



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

Невена Д. Лазаревић

**Утицај хроничне администрације
екстракта матичњака (*Melissa officinalis*,
Lamiaceae) на развој и прогресију
експерименталног аутоимунског
миокардитиса пацова**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Крагујевац, 2023. године



**UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA**

Nevena D. Lazarević

**Uticaj hronične administracije ekstrakta
matičnjaka (*Melissa officinalis*, *Lamiaceae*)
na razvoj i progresiju eksperimentalnog
autoimunskog miokarditisa pacova**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Kragujevac, 2023. godine



**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES**

Nevena D. Lazarević

**The effect of chronic administration of
lemon balm extract (*Melissa officinalis*,
Lamiaceae) on the development and
progression of autoimmune myocarditis in
rats**

DOCTORAL DISSERTATION

Kragujevac, 2023

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Аутор
Име и презиме: Невена Лазаревић
Датум и место рођења: 18.02.1993. године, Крагујевац, Република Србија
Садашње запослење: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: Утицај хроничне администрације екстракта матичњака (<i>Melissa officinalis</i> , <i>Lamiaceae</i>) на развој и прогресију експерименталног аутоимунског миокардитиса пацова
Број страница: 164
Број слика: 13 слика; 3 схеме; 17 табела; 34 графика
Број библиографских података: 311
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац, Србија
Научна област (УДК): медицина
Ментор: Доц. др Исидора Милосављевић, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 10.11.2020.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-90/19 од 10.02.2021.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњеност услова кандидата: 1. Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област <i>Физиологија</i> , председник 2. Проф. др Биљана Љујић, ванредни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област <i>Генетика</i> , члан 3. Проф. Биљана Божин, ванредни професор Медицинског факултета, Универзитета у Новом Саду, за ужу научну област <i>Фармакогнозија и фитотерапија</i> , члан
Комисија за оцену и одбране докторске дисертације: 1. Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област <i>Физиологија</i> , председник 2. Проф. др Биљана Љујић, ванредни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област <i>Генетика</i> , члан 3. Доц. др Небојша Кладар, доцент Медицинског факултета, Универзитета у Новом Саду, за ужу научну област <i>Фармакогнозија и фитотерапија</i> , члан
Датум одбране дисертације:

IDENTIFIKACIONA STANICA DOKTORSKE DISERTACIJE

Autor
Ime i prezime: Nevena Lazarević
Datum i mesto rođenja: 18.02.1993. godine, Kragujevac, Republika Srbija
Sadašnje zaposlenje: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
Doktorska disertacija
Naslov: Uticaj hronične administracije ekstrakta matičnjaka (<i>Melissa officinalis</i> , <i>Lamiaceae</i>) na razvoj i progresiju eksperimentalnog autoimunskog miokarditisa
Broj stranica: 164
Broj slika: 13 slika, 3 sheme, 17 tabela, 34 grafika
Broj bibliografski podataka: 311
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac
Naučna oblast (UDK): medicina
Mentor: doc. dr Isidora Milosavljević, docent Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu
Oцена i odbrana
Datum prijave teme: 10.11.2020.
Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske disertacije: IV-03-90/19 од 10.02.2021.
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenost uslova kandidata: 1. Prof. dr Vladimir Jakovljević, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu, za užu naučnu oblast <i>Fiziologija</i> , predsednik 2. Prof. dr Biljana Ljujić, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu, za užu naučnu oblast <i>Genetika</i> , član 3. Prof. dr Biljana Božin, vanredni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu, za užu naučnu oblast <i>Farmakognozija i fitoterapija</i> , član
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije: 1. Prof. dr Vladimir Jakovljević, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu, za užu naučnu oblast <i>Fiziologija</i> , predsednik 2. Prof. dr Biljana Ljujić, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu, za užu naučnu oblast <i>Genetika</i> , član 3. Doc. dr Nebojša Kladar, docent Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu, za užu naučnu oblast <i>Farmakognozija i fitoterapija</i> , član
Datum odbrane disertacije

**IDENTIFIKACIONA STRANICA DOKTORSKE DISERTACIJE NA ENGLLESKOM
JEZIKU**

Author
Name and surname: Nevena Lazarevic
Date and place of birth: 18.02.1993. , Kragujevac, Serbia
Current employment: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Doctoral Dissertation
Title: The effect of chronic administration of lemon balm extract (<i>Melissa officinalis</i> , <i>Lamiaceae</i>) on the development and progression of experimental autoimmune myocarditis in rats
No. of pages: 164
No. of images: 13 figures; 3 schemes; 17 tables, 34 graphs
No. of bibliographic data: 311
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac
Scientific area (UDK): medicine
Mentor: Assis. prof. Isidora Milosavljevic, Assistant professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 10.11.2020
Decision number and date of acceptance of the doctoral: IV-03-90/19 од 10.02.2021
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: 1. Prof. Dr Vladimir Jakovljević, Full professor of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for the narrow scientific field of Physiology, president 2. Prof. Dr Biljana Ljujić, Associate professor of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for the narrow scientific field of Genetics, member 3. Prof. Dr Biljana Božin, Associate professor of the Medical Faculty, University of Novi Sad, for the narrow scientific field of Pharmacognosy and Phytotherapy, member
Commission for evaluation and defense of doctoral: 1. Prof. Dr Vladimir Jakovljević, Full professor of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for the narrow scientific field of Physiology, president 2. Prof. Dr Biljana Ljujić, Associate professor of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for the narrow scientific field of Genetics, member 3. Prof. Dr Nebojša Kladar, Assistant professor of the Medical Faculty, University of Novi Sad, for the narrow scientific field of Pharmacognosy and Phytotherapy, member
Date of Dissertation Defense:

ЗАХВАЛНИЦА

Огромно поштовање и захвалност дугујем проф. др Владимиру Јаковљевићу који ми је пружио поверење и драгоцену прилику да будем део његовог тима Центра за претклиничка истраживања, да се развијам као истраживач и да учим од најбољих. Захваљујем се на професионалним и пријатељским саветима, на бескрајној подршци и пруженој научној слободи. Хвала што је ту да саслуша сваку нову идеју и да подржи и усмери младе, вредне и талентоване људе.

Не постоје адекватне речи које би описале захвалност коју дугујем свом ментору доц. др Исидори Милосављевић. Хвала за сваки издвојени дан, сат и минут, хвала што је веровала у ову идеју и у мене од самог почетка, хвала за мотивацију, подстрек, моралну и пријатељску подршку. Хвала за максималну посвећеност у сваком сегменту израде ове дисертације, за сваки детаљ, хвала што је извукла мој максимум и у великој мери утицала на мој лични и професионални развој као младог научника. Уз њену помоћ, знање и искуство, ова теза попримила је финални и комплетни облик. Част ми је што сам имала прилику да будем њен први кандидат.

Велику захвалност дугујем драгим колегама и пријатељима тима Лабораторије за кардиоваскуларну физиологију где се сваки научни задатак претвара у задовољство: проф. др Владимиру Живковићу, проф. др Ивану Срејовићу, доц. др Јовани Јерemiћ, доц. др Јовани Брадић, проф. др Невени Јерemiћ, проф. др Тамари Николић Турнић хвала за пренесено знање и искуство у вези са експерименталним и научноистраживачким радом, бројним стручним и пријатељским саветима. Бескрајну и неизмерну захвалност дугујем асс. Маријани Анђић, асс. Марини Николић, доц. др Јовани Јерemiћ, асс. Александру Кочовићу, асс. Маји Николић, доц. др Драгани Станишић, доц. др Аници Петровић, доц. др Александри Стојановић, доц. др Јовани Јоксимовић Јовић, доц. др Јасмини Сретеновић, асс. Марку Равићу, асс. Катарини Михајловић, асс. Маји Савић, мр. фарм. Милицы Милинковић и сар. Божидару Пиндовићу на несебичној помоћи, подршци, посвећености и пријатној радној атмосфери током целокупне израде ове дисертације.

Велику захвалност дугујем и члановима своје катедре, на челу са проф. др Слободаном Новокметом на подршци током вишегодишње сарадње.

Захваљујем се и проф. Слободанки Митровић на помоћи у патохистолошкој анализи, стручним и пријатељским саветима. Желим да се захвалим и Предрагу Равићу и Љиљани Ђоковић на подршци, позитивној енергији и пријатној радној атмосфери током спровођења експеримената, као и Душану Томашевићу на техничкој подршци и пријатељској помоћи.

Хвала мом Павлу, на безграничном стрпљењу, разумевању, љубави и подршци. Без њега овај успех не би био комплетан.

Најзад, на овом путу највећу улогу имала је моја породица, родитељи Војка и Драгослав, и брат Ненад. Хвала за све што су ми пружили и омогућили да постанем оно што сам данас. Од њих сам научила највише.

Мом анђелу Жељку

САЖЕТАК

Циљ ове студије био је да се испита утицај примене екстракта *Melissa officinalis* (МОЕ) на развој и прогресију експерименталног ауотимунског миокардитиса (ЕАМ) код пацова. Како би се идентификовао екстракт МОЕ са потенцијално најбољим кардиопротективним ефектом, прво су хемијски окарактерисани водени и етанолни МОЕ, а потом испитан и њихов антиинфламацијски и антиоксидациони потенцијал. На основу тога одабран је етанолни екстракт под рефлуксом за даље истраживање. Други део истраживања спроведен је на 80 *Dark Agouti* пацова подељених у 10 група у зависности од тога да ли су животиње здраве или им је индукован ЕАМ, од примењене дозе МОЕ (50, 100 и 200 mg/kg) и дужине третмана (3/6 недеља). ЕАМ је индукован имунизацијом пацова миозином 0. дана протокола. Хемодинамски параметри праћени су 0., 21. и 42. дана. Након завршеног протокола животиње су жртвоване, прикупљени су узорци крви за одређивање различитих биохемијских параметара и изолована су срца у циљу патохистолошких анализа, и анализе релативне експресије гена укључених у оксидациони стрес, апоптозу и инфламацију. Третман МОЕ побољшао је функцију и морфологију миокарда, у акутној и хроничној фази ЕАМ (смањење инфламаторног инфилтрата, колагених влакана и апоптотских ћелија у ткиву миокарда уз побољшање хемодинамских параметара). Механизми постигнутих ефеката највероватније подразумевају синергију антиоксидационих, антиинфламацијских и антиапоптотских својстава МОЕ. Ова студија сугерише да МОЕ, посебно у дози од 200mg/kg, побољшава функцију и архитектуру миокарда у ЕАМ, чиме се спречава ремоделовање срца и развој дилатативне кардиомиопатије. Стога се МОЕ могу сматрати потенцијално корисном адјувантном терапијом код пацијената са аутоимунским миокардитисом.

Кључне речи: *Melissa officinalis*; екстракт; експериментални аутоимунски миокардитис; оксидациони стрес; инфламација.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effect of *Melissa officinalis* extract (MOE) administration on the development and progression of experimental autoimmune myocarditis (EAM) in rats. In order to identify MOE extract with potentially the best cardioprotective effect, aqueous and ethanolic MOE were chemically characterized, and their anti-inflammatory and antioxidant potential was examined. Based on this, ethanolic extract under reflux was selected for further research. The second part included 80 *Dark Agouti* rats divided into 10 groups depending on the animals' health, applied dose of MOE (50, 100 and 200 mg/kg) and the length of treatment (3/6 weeks). EAM was induced by rat immunization with myosin on day 0. Hemodynamic parameters were monitored on days 0, 21 and 42. After finishing the protocol, animals were sacrificed, and blood samples collected in order to measure different biochemical parameters hearts were isolated for pathohistological analysis, and the relative expression of genes involved in oxidative stress, apoptosis, and inflammation. MOE treatment improved myocardial function and morphology, both in acute and chronic phase of EAM (reduction of inflammatory infiltrate, collagen, and apoptotic cells in myocardial tissue with improvement of hemodynamic parameters). The mechanisms of the achieved effects most likely involve the synergy of antioxidant, antiinflammatory and antiapoptotic properties of MOE. This study suggests that MOE, especially at 200mg/kg, improves myocardial function and architecture in EAM, thus preventing cardiac remodeling and development of dilated cardiomyopathy. Therefore, MOE can be considered a potentially useful adjuvant therapy in patients with autoimmune myocarditis.

Key words: lemon balm; *Melissa officinalis*; extract; experimental autoimmune myocarditis; oxidative stress; inflammation.

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. Melissa officinalis	2
1.1.1. Етимологија, карактеристике, распрострањеност	2
1.1.2. Фитохемија биљне врсте <i>M. officinalis</i>	3
1.1.2.1. Полифеноли <i>M. officinalis</i>	3
1.1.2.2. Флавоноиди <i>M. officinalis</i>	3
1.1.2.3. Испарљива терпенска једињења <i>M. officinalis</i>	4
1.1.2.4. Неиспарљиви тритерпени <i>M. officinalis</i>	4
1.1.2.5. Остале компоненте <i>M. officinalis</i>	5
1.1.3. Традиционална употреба <i>M. officinalis</i>	7
1.1.4. Фармакотерапијска својства <i>M. officinalis</i>	7
1.1.4.1. Неуропротективни ефекти <i>МО</i>	7
1.1.4.2. Спазмолитички ефекти <i>МО</i>	8
1.1.4.3. Антимикробни ефекти <i>МО</i>	8
1.1.4.4. Антитуморски ефекти <i>МО</i>	8
1.1.4.5. Ефекти <i>МО</i> на липидни статус.....	8
1.1.4.6. Хипогликемијски ефекти <i>МО</i>	9
1.1.4.7. Антиоксидациони ефекти <i>M. officinalis</i>	9
1.1.5. Антиинфламаторни ефекти <i>M. officinalis</i>	13
1.1.6. Антиапоптотски ефекти <i>M. officinalis</i>	14
1.1.7. Кардиоваскуларни ефекти <i>M. officinalis</i>	14
1.2. Миокардитис	17
1.2.1. Дефиниција, етиологија и епидемиологија миокардитиса	17
1.2.2. Врсте миокардитиса.....	18
1.2.3. Клиничка слика и дијагноза миокардитиса.....	19
1.2.4. Компликације миокардитиса – развој дилатативне кардиомиопатије (ДКМ).....	20
1.2.5. Хемодинамске алтерације у миокардитису – крвни притисак, срчана фреквенца, ехокардиографски параметри	20
1.2.6. Патогенеза аутоимунског миокардитиса.....	21
1.2.6.1. Стечени имунски одговор у <i>ЕАМ</i>	22
1.2.6.2. Урођени имунски одговор у <i>ЕАМ</i>	22
1.2.6.3. Експресија и улога цитокина у <i>ЕАМ</i>	23
1.2.6.4. Улога оксидационог стреса у <i>ЕАМ</i>	25
1.2.6.5. Улога апоптозе у <i>ЕАМ</i>	26
1.2.7. Анимални модели аутоимунског миокардитиса.....	27
1.2.7.1. <i>ЕАМ</i> - Имунизација пацова/мишева срчаним миозином свињског порекла или <i>МуНСα334-352</i> пептидом.....	27
1.2.7.2. <i>ЕАМ</i> - Имунизација пацова/мишева тропонином <i>I</i>	28
1.2.7.3. Липополисахаридом (<i>LPS</i>) индукован миокардитис	28
1.2.8. Терапијски приступ у лечењу аутоимунског миокардитиса	29

1.2.9. Фитотерапијски приступ у лечењу и превенцији аутоимунског миокардитиса	30
2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА.....	33
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	35
3.1. Припрема и карактеризација екстракта матичњака, испитивање антиоксидационог и антиинфламаторног потенцијала добијених екстракта.....	36
3.1.1. Биљни материјал	36
3.1.2. Припрема екстракта матичњака	36
3.1.3. Одређивање укупног фенолног и флавоноидног садржаја у испитиваним екстрактима матичњака.....	37
3.1.3.1. Одређивање укупног садржаја фенола у испитиваним екстрактима матичњака	37
3.1.3.2. Одређивање укупног садржаја флавоноида у испитиваним екстрактима матичњака.....	37
3.1.4. HPLC анализа испитиваних екстракта матичњака	38
3.1.5. Испитивање екстракта матичњака гасном хроматографијом.....	38
3.1.6. In vitro испитивање антиоксидационих ефеката екстракта матичњака.....	39
3.1.6.1. Испитивање антиоксидационог потенцијала екстракта матичњака DPPH тестом.....	39
3.1.6.2. Испитивање потенцијала екстракта матичњака да неутралишу OH радикал.....	39
3.1.6.3. Испитивање потенцијала екстракта матичњака да инхибирају ослобађање NO.....	39
3.1.6.4. Испитивање потенцијала екстракта матичњака да инхибирају липидну пероксидацију (LP)	39
3.1.6.5. Испитивање потенцијала екстракта матичњака да редукује феријон (FRAP тест).....	40
3.1.7. Испитивање антиинфламаторног ефекта екстракта матичњака in vivo моделом карагенином индуковане инфламације шапице.....	40
3.1.7.1. Етички аспекти	40
3.1.7.2. Експерименталне животиње	40
3.1.7.3. Индуkcија инфламације шапице.....	41
3.1.7.4. Квантификовање антиинфламаторне активности испитиваних екстракта матичњака	41
3.1.7.5. Процена системског редокс статуса након карагенинског теста едема шапице.....	42
3.1.7.6. Спектрофотометријско одређивање прооксидационих параметара (O_2^- , H_2O_2 , NO_2^- , TBARS)	42
3.1.7.7. Спектрофотометријско одређивање антиоксидационих параметара (SOD, CAT, GSH).....	43
3.2. Испитивање кардиопротективних својстава етанолног екстракта матичњака у моделу експерименталног аутоимунског миокардитиса.....	44
3.2.1. Анимални протокол.....	44
3.2.1.1. Дизајн студије.....	44

3.2.2. Индукција експерименталног аутоимунског миокардитиса (EAM).....	45
3.2.3. Третман екстрактом матичњака	45
3.2.4. Испитивање ефеката примене етанолног екстракта матичњака на хемодинамске параметре.....	46
3.2.4.1. Испитивање ефеката примене етанолног екстракта матичњака на крвни притисак	46
3.2.4.2. Испитивање ефеката примене етанолног екстракта матичњака на ехокардиографске параметре леве коморе	47
3.2.5. Испитивање утицаја примене екстракта матичњака на биохемијске маркере срчане функције и инфламације ELISA методом	48
3.2.5.1. Испитивање ефеката екстракта матичњака на активност срчаних ензима.....	50
3.2.5.2. Испитивање утицаја примене екстракта матичњака на маркере инфламације ELISA методом	50
3.2.6. Испитивање утицаја примене екстракта матичњака на маркере оксидационог стреса	51
3.2.7. Испитивање ефеката примене екстракта матичњака на патохистолошке карактеристике ткива миокарда	51
3.2.7.1. Испитивање ефеката примене екстракта матичњака на ткиво миокарда- бојење хематоксилин-еозин методом	51
3.2.7.2. Испитивање ефеката примене екстракта матичњака на фиброзу миокарда и садржај колагена	52
3.2.7.2.1. Бојење <i>Picrosirius red</i> методом	52
3.2.7.2.2. Бојење <i>Masson trichrome</i> методом	53
3.2.7.3. Испитивање утицаја примене екстракта матичњака на апоптозу у ткиву миокарда (<i>TUNEL assay</i>).....	53
3.2.8. Испитивање утицаја примене екстракта матичњака на релативну експресију гена укључених у апоптозу, оксидациони стрес и инфламацију у левој комори срца	54
3.3. Снага студије и величина узорка.....	56
3.4. Статистичка обрада и анализа података	56
4. РЕЗУЛТАТИ	57
4.1. Принос добијених екстраката матичњака	58
4.2. Укупни садржај фенола и флавоноида у испитиваним екстрактима матичњака	58
4.3. Хемијска карактеризација испитиваних екстраката матичњака	59
4.4. Антиоксидациона активност испитиваних екстраката матичњака <i>in vitro</i>.....	63
4.5. Антиинфламаторни ефекти испитиваних екстраката матичњака	64
4.6. Процена редокс статуса након карагенинског теста едема шапице.....	66
4.7. Ефекти екстракта матичњака на телесну масу, Hw/Bw однос и Sw/Bw однос у EAM моделу.....	73
4.8. Ефекти екстракта матичњака на хемодинамске параметре у EAM моделу.....	74

4.8.1. Ефекти екстракта матичњака на артеријски крвни притисак и срчану фреквенцу у ЕАМ моделу	75
4.8.2. Ефекти екстракта матичњака на ехокардиографске параметре у ЕАМ моделу	76
4.9. Ефекти екстракта матичњака на срчане ензиме у ЕАМ моделу.....	86
4.10. Ефекти екстракта матичњака на системски редокс статус у ЕАМ моделу	89
4.10.1. Ефекти екстракта матичњака на прооксидационе параметре у ЕАМ моделу	89
4.10.2. Ефекти екстракта матичњака на антиоксидационе параметре у ЕАМ моделу	93
4.11. Ефекти екстракта матичњака на инфламаторни статус у ЕАМ моделу.....	96
4.11.1. Ефекти примењених екстраката матичњака на ниво Ц-реактивног протеина у серуму.....	96
4.11.2. Ефекти примењених екстраката матичњака на ниво Th1 цитокина у серуму	97
4.11.3. Ефекти примењених екстраката матичњака на ниво Th2 цитокина у серуму	100
4.11.4. Ефекти примењених екстраката матичњака на ниво Th17 цитокина у серуму	102
4.12. Ефекти екстракта матичњака на патохистолошке карактеристике миокарда у ЕАМ моделу	105
4.12.1. Ефекти екстракта матичњака на структуру миокарда у ЕАМ моделу – Н/Е бојење	105
4.12.2. Ефекти екстракта матичњака на садржај колагена у ткиву миокарда у ЕАМ моделу – Sirius Red и Massson Trichrome бојења.....	110
4.12.3. Ефекти екстракта матичњака на апоптозу у ткиву миокарда у ЕАМ моделу –Tunel assay бојење.....	113
4.13. Ефекти екстракта матичњака на експресију одређених гена у миокарду у ЕАМ моделу.....	115
4.13.1. Ефекти екстракта матичњака на експресију гена укључених у апоптозу у миокарду	115
4.13.2. Ефекти екстракта матичњака на релативну експресију гена маркера оксидационог стреса у миокарду у ЕАМ моделу	117
4.13.3. Ефекти екстракта матичњака на експресију гена укључених у инфламацију у миокарду у ЕАМ моделу.....	119
5. ДИСКУСИЈА	122
5.1. Карактеризација испитиваних екстраката матичњака.....	123
5.1.1. Разлике у приносу испитиваних екстраката матичњака	123
5.1.2. Разлике у фитохемијском саставу испитиваних екстраката матичњака	123
5.1.3. Антиоксидациони ефекти испитиваних екстраката матичњака	125
5.1.4. Анти-инфламаторни ефекти испитиваних екстраката матичњака	126
5.2. Ефекти примене МОЕ на ублажавање ЕАМ и превенцију настанка и прогресију болести	128

5.2.1. Ефекти МОЕ на морфометријске, хемодинамске параметре и функцију срца у ЕАМ моделу.....	128
5.2.2. Ефекти МОЕ на биохемијске параметре срчаног оштећења.....	130
5.2.3. Ефекти МОЕ на системски оксидациони стрес у ЕАМ моделу	131
5.2.4. Ефекти МОЕ на параметре инфламације у ЕАМ моделу	133
5.2.5. Ефекти МОЕ на апоптозу миокарда у ЕАМ моделу	137
5.2.6. Ефекти МОЕ на очуваност структуре миокарда у ЕАМ моделу	139
6. ЗАКЉУЧЦИ	142
7. ЛИТЕРАТУРА.....	145

1. УВОД

1.1. *Melissa officinalis*

1.1.1. Етимологија, карактеристике, распрострањеност

Melissa officinalis (грчки "Melissa" – пчела) је вишегодишња зељаста ароматична биљка традиционално позната под називима матичњак, лимунова трава, пчелиња трава, или пчелињи балзам. Припада фамилији уснатица (*Lamiaceae*), роду *Melissa L.* заједно са *Melissa axillaris*, *Melissa flava*, и *Melissa yunnanensis*. Матичњак има усправну стабљику, квадратног или четвороугаоног облика, до 70 – 150 cm висине, што је карактеристично за припаднике фамилије *Lamiaceae* (Табела 1; Слика 1). Листови су распоређени у паровима један наспрам другог, благо длакави, тамно зелене боје, срцоликог облика, са тестерастим, расцепканим ободом, висине 2 - 8 cm. Листови се користе као лековита биљна дрога јер су активни састојци сконцентрисани у том делу. Имају мирис и укус налик лимуну, услед присуства испарљивих монотерпенских и сесквитерпенских једињења, па отуда и назив лимунова трава. Цвета у летњем периоду, од јула до септембра, при чему се формирају бели/бледо ружичасти цветови који привлаче пчеле услед присуства нектара што објашњава и други назив ове биљке, пчелиња трава. Листови се сакупљају пре периода цветања. Корен је длакав и обухвата неколико латералних коренова, пружајући способност лакше адаптације на различите спољашње услове (1-8).



