



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Тања П. Радоњић

**УЛОГА ТИАМИНА У ИНХИБИЦИЈИ ОКСИДАТИВНОГ
СТРЕСА МИТОХОНДРИЈА И ЕНДОПЛАЗМАТСКОГ
РЕТИКУЛУМА У АНИМАЛНОМ МОДЕЛУ ДОКСОРУБИЦИНОМ
ИНДУКОВАНЕ КАРДИТОКСИЧНОСТИ**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2021.



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Tanja P. Radonjic

**ULOGA TIAMINA U INHIBICIJI OKSIDATIVNOG STRESA
MITOHONDRIJA I ENDOPLAZMATSKOG RETIKULUMA U
ANIMALNOM MODELU DOKSORUBICINOM INDUKOVANE
KARDIOTOKSIČNOSTI**

Doktorska disertacija

Kragujevac, 2021.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Tanja P. Radonjic

**ROLE OF THIAMINE IN INHIBITION OF OXIDATIVE STRESS
OF MITOCHONDRIES AND ENDOPLASMIC RETICULUM IN
ANIMAL MODEL OF DOXORUBICIN-INDUCED CARDIOTOXICITY**

Doctoral Dissertation

Крагујевац, 2021.

I Аутор
Име и презиме: Тања П. Радоњић
Датум и место рођења: 04.01.1990.
Садашње запослење: Дом здравља Палилула, Београд
II Докторска дисертација
Наслов: Улога тиаминa у инхибицији оксидативног стреса митохондрија и ендоплазматског ретикулума у анималном моделу доксорубицином индуковане кардиотоксичности
Број страница: 105
Број слика: 18 слика, 38 графикона, 36 табела
Број библиографских података: 152
Установа и место где је рад урађен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: Др сци. мед. Тамара Николић Турнић, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу
III Оцена и одбрана
Датум пријаве тезе: 10.10.2018.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-774/28
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Проф. др Марко Фолић, ванредни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Клиничка фармација, председник 2. Проф. др Тибор Сабо, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Општа и неорганска хемија, члан 3. Доц. др Невена Јеремић, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармацеутска хемија, члан
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Доц. др Невена Јеремић, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармацеутска хемија, председник 2. Доц. др Маја Саздановић, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан 3. Проф. др Зоран Тодоровић, редовни професор Медицинског факултета, Универзитета у Београду, за ужу научну област Фармакологија, Клиничка фармакологија и токсикологија, члан
Датум одбране дисертације:

I Autor
Ime i prezime: Tanja P. Radonjic
Datum i mesto rođenja: 04.01.1990.
Sadašnje zaposlenje: Dom zdravlja Palilula, Beograd
II Doktorska disertacija
Naslov: Uloga tiamina u inhibiciji oksidativnog stresa mitohondrija i endoplazmatskog retikuluma u animalnom modelu doksorubicinom indukovane kardiotoksičnosti
Broj stranica: 105
Broj slika: 18 slika, 38 grafikona, 36 tabela
Broj bibliografskih podataka: 152
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu.
Naučna oblast (UDK): Medicina
Mentor: dr sci. med. Tamara Nikolic Turnic, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu
III Ocena i odbrana
Datum prijave teme: 10.10.2018.
Broj odluke i datum prihvatanja doktorske disertacije: IV-03-774/2
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata: <ol style="list-style-type: none"> 1. Prof.dr Marko Folić, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Klinička farmacija, predsednik 2. Prof. dr Tibor Sabo, redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu za užu naučnu oblast Opšta i neorganska hemija, član 3. Doc. dr Nevena Jeremić, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Farmaceutska hemija, član
Komisija za ocenu i odbranu doktorske/umetničke disertacije: <ol style="list-style-type: none"> 1. Doc. dr Nevena Jeremić, docent Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu, za užu naučnu oblast Farmaceutska hemija, predsednik 2. Doc. dr Maja Sazdanović, docent Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu, za užu naučnu oblast Histologija i embriologija, član 3. Prof. Dr Zoran Todorović, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, za užu naučnu oblast Farmakologija, Klinička farmakologija i toksikologija, član
Datum odbrane disertacije:

I Author
Name and surname: Tanja P. Radonjic
Date and place of birth: 04.01.1990.
Current employment: Health Center Palilula, Belgrade
II Doctoral dissertation
Title: The role of thiamine in the inhibition of oxidative stress of mitochondria and endoplasmic reticulum in an animal model of doxorubicin-induced cardiotoxicity
No. of pages: 105
No. of images: 18 pictures, 38 figures, 36 tables
No. of bibliographic data: 152
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific arae (UDK): Medicine
Mentor: dr. sc. Tamara Nikolic Turnic, assistant professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
III Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 10.10.2018.
Decision number and date of accep of doctoral/artistic dissertation topic: IV-03-774/2
Comission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: <ol style="list-style-type: none"> 1. Prof. dr. Marko Folić, Associate Professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for the narrower scientific field of Clinical Pharmacy, president 2. Prof. dr Tibor Sabo, Full Professor of Faculty of Chemistry, University of Belgrade for the narrower scientific field of General and Inorganic Chemistry, member 3. Ass. Prof. Nevena Jeremić, Assistant Professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Pharmaceutical Chemistry, member
Comission for evaluation and defense of doctoral/artistic dissertation: <ol style="list-style-type: none"> 1. Ass. Prof. Nevena Jeremić, Assistant Professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for the narrower scientific field of Pharmaceutical Chemistry, President 2. Ass. Prof. Maja Sazdanović, Assistant Professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for the narrower scientific field of Histology and Embryology, member 3. Prof. Dr. Zoran Todorović, full professor at the Faculty of Medicine, University of Belgrade, for the narrower scientific field of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Toxicology, member
Date of Dissertation Defense:

САЖЕТАК

Циљ овог истраживања је био испитати потенцијалну улогу тиамин у инхибицији оксидационог стреса узрокован након акутне примене високе кумулативне дозе антрациклинског цитостатика доксорубицина и испитати потенцијалне нове молекуларне механизме којима тиамин и доксорубицин, самостално или у комбинацији остварују своје ефекте на кардиоваскуларни систем.

Истраживање је обухватило 48 пацова мушког пола Wistar albino соја (12 пацова по групи), старости 12 недеља и просечне телесне масе 350 грама. У односу на третман, све животиње су биле подељене у четири групе: Контролна група, група пацова без третмана; Доксорубицин група, (доксорубицин једнократно, у дози од 15 mg/kg телесне тежине и.п.); Тиамин група, (тиамин хидрохлорид у дози од 25 mg/kg телесне тежине дневно током 7 дана); Тиамин+Доксорубицин група, (тиамин хидрохлорид у дози од 25 mg/kg телесне тежине дневно током 7 дана, а након тога 8.ог дана доксорубицин у дози 15 mg/kg телесне тежине). У зависности од групе, експеримент је подразумевао примену тиамин и/или након 72 часа апликацију доксорубицину. Након тога животиње су жртвоване да би се спровела истраживања на срцу, изоловала крв и ткиво леве коморе срца.

Примена доксорубицина је значајно утицала на повећање активности срчаних ензима, СК-МВ, Тропонина 1 и LDH, док је примена тиамин значајно смањила концентрације у односу на контролне групе. Седмодневна примена тиамин у терапијским дозама је ефикасна у погледу повећања ејекционе фракције леве коморе, довела до повећања контрактилне способности срца и то повећањем нивоа $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$, довео до значајне редуције насталог оксидационог стреса и до повећања одбрамбених механизма антиоксидативног система, чиме је потврђен кардиопротективни ефекат тиамин и кардиотоксични ефекат доксорубицина. Морфометријским методама и патохистолошким анализама ткива срца потврдили смо цитотоксичне ефекте доксорубицина и заштитне ефекте тиамин.

Резултати су указали на значајан кардиопротективни ефекат тиамин на моделу доксорубицином-индуковане кардиотоксичности.

Кључне речи: тиамин, доксорубицином-индукована кардиотоксичност, срце пацова, оксидациони стрес

ABSTRACT

The aim of this study was to examine the potential role of thiamine in inhibiting oxidative stress caused after acute administration of a high cumulative dose of the anthracycline cytostatic doxorubicin and to examine potential new molecular mechanisms by which thiamine and doxorubicin, alone or in combination, exert their effects on the cardiovascular system.

The study included 48 male Wistar albino rats (12 rats per group), aged 12 weeks and an average body weight of 350 grams. In terms of treatment, all animals were divided into four groups: Control group, group of rats without treatment; Doxorubicin group, (doxorubicin once, at a dose of 15 mg / kg body weight i.p); Thiamine group, (thiamine hydrochloride at a dose of 25 mg / kg body weight daily for 7 days); Thiamine + Doxorubicin group, (thiamine hydrochloride at a dose of 25 mg / kg body weight daily for 7 days, and then on the 8th day doxorubicin at a dose of 15 mg / kg body weight). Depending on the group, the experiment involved the use of thiamine and/or after 72 hours the application of doxorubicin. After that, the animals were sacrificed in order to conduct research on the heart, isolate blood and tissue of the left ventricle of the heart.

The use of doxorubicin significantly increased the activity of cardiac enzymes, CK-MB, Troponin 1 and LDH, while the use of thiamine significantly reduced concentrations compared to control groups. Seven-day use of thiamine in therapeutic doses is effective in increasing the ejection fraction of the left ventricle, led to an increase in cardiac contractility by increasing the levels of dp/dt max and dp/dtmin, led to a significant reduction in oxidative stress and increased defense mechanisms of the antioxidant system. Thus confirming the cardioprotective effect of thiamine and the cardiotoxic effect of doxorubicin. We confirmed the cytotoxic effects of doxorubicin and the protective effects of thiamine by morphometric methods and pathohistological analyzes of heart tissue.

These results indicated a significant cardioprotective effect of thiamine on the doxorubicin-induced cardiotoxicity model.

Key words: thiamine, doxorubicin-induced cardiotoxicity, rat heart, oxidative stress

САДРЖАЈ

УВОД.....	3
1. Кардиотоксичност	3
1.1. Историјат и значај	3
1.2. Епидемиолошки подаци	3
1.3. Патолофизиолошки аспекти кардиотоксичности	4
1.4. Кардиотоксичност услед примене хемиотерапије	6
1.5. Доксорубицин	8
1.6. Идентификација пацијента са ризиком за настанак антрациклинима-индуковане кардиотоксичности	12
1.7. Превенција и терапија кардиотоксичности узроковане хемиотерапијом.....	14
1.8. Витамин В ₁	16
2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	21
2.1. Генерални циљ.....	21
2.2. Специфични циљеви	21
3. МЕТОДОЛОГИЈА ИСТРАЖИВАЊА	23
3.1. Етички аспекти истраживања	23
3.2. Супстанце употребљене у студији	23
3.4. Испитивање функције миокарда и коронарне циркулације.....	25
3.5. Метода ретроградне перфузије по Оскару Лангендорфу.....	25
1.4. Ехокардиографија пацова.....	26
1.5. Одређивање активности срчаних ензима.....	27
1.6. Одређивање маркера оксидационог стреса	27
1.7. Одређивање ензима антиоксидативне заштите.....	28
1.8. Патохистолошка анализа.....	28
1.9. Хистохемијско испитивање експресије апоптотских гена.....	28
1.10. Статистичка анализа	29
2. РЕЗУЛТАТИ	31
4.1. Концентрација срчаних ензима у серуму Wistar albino пацова	31
4.2. УТИЦАЈ ТИАМИНА НА ФУНКЦИЈУ МИОКАРДА НА МОДЕЛУ РЕТРОГРАДНЕ ПЕРФУЗИЈЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	33
4.2.1. Контролна група	33
4.2.2. Доксорубицин група	39
4.2.3. Тиамин група	45
4.2.4. Тиамин+доксорубицин група.....	51
4.2.5. Анализа динамике кардиодинамских параметара поређењем група	57
4.3. АНАЛИЗА ХЕМОДИНАМСКИХ ПРОМЕНА	63
4.4. УТИЦАЈ ПРИМЕНЕ ТИАМИНА НА МАРКЕРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА	64
4.5. ПАТОХИСТОЛОШКА АНАЛИЗА ТКИВА ЛЕВЕ КОМОРЕ СРЦА ПАЦОВА	68
4.6. Имунохистохемијско мерење активности маркера апоптозе	72
5. ДИСКУСИЈА	75
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	80
7. ЛИТЕРАТУРА.....	82

УВОД

УВОД

1. Кардиотоксичност

1.1. Историјат и значај

Први подаци о кардиотоксичности као феномену помињу се давне 1967.-е године када је примећено оштећење срчаног мишића код деце са леукемијом која су лечена доксорубицином (1). Заправо први подаци о кардиотоксичности су се појавили са појавом антрациклинских цитостатика и са почетком примене хемиотерапије. Од тада па до данас, утицај различитих агенаса и фактора на настанак оштећења срца заокупља пажњу многих научника, до те мере да се развила нова грана медицине кардиоонкологија (2). У вези са тим, 2009. године је основано и прво удружење за кардиоонкологију у Италији (*ICOS, International Cardioncology Society*) које је ујединило рад онколога и кардиолога. Последњих година се редовно одржавају конференције кардиоонкологије, што је донело многа нова сазнања, препоруке и смернице и дало на значају овој грани медицине. Циљ деловања овог удружења је да се онколошким болесницима обезбеди адекватан и квалитетан начин живота, у току и после процеса хемиотерапије (3, 4).

Када је реч о кардиотоксичности, она се увек везује за употребу цитотоксичних лекова и то у првом реду антрациклина (5). Антрациклини су откривени давне 1950.-е године када је идентификован даунорубицин из соја бактерија *Streptomyces peucetius*. Давне 1960. године, даунорубицин се сматра ефикасним леком у третману леукемија и лимфома, а исте године дериват даунорубицина, 14-хидроксидауномицин, познатији под заштићеним називом Адриамицин а касније назван доскорубицином, бива идентификован као ефикаснији антитуморски лек. Од тада па до данас, цела група антрациклинских лекова се користи врло ефикасно у третману многих тумора и хематолошких малигнитета, укључујући леукемије, лимфоме, карциноме дојке и плућа, мултиплих мијелома и саркома (5-10).

1.2. Епидемиолошки подаци

Последњих тридесет година стопа морталитета од канцерских болести се драстично повећала како због унапређених дијагностичких стратегија тако и због унапређене терапије малигних болести (11, 12). Стопа преживљавања код оболелих од малигних болести дакле је повећана такође услед истих узрока (13). Кардиоваскуларне болести су после малигних болести, на другом месту по стопи морбидитета и морталитета а нарочито заступљене код пацијената са малигним поремећајима. Са друге стране, савремена терапија малигних болести довела је до продужења дужине живота односно преживљавања, па је тако петогодишње преживљавање код пацијенткиња са карциномом дојке повећано са 79% колико је било 1990. године на 88% у 2012. години (14). Претпоставка је да ће до 2022. године доћи до повећане стопе преживљавања оболелих од карцинома за око 30% (14). У вези са тим је сигурно и повећана употреба антитуморске терапије која има значајне фармакоекономске аспекте.

Заступљеност кардиоваскуларних обољења код пацијената који су на антиканцерској терапији је такође висока, од око 50% што значајно доприноси укупном mortalitetу од малигних болести (14).

Студије које су пратиле епидемиолошке податке онколошких пацијената, објавиле су да онколошким пацијентима након 15 до 25 година који су примали хемиотерапију је 8,2 пута повећана инциденца кардиоваскуларног поремећаја (15, 16).

1.3. Патофизиолошки аспекти кардиотоксичности

Према дефиницији, кардиотоксичност подразумева оштећење срца услед примене токсичних агенаса/лекова (17). У литератури се описују рана и касна кардиотоксичност (17, 18), односно акутна, субакутна и хронична у зависности од времена јављања у односу на примењени лек. Акутна се може јавити у току терапије или неколико сати након терапије, субакутна кардиотоксичност се обично јавља неколико дана од престанка примене и касна кардиотоксичност се може јавити неколико месеци па чак и година након примене хемиотерапеутика (19). Поред тих ентитета, данас се антрациклинска кардиотоксичност дели на тип 1 и тип 2 у зависности од времена јављања и самог механизма настанка. Тип 1 представља поремећај који у основи има смрт кардиомиоцита, путем некрозе или апоптозе односно иреверзибилан поремећај. Тип 2 кардиотоксичности је узрокован дисфункцијом кардиомиоцита а врло ретко узрокован апоптозом кардиомиоцита и из тог разлога је врло често реверзибилног карактера. Дуготрајна употреба антрациклина и појава касне кардиотоксичности су појаве карактеристичне за тзв. тип 1 кардиотоксичности (20, 21).

Примарни механизам антрациклина је цитотоксичност по малигне ћелије посредовано оштећењем ДНК па у вези са тим очекивано је оштећење и здравих ћелија. Услед оштећења ДНК у здравој ћелији, доксорубицин у ћелији покреће реакцију производње слободних радикала и настанак оксидационог стреса. Тачније, током метаболизма доксорубицина, у кардиомицитима долази до реакције у којој се ствара семихинон и последично супероксид анјон радикал. Као резултат насталих реакција у митохондријалном респираторном комплексу настају водоник пероксид и хидроксил радикал (20-23).

Национални институт за испитивање кардиотоксичности (24) је дефинисао појам кардиотоксичности врло прецизно. Дефинисање термина кардиотоксичности је настало у току једне од претходних студија која је испитивала трастузумаб и према томе кардиотоксичност постоји уколико се потврди постојање (24):

а) Кардиомиопатије, односно смањење ејекционе фракције леве коморе срца за више од 5% од претходне односно пре терапије уз присутну клиничку симптоматологију слабости срца, или смањење више од 10% без присутних клиничких симптома;

б) Симптома инсуфицијенције срца;

в) Симптома који су у вези са инсуфицијенцијом срца као што су неки поремећаји ритма по типу галоба или тахикардије или оба.

Дефиниција кардиотоксичности је дакле базирана на клиничким манифестацијама на срцу и не укључује субклиничка оштећења која настају некада и веома рано у току или непосредно након примене хемиотерапеутика.

У клиничкој пракси се употребљавају две основне поделе кардиотоксичности, на основу времена испољавања и механизма настанка (*Табела 1*).

Табела 1. Класификација кардиотоксичности (24)

Према времену јављања	Према механизму настанка
Акутна кардиотоксичност	Тип I
Субхронична кардиотоксичност	Тип II
Хронична кардиотоксичност	

Дакле, у односу на време јављања кардиотоксичности разликујемо акутну, субакутну односно субхроничну и хроничну (25). Акутна подразумева појаву дисфункције срца у било ком тренутку од апликовања до две недеље након престанка примене хемиотерапеутика и то најчешће су у питању промене у виду појаве поремећаја ритма, акутних исхемијских промена, перикардитиса или миокардитиса. Субакутна кардиотоксичност се карактерише појавом симптома унутар 4 недеље од примене и представља нов ентитет у погледу појаве овог феномена услед примене хемиотерапеутика. Основи клиничке манифестације су у виду едема и дисфункције миокарда леве коморе и то реверзибилног карактера. Са друге стране, хронична кардиотоксичност се карактерише појавом дисфункције срца и то након периода од најмање једне године од примене хемиотерапеутика. Промене које се тада јављају су у виду симптоматске или асимптоматске дисфункције леве коморе па до тешке форме конгестивне кардиомиопатије (25-29).

Механизам настанка кардиотоксичности се огледа кроз тип 1 и тип 2 кардиотоксичности услед деловања хемиотерапеутика на хемиотерапеутике. Тип 1 се се другачије назива антрациклинска кардиотоксичност и у основи се манифестује некротичним променама на срцу и високом стопом морталитета услед иреверзибилних промена на срцу. Тип 2 кардиотоксичности се повезује са променама које најчешће настају услед примене трастузумаба и такође су иреверзибилног карактера (29-32).

1.4. Кардиотоксичност услед примене хемиотерапије

Кардиотоксичне промене најчешће настају услед примене антрациклинских цитостатика али могу настати и након примене других хемиотерапеутика (33). У литератури су сада јасно познати фактори ризика за развијање овог тешког поремећаја. Учесталост кардиотоксичности је у директној повезаности са врстом, дозом примењеног хемиотерапеутика као и дужином примене (35-36). У вези са тим, табеларно су приказане кардиотоксичне дозе цитостатитка који могу бити кардиотоксични (Табела 2).

Табела 2. Кардиотоксичне дозе цитостатика и клиничко испољавање након примене

Цитостатик	Кардиотоксична доза	Клиничко испољавање кардиотоксичности
Доксорубицин	>450 m ²	Дисфункција леве коморе
Епирубицин	>900 m ²	Дисфункција леве коморе
Идарубицин	150-290 mg/m ²	Дисфункција леве коморе
Пацитаксел	Конвенционална примена	Дисфункција леве коморе
Доцетаксел	Конвенционална примена	Дисфункција леве коморе
Циклофосфамид	>100-120 mg/m ²	Дисфункција леве коморе
Ифосфамид	>10 mg/m ²	Дисфункција леве коморе
Капецитабин	Конвенционална примена	Исхемија срца
Флуороурацил	Конвенционална примена	Исхемија срца
Доцетаксел	Конвенционална примена	Исхемија срца
Трабектедин	Конвенционална примена	продужење QTc интервала
Арсен триоксид	Конвенционална примена	продужење QTc интервала

Дакле, најважнији фактори ризика који доприносе развоју кардиотоксичности везани су за карактеристике само лека који се примењује, односно врста лека, доза лека, кумулативна доза, распоред и начине примене, комбинована примена са другим кардиотоксичним лековима и истовремена примена са радиотерапијом. Други фактори који се описују као чиниоци за настанак кардиотоксичности су карактеристике самог пацијента, односно године старости, присуство кардиоваскуларних фактора ризика и претходне и постојеће кардиоваскуларне болести. Дакле неће се код сваког појединца развити кардиотоксичност, већ ризик умногоне зависи и од пацијента (37, 38).

Заједнички механизам настанка кардиотоксичности се заснива на неколико кључних оштећења на нивоу кардиоваскуларног система (38):

- а) инфламацијске промене перикарда,
- б) директно оштећење кардиомиоцита,
- в) про-коагулационо дејство хемиотерапеутика и настанак тромботичних поремећаја и догађаја,
- г) повећање системског крвног притиска и настанак хипертензије,
- д) поремећаји срчаног ритма, од тахикардије до атријалне фибрилације.

Најчешће објашњење настанка ових базичних патофизиолошких модалитета је хипотеза која подржава полифакторијалну етиопатогенезу кардиотоксичности (39). Тачније, у основи кардиотоксичности сматра се да је поремећен сигнални пут за регенерацију кардиомиоцита. Познато је да већина хемиотерапеутика делује инхибицијом тирозин киназе и да управо везивањем за рецептор тирозин киназе долази до поремећаја функционисања хематопоезе, интестиналних промена и промена на нивоу централног нервног система. Са тим у вези настају и поремећаји у смислу ремоделовања срчаног мишића. Још један разлог настанка кардиотоксичности је свакако смањена регенеративна способност срчаног мишића, односно плурицелуларност срца (40).

Затим, други основни патофизиолошки механизам настанка кардиотоксичности је стварање слободних радикала услед метаболизма хемиотерапеутика (41). Дакле, иако су примарни механизми већине цитостатика одговорни за уништавање ћелија канцера и настанак оштећења ДНК-а, ти исти механизми доводе и то стварања слободни радикала у кардиомиоцитима. Тачније, редукција на пример доксорубицина NADPH дехидрогеназом у митохондријалном респираторном комплексу-1 доводи до формирања полихинонских радикала који даље ступа и интеракцију са молекуларним кисеоник и формира супероксид анјон радикал (41, 42). Након тога се покрећу и друге реакције при чему настаје водоник пероксид и хидроксил радикал. Код примене доксорубицина, у физиологији је позната тзв. Фентонова реакција, која подразумева Fe^{2+} -катализовану реакцију конверзије водоник пероксида у хидроксил радикал и стварањем реактивних кисеоничних врста. Са тим у вези, услед смањење осетљивости кардиомиоцита на настали оксидациони стрес и агресивности самог хемиотерапеутика нарочито ако је примењен у високој дози и кратком временском интервалу, настаје кардиотоксичност (43).

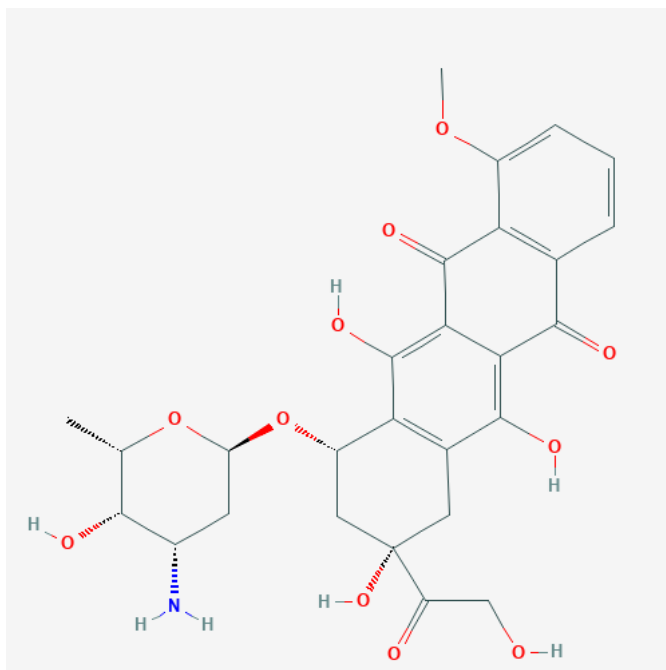
Поред реактивних кисеоничних врста, у патофизиологији кардиотоксичности значајну улогу има и смањена експресија супероксид дисмутазе зависне од мангана (Mn-SOD) која онда има ослабљену улогу у смислу редукције кардиотоксичности (44). Такође, азот моноксид синтетаза има значајну улогу јер она може да спречи смањење функције леве коморе срца услед примене хемиотерапеутика. Последице, сматра се да кардиомиоцити се оштећују трајно апоптским механизмом при чему посредују каспазе и то 3 и 9 као одговор на настали оксидациони стрес (45).

1.5. Доксорубицин

Доксорубицин је цитостатик из групе антрациклина, који је по хемијској структури најсличнији даунорубицину и попут свих антрациклина своје дејство остварује путем интеркалације ДНК (Слика 1). Тачније, доксорубицин ступа у интеракцију са ДНК путем интеркалације чиме се инхибира макромолекулска синтеза. Затим инхибира ензим топоизомеразу 2 који отпушта делове током транскрипције ДНК, и последично спречава репликацију ДНК. Дозира се интравенозно у облику хидрохлоридне соли и познат под заштићеним именима *Adriamycin PFS*[®], *Adriamycin RDF*[®], *Rubex*[®], *Doxil*[®], *Caelyx*[®], *Myocet*[®]. Доступан у липозомалној формулацији. Фотосензитиван је и због тога се чува обложен заштитном фолијом (46).

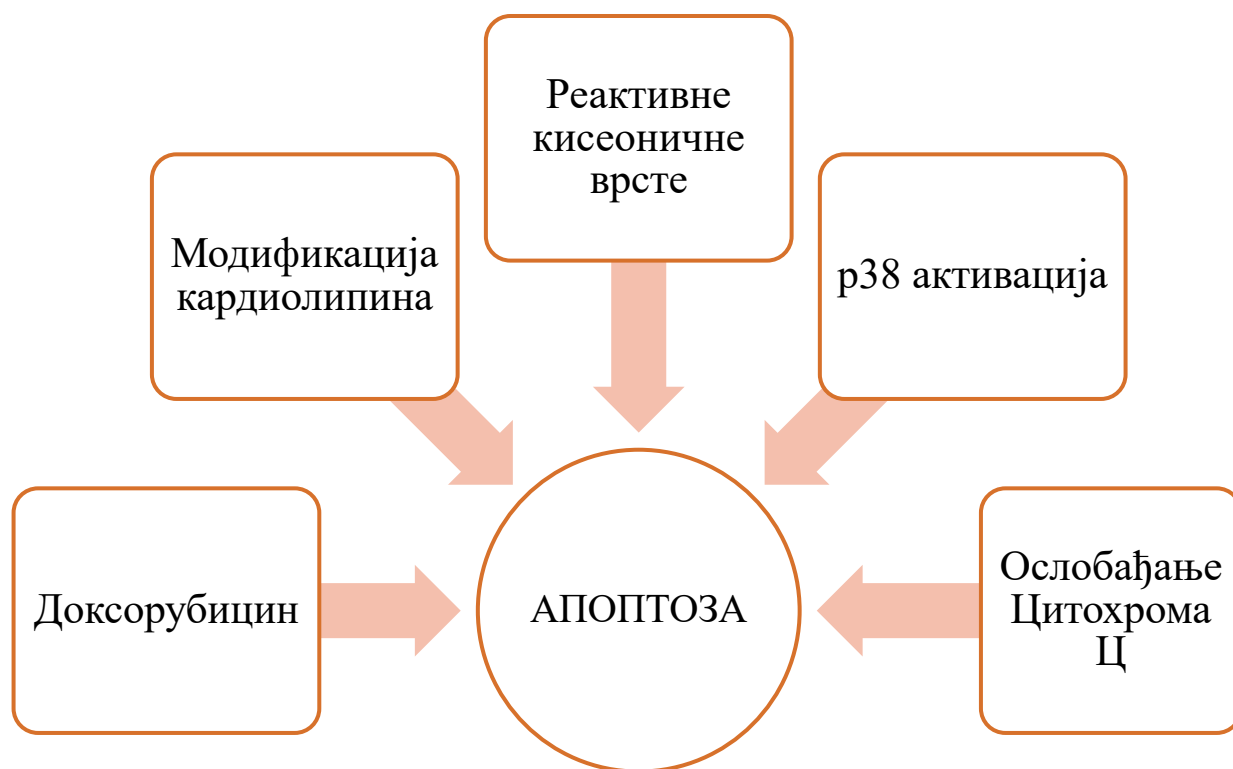
Доксорубицин, антрациклински антибиотик, је хемотерапеутик широког спектра који се користи у лечењу пацијената оболелих од тумора дојке, оваријума, акутне лимфобластне леукемије, Хочкиновог и нон-Хочкиновог лимфома, саркома и многих других тумора (47). Своје антитуморско дејство испољава као интеркалатор тако што блокира дејство ензима топоизомеразе-II чиме се спречава процес репарације ДНК молекула и стварањем слободних радикала који оштећују ћелијску мембрану, ДНК и протеине у туморским ћелијама. Упркос клиничкој ефикасности овог цитостатика, његова примена је ограничена због појаве супресије коштане сржи, мучнине, повраћања, алопеције, а нарочито због специфичне кардиотоксичности (48, 49).

Слика 1. Хемијска структура доксорубицина; $C_{27}H_{29}NO_{11}$, $M_r=543,52$ g/mol, (извор: PubChem)



Сматра се да је механизам којим доксорубицин доводи до појаве кардиотоксичности уско повезан са повећањем оксидативног стреса срца (Слика 2). Оксидацијом до семихинона, доксорубицин ослобађа реактивне кисеоничне врсте (ROS) које изазивају липидну пероксидацију, оштећења ћелијске мембране и молекула ДНК, као и до програмиране ћелијске смрти (50). Срчана дисфункција током терапије је асимптоматска, међутим са развојем оксидативног стреса митохондрије кардиомиоцита постају инсуфицијентне доводећи до ехокардиографских промена, перикардитиса и декомпензоване кардиомиопатије (51). Иако је ефекат доксорубицина на кардиоваскуларни систем дозно-зависан, кардиотоксичност се може јавити и при примени ниских доза (52).

