



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Никола М. Шобот

**Утицај Миноциклина на
исхемијско/реперфузиону повреду
изолованог срца хипертензивних и
дијабетичних пацова**

докторска дисертација

Крагујевац, 2022. године



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Nikola M. Šobot

**Uticaj minociklina na ishemijsko/reperfuzionu
povredu izolovanog srca hipertenzivnih i
dijabetičnih pacova**

doktorska disertacija

Kragujevac, 2022.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Nikola M. Sobot

**Effect of minocycline on ischemic/reperfusion
injury of isolated heart of hypertensive and
diabetic rats**

doctoral dissertation

Kragujevac, 2022.

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

| |
|---|
| <i>Аутор</i> |
| Име и презиме: Никола Шобот |
| Датум и место рођења: 28.03.1982. године, Бања Лука, Република Српска, Босна и Херцеговина |
| Садашње запослење: Специјалиста кардиохирургије, Клиника за кардиохирургију, Универзитетски клинички центар Републике Српске, Бања Лука, Република Српска, Босна и Херцеговина |
| |
| <i>Докторска дисертација</i> |
| Наслов: Утицај миноциклина на исхемијско/реперфузиону повреду изолованог срца хипертензивних и дијабетичних пацова |
| Број страница: 113 |
| Број слика: 13 слика, 4 табеле, 83 графика |
| Број библиографских података: 145 |
| Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац |
| Научна област (УДК): медицина |
| Ментор: Проф. др Владимир Јаковљевић |
| |
| <i>Оцена и одбрана</i> |
| Датум пријаве теме: 03.07.2020. |
| Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: бр. IV-03-830/8 од 18.11.2020. |
| Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: <ol style="list-style-type: none">Доц. др Тамара Николић Турнић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка фармација, председник;Доц. др Иван Срејовић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан;Проф. др Ненад Понорац, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци за ужу научну област Физиологија, члан. |
| Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације: <ol style="list-style-type: none"> |
| Датум одбране дисертације: |

IDENTIFIKACIONA STRANICA DOKTORSKE DISERTACIJE

| |
|---|
| <i>Autor</i> |
| Ime i prezime: Nikola Šobot |
| Datum i mesto rođenja: 28.03.1982. godine, Banja Luka, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina |
| Sadašnje zaposlenje: Specijalista kardiohirurgije, Klinika za kardiohirurgiju, Univerzitetski klinički centar Republike Srpske, Banja Luka, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina |
| |
| <i>Doktorska disertacija</i> |
| Naslov: Uticaj minociklina na ishemijsko/reperfuzionu povredu izolovanog srca hipertenzivnih i dijabetesnih pacova |
| Broj stranica: 113 |
| Broj slika: 13 slika, 4 tabele, 83 grafika |
| Broj bibliografskih podataka: 145 |
| Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac |
| Naučna oblast (UDK): medicina |
| Mentor: Prof. dr Vladimir Jakovljević |
| |
| <i>Ocena i odbrana</i> |
| Datum prijave teme: 03.07.2020. |
| Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske/umetničke disertacije: br. IV-03-830/8 od 18.11.2020. |
| Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata: <ol style="list-style-type: none">1. Doc. dr Tamara Nikolić Turnić, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Klinička farmacija, predsednik;2. Doc. dr Ivan Srejšević, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Fiziologija, član;3. Prof. dr Nenad Ponorac, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci za užu naučnu oblast Fiziologija, član. |
| Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije: <ol style="list-style-type: none">1.2.3. |
| |
| Datum odbrane disertacije: |

DOCTORAL DISSERTATION IDENTIFICATION PAGE

| <i>Author</i> |
|---|
| Name and surname: Nikola Sobot |
| Date and place of birth: 28.03.1982., Banja Luka, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina |
| Current employment: Cardiac Surgery Specialist, Cardiac Surgery Clinic, University Clinical Center of Republika Srpska, Banja Luka, Republika Srpska, Bosnia and Herzegovina |
| |
| <i>Doctoral Dissertation</i> |
| Title: Effect of minocycline on ischemic/reperfusion injury of isolated heart of hypertensive and diabetic rats |
| No. of pages: 113 |
| No. of images: 13 images, 4 tables, 83 graphs |
| No. of bibliographic data: 145 |
| Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac |
| Scientific area (UDK): medicine |
| Mentor: Prof. Vladimir Jakovljevic |
| <i>Grade and Dissertation Defense</i> |
| Topic Application Date: 03.07.2020. |
| Decision number and date of acceptance of the doctoral/artistic dissertation topic: No. IV-03-830/8 from 18.11.2020. |
| Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: <ol style="list-style-type: none">1. Prof. dr Tamara Nikolic Turnic, Assistant professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Clinical pharmacy, president;2. Prof. dr Ivan Srejovic, Assistant Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Physiology, member;3. Prof. dr Nenad Ponorac, Associate Professor at the Faculty of Medicine, University of Banja Luka, Physiology, member. |
| Commission for evaluation and defense of the doctoral dissertation: <ol style="list-style-type: none">1.2.3. |
| |
| Date of Dissertation Defense: |

Сажетак

Увод: Коронарна болест артерија је једна од најчешћих болести срца и главни је узрок оболевања и смртности широм света. Оштећење ткива миокарда у акутном инфаркту миокарда настаје управо због артеријске оклузије која узрокује исхемију док накнадно успостављање поновног протока крви може да резултира реперфузијском повредом. У фармаколошкој терапији и превенцији исхемијско/реперфузионе повреде током претходне две деценије учињено је много напора како би се пронашао што ефикаснији агенс који би могао да умањи морфолошка и функционална оштећења миокарда након исхемије и реперфузије. Позитивни плејотропни ефекти миноциклина приписују се различитим механизмима укључујући антиинфламацијско, антиоксидационо и антиапоптозоно дејство, као и инхибиција металопротеиназа.

Циљ: Испитивање ефеката прекондиционарања и посткондиционарања миноциклином на функционални и морфолошки опоравак срца пацова након исхемијско/реперфузионе повреде миокарда са посебним освртом на услове дијабетеса типа 2 и хипертензије.

Метод: Истраживање је обухватило 72 пацова мушког пола (Wistar albino сој, телесне масе 250 ± 20 g, старости 8 недеља). Пацови су сврстани у групе на основу присуства дијабетеса типа 2 или хипертензије као и на основу неког од типа кондиционарања миноциклином: прекондиционарање миноциклином у дози од $1 \mu\text{M}$ или посткондиционарање миноциклином у истој дози. Дијабетес тип 2 индукован је применом исхране богате мастима и стрептозотоцина у дози од 25 mg/kg телесне масе. За експериментални модел хипертензије користили су се спонтанно-хипертензивни пацови. Изолована срца су перфундована методом ретроградне перфузије по Лангендорфу. За исхемију је употребљен модел глобалне исхемије у трајању од 20 минута којој следи реперфузија у трајању од 30 минута. Вредности коронарног протока су одређиване флоуметријски, а параметри функције леве коморе ($dp/dt \text{ max}$, $dp/dt \text{ min}$, SLVP, DLVP и HR) су континуирано праћени. У узорцима коронарног венског ефлуента срца пацова спектрофотометријским методама су одређивани параметри оксидационог стреса, а стандардном хистолошком анализом испитиване су промене на срцу.

Резултати: Резултати овог истраживања указују на несумњиве протективне ефекте миноциклина у условима експериментално индуковане исхемије и реперфузије како на срцима пацова са индукованим дијабетесом типа 2, тако и на срцима спонтанно хипертензивних пацова. Анализом добијених резултата који се односе на динамику продукције биомаркера оксидационог стреса изводи се закључак да антиоксидациони потенцијал миноциклина и редуција оксидационог оштећења свакако чини важан, ако не и кључни механизам протективног дејства миноциклина.

Кључне речи: миноциклин, исхемија, реперфузија, дијабетес тип 2, хипертензија, оксидациони стрес

Abstract

Introduction: Coronary artery disease is one of the most common heart diseases and is the leading cause of morbidity and mortality worldwide. Myocardial damage in acute myocardial infarction occurs due to arterial occlusion that causes ischemia, while subsequent re-establishment of blood flow can result in reperfusion injury. Much effort has been made in pharmacological therapy and prevention of ischemic/reperfusion injury over the past two decades to find the most effective agent that could reduce morphological and functional myocardial damage after ischemia and reperfusion. The positive pleiotropic effects of minocycline are attributed to various mechanisms including anti-inflammatory, antioxidant and antiapoptotic effects, as well as inhibition of metalloproteinases.

Objective: Investigation of the effects of preconditioning and postconditioning with minocycline on functional and morphological recovery of rat heart after ischemic/reperfusion myocardial injury with special attention to conditions of type 2 diabetes and hypertension.

Methods: The study included 72 male rats (Wistar albino strain, body weight 250 ± 20 g, age 8 weeks). Rats were classified into groups based on the presence of type 2 diabetes or hypertension as well as on one of the types of minocycline conditioning: preconditioning with minocycline at a dose of $1 \mu\text{M}$ or postconditioning with minocycline at the same dose. Type 2 diabetes was induced by a high-fat diet and streptozotocin at a dose of 25 mg/kg body weight. Spontaneously-hypertensive rats were used for the experimental model of hypertension. Isolated hearts were perfused by retrograde Langendorff perfusion. For ischemia, a 20-minute model of global ischemia was used, followed by a 30-minute reperfusion. Coronary flow values were determined fluometrically, and left ventricular function parameters (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP and HR) were continuously monitored. In the coronary venous effluent samples of rat heart, oxidative stress parameters were determined by spectrophotometric methods, and changes in the heart were examined by standard histological analysis.

Results: The results of this study indicate the undoubted protective effects of minocycline in conditions of experimentally induced ischemia and reperfusion in the hearts of rats with induced type 2 diabetes and in the hearts of spontaneously hypertensive rats. The analysis of the obtained results related to the dynamics of production of biomarkers of oxidative stress leads to the conclusion that the antioxidant potential of minocycline and reduction of oxidative damage certainly makes important, if not the key mechanism of protective action of minocycline.

Key words: minocycline, ischemia, reperfusion, type 2 diabetes, hypertension, oxidative stress

САДРЖАЈ:

| | |
|---|----|
| I УВОД..... | 1 |
| 1. Физиологија коронарне циркулације..... | 2 |
| 1.1. Регулација коронарног протока..... | 2 |
| 1.2. Ишемијско-реперфузиона повреда..... | 3 |
| 1.2.2 Улога оксидационог стреса у И/Р повреди..... | 6 |
| 1.3. Феномен прекондиционарања..... | 6 |
| 1.3.1 Фармаколошко прекондиционарање..... | 8 |
| 1.3.2 Улога миноциклина у И/Р повреди..... | 8 |
| 1.4. Тетрациклини..... | 9 |
| 1.4.1. Механизам дејства тетрациклина..... | 9 |
| 1.4.2. Миноциклин..... | 10 |
| 1.4.3. Биолошки ефекти миноциклина..... | 12 |
| 1.4.4. Дозирање миноциклина..... | 13 |
| 1.4.5. Нежељена дејства миноциклина..... | 13 |
| 1.4.6. Интеракције миноциклина са другим лековима..... | 14 |
| 1.4.7. Механизам резистенције на миноциклин..... | 16 |
| II ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ..... | 18 |
| ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ..... | 19 |
| ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ..... | 19 |
| III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ..... | 20 |
| 3.1. МАТЕРИЈАЛ..... | 21 |
| 3.1.1. Супстанце за припремање Крепс-Хенселејтовог (<i>Krebs-Hensenleit</i>) раствора..... | 21 |
| 3.1.2. Супстанце употребљене за одређивање индекса липидне пероксидације..... | 21 |
| 3.1.4. Супстанце употребљене за одређивање супероксид анјон радикала (O_2^-) у коронарном венском ефлуенту..... | 21 |
| 3.1.5. Супстанце употребљене за одређивање водоник пероксида (H_2O_2) у коронарном венском ефлуенту..... | 21 |
| 3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛ..... | 22 |
| 3.2.1. Основе Лангендорфове технике ретроградне перфузије изолованог срца сисара..... | 22 |
| 3.2.2. Особине Лангендорфовог апарата коришћеног у овом истраживању..... | 23 |
| 3.2.3. Крепс-Хенселејтов перфузиони раствор..... | 25 |
| 3.3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ..... | 26 |
| 3.3.1. Експериментални <i>ex vivo</i> протокол ишемије и реперфузије, прекондиционарања и посткондиционарања..... | 27 |

| | |
|---|----|
| 3.3.2. Експериментални протокол са прекондиционарањем | 28 |
| 3.3.3. Експериментални протокол са посткондиционарањем | 29 |
| 3.3.4. Експерименталне групе | 30 |
| 3.4. ИНДУКЦИЈА ДИЈАБЕТЕСА ТИПА 2 | 30 |
| 3.5. БИОХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ..... | 30 |
| 3.5.1 Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS) | 31 |
| 3.5.2. Одређивање нитрита..... | 31 |
| 3.5.3. Одређивање супероксид ањон радикала | 32 |
| 3.5.4. Одређивање водоник пероксида..... | 32 |
| 3.5.5. Одређивање гликемије | 33 |
| 3.6. МЈЕРЕЊЕ КРВНОГ ПРИТИСКА | 33 |
| 3.7. ХИСТО-МОРФОЛОШКА АНАЛИЗА ТКИВА МИОКАРДА | 33 |
| 3.8. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА | 33 |
| IV РЕЗУЛТАТИ | 35 |
| 4.1. Вриједности гликемије и инсулинемије пацова са дијабетесом типа 2 | 36 |
| 4.2. Ефекти прекондиционарања миноциклином на кардиодинамске параметре срца пацова са дијабетесом типа 2..... | 37 |
| 4.3. Ефекти посткондиционарања миноциклином на кардиодинамске параметре срца пацова са дијабетесом типа 2..... | 45 |
| 4.4. Ефекти прекондиционарања миноциклином на биомаркере оксидационог стреса у коронарном венском ефуленту срца пацова са дијабетесом типа 2 | 53 |
| 4.5. Ефекти посткондиционарања миноциклином на биомаркере оксидационог стреса у коронарном венском ефуленту срца пацова са дијабетесом типа 2..... | 58 |
| 4.6. Патохистолошка евалуација миокарда здравих и миокарда пацова са дијабетесом типа 2, пре и посткондиционираних миноциклином и физиолошким раствором | 63 |
| 4.7. Вриједности артеријског крвног притиска нормотензивних и хипертензивних пацова..... | 65 |
| 4.8. Ефекти прекондиционарања миноциклином на кардиодинамске параметре срца пацова са хипертензијом | 66 |
| 4.9. Ефекти посткондиционарања миноциклином на кардиодинамске параметре срца пацова са хипертензијом | 73 |
| 4.10. Ефекти прекондиционарања миноциклином на биомаркере оксидационог стреса у коронарном венском ефуленту срца хипертензивних пацова | 81 |
| 4.11. Ефекти посткондиционарања миноциклином на биомаркере оксидационог стреса у коронарном венском ефуленту срца хипертензивних пацова | 86 |
| 4.12. Патохистолошка евалуација миокарда здравих и миокарда пацова са хипертензијом, пре и посткондиционираних миноциклином и физиолошким раствором..... | 91 |
| V ДИСКУСИЈА..... | 94 |

| | |
|---|-----|
| 5.1. Ефекти прекондиционарања и посткондиционарања миноциклином на функцију дијабетичних срца..... | 96 |
| 5.2. Ефекти прекондиционарања и посткондиционарања миноциклином на биомаркере оксидационог стреса | 100 |
| VI <u>ЗАКЉУЧЦИ</u> | 102 |
| VII <u>ЛИТЕРАТУРА</u> | 104 |

I

УВОД

1. Физиологија коронарне циркулације

Још почетком XVIII вијека француски анатом *Raimond de Vieussens* дао је први опис крвних судова срца, што је значајно олакшало спровођење даљих истраживања и разумевање анатомије коронарне циркулације (1).

Срце посједује јединствен циркулацијски систем, односно снабдева се крвљу преко епикардијалних коронарних артерија које се дијеле и продиру у миокард. Двије главне коронарне артерије срца, лијева и десна, полазе из коронарних ушћа унутар Валсалвиних синуса. Стабло лијеве главне коронарне артерије полази из лијевог задњег аортног синуса и грана се на лијеву предње силазну и циркумфлексну коронарну артерију. Ове двије велике епикардијалне коронарне артерије заслужне су за највећи удио васкуларизације лијеве коморе. И то, циркумфлексна коронарна артерија исхрањује лијеву преткомору и латерални зид лијеве коморе, док лијева предње силазна коронарна артерија даје бројне дијагоналне и септалне гране које исхрањују предњи зид лијеве коморе, као и предњи део лијеве гране Хисовог снопа, средњи дио десне гране Хисовог снопа и предњи дио септума. Стабло десне коронарне артерије полази из предњег аортног синуса и на свом путу даје бројне маргиналне гране исхрањујући десну преткомору и комору (2).

Срчани циклус као појам, први пут је поменут од стране *Wiggers*-а 1915. године (3), док је 5 година касније комплетне догађаје у срчаном циклусу описао *Lewis* (4). Срчани циклус представља један цјелокупни откуцај срца, тј. контракцију (систола) и релаксацију (дијастола).

У физиолошком смислу, срце се може посматрати као двострука мишићна пумпа која прима деоксигенисану крв из цијелог организма, а потом је, након оксигенације у плућима, пумпа до свих ткива и органа. Имајући у виду свакодневни учинак и ефикасност срчаног мишића, адекватна снабдевеност крвљу овог органа од пресудног је значаја за његово нормално функционисање. Посебно специјализована циркулација, коронарна циркулација, задужена је за снабдевање миокарда кисеоником и супстратима неопходним за обезбјеђивање нормалне функције и одрживости срца.

Одговарајући проток крви кроз коронарне крвне судове неопходан је да би се очувао интегритет ткива срчаног мишића. У физиолошким условима, срчана циркулација чини 5-10% минутног волумена срца, тј. око 250-300 ml крви прође кроз крвне судове срца током једног минута. Управо овај волумен крви представља коронарни проток, који се доминантно одвија током дијастоле. Током мировања, срце екстрахује 60% до 70% кисеоника из крви у коронарним артеријама (5), што указује на високу метаболичку активност срчаног мишића и значај повећања укупног протока кроз срце током повећаних потреба миокарда за кисеоником (6). Дакле, коронарни васкуларни тонус мора бити константно прилагођен обезбјеђивању адекватне перфузије миокарда, односно повећане потребе за кисеоником могу се примарно постићи повећањем коронарног протока, који се у условима физичке активности може повећати чак 4-7 пута (7).

1.1. Регулација коронарног протока

У регулацији коронарне циркулације укључени су многобројни механизми као што су екстраваскуларне компресивне силе, коронарни перфузиони притисак, миогени, локални метаболички, ендотелни као и нервни и хормонски фактори. Свеукупни учинак ових механизма огледа се у управљању коронарним протоком у циљу обезбјеђивања баланса између снабдевања миокарда кисеоником и метаболичких потреба (2).

Обзиром да је аортни притисак главни фактор одговоран за перфузију миокарда, промјене овог параметра посљедично доводе до промјена у коронарном протоку. Способност ткива да регулише сопствени проток крви назива се *ауторегулација*. Када је у питању ауторегулације срчаног мишића, постоје двије теорије које објашњавају овај феномен. *Миогена теорија ауторегулације* говори у прилог томе да дио васкуларне мреже има способност да промјенама у васкуларном отпору компензује промјене перфузионог притиска, тиме одржавајући проток релативно константним. Са друге стране, *метаболичка теорија ауторегулације* подржава учешће вазодилататорних супстанци у процесу ауторегулације. Наиме, при смањењу протока ове супстанце се нагомилавају, док се при повећању протока исте уклањају из тог одељка циркулације. (8, 9).

Коронарни проток може бити нарушен током многобројних патофизиолошки стања. Нагомилавање липида, пролиферација глатких мишића и дисфункција ендотела смањује пречник лумена крвних судова, све до појаве критичне стенозе при којој коронарни проток крви није у стању да реагује на повећање метаболичких потреба (обично када је дијаметар сужен за 50 %). Нарушен проток током мировања дешава се при смањењу дијаметра крвног суда за 80 % (10).

1.2. Ишемијско-реперфузиона повреда

Коронарна болест артерија (КБА) једна је од најчешћих кардиоваскуларних (КВ) болести и представља водећи узрок смртности и инвалидитета широм свијета. Захваљујући великим напорима научног друштва, разумјевање саме патофизиологије овог обољења доживјело је значајну еволуцију посљедњих деценија. Главни патофизиолошки процес у развоју КБА јесте атеросклероза, инфламаторна болест артерија (11), која се карактерише нарушеном функцијом ендотела, ниским степеном инфламације, нагомилавањем липида и формирањем плака у интими зидова крвних судова (12). Руптура или ерозија атеросклеротског плака резултира суперпонираном атеротромбозом и накнадном оклузијом крвних судова, што може узроковати инфаркт миокарда и КВ смрт (13). Прекид протока крви кроз срчани мишић узрокује дисбаланс између снабдевања и потреба миокарда за кисеоником, односно ишемије која резултира оштећењем и дисфункцијом срчаног ткива (14).

Први пут употребљен почетком XIX века, појам ишемија (грчки *isch-* рестрикција и *haema* - крв) односи се на неадекватно снабдевање ткива крвљу, узроковано смањеним или опструираним приливом артеријске крви. Последњих деценија развијане су различите терапијске стратегије ради умањења штетних ефеката ишемије на метаболизам и контрактилност миокарда. Последице КБА се најчешће везују за штетне ефекта настале услед акутне ишемијско-реперфузионе повреде миокарда, која се обично јавља код пацијената са акутним инфарктом миокарда са елевацијом СТ сегмента (15). Стога је тренутна најефикаснија терапијска стратегија код ових пацијената, благовремено успостављање протока крви кроз ишемична подручја и смањење величине инфаркта применом тромболитичке терапије или примарне перкутане коронарне интервенције. Међутим, познато је да реперфузија, премда неопходна за поновно успостављање снабдевања ткива кисеоником и хранљивим материјама, може покренути низ патофизиолошких процеса који погоршавају ефекте ишемије, узрокујући и повреде ткива у удаљеним органима услед ослобађања медијатора у крвоток реваскуларизованог ткива (16).

1.2.1. Патофизиолошки механизми исхемијско-реперфузионе повреде миокарда

Познато је да продужена исхемија узрокује читав спектар метаболичких и ултраструктурних промена у ћелији. Важно је напоменути да у овим околностима долази до смањена ћелијске оксидативне фосфорилације, инхибира се активност Na^+/K^+ АТР-азе услед чега је онемогућена синтеза једињења богатих енергијом, аденозин 5'-трифосфата (АТР) и фосфокреатина. Такође, у условима исхемије долази до катаболизма аденина и следственог нагомилавања хипоксантина у ћелијама, који се претварају у токсичне реактивне кисеоничне врсте (ROS) (24). При недостатку кисеоника процес ћелијског метаболизма почиње да се ослања на анаеробну гликолизу са нагомилавањем лактата, доводећи до смањења унутарћелијске рН вриједности ($<7,0$). Прекомјерено нагомилавање H^+ јона унутар ћелије активира Na^+/H^+ пумпу, која тежи да избаци што већу количину H^+ јона из ћелије у замјену за повећан улазак Na^+ јона унутар ћелије. Са друге стране, услед недостатка АТР-а нарушава се активност Na^+/K^+ АТР-азе, погоршава се интрацелуларно преоптерећење Na^+ јонима, као и интрацелуларно преоптерећење Ca^{2+} (15).

Опште је познато да правовремена реперфузија миокарда представља суштински моменат у очувању одрживог срчаног ткива, смањењу величине инфаркта, очувању систолне функције лијеве коморе и спречавању развоја срчане инсуфицијенције. Међутим, реперфузија *per se* може изазвати смрт кардиомиоцита. Реперфузиона повреда срца је парадоксално стање које настаје услед поновног успостављања протока кроз исхемично ткиво (15). Различити патофизиолошки механизми посредују у настајању патофизиолошке повреде: акумилација јона (H^+ и Ca^{2+} , пре свега), продукција реактивних врста кисеоника (енг. *Reactive Oxygen Species* – ROS) и посљедишно оксидационо оштећење, оштећење митохондрија и поремећај у синтези АТР, неадекватна синтеза азот монооксида (NO), ендотелна дисфункција, активација имунског система, агрегација тромбоцита и индукција апоптозе и аутофагије (16). Као посљедица наведених патолошких промена у миокарду могу да настану различити патолошки ентитети (16):

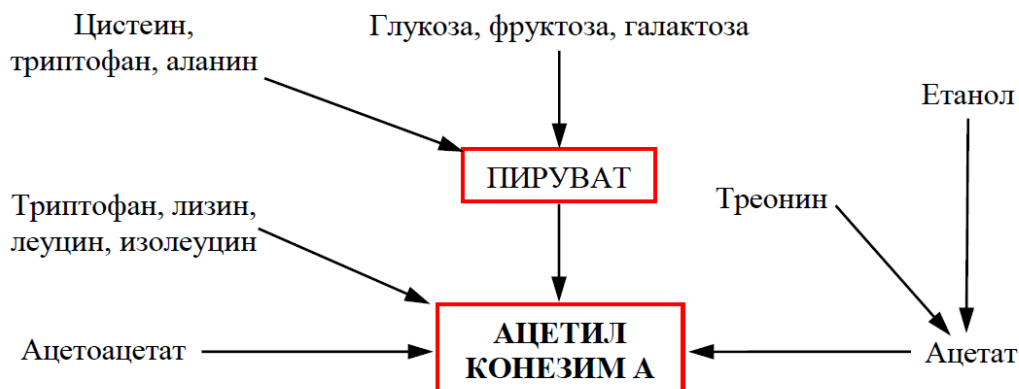
1. аритмије изазване реперфузијом - нагла реперфузија пацијената са STEMI може да узрокује коморске аритмије, које се најчешће спонтано губе или се релативно лако лијече (16,17).
2. „Ошамућеност“ миокарда (енг. *myocardial stunning*) – стање реверзибилне постисхемијске контрактниле дисфункције миокарда које настаје као посљедица оштећења насталог дјеловањем оксидационог стреса и прекомјерног накупљања Ca^{2+} (16,18,19).
3. Микроваскуларна опструкција – оштећење капилара које се манифестује поремећеном вазодилатацијом капилара, компресијом капилара ендотелним ћелијама, бубрењем кардиомиоцита, микроемболизацијом капилара садржајем који се ослобађа из атеросклеротских плакова, стварање микротромбова, ослобађање вазомоторних и тромбогених супстанци (16,20). Микроваскуларна опструкција, која настаје током реперфузије, узрокује захватање веће масе ткива инфарктом, мању ејекциону фракцију лијеве коморе, већи степен ремоделовања лијеве коморе и већи проценат нежељеног исхода лечења (21).
4. Летално реперфузионо оштећење миокарда – смрт кардиомиоцита које је изазвано реперфузијом а који су били вијабилни на крају периода исхемије (22). Најзначајнији фактори који доприносе настајању леталног реперфузионог оштећења миокарда укључују оксидациони стрес, накупљање Ca^{2+} , отварање митохондријских пермеабилizacionих пора (енг. *mitochondrial permeability transition pore* – МРТР) и хиперконтрактура (23).

1.2.2. Механизми који посредују у настајању исхемијско/реперфузионог оштећења миокарда

Акутни инфаркт миокарда настаје као последица оклузије коронарне артерије, услед чега настаје исхемија, а по успостављању протока настаје реперфузионо оштећење. Исхемија миокарда, настала као последица драстичног смањења протока кроз једну или више коронарних артерија, за последицу има смањење доступности кисеоника а самим тим и поремећај оксидационог метаболизма масних киселина, глукозе, пирувата и лактата (24). Поремећај оксидационог метаболизма за последицу има смањење митохондријске респирације, оксидативне фосфорилације и продукције АТФ (25, 26). Недостатак кисеоника узрокује помјерање метаболизма ка анаеробној гликолизи, што за последицу има повећање продукције лактата, а самим тим и смањење рН унутар ћелије (24, 27). Услед недостатка кисеоника прекида се β -оксидација масних киселина, и недовољно разграђени продукти масти се накупљају у цитоплазми кардиомиоцита (28). Као резултанта наведених метаболичких поремећаја услед недостатка кисеоника настаје недостатак АТФ и изумирање кардиомиоцита. Недовољна количина АТФ узрокује неадекватну функцију АТФ-аза у мембрани кардиомиоцита, а самим тим и поремећај у концентрацији појединих јона. Инсуфицијентна активност Ca^{2+} АТФ-азе за последицу има накупљање Ca^{2+} у цитоплазми и поремећај сигналних путева у којима учествује Ca^{2+} , смањење контрактилности миокарда и поремећај функције срца (24).

Метаболичке промјене у миокарду фаворизује и стимулација симпатичког дијела аутономног нервног система услед накупљања катехоламина. Катехоламини стимулишу разградњу триглицерида у адипоцитима и повећање концентрације масних киселина у плазми (28).

Смањење метаболизма у митохондријама највећим дијелом настаје као последица недостатка кисеоника, као крајњег примаоца електрона. Недостатак интермедијерних продуката Кребсовог циклуса и слободног ацетил-конензим А током исхемије додатно лимитира метаболизам митохондрија. Услед смањене метаболичке активности митохондрија нагомилава се сукцинат (међупродукт Кребсовог циклуса) и ацилкарнитини и ацил-конензим А (међупродукти метаболизма масних киселина). Сматра се да је нагомилавање сукцината универзални „метаболички“ знак исхемије и да је управо прекомјерно накупљање сукцината узрок повећања продукције реактивних врста кисеоника (енг. *Reactive Oxygen Species* - ROS) у митохондријама током реперфузије (29).



Слика 1.1. Ацетил-конензим А је кључни међупроизвод у катаболизму и продукцији енергијом богатих једињења.

Оксидациони стрес представља једну од кључних детерминанти у настајању исхемијско/реперфузионог оштећења миокарда. Непосредно након успостављања поновног протока кроз исхемично ткиво настаје нагла продукција реактивних врста – *оксидациони прасак* (30, 31). Оксидационо оштећење и оксидациони стрес узрокују оштећење миокарда и изумирање кардиомиоцита кроз више сигналних путева и каскада. Међутим, покушај редукације оксидационог стреса применом различитих антиоксиданаса није дао очекиване резултате у заштити миокарда током реперфузије. Наиме, резултати различитих истраживања дају донекле контрадикторне резултате у погледу појединих антиоксиданаса. Узрок оваквих резултата антиоксидантне терапије током реперфузије може да буде промена својстава ћелијске и митохондријске мембране и смањена пермеабилност за антиоксидансе (32).

1.2.2 Улога оксидационог стреса у И/Р повреди

Оксидативни стрес јавља се као последица дисбаланса између производње ROS и антиоксидативног одбрамбеног система, тако да овај други бива надвладан (33). У ROS се убрајају водоник пероксид (H_2O_2), супероксид анјон радикал ($O_2^{\cdot-}$), хидроксил радикал (OH^{\cdot}), хипохлорна киселина ($HOCl$) и водоник пероксид (H_2O_2) и пероксинитрит из азот монооксида.

Реактивне врсте кисеоника и азота (ROS/RNS) сматрају се једним од главних иницијатора И/Р повреде. Метаболичке промјене узроковане исхемијом, као и поремећена хомеостаза митохондрија сматра се да доприносе прекомјереном ослобађању ROS/RNS током поновног успостављања протока крви у ткиву, који заузврат могу надвладати антиоксидациони систем узрокујући оксидационо оштећење, као и секундарно покретање проинфламаторног одговора (34, 35). Сматра се да у овим околностима повећана производња ROS настаје услед активације ксантин оксидазе у ендотелним ћелијама, реакције ланца преноса електрона у митохондријама кардиомиоцита и никотинамид аденин динуклеотид фосфат (NADPH) оксидазе (36). ROS покрећу низ ензимских реакција које доводе до оксидационог оштећења ћелијских мембрана, као и стварања токсичних метаболита и оштећења ћелија, укључујући и штетне ефекте на ДНК, протеине и липиде (37).

1.3. Феномен прекондиционарања

И/Р повреда миокарда први пут је описана 1960. године од стране *Jennings*-а и коаутора, на анималном моделу коронарне лигације (38). Том приликом је показано да реперфузија убрзава развој некрозе, обзиром да хистолошке промјене након 30-60 минута И/Р одговарају степену некрозе која се нормално развија након 24 сата перманентне коронарне оклузије (38). Након ових иницијалних запажања усљедило је откриће исхемијског прекондиционарања.

Појам исхемијско прекондиционарање први пут је описан у студији *Murry*-ја и *Jennings*-а 1986. године (39). Поменути аутори су показали да срчани мишић паса код којих је изазвана потпуна оклузија коронарне артерије може бити заштићен претходном применом серије краткотрајних периода оклузије коронарне артерије, 4 пута по 5 минута са периодима реперфузије од по 5 минута. У групи животиња код којих је примјењено исхемијско прекондиционарање величина инфаркта изазвана оклузијом коронарне артерије била је за 75% мања у односу на контролну групу (39). Студије које су усљедиле потврдиле су да исхемијско прекондиционарање смањује величину инфаркта код паса (40, 41), свиња (42), зечева (43), пацова (44) и људи (45, 46).

Према томе, одговор на исхемију је бимодалан, односно дужи периоди исхемије доводе до дисфункције и/или смрти ћелије која је погоршана реперфузијом, док краткотрајни периоди исхемије штите ткиво, чинећи га отпорнијим на штетне ефекте дуготрајне исхемије праћене реперфузијом.

Прецизан механизам одговоран за феномен прекондиционарања још увјек није у потпуности разјашњен, мада резултати бројних студија указују на постојање неколико потенцијалних окидача исхемијског прекондиционарања, као што су аденозин, брадикинин, простагландини, NO и јони Ca^{2+} (47), који активирају интрацелуларне сигналне путеве задужене за заштиту кардиомиоцита од повреде (48).

Сматра се да аденозин игра важну улогу у обезбеђивању кардиопротективног ефекта током исхемијског прекондиционарања и то преко функционалних аденозинских А3 рецептора који су уочени у кардиомиоцитима. Иако активација и А1 и А3 рецептора може пружити заштитни ефекат током исхемијског прекондиционарања, А3 рецептори могу обезбедити дуготрајнију кардиопротекцију (49).

У циљу бољег разумевања сигналне каскаде исхемијског прекондиционарања, сам процес прекондиционарања може се посматрати кроз две фазе:

I фаза – догађа се током прве епизоде исхемије кратког трајања

II фаза – испољавање кардиопротекције током друге продужене епизоде исхемије

Ослобађање аденозина и активација његових рецептора одговорни су за покретање, али и за кардиопротективни ефекат исхемијског прекондиционарања. Такође, постоје докази о улози фосфолипазе C или D, протеин киназе C и АТР-осетљивих калијумових канала у обје поменуте фазе (49).

1.3.1 Фармаколошко прекондиционирање

Показано је да у анималним моделима различити фармаколошки агенси могу опонашати ефекте сличне прекондиционирању, што би значајно допријело обезбјеђивању кардиопротекције код људи, на начин свакако сигурнији од примјене исхемије. Уочено је да улогу у фармаколошком прекондиционирању могу имати аденозински рецептори, протеин киназа С и митохондријски АТФ-осетљиви калијумски канали (50).

Интересантно је да испарљиви анестетици могу развити ефекат акутне кардиопротективне меморије који перзистира и након њиховог уклањања. Додатне студије су указале на то да испарљиви анестетици изазивају прекондиционирање миокарда и то механизмом сличним у исхемијском прекондиционирању, мада њихова предност је очигледна, обзиром да не захтевају исхемију при испољавању овог ефекта (51). Са друге стране, уочено је да примјена дексмететомидина, високо селективног агонисте α_2 -адренергичких рецептора, у стању глобалне исхемије испољава заштитно дејство умањујући оштећење миокарда и то активацијом протеин киназе *Akt* и *Erk1/2* као и *eNOS* чиме се смањује величина инфаркта након И/Р повреде (52).

У фармаколошкој терапији и превенцији И/Р је током претходне двије деценије уложено је много напора у циљу проналажења што ефикаснијег агенса који би могао да умањи морфолошка и функционална оштећења миокарда након исхемије и реперфузије. Иако је проучаван велики број љековитих супстанци, још увек је мало остварено у смислу постизања поменутог циља. Међу проучаваним агенсима последњих година су се издвојили антибиотици (53) као потенцијално дјелотворни кардиопротективни фармацеутици са доминантно обећавајућим ефектима из групе тетрациклина (54, 55). Последњих година показани су цитопротективни ефекти миноциклина, тетрациклина друге генерације (56). Из тог разлога уследила су бројна истраживања цитопротективне активности миноциклина код неуролошких пацијената, док у најскоријем периоду испитивање његовог кардиопротективног потенцијала поприма огромно интересовање у научним круговима.

1.3.2 Улога миноциклина у И/Р повреди

Прва велика експериментална студија која је указала на ефикасност миноциклина у И/Р повреди миокарда обухватала је 3 нивоа истраживања: *in vitro* (примарне културе неонаталних и одраслих кардиомиоцита), *ex vivo* (интракардијална апликација у изоловано срце пацова), и *in vivo* (тродневна примјена миноциклина код пацова). Резултати ове студије су указали на кардиопротективно дејство миноциклина, у смислу смањења некротичне и апоптотске ћелијске смрти неонаталних и одраслих кардиомиоцита, мада током *ex vivo* и *in vivo* испитивања, значајан позитиван ефекат на хемодинамику није уочен (57).

Након пар година, *Romero-Perez* и коаутори показали су кардиопротективне ефекте миноциклина на *in vivo* моделу пацова, који су били подвргнути исхемији од 45 минута, а потом реперфузији од 48 сати. Третман миноциклином, започет 2 дана прије и настављен 2 дана након торакотомије довео је до значајног смањења величине инфарктног подручја у односу на контролну групу и то за око 33% (58). Такође, сматра се да примена миноциклина може дјеловати повољно на аспекте реперфузионе повреде миокарда, укључујући аритмије изазване реперфузијом и стање ошамућеног миокарда (57).

Обзиром на досадашње резултате студија са миноциклином, неопходна су даља претклиничка истраживања ради прецизнијег утврђивања протективних ефеката

миноциклина, и то не само на здравим животињама, већ и на моделу дијабетес мелитуса тип 2 и хипертензије који умногоме доприносе развоју коронарне болести срца.

1.4. Тетрациклини

Тетрациклини су антибиотици природног порекла добијени поступцима ферментације из *Streptomyces* врста или хемијским трансформацијама природних молекула. Међу најважнијим антибиотцима широког спектра дејства управо се налазе тетрациклини, их бибирајући раст аеробних и анаеробних грам-позитивних, грам-негативних бактерија, рикеција и хламидија. Углавном испољавају бактериостатички ефекат док у вишим концентрацијама могу дјеловати и бактерицидно (59, 60). Природни тетрациклини, откривени још давне 1940. године, се историјски гледано могу сматрати првом генерацијом ове групе лијекова чији су представници хлортетрациклин, окситетрациклин и тетрациклин, по коме је ова група антибактеријских лијекова и добила име (61). Упркос изузетном терапијском успјеху раних тетрациклина, модификацијом природних једињења и синтезом нових унутар добијени су аналози са бољим фармакокинетичким особинама, мањим степеном токсичности и ширим антибактеријским спектром дејства. Ову групу једињења чине полусинтетски тетрациклини који припадају другој генерацији чији су представници метациклин, доксициклин, миноциклин, демеклоциклин, лимециклин и ролитетрациклин (62, 63). Међутим, све учесталија појава бактеријске резистенције на претходне две генерације тетрациклина привукла је пажњу научника ка дизајну нове групе једињења. Тако су крајем 1980. године добијени тетрациклини треће генерације називајући се још и глицилциклинима или синтетским тетрациклинима, чији је главни представник тигециклин као синтетски дериват миноциклина (59).

Табела 1.1. Тетрациклини - подјела по генерацијама

| Генерација | Метод добијања | Представници групе |
|------------|----------------|--|
| Прва | Биосинтетски | хлортетрациклин, окситетрациклин, тетрациклин |
| Друга | Полусинтетски | метациклин, доксициклин, МИНОЦИКЛИН , демеклоциклин, лимециклин ролитетрациклин |
| Трећа | Синтетски | тигециклин, омадациклин, сарециклин, еравациклин |

1.4.1. Механизам дејства тетрациклина

Своје антибактеријско дејство тетрациклини остварују инхибицијом синтезе протеина спрјечавајући везивање аминокил-тРНК за бактеријске рибозоме. Наиме, тетрациклини се високим афинитетом везују за специфични локус (16S) на 30S субјединици рибозома током процеса транслације. На овај начин онемогућено је продирање тРНК до акцепторског места на бактеријском рибозому узроковајући прекид елонгације полипептидног ланца услед онемогућене уградње аминокиселинског остатка. На овај начин, процес синтезе протеина је у потпуности блокиран (59, 64, 65).

Иако ниским афинитетом, тетрациклини се везују и за рибозоме домаћина али не постижу довољно високе интрацелуларне концентрације да би ометале синтезу

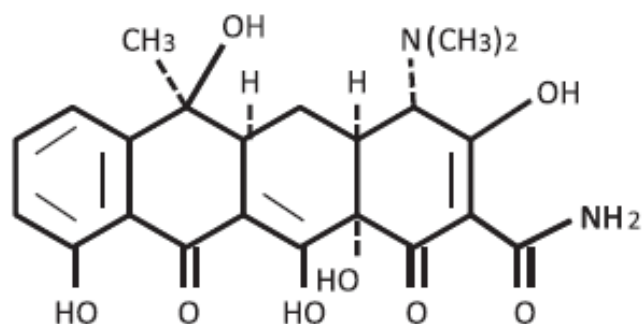
протеина. На тај начин показују селективност ка бактеријским ћелијама која умногоме зависи од капацитета бактерије да концентрише тетрациклине унутар своје ћелије. Тетрациклини пролазе кроз ћелијску мембрану бактерије на два начина: пасивном дифузијом и активним транспортом који захтјева присуство јона магнезијума или аденозин трифосфата (АТР) (66, 67).

1.4.2. Миноциклин

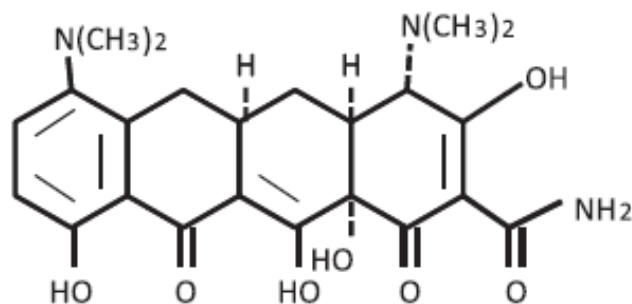
Миноциклин као изразито липофилан полусинтетски молекул, друге генерације тетрациклина, је први пут уведен 1960. у клиничку праксу за лијечење различитих инфекција Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија. Захваљујући високој липофилности, миноциклин се лако апсорбује у цереброспиналну течност, ефикасно пролази крвно-мождану баријеру и има дужи полуживот у односу на тетрациклине прве генерације. Терапијски ефекат остварује као и остали лијекови из ове групе, везивајући се за 30S субјединицу бактеријског рибозома спрјечавајући даљу синтезу протеина (68-70).

1.4.2.1. Структурна карактеризација

Миноциклин (7-диметиламино-6-деметил-6-деокситетрациклин) се хемијски назива још (4*S*,4*aS*,5*aR*,12*aR*)-4,7-*bis*(диметил-амино)-1,10,11,12*a*-тетрахидрокси-3,12-диоксо-4*a*,5,5*a*,6-тетрахидро-4*H*-тетрацен-2-карбоксамид (71). Хемијска формула миноциклина је C₂₃H₂₇N₃O₇ док молекулска маса износи 457.5 g/mol. Као и сви остали тетрациклини, миноциклин је дериват дјелимично редукованог нафтацена који се састоји од 4 линеарно спојених прстенова означених А, В, С, и D са приложеним различитим функционалним групама (слика 1.2.). Миноциклин у својој структури поседује диметиламино групу на позицији 7 али нема хидроксилне групе на позицијама 5 и 6 (слика 1.3.), што га чини липофилнијим у односу на остале тетрациклине са оптималним степеном пенетрације кроз ткива (61, 72, 73). Као и остали тетрациклини, миноциклин је амфотерно једињење које гради соли и са киселинама и базама при чему награђене соли са базама подлежу деградационим реакцијама због чега се не користе у терапији па се у терапијске сврхе користе само хидрохлоридне соли (74).



Слика 1.2. Општа структура тетрациклина



Слика 1.3. Хемијска структура миноциклина

1.4.2.2. Фармакокинетика и метаболизам миноциклина

Захваљујући изразито липофилним карактеристикама, миноциклин добро пенетрира кроз све ћелијске мембране постижући максималне терапијске концентрације $C_{max} = 3-8,5 \text{ mg/mL}$ које зависи од фармацеутског облика примјењеног лека. Добро се апсорбује након оралне примјене са временом полуживота од 11-23 сати код здравих особа, до 30 сати код пацијената са реналном дисфункцијом па чак и дуже код пацијената са обољењима јетре (75). Иако се апсорпција несметано одвија у желудачној слузници и проксималном дијелу танког цријева, истовремена примена миноциклина са млијечним производима, двовалентним катјонима (посебно са јонима калцијума и магнезијума), антацидима, солима на бази јона алуминијума и соли гвожђа може смањити степен апсорпције услед награђивања нерастворних хелатних комплекса. Из поменутог разлога, саветује се примјена суплемената на бази јона метала сат времена прије или два сата након примјене тетрациклина (76, 77). Миноциклин се доминантно излучује путем фецеса и жучи (70-90%) а мањим дијелом путем урина (5-12%), што је супротно путу екскреције тетрациклина прве генерације који се највећим дијелом излучују путем урина (60% за тетрациклин, 70% за окситетрациклин) (78). Метаболизам миноциклина се обавља у јетри процесом *N*-деалкилације преко цитохрома П450 до потпуно инактивних метаболита при чему је ренални клиренс овог тетрациклина веома низак. Вријеме полуелиминације миноциклина се креће од 15-23 сати што је приближно времену полуелиминације доксициклина али значајно дуже од тетрациклина прве генерације. Значајна пасивна тубуларна реасорпција миноциклина као и висок проценат везивања миноциклина за протеине плазме (76%) узрокује нижи бубрежни клиренс и дуже трајање дјеловања миноциклина у поређењу са осталим лијековима из ове групе антибиотика, посебно у односу на дужину терапијског ефекта тетрациклина и окситетрациклина. Из претходно наведених чињеница, дозирање миноциклина ограничено је на једну или двије дозе дневно (79). Волумен дистрибуције миноциклина износи 1.3 L/kg или 67,5-115 L (80, 81). Иако се елиминација миноциклина не обавља преко бубрега, стања попут бубрежне инсуфицијенције и цирозе јетре могу благо утицати на вријеме полуелиминације и површину испод криве (AUC) због чега се саветује опрезна примјена миноциклина код ових пацијената (78, 82). Узимајући у обзир да концентрација миноциклина у спутуму може достићи 20% од концентрације лијека у серуму, терапијска примјена миноциклина је у потпуности оправдана код пацијената са инфекцијом респираторног тракта. Такође, миноциклин продире у себум и дијелом се излучује путем зноја због чега се може примењивати и у лијечењу акни (83). Иако сви

лијекови из ове групе антибиотика добро продиру у сва ткива, липосолубилни тетрациклини се издвајају по изразито доброј дистрибуцији у слабо васкуларизована ткива. Са друге стране, степен дистрибуције Миноциклина и доксициклина у коштано ткиво је нешто мањег степена у поређењу са другим лековима из ове групе антибиотика.