Слика 1. Матичњак

Порекло матичњака везује се за земље јужне Европе, посебно Медитерана, као и земље централне и западне Азије. С обзиром на то да се лако култивише, матичњак је широко распрострањен и у многим деловима Сједињених Америчких Држава (источне, средњезападне и северозападне државе), као и Централној Европи (9-11). Међу земљама које предњаче у узгоју матичњака издвајају се САД, Уједињено Краљевство, Иран, Бразил, Италија, Немачка, Пољска, Турска, Србија и Шпанија (12).

Табела 1. Таксономија биљне врсте *Melissa officinalis* L.

Таксономија	Таксони
Царство	<i>Plantae</i>
Потцарство	<i>Tracheobionta</i>
Надраздео	<i>Spermatophyta</i>
Раздео	<i>Magnoliophyta</i>
Класа	<i>Magnoliopsida</i>
Поткласа	<i>Asteridae</i>
Ред	<i>Lamiales</i>
Фамилија	<i>Lamiaceae/Labiataeae</i>
Род	<i>Melissa</i>
Врста	<i>Melissa officinalis</i>

1.1.2. Фитохемија биљне врсте *M. officinalis*

Melissa officinalis (МО) се сматра одличним извором широког спектра активних хемијских једињења присутних како у листовима, тако и у етарском уљу, укључујући полифенолна, флавоноидна и терпенска једињења.

1.1.2.1. Полифеноли *M. officinalis*

Бројна истраживања идентификовала су неколико главних полифенолних киселина у екстрактима матичњака, присутних у различитим односима. Сматра се да је главни и најзаступљенији активни састојак розмаринска киселина, која је одговорна за бројне, по здравље корисне ефекте матичњака. Уз розмаринску киселину присутне су и: кафена, хлорогена, циметна, гална, протокатехична, гентизинска, *p*-кумаринска, ферулна, салвианолна и елагична киселина (Табела 2) (13, 14). Терапијско својство матичњака се приписује високом садржају фенола, због добро познатог антиоксидационог потенцијала ових једињења. Стога је од великог значаја оптимизовати услове екстракције ради постизања оптималног садржаја фенола у екстрактима. Садржај фенола варира у зависности од биљног порекла (нпр. водени екстракт матичњака пореклом из Босне и Херцеговине има већи садржај розмаринске, галне и хлорогене киселине у односу екстракт матичњака пореклом из Турске, док је садржај циметне киселине већи у екстракту пореклом из Турске (13). Студије оптимизације екстракције фенолних киселина (розмаринске и кафене киселине) утврдиле су да је могуће екстраховати највећи проценат розмаринске киселине на температурама до 80 °C (на вишим температурама долази до деградације розмаринске киселине), уз коришћење 30% метанола као растварача (15). Додатно, сматра се да алкохолни екстракти садрже већи проценат розмаринске киселине у односу на водени.

1.1.2.2. Флавоноиди *M. officinalis*

Флавоноидна једињења су углавном сконцентрисана у надземним деловима *M. officinalis*, као и код већине припадника *Lamiaceae* фамилије. До данас је изоловано неколико флавоноидних једињења из матичњака, како у агликонској форми, тако и у форми гликозида. Према хемијској структури флавоноидна једињења присутна у различитим екстрактима матичњака могу се поделити на: флавоне (лутеолин, апигенин (16) и њихови деривати лутеолин 7-О-β-D-глукопиранозид, апигенин 7-О-β-D-

глукопиранозид, лутеолин 7-О-β-D-глукуронопиранозид, лутеолин 3'-О-β-D-глукуронопиранозид, лутеолин 7-О-beta-D-глукопиранозид-3'-Obeta-D-глукуронопиранозид) (17), флаваноне (хесперидин, хесперетин, нарингин, нарингенин), флаваноле (катехин, епикатехин, рутин) (17, 18) и флавоноле (кверцетин, кверцитрин, изокверцитрин, рамноцитрин) (Табела 2; 19). У зависности од начина и услова екстракције, као и поларности коришћеног растварача варира и садржај флавоноида у екстрактима матичњака. Тако на пример, у воденим екстрактима се у много мањој мери налазе агликонске форме флавоноида, због њихове слабе растворљивости у води, док ће се повећањем рН, температуре, као и коришћењем меша етанола и воде као растварача растворљивост ових компоненти повећати. С друге стране, органски растварачи попут ацетона и ацетонитрила могу бити корисни у екстраховању флавоноидних компоненти попут кверцетина, хесперетина и нарингенина (20, 21).

1.1.2.3. Испарљива терпенска једињења *M. officinalis*

Један од главних активних састојака матичњака представљају испарљива терпенска једињења присутна у листу, у етарском уљу (Табела 2). Сматра се да листови матичњака садрже до 0,3% етарског уља (2, 22). Садржај етарског уља матичњака је испитиван у бројним студијама и утврђено је да су главни конституенси етарског уља заправо испарљива монотерпенска и сесквитерпенска једињења цитрал (гераниал и нерал који дају арому налик на цитрусе), гераниол, цитронелал, тимол и β-кариофилен у различитим односима (23). Присуство додатних компоненти и њихов проценат варира у зависности од начина добијања етарског уља, услова дестилације, климе региона, биљне врсте и зрелости биљке (6, 24). Анализом два етарска уља матичњака, добијена методом хидродестилације из МО узгајаних у Ирану и Турској, откривено је преко 20 различитих компоненти, при чему је процентуални садржај главних компоненти био сличан и то: цитронелал (37,33% vs. 36,62 - 43,78%), тимол (11,96% наспрам 0,40-11,94%), цитрал (10,10% наспрам 10,10 - 17,43%) и β-кариофилен (7,27% наспрам 5,91- 7,27%) (24, 25). С друге стране, етарско уље матичњака узгајаног у Алжиру састоји се претежно од оксидованих монотерпена (нерал (30,2%), гераниал (44,2%) и цитронелал (6,3%)), док је фракција сесквитерпена нижа: α-копен (1,8%) и β-кариофилен (1,3%) и оксигенисани сесквитерпен кариофилен оксид (1,3%) (4). Етарско уље матичњака гајеног на Балкану, у Србији се састоји углавном од цитрала (гераниал и нерал 39,9%), цитронелала (13,7%), лимонена (2,2%), гераниола (3,4%), β-кариофилена (4,6%), β-кариофилен оксида (1,7%) и гермакрена Д (2,4%) (26). Такође, на варијабилност састава етарског уља утиче и време сакупљања биљне дроге. Наиме, недавно истраживање показало је да је лишће сакупљено у јуну, богатије уљем у односу на оно сакупљено у августу, док се садржај уља (углавном цитрал (гераниал, нерал) и цитронелал) не разликује значајно (27). Старост биљке такође утиче на садржај етарског уља, јер двогодишње биљке садрже већу количину етарског уља у односу на биљке старе годину дана (28).

1.1.2.4. Неиспарљиви тритерпени *M. officinalis*

Главна тритерпеноидна неиспарљива једињења изолована из матичњака су урсолна и олеанолна киселина (Табела 2), али су такође пронађени и додатни сулфовани тритерпени типа урсана (3β,16β,23-трихидрокси-13,28-епоксиурс-11-ен-3-О-β-D-глукопиранозид, 3,23-дисулфатни естар 2α,3β,19α,23-тетрахидроксиурс-12-ен-28-оичне киселине и 3,23-дисулфатни естар 2α,3β,19α,23-тетрахидроксиурс-12-ен-28-оичне киселине 28-О-β-D-глукопиранозид), и олеанана (3,23-дисулфатни естар 2α,3β,23,29-

тетрахидроксиолеан-12-ен-28-оичне киселине и 3,23-дисулфатни естар 3 β -23,29-трихидорксиолеан-12-ен-28-оичне киселине) у хидроалкохолном екстракту листа матичњака (29). Поред наведених, у мањој концентрацији се може наћи и бетулинска киселина у 96% етанолном екстракту матичњака (30).

1.1.2.5. Остале компоненте M. officinalis

Поред већ наведених група једињења, МО представља и извор важних биолошки активних једињења као што су лигнини, полисахариди (висок садржај алфа-целулозе), протеини и пепео (3, 31, 32). Недавно је у једној студији анализиран минерални састав листова матичњака пореклом из Алжира, при чему је утврђено да је ова биљка значајан извор и минерала попут калијума, гвожђа, рубидијума, баријума натријума и цинка ($K > Fe > Rb > Ba > Na > Zn$) (1).

Табела 2. Фитохемијски састав *M.officinalis*

<i>M. officinalis</i>	Етарско уље	Лист
Терпени		
-Монотерпени	Цитронелал ^(6,24,25) Тимол ^(6, 24, 25) Цитрал (Нерал и Гераниал) ^(4, 6, 24, 25)	
-Сесквитерпени	β-кариофилен ^(4, 6, 24, 25) Кариофилен оксид ^(4, 26) Лимонен ⁽²⁶⁾ Гемакрен D ⁽²⁶⁾	
-Тритерпени		Урсолна киселина ^(13, 33) Олеанолна киселина ^(13, 33) Бетулинска киселина ^(29, 30, 34)
Полифеноли		
-Полифенолне киселине		розмаринска киселина ⁽¹³⁾ кафена киселина ⁽¹³⁾ протокатехична киселина ⁽¹³⁾ цинамична киселина ⁽¹³⁾ хлорогена киселина ⁽¹³⁾ гална киселина ⁽¹³⁾ гентизинска киселина ⁽³⁰⁾ ферулна киселина ⁽¹⁴⁾ елагична киселина ⁽¹⁴⁾ <i>p</i> -кумаринска киселина ⁽¹⁴⁾ салвианолна киселина ⁽³⁵⁾
Флавоноиди		
-Флавоноли		Лутеолин ⁽²⁹⁾ Апигенин ⁽²⁹⁾
-Флаванони		хесперидин ^(8,19) хесперетин ^(8,19) нарингин ^(8,19) нарингенин ^(8,19)
-Флаваноли		катехин ^(8,17) епикатехин ^(8,17) рутин ^(8,17)
-Флавоноли		кверцетин ⁽¹⁴⁾ кверцитрин ^(8,17, 29) рамноцитрин ^(8, 17, 29) изокверцитрин ^(8, 17, 29)

1.1.3. Традиционална употреба *M. officinalis*

Употреба матичњака у различите медицинске сврхе позната је преко 2000 година. Отац фармакологије Диоскорид био је први који је поменуо ову биљку у својој Фармакопеји о лековитим биљкама, *De Materia Medica*. Од тада су лековита својства МО описана и у многим другим медицинским књигама, укључујући и Канонску медицину Авицене, док су монографије о *M. officinalis* такође наведене у неколико фармакопеја: Европској, Британској биљној фармакопеји и Иранској биљној фармакопеји. Поред широке употребе у традиционалној медицини, МО се користи и у прехранбеној индустрији и ароматерапији због мириса. Важно је напоменути да се традиционално користе само надземни делови биљака, и то најчешће лист (*Melissae folium*) (8).

На просторима Балкана широко је распрострањена употреба матичњака. На просторима Србије матичњак се у различитим формулацијама (инфуз, екстракт водени или етанолни, тинктура, етарско уље) користи за побољшање здравља. Тако на пример, познати су корисни ефекти инфуза на централни нервни систем, у погледу благог седативног и анксиолитичког ефекта, побољшања когнитивних способности и меморије. Сматра се да ова биљка поправља расположење, као и соматске симптоме индуковане анксиозношћу попут палпитација и несанице. Поред тога, познато је да матичњак благотворно делује на гастроинтестинални тракт у погледу стимулације варења, смањење надутости и флатуленције, а такође се у народној медицини користи и код прехладе, за ублажавање бола у грлу и кашља (36). На просторима Босне и Херцеговине традиционална употреба заснива се на коришћењу пероралних препарата матичњака за лечење несанице, узнемирености, депресије, аритмија, повећане лактације, надутости, јутарње мучнине, дијареје, мигрене, реуматизма, као и за детоксикацију (37). У Бугарској се такође матичњак у облику инфуза традиционално користи за контролу крвног притиска; као спазмолитик и седатив (38), док се у Хрватској чешће наводи употреба ове биљке код прехладе за ублажавање кашља и бола у грлу (39).

1.1.4. Фармакотерапијска својства *M. officinalis*

Резултати бројних студија указују на различите фармаколошке ефекте матичњака као што су седациони и благи хипнотички (40-42), хипогликемијски, хепатопротективни, антибактеријски, антивирусни, спазмолитички и неуропротективни (8, 43, 44).

1.1.4.1. Неуропротективни ефекти МО

Једињења заступљена у МО поседују способност везивања за рецепторе за ацетилхолин као и инхибиције ензима ацетилхолинестеразе што последично доводи до побољшања когнитивних способности функције као што је меморија. Поред тога, истраживачи истичу да МОЕ може превенирати неуродегенеративне поремећаје који су повезани са оксидационим стресом као што су Паркинсонова и Алцхајмерова болест. Штавише, утврђено је да МОЕ може смањити агитацију, као и тонус мишића код пацијената са Алцхајмеровом болешћу (45, 46). Када је реч о анксиолитичким ефектима МОЕ, резултати неколико студија имплицирају да ниже дозе воденог екстракта имају анксиолитички ефекат, док више дозе имају седативни ефекат (43). У неким европским земљама, ова биљка се традиционално користи за опуштање, посебно када постоје сметње у првој фази сна. Употреба матичњака код ментално оболелих пацијената резултира значајним побољшањем раздражљивости, несанице, главобоље и

срчаних тегоба (11). Сви ови благотворни ефекти могу се приписати присуству значајних количина розмаринске, олеанолне и урсолне киселине, као и тритерпеноида у биљци. Претпоставља се да ови активни принципи могу инхибирати транспортну активност GABA и повећати ниво овог неуротрансмитера у мозгу (47, 48).

1.1.4.2. Спазмолитички ефекти МО

Матичњак се деценијама традиционално користи за ублажавање симптома дигестивних поремећаја, као карминатив и тоник. Међутим, постоје и научни докази који истичу *ex vivo* спазмолитички ефекат хидроетанолног екстракта МО на различите делове дигестивног тракта, а најбољи ефекат показан је на танком цреву и то у дозно-зависном маниру (јејунум и илеум). Претпоставља се да и ови ефекти потичу од фенолних компоненти, на првом месту розмаринске киселине (49). Поред тога, претходно је потврђено да и етарско уље МО, као и његова главна компонента цитрал, релаксантно делује на илеум пацова (50).

1.1.4.3. Антимикробни ефекти МО

До сада су описани различити антимикробни ефекти МО, антибактеријски и антивирусни. *In vitro* студије откриле су значајно антимикробно дејство МО етарског уља против *S. typhimorium*, *E. coli*, *L. monocytogenes* и *S. aureus*, док екстракти МО правасходно делују против *S. lutea*, *S. aureus* и *B. cereus* (24).

Такође постоје докази о антивирусним ефектима МОЕ у врло раној фази инфекције херпес симплекс вирусом тип 1 (HSV-1) (51). Резултати *in vitro* студије сугеришу да МО делује као потентни вируцид против HSV-1 чак и у веома ниској концентрацији. Такође, претпоставља се да розмаринска киселина доприноси овом антивирусном ефекту (52). Етарско уље матичњака делује на вирус пре него што се адсорбује за површину ћелије, тако да није ефикасно након продирања вируса у ћелију домаћина. Коначно, узимајући у обзир да етарско уље матичњака може да продре у кожу, захваљујући својој липофилној природи важно је напоменути да уље МО може бити корисно за локални третман херпетичне инфекције (53).

1.1.4.4. Антитуморски ефекти МО

Бројне *in vitro* студије показале су антипролиферативна својства различитих МО екстраката. Тако су на пример, *Esfahlan* и сарадници показали цитотоксична својства хидроалкохолног екстракта МО на ћелијске линије карцинома А549 (ћелије карцинома плућа MCF-7 (ћелије аденокарцима дојке), SKOV3 (ћелије карцинома јајника), и РС-3 (ћелије аденокарцинома простате) (54). Додатно, постоје и докази о цитотоксичним ефектима екстракта МО на карцином дојке и карцином дебелог црева (43). Ови цитотоксични ефекти МО посредовани су инхибицијом пролиферације, индукцијом смрти ћелија карцинома апоптозом зависном од каспаза и инхибицијом ћелијске миграције. Сматра се да је розмаринска киселина заправо одговорна за антимиграциони ефекат екстраката МО на ћелије колоректалног карцинома (55-57).

1.1.4.5. Ефекти МО на липидни статус

Пошто је познато да су хиперлипидемије један од најважнијих фактора за развој кардиоваскуларних болести, велики напор је уложен у развијање превентивних

стратегија укључујући фитоисхрану. Постоје докази о бенефитима примене матичњака на липидни статус. Наиме, студије су показале да свакодневно конзумирање чаја матичњака може довести до побољшања метаболичких параметара у виду смањења концентрације липида у серуму и смањења липидне пероксидације. Иако механизам којим матичњак индукује снижење липида није довољно разјашњен, претпоставља се да је присуство кверцетина одговорно за овај фармаколошки ефекат (58). Метаболички ефекти матичњака потврђени су и клиничким студијама, где је показано да тромесечна примена екстракта у вишим дозама (700 mg/kg) доводи до побољшања АроА-I, Аро В, индекса липида и да на тај начин доприноси контроли дијабетеса тип 2, и превенцији и успоравању прогресије кардиоваскуларних компликација ове болести (59).

1.1.4.6. Хипогликемијски ефекти МО

Додатно, у литератури су описани повољни ефекти примене ове биљке на гликемију. Тако на пример, дневни унос у малим дозама побољшава толеранцију на глукозу и прилагођава експресију гена укључених у глуконеогенезу у јетри (60). У једној анималној студији показано је да екстракт матичњака ALS-L103 такође ублажава инфламацију панкреаса смањењем инфилтрације панкреаса CD68+ макрофагима и мастоцитима и смањењем продукције проинфламаторних маркера IL-6 и CD68. Поред тога, аутори су доказали да применом овог екстракта долази до смањења повишеног нивоа глукозе и губитка ћелија панкреаса (61). Заједно, ови механизми доприносе хипогликемијским својствима ове биљке и потенцијалним бенефитима примене матичњака код људи са дијабетесом тип 2 (60, 61).

1.1.4.7. Антиоксидациони ефекти *M. officinalis*

Последње две деценије екстензивно су истраживани механизми благотворних ефеката *M. officinalis*, а као један од основних наводе се изражена антиоксидациона својства ове биљке, као и њених различитих формулација, укључујући етарско уље, екстракте, инфузе, тинктуре (8, 51). Многобројни докази спроведених истраживања говоре у прилог тврдњи да матичњак, а нарочито екстракти матичњака делују као чистачи слободних радикала и издвајају ову биљку као значајан природни извор антиоксидационих једињења (62). С обзиром да оксидациони стрес посредује у патогенези многобројних акутних и хроничних болести попут кардиоваскуларних, неуродегенеративних, метаболичких, карцинома и других, од круцијалног је значаја проналажење и употреба потентних и безбедних антиоксиданаса природног порекла. Постоји неколико основних механизма дејстава антиоксиданаса и то: деловање као редукциони агенси, чистачи слободних радикала, потенцијални хелатори прооксидационих метала и као неутрализатори синглетног кисеоника (63). Досадашња истраживања проучавала су антиоксидациони потенцијал екстраката матичњака коришћењем *in vitro* антиоксидационих тестова и *in vivo* коришћењем анималних модела различитих болести.

Антиоксидациони потенцијал различитих МО екстраката доказан је првенствено коришћењем *in vitro* антиоксидационих тестова, попут тестова за испитивање капацитета неутрализације DPPH радикала, хидроксил радикала, азот монооксида, супероксид анјон радикала, водоник пероксида, као и FRAP теста (64). Још 2008. анализирани су антиоксидациони ефекти различитих екстраката матичњака са територије Србије (водени, n-бутанолни, хлороформски, етарски, етил-ацетатни), а резултати овог истраживања сугеришу да се максимални капацитет неутрализације DPPH радикала, хидроксил радикала, липидног перокси радикала постижу n-

бутанолним екстрактом при концентрацији од 0,4 mg/ml, док хлоформски и етарски етарски екстракт нису уопште показали антиоксидационе особине (5). *Pereira* и сарадници су доказали супериорнији капацитет неутрализације DPPH радикала екстрактима МО (водени, етанолни и метанолни) у односу на екстракте *M. recutita* и *C. citratus*, при чему се капацитет неутрализације етанолног, метанолног и воденог екстракта МО није значајно разликовао (65). Додатно, друга група истраживача дошла је до сличних закључака. Они истичу да су етанолни екстракти матичњака пореклом из Румуније показали одличну способност неутрализације DPPH радикала, при чему се издваја бољи потенцијал етанолног екстракта листа матичњака у односу на екстракт стабљике матичњака. Најбољи ефекат постигнут је концентрацијама 10, 5, и 3 mg/mL (% инхибиције 91,43%, 93,36% и 91,96%) слично стандарду аскорбинској киселини (44, 66). Друге студије су пак истраживале утицај различитих услова екстракције на антиоксидациони потенцијал екстракта МО и дошли до закључка да етанолни екстракт добијен течном екстракцијом под притиском има бољи капацитет неутрализације DPPH, као и антиоксидативни капацитет одређен TEAC тестом у односу на ензимски потпомогнуту екстракцију (67). Слични резултати добијени су и анализом етанолног екстракта матичњака пореклом из Италије, бољи капацитет неутрализације DPPH у односу на бутанолни екстракт (29). Недавна студија истакла је снажан антиоксидациони потенцијал етанолног екстракта матичњака пореклом из Румуније што је потврђено помоћу три антиоксидациона теста: капацитет неутрализације DPPH и ABTS радикала, као и FRAP тестом (68). Група истраживача поредила је антиоксидативни потенцијал лиофилизованог инфуза, *in vitro* културе, и комерцијалних препарата матичњака (гранулат или кесице) при чему докази говоре у прилог већем капацитету неутрализације DPPH радикала, инхибиције формирања TBARS, инхибицији избељивања β -каротена, и редукционе моћи комерцијалних препарата матичњака, највероватније услед концентрованијег састава активних састојака (већи фенолни и флавоноидни садржај) (32). Сви доказани ефекти приписују се богатом садржају фенолних и флавоноидних компоненти, а на првом месту розмаринске киселина, хлорогене, урсолне, цинамичне, као и кверцетина, рутина, катехина, епикатехина, и њиховом синергистичком ефекту.