Слика 2. Механизам деловања доксорубицина на нивоу кардиомиоцита



Поред тога, описују се и други механизми доксорубицина којима може деловати кардиотоксично (53-56). Дакле активација апоптозе доксорубицином је делимично посредована активацијом р38 протеина. Литературни подаци наводе да врло рано након излагања доксорубицину се покреће експресија антиапоптоских протеина као што су bcl-2 и bcl-KCL, која може бити смањења или повишена. Смрт кардиомиоцита настаје као резултат неравнотеже између регулаторних протеина и сигналних путева који учествују у апоптози кардиомиоцита. Обзиром да оксидациони стрес итекако посредује у настанку цитотоксичних ефеката на кардиомиоците, онда примена антиоксиданаса умногоме може бити корисна (53-56). У основи тог кардиопротективног ефекта антиоксиданаса је активација актина који инхибира апоптозу путем инактивације каспаза 3 и 9, а у исто време активира експресију регулаторних протеина Bcl-2 и Bax (53-56).

По клиничким карактеристикама које настају, доксорубицин се разликује по свом кардиотоксичном дејству од других цитостатика (57, 58). Познато је да доксорубицин изазива срчану инсуфицијенцију односно слабост срца акутног карактера и то у директној пропорцији са примењеном дозом (Табела 3). Дакле при кумулативној дози од 150 mg/m² доксорубицин изазива оштећење срца код 0,2% свих пацијената који су на терапији доксорубицином, а док кумулативна доза од 600 mg/m² узрокује оштећење срца знатно чешће (Табела 3).

Табела 3. Дозно-зависни ризик за настанак срчаног оштећења услед примене доксорубицина

Кумулативна доза (mg/m ²)	Пацијенти са оштећењем срца (%)
150	0.2
300	1.6
450	3.3
600	8.7

На основу временског периода који је протекао између примене лека и испољавања првих симптома, кардиотоксичност се може поделити у три клиничка стадијума: акутни, субакутни и хронични (22, 58). Акутна кардиотоксичност се јавља код око 40% пацијената у току првих 24 сата од инфузије и препознаје се по синусној тахикардији, продужењу QT интервала и исхемији миокарда. Знатно је ређа субакутна кардиотоксичност која се јавља у периоду од неколико недеља до 30 месеци након последње дозе доксорубицина и најчешће се манифестује као миокардитис и перикардитис. Посебну пажњу истраживача привлачи хронична форма токсичности која се може јавити у периоду од 4-20 година након примене последње дозе лека и повезана је са прогресивном дисфункцијом миокарда (59). Научници велику пажњу усмеравају ка дизајну кардиопротективних протокола након краткорочне и дугорочне примене доксорубицина у циљу смањења нежељених ефеката на кардиоваскуларни систем. Протоколи укључују смањење дозе лека, примену липозомалне формулације и коадминистрацију антиоксиданаса чиме се може постићи адекватан антинеопластични

ефекат на туморским ћелијама уз истовремено смањен ризик од појаве кардиомиопатије (60). До сада су испитивани бројни антиоксиданси на експерименталним анималним моделима у циљу процене њиховог кардиопротективног потенцијала. Студије су показале да дексразоксан има важну улогу у превенцији оштећења митохондријалне ДНК, због чега се користи као кардиопротективни адјуванс у хемотерапији доксорубицином (61). Због способности да смањују оксидативни стрес такође је испитан кардиопротективни потенцијал амлодипина, карведилола (62), АСЕ инхибитора, еритропоетина и силденафила (62). Ликопен, ресвератрол (64), аскорбинска киселина, витамин Е, β -каротен се везују за супероксидни анјон и хидроксилне радикале чиме штите ћелију од оксидативног оштећења.

Иако се не зна тачан механизам којим доксорубицин изазива кардиотоксичност, најшире прихваћена хипотеза се базира на оксидативном стресу који настаје као последица стварања реактивних кисеоничних врста. У прилог овој претпоставци стоји чињеница да је миокард изразито осетљив на дејство слободних радикала због слабо развијеног антиоксидативног одбрамбеног механизма (65, 66). Са друге стране, показано је да суплементација ликопеном није довела до побољшања функције миокарда након акутне примене доксорубицина (64).

Резултати једне студије показују да је доксорубицин повећао укупни антиоксидативни потенцијал миокарда недељу дана након последње дозе (65). Ово сазнање указује на потенцијалну антиоксидативну активност доксорубицина након хроничне примене. Пошто је добро познато да је ефекат овог цитостатика на кардиоваскуларни систем дозно-зависан, било би значајно утврдити да ли и антиоксидативна активност доксорубицина такође зависи од примењене дозе (66, 67). До сада ни у једној студији није вршено испитивање утицаја доксорубицина на коронарну циркулацију и ниво оксидативног стреса на изолованом ретроградно перфундованом срцу пацова по *Langendorff*-у након појединачних и вишеструких доза.

1.6. Идентификација пацијента са ризиком за настанак антрациклинима-индуковане кардиотоксичности

Као што је већ објашњено, највећи фактор ризика за кардиотоксичност је кумулативна доза примењеног хемиотерапеутика (66-69). Поред кумулативне дозе, идентификовани су и други фактори ризика који повећавају ризик од кардиотоксичности изазване антрациклином, укључујући године старости, пол, претходну терапију медијастиналним зрачењем, хипертензију, истовремено лечење циклофосфамидом, трастузумабом или паклитакселом, и присутност срчаних болести (66, 70). Од посебног интереса је интеракција између антрациклина, попут доксорубицина и трастузумаба, с обзиром на релативно уобичајену употребу последњег средства за помоћну терапију рака дојке. Недавни преглед два велика испитивања која су упоређивала примену хемиотерапије само доксорубицином и циклофосфамидом уз примену два средства поред адјувантног трастузумаба показао је учесталост конгестивне срчане инсуфицијенције од 0,45% за саму хемотерапију у односу на 2,0% за хемотерапију и адјувантни трастузумаб (71, 72). Иако су пацијенти са пре-постојећом дисфункцијом леве коморе изложени повећаном ризику од развоја кардиотоксичности изазване антрациклином, барем једно истраживање сугерира да се значајно не смањују ејекциона фракција леве коморе у поређењу са базичним вредности за кумулативне дозе до 350 mg/m² (73). Међутим, од суштинског је значаја често праћење функције леве коморе. Тачније, свим пацијентима којима ће бити ординирана хемиотерапија индиковано је пажљиво евалуирати кардијални статус. То подразумева клинички преглед, мерење виталних параметара, електрокардиографију као и процену свих фактора ризика за настанак кардиоваскуларних обољења, хипертензије, дојабетеса, дислипидемија, гојазности и конзумирања дувана (Слика 3). Са тим у вези, апликавање хемиотерапије је индиковано уколико је ејекциона фракција већа од 50% уз референтне вредности натриуретског пептида и тропонина (74).

Поред тога, битно је и праћење пацијената током и након лечења потенцијалних кардиотоксичним антитуморским лековима. Саветује се мерење серумских маркера кардиотоксичности како би се идентификовали пацијенти са ослабљеном функцијом срца. Затим ехокардиографија путем које се прати ејекциона функција леве коморе и уколико се примети пад од 15% у односу на базалне вредности саветује се прекид хемиотерапије на три недеље, након чега се наставља терапија. Уколико је пад ејекционе фракције већи од 40% индикован је потпуни прекид хемиотерапије кардиотоксичним цитостатиком (75-79).

Слика 3. Фактори повезани са повишеним ризиком за развијање кардиотоксичности услед примене доксорубицина



Будући да је кардиотоксичност изазвана антрациклинима кардиотоксичност типа 1, очекује се да би откривање повреда кардиомиоцита идентификовало оне пацијенте који могу да наставе да развију дисфункцију леве коморе. Док је истражено неколико биомаркера, тропонин I има највећи доказ раног откривања промена у функцији леве коморе. Претходне студије су уврдиле да су пацијенти који су примали терапију доксорубицином високе дозе су имали пораст тропонина I $\geq 0,5$ ng /ml већ 12-72 сата након лечења доксорубицином, а имали и већи пад ејекционе фракције после 7 месеци (65, 72). Поред тога, особе које имају трајно повећање тропонина I након лечења антрациклинима имају већи пад ејекционе фракције у поређењу са онима који имају само повишен рани тропонин (65-70).

Разумно је претпоставити да може постојати генетска предиспозиција за развој кардиотоксичности изазване антрациклином код неких пацијената и постоји велико интересовања за идентификовање генских полиморфизама који су повезани са већом осетљивошћу на кардиотоксичне ефекте антрациклина. У студији на пацијентима са неходчкиновим лимфомом, аутори су процењени моно-нуклеотидне полиморфизме у 82 потенцијална гена за које се претпоставља да могу бити повезани са развојем кардиотоксичности антрациклина (78). Идентификовали су полиморфизме у генима који кодирају три протеина: NADPH (H⁺) оксидазу, која је одговорна за стварање реактивних врста кисеоника, и транспортере доксорубицинског излива MRP1 и MRP2 (78). Иако су се ове студије фокусирале на одређену групу гена, није постојало истраживање повезаности у читавом геному које би утврдило друге гене који би могли идентификовати појединце који имају повећан ризик од развоја токсичности антрациклина.

1.7. Превенција и терапија кардиотоксичности узроковане хемиотерапијом

Доксорубицин, антрациклински антибиотик, је хемотерапеутик широког спектра који се користи у лечењу пацијената оболелих од тумора дојке, оваријума, акутне лимфобластне леукемије, Хочкиновог и нон-Хочкиновог лимфома, саркома и многих других тумора (45-61). Своје антитуморско дејство испољава као интеркалатор тако што блокира дејство ензима топоизомеразе-II чиме се спречава процес репарације ДНК молекула и стварањем слободних радикала који оштећују ћелијску мембрану, ДНК и протеине у туморским ћелијама. Упркос клиничкој ефикасности овог цитостатика, његова примена је ограничена због појаве супресије коштане сржи, мучнине, повраћања, алопеције, а нарочито због специфичне кардиотоксичности (45-61).

Сматра се да је механизам којим доксорубицин доводи до појаве кардиотоксичности уско повезан са повећањем оксидативног стреса срца. Оксидацијом до семихинона, доксорубицин ослобађа реактивне кисеоничне врсте (ROS) које изазивају липидну пероксидацију, оштећења ћелијске мембране и молекула ДНК, као и до програмиране ћелијске смрти (49). Срчана дисфункција током терапије је асимптоматска, међутим са развојем оксидативног стреса митохондрије кардиомиоцита постају инсуфицијентне доводећи до ехокардиографских промена, перикардитиса и декомпензоване кардиомиопатије. Иако је ефекат доксорубицина на кардиоваскуларни систем дозно-зависан, кардиотоксичност се може јавити и при примени ниских доза (61, 79).

На основу временског периода који је протекао између примене лека и испољавања првих симптома, кардиотоксичност се може поделити у три клиничка стадијума: акутни, субакутни и хронични. Акутна кардиотоксичност се јавља код око 40% пацијената у току првих 24 сата од инфузије и препознаје се по синусној тахикардији, продужењу QT интервала и исхемији миокарда. Знатно је ређа субакутна кардиотоксичност која се јавља у периоду од неколико недеља до 30 месеци након последње дозе доксорубицина и најчешће се манифестује као миокардитис и перикардитис. Посебну пажњу истраживача привлачи хронична форма токсичности која се може јавити у периоду од 4-20 година након примене последње дозе лека и повезана је са прогресивном дисфункцијом миокарда (66, 77, 79, 80).

Према препорукама америчког удружења за болести срца и европског удружења за медицинску онкологију (24) лекови који тренутно су највише испитивани и одобрени за употребу код пацијената на хемиотерапији су АЦЕ-инхибитори и бета блокатори, који се описују као делотворни у области превенције али и лечења кардиотоксичности. АЦЕ инхибитори своје дејство остварују преко локалне ихнибиције срчаног ангиотензин конвертујућег ензима у превенцији кардиотоксичности, а нарочито када је присутна срчана инсуфицијенција. Претходна истраживања потврдила су да примена еналаприла код онколошких пацијената значајно утиче на очување систолне функције срца (65, 73). Затим, карведилол као неселективни бета блокатор такође може имати кардиопротективно дејство и нарочито током циклуса хемиотерапије. Као снажан антиоксиданс, карведилол побољшава функцију леве коморе код пацијената који су били на хемиотерапији антрациклинима (77).

Како је кардиотоксичност изазвана антрациклинима последица стварања слободних радикала путем митохондријалних реакција у кардиомиоцитима што резултира дисфункцијом леве коморе а некада и застојем срца, тако је врло јасно да антиоксидативна средства итекако имају важну улогу у овом поремећају. Једна од превентивних стратегија се огледа у смањењу оксидационог стреса смањењем циркулишућег антрациклина тако што се препоручује употреба пегилираног доксорубицина (63). Оваква формулација доксорубицина смањује концентрацију слободног лека и резултира селективнијим уносом лека у ћелије тумора. Клинички и експериментални подаци указују да чак и у дозама од 500 mg/m^2 доксорубицин уколико се примени у пегилуваној форми, кардиотоксичност је значајно смањена.

Као што је раније објашњено, реактивне врсте кисеоника се могу генерисати у Фентоновој реакцији током интеракције доксорубицина са нехемским гвожђем. На основу таквог механизма, у примени је средство за хелирање гвожђа декразоксан које се користи за спречавање кардиотоксичности. Декразоксан је ефикасан у смањењу учесталости конгестивне срчане инсуфицијенције и смањења ејекционе фракције. Препорука је да се овај агенс примени код пацијената који су примили доксорубицин у дози од 300 mg/m^2 како би се остварио кардиопротективни ефекат декразоксана. Са друге стране, у литератури се описује феномен слабљења хемотерапеутика услед примене овог агенса, па се из тог разлога препоручује примена тек након достигнуте кумулативне дозе антрациклина од 300 mg/m^2 (66-78).

Научници велику пажњу усмеравају ка дизајну кардиопротективних протокола након краткорочне и дугорочне примене доксорубицина у циљу смањења нежељених ефеката на кардиоваскуларни систем. Протоколи укључују смањење дозе лека, примену липозомалне формулације и коадминистрацију антиоксиданаса чиме се може постићи адекватан антинеопластични ефекат на туморским ћелијама уз истовремено смањен ризик од појаве кардиомиопатије (81). До сада су испитивани бројни антиоксиданси на експерименталним анималним моделима у циљу процене њиховог кардиопротективног потенцијала. Иако се не зна тачан механизам којим доксорубицин изазива кардиотоксичност, најшире прихваћена хипотеза се базира на оксидативном стресу који настаје као последица стварања реактивних кисеоничних врста. У прилог овој претпоставци стоји чињеница да је миокард изразито осетљив на дејство слободних радикала због слабо развијеног антиоксидативног одбрамбеног механизма (82, 83). Са друге стране, показано је да суплементација ликопоном није довела до побољшања функције миокарда након акутне примене доксорубицина.

Студије су показале да декразоксан има важну улогу у превенцији оштећења митохондријалне ДНК, због чега се користи као кардиопротективни адјуванс у хемотерапији доксорубицином (84) Због способности да смањују оксидативни стрес такође је испитан кардиопротективни потенцијал амлодипина, карведилола (85), АСЕ инхибитора, еритропоетина и силденафила (86). Ликопен, ресвератрол (87), аскорбинска киселина, витамин Е, β -каротен се везују за супероксидни анјон и хидроксилне радикале чиме штите ћелију од оксидативног оштећења.

1.8. Витамин В₁

Тренутно не постоји довољно ефикасно средство које би превенирало настанак кардиотоксичности. Иако је доказано да карведилол као бета блокатор и еналаприл као АЦЕ инхибитор могу утицати на смањење учесталости срчане инсуфицијенције код онколошких пацијената, још увек је то недовољна стратегија која би заштитила све оне који су на третману антрациклинима (83). Дакле, за сада пацијентима код којих се развије нежељено дејство на срце услед примене антрациклина остаје да се примени стандардна терапија за лечење срчане инсуфицијенције, односно примена диуретика, бета блокатора и АЦЕ инхибитора. У недавном истраживању пацијената који су били на третману антрациклинима и код којих је дијагностиковано смањење ејекционе фракције, приметан је пораст ејекционе фракције услед примене АЦЕ инхибитора и бета блокатора код чак 42% пацијената (83). Поред тога, важна је и комуникација кардиолога и онколога, односно правовремено откривање и препознавање нежељених ефеката хемиотерапеутика јер је познато да само 33% испитаника који су примили хемиотерапију се упућује на преглед кардиолога. Дакле, одлука о избору и лечењу малигне болести код пацијента је одлука донесена на основу потенцијалне користи од примене хемиотерапеутика у односу на ризик по функцију срца. Оваква одлука условљена је комуникацијом и договором између кардиолога и онколога ради утврђивања користи и ризика по пацијента. Код пацијената који немају факторе ризика за настанак болести срца, одлука о употреби антрациклина је једноставна, уз праћење функције леве коморе срца континуирано. Са друге стране, код пацијената код којих постоји два или више фактора ризика за развој дисфункције срца, велико је питање колико ће тај пацијент имати користи од употребе антрациклина (Слика 4). Дефинитивно, константне процене ризика по пацијента се морају се спроводити, како на почетку лечења малигне болести, у току, па тако и након престанка примене антрациклина. На пример, код пацијената код којих је велика корист од примене доксорубицина, одлука о наставку лечења упркос његовој кардиотоксичности може се донети на основу вредности ејекционе фракције односно уколико је већа од 40% и уколико се примене кардиопротективна средства (82-85).

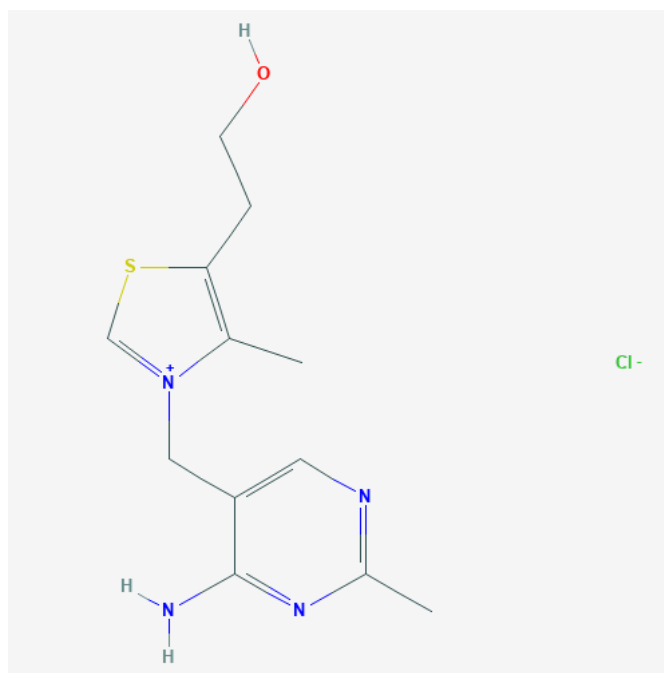
Имајући у виду прооксидациони потенцијал доксорубицина, постоје назнаке да би сва потенцијална антиоксидативна средства попут витамина и полифенолних једињења била кардиопротективна, Студије се показале и да је администрација витамина Е недовољно ефикасна у спречавању дисфункције леве коморе. Експерименталне и клиничке студије са друге стране су показале неконзистентне резултате у погледу ефикасности антиоксиданаса у неутралисању дисфункције леве коморе код животиња-људи на третману доксорубицином. За сада једина ефикасна техника протекције у смислу спречавања настанка дисфункције леве коморе је процена фактора ризика и смањење дозе односно употреба некардиотоксичног хемиотерапеутика код пацијената који су у ризику (86) (Слика 4).

Слика 4. Протокол лечења кардиотоксичности према смерницама европског удружења за медицинску онкологију (24)



Витамини *B* групе спадају у групу потенцијално протективних агенаса а посебно се по својој структури издваја витамин B_1 или тиамин (87). Састоји се од два хетероциклична језгра, пиримидинског и тиазолског који су повезани метиленском групом (Слика 5). Сем аминске функције, везане за пиримидинско језгро, витамин поседује и примарну алкохолну групу у бочном низу тиазолског прстена. За ову хидроксилну функцију у организму се естарски везује пирофосфорна киселина када се формира тиамин-пирофосфат који има улогу коензима у процесу оксидативне декрабоксилације. Тиамин се налази у житарицама, изнутрицама, квасцу, воћу и поврћу и неопходан је за правилан метаболизам угљених хидрата (88). Масти и протеини смањују а угљени хидрати повећавају потребу за тиамином, и сматра се фундаменталним за функционисање нервног и кардиоваскуларног система. Препоручене дневне потребе тиамина су од 1,2-1,4 mg/дан за мушкарце до 1,0-1,5 mg/дан за жене, при чему се повећавају потребе код алкохолизма, болести јетре и цревних болести, стреса и неуритиса. Недостатак тиамина доводи до обољења бери бери која се карактерише сметњама у раду срца и појавом парестезија у екстремитетима, а лечење се спроводи применом терапијских доза тиамина од 20-50 mg/дан. Дефицит тиамина је у директној повезаности са настанком слабошћу срца и настанком симптома срчане декомпензације уз појаву отока и асцитеса (89, 90, 91)

Слика 5. Хемијска структура тиамина ($C_{12}H_{17}ClN_4OS$, извор: *PubChem*)



Тиамин или витамин B_1 се користи у превенцији и лечењу поремећаја узрокованих недостатком тиамина, као што су Верникеова енцефалопатија, синдром бери-бери и друга стања повезана са недостатком тиамина (94). Терапеутске дозе за недостатак тиамина су 1-2 ампуле (100-200 mg) дневно. У неким случајевима када су потребне веће дозе, потребно је до 1000 mg у првих 12 сати. Код људи је егзогени извор тиамина од суштинске важности за метаболизам угљених хидрата (92, 93). Тиамин се

везује за аденозин трифосфат у јетри, бубрезима и леукоцитима и формира коензим тиамин пирофосфат (тиамин дифосфат, кокарбоксилаза), неопходан за метаболизам угљених хидрата. Ензим дифосфокиназа претвара тиамин у активни коензим тиамин пирофосфат. Тиамин пирофосфат учествује у метаболизму угљених хидрата, декарбоксилацији алфа кето киселине и хексозо-монофосфатном путу (92, 93).

Тиамин је витамин растворљив у води; због тога је количина тиаминских резерви у липидним структурама телесних ћелија прилично мала. Тиамин у телу делује као коензим за реакције редукције оксидације у телу, посебно метаболизам глукозе, шант пентозе и циклус лимунске киселине. Претходне студије сугерисале су да тиамин има антиоксидативну активност и да може смањити производњу РОС-а код различитих поремећаја. Поред тога, знамо да пацијенти са кардиомиопатијом често користе диуретике, а због употребе диуретика развијају недостатак тиамина (92, 93).

Наша студија се фокусирала на ефекат тиамин хидрохлорида на преокрет доксорубицином индуковане кардиотоксичности и упоредила га са резултатима без претходног третмана тиамином.

Антрациклини остају важна и неопходна група антитуморских лекова, али такође остају проблематична хемиотерапеутска средства обзиром на њихове кардиотоксичне ефекте и непостојање ефикасног превентивног средства. Са тим у вези, идеално би било да постоји рана примена ефикасног кардиопротективног средства а нарочито код пацијената који су примили веће дозе антрациклина.

ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

2.1. Генерални циљ

Генерални циљ овог истраживања је био испитати потенцијалну улогу тиамина у инхибицији оксидационог стреса узрокован након акутне примене високе кумулативне дозе антрациклинског цитостатика доксорубицина. Поред тога, циљ истраживања је био и испитати потенцијалне нове молекуларне механизме којима тиамин и доксорубицин, самостално или у комбинацији остварују своје ефекте на кардиоваскуларни систем.

2.2. Специфични циљеви

Специфични циљеви овог истраживања су били:

а) Испитати *ex vivo* утицај тиамина на кардиодинамске параметре (максимална и минимална стопа раста притиска леве коморе, систолни и дијастолни притисак леве коморе, срчана фреквенца и коронарни проток) изолованог срца пацова на анималном моделу доксорубицином узроковане кардиотоксичности;

б) Испитати *in vivo* утицај тиамина на ехокардиографске параметре (ејекциона фракција леве коморе) изолованог срца пацова на анималном моделу доксорубицином узроковане кардитоксичности;

в) Испитати утицај тиамина самостално или у комбинацији са доксорубицином на активност срчаних ензима (LDH, СК-МВ);

г) Испитати утицај тиамина на маркере оксидационог стреса (супероксид анион радикал, водоник пероксид, индекс липидне пероксидације, нитрити) на анималном моделу доксорубицином узроковане кардитоксичности;

д) Испитати утицај тиамина на ензиме антиоксидативног система заштите (каталаза и супероксид дисмутаза) на анималном моделу доксорубицином узроковане кардитоксичности;

ђ) Испитати утицај тиамина на патохистолошке промене срчаног мишића и на присуство апоптотских промена.

е) Испитати утицај тиамина самостално или у комбинацији са доксорубицином на експресију апоптотских гена Вах, Bcl-2 и каспазу-3 у ткиву леве коморе срца.

МЕТОДОЛОГИЈА ИСТРАЖИВАЊА

3. МЕТОДОЛОГИЈА ИСТРАЖИВАЊА

3.1. Етички аспекти истраживања

Истраживање је одобрено од стране Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу (број одлуке:). Све експерименталне процедуре су урађене у складу са етичким принципима европске регулативе број 2010/63 за заштиту лабораторијских животиња.

3.2. Супстанце употребљене у студији

У нашем истраживању, употребљене су супстанце аналитичке чистоће (>98%) произвођача Сигма Алдрих, Немачка. За справљање Кребс-Хенселејтовог раствора употребљене су следеће супстанце: натријум хлорид, калијум хлорид, магнезијум сулфат, калијум дихидроген фосфат, натријум бикарбонат, глукоза и калцијум хлорид. За справљање реагенаса и одређивање маркера оксидационог стреса употребљене су следеће супстанце: 2-тиобарбитуратна киселина, натријум хидроксид, сулфанилна киселина, етилендиамин дихрохидрат, амонијум хлорид, боракс, 85% ортофосфорна киселина, натријум нитрит, трисхидроксиметил аминметан, хлороводонична киселина, нитротетразолијум плаво хлорид, желатин, калијум хидрогенфосфат дихидрат, калијум дихидригенфосфат дихидрат, натријум хидрат, глукоза монохидрат, фенол црвено, пероксидаза из коњске ротквице и водоник пероксид.

3.3. Протокол експерименталног истраживања

У просторијама Лабораторије за кардиоваскуларна истраживања Факултета медицинских наука су спроведене све истраживачке процедуре.

Истраживање је обухватило 48 пацова мушког пола Wistar albino соја (12 пацова по групи), старости 12 недеља и просечне телесне масе 350 грама. У односу на третман, све животиње су биле подељене у четири групе:

- a) Контролна група, група пацова без третмана;
- b) Доксорубицин група, група пацова којима је примењен доксорубицин једнократно, у дози од 15 mg/kg телесне тежине интраперитонеалном инјекцијом;
- c) Тиамин група, група пацова којима је примењен тиамин хидрохлорид у дози од 25 mg/kg телесне тежине дневно током 7 дана;
- d) Тиамин+Доксорубицин група, група пацова којима је примењен тиамин хидрохлорид у дози од 25 mg/kg телесне тежине дневно током 7 дана, а након тога 8.ог дана доксорубицин у високој кумулативној дози (15 mg/kg телесне тежине) интраперитонеалном применом.

У зависности од групе пацова, експериментални период је започет нултог дана, након седмодневног периода адаптације и то обављањем ехокардиографије у свим групама. Након тога, у зависности од групе, почињала је примена тиамина током наредних седам дана свакодневно у дози од 25mg/kgtt интраперитонеалном применом. Осмог дана, примењен је доксорубицин у дози од 15mg/kgtt интраперитонеалном инјекцијом (Слика 5), а 72 часа од примене доксорубицина урађена је ехокардиографија

а након тога животиње су жртвоване да би се спровела истраживања на срцу, изоловала крв и ткиво леве коморе срца (Слика 6). У тренутку жртвовања животиња, након примене кратке етарске наркозе и цервикалне дислокације, сакупљана је венска крв из које се затим различитим методама сепарације одвајао серум, плазма и хемолизат. У узорцима серуме одређивали смо концентрације срчаних ензима (тропонин, креатин киназа-МБ и лактат дехидрогеназа), у узорцима плазме одређивали смо биомаркере оксидационог стреса (реактивне кисеоничне и азотне врсте), а у хемолизату смо одређивали активност ензима антиоксидативног система заштите (каталаза и супероксид дисмутаза).

Слика 6. Тиамин хидрохлорид (Витамин Б₁) ампуле, 100mg/1ml; произвођача Алкалоид д.о.о., Северна Македонија и Доксорубицин раствор, 2 mg/1ml (Doxorubicin Ebewe®, концентрат за инфузију) произвођача EBWE Pharma, Ges.m.b.H. Nfg. KG.



Слика 7. Интрапериотонеална апликација доксорубицина пацовима (15mg/kg/tt)



3.4. Испитивање функције миокарда и коронарне циркулације

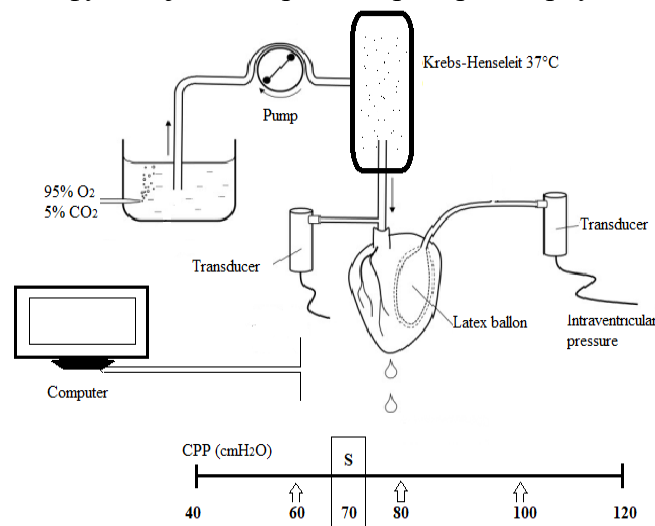
Испитивање функције миокарда представља низ корака који подразумевају хируршку процедуру изоловања срца пацова, перфузију срца и праћење и анализирање промена кардиодинамских параметара променом коронарног перфузионог притиска на специјализованом апарату за изоловано срце, Лангендорфов апарат (Слика 3).