1.4.3. Биолошки ефекти Миноциклина

Миноциклин испољава бактериостатичко дејство истим механизмом дејства као и остали лијекови из ове групе инхибирајући биосинтезу бактеријских протеина услед везивања за 30S подјединицу рибозома. Антибактеријско дејство Миноциклина је први пут описано још 1966. године од када се користи за лијечење инфекција како Грам-позитивним и Грам-негативним бактерија тако и инфекција атипичним организмима попут хламидија, микоплазма, рикеција и протозоа (61, 63). Дуготрајна терапија Миноциклина у највишој дози од 200mg/дан по препоруци FDA (енгл. *Food and Drug Administration*) је генерално безбједна и добро се подноси (82). Миноциклин се користи и у терапији инфекција изазваних метицилин резистентним сојевима *Staphylococcus aureus*-а услед резистенције на тетрациклине осталих генерација. Међутим, Миноциклин није лијек првог избора у лијечењу резистентних сојева стафилокока због чега се чешће користи у третману инфекција меких ткива. Као антибиотик са широким спектром дејства, Миноциклин се користи у терапији респираторних инфекција попут хроничног бронхитиса, инфекција уринарног тракта, инфекција коже (умјерени и тежи облици акни), уједа крпеља, сексуално преносивих болести (инфекције хламидијом) и друго. Поред тога, Миноциклин је лек другог избора код пацијената који су алергични на пеницилин када се користи у терапији сифилиса, гонореје и других гениталних инфекција а такође се примјењује и у процесу ерадикације асимптоматских носилаца инфекције *N. Meningitidis*. У профилактичке сврхе, Миноциклин се користи у превенцији настанка маларије, путничке дијареје, колере, инфекције *Enterobacter spp.*, Лајмске болести, антракса и многих других инфекција (83, 84).

Табела 1.2. Антибактеријска активност Миноциклина

| Инфекција | Патоген |
|-----------------------------|---|
| Кожа/мека ткива | <i>Staphylococcus aureus, Actinomyces spp.</i> |
| Гастроинтестинални тракт | <i>Vibrio cholera, Campylobacter spp.</i> |
| Лајмска болест | <i>Borrelia burgdorferi</i> |
| Сексуално преносиве болести | <i>Ureaplasma urealyticum, Chlamydia trachomatis, Klebsiella granulomatis</i> |
| Инфекције рикецијама | <i>Rickettsia akari</i> |
| Зоонозе | <i>Brucella spp., Yersinia pestis, Chlamydia psittaci, Bartonella bacilliformis, Francisella tularensis</i> |

Поред основних антимикуробних својстава, Миноциклин се често примјењује и у терапији болести различите етиологије када су од суштинског значаја други терапијских ефекти Миноциклина поред антибактеријског дејства овог лијека. Заправо, Миноциклин испољава бројна биолошка дејства која су независна од антимикуробних својстава попут антиинфламаторне, антиапоптотске, имуномодулаторне активности, инхибиторног ефекта на протеолизу, ангиогенезу, метастазу ћелија карцинома као и неуропротективно својство Миноциклина. Антиинфламаторну активност Миноциклин, као и остали лијекови из ове групе, остварују различитим механизмима укључујући инхибицију

активације и миграције неутрофила, активацију и пролиферацију Т-лимфоцита, инхибицију фосфолипазе, ангиогенезе, синтезе азот-моноксида, супресију ослобађања инфламаторних цитокина (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8) као и инхибицију стварања реактивних кисеоничних врста (85-87). Међутим, најпознатији и најчесталији механизам којим миноциклин остварује антиинфламаторну активност посредован је инхибицијом матриксних металопротеиназа (MMPs) блокирајући директним или индиректним путем њихову синтезу. Претходно спроведене студије на експерименталним моделима показале су значајну антиинфламаторну активност миноциклина у терапији дерматитиса, перидонтитиса, атеросклерозе као и аутоимуних болести укључујући реуматоидни артритис и инфламаторну болест цријева (88-91). С обзиром на висок степен липофилности, миноциклин пролази кроз крвно-мождану баријеру постижући високе концентрације у мозгу и на тај начин испољава неуропротективно својство. Неуропротективни ефекат миноциклина доказан је на експерименталним моделима исхемије, трауматским повредама мозга и неуропатског бола као и на моделима неуродегеративних болести попут Паркинсонове, Хантингтонове, Алцхајмерове болести, амиотрофичне латералне склерозе, мултипле склерозе и моделу повреде кичмене мождине (92). Поред тога, претклиничким студијама показана је још способност миноциклина да инхибира ћелијски раст и активацију малигних ћелија, репликацију HIV вируса као и ресорпцију кости (67).

1.4.4. Дозирање миноциклина

Интравенска примена миноциклина у терапији инфекција узрокованих сојем *Acinetobacter spp.* је оправдана када се бактериолошким испитивањем уочи осјетљивост бактерије на примјењени лијек. Уопштено гледано, миноциклин као и остали тетрациклини се примјењују за спрјечавање настанка и лијечење инфекција за које се зна или сумња да су изазване патогенима сензитивним на примјену тетрациклина. На овај начин се одржава ефикасност лијека и уједно смањује ризик од настанка резистенције на примјену миноциклина. Код одраслих, препоручена иницијална доза миноциклина да парентерално је 200 mg, а затим се на сваких 60 минута даје 100 mg лека током 12 сати при чему дневна доза не смије бити већа од 400 mg. Код дјеце старије од осам година препоручује се иницијална доза миноциклина у дози од 4 mg/kg интравенски а затим након сваког сата примењивати лијек у дози од 2 mg/kg током 12 сати. Прекорачење препоручене дневне дозе лијека повећава ризик од настанка нежељених дејстава миноциклина (93, 94).

1.4.5. Нежељена дејства миноциклина

Најчешћа нежељена дејства миноциклина одражавају се на нивоу гастроинтестиналног тракта при чему дуготрајна орална примјена овог антибиотика може довести до дисбиозе цријевне флоре. Симптоми повезани са поремећајем цријевне микрофлоре укључују дијареју, нелагодност у епигастријуму, мучнину и повраћање (95). С обзиром да лако пролази крвно-мождану баријеру, миноциклин често узрокује и нежељена дејства на нивоу централног нервне система која се испољавају у виду вртоглавице, главобоље или тинитиса. Понекад, главобоља изазвана примјеном миноциклина може бити почетни симптом ријетког али тешког синдрома назван као идиопатска интракранијална хипертензија (ИИХ) који је повезан са повећањем интракранијалног притиска, едемом папиле услед накупљања или лоше реасорпције цереброспиналне течности. Главобоља повезана са ИИХ се погоршава када се пацијент сагне, накашље или кија, а још се могу јавити и замагљен вид као и пулсирајући звуци у

глави. Консултација офталмолога и процјена едема папиле могу помоћи у постављању дијагнозе овог синдрома. Још један нежељени ефекат Миноциклина на нивоу централног нервног система је пролазни симптоми деперсонализације за који се претпоставља да настаје услед преосетљивости серотонергичког система током примјене овог тетрациклина (75, 96, 97).

Иако је фототоксичност често нежељено дејство свих тетарциклина, инциденца ове нежељене реакције је нижа услед примјене Миноциклина. Међутим, дуготрајна примјена Миноциклина такође може довести до хиперпигментације коже, зуба, ноктију, костију, коњуктиве, склере па чак и унутрашњих органа. То је споредни ефекат орално примјењеног Миноциклина који се испољава у виду плаво-сивих или браонкастих промјена. У већини случајева ово је реверзибилан процес који пролази када се прекине терапија тетрациклинима. Већа инциденца овог нежељеног ефекта повезана је са примјеном већих доза, током дужег временског периода и код старијих пацијената (98-101). Примјена Миноциклина током трудноће или код деце млађе од 9 година може доћи до тамне пребојености зуба дијете током раста који се испољава најчешће након мјесец до годину дана од терапијске примјене лијека. Како би се потенцијално смањила инциденца овог нежељеног ефекта Миноциклина, саветује се редукција дозе лијека као и истовремена примјена Миноциклина са витамином С или неким другим антиоксидансом (102).

Примјена Миноциклина такође може бити повезана и са настанком локалних реакција на месту примјене лека (нпр. еритем на месту примјене или бол) као и хепатотоксичности због чега се опрезно примјењује код пацијената са обољењима јетре (93). Брза или продужена интравенска примјена Миноцилина може узроковати настанак тромбоза због чега се саветује орална примјена овог антибиотика узимајући у обзир добар степен апсорпције овог тетрациклина (74).

Код пацијената са ослабљеном функцијом бубрега може доћи до настанка хиперфосфатемије и ацидозе услед антианаболичког ефекта Миноциклина при чему се саветује прилагођавање дозе лијека као и праћење вриједности креатинина ових пацијената (93). Углавном три ријетка али веома озбиљна нежељена дејства Миноциклина подразумевају дозно зависне реакције токсичности које се испољавају мултиорганском дисфункцијом, настанак хиперсензитивног синдрома којег карактерише пнеумонитис, еозинофилија, хепатитис, панкреатитис и нефритис као и настанак аутоимунских болести (синдром сличан лупусу еритематодесу изазван лијековима, аутоимунски хепатитис и полиартеритис нодоза) (78, 103). Као и већина антибиотика широког спектра дејства, интравенска примјена Миноциклина се понекад може повезати са настанком псеудомембранозног колитиса изазваног бактеријом *Clostridium difficile* када је неопходно прекинути примјену Миноциклина и започети одговарајућу терапију (93).

Примјена Миноциклина је контраиндицирана током трудноће због тератогеног дејства на плод док је код дојиља дозвољена краткотрајна примјена овог тетрациклина. Миноциклин не би требало примјењивати код хиперсензитивних пацијената на тетрациклине с обзиром да постоји потпуна унакрсна осјетљивост међу лијековима из ове групе антибиотика (104).

1.4.6. Интеракције Миноциклина са другим лековима

Иако фармакокинетичке интеракције Миноциклина са другим фармаколошки активним супстанцама нису толико честе, све интеракције Миноциклина са другим лијековима се могу подијелити на три основне групе:

1. озбиљне (клинички веома значајне интеракције лијекова када би истовремену примјену миноциклина и других лијекова увек требало избјегавати);
2. умерено озбиљне (истовремена примена миноциклина и других лијекова је оправдана само у појединим околностима);
3. благе (примена миноциклина и других лијекова је оправдана ако не постоји друга безбједнија алтернатива при чему је неопходно континуирано праћење ових пацијената) (Табела 3).

Миноциклин као дериват тетрациклина ступа у интеракцију са различитим групама лијекова па тако истовремена примјена миноциклина са варфарином или неким другим антикоагулантним лијеком снижава активност протромбина због чега је неопходна редукција дозе примјењиваних антикоагуланаса како би се спријечио ризик од настанка крвављења (105, 106). Иако је познато да тетрациклини смањују ефикасност оралних контрацептива, претходно спроведене студије указале су на то да не постоји статистички значајна разлика у броју непланираних трудноћа као ни у серумским вриједностима естрадиола и прогестерона код трудница које су истовремено примјењивале тетрациклине и оралне контрацептиве у односу на оне које су примјењивале оралне контрацептиве самостално (107-109). Поред тога истовремена примјена миноциклина са ергот алкалоидима повећава ризик од настанка ерготизма и фаталне нефротоксичности. Уколико се изотретиноин примјењује непосредно прије или током примјене миноциклина може доћи до настанка интракранијалне хипертензије (93, 110). Познато је да миноциклин ступа у интеракцију са дигоксином, лијеком који се користи у терапији атријалне фибрилације као и других кардиоваскуларних сметњи, повећавајући серумске врљиједности дигоксина (111). Хипогликемијски ефекат инсулина се може појачати уколико се истовремено примјени и миноциклин због чега је неопходна опрезна примјена ова два лијека истовремено уз редовну контролу глукозе. Иако описана као ретка интеракција, паралелна примјена миноциклина са диуретицима може ослабити бубрежну функцију и довести до појаве нефротоксичности. Такође, саветује се одвојена примјена миноциклина и пеницилина узимајући у обзир бактериостатски ефекат миноциклина који може умањити бактерицидни ефекат пеницилина (75, 106, 112).

Табела 1.3. Интеракције миноциклина са другим лијековима

| Озбиљне интеракције | | |
|--|---|-----------------------------------|
| <i>Лијек</i> | <i>Фармаколошка активност лијека</i> | <i>Ефекат интеракције</i> |
| Ацитретин, Етретинат, Изотретиноин | Ретиноиди, деривати витамина А | Настанак ИИХ, трајни губитак вида |
| Вакцина против колере | Вакцина | Смањен ефекат вакцине |
| Лефлуномид | Имуносупресивни лек у терапији реуматоидног артритиса | Оштећење јетре |
| Метоксифлуран | Анестетик | Оштећење бубрега |
| Умерене интеракције | | |
| Аминофилин | Бронходилататор | Појачан ефекат аминофилина |
| Деривати пеницилина | Антибиотици | Смањен ефекат пеницилина |
| Антракуријум, Мивакуријум, | Неуромишићни блокатори | Појачан ефекат неуромишићних |

| | | |
|--|------------------------------------|--|
| Панкуронијум, Рокуронијум | | блокатора, респираторна депресија, мишићна слабост |
| Балсалазид | Антиинфламаторни лек | Смањен ефекат балсалазида |
| Метотрексат | Имуносупресив | Смањен/појачан ефекат метотрексата |
| Ефавиренц Ремдесивир | Антивиротик | Оштећење јетре |
| Епирубицин | Антрациклин | Оштећење јетре |
| Налтрексон | Антагониста опиоидних рецептора | Оштећење јетре |
| Тиогуанин | Антитуморски лек | Оштећење јетре |
| Благе интеракције | | |
| Ацетазоламид, амилорид, буметанид, хлортиазид, хидрохлортиазид, етакринска киселина, фуросемид, индапамид, манитол, спиронолактон, торсемид, триамтерен | Диуретици | Ослабљена функција бубрега |
| Холестипол | хиполипемик | Смањена апсорпција миноциклина |
| литијум | Стабилизатор расположења | Повећане серумске вредности литијума |

1.4.7. Механизам резистенције на миноциклин

Иако спада у антибиотике широког спектра дејства, употреба миноциклина у појединим случајевима је ограничена с обзиром на честу појаву резистентних бактеријских сојева. Примарни механизам настанка резистенције на миноциклин посредован је повећаним избацавањем лијека из бактеријске ћелије помоћу фамилије *Tet*-протеина локализованих на површини бактеријске мембране. На овај начин је смањена интрацелуларна минимална инхибиторна концентрација миноциклина спречавајући везивање лијека за протеине бактерије и остваривање бактериостатичког дејства. Укупно постоји 33 *Tet*-протеина који посредују у настанку резистенције на тетрациклин прве генерације и доксициклин али не и на миноциклин и тетрациклин треће генерације. Ови протеини су широко распрострањени на мембранама микроорганизама, посебно на површини Грам-негативних бактерија. Посебан *tet-B* ген ове фамилије протеина кодира резистенцију на тетрациклин, доксициклин и миноциклин. Уколико патоген на својој мембрани поседује било који други ген од *tet-B* гена постоји могућност изостанка резистенције патогена на примјену миноциклина када се остварује довољна интрацелуларна концентрација овог тетрациклина и адекватан бактериостатички ефекат лека (61, 80).

Други описани механизам настанка резистенције на миноциклин одвија се уз помоћ протеина заштите рибозома. Заправо, то су цитоплазматски протеини који поседују *GTP*-азну активност спречавајући везивање тетрациклина за бактеријске протеине. Ови протеини нађени су на површини Грам-позитивних, Грам-негативних и анаеробних бактерија (113).

Резистенција на тетрациклине се рјеђе дешава услед мутација које су до сада описане као механизам настанка резистенције *N. Gonorrhoeae* на примјену миноциклина. Мутације које појачавају ефлукс пумпи описане су код *Burkholderia cepacia*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumonia* и других патогених организама (61, 80).

II

ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ

ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ

1. Користећи модел глобалне исхемије, испитати утицај примјене миноциклина прије исхемије на исхемијско/реперфузиони поремећај функције изолованог срца здравих, хипертензивних и дијабетичних пацова (прекондиционирање миноциклином).
2. Користећи модел глобалне исхемије, испитати утицај примјене миноциклина за вријеме реперфузије на исхемијско/реперфузиони поремећај функције изолованог срца здравих, хипертензивних и дијабетичних пацова (посткодниционирање миноциклином).
3. Хистопатолошким методама утврдити морфолошке промјене изолованог срца након, прекондиционирања и посткондиционирања миноциклином на здравим, хипертензивним и дијабетичним пацовима.
4. Испитати утицај примјене миноциклина на срчани оксидациони статус здравих, хипертензивних и дијабетичних пацова.
5. Утврдити корелацију свих добијених функционалних, биохемијских и патохистолошких промена.

ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

1. Очекује се да прекондиционирање и посткодниционирање миноциклином може да оствари позитиван утицај на функционални опоравак изолованог срца пацова након исхемије/реперфузије.
2. Претпоставља се да прекондиционирање и посткодниционирање миноциклином може да буде повезано са бољом очуваношћу морфолошких одлика изолованог срца након исхемије/реперфузије.
3. Очекује се да постоји корелација између бар неких од мјерених функционалних, биохемијских и патохистолошких варијабли.
4. Очекује се да ће утицај миноциклина на све испитиване варијабле бити знатно уочљивији и израженији у условима хипертензије и дијабетеса.

III

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. МАТЕРИЈАЛ

За прављење перфузионих раствора и пуфера који су коришћени у експерименталним протоколима овог истраживања употребљени су комерцијални реагенси и супстанце квалитета *pro analysis* произвођача *Sigma–Aldrich Chemie GmbH*, (Немачка).

3.1.1. Супстанце за припремање Крепс-Хенселејтовог (*Krebs-Hensenleit*) раствора

- Натријум хлорид (NaCl , 27.216 g/4L)
- Калијум хлорид (KCl , 1.4 g/4L)
- Магнезијум сулфат ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1.636 g/4L)
- Калијум дихидроген фосфат ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0644 g/4L)
- Натријум бикарбонат (NaHCO_3 , 8.36g/4L)
- Глукоза ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \times \text{H}_2\text{O}$, 8.8g/4L)
- Калцијум хлорид ($\text{CaCl}_2(\text{anh.})$, 1.117 g/4L)

3.1.2. Супстанце употребљене за одређивање индекса липидне пероксидације (*TBARS*) у коронарном венском ефлуенту

- 2-тиобарбитурна киселина (ТВА, $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$), Mr 144.15
- Натријум хидроксид (NaOH), Mr 40.00.

3.1.3. Супстанце употребљене за одређивање азот монооксида (NO) у облику нитрита у коронарном венском ефлуенту

- Сулфанилна киселина (4-амино бензенсулфонска киселина, $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$), Mr 173.19
- N-(1-нафтил)-етилендиамин дихидрохидрат (NEDA, $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{C}_{12}\text{N}$), Mr 259.18
- Амонијум хлорид (NH_4Cl), Mr 53.49
- Боракс ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$), Mr 381.4
- Орто-фосфорна киселина (85%) (H_3PO_4), $\rho=1,685 \text{ gcm}^{-3}$
- Натријум нитрит (NaNO_2), Mr 69.00

3.1.4. Супстанце употребљене за одређивање супероксид анјон радикала (O_2^-) у коронарном венском ефлуенту

- TRIS (Трис (хидроксиметил) аминоетан, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$), Mr 121.14
- Хлороводонична киселина (37%) (HCl), $\rho=1,19 \text{ gcm}^{-3}$, Mr 36.5
- Na_2EDTA , Mr 372.24
- Нитро-тетразолијум плаво хлорид (NBT, $\text{C}_{40}\text{H}_{30}\text{ClN}_{10}\text{O}_6$), Mr 817.6
- Желатин ($\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}_2 \text{NaO}_2$), Mr 61.5 kDa

3.1.5. Супстанце употребљене за одређивање водоник пероксида (H_2O_2) у коронарном венском ефлуенту

- Калијум хидрогенфосфат дихидрат ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) Mr 214.23
- Калијум дихидрогенфосфат дихидрат ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) Mr 164.09
- Натријум хлорид (NaCl) Mr 58.44
- Водоник пероксид (H_2O_2), Mr 34.01
- D(+)-глукоза монохидрат (декстроза), Mr 198.17
- Фенол црвено (phenol red, $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_5\text{S}$), Mr 354.4
- Пероксидаза из коњске ротквице (peroxidase from horse radish – HRPO EC 1.11.1.7), Mr 44 kDa.

3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛ

3.2.1. Основе Лангендорфове технике ретроградне перфузије изолованог срца сисара

Све експерименталне процедуре предвиђене планом истраживања и одобрене од стране Етичког одбора за добробит лабораторијских животиња и Комисије за снагу и дизајн студије Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу изведене су у Лабораторији за кардиоваскуларни физиологију Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. При извођењу експеримената поштоване су све одредбе важећих докумената за заштиту добробити лабораторијских животиња и принципа етичности у раду са лабораторијским животињама (*EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC*). По дизајну и методама које су примјењене, спроведена студија спада у експерименталне студије на матријалу анималног порекла *ex vivo* и *in vitro*.

Окосницу експерименталног дизајна овог истраживања представља модел ретроградне перфузије изолованог срца сисара модификованом методом по Лангендорфу (*Langendorff*) при константном перфузионом притиску. Модел ретроградне перфузије изолованог срца сисара, коју је још 1895. године поставио њемачки физиолог Оскар Лангендорф (*Oscar Langendorff*), је један од експерименталних модела коме савремена медицина дугује највише захвалности. Дуже од једног века овај експериментални модел је један од најпоузданијих и најприступачнијих метода за изучавање физиологије срчаног мишића, спроводног система и сигналних путева који посредују у одржавању хомеостазе срца и коронарне циркулације. Поред изучавања физиолошких феномена срца, Лангендорфов модел изолованог срца сисара представља и један од готово идеалних алата за изучавање патофизиолошких збивања у оквиру различитих патолошких ентитета попут хипертензије, дијабетеса, срчане слабости или различитих облика аритмија (114-116).

И поред извјесних промјена и унапређења, основа Лангендорфове технике изолованог срца пацова се није значајно мијењала током година. Градијент притиска перфузионог раствора (у овој студији Крепс-Хенселејтовог раствора), који у срце улази кроз аорту (ретроградно), држи семилунарне аортне залистке затвореним. Услед наведене чињенице, раствор улази у коронарне артерије чији се отвори налазе на самом исходишту аорте из лијеве коморе (Валсалвини синуси). Перфузиони раствор пролази кроз васкуларно корито коронарних крвних судова, пролази кроз коронарне вене и преко коронарних венских синуса се излива преко срца. Закључује се да перфузиони раствор служи искључиво за подмиривање нутритивних потреба миокарда, при чему срчане шупљине остају „суве“, односно перфузиони раствор не доспева у срчане шупљине.

Данас постоје двије варијанте ретроградне перфузије изолованог срца сисара: 1) перфузија при константном притиску, и 2) перфузија при константном протоку. У првом моделу, који је основа експерименталне поставке овог истраживања, перфузиони притисак је позната варијабла, док је коронарни проток промјенљива варијабла. У варијанти ретроградне перфузије при константном протоку, коронарни проток је позната варијабла, док је перфузиони притисак промјенљива. Промјена коронарног протока, при чему је перфузиони притисак сталан, региструје се мјерењем запремине коронарног венског ефлуента који се излива из коронарне циркулације у јединици времена (ml/минут).

Сви експерименти у овом експерименталном протоколу су изведени при константном перфузионом притиску који је износио 70 cmH₂O. Одговарајући перфузиони притисак се постиже подешавањем хидростатског притиска под којим

перфузиони раствор улази у коронарне артерије – висина стуба перфузионог раствора изнад отвора коронарних артерија.

Модел ретроградне перфузије при константном притиску представља нешто „физиолошкију“ варијанту у односу на перфузију при константном протоку, јер у *in vivo* условима притисак у аорти се одржава у релативно константом опсегу, а самим тим и притисак под којим крв улази у коронарне артерије. Такође, овај модел ретроградне перфузије изолованог срца сисара омогућава испитивање реактивности коронарних крвних судова и њиховог ауторегулаторног опсега, као и испитивање патофизиолошких механизма исхемијског оштећења и реперфузионе повреде, који могу да настану индукцијом глобалне или регионалне исхемије.

Сви параметри од интереса који се прате и мјере током експеримента и који ће у даљем тексту бити детаљно објашњени имају тенденцију да се мијењају у функцији времена, тако да се узима њихова средња вредност у одређеном временском интервалу, уместо апсолутне вредности у одређеном тренутку. Склоност ка варирању настаје услед саме природе срчаног мишића и регулације рада срца, попут различитог трајања систоле и дијастоле, промјене фреквенције рада срца, промјене температуре околине или температуре перфузионог раствора.

3.2.2. Особине Лангендорфовог апарата коришћеног у овом истраживању

Експерименти у оквиру овог истраживања изведени су на Лангендорфовом апарату произвођача *Experimetria Ltd, Budapest*, марке LF-01 F-P. Саставне компоненте овог апарата су:

- Двије усправне стаклене цијеви, исте дужине а различитог пречника, при чему је цијев мањег пречника уметнута у цијев већег пречника. Између ове двије цијеви се налази простор који испуњава дестилована вода, која се, када је апарат у функцији, загријава на 37°C и чија је улога да загријава перфузиони раствор који се налази унутар мање цијеви. У цијев мањег пречника се помоћу пумпе убације перфузиони раствор (у овом експерименту Крепс-Хенселејтов раствор). Унутар мање цијеви налази се танка, права стаклена цијев која је повезана са резервоаром перфузионог раствора и преко које се вишак раствора враћа у резервоар. Помјерањем ове танке стаклене цијеви вертикално навише или вертикално наниже мијења се притисак под којим раствор доспијева у коронарну циркулацију (хидростатски притисак – висина стуба течности изнад срца). Перфузиони раствор помоћу система цијеви се доводи до каниле за коју се качи срце аортом.
- Резервоар у коме се налази перфузиони раствор. Резервоар је са једне стране повезан са пумпом која повлачи перфузиони раствор из резервоара и пуни претходно поменуту вертикалну стаклену цијев из које раствор долази до срца. Са друге стране резервоар је повезан са танком стакленом цијевчицом преко које се вишак раствора враћа у резервоар. Такође, у резервоару се врши гасирање перфузионог раствора смешом O₂ и CO₂.
- Боца која садржи смјешу гасова O₂ и CO₂ у односу 95%:5%. Сврха гасирања перфузионог раствора је постизање парцијалних притисака O₂ и CO₂ који су довољни за задовољење метаболичких потреба изолованог срца, као и постизање одговарајуће рН вредности раствора.
- Водено купатило које загријава дестиловану воду до температуре од 37°C и које омогућава циркулисање загријане дестиловане воде кроз систем цијеви које окружују перфузиони раствор. На тај начин перфузиони раствор се загријава до

температуре од 37°C , односно температуре тијела, при чему се постиже изотермичност.



Слика 3.1. Лангендорфов апарат за перфузију изолованог срца сисара (лијево) и канила за качење изолованог срца сисара и сензор који се поставља у лијеву комору (десно).

- Инфузиона пумпа која омогућава апликовање супстанце, чији се ефекат на срце испитује, у коронарну циркулацију. Брзина апликовања супстанце зависи од величине коронарног протока и може стално да се подешава у складу са промјенама вриједности коронарног протока.
- Сензори који континуирано региструју одговарајуће варијабле. Сензор *transducer* BS4 73-0184 је повезан са лучном металном цијевчицом на чијем се врху налази „балончић“ пречника око 5 mm направљен од латекса или најлонске фолије. Након прокидања митралних залистака балончић се убацује у лијеву комору и омогућава континуирано праћење кардиодинамских параметара и срчане фреквенције из лијеве коморе. Поред сензора који се поставља у лијеву комору, постоји сензор (*perfusion pressure transducer*) који региструје притисак под којим раствор за перфузију улази у аорту и коронарну циркулацију - средњи перфузиони притисак у аорти - МВР (mmHg). Такође, постоји и сензор који биљежи температуру (*temperature transducer*) перфузионог раствора на улазу у аорту.
- Рачунар на коме је инсталиран одговарајући софтвер (*Spel Advanced HaemoSys v3.24*) који преводи и биљежи сигнале из сензора.

Кардиодинамски параметри лијеве коморе који су праћени у овом експерименталном протоколу су:

- максимална стопа промјене притиска у лијевој комори – $dp/dt \max$, јединица је mmHg/s, овај параметар осликава инотропну (контрактилну) способност миокарда лијеве коморе;
- минимална стопа промјене притиска у лијевој комори – $dp/dt \min$, јединица је mmHg/s, овај параметар осликава луситропну (релаксацију) способност миокарда;
- систолни притисак у лијевој комори – SLVP, изражава се у mmHg;
- дијастолни притисак у лијевој комори – DLVP, изражава се у mmHg;
- фреквенција срчаног рада – HR, изражава се као број откуцаја срца у минути (bpm).

Коронарни проток (CF) је изражен у ml коронарног венског ефлуента у минути (ml/минут).

3.2.3. Крепс-Хенселејтов перфузиони раствор

Крепс-Хенселејтов је најчешће коришћени бикарбонатни раствор који се користи за перфузију изолованог срца сисара на Лангендорфовом апарату. Први пут су га описали Ханс Адолф Крепс (*Krebs*) и Курт Хенселеит (*Henseleit*) 1932. године, и по њима носи име (4). Супстанце које улазе у састав Крепс-Хенселејтовог раствора и њихове концентрације наведене су у табели 3.1. Уколико се Крепс-Хенселејтов (*Krebs-Henseleit*) раствор гасира са 95% O₂ и 5% CO₂ постиже се рН 7,4 при температури раствора од 37°C.

Постоје недоумице везане за концентрацију јона калцијума у Крепс-Хенселејтовом раствору. Наиме, концентрација јонизованог калцијума (Ca²⁺) у Крепс-Хенселејтовом раствору износи 2,5 mmol/L, док физиолошки у крви износи упола мање, негде око 1,2 mmol/L. Укупна концентрација Ca²⁺ у Крепс-Хенселејтовом раствору и плазми је приближно иста, међутим у плазми је половина наведене концентрације везана за протеине плазме, тако да је концентрација јонизованог, слободног или активног Ca²⁺ око 1,2 mmol/L. Због наведене чињенице став појединих аутора је да концентрацију Ca²⁺ у Крепс-Хенселејтовом раствору треба редуковати.

Табела 3.1. Крепс-Хенселејтов (*Krebs-Henseleit*) раствор

| Супстанца | Концентрација |
|---------------------------------------|---------------|
| NaCl | 118 mmol/L |
| KCl | 4,7 mmol/L |
| MgSO ₄ × 7H ₂ O | 1,7 mmol/L |
| NaHCO ₃ | 25 mmol/L |
| KH ₂ PO ₄ | 1,2 mmol/L |
| Глукоза | 11 mmol/L |
| CaCl ₂ × 2H ₂ O | 2,5 mmol/L |

NaCl – натријум хлорид; KCl – калијум хлорид; MgSO₄ × 7H₂O – магнезијум сулфат хептахидрат; NaHCO₃ – натријум хидрогенкарбонат; KH₂PO₄ – калијум дихидрогенкарбонат; CaCl₂ × 2H₂O – калцијум хлорид дихидрат

Друга специфичност Крепс-Хенселејтовог раствора је глукоза као извор енергије за миокард који иначе користи масти као енергетски супстрат. Поред тога концентрација глукозе је знатно виша (11 mmol/L) од вриједности које се сматрају нормогликемичним (3,9 mmol/L – 6,1 mmol/L).

Постоји више алтернатива и модификација Крепс-Хенселејтовог раствора, од перфузије срца пуном крвљу до обогаћивања раствора ресуспендованим еритроцитима, албуминима, пируватом. Свака од алтернатива има своје предности, али и своје мане, које у великој мери могу да отежају извођење експеримента.

3.3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ

У експериментима су коришћени пацови *Wistar albino* соја и спонтано-хипертензивни пацови (*spontaneously hypertensive rats* - SHR), мушког пола, старости 8 недеља, просјечне тјелесне масе 250 ± 25 g. Животиње су чуване у стандардним лабораторијским условима, групни кавезни систем (4 животиње по кавезу), у виваријуму са просјечном температуром $22 \pm 2^\circ\text{C}$ и релативном влажношћу ваздуха $35 \pm 5\%$. У виваријуму су се на сваких 12 сати смјењивали циклуси свјетлост-тама (12 часова свјетлост, па 12 часова тама, са почетком свијетлог периода у 7:00 часова) и животиње су имале слободан приступ води и храни (*ad libitum*).

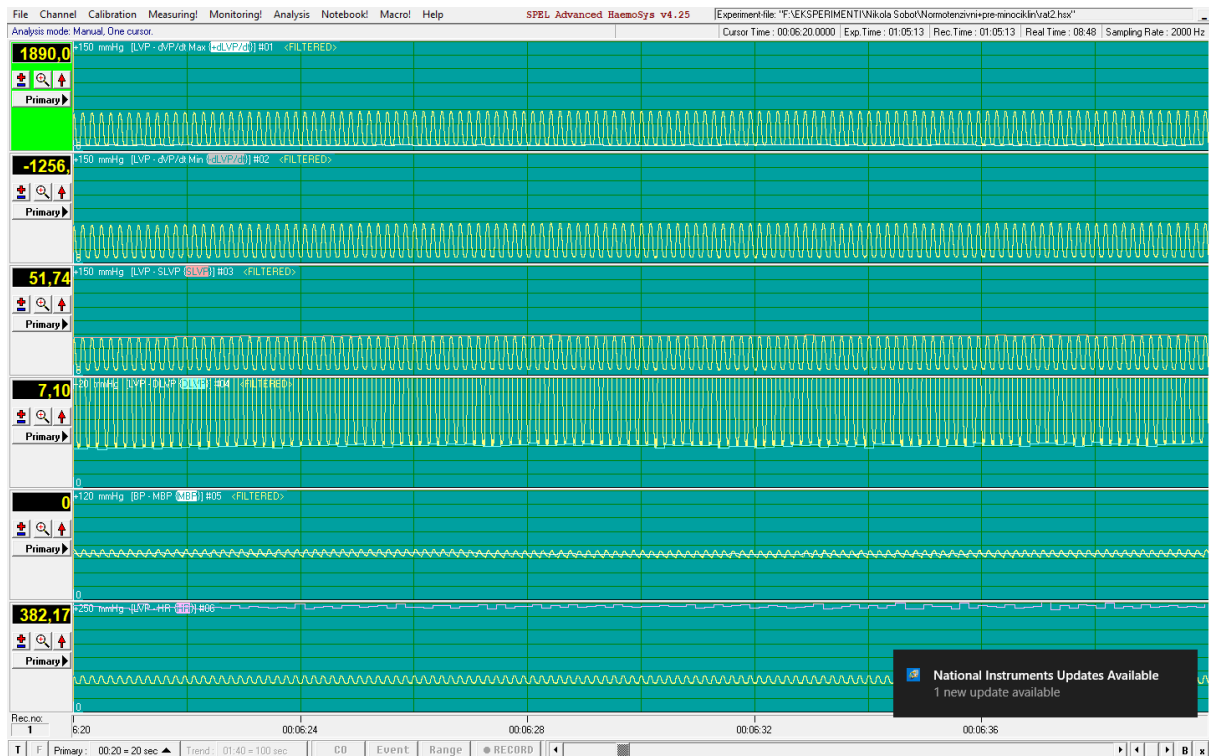
Животиње се жртвују цервикалном дислокацијом (ударац потиљком о чврсту подлогу) након индуковања анестезије интраперитонеалним убризгавањем комбинације кетамина и ксилазина. Одмах након жртвовања врши се брза лапаротомија и омогућава се приступ дијафрагми. Потом се дијафрагма лучно просјеца и отвара се приступ грудној дупљи и срцу. По просјецању дијафрагме, сијеку се ребарни лукови десно и лијево, како би се омогућио несметан приступ срцу. Срце се стално прелива хладним физиолошким раствором.

Када је приступ срцу омогућен, просјеца се перикард, срце се благо одиже увис и пресецају се крвни судови базе срца. Одмах по пресецању великих крвних судова и ослобађању срца, оно се потапа у ледени физиолошки раствор (-4°C – -10°C). Жељени учинак потапања срца у ледени физиолошки раствор је смањење метаболичких потреба срчаног ткива, а самим тим и минимизирање оштећења миокарда. Урањање срца у ледени физиолошки раствор повећава временски прозор вијабилности препарата срца и даје довољно времена за препарацију крвних судова. Сви крвни судови изузев асцедентне аорте се уклањају, као и евентуални вишак околних ткива. Асцедентна аорта се причвршћује за канилу кроз коју раствор за перфузију доспијева у изоловано срце. Читава процедура, од жртвовања животиње па до причвршћивања аорте за Лангендорфов апарат и отпочињања ретроградне перфузије не смије да траје дуже од два минута.

Након постављања срца на Лангендорфов апарат и отпочињања ретроградне перфузије, уклања се лијева аурикула чиме се омогућава приступ лијевој преткомори. Након тога се пинцетом прокидају митрални залисци, а као посљедица тога притисак у лијевој комори се своди на нулу и самим тим нема никакав утицај на коронарне крвне судове и проток кроз коронарну циркулацију и омогућава се постављање сензора у лијеву комору којим се биљеже кардиодинамски параметри који осликавају функцију срца, а пре свега лијеве коморе.

Сензор који се поставља у лијеву комору омогућава праћење промјена кардиодинамских параметара током читавог експеримента. Сензор је повезан са софтвером који омогућава биљежење кардиодинамских параметара током читавог експеримента. Такође, софтвер омогућава означавање појединих тренутака од интереса

у самом експерименту или обиљежавање одређених периода током трајања експеримента (исхемија или апликација лијека).



Слика 3.2. Софтверски запис кардиодинамских параметара.

Проток кроз коронарну циркулацију се мјери у јединици времена и изражава се у милилитрима у минуто (ml/min).

3.3.1. Експериментални *ex vivo* протокол исхемије и реперфузије, прекондиционирања и посткондиционирања

Након периода стабилизације у трајању од око 20 минута и постизања устаљеног срчаног рада почиње се са експерименталним протоколом. Стабилан срчани рад подразумјева одржавање приближно константних вриједности кардиодинамских параметара и непромјењене вриједности коронарног протока након три узастопна мјерења. За испитивање ефеката исхемије и реперфузије, као и протективни утицај миноциклина, у овом истраживању коришћен је протокол 20 минута исхемије и 30 минута реперфузије.

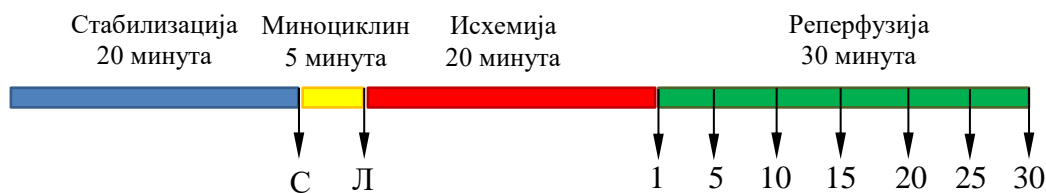
Исхемија је у овом експерименталном моделу индукована прекидом дотока перфузионог раствора у коронарну циркулацију – глобална исхемија. Услјед тога читав миокард је подвргнут исхемији. Поред овог механизма изазивања исхемије, постоји и исхемија изазвана малим протоком перфузионог раствора (*low-flow ischemia*) и регионална исхемија која настаје подвезивањем одређене гране коронарне артерије, у зависности од тога колики дио миокарда треба да буде захваћен исхемијом. За потребе испитивања хипотеза овог истраживања глобална исхемија је била најоптималнији избор, при чему протокол који подразумјева 20 минута исхемије и 30 минута реперфузије омогућава довољно оштећење миокарда (али ипак настале промјене нису масивне и неповратне) гдје може да се сагледа протективни потенцијал испитиваног агенса (о овом случају миноциклина).



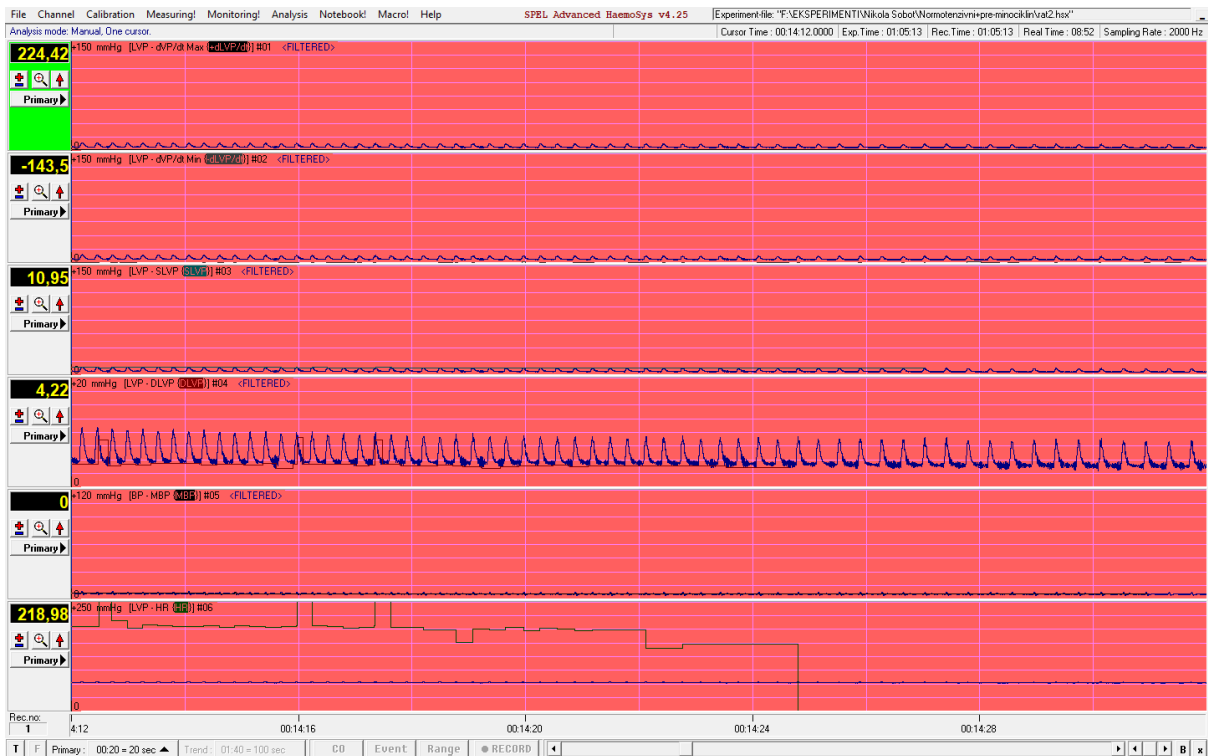
Слика 3.3. Софтверски запис кардиодинамских параметара на почетку апликације миноциклина

3.3.2. Експериментални протокол са прекондиционарањем

Након периода стабилизације и успостављања стабилног коронарног протока и устаљених вриједности кардиодинамских параметара, преко инфузионе пумпе вршена је континуирана апликација миноциклина растовреног у физиолошком раствору у концентрацији од 1 $\mu\text{mol/L}$. Апликација је трајала 5 минута, а брзина апликовања је усаглашавана са величином коронарног протока. Одмах након завршетка апликације миноциклина, индукована је глобална исхемија срца у трајању од 20 минута, а затим је слиједила тридесетоминутна реперфузија. Кардиодинамски параметри су биљежени континуирано, а вриједности за статистичку анализу су узимане у последњем минути стабилизације, у последњем минути апликације миноциклина, као и у 1, 5, 10, 15, 20, 25. и 30. минути реперфузије. Експериментални протокол са прекондиционарањем је приказан на слици 3.4. У контролним групама у којима није примјењен миноциклин као кондиционарајући агенс, примјењен је физиолошки раствор.



Слика 3.4. Експериментални протокол са прекондиционарањем



Слика 3.5. Софтверски запис кардиодинамских параметара током трајања исхемије

3.3.3. Експериментални протокол са посткондиционирањем

И у протоколу са посткондиционирањем, период стабилизације је трајао 20 минута. Након стабилизације коронарног протока и постизања вриједности кардиодинамских параметара који не одступају много, индукована је глобална исхемија у трајању од 20 минута. Након исхемије слиједила је реперфузија у трајању од 30 минута. Посткондиционирање миноциклином је вршено током првих пет минута реперфузије. Кардиодинамски параметри су биљежени током читавог трајања експеримента, а вриједности за статистичку обраду су узимане у посљедњем минути стабилизације, као и у 1, 5, 10, 15, 20, 25. и 30. минути реперфузије, при чему су 1. и 5. минут реперфузије практично први и посљедњи минут посткондиционирања миноциклином. Експериментални протокол са посткондиционирањем је приказан на слици 3.6. У контролним групама у којима није примјењен миноциклин као кондиционирајући агенс, примјењен је физиолошки раствор.



Слика 3.6. Експериментални протокол са посткондиционирањем

3.3.4. Експерименталне групе

Животиње ће бити разврстане у следеће експерименталне групе (по 8 животиња у свакој групи):

1. Здрави, нормотензивни, нормогликемични пацови, без икаквог третмана којима ће се изазвати исхемијско/реперфузиона повреда и који ће бити прекондиционирани или посткондиционирани физиолошким раствором (контролна група);
2. Хипертензивни пацови без икаквог третмана којима ће се изазвати исхемијско/реперфузиона повреда и који ће бити прекондиционирани или посткондиционирани физиолошким раствором;
3. Дијабетични пацови без икаквог третмана којима ће се изазвати исхемијско/реперфузиона повреда и који ће бити прекондиционирани или посткондиционирани физиолошким раствором;
4. Нормотензивни пацови чија ће срца бити прекондиционирана миноциклином у дози од 1 μ М прије изазивања исхемијско/реперфузионе повреде;
5. Нормотензивни пацови којима ће се најприје изазвати исхемија миокарда а потом ће у реперфузији бити посткондиционирана миноциклином у дози од 1 μ М;
6. Хипертензивни пацови чија ће срца бити прекондиционирана миноциклином у дози од 1 μ М пре изазивања исхемијско/реперфузионе повреде;
7. Хипертензивни пацови којима ће се најприје изазвати исхемија миокарда а потом ће у реперфузији бити посткондиционирана миноциклином у дози од 1 μ М;
8. Дијабетични пацови чија ће срца бити прекондиционирана миноциклином у дози од 1 μ М прије изазивања исхемијско/реперфузионе повреде;
9. Дијабетични пацови којима ће се најприје изазвати исхемија миокарда а потом ће у реперфузији бити посткондиционирана миноциклином у дози од 1 μ М.