Благотворни ефекти различитих екстраката МО на системски редокс статус у кардиоваскуларним и неуролошким болестима су потврђени у *in vivo* анималним студијама. Ови ефекти посредовани су повећањем активности антиоксидационих ензима каталазе (CAT) и супероксид-дизмутазе (SOD), као и глутатиона, и неутрализацијом тј. смањењем концентрације прооксиданаса попут супероксид анјон радикала, водоник-пероксида, модулацијом NO-зависних путева, смањењем производа липидне пероксидације TBARS и малондиалдехида (MDA) (69-72).

Антиоксидациони ефекти инфуза матичњака потврђени су и у клиничкој студији, при чему је доказано да једномесечна примена матичњака код људи дуготрајно изложених ниском јонизујућем зрачењу значајано побољшава параметре антиоксидационе заштите (SOD, CAT, GrX) и смањује оксидационо оштећење ДНК (8-OH-dG), као и липидну пероксидацију. Додатно, показано је да примена комерцијалног препарата матичњака током 8 недеља у дозном режиму 3 g/дан има повољне ефекте на редокс, инфламаторни и липидни статус код пацијената са стабилном ангином пекторис. Након суплементације, забележено је значајно снижење прооксиданса MDA, маркера липидне пероксидације и пораст концентрације параксоназе 1 (PNO1) која представља ензим важан за функцију HDL и детоксификацију од оксидационих медијатора (73) (Табела 3).

Табела 3. Преглед резултата студија које су проучавале антиоксидациона дејства екстраката *M.officinalis* *in vitro* и *in vivo*.

Референца	Тип студије	Метода	Порекло <i>M.officinalis</i>	Формулациј а <i>M.officinalis</i>	Резултат
Canadanovi ć-Brunet et al. 2008 (5)	<i>In vitro</i>	Одређивање капацитета неутрализације DPPH• Одређивање капацитета хватања ОН• Капацитета хватања липидног перокси радикала	Србија	Водени n-бутанолни хлороформски и етарски етил-ацетатни екстракт	Дозно-зависни ефекти, максимални капацитет показао n-бутанолни екстракт
Pereira et al. 2009 (65)	<i>In vitro</i>	Одређивање капацитета неутрализације DPPH•	-	Водени Етанолни метанолни екстракт	IC ₅₀ =32,9 ± 1,2 µg/mL IC ₅₀ =28,2 ± 0,4 µg/mL IC ₅₀ =24,3 ± 2,1 µg/mL
Moacă et al. 2018 (44)	<i>In vitro</i>	Одређивање капацитета неутрализације DPPH•	Румунија	Етанолни екстракт листа Етанолни екстракт стабљике	IC ₅₀ =0,66 ± 0,01 mg/mL IC ₅₀ =10,27±0,45 mg /mL
Miron et al. 2013 (67)	<i>In vitro</i>	Одређивање капацитета неутрализације DPPH• TEAC тест - одређивање неутрализације АВТС•	Шпанија	Водени и Етанолни екстракт	EC ₅₀ =8,09± 0,29 µg/mL TEAC=2,53 ± 0,03 mmol/g
Mencherini et al. 2007 (27)	<i>In vitro</i>	Одређивање капацитета неутрализације DPPH•	Италија	Водено-етанолни екстракт Бутанолни екстракт	EC ₅₀ =18,5± 3,0 µg/mL EC ₅₀ =15,2± 2,2 µg/mL
Luta et al. 2022 (68)	<i>In vitro</i>	Одређивање капацитета неутрализације DPPH• Одређивање неутрализације АВТС• FRAP тест	Румунија	Водено-етанолни екстракт	IC ₅₀ =0,042 mg/mL IC ₅₀ =0,025 mg/mL IC ₅₀ =0,591 mg/mL
Spiridon et al. 2011 (66)	<i>In vitro</i>	Одређивање капацитета неутрализације DPPH• Тотални антиоксидативни капацитет	Румунија	Лиофилизовани метанолни екстракт	IC ₅₀ =87,28 µg/mL 108 ±6,33 mg AA/g

Dias et al. 2012 (32)	<i>In vitro</i>	Одређивање капацитета неутрализације DPPH• одређивање редукционе способности инхибиција избељивања β-каротена инхибиција формирања TBARS	Португал	Лиофилизовани инфузи Комерцијални препарат	EC50=0,19 ±0,01mg/mL EC50=0,08 ±0,00mg/mL EC50=0,38 ±0,05mg/mL EC50=0,03 ±0,00mg/mL EC50=0,08±0,00mg/ mL EC50=0,04±0,00mg/ mL EC50=0,16 ±0,01mg/mL EC50=0,01 ±0,00mg/mL
Hamza et al. 2016 (69)	<i>In vivo</i>	Спектрофотометријски	Сирија	Етанолни екстракт, 250, 500, и 750 mg/kg <i>per os</i> 10 дана	↓MDA ↓TOC ↑SOD
Sedighi et al. 2019 (70)	<i>In vivo</i>	Спектрофотометријски	Иран	Етанолни екстракт, 25, 50, и 100 mg/kg <i>per os</i> 14 дана	↓MDA ↑SOD
Joukar et al. 2016 (72)	<i>In vivo</i>	Спектрофотометријски	Иран	Водени екстракт, 50, 100, и 200 mg/kg <i>per os</i> 7 дана	↓MDA
Draginic et al. 2022 (74)	<i>In vivo</i>	Спектрофотометријски	Србија	Етанолни екстракт 50, 100 и 200 mg/kg <i>per os</i> 7 дана	↓TBARS
Zeraatpishe et al. 2011 (75)	Клиничка студија	ELISA	Иран	Инфузи 1,5g/100ml <i>Per os</i> 30 дана	↑SOD ↑CAT ↑Gpx ↓LPO ↓8-OH-dG
Javid et al. 2018 (73)	Клиничка студија	ELISA	Иран	Капсула 3 g/дан <i>Per os</i> 8 недеља	↓MDA ↑PON1

DPPH• - 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикал; OH• - хидроксил радикал; TBARS – реактивни продукти тиобарбитурне киселине; ABTS• - 2,2-азинобис-(3-етилбензотиазолин-6-сулфонат); FRAP тест – антиоксидациони тест редукције гвожђа; TEAC- Trolox еквивалент антиоксидациони капацитет; SOD- супероксид димутаза; CAT-каталаза; MDA- малондиалдехид; GrX-глутатион пероксидаза; TOC- тотални антиоксидациони капацитет; LPO-липидна пероксидација; 8-OH-dG – 8-оксо-2-деоксогуанозин.

1.1.5. Антиинфламаторни ефекти *M. officinalis*

Процес инфламације подразумева покретање комплексне мреже различитих медијатора, ћелија и вишеструких сигналних путева. Сматра се да је инфламација један од уобичајених ентитета у већини акутних и хроничних болести и може се издвојити као један од главних узрока морбидитета у данашњој ери модерног начина живота. Уколико није адекватно контролисана, инфламација може довести до развоја многих болести попут аутоимунских, кардиоваскуларних, реуматоидног артритиса, инфламаторних болести црева, дијабетес мелитуса, различитих карцинома, Алцхајмерове болести, и других (76). Актуелна терапија инфламаторних болести је ограничена и подразумева примену нестероидних антиинфламаторних лекова и кортикостероида. Код хроничне употребе ових лекова настају озбиљни нежељени ефекти попут гастроинтестиналних, кардиоваскуларних и бубрежних абнормалности, при чему се губи и ефикасност. Стога, данас постоји велика потреба за истраживањем нових потенцијалних антиинфламаторних агенаса са селективним деловањем и мањом токсичношћу. Фитофармацеутици (биљке, биљни продукти, као и изоловане компоненте биљака) представљају обећавајуће изворе нових антиинфламаторних средстава захваљујући многим повољним аспектима попут безбедности, ефикасности, биокомпатибилности и економске исплативости (77). Велики антиинфламаторни потенцијал *M. officinalis* екстракта је очекиван јер је састављен од мешавине биоактивних једињења за које је познато да делују антиинфламаторно у различитим стањима. До сада је потврђен *in vivo* антиинфламаторни потенцијал етарског уља и воденог екстракта матичњака коришћењем модела карагенином индукованог едема шапице пацова (78, 79). Антиинфламаторни потенцијал етарског уља матичњака у дозама од 200 mg/kg и 400 mg/kg је испитиван у студији спроведеној од стране *Bounihi* и сарадника, при чему је истакнуто значајно смањење карагенином изазваног едема шапице пацова, које је супериорније у односу на стандардни антиинфламаторни лек индометацин. Иако овај модел није адекватан за проучавање механизма испољеног антиедематозног ефекта, претпоставља се да су цитрали компоненте етарског уља које углавном посредују у овом ефекту инхибицијом синтезе и ослобађања TNF- α (78). Додатно, показано је да водени екстракт матичњак у дозама од 50, 100, 200 и 400 mg/kg инхибира формирање едема шапице индукованог и карагенином и хистамином, указујући на мултипли антиинфламаторни механизам: смањење лучења хистамина (инфламаторног медијатора који повећава васкуларну пермеабилност и делује вазодилататорно) и инхибиција циклооксигеназних и липооксигеназних путева (79). Недавна студија бавила се *in vivo* испитивањем акутног и хроничног антиинфламаторног потенцијала водено-метанолног екстракта матичњака пореклом из Египта, коришћењем два анимална модела на пацовима: грануломски тест индукован памучним пелетом за проучавање хроничног антиинфламаторног ефекта и карагенином индукован едем шапице за испитивање акутног антиинфламаторног ефекта, а као стандард коришћен је диклофенак-натријум. Аутори су показали да је метанолни екстракт МО значајно редуковао средње тежине памучних пелета након 7 дана примене, што указује на инхибицију формирања грануломског ткива, тј. инхибицију пролиферативне фазе инфламације, при чему је овај ефекат био скоро једнак дејству стандарда диклофенак-натријума (80). Такође, доказано је да примена екстракта матичњака може деловати антиинфламаторно у различитим патологијама, смањењем продукције проинфламаторних цитокина IL1, IL6, TNF- α (81, 82). Може се претпоставити да укупни антиинфламаторни потенцијал биљке потиче од њених компонената, и то пре свега розмаринске киселине као најзаступљеније, заједно са

другим фенолним и флавоноидним компоненатама попут кверцетина, лутеолина, урсолне киселине, хлорогене киселине и других (62).

1.1.6. Антиапоптотски ефекти *M. officinalis*

Утицај МО на апоптозу испитиван је како *in vitro*, на ћелијским линијама различитих карцинома (Поглавље 1.1.4.4.), тако и *in vivo* у различитим анималним моделима. Hamza и сарадници истакли су антиапоптотски ефекат етанолног екстракта МО у моделу доксорубицином-индуковане кардиотоксичности пацова. Наиме, доказано је да десетодневна *per os* примена МОЕ у дозама од 250, 500 и 750 mg/kg дозно-зависно смањује експресију проапоптотских протеина Вах и каспазе-3, чија је експресија индукована применом доксорубицина (69). Постигнут антиапоптотски ефекат може се приписати способности МОЕ да ефикасно уклањања слободне радикале, јер појачана продукција РОС (оксидациони стрес) може индуковати унутрашњи (митохондријски) пут апоптозе. С обзиром да и самостално примењена розмаринска киселина делује антиапоптотски на кардиомиоците у моделу доксорубицином индуковане кардиотоксичности, може се претпоставити да антиапоптотска својства МО на миокард потичу управо од ове компоненте (83). Антиапоптотска својства розмаринске киселине показана су и у моделу I/R повреде изолованог срца пацова након акутне примене 10 μ M ове компоненте. Претпоставља се да ово перкондиционирање миокарда розмаринском киселином штити миокард од I/R повреде инхибицијом апоптозе и инфламације, а главни механизам јесте активација PPAR γ и инхибиција NF κ B сигналног пута (84). Антиапоптотски ефекти МО описани су и код неуродегенеративних болести, где је један од механизма неуропротекције заправо супресија апоптозе. Тачније, показано је да примена етанолног МОЕ (50 и 75 mg/kg) током две недеље у *in vivo* моделу депресије и анксиозности код мишева значајно редукује експресију проапоптотских маркера Вах и каспазе-3, а повећава експресију антиапоптотског маркера Bcl-2 у узорцима хомогената префронталног кортекса и хипокампуса (85).

1.1.7. Кардиоваскуларни ефекти *M. officinalis*

Узевши у обзир добро позната својства МО на рад срца и дугогодишњу традиционалну употребу у сврху лечења палпитација, предмет великог броја истраживања (*in vitro*, *in vivo*, и *ex vivo*) био је испитивање кардиопротективних ефеката ове биљке и њених екстраката у различитим кардиоваскуларним болестима, као и расветљавање могућих механизма који посредују у овим ефектима (Схема 1). Сходно резултатима ових студија, показано је да МО поседује антиаритмогена својства, хипотензивно дејство, кардиопротективни ефекат код исхемијско-реперфузионе повреде миокарда и кардиотоксичности индуковане доксорубицином (8, 62). Почетна истраживања била су оријентисана на проучавање ефекта МО на аритмије, и то коришћењем Лангендорфове технике изолованих срца пацова. Том приликом је утврђено је да акутна примена воденог МОЕ у изолованом срцу пацова индукује негативан хронотропни ефекат, без промене контрактилне силе. Мултипли механизми покренути полифенолима биљака могу се сматрати одговорним за ове ефекте, као што је стимулација мускаринских M₂ рецептора у срцу и/или блокада волтаж-зависних калцијумових канала која доводи до брадикардије (86). Међутим, овај ефекат није потврђен у каснијој студији Joukar и сарадника, вероватно због различитог модела исхемијско-реперфузионе повреде (И/Р), *in vivo* (лигација леве десцендентне коронарне артерије (LAD)) у односу на претходно коришћен модел изолованог срца пацова *ex vivo*. Применом овог модела, уочен је слабији антиаритмогени ефекат воденог екстракта МО у поређењу са стандардним

антиаритмиком амјодароном. Примена екстракта матичњака индуковала је спорију електричну проводљивост у срцу уз делимично продужење PR и QTc на електрокардиограму (ЕКГ), и смањену осетљивост на вентрикуларне аритмије (фибрилација) и побољшање крвног притиска, посебно у дози од 200 mg/kg (87). Годину дана касније, проучаван је ефекат осмодневне конзумације воденог екстракта МО у три различите дозе (50, 100 и 200 mg/kg) на ЕКГ и електрофизиологију срца пацова. Доказано је да је примена МО повезана са продуженим QRS, QTc, JT и TrTe интервалом на дозно-зависни начин, без промена PP интервала, PR интервала, амплитуде ЕКГ таласа, срчане фреквенце и крвног притиска. Међутим, у вишим дозама МО може деловати и проаритмогено, индуковањем ране деполаризације која може повећати ризик од вентрикуларних екстрасистола, феномена поновног уласка импулса и аритмије *torsade de pointes* (88, 89). Кардиопротективни ефекти екстракта МО изучаван је у добро познатом моделу инфаркта миокарда изазваног изопротеренолом, при чему је установљено да је од великог значаја дозирање овог екстракта. Наиме, доказано је да ниже дозе екстракта МО (50 и 100 mg/kg) обезбеђују бољу кардиопротекцију и то смањењем артеријског крвног притиска и срчане фреквенце, као и побољшањем редокс статуса кроз смањење концентрације штетног продукта липидне пероксидације малондиалдехида (MDA). Ова студија је и пружила увид у аспекте безбедности примене МО, јер је висока доза (200 mg/kg) довела до интензивирања повреде срца изазване изопротеренолом у условима исхемије миокарда, као последица повећане контрактилности срца и повећане потребе миокарда за кисеоником, а самим тим и већим ризиком од повреда миокарда (72). Такође је у једној студији истакнут снажан кардиопротективни ефекат етанолног екстракта МО у *in vivo* моделу регионалне исхемије срца пацова (LAD модел) (70). Двонедељна примена овог екстракта *per os* довела је до смањења величине инфаркта, смањења инциденце вентрикуларне тахикардије и епизода вентрикуларних ектопичних откуцаја, и срчане фреквенце током исхемије. Постигнути антиаритмогени ефекти били су дозно-зависни, при чему је доза од 100 mg/kg била најефикаснија. До сличних резултата дошла је и друга истраживачка група која је користила модел аритмија изазваних CaCl₂ код *Sprague-Dawley* пацова. Опет, двонедељна конзумација екстракта МО смањила је срчану фреквенцу и инциденцу вентрикуларне тахикардије, вентрикуларне фибрилације и вентрикуларних екстрасистола, посебно у вишој дози од 200 mg/kg (90). Додатно, доказано је и својство МОЕ да очува срчану функцију и морфологију у моделу кардиотоксичности изазване доксорубицином и то механизмом модулације оксидационог стреса, као и редуковањем инфламације и апоптозе у миокарду пацова. Изненађујуће, оптимална кардиопротекција постигнута је високом дозом од 750 mg/kg, што указује на велики терапијски индекс МО (69).

Поред наведених кардиопротективних својстава, такође су изучавани и ефекти ове биљке на крвне судове. Иницијално истраживање спроведено 2008. године је показало вазорелаксатна својства воденог екстракта МО на моделу изолованих аортних прстенова пацова. Ова релаксација је ендотел-зависна, а у њеној основи су покретање превасходно NO-зависног пута, али су укључени и EDHF (ендотелни хиперполаришући фактор) и простаглицински путеви (91). Претпоставља се да је цитрал главна компонента која доприноси овом ефекту блокадом калцијумских канала у аорти (92). Међутим, постоје докази да најзаступљенији фенолни састојак, розмаринска киселина, самостално примењена у моделу изоловане аорте такође индукује дозно-зависни вазорелаксатни ефекат (91). Скоро деценију касније, истакнут је цитопротективни ефекат етанолног екстракта МОЕ на H₂O₂-индуковано оксидационо оштећење хуманих умбиликалних васкуларних ћелија (HUVECs). Претпостављени механизми за ове ефекте су антиоксидациони ефекат (уклањање

супероксид анјон радикала, инхибиција оксидације липопротеина мале густине (LDL) у ендотелним ћелијама хумане аорте) и антиангиогенетски ефекат путем експресије H_2O_2 -зависног ендотелног фактора раста и ослобађања интерлеукина 8 (IL-8) из ендотелних ћелија и инхибиције пролиферације, миграције и адхезије HUVECs (93, 94). Иако су клинички подаци о кардиоваскуларним бенефитима употребе МО и различитих формулација ограничени, постоји неколицина охрабрујућих резултата нових клиничких испитивања. Сprovedено је двоструко слепо, рандомизирано, плацебо контролисано испитивање ефикасности и безбедности традиционалне употребе матичњака у третману палпитација. Утврђено је да двонедељна конзумација лиофилизованог воденог екстракта (500 mg; два пута дневно) смањује епизоде палпитација срца за 36% у поређењу са плацебо групом, при чему није било забележених нежељених ефеката (95). Други доступни резултати клиничких испитивања тичу се утицаја МО на кардиометаболичке параметре, као што су липидни статус, гликемија и инфламаторни статус, тј. фактора који промовишу кардиоваскуларни ризик код пацијената са дијабетесом (59). Примећено је да примена МО побољшава односе липида, липопротеина високе густине (HDL), триглицерида (TG), нивое Ц-реактивног протеина високе осетљивости (hs-CRP), као и систолни и дијастолни крвни притисак, чиме се спречава кардиоваскуларни ризик код ове популације пацијената. Важно је напоменути да су ови ефекти постигнути већом дозом МО (700 mg, 2 × дневно, *per os*) и дужом употребом него за палпитације (3 месеца). Без обзира на дужу примену, такође нису пријављене нежељене реакције зависне од дозе (59, 96).

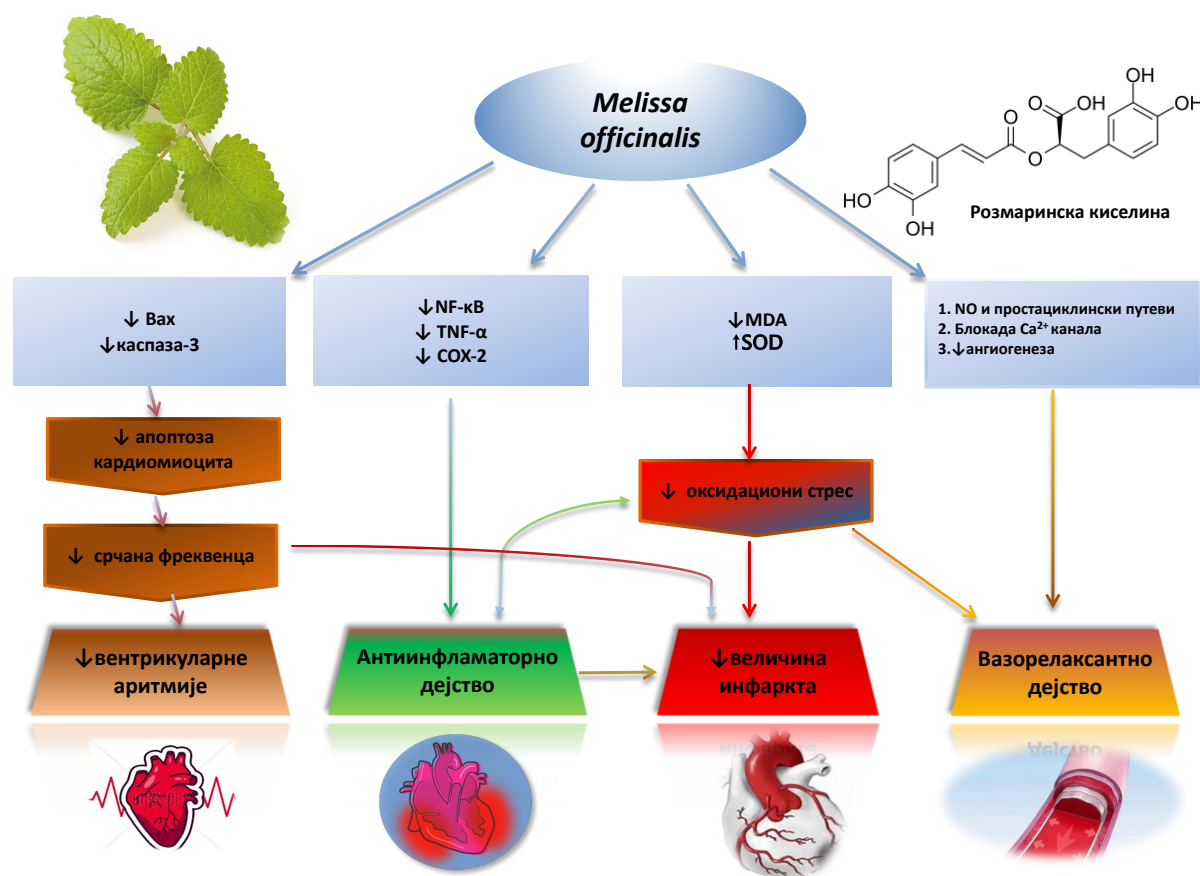


Схема 1. Схематски приказ кардиопротективних својстава *M. officinalis*.