Први корак представља припрему животиње за општу анестезију и примена анестетика. Узимајући у обзир штетне ефекте по кардиоваскуларни систем општих анестетика, у нашем истраживању је примењен ксилазин у дози у 100 mg/kg телесне тежине. Иста метода анестезирања примењена је и током ехокардиографског прегледа свих пацова пре и после третмана. Након анестезирања, приступило се хируршкој процедури изоловања срца пацова: отварање грудног коша, пресецање перикарда, хлађење физиолошким раствором, изолација срца са почетним делом асцендентне аорте. Након брзог изоловања срца, срце се потапа у ледени физиолошки раствор (-4°C до -10°C). Концем се причвршћује почетни део асцендентни аорте на канилу Лангендорф апарата уз константно чување и праћење виталне функције срца.

3.5. Метода ретроградне перфузије по Оскару Лангендорфу

Ex vivo метода ретроградне перфузије изолованог срца представља јединствен модел иипитивања функције и контрактилности миокарда експерименталних животиња коју је успоставио чувени Оскар Лангендорф давне 1897. године. Овом методом је могуће пратити функцију срца ван живог организма које у експерименталним условима наставља свој рад, који је омогућен због константне примене кисеоника и хранљивих материја из Кребс-Хенселејтовог раствора на оптималној температури (37°C), односно у физиолошким условима. Разликујемо два начина перфундовања изолованог срца, и то променом притиска и променом протока. Током нашег истраживања, користили смо модел ретроградне перфузије срца на констатном протоку и променљивом притиску (од 40 до 120 cmH₂O) (Слика 7).

Слика 8. Испитивање функције миокарда и коронарне циркулације по Лангендорфу



Као златни стандард у испитивањима функције изолованог органа (срце) глодара, данас се ова метода користи за читав спектар физиолошко-фармаколошких истраживања у

области кардиоваскуларне медицине. Предност овог модела је та што директним праћењем је могуће евидентирати промене срчане активности и контрактилности и сигурни смо да су искључени компензаторни механизми унутар живог организма који су укључени када су у питању *in vivo* истраживања на срцу. Основни делови Лангедорфовог апарата, произвођача *Експериметриа*, Мађарска, модела број LF-01-FP, су:

- 1) Две вертикалне цеви различитог промера које методом негативног притиска се испуњавају Кребс-Хенселејетовим раствором (мања цев) или загревајаном водом (већа цев).
- 2) Резервоар запремине 4 литра у који се смешта сложени Кребс-Хенселејтов раствор који је по свом саставу сличан ванћелијској течности и има улогу да обезбеди физиолошке услове за несметан рад срца.
- 3) Боца са констатном смешом гасова кисеоника+угљен монооксида (95%/5%) чиме се постижу физиолошки услови у погледу оксигенисаности.
- 4) Канила која је на врху тање изводне цеви и на коју се качи врх аорте,
- 5) Водено купатило, које има улогу да угреје воду до температуре од 37°C .
- 6) Пумпа која има улогу да убаци тест супстанцу у зависности од протокола за истраживање, сада у нашем случају није употребљавана,
- 7) Сензори који имају улогу у констатном регистровању параметара функције леве коморе изолованог органа, и
- 8) Рачунар са софтвером (*Spel Advanced HaemoSys version 3.24*) који има улогу да прати и усними путем одговарајућег сензора и програма сваку промену али и константно да прати срчани рад.

На овај начин и помоћу овако сложеног апарата, путем сензора који је директно локализован у левој комори, пратили смо следеће параметре кардиодинамике, маркере инотропне и луситропне способности срчаног мишића:

- 1) Максимална стопа раста притиска леве коморе, (dp/dt_{max}) изражена у mmHg/s;
- 2) Минимална стопа раста леве коморе (dp/dt_{min}), изражена у mmHg/s;
- 3) Систолни притисак у левој комори (SLVP), изражен у mmHg;
- 4) Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) изражен у mmHg;
- 5) Фреквенца срца (HR) изражена у број откуцаја/минути;
- 6) Коронарни проток (CF) изражен у ml/min и који се мери директним мерењем протока.

Након периода стабилизације на притиску од 70 cmH₂O, што подразумева постојање једнаких вредности три узастопна мерења коронарног протока, приступило би се експерименту односно процесу испитивања ауторегулације. Прво мерење кардиодинамских параметара је обављено на притиску од 60 cmH₂O, затим 80 cmH₂O, 100 cmH₂O и 120 cmH₂O, а затим на притиску од 40 cmH₂O, након чега се приступило поновном мерењу на свим притисцима почев од 40 cmH₂O па до 120 cmH₂O. На тај начин смо пратили параметре функције срца у контролном (прво мерење) и експерименталном периоду (друго мерење).

1.4. Ехокардиографија пацова

Ултразвук срца пацова као неинвазивна дијагностичка процедура је рађена на специјализованом ултразвучном апарату за мале лабораторијске животиње (HP/Phillips, SONOS 5500, Imaging System, Hewlett Packard. 3000 Minuteman Road, Andover, 010810

Massachusetts). У нашем истраживању, ултразвук срца је рађен пре и после експерименталног периода, уз претходну примену општег анестетика (ксилазин у дози од 100 mg/kg tt). Након увођења у општу анестезију, пацовима се овом методом пратила функција леве коморе праћењем следећих ехокардиографских параметара:

- 1) енд-дијастолни дијаметар леве коморе (LVEDd) (cm),
- 2) енд-сistolни дијаметар леве коморе (LVEDs) (cm),
- 3) енд-дијастолна дебљина интервентрикуларног септума (LVEId) (cm),
- 4) енд-сistolна дебљина интервентрикуларног септума (LVEIs) (cm),
- 5) фракционо скраћење леве коморе (FS) (cm),
- 6) и ејекциона фракција леве коморе (LVEF) (%) израчунавањем из формуле $LVEF=(LVEDd-LVEDs)/LVEDd*100$.

1.5. Одређивање активности срчаних ензима

Применом спектрофотометријских метода одређивања, у узорцима серума одређивана је активност срчаних ензима. Концентрација изоензима креатин киназе (СК-МВ) је одређивана методом електрохемилуминисценције (ECLIA) на апарату Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany. Концентрација лактат дехидрогеназе (LDH) је одређивана стандардном спектрофотометријском методом која је подразумевала употребу реагенса за одређивање активности лактат дехидрогеназе у серуму. Мерење је извршено на таласној дужини од 340 nm (95-97).

1.6. Одређивање маркера оксидационог стреса

Спектрофотометријско читавање је спроведено на апарату Shimadzu UV-1800 UV-VIS, Јапан. Циљ је био одредити концентрацију супероксид анјон радикала, азот монооксида, водоник пероксида и индекса липидне пероксидације у узорцима плазме.

Метода одређивања супероксид анјон радикала се заснива на хемијској реакцији са нитро-тетразолијум плавим. Мерење се врши на таласној дужини од 550 nm. За одређивање концентрације супероксида, неопходна је примена есеја који су себи садржи: 50 nm TRIS-HCL-a (pH=8,6); 0,1 mM EDTA, 0,1 mg/ml желатина и 0,1 mM NBT (Nitro Tetrazolium Blue). Метода подразумева пипетирање 50 микролитара узорка плазме и 950 микролитара есејне смеше чиме се започиње хемијска реакција. Слепа проба је била дестилована вода. На сваких 60 секунди се вршило мешање и нотирање екстинције до постизања све узастопне приближно исте екстинције (98).

Метода одређивања водоник пероксида се базира на оксидацији фенол црвеног употребом водоник пероксида, у хемијској реакцији која је катализована пероксидазом. Мерење се обављало на таласној дужини од 610 nm. Поступак подразумева пипетирање 200 микролитара узорка плазме и 800 микролитара раствора фенол црвеног (Phenol Red Solution-PRS). Затим се додаје по 10 микролитара HRPO, припремљеног *ex tempore*. Након инкубирања на собној температури током 10 минута, додавањем натријум хидроксида подешавала се киселост односно рН до 12. Слепа проба је била дестилована вода (98, 99).

Метода одређивања индекса липидне пероксидације се заснива на индиректном одређивању продуката липидне пероксидације са тиобарбитуратном киселином (ТВА). Тачније, у питању је спектрофотометријска метода одређивања супстанци које интерагују са тиобарбитуратном киселином (Thiobarbituric Acid Reactive Substances). Поступак подразумева пипетирање 800 микролитара узорка и 200 микролитара 1% ТВА. Као слепа проба употребљена је дестилована вода, а мерење вршено на таласној дужини од 530 nm (100).

Метода одређивања азот монооксида подразумева индиректну спектрофотометријску методу одређивања биорасположивости нитрита у узорку плазме. Основу методу чини употреба Griess-овог реагенса који се припрема употребом 1% сулфанилне киселине растворене у 5% ортофосфорној киселини и 0,1% воденог раствора N-(1-нафтил)-етилендиамин дихидрохлорида (NEDA) који је фотосензитиван. Поступак подразумева пипетирање 1 ml узорка плазме, 250 микролитара Griess-овог реагенса и 125 микролитара амнојачног пуфера (pH=9,0). Слепа проба је била дестилована вода и мерење је вршено на таласној дужини од 550 nm (99).

1.7. Одређивање ензима антиоксидативне заштите

Сепаратисањем серума и хемолизата из пуне крве спровели смо биохемијска мерења у погледу одређивања активности срчаних ензима и ензима антиоксидативне заштите, као што су каталаза (CAT) и супероксид дисмутаза (SOD).

Одређивање активности каталазе подразумева спектрофотометријску методу одређивања у хемолизату еритроцита, где након дилуције водом у односу 1:7 додавања етанола и односу 0,6:1 се отпочело одређивање. Додавање 50 микролитара пуфера, 100 микролитара лизата и 1 ml 10 mM водоник пероксида је суштина методологије, а затим и приступило се мерењу на таласној дужини од 360 nm (101).

Одређивање супероксид дисмутазе је такође спектрофотометријска метода која подразумева следећи поступак: мешање 100 микролитара лизата и 1 ml карбонантног пуфера, затим додавањем 100 микролитара епинефрина се завршава биохемијска реакција. Одређивање се вршило на таласној дужини од 470 nm (102).

1.8. Патохистолошка анализа

Патохистолошка анализа ткива срца пацова је спроведена у Центру за патолошку дијагностику, Клиничког центра Крагујевац. Након жртвовања животиња, изоловано је срце и ткиво срца односно део леве коморе је фиксирано у 4% формалдехиду најмање 24 часа. После фиксације, ткиво је подвргнуто процесу дехидратације употребом растућих концентрација алкохола, просветљењу хлороформом или ксиленом, паковању у парафинске блокове и калуљењу, сечењу микрономом на дебљину око 5 микрометара, депарафинисању и хидратацији. Од узимања узорка ткива сви узорци су обрађени унутар 15 дана од узорковања. Након бојења Hematoxylin-Eosin-ом и Masson Trichome метода, сви узорци су визуелизовани помоћу микроскопа.

1.9. Хистохемијско испитивање експресије апоптотских гена

Испитивање експресије апоптотских гена у ткиву леве коморе срца пацова спроведено је имунохистохемијским методама бојења и визуелизације ткива. У нашем истраживању, од великог интереса је било испитати да ли примена доксорубицина самостално или у комбинацији са тиамином утиче на активност Б-ћелијског лимфома-2 (Bcl-2), који представља главни маркер апоптозе има антиапоптотску активност у случају изражене експресије, као и на протеине Вах и каспазу-3, који су главни медијатори почетне и завршне фазе апоптозе кардиомиоцита.

1.10. Статистичка анализа

У овом истраживању употребљене су методе дескриптивне и аналитичке статистике употребом програма SPSS for Macintosh version 26.0. Резултати су приказани табеларно и графички и то дескриптивно у виду аритметичке средине, стандардне девијације и стандардне грешке. За поређење резултата унутар групе употребљен је Mann-Whitney U тест, а за поређење разлика између група за исти параметар употребљена је ANOVA или Kruskal-Wallis тест, уз употребу одговарајућег post hoc теста (Tukey-B или Bonferroni). Статистички значајним нивоом сматра се вредност значајности мање од 0,05 ($p < 0,05$).

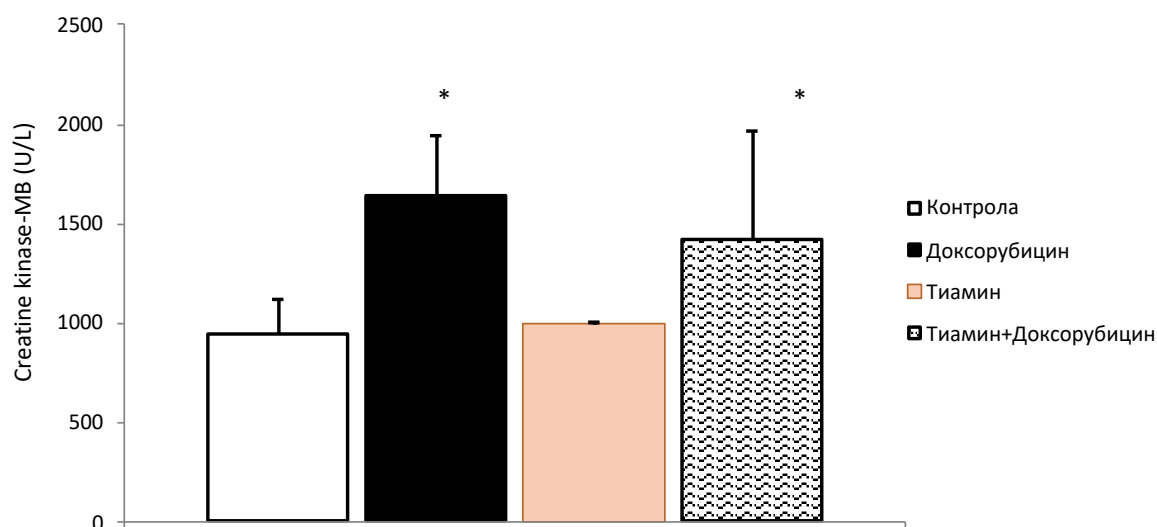
РЕЗУЛТАТИ

2. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Концентрација срчаних ензима у серуму Wistar albino пацова

На Графиконима 1а и 1б су приказане активности срчаних ензима у серуму пацова у свим групама. Утврђена је статистички значајно виша активност креатин киназе и лактат дехидрогеназе у групи пацова која је третирана доксорубицином, као и повишена активност креатин киназе у групи која је третирана тиамином и доксорубицином у односу на остале групе (Графикони 1а и 1б, Табеле 1а и 1б).

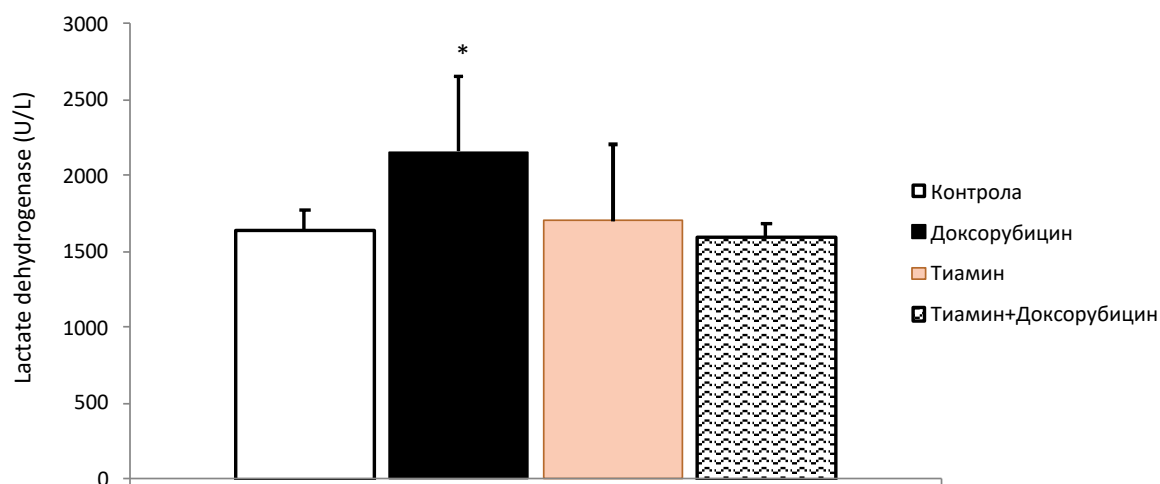
Графикон 1а. Активност креатин киназе-МБ у серуму пацова у свим групама. Резултати су приказани као аритметичка средина \pm стандардна грешка.



Табела 1а. Креатин киназа у серуму. Статистичка значајност утврђена је Mann-Whitney U тестом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	Контрола <i>вс.</i> Доксорубицин	Контрола <i>вс.</i> Тиамин	Контрола <i>вс.</i> Тиамин+Докс	Доксорубицин <i>вс.</i> Тиамин	Доксорубицин <i>вс.</i> Тиамин+Докс
<i>p</i> вредност	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$

Графикон 1б. Активност лактат дехидрогеназе у серуму пацова у свим групама. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка. Статистичка значајност утврђена је Kruskal-Wallis тестом, уз статистички праг од 0,05.



Табела 1б. Лактат дехидрогеназа у серуму. Статистичка значајност утврђена је Mann-Whitney U тестом, уз статистички праг од 0,05.

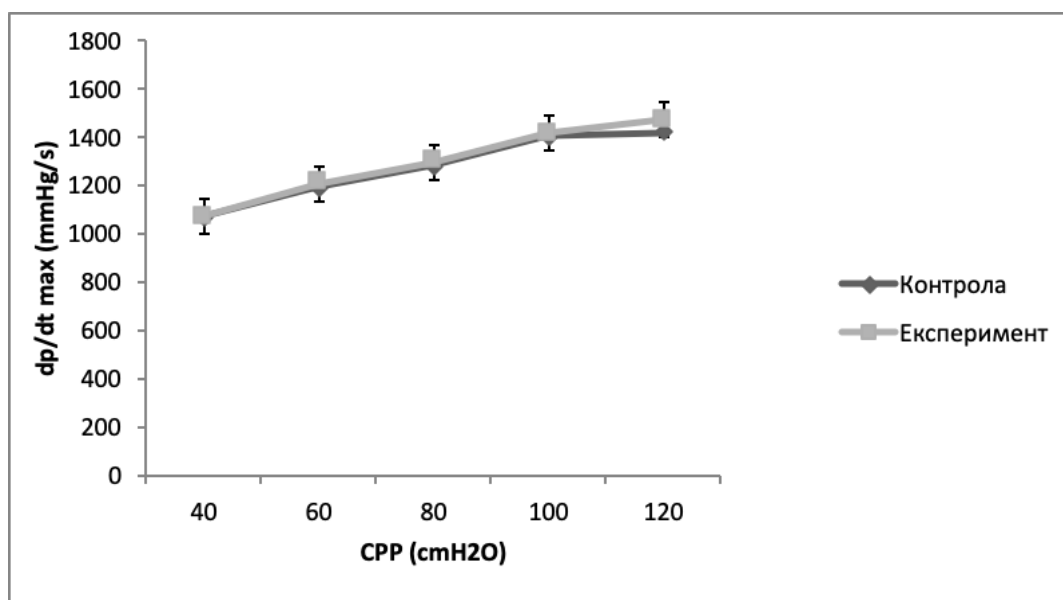
Поређење	Контрола <i>вс.</i> Доксорубицин	Контрола <i>вс.</i> Тиамин	Контрола <i>вс.</i> Тиамин+Докс	Доксорубицин <i>вс.</i> Тиамин	Доксорубицин <i>вс.</i> Тиамин+Докс
<i>p</i> вредност	<i>p</i> <0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> <0,05	<i>P</i> <0,05

4.2. УТИЦАЈ ТИАМИНА НА ФУНКЦИЈУ МИОКАРДА НА МОДЕЛУ РЕТРОГРАДНЕ ПЕРФУЗИЈЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

4.2.1. Контролна група

У контролној групи, статистичком анализом и поређењем средњих вредности dp/dt_{max} за сваку вредност коронарног перфузионог притиска (40-120 cmH_2O) није утврђена статистички значајна разлика у експерименталном периоду у односу на контролне услове (Графикон 2а, Табела 2а).

Графикон 2а. Средња вредност максималне стопе раста притиска у левој комори (dp/dt_{max}) у контролној групи. Резултати су приказани као аритметичка средина \pm стандардна грешка.

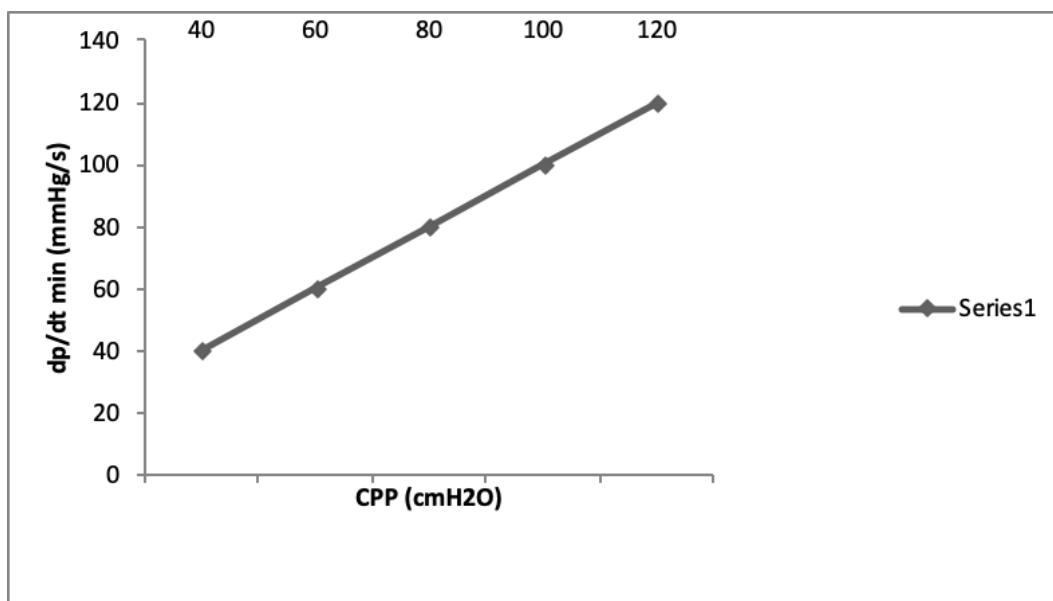


Табела 2а. Максимална стопа раста притиска у левој комори. Статистичка значајност утврђена је Mann-Whitney U тестом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 40 cmH_2O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 60 cmH_2O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 80 cmH_2O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 100 cmH_2O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 120 cmH_2O
<i>p</i> вредност	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$

У контролној групи, статистичком анализом и поређењем средњих вредности dp/dt_{min} за сваку вредност коронарног перфузионог притиска (40-120 cmH_2O) није утврђена статистички значајна разлика у експерименталном периоду у односу на контролне услове (Графикон 2б, Табела 2б).

Графикон 2б. Средња вредност минималне стопе раста притиска у левој комори (dp/dt_{min}) у контролној групи. Резултати су приказани као аритметичка средина \pm стандардна грешка.

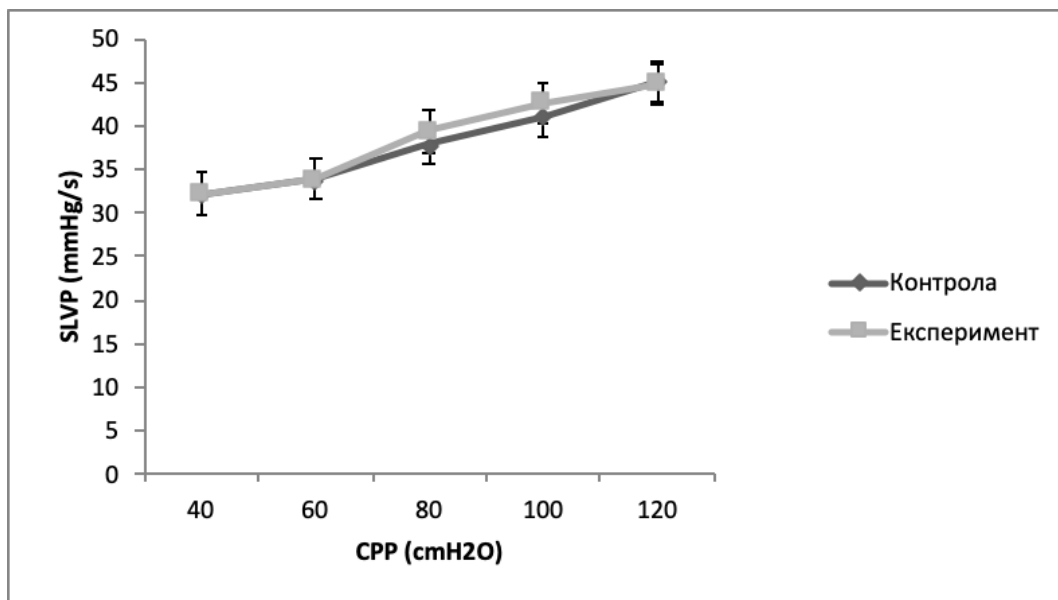


Табела 2б. Минимална стопа раста притиска у левој комори. Статистичка значајност утврђена је Mann-Whitney U тестом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 40 cmH_2O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 60 cmH_2O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 80 cmH_2O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 100 cmH_2O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 120 cmH_2O
<i>p</i> вредност	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$

Затим, у контролној групи, статистичком анализом и поређењем средњих вредности SLVP за сваку вредност коронарног перфузионог притиска (40-120 cmH₂O) није утврђена статистички значајна разлика у експерименталном периоду у односу на контролне услове (Графикон 2в, Табела 2в).

Графикон 2в. Средња вредност систолног притиска у левој комори (SLVP) у контролној групи. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка.

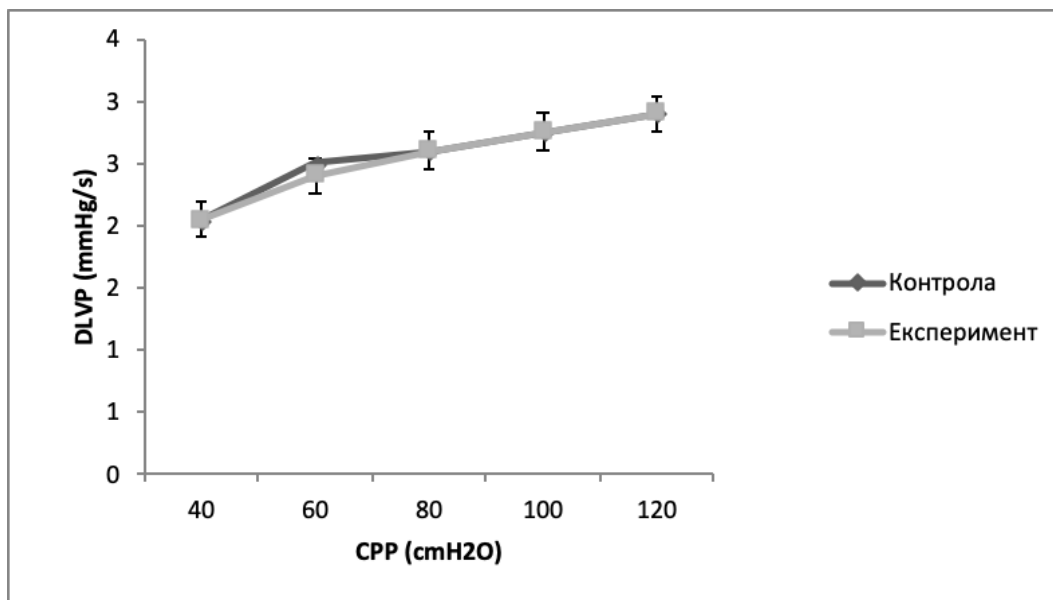


Табела 2в. Систолни притисак у левој комори. Статистичка значајност утврђена је Mann-Whitney U тестом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	Контрола <i>вс.</i> Експеримент 40 cmH ₂ O	Контрола <i>вс.</i> Експеримент 60 cmH ₂ O	Контрола <i>вс.</i> Експеримент 80 cmH ₂ O	Контрола <i>вс.</i> Експеримент 100 cmH ₂ O	Контрола <i>вс.</i> Експеримент 120 cmH ₂ O
<i>p</i> вредност	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05

DLVP се статистичком анализом и поређењем средњих вредности SLVP за сваку вредност коронарног перфузионог притиска (40-120 cmH₂O) није значајно разликовао у експерименталном периоду у односу на контролне услове (Графикон 2г, Табела 2г).

Графикон 2г. Средња вредност дијастолног притиска у левој комори (DLVP) у контролној групи. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка.

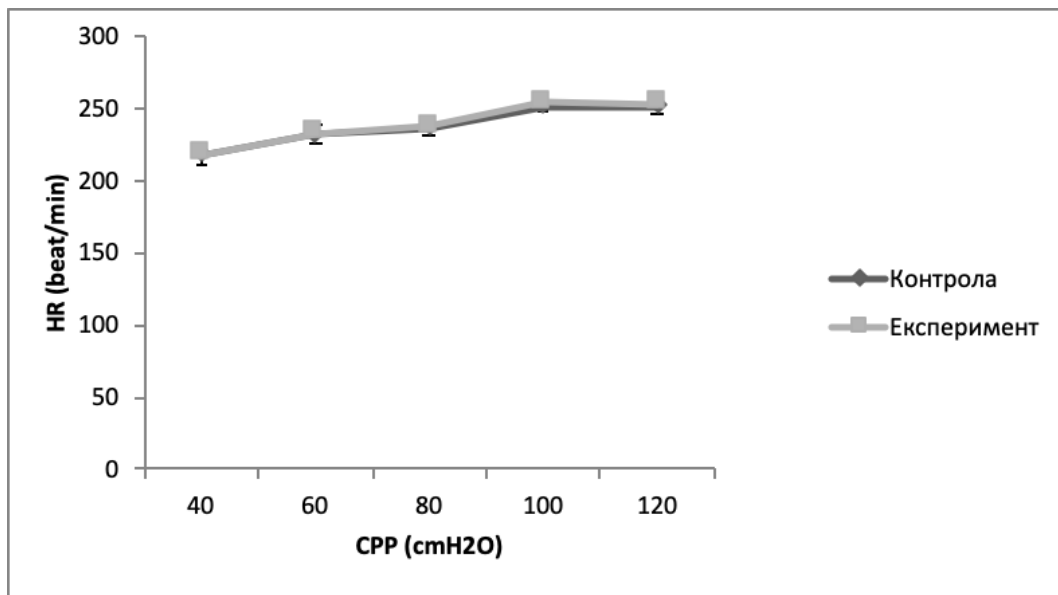


Табела 2г. Дијастолни притисак у левој комори. Статистичка значајност утврђена је Mann-Whitney U тестом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 40 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 60 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 80 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 100 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 120 cmH ₂ O
<i>p</i> вредност	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05

Срчана фреквенца се статистичком анализом и поређењем средњих вредности SLVP за сваку вредност коронарног перфузионог притиска (40-120 cmH₂O) није значајно разликовала у експерименталном периоду у односу на контролне услове (Графикон 2д, Табела 2д).

Графикон 2д. Средња вредност срчане фреквенце (HR) у контролној групи. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка.