3.4. ИНДУКЦИЈА ДИЈАБЕТЕСА ТИПА 2

Дијабетес тип 2 је индукован у 4 експерименталне групе (у свакој по 8 животиња) пацова *Wistar albino* соја. Животињама којима је планирано индуковање дијабетеса типа 2 хране се 4 недеље храном са повећаним садржајем масти (масна храна садржи 25% масти и 15% протеина, док уобичајена храна садржи 9% масти и 20% протеина). Након 4 недеље животињама се апликује стрептозотозин у дози од 25 mg/kg телесне масе. Стрептозотозин се апликује интраперитонеално, растворен у цитратном пуферу, након гладовања у трајању од 12 сати. Након 72 сата од апликације стрептозотоцина мјери се гликемија и ради се орални тест оптерећења глукозом. Животиње са повишеним вриједностима гликемије се укључују у даље истраживање. Масна храна се наставља још 4 недеље, имајући у виду да су истраживања показала да враћање на уобичајену храну узрокује нормализацију гликемије.

3.5. БИОХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ

Узорци коронарног венског ефлуента су прикупљани у истим тачкама од интереса када су регистроване вриједности кардиодинамских параметара за статистичку анализу (слика 3.4 и 3.6). У групама где је вршено прекондиционирање у посљедњем минути стабилизације, у посљедњем минути апликације миноциклина, као и у 1, 5, 10, 15, 20, 25. и 30. минути реперфузије, а у групама где је вршено посткондиционирање у посљедњем минути стабилизације, као и у 1, 5, 10, 15, 20, 25. и 30. минути реперфузије. Одмах по

узорковању коронарни венски ефлуент је замрзаван (-80°C) до тренутка извођења анализа.

Из узорака коронарног венског ефлуента одређиване су вриједности биомаркера оксидационог стреса, и то индекс липидне пероксидације (мјерен као TBARS), нитрити (NO₂⁻), који рефлектују степен продукције азот монооксида (NO), супероксид анјон радикал (O₂⁻) и водоник пероксид (H₂O₂). Сви прооксидативни молекули који су анализирани у овом истраживању одређивани су спектрофотометријски на апарату марке *Shimadzu UV-1800* спектрофотометар, Северна Америка.

3.5.1 Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS)

Индекс липидне пероксидације одређиван је индиректно, мјерењем продуката реакције липидне пероксидације са тиобарбитурном киселином (TBARS - **T**hio**B**arbituric **A**cid **R**eactive **S**ubstances). Вриједности TBARS одређиване су спектрофотометријски у складу са претходно публикованим радовима (118).

Узима се 800 µl коронарног венског ефлуента коме се додаје 200 µl 1% тиобарбитурне киселине растворене у 0,05 М NaOH. Затим су узорци инкубирани 15 минута на 100°C и 10 минута на собној температури. Апсорбанца је одређивана на таласној дужини од λ=530nm. Као слијепа проба коришћена је иста запремина Крепс-Хенселејтовог раствора (уместо коронарног венског ефлуента).

Концентрација TBARS одређује се на основу једначине:

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

где је A_u апсорбанца узорка (коронарног венског ефлуента), A_{sp} је апсорбанца слепе пробе, а 1,56 и 1,25 представљају корекционе факторе. За разлику од осталих биомаркера оксидационог стреса који су одређивани у овом истраживању и који се изражавају у nmol, TBARS се изражава у µmol.

3.5.2. Одређивање нитрита

Одређивање вриједности нитрита у коронарном венском ефлуенту је индиректна метода процене активности L-аргинин-NO система ендотела коронарне циркулације. Имајући у виду да ослобођени NO реагује са O₂ при чему се награђују нитрити (NO₂⁻), у реакцији: NO + ½O₂ → NO₂⁻, измјерене вриједности нитрита корелирају са ослобођеним NO.

Спектрофотометријско одређивање вриједности нитрита заснива се на употреби *Griess*-реагенса, који са нитритима гради диазо-комплекс љубичасте боје (119).

У 1000 µl коронарног венског ефлуента додаје се 250 µl *Griess*-реагенса, направљеног *ex tempore*, и 125 µl амонијачног пуфера (pH=9,0). *Griess*-реагенс се припрема мјешањем једнаких запремина 1 % сулфанилне киселине која је растворена у 5% орто-фосфорној киселини и 0,1% воденог раствора N-(1-нафтил)-етилендиамин дихидрохлорида (NEDA). Амонијачни пуфер прави се од амонијум хлорида (NH₄Cl) и натријум тетрабората (Na₂B₄O₇). За слијепу пробу умјесто коронарног венског ефлуента користи се 1000 µl Крепс-Хенселејтовог раствора.

Нитрити у узорку коронарног венског ефлуента одређивани су помоћу калибрационе криве која је конструисана на основу узорака који садрже познату концентрацију нитрита (NaNO₂ у различитим концентрацијама), који су одреаговали са *Griess*-овим реагенсом у присуству пуфера. Након стабилизације боје у трајању од 10 минута на собној температури, нитрити су одређивани спектрофотометријски на

таласној дужини од $\lambda=550$ nm. Нитрити у коронарном венском ефлуенту добијени су на основу одређивања стандардног фактора (F), помоћу једначине:

Екстинкција стандарда – екстинкција слијепе пробе

Концентрација NaNO_2 у стандарду

И даље, дијелењем разлике екстинкција узорка и слијепе пробе са стандардом F:

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

3.5.3. Одређивање супероксид анјон радикала

Мјерење количине ослобођеног супероксид анјон радикала (O_2^-) у коронарном венском ефлуенту засновано је на реакцији O_2^- са нитро тетразолијум плавим (Nitro Blue Tetrazolium - **NBT**) при чему настаје нитроформазан плаво (120). *Ex tempore*, непосредно прије мјерења, прави се есејна смјеша која садржи: 50 mmol TRIS-HCl пуфера (pH=8,6), 0,1 mmol EDTA, 0,1 mg/ml желатина и 0,1 mmol NBT. 50 μl коронарног венског ефлуента додаје се у 950 μl есејне смјеше. Мјерење се врши на таласној дужини $\lambda=550$ nm. Као слијепа проба користи се одговарајућа запремина Крепс-Хенселејтовог раствора. Апсорбанца се мјери три пута уз мјешање пластичним штапићем. Прва измјерена екстинкција је E_1 , а последња E_2 .

Укључивањем измјерених вриједности у једначину добија се количина ослобођеног супероксид анјон радикала:

$$\begin{aligned}\Delta E_u &= E_{2u} - E_{1u} \text{ (за узорак)} \\ \Delta E_{sp} &= E_{2sp} - E_{1sp} \text{ (за слијепу пробу)} \\ \Delta E &= \Delta E_u - \Delta E_{sp}\end{aligned}$$

$$\text{nmol O}_2^-/\text{ml ефлуента} = \Delta E / 0,015 \times 1/0,05$$

3.5.4. Одређивање водоник пероксида

Мјерење количине водоник пероксида (H_2O_2) у узорцима коронарног венског ефлуента засновано је на оксидацији фенол црвеног водоник пероксида у реакцији коју катализује пероксидаза из коњске ротквице (Horse Radish PerOxidase - HRPO). У 200 μl коронарног венског ефлуента додаје се 800 μl раствора фенол црвеног (Phenol Red Solution - PRS). PRS садржи 140 mmol NaCl, 10 mmol калијум фосфатног пуфера (pH=7), 5,5 mmol D(+)-глукозе и 0,28 mmol фенол црвеног. Затим се у узорак додаје 10 μl HRPO. Узорци се потом инкубирају на собној температури током 10 минута. Апсорбанца се мјери на таласној дужини $\lambda=610$ nm (121). Као слијепа проба користи се одговарајућа количина Крепс-Хенселејтовог раствора.

Помоћу стандардне криве, одређује се фактор апсорбанце (F) по једном nmol-у водоник пероксида:

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

На основу вредности апсорбанце узорка (A_u) и упоређивања са слијепом пробом (A_{sp}) израчунава се коначна апсорбанца (ΔA) ($A = A_u - A_{sp}$). Укључивањем добијене апсорбанце, фактора F и количине коронарног венског ефлуента употребљеног у есеју (200 μl) израчунава се H_2O_2 у коронарном венском ефлуенту помоћу једначине:

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

3.5.5. Одређивање гликемије

Животињама којима је индукован дијабетес тип 2, као и одговарајућим контролама мјериће се гликемија. Вриједности гликемије одређиваће се из пуне крви, пункцијом репне вене пацова, помоћу *Accu-Chek Performa* (Roche, Germany) глукомера и одговарајућих трачица. Мерењу гликемије увек претходи дванаесточасовно гладовање. Гликемија ће се одређивати прије почетка индукције дијабетеса, 72 сата након апликације стрептозотоцина и непосредно прије жртвовања.

Орални тест оптерећења глукозом је извођен након периода гладовања у трајању од 12 сати. Након иницијалног мјерења гликемије, животињама је оралном гаважом, интрагастрично убризган раствор глукозе (2 g/kg), након чега је одређивана гликемија у 30, 60, 120. и 180. минути. На основу вриједности гликемије, конструисана је крива толеранције глукозе.

3.6. МЈЕРЕЊЕ КРВНОГ ПРИТИСКА

Спонтано хипертензивни пацови (*spontaneously hypertensive rats - SHR*) развијају хипертензију око 4. недеље старости. Крвни притисак је мјерен SHR и одговарајућим контролним групама неинвазивном *tail-cuff* методом. Ова метода подразумјева постављање манжетне на корен репа пацова који је имобилисан и налази се на загријаној подлози. За мјерење крвног притиска употребљен је апарат *IITC Life Science Inc., Los Angeles, CA, USA*). Мерење крвног притиска за сваку животињу је понављано 5 пута, да би се узела средња вриједност.

3.7. ХИСТО-МОРФОЛОШКА АНАЛИЗА ТКИВА МИОКАРДА

По завршетку експерименталног протокола на Лангендорфовом апарату, срца су потапана у 4% раствор пуферованог формалина у коме су остајала 24 сата. Након 24 сата у формалину, урађена је дехидратација ткива миокарда помоћу растућих концентрација етанола (завршна концентрација 96%), а потом је ткиво инкубирано у ксилену у трајању од 60 минута на температури од 70°C. По завршеној инкубацији у ксилену, ткива су потапана у формалин током 24 часа како би се осигурала фиксација ткива. Након прављења парафинских калупа, прављени су пресјеци ткива дебљине 4 μm .

Направљени препарати бојени су хематоксилин/еозин (HE) техником. У овом истраживању употребљен је Мајеров (*Mayer*) протокол за HE бојење. Парафинске секције су најприје загријаване до температуре од 56°C током 45 минута, а потом је урађена рехидратација ткива опадајућим концентрацијама етанола. Ткиво је затим бојено хематоксилином у трајању од 10 минута, а затим испирано дестилованом водом. Након тога ткиво је бојено еозином. По завршеном бојењу, ткиво је поново дехидрисано растућим концентрацијама етанола.

Анализу обојених препарата радио је специјалиста патологије помоћу светлосног микроскопа (*Olympus*, Јапан).

3.8. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Сви резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна грешка (SE). Сви графици и табеле у оквиру дела Резултати урађени су у Microsoft Excel програму. Статистички су анализирани и поређене експерименталне групе и одговарајуће контролне групе, као и

међусобно компатибилне експерименталне групе. За статистичку анализу података коришћена је двосмјерна анализа варијансе (*two-way mixed ANOVA*) или једносмјерна анализа варијансе (*one-way ANOVA*). Имајући у виду да постоји велики број података и тачака од интереса у којима су биљежени подаци, није приказана статистичка анализа свих већ само одабраних тачака од интереса. У групама где је вршено прекондиционирање поређени су посљедњи минут стабилизације, посљедњи минут апликације лијека и посљедњи минут реперфузије, а у групама са посткондиционирањем приказана је статистичка значајност између посљедњег минута стабилизације, петог минута реперфузије (посљедњи минут апликације лијека у реперфузији) и посљедњег минута реперфузије. Статистичка анализа вршена је уз помоћ програма IBM-SPSS, верзија 20. P вриједности мање од 0,05 сматране су за статистички значајне.

IV

РЕЗУЛТАТИ

Резултати овог истраживања су подијељени у двије групе: 1) утицај миноциклина на исхемијско-реперфузиону повреду срца пацова којима је изазван дијабетес типа 2, и 2) утицај миноциклина на исхемијско-реперфузиону повреду срца пацова са хипертензијом.

4.1. Вриједности гликемије и инсулинемије пацова са дијабетесом типа 2

Апликација стрептозотоцина у дози од 25 mg/kg (растовреног у цитратном пуферу) четири недеље након примјене масне исхране (25% масти, 15% протеини, 51% скроб, и 5% влакна) узроковала је значајно повећање вриједности гликемије наште у односу на иницијалне вриједности (График 4.1А). Такође, вриједности инсулинемије су биле статистички значајно више након примјене стрептозотоцина у односу на контролне вриједности (График 4.1Б).

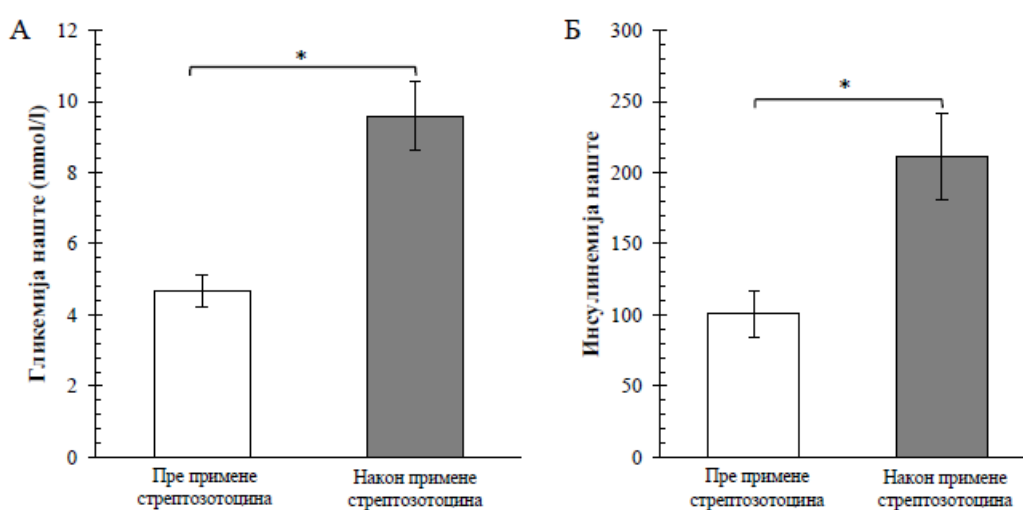


График 4.1. Вриједности гликемије наште прије и након примјене стрептозотоцина у дози од 25 mg/kg.

Вриједности гликемије и инсулинемије измјерене током оралног теста оптерећења глукозом су биле статистички значајно више код животиња са индукованим дијабетесом типа 2 у поређењу са здравим животињама. Тест оралног оптерећења глукозом изведен је интрагастричном апликацијом раствора глукозе (2 g/kg). Вриједности гликемије су мјерене непосредно прије апликације глукозе, а потом у 30., 60., 120. и 180. минути. Вриједности инсулинемије су измјерене непосредно прије апликације глукозе и у 180. минути. Све вриједности гликемије и инсулинемије су биле статистички значајно више у поређењу са здравим животињама (График 4.2А и 4.2Б).

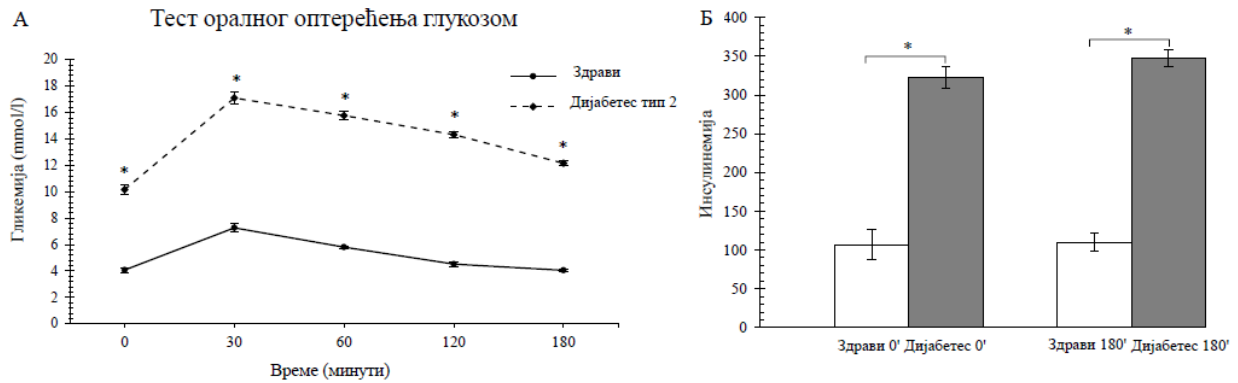


График 4.2. Вриједности гликемије (А) и инсулинемије (Б) током теста оралног оптерећења глукозом.

4.2. Ефекти прекондиционарања миноциклином на кардиодинамске параметре срца пацова са дијабетесом типа 2

Примјена миноциклина је статистички значајно редуковала смањење контрактилне способности срца, рефлектовану кроз параметар $dp/dt \max$ (максимална стопа развоја притиска у лијевој комори). Вриједности $dp/dt \max$ у групама које су прекондициониране миноциклином (здрава срца и срца дијабетичних животиња) на крају периода стабилизације и у последњем минути реперфузије су биле приближне, за разлику од контролних група, у којима је, умјесто миноциклина, као кондиционарајући агенс коришћен физиолошки раствор. На графику 4.3. приказане су вриједности $dp/dt \max$ у свим тачкама мјерења у експерименталном моделу прекондиционарања.

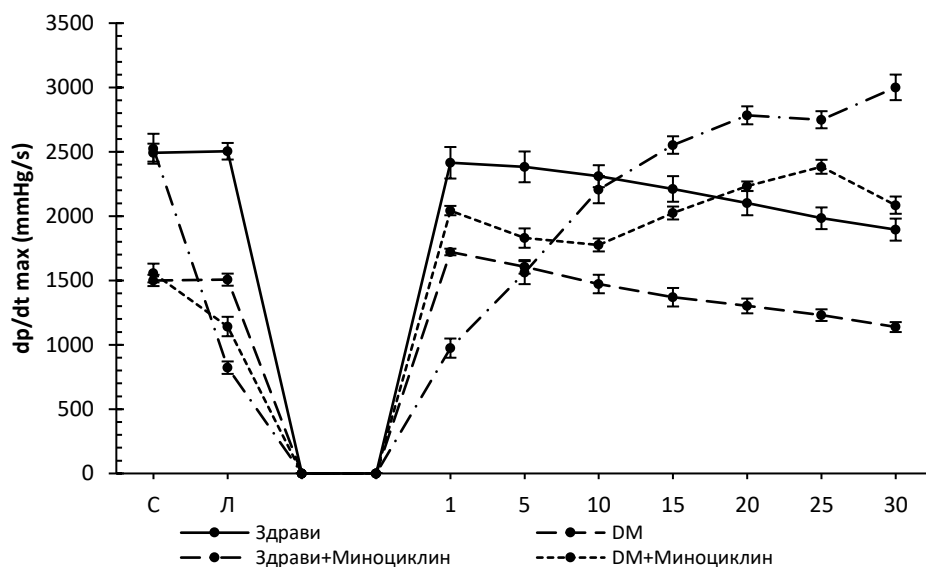


График 4.3. Вриједности максималне стопе промјене притиска у лијевој комори ($dp/dt \max$) у експерименталном моделу прекондиционарања срца здравих и животиња са дијабетесом типа 2. Здрави – срца здравих животиња прекондиционираних физиолошким раствором, DM - срца дијабетичних животиња прекондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин - срца здравих животиња прекондиционираних миноциклином, DM+Миноциклин - срца дијабетичних животиња прекондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: С (стабилизација) – последњи

минут стабилизације, Л (лијек) – последњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је биљежена вриједност $dp/dt \max$.

На графику 4.4. приказане су статистичке значајности између поређених тачака од интереса: последњи минут стабилизације (С), последњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин) (Л) и последњи минут реперфузије (30).

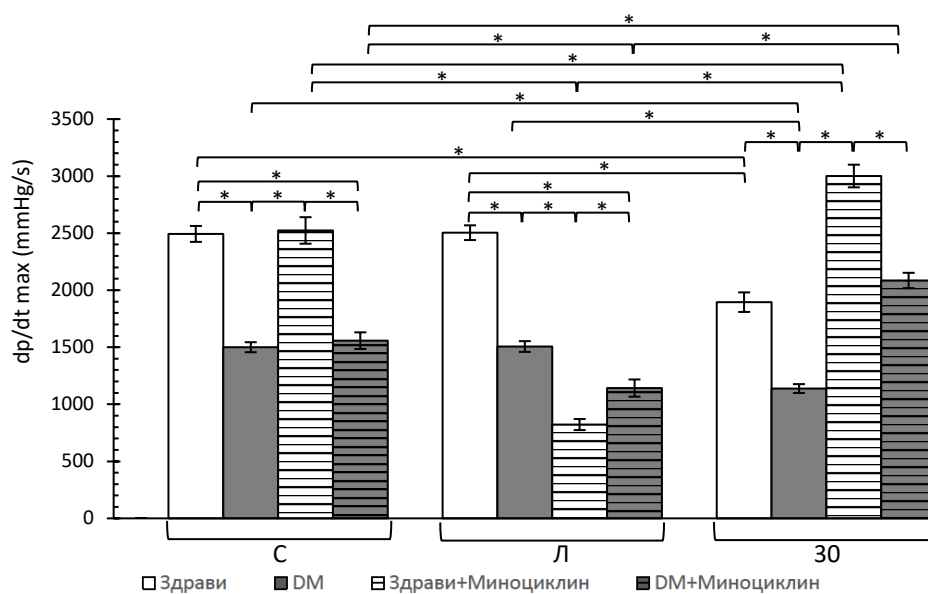


График 4.4. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

Миноциклин у дози од $1 \mu\text{mol/L}$ је статистички значајно смањило минималну стопу промјене притиска у лијевој комори $dp/dt \min$. Вриједности $dp/dt \min$ у групама које су прекондициониране миноциклином (здрава срца и срца дијабетичних животиња) на крају периода стабилизације и у посљедњем минуту реперфузије нису се статистички разликовале, за разлику од група у којима је, уместо миноциклина, као кондиционирајући агенс употребљен физиолошки раствор. На графику 4.5. приказане су вриједности $dp/dt \min$ у свим тачкама мерења у експерименталном моделу прекондиционирања.

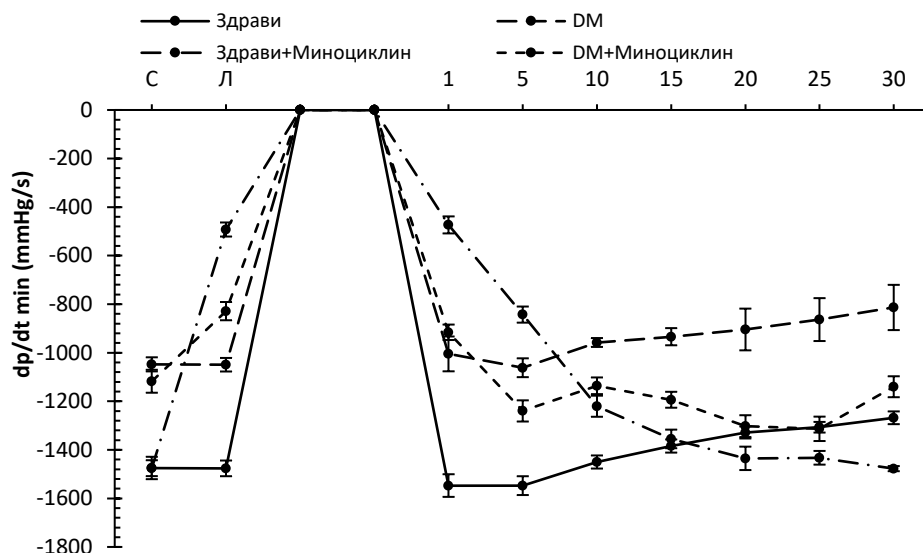


График 4.5. Вриједности минималне стопе промјене притиска у лијевој комори (**dp/dt min**) у експерименталном моделу прекондиционирања срца здравих и животиња са дијабетесом типа 2. Здрави – срца здравих животиња прекондиционираних физиолошким раствором, DM - срца дијабетичних животиња прекондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин - срца здравих животиња прекондиционираних миноциклином, DM+Миноциклин - срца дијабетичних животиња прекондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: С (стабилизација) – посљедњи минут стабилизације, Л (лек) – посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је биљежена вриједност dp/dt min.

На графику 4.6. приказане су статистичке значајности између поређених тачака од интереса: посљедњи минут стабилизације (С), посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин) (Л) и посљедњи минут реперфузије (30). Најзначајнији закључак који се изводи анализом овог параметра је да су вриједности dp/dt min у групама које су прекондиционирани миноциклином на крају реперфузије (30) приближне вриједностима на крају стабилизације. Супротно томе, вриједности dp/dt min на крају реперфузије (30) у групама које су прекондиционирани физиолошким раствором биле су значајно ниже у односу на вриједности на крају стабилизације.

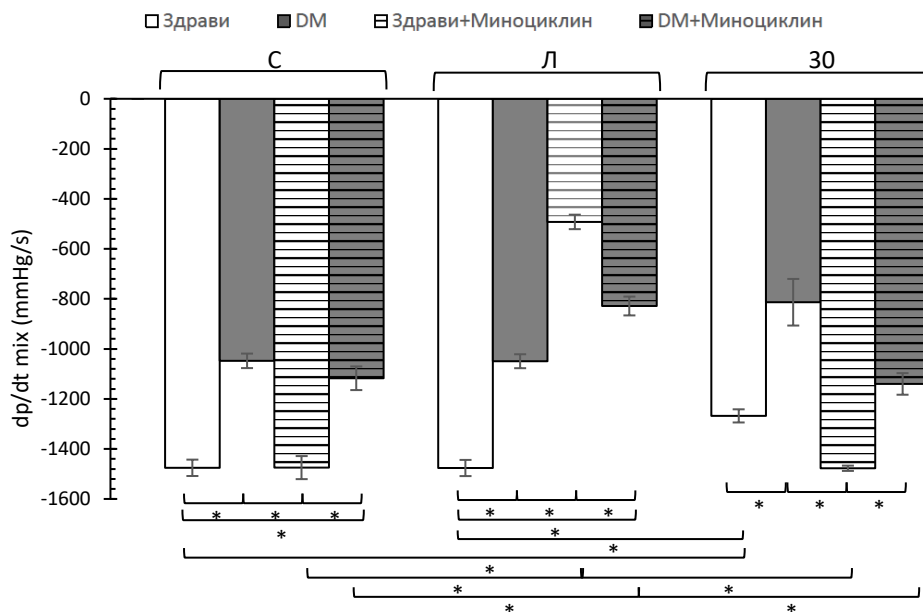


График 4.6. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

На графику 4.7. приказане су промјене вриједности систолног притиска у лијевој комори (SLVP) током читавог експеримента, при чеми је апликација Миноциклина значајно редуковала вриједности SLVP. Поредећи последњи минут реперфузије (30) између група које су прекондициониране физиолошким раствором или Миноциклином закључује се да примјена Миноциклина превенира смањење SLVP током реперфузије.

На графику 4.8. приказане су изабране тачке од интереса за које је анализирана статистичка значајност. Слично, $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$, и вриједности SLVP нису се значајно разликовале између последњег минута стабилизације (C) и последњег минута реперфузије (30) у групама здравих и дијабетичних животиња чија су срца прекондиционирана Миноциклином, за разлику срца здравих и дијабетичних животиња која су прекондиционирана физиолошким раствором.

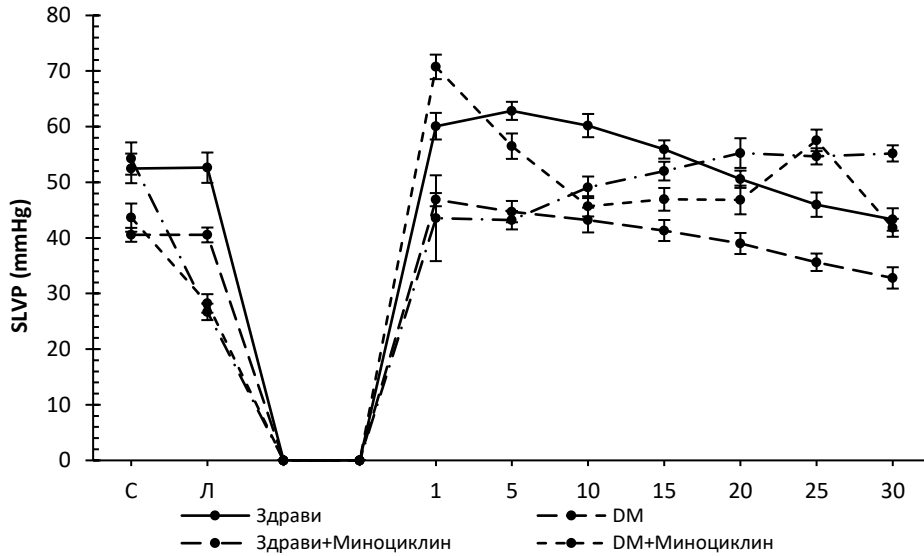


График 4.7. Вриједности систолног притиска у лијевој комори (SLVP) у експерименталном моделу преко кондиционара срца здравих и животиња са дијабетесом типа 2. Здрави – срца здравих животиња преко кондиционараних физиолошким раствором, DM - срца дијабетичних животиња преко кондиционараних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин - срца здравих животиња преко кондиционараних миноциклином, DM+Миноциклин - срца дијабетичних животиња преко кондиционараних миноциклином. Ознаке на X оси: С (стабилизација) – посљедњи минут стабилизације, Л (лијек) – посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је биљежена вриједност SLVP.

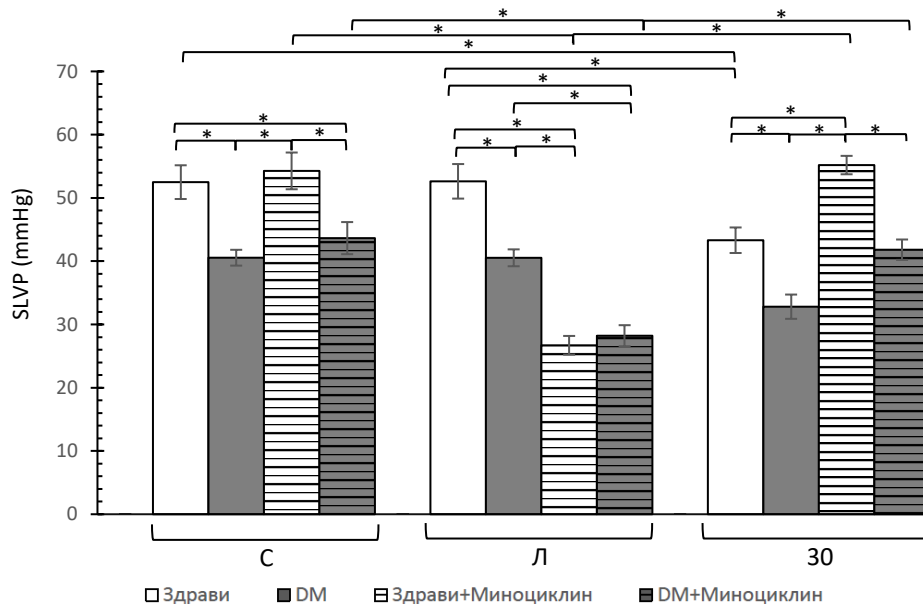


График 4.8. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

На графику 4.9. приказане су вриједности дијастолног притиска у лијевој комори (DLVP) које се нису значајно мијењале током експеримента. Постоје извјесне разлике између група у појединим тачкама од интереса.

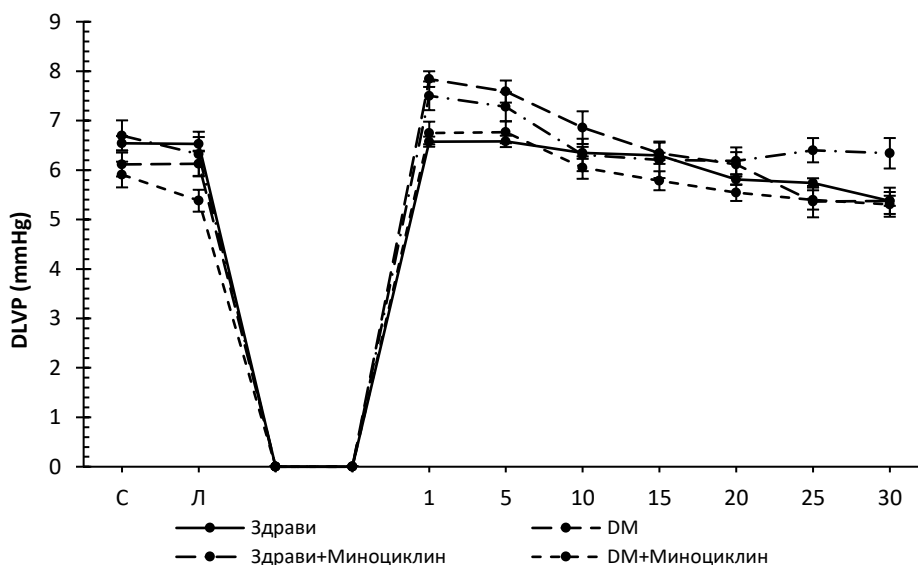


График 4.9. Вриједности дијастолног притиска у лијевој комори (**DLVP**) у експерименталном моделу прекондиционарања срца здравих и животиња са дијабетесом типа 2. Здрави – срца здравих животиња прекондиционираних физиолошким раствором, DM - срца дијабетичних животиња прекондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин - срца здравих животиња прекондиционираних миноциклином, DM+Миноциклин - срца дијабетичних животиња прекондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: С (стабилизација) – посљедњи минут стабилизације, Л (лијек) – посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је биљежена вриједност DLVP.

На графику 4.10. приказане су статистичке значајности за изабране тачке од интереса за параметар дијастолни притисак у лијевој комори (DLVP).

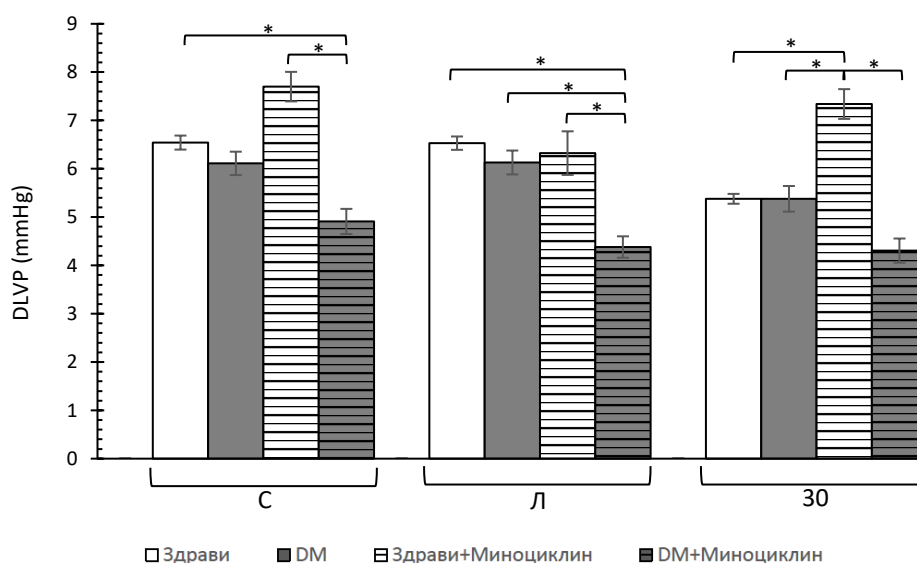


График 4.10. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

На графику 4.11. приказан је утицај исхемије и реперфузије на срчану фреквенцију, при чему је прекондиционирање миноциклином показало протективни ефекат. Наиме, и здрава и дијабетична срца прекондиционирана миноциклином одржала су срчану фреквенцију на вријдностима које су приближне почетним, за разлику од група где је прекондиционирање вршено физиолошким раствором.

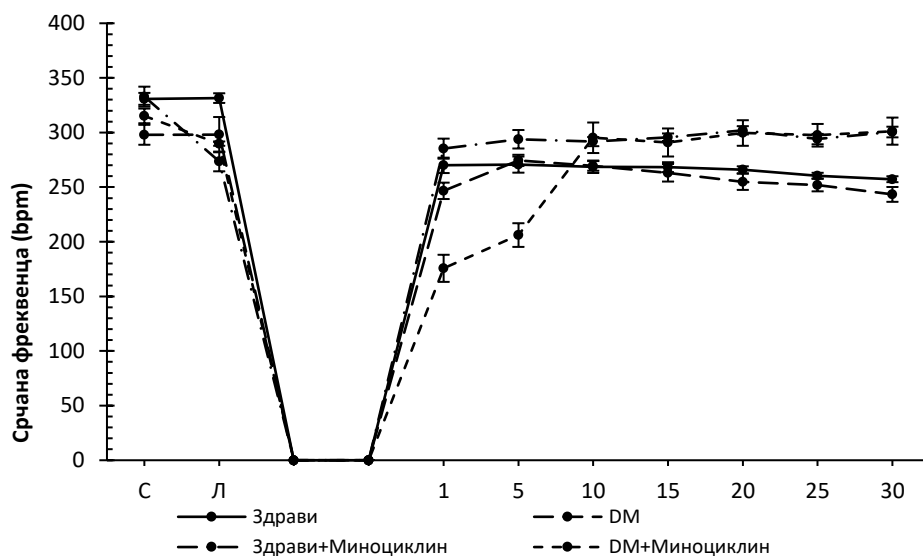


График 4.11. Вриједности срчане фреквенце у експерименталном моделу прекондиционирања срца здравих и животиња са дијабетесом типа 2. Здрави – срца здравих животиња прекондиционираних физиолошким раствором, DM - срца дијабетичних животиња прекондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин - срца здравих животиња прекондиционираних миноциклином, DM+Миноциклин - срца дијабетичних животиња прекондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: С (стабилизација) – последњи минут стабилизације, Л (лијек) – последњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је биљежена вриједност срчане фреквенце.

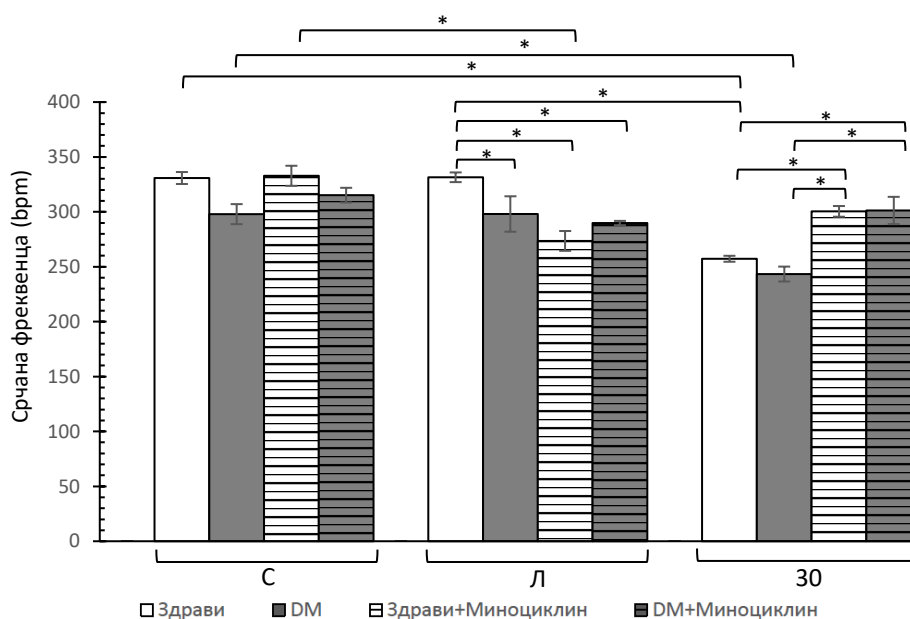


График 4.12. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

На графику 4.12. приказане су статистичке значајности између појединих група и изабраних тачака од интереса за срчану фреквенцију. Као што је већ наглашено, срчана фреквенција у групама у којима је миноциклин примјењен током прекондиционарања је на крају реперфузије остала на вриједностима које се нису значајно разликовале у односу на последњи минут реперфузије.

На графику 4.13. приказане су вриједности коронарног протока након исхемијско-реперфузионе повреде, као и заштитне могућности миноциклина. Слично претходно приказаним параметрима, примјена миноциклина је имала за резултат очување вриједности коронарног протока током реперфузије, тако да се вриједности на крају реперфузије (30) нису значајно разликовале у односу на вриједности у последњем минуту стабилизације (С). Супротно томе, у групама у којима су срца прекондиционирана физиолошким раствором вриједности коронарног протока су биле значајно ниже у односу на почетне вриједности.

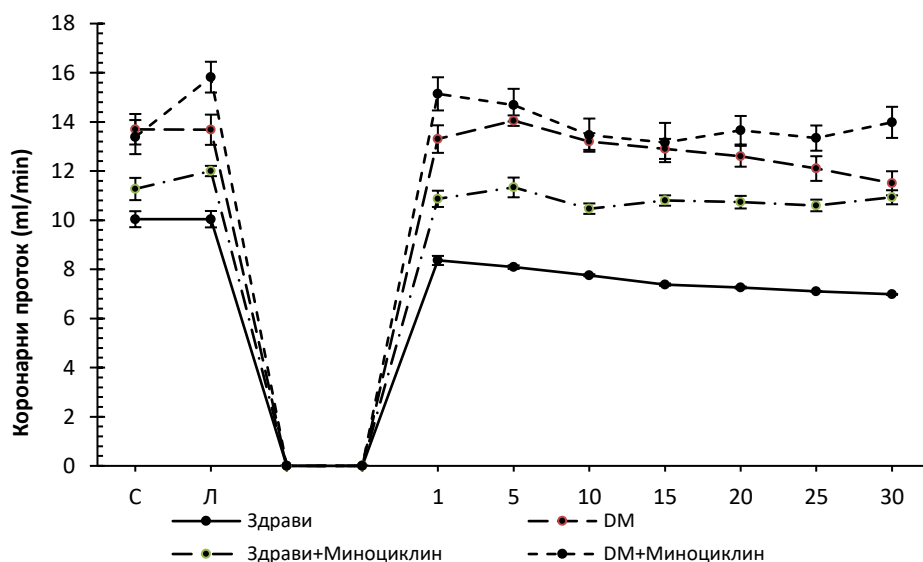


График 4.13. Вриједности коронарног протока у експерименталном моделу прекондиционарања срца здравих и животиња са дијабетесом типа 2. Здрави – срца здравих животиња прекондиционираних физиолошким раствором, DM - срца дијабетичних животиња прекондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин - срца здравих животиња прекондиционираних миноциклином, DM+Миноциклин - срца дијабетичних животиња прекондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: С (стабилизација) – последњи минут стабилизације, Л (лијек) – последњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је биљежена вриједност коронарног протока.

На графику 4.14. приказане су изабране тачке од интереса за које је анализирана статистичка значајност. Најзначајни закључак који се добија анализом упоређених вриједности је да миноциклин ефикасно штити од исхемијско-реперфузионог оштећења како здрава, тако и срца пацова са дијабетесом типа 2.

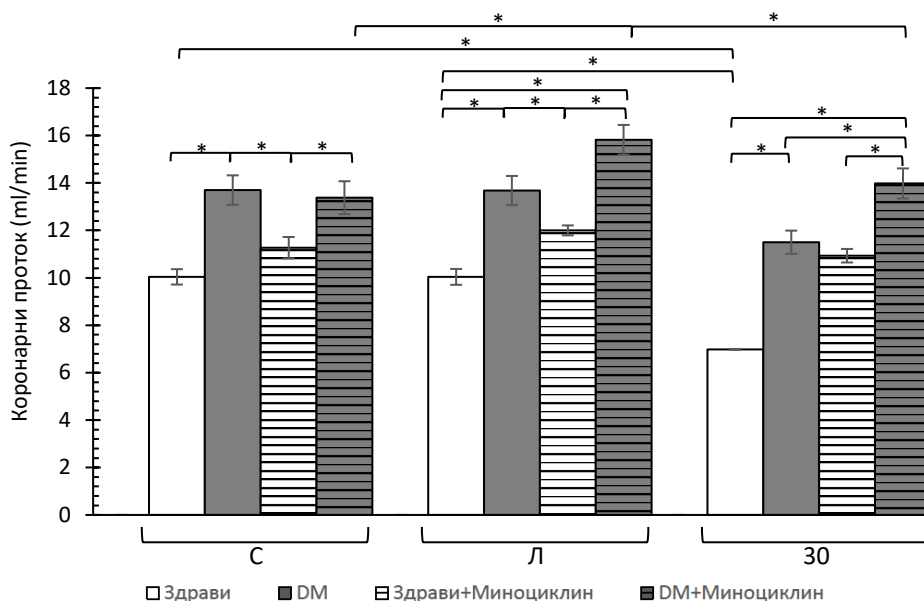


График 4.14. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

4.3. Ефекти посткондиционирања миноциклином на кардиодинамске параметре срца пацова са дијабетесом типа 2

Посткондиционирање миноциклином у дози од 1 $\mu\text{mol/L}$ је значајно унаприједило контрактилност миокарда током реперфузије (график 4.15.). Примјена миноциклина током првих пет минута реперфузије узроковала је унапређење контрактилне функције срца, тако да је максимална стопа повећања притиска у лијевој комори ($dp/dt \text{ max}$) била значајно виша на крају реперфузије (30) у односу на последњи минут стабилизације (C). У групама у којима је уместо миноциклина примјењен физиолошки раствор вриједност $dp/dt \text{ max}$ је била значајно нижа на крају реперфузије (30) у односу на стабилизацију (график 4.15.).