1.2. Миокардитис

1.2.1. Дефиниција, етиологија и епидемиологија миокардитиса

Миокардитис представља инфламаторну болест срчаног мишића која може бити различите етиологије, превасходно инфективне или неинфективне. Према *Dallas* критеријумима миокардитис се дефинише као инфламаторна болест миокарда, која се карактерише присуством инфламаторног инфилтрата неискхемијског порекла у ткиву миокарда, повезаног са дегенерацијом и/или некрозом кардиомиоцита. Најчешћи узрочници инфективног миокардитиса су вируси попут коксаки вируса (CVB3), парвовируса, аденовируса, цитомегаловируса (CMV), вируса хумане имунодефицијенције (HIV), корона вируса (SARS-CoV2). Међутим и одређене бактерије могу бити узрочници овог стања попут *B. burgdorferi* (узрочник Лајмске болести), микобактерије, *S. pyogenes*, *H. influenzae*, *C. diphtheria*, *N. meningitidis*, *Salmonella*, *M. pneumoniae*, *C. psittaci*, као и гљивице *Aspergillus*, *Candida*, *Coccidioides*, *Cryptococcus*, *Histoplasma* и протозоа *T. cruzi* (узрочник Шагасове болести). С друге стране, неинфективни миокардитис настаје као последица токсичног дејства одређених супстанци (токсин паука, кокаин, антрациклини), хиперсензитивности на одређене лекове (клозапин, цефалоспорини, сулфонамиди, трициклични антидепресиви, нестероидни антиинфламаторни лекови и др.) или активације аутоимунског одговора на срчане аутоантигене (миозин, тропонин), затим у склопу неке системске аутоимунске болести (Системски лупус, Сјогренов синдром) или као засебни ентитет, миокардитис циновских ћелија (*Giant cell myocarditis*) (97, 98). Према подацима Међународног друштва кардиолога од миокардитиса годишње оболи око 1,8 милиона пацијената, при чему се сматра да преваленца зависи од старосне доби јер пацијенти старости између 20 и 44 године чешће обољевају. Процењено је да је инциденца миокардитиса већа код мушкараца (6,1/100000 мушкараца и 4,4/100000 жена) (99, 100), док је глобална преваленца миокардитиса 22 на 100 000 (податак из 1990-2013) (101), и има тенденцију даљег пораста (102). Миокардитис представља глобални здравствени проблем, услед широког спектра клиничких симптома и знакова, најчешће неспецифичних који се преклапају са другим кардиоваскуларним патологијама, па се често не дијагностикује на време, или уопште. Последице овог стања могу бити веома озбиљне и опасне по живот пацијента, акутни миокардитис може индуковати леталне вентрикуларне аритмије и кардиогени шок, док пролонгирана инфламација миокарда води ка развоју дилатативне кардиомиопатије (ДКМ) леве коморе. У хроничној фази, ДКМ доводи до срчане слабости и најчешће захтева трансплантацију срца. Чак 30% ДКМ неискхемијског порекла заправо потичу од последица миокардитиса. Забрињавајући је и податак да је миокардитис чест узрок изненадне срчане смрти код младих (6 – 10 % аутопсија) (103). Епидемиолошке студије показале су да полне разлике утичу на карактеристике, ток и исход миокардитиса. Наиме, доказано је да мушкарци чешће обољевају од жена, као и да је ризик и вероватноћа тежег исхода већи код мушкараца, док је ризик од леталног исхода или трансплантације срца код жена много ређи (104, 105). Разлог овоме могу бити разлике у урођеном имунском одговору код жена у односу на мушкарце (106, 107), као и протективна својства женских полних хормона (108). Такође, показано је да жене испољавају појачан Th2 заштитни имунски одговор, повећан ниво Б-лимфоцита, CD4⁺ Т-лимфоцита и Т- регулаторних ћелија (T_{reg}), за разлику од мушкараца где доминира Th1 имунски одговор, појачана инфламација, повећан број макрофага и мастоцита и неутрофила (106, 107).

1.2.2. Врсте миокардитиса

На основу тока болести миокардитис може бити акутни и хронични, на основу етиологије инфективни или неинфективни, док се на основу налаза хистопатолошког налаза миокардитис класификује на: акутни лимфоцитни, хронични лимфоцитни, миокардитис циновских ћелија, саркоидни и еозинофилни миокардитис. Врло често се симптоми преклапају, па је коначна дијагноза могућа тек након ендомиокардијалне биопсије и имунохистохемијских анализа (109, 110).

Акутни лимфоцитни миокардитис се сматра најчешћим типом миокардитиса, а главни узрок јесте инфективне природе, и то пре свега инфекција коксаки вирусом В3 (СВВ3) и инфекција аденовирусом. Хистопатолошки се одликује превасходно масовном инфилтрацијом Т-лимфоцита у ткиву миокарда, без или уз минималну фиброзу миокарда. Додатно, за дијагнозу је неопходна и имунохистохемијска потврда CD3⁺ и присуство локализованих инфилтрата CD68⁺ макрофага (109, 111).

Хронични лимфоцитни миокардитис настаје преласком акутног лимфоцитног миокардитиса у хроничну фазу и карактерише се присуством запаљењског инфилтрата и фиброзом миокарда, која настаје као последица хроничне инфламације (112).

Миокардитис циновских ћелија (*Giant cell* миокардитис) се сматра најозбиљнијом формом миокардитиса са најлошијом прогнозом и током болести. Процењено је да чак 80% ових пацијената развија ДКМ, а најчешће ово стање захтева трансплантацију срца у прве 4 године код 10% пацијената, без обзира на примену имуносупресивне терапије. Миокардитис циновских ћелија најчешће настаје као последица аутоимунског процеса на срчане аутоантигене (нпр. миозин, тропонин), али такође у мањем броју случајева може бити асоциран са системским аутоимунским болестима. Хистопатолошки, ова форма миокардитиса се одликује присуством дифузног или мултифокалног инфламаторног инфилтрата превасходно сачињеног од CD68⁺ макрофага и Т-лимфоцита, као и присуством некрозе, а специфична карактеристика јесте појава мултинуклеарних гигантских ћелија (113). Врло често су присутни и еозинофили, па је неопходна адекватна диференцијална дијагноза у односу на еозинофилни облик миокардитиса (114, 115). Данас највише коришћени анимални модел миокардитиса експериментални аутоимунски миокардитис (ЕАМ) мимикује управо ову форму миокардитиса.

Саркоидни миокардитис представља ентитет који настаје у склопу саркоидозе, системске идиопатске болест на граници између аутоимуноске и аутоинфламаторне болести. Карактерише се дисфункцијом антиген презентујућих ћелија (АПЋ), а хистопатолошки налаз миокарда одликује се грануломатозним лезијама и екстензивном инфилтрацијом активираних макрофага. Ова хронична инфламација доводи до оштећења кардиомиоцита, без некрозе. Поред срца, ове промене најчешће захватају и друге органе као што су плућа и бубрези. Сматра се да 5-25% пацијената са саркоидозом развија саркоидотични миокардитис (109, 116, 117).

Еозинофилни миокардитис, као што и назив каже, карактерише се запаљењским инфилтратом миокарда и ендокарда у коме доминирају еозинофили, као и фиброзом миокарда (109, 118). Може се јавити засебно, као примарна болест аутоимунског порекла, али може бити и последица патолошких хипереозонофилних стања попут примарне идиопатске еозинофилије, инфективне хроничне еозинофилије или као последица примене одређених супстанци (суматриптан) (119). Поред стандардних срчаних симптома и знакова, код еозинофилног миокардитиса је карактеристично да чак трећина пацијената има алергијске болести (астма, ринитис, дерматитис), док две трећине пацијената испољавају и симптоме сличне грипу (кашаљ, бол у грлу,

дрхтавица, грозница). Овај тип миокардитиса такође се карактерише лошом прогнозом и лошим одговором на имуносупресивну терапију (109).

1.2.3. Клиничка слика и дијагноза миокардитиса

Кардиоваскуларни симптоми и знаци миокардитиса су изразито хетерогени и неспецифични, и зависе од степена инфламације миокарда и дисфункције комора, тако да могу бити и субклинички. Као последица тога, ова болест често бива непрепозната или погрешно дијагностикована (120, 121). Најчешће се описују симптоми попут диспнеје, бола у грудима, палпитација или аритмија. Међутим неретко су пацијенти са миокардитисом и потпуно асимптоматски (нпр. у случају вирусног миокардитиса, респираторни или гастроинтестинални симптоми, као и повишени системски инфламаторни маркери и грозница могу претходити клиничкој презентацији поменутих срчаних знакова и симптома). Миокардитис се може манифестовати и палпитацијом, синкопом, па чак и изненадном смрћу која може бити последица новонастале атријалне или вентрикуларне тахиаритмије или брадиаритмије (122). У хроничној фази, миокардитис најчешће прогредира до инфламаторне ДКМ са симптомима хроничне срчане инсуфицијенције или новонастале акутне срчане инсуфицијенције (123).

У ехокардиографском налазу ових пацијената присутна је смањена ејекциона фракција, док се на електрокардиограму може уочити елевација ST сегмента и срчани блок. Међутим, ове методе нису довољне за предикцију миокардитиса. Повишене вредности срчаних ензима у серуму такође могу указивати на оштећење кардиомиоцита, али опет то није довољно за постављање дијагнозе миокардитиса. Ендомиокардијална биопсија се данас сматра златним стандардом у дијагностици миокардитиса (109, 121). Према Далас критеријумима постављеним још 1986. године миокардитис подразумева присуство инфламаторног инфилтрата и некрозе или оштећења кардиомиоцита које није исхемијског порекла. Поред тога, дефинисан је и гранични (*"borderline"*) миокардитис који подразумева мање интензиван инфламаторни инфилтрат без микроскопских доказа о деструкцији кардиомиоцита (110, 124, 125). Ови критеријуми су се дуго користили у клиничкој пракси, међутим услед грешака током узорковања, варијација у стручној интерпретацији, данас су Далас критеријуми недовољно адекватни и делимично напуштени. Данас се златним стандардом финалне дијагнозе миокардитиса сматра скуп дијагностичких метода, пре свега ендомиокардијална биопсија уз примену Далас критеријума, затим полимераза ланчана реакција (PCR у циљу идентификовања вирусне ДНК или РНК) и имунохистохемија, и овакав приступ препоручује се пацијентима који имају фулминантни ток или не реагују на емпиријски третман (110). Од 2009. користе се критеријуми LLC (*Lake Louis criteria*) који се односе на карактеристике миокардитиса на магнетној резонанци (MRI), као што су докази о едему, хиперемiji, некрози и фибрози миокарда. Ова метода има високу дијагностичку вредност код пацијената где се на основу клиничког стања сумња на акутни миокардитис. Ови критеријуми су измењени 2018. године, што је додатно побољшало дијагностичке перформансе (126).

1.2.4. Компликације миокардитиса – развој дилатативне кардиомиопатије (ДКМ)

Најчешћа и уједно најтежа последица хроничне инфламације миокарда јесте ДКМ. ДКМ представља дилатацију срчаних комора која узокује систолну дисфункцију (поремећај контрактилне функције) миокарда (127). Сматра се да чак у 30% случајева миокардитис прогредира до ДКМ, док се међу случајевима неисхемијске ДКМ као узрок издваја аутоимунски миокардитис код 9-16% случајева (109). Пацијенти који развију ДКМ имају лошију прогнозу и код њих се може развити срчана инсуфицијенција (стадијум III/IV према Америчком удружењу за срце), која настаје услед услед иреверзибилног оштећења и фиброзе кардиомиоцита и „лечи“ се само трансплантацијом (109, 128, 129). Поред ДКМ, додатне компликације које могу настати као последица оштећења ткива у миокардитису јесу: инсуфицијенција срчаних залистака услед руптуре папиларних мишића; затим аритмије услед оштећења спроводног система срца; феномен поновног уласка импулса услед фиброзе миокарда; као и стимулација адренергичких рецептора аутоантителима (112, 129). Штавише, према Европском друштву кардиолога (ESC) термин ”инфламаторна кардиомиопатија” се користи за хроничну фазу миокардитиса где се дешава прелазак урођеног до стеченог имунског одговора и постоји присуство инфламаторног ћелијског инфилтрата (130). Једна од одлика хроничне форме аутоимунског миокардитиса јесте присуство аутоантитела на срчане аутоантигене (миозин, тропонин, актин, тубулин, митохондријски протеини, мускарински M2 рецептор, β 1-адренергички рецептор, heat-shock протеини). Према подацима клиничких и експерименталних студија, сматра се да су аутоантитела против срчаног β 1-адренергичког рецептора повезана са срчаном дисфункцијом и кардиомиопатијом, као и са тежином болести. Међутим, и даље је неразјашњено да ли пацијенти развијају срчану слабост зато што поседују ова аутоантитела за рецепторе или развијају ова антитела као резултат повреде срчаног ткива. Циркулишућа срчана аутоантитела се *de facto* чешће идентификују код пацијената са миокардитисом који је прогредирао до ДКМ, него код пацијената са неинфламаторним обољењима срца (131, 132).

1.2.5. Хемодинамске алтерације у миокардитису – крвни притисак, срчана фреквенца, ехокардиографски параметри

Процена функције миокарда представља основу за дијагнозу миокардитиса. Сходно томе, најчешће се испитују параметри димензије леве коморе, зидова, септума трансторакалном ехокардиографијом, као и ејекциона фракција, док такође и мерење крвног притиска и фреквенце може бити од користи. Међутим, због интериндивидуалних разлика и потенцијалних преклапања симптома са другим кардиоваскуларним патологијама, за егзактну дијагнозу миокардитиса неопходан је патохистолошки налаз узорка након биопсије миокарда. Знаци и симптоми миокардитиса су хетерогени и недовољно специфични, у зависности од степена инфламације миокарда и вентрикуларне дисфункције. С друге стране, миокардитис може бити субклинички, тако да болест може проћи и непрепозната.

Код пацијената са хроничном срчаном инсуфицијенцијом низак крвни притисак може бити независни предиктор mortalитета и лошег исхода. Наиме, код пацијената са очуваним вредностима ситолног крвног притиска постоје очувани компензаторни механизми, док је код акутно декомпензоване хроничне срчане инсуфицијенције регротовање контрактилне резерве неопходно за одржавање крвног притиска. Међутим, и даље је контроверзно да ли се ова сазнања могу транслатовати и на

пацијенте са суспектним миокардитисом (133, 134). Једна клиничка студија проучавала је повезаност крвног притиска и срчане фреквенце са исходом миокардитиса, при чему је утврђено да су пацијенти са нижим систолним крвним притиском од 115 mmHg, и фреквенцом вишом од 71 откуцаја/мин имали ниже вредности ејекционе фракције леве коморе, лошији налаз биопсије миокарда, као и уједно лошији исход (NYHA III/IV) (134). Срчана фреквенца у аутоимунском миокардитису може варирати. Постоје претклиничке студије где је показано значајно повећање срчане фреквенце 21. дан код имунизованих пацова у односу на здраве, док пак нека клиничка истраживања указују да као компликација миокардитиса могу настати и тахиаритмије и брадиаритмије (135, 136).

Ехокардиографски параметри код миокардитиса могу варирати. У неким случајевима, могућ је нормалан ехокардиографски налаз, док су забележени и случајеви задебљања зидова леве коморе са нормалним димензијама, са или без глобалне систолне и/или дијастолне дисфункције или абнормалности сегментног покрета зида. С друге стране, у хроничној фази миокардитиса може се уочити типичан налаз ДКМ. Код фулминантног миокардитиса лева комора је најчешће недилатирана, задебљаних зидова и хипоконтрактилна. Ехокардиографија може бити корисна у диференцијалној дијагностици миокардитиса, односно у искључивању неких неинфламаторних узрока срчаних знакова и симптома или повезаних стања, на пример, болести срчаних валвула. Међутим, током периода праћења пацијената може доћи до промене систолне функције, величине и дебљине коморе, што захтева ехокардиографске прегледе у више временских тачака (120, 137). Систолна функција је такође важна у предвиђању исхода миокардитиса. На пример, код пацијената са акутним миокардитисом и очуваном систолном функцијом леве коморе је прогноза боља у односу на пацијенте са смањеном систолном функцијом леве коморе (138). Са прогресијом миокардитиса врло често долази до погоршања систолне функције која може прогредирати до ДКМ и резултовати повећаном смртношћу. Детаљно су ехокардиографске промене проучаване у анималним моделима аутоимунског миокардитиса (ЕАМ). Наиме, 21. дан након имунизације достиже се пик болести са знацима срчане инсуфицијенције, а ефекат испитиване терапије се често евалуира транстокракалном ехокардиографијом, јер се на тај начин могу видети и макроскопске и функционалне промене инфламације миокарда. Међутим, пажљиви мониторинг дубине анестезије током извођења ехокардиографије је круцијалан, јер сама анестезија може утицати на хемодинамику и систолну функцију. Стога је пажљиво праћење дубине анестезије неопходно за добијање валидних и поузданих резултата (139). Оно што је карактеристично за ЕАМ, јесте да се 21. дана виде знаци дилатације леве коморе и хипертрофије миокарда. Међутим контроверзно је да ли је увек присутна систолна дисфункција. Наиме, аутори једне студије истичу да ЕАМ није увек повезан са систолном, већ са дијастолном дисфункцијом јер њихови резултати истичу повећање LVAWDd као маркера дебљине зида леве коморе, LVIDd, LVIDs као и масе леве коморе миокарда, уз линеарно смањење EF 21. дана болести у односу на контролну групу, док је систолна дисфункција присутна само прве недеље након имунизације (140).

1.2.6. Патогенеза аутоимунског миокардитиса

Физиолошки, миокард не поседује много имунских ћелија, свега неколико. Међутим, уколико дође до аутореактивне сензибилизације на аутоантигене миокарда (најчешће миозин или тропонин), долази до привлачења и миграције различитих имунских ћелија и регулаторних молекула цитокина у интерстицијумски простор срца, како би се иницирао инфламаторни одговор (141). Патогенеза аутоимунског миокардитиса

карактерише се учешћем урођеног и стеченог имунског одговора (109), који заједно доприносе и иницијацији и одржавању аутореактивности Т-лимфоцита. Сматра се да у овом процесу важну улогу имају аутореактивни Т-лимфоцити, аутоантитела специфична за срце, различити цитокини и хемокини. НК-ћелије (ћелије природне убице) и систем комплемента (121).

1.2.6.1. Стечени имунски одговор у ЕАМ

Преко две деценије истраживања имунопатогенезе ЕАМ указала су на то да је у питању болест посредована CD4⁺ Т-лимфоцитима. Првенствено се сматрало да постоји учешће Th1/Th2 одговора, да би се након открића Th17 истакла и важна улога Th17 лимфоцита у транзицији ЕАМ из акутне у хроничну фазу (**Схема 2**). Познато је да аутоимунске болести зависе пре свега од Th1 одговора посредованог IL-12 који доводи до активације CD4⁺ реактивних Т-лимфоцита. У Th1 одговору учествује и IFN- γ , чија је улога да регрутује Т-лимфоците и промовише њихову пролиферацију, а то за последицу може имати појачану фиброзу и ремоделовање миокарда у хроничној фази у условима ДКМ (141). Интересантно, одређене студије тврде да IFN- γ делује супротно и да може да утиче и на опоравак миокарда након инфламаторног оштећења, делујући на моноците и фибробласте (142). Додатно, транскрипциони фактор t-bet индукује диференцијацију Th1 субпопулације Т-лимфоцита, што је експериментално и потврђено. Наиме, t-bet *knock-out* мишеви испољавају тежи облик миокардитиса (143). Такође, улога Th2 одговора у патогенези ЕАМ је јако важна, нарочито у случају еозинофилног миокардитиса, али и других форми, попут миокардитиса циновских ћелија. Студије на трансгеном соју мишева који имају дефицит Th1 и Th17 цитокина показале су важност Th2 одговора, јер се у овим условима генерише изражена инфламаторна инфилтрација миокарда еозинофилима, који су главне ефекторске ћелије Th2 одговора (144). Th2 је посредован IL-4 и IL-13. IL-4 регрутује еозинофиле који инфилтрирају миокард и углавном делује проинфламаторно, док IL-13 има антиинфламаторно дејство. Данас се сматра да је круцијални фактор аутоимунског процеса у срцу заправо дисфункција Th17 и T_{reg}. За активацију и диференцијацију Th17 и T_{reg} неопходно је присуство регулаторних молекула, пре свега TGF- β . Додатно, баланс између проинфламаторних цитокина (IL6/IL1 β) и антиинфламаторног цитокина IL-10 даље диктира диференцијацију Th17 и T_{reg}. Откривено је да је IL-17A неопходан за прогресију акутног миокардитиса у ДКМ, фиброзу и губитак функције миокарда односно да се акутна инфламација може одвијати у одсуству овог цитокина, али да без њега миокардитис неће прогредирати до ДКМ (145, 146).

1.2.6.2. Урођени имунски одговор у ЕАМ

Ефекторске ћелије урођеног (нативног) имунског одговора су јако важне у имунопатолошким процесима ЕАМ. Пре свега, по важности се издваја улога НК ћелија, затим еозинофила, неутрофила, моноцита и макрофага. НК ћелије превасходно учествују у примарној одбрани од вирусне инфекције, у иницијалној фази акутног вирусног миокардитиса, међутим, улога ових ћелија је неоспорна и код аутоимунског миокардитиса. Наиме, анималне студије на ЕАМ моделу говоре у прилог чињеници да су НК ћелије важне у патогенези миокардитиса јер дефицијенција ових ћелија код мишева резултује јачом инфламацијом, фиброзом и погоршањем функције миокарда, и развојем фулминантног облика миокардитиса (147). У иницијалној фази, у инфилтрату миокарда значајно је и присуство неутрофила. Улога неутрофила огледа се у продукцији протеолитичких ензима и РОС, који заузврат индукују повреду

кардиомиоцита и депресију контрактилне функције, те се повезују са погоршањем функције срца. Сматра се да број неутрофила у крви може бити предиктор некрозе кардиомиоцита, јер је показана корелација са степеном некрозе код пацијената са акутним коронарним синдромом (148). Још један тип важних ефекторских ћелија у миокардитису, који се у високом проценту налазе у инфламаторном инфилтрату су моноцити. С обзиром да су моноцити хетерогена, мултифункционална ћелијска популација са кључном улогом у патогенези миокардитиса, њихова улога је доста проучавана у анималним студијама. До сада је потврђено присуство следећих проинфламаторних подтипова моноцита $CD115^+CD11b^+Ly6C^{high}CCR2^{high}CX3CR1^{low}$ и $CD115^+CD11b^+Ly6C^{middle}CCR2^{high}CX3CR1^{low}$ у инфилтрату код миокардитиса (149). Фибробласти пореклом из миокарда луче хемокине који подстичу миграцију наведених моноцита у миокард и омогућавају диференцијацију моноцита у макрофаге код мишева са миокардитисом. Моноцити се даље диференцирају до инфламаторних макрофага који продукују проинфламаторне цитокине, као што су TNF и IL-6, и доводе до оштећења срчаног ткива и активације Т-лимфоцита (150, 151). Што се тиче макрофага, они су такође важна популација ћелија у инфилтрату миокарда, а превасходно два подтипа макрофага MHC II high /CCR2- и MHC II low/CCR2- доприносе ремоделовању ткива миокарда и опоравку миокарда. Додатно, сматра се да макрофаги појачавају експресију M2 гена и последично подстичу пролиферацију регулаторних Т-лимфоцита, који делују протективно и супримирају појачан аутоимунски одговор (152, 153).

1.2.6.3. Експресија и улога цитокина у ЕАМ

Т-лимфоцити и АПТ укључени у патогенезу миокардитиса производе различите регулаторне молекуле, цитокине и хемокине који у великој мери утичу на даљу контролу имунског одговора, притом делују стимулаторно или инхибиторно на имунске и инфламаторне процесе. Дугогодишња *in vivo* истраживања пружила су доказе и донекле разјаснила учешће одређених цитокина у имунопатогенези акутног миокардитиса, али и његове даље прогресије у хроничну форму и развој дилатативне кардиомиопатије. Анималне студије које су користиле приступ антицитокинских антитела или антагониста одређених цитокина или њихових рецептора омогућиле су боље разумевање механизма укључених у имунопатогенезу аутоимунског миокардитиса (154, 155).