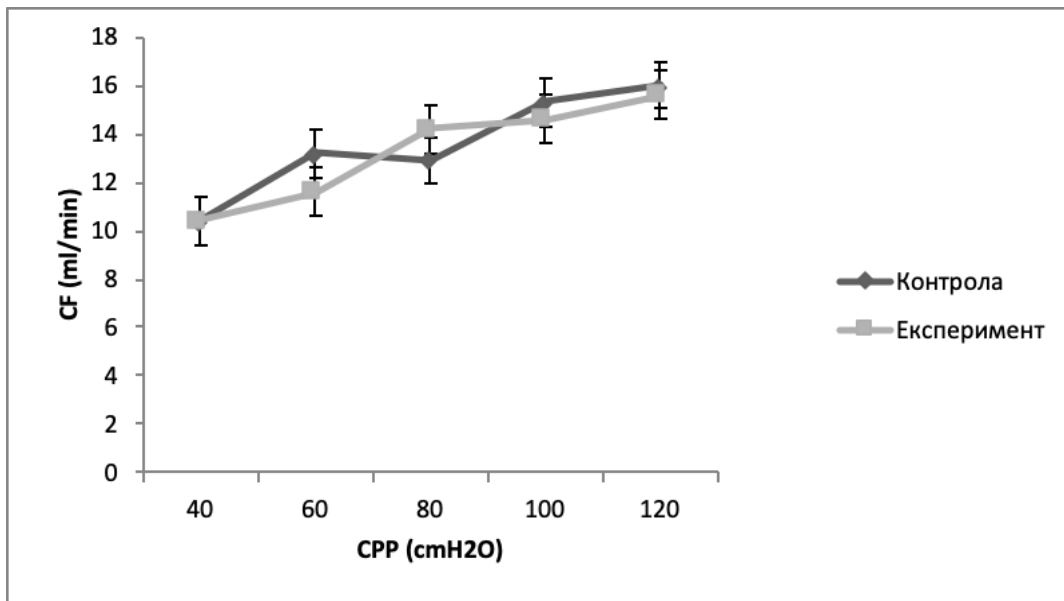


Табела 2д. Срчана фреквенца. Статистичка значајност утврђена је Mann-Whitney U тестом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 40 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 60 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 80 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 100 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 120 cmH ₂ O
<i>p</i> вредност	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05

Коронарни проток се статистичком анализом и поређењем средњих вредности SLVP за сваку вредност коронарног перфузионог притиска (40-120 cmH₂O) није значајно разликовао у експерименталном периоду у односу на контролне услове (Графикон 2ђ, Табела 2ђ).

Графикон 2ђ. Средња вредност коронарног протока (CF) у контролној групи. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка.



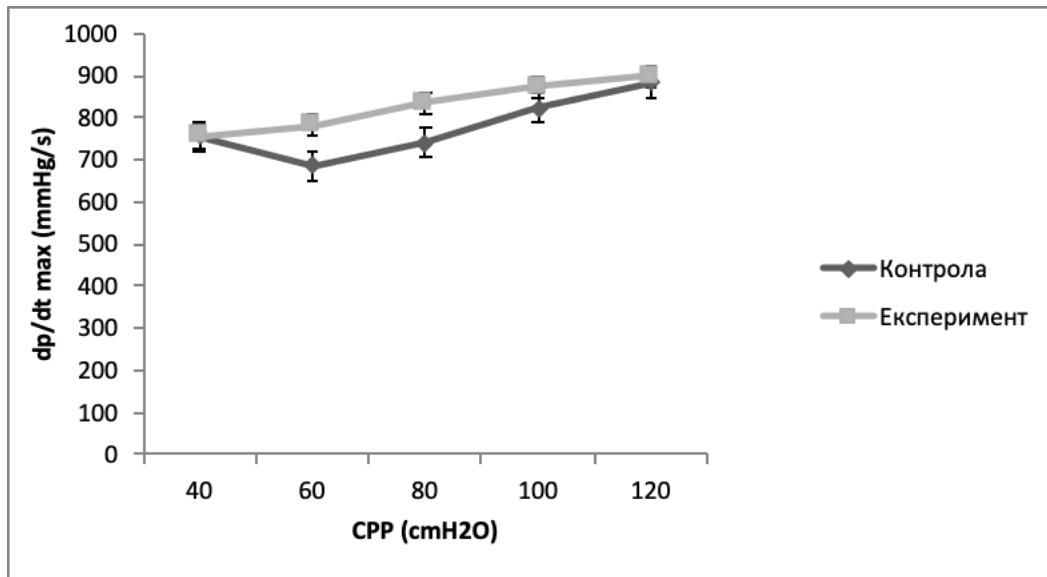
Табела 2ђ. Коронарни проток. Статистичка значајност утврђена је Mann-Whitney U тестом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 40 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 60 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 80 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 100 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 120 cmH ₂ O
<i>p</i> вредност	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05

4.2.2. Доксорубицин група

У доксорубицин групи је утврђен статистички значајан пад максималне стопе раста притиска у левој комори на притисцима од 60 до 100 cmH₂O у експерименталном периоду у односу на контролни (Графикон 3а, Табела 3а).

Графикон 3а. Максимална стопа раста притиска у левој комори (dp/dt_{max}) у доксорубицин групи. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка.

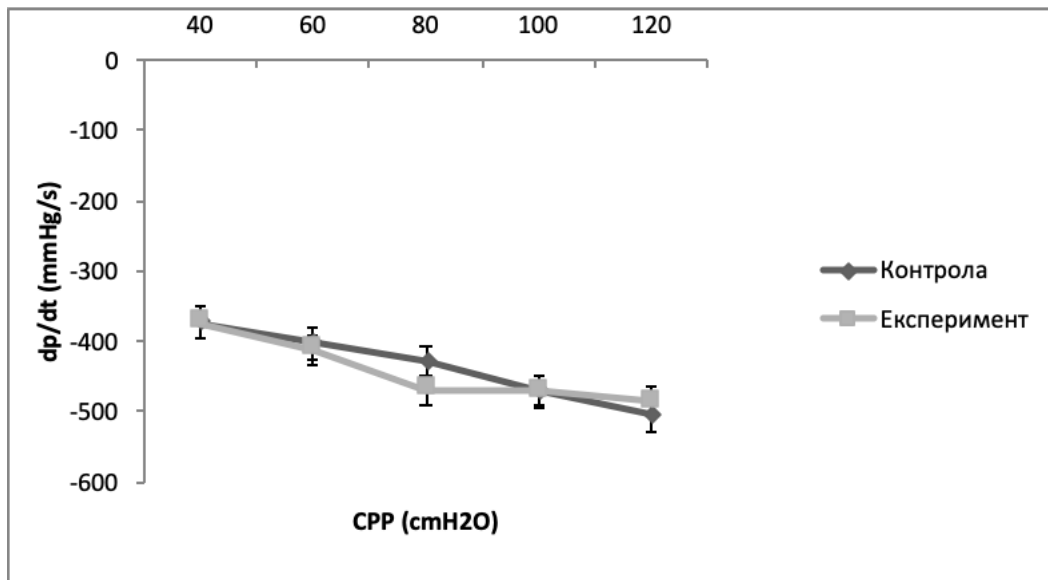


Табела 3а. Максимална стопа раста притиска у левој комори. Статистичка значајност утврђена је Mann-Whitney U тестом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 40 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 60 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 80 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 100 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 120 cmH ₂ O
p вредност	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p>0,05

Поређењем средњих вредности минималне стопе раста притиска у левој комори, утврђена је статистички значајна разлика на притиску од 80 cmH₂O у експерименталном периоду у односу на контролни период (Графикон 3б, Табела 3б).

Графикон 3б. Минимална стопа раста притиска у левој комори (dp/dt_{min}) у доксорубицин групи. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка.

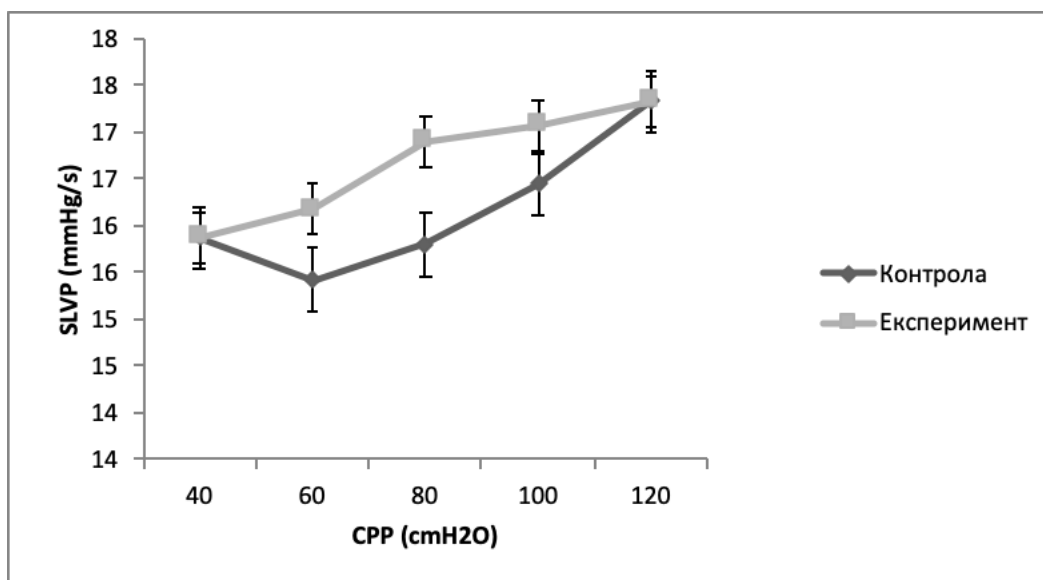


Табела 3б. Минимална стопа раста притиска у левој комори. Статистичка значајност утврђена је Mann-Whitney U тестом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 40 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 60 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 80 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 100 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 120 cmH ₂ O
<i>p</i> вредност	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> <0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05

Поређењем средњих вредности систолног притиска у левој комори, утврђена је статистички значајна разлика на притисцима од 60 до 100 cmH₂O у експерименталном периоду у односу на контролни период (Графикон 3в, Табела 3в).

Графикон 3в. Систолни притисак у левој комори (SLVP) у доксорубицин групи. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка.

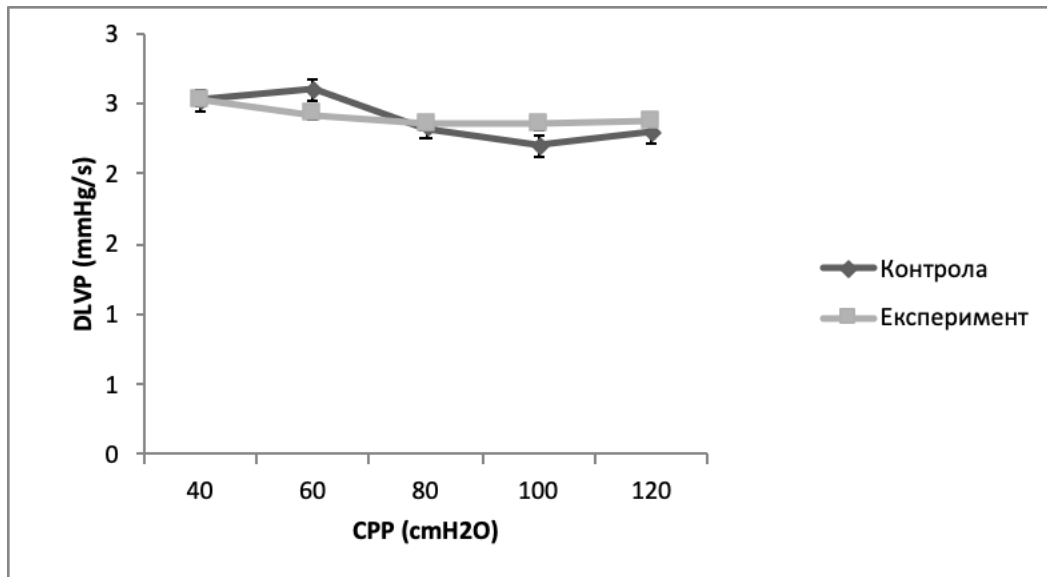


Табела 3в. Систолни притисак у левој комори. Статистичка значајност утврђена је Mann-Whitney U тестом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 40 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 60 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 80 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 100 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 120 cmH ₂ O
p вредност	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p>0,05

Поређењем средњих вредности дијастолног притиска у левој комори, није утврђена статистички значајна разлика у оквиру перфузионог ранга од 40 до 120 cmH₂O у експерименталном периоду у односу на контролни период (Графикон 3г, Табела 3г).

Графикон 3г. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) у доксорубицин групи. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка.

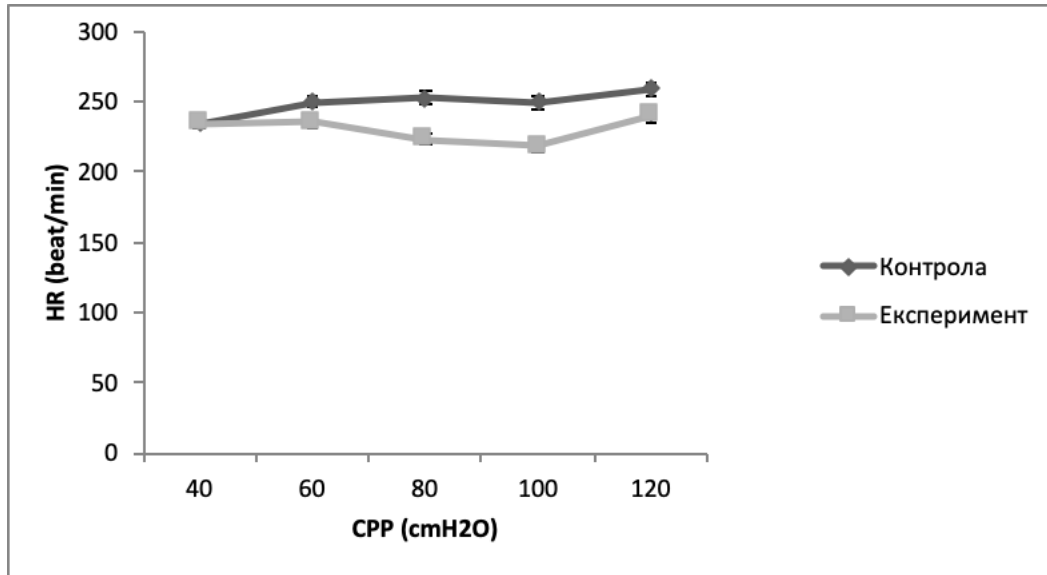


Табела 3г. Дијастолни притисак у левој комори. Статистичка значајност утврђена је Mann-Whitney U тестом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	Контрола <i>вс.</i> Експеримент 40 cmH ₂ O	Контрола <i>вс.</i> Експеримент 60 cmH ₂ O	Контрола <i>вс.</i> Експеримент 80 cmH ₂ O	Контрола <i>вс.</i> Експеримент 100 cmH ₂ O	Контрола <i>вс.</i> Експеримент 120 cmH ₂ O
<i>p</i> вредност	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05

Поређењем средњих вредности срчане фреквенце, утврђена је статистички значајна разлика на притисцима од 80 до 120 cmH₂O у експерименталном периоду у односу на контролни период (Графикон 3д, Табела 3д).

Графикон 3д. Срчана фреквенца (HR) у доксорубицин групи. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка.

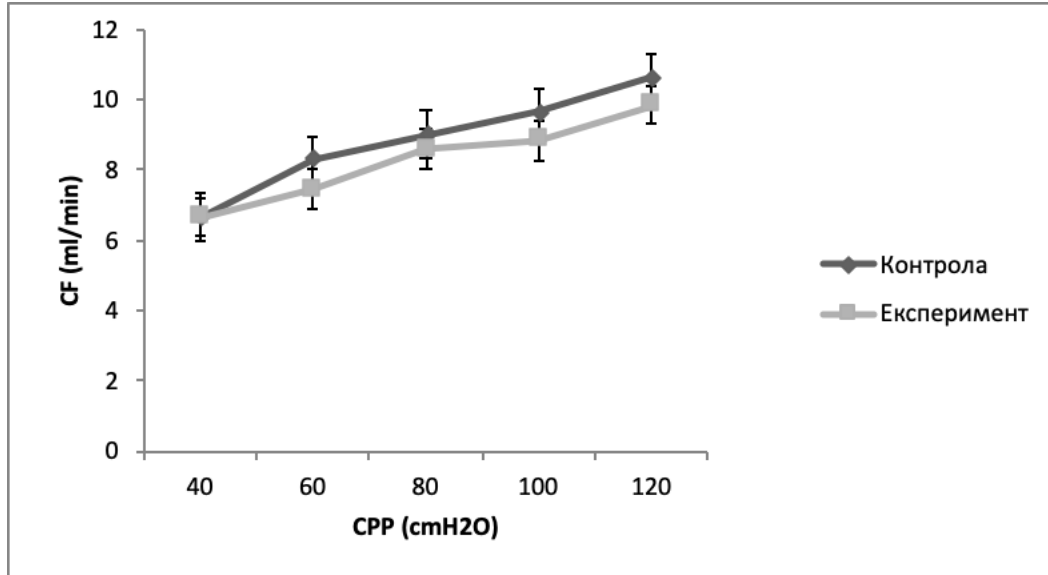


Табела 3д. Срчана фреквенца. Статистичка значајност утврђена је Mann-Whitney U тестом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 40 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 60 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 80 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 100 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 120 cmH ₂ O
<i>p</i> вредност	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> <0,05	<i>p</i> <0,05	<i>p</i> <0,05

Поређењем средњих вредности коронарног протока, утврђена је статистички значајна разлика на притисцима од 60, 100 и 120 cmH₂O у експерименталном периоду у односу на контролни период (Графикон 3ж, Табела 3ђ).

Графикон 3ж. Коронарни проток (CF) у доксорубицин групи. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка.



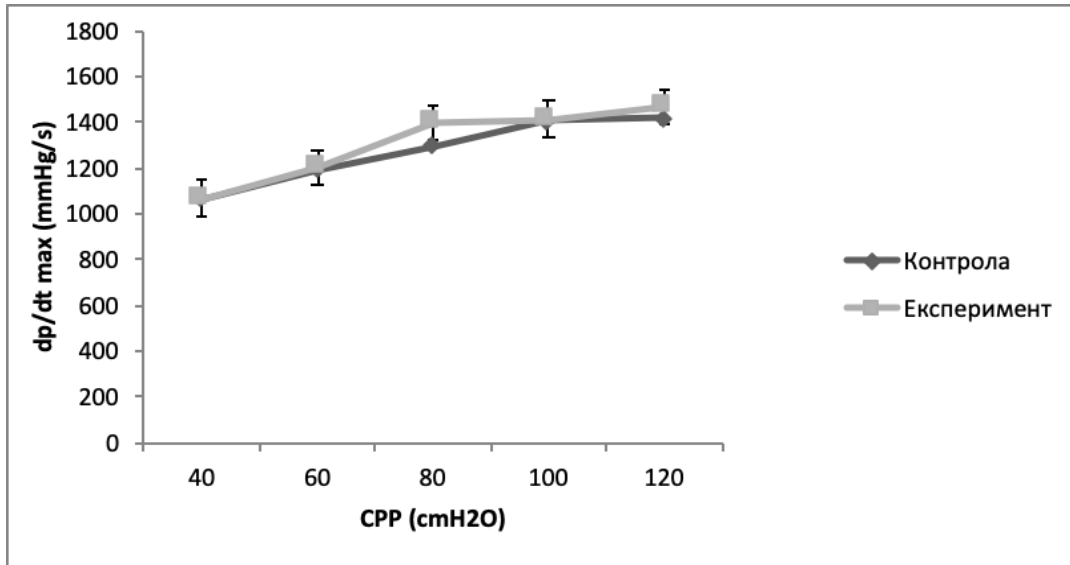
Табела 3ђ. Коронарни проток. Статистичка значајност утврђена је Mann-Whitney U тестом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	Контрола <i>вс.</i> Експеримент 40 cmH ₂ O	Контрола <i>вс.</i> Експеримент 60 cmH ₂ O	Контрола <i>вс.</i> Експеримент 80 cmH ₂ O	Контрола <i>вс.</i> Експеримент 100 cmH ₂ O	Контрола <i>вс.</i> Експеримент 120 cmH ₂ O
<i>p</i> вредност	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05

4.2.3. Тиамин група

У тиамин групи је утврђен статистички значајан пораст максималне стопе раста притиска у левој комори на притиску од 80 cmH₂O у експерименталном периоду у односу на контролни (Графикон 4а, Табела 4а).

Графикон 4а. Максимална стопа раста притиска у левој комори (dp/dt_{max}) у тиамин групи. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка.

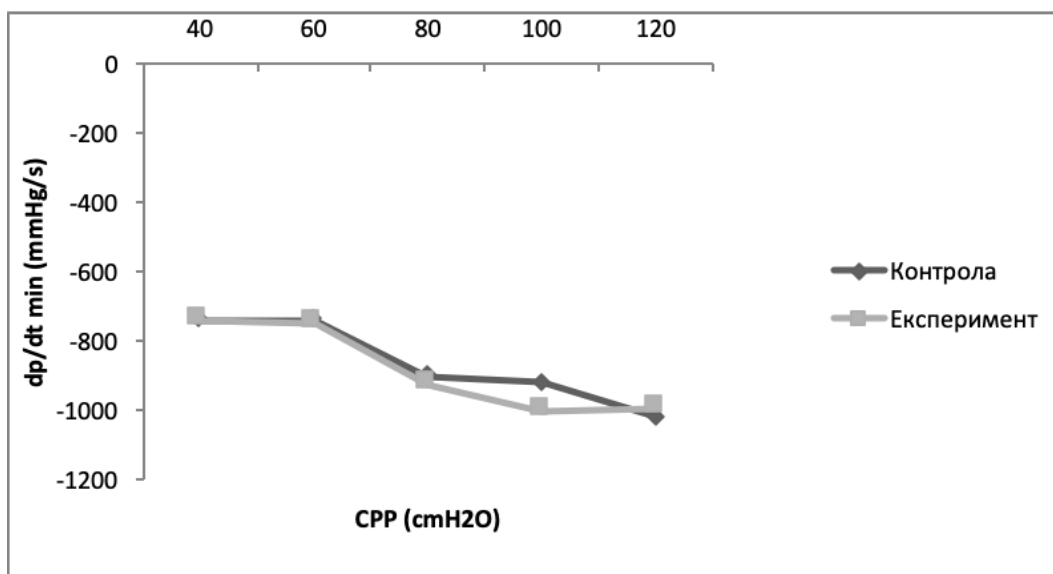


Табела 4а. Максимална стопа раста притиска у левој комори. Статистичка значајност утврђена је Mann-Whitney U тестом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 40 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 60 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 80 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 100 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 120 cmH ₂ O
p вредност	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05

Затим, у тиамин групи је утврђен статистички значајан пораст минималне стопе раста притиска у левој комори на притиску од 100 cmH₂O у експерименталном периоду у односу на контролни (Графикон 4б, Табела 4б).

Графикон 4а. Минимална стопа раста притиска у левој комори (dp/dt_{min}) у тиамин групи. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка.

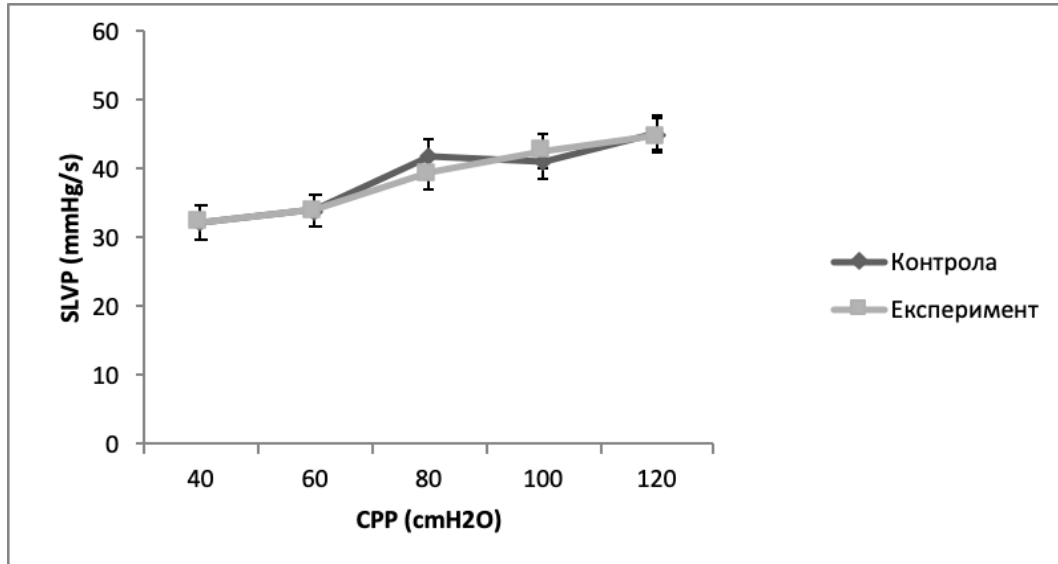


Табела 4б. Минимална стопа раста притиска у левој комори. Статистичка значајност утврђена је Mann-Whitney U тестом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 40 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 60 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 80 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 100 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 120 cmH ₂ O
p вредност	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05

Систолни притисак у левој комори није био статистички промењен у експерименталном периоду у односу на контролни период (Графикон 4в, Табела 4в).

Графикон 4в. Систолни притисак у левој комори (SLVP) у тиамин групи. Резултати су приказани као аритметичка средина \pm стандардна грешка.

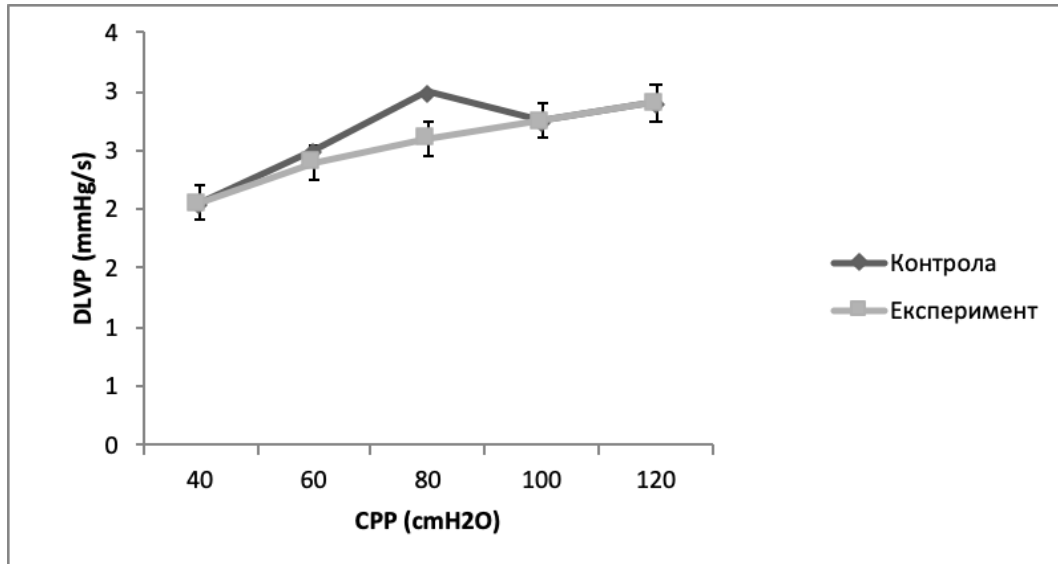


Табела 4в. Систолни притисак у левој комори. Статистичка значајност утврђена је Mann-Whitney U тестом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	Контрола <i>вс.</i> Експеримент 40 cmH ₂ O	Контрола <i>вс.</i> Експеримент 60 cmH ₂ O	Контрола <i>вс.</i> Експеримент 80 cmH ₂ O	Контрола <i>вс.</i> Експеримент 100 cmH ₂ O	Контрола <i>вс.</i> Експеримент 120 cmH ₂ O
<i>p</i> вредност	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05

Затим, у тиамин групи је утврђен статистички значајан пад дијастолног притиска у левој комори на притиску од 80 cmH₂O у експерименталном периоду у односу на контролни (Графикон 4г, Табела 4г).

Графикон 4г. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) у тиамин групи. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка.

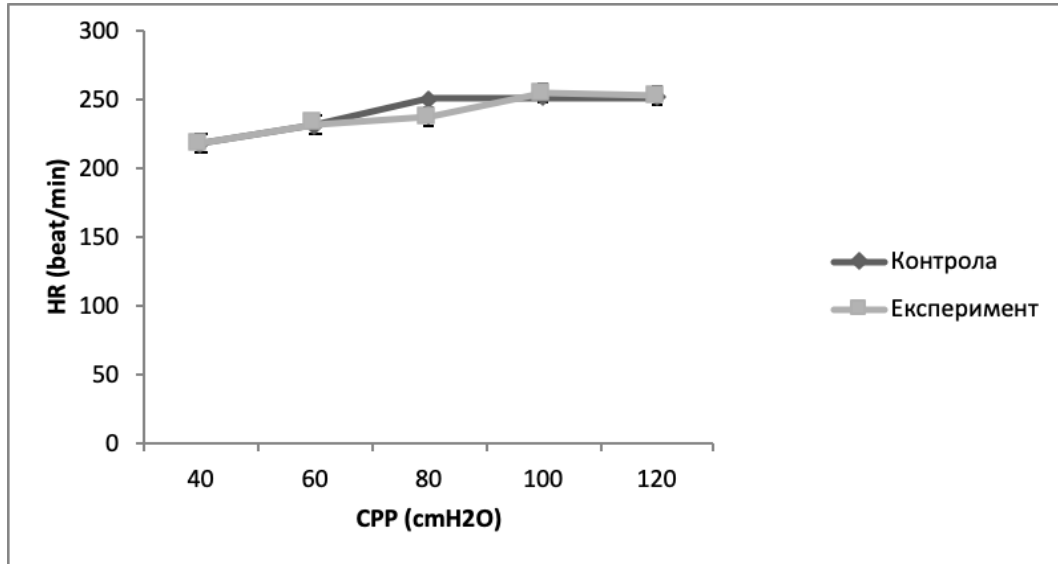


Табела 4г.. Дијастолни притисак у левој комори. Статистичка значајност утврђена је Mann-Whitney U тестом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 40 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 60 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 80 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 100 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 120 cmH ₂ O
<i>p</i> вредност	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> <0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05

Срчана фреквенца у левој комори није била статистички промењена у експерименталном периоду у односу на контролни период (Графикон 4д, Табела 4д).

Графикон 4д. Срчана фреквенца (HR) у тиамин групи. Резултати су приказани као аритметичка средина \pm стандардна грешка.