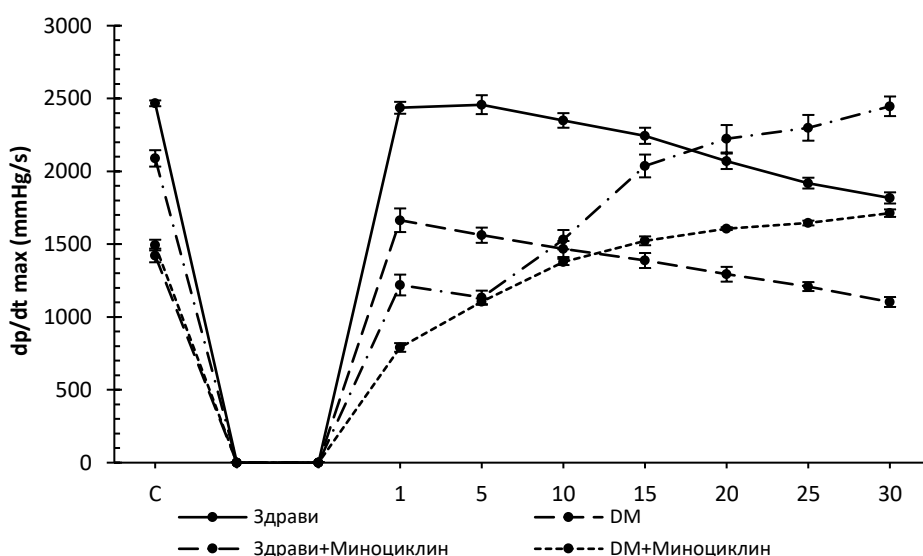


График 4.15. Вриједности максималне стопе промене притиска у лијевој комори ($dp/dt \text{ max}$) у експерименталном моделу посткондиционирања срца здравих и животиња са

дијабетесом типа 2. Здрави – срца здравих животиња прекондиционирана физиолошким раствором, DM - срца дијабетичних животиња прекондиционирана физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин - срца здравих животиња прекондиционирана миноциклином, DM+Миноциклин - срца дијабетичних животиња прекондиционирана миноциклином. Ознаке на X оси: С (стабилизација) – последњи минут стабилизације, 5 – пети минут реперфузије и уједно последњи минут апликације лека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је биљежена вриједност $dp/dt \max$.

На графику 4.16. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: последњи минут стабилизације (С), последњи минут посткондиционарања, уједно и пети минут реперфузије (5) и последњи минут реперфузије (30).

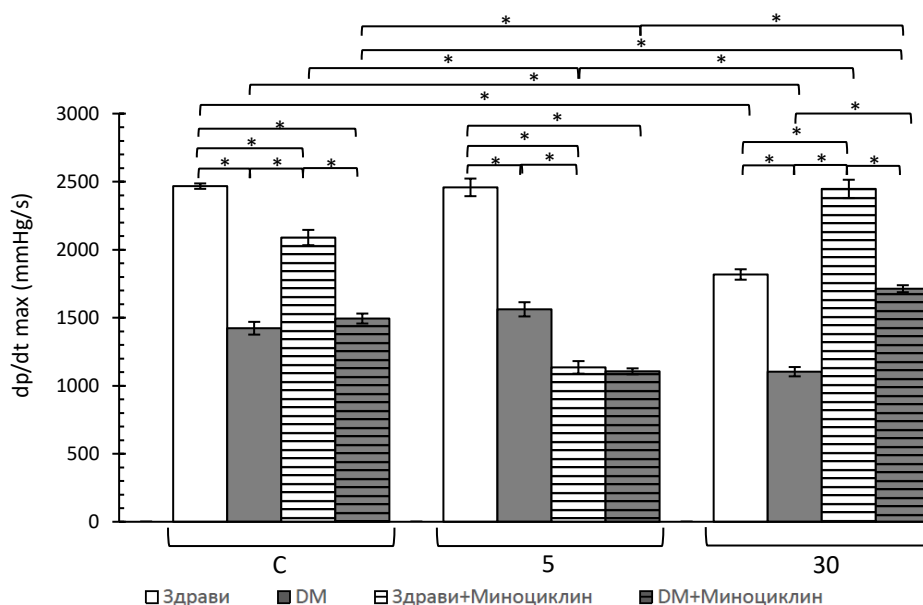


График 4.16. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

Уочава се да је након посткондиционарања миноциклином вриједност $dp/dt \max$ виша у последњем минуту реперфузије у односу на почетне вриједности, за разлику од група гдје је посткондиционарање вршено физиолошким раствором и у којима су вриједности $dp/dt \max$ значајно ниже у последњем минуту реперфузије у односу на почетне вриједности. Такође, уочава се да је су вриједности $dp/dt \max$ значајно ниже у групама са дијабетесом у односу на нормогликемичне групе.

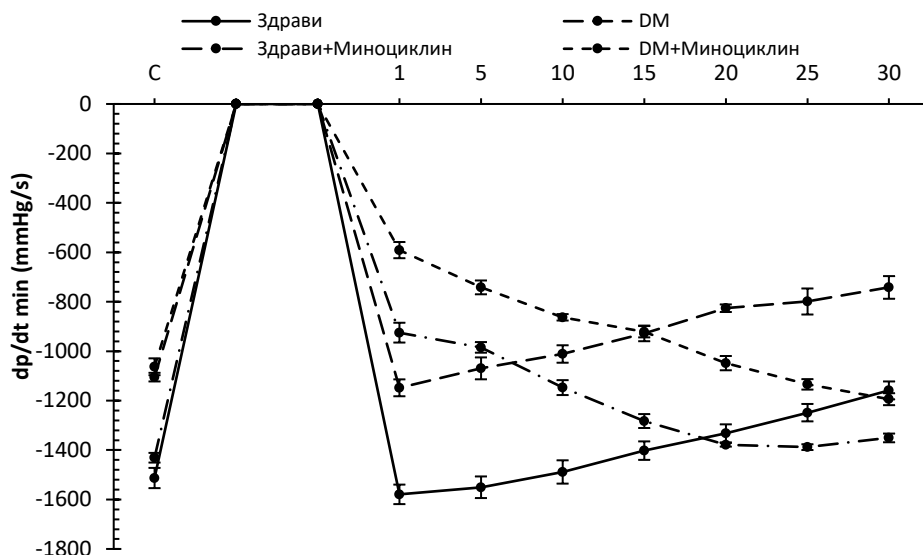


График 4.17. Вриједности минималне стопе промјене притиска у лијевој комори ($dp/dt \text{ min}$) у експерименталном моделу посткондиционарања срца здравих и животиња са дијабетесом типа 2. Здрави – срца здравих животиња прекондиционирана физиолошким раствором, DM - срца дијабетичних животиња прекондиционирана физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин - срца здравих животиња прекондиционирана миноциклином, DM+Миноциклин - срца дијабетичних животиња прекондиционирана миноциклином. Ознаке на X оси: C (стабилизација) – посљедњи минут стабилизације, 5 – пети минут реперфузије и уједно посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је биљежена вриједност $dp/dt \text{ min}$.

На графику 4.18. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: посљедњи минут стабилизације (C), посљедњи минут посткондиционарања, уједно и пети минут реперфузије (5) и посљедњи минут реперфузије (30).

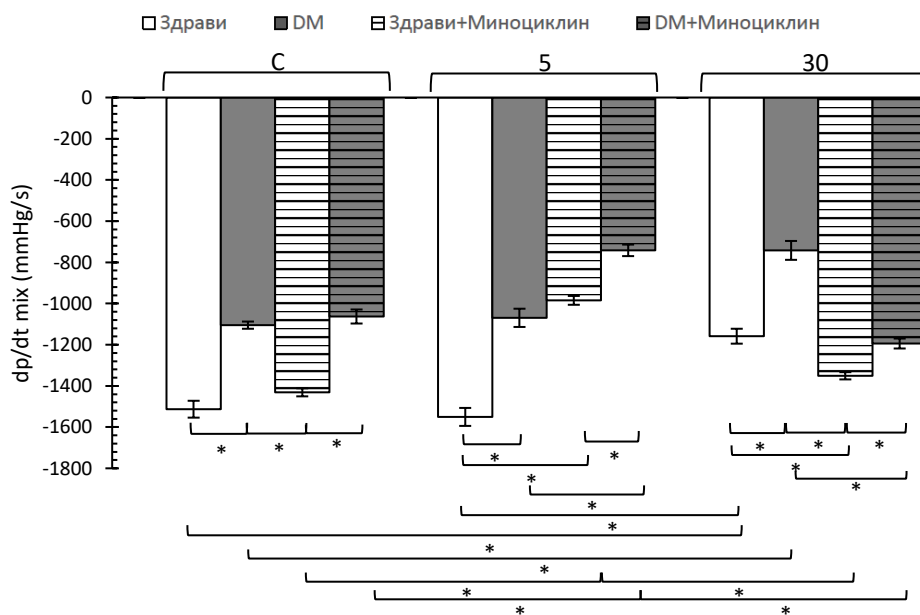


График 4.18. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

Слично претходном параметру, посматрајући промјене вриједности $dp/dt \min$ и статистичке значајности, уочава се да примјена миноциклина као посткондиционог агенса превенира смањење вриједности током реперфузије. У обје групе срца посткондиционираних миноциклином, здрава и дијабетична, вриједности $dp/dt \min$ на крају реперфузије слична су вриједностима на крају стабилизације.

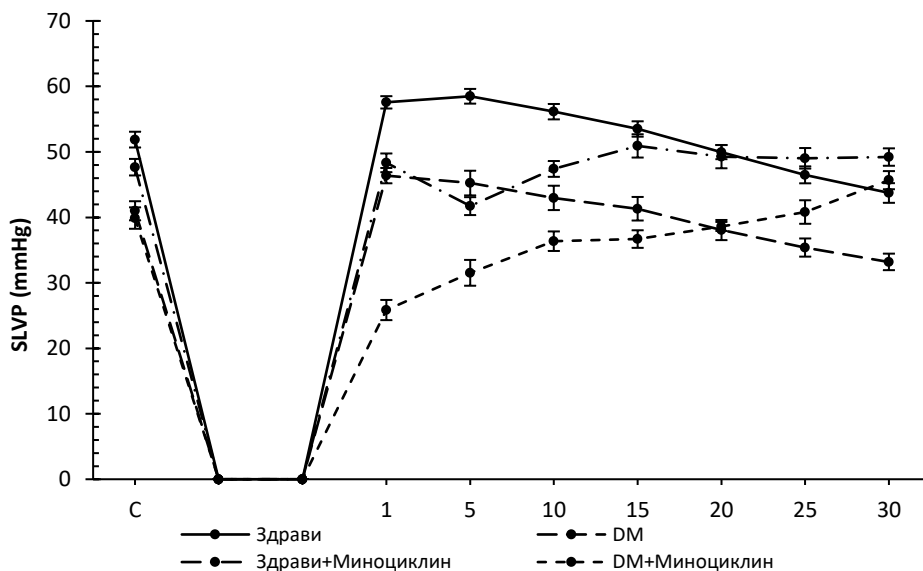


График 4.19. Вриједности систолног притиска у лијевој комори (SLVP) у експерименталном моделу посткондиционирања срца здравих и животиња са дијабетесом типа 2. Здрави – срца здравих животиња прекондиционирана физиолошким раствором, DM - срца дијабетичних животиња прекондиционирана физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин - срца здравих животиња прекондиционирана миноциклином, DM+Миноциклин - срца дијабетичних животиња прекондиционирана миноциклином. Ознаке на X оси: C (стабилизација) – посљедњи минут стабилизације, 5 – пети минут реперфузије и уједно посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је биљежена вриједност SLVP.

На графику 4.20. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: посљедњи минут стабилизације (C), посљедњи минут посткондиционирања, уједно и пети минут реперфузије (5) и посљедњи минут реперфузије (30), за параметар SLVP. Посткондиционирање миноциклином предупредило је смањење вриједности SLVP током реперфузије како у групи здравих, тако и у групи дијабетичних срца. Супротно томе, у групама где је посткондиционирање срца вршено физиолошким раствором вриједности SLVP су значајно ниже на крају реперфузије (30) у односу на последњи минут стабилизације (C).

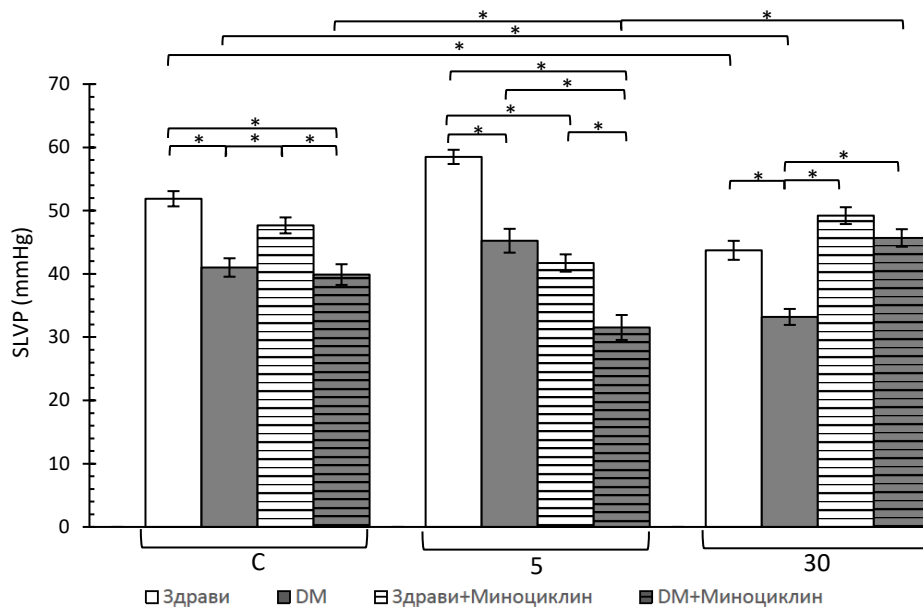


График 4.20. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

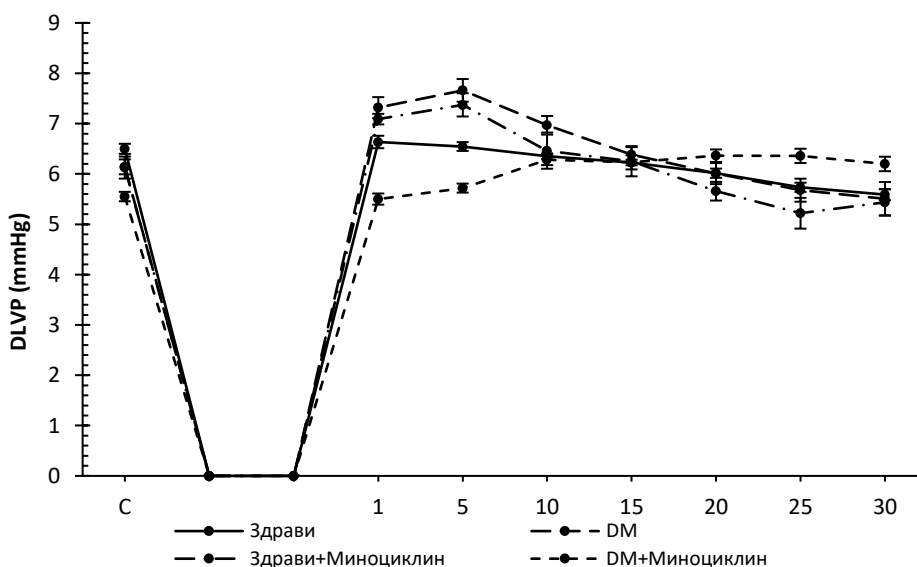


График 4.21. Вриједности дијастолног притиска у лијевој комори (DLVP) у експерименталном моделу посткондиционирања срца здравих и животиња са дијабетесом типа 2. Здрави – срца здравих животиња прекондиционирана физиолошким раствором, DM - срца дијабетичних животиња прекондиционирана физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин - срца здравих животиња прекондиционирана миноциклином, DM+Миноциклин - срца дијабетичних животиња прекондиционирана миноциклином. Ознаке на X оси: C (стабилизација) – посљедњи минут стабилизације, 5 – пети минут реперфузије и уједно посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је биљежена вриједност DLVP.

На графику 4.22. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: последњи минут стабилизације (C), последњи минут посткондиционарања, уједно и пети минут реперфузије (5) и последњи минут реперфузије (30), за параметар DLVP.

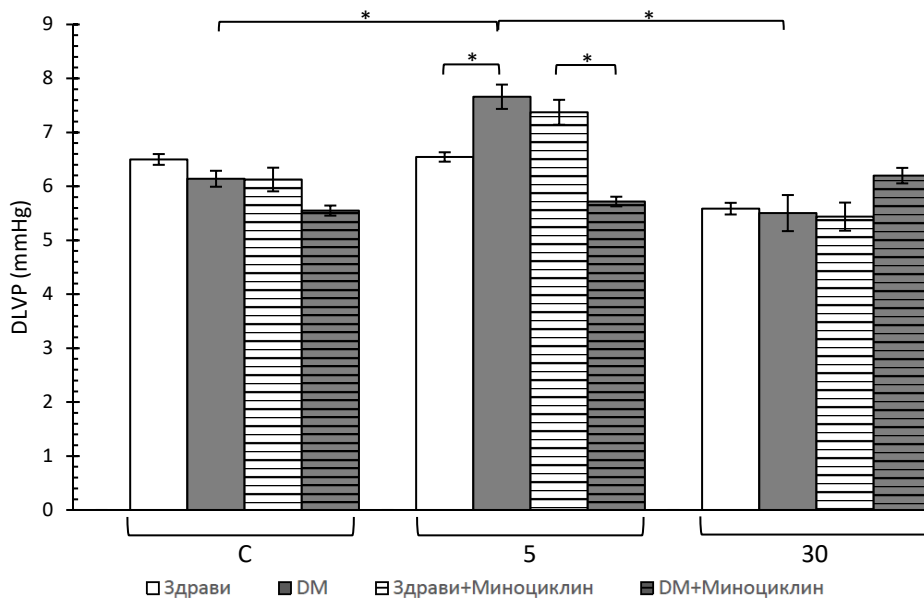


График 4.22. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

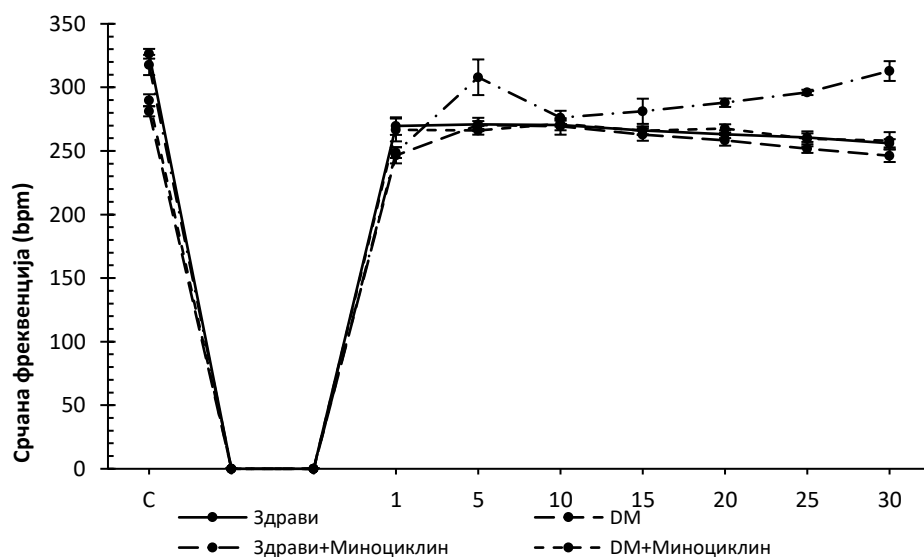


График 4.23. Вриједности срчане фреквенције (**Heart Rate - HR**) у експерименталном моделу посткондиционарања срца здравих и животиња са дијабетесом типа 2. Здрави – срца здравих животиња прекондиционирана физиолошким раствором, DM - срца дијабетичних животиња прекондиционирана физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин - срца здравих животиња прекондиционирана миноциклином, DM+Миноциклин - срца дијабетичних животиња прекондиционирана миноциклином. Ознаке на X оси: C (стабилизација) – последњи минут стабилизације, 5 – пети минут

реперфузије и уједно посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је биљежена вриједност HR.

На графику 4.24. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: посљедњи минут стабилизације (C), посљедњи минут посткондиционирања, уједно и пети минут реперфузије (5) и посљедњи минут реперфузије (30), за параметар HR. Постокондиционирање миноциклином одржало је вриједности HR током реперфузије како у групи здравих, тако и у групи дијабетичних срца. Супротно томе, у групама где је посткондиционирање срца вршено физиолошким раствором вриједности HR су значајно ниже на крају реперфузије (30) у односу на посљедњи минут стабилизације (C).

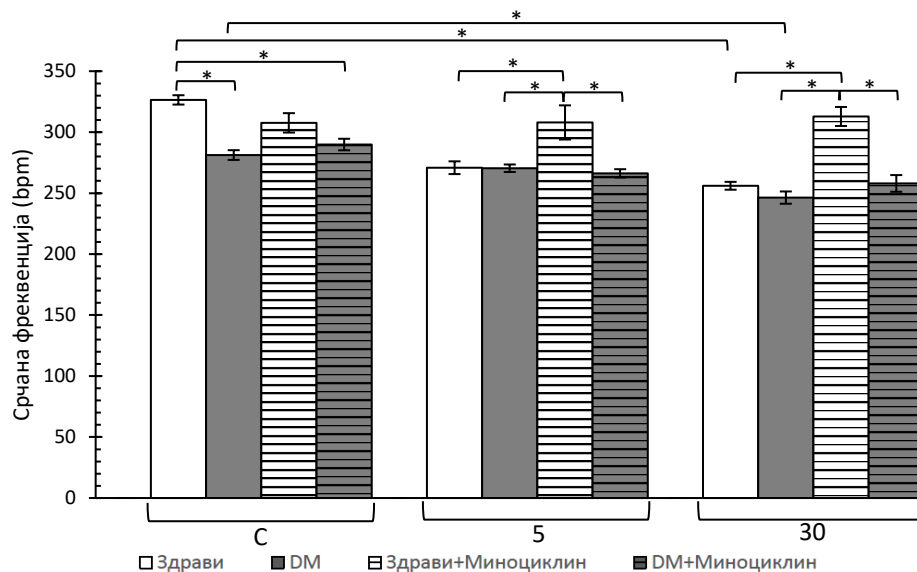


График 4.24. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

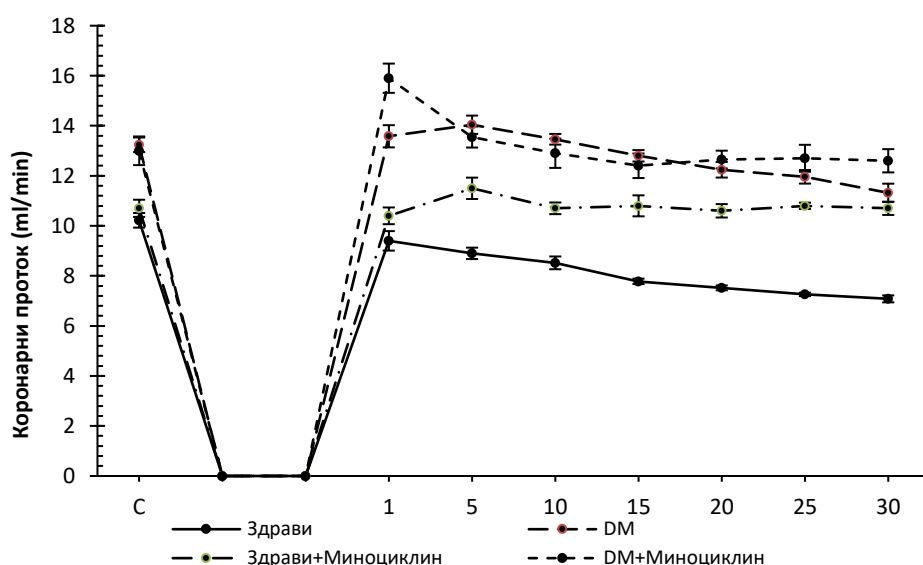


График 4.25. Вриједности коронарног протока (Coronary Flow - CF) у експерименталном моделу посткондиционирања срца здравих и животиња са

дијабетесом типа 2. Здрави – срца здравих животиња прекондиционирана физиолошким раствором, DM - срца дијабетичних животиња прекондиционирана физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин - срца здравих животиња прекондиционирана миноциклином, DM+Миноциклин - срца дијабетичних животиња прекондиционирана миноциклином. Ознаке на X оси: С (стабилизација) – посљедњи минут стабилизације, 5 – пети минут реперфузије и уједно посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је биљежена вриједност CF.

На графику 4.26. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: посљедњи минут стабилизације (С), посљедњи минут посткондиционирања, уједно и пети минут реперфузије (5) и посљедњи минут реперфузије (30), за параметар CF. Вредности CF у групама, и здравих и групи дијабетичних срца, које се посткондиционирају миноциклином одржале су се током реперфузије на вриједностима које су приближне почетним, за разлику од група где је прекондиционирање вршено физиолошким раствором.

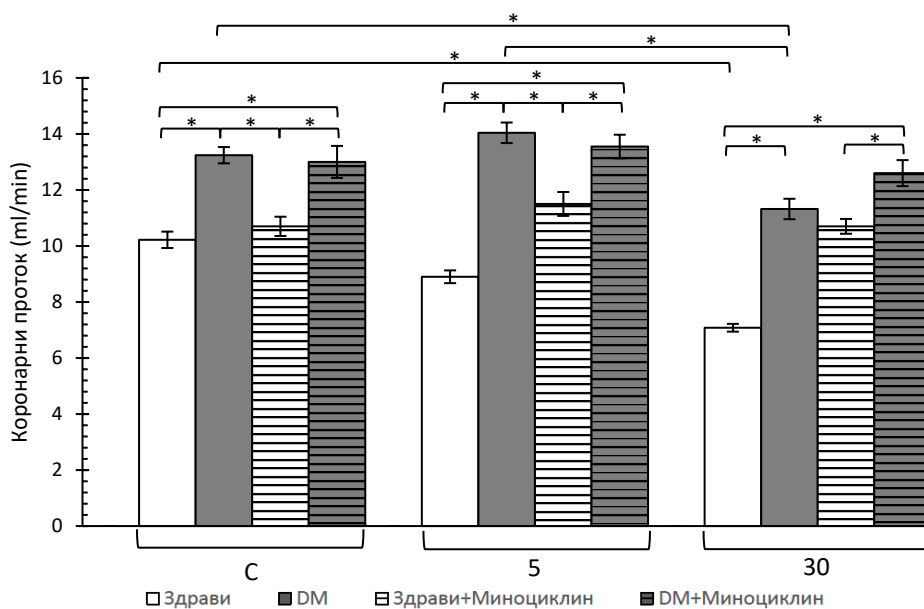


График 4.26. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

4.4. Ефекти прекодиционарања миноциклином на биомаркере оксидационог стреса у коронарном венском ефуленту срца пацова са дијабетесом типа 2

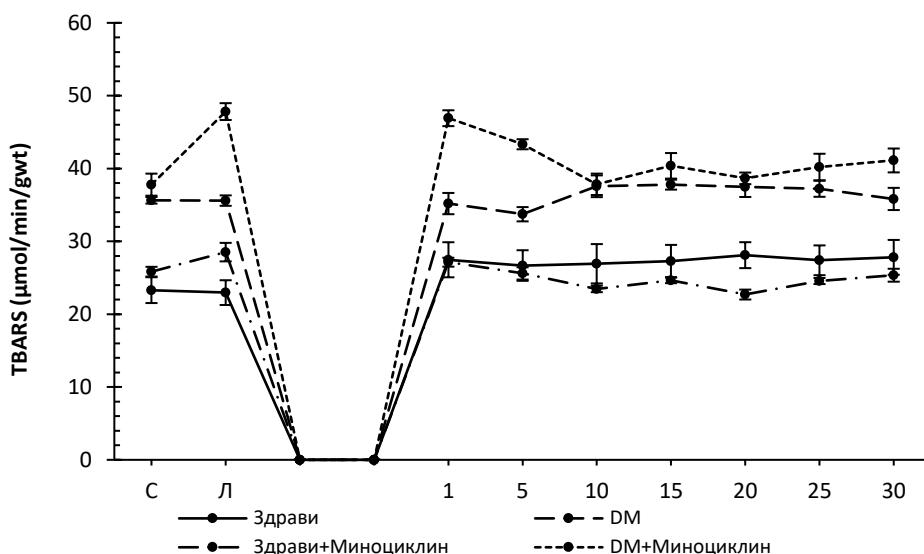


График 4.27. Вриједности индекса липидне пероксидације мјереног као TBARS (TBARS) у експерименталном моделу прекодиционарања срца здравих и животиња са дијабетесом типа 2. Здрави – срца здравих животиња прекодиционараних физиолошким раствором, DM - срца дијабетичних животиња прекодиционараних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин - срца здравих животиња прекодиционараних миноциклином, DM+Миноциклин - срца дијабетичних животиња прекодиционараних миноциклином. Ознаке на X оси: С (стабилизација) – посљедњи минут стабилизације, Л (лијек) – посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је узиман узорак коронарног венског ефулента за одређивање вриједности TBARS.

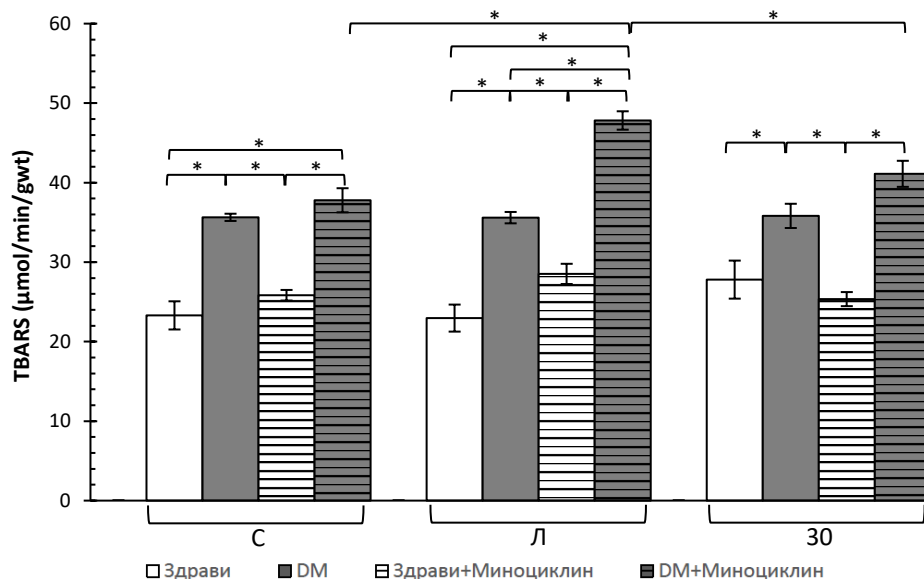


График 4.28. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

На графику 4.28. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: последњи минут стабилизације (С), последњи минут апликације лијека, миноциклин или физиолошки раствор (Л) и последњи минут реперфузије (30). Уочава се да нема статистички значајних разлика у вриједностима TBARS између вриједности у последњем минуту стабилизације (С) и последњем минуту реперфузије (30).

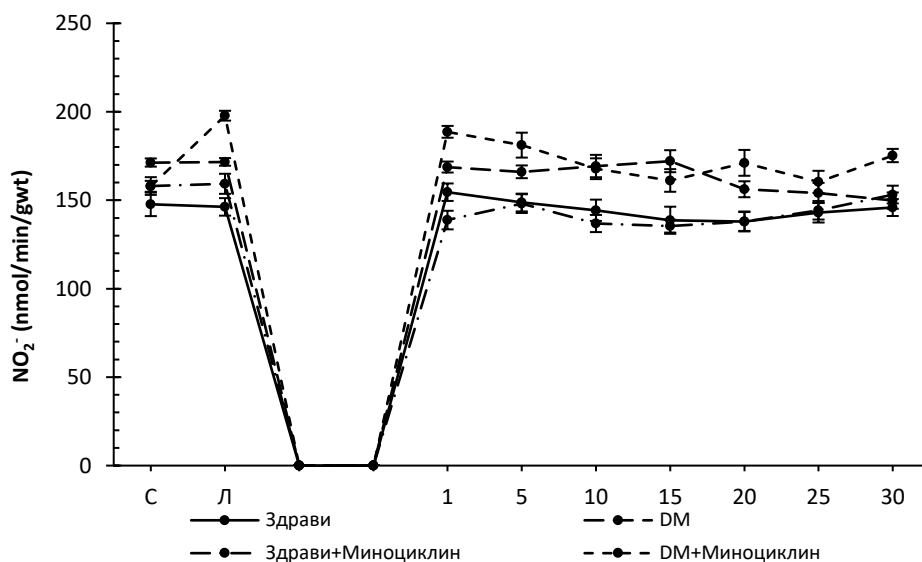


График 4.29. Вриједности нитрита (NO_2^-) у експерименталном моделу прекондиционирања срца здравих и животиња са дијабетесом типа 2. Здрави – срца здравих животиња прекондиционираних физиолошким раствором, DM - срца дијабетичних животиња прекондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин - срца здравих животиња прекондиционираних миноциклином, DM+Миноциклин - срца дијабетичних животиња прекондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: С (стабилизација) – последњи минут стабилизације, Л (лијек) – последњи минут апликације лека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је узиман узорак коронарног венског ефлуента за одређивање вриједности NO_2^- .

На графику 4.30. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: последњи минут стабилизације (С), последњи минут апликације лијека, миноциклин или физиолошки раствор (Л) и последњи минут реперфузије (30). Уочава се да нема статистички значајних разлика у вриједностима NO_2^- између вриједности у последњем минуту стабилизације (С) и последњем минуту реперфузије (30), изузев у групи дијабетичних срца прекондиционираних физиолошким раствором гдје су вриједности NO_2^- биле значајно ниже у последњем минуту реперфузије (30) у односу на последњи минут стабилизације (С).

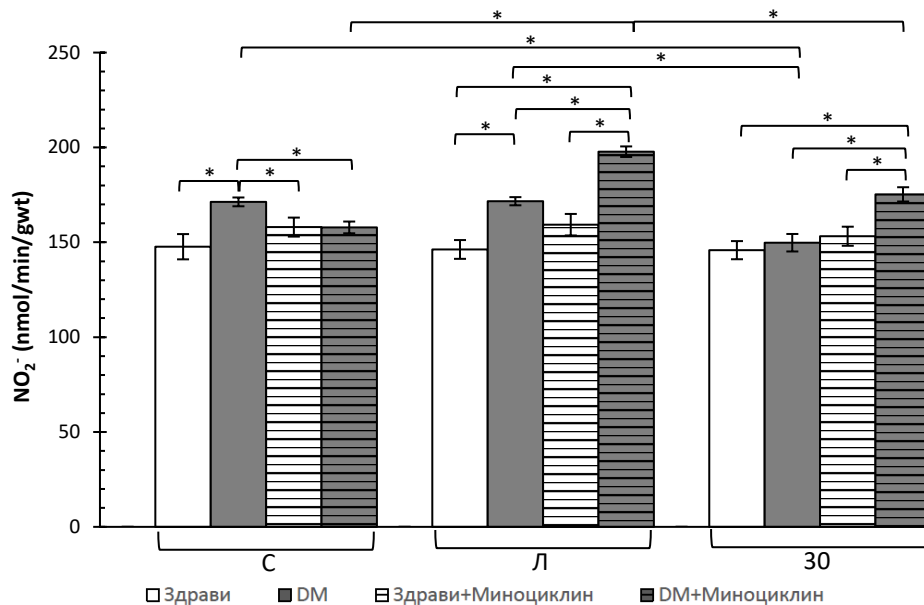


График 4.30. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

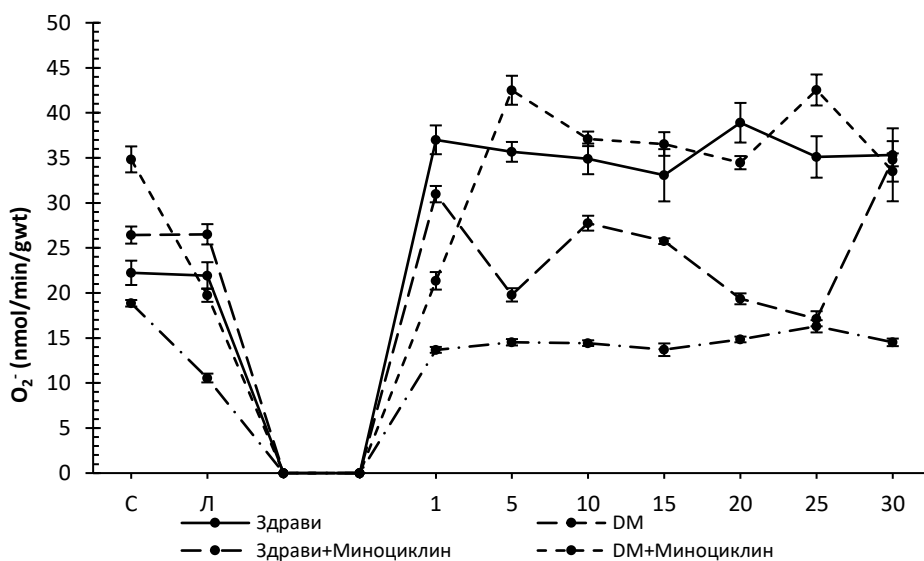


График 4.31. Вриједности супероксид анијон радикала (O₂⁻) у експерименталном моделу прекондиционарања срца здравих и животиња са дијабетесом типа 2. Здрави – срца здравих животиња прекондиционираних физиолошким раствором, DM - срца дијабетичних животиња прекондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин - срца здравих животиња прекондиционираних миноциклином, DM+Миноциклин - срца дијабетичних животиња прекондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: С (стабилизација) – посљедњи минут стабилизације, Л (лијек) – посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је узиман узорак коронарног венског ефлуента за одређивање вриједности O₂⁻.

На графику 4.32. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: посљедњи минут стабилизације (С), посљедњи минут апликације лијека,

миноциклин или физиолошки раствор (Л) и посљедњи минут реперфузије (30). Вриједности O_2^- су значајно веће у дијабетичним срцима, при чему миноциклин смањује продукцију O_2^- (тачка Л у групама које су прекондициониране миноциклином). Такође, у групама које су прекондициониране миноциклином вриједности O_2^- на крају реперфузије (30) су сличне вриједностима на крају стабилизације (С). Супротно томе, у групама које су прекондициониране физиолошким раствором вриједности O_2^- су значајно веће на крају реперфузије (30) у односу на посљедњи минут стабилизације (С).

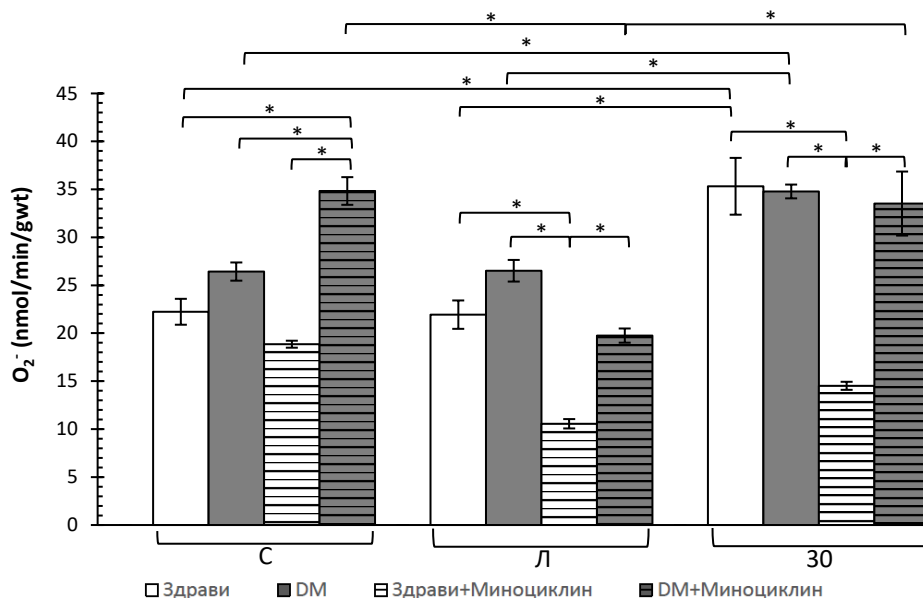


График 4.32. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

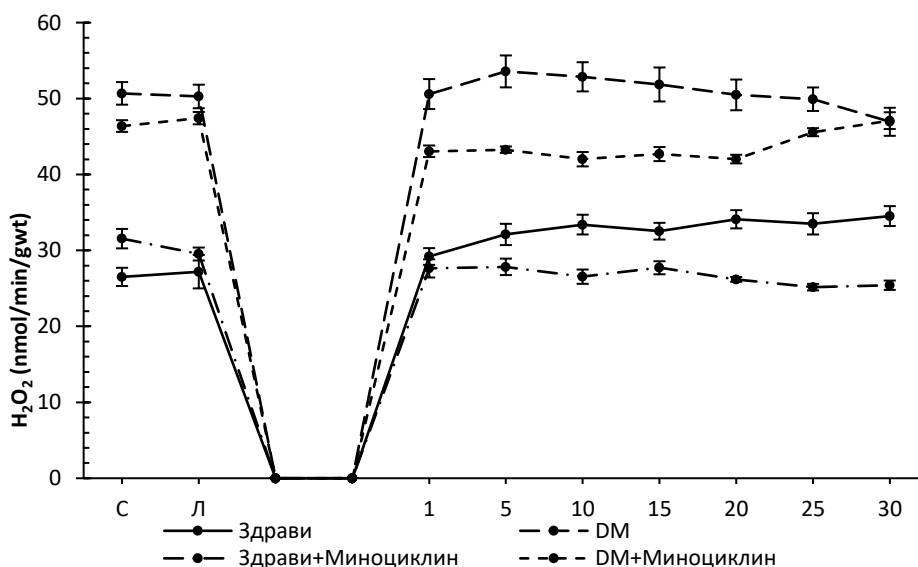


График 4.33. Вриједности водоник пероксида (H_2O_2) у експерименталном моделу прекондиционарања срца здравих и животиња са дијабетесом типа 2. Здрави – срца здравих животиња прекондиционираних физиолошким раствором, DM - срца дијабетичних животиња прекондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин - срца здравих животиња прекондиционираних миноциклином,

DM+Миноциклин - срца дијабетичних животиња прекондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: С (стабилизација) – последњи минут стабилизације, Л (лијек) – последњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је узиман узорак коронарног венског ефлуента за одређивање вриједности H_2O_2 .

На графику 4.34. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: последњи минут стабилизације (С), последњи минут апликације лијека, миноциклин или физиолошки раствор (Л) и последњи минут реперфузије (30). Вриједности H_2O_2 су значајно веће у групама дијабетичних срца у односу на здрава, али се вриједности H_2O_2 нису значајно мијењале током експеримента.

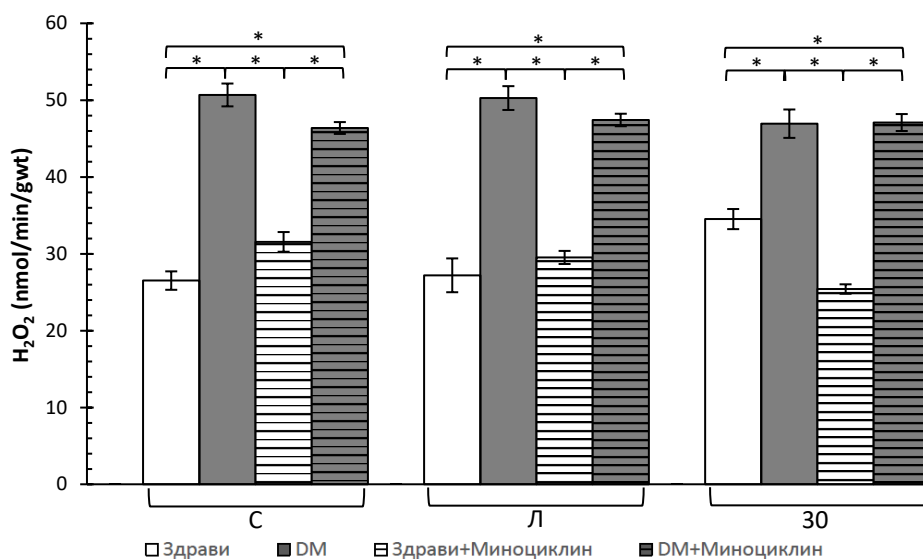


График 4.34. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

4.5. Ефекти посткондиционирања миноциклином на биомаркере оксидационог стреса у коронарном венском ефуленту срца пацова са дијабетесом типа 2

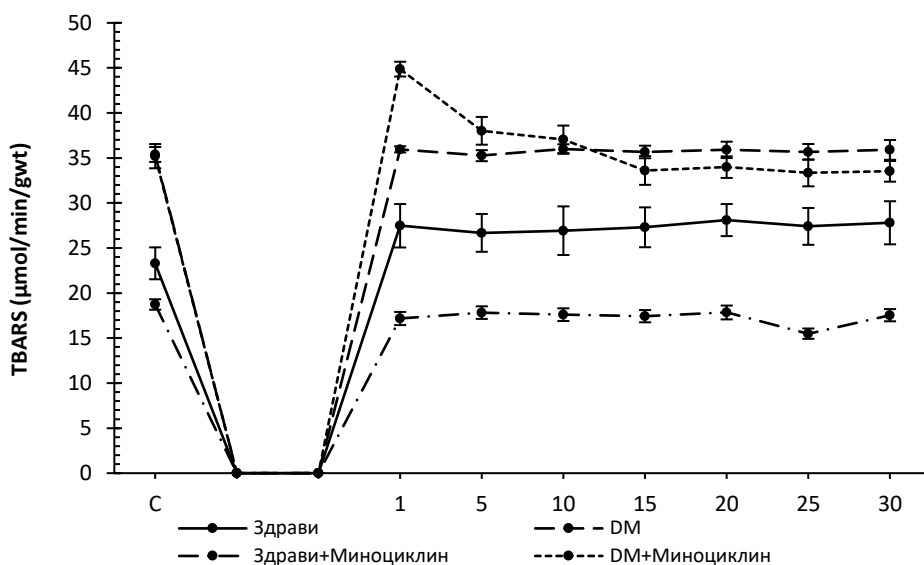


График 4.35. Вриједности индекса липидне пероксидације мјереног као TBARS (TBARS) у експерименталном моделу посткондиционирања срца здравих и животиња са дијабетесом типа 2. Здрави – срца здравих животиња прекондиционираних физиолошким раствором, DM - срца дијабетичних животиња прекондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин - срца здравих животиња прекондиционираних миноциклином, DM+Миноциклин - срца дијабетичних животиња прекондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: C (стабилизација) – последњи минут стабилизације, 5 – пети минут реперфузије и уједно последњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је узиман узорак коронарног венског ефулента за одређивање вриједности TBARS.