Дугогодишња истраживања патогенетских процеса аутоимунског миокардитиса показала су да су Th1 цитокини (TNF, IFN- γ , IL-1, и IL-6) укључени у инфламаторне процесе у раној акутној фази болести и индукцији ЕАМ, док су цитокини продуковани од стране Th2 лимфоцита (IL-4, IL-10 и IL-13) превасходно важни у фази резолуције миокардитиса. С друге стране, Th17 одговор, као и цитокини Th17 (IL-17 и IL-23) профила су од круцијалне важности при прогресији акутне у хроничну форму миокардитиса (109).

Један од главних проинфламаторних цитокина који има улогу у патогенези миокардитиса је свакако TNF- α . Главне ћелије које продукују TNF- α су макрофаги, али и кардиомиоцити. Након везивања за своје рецепторе (TNFR55 и TNFR75), TNF- α остварује своје дејство активацијом нуклеарног фактора капа Б (Nf- κ B) и последичном активацијом гена за хемокине MIP-1 и MCP-1. Штетни ефекти TNF- α на ткиво миокарда су већ изучени и познати у литератури и подразумевају проапоптотско, негативно инотропно дејство, као и промовисање прогресије и тежине аутоимунског миокардитиса. Анималне студије које су користиле солубилни рецептор TNF p55 као стратегију лечења ЕАМ показале су побољшање болести кроз смањену експресију IL-

1, адхезионих молекула и MCP-1 (155). Додатно, Nf-κB се сматра једним од регулатора прогресије болести, што је доказано још пре 2 деценије у студији где је блокада Nf-κB спречила развој болести (156). Поред TNF-α, активирани макрофаги у великој мери продукују и IL-1β и IL-6, који такође синергистички делују проинфламаторно. Природа IL-6 је дуална, с једне стране учествује у акутној фази инфламације и штити ткиво миокарда антиапоптоским механизмом, међутим када експресија овог цитокина буде хронично повишена, долази до патолошких ефеката на миокард у погледу смањења контрактилности и хипертрофије леве коморе (157). Доказано је да и проинфламаторни цитокин акутне фазе, IL-1, такође има кључну улогу у патогенези миокардитиса. Наиме, оштећени IL-1α се ослобађа из оштећеног миокарда уз дебрис и остале инфламаторне медијаторе, да би потом последично активирао молекулски комплекс инфламазом који индукује даље ослобађање IL-1β од стране запаљењских ћелија. Све ово резултује инфламацијом и апоптозом кардиомиоцита и даљим компромитовањем контрактилне функције (инхибиција L-типа Ca канала и појачана експресија NOS), последичном кардиомипатијом и срчаном инсуфицијенцијом (158). Ова хипотеза је доказана анималним студијама где је инхибиција ефеката IL-1 довела до значајног побољшања миокардитиса, спречила прогресију неконтролисане инфламације и даља оштећења ткива и дисфункцију миокарда (159). Додатно, постоје докази да постојање већег броја леукоцита који садрже инфламазоми у ткиву корелира са тежином болести, дисфункцијом леве коморе и смањеном ејекционом фракцијом (160). Поменути депресорни ефекти на контрактилност индуковани TNF-α, IL-1β, IL-6 су посредовани азот-моноксидом, јер инхибирају експресију iNOS у макрофагима и кардиомиоцитима (161). Интерлеукин 4 (IL-4) је један од Th2 цитокина чија је улога у патогенези ЕАМ проучавана и потврђена. У оквиру Th2 одговора, IL-4 има проинфламаторну улогу (захтева GATA3 и STAT6 факторе транскрипције), јер учествује у регрутовању еозинофила из урођеног имунског система, што продубљује инфламацију и доводи до акумулације и инфилтрације интерстицијума еозинофилима, што се најчешће среће код еозинфилног миокардитиса (153, 162). Додатно, без сумње је IL-4 умешан и у прогресију ЕАМ до ДКМ, а ова хипотеза је потврђена у студији где су мишеви којима недостају главни цитокини Th1 и Th17 одговора, IFN-γ и IL17, развили фулминанти миокардитис (144). С друге стране, IL-13 посредује у Th2 одговору и испољава регулаторне ефекте на диференцијацију макрофага, самим тим доводећи до репресије степена инфламације миокарда (163). У хроничној фази болести, јавља се појачана експресија IL-10, Th2 цитокина који делује антиинфламаторно и учествује у фази опоравка од болести. Директни доказ ове тврдње јесте да примена IL-10 спречава развој ЕАМ код мишева, или погоршање болести уколико се примени анти-IL-10 антитело (164, 165). Појачана експресија IL-10 је најчешће праћена појачаном експресијом трансформишућег фактора раста бета (TGF-β) који учествује у ремоделовању ткива миокарда, промовише фиброзу и настанак ДКМ, али и инхибира производњу проинфламаторних цитокина (166). Последња и најскорије откривена субпопулација помоћничких Т-лимфоцита Th17, такође има важну улогу у имунопатогенези ЕАМ, а два кључна цитокина која то регулишу су IL-17 и IL-23. Сматра се да Th17 одговор доприноси прогресији болести и да промовише прелазак у хроничну фазу и развој ДКМ, док није од великог значаја у акутној фази. Одређене студије су потврдиле да IL-17 индукује фиброзу миокарда кроз PKC/Erk1/Nf-κB сигналне путеве (167). IL-23, продукован од стране АПћ, је од велике важности за развој аутоимунског миокардитиса код мишева, јер промовише сазревање Th17 ћелија, и на тај начин доводи до пораста Th17/T_{reg} односа (168).

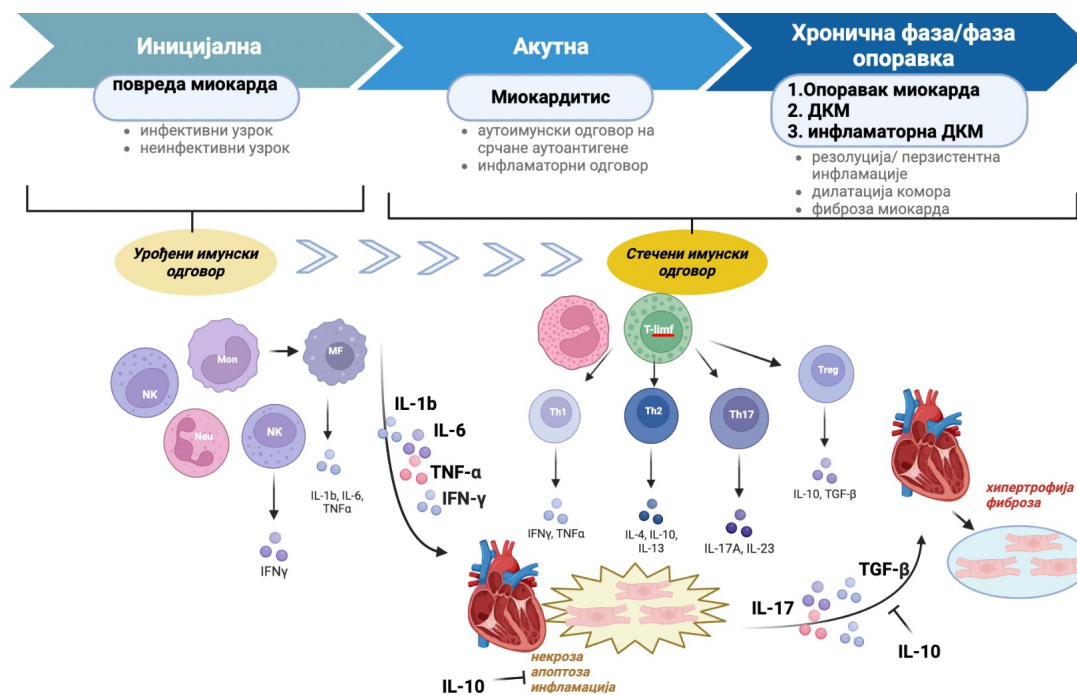


Схема 2. Патогенеза ЕАМ

1.2.6.4. Улога оксидационог стреса у ЕАМ

Улога РОС у миокардитису је вишеструка. Они могу деловати као ефектори за убијање патогена, посредници у сигналној трансдукцији, а уско су повезани и са урођеним и са стеченим имунитетом (169). Претерана продукција слободно-радикалских честица која надмашује капацитет антиоксидационог система може погоршати оштећење ткива у условима тешке инфламације. Поред тога, погоршава и већ постојећу инфламацију. Оксидациони стрес је умешан у патофизиологију и акутног и хроничног миокардитиса. У акутној фази, оксидациони стрес промовише оштећење миокарда и погоршава акутни миокардитис на више начина. Првенствено, претерана продукција РОС делује директно депресивно на контрактилност миокарда, затим РОС-индуковано оштећење ДНК, протеина и липида чиме се директно изазива оштећење ткива и ћелијска смрт. Оксидација ових биомолекула иреверзибилно компромитује њихову функцију и индукује дуготрајно оштећење ткива и утиче на тежину миокардитиса. Настало оштећење ткива и смрт кардиомиоцита услед оксидационог стреса додатно подстичу инфламацију (170). Поред тога, сматра се да оксидациони стрес утиче и на аутоимунски процес ове болести, тако да се може сматрати и једним од механизма ремоделовања миокарда у хроничној фази, и директним учесником у развоју дилатативне инфламаторне кардиомиопатије. Оксидациони стрес и инфламација су међусобно повезани и сматра се да заједно промовишу ремоделовање срца у хроничној фази аутоимунског миокардитиса. У хроничној фази постоји опште прооксидантно стање које се карактерише повишеним нивоом РОС, а смањеном активношћу антиоксидационих ензима MnSOD и Grx, смањеном концентрацијом GSH и повишеним нивоом продуката липидне пероксидације и оксидације протеина. До сада је познато неколико механизма којим РОС и инфламација погоршавају ремоделовање срца укључујући: поремећај функције протеина кроз конформационе промене изазване електрофилним производима оксидације (8-нитро-циклични гуанозин монофосфат, нитро-тирозин и 4-хидрокси-ноненал); активацију сигналних путева у ћелији који

изазивају хипертрофију срца; ћелијску смрт; интерстицијалну фиброзу; оштећење митохондријалних функција и исхемију (169,171). Један од потенцијалних механизма хипертрофије миокарда индуковане РОС митохондријског порекла је активација Nf-κB зависне експресије проинфламаторних цитокина у кардиомиоцитима. Поред тога, митохондријске РОС индукују оксидацију ДНК и последичну акумулацију производа оксидације ДНК 8-хидроксигуанина и фрагментацију ДНК која активира полиаденозин-рибоза-полимеразу 1 (PARP-1). Хиперактивација PARP-1 доводи до експресије гена укључених у хипертрофију и ћелијску смрт кардиомиоцита (172, 173). Ћелијска инфилтрација и пролиферација присутни у миокардитису изазивају исхемију, а оксидациони стрес настао током инфламације може чак погоршати ову исхемију. Интерстицијски едем и хистолошке промене као што су компензаторна хипертрофија ћелија миокарда и интерстицијална фиброза могу такође додатно погоршати хипоксију. У регионима ткива миокарда са највећом инфламаторном инфилтрацијом услед деструкције је повређена микроваскулатура, што је и потврђено у студији где је примећена активација хипоксијом индукованог транскрипционог фактора 1 (HIF-1) код миокардитиса, која има улогу у промовисању ангиогенезе (174). Због свега наведеног, оксидациони стрес се такође сматра метом потенцијално нових обећавајућих терапијских стратегија у лечењу миокардитиса.

1.2.6.5. Улога апоптозе у ЕАМ

Проучавањем патогенезе аутоимунског миокардитиса доказано је да код ове болести инфламаторне ћелије, као и кардиомиоцити умиру некрозом и/или апоптозом. Апоптоза подразумева физиолошки процес смрти ћелије који се одликује фрагментацијом ДНК молекула, док се морфолошки то може повезати са кондензацијом и фрагментацијом једарног хроматина и доказати имунохистохемијски TUNEL есејом. Још пре две деценије, научници су показали да вишеједарне циновске ћелије (састављене из 5-15 једара) присутне у фокалним инфламаторним инфилтратима у ЕАМ моделу, пролазе кроз апоптозу. Електронском микроскопијом је уочена кондензација хроматина, који формира густу хомогену масу око мембране, док су TUNEL реакцијом обележена апоптотски измењена једра (ова метода се заснива на директном и специфичном обележавању прекида ДНК у једрима) (175). Претерана продукција РОС и последични оксидациони стрес у ЕАМ утиче на различите интрацелуларне догађаје, међу њима и на инфламацију, ЕР (ендоплазматски ретикулум) стрес и апоптозу кардиомиоцита. ЕР стрес подразумева поремећај хомеостазе ЕР калцијума и акумулацију прекомерних протеина у ЕР, а прекомерни ЕР стрес доводи до ћелијске смрти у виду апоптозе. Додатно, током ћелијског стреса долази до ослобађања цитохрома Ц из митохондрија у цитосол, који такође може активирати апоптозу (176). С друге стране, резултати недавно спроведене студије од стране *Chang et al.* сугеришу повезаност повишеног нивоа холестерола и стопе апоптозе кардиомиоцита у ЕАМ моделу. Наиме, у овој студији је откривено да ЕАМ индукује смањење нивоа HDL, PON1 (параоксоназа 1 – протеин повезан за функцијом HDL) и ApoA1 (аполипопротеин А1), смањује ефлукс холестерола у срчано ткиво, а повећава ниво укупног холестерола, док су истовремено забележене и повећане експресије проапоптских протеина Fas, каспаза-3 и -9 и Вах, а смањена експресија антиапоптотског протеина Bcl-2. Све ово сугерише да су и унутрашњи и спољашњи апоптотички путеви укључени у развој ЕАМ. С обзиром је примена агенса за смањење холестерола метил-β-циклодекстрина ублажила ЕАМ и побољшала срчану функцију, смањила инфламаторни инфилтрат и фиброзу, као и параметре апоптозе, може се претпоставити да снижење нивоа холестерола у срцу јесте један од механизма

супресије ЕАМ-индуковане апоптозе, и кроз спољашњи и унутрашњи пут (177). Улога апоптозе у развоју фаталног акутног миокардитиса проучавана је и у клиничкој студији. Ово истраживање доказало је присуство апоптозе имуностохемијски детекцијом TUNEL и каспаза-3 позитивних ћелија у узорку ткива миокарда добијеног биопсијом. Додатно, показано је да количина апоптозе није корелирала са старосном доби или полом пацијената, етиологијом, хистолошким карактеристикама или трајањем болести. Међутим, већа стопа апоптозе кардиомиоцита била је повезана са развојем фаталне срчане инсуфицијенције код акутног миокардитиса (178).

1.2.7. Анимални модели аутоимунског миокардитиса

Узевши у обзир клиничку слику, прогнозу и немогућност правовремене дијагнозе аутоимунског миокардитиса, последње три деценије велики број истраживања посвећен је проучавању ове патологије коришћењем анималних модела. Пионирски покушај изазивања аутоимунске болести срца датира још од 50-их година двадесетог века, када је показана унакрсна реакција на антигене срца код различитих испитиваних врста сисара, зечева, пацова и човека. Заправо је откривено да имунизовање зечева хомогенатом говеђег, пацовског или хуманог срца стимулише продукцију аутоантитела на ткиво срца зеца (179). Тек две деценије касније, истраживачка група из Балтимора (*John Hopkins Medical Institution*) на челу са *Neu* бавила се механизмима индуковања аутоимуности срца и поставила темељ анималних модела аутоимунског миокардитиса код глодара. У овој студији доказано је да након инфекције генетски предиспонираних мишева коксаки вирусом (CVB3) долази до појачане продукције аутоантитела на миозин, и то баш на изоформу миозина заступљену у срцу. Управо из те чињенице, проистекла је хипотеза да и сам срчани миозин са комплетним Фројндовим адјувансом може индуковати миокардитис, што је и доказано на другој групи животиња (180). Овај модел назива се експериментални аутоимунски миокардитис (ЕАМ) и до данас се широко користи. Каснијих година установљени су и други модели неинфективног аутоимунског миокардитиса, који су базирани на имунизацији животиња антигенима (аутоантигенима) специфичним за срце:

1.2.7.1. ЕАМ - Имунизација пацова/мишева срчаним миозином свињског порекла или *MyHC α 334-352* пептидом

Сматра се да анимални модел ЕАМ најбоље мимикује миокардитис циновских ћелија код људи, као и његове хистопатолошке карактеристике. Студије су показале да се већ након прве недеље од имунизације развијају промене у ткиву миокарда, у погледу изражене експресије адхезивних молекула ендотела, а касније од друге до треће недеље се формира инфламаторни инфилтрат сачињен од мононуклеара (најчешће моноцити, макрофаги, CD4+ и CD8+Т-лимфоцити, ређе Б-лимфоцити), који има пик 21. дана болести, јер је тада инфламација и некроза миокарда најизраженија, а хистолошки се може потврдити и присуство вишеједарних циновских ћелија. Развој аутоимунског миокардитиса пре свега зависи од CD4+ Т-лимфоцита који препознају срчане аутоантигене (пептиде) заједно са МНС молекулима II класе које приказују антиген-презентујуће ћелије. Индукција ЕАМ код глодара подразумева апликацију срчаног миозина свињског порекла или *MyHC α 334-352* пептида тешког ланца миозина, који представља антиген, емулгованих са комплетним Фројндовим адјувансом, најчешће двократној апликацијом првог и осмог дана код осетљивих сојева мишева (*A/J* и *Balb/c*) или пацова (*Lewis, Dark Agouti, Sprague Dawley*) (109, 181). Познато је да полне разлике утичу на исход болести и ризик од обољевања код људи, ово је

потврђено и код глодара у ЕАМ моделу. Наиме, промене у инфламаторном статусу у ЕАМ праћене су формирањем фиброзе и смањеном срчаном функцијом, повећаном експресијом инфламаторних маркера превасходно код мужјака. Сходно томе, да би индукција ЕАМ била успешна користе се превасходно животиње мушког пола, старости 6-8 недеља. Већ након прве недеље од имунизације, уочава се појачана експресија адхезивних молекула, формирање запаљењског инфилтрату сачињеног од моноклеара развија се у другој недељи, да би у трећој недељи наступио пик инфламације, појава гигантских ћелија у инфилтрату и екстензивна некроза кардиомиоцита. Након пете недеље наступа хронична фаза праћена фиброзом, док се инфламаторне промене смањују (182).

1.2.7.2. ЕАМ - Имунизација пацова/мишева тропонином I

Улога тропонина и хронично повишеног нивоа тропонина у циркулацији, у аутоимунским процесима срчаног ткива недовољно је разјашњена. Тек 2006. године једно истраживање је показало да имунизација А/Ј мишева рекомбинантним тропонином I заједно са СФА доводи до инфламације и фиброзе миокарда, кардиомегалије, док се то не дешава код имунизације мишева тропонином Т. Сматра се да је узрок овоме продукција аутоантитела и Т-лимфоцита на тропонин I, при чему се након везивања за тропонин I индукује изражена инфламација, у поређењу са аутоантителима на тропонин Т која не успевају да се вежу за циљни срчани протеин тропонин Т. Такође, показано је и да имунизација мишева тропонином I непосредно пре лигације леве антериорне десцендентне артерије узрокује значајно веће оштећење миокарда, уз већи скор инфламације, фиброзе и већу зону инфаркта и смањење фракционог скраћења. Сходно томе, ова студија доказује да имунизација тропонином I може бити још један начин, тј. анимални модел за индукцију аутоимунског миокардитиса, јер индукује и хуморални и целуларни имунски одговор, као и аутоимунски посредовано оштећење миокарда (183, 184). Недуго затим, иста истраживачка група идентификовала је две аминокиселинске секвенце тропонина I које доводе до инфламације и фиброзе миокарда, и последичне срчане инсуфицијенције (епитопи, пептид 105-122 и 131-148). Закључено је да је пептид 105-122 имунодоминантни епитоп тропонина I који индукује продукцију аутоантитела, јер је овај пептид индуковао бржу и јачу инфламацију, праћену повећаном експресијом хемокина (MCP1, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , TCA-3 и еотаксин) код мишева у односу на пептид 131-148. Овај начин индукције аутоимунског миокардитиса задржан је и до данас, међутим мање је заступљен у односу на имунизацију миозином и превасходно има улогу у откривању улоге аутоантитела на тропонин I у патогенези дилатативне кардиомиопатије и повезаности овог ентитета са аутоимунским миокардитисом (185, 186).

1.2.7.3. Липополисахаридом (LPS) индукован миокардитис

Још један од начина индуковања миокардитиса код глодара јесте интраперитонеална примена LPS (10 - 20 mg/kg), као једног од најјачих антигена ћелијског зида Грам негативних бактерија, који ће покренути снажну имунску реакцију и мимиковати миокардитис настао у стању сепсе. LPS узрокује повећано ослобађање проинфламаторних цитокина и оштећења кардиомиоцита превасходно апоптозом. Овај модел је од великог значаја у проучавању патофизиолошких механизма, као и могућих терапијских опција септичне кардиомиопатије (187-189). Међутим, уколико говоримо о моделу аутоимунског миокардитиса, LPS може послужити као адјуванс уз

примену одговарајућег срчаног антигена. Овакав модел постављен је још 1993. године, при чему је за имунизацију мишева коришћен екстракт срца миша, а као адјуванс LPS O3 изолован из *Klebsiella pneumoniae* O3, а сама имунизација понављана у интервалима од по 30 дана, 12 пута. Покретање аутоимунских механизма доказано је присуством антитела на протеине срца, лезија у ткиву миокарда и кардиомегагије. Лезије у ткиву миокарда претежно се састоје од макрофага и лимфоцита што имплицира учешће целуларног имунског одговора, док кардиомегагија указује на дилатацију и хипертрофију миокарда). Поред тога, још пре три деценије описана је и егзацербација аутоимунског миокардитиса индукованог CVB3 вирусом у комбинацији са LPS, што такође може бити основа за још један модел инфективног аутоимунског миокардитиса (190). Међутим, примена LPS у индукцији аутоимунског миокардитиса данас је напуштена, превасходно се овај модел данас користи за проучавање септичног миокардитиса.

1.2.8. Терапијски приступ у лечењу аутоимунског миокардитиса

Лечење миокардитиса првенствено подразумева примену општих неспецифичних мера (симптоматску терапију) за лечење последица овог стања, терапију срчане инсуфицијенције и аритмија према актуелним смерницама. Као последња терапијска опција може се применити механичка циркулаторна потпора и трансплантација код пацијената са рефракторном срчаном инсуфицијенцијом и хроничном инфламаторном дилатативном кардиомиопатијом (109, 153, 191).

Специфично лечење зависи пре свега од типа миокардитиса. У случају вирусног миокардитиса, терапија је оријентисана на примену специфичних антивирусних лекова, док се у случају аутоимунског миокардитиса који није вирусног порекла најчешће прибегава примени имуносупресива и имуномодулатора. Имуносупресивни третман је неопходан, нарочито код акутног неинфективног миокардитиса попут миокардитиса циновских ћелија, саркоидотичног и еозинофилног миокардитиса. Као што је већ наведено, уколико акутни миокардитис прогредира до хроничног, најчешће се развија дилатативна кардиомиопатија карактерисана инфламацијом, фиброзом, ремоделовањем ткива што указује на потребу модулације имунског одговора као терапијске опције (153).