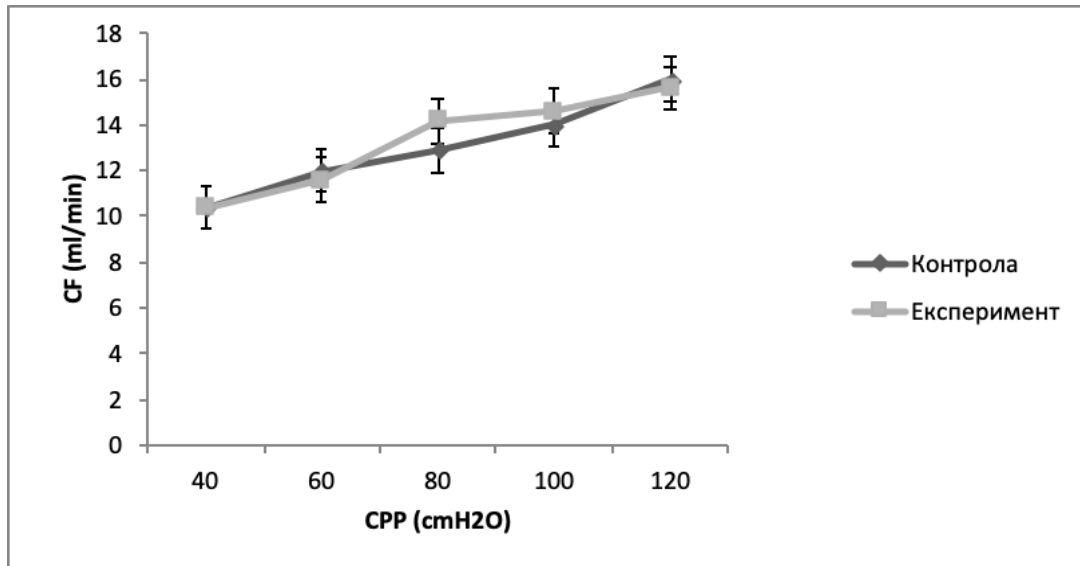


Табела 4д. Срчана фреквенца. Статистичка значајност утврђена је Mann-Whitney U тестом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 40 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 60 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 80 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 100 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 120 cmH ₂ O
<i>p</i> вредност	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$

Коронарни проток се статистички значајно разликовао у експерименталном периоду у односу на контролни период, односно приметан је пораст овог параметра на коронарном перфузионом притиску од 80 cmH₂O (Графикон 4ђ, Табела 4ђ).

Графикон 4ђ. Коронарни проток (CF) у тиамин групи. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка.



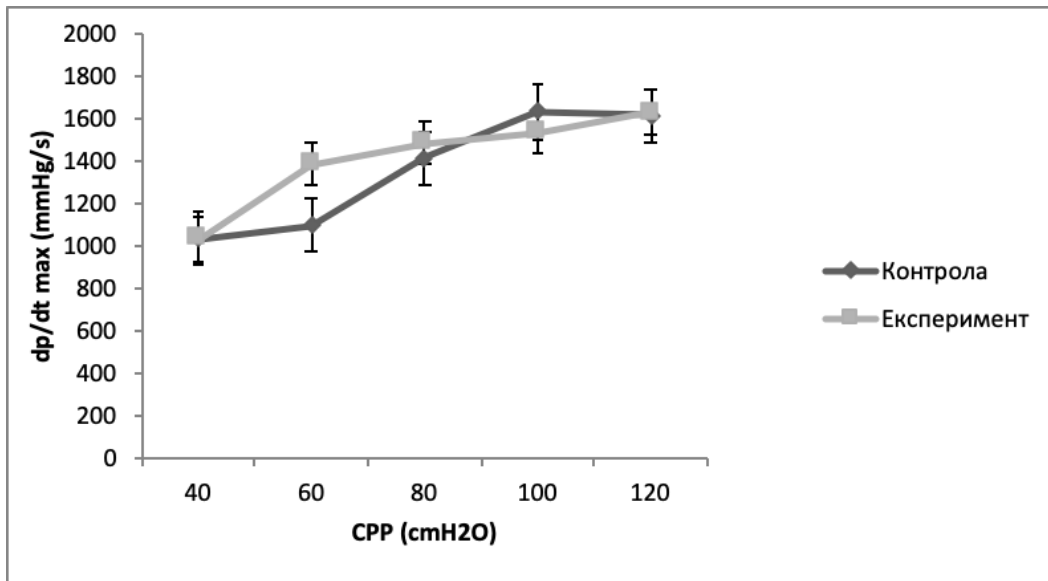
Табела 4г. Коронарни проток. Статистичка значајност утврђена је Mann-Whitney U тестом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 40 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 60 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 80 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 100 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 120 cmH ₂ O
<i>p</i> вредност	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> <0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05

4.2.4. Тиамин+доксорубицин група

У тиамин+доксорубицин групи је утврђен статистички значајан пораст максималне стопе раста притиска у левој комори на притиску од 60 cmH₂O у експерименталном периоду у односу на контролни (Графикон 5а, Табела 5а).

Графикон 5а. Максимална стопа раста притиска у левој комори (dp/dtmax) у тиамин+доксорубицин групи. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка.

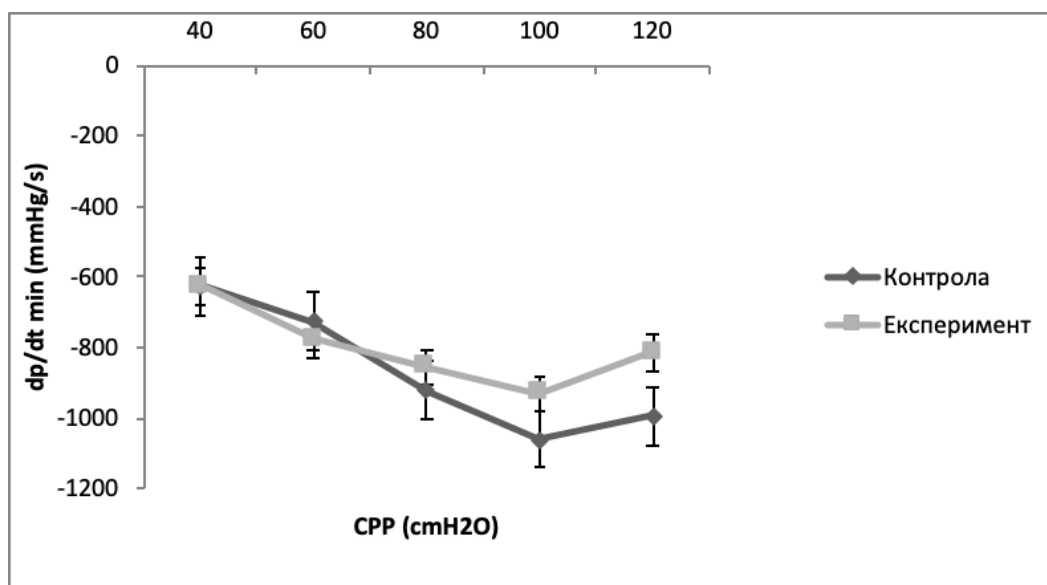


Табела 5а. Максимална стопа раста притиска у левој комори. Статистичка значајност утврђена је Mann-Whitney U тестом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	Контрола <i>вс.</i> Експеримент 40 cmH ₂ O	Контрола <i>вс.</i> Експеримент 60 cmH ₂ O	Контрола <i>вс.</i> Експеримент 80 cmH ₂ O	Контрола <i>вс.</i> Експеримент 100 cmH ₂ O	Контрола <i>вс.</i> Експеримент 120 cmH ₂ O
p вредност	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

У тиамин+доксорубин групи је утврђен статистички значајан пораст минималне стопе раста притиска у левој комори на притисцима од 80 до 120 cmH₂O у експерименталном периоду у односу на контролни (Графикон 5б, Табела 5б).

Графикон 5б. Минимална стопа раста притиска у левој комори (dp/dt_{min}) у тиамин+доксорубин групи. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка.

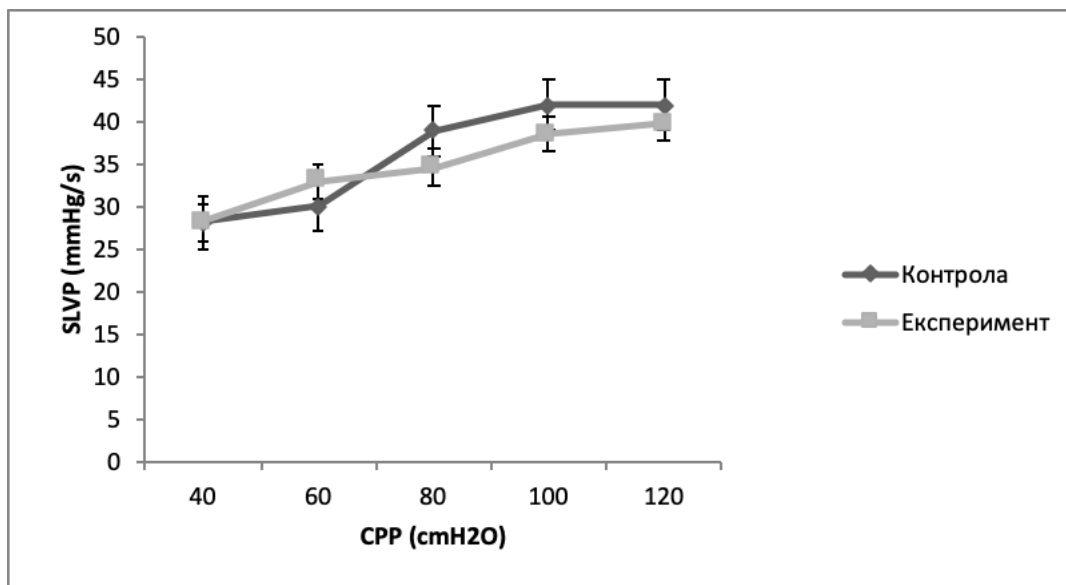


Табела 5б. Минимална стопа раста притиска у левој комори. Статистичка значајност утврђена је Mann-Whitney U тестом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 40 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 60 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 80 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 100 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 120 cmH ₂ O
p вредност	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05

Систолни притисак у левој комори у тиамин+доксорубицин групи је статистички био значајно сниже у експерименталном периоду на притисцима од 80 до 120 cmH₂O у односу на контролни (Графикон 5в, Табела 5в).

Графикон 5в. Систолни притисак у левој комори (SLVP) у тиамин+доксорубицин групи. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка.

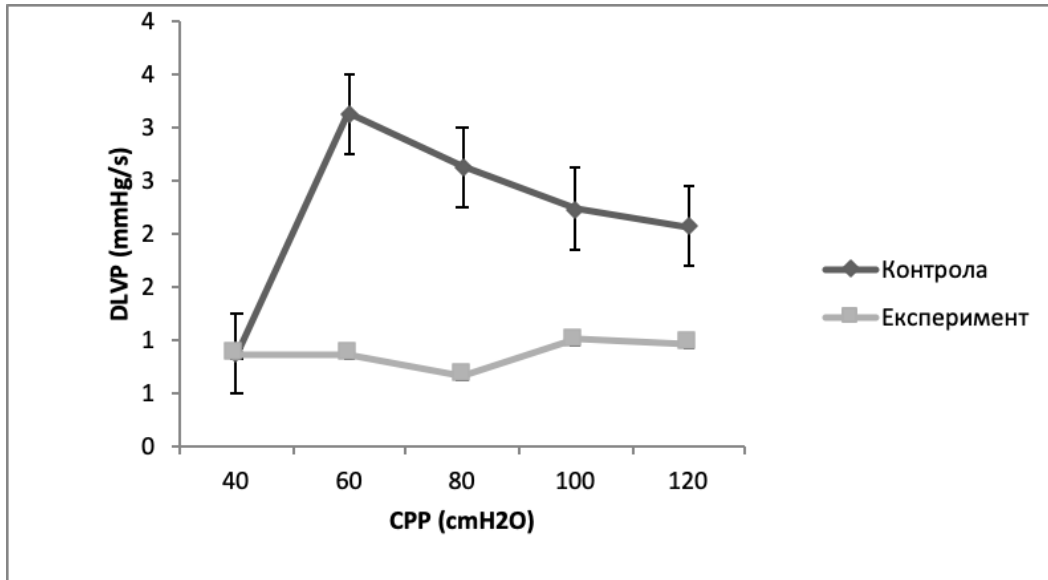


Табела 5в. Систолни притисак у левој комори. Статистичка значајност утврђена је Mann-Whitney U тестом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 40 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 60 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 80 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 100 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 120 cmH ₂ O
p вредност	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05

Дијастолни притисак у левој комори у тиамин+доксорубицин групи је статистички био значајно снижен у експерименталном периоду на свим притисцима (60 до 120 cmH₂O) у односу на контролни (Графикон 5г, Табела 5г).

Графикон 5г. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) у тиамин+доксорубицин групи. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка.

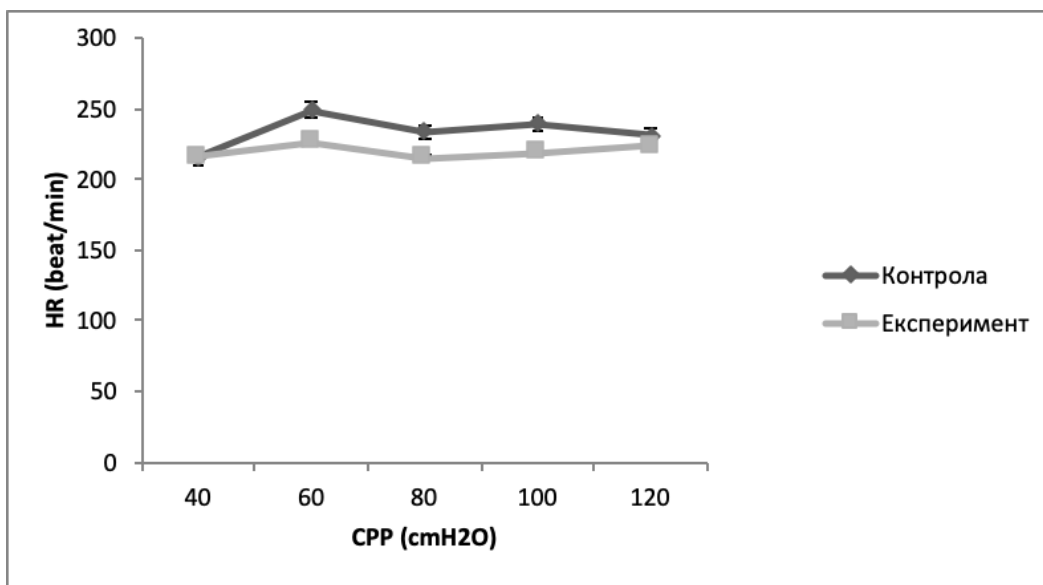


Табела 5г. Дијастолни притисак у левој комори. Статистичка значајност утврђена је Mann-Whitney U тестом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 40 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 60 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 80 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 100 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 120 cmH ₂ O
<i>p</i> вредност	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> <0,05	<i>p</i> <0,05	<i>p</i> <0,05	<i>p</i> <0,05

Срчана фреквенца у тиамин+доксорибуцин групи је статистички била значајно снижена у експерименталном периоду на скоро свим притисцима (60 до 100 cmH₂O) у односу на контролни (Графикон 5д, Табела 5д).

Графикон 5д. Срчана фреквенца (HR) у тиамин+доксорибуцин групи. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка.

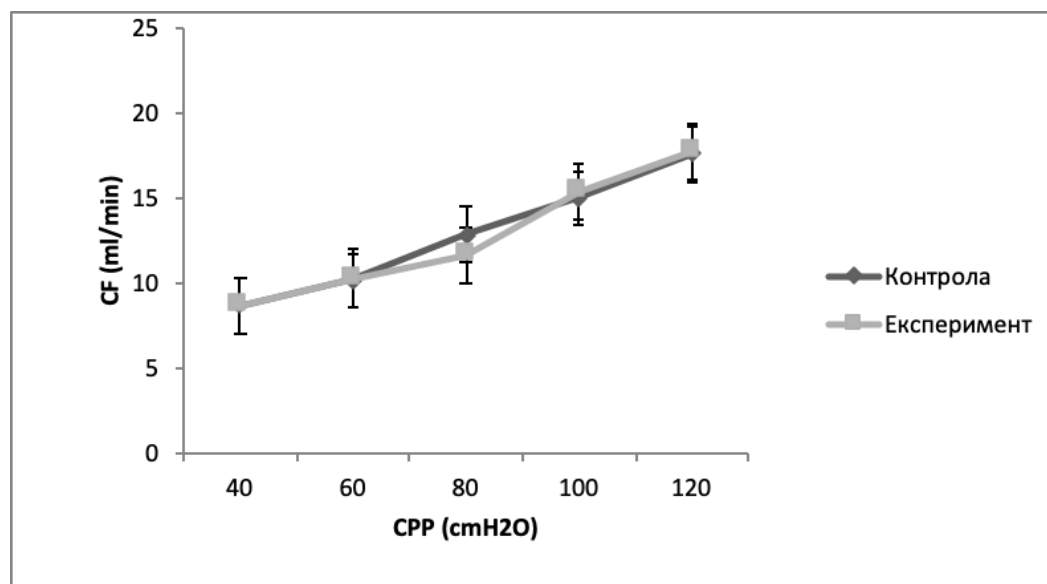


Табела 5д. Срчана фреквенца. Статистичка значајност утврђена је Mann-Whitney U тестом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 40 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 60 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 80 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 100 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 120 cmH ₂ O
p вредност	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p>0,05

Коронарни проток у тиамин+доксорубицин групи није био статистички значајно снижен у експерименталном периоду у односу на контролни (Графикон 5ђ, Табела 5ђ).

Графикон 5ђ. Коронарни проток (CF) у тиамин+доксорубицин групи. Резултати су приказани као аритметичка средина \pm стандардна грешка.



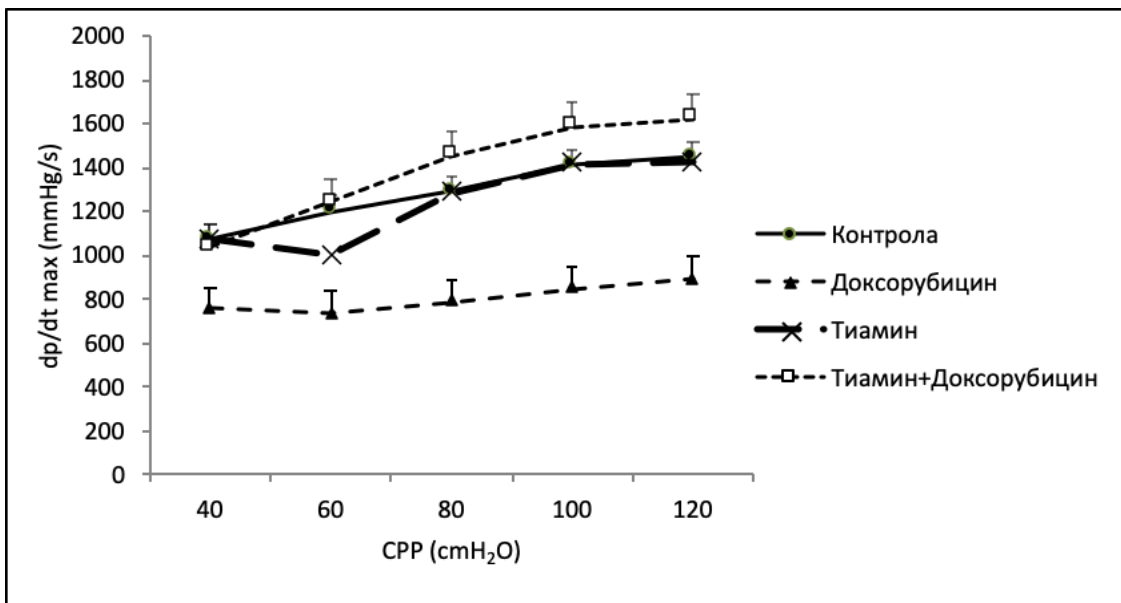
Табела 5ђ. Коронарни проток. Статистичка значајност утврђена је Mann-Whitney U тестом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 40 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 60 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 80 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 100 cmH ₂ O	Контрола <i>vs.</i> Експеримент 120 cmH ₂ O
<i>p</i> вредност	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05

4.2.5. Анализа динамике кардиодинамских параметара поређењем група

Максимална стопа раста притиска у левој комори, као један од параметара контрактилности изолованог срца пацова, је била статистички значајно снижена у доксорубицин групи у односу на друге групе на свим притисцима. У тиамин+доксорубицин групи дошло је до повећања контрактилне способности срца на скоро контролне вредности (Графикон ба, Табела ба).

Графикон ба. Максимална стопа раста притиска у левој комори (dp/dtmax) у свим групама. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка.

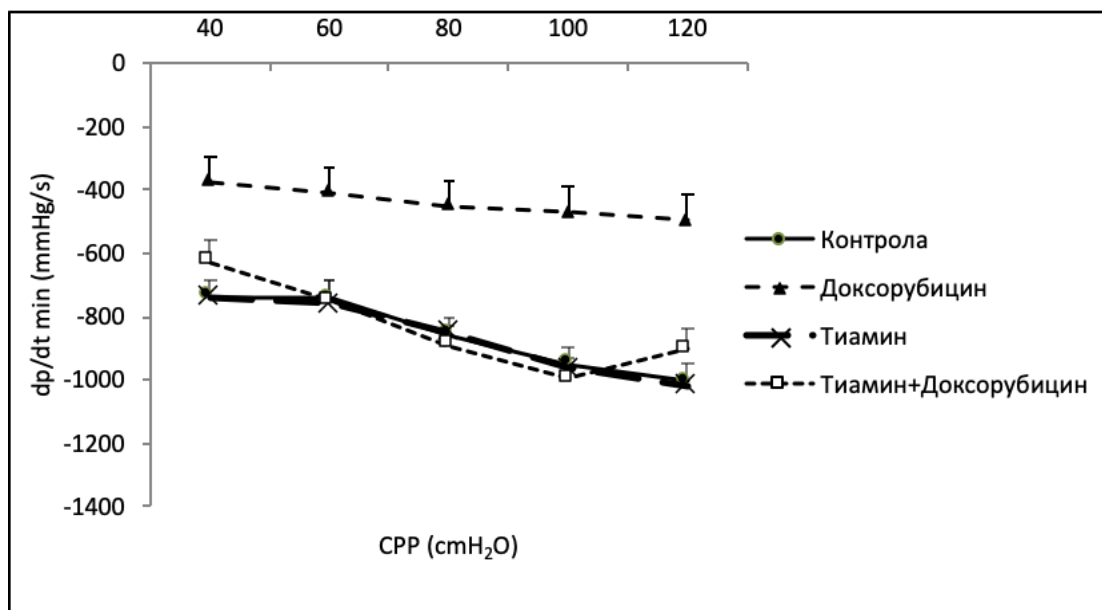


Табела ба. Максимална стопа раста притиска у левој комори (dp/dtmax). Статистичка значајност утврђена је ANOVA анализом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
Контрола vs. Доксорубицин	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Контрола vs. Тиамин	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Контрола vs. Тиамин+Доксорубицин	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Доксорубицин vs. Тиамин	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Доксорубицин vs. Тиамин+Доксорубицин	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Тиамин vs. Тиамин+Доксорубицин	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

У погледу промене динамике минималне стопе раста притиска у левој комори, приметна је статистички значајна разлика (пад) овог параметра у групи која третирана доксорубицином у односу на друге групе. Групе третиране тиамином, комбинацијом тиаминa и доксорубицина и нетретирана, су имале сличне вредности dp/dt_{min} -а те се нису статистички међусобно разликовале (Графикон бб, Табела бб).

Графикон бб. Минимална стопа раста притиска у левој комори (dp/dt_{min}) у свим групама. Резултати су приказани као аритметичка средина \pm стандардна грешка.

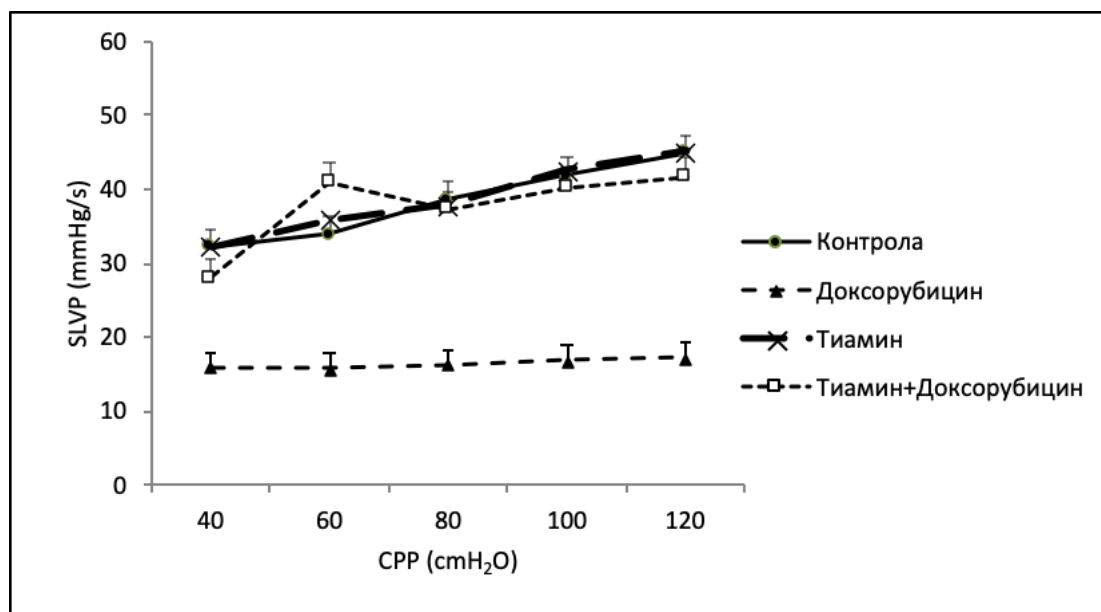


Табела бб. Минимална стопа раста притиска у левој комори (dp/dt_{min}). Статистичка значајност утврђена је ANOVA анализом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
Контрола vs. Доксорубицин	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Контрола vs. Тиамин	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Контрола vs. Тиамин+Доксорубицин	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Доксорубицин vs. Тиамин	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Доксорубицин vs. Тиамин+Доксорубицин	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Тиамин vs. Тиамин+Доксорубицин	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

Слично претходним параметрима контрактилне функције срца, и систолни притисак је био статистички значајно снижен у доксорубицин групи. Тиамин самостално или у комбинацији са доксорубицином је деловао, па тако је у контролним условима сачувао контрактилну функцију а у коадминистрацији са доксорубицином је повећао контрактилност миокарда изолованог срца пацова (Графикон бв, Табела бв).

Графикон бв. Систолни притисак у левој комори (SLVP) у свим групама. Резултати су приказани као аритметичка средина \pm стандардна грешка.

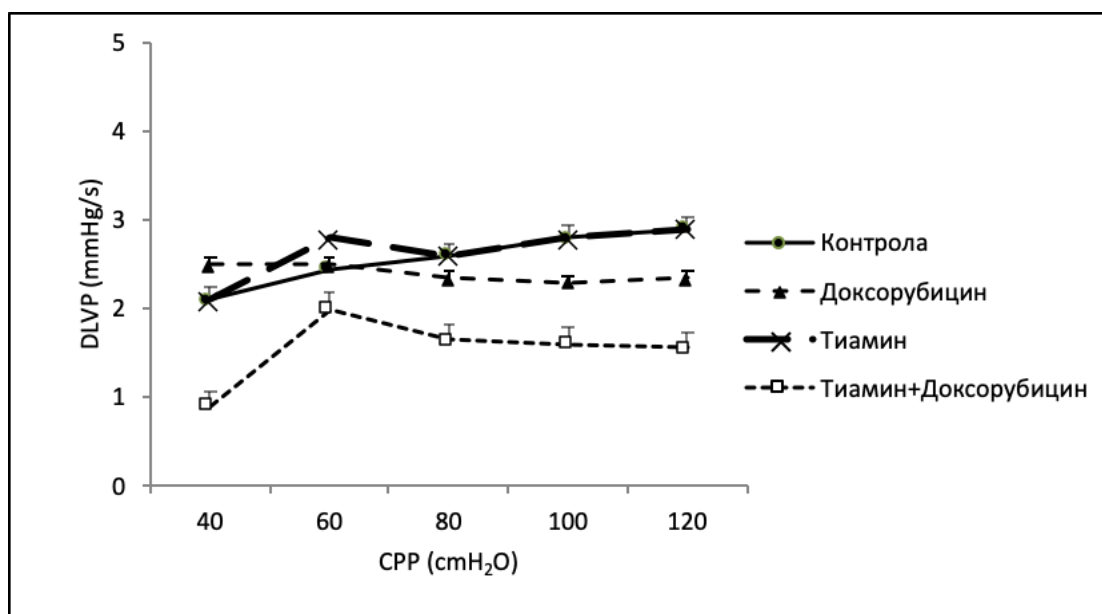


Табела бв. Систолни притисак у левој комори (SLVP). Статистичка значајност утврђена је ANOVA анализом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
Контрола vs. Доксорубицин	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Контрола vs. Тиамин	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Контрола vs. Тиамин+Доксорубицин	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Доксорубицин vs. Тиамин	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Доксорубицин vs. Тиамин+Доксорубицин	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Тиамин vs. Тиамин+Доксорубицин	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

Затим, пад дијастолног притиска у левој комори примећен је у тиамин+доксорубицин групи на свим притисцима у односу на друге групе. Вредности овог маркера су биле значајно другачије у доксорубицин групи, и то снижене у односу на контролну и тиамин групу и повишене у односу на тиамин+доксорубицин на притисцима од 80 до 120 cmH₂O (Графикон 6г, Табела 6г).

Графикон 6г. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) у свим групама. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка.

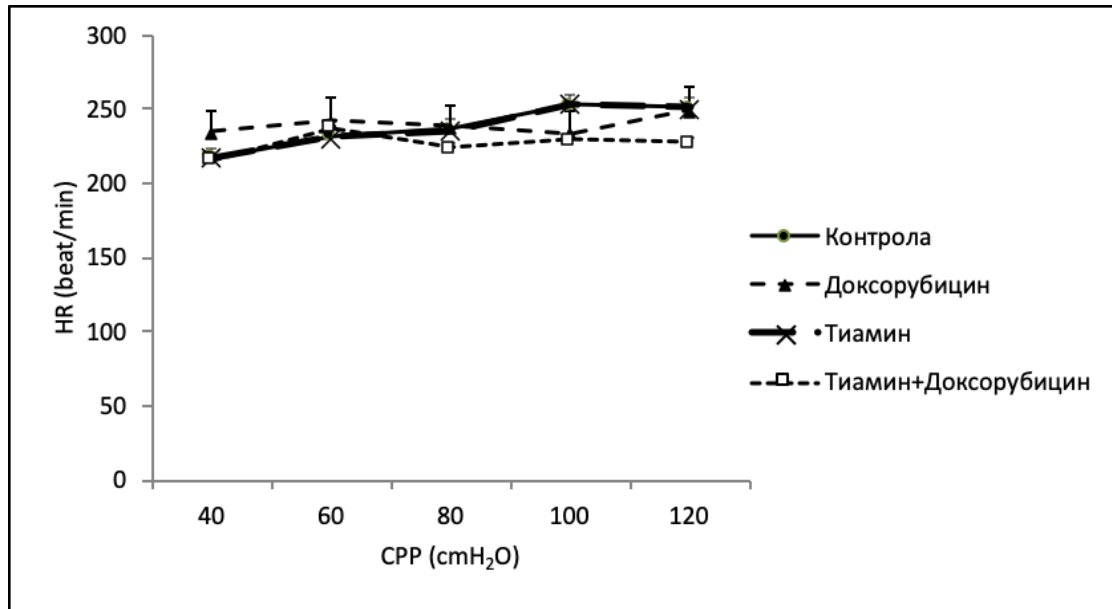


Табела 6г. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP). Статистичка значајност утврђена је ANOVA анализом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
Контрола vs. Доксорубицин	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Контрола vs. Тиамин	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Контрола vs. Тиамин+Доксорубицин	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Доксорубицин vs. Тиамин	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Доксорубицин vs. Тиамин+Доксорубицин	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Тиамин vs. Тиамин+Доксорубицин	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05

Поређењем средњих вредности срчане фреквенце у свим групама, статистички је утврђена значајна разлика у овом параметру и то на притиску од 100 cmH₂O, са доминантно нижим вредностима фреквенце срца у доксорубицин и тиамин+доксорубицин групама (Графикон бд, Табела бд).