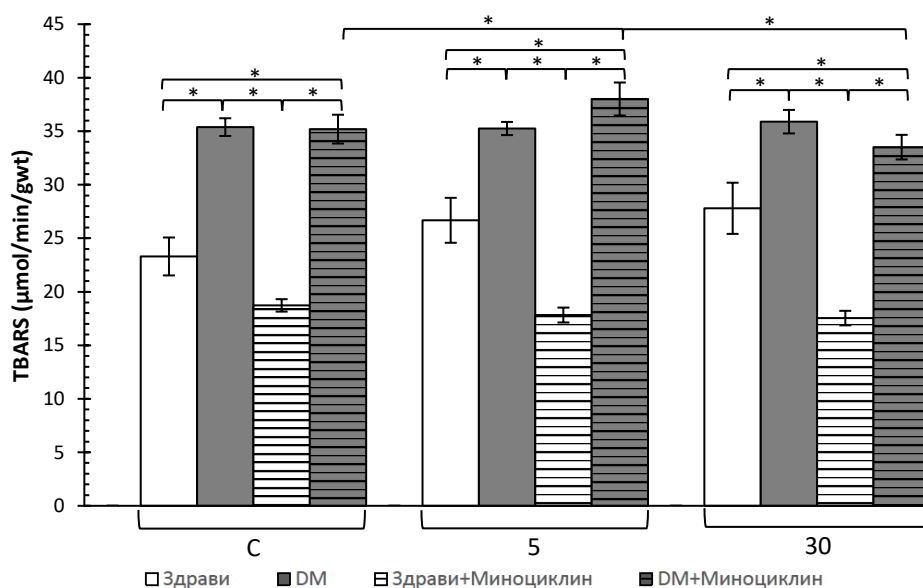


График 4.36. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

На графику 4.36. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: посљедњи минут стабилизације (C), посљедњи минут посткондиционарања, уједно и пети минут реперфузије (5) и посљедњи минут реперфузије (30) за вриједности TBARS. Вриједности TBARS се нису значајно мијењале током експеримента ни у једној групи, изузев у групи дијабетичних срца посткондиционираних миноциклином, али се вриједности између посљедњег минута стабилизације (C) и краја реперфузије нису значајно разликовале.

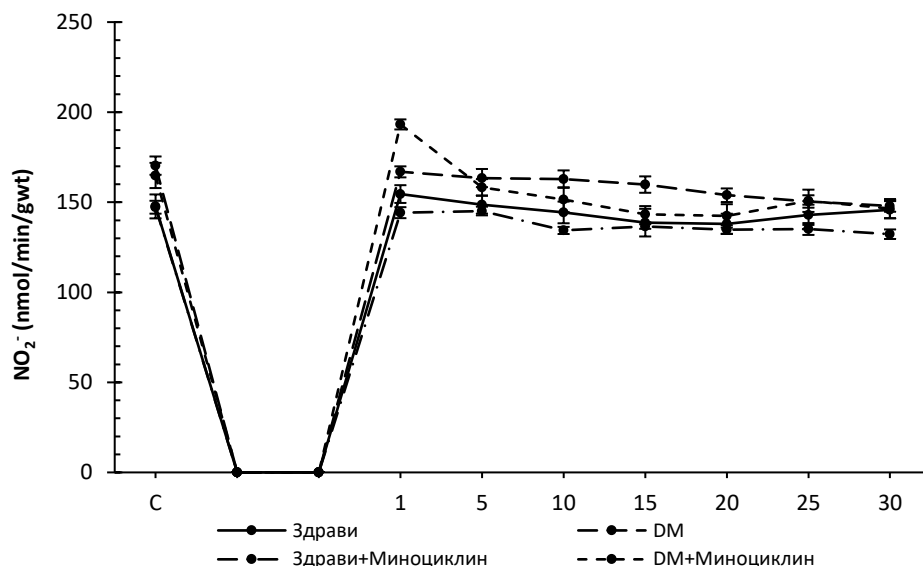


График 4.37. Вриједности нитрита (NO_2^-) у експерименталном моделу посткондиционарања срца здравих и животиња са дијабетесом типа 2. Здрави – срца здравих животиња прекондиционираних физиолошким раствором, DM - срца дијабетичних животиња прекондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин - срца здравих животиња прекондиционираних миноциклином, DM+Миноциклин - срца дијабетичних животиња прекондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: C (стабилизација) – посљедњи минут стабилизације, 5 – пети минут реперфузије и уједно посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је узиман узорак коронарног венског ефлуента за одређивање вриједности NO_2^- .

На графику 4.38. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: посљедњи минут стабилизације (C), посљедњи минут посткондиционарања, уједно и пети минут реперфузије (5) и посљедњи минут реперфузије (30) за вриједности NO_2^- . Вриједности NO_2^- у групи дијабетичних срца посткондиционираних физиолошким раствором и у групи здравих срца посткондиционираних миноциклином биле су статистички значајно ниже на крају реперфузије (30) у односу на крај стабилизације (C). У осталим групама промјене NO_2^- нису од значаја.

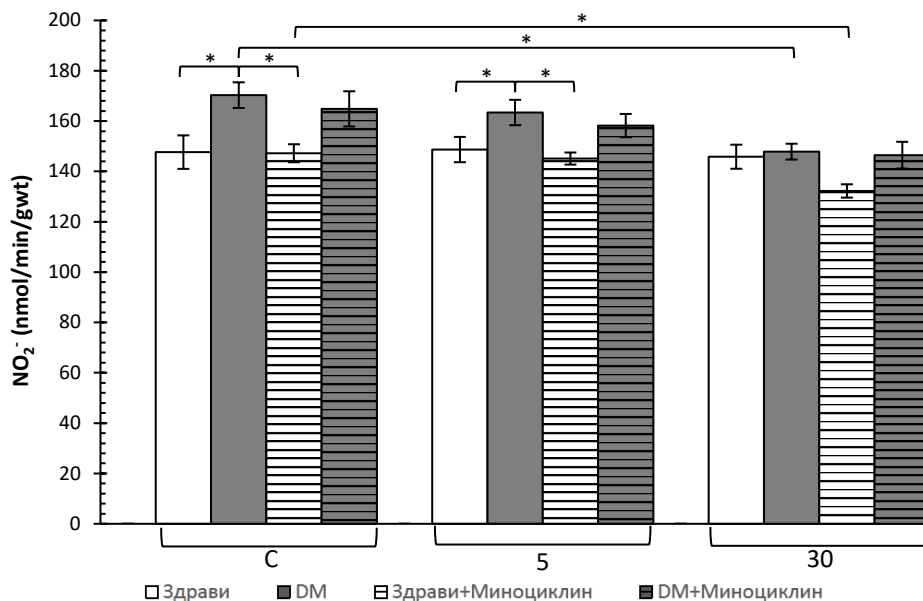


График 4.38. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

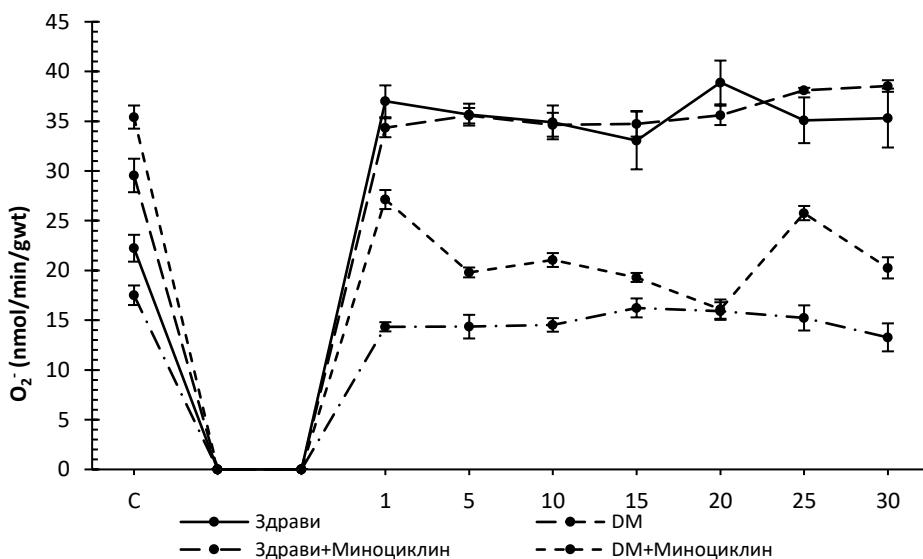


График 4.39. Вриједности супероксид анјон радикала (O₂⁻) у експерименталном моделу посткондиционарања срца здравих и животиња са дијабетесом типа 2. Здрави – срца здравих животиња прекондиционираних физиолошким раствором, DM - срца дијабетичних животиња прекондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин - срца здравих животиња прекондиционираних Миноциклином, DM+Миноциклин - срца дијабетичних животиња прекондиционираних Миноциклином. Ознаке на X оси: C (стабилизација) – посљедњи минут стабилизације, 5 – пети минут реперфузије и уједно посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или Миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је узиман узорак коронарног венског ефлуента за одређивање вриједности O₂⁻.

На графику 4.40. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: посљедњи минут стабилизације (C), посљедњи минут

посткондиционирања, уједно и пети минут реперфузије (5) и посљедњи минут реперфузије (30) за вриједности O_2^- . Вриједности O_2^- су биле статистички значајно ниже у групама здравих срца у односу на дијабетична. Најочљивије смањење вриједности O_2^- на крају реперфузије (30) у односу на крај стабилизације (C) види се у групи дијабетичних срца посткондиционираних миноциклином. Супротно томе, вриједности O_2^- су се значајно повећале у групама посткондиционираним физиолошким раствором.

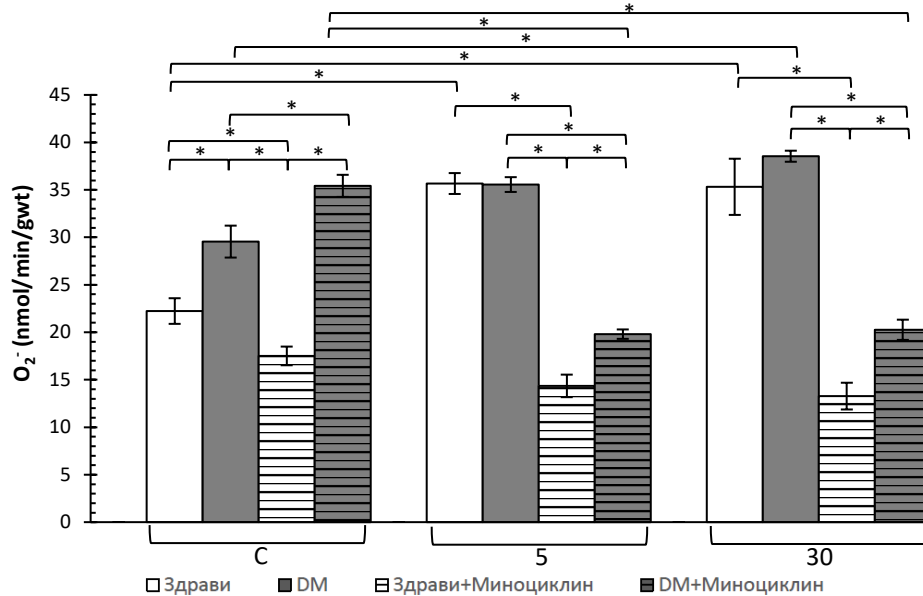


График 4.40. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

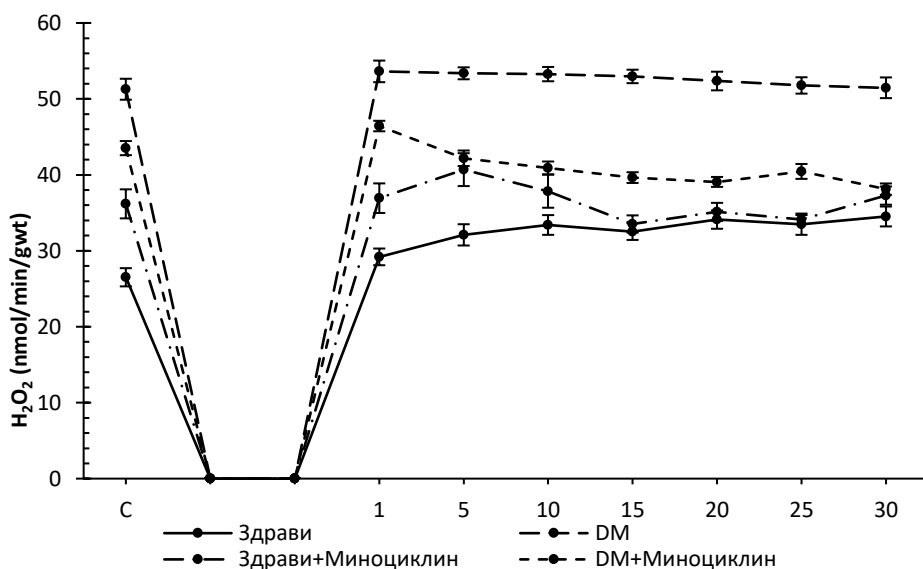


График 4.41. Вриједности водоник пероксида (H_2O_2) у експерименталном моделу посткондиционирања срца здравих и животиња са дијабетесом типа 2. Здрави – срца здравих животиња прекондиционираних физиолошким раствором, DM - срца дијабетичних животиња прекондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин - срца здравих животиња прекондиционираних миноциклином, DM+Миноциклин - срца дијабетичних животиња прекондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: C (стабилизација) – посљедњи минут стабилизације, 5 – пети минут

реперфузије и уједно посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је узиман узорак коронарног венског ефлуента за одређивање вриједности H_2O_2 .

На графику 4.42. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: посљедњи минут стабилизације (C), посљедњи минут посткондиционирања, уједно и пети минут реперфузије (5) и посљедњи минут реперфузије (30) за вриједности H_2O_2 . Вриједности H_2O_2 се нису значајније мијењале током експеримента. Уочавају се више вриједности у дијабетичним срцима у односу на здрава.

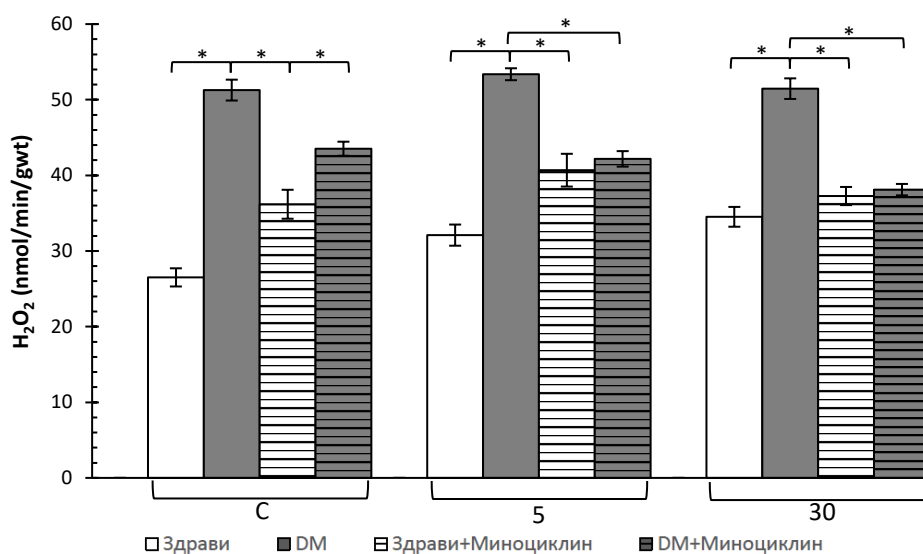
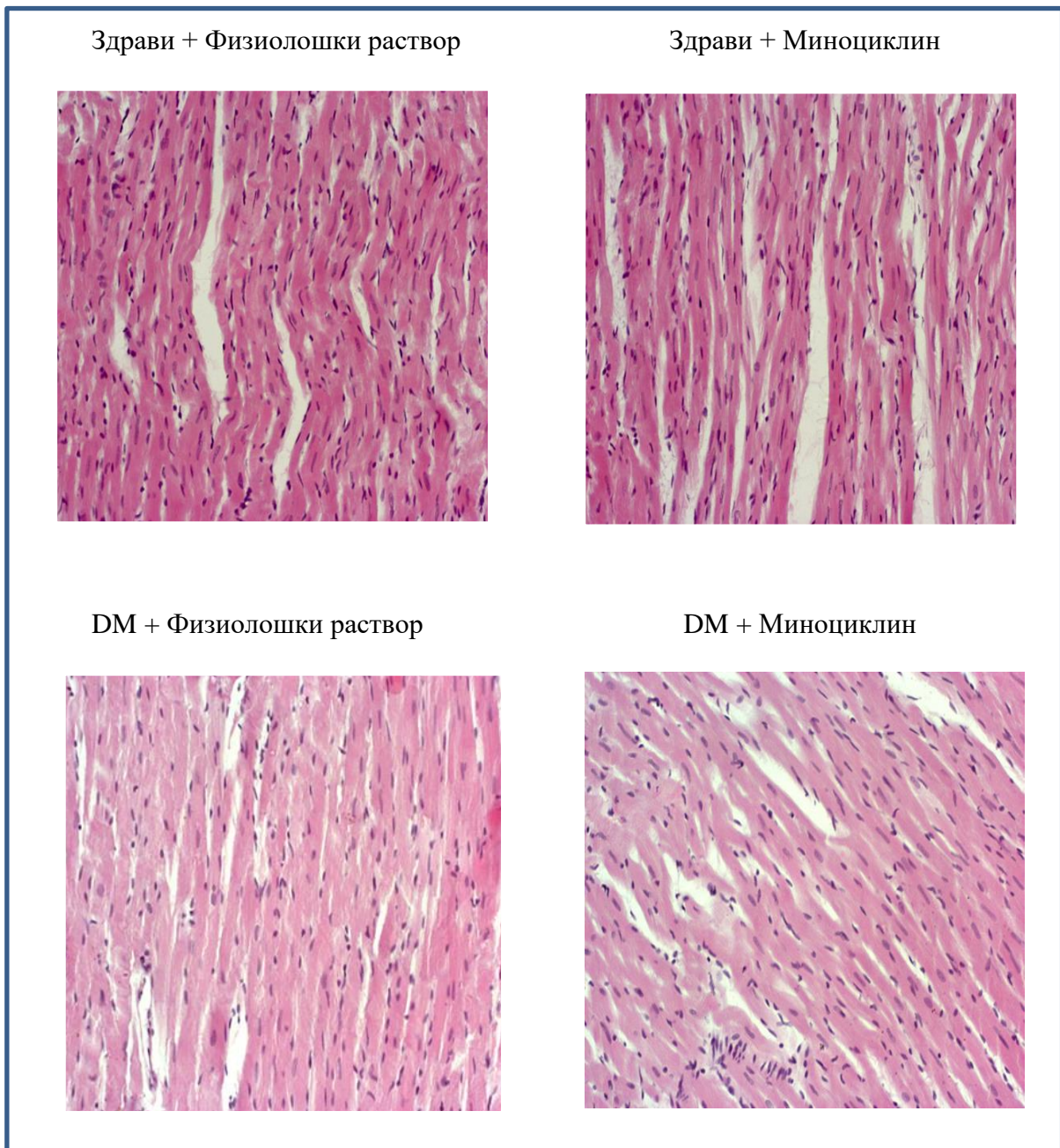
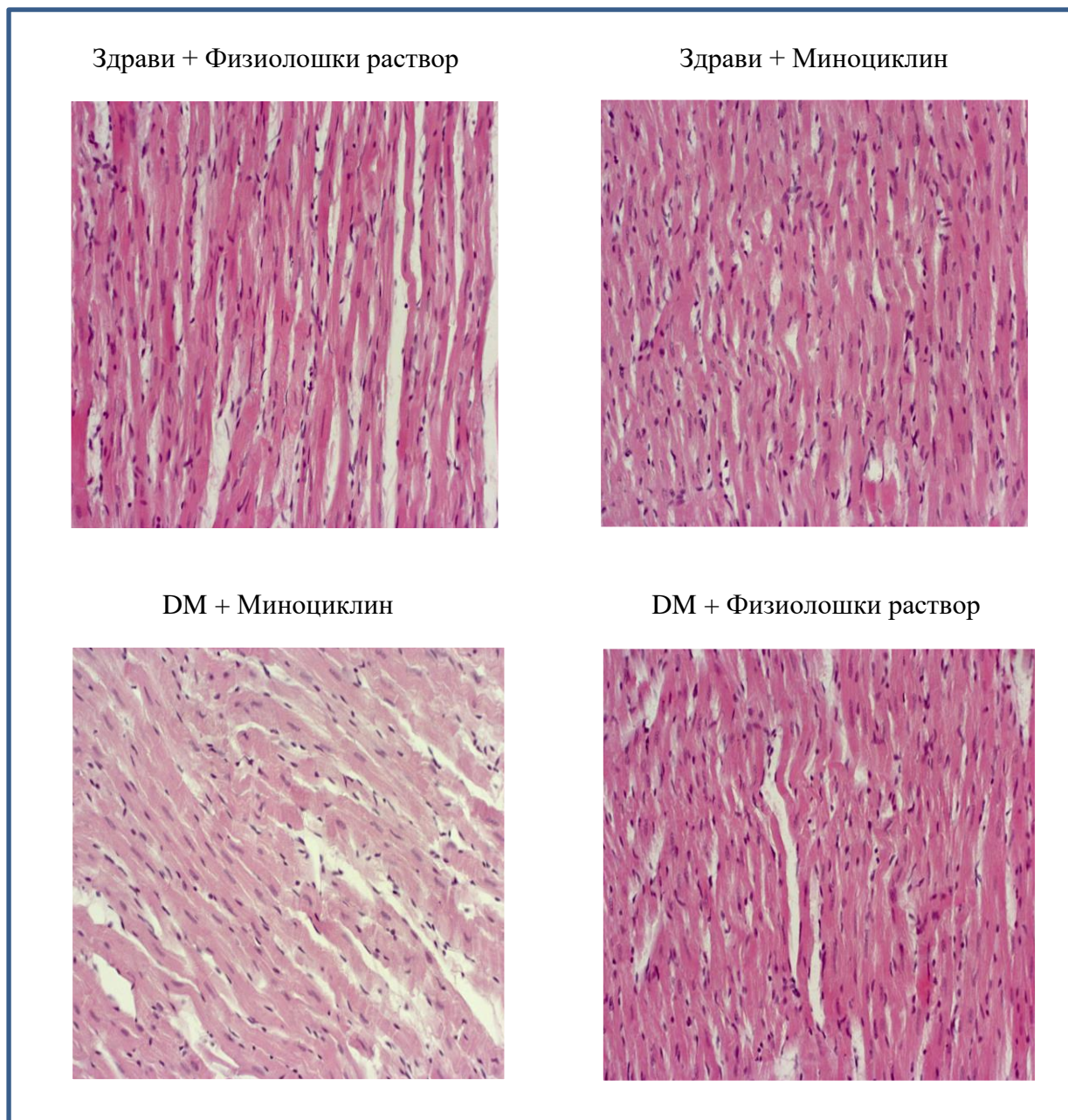


График 4.42. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

4.6. Патохистолошка евалуација миокарда здравих и миокарда пацова са дијабетесом типа 2, пре и посткондиционираних миноциклином и физиолошким раствором



Слика 4.1. Патохистолошке промјене у миокарду здравих и миокарду пацова са дијабетесом типа 2 преко кондиционираних миноциклином и физиолошким раствором.



Слика 4.2. Патохистолошке промјене у миокарду здравих и миокарду пацова са дијабетесом типа 2 посткондиционираних миноциклином и физиолошким раствором

На анализираним коронарним пресјецима срца пацова, свих 8 испитиваних група, у миокарду су присутне микроскопске промјене које варирају од хиперемije и едема до израженијих дегенеративних промјена и некрозе мишићних ћелија.

Код здравих пацова мишићна влакна су углавном у регуларном распореду. Ишемијска некроза, дегенеративне промјене, хиперемија и едем су израженији у групама пре и посткондиционираних животиња физиолошким раствором, као и у групи посткондиционираних миноциклином. У овим групама, хистолошке промјене су сличног степена, некроза се уочава у већем броју кардиомиоцита у односу на групу прекондиционирану миноциклином, где је некроза дискретнија, фокална и углавном уницелуларна.

У групи животиња са дијабетесом типа 2, значајно мањи степен исхемијског оштећења мишићних влакана показују срца пацова прекондиционираних миноциклином, у односу на групе кондициониране физиолошким раствором, гдје се уочавају конфлуентне, зоналне некрозе већег броја мишићних ћелија, са фрагментацијом влакана, губитком једара и хипереозинофилијом цитоплазме.

4.7. Вриједности артеријског крвног притиска нормотензивних и хипертензивних пацова

Вриједности крвног притиска мјерене методом репне платизмографије биле су статистички значајно веће у групи спонтано хипертензивних пацова (енг. *spontaneously hypertensive rats* - SHR) у односу на здраве, нормотензивне пацове.

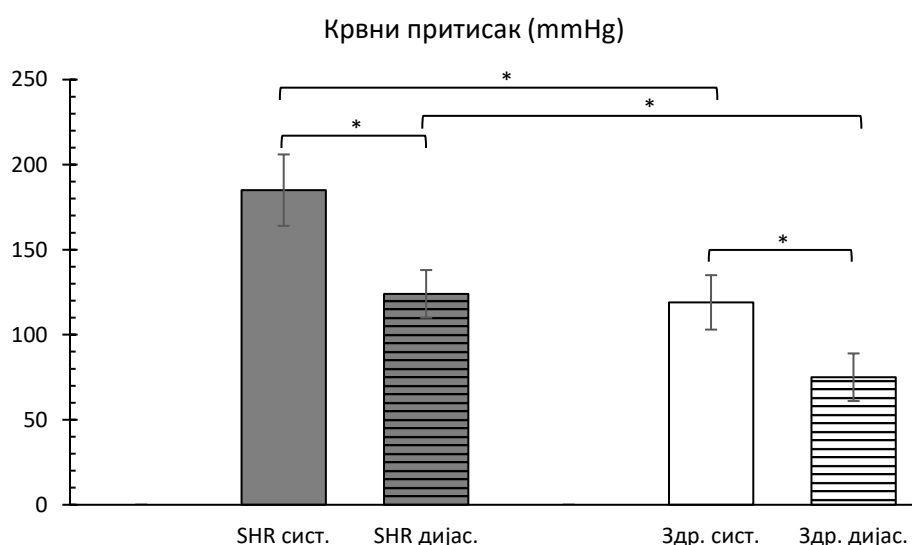


График 4.43. Поређење вриједности крвног притиска између спонтано хипертензивних пацова (SHR) и здравих, нормотензивних пацова

4.8. Ефекти прекондиционарања миноциклином на кардиодинамске параметре срца пацова са хипертензијом

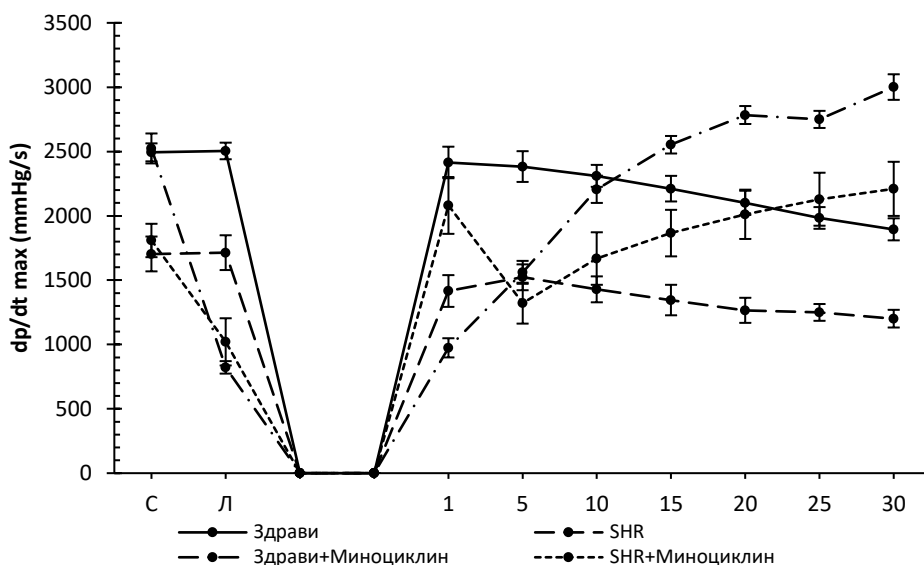


График 4.44. Вриједности максималне стопе промјене притиска у лијевој комори (**dp/dt max**) у експерименталном моделу прекондиционарања срца здравих и животиња са хипертензијом. Здрави – срца здравих животиња прекондиционираних физиолошким раствором, SHR - срца спонтано хипертензивних пацова прекондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин - срца здравих животиња прекондиционираних миноциклином, SHR+Миноциклин - срца спонтано хипертензивних пацова прекондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: С (стабилизација) – посљедњи минут стабилизације, Л (лијек) – посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је биљежена вриједност dp/dt max.

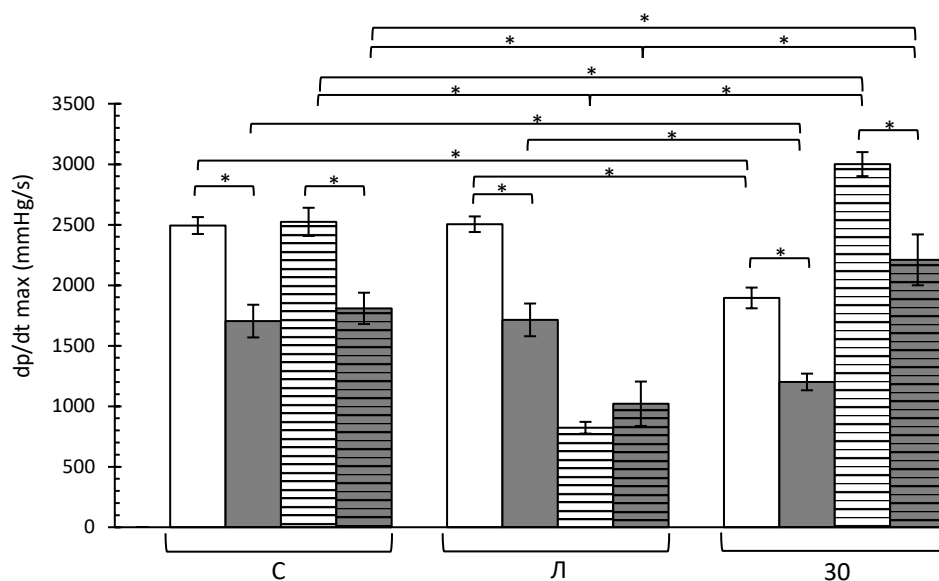


График 4.44. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

На графику 4.45. приказане су статистичке значајности између поређених тачака од интереса: посљедњи минут стабилизације (С), посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин) (Л) и посљедњи минут реперфузије (30). Вриједности $dp/dt \max$ биле су статистички значајно веће на крају реперфузије (30) у односу на посљедњи минут стабилизације (С) у групама које су прекондициониране миноциклином. Супротно томе, у групама које су прекондициониране физиолошким раствором, вриједности $dp/dt \max$ у посљедњем минуту реперфузије (30) биле су значајно ниже у односу на крај стабилизације (С). Акутно апликовање миноциклина узроковало је значајно смањење $dp/dt \max$ (Л).

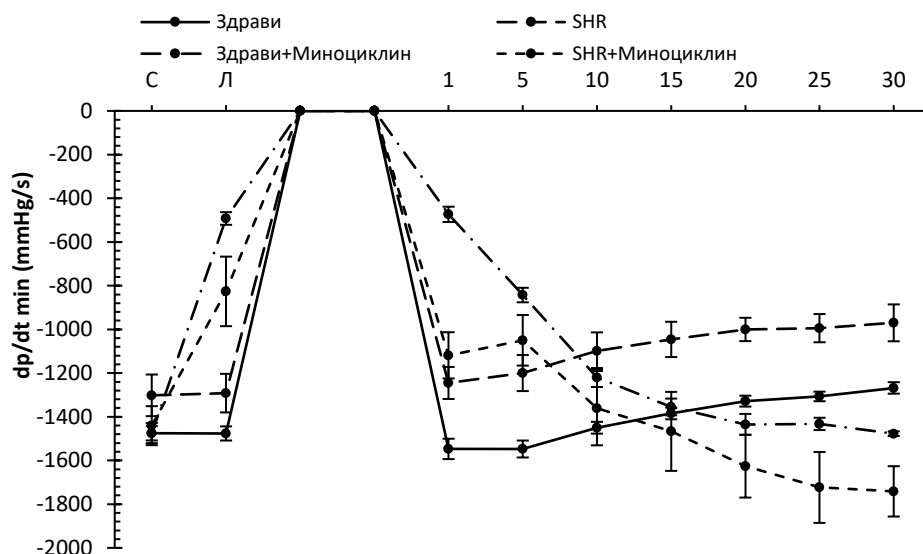


График 4.46. Вриједности минималне стопе промјене притиска у лијевој комори ($dp/dt \min$) у експерименталном моделу прекондиционирања срца здравих и животиња са хипертензијом. Здрави – срца здравих животиња прекондиционираних физиолошким раствором, SHR - срца спонтано хипертензивних пацова прекондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин - срца здравих животиња прекондиционираних миноциклином, SHR+Миноциклин - срца спонтано хипертензивних пацова прекондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: С (стабилизација) – посљедњи минут стабилизације, Л (лијек) – посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је биљежена вриједност $dp/dt \min$.

На графику 4.47. приказане су статистичке значајности између поређених тачака од интереса: посљедњи минут стабилизације (С), посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин) (Л) и посљедњи минут реперфузије (30). Вриједности $dp/dt \min$ биле су значајно веће на крају реперфузије (30) у односу на крај стабилизације (С) у групама које су прекондициониране миноциклином. Супротно томе, у групама које су прекондициониране физиолошким раствором, вриједности $dp/dt \min$ у посљедњем минуту реперфузије (30) биле су значајно ниже у односу на крај стабилизације (С). Акутно апликовање миноциклина узроковало је значајно смањење $dp/dt \min$ (Л).

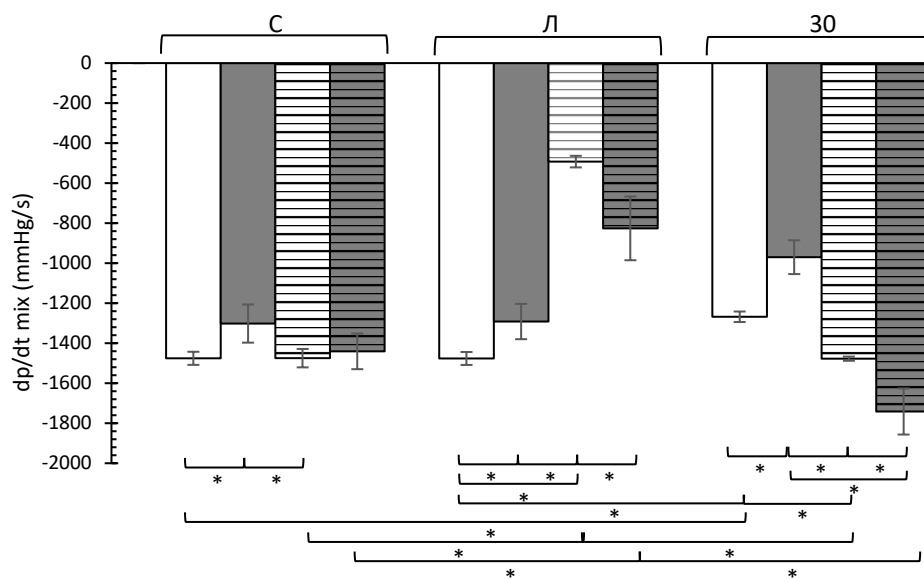


График 4.47. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

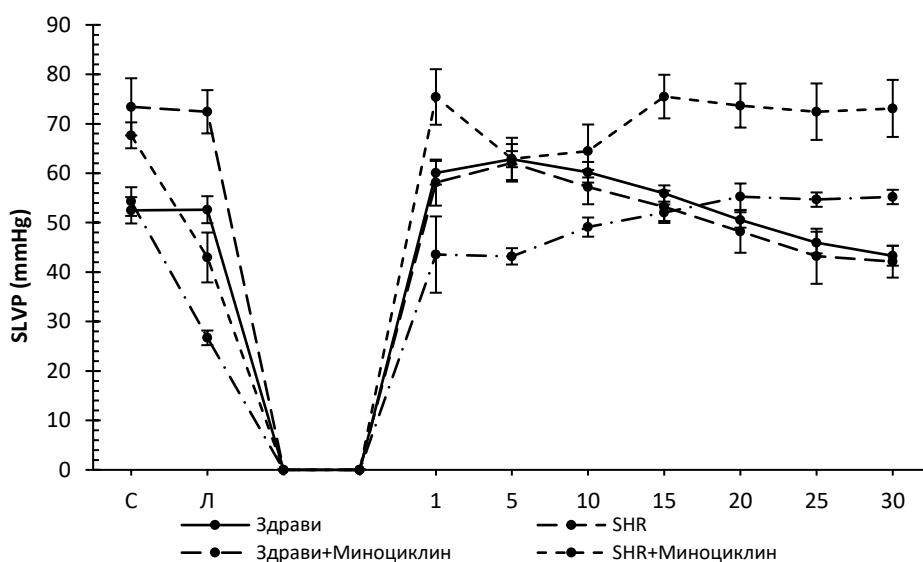


График 4.48. Вриједности систолног притиска у лијевој комори (SLVP) у експерименталном моделу прекондиционирања срца здравих и животиња са хипертензијом. Здрави – срца здравих животиња прекондиционираних физиолошким раствором, SHR - срца спонтано хипертензивних пацова прекондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин - срца здравих животиња прекондиционираних миноциклином, SHR+Миноциклин - срца спонтано хипертензивних пацова прекондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: С (стабилизација) – посљедњи минут стабилизације, Л (лијек) – посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је биљежена вриједност SLVP.

На графику 4.49. приказане су статистичке значајности између поређених тачака од интереса: посљедњи минут стабилизације (С), посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин) (Л) и посљедњи минут реперфузије (30) за

параметар SLVP. Вриједности SLVP биле су приближно исте на крају реперфузије (30) у односу на посљедњи минут стабилизације (C) у групама које су прекондициониране миноциклином. Супротно томе, у групама које су прекондициониране физиолошким раствором, вриједности SLVP у посљедњем минуту реперфузије (30) биле су значајно ниже у односу на крај стабилизације (C). Акутно апликовање миноциклина узроковало је значајно смањење SLVP (Л).

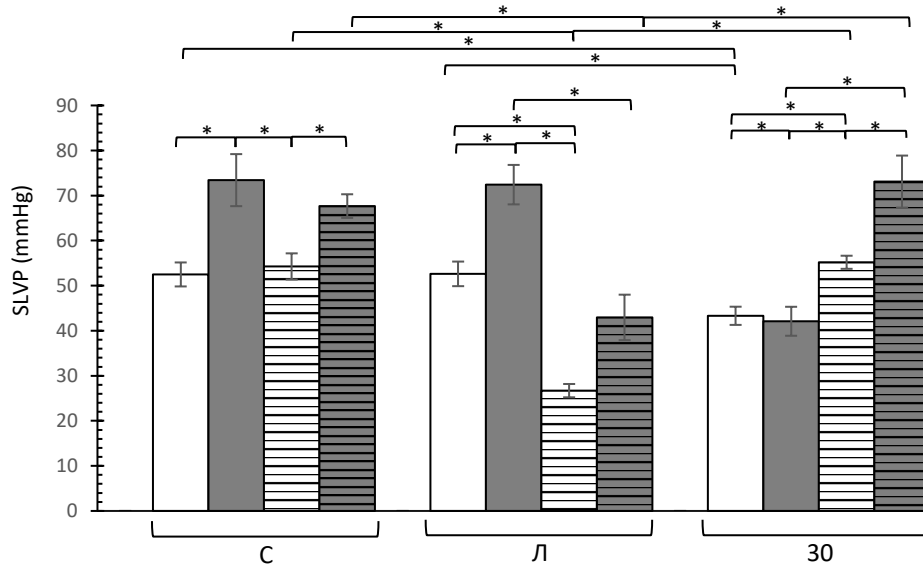


График 4.49. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

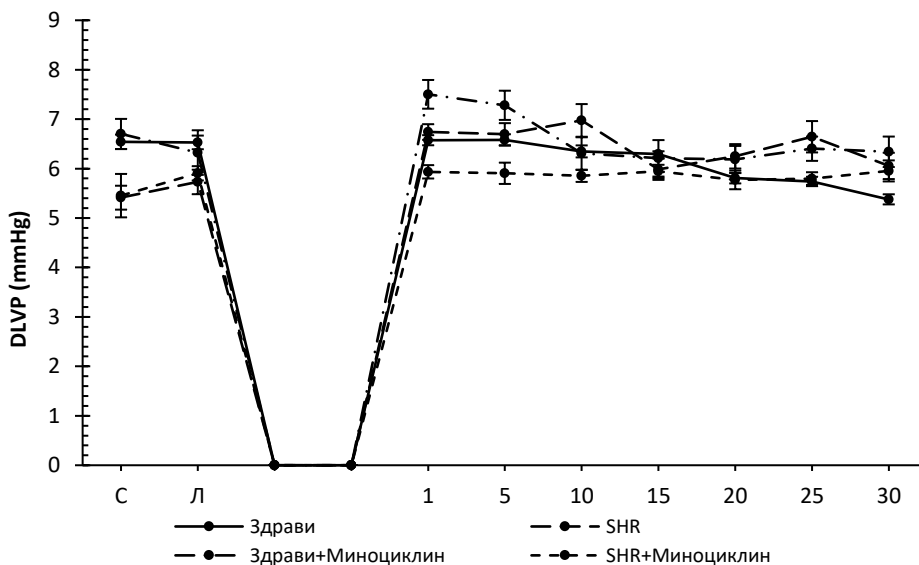


График 4.50. Вриједности дијастолног притиска у лијевој комори (DLVP) у експерименталном моделу прекондиционарања срца здравих и животиња са хипертензијом. Здрави – срца здравих животиња прекондиционираних физиолошким раствором, SHR - срца спонтано хипертензивних пацова прекондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин - срца здравих животиња прекондиционираних миноциклином, SHR+Миноциклин - срца спонтано хипертензивних пацова прекондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: C (стабилизација) – посљедњи минут стабилизације, Л (лијек) – посљедњи минут

апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је биљежена вриједност DLVP.

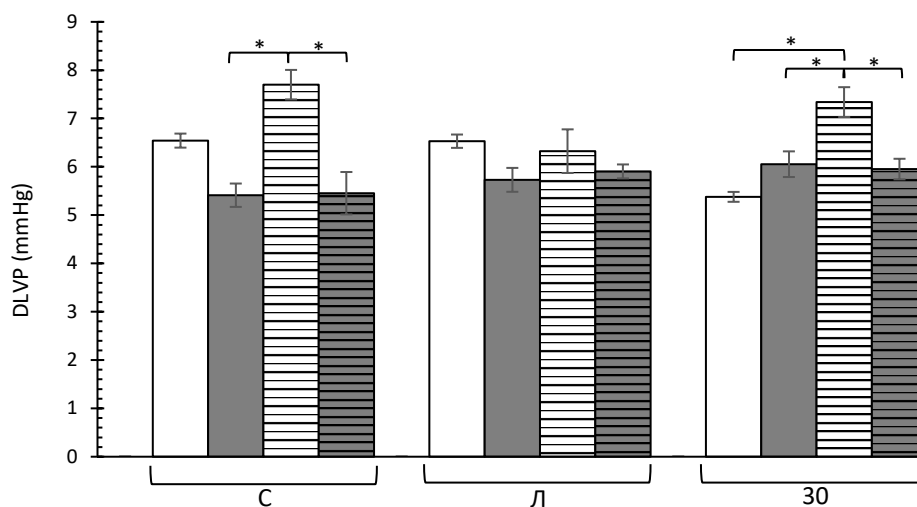


График 4.51. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

На графику 4.51. приказане су статистичке значајности између поређених тачака од интереса: посљедњи минут стабилизације (C), посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин) (Л) и посљедњи минут реперфузије (30) за параметар DLVP. Вриједности DLVP се нису значајније мијењале током експеримента.

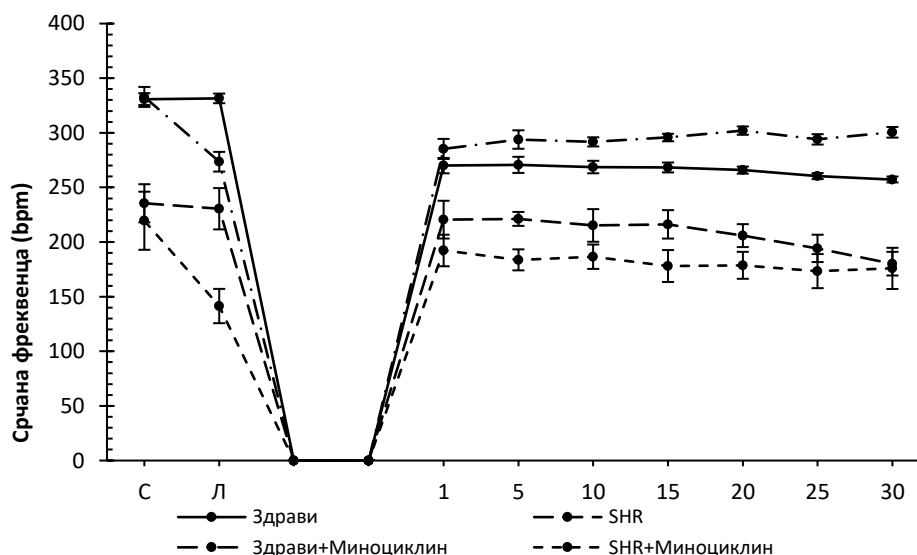


График 4.52. Вриједности срчане фреквенције (**Heart Rate - HR**) у експерименталном моделу прекондиционарања срца здравих и животиња са хипертензијом. Здрави – срца здравих животиња прекондиционираних физиолошким раствором, SHR - срца спонтано хипертензивних пацова прекондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин - срца здравих животиња прекондиционираних миноциклином, SHR+Миноциклин - срца спонтано хипертензивних пацова прекондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: C (стабилизација) – посљедњи минут стабилизације, Л

(лијек) – посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је биљежена вриједност HR.

На графику 4.53. приказане су статистичке значајности између поређених тачака од интереса: посљедњи минут стабилизације (С), посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин) (Л) и посљедњи минут реперфузије (30) за параметар HR. Срчана фреквенција (HR) је била значајно виша код нормотензивних животиња у поређењу са хипертензивним. Миноциклин је превенирао смањење HR код нормотензивних животиња, док је вриједност HR срца SHR пацова и поред примјене миноциклина била нижа на крају реперфузије (30) у односу на крај стабилизације (С). Вриједности HR су биле ниже на крају реперфузије (30) у односу на крај стабилизације (С) у обје групе срца, нормотензивних и хипертензивних, која су прекондиционирана физиолошким раствором.