Овај терапијски приступ подразумева циљање проинфламаторних медијатора болести. У те сврхе данас се најчешће користе имуносупресивни лекови широког спектра кортикостероиди (преднизон, преднизолон), као и циклоспорин и азатиоприн. Међутим, ефикасност овакве терапије је и даље дискутабилна, а резултати студија опречни. Неке студије говоре у прилог примени имуносупресива јер доводе до побољшања ејекционе фракције, док друге пак нису доказале побољшање ејекционе фракције и стопе преживљавања ових пацијената (192, 193). Други начин је имуномодулација која се постиже применом имуноглобулина у високим дозама, која се показала корисном код пацијената са акутним миокардитисом у погледу побољшања хемодинамских параметара, ејекционе фракције и стопе преживљавања (194). Последњих година постоји тренд истраживања потенцијално нових лекова за лечење аутоимунског миокардитиса, који делују циљано на одређене компоненте имунског система укључене у инфламаторни аутоимунски процес, али до данас није регистрован ниједан. С обзиром да се током година патогенеза болести у великој мери разјаснила, развијање нових терапијских опција подразумева индукцију ауто толеранције, појачавање одговора Т-регулаторних ћелија, блокаду рецептора повезаних са урођеним имунским одговором, као и модулацију имунолошке улоге фибробластних и ендотелних ћелија у овом патолошком процесу (153, 191-194).

1.2.9. Фитотерапијски приступ у лечењу и превенцији аутоимунског миокардитиса

С обзиром да ефикасна и селективна терапија аутоимунског миокардитиса до данас не постоји, биљке и изоловани фитоконституенси се увелико истражују у *in vivo* моделима аутоимунског миокардитиса код глодара као потенцијално ефикасна антиинфламаторна терапија. Сходно томе, неколико фитоконституенаса је већ показало корисне ефекте у ублажавању ове болести у анималном моделу експерименталног аутоимунског миокардитиса попут кверцетина, ресвератрола, олеанолне киселине, хлорогене киселине, урсолне киселине, берберина, куркумина. Благотворни ефекти ових фитоконституенаса приписују се њиховим јаким антиоксидационим и антиинфламаторним ефектима (195, 196). Тронедељна суплементација флавоноидом кверцетином показала је дозно-зависни протективни ефекат у експерименталном моделу аутоимунског миокардитиса пацова, што се може објаснити смањењем експресије и продукције проинфламаторних цитокина TNF- α и IL-17 и повећаним ослобађањем антиинфламаторног цитокина IL-10 (197). Друга група истраживача проучавала је ефекте третмана флавоном апигенином на развој и прогресију ЕАМ код мишева. Доказано је да је третман апигенином нарочито у дози од 200 mg/kg побољшао експериментални аутоимунски миокардитис код Balb/c мишева модулацијом Th1/Th2 равнотеже, тј смањењем експресијом Th1 цитокина (TNF- α , IL-2 и IFN- γ) и појачаном регулацијом Th2 цитокина (IL-4, IL -10), независно од регулације крвног притиска и срчане фреквенце. Хистопатолошки, уочена је значајно смањена инфилтрација миокарда запаљењским ћелијама у групи третираној апигенином, а такође овај третман је успео да побољша и срчану функцију, што је потврђено ехокардиографски, успешним превенирањем ремоделовања миокарда у односу на ЕАМ групу (198). Примена олеанолне киселине такође се показала кардиопротективно у ЕАМ моделу код мишева. Наиме, примећено је да овај природни тритерпен може драматично превенирати настанак и смањити тежину аутоимунског миокардитиса што се може објаснити смањеним Hw/Bw односом, смањењем плазма концентрацијом маркера оштећења миокарда СК-МВ и BNP, као и смањењем продукцијом антимиозинских аутоантитела. Додатно, примена олеанолне киселине у дози од 50 mg/kg може регулисати имунски одговор у ЕАМ кроз: повећање броја Т регулаторних ћелија, повећану продукцију антиинфламаторних цитокина IL-10 и IL-35, као и смањену продукцију проинфламаторних цитокина TNF- α , IL-1, IL-6, и IL-17. Додатно, протективни ефекти овог тритерпена евидентирани су и хистолошком анализом срца, где је показана редукована ћелијска инфилтрација, фиброза и калцификација миокарда (199). Полифенолно једињење из групе стилбеноида, ресвератрол такође се показао корисним у третману ЕАМ код пацова. Наиме, двонедељни третман ресвератролом у дози од 50 mg/kg индуковао је маркантно побољшање структуре миокарда ЕАМ пацова, у погледу смањења инфламације и фиброзе. Додатни протективни ефекти огледају се у модулацији оксидационог стреса и то смањењем експресије антиоксидационих гена Mn-SOD и Cu/Zn-SOD која је код ЕАМ пацова појачана, као и смањење експресије проинфламаторних гена TNF- α и iNOS. Још један од механизма којим ресвератрол ублажава ЕАМ може бити и модулација SIRT1 гена у имунским ћелијама, што последично доводи до инхибиције њихове пролиферације (200). Још једно фенолно једињење, хлорогена киселина доказано може ублажити ЕАМ, и то смањењем експресије интрацелуларног адхезионог молекула-1 (ICAM-1) у миокарду ЕАМ животиња и последичним смањењем фиброзе миокарда. Овакви налази сугеришу

да примена хлорогене киселине може инхибирати ћелијску адхезију код миокардитиса, и тако успорити прогресију миокардитиса (201). Куркумин, најзаступљенији полифенол *Curcuma longa* показао је кардиопротективни ефекат у акутној фази ЕАМ. Куркумин на више начина побољшава ЕАМ; смањењем хипертрофије миокарда и смањењем инфламаторног инфилтрата у миокарду. Додатно, куркумин утиче повољно и на хемодинамске параметре, ехокардиографијом је доказано побољшање и систолне и дијастолне функције срца миокарда код пацова са ЕАМ третираних куркумином. Сматра се да је у основи ових ефеката антиинфламаторни ефекат што је потврђено смањењем нивоа проинфламаторних протеина миокарда Nf-κB, IL-1 β, TNF- α и GATA-4 (202). Поред наведених фитоконституенаса, одређени екстракти биљака такође су показали обећавајуће ефекте у ЕАМ моделу. Тако је на пример, примена смоластог екстракт индијског тамјана *Boswellia serrata per os* довела до значајног побољшања структуре миокарду у ЕАМ моделу на пацовима у смислу смањења инфламаторног инфилтрата и фиброзе миокарда што је посредовано пре свега, ублажавањем оксидационог стреса кроз смањење MDA и NO, и повећањем експресије антиоксидационог транскрипционог фактора Nrf2. Поред тога, екстракт *Boswellia* нормализовао је биохемијске параметре срчаног оштећења LDH и СК-МВ и смањио продукцију проинфламаторних Th1 и Th17 цитокина, а појачао продукцију антиинфламаторног Th2 цитокина IL-10 (203). Додатно, показано је и да корен астрагалуса има протективно дејство у ЕАМ моделу. Ова биљка такође значајно смањује инфламацију и фиброзу миокарда изазвану ЕАМ, а такође и ублажава пролиферацију лимфоцита изазвану аутоимуним миокардитисом. Ова антиинфламаторна својства су посредована значајним смањењем нивоа Th1 цитокина и повећањем Th2 цитокина (204).

Табела 4. Преглед фитоконституенаса који доказано ублажавају експериментални аутоимунски миокардитис.

Природни производ	Дозни режим	Анимални модел	резултат	референца
Кверцетин	20 mg/kg <i>per os</i> 21 дан	ЕАМ <i>Dark Agouti</i> пацови	↓TNF- α ↓IL-17 ↑IL-10	Milenkovic et al. 2010 (197)
Апигенин	20,100 и 200 mg/kg <i>per os</i> 21 дан	ЕАМ <i>Balb/c</i> мишеви	↓TNF- α ↓IL-2 ↓IFN- γ ↑IL-10 ↑IL-4 ↓инфламаторни инфилтрат у ткиву миокарда	Zhang et al. 2016 (198)
Ресвератрол	50 mg/kg <i>i.p.</i> 14 дана	ЕАМ <i>Lewis</i> пацови	↓експресија TNF- α и iNOS гена ↓експресија Mn-SOD и Cu/Zn-SOD гена ↓инфламација и фиброза у ткиву миокарда	Yoshida et al. 2007 (200)
Куркумин	50 mg/kg <i>per os</i> 21 дан	ЕАМ <i>Lewis</i> пацови	↓Nf- κ B, IL-1 β , TNF- α и GATA-4 протеина ↓инфламаторни инфилтрат у ткиву миокарда	Mito et al. 2011 (202)
Хлорогена киселина	mg/kg <i>per os</i> 21 дан	ЕАМ <i>Balb/c</i> мишеви	↓ICAM-1 ↓инфламација и фиброза у ткиву миокарда	Zempo et al. 2013 (201)
Олеанолна киселина	50 mg/kg <i>i.p.</i> 21 дан и 65 дана	ЕАМ <i>Balb/c</i> мишеви	↓CK-MB ↓BNP ↓TNF- α , IL-1, IL-6, IL-17 ↑IL-10 ↓инфламација и фиброза у ткиву миокарда	Martin et al. 2014 (199)
Смоласти екстракт <i>Boswellia serrata</i>	100 mg/kg <i>per</i> <i>os</i> 21 дан	ЕАМ Sprague-Dawley пацови	↓CK-MB, LDH ↓MDA, NO ↑Nrf2 ↓TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-17 ↑IL-10, IL-4 ↓инфламација и фиброза (↓TGF β) у ткиву миокарда	D'Amico et al. 2022 (203)
Екстракт корена <i>Astragalus</i>	0,2 ml/100g bw <i>i.v.</i> 21 дан	ЕАМ <i>Lewis</i> пацови	↓IL-2, IFN- γ ↑IL-10, IL-4 ↓инфламација и фиброза у ткиву миокарда	Zhao et al. 2008 (204)

ЕАМ – експериментални аутоимунски миокардитис; TNF- α – фактор некрозе тумора; IL-1- интерлеукин 1; IL-2 – интерлеукин 2; IFN- γ – интерферон гама; IL-4- интерлеукин 4; IL-6 - интерлеукин 6, IL-17 - интерлеукин 17; IL-10 - интерлеукин 10; СК-МВ – креатин киназа изоформа МВ; BNP – натриуретски пептид из мозга; iNOS – индуцибилна азот-моноксид синтаза; SOD – супероксид дизмутаза; Nf- κ B – нуклеарни фактор капа бета; ICAM-1 - интрацелуларни адхезиони молекул 1; TGF β – трансформишући фактор раста бета; . Nrf2 – нуклеарни еритроид 2 асоцирани фактор 2.

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

У циљу идентификације екстракта *Melissa officinalis* са потенцијално најбољим кардиопротективним ефектом у ЕАМ моделу, првенствено је од интереса било испитати антиинфламацијски и антиоксидациони потенцијал воденог и етанолних екстраката матичњака, као и хемијски охарактерисати све наведене екстракте. На основу хемијског састава, *in vitro* одређеног антиоксидационог потенцијала и *in vivo* одређеног антиинфламацијског потенцијала екстраката, одабран је екстракт који је коришћен за даљи ток истраживања. Главни циљ истраживања био је испитивање ефеката хроничне примене различитих доза (50, 100 и 200mg/kg телесне масе) одабраног екстракта *M.officinalis* на функцију и морфологију миокарда у ЕАМ моделу, као и механизме остварених ефеката.

У складу са претходно наведеним, постављени су и специфични циљеви:

1. Хемијска карактеризација екстраката матичњака
2. Евалуација и компарација антиоксидационих ефеката примењених доза екстраката матичњака
3. Евалуација и компарација антиинфламацијских ефеката примењених доза екстраката матичњака
4. Евалуација и компарација ефеката хроничне администрације примењених доза екстракта матичњака у моделу ЕАМ на функцију и структуру миокарда у акутној фази
5. Евалуација и компарација ефеката хроничне администрације примењених доза екстракта матичњака у моделу ЕАМ на функцију и структуру миокарда у хроничној фази
6. Евалуација и компарација ефеката хроничне администрације примењених доза екстракта матичњака у моделу ЕАМ на редокс и инфламаторни статус у акутној фази
7. Евалуација и компарација ефеката хроничне администрације примењених доза екстракта матичњака у моделу ЕАМ на редокс и инфламаторни статус у хроничној фази
8. Испитивање потенцијалних механизма кардиопротекције изазване применом матичњака у акутној фази ЕАМ
9. Испитивање потенцијалних механизма кардиопротекције изазване применом матичњака у хроничној фази ЕАМ

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

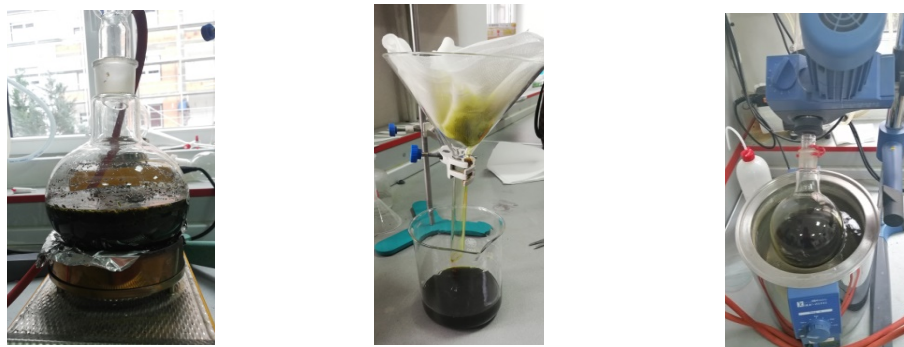
3.1. Припрема и карактеризација екстракта матичњака, испитивање антиоксидационог и антиинфламаторног потенцијала добијених екстракта

3.1.1. Биљни материјал

За потребе истраживања коришћени су осушени листови *Melissa officinalis* L. (*Lamiaceae*). Биљни материјал, осушени листови матичњака (*Melissae folium*), коришћен за анализу је купљен је од предузећа Биље Борча доо (Београд, Србија, серија/Lot: 030-12-19). Добијени осушени биљни материјал је уситњен до праха коришћењем млина (*IKA A11, IKA® Werke GmbH & Co., Germany*). Потом је биљни материјал у праху спакован и чуван у добро затвореним папирним кесама на собној температури све до почетка процеса екстракције.

3.1.2. Припрема екстракта матичњака

За потребе истраживања направљена су три различита екстракта. Екстракт 1 (E₁) је направљен поступком мацерације, који је подразумевао екстракцију осушеног биљног материјала са 70% етанолом (однос 1:5) током 72h у добро затвореној посуди уз мешање на шејкеру на собној температури. Првенствено је биљна дрога наквашена истом количином етанола и остављена да набубри 5 минута, ради лакше екстракције, а потом је додат и остатак растварача. Друга два екстракта су направљена уз рефлукс растварача, на температури кључања коришћених растварача (вода и 70% етанол; **Слика 2А**). Водени (E₂) и етанолни (E₃) екстракти су припремљени поступком екстракције биљне дроге (листа) додавањем 10 пута веће количине растварача уз загревање, у апаратури са повратном воденом паром - рефлукс (вода или 70% етанол). Процес екстракције је трајао 2,5 сата, након чега је уследило филтрирање смеше кроз газу. Након тога, добијени екстракти су остављени на собној температури како би се спонтано исталожиле баластне материје. Добијени течни екстракти су потом филтрирани кроз филтер папир (*Whatman, No.1, Cytiva, Buckinghamshire, UK*; **Слика 2Б**). На крају, коришћењем ротационог вакуум упаривача (*RV05 basic IKA, IKA® Werke GmbH & Co., Germany*; **Слика 2В**) на 40°C, 90 g/min и 250 mbar вакууму добијена су сва три сува екстракта. Осушени екстракти су затим чувани у тамним стакленим бочицама на +4° С до употребе за даља испитивања (205). По завршетку сваког од наведених процеса екстракције, квантификована је количина сувог екстракта и израчунат принос екстракције.



А

Б

В

Слика 2. Приказ делова процеса екстракције *M. officinalis*. А – екстракција под рефлуксом растварача; Б – филтрирање добијеног течног екстракта кроз филтер *Whatman, No.1*; В – упаравање преостале количине растварача у ротационом вакуум упаривачу.

3.1.3. Одређивање укупног фенолног и флавоноидног садржаја у испитиваним екстрактима матичњака

3.1.3.1. Одређивање укупног садржаја фенола у испитиваним екстрактима матичњака

Одређивање укупног садржаја фенола у испитиваним екстрактима базирало се на спектрофотометријској методи, која подразумева оксидацију полифенолних једињења у присуству *Folin-Ciocalteu* реагенса (FC; смеша фосфоволфрамне и фосфомолибденске киселине (*Merck, Darmstadt, Germany*)) до феноксидних анјона, и редукцију реагенса до волфрам-оксида и плавог молибден-оксида. Наиме, 100 μL 0,1 % (m/m) воденог раствора сувог екстракта ($E_1/E_2/E_3$) помешано је са 500 μL 0,2 М FC реагенса и 600 μL раствора Na_2CO_3 ($c = 60 \text{ g/L}$). Интензитет плаве боје одређен је спектрофотометријски на $\lambda = 760 \text{ nm}$ после тридесетоминутне инкубације. Количина укупних фенола је изражена као еквиваленти галне киселине (GAE) по граму сувог екстракта (d. e.) на основу стандардне криве добијене за галну киселину под истим експерименталним условима (206, 207). Сва спектрофотометријска мерења рађена су у трипликату, а као коначна вредност узета је просечна вредност три мерења.

3.1.3.2. Одређивање укупног садржаја флавоноида у испитиваним екстрактима матичњака

Одређивање укупног садржаја флавоноида је засновано на својствима флавоноида да граде комплексе са металима. Наиме, у реакцији флавоноида са AlCl_3 гради се комплекс. Протокол је био следећи: 500 μL 10% воденог раствора екстраката је разблажено екстракционим раствором (10% раствор (v/v) сирћетне киселине у метанолу) до 10 mL. Затим је 5 mL тако добијеног раствора пренето у епрувету, и одмах након тога додато још 10 mL AlCl_3 реагенса (133 mg $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ и 400 mg CH_3COONa раствореног у 100 mL дестиловане воде). Као слепа проба коришћена је

празна епрувета која је садржала дестиловану воду уместо AlCl_3 реагенса. Интензитет обојеног комплекса у епрувети одређен је спектрофотометријски на $\lambda = 430 \text{ nm}$. Квантификоване количине укупних флавоноида су изражене као еквиваленти кверцетина (QE) по g d. e. на основу калибрационе криве добијене за кверцетин под истим експерименталним условима (206, 207). Сва спектрофотометријска мерења рађена су у трипликату, а као коначна вредност узета је просечна вредност три мерења.

3.1.4. HPLC анализа испитиваних екстраката матичњака

Сва три испитивана екстракта су хемијски окарактерисана, а квантификација одабраних једињења је постигнута валидираном HPLC методом. Конкретно, фенолна једињења су одвојена коришћењем *Agilent Technologies 1100 liquid chromatographer* опремљеног DAD (енгл. Diode array detector - детектор диодног низа) (*Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA*). Компоненте су издвојене помоћу реверзно-фазне, хидрофобне *Nucleosil C18* колоне ($250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, величина честица $5 \mu\text{m}$; *Agilent Technologies*) на $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Као мобилна фаза коришћен је систем два растварача 1% (v/v) водени раствор мравље киселине (HCOOH) и метанол (CH_3OH). Следећи програм је коришћен за испоруку мобилне фазе у градијентном режиму: од 0 min 10% метанол, од 10 min 25% метанол, од 20 min 45% метанол, од 35 min 70% метанол, и на крају од 40 min до 48 min 100% метанол. Мобилна фаза је свакодневно свеже припремана и филтрирана (најлонски филтер са величином пора $0,45 \mu\text{m}$). У HPLC колону је додато $10 \mu\text{L}$ екстракта и током 48 min брзина протока је мењана (у току првих 10 min , $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; током других 10 min , $0,8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; током трећих 10 min $0,7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ и током последњих 18 min $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) (14). За квантификацију су коришћени стандарди следећих једињења: гална, кафена, *trans*-циметна, *p*-кумаринска, хлорогена, розмаринска и ферулна киселина, као и кверцетин, рутин и кверцитрин. Сви стандарди су анализирани под истим експерименталним условима, а као растварач је коришћен метанол. Гална, кафена и *trans*-циметна киселина су испитиване на таласној дужини од 280 nm , кверцетин, *p*-кумаринска, хлорогена, розмаринска и ферула киселина су испитивани на 330 nm , док су рутин и кверцитрин испитивани на 350 nm . За обраду података коришћен је софтвер *Agilent OpenLAB Chemstation v.A.01.05* (*Agilent Technologies*). Резултати су изражени као милиграми по граму сувог екстракта (208).

3.1.5. Испитивање екстраката матичњака гасном хроматографијом

У циљу детекције и квантификације евентуално присутних испарљивих органских једињења екстракти матичњака су подвргнути и гасној хроматографији (енгл. *headspace gass chromatography*). У те сврхе користили смо технику *headspace* узорковања са гасном хроматографијом-масеном спектрометријом (GC/MS), купловану са пламено-јонизујућим детектором (Headspace-GC/MS-FID).

Непосредно пре анализе примарних испарљивих органских једињења, узорци сувих екстраката матичњака E_1 , E_2 , E_3 убачени су у *headspace* бочице запремине 20 mL , које су потом инкубиране током 20 min на температури од $100 \text{ }^\circ\text{C}$ у *headspace sampler*-у (*5977HSS, Agilent Technologies*) и инјектоване у гасни хроматограф у *splitless* режиму. За квалитативну и квантитативну анализу једињења у испитиваним узорцима користили смо HP-5MS капиларну колону ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm}$; дебљине филма $0,25 \mu\text{m}$) на апарату *Agilent 6890B GC-FID instrument coupled to Agilent 5977 MSD*. Приликом инјектовања узорака, улазна температура била је $220 \text{ }^\circ\text{C}$, док је температура у пећници била подешена на $60 \text{ }^\circ\text{C}$ и повећавана за по $3 \text{ }^\circ\text{C}$ сваког минута, све док није постигнута температура од $246 \text{ }^\circ\text{C}$. Као носећи гас употребљен је хелијум (брзина протока 1

ml/min) док је температура *MSD* (енгл. *mass spectrometry detector*) *transfer* линије била подешена на 230°C. Подаци са масених спектра прикупљени су у *scan* режиму ($m/z = 50 - 550$), док је идентификација испарљивих једињења урађена поређењем података из NIST (v14) базе података са масеним спектрима (<https://chemdata.nist.gov/>) и поређењем релативних ретенционих времена (RT), као и са подацима из литературе (209).

3.1.6. *In vitro* испитивање антиоксидационих ефеката екстраката матичњака

3.1.6.1. Испитивање антиоксидационог потенцијала екстраката матичњака DPPH тестом

Првенствено је испитан антиоксидациони потенцијал екстраката матичњака коришћењем дуго познатог DPPH теста (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикал). Ова метода коришћена је као прелиминарна с обзиром да је DPPH синтетска супстанца, а како би се испитало детаљно комплексно антиоксидационо дејство екстраката матичњака коришћени су и додатни тестови, биолошки важни, у наставку. DPPH тестом је процењена способност екстраката матичњака да донирају електрон или протон. Наиме, DPPH• радикал је стабилан молекул љубичасте боје, који се у присуству антиоксиданаса или других радикала преводи у редуковани неутрални DPPH-H који је жуте боје. Ова реакција се прати мерењем апсорбанце на таласној дужини од 515 nm. Резултати су представљени као IC50 вредност (210).

3.1.6.2. Испитивање потенцијала екстраката матичњака да неутралишу OH радикал

Други антиоксидациони тест подразумевао је испитивање потенцијала екстраката матичњака (концентрације у распону од 10,00 до 400,00 µg сувог екстракта по mL да неутралишу хидроксил (OH) радикал. Овај *in vitro* тест заснива се на мерењу деградације 2-деоксирибозе деловањем хидроксил радикала, насталим у Фентоновој реакцији. Добијени продукти разградње 2-деоксирибозе су реактивне супстанце 2-тиобарбитурне киселине (ТВА), чија је апсорбанца спектрофотометријски мерена на 532 nm (210).