Графикон бд. Срчана фреквенца (HR) у свим групама. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка.

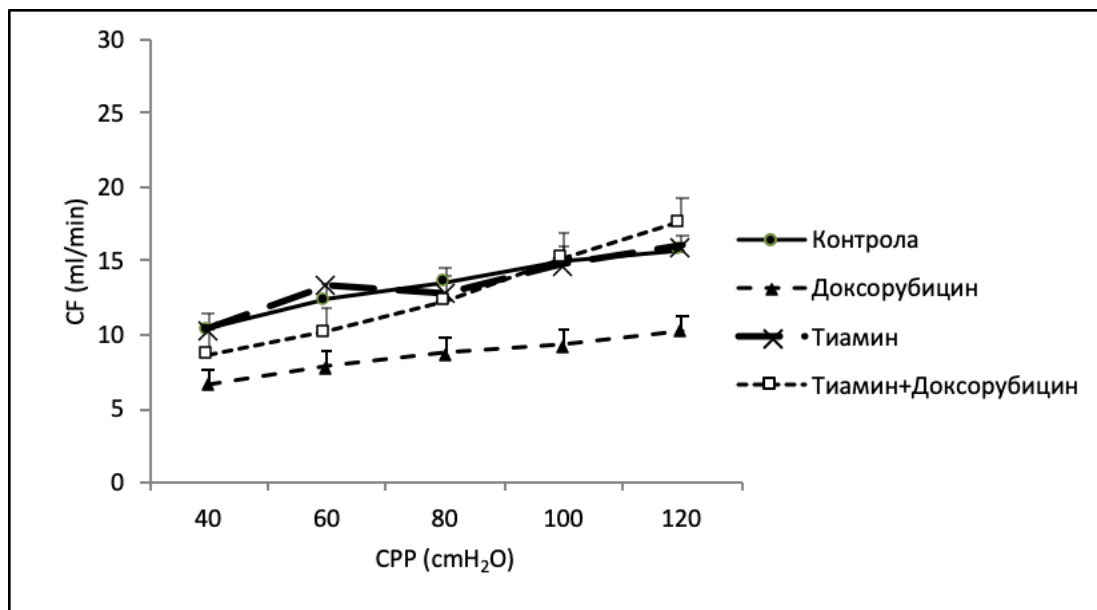


Табела бд. Срчана фреквенца (HR). Статистичка значајност утврђена је ANOVA анализом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
Контрола vs. Доксорубицин	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05
Контрола vs. Тиамин	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Контрола vs. Тиамин+Доксорубицин	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05
Доксорубицин vs. Тиамин	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05
Доксорубицин vs. Тиамин+Доксорубицин	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Тиамин vs. Тиамин+Доксорубицин	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05

Коронарни проток се статистички значајно разликовао у доксорубицин групи, односно значајно је нижи у односу на остале групе на свим притисцима (40-120 cmH₂O). Поред тога, снижење овог параметра коронарне циркулације је примећено и у тиамин+доксорубицин групи али на нижим притисцима (40-120 cmH₂O). (Графикон бђ, Табела бђ).

Графикон бђ. Коронарни проток (CF) у свим групама. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна грешка.



Табела бг. Коронарни проток (CF). Статистичка значајност утврђена је ANOVA анализом, уз статистички праг од 0,05.

Поређење	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
Контрола vs. Доксорубицин	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Контрола vs. Тиамин	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Контрола vs. Тиамин+Доксорубицин	p<0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Доксорубицин vs. Тиамин	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Доксорубицин vs. Тиамин+Доксорубицин	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Тиамин vs. Тиамин+Доксорубицин	p<0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

4.3. АНАЛИЗА ХЕМОДИНАМСКИХ ПРОМЕНА

Пре и после експерименталног периода односно пре и после седмодневног третмана тиамином, праћене су хемодинамске промене *in vivo* у свим групама. У доксорубицин групи дошло је до значајног смањења ејекционе фракције, са 50,9 на 38,2% (Табела 7а), као и у тиамин+доксорубицин групи, са 51% на 46,7%. Дакле третман доксорубицином је значајно утицао на смањење ејекционе фракције, а третман тиамин је довео до благог повећања у групи која је третирана доксорубицином, док у контролним групама није утицао на промену ејекционе фракције (Табела 7а).

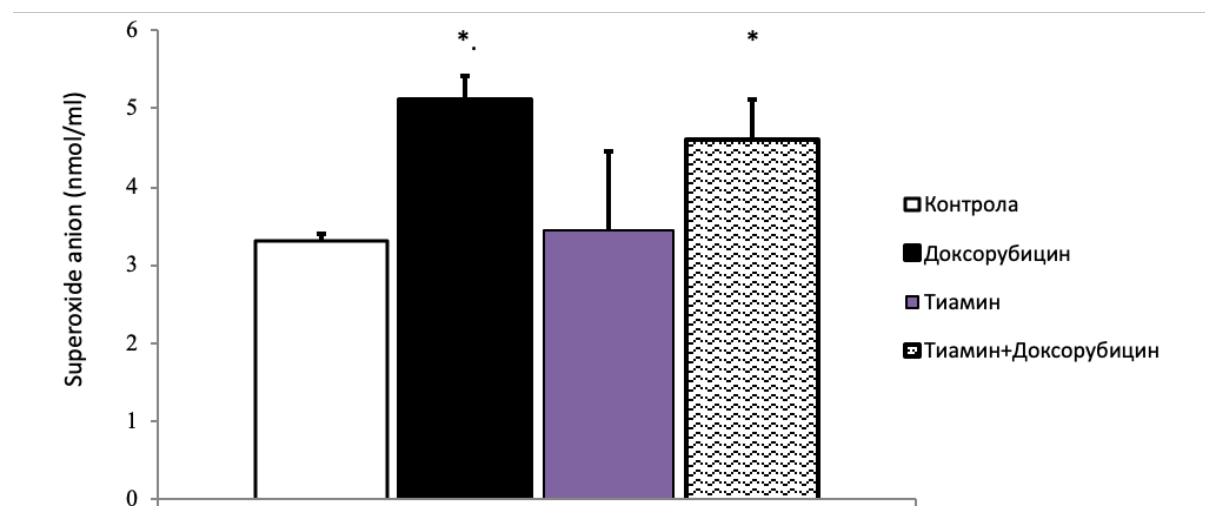
Табела 7а. Ехокардиографски параметри функције леве коморе срца пацова пре и после третмана у свим групама. Резултати су приказани као средња вредност \pm средња стандардна грешка. Статистичка значајност утврђена је RM-ANOVA (енг. *Repeat Measured ANOVA*). Статистички праг од 0,05.

Групе Параметри	Пре третмана/На почетку експерименталног периода			
	Контрола	Доксорубицин	Тиамин	Тиамин+Доксорубицин
Ivsd (cm)	0.136	0.153	0.133	0.136
LviDd (cm)	0.390	0.475	0.390	0.423
LVPWd (cm)	0.157	0.162	0.151	0.157
IVSs (cm)	0.123	0.165	0.123	0.122
LVIDs (cm)	0.225	0.233	0.233	0.225
LVPWs (cm)	0.148	0.178	0.148	0.147
FS (%)	49.5	50.9	49.0	51.0
-	После третмана/На крају експерименталног периода			
Ivsd (cm)	0.199	0.174	0.174	0.191
LviDd (cm)	0.403	0.466	0.564	0.318
LVPWd (cm)	0.292	0.246	0.237	0.254
IVSs (cm)	0.191	0.186	0.199	0.169
LVIDs (cm)	0.182	0.288	0.275	0.159
LVPWs (cm)	0.258	0.258	0.220	0.135
FS (%)	54.7	38.2	51.1	46.7
	p=0.061	p=0.003	p=0.238	p=0.008

4.4. УТИЦАЈ ПРИМЕНЕ ТИАМИНА НА МАРКЕРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА

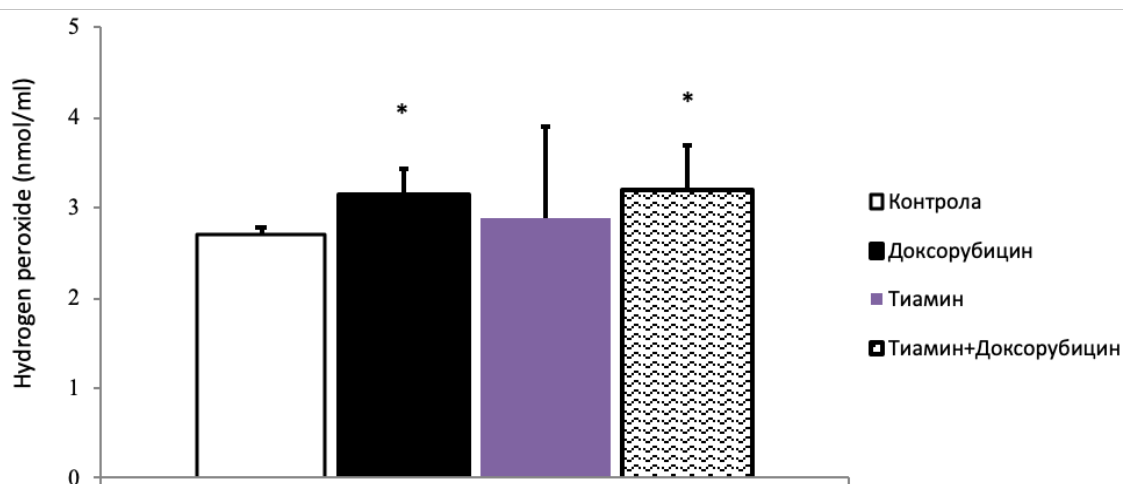
На крају експерименталног периода, из узорака крви одређиван је редокс статус у свим групама. Концентрација супероксид анјон радикала је била статистички значајно повишена у групама које су третиране доксорубицином (Доксорубицин и Тиамин+Доксорубицин група) у поређењу са осталим групама. Примена тиамин је довела благог пада супероксид анјон радикала у тиамин+доксорубицин групи у поређењу са доксорубицин групом (Графикон 7а).

Графикон 7а. Супероксид анјон радикал (O_2^-) у узорку плазме пацова. Резултати су приказани као аритметичка средина \pm стандардна грешка. Статистички значајна разлика између група утврђена је ANOVA анализом уз статистички праг од 0,05.



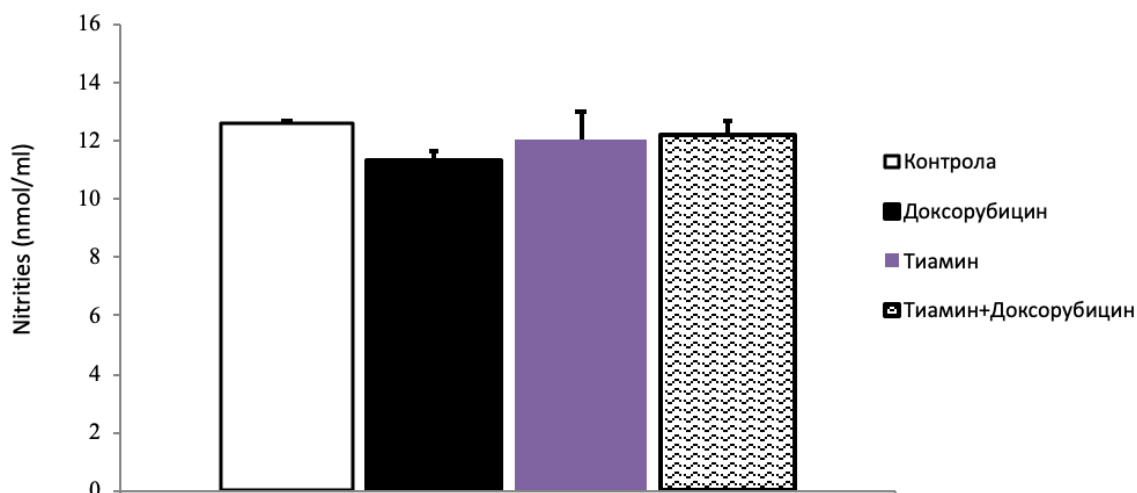
Слично као и код концентрације супероксид анјон радикала, и концентрације водоник пероксида мерених у плазми су биле значајно повишене у доксорубицин групама, а снижене након примене тиамин у односу на групу која је третирана и доксорубицином и тиамин (Графикон 7б).

Графикон 7б. Водоник пероксид (H_2O_2) у узорку плазме пацова. Резултати су приказани као аритметичка средина \pm стандардна грешка. Статистички значајна разлика између група утврђена је ANOVA анализом уз статистички праг од 0,05.



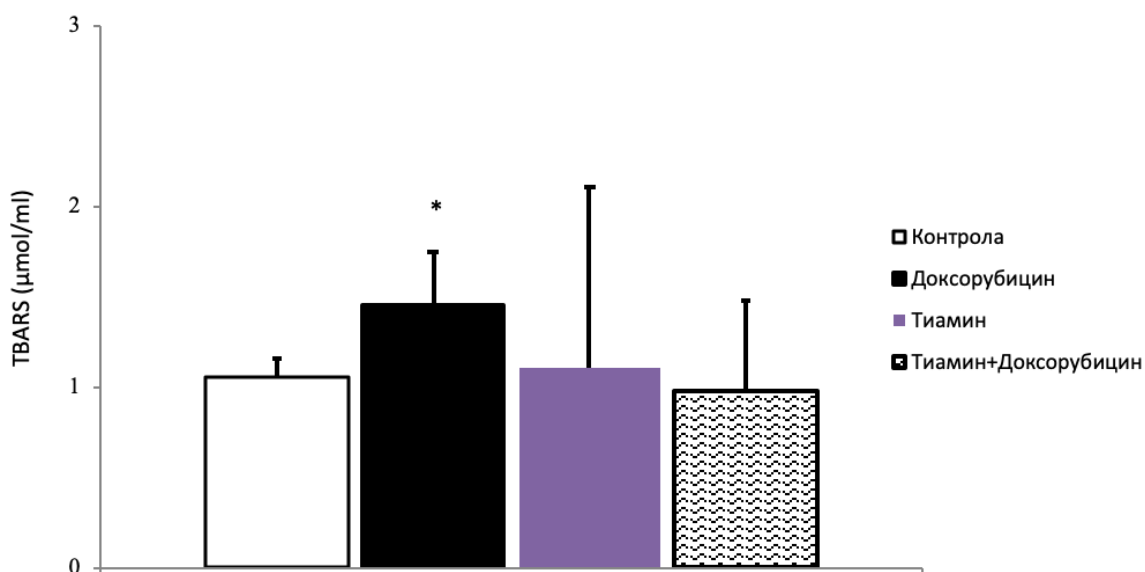
Са друге стране, концентрација азот монооксида се није значајно разликовала ни у једној групи у односу на контролне услове (Графикон 7в).

Графикон 7в. Азот моноксид (NO) у форми нитрита (NO_2) у узорку плазме пацова. Резултати су приказани као аритметичка средина \pm стандардна грешка. Статистички значајна разлика између група утврђена је ANOVA анализом уз статистички праг од 0,05.



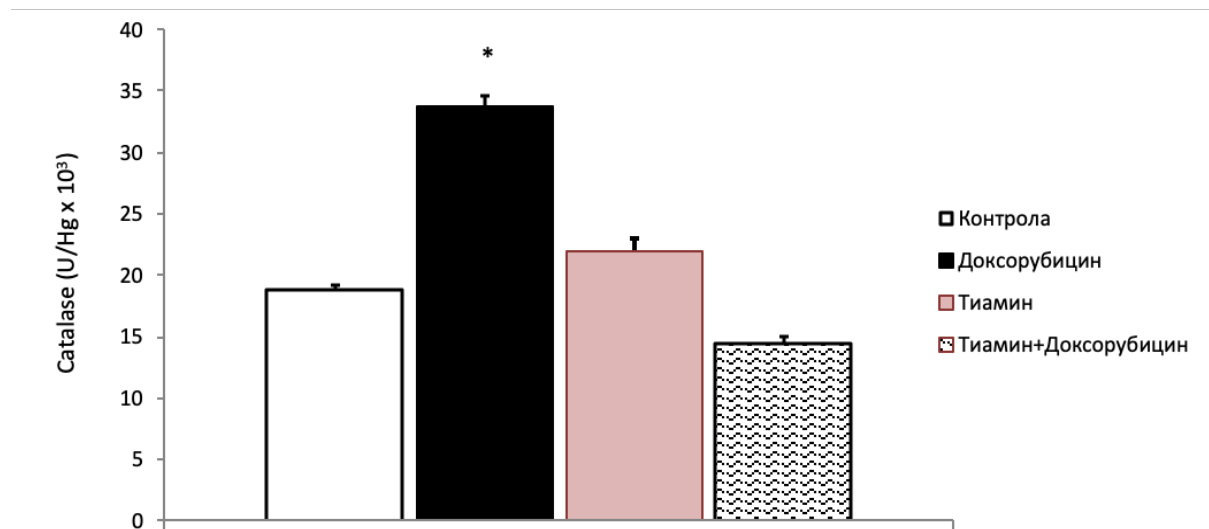
Индекс липидне пероксидације, мерен у форми тиобарбитуратне киселине је био значајно повишен у доксорубицин групи у односу на остале групе. У комбинацији са доксорубицином, тиамин је благо снизио вредности овог маркера оксидационог стреса али статистички незначајно (Графикон 7г).

Графикон 7г. Индекс липидне пероксидације у форми TBARS-а (TBARS) у узорку плазме пацова. Резултати су приказани као аритметичка средина \pm стандардна грешка. Статистички значајна разлика између група утврђена је ANOVA анализом уз статистички праг од 0,05.



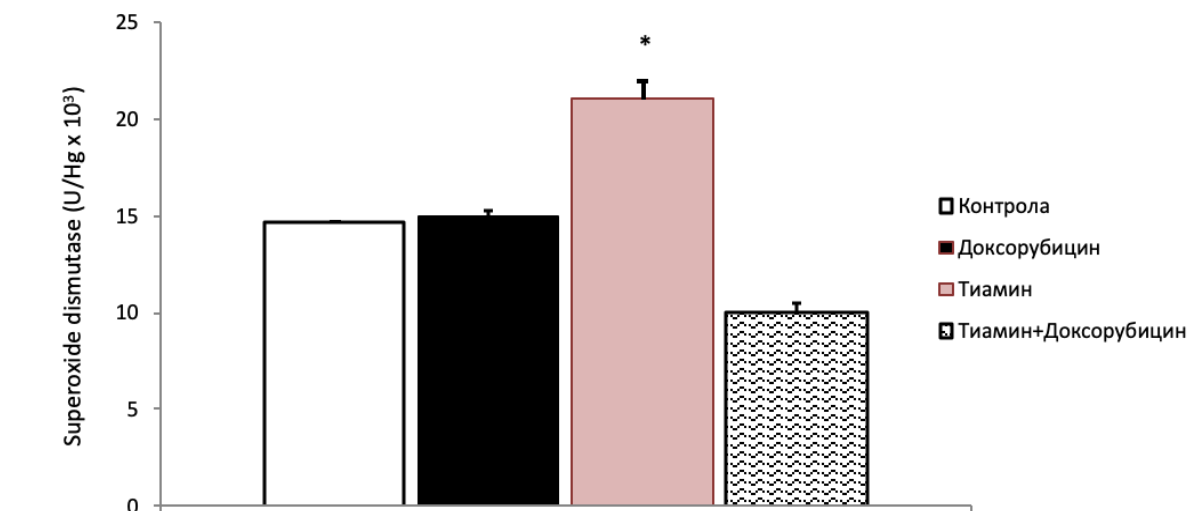
Парадоксално, вредности каталазе су биле статистички повишене у доксорубицин групи у односу на остале групе. Са друге стране, очекивано, тиамин је деловао антиоксидационо па је забезен пораст активности каталазе у групама које су третиране тиамином у односу на оне које то нису (Графикон 7д).

Графикон 7д. Активност каталазе (CAT) у узорку крви пацова. Резултати су приказани као аритметичка средина \pm стандардна грешка. Статистички значајна разлика између група утврђена је ANOVA анализом уз статистички праг од 0,05.



Са друге стране, активност супероксид дисмутазе је била значајно повишена у групи која је третирана тиамином, док је након примене доксорубицина овај ензим значајно снижене активности био. Доминантно високе вредности супероксид дисмутазе су забележене у тиамин групи (Графикон 7ђ).

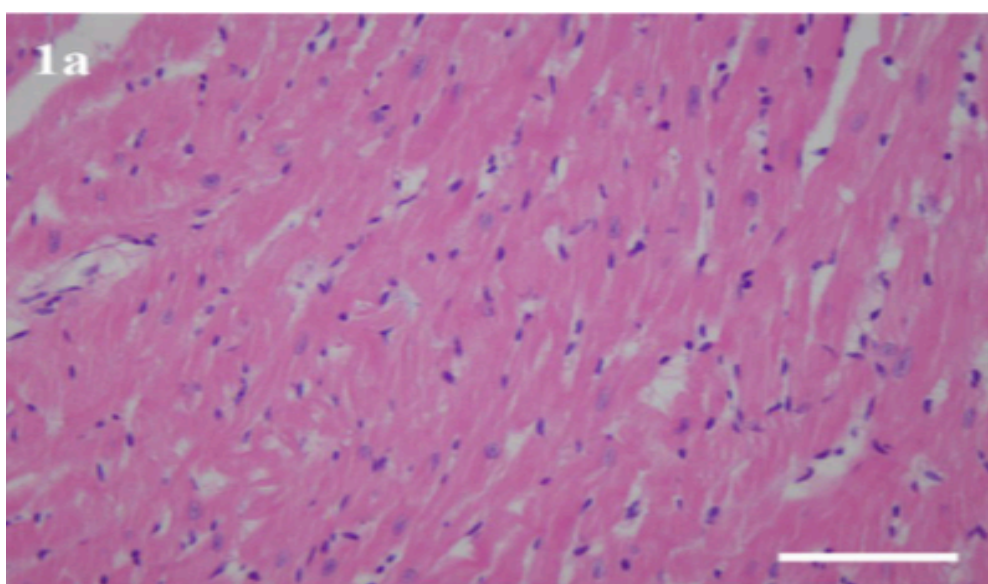
Графикон 7ђ. Активност супероксид дисмутазе (SOD) у узорку крви пацова. Резултати су приказани као аритметичка средина \pm стандардна грешка. Статистички значајна разлика између група утврђена је ANOVA анализом уз статистички праг од 0,05.



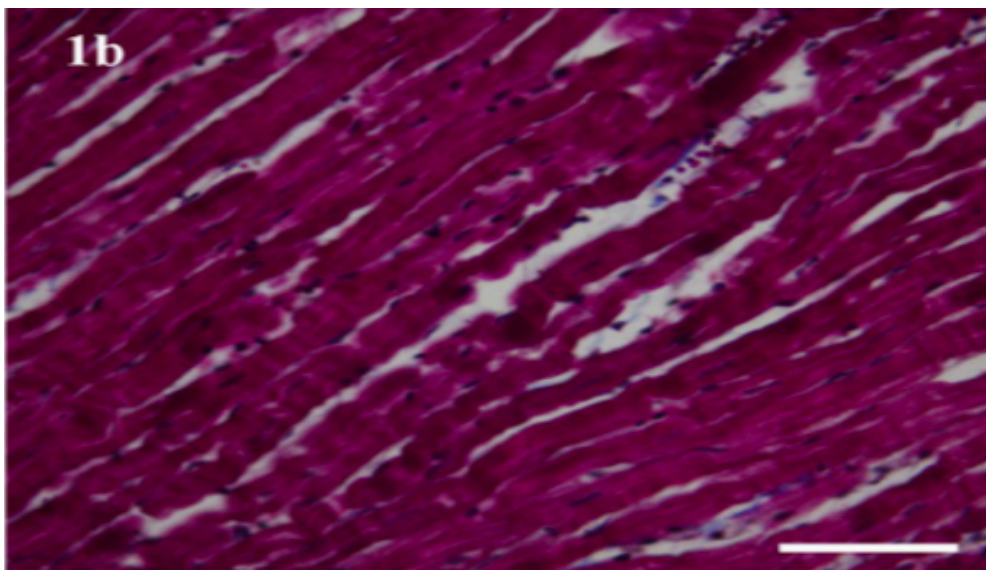
4.5. ПАТОХИСТОЛОШКА АНАЛИЗА ТКИВА ЛЕВЕ КОМОРЕ СРЦА ПАЦОВА

Патохистолошка анализа ткива леве коморе срца пацова је подразумевала посматрање морфометрије ткива срчаног мишића применом различитих техника бојења. На сликама 1а и 1б приказана је морфометрија ткива срца нетретираних пацова, тј. приметан је нормалан и регуларан распоред мишићних влакана, без присуства интерстицијалних промена и инфламације. На слици 2б приметан је регуларан распоред и присуство нормалне количине фиброзних влакана.

Слика 1а. Контролна група (n=6). Репрезентативни исечак ткива леве коморе срца пацова. Хематоксилин-Еозин бојење. Увећање 400х; Скала 200 μm .

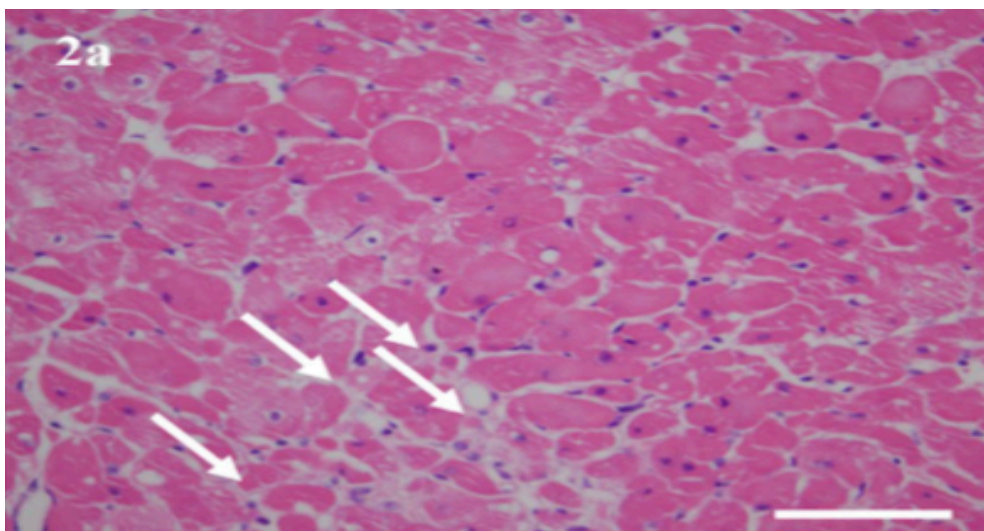


Слика 1б. Контролна група (n=6). Репрезентативни исечак ткива леве коморе срца пацова. Масон-Трихром бојење. Увећање 400х; Скала 200 μm .

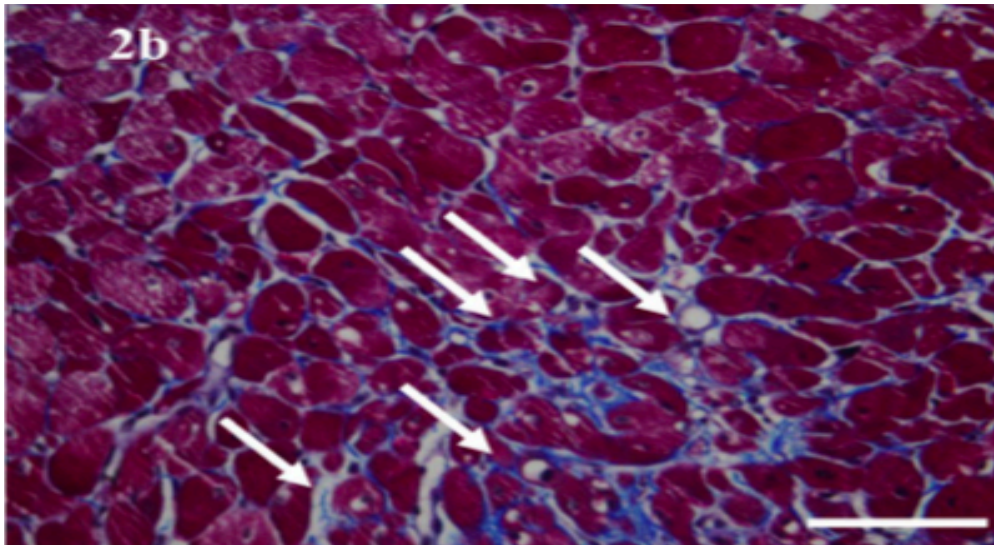


На сликама 2а и 2б приказана је морфометрија ткива срца пацова третираних високом кумулативном дозом доксорубицина. Патохистолошким бојењима, утврђен је абнормалан и ирегуларан распоред мишићних влакана, са знацима присуства интерстицијалних промена и инфламације. Периваскуларне инфламаторне промене су такође примећене. На слици 2б приметан је ирегуларан распоред и присуство велике количине фиброзних влакана, доминантно присутних око крвних судова. Такође, знаци вакуолизације су доминантно изражени у овој групи.

Слика 2а. Доксорубицин група (n=6). Репрезентативни исечак ткива леве коморе срца пацова. Хематоксилин-Еозин бојење. Увећање 400x; Скала 200 μm .

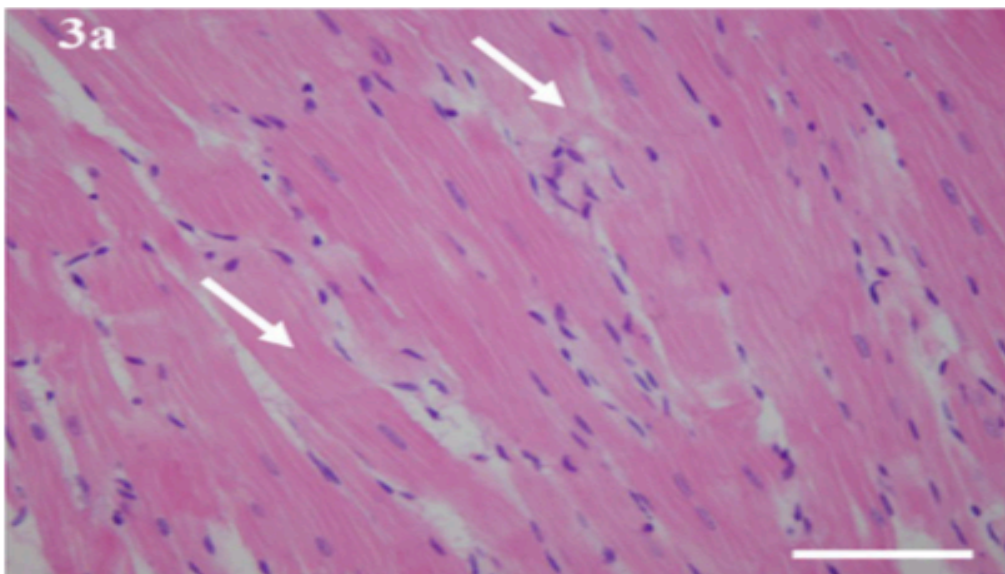


Слика 2б. Доксорубицин група (n=6). Репрезентативни исечак ткива леве коморе срца пацова. Масон-Трихром бојење. Увећање 400x; Скала 200 μm .