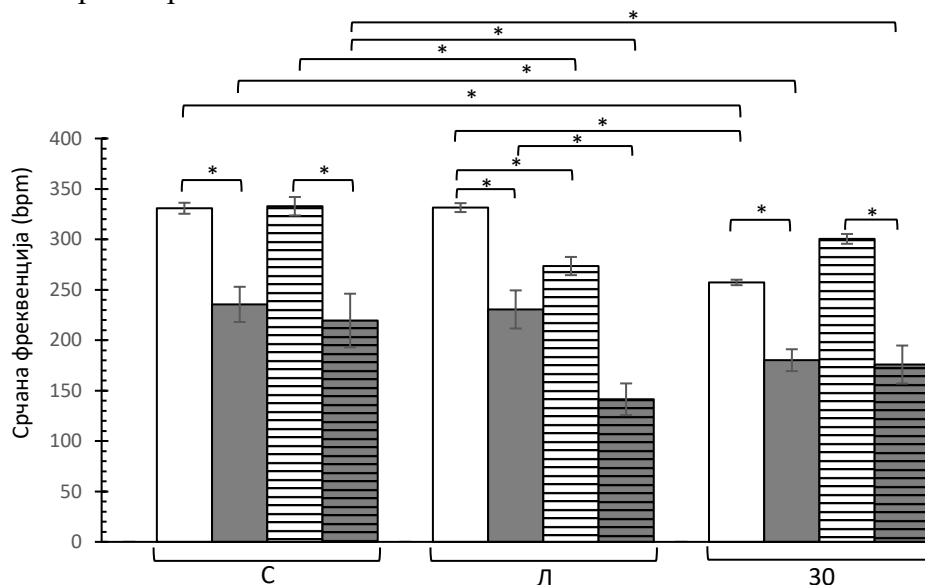


График 4.53. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

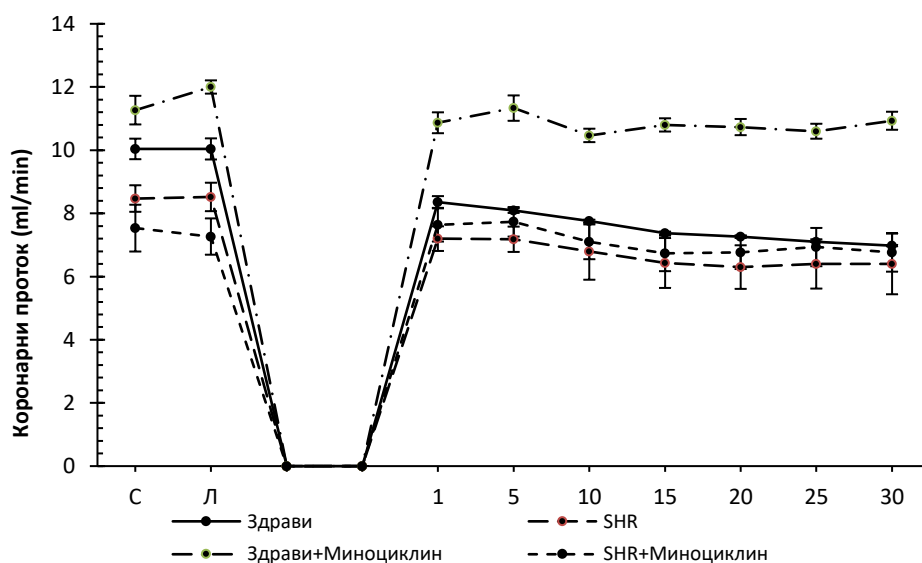


График 4.54. Вриједности коронарног протока (Coronary Flow - CF) у експерименталном моделу прекондиционирања срца здравих и животиња са

хипертензијом. Зрави – срца здравих животиња прекондиционираних физиолошким раствором, SHR - срца спонтано хипертензивних пацова прекондиционираних физиолошким раствором, Зрави+Миноциклин - срца здравих животиња прекондиционираних миноциклином, SHR+Миноциклин - срца спонтано хипертензивних пацова прекондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: С (стабилизација) – посљедњи минут стабилизације, Л (лијек) – посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је биљежена вриједност CF.

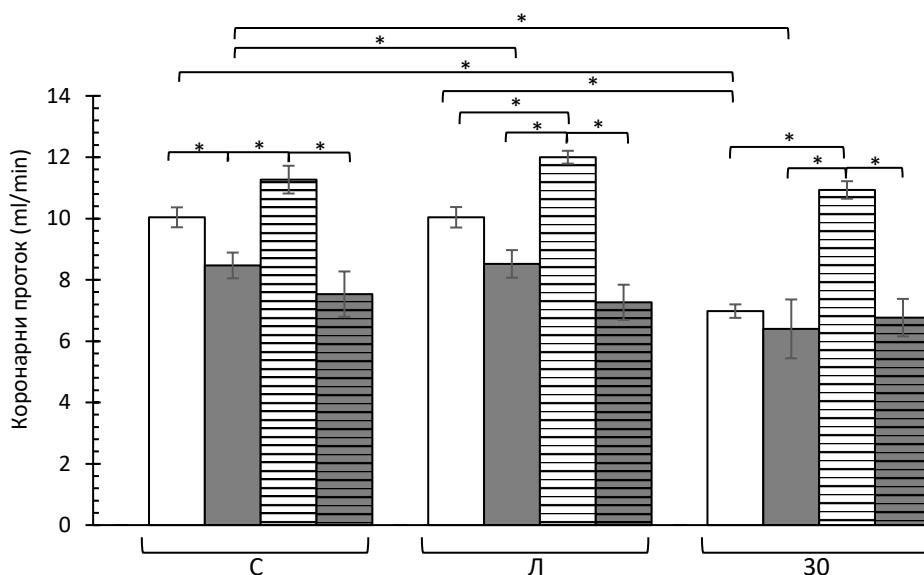


График 4.55. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

На графику 4.55. приказане су статистичке значајности између поређених тачака од интереса: посљедњи минут стабилизације (С), посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин) (Л) и посљедњи минут реперфузије (30) за параметар CF. CF је значајно виши у групама здравих срца у односу на хипертензивна. Вриједности CF су значајно ниже у посљедњем минуту реперфузије (30) у односу на стабилизацију (С) у групама које су прекондиционирани физиолошким раствором. У групама где су срца прекондиционирани миноциклином вриједности CF су приближне почетним вриједностима (С).

4.9. Ефекти посткондиционарања миноциклином на кардиодинамске параметре срца пацова са хипертензијом

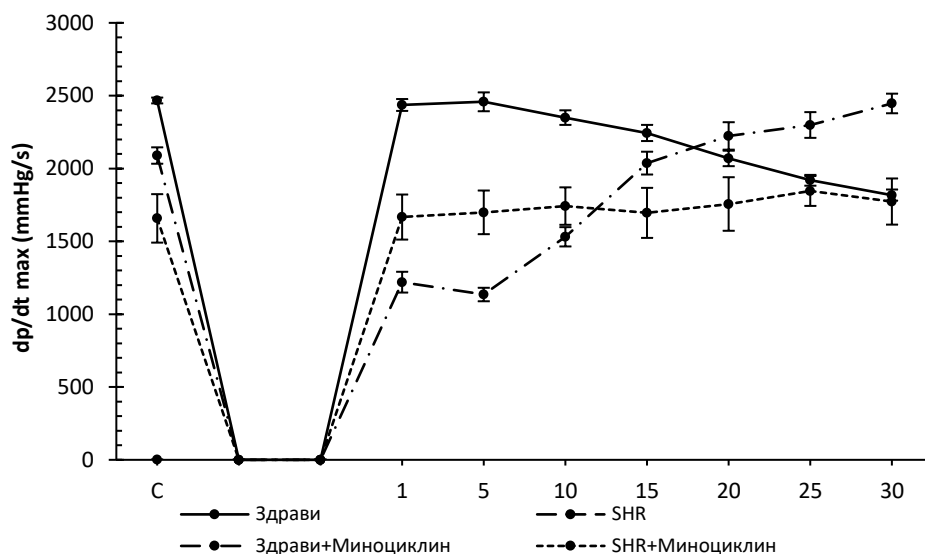


График 4.56. Вриједности максималне стопе промјене притиска у лијевој комори (**dp/dt max**) у експерименталном моделу посткондиционарања срца здравих и животиња са хипертензијом. Здрави – срца здравих животиња посткондиционираних физиолошким раствором, SHR – срца спонтано хипертензивних пацова посткондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин – срца здравих животиња посткондиционираних миноциклином, SHR+Миноциклин – срца спонтано хипертензивних пацова посткондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: C (стабилизација) – последњи минут стабилизације, 5 – пети минут реперфузије и уједно последњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је биљежена вриједност dp/dt max.

На графику 4.57. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: последњи минут стабилизације (C), последњи минут посткондиционарања, уједно и пети минут реперфузије (5) и последњи минут реперфузије (30).

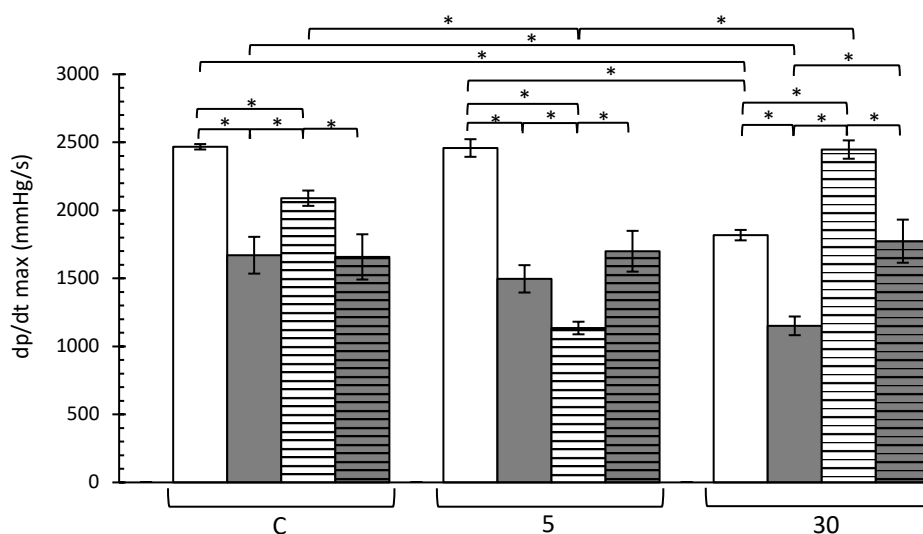


График 4.57. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

У групи нормотезивних срца која су посткондиционирана миноциклином вриједност $dp/dt \max$ је била виша у посљедњем минути реперфузије (30) у односу на крај стабилизације (C). Вриједност $dp/dt \max$ на крају реперфузије (30) у групи хипертензивних срца посткондиционираних миноциклином била је приближна почетним вриједностима (C). Супротно томе у групама у којима је посткондиционирање вршено физиолошким раствором (и нормотензивна и хипертензивна срца), вриједност $dp/dt \max$ на крају реперфузије (30) била је значано нижа у односу на крај стабилизације.

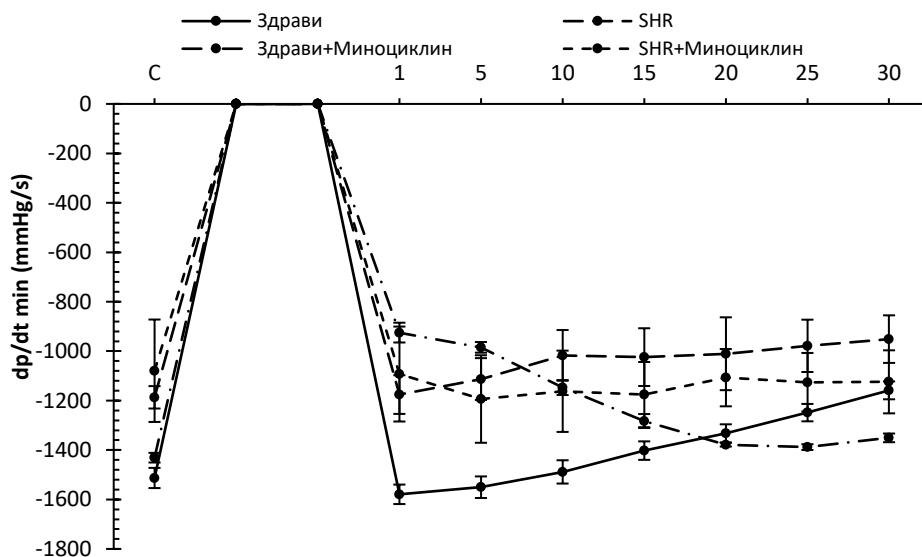


График 4.58. Вриједности минималне стопе промјене притиска у лијевој комори ($dp/dt \min$) у експерименталном моделу посткондиционирања срца здравих и животиња са хипертензијом. Здрави – срца здравих животиња посткондиционираних физиолошким раствором, SHR – срца спонтано хипертензивних пацова посткондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин – срца здравих животиња посткондиционираних миноциклином, SHR+Миноциклин – срца спонтано

хипертензивних пацова посткондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: С (стабилизација) – последњи минут стабилизације, 5 – пети минут реперфузије и уједно последњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је биљежена вриједност $dp/dt \text{ min}$.

На графику 4.59. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: последњи минут стабилизације (С), последњи минут посткондиционирања, уједно и пети минут реперфузије (5) и последњи минут реперфузије (30) за параметар $dp/dt \text{ min}$. У групама које су посткондиционирание миноциклином, и нормотензивна и хипертензивна, вриједност $dp/dt \text{ min}$ на крају реперфузије (30) је била приближна вриједностима на крају стабилизације (С). Слично претходном параметру, у групама које су посткондиционирание физиолошким раствором, вриједности $dp/dt \text{ min}$ у последњем минуту реперфузије (30) биле су значајно ниже у односу на последњи минут стабилизације (С).

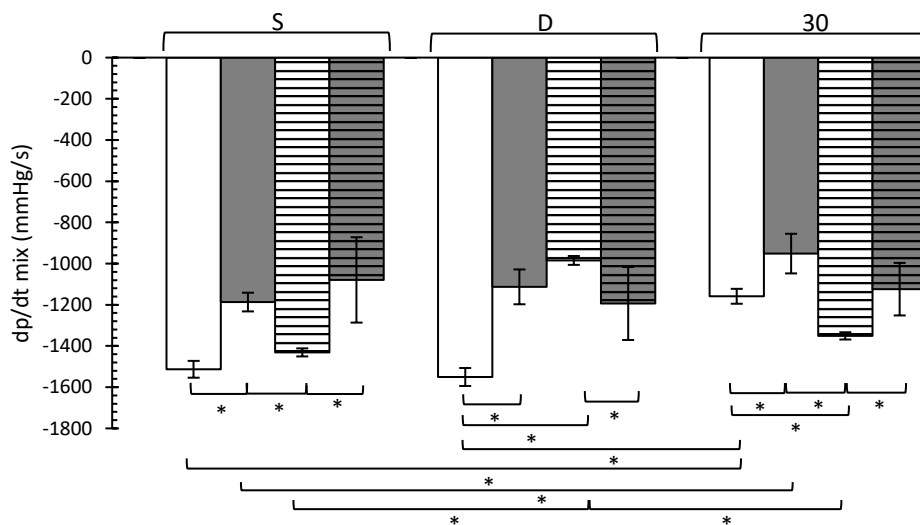


График 4.59. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

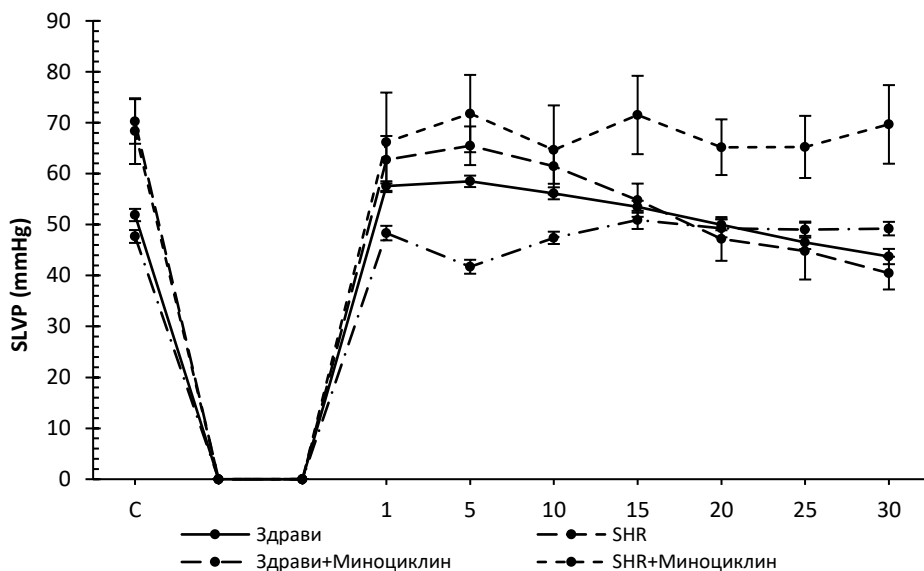


График 4.60. Вриједности систолног притиска у лијевој комори (SLVP) у експерименталном моделу посткондиционирања срца здравих и животиња са хипертензијом. Здрави – срца здравих животиња посткондиционираних физиолошким раствором, SHR – срца спонтано хипертензивних пацова посткондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин – срца здравих животиња посткондиционираних миноциклином, SHR+Миноциклин – срца спонтано хипертензивних пацова посткондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: C (стабилизација) – посљедњи минут стабилизације, 5 – пети минут реперфузије и уједно посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је биљежена вриједност SLVP.

На графику 4.61. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: посљедњи минут стабилизације (C), посљедњи минут посткондиционирања, уједно и пети минут реперфузије (5) и посљедњи минут реперфузије (30) за параметар SLVP. Вриједности SLVP су биле значајно више у групама хипертензивних срца на крају стабилизације (C) у односу на нормотензивне. У групама које су посткондиционирани миноциклином вриједности SLVP су се одржале током реперфузије на вриједностима које су приближне почетним (C), за разлику од група које су посткондиционирани физиолошким раствором.

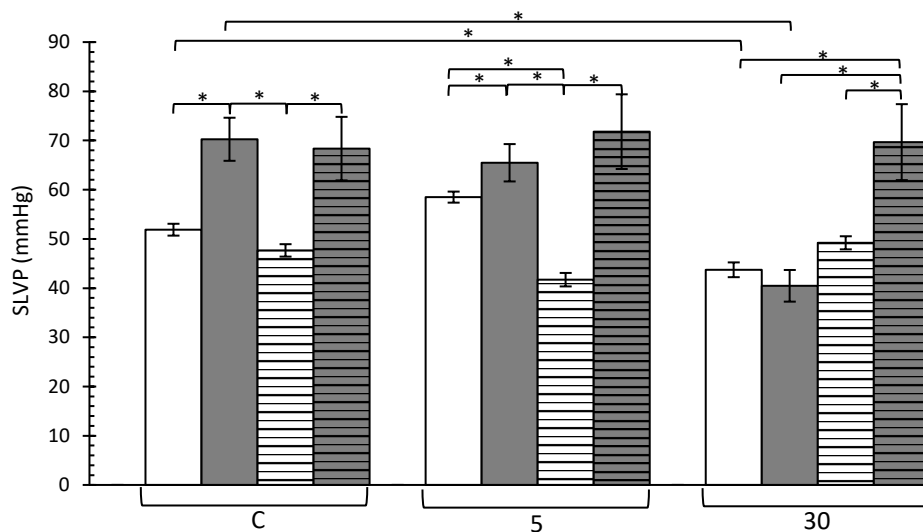


График 4.61. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

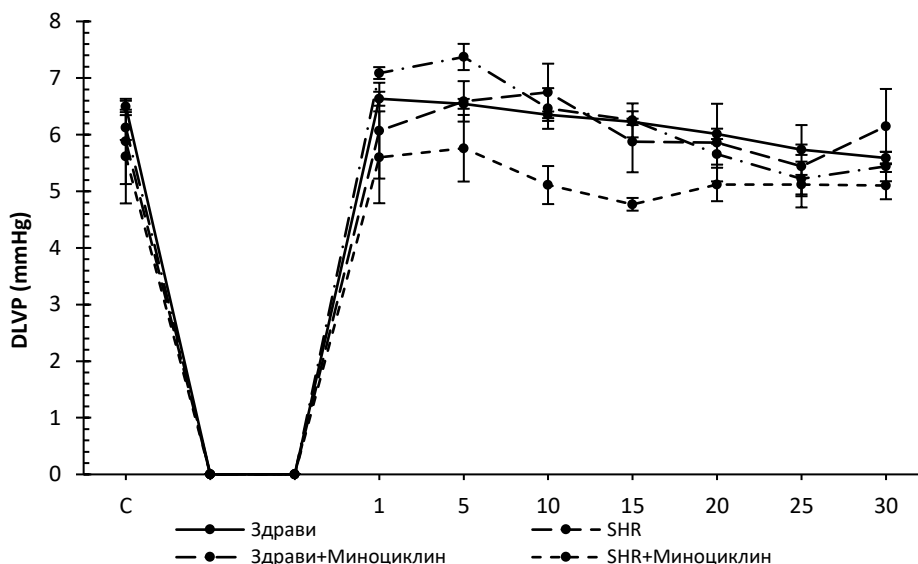


График 4.62. Вриједности дијастолног притиска у лијевој комори (DLVP) у експерименталном моделу посткондиционарања срца здравих и животиња са хипертензијом. Здрави – срца здравих животиња посткондиционираних физиолошким раствором, SHR – срца спонтано хипертензивних пацова посткондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин – срца здравих животиња посткондиционираних миноциклином, SHR+Миноциклин – срца спонтано хипертензивних пацова посткондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: C (стабилизација) – посљедњи минут стабилизације, 5 – пети минут реперфузије и уједно посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је биљежена вриједност DLVP.

На графику 4.63. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: посљедњи минут стабилизације (C), посљедњи минут посткондиционарања, уједно и пети минут реперфузије (5) и посљедњи минут

реперфузије (30) за параметар DLVP. Вриједности DLVP нису се значајно разликовале између група и посматраних тачака од интереса.

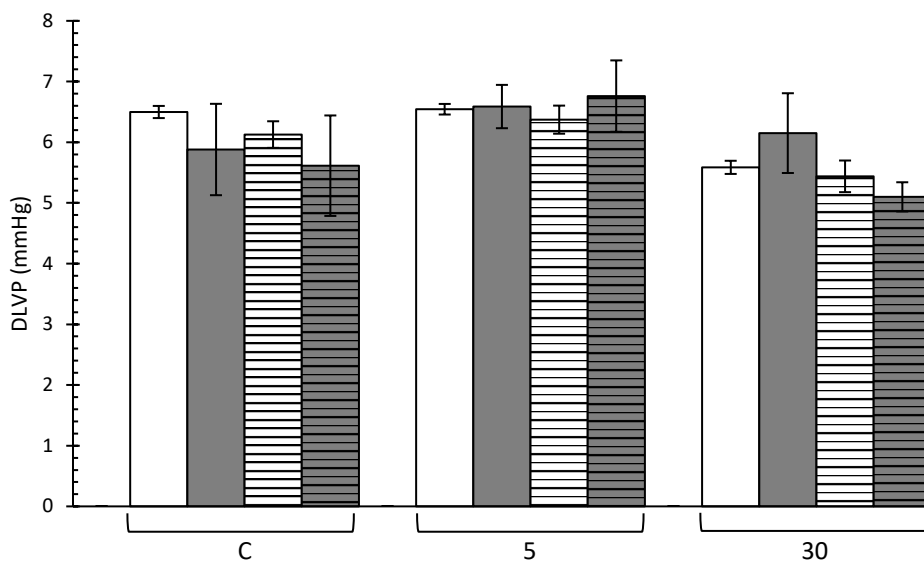


График 4.63. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

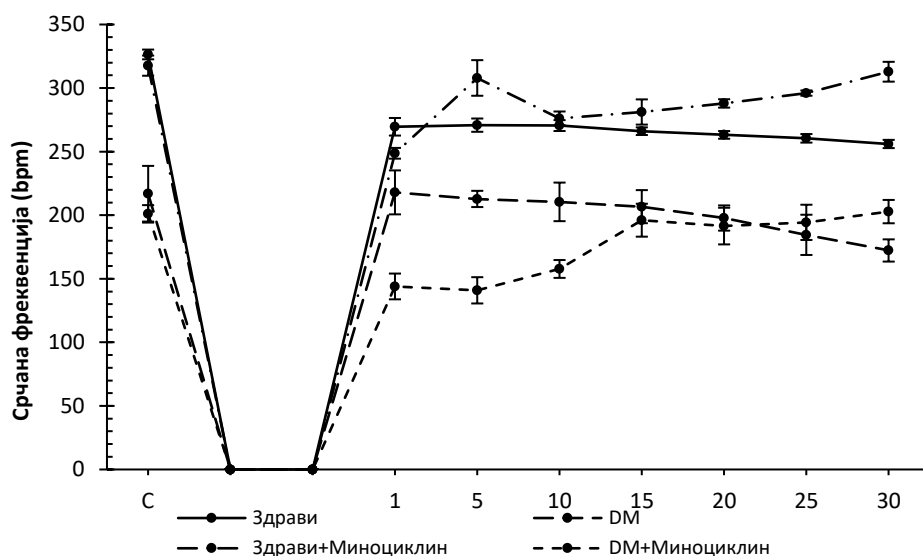


График 4.64. Вриједности срчане фреквенције у експерименталном моделу посткондиционарања срца здравих и животиња са хипертензијом. Здрави – срца здравих животиња посткондиционираних физиолошким раствором, SHR – срца спонтано хипертензивних пацова посткондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин – срца здравих животиња посткондиционираних миноциклином, SHR+Миноциклин – срца спонтано хипертензивних пацова посткондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: C (стабилизација) – последњи минут стабилизације, 5 – пети минут реперфузије и уједно последњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је биљежена вриједност срчане фреквенције.

На графику 4.65. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: последњи минут стабилизације (С), последњи минут посткондиционарања, уједно и пети минут реперфузије (5) и последњи минут реперфузије (30) за параметар срчана фреквенција. Срчана фреквенција је била значајно нижа у групама хипертензивних срца. У групама које су посткондициониране миноциклином вриједности срчане фреквенције на крају реперфузије (30) биле су приближне вриједностима на крају стабилизације (С). У групама посткондиционираним физиолошким раствором срчана фреквенција је значајно опала током реперфузије (С у односу на 30).

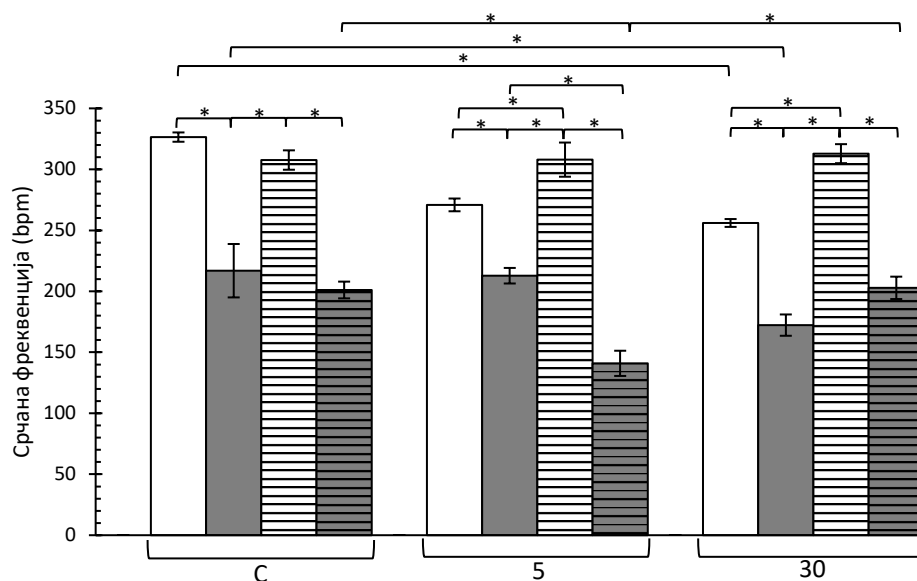


График 4.65. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

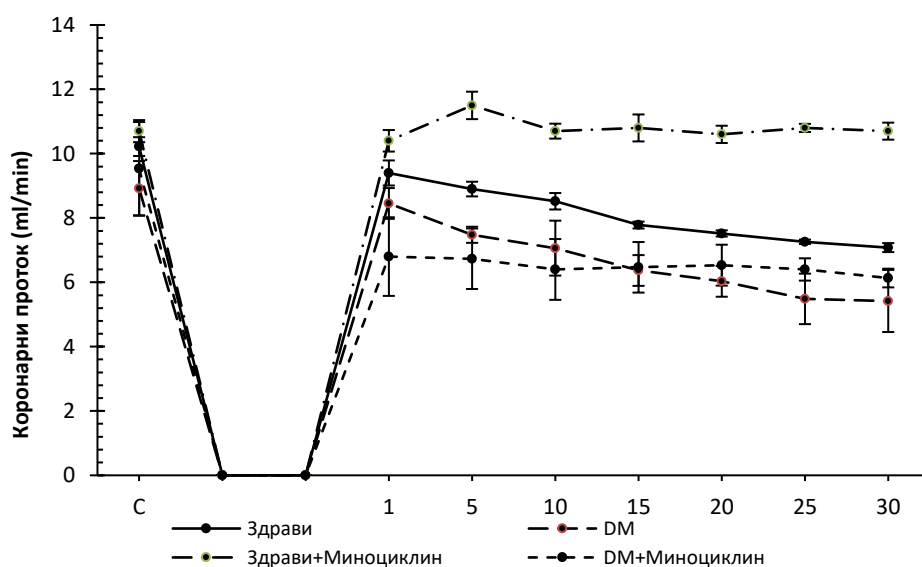


График 4.66. Вриједности коронарног протока у експерименталном моделу посткондиционарања срца здравих и животиња са хипертензијом. Здрави – срца здравих животиња посткондиционираних физиолошким раствором, SHR – срца спонтано хипертензивних пацова посткондиционираних физиолошким раствором,

Здрави+Миноциклин – срца здравих животиња посткондиционираних миноциклином, SHR+Миноциклин – срца спонтано хипертензивних пацова посткондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: С (стабилизација) – посљедњи минут стабилизације, 5 – пети минут реперфузије и уједно посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је бележена вриједност коронарног протока.

На графику 4.67. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: посљедњи минут стабилизације (С), посљедњи минут посткондиционирања, уједно и пети минут реперфузије (5) и посљедњи минут реперфузије (30) за параметар коронарни проток. Коронарни проток је био знатно нижи у групи хипертензивних срца (С). Током реперфузије (30) вриједности коронарног протока су остале приближне почетним (С) само у групи нормотензивних срца посткондиционираних миноциклином, док је у свим осталим групама вриједност коронарног протока на крају реперфузије (30) била значајно нижа у односу на почетне вриједности (С).

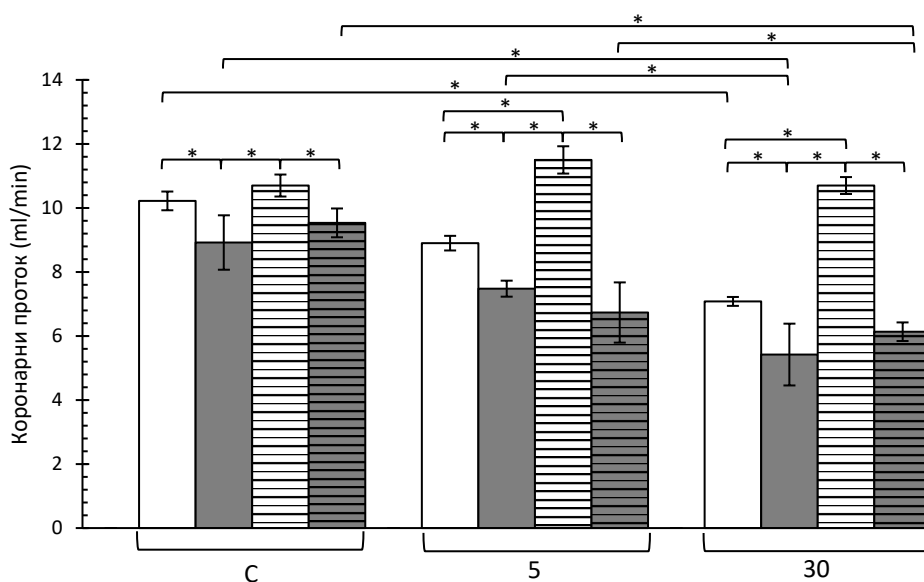


График 4.67. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

4.10. Ефекти прекодиционарања миноциклином на биомаркере оксидационог стреса у коронарном венском ефуленту срца хипертензивних пацова

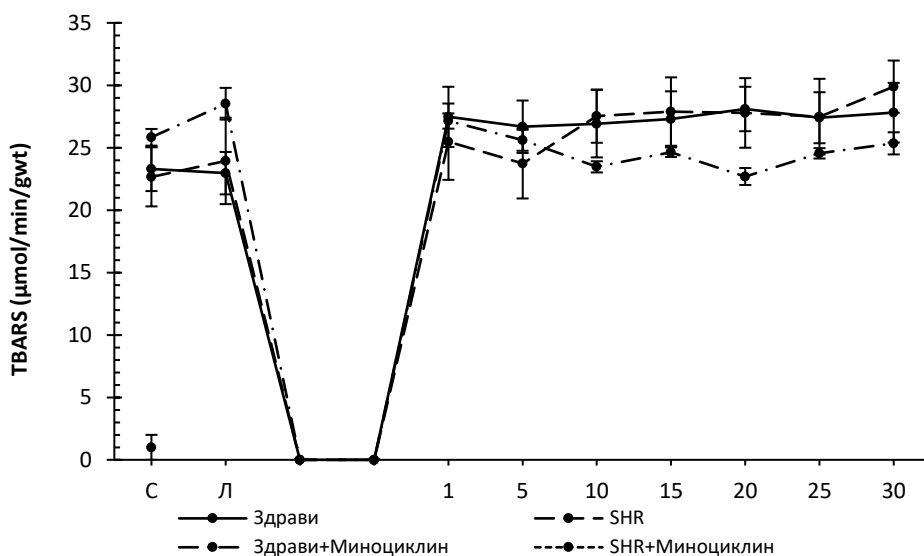


График 4.68. Вриједности индекса липидне пероксидације мјереног као TBARS (TBARS) у експерименталном моделу прекодиционарања срца здравих и животиња са хипертензијом. Здрави – срца здравих животиња прекодиционараних физиолошким раствором, SHR – срца спонтано хипертензивних пацова прекодиционараних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин – срца здравих животиња прекодиционараних миноциклином, SHR+Миноциклин – срца спонтано хипертензивних пацова прекодиционараних миноциклином. Ознаке на X оси: С (стабилизација) – посљедњи минут стабилизације, Л (лијек) – посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је узиман узорак коронарног венског ефулента за одређивање вриједности TBARS.

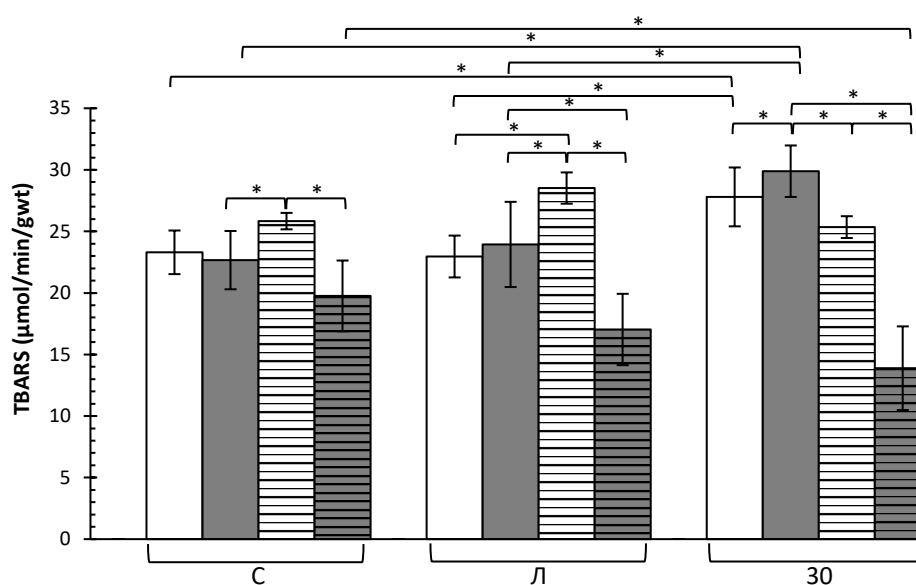


График 4.69. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

На графику 4.69. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: последњи минут стабилизације (С), последњи минут апликације лијека, миноциклин или физиолошки раствор (Л) и последњи минут реперфузије (30) за параметар ТВАРС. У групама које су прекондициониране физиолошким раствором вриједности ТВАРС у последњем минуту реперфузије (30) биле су значајно више у односу на почетне вриједности (С).

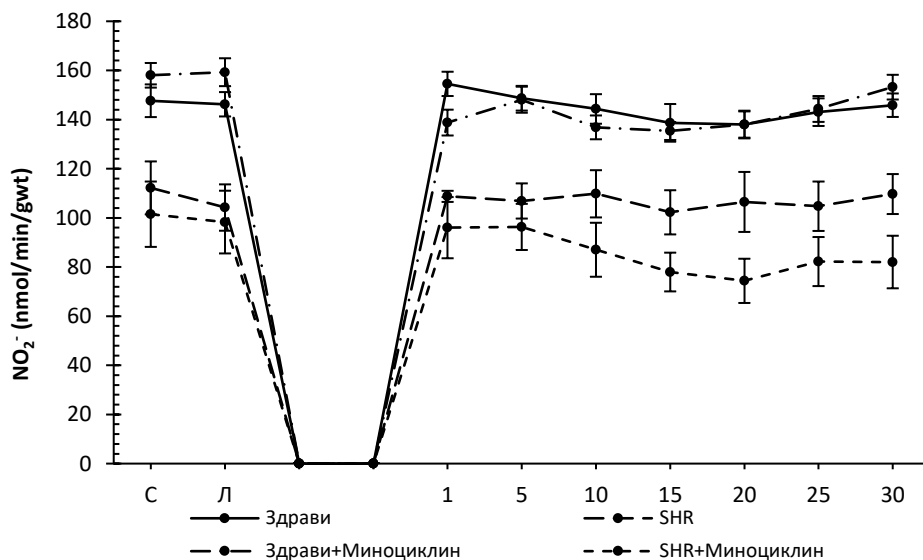


График 4.70. Вриједности нитрита (NO_2^-) у експерименталном моделу прекондиционарања срца здравих и животиња са хипертензијом. Здрави – срца здравих животиња прекондиционираних физиолошким раствором, SHR – срца спонтано хипертензивних пацова прекондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин – срца здравих животиња прекондиционираних миноциклином, SHR+Миноциклин – срца спонтано хипертензивних пацова прекондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: С (стабилизација) – последњи минут стабилизације, Л (лијек) – последњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је узиман узорак коронарног венског ефлуента за одређивање вриједности NO_2^- .

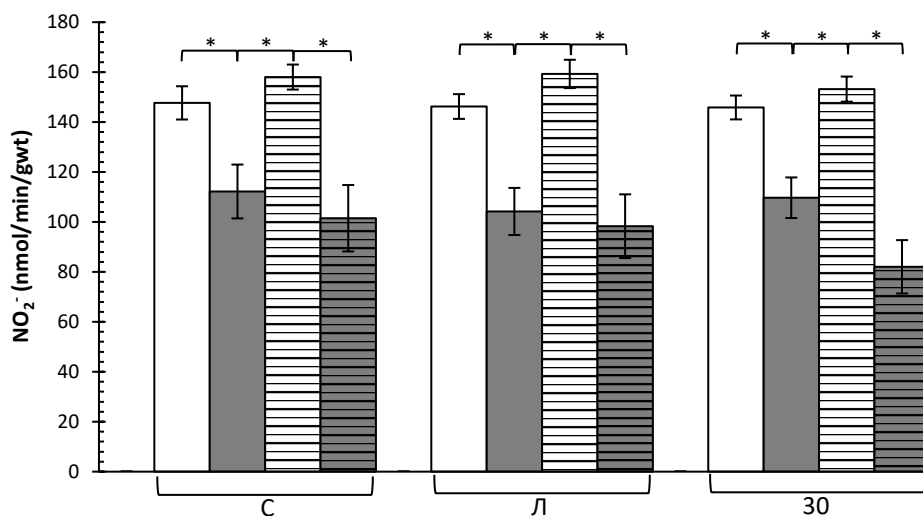


График 4.71. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

На графику 4.71. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: последњи минут стабилизације (С), последњи минут апликације лијека, миноциклин или физиолошки раствор (Л) и последњи минут реперфузије (30) за параметар NO_2^- . У групама нормотензивних срца вриједности NO_2^- биле су значајно више у односу на хипертензивна срца. Вриједности NO_2^- нису се значајније мијењале током експеримента.

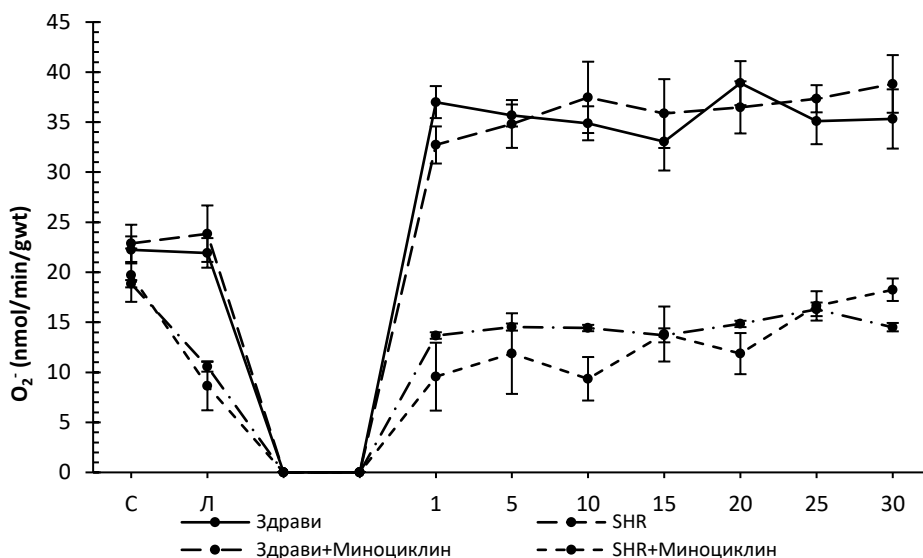


График 4.72. Вриједности супероксид анјон радикала (O_2^-) у експерименталном моделу прекондиционарања срца здравих и животиња са хипертензијом. Здрави – срца здравих животиња прекондиционираних физиолошким раствором, SHR – срца спонтано хипертензивних пацова прекондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин – срца здравих животиња прекондиционираних миноциклином, SHR+Миноциклин – срца спонтано хипертензивних пацова прекондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: С (стабилизација) – последњи минут стабилизације, Л (лијек) – последњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је узиман узорак коронарног венског ефлуента за одређивање вриједности O_2^- .

На графику 4.73. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: последњи минут стабилизације (С), последњи минут апликације лијека, миноциклин или физиолошки раствор (Л) и последњи минут реперфузије (30) за параметар O_2^- . Прекондиционарање миноциклином ефикасно је превенирало повећање продукције O_2^- узроковано исхемијом и реперфузијом. Супротно томе, у групама које су прекондиционирани физиолошким раствором вриједности O_2^- на крају реперфузије (30) биле су значајно више у односу на крај стабилизације (С).

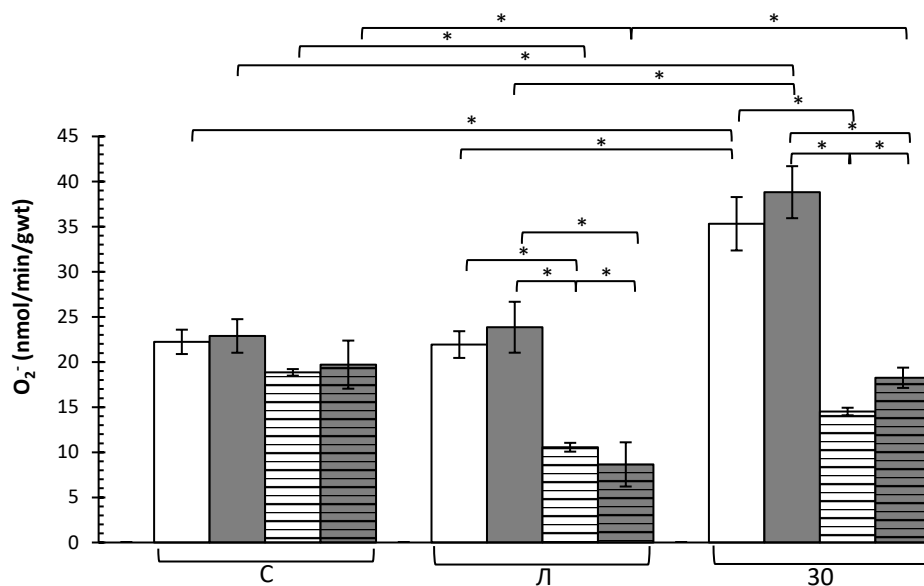


График 4.73. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

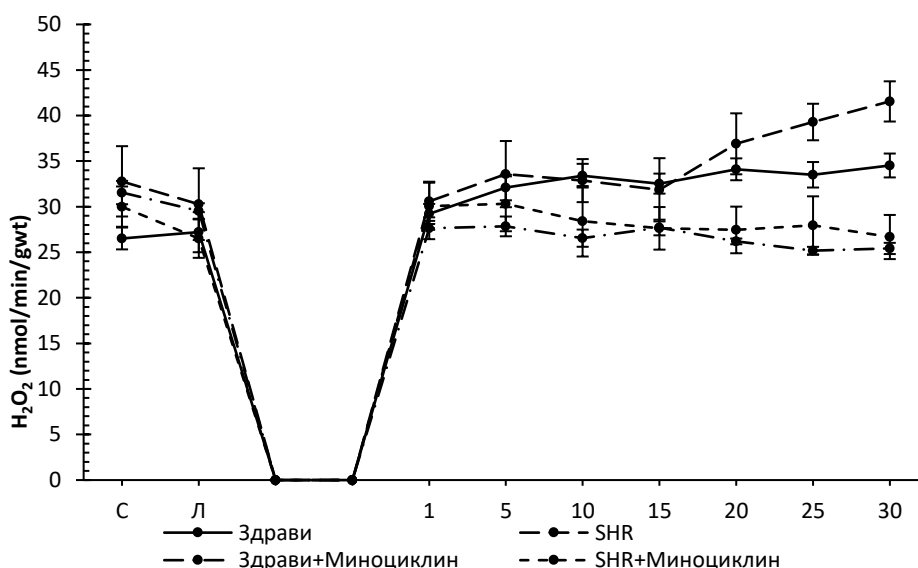


График 4.74. Вриједности водоник пероксида (H_2O_2) у експерименталном моделу прекондиционарања срца здравих и животиња са хипертензијом. Здрави – срца здравих животиња прекондиционираних физиолошким раствором, SHR – срца спонтано хипертензивних пацова прекондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин – срца здравих животиња прекондиционираних миноциклином, SHR+Миноциклин – срца спонтано хипертензивних пацова прекондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: С (стабилизација) – посљедњи минут стабилизације, Л (лијек) – посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је узиман узорак коронарног венског ефлуента за одређивање вриједности H_2O_2 .