3.1.6.3. Испитивање потенцијала екстраката матичњака да инхибирају ослобађање NO

Екстракти матичњака (у концентрационом опсегу 10-500 µg/mL d.e) су подвргнути тесту који евалуира потенцијал екстраката да инхибирају ослобађање азот-монооксида (NO). Ова метода заснива се на реакцији редукције NO са *Griess* реагенсом (1 % сулфанилна киселина у 5 % *o*-H₃PO₄ и 0,1 % N-(1-нафтил)-етилендиамин дихидрохлорид (NEDA)), при чему се мери апсорбанца спектрофотометријски на 546 nm (210).

3.1.6.4. Испитивање потенцијала екстраката матичњака да инхибирају липидну пероксидацију (LP)

Такође, одређиван је и потенцијал испитиваних екстраката матичњака да инхибирају липидну пероксидацију. Степен липидне пероксидације одређиван је колориметријским мерењем једињења (адукта) насталог у реакцији тиобарбитурне киселине (ТВА) и малондиалдехида (MDA). У овом тесту се користи модификовани

ТВА есеј, где се користи емулзија липозома као тест-модел. Као систем за активацију липидне пероксидације се користи систем $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$. Испитује се неутрализација ОН радикала ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ систем) од стране екстракта матичњака (концентрације опсега 10.00-350.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Концентрација MDA (реактивне врсте настале од тиобарбитурне киселине) одређује се спектрофотометријски мерењем апсорбанце адукта на 532 nm (209). Све реакције поновљене су пет пута, док је проценат инхибиције липидне пероксидације израчунат на основу следеће једначине

$$\text{LP}(\%) = (\text{A}_0 - \text{A}_1) / \text{A}_0 \times 100$$

A_0 апсорбанца контроле

A_1 апсорбанца испитиваних узорака

3.1.6.5. Испитивање потенцијала екстракта матичњака да редукује фери-јон (FRAP тест)

Додатно је испитиван и евалуиран потенцијал истраживаних екстракта матичњака да редукују фери-јон (Fe^{3+}) до феро-јона (Fe^{2+}) коришћењем добро познате и описане FRAP (енгл. *ferric ion reducing power*) методе. Наведена метода базира се на мерењу апсорбанце (на таласној дужини од 593 nm) обојеног комплексног једињења које се формира у реакцији Fe^{2+} са 2,4,6-трипиридил-S-триазином (TPTZ). Сам поступак подразумева додавање различитих концентрација испитиваних екстракта матичњака у реакциону смешу са FRAP реагенсом (раствор TPTZ у HCl, ацетатни пуфер, рН 3,6). Антиоксидациони потенцијал испитиваних екстракта матичњака изражава се у милиграмима еквивалената аскорбинске киселине по граму сувог екстракта (mg AAE/g d. e.). У складу са тим, целокупни протокол се користи и за одређивање антиоксидационог потенцијала аскорбинске киселине, као позитивне контроле, док се сва мерења раде у трипликату (207).

3.1.7. Испитивање антиинфламаторног ефекта екстракта матичњака *in vivo* моделом карагенином индуковане инфламације шапице

3.1.7.1. Етички аспекти

Сви експерименти, процедуре и анализе које укључују коришћење лабораторијских животиња или анималног биолошког материјала у овој студији одобрене су од стране Етичког комитета за добробит и заштиту лабораторијских животиња Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, Србија (No.01-10171). Такође, све експерименталне процедуре изведене су у складу са Европском директивом 2010/63/EU за добробит лабораторијских животиња, ЕУ директивом 86/609/EES за заштиту животиња које се користе у експерименталне и друге научне сврхе и према етичким принципима *Добре лабораторијске праксе (GLP)*.

3.1.7.2. Експерименталне животиње

Овај део истраживања обухватио је укупно 88 *Dark Agouti* пацова мушког пола (8 недеља старости, телесне тежине 160 ± 20 g) (211). Животиње су набављене из виваријума релевантне установе за гајење лабораторијских животиња, Војномедицинске академије у Београду, Србија. Све животиње су првобитно чуване у карантину 14 дана, ради аклиматизације на услове чувања и проверу њиховог здравља, пре него што су укључене у студију. Животиње су чуване у прописаним условима

(температура 22±2°C, циклус светлост:тама 12:12 часова) у полиетиленским кавезима (4 животиње по кавезу), док им је вода и храна (стандардна храна за лабораторијске пацове 9% масти, 20% протеина, 53% угљених хидрата) била доступна у довољној количини да могу да их узимају према потреби (*ad libitum*).

Све животиње (n=88) су насумично подељене у следеће групе (n=8):

1. **CTRL** - контролна група, животиње третиране физиолошким раствором;
2. **IND** - група животиња третираних стандардним нестероидним антиинфламаторним леком (НСАИЛ) индометацином (8 mg/kg);
3. **E₁50** - животиње третиране екстрактом E₁ у дози од 50 mg/kg;
4. **E₁100** - животиње третиране екстрактом E₁ у дози од 100 mg/kg;
5. **E₁200** - животиње третиране екстрактом E₁ у дози од 200 mg/kg;
6. **E₂50** - животиње третиране екстрактом E₂ у дози од 50 mg/kg;
7. **E₂100** - животиње третиране екстрактом E₂ у дози од 100 mg/kg;
8. **E₂200** - животиње третиране екстрактом E₂ у дози од 200 mg/kg;
9. **E₃50** - животиње третиране екстрактом E₃ у дози од 50 mg/kg;
10. **E₃100** - животиње третиране екстрактом E₃ у дози од 100 mg/kg;
11. **E₃200** - животиње третиране екстрактом E₂ у дози од 200 mg/kg;

3.1.7.3. Индуција инфламације шапице

Антиинфламаторни потенцијал испитиваних екстраката матичњака (E₁, E₂ и E₃) у поменуте три дозе процењен је помоћу анималног модела едема шапице индукованог карагенином (212). Првенствено су пацови третирани екстрактом/индометацином/физиолошким раствором перорално, узависности од групе којој припадају, а 1h након тога свим животињама је убризгано 0,1 mL 0,5% карагенина (припремљеног као 1% v/v раствор у 0,9% физиолошком раствору) у десну задњу шапу интраплантарно, док лева задња шапа није третирана, већ је посматрана као контрола.

Дебљина односно дијаметар ткива шапе сваког пацова мерена је увек на исти начин, по средини шапе пацова коришћењем дигиталног калипера. Мерења су спроведена у следећим тачкама од интереса: непосредно пре индуције инфламације инјекцијом карагенина, а затим један, два, три, четири и шест часова након примене карагенина.

3.1.7.4. Квантификовање антиинфламаторне активности испитиваних екстраката матичњака

Разлике у дебљини ткива између десне и леве шапе пацова у одговарајућим тачкама од интереса служиле су као мера постигнутог антиинфламаторног ефекта. Инхибиција (смањење) едема шапе изражена је у процентима и израчуната је према следећој формули:

$$\text{Смањење едема (инхибиција)} = (\Delta k - \Delta e) / (\Delta k \times 100)$$

где је Δk разлика у дебљини ткива шапе у контролној (нетретираној) групи, а Δe је разлика у дебљини ткива шапе у експерименталној групи, при чему максимални антиинфламаторни ефекат може бити 100%. Сва мерења су извршена у триплекату од стране истог истраживача како би се избегао *bias*. Након карагенинског теста, све животиње су анестезиране мешавином кетамина и ксилазина (10 и 100 mg/kg) и жртвоване декапитацијом да би се сакупили узорци крви који ће се користити за даље одређивање параметара редокс статуса.

3.1.7.5. Процена системског редокс статуса након карагенинског теста едема шатице

Прликом жртвовања животиња на крају експерименталног протокола, сакупљена је пуна крв, која је потом центрифугирана 10 минута на 3000 rpm ради одвајања крвне плазме, а потом испирана физиолошким раствором 3:1, исти поступак испирања еритроцита поновљен је још 3 пута, да би се на крају додавањем ледено хладне дестиловане воде (3:1) и вортексирањем добили узорци лизата еритроцита. Плазма је коришћена као узорак за спектрофотометријско (*UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan*) одређивање прооксидационих параметара: супероксид-анјон радикал ($O_2^{\cdot-}$), водоник-пероксид (H_2O_2), нитрити (NO_2^-) и индекс липидне пероксидације мерен као TBARS. Лизат еритроцита служио као узорак за одређивање антиоксидационих параметара: активност антиоксидационих ензима супероксид-дизмутазе (SOD) и каталазе (CAT), као и нивоа редукованог глутатиона (GSH).

3.1.7.6. Спектрофотометријско одређивање прооксидационих параметара ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , NO_2^- , TBARS)

Супероксид анјон радикал је одређиван коришћењем 50 μ l узорка плазме помешане са 950 μ l есеја за $O_2^{\cdot-}$ (смеша 50 mM TRIS-HCl пуфера, 0,1 mM EDTA, 0,1 mg/ml желатина и 0,1 mM NBT), након чега је апсорбанца мерена у трипликату, на сваких 60 секунди уз мућкање штапићем на таласној дужини од 550 nm. За слепу пробу коришћена је дестилована вода уместо узорка (213).

Водоник пероксид (H_2O_2) је одређиван у реакцији, катализованој *horseradish* пероксидазом (POD), оксидације фенол црвеног помоћу H_2O_2 . У епрувете је пипетирано 200 μ L узорака плазме и потом 800 μ L фенол-црвеног (PRS), а потом и 10 μ L POD да би се индуковала реакција. Апсорбанца узорака плазме измерена је на $\lambda=610$ nm. Као слепа проба коришћена је дестилована вода (214).

Ниво NO је мерен индиректно мерењем концентрације нитрита (NO_2^-). Нитрити у узорцима плазме одређени су спектрофотометријском методом, која се заснива на реакцији нитрита са *Griess* (125 μ l 0,1% NEDA (N-(1-нафтил)етилендиамин дихидрохлорид) и 125 μ l 1% сулфанилне киселине) реагенсом, при чему настаје комплекс љубичасте боје. Протокол је био следећи: у микротубе пипетирано је следећим редоследом, 100 μ L перхлорне киселине, 400 μ L 20 mM EDTA (етилендиаминтетрасирћетна киселина) и 200 μ L узорка плазме. Затим је смеша мешана на вортексу и инкубирана 15 минута на леду, а потом центрифугирана током 10 минута на 6000 rpm. Потом је супернатант одливан, а у преципитат додато 220 μ l калијум карбоната. 200 μ l тако добијеног узорка/екстракта пренето је у нове епрувете и помешано са 250 μ l *Griess*-овог реагенса и 125 μ l пуфера за NO (амонијачни пуфер, pH=9). Након 15 минута на собној температури измерена је апсорбанца на 550 nm. За слепу пробу је уместо узорка коришћена дестилована вода (215).

Степен пероксидације липида у узорцима плазме је процењен индиректно мерењем нивоа реактивних продуката тиобарбитурне киселине (TBARS) коришћењем 1% тиобарбитурне киселине растворене у 0,05 M натријум хидроксида (NaOH) при апсорбанци од 530 nm. Протокол је подразумевао додавање 28% трихлороацетатне киселине (200 μ L) и узорка плазме (400 μ L) у микротубе, потом одлагање на лед током

10 минута и центрифугирање на 150000 rpm током 10 минута. Након тога 400 μL супернатанта је пипетирано у стаклене епрувете, додато је 100 μL 1% тиобарбитурне киселине растворене у натријум хидроксида. Уследило је инкубирање свих узорка у воденом купатилу на температури од 100 $^{\circ}\text{C}$ током 15 минута. Узорци су остављени да се охладе на собној температури током 10 минута, а након тога је измерена апсорбанца на 530 nm. У слепу пробу, пипетирана је дестилована вода уместо узорка (216).

3.1.7.7. Спектрофотометријско одређивање антиоксидационих параметара (SOD, CAT, GSH)

CAT пуфер, припремљени узорак лизата еритроцита (припрема подразумева мешање 50 μL узорка са 100 μL етанола и 10000 μL дестиловане воде) и 10 mM H_2O_2 (1000 μL) коришћени су за одређивање активности каталазе. Апсорбанца узорка измерена је на $\lambda=230$ nm (217).

Активност SOD је одређена методом епинефрина, која је укључивала мешање узорка лизата еритроцита (100 μL) са карбонатним пуфером (1000 μL) и епинефрином (100 μL), а за слепу пробу уместо узорка користили смо дестиловану воду. Затим је уследило мерење апсорбанце на $\lambda=470$ nm (218, 219).

Ниво редукованог глутатиона (GSH) је одређиван коришћењем DTNB (5,5-дителиобис-6,2-нитробензоевом киселином) која оксидује GSH. Протокол је био следећи: у микротубе додато је 50 μL лизата еритроцита, а потом и 100 μL 0,1% EDTA и 385 μL пуфера за преципитацију. Припремљена смеша је инкубирана на -20 $^{\circ}\text{C}$ током 10 минута, а затим центрифугирани током 15 минута на 4000 rpm како би се одвојио супернатант (екстракт). Триста микролитара екстракта пипетирано је у епрувете и потом је додато 750 μL динатријум-фосфата и 100 μL DTNB. Ниво GSH је мерен на $\lambda=420$ nm, док је за слепу пробу уместо узорка коришћена дестилована вода. За конструисање калибрационе криве и израчунавање концентрације редукованог GSH у испитиваним узорцима послужили су стандарди GSH познатих концентрација (15 mM, 30 mM, 45 mM и 60 mM) (220).

3.2. Испитивање кардиопротективних својстава етанолног екстракта матичњака у моделу експерименталног аутоимунског миокардитиса

У другом делу дисертације, испитивани су кардиопротективни ефекти екстракта матичњака, као и ефекти на оксидациони стрес и инфламацију. На основу резултата хемијске карактеризације, антиоксидационог и антиинфламаторног потенцијала испитиваних екстракта одабран је етанолни екстракт матичњака добијен уз рефлукс растварача, као екстракт са највећим антиоксидационим и антиинфламаторним потенцијалом. Овај екстракт је потом коришћен у моделу експерименталног аутоимунског миокардитиса (ЕАМ) у циљу испитивања његових кардиопротективних својстава.

3.2.1. Анимални протокол

3.2.1.1. Дизајн студије

У другом делу студије коришћени су *Dark Agouti* (DA) пацови (6 - 8 недеља, телесне масе 150 ± 20 g). DA пацови подељени су у десет група у зависности од тога да ли су животиње здраве или им је индукован ЕАМ, у зависности од примењене дозе екстракта (50 mg/kg, 100 mg/kg и 200 mg/kg) и дужине третмана (3 и 6 недеља).

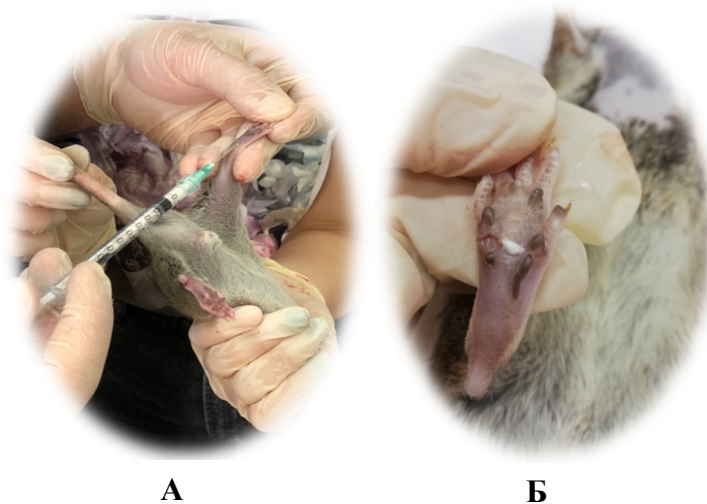
Све животиње (n=80) су насумично подељене у следеће групе:

1. **CTRL/3** - Контролна група, здраве животиње - без третмана, 3 недеље (n=8)
2. **ЕАМ/3** - Група пацова са ЕАМ – без третмана, 3 недеље (n=8)
3. **МОЕ50/3** - Група пацова са ЕАМ *per os* примена екстракта матичњака у дози од 50 mg/kg током 3 недеље (n=8)
4. **МОЕ100/3** - Група пацова са ЕАМ - *per os* примена екстракта матичњака у дози од 100 mg/kg током 3 недеље (n=8)
5. **МОЕ200/3** - Група пацова са ЕАМ - *per os* примена екстракта матичњака у дози од 200mg/kg током 3 недеље (n=8)
6. **CTRL/6** - Контролна група, здраве животиње - без третмана, 6 недеља (n=8)
7. **ЕАМ/6** - Група пацова са ЕАМ – без третмана, 6 недеља (n=8)
8. **МОЕ50/6** - Група пацова са ЕАМ *per os* примена екстракта матичњака у дози од 50 mg/kg током 6 недеља (n=8)
9. **МОЕ100/6** - Група пацова са ЕАМ - *per os* примена екстракта матичњака у дози од 100 mg/kg током 6 недеља (n=8)
10. **МОЕ200/6** - Група пацова са ЕАМ - *per os* примена екстракта матичњака у дози од 200mg/kg током 6 недеља (n=8)

Наиме, студија је имала две тачке пресека, прва након 3 недеље (21. дана) како би се евалуирали ефекти матичњака у акутној фази ЕАМ, а друга након 6 недеља (42. дана) како би се евалуирали ефекти матичњака у хроничној фази ЕАМ.

3.2.2. Индукција експерименталног аутоимунског миокардитиса (ЕАМ)

Као антиген за индукцију ЕАМ коришћен је пречишћени срчани миозин свињског порекла (*Sigma Aldrich, Munich, Germany*) обogaћен *Mycobacterium tuberculosis H37Ra* (*Difco Laboratories, Detroit, MI*). Првобитно је пречишћени срчани миозин растворен у фосфатном пуферу (PBS), а засебно је одвојена једнака запремина комплетног Фројндовога адјуванса уз додатак *Mycobacterium tuberculosis* (10 mg/ml) (*CFA, Sigma Aldrich*). Суспензије из обе епрувете су потом помешане и вортексоване. Добијена смеша је затим хомогенизована помоћу шприца померањем садржаја напред-назад током 60 минута. Коначна запремина суспензије је увучена у стерилни шприц од 1 mL са *Luer-Lock* врхом уз иглу од 26G. Суспензија је припремљена *ex tempore* на дан имунизације. Да бисмо се уверили у хомогеност емулзије, која је есенцијална за успешну имунизацију, кап емулзије сипана је у Петријеву шољу са водом, и уколико се кап емулзије не расипа, хомогеност је адекватна и емулзију је могуће инјектовати (Слика 3; 221). На почетку експерименталног протокола, дана 0, пацовима је убризгано субкутано у јастучић обе задње шапице 0,1 mL финалне емулзије (0,05 mL по шапици), дајући имунизациону дозу од 0,25 ml срчаног миозина по пацову. Контролној групи пацова апликован је само CFA емулгован са PBS (222).



Слика 3. А - Приказ инјектовања емулзије миозина интраплантарно у задњу шапицу пацова, у циљу индукције ЕАМ; Б - Приказ нересорбованог инјектованог антигена миозина, на крају протокола, након жртвовања.

3.2.3. Третман екстрактом матичњака

Комплетан експериментални протокол приказан је у Схеми 3 (Схема 3). Животиње које припадају експерименталним групама (МОЕ50, МОЕ100 и МОЕ200) третиране су етанолним екстрактом матичњака *per os*, свакодневно у исто време у три дозе 50, 100 и 200 mg/kg (72) у трајању од 3 или 6 недеља, у зависности од подгрупе којој припадају. Екстракт је свакодневно растваран у дестилованој води, тако да свака животиња прими одговарајућу дозу екстракта у волумену око 250 μ L. Телесна тежина животиња праћена је једном недељно, и према томе су дозе екстракта усклађиване током целокупног трајања протокола. Животињама које припадају контролним групама (CTRL и ЕАМ), администрирана је једнака запремина дестиловане воде.

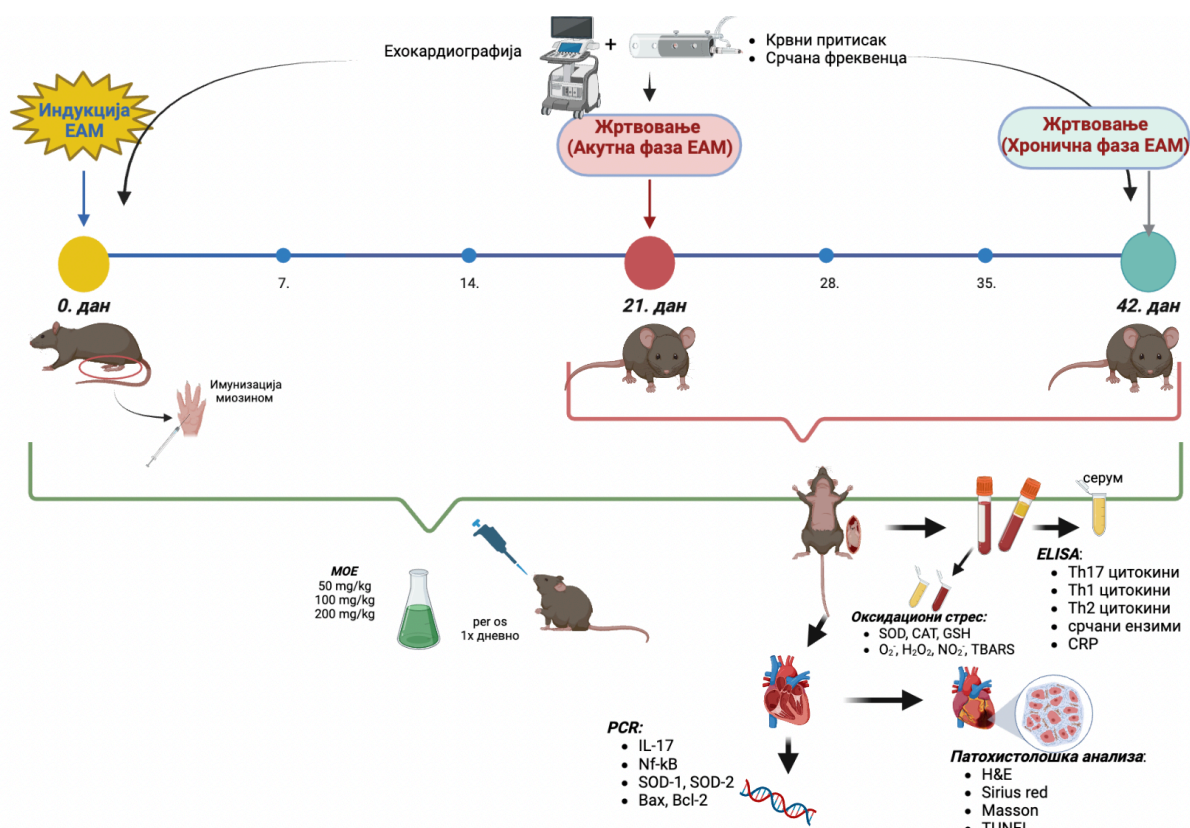


Схема 3. Схематски приказ експерименталног протокола *in vivo* и *post mortem*, хронолошког редоследа и врсте анализа.