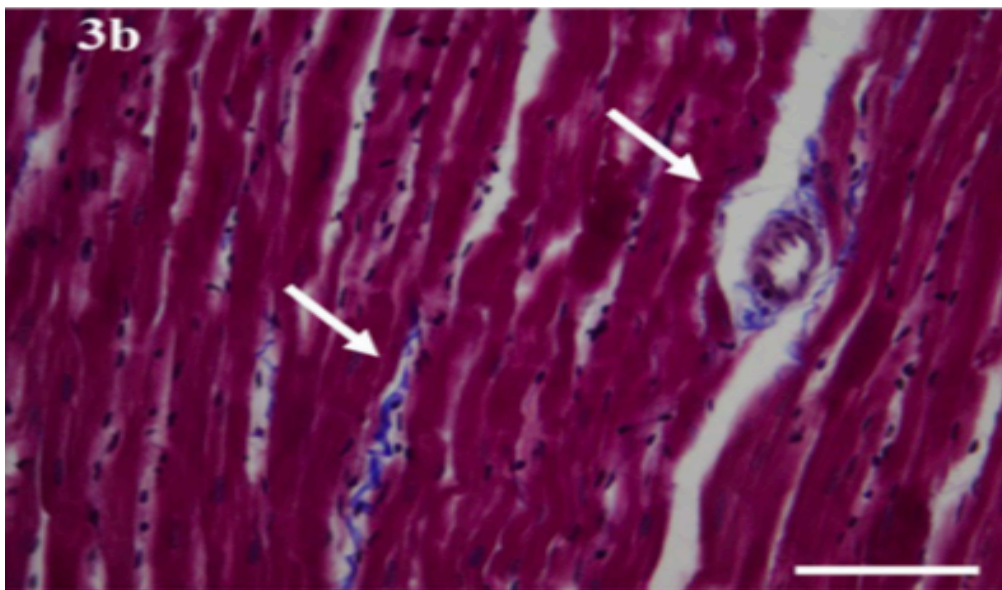


На сликама 3а и 3б приказана је морфометрија ткива срца пацова третираних високом кумулативном дозом доксорубицина и тиамином у виду субакутне примене у трајању од 7 дана пре примене доксорубицина. Патолошко-истолошким бојењима, утврђен је абнормалан и ирегуларан распоред мишићних влакана, са знацима присуства благо изражених интерстицијалних промена и вакуолизације. Периваскуларне инфламаторне промене су такође примећене али у мањој мери него у доксорубицин групи. Поред тога, на слици 3б могу се видети знаци заступљених фиброзових промена и периваскуларне инфламације око већих крвних судова. Примењена вакуолизација је мање присутна у односу на доксорубицин групу.

Слика 3а. Тиамин+Доксорубицин група (n=6). Репрезентативни исечак ткива леве коморе срца пацова. Хематоксилин-Еозин бојење. Увећање 400x; Скала 200 μ m.



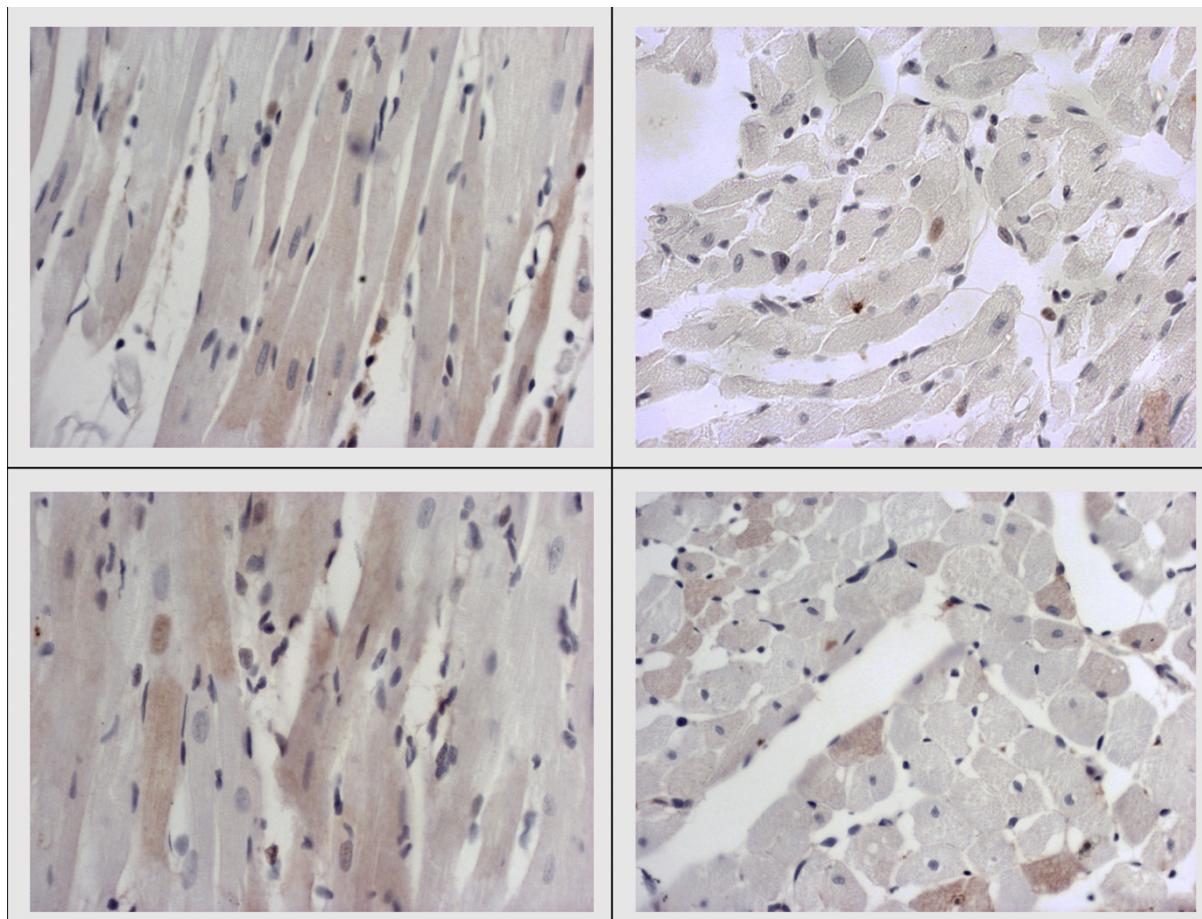
Слика 3б. Тиамин+Доксорубицин (n=6). Репрезентативни исечак ткива леве коморе срца пацова. Масон-Трихром бојење. Увећање 400x; Скала 200 μ m.



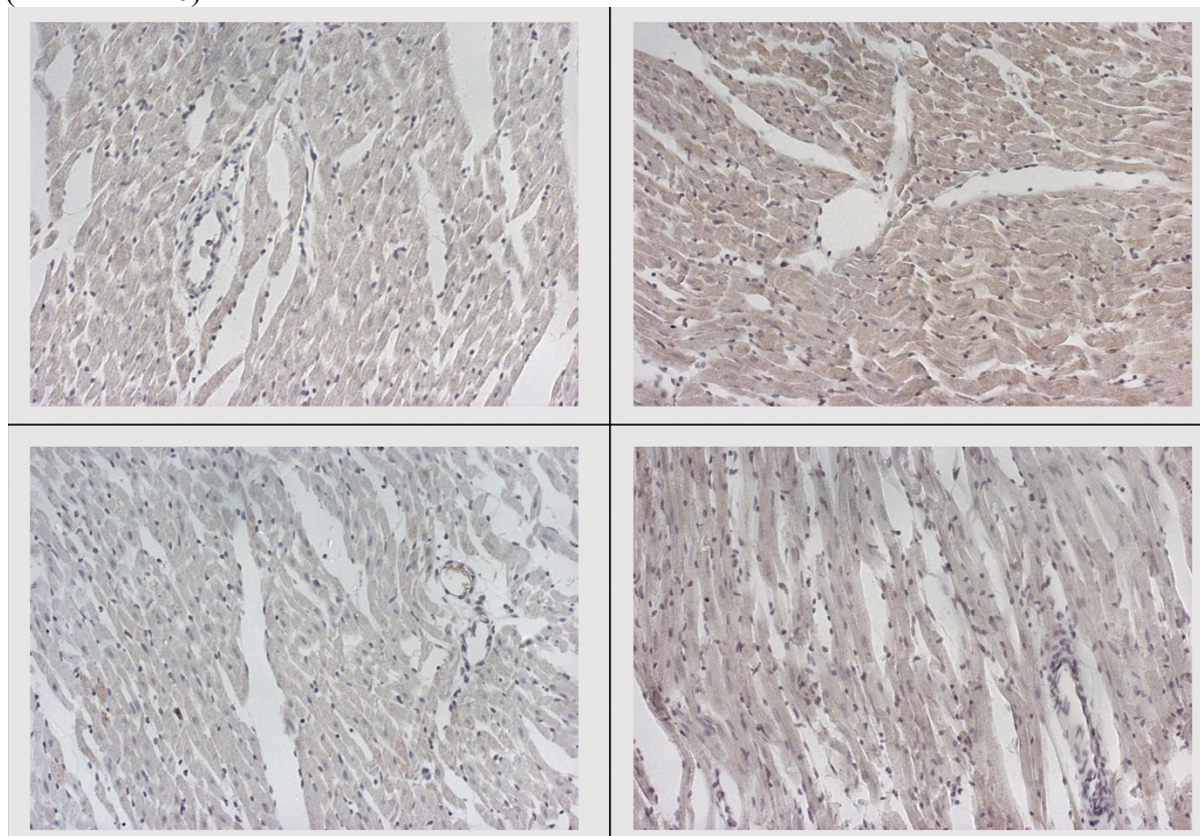
4.6. Имунохистохемијско мерење активности маркера апоптозе

Мерењем активности антиапоптоских и апоптотских маркера (Бах, Bcl-1, каспаза-3) у узорку ткива леве коморе срца пацова у свим групама (Контролна, Тиамин, Доксорубицин, Доксорубицин+Тиамин група) приметили смо интересантне резултате. Апоптотска активност је мерена експресијом проапоптотских (Бах и каспаза-3) и антиапоптотских маркера (Bcl2). Експресија бах (Слика 4б) и каспазе-3 (Слика 4ц) је највећа у ДОКС експерименталној групи, значајно је мања у ДОКС+Т групи, док је врло дискретна у контролним групама (К и Т). Насупрот томе, Bcl-2 се највише експримира у К и Т групи (Слика 4а), експресија је нешто дискретнија у ДОКС + Т групи, док је оскудна, уницелуларна и слабог интензитета у експерименталној групи пацова третираној само доксорубицином.

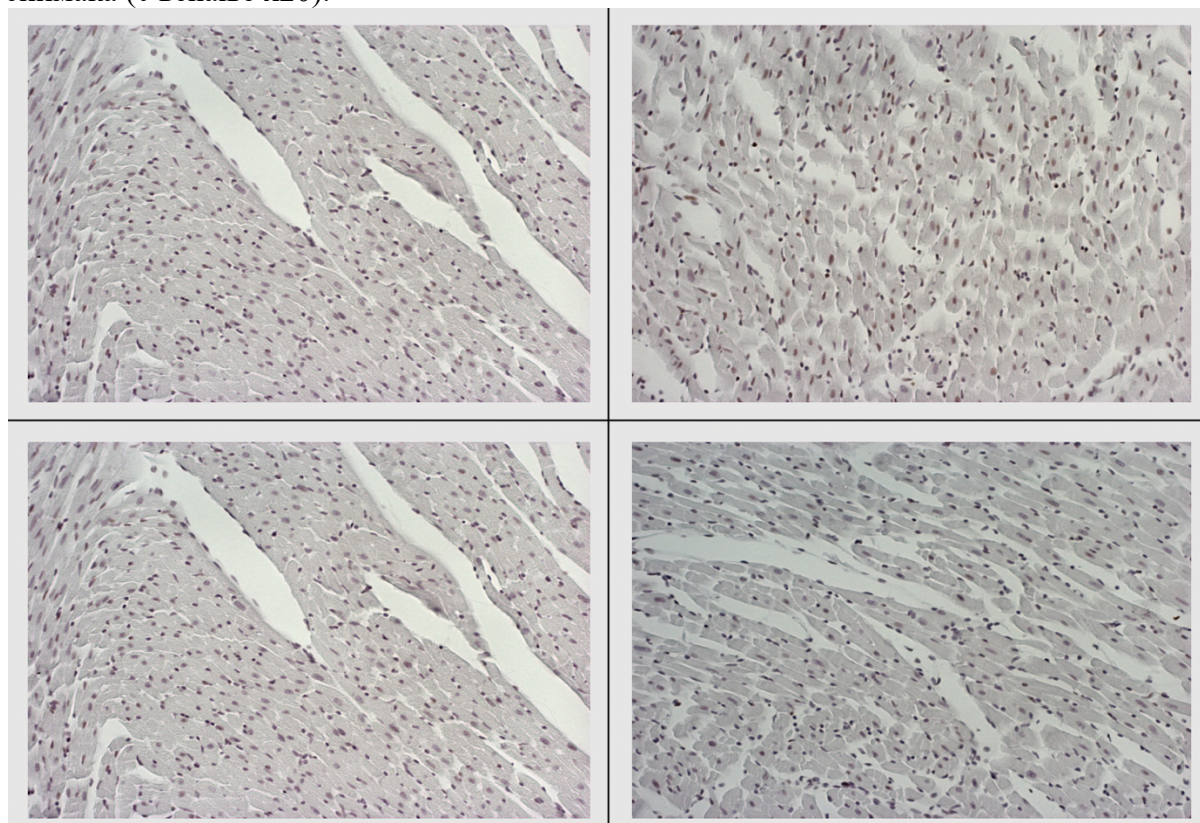
Слика 4а. Експресија Bcl-2 у ткиву леве коморе срца и приказ репрезентативних снимака (Увећање x40).



Слика 4б. Експресија Вах у ткиву леве коморе срца и приказ репрезентативних снимака (Увећање x20).



Слика 4ц. Експресија каспазе-3 у ткиву леве коморе срца и приказ репрезентативних снимака (Увећање x20).



ДИСКУСИЈА

5. ДИСКУСИЈА

Генерални циљ овог истраживања је био испитати потенцијалну улогу тиаминa у инхибицији оксидационог стреса узрокован након акутне примене високе кумулативне дозе антрациклинског цитостатика доксорубицина. Поред тога, циљ истраживања је био и испитати потенцијалне нове молекуларне механизме којима тиамин и доксорубицин, самостално или у комбинацији остварују своје ефекте на кардиоваскуларни систем.

Употреба доксорубицина је ограничена због срчаних нежељених ефеката доксорубицина, попут различитих облика кардиомиопатија (103, 104). У нашој студији користили смо животињски модел кардиотоксичности изазван доксорубицином за тестирање заштитних ефеката тиаминa на срчану функцију и редокс статус.

У погледу дијагностиковања кардиотоксичности клиничке препоруке су јасне и препорука се односи на мерење серумских биомаркера кардиотоксичности нарочито код типа 1 кардиотоксичности. Да бисмо потврдили нежељене ефекте доксорубицина на моделу пацова, измерили смо ослобађање срчаних ензима као дијагностичке маркере оштећења миокарда, који су често повезани са кардиомиопатијама. Нивои СК-МВ су значајно повећани у групи пацова након третмана једном дозом доксорубицина. Поред тога, LDH је такође повећан у доксорубицин групи, али је неспецифични маркер срчаног оштећења и може бити повезан са оштећењем скелетних мишића у телу. Подаци из литературе потврђују да је овај модел експерименталне кардиотоксичности златни стандард у истраживањима антинеопластичних лекова (105, 106).

Howard и сарадници (107) су у својој рандомизираној клиничкој студији испитивали ефекат суплементације тиамином на промене током акутне срчане слабости тако што су пацијенти примали 100 mg дневно тиаминa или плацебо. Резултати овог истраживања су показали да је тиамин значајно побољшао клинички статус пацијената, у смислу смањења симптоматологије, и утицао на смањење концентрације срчаних ензима, натруретског пептида. Поред тога, у овом истраживању које је обухватило пацијенте са срчаном инсуфицијенцијом приметан је био и дефицит тиаминa услед примене диуретика, тако да је корист од примене тиаминa била вишеструка.

Поред тога ехокардиографија као златни стандард у дијагностици смањења ејекционе фракције и знак да уколико је пад ЕФ већи од 15% у односу на почетне вредности тада је индикован прекид терапије хемиотерапеутицима. Пре и после експерименталног периода односно пре и после седмодневног третмана тиамином, праћене су хемодинамске промене *in vivo* у свим групама. У доксорубицин групи дошло је до значајног смањења ејекционе фракције, са 50,9 на 38,2% (Табела 7а), као и у тиамин+доксорубицин групи, са 51% на 46,7%. Дакле третман доксорубицином је значајно утицао на смањење ејекционе фракције, а третман тиамином је довео до благог повећања у групи која је третирана доксорубицином, док у контролним групама није утицао на промену ејекционе фракције (Табела 7а).

Тиамин је дакле липосолубилни витамин и припада витаминима Б комплекса а има значајну улогу као коензим у оксидативним реакцијама и у продукцији аденозин три фосфата (АТФ) (108, 109). Са тим у вези литературни подаци наводе да тиамин у

виду суплемента код пацијената са слабошћу срца може побољшати функцију срца. Међутим резултати рандомизираних клиничких студија су још увек неконзистентни. Mary Keith и сарадници (110) тврде да је тиамин недовољно ефикасан у погледу кардиопротекције. У својој мултицентричној двоструко слепој плацебо-контролисаној студији амбулаторно су пратили пацијенте са смањеном и очуваном функцијом леве коморе и то праћење ејекционе фракције ехокардиографијом. Плацебо или тиамин су администрирали пацијентима током 6 месеци у дози од 200 mg дневно. Резултати су показали да након шестомесечне суплементације тиамином, код пацијената је дошло до повећања ејекционе фракције који су били на суплементацији у односу на плацебо. Међутим због неутцаја на укупни Heart скор и осећај замарања закључено је да тиамин није био довољно у том смислу ефикасан, Дакле резултати нашег истраживања су у корелацији са познатим, која недвосмислено указују да је тиамин може утицати на смањење концентрације срчаних ензима и повећати ејекциону фракцију али не може значајно утицати на отклањање симптома услед постојење срчане инсуфицијенције. Разлог за овакве резултате лежи можда у томе што су пацијенти код којих је дијагностикована срчана инсуфицијенције можда у значајном дефициту тиамина у организму услед примене диуретима, па зато суплементација тиамином у терапијским дозама није дала терапијски ефекат већ само је обезбеђена надоканада. Примена фуросемида на пример нарочито хронична и у вишим дозама инхибира преузимање тиамина на ћелијском нивоу, па је зато индикована примена тиамина у знатно већим од препоручених доза (111, 112). Студије које би испитивале утицај високих доза тиамина, и то изнад 1000 mg на дан, би дале одговор на ово питање.

У другом делу студије проценили смо ефекте тиамина на срчану функцију са или без третмана доксорубицином. $Dp/dt \max$ и $dp/dtmin$ су главни параметри срчане контрактилности, а у нашој студији је функција срчаног мишића срца пацова била значајно смањена након терапије доксорубицином, чак и након једне дозе. Егзогени тиамин има заштитни ефекат против акутне доксорубицин-индуковане кардиотоксичности повећањем нивоа $Dp/dt \max$ и $dp/dtmin$. Поред тога, динамика SLVP била је врло слична претходним параметрима, што је јачи разлог за веровање да би тиамин могао имати неке заштитне ефекте на функционалне параметре срца. С друге стране, HR и CF, као индикатори коронарне циркулације, значајно су промењени при вишим коронарним перфузијским притисцима или у стању хипероксије. Током патолошких стања, тиамин је имао снажнији благотворни ефекат на коронарну циркулацију (113, 114).

Дефинитивно тиамин је способан да побољша функцију самог срца као пумпе али и функционално да побољша његову способност. И други аутори су то потврдили. Тако на пример, Jing Wang и Tao Guo (115) су свом раду објаснили утицај тиамина на ремоделовање срца усред патофизиолошких механизма који се развијају код пацијената са хроничном болешћу срца. У средишту тих механизма они наглашавају да се повећавају нивои инсулина и инсулинске резистенције што последично доводи до веће оксидације масних киселина и оксидације уопште. У средишту ових метаболичких дешавања кључну улогу имају антиоксиданси, попут тиамина и других предложених па је улога тиамина у патофизиологији настанка али самом третману хроничне срчане инсуфицијенције итекако јасна и позитивна. У литератури постоји широк спектар експерименталних и клиничких студија које су потврдиле негативне ефекте доксорубицина или других антрациклина на срце и кардиоваскуларни систем уопште (88, 116). Истовремено, постоји низ студија које испитују потенцијална средства за

слабљење доксорубицина, као што су метформин, ситаглиптин, алфа-линоленска киселина и фенолна једињења (88-95).

Кардиомиопатија изазвана антрациклинима значајна је са аспекта јавног здравља, јер се можда неће открити дуги низ година и остаје доживотна претња (64, 67, 71). Чак и након деценија испитивања, ни тачан начин деловања антрациклина нити путеви који воде до њихових нежељених ефеката нису у потпуности разјашњени. Стога су истраживања повезана са откривањем заштитних средстава против доксорубицин-индуковане кардиотоксичности пресудне. Наши резултати су потврдили утицај тиаминa на срчану контрактилност, али нема литературних података о ефектима витамина В₁ на рад срца.

Познато је да је срце веома осетљиво на доксорубицин и да индукује кардиотоксичност због стварања реактивних врста кисеоника и смањења антиоксидативног система одбране у поређењу са другим органима (85-87). Биоредуктивна активација доксорубицина доводи до стварања полихинонских радикала у којима су укључени различити ензими, укључујући NADPH-зависне цитокром P450 редуктазе и NADH дехидрогеназу митохондријског ланца транспорта електрона и цитоплазматску ксантин оксидазу. Ауто-оксидација полихинонских радикала узрокује знатно повећано стварање супероксида и мења ћелијске редокс одбрамбене механизме, који могу бити одговорни за доксорубицином индуковану кардиотоксичност (88, 98, 117).

У нашој студији, параметри прооксиданата су значајно повећани у доксорубицин групи. Нивои O₂⁻, H₂O₂ и TBARS значајно су повећани у доксорубицин групи, а смањени у доксорубицин + тиамин групи у поређењу са нивоима у доксорубицин групи. Занимљиво је да нивои нитрита нису значајно промењени. Претходна студија сугерисала је да су недостатак тиаминa и оксидативни стрес предиктори различитих кардиоваскуларних и неуролошких поремећаја (117, 118). Gioda CR и сарадници су испитивали редокс статус након 35 дана дефицита тиаминa. Како је тиамин важан кофактор метаболичким ензимима његов дефицит води до кардиоваскуларне дисфункције (119). Приметан је пораст активности каталазе чак двоструко након примене тиаминa у односу на пацове којима није администриран тиамин.

Поред тога, читав је спектар студија које су на моделима примене хемиотерпеутика испитивале кардиопротективни ефекат тиаминa. Тако на пример, Coskun R и сарадници (120) су испитивали утицај примене тиаминa у дози од 20mg/kg дневно током 14 дана на функцију срца пацова којима је примењена цисплатина у дози од 5mg/kg. Резултати указују да тиамин делује кардиопротективно, и то смањењем креатин киназе, тропонина I и нивоа оксидационог стреса.

Међутим, још увек је недовољно сазнања о прецизном деловању тиаминa на кардиоваскуларни систем. Последњих година употреба тиаминa, а посебно његових деривата дисулфида, занемарена је у западној медицини, али је од великог интереса за становнике Јапана. Метаболизам тиаминa заснован је на биохемијској улози тиамин монофосфата (TMP) и може бити аналог постепеној фосфорилацији аденозина. За оксидативни процес су потребни кисеоник, азот и катализатори, а витаминско-минерални комплекс је доказано величанствен алат милионима година еволуције (67, 81, 117).

Портари и сарадници испитивали су ефекат лечења тиамином на оксидативно оштећење јетре код акутне интоксикације етанолом код пацова. Закључили су да би лечење тиамином чак 30 минута након масовне дозе етанола могло бити корисно против оштећења јетре (121). Поред тога, *Аксон* и сарадници истраживали су значај антиоксидативне активности тиаминa. Нагласили су да тиамин најбоље спречава оксидативни стрес изазван цисплатином у поређењу са другим витаминима, као и неплодност (122).

Наши резултати су показали да су у групи која се лечи тиамином антиоксидативни ензими били знатно већи од оних у доксорубицин групи. Ово је најважнији резултат за нас и дефинитивно је потврда кардиопротективне улоге тиаминa против седмодневног третмана доксорубицином код пацова.

Поред тога, чини се да је морфометријска анализа промена миокарда на пацовима, као квантитативна и објективна метода, добар модел за упоредне студије о кардиомиопатији индукованој аналогама антрациклина. Помоћу ове методе потврдили смо цитотоксичне ефекте доксорубицина и заштитне ефекте тиаминa.

Претходни третман тиамин хидрохлоридом пре примене доксорубицина могао би смањити производњу оксидативног стреса и повећати контрактилност миокарда и побољшати антиоксидативни одбрамбени систем. Фокус управљања срчаним поремећајима изазваним антрациклинама можда ће бити потребно проширити тако да укључује нормализацију витаминских и нутритивних абнормалности. Наша студија промовише позитиван ефекат тиаминa на срчану функцију и антиоксидативни капацитет у односу на хемотерапеутике.

Имајући у виду велики број пацијената који су на хемиотерапији и повећање учесталости кардиотоксичности, у наредним годинама се очекује велики помак у погледу откривања потенцијалих кардиопротективних средстава (123-152). Напредак се очекује у свим нивоима од истраживања до клиничке праксе, односно од откривања и разумевања молекуларних механизма тиаминa па до скрининга на нивоу гена и нових терапијских и клиничких поступака. У сваком случају рана идентификација пацијената који су под ризиком за развијање кардиотоксичности треба да буде примарни циљ у развоју превентивних и терапијских стратегија код онколошких пацијената. Будућност кардиоонкологије се свакако огледа у развоју савремених и ефикасних превентивних мера и агенаса и терапијских процедура и смерница код пацијената на хемиотерапији.

ЗАКЉУЧЦИ

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу свега претходно наведеног, можемо закључити следеће:

- I. Примена доксорубицина је значајно утицала на повећање активности срчаних ензима, СК-МВ, Тропонина 1 и LDH, док је примена тиамина значајно смањила концентрације у односу на контролне групе.
- II. Седмодневна примена тиамина у терапијским дозама је ефикасна у погледу повећања ејекционе фракције леве коморе, чиме је потврђен кардиопротективни ефекат тиамина и кардиотоксични ефекат доксорубицина.
- III. Егзогени тиамин има заштитни ефекат у односу на доксорубицин-индуковане субакутне кардиотоксичности повећањем контрактилне способности срца и то повећањем нивоа $Dp/dt \max$ и $dp/dtmin$.
- IV. Поред тога, динамика SLVP била је врло слична претходним кардиодинамским параметрима, што је још један разлог за веровање да би тиамин могао имати заштитне ефекте на функционалне параметре срца.
- V. Као антиоксиданс, тиамин примењен током седам дана пре примене високе кумулативне дозе доксорубицина је довео до значајне редукције насталог оксидационог стреса и до повећања одбрамбених механизма антиоксидативног система.
- VI. Мофрометријским методама и патохистолошким анализама ткива срца потврдили смо цитотоксичне ефекте доксорубицина и заштитне ефекте тиамина.
- VII. Доксорубицин значајно утиче на повећање експресије Вах и каспазе-3, док примена тиамина пре доксорубицина значајно смањује експресију истих протеина. Са друге стране, Bcl-2 се највише експримира у К и Т групи у поређењу са осталим група.
- VIII. Имајући у виду велики број пацијената који су на хемиотерапији и повећање учесталости кардиотоксичности, у наредним годинама се очекује велики помак у погледу откривања потенцијалих кардиопротективних средстава, а тиамин се свакако због тренутно актуелних истраживања кандидује за једно од њих.

ЛИТЕРАТУРА

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Tan C, Tasaka H, Yu KP, Murphy ML, *et al.* Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer* 1967; 20(3): 333-53.
2. Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, *et al.* Adriamycin, 14- hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng* 1969; 11(6): 1101-10.
3. Di Marco A, Gaetani M, Scarpinato B. Adriamycin (NSC- 123,127): a new antibiotic with antitumor activity. *Cancer Chemother Rep* 1969;53(1): 33-7.
4. Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S, Gottlieb JA. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer* 1973; 32(2): 302-14.
5. Von Hoff DD, Layard MW, Basa P, *et al.* Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann Intern Med* 1979; 91(5): 710-7.
6. Alexander J, Dainiak N, Berger HJ, *et al.* Serial assessment of doxorubicin cardiotoxicity with quantitative radionuclide angiocardiology. *N Engl J Med* 1979; 300(6): 278-83.
7. Buzdar AU, Marcus C, Smith TL, *et al.* Early and delayed clinical cardiotoxicity of doxorubicin. *Cancer* 1985; 55(12): 2761-5.
8. Swain SM, Whaley FS, Ewer MS. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin. *Cancer* 2003; 97(11): 2869-79. [10] Billingham ME, Mason JW, Bristow MR, *et al.* Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treat Rep* 1978; 62(6): 865-72.
9. Bristow MR, Mason JW, Billingham ME, *et al.* Doxorubicin cardiomyopathy: evaluation by phonocardiography, endomyocardial biopsy, and cardiac catheterization. *Ann Intern Med* 1978; 88(2): 168-75.
10. Kremer LC, van Dalen EC, Offringa M, *et al.* Anthracycline- induced clinical heart failure in a cohort of 607 children: long-term follow-up study. *J Clin Oncol* 2001; 19(1): 191-6.
11. Mulrooney DA, Yeazel MW, Kawashima T, *et al.* Cardiac outcomes in a cohort of adult survivors of childhood and adolescent cancer: retrospective analysis of the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *Bmj* 2009; 339: b4606.
12. Grenier MA, Lipshultz SE. Epidemiology of anthracycline cardiotoxicity in children and adults. *Seminars in oncology* 1998; 25(4 Suppl 10): 72-85.
13. Abu-Khalaf MM, Juneja V, Chung GG, *et al.* Long-term assessment of cardiac function after dose-dense and -intense sequential doxorubicin (A), paclitaxel (T), and cyclophosphamide (C) as adjuvant therapy for high risk breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 104(3): 341-9.
14. <https://www.heart.org/en/search?q=cardiovascular%20disease%20risk%20factors&sort=relevancy> последњи пут посећено 15/12/2020.
15. Bristow MR, Thompson PD, Martin RP, *et al.* Early anthracycline cardiotoxicity. *Am J Med* 1978; 65(5): 823-32.
16. Dazzi H, Kaufmann K, Follath F. Anthracycline-induced acute cardiotoxicity in adults treated for leukaemia. Analysis of the clinico-pathological aspects of documented acute anthracycline- induced cardiotoxicity in patients treated for acute leukaemia at the University Hospital of Zurich, Switzerland, between 1990 and 1996. *Ann Oncol* 2001; 12(7): 963-6.