На графику 4.75. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: посљедњи минут стабилизације (С), посљедњи минут апликације лијека, миноциклин или физиолошки раствор (Л) и посљедњи минут реперфузије (30) за параметар H_2O_2 . Слично претходном параметру, O_2^- , и вриједности H_2O_2 у групама које

су прекодициониране миноциклоном на крају реперфузије (30) нису се значајно разликовале од вриједности на крају стабилизације (С). У групама у којима су срца прекодиционирана физиолошким раствором, вриједности H_2O_2 на крају реперфузије (30) биле су значајно више у односу на посљедњи минут стабилизације (С).

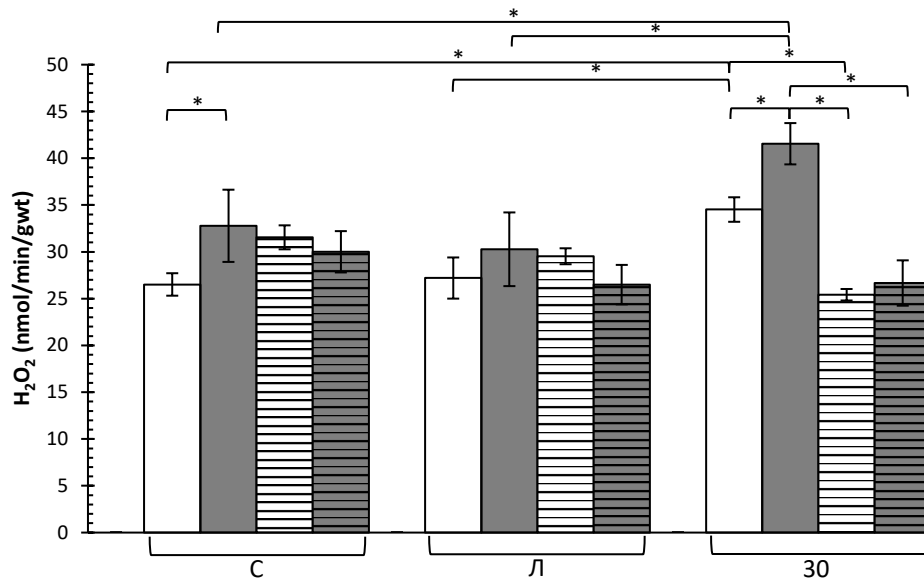


График 4.75. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

4.11. Ефекти посткондиционирања миноциклином на биомаркере оксидационог стреса у коронарном венском ефуленту срца хипертензивних пацова

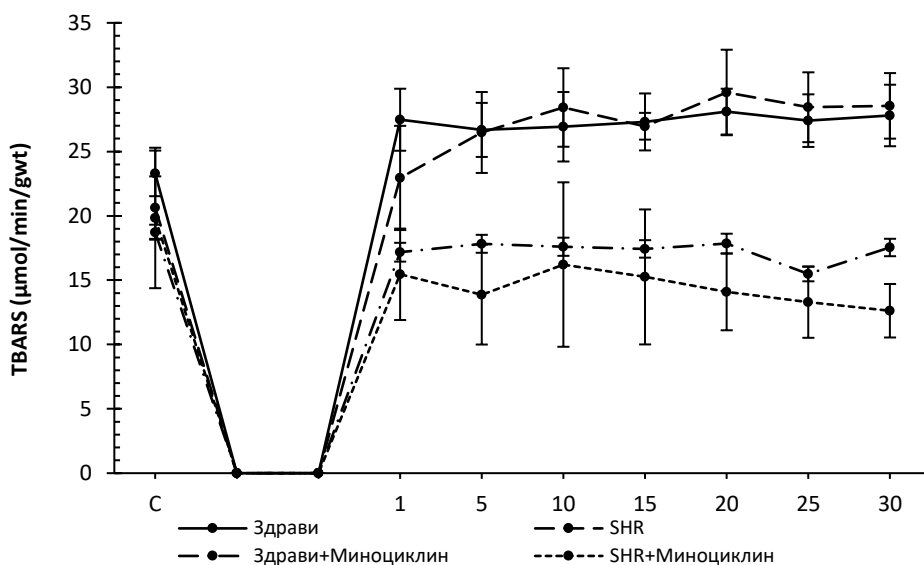


График 4.76. Вриједности индекса липидне пероксидације мјереног као TBARS (TBARS) у експерименталном моделу посткондиционирања срца здравих и животиња са хипертензијом. Здрави – срца здравих животиња прекондиционираних физиолошким раствором, SHR – срца спонтано хипертензивних пацова прекондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин – срца здравих животиња прекондиционираних миноциклином, SHR+Миноциклин – срца спонтано хипертензивних пацова прекондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: C (стабилизација) – посљедњи минут стабилизације, 5 – пети минут реперфузије и уједно посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је узиман узорак коронарног венског ефулента за одређивање вриједности TBARS.

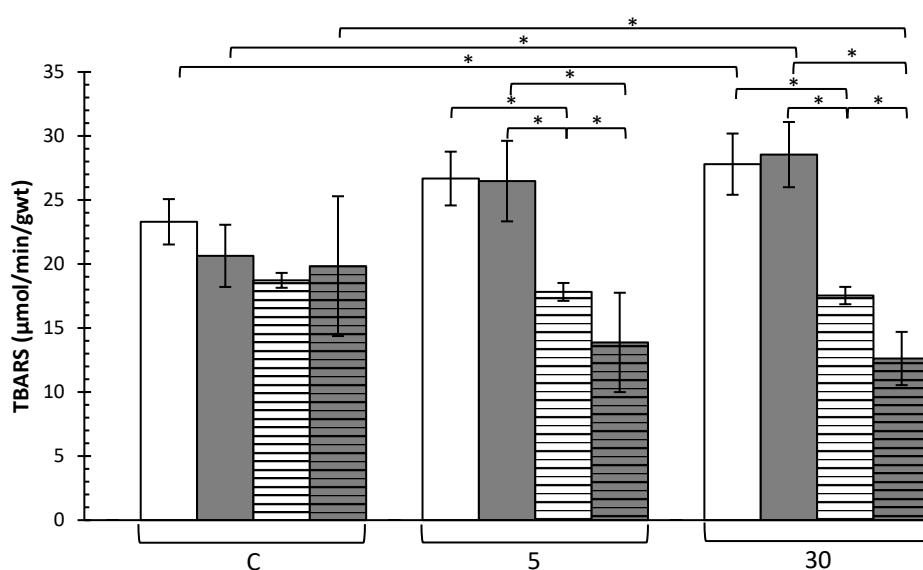


График 4.77. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

На графику 4.77. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: посљедњи минут стабилизације (C), посљедњи минут посткондиционирања, уједно и пети минут реперфузије (5) и посљедњи минут реперфузије (30) за параметар TBARS. Вриједности TBARS биле су значајно више у петом (5) и посљедњем минути реперфузије (30) у односу на почетне вриједности (C) у групама које су посткондиционирани физиолошким раствором у односу на миноциклин. У групи хипертензивних срца која су посткондиционирана миноциклином вриједности TBARS биле су значајно ниже на крају реперфузије (30) у односу на посљедњи минут стабилизације (C).

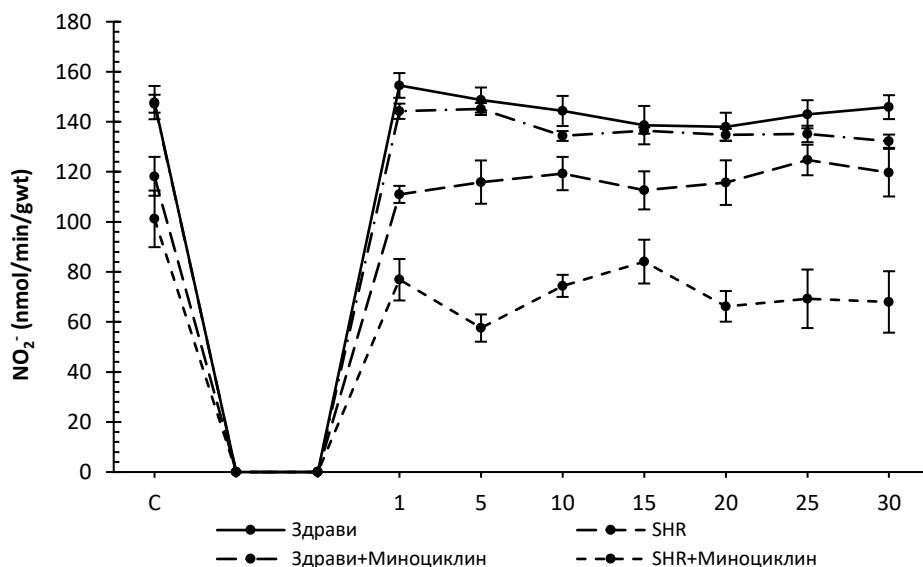


График 4.78. Вриједности нитрита (NO_2^-) у експерименталном моделу посткондиционирања срца здравих и животиња са хипертензијом. Здрави – срца здравих животиња прекондиционираних физиолошким раствором, SHR – срца спонтано хипертензивних пацова прекондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин – срца здравих животиња прекондиционираних миноциклином, SHR+Миноциклин – срца спонтано хипертензивних пацова прекондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: C (стабилизација) – посљедњи минут стабилизације, 5 – пети минут реперфузије и уједно посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је узиман узорак коронарног венског ефлуента за одређивање вриједности NO_2^- .

На графику 4.79. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: посљедњи минут стабилизације (C), посљедњи минут посткондиционирања, уједно и пети минут реперфузије (5) и посљедњи минут реперфузије (30) за параметар NO_2^- . Вриједности NO_2^- биле су значајно ниже у групама хипертензивних срца. Посткондиционирање миноциклином значајно је смањило вриједности NO_2^- током реперфузије (30) у групи хипертензивних срца.

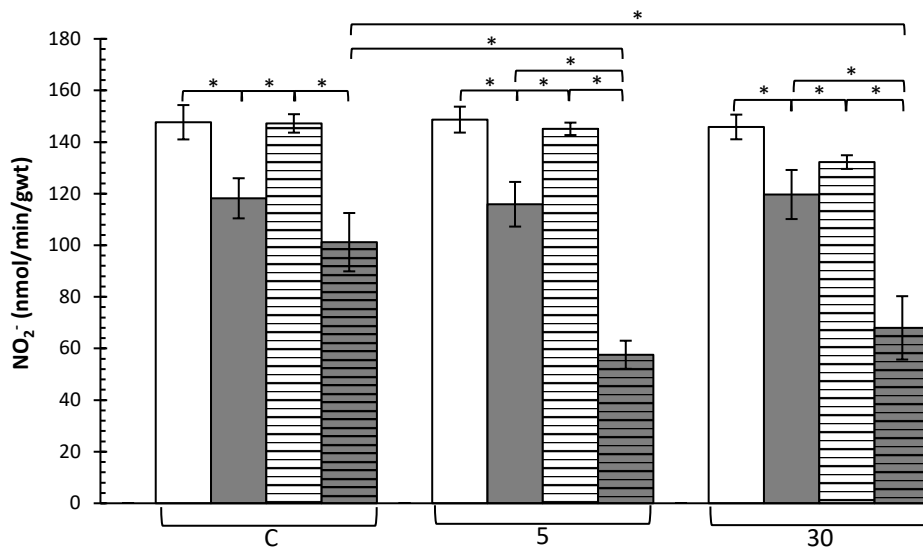


График 4.79. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

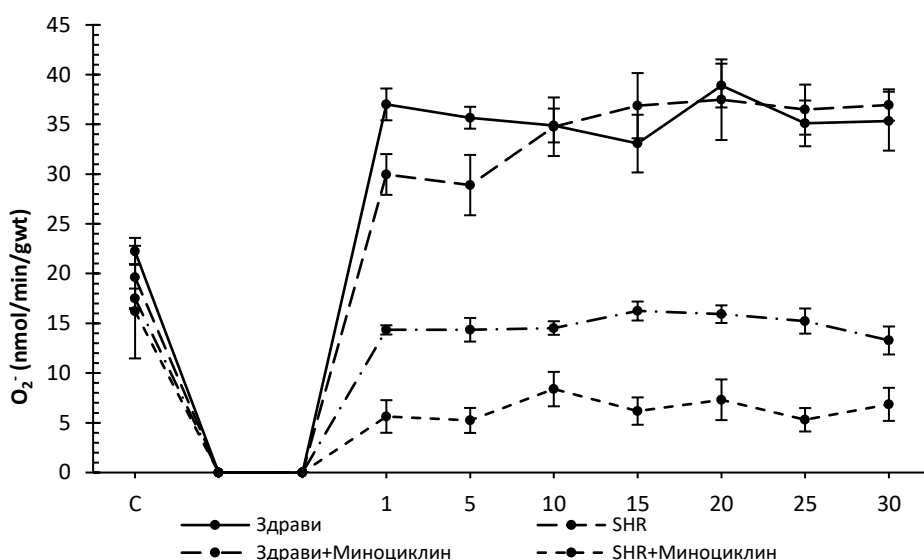


График 4.80. Вриједности супеоксид анјон радикала (O_2^-) у експерименталном моделу посткондиционарања срца здравих и животиња са хипертензијом. Здрави – срца здравих животиња прекондиционираних физиолошким раствором, SHR – срца спонтано хипертензивних пацова прекондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин – срца здравих животиња прекондиционираних миноциклином, SHR+Миноциклин – срца спонтано хипертензивних пацова прекондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: C (стабилизација) – посљедњи минут стабилизације, 5 – пети минут реперфузије и уједно посљедњи минут апликације лијека (физиолошки раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је узиман узорак коронарног венског ефлуента за одређивање вриједности O_2^- .

На графику 4.81. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: посљедњи минут стабилизације (C), посљедњи минут посткондиционарања, уједно и пети минут реперфузије (5) и посљедњи минут

реперфузије (30) за параметар O_2^- . Вриједности O_2^- су имале сличан образац промјена као и вриједности NO_2^- . У групама које су посткондициониране физиолошким раствором вриједности O_2^- током реперфузије (5 и 30) биле су значајно више у односу на групе које су посткондициониране миноциклином. Вриједност O_2^- у групи хипертензивних срца која су посткондиционирана миноциклином била је значајно нижа на крају реперфузије (30) у односу на крај стабилизације (C).

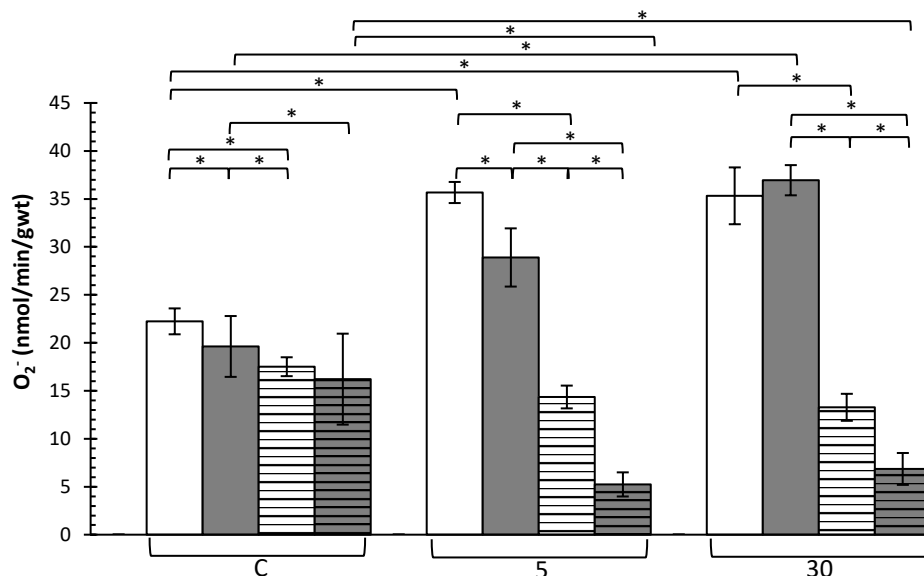


График 4.81. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

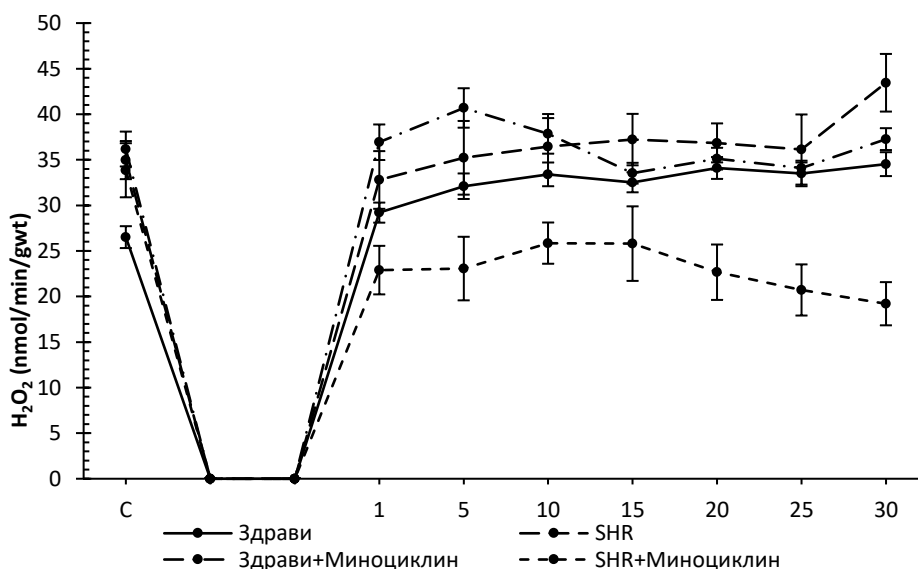


График 4.82. Вриједности водоник пероксида (H_2O_2) у експерименталном моделу посткондиционарања срца здравих и животиња са хипертензијом. Здрави – срца здравих животиња прекондиционираних физиолошким раствором, SHR – срца спонтано хипертензивних пацова прекондиционираних физиолошким раствором, Здрави+Миноциклин – срца здравих животиња прекондиционираних миноциклином, SHR+Миноциклин – срца спонтано хипертензивних пацова прекондиционираних миноциклином. Ознаке на X оси: C (стабилизација) – посљедњи минут стабилизације, 5 – пети минут реперфузије и уједно посљедњи минут апликације лијека (физиолошки

раствор или миноциклин), 1 - 30 – минути реперфузије у којима је узиман узорак коронарног венског ефлуента за одређивање вриједности H_2O_2 .

На графику 4.83. приказане су статистичке значајности између група за изабране тачке од интереса: последњи минут стабилизације (C), последњи минут посткондиционарања, уједно и пети минут реперфузије (5) и последњи минут реперфузије (30) за параметар H_2O_2 . Вриједности H_2O_2 на крају реперфузије (30) биле су значајно више у односу на почетне вриједности (C) у групама посткондиционираним физиолошким раствором, а у групи хипертензивних срца посткондиционираним миноциклином вриједности H_2O_2 на крају реперфузије (30) биле су значајно ниже у односу на крај стабилизације (C).

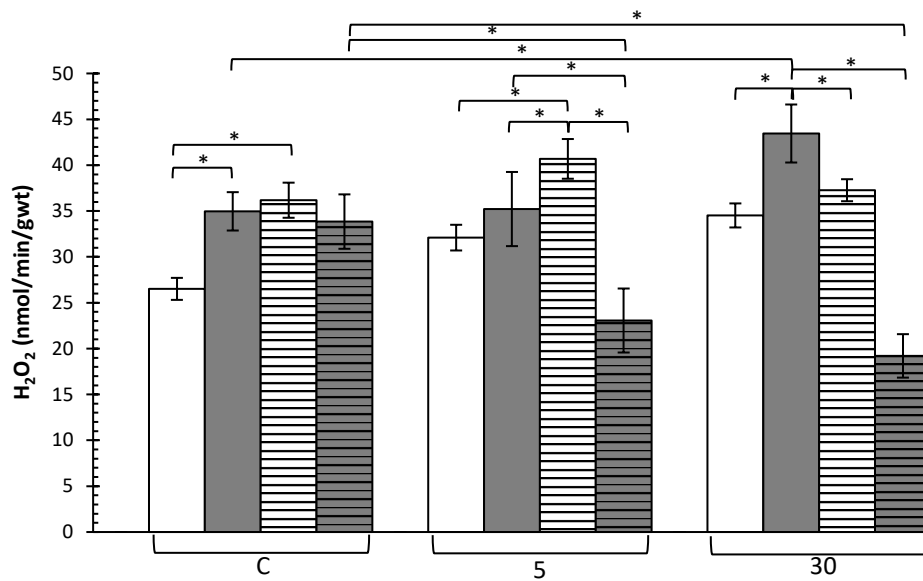
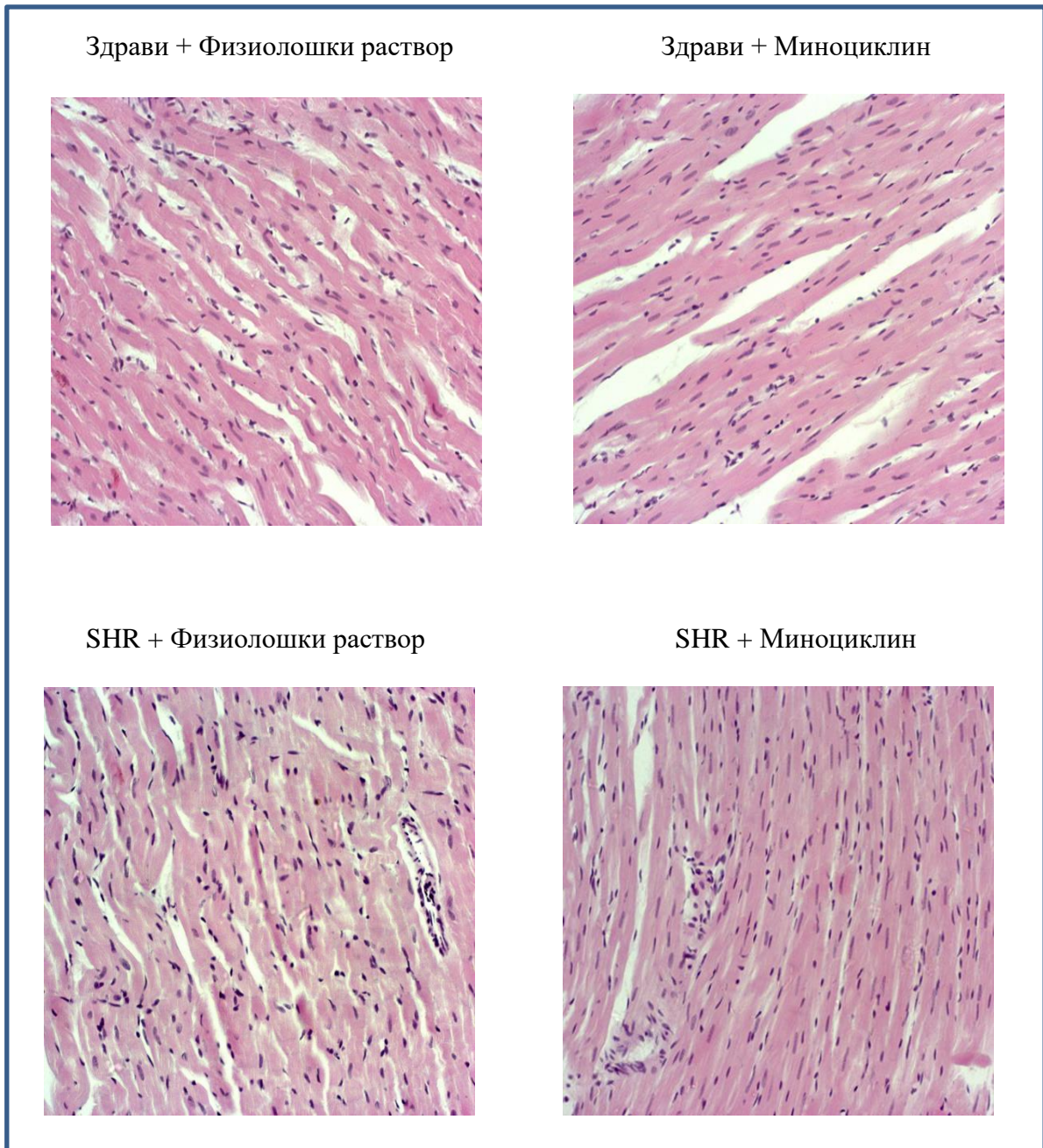
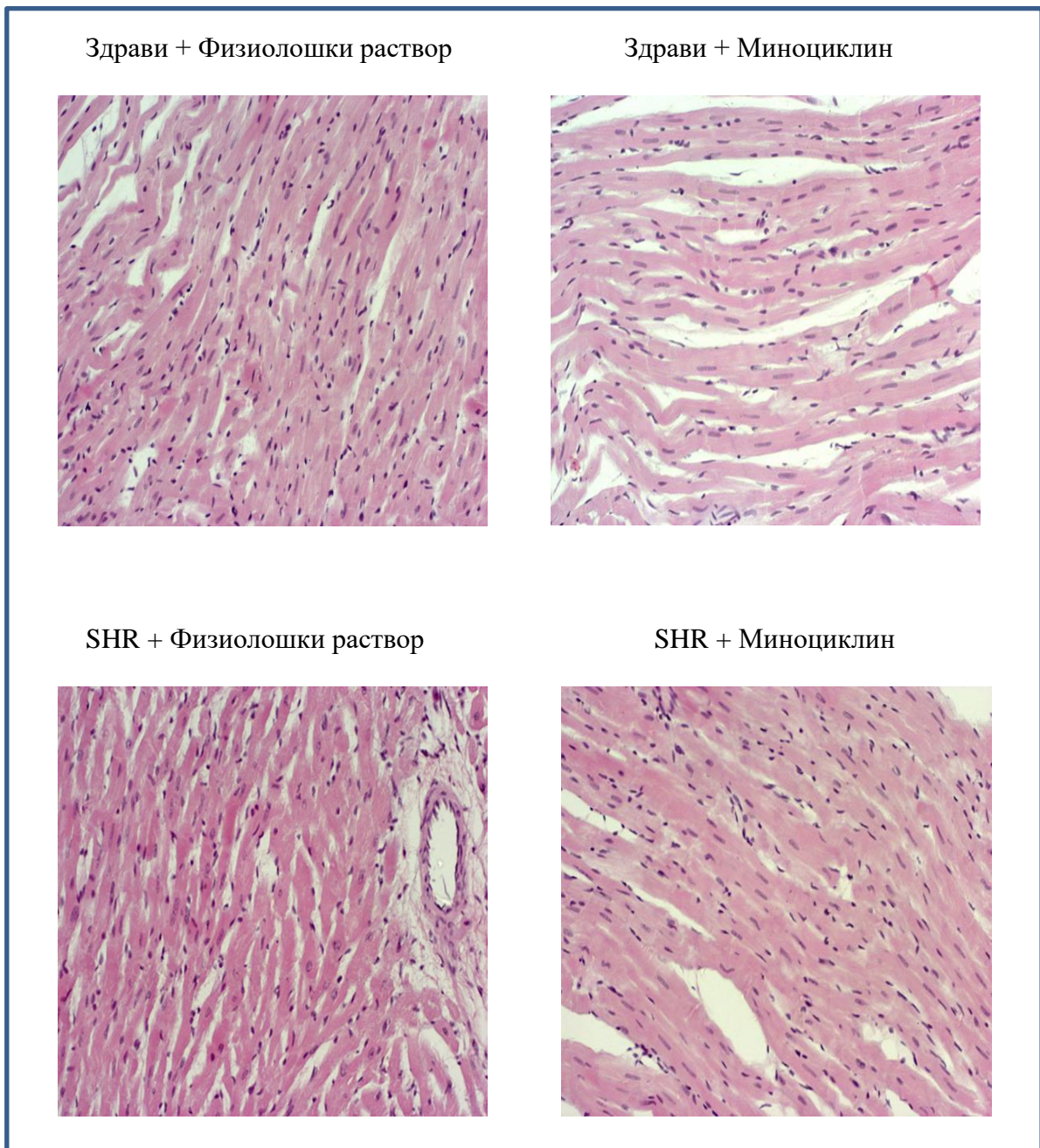


График 4.83. Поређење одабраних тачака од интереса између појединачних група.

4.12. Патохистолошка евалуација миокарда здравих и миокарда пацова са хипертензијом, пре и посткондиционираних миноциклином и физиолошким раствором



Слика 4.3. Патохистолошке промјене у миокарду здравих и миокарду пацова са хипертензијом (SHR) преко кондиционираних миноциклином и физиолошким раствором.



Слика 4.4. Патохистолошке промјене у миокарду здравих и миокарду пацова са хипертензијом (SHR) посткондиционираних миноциклином и физиолошким раствором.

На уздужним пресјецима срца здравих, нормотензивних пацова, мишићна влакна су у регуларном распореду, доминирају хиперемија и едем, уз присутну дегенерацију и некрозу мишићних ћелија. Степен хиперемије и едема је сличан у свим групама, док се у миокарду пацова прекондиционираних миноциклином, уочавају дегенеративне промене и углавном фокалне, дискретне и уницелуларне некрозе мишићних ћелија. У осталим групама, исхемијска оштећења су израженија, сличног су обима, укључују мрљасту некрозу већег броја ћелија, ретко и некрозу конфлуентног типа.

На уздужним пресјецима хипертензивних срца, мишићна влакна су хипертрофична, дијелом у ирегуларном распореду, крвни судови су задебљалог зида са уочљивом периваскуларном фиброзом, интерстицијум је проширен и местимично хиперцелуларан, са повећањем броја мононуклеарних и везивних ћелија. Хистоморфолошке промене, хиперемја и едем, дегенерација и некроза мишићних ћелија, варирају у степену и обиму захваћености миокарда. Код пацова пре и посткондиционираних физиолошким раствором, хиперемја и едем су израженији, дегенеративне промене доминирају, а некроза се уочава у већем броју кардиомиоцита, често је конфлуентна и масивно-зонална. Степен некрозе и дегенерације мишићних ћелија хипетензивних срца посткондиционираних миноциклином је сличан, али нешто блажег степена, док су код хипетензивних срца прекондиционираних миноциклином хистоморфолошке промене значајно мањег степена, што укључује доминантну дегенерацију са чешће мрљастом и уницелуларном некрозом мишићних ћелија.

V
ДИСКУСИЈА

У посљедњих неколико деценија више аутора се бавило испитивањем протективних могућности миноциклина у различитим условима исхемије или реперфузије. Међутим, ова истраживања су углавном била оријентисана ка нервном систему и могућностима заштите у оквиру неуролошких поремећаја. *Naderi* и сарадници су систематизовали протективна дејства миноциклина у анималним моделима и клиничким истраживањима која се односе на фокалну церебралну исхемију (122). Кључни закључак овог ревијског рада, у коме је анализирано 35 анималних истраживања и 6 клиничких студија, је неуропротективни ефекат миноциклина потврђен кроз повећање вијабилности неурона и смањење величине инфаркта. Механизми који су наведени у овом раду којима миноциклин остварује своје ефекте укључују антиинфламацијско, антиапоптозо и антиоксидационо дејство. Пред тога, показано је да миноциклин повећава и поспешује регенерацију неурона након церебралне исхемије. Овакви резултати захтјевају веће и опсежније клиничко истраживање које би кроз више детаља потврдило оправданост примјене миноциклина као неуропротективног агенса у исхемијском можном удару (122). Истраживање које директно повезује неуропротективне ефекте миноциклина и редукцију оксидационог стреса спровели су *Cai* и сарадници (123). Показано је да примјена миноциклина смањује величину инфаркта уз повећање активности глутатион пероксидазе, глутатион синтетазе и глутатион редуктазе, као и супероксид дисмутазе. Услед наведене чињенице закључује се да протективни ефекти миноциклина произилазе из повећања антиоксидационих капацитета нервног ткива (123).

Са друге стране, *Zhou* и сарадници су приказали доступне резултате који се односе на други, може се рећи, неочекивани ефекат миноциклина – антиноцицептивни или анагетски (124). Резултати више истраживања указују на снажан анагетски ефекат миноциклина у испитивању бола различитог порјекла – висцерални бол, периферна неуропатија изазвана хемиотерапијом, неуропатки бол изазван повредом, бол услед дијабетесне неуропатије, бол настао услед оштећења кичмене мождине, бол изазван запаљењем и бол настао као посљедица карцинома костију. Резултати овог истраживања указују на евентуалну могућност примјене миноциклина у лијечењу бола, поготово бола који је рефрактаран на друге видове терапије (124). Интересантан рад који потписује *Mak Adam Daulatzai* указује на могућност употребе миноциклина у терапији Алцхајмерове болести (125). Наиме, готово 99% клиничких истраживања која су у трећој фази и која се баве новим терапијским могућностима Алцхајмерове болести завршава се неуспјешно. Највероватније због комплексне етиологије Алцхајмерове болести гдје суделује велики број етиолошких фактора, при чему механизам њиховог дјеловања и њихове међусобне интеракције нису довољно познате. Миноциклин, уз мелатонин, модафинил и мемантин, представља дио групе „М“ лијекова који би могли да дају позитиван ефект у лијечењу пацијената са једним од најтежих облика деменције. Кључ успеха оваквог терапијског приступа је истовремено дјеловање на више етиолошких фактора, при чему је неуропротективни ефекат миноциклина од кључног значаја (125).

Антиинфламацијско и неуропротективно дејство миноциклина је показано на анималном моделу ретинопатије, при чему је испитиван ефекат двије дозе миноциклина (126). Показано је да доза миноциклина од 13,5 mg/kg испољава најизраженији протективни ефекат и значајно повећава број ретиналних ганглијских ћелија. Наведени ефекат је посредован смањењем активације микроглије, редукцијом оксидационог стреса и смањењем инфламације (126).

Анализом наведених истраживања формулисан је циљ овог истраживања као испитивање потенцијално кардиопротективних ефеката миноциклина у условима исхемије и реперфузије изолованих срца пацова са дијабетесом типа 2 и хипертензијом. Посебан осврт у истраживању је праћење биомаркера оксидационог стреса у узорцима коронарног венског ефлуента.

Резултати овог истраживања указују на несумњиве протективне ефекте миноциклина у условима експериментално индуковане исхемије и реперфузије како на срцима пацова са индукованим дијабетесом типа 2, тако и на срцима спонтано хипертензивних пацова. Анализом добијених резултата који се односе на динамику продукције биомаркера оксидационог стреса изводи се закључак да антиоксидациони потенцијал миноциклина и редукација оксидационог оштећења свакако чини важан, ако не и кључни механизам протективног дејства миноциклина.

5.1. Ефекти прекондиционарања и посткондиционарања миноциклином на функцију дијабетичних срца

Као што је наведено у одјелку који се односи на резултате, анализирајући параметре који се односе на контрактилну способност срца (dp/dt max и dp/dt min) и притиске у лијевој комори (SLVP и DLVP), миноциклин је испољио евидентан кардиопротективни ефекат и на дијабетичним и на хипертензивним срцима.

Yoshida и сарадници су ипитивали утицај интерлеукина 17А (IL-17А) на вијабилност кардиомиоцита, утицај миноциклина на негативне ефекте узроковне IL-17А на кардиомиоцитима и молекулске механизме који су укључени у негативни инотропни ефекат IL-17А и протективне механизме миноциклина (127). Додавање рекомбинантног мишијег IL-17А узроковало је смањење контрактилности кардиомиоцита (за 34%) праћено повећањем активности индуцибилне азот монооксид синтетазе (енг. *inducible nitric oxide synthase* - iNOS) и повећаном продукцијом азот монооксида (NO). Повећање активности iNOS и повећана концентрација IL-17А праћена је повећањем продукције IL-1 β и фактора туморске некрозе α (TNF- α). Примјена миноциклина је узроковала смањење штатних ефеката насталих дјеловањем IL-17А, што указује на евентуалну могућност примјене миноциклина у терапији инфламацијских болести срца (127). Важност ублажавања инфламацијске каскаде у којој посредује IL-17А свједочи и неколико других истраживања. *Yan* и сарадници су показали на експерименталном моделу инфаркта миокарда код мишева, који је индукован перманентном лигацијом лијеве десцендентне коронарне артерије, акумулацију IL-17А и IL-23 у ткиву које је захваћено исхемијом (128). Смањење експерисије IL-17А и IL-23 узроковало је повећање седмодневног преживљавања, смањење ткива које је захваћено инфарктом, смањење фиброзе и побољшање систолне функције лијеве коморе (128). На сличном експерименталном моделу, други аутори су показали улогу IL-17А у ремоделовању лијеве коморе након инфаркта миокарда (129). Додавање IL-17А имало је за посљедицу повећање масе миокарда захваћеног инфарктом, ремоделовање комора, смањење систолне функције и повећање фиброзе миокарда. Генска деплеција IL-17А имала је супротан ефекат (129). Већ показана веза између исхемије миокарда и IL-17А, као и могућност деловања миноциклина на нежељене ефекте повећане продукције IL-17А, представља могућност терапијског деловања и повећања функционалне способности миокарда након инфаркта.

Комплексније истраживање на пацовима, које су спровели *Wang* и сарадници, указало је на терапијски потенцијал миноциклина како у смањењу оштећења миокарда услед дуготрајне исхемије, тако и у редуковању бихевиоралних промјена које су везане за инфаркт миокарда (130). Апликација миноциклина у дози од 50 mg/kg/day значајно је редуковала величину инфаркта, повећала ејекциону фракцију и смањила енд-дијастолни притисак. Поред евидентних протективних ефеката на миокард, миноциклин је преудпредио развој бихевиоралних промјена које се описују као стање слично депресији. Дакле, примјена миноциклина смањује системску инфламацију насталу

након инфаркта миокарда, превенира срчану слабост и редукује бихевиоралне последице инфаркта миокарда, вјероватно смањењем неуроинфламације (130).

Резултати истраживања релативно сличног дизајна као и претходно показали су протективне ефекте миноциклина и на *in vivo* и на *in vitro* моделу инфаркта миокарда (131). Инфаркт *in vivo* је индукован на пацовима, подвезивањем предње лијеве десцендентне коронарне артерије у трајању од 1 сата, након чега је наступио период реперфузије у трајању од 48 сати. Апликација миноциклина, у дози од 45 mg/kg, је претходила исхемији, док је у дози од 22.5 mg/kg апликован током реперфузије. Примјена миноциклина је, слично претходним истраживањима, смањила величину инфаркта и оштећење кардиомиоцита, побољшала ејекциону фракцију лијеве коморе и фракционо скраћење лијеве коморе. Наведени повољни ефекти праћени су значајним смањењем концентрације IL-1 β и моноцитног хемоатрактантног протеина 1 (енг. *monocyte chemoattractant protein-1* - MCP-1). Ефекти миноциклина *in vitro* испитивани су на H9c2 кардиомиоцитима, а симулација инфаркта је вршена депривацијом кисеоника и глукозе (131). Претходна примјена миноциклина у растућим концентрацијама (1-50 μ mol/L) је дозно-зависно узроковала смањење оштећења ћелија и смањење продукције MCP-1 и IL-6. Поред тога, у оба експериментална модела, миноциклин је повећао експресију MCP1P1 (енг. *monocyte chemotactic protein-induced protein-1*) који дјелује антиинфламаторно. Имајући у виду да је смањење експресије MCP1P1 праћено минимизирањем протективног учинка миноциклина, аутори су закључили да је MCP1P1 важан део комплексне каскаде која посредује у кардиопротективном дејству миноциклина (131).

Zhao и сарадници су у свом истраживању показали да миноциклин остварује кардиопротективно дејство инхибицијом поли (ADP-рибоза) полимеразе (енг. *Poly [ADP-ribose] polymerase 1* - PARP-1) (132). Примјена миноциклина је значајно редуковала ремоделовање миокарда и инхибисала проинфламаторне факторе. TUNEL анализа је указала на смањење апоптозе у зони инфаркта. Инхибиција PARP-1 је повезана са смањењем експресије инфламаторних фактора нуклеарног фактора κ B (NF- κ B) и IL-1 β . На основу добијених резултата аутори су закључили да миноциклин може да инхибира апоптозу и продукцију инфламаторних фактора, смањи инфламацију и побољша ремоделовање миокарда након инфаркта инхибицијом PARP-1 (132).

Протективни ефекти миноциклина су показани и на Лангендорфовом моделу изолованог срца зеца (133). Кључни циљ овог истраживање био је испитивање протективног ефекта миноциклина примјењеног непосредно прије индукције кардиоплегије. Миноциклин је примјењен у дози од 1 μ mol/L непосредно пред индукцију хладне кардиоплегије примјеном раствора *Custodiol*, која је трајала 90 минута, а након које је усљедила реперфузија у трајању од 30 минута. Хистоморфолошка анализа ткива миокарда показала је значајно смањење апоптозе, као и маркера оксидационог и нитрозативног стреса. Вриједности АТФ-а, малондиалдехида и супероксид анјон радикала (O_2^-) нису се значајно разликовале између група. Функционални опоравак срца након кардиоплегије, анализом параметара контрактилности срца dp/dt max и dp/dt min, у групи која је прекондиционирана миноциклином био је значајно бржи. На основу добијених резултата аутори истраживања су закључили да додавање миноциклина у кардиоплегични раствор може потенцијално у великој мјери да унаприједи функционисање срца и убрза опоравак након кардиоплегије (133).

Резултати претходно наведених истраживања су у сагласју са резултатима овог истраживања, имајући у виду да је примјена миноциклина, и као прекондиционарајућег и као посткондиционарајућег агенса, има повољне протективне ефекте на срчано ткиво. Са друге стране, у литератури нема резултата који се односе на утицај миноциклина на

срце у дијабетесу и хипертензији, тако да је ово истраживање пионирско у тој области. Резултати су показали да миноциклин има протективни ефекат и на дијабетичним и на хипертензивним срцима. Молекулски механизми кардиопротекције изазване миноциклином се вјероватно подударају са сигналним каскадама у здравом срцу. Међутим, имајући у виду значајно измјењене регулаторне механизме у дијабетесу и хипертензији, вјероватно постоје особености које ће бити тема будућих истраживања.

Иако нема резултата који се односе на испитивање протективног утицаја миноциклина на срце у дијабетесу или хипертензији, постоји неколико истраживања која су се бавила испитивањем утицаја миноциклина на друге органске системе. *Shah* и коаутори су испитивали оправданост примјене миноциклина уз инхибиторе ренин-ангиотезин-алдостерин система у лијечењу протеинурије код пацијената са дијабетичном нефропатијом (134). У истраживање су укључени пацијенти који имају дијабетес типа 2 компликован дијабетесном нефропатијом, клиренс креатинина >30 mL/min, протеинурију ≥ 1.0 g/дан, узраста преко 30 година, при чему су се вриједности крвног притиска одржавале на вриједностима нижим од 150/95 mmHg. У урину су праћене вриједности IL-6 и остеопротегерина. Примјена миноциклина код ових пацијената је узроковала редукцију односа IL-6:креатинин као и односа остеопротегерин:креатинин. Добијени резултати сугеришу на цитопротективне и нефропротективне ефекте миноциклина у дијабетесу (134). Друго истраживање које се бавило нефропротективним дејством миноциклина спроведено је на пацовима са дијабетесом који је индукован стрептозотоцином (135). Дијабетес је индукован интраперитонеалном примјеном стрептозотоцина у дози од 55 mg/kg. Поједини аутори ову врсту дијабетеса поистовјећују са дијабетесом типа 1, међутим у дијабетесу који је индукован стрептозотоцином недостаје аутоимунска компонента болести, па је свакако правилније овакав дијабетес класификовати као посебну форму – хемијски дијабетес или дијабетес индукован стрептозотоцином (енг. *streptozotocin (STZ) induced diabetes*). Хистопатолошке промене у бубрезима анализирани су класичним хематоксилин/еозин (HE) бојењем и TUNEL бојењем. У ткиву бубрега RT-PCR техником квантификована је експресија каспазе-3, Вах и Bcl-2, као маркера апоптозе. Миноциклин је узроковао смањење количине протеина у урину, као и креатинина и урее у серуму. У бубрезима је миноциклин смањивао експресију каспазе-3 и Вах, док је експресија Bcl-2 била повишена. Резултати овог истраживања указују на ренопротективне ефекте миноциклина који су, бар дијелом, посредовани инхибицијом апоптозе (135). Имајући у виду већ претходно описано антиапоптоско дејство миноциклина, које је потврђено у нефропротекцији у дијабетесу, вјероватно је овај механизам важан и у кардиопротекцији која је описана у овом истраживању.

Поред нефропротективног дејства, описано је и неуропротективно дејство миноциклина у дијабетесу. *Kelly-Cobbs* и сарадници су испитивали различите модалитете помоћне терапије у експерименталном можданом удару и можданој исхемији у дијабетесу (136). Миноциклин је као инхибитор матриксне металопротеиназе (енг. *matrix metalloproteinase* - MMP) смањивао експресију MMP-9. Примјена миноциклина је била праћена неуропротекцијом која се манифестовала кроз смањење церебралног едема и побољшање неуролошких функција (136). Значај инхибиторног ефекта миноциклина на MMP-9 претходно је показан на моделу експерименталног аутоимунског миокардитиса (137). Поређењем ефеката миноциклина, који је инхибитор MMP-9, и специфичног инхибитора MMP-2, TISAM показано је да миноциклин значајно смањује инфилтрацију ткива миокарда Т-ћелијама и макрофагима, што је праћено и смањењем интензитета експерименталног аутоимунског миокардитиса. Супротно томе, инхибиција MMP-2 није имала значајан ефекат на ток експерименталног аутоимунског миокардитиса (137).

Ефекти миноциклина као инхибитора MMP показали су успјех у смањењу портне хипертензије, имајући у виду значај MMP у фиброгенези и ангиогенези (138). У експерименталном моделу портне хипертензије која је индукована подвезивањем главног жучног вода на пацовима и мишевима, примјена миноциклина је смањила портну хипертензију, хемодинамске поремећаје, колатерални шант, вриједности васкуларног ендотелног фактора раста (енг. *Vascular Endothelial Growth Factor* - VEGF) у плазми и фиброзу у јетри. Резултати овог истраживања указују на значај MMP-9 у развоју портне хипертензије, као и могућност миноциклина да редукује последице портне хипертензије инхибицијом MMP-9 (138).