17. Hayek ER, Speakman E, Rehmus E. Acute doxorubicin cardiotoxicity. *N Engl J Med* 2005; 352(23): 2456-7.
18. Steinberg JS, Cohen AJ, Wasserman AG, *et al.* Acute arrhythmogenicity of doxorubicin administration. *Cancer* 1987; 60(6): 1213-8.
19. Fernandez SF, Basra M, Canty JM. Takotsubo cardiomyopathy following initial chemotherapy presenting with syncope and cardiogenic shock – a case report and literature review. *J Clin Exp Heart Circ* 2001; 2: 124.
20. Ewer SM, Ewer MS. Cardiotoxicity profile of trastuzumab. *Drug Saf* 2008; 31(6): 459-67.
21. Davies KJ, Doroshov JH. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. *J Biol Chem* 1986; 261(7): 3060-7.
22. Doroshov JH, Davies KJ. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. *J Biol Chem* 1986; 261(7): 3068-74.
23. Kotamraju S, Chitambar CR, Kalivendi SV, *et al.* Transferrin receptor-dependent iron uptake is responsible for doxorubicin-mediated apoptosis in endothelial cells: role of oxidant-induced iron signaling in apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277(19): 17179-87.
24. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/cardiotoxicity> последњи пут посећено 15/12/2020.
25. Minotti G, Recalcati S, Menna P, *et al.* Doxorubicin cardiotoxicity and the control of iron metabolism: quinone-dependent and independent mechanisms. *Methods Enzymol* 2004; 378: 340-61.
26. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, *et al.* Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 2004; 56(2): 185-229.
27. Cole MP, Chaiswing L, Oberley TD, *et al.* The protective roles of nitric oxide and superoxide dismutase in adriamycin-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Res* 2006; 69(1): 186-97.
28. Daosukho C, Ittarat W, Lin SM, *et al.* Induction of manganese superoxide dismutase (MnSOD) mediates cardioprotective effect of tamoxifen (TAM). *J Mol Cell Cardiol* 2005; 39(5): 792-803.
29. Volkova M, Palmeri M, Russell KS, *et al.* Activation of the aryl hydrocarbon receptor by doxorubicin mediates cytoprotective effects in the heart. *Cardiovascular Res* 2011; 90: 305-14.
30. Neilan TG, Blake SL, Ichinose F, *et al.* Disruption of Nitric Oxide Synthase 3 Protects Against the Cardiac Injury, Dysfunction, and Mortality Induced by Doxorubicin. *Circulation* 2007; 116(5): 506-14.
31. Dowd NP, Scully M, Adderley SR, *et al.* Inhibition of cyclooxygenase-2 aggravates doxorubicin-mediated cardiac injury *in vivo*. *J Clin Invest* 2001; 108(4): 585-90.
32. Kotamraju S, Kalivendi SV, Konorev E, *et al.* Oxidant-induced iron signaling in Doxorubicin-mediated apoptosis. *Methods Enzymol* 2004; 378: 362-82.
33. Kotamraju S, Konorev EA, Joseph J, *et al.* Doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and cardiomyocytes is ameliorated by nitron spin traps and ebselen. Role of reactive oxygen and nitrogen species. *J Biol Chem* 2000; 275(43): 33585-92.
34. Chua CC, Liu X, Gao J, *et al.* Multiple actions of pifithrin- α on doxorubicin-induced apoptosis in rat myoblastic H9c2 cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290(6): H2606-13.

35. Wu W, Lee WL, Wu YY, *et al.* Expression of constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase inhibits activation of caspase 3 and apoptosis of cardiac muscle cells. *J Biol Chem* 2000; 275(51): 40113-9.
36. Wang L, Ma W, Markovich R, *et al.* Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by insulin-like growth factor I. *Circ Res* 1998; 83(5): 516-22.
37. Childs AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, *et al.* Doxorubicin treatment *in vivo* causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio. *Cancer Res* 2002; 62(16): 4592-8.
38. Wang GW, Klein JB, Kang YJ. Metallothionein inhibits doxorubicin-induced mitochondrial cytochrome c release and caspase-3 activation in cardiomyocytes. *J Pharmacol. Experimental Therapeutics* 2001; 298(2): 461-8.
39. Goormaghtigh E, Huart P, Praet M, *et al.* Structure of the adriamycin-cardiolipin complex. Role in mitochondrial toxicity. *Biophys chem* 1990; 35(2-3): 247-57.
40. Demant EJ. Inactivation of cytochrome c oxidase activity in mitochondrial membranes during redox cycling of doxorubicin. *Biochem Pharmacol* 1991 ; 41(4): 543-52.
41. Tokarska-Schlattner M, Dolder M, Gerber I, *et al.* Reduced creatine-stimulated respiration in doxorubicin challenged mitochondria: particular sensitivity of the heart. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1767(11): 1276-84.
42. Kang YJ, Zhou Z-X, Wang G-W, *et al.* Suppression by Metallothionein of Doxorubicin-induced Cardiomyocyte Apoptosis through Inhibition of p38 Mitogen-activated Protein Kinases. *J Biol Chem* 2000.; 275(18): 13690-8.
43. Grethe S, Coltella N, Di Renzo MF, *et al.* p38 MAPK downregulates phosphorylation of Bad in doxorubicin-induced endothelial apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 347(3): 781-90.
44. Wu S, Ko Y-S, Teng M-S, *et al.* Adriamycin-induced Cardiomyocyte and Endothelial Cell Apoptosis: *In vitro* and *In vivo* Studies. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34(12): 1595-607.
45. Shan YX, Liu TJ, Su HF, *et al.* Hsp10 and Hsp60 modulate Bcl-2 family and mitochondria apoptosis signaling induced by doxorubicin in cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35(9): 1135-43.
46. Kunisada K, Tone E, Negoro S, *et al.* Bcl-xl reduces doxorubicin- induced myocardial damage but fails to control cardiac gene downregulation. *Cardiovascular Res* 2002; 53(4): 936-43.
47. Chen QM, Alexander D, Sun H, *et al.* Corticosteroids inhibit cell death induced by doxorubicin in cardiomyocytes: induction of antiapoptosis, antioxidant, and detoxification genes. *Mol Pharmacol* 2005; 67(6): 1861-73.
48. Reeve JL, Szegezdi E, Logue SE, *et al.* Distinct mechanisms of cardiomyocyte apoptosis induced by doxorubicin and hypoxia converge on mitochondria and are inhibited by Bcl-xL. *J cellular and molecular medicine.* 2007; 11(3): 509-20.
49. Palfi A, Toth A, Kulcsar G, *et al.* The role of Akt and mitogen- activated protein kinase systems in the protective effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in Langendorff perfused and in isoproterenol-damaged rat hearts. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315(1): 273-82.
50. Toth A, Kovacs K, Deres P, *et al.* Impact of a novel cardioprotective agent on the ischaemia-reperfusion-induced Akt kinase activation. *Biochem Pharmacol* 2003; 66(11): 2263-72.
51. Toth A, Halmosi R, Kovacs K, *et al.* Akt activation induced by an antioxidant compound during ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med* 2003; 35(9): 1051-63.

52. Taniyama Y, Walsh K. Elevated Myocardial Akt Signaling Ameliorates Doxorubicin-induced Congestive Heart Failure and Promotes Heart Growth. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34(10): 1241-7.
53. del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, *et al.* Interleukin-3- induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 1997; 278(5338): 687-9.
54. Nagy N, Malik G, Tosaki A, *et al.* Overexpression of glutaredoxin- 2 reduces myocardial cell death by preventing both apoptosis and necrosis. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 44(2): 252-60.
55. Pastukh V, Ricci C, Solodushko V, *et al.* Contribution of the PI 3- kinase/Akt survival pathway toward osmotic preconditioning. *Mol Cell Biochem* 2005; 269(1-2): 59-67.
56. Sawyer DB, Zuppinger C, Miller TA, *et al.* Modulation of Anthracycline-Induced Myofibrillar Disarray in Rat Ventricular Myocytes by Neuregulin-1 β and Anti-erbB2: Potential Mechanism for Trastuzumab-Induced Cardiotoxicity. *Circulation* 2002, 2002; 105(13): 1551-4.
57. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, *et al.* Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001; 344(11): 783-92.
58. Russell SD, Blackwell KL, Lawrence J, *et al.* Independent adjudication of symptomatic heart failure with the use of doxorubicin and cyclophosphamide followed by trastuzumab adjuvant therapy: a combined review of cardiac data from the National Surgical Adjuvant breast and Bowel Project B-31 and the North Central Cancer Treatment Group N9831 clinical trials. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. [Clinical Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Jul 20; 28(21): 3416-21.
59. Choi BW, Berger HJ, Schwartz PE, *et al.* Serial radionuclide assessment of doxorubicin cardiotoxicity in cancer patients with abnormal baseline resting left ventricular performance. *Am Heart J* 1983; 106(4 Pt 1): 638-43.
60. Cardinale D, Sandri MT, Martinoni A, *et al.* Left ventricular dysfunction predicted by early troponin I release after high-dose chemotherapy. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36(2): 517-22.
61. Cardinale D, Sandri MT, Martinoni A. Myocardial injury revealed by plasma troponin I in breast cancer treated with high-dose chemotherapy. *Ann Oncol* 2002; 13(5): 710-5.
62. Simunek T, Sterba M, Popelova O, Adamcova M, Hrdina R, Gers V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep* 2009; 61(1): 154-71.
63. Ferreira ALA, Russell RM, Rocha N, Ladeira MSP, Salvadori DMS, Nascimento MCMO, *et al.* Effect of lycopene on doxorubicin-induced cardiotoxicity: an echocardiographic, histological, and morphometrical assessment. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007; 101: 16–24.
64. Ferreira ALA, Yeum K-J, Matsubara LS, Matsubara BB, Correa CR, Pereira EJ, *et al.* Doxorubicin as an antioxidant: maintenance of myocardial levels of lycopene under doxorubicin treatment. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 740–51.
65. De Angelis A, Urbanek K, Cappetta D, Piegari E, Ciuffreda LP, Rivellino A, *et al.* Doxorubicin cardiotoxicity and target cells: a broader perspective. *Cardio-Oncology*. 2016; 2(1): 1-8.
66. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, *et al.* Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and genomics*. 2011; 21(7): 440-6.

67. Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol* 2012; 52(6): 1213-25.
68. Doroshow JH. Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation in the killing of Ehrlich tumor cells by anticancer quinones. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986; 83: 4514-8.
69. de Freitas Segredo MP, Salvadori DF, Rocha NS, Moretto FF, Correa CR, Camargo EA, et al. Oxidative stress on cardiotoxicity after treatment with single and multiple doses of doxorubicin. *Human & experimental toxicology*. 2014; 33(7): 748-60.
70. Polegato BF, Minicucci MF, Azevedo PS, Carvalho RF, Chiuso-Minicucci F, Pereira EJ, et al. Acute doxorubicin-induced cardiotoxicity is associated with matrix metalloproteinase-2 alterations in rats. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2015; 35(5): 1924-33.
71. Tokarska-Schlattner M, Zaugg M, Zuppinger C, Wallimann T, Schlattner U. New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: The critical role of cellular energetics. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 41(3): 389-405.
72. Zhang J, Cui X, Yan Y, Li M, Yang Y, Wang J, et al. Research progress of cardioprotective agents for prevention of anthracycline cardiotoxicity. *American journal of translational research*. 2016; 8(7): 2862-75.
73. Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology*. 2009; 115(2): 155-62.
74. Tatlidede E, Sehirli O, Velioglu-Ogunc A, Cetinel S, Yegen BC, Yarat A, et al. Resveratrol treatment protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by alleviating oxidative damage. *Free Radic Res* 2009; 43: 195-205.
75. Razmaraii N, Babaei H, Nayebi AM, Assadnassab G, Helan JA, Azarmi Y. Cardioprotective Effect of Grape Seed Extract on Chronic Doxorubicin-Induced Cardiac Toxicity in Wistar Rats. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2016; 6(3): 423-33.
76. Cardinale D, Sandri MT, Colombo A, *et al*. Prognostic value of troponin I in cardiac risk stratification of cancer patients undergoing high-dose chemotherapy. *Circulation* 2004; 109(22): 2749-54.
77. Wojnowski L, Kulle B, Schirmer M, *et al*. NAD(P)H oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphisms are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Circulation* 2005; 112(24): 3754-62.
78. O'Brien ME, Wigler N, Inbar M, *et al*. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. [Clinical Trial, Clinical Trial, Phase III, Comparative Study, Multicenter Study, Randomized Controlled Trial, Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2004 Mar;15(3):440-9.
79. Safra T, Muggia F, Jeffers S, *et al*. Pegylated liposomal doxorubicin (doxil): reduced clinical cardiotoxicity in patients reaching or exceeding cumulative doses of 500 mg/m². *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2000 Aug;11(8):1029-33.
80. Lou H, Danelisen I, Singal PK. Involvement of mitogen-activated protein kinases in adriamycin-induced cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288(4): H1925-30.

81. Singal P, Li T, Kumar D. Adriamycin-induced heart failure: mechanisms and modulation. *Molecular and Cellular Biochem* 2000; 207(1): 77-86.
82. Oliveira PJ, Bjork JA, Santos MS, *et al.* Carvedilol-mediated antioxidant protection against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 200(2): 159- 68.
83. Bâ A. Metabolic and structural role of thiamine in nervous tissues. *Cell Mol Neurobiol.* 2008;28(7):923–31.
84. Young RC, Blass JP. Iatrogenic nutritional deficiencies. *Annu Rev Nutr.* 1982;2:201–27.
85. Anderson S, Vickery C, Nicol A. Adult thiamine requirements and the continuing need to fortify processed cereals. *Lancet.* 1986;328(8498):85–9.
86. DiNicolantonio JJ, Liu J, O’Keefe JH. Thiamine and cardiovascular disease: a literature review. *Prog Cardiovasc Dis.* 2018;
87. Pfizenmeyer P, Guillard JC, d’Athis P, Petit-Marnier C, Gaudet M. Thiamine status of elderly patients with cardiac failure including the effects of supplementation. *Int J Vitam Nutr Res.* 1994;64(2):113–8.
88. Oliveira FA, Guatimosim S, Castro CH, Galan DT, Lauton-Santos S, Ribeiro AM, *et al.* Abolition of reperfusion-induced arrhythmias in hearts from thiamine-deficient rats. *Am J Phys Heart Circ Phys.* 2007;293(1):H401.
89. Dabar G, Harmouche C, Habr B, Riachi M, Jaber B. Shoshin beriberi in critically-ill patients: case series. *Nutr J.* 2015;14(1):51.
90. Lei Y, Zheng M, Huang W, Zhang J, Lu Y. Wet beriberi with multiple organ failure remarkably reversed by thiamine administration: a case report and literature review. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(9):e0010.
91. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, *et al.* Heart disease and stroke statistics—2017 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2017;135(10):e603.
92. Jain A, Mehta R, Al-Ani M, Hill JA, Winchester DE. Determining the role of thiamine deficiency in systolic heart failure: a meta-analysis and systematic review. *J Card Fail.* 2015;21(12):1000–7.
93. Katta N, Balla S, Alpert MA. Does long-term furosemide therapy cause thiamine deficiency in patients with heart failure? A focused review. *Am J Med.* 2016;129(7):753.e11.
94. Seligmann H, Halkin H, Rauchfleisch S, Kaufmann N, Tal R, Motro M, *et al.* Thiamine deficiency in patients with congestive heart failure receiving long-term furosemide therapy: a pilot study. *Am J Med.* 1991;91(2):151–5.
95. Undhad, V. V., *et al.* (2012). Cardiac troponin: An emerging cardiac biomarker in animal health. *Veterinary World,* 5(8), 508–511.
96. Fiolet, J. W., Willebrands, A. F., Lie, K. I., & ter Welle, H. F. (1977). Determination of creatine kinase isoenzyme MB (CK- MB): Comparison of methods and clinical evaluation. *Clinica Chimica Acta,* 80(1), 23–35.
97. Stambaugh, Richard, & Post, Diana. (1966). A spectrophotometric method for the assay of lactic dehydrogenase subunits. *Analytical Biochemistry,* 15(3), 470–480.
98. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA, eds. *Handbook of methods for oxygen radical research.* Boca Raton, CRC Press 1985;123-132
99. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15 N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982;126:131-138

100. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-358
101. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 1984;105:121-126
102. Beutler E. Superoxide dismutase. In: Beutler E, eds. *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*. Philadelphia, Grune & Stratton:PA 1984;83-85
103. Spallarossa P, Garibaldi S, Altieri P, *et al.* Carvedilol prevents doxorubicin-induced free radical release and apoptosis in cardiomyocytes *in vitro*. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 37(4): 837-46.
104. Berthiaume JM, Oliveira PJ, Fariss MW, *et al.* Dietary vitamin E decreases doxorubicin-induced oxidative stress without preventing mitochondrial dysfunction. *Cardiovasc toxicol* 2005; 5(3): 257-67.
105. Bjelogrić SK, Radic J, Jovic V, *et al.* Activity of d,l-alpha- tocopherol (vitamin E) against cardiotoxicity induced by doxorubicin and doxorubicin with cyclophosphamide in mice. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2005; 97(5): 311-9.
106. Ladas EJ, Jacobson JS, Kennedy DD, *et al.* Antioxidants and cancer therapy: a systematic review. *J Clin Oncol* 2004; 22(3): 517- 28.
107. Smithline HA, Donnino M, Blank FSJ, Barus R, Coute RA, Knee AB, Visintainer P. Supplemental thiamine for the treatment of acute heart failure syndrome: a randomized controlled trial. *BMC Complement Altern Med*. 2019 May 6;19(1):96.
108. Swain SM, Whaley FS, Gerber MC, *et al.* Delayed administration of dexrazoxane provides cardioprotection for patients with advanced breast cancer treated with doxorubicin-containing therapy. *J Clin Oncol* 1997; 15(4): 1333-40.
109. Swain SM, Whaley FS, Gerber MC, *et al.* Cardioprotection with dexrazoxane for doxorubicin-containing therapy in advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 1997; 15(4): 1318-32.
110. Keith M, Quach S, Ahmed M, Azizi-Namini P, Al-Hesayen A, Azevedo E, James R, Leong-Poi H, Ong G, Desjardins S, Lee PJ, Ravamehr-Lake D, Yan AT. Thiamin supplementation does not improve left ventricular ejection fraction in ambulatory heart failure patients: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2019 Dec 1;110(6):1287-1295. doi: 10.1093/ajcn/nqz192. PMID: 31504093.
111. Katta N, Balla S, Alpert MA. Does Long-Term Furosemide Therapy Cause Thiamine Deficiency in Patients with Heart Failure? A Focused Review. *Am J Med*. 2016 Jul;129(7):753.e7-753.e11. doi: 10.1016/j.amjmed.2016.01.037. Epub 2016 Feb 18. PMID: 26899752.
112. Seligmann H, Halkin H, Rauchfleisch S, Kaufmann N, Motro M, Vered Z, Ezra D. Thiamine deficiency in patients with congestive heart failure receiving long-term furosemide therapy: a pilot study. *Am J Med*. 1991 Aug;91(2):151-5. doi: 10.1016/0002-9343(91)90007-k. PMID: 1867241.
113. Trachtenberg BH, Landy DC, Franco VI, *et al.* Anthracycline- associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Pediatr Cardiol* 2011; 32(3): 342-53.
114. Cardinale D, Colombo A, Sandri MT, *et al.* Prevention of high- dose chemotherapy-induced cardiotoxicity in high-risk patients by angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circulation* 2006; 114(23): 2474-81.
115. Wang J, Guo T. Metabolic remodeling in chronic heart failure. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2013 Aug;14(8):688-95. doi: 10.1631/jzus.B1300137. PMID: 23897787; PMCID: PMC3735968.
116. Kalay N, Basar E, Ozdogru I, *et al.* Protective effects of carvedilol against anthracycline-induced cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48(11): 2258-62.

117. Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM, *et al.* The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology. Endorsed by the Heart Failure Society of America and the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50(19): 1914-31.
118. Cardinale D, Colombo A, Lamantia G, *et al.* Anthracycline- induced cardiomyopathy: clinical relevance and response to pharmacologic therapy. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55(3): 213-20. Yoon GJ, Telli ML, Kao DP, *et al.* Left ventricular dysfunction in patients receiving cardiotoxic cancer therapies are clinicians responding optimally? *J Am Coll Cardiol* 2010; 56(20): 1644-50.
119. Gioda CR, de Oliveira Barreto T, Prímola-Gomes TN, de Lima DC, Campos PP, Capettini Ldos S, Lauton-Santos S, Vasconcelos AC, Coimbra CC, Lemos VS, Pesquero JL, Cruz JS. Cardiac oxidative stress is involved in heart failure induced by thiamine deprivation in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010 Jun;298(6):H2039-45. doi: 10.1152/ajpheart.00820.2009. Epub 2010 Mar 19. PMID: 20304817
120. Coskun R, Turan MI, Turan IS, Gulapoglu M. The protective effect of thiamine pyrophosphate, but not thiamine, against cardiotoxicity induced with cisplatin in rats. *Drug Chem Toxicol.* 2014 Jul;37(3):290-4. doi: 10.3109/01480545.2013.851688. Epub 2013 Nov 11. PMID: 24215635.
121. Portari GV, Ovidio PP, Deminice R, Jordão AA Jr. Protective effect of treatment with thiamine or benfotiamine on liver oxidative damage in rat model of acute ethanol intoxication. *Life Sci* 2016;162:21-4
122. Aksoy AN, Kabil Kucur S, Batmaz G, Gözükarı I, Aksoy M, Kurt N, Mammadov R. The role of antioxidant activity in the prevention and treatment of infertility caused by Cisplatin in rats. *Gynecol Obstet Invest* 2015;79(2):119-25
123. William J. McKenna, Barry J. Maron, and Gaetano Thiene. Classification, Epidemiology, and Global Burden of Cardiomyopathies. *Circulation Research* 2017;121:722–730
124. Renu K, Arunachalam S. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy - An update. *Eur J Pharmacol* 2018;818:241-253. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.10.043
125. Nagiub M, Nixon JV, Kontos MC. Ability of Nonstrain Diastolic Parameters to Predict Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy: A Systematic Review With Meta-Analysis. *Cardiol Rev* 2018;26(1):29-34
126. Jain D, Russell RR, Schwartz RG, Panjraıh GS, Aronow W. Cardiac Complications of Cancer Therapy: Pathophysiology, Identification, Prevention, Treatment, and Future Directions. *Curr Cardiol Rep* 2017;19(5):36
127. Payne DL, Nohria A. Prevention of Chemotherapy Induced Cardiomyopathy. *Curr Heart Fail Rep* 2017;14(5):398-403
128. Chung WB, Youn HJ. Pathophysiology and preventive strategies of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Korean J Intern Med* 2016;31(4):625-33.
129. Abushouk AI, Ismail A, Salem AMA, Afifi AM, Abdel-Daim MM. Cardioprotective mechanisms of phytochemicals against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biomed Pharmacother* 2017;90:935-946
130. Aminkeng F, Ross CJ, Rassekh SR, Hwang S, Rieder MJ, Bhavsar AP, Smith A, Sanatani S, Gelmon KA, Bernstein D, Hayden MR, Amstutz U, Carleton BC; CPNDS Clinical Practice Recommendations Group. Recommendations for genetic testing to

- reduce the incidence of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Br J Clin Pharmacol* 2016;82(3):683-95
131. Ghigo A, Li M, Hirsch E. New signal transduction paradigms in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 2016;1863(7 PtB):1916-25
 132. DiNicolantonio JJ, Niazi AK, Lavie CJ, O'Keefe JH, Ventura HO. Thiamine supplementation for the treatment of heart failure: a review of the literature. *Congest Heart Fail* 2013;19(4):214-22
 133. Wong EKC, Lee JY, Leong DP, Mbuagbaw L, Yousuf H, Keen S, Straus SE, Patterson CJ, Demers C. Thiamine versus placebo in older heart failure patients: study protocol for a randomized controlled crossover feasibility trial (THIAMINE-HF). *Pilot Feasibility Stud* 2018;4:149
 134. Eshak ES, Arafa AE. Thiamine deficiency and cardiovascular disorders. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2018;28(10):965-972
 135. Tveden-Nyborg P, Bergmann TK, Lykkesfeldt J. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology Policy for Experimental and Clinical studies. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2018;123:233-235.
 136. Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2011;50(6):940-50
 137. Undhad, Vishal V., et al. Cardiac troponin: an emerging cardiac biomarker in animal health. *Veterinary World* 2012;5.8:508-511
 138. Fiolet JW, Willebrands AF, Lie KI, ter Welle HF. Determination of creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB): comparison of methods and clinical evaluation. *Clin Chim Acta* 1977;80(1):23-35
 139. Richard Stambaugh, Diana Post. A spectrophotometric method for the assay of lactic dehydrogenase subunits, *Analytical Biochemistry* 1966; 15(3): 470-480
 140. Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, et al. Myocardial cell death in human diabetes. *Circ Res.* 2000;87:1123-32
 141. Farraj AK, Hazari MS, Cascio WE. The utility of the small rodent electrocardiogram in toxicology. *Toxicol Sci* 2011;121(1):11-30
 142. Carvalho FS, Burgeiro A, Garcia R, Moreno AJ, Carvalho RA, Oliveira PJ. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. *Med Res Rev* 2014;34(1):106-35
 143. Studneva I, Palkeeva M, Veselova O, Molokoedov A, Ovchinnikov M, Sidorova M, Pisarenko O. Protective Effects of a Novel Agonist of Galanin Receptors Against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats. *Cardiovasc Toxicol* 2018; doi: 10.1007/s12012-018-9483-x.
 144. Yu X, Cui L, Zhang Z, Zhao Q, Li S. α -Linolenic acid attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats through suppression of oxidative stress and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2013;45(10):817-26
 145. Razavi-Azarkhiavi K, Iranshahy M, Sahebkar A, Shirani K, Karimi G. The Protective Role of Phenolic Compounds Against Doxorubicin-induced Cardiotoxicity. A Comprehensive Review. *Nutr Cancer* 2016;68(6):892-917
 146. Sheta A, Elsakkar M, Hamza M, Solaiman A. Effect of metformin and sitagliptin on doxorubicin-induced cardiotoxicity in adult male albino rats. *Hum Exp Toxicol* 2016;35(11):1227-1239
 147. Bachur NR, Gordon SL, Gee MV. Anthracycline antibiotic augmentation of microsomal electron transport and free radical formation. *Mol Pharmacol* 1977;13(5): 901-10

148. Davies KJ, Doroshowm JH. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. *J Biol Chem* 1986;261(7): 3060-67
149. Yee SB, Pritsos CA. Comparison of oxygen radical generation from the reductive activation of doxorubicin, streptonigrin, and menadione by xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 1997;347(2): 235–41
150. Costa NA, Gut AL, de Souza Dorna M, Pimentel JA, Cozzolino SM, Azevedo PS, Fernandes AA, Zornoff LA, de Paiva SA, Minicucci MF. Serum thiamine concentration and oxidative stress as predictors of mortality in patients with septic shock. *J Crit Care* 2014;29(2):249-52
151. Williams RR. Chemistry of thiamine (vitamin B1) *JAMA* 1938;110:727–31
152. Flodin NW. Thiamine (vitamin B1) In: Alan R., editor. *Current Topics in Nutrition and Disease*. New York: Liss, Inc.; 1988. pp. 103–16.

БИОГРАФИЈА

Др Тања Радоњић је рођена 04.01.1990. године у Београду, а своје основно и средње образовање односно завршену Гимназију и Средњу музичку школу похађала је у Београду, након чега је уписала основне студије медицине на Медицинском факултету, Универзитета у Београду. Последњу годину Гимназије завршила је у Минесоти у Сједињеним америчким државама. Након обављеног стажа и положеног државног испита, своју лекарску праксу започиње 2015. године запослењем у Дому здравља Палилула у Служби опште медицине. Од августа 2019. године, Др Тања Радоњић се налази на специјализацији из Офталмологије у Клиничком центру Србије, Клиници за офталмологију. Студент је завршне године Докторских академских студија на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином. Последњих година је посвећена усавршавању из области естетске медицине а била је учесник и многих других међународних конференција из области медицине. Члан је комитета знања Србије. SESIAM удружења и Светског удружења за антиејџинг медицину (WOSIAM (*World Society of Interdisciplinary Anti-aging Medicine*)). Одлично познаје рад на рачунару и енглески, немачки и шпански језик.

БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Radonjic T**, Rankovic M, Ravic M, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic J, Jeremic N, Sretenovic J, Matic S, Jakovljevic V, Nikolic Turnic T. The Effects of Thiamine Hydrochloride on Cardiac Function, Redox Status and Morphometric Alterations in Doxorubicin-Treated Rats. *Cardiovasc Toxicol*. 2020 Apr;20(2):111-120.
2. Nikolic Turnic T, Arsic A, Vucic V, Petrovic S, Ristic-Medic D, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic J, **Radonjic T**, Milosavljevic I, Bolevich S, Bolevich S, Djuric D, Jakovljevic V. Hydroxymethylglutaryl Coenzyme a Reductase Inhibitors Differentially Modulate Plasma Fatty Acids in Rats With Diet-Induced-Hyperhomocysteinemia: Is ω -3 Fatty Acids Supplementation Necessary? *Front Physiol*. 2019 Jul 16;10:892.
3. **Radonic T**, Simonovic N, Nikolic Turnic T. An overview of pharmacological and non-pharmacological treatment as a useful tool for the protection. From cardiotoxicity of antineoplastic drugs. *Ser J Exp Clin Res* 2020; 21 (3): 263-270
doi: 10.2478/sjecr-2018-0019

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Тања Радоњић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Улога тиамина у инхибицији оксидативног стреса митохондрија и ендоплазматског ретикулума у анималном моделу доксорубиничном индукције кардиотоксичности,

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

Овом Изјавом такође потврђујем:

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

у Крагујевцу, 17.01.2021. године,

Тања Радоњић
потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Тања Радосић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

Улога тиаминa у инхибицији оксидативног стреса у митохондријама и ендотелног реперкулума у анималном моделу доксорубицином индукване кардиотоксичности

која је одбрањена на Филозофском факултету Медицинских наука

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

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

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

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

у Кратујевићу, 17.01.2021. године,


потпис аутора

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