Друго истраживање указује на могућност примјене миноциклина у терапији резистентне хипертензије (139). Наиме у клиничком истраживању које се бавило могућношћу примјене миноциклина у терапији хипертензије показано је да миноциклин смањује крвни притисак, међутим предложени механизам подразумјева интиинфламаторно дејство миноциклина, као кључни механизам за постизање антихипертензивног ефекта. Сматра се да миноциклин смањује активацију микроглије, чиме се смањује продукција IL-17, па антихипертензивно дејство миноциклина заправо произилази из смањења неуроинфламације која настаје усљед поремећаја крвно-мождане баријере код старијих особа (139).

Акутна апликација миноциклина у овом истраживању узроковала је смањење систолног крвног притиска у лијевој комори. Међутим, како у здравим, тако и у дијабетичним и хипертензивним срцима, прекондиционирање и посткондиционирање миноциклином одржало је вриједности систолног притиска у лијевој комори (SLVP) током реперфузије на вриједностима које се нису значајно разликовале од почетних вриједности. Вриједности дијастолног притиска у лијевој комори (DLVP) се нису значајније мијењале током експеримената.

Истраживање које су спровели *Bhatt* и *Veeranjaneyulu* бавило се испитивањем комбиноване примјене миноциклина, као инхибитора MMP, и аспирина који делује као инхибитор циклооксигеназе и активатора ткивног плазминогена, у експерименталном дијабетесу (140). Вриједности средњег артеријског притиска, срчане фреквенције и контрактилности миокарда биле су значајно ниже код пацова који су имали дијабетес индукован стрептозотоцином у односу на здраве животиње. Комбинована примјена аспирина и миноциклина је значајно редуковала експресију колагена, MMP-2 и MMP-9 у односу на животиње са дијабетесом које нису примале никакву терапију. Наведено истраживање указује на синергистички ефекат аспирина и миноциклина у инхибицији MMP и остваривању кардиопротективних ефеката (140). Слично истраживање истих аутора, бавило се примјеном миноциклина у комбинацији са аспирином на експериментални инфаркт миокарда дијабетичних пацова (141). Слично претходном истраживању, дијабетес је индукован стрептозотоцином у дози од 55 mg/kg, а три недеље након индукције дијабетеса животиње су примале миноциклин, аспирин или комбинацију два лијека. Инфаркт миокарда је изаван три недеље након почетка апликовања лијекова, а шест недеља од индуковања дијабетеса, *in vivo*, подвезивањем предње лијеве десцендентне коронарне артерије у трајању од 30 минута, након чега је усљедила реперфузија у трајању од 2 сата. Резултати истраживања су показали да комбинована примјена миноциклина и аспирина значајно смањује масу миокарда захваћену инфарктом, аритмије, морталитет и ниво колагена у микораду као и експресију MMP-2 и MMP-9 (141). Оба наведена истраживања потенцирају инхибицију MMP, пре свега MMP-9, као кључни механизам протективног деловања миноциклина.

Кардиопротективно дејство миноциклина је показано и на моделу акутне токсичности изазване алумијум фосфитом (142). Алумијум фосфит је апликован пацовима оралном гаважом а након тога је усљедила примјена миноциклина. Резултати

су показали да алумијум фосфит изазива поремећаје у електрокардиограму (ЕКГ), као и пад срчане фреквенције и крвног притиска. Поред кардиопротективног дејства у овом експерименталном моделу, миноциклин је испољио и нефропротективно дејство.

Резултати овог истраживања у великој мјери корелирају са досадашњим резултатима. Миноциклин испољава кардиопротективно дејство у условима исхемије и реперфузије. Анализом досадашњих истраживања закључују се да у испољавању протективног ефекта миноциклина посредује већи број механизма и сигналних путева, чиме се заправо повећава терапијски потенцијал и шири лепеза могућности у примјени.

5.2. Ефекти прекондиционирања и посткондиционирања миноциклином на биомаркере оксидационог стреса

Анализом добијених резултата уочавају се знатно више вриједности биомаркера оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту дијабетичних срца у поређењу са здравим срцима. Са друге стране, почетне вриједности биомаркера оксидационог стреса нису се значајно разликовале између хипертензивних и нормотензивних срца. На основу наведене чињенице закључује се да дијабетес индукује прооксидационо окружење, док се у хипертензији такво стање не среће.

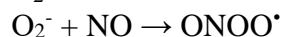
Маркер оксидационог стреса који се у дијабетичним срцима највише мијењао је супероксид анјон радикал (O_2^-). У срцима гдје је прекондиционирање вршено физиолошким раствором вриједности O_2^- су се значајно повећале током реперфузије. Супротно томе, у групама гдје је прекондиционирање вршено миноциклином вриједности O_2^- су остале у нивоу почетних вриједности, а у групама у којима је вршено посткондиционирање вриједности O_2^- су биле значајно ниже у односу на вриједности на крају стабилизације.

У групи хипертензивних срца прекондиционирање миноциклином је значајно редуковало вриједности индекса липидне пероксидације, док су остали мјерени биомаркери били на сличном нивоу као на крају стабилизације. Посткондиционирање миноциклином је имало израженији утицај на редокс равнотежу хипертензивних срца имајући у виду чињеницу да су вриједности свих биомаркера оксидационог стреса биле ниже на крају реперфузије у односу на крај стабилизације.

Антиоксидациони потенцијал миноциклина је већ претходно поменут у истраживању које су спровели *Сai* и сарадници (123). Примјена миноциклина у експерименталном моделу фокалне церебралне исхемије узроковала је повећање активности већег броја ензима са антиоксидационим дејством – глутатион пероксидазе, глутатион синтетазе, глутатион редуктазе и супероксид дисмутазе. Као последица повећане активности антиоксидационих ензима ниво липидне пероксидације је био знатно нижи. Аутори су закључили да протективно дејство миноциклина у овом моделу потиче од антиоксидационог ефекта (123). Такође, у претходно описаном истраживању које су спровели *Salameh* и сарадници на изолованом срцу зеца, миноциклин је испољио антиоксидационо дејство (133). Међутим, супротно резултатима овог истраживања вриједности малондиладехида и O_2^- су остале непромјењене дјеловањем миноциклина.

Поред повећања антиоксидационог капацитета *Schildknecht* и сарадници су показали да миноциклин може директно да неутралише пероксинитрит (143). Показано је да овакво понашање миноциклина (скевенџер – енг. *scavenger*) штити ћелију од штетног дејства пероксинитрита, при чему су структуре попут митохондријске ДНК и протеина поштеђене оксидационог оштећења. Реакцијом моноциклина и пероксинитрита мијења се структура миноциклина при чему настају једињења која немају антиоксидациони потенцијал. Са друге стране, аутори поменутог истраживања су

показали да миноциклин не неутралише O_2^- и NO, међутим имајући у виду да пероксинитрит настаје реакцијом O_2^- и NO:



смањење вриједности O_2^- у овом истраживању можда настаје посредно, неутрализацијом пероксинитрита који настаје усљед повећане продукције O_2^- (144).

У експерименту чији је циљ био испитивање ефеката додавања миноциклина или епигалокатехин-3-галета у кардиоплегични раствор приликом кардиопулмоналног бајпаса (145), иако примјена миноциклина није значајно побољшала кардиодинамску функцију, смањени су параметри нитросативног и оксидационог стреса, као и маркери инфламације.

Број истраживања која се тичу улоге миноциклина у редукцији оксидационог оштећења изазваног исхемијом у кардиоваскуларном систему је прилично ограничен. Међутим, у истраживању чији је циљ био испитивање утицаја миноциклина на оштећење тестиса током исхемије и реперфузије индуковане експерименталном моделу торзије тестиса на пацовима (146). Показано је да примјена миноциклина у великој мери редукује оксидационо оштећење тестиса индуковано торзијом повећањем активности антиоксидационих ензима – глутатион пероксидазе, супероксид дисмутазе и каталазе. Поред тога смањена је експресија проапоптотских гена попут каспазе 3 и Вах, као и проинфламаторних молекула IL-1 β и TNF- α (146).

Резултати овог истраживања, као и већег броја других истраживања указују на значајан терапијски потенцијал миноциклина у превенцији оштећења миокарда током исхемије и реперфузије, а један од кључних механизма је свакако редукција оксидационог стреса и повећање антиоксидационог потенцијала.

VI ЗАКЉУЧЦИ

Анализом резултата овог истраживања, као и поређењем са резултатима других истраживања сличног дизајна и циља, изведени су сљедећи закључци:

1. Примјена миноциклина као кондиционирајућег агенса је значајно унаприједила функцију срца у условима исхемије и реперфузије, што се манифестовало кроз очување вриједности кардиодинамских параметара током реперфузије на вриједностима које су приближне почетним вриједностима;
2. Протективни ефекти миноциклина се испољавају и у срцима пацова са индукованим дијабетесом типа 2, као и у срцима спонтано хипертензивних пацова;
3. Кардиопротективни ефекти миноциклина постоје и када се примјени током прекондиционирања, као и током посткондиционирања;
4. Хистоморфолошка анализа ткива миокарда указује на значајан протективни потенцијал миноциклина, имајући у виду да се у групама у којима је примјењено кондиционирање уочавају оштећења ткива нижег степена;
5. Анализом резултата овог истраживања, као и истраживања других аутора, уочава се сложен образац дјеловања миноциклина и више потенцијалних механизма протекције – антиинфламаторни, антиоксидациони, антиапоптоски;
6. Оксидациони стрес је значајније изражен у дијабетичним срцима у односу на срца хипертензивних пацова;
7. У дијабетесним срцима, миноциклин у највећој мјери дјелује на смањење вриједности супероксид анјон радикала;
8. У хипертензивним срцима, поготово у условима посткондиционирања, миноциклин испољава значајнији антиоксидациони ефекат;
9. Анализом динамике промјена вриједности биомаркера оксидационог стреса током експеримента, као и хистоморфолошке анализе препарата миокарда, може се закључити да извјесну предност у кардиопротекцији има посткондиционирање миноциклином, у односу на прекондиционирање;
10. Даља истраживања, како експериментална, тако и клиничка, могла би да дају ширу и свеобухватнију слику о механизмима дјеловања миноциклина, као кардиопротективног агенса у условима исхемије и реперфузије, а самим тим и да прецизно одреде оправданост и сврсисходност употребе миноциклина као кондиционирајућег агенса.

VII
ЛИТЕРАТУРА

1. Loukas M, Clarke P, Tubbs RS, Kapos T. Raymond de Vieussens. *Anat Sci Int.* 2007; 82:233– 236.
2. Goodwill AG, Dick GM, Kiel AM, Tune JD. Regulation of Coronary Blood Flow. *Compr Physiol.* 2017;7(2):321-382.
3. Wiggers CJ. Modern aspects of circulation in health and disease. Philadelphia: Lea & Febiger, 1915.
4. Lewis T. The mechanism and graphic registration of the heart beat. London: Shaw and Sons, 1920.
5. Deussen A, Ohanyan V, Jannasch A, Yin L, Chilian W. Mechanisms of metabolic coronary flow regulation. *J Mol Cell Cardiol.* 2012 Apr;52(4):794-801.
6. Rehman S, Khan A, Rehman A. Physiology, Coronary Circulation. [Updated 2021 May 9]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-.
7. Schelbert HR. Anatomy and physiology of coronary blood flow. *Journal of nuclear cardiology.* 2010; 17(4): 545-54.
8. Hall JE. Guyton and Hall textbook of medical physiology e-Book. Elsevier Health Sciences; 2010.
9. Mujović VM. Medicinska Fiziologija-Textbook, 2012., Izdavač: Fondacij "Solidarnost Srbije".
10. Tamilselvi Ramanathan, FRCA, Henry Skinner, FRCA, Coronary blood flow, Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain, Volume 5, Issue 2, April 2005, Pages 61–64, <https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mki012>
11. Khan MA, Hashim MJ, Mustafa H, et al. Global Epidemiology of Ischemic Heart Disease: Results from the Global Burden of Disease Study. *Cureus.* 2020;12(7):e9349. Published 2020 Jul 23. doi:10.7759/cureus.9349
12. P. Libby, P. M. Ridker, and G. K. Hansson, “Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis,” *Nature*, vol. 473, no. 7347, pp. 317–325, 2011.
13. Bauersachs R, Zeymer U, Brière JB, Marre C, Bowrin K, Huelsebeck M. Burden of Coronary Artery Disease and Peripheral Artery Disease: A Literature Review. *Cardiovasc Ther.* 2019 Nov 26;2019:8295054. doi: 10.1155/2019/8295054.
14. Frank A, Bonney M, Bonney S, Weitzel L, Koeppen M, Eckle T. Myocardial ischemia reperfusion injury: from basic science to clinical bedside. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth.* 2012;16(3):123-132. doi:10.1177/1089253211436350
15. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest.* 2013;123(1):92-100.
16. Turer AT, Hill JA. Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy. *Am J Cardiol.* 2010;106(3):360-8.
17. Hearse DJ, Tosaki A. Free radicals and reperfusion-induced arrhythmias: protection by spin trap agent PBN in the rat heart. *Circ Res.* 1987;60(3):375-83.
18. Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L, Braunwald E. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation.* 1998;97(18):1848-67.
19. Krug A, Du Mesnil de Rochemont, Korb G. Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion. *Circ Res.* 1966;19(1):57-62.
20. Luo AK, Wu KC. Imaging microvascular obstruction and its clinical significance following acute myocardial infarction. *Heart Fail Rev.* 2006;11(4):305-12.
21. Hombach V, Grebe O, Merkle N, Waldenmaier S, Höher M, Kochs M, Wöhrle J, Kestler HA. Sequelae of acute myocardial infarction regarding cardiac structure and function and their prognostic significance as assessed by magnetic resonance imaging. *Eur Heart J.* 2005;26(6):549-57.

22. Piper HM, García-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 1998;38(2):291-300.
23. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med.* 2007;357(11):1121-35.
24. Zhu H, Zhou H. Novel Insight into the Role of Endoplasmic Reticulum Stress in the Pathogenesis of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021:5529810.
25. Yang X, An N, Zhong C, Guan M, Jiang Y, Li X, Zhang H, Wang L, Ruan Y, Gao Y, Liu N, Shang H, Xing Y. Enhanced cardiomyocyte reactive oxygen species signaling promotes ibrutinib-induced atrial fibrillation. *Redox Biol.* 2020;30:101432.
26. Kleinbongard P. Cardioprotection by early metoprolol- attenuation of ischemic vs. reperfusion injury? *Basic Res Cardiol.* 2020;115(5):54.
27. Manevski M, Muthumalage T, Devadoss D, Sundar IK, Wang Q, Singh KP, Unwalla HJ, Chand HS, Rahman I. Cellular stress responses and dysfunctional Mitochondrial-cellular senescence, and therapeutics in chronic respiratory diseases. *Redox Biol.* 2020;33:101443.
28. Dambrova M, Zuurbier CJ, Borutaite V, Liepinsh E, Makrecka-Kuka M. Energy substrate metabolism and mitochondrial oxidative stress in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Free Radic Biol Med.* 2021;165:24-37.
29. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijević D, Sundier SY, Robb EL, Logan A, Nadtochiy SM, Ord ENJ, Smith AC, Eyassu F, Shirley R, Hu CH, Dare AJ, James AM, Rogatti S, Hartley RC, Eaton S, Costa ASH, Brookes PS, Davidson SM, Duchon MR, Saeb-Parsy K, Shattock MJ, Robinson AJ, Work LM, Frezza C, Krieg T, Murphy MP. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature.* 2014;515(7527):431-435.
30. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest.* 2013;123(1):92-100.
31. Ganame J, Messalli G, Dymarkowski S, Rademakers FE, Desmet W, Van de Werf F, Bogaert J. Impact of myocardial haemorrhage on left ventricular function and remodelling in patients with reperfused acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2009;30(12):1440-9.
32. Effect of 48-h intravenous trimetazidine on short- and long-term outcomes of patients with acute myocardial infarction, with and without thrombolytic therapy; A double-blind, placebo-controlled, randomized trial. The EMIP-FR Group. European Myocardial Infarction Project--Free Radicals. *Eur Heart J.* 2000;21(18):1537-46.
33. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists.* 2001; 94(6): 1133
34. González-Montero J, Brito R, Gajardo AI, Rodrigo R. Myocardial reperfusion injury and oxidative stress: Therapeutic opportunities. *World J Cardiol.* 2018;10(9):74-86. doi:10.4330/wjc.v10.i9.74
35. de Vries DK, Kortekaas KA, Tsikas D, et al. Oxidative damage in clinical ischemia/reperfusion injury: a reappraisal. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19(6):535-545. doi:10.1089/ars.2012.4580
36. Chamiec T, Herbaczyńska-Cedro K, Ceremużyński L. Effects of antioxidant vitamins C and E on signal-averaged electrocardiogram in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1996; 77: 237-241 [PMID: 8607400 DOI: 10.1016/S0002-9149(97)89385-X]
37. Wang M, Liu Y, Liang Y, Naruse K, Takahashi K. Systematic Understanding of Pathophysiological Mechanisms of Oxidative Stress-Related Conditions-Diabetes

- Mellitus, Cardiovascular Diseases, and Ischemia-Reperfusion Injury. *Front Cardiovasc Med.* 2021 Apr 13;8:649785. doi: 10.3389/fcvm.2021.649785.
38. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol.* 1960; 70:68–78. [PubMed: 14407094]
 39. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischaemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74(5): 1124–36.
 40. Li G, Vasquez J, Gallagher K, Lucchesi B: 1990. Myocardial protection with preconditioning. *Circulation* 82:609-619.
 41. Nao B, McClanahan T, Groh M, Schott R, Gallagher K: 1990. The time limit of effective ischemic preconditioning in dogs [abst]. *Circulation* 82(Suppl3):III-271.
 42. Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, Schaper W. Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res.* 1990 Apr;66(4):1133-42. doi: 10.1161/01.res.66.4.1133.
 43. Iwamoto T, Miura T, Adachi T, et al.: 1991. Myocardial infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning was not attenuated by oxygen free-radical scavengers in the rabbit. *Circulation* 83:1015-1022.
 44. Li Y, Kloner R: 1991. Is ischemic “preconditioning” mediated by cardioprotective prostanoids [abst]? *Circulation* 84(Suppl 2):~ 619.
 45. Deutsch E, Berge M, Kussmaul WG, Hirshfeld JW, Herrmann HC, Laskey WK. Adaptation to ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty: clinical, hemodynamic, and metabolic features. *Circulation.* 1990;82:2044-2051.
 46. Eisen DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet.* 1993;342:276-277.
 47. Eisen A, Fisman EZ, Rubenfire M, Freimark D, McKechnie R, Tenenbaum A, Motro M, Adler Y. Ischemic preconditioning: nearly two decades of research. A comprehensive review. *Atherosclerosis.* 2004; 172: 201–210.
 48. Ardehali H. Signaling mechanisms in ischemic preconditioning: interaction of PKCepsilon and MitoK(ATP) in the inner membrane of mitochondria. *Circ Res.* 2006 Oct 13;99(8):798-800. doi: 10.1161/01.RES.0000247029.31997.a4.
 49. Liang BT, Jacobson KA. Adenosine and ischemic preconditioning. *Curr Pharm Des.* 1999;5(12):1029-1041.
 50. Zaugg, M., & Schaub, M. C. (2003). *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 24(2/3), 219–249. doi:10.1023/a:1026021430091
 51. Riess ML, Stowe DF, Warltier DC. Cardiac pharmacological preconditioning with volatile anesthetics: from bench to bedside? *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004 May;286(5):H1603-7. doi: 10.1152/ajpheart.00963.
 52. Ibacache M, Sanchez G, Pedrozo Z, Galvez F, Humeres C, Echevarria G, Duaso J, Hassi M, Garcia L, Díaz-Araya G, Lavandero S. Dexmedetomidine preconditioning activates pro-survival kinases and attenuates regional ischemia/reperfusion injury in rat heart. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease.* 2012; 1822(4): 537-45.
 53. Penco M, Romeo F, Mercurio G. Novel insights in pathophysiology of antiproliferative drugs-induced cardiotoxicity and cardioprotection. *J Cardiovasc Med (Hagerstown).* 2016 May;17 Suppl 1 Special issue on Cardiotoxicity from Antiproliferative Drugs and Cardioprotection:e76-e83.
 54. Mangum LC, Garcia GR, Akers KS, Wenke JC. Duration of extremity tourniquet application profoundly impacts soft-tissue antibiotic exposure in a rat model of ischemia-reperfusion injury. *Injury.* 2019 Dec;50(12):2203-2214.

55. Ulgen BO, Field MG, Qureshi W et al. The role of minocycline in ischemia–reperfusion injury: a comprehensive review of an old drug with new implications. *Recent Pat. Cardiovasc. Drug Discov.* 6(2), 123–132 (2011).
56. Thind, G. S., Agrawal, P. R., Hirsh, B., Saravolatz, L., Chen-Scarabelli, C., Narula, J., & Scarabelli, T. M. (2015). Mechanisms of myocardial ischemia–reperfusion injury and the cytoprotective role of minocycline: scope and limitations. *Future Cardiology*, 11(1), 61–76. doi:10.2217/fca.14.76
57. Scarabelli TM, Stephanou A, Pasini E et al. Minocycline inhibits caspase activation and reactivation, increases the ratio of XIAP to smac/DIABLO, and reduces the mitochondrial leakage of cytochrome C and smac/DIABLO. *J. Am. Coll. Cardiol.* 43(5), 865–874 (2004).
58. Romero-Perez D, Fricovsky E, Yamasaki KG et al. Cardiac uptake of minocycline and mechanisms for in vivo cardioprotection. *J. Am. Coll. Cardiol.* 52(13), 1086–1094 (2008).
59. Rusu A, Buta EL. The Development of Third-Generation Tetracycline Antibiotics and New Perspectives. *Pharmaceutics.* 2021; 13(12): 2085.
60. Јеремић Н, Мијајловић М, Николић М. Фармацеутска хемија 1, одабрана поглавља. Крагујевац: Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу; 2021.
61. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001; 65(2): 232-260.
62. Nelson ML, Levy SB. The history of the tetracyclines. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2011, 1241: 17-32.
63. Garrido-Mesa N, Zarzuelo A, Galvez J. Minocycline: Far beyond an antibiotic. *Br. J. Pharmacol.* 2013; 169: 337-352.
64. Rizvi SFA, Tariq S, Anwar U. Tetracycline: Classification, Structure Activity Relationship and Mechanism of Action as a Theranostic Agent for Infectious Lesions- A Mini Review. *Biomed. J. Sci. Tech. Res.* 2018; 7: 1-10.
65. Brodersen DE, Clemons WM, Carter AP, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan, V. The Structural Basis for the Action of the Antibiotics Tetracycline, Pactamycin, and Hygromycin B on the 30S Ribosomal Subunit. *Cell.* 2000; 103: 1143-1154.
66. Beale, John M, Block J, Hill R. *Organic medicinal and pharmaceutical chemistry.* 2010. pp. 303.
67. Grossman TH. Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016; 6: a025387.
68. Yong VW, Wells J, Giuliani F, Casha S, Power C, Metz LM. The promise of minocycline in neurology. *Lancet Neurol* 2004;3:744–51.
69. Kim HS, Suh YH. Minocycline and neurodegenerative diseases. *Behav Brain* 2009;168-79.
70. Sapadin AN, Fleischmajer R. Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications. *J Am Acad Dermatol* 2006;54:258–65.
71. Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, et al. PubChem substance and compound databases. *Nucl Acids Res* 2015;44:D1202–13.
72. Colton B, McConeghy KW, Schreckenberger PC, Danziger LH. IV minocycline revisited for infections caused by multidrug–resistant organisms. *Am J Health Syst Pharm* 2016;73:279–85.

73. Hoban DJ, Reinert RR, Bouchillon SK, Dowzicky MJ. Global in vitro activity of tigecycline and comparator agents: tigecycline evaluation and surveillance trial 2004-2013. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2015;14:27.
74. Gentry EJ. Antibiotics and antimicrobial agents. Lemke TL, Williams DA, Roche VF, Zito SW. Foye's Principles of Medicinal Chemistry 7th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012, 1113-1114.
75. Martins AM, Marto JM, Johnson JL, Graber EM. A Review of Systemic Minocycline Side Effects and Topical Minocycline as a Safer Alternative for Treating Acne and Rosacea. *Antibiotics (Basel)*. 2021; 10(7): 757.
76. Grenier D, Huot MP, Mayrand D. Iron-chelating activity of tetracyclines and its impact on the susceptibility of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to these antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44(3): 763-766.
77. Agwuh KN, MacGowan A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:256–65.
78. Asadi A, Abdi M, Kouhsari E, Panahi P, Sholeh M, Sadeghifard N, Amiriani T, Ahmadi A, Maleki A, Gholami M. Minocycline, focus on mechanisms of resistance, antibacterial activity, and clinical effectiveness: Back to the future. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020; 22: 161-174.
79. Ritchie DJ, Garavaglia-Wilson A. A review of intravenous minocycline for treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter* infections. *Clin Infect Dis*. 2014; 59(Suppl 6): S374-80.
80. Bishburg E, Bishburg K. Minocycline—an old drug for a new century: emphasis on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*. 2009; 34(5): 395-401
81. Macdonald H, Kelly RG, Allen ES, Noble JF, Kanegis LA. Pharmacokinetic studies on minocycline in man. *Clin Pharmacol Ther* 1973;14:852–61.
82. Solodyn (Minocycline Hydrochloride) Extended Release Tablets. Available online: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2006/050808s000TOC.cfm (accessed on 13 June 2021).
83. Freeman CD, Nightingale CH, Quintiliani R. Minocycline: old and new therapeutic uses. *Int J Antimicrob Agents* 1994; 4: 325-35.
84. Griffin MO, Fricovsky E, Ceballos G, Villarreal F. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010; 299(3): C539-48.
85. Krady JK, Basu A, Allen CM, Xu Y, LaNoue KF, Gardner TW et al. (2005). Minocycline reduces proinflammatory cytokine expression, microglial activation, and caspase-3 activation in a rodent model of diabetic retinopathy. *Diabetes* 54: 1559-1565.
86. Kraus RL, Pasieczny R, Lariosa-Willingham K, Turner MS, Jiang A, Trauger JW (2005). Antioxidant properties of minocycline: neuroprotection in an oxidative stress assay and direct radical-scavenging activity. *J Neurochem* 94: 819-827.
87. Ledebauer A, Sloane EM, Milligan ED, Frank MG, Mahony JH, Maier SF et al. (2005). Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain* 115: 71–83.
88. Farrah, G.; Tan, E. The use of oral antibiotics in treating acne vulgaris: A new approach. *Dermatol. Ther.* 2016, 29, 377–384.
89. Mays, R.M.; Gordon, R.A.; Wilson, J.M.; Silapunt, S. New antibiotic therapies for acne and rosacea. *Dermatol. Ther.* 2012, 25, 23–37.
90. Perret, L.J.; Tait, C.P. Non-antibiotic properties of tetracyclines and their clinical application in dermatology. *Australas. J. Dermatol.* 2013, 55, 111–118.

91. Langevitz P, Livneh A, Bank I, Pras M (2000). Benefits and risks of minocycline in rheumatoid arthritis. *Drug Saf* 22: 405–414.
92. Kriz J, Nguyen MD, Julien J-P (2002). Minocycline slows disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 10: 268–278.
93. Greig SL, Scott LJ. Intravenous Minocycline: A Review in *Acinetobacter Infections*. *Drugs*. 2016 Oct;76(15):1467-1476. doi: 10.1007/s40265-016-0636-6. PMID: 27573640.
94. The Medicines Company. Minocin_ (minocycline for injection): US prescribing information. 2015. <http://www.fda.gov>. Accessed 16 Aug 2016.
95. Kircik, L.H. Doxycycline and minocycline for the management of acne: A review of efficacy and safety with emphasis on clinical implications. *J. Drugs Dermatol*. 2010, 9, 1407–1411.
96. Donnet, A.; Dufour, H.; Graziani, N.; Grisoli, F. Minocycline and benign intracranial hypertension. *Biomed. Pharmacother*. 1992, 46, 171–172
97. Kaabour, M.; Guerisse, F.; Mols, P.; Levy, S. Pseudotumor cerebri due to taking minocycline. *Rev. Med. Brux*. 2017, 38, 169–172.
98. Filitis, D.C.; Graber, E.M. Minocycline-induced hyperpigmentation involving the oral mucosa after short-term minocycline use. *Cutis* 2013, 92, 46–48.
99. Fiscus, V.; Hankinson, A.; Alweis, R. Minocycline-induced hyperpigmentation. *J. Community Hosp. Intern. Med. Perspect*. 2014, 4, 1.
100. Haskes, C.; Shea, M.; Imondi, D. Minocycline-Induced Scleral and Dermal Hyperpigmentation. *Optom. Vis. Sci*. 2017, 94, 436–442
101. Krause, W. Drug-induced hyperpigmentation: A systematic review. *J. Dtsch. Dermatol. Ges*. 2013, 11, 644–651.
102. Good, M.L.; Hussey, D.L. Minocycline: Stain devil? *Br. J. Dermatol*. 2003, 149, 237–239.
103. Hanada Y, Berbari EF, Steckelberg JM. Minocycline-induced cutaneous hyperpigmentation in an orthopedic patient population. *Open Forum Infect Dis* 2016;3:ofv107.
104. Dinnendahl, V.; Minocyclin, F.U. Basisinformation über arzneiliche Wirkstoffe. In *Arzneistoff-Profile*; Dinnendahl, V., Minocyclin, F.U., Eds.; Govi Pharmazeutischer Verlag: Eschborn, Germany, 2010. (In German)
105. Zimmerman JJ, Raible DG, Harper DM, Matschke K, Speth JL. Evaluation of a potential tigecycline-warfarin drug interaction. *Pharmacotherapy*. 2008 Jul;28(7):895-905. doi: 10.1592/phco.28.7.895. PMID: 18576904.
106. ONGE, Erin St; MOBLEY, W. Cary. Minocycline topical foam: A new drug for the treatment of acne. *Annals of Pharmacotherapy*, 2021, 55.1: 105-110.
107. de Groot AC, Eshuis H, Stricker BH. Ineffectiviteit van orale anticonceptie tijdens gebruik van minocycline [Inefficacy of oral contraception during use of minocycline]. *Ned Tijdschr Geneesk*. 1990 Jun 23;134(25):1227-9. Dutch. PMID: 2143563.
108. Dickinson, B.D.; Altman, R.D.; Nielsen, N.H.; Sterling, M.L.; American Medical Association Council on Scientific Affairs. Drug interactions between oral contraceptives and antibiotics. *Obstet. Gynecol*. 2001, 98, 853–860.
109. Neely, J.L.; Abate, M.; Swinker, M.; D'Angio, R. The effect of doxycycline on serum levels of ethinyl estradiol, norethindrone, and endogenous progesterone. *Obstet. Gynecol*. 1991, 77, 416–420.
110. Layton, Alison. The use of isotretinoin in acne. *Dermato-endocrinology*, 2009, 1.3: 162-169.
111. Rodin SM, Johnson BF. Pharmacokinetic interactions with digoxin. *Clin Pharmacokinet*. 1988 Oct;15(4):227-44.

112. Chait, Remy; Craney, Allison; Kishony, Roy. Antibiotic interactions that select against resistance. *Nature*. 2007; 446.7136: 668-671.
113. Spahn CM, Blaha G, Agrawal RK, Penczek P, Grassucci RA, Trieber CA, et al. Localization of the ribosomal protection protein Tet(O) on the ribosome and the mechanism of tetracycline resistance. *Mol Cell*. 2001; 7:1037-1045.
114. Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 2011 Jun;50(6):940-50.
115. Langendorff O. Untersuchungen am uberlebenden Saugethierherzen. *Pflugers Arch* 1895;61:291-332.
116. Döring HJ. The isolated perfused heart according to Langendorff technique--function-application. *Physiol Bohemoslov*. 1990;39(6):481-504.
117. Krebs HA, Henseleit K. Untersuchungen ueber die Harnstoffbildung im Tierkoerper. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 1932;210:33–6.
118. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979; 95:351-8.
119. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982; 126:131-8.
120. Auclair C, Voisin E (1985). Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press Une, Boca Raton, pp 123-132.
121. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods*. 1980; 38:161-70.
122. Naderi Y, Panahi Y, Barreto GE, Sahebkar A. Neuroprotective effects of minocycline on focal cerebral ischemia injury: a systematic review. *Neural Regen Res*. 2020;15(5):773-782.
123. Cai Z, Wang C, Chen Y, He W. An Antioxidant Role by Minocycline Via Enhancing the Activation of LKB1/AMPK Signaling in the Process of Cerebral Ischemia Injury. *Curr Mol Med*. 2018;18(3):142-151.
124. Zhou YQ, Liu DQ, Chen SP, Sun J, Wang XM, Tian YK, Wu W, Ye DW. Minocycline as a promising therapeutic strategy for chronic pain. *Pharmacol Res*. 2018;134:305-310.
125. Daulatzai MA. Pharmacotherapy and Alzheimer's Disease: The M-Drugs (Melatonin, Minocycline, Modafinil, and Memantine) Approach. *Curr Pharm Des*. 2016;22(16):2411-30.
126. Grotegut P, Perumal N, Kuehn S, Smit A, Dick HB, Grus FH, Joachim SC. Minocycline reduces inflammatory response and cell death in a S100B retina degeneration model. *J Neuroinflammation*. 2020;17(1):375.
127. Yoshida T, Das NA, Carpenter AJ, Izadpanah R, Kumar SA, Gautam S, Bender SB, Siebenlist U, Chandrasekar B. Minocycline reverses IL-17A/TRAF3IP2-mediated p38 MAPK/NF- κ B/iNOS/NO-dependent cardiomyocyte contractile depression and death. *Cell Signal*. 2020;73:109690.
128. Yan X, Shichita T, Katsumata Y, Matsushashi T, Ito H, Ito K, Anzai A, Endo J, Tamura Y, Kimura K, Fujita J, Shinmura K, Shen W, Yoshimura A, Fukuda K, Sano M. Deleterious effect of the IL-23/IL-17A axis and $\gamma\delta$ T cells on left ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Am Heart Assoc*. 2012;1(5):e004408.

129. Wang HW, Ahmad M, Jadayel R, Najjar F, Lagace D, Leenen FHH. Inhibition of inflammation by minocycline improves heart failure and depression-like behaviour in rats after myocardial infarction. *PLoS One*. 2019;14(6):e0217437.
130. Yi Q, Tan FH, Tan JA, Chen XH, Xiao Q, Liu YH, Zhang GP, Luo JD. Minocycline protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats by upregulating MCP1 to inhibit NF- κ B activation. *Acta Pharmacol Sin*. 2019;40(8):1019-1028.
131. Zhao H, Zhang J, Hong G. Minocycline improves cardiac function after myocardial infarction in rats by inhibiting activation of PARP-1. *Biomed Pharmacother*. 2018;97:1119-1124.
132. Salameh A, Halling M, Seidel T, Dhein S. Effects of minocycline on parameters of cardiovascular recovery after cardioplegic arrest in a rabbit Langendorff heart model. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2015;42(12):1258-65.
133. Shah AP, Shen JI, Wang Y, Tong L, Pak Y, Andalibi A, LaPage JA, Adler SG. Effects of Minocycline on Urine Albumin, Interleukin-6, and Osteoprotegerin in Patients with Diabetic Nephropathy: A Randomized Controlled Pilot Trial. *PLoS One*. 2016;11(3):e0152357.
134. Yuan H, Zhang X, Zheng W, Zhou H, Zhang BY, Zhao D. Minocycline Attenuates Kidney Injury in a Rat Model of Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy. *Biol Pharm Bull*. 2016;39(8):1231-7.
135. Kelly-Cobbs AI, Prakash R, Li W, Pillai B, Hafez S, Coucha M, Johnson MH, Ogbi SN, Fagan SC, Ergul A. Targets of vascular protection in acute ischemic stroke differ in type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;304(6):H806-15.
136. Matsumoto Y, Park IK, Kohyama K. Matrix metalloproteinase (MMP)-9, but not MMP-2, is involved in the development and progression of C protein-induced myocarditis and subsequent dilated cardiomyopathy. *J Immunol*. 2009;183(7):4773-81.
137. Huang HC, Ho HL, Chang CC, Chuang CL, Pun CK, Lee FY, Huang YH, Hou MC, Hsu SJ. Matrix metalloproteinase-9 inhibition or deletion attenuates portal hypertension in rodents. *J Cell Mol Med*. 2021;25(21):10073-10087.
138. Pepine CJ, Thiel A, Kim S, Handberg EM, Richards EM, Dasa O, Mohammed M, Smith SM, Cooper-DeHoff RM, Raizada MK. Potential of Minocycline for Treatment of Resistant Hypertension. *Am J Cardiol*. 2021;156:147-149.
139. Bhatt LK, Veeranjanyulu A. A therapeutic approach to treat cardiovascular dysfunction of diabetes. *Exp Toxicol Pathol*. 2012;64(7-8):847-53.
140. Bhatt LK, Veeranjanyulu A. Enhancement of matrix metalloproteinase 2 and 9 inhibitory action of minocycline by aspirin: an approach to attenuate outcome of acute myocardial infarction in diabetes. *Arch Med Res*. 2014;45(3):203-9.
141. Haggi-Aminjan H, Baeeri M, Rahimifard M, Alizadeh A, Hodjat M, Hassani S, Asghari MH, Abdollahi A, Didari T, Hosseini R, Sharifzadeh M, Abdollahi M. The role of minocycline in alleviating aluminum phosphide-induced cardiac hemodynamic and renal toxicity. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2018;64:26-40.
142. Schildknecht S, Pape R, Müller N, Robotta M, Marquardt A, Bürkle A, Drescher M, Leist M. Neuroprotection by minocycline caused by direct and specific scavenging of peroxynitrite. *J Biol Chem*. 2011;286(7):4991-5002.
143. Guzik TJ, West NE, Pillai R, Taggart DP, Channon KM. Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. *Hypertension*. 2002;39(6):1088-94.
144. Salameh A, Dhein S, Mewes M, Sigusch S, Kiefer P, Vollroth M, Seeger J, Dähnert I. Anti-oxidative or anti-inflammatory additives reduce ischemia/reperfusion injury in an animal model of cardiopulmonary bypass. *Saudi J Biol Sci*. 2020;27(1):18-29.

145. Azarabadi M, Heidari F, Khaki AA, Kaka G, Ghadian A. Minocycline attenuates testicular damages in a rat model of ischaemia/reperfusion (I/R) injury. *Andrologia*. 2020;52(9):e13704.

8. Прилог

8.1 КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ**

Редни број - РБ:

Идентификациони број - ИБР:

Тип документације - ТД: Монографска публикација

Тип записа - ТЗ: Текстуални штампани материјал

Врста рада - ВР: Докторска дисертација

Аутор - АУ: Никола Шобот

Ментор/коментор - МН: Проф. др Владимир Јаковљевић

Наслов рада - НР: Утицај миноциклина на исхемијско/реперфузиону повреду изолованог срца хипертензивних и дијабетичних пацова

Језик публикације - ЈП: српски/ћирилица

Језик извода - ЈИ: српски/енглески

Земља публиковања - ЗП: Србија

Уже географско подручје - УГП: Централна Србија

Година - ГО: 2022.

Издавач - ИЗ: Ауторски репринт

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

Физичи опис рада - ФО: 113 страна, 13 слика, 4 табела, 83 графика

Научна област - НО: Медицина

Научна дисциплина - ДИ: Физиологија

Предметна одредница / кључне речи - ПО: миноциклин, исхемија, реперфузија, дијабетес тип 2, хипертензија, оксидациони стрес

УДК:

Чува се - ЧУ: У библиотеци Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

Важна напомена - МН:

Извод:

ИД

Коронарна болест артерија је једна од најчешћих болести срца и главни је узрок оболевања и смртности широм света. Оштећење ткива миокарда у акутном инфаркту миокарда настаје управо због артеријске оклузије која узрокује исхемију док накнадно успостављање поновног протока крви може да резултира реперфузијском повредом. У фармаколошкој терапији и превенцији исхемијско/реперфузионе повреде током претходне две деценије учињено је много напора како би се пронашао што ефикаснији агенс који би могао да умањи морфолошка и функционална оштећења миокарда након исхемије и реперфузије. Позитивни плејотропни ефекти миноциклина приписују се различитим механизмима укључујући антиинфламацијско, антиоксидационо и антиапоптозоноско дејство, као и инхибиција металопроотеиназа.

Испитивање ефеката преко кондиционарања и посткондиционарања миноциклином на функционални и морфолошки опоравак срца пацова након исхемијско/реперфузионе повреде миокарда са посебним освртом на услове дијабетеса типа 2 и хипертензије.

Истраживање је обухватило 72 пацова мушког пола (Wistar albino сој, телесне масе 250 ± 20 g, старости 8 недеља). Пацови су сврстани у групе на основу присуства дијабетеса типа 2 или хипертензије као и на основу неког од типа кондиционарања миноциклином: преко кондиционарања миноциклином у дози од $1 \mu\text{M}$ или посткондиционарања миноциклином у истој дози. Дијабетес тип 2 индукован је применом исхране богате мастима и стрептозотоцина у дози од 25 mg/kg телесне масе. За експериментални модел хипертензије користили су се спонтанно-хипертензивни пацови. Изолована срца су перфундована методом ретроградне перфузије по Лангендорфу. За исхемију је употребљен модел глобалне исхемије у трајању од 20 минута којој следи реперфузија у трајању од 30 минута. Вредности коронарног протока су одређиване флоуметријски, а параметри функције леве коморе ($dp/dt \text{ max}$, $dp/dt \text{ min}$, SLVP, DLVP и HR) су континуирано праћени. У узорцима коронарног венског ефлуента срца пацова спектрофотометријским методама су одређивани параметри оксидационог стреса, а стандардном хистолошком анализом испитиване су промене на срцу.

Резултати овог истраживања указују на несумњиве протективне ефекте миноциклина у условима експериментално индуковане исхемије и реперфузије како на срцима пацова са индукованим дијабетесом типа 2, тако и на срцима спонтанно хипертензивних пацова. Анализом добијених резултата који се односе на динамику продукције биомаркера оксидационог стреса изводи се закључак да антиоксидациони потенцијал миноциклина и редукција оксидационог оштећења свакако чини важан, ако не и кључни механизам протективног дејства миноциклина.

Датум прихватања теме од стране ННВ:
ДП

Датум одбране:
ДО

Чланови комисије:
КО

- 1.
- 2.
- 3.

8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

Accession number - ANO:

Identification number - INO:

Documentation type - DT: Monographic publication

Type of record - TR: Printed textual material

Contents code - CC: PhD Thesis

Author - AU: Nikola Sobot

Menthor/co-mentor - MN: Prof. Vladimir Jakovljevic

Title - TI: Effect of minocycline on ischemic/reperfusion injury of isolated heart of hypertensive and diabetic rats

Language of text - LT: Serbian (cyrilic)

Language of abstract: Serbian/English

Country of publication - CP: Republic of Serbia

Locality of publication - LP: Central Serbia

Publication year - PY: 2022.

Publisher - PU: Author`s reprint

Publication place - PP: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Street Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac

Physical description - PD: 113 pages, 13 images, 4 tables, 83 graphs

Scientific field - SF: Medicine

Scientific discipline - SD: Physiology

Subject/key words - SKW: minocycline, ischemia, reperfusion, type 2 diabetes, hypertension, oxidative stress

UDC:

Holding data: Library of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Republic of Serbia

Note - N:

Abstract:**AB**

Coronary artery disease is one of the most common heart diseases and is the leading cause of morbidity and mortality worldwide. Myocardial damage in acute myocardial infarction occurs due to arterial occlusion that causes ischemia, while subsequent re-establishment of blood flow can result in reperfusion injury. Much effort has been made in pharmacological therapy and prevention of ischemic/reperfusion injury over the past two decades to find the most effective agent that could reduce morphological and functional myocardial damage after ischemia and reperfusion. The positive pleiotropic effects of minocycline are attributed to various mechanisms including anti-inflammatory, antioxidant and antiapoptotic effects, as well as inhibition of metalloproteinases.

Investigation of the effects of preconditioning and postconditioning with minocycline on functional and morphological recovery of rat heart after ischemic/reperfusion myocardial injury with special attention to conditions of type 2 diabetes and hypertension.

The study included 72 male rats (Wistar albino strain, body weight 250 ± 20 g, age 8 weeks). Rats were classified into groups based on the presence of type 2 diabetes or hypertension as well as on one of the types of minocycline conditioning: preconditioning with minocycline at a dose of $1\mu\text{M}$ or postconditioning with minocycline at the same dose. Type 2 diabetes was induced by a high-fat diet and streptozotocin at a dose of 25 mg/kg body weight. Spontaneously-hypertensive rats were used for the experimental model of hypertension. Isolated hearts were perfused by retrograde Langendorff perfusion. For ischemia, a 20-minute model of global ischemia was used, followed by a 30-minute reperfusion. Coronary flow values were determined fluometrically, and left ventricular function parameters (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP and HR) were continuously monitored. In the coronary venous effluent samples of rat heart, oxidative stress parameters were determined by spectrophotometric methods, and changes in the heart were examined by standard histological analysis.

The results of this study indicate the undoubted protective effects of minocycline in conditions of experimentally induced ischemia and reperfusion in the hearts of rats with induced type 2 diabetes and in the hearts of spontaneously hypertensive rats. The analysis of the obtained results related to the dynamics of production of biomarkers of oxidative stress leads to the conclusion that the antioxidant potential of minocycline and reduction of oxidative damage certainly makes important, if not the key mechanism of protective action of minocycline.

Accepted by the Scientific Board on:
ASB

Defended on:
DE

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

- 1.
- 2.
- 3.

БИОГРАФИЈА

1. Лични подаци

Име и презиме: Никола Шобот

Датум и место рођења: 28.03.1982. године, Бања Лука, Република Српска, Босна и Херцеговина

Адреса: Крфска 42, 78000 Бања Лука

Телефон: 065/953428

2. образовање

-
-
-

3. Познавање страних језика

- Енглески (виши ниво)

Радно искуство

-

БИБЛИОГРАФИЈА

- 1.
- 2.
- 3.

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Никола Шобот, изјављујем да докторска

дисертација под насловом:

Утицај миноциклина на исхемијско/реперфузиону повреду изолованог срца хипертензивних и дијабетичних пацова

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу 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, 07.03.2022. године,

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Никола Шобот,

дозвољавам

не дозвољавам

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

Утицај миноциклина на исхемијско/реперфузиону повреду изолованог срца хипертензивних и дијабетичних пацова

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

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 _____, 07.03.2022. 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/>