3.2.4. Испитивање ефеката примене етанолног екстракта матичњака на хемодинамске параметре

3.2.4.1. Испитивање ефеката примене етанолног екстракта матичњака на крвни притисак

На почетку експерименталног протокола, пре индукције експерименталног аутоимунског миокардитиса, свим животињама измерен је систолни и дијастолни крвни притисак (SBP, DBP-mmHg), као и срчана фреквенца (HR-bpm) методом репне плетизмографије, и то коришћењем неинвазивног ВР система са репном манжетом, при чему се преко репног сензора региструје крвни притисак унутар крвног суда (*Rat Tail Cuff Method Blood Pressure Systems (MRBP-R), IITC Life Science Inc., Los Angeles, CA, USA*; Слика 4). У свакој групи животиња, мерење је спроведено два пута, прво на почетку експерименталног протокола (дан 0) да би се проверила хомогеност животиња (*baseline*), када није пронађена разлика, а затим након завршетка тронедељног протокола (дан 21) или шестонедељног протокола (дан 42) непосредно пре жртвовања животиња. Мерење крвног притиска свим пацовима спроведено је у 8-10 понављања, а као коначна вредност узета је средња вредност свих мерења.



Слика 4. Мерење крвног притиска и срчане фреквенце код пацова, употребом апарата *Rat Tail Cuff Method Blood Pressure Systems (MRBP-R)*, *IITC Life Science Inc., Los Angeles, CA, USA*

3.2.4.2. Испитивање ефеката примене етанолног екстракта матичњака на ехокардиографске параметре леве коморе

Како би се проценили ефекти МОЕ на *in vivo* функцију и развој аутоимунског миокардитиса свим животињама урађена је трансторакална ехокардиографија. Поступак је поновљен два пута, на почетку (0. дан) ради провере хомогености животиња и њиховог здравља, када није утврђена разлика, а затим након завршетка тронедељног протокола (дан 21) или шестонедељног протокола (дан 42) непосредно пре жртвовања животиња. Животиње су анестезиране интраперитонеалном инјекцијом мешавине кетамина (75 mg/kg) и ксилазина (5 mg/kg). Ехокардиограми су добијени коришћењем ултразвучног апарата за мале животиње *Hewlett-Packard Sonos 5500 (Andover, MA, USA; Слика 5)* опремљен сондом од 15.0-MHz. У 2D-моду у дугој парастерналној оси, М-мод курсор постављен је перпендикуларно на интервентрикуларни септум и задњи зид леве коморе (LV) у нивоу папиларних мишића. Ехокардиографске слике добијене су у М-моду. Измерени су следећи параметри:

- дебљина зида интервентрикуларног септума на крају дијастоле (IVSd),
- унутрашња димензија LV на крају дијастоле (LVIDd),
- дебљина задњег зида LV на крају дијастоле (LVPWd),
- дебљина зида интервентрикуларног септума на крају систоле (IVSs),
- унутрашњи димензија LV на крају систоле (LVIDs) и
- дебљина задњег зида LV на крају систоле (LVPWs)

Сви претходно наведени параметри изражени су у милиметрима (mm), док је фракционо скраћење изражено у процентима (FS%) и израчунато из М-мода коришћењем следеће једначине:

$$FS=100 \times \frac{(LVIDd-LVIDs)}{LVIDd}$$

где је LVIDd крајњи дијастолни пречник леве коморе, а LVIDs је крајњи систолни пречник леве коморе (223).

Ејекциона фракција (EF%) израчуната је према *Teicholz* формули (224), где LVEDV представља енддијастолни волумен LV, док LVESV представља ендсистолни волумен LV.

$$EF=100 \times \frac{(LVEDV-LVESV)}{LVEDV} \quad LVESV = \frac{(7 \times LVIDs)}{(2.4 \times LVIDs)} \quad LVEDV = \frac{(7 \times LVIDd)}{(2.4 \times LVIDd)}$$



Слика 5. Ехокардиографија пацова, апарат *Hewlett-Packard Sonos 5500* (Andover, MA, USA)

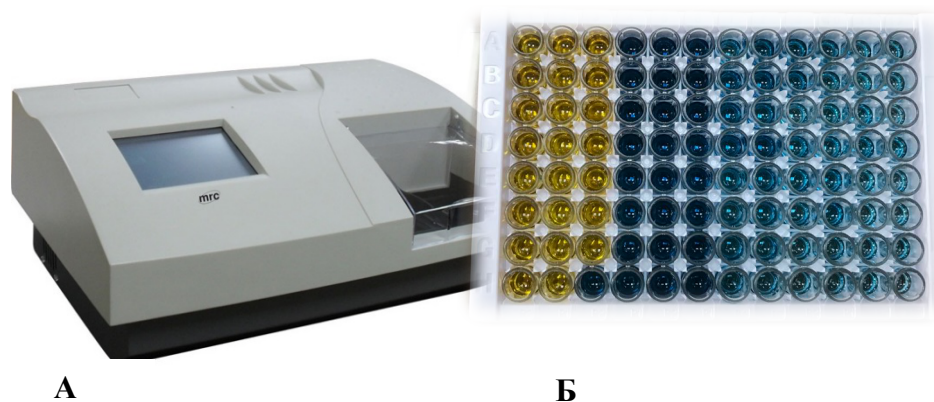
3.2.5. Испитивање утицаја примене екстракта матичњака на биохемијске маркере срчане функције и инфламације ELISA методом

Након завршетка експерименталног протокола све животиње су анестезиране (кетамин 5mg/kg; ксилазин 75 mg/kg) и потом жртвоване декапитацијом, при чему су сакупљени узорци крви за даље анализе. Из прикупљених узорака пуне крви, коришћењем сепарационог гела издвојен је серум који је коришћен за одређивање параметара ELISA методом. Концентрација срчаних ензима креатин фосфокиназе изоформа MB (СКМБ) и тропонина Т (сTnT), Ц-реактивног протеина (CRP), као и одговарајућих проинфламаторних и антиинфламаторних цитокина (фактор некрозе тумора алфа, интерлеукини 1, 6, 4, 10 и 17, и трансформишући фактор раста бета (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-4, IL-10, IL-17 и TGF- β) одређени су ELISA (имуноензимским тестом високе осетљивости и селективности) методом. ELISA метода је коришћена ради детектовања циљног антигена у узорку серума пацова. За одређивање свих претходно наведених параметара коришћена је *sandwich* ELISA. Такође, употребљени су одговарајући комерцијални ELISA китови специфични за биолошке узорке пацова.

Sandwich ELISA је тип ензимског имуносорбентног теста код којег ће се циљни антиген наћи заправо везан између два антитела (отуда и назив „сендвич”). У овој методи се користе антитело за хватање (*Capture antibody*) и антитело за детекцију (*Detection antibody*) које је коњуговано са ензимом (најчешће пероксидаза рена – HRP *horseradish peroxidase*) и додаје се на крају, пре квантификације самог антигена. У овој методи

користи се већ комерцијално припремљена микротитар плоча која садржи 96 бунарчића и која је већ претходно припремљена- преинкубирана *Capture* антителима. Даљи поступак се спроводи према упутству произвођача, а главни кораци су следећи:

1. Припрема и додавање одговарајућих стандарда у бунарчиће (у опадајућим концентрацијама) у дупликату, који су неопходни за конструисање калибрационе криве и квантификовање концентрације циљног антигена у испитиваним узорцима.
2. Додавање узорка серума који садржи непознату концентрацију антигена у бунарчиће, у претходно припремљеном одговарајућем разблажењу (најчешће је употребљавано разблажење 4, 8, или 16 пута) у дупликату након чега следи инкубација.
3. Испирање плоче додавањем пуфера за испирање (*Wash buffer*) у циљу уклањања невезаних молекула антигена за *Capture* антителима. Волумен пуфера за испирање и број испирања варира у зависности од упутства произвођача.
4. Додавање *Detection* антителима и инкубација на 37 °C у инкубатору (у трајању према упутству произвођача).
5. Након поновног испирања бунарчића пуфером за испирање додаје се ензим обележен стрептавидином који ће се везати за биотиниловано детекционо антителима (стрептавидин-HRP). Потом следи инкубирање и испирање како би се уконила антителима које се нису везала за ензим стрептавидин-HRP.
6. Следећа фаза подразумева додавање хромофорног супстрата (најчешће ТМВ триметилбензидин) који доводи до промене боје у плаво, у интензитету зависно од количине везаног антигена.
7. Без испирања, на крају се додаје раствор за заустављање реакције (*Stop solution*- јака киселина, најчешће хлороводонична (HCl) или сумпорна (H₂SO₄)) што се уочава променом боје из плаве у жуту.
8. Одмах следи мерење апсорбанце на таласној дужини од 450 nm на ELISA читачу (*Auto Microplate reader (MRC VT 2100C, Holon, Israel; Слика 6)*)
9. Конструисање калибрационе криве и одређивање концентрације испитиваног маркера у узорцима.



Слика 6. А - ELISA читач (*Auto Microplate reader (MRC VT 2100C, Holon, Israel)*); Б - приказ ELISA плоче и промене боје након додавања *Stop Sollution*-а.

3.2.5.1. Испитивање ефеката екстракта матичњака на активност срчаних ензима

У циљу испитивања утицаја примене екстракта на оштећење миокарда одређивана је активност срчаних ензима креатинфосфокиназе МВ (pg/mL) и тропонина Т (pg/mL) из узорака серума *sandwich ELISA* методом, коришћењем комерцијалних *ELISA* китова према претходно описаном поступку и упутству произвођача:

- Rat CK-MB (Creatine kinase MB isoenzyme) ELISA kit (*FineTest, Wuhan, каталошки број: ER0841*)
- Rat Tn-T (troponin T) ELISA kit (*FineTest, Wuhan; каталошки број: ER1396*)
- Rat Tn-I/TNNI3 (cardiac troponin I) ELISA kit (*FineTest, Wuhan; каталошки број: R0870H096*)

3.2.5.2. Испитивање утицаја примене екстракта матичњака на маркере инфламације *ELISA* методом

За испитивање утицаја примене екстракта матичњака на системски инфламаторни статус коришћени су узорци серума. У ове сврхе праћене су концентрације протеина акутне фазе (CRP), проинфламаторних и антиинфламаторних цитокина круцијалних у патофизиологији аутоимунског миокардитиса. С обзиром да су у патофизиологији ЕАМ укључени Th1, Th2 и Th17 имунски одговор, праћене су концентрације карактеристичних цитокина.

Ради процене утицаја примене екстракта матичњака на инфламаторни статус првенствено је мерена концентрација општег маркера инфламације, протеина акутне фазе CRP у узорцима серума. Концентрација CRP одређена је *sandwich ELISA* методом коришћењем комерцијалног *ELISA* кита *Rat hs-CRP ELISA Kit (FineTest, Wuhan, China, каталошки број: ER1048)*.

Ради процене утицаја примене екстракта матичњака на Th1 имунски одговор праћене су концентрације карактеристичних проинфламаторних цитокина IL-1(pg/mL), IL-6 (pg/mL) и TNF alpha (pg/mL) *sandwich ELISA* методом коришћењем следећих комерцијалних *ELISA* китова:

- Rat IL-1 beta ELISA Kit (*Cloud - Clone Corp., Katy, USA*)
- Rat IL-6 ELISA Kit (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)
- Rat TNF alpha ELISA Kit (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

Ради процене утицаја примене екстракта матичњака на Th2 имунски одговор праћена је концентрација проинфламаторног цитокина IL-4 (pg/mL), *sandwich ELISA* методом. Такође, праћена је и концентрације антиинфламаторног цитокина IL-10 (pg/mL) *sandwich ELISA* методом коришћењем *ELISA duoseta*. Коришћени су следећи комерцијални *ELISA* китови:

- Rat IL-4 ELISA Kit (*Elabscience, Wuhan, China*)
- Rat IL-10 ELISA DuoSet (*R&D systems, Mineapolis, USA*)

С обзиром да је за одређивање IL-10 коришћен *ELISA duoset*, микротитар плоча није унапред припремљена, већ је неопходно у празне бунарчиће првенствено додати примарно *capture* антителио и инкубирати га 12h заштићено од светлости на температури 37 °C у инкубатору. Након тога следи испирање, а даљи поступак је исти као и код претходно описане методе. Такође, неопходно је и додати средство које ће спречити неспецифично везивање (0,1% BSA говеђи серумски албумин).

Ради процене утицаја примене екстракта матичњака на Th17 имунски одговор праћене су концентрације карактеристичних цитокина, проинфламаторног IL-17 (pg/mL), као и трансформишућег фактора раста TGF- β (pg/mL), маркера ремоделовања ткива миокарда, карактеристичног за дилатативну кардиомиопатију која се развија у моделу

ЕАМ. Концентрације наведених маркера одређене су *sandwich* ELISA методом према у упутству произвођача коришћењем следећих комерцијалних ELISA китова:

- Rat IL-17A ELISA Kit (*AbClonal, Woburn, MA, USA*)
- Rat TGF- β ELISA Kit (*Elabscience, Wuhan, China*)

3.2.6. Испитивање утицаја примене екстракта матичњака на маркере оксидационог стреса

Узорци пуне крви сакупљени приликом жртвовања животиња центрифугирани су како би се добили узорци плазме и лизата еритроцита (према протоколу описаном у **Поглављу 3.1.7.5.**). Узорци плазме коришћени су за спектрофотометријско одређивање концентрације прооксидационих параметара (на исти начин као претходно описано у **Поглављу 3.1.7.6.**):

- Супероксид анјон радикал ($O_2^{\cdot-}$)
- Водоник-пероксид (H_2O_2)
- Индекс липидне пероксидације, мерен као TBARS
- Нитрити ($NO_2^{\cdot-}$)

Лизати еритроцита коришћени су за процену ефеката примене екстракта матичњака на антиоксидационе параметре већ претходно описаним спектрофотометријским методама (**Поглавље 3.1.7.7.**):

- активност каталазе (CAT)
- активност супероксид-дизмутазе (SOD)
- ниво редукваног глутатиона (GSH)

3.2.7. Испитивање ефеката примене екстракта матичњака на патохистолошке карактеристике ткива миокарда

Након завршетка експерименталног протокола, животиње су анестезиране и жртвоване, при чему су изолована и измерена срца, а затим пресечена на две половине тако да сваки исечак ткива садржи и леву и десну половину срца за даљу хистолошку анализу. Срца су затим фиксирана у 4% неутралном параформалдехиду, дехидрирана у растућој концентрацији алкохола (70%, 96% и 100%), очишћена у ксилену и потопљена у парафин. Процес импрегнирања ткива срца парафином изведен је на температури од 56 – 60 °C, како би ткива остала интактна. Ткива су укалупљена у парафинске блокове, а непосредно пре хистолошких анализа из парафинских блокова/калупа ткива добијене су секције ткива дебљине 5 μ m сечењем на микротому. Овако исечене секције ткива су потом пренете закривљеном пинцетом у водено купатило (45°C), како би се установило да ли узорак је ткива репрезентативан, без набора и одсечених ивица, и одмах монтиране на покровно стакло/плочицу. Тако добијени препарати остављени су да се суше у термостату током 12 часова на 56 °C. Плочице са исечцима ткива срца припремљене на овај начин су коришћене су за даље анализе.

3.2.7.1. Испитивање ефеката примене екстракта матичњака на ткиво миокарда-бојење хематоксилин-еозин методом

Ткивни исечци срца свих животиња обојени су стандардном и најкоришћенијом хистолошком методом Н/Е (хематоксилин/еозин) у циљу морфометријске анализе ћелија и верификације морфолошких промена, а нарочито у циљу процене утицаја третмана екстрактом матичњака на инфламаторни инфилтрат карактеристичан за ЕАМ

модел. Овом методом једра се боје тамно плавом до црном бојом, док се цитоплазма боји розе до бледо љубичастом бојом. Протокол је био следећи: првенствено су испитиване секције ткива срца, које су претходно фиксиране и укалупљене у парафин сада депарафинизоване на следећи начин: загревањем у термостату у трајању од 45 минута на 56 °C и урањањем у ксилол 2 пута у трајању од по 5 минута, потом и рехидратисане. Рехидратација ткива спроводила се потапањем плочица у алкохол (2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу (100%), а потом по 5 минута у опадајућим концентрацијама алкохола 96%, 70%), да би се на крају плочице урониле у дестиловану воду (5 минута). Потом су плочице потопљене у боју *Mayer*-ов хематоксилин током 5 минута. Након испирања дестилованом водом, ткива су поново потопљена у боју еозин у трајању од 3 минута. Даљи процес подразумевао је испирање плочица дестилованом водом и поновну дехидратацију ткива урањањем у сада растуће концентрације алкохола (70%, 96%, 100%), просветљавање обојених секција ткива ксилолом и финално фиксирање ткива, монтирањем покровних стакала за плочице коришћењем DPX-а (мешавина дистирена и ксилена, (*Sigma-Aldrich, Co., USA*)).

Морфометријска анализа кардиомиоцита (пречник уздужног пресека као и површина попречног пресека) урађена је у програму за анализу слике *Axiovision image analysis program* (*Zeiss, USA*), где је анализирано 100-120 ћелија по животињи (225). Густина ћелијског инфилтрата анализирана је коришћењем програма *Image Pro-Plus programs* (*Media Cybernetics, USA*). Анализа густине ћелијског инфилтрата урађена је на укупно 10 пресека, од укупног броја серијских пресека срца, при чему је анализиран сваки 20. пресек срчаног ткива, односно растојање између анализираних пресека је 100 µm. Резултати су представљени у процентима. Важно је напоменути да у контролној групи није верификован ћелијски инфилтрат, па је вредност за густину инфилтрата у овој групи представљена као 0%. Сва морфометријска мерења су извршена у трипликату, а као финална вредност узета је просечна вредност три мерења. Такође, анализа су спровела два независна истраживача.

3.2.7.2. Испитивање ефеката примене екстракта матичњака на фиброзу миокарда и садржај колагена

3.2.7.2.1. Бојење *Picrosirius red* методом

Метода бојења *Picrosirius red* коришћена је за детекцију колагена у испитиваним ткивима миокарда што је од великог интереса за процену ефеката примене екстракта на фиброзу у срцу, која се карактеристично развија у оквиру дилатативне кардиомиопатије након 21. дана од индукције ЕАМ. У овој методи, колагена влакна боје се црвено, док се мишићна влакна и цитоплазма боје жуто. Протокол је подразумевао првобитну депарафинизацију и рехидратацију ткива срца према на претходно описани начин (**Поглавље 3.2.7.**). Када је процес рехидратације завршен, плочице су бојене *Picro Sirius Red* раствором (добива се растварањем 500 mg, урањањем у боју у трајању од 60 минута. Након тога следило је испирање боје, два пута у интервалима од по пет минута у 2% глацијалној сирћетној киселини. Након тога је поново ткиво дехидратисано потапањем у апсолутни алкохол (100%) 2 пута у трајању по 5 минута, да би се на крају ткива посветлила урањањем у ксилол. Финално обојени ткивни исечци фиксирани су DPX-ом за покровна стакла, и остављени да се суше 24 часа на собној температури. Сви препарати ткива су посматрани и сликани дигиталном камером под светлосним микроскопом (*Olympus BX51 light microscope*). Садржај колагена анализиран је у програму *Image Pro-Plus programs* (*Media Cybernetics, USA*), при чему је анализа извршена на 10 различитих пресека срчаног

тквива, односно анализиран је сваки 20. пресек, тј. растојање на сваких 100 μm . Резултати су представљени у процентима. Такође, квантификацију колагена су спровела два независна истраживача, а као финална вредност узета је просечна вредност два мерења.

3.2.7.2.2. Бојење Masson trichrome методом

Бојење по *Masson trichrome*-у је такође метода корисна у хистолошкој визуализацији колагених влакана везивног ткива у пресецима ткива срца, ради процене фиброзе и утицаја екстракта матичњака на исту, где се мишићна влакна боје црвено, док се једра боје тамно плаво/црно. Протокол бојења по *Masson trichrome*-у подразумева такође првенствено поступак депарафинизације и рехидратисања ткива (као претходно описано у *Поглављу 2.6.1.*). Следећи корак био је потапање плочица у загрејан *Bouins* (Буеново) раствор на 56 °C у трајању од 15 минута, и накнадно испирање дестилованом водом 10 минута. Затим је уследило урањање плочица у *Weigert*-ов хематоксилин (*Sigma Aldrich, USA*) у интервалу од 5 минута. Одмах након тога, ткива су испрана дестилованом водом, потом бојена у киселом фуксину (*Biebrich Scarlet Acid Fuchsin, Sigma Aldrich*) током 10 минута и поново испрана дестилованом водом. Затим су ткива уроњена у плаву боју која садржи смешу једнаке количине две киселине 5% фосфотунгстичне и 5% фосфомолибденске (*Phosphotungstic acid, Phosphomolybdic acid, Sigma Aldrich*). Тако обојене плочице бојене су још 5 минута 2,5% раствором анилин плавог (*Sigma Aldrich*). На крају, плочице су потопљене поново у дестиловану воду, а затим и у раствор 2% глацијалне сирћетне киселине током 5 минута, након чега је следио процес поновне дехидратације ткива у алкохолу (као претходно описано у *Поглављу 2.6.1.*), посветљавање и чишћење ткива ксилолом и финално монтирање ткива DPX-ом стављањем покровних стакала.

3.2.7.3. Испитивање утицаја примене екстракта матичњака на апоптозу у ткиву миокарда (TUNEL assay)

TUNEL assay (*енгл. Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling*) методу бојења ткива користили смо како бисмо проценили степен апоптозе у ткивима миокарда са ЕАМ, као и утицај хроничне примене екстракта матичњака на степен апоптозе у миокарду. Ткива срца свих експерименталних и контролних група подвргнута су овој анализи (CTRL/3, ЕАМ/3, МОЕ50/3, МОЕ100/3, МОЕ200/3, CTRL/6, ЕАМ/6, МОЕ50/6, МОЕ100/6 и МОЕ200/6). Ова метода заснива се на чињеници да се услед апоптозе кардиомиоцита активирају ензими ендонуклеазе које цепају фосфодиестарске везе унутар ДНК молекула, између нуклеотида, остављајући изложен 3'-ОН крај на који се може додати биотиниловани флуоресцентно обележен деоксиуридин-трифосфат (dUTP) посредством ензима терминалне деоксинуклеотидил трансферазе (TdT), што се може детектовати флуоресцентним микроскопом.

Секције ткива миокарда (5 μm) бојене су и анализирани према упутству произвођача комерцијалног TUNEL кита (*One-step TUNEL In Situ Apoptosis Kit, Elabscience*, каталогски број: Е-СК-А320/Е-СК-А321). Поступак је био следећи:

- Првенствено су секције ткива миокарда депарафинисане (потапањем у различите концентрације алкохола), а потом испране PBS-ом три пута по 5 минута
- Затим је додато пипетом 100 μl раствора протеиназе К на сваку плочицу, и инкубирано током 20 минута на температури од 37 °C. По истеку инкубационог периода плочице су поновно испране PBS-ом (3x5 min)

- Затим је пипетирано 100 μl *TdT Equilibration buffer*-а по плочици и инкубирано 15 минута на 37⁰С
- Потом је додато 50 μl TdT реакционе смеше за обележавање (смеша 5 μl TdT ензима, 40 μl *TdT equilibration buffer*-а и 5 μl biotin-dUTP-а) и инкубирано 60 минута на 37⁰С. Након инкубације уследило је испирање PBS-ом (3x5 min)
- Следећи корак било је додавање 100 μl DAPI раствора и инкубација током 5 минута на собној температури заштићено од светлости, након чега су плочице испране PBS-ом (4x5 min)
- Последњи корак подразумевао је додавање антифлуоресцентног средства у циљу фиксирања и монтирање ткива.

3.2.8. Испитивање утицаја примене екстракта матичњака на релативну експресију гена укључених у апоптозу, оксидациони стрес и инфламацију у левој комори срца

Употребом PCR методе уз коришћење одговарајућих прајмера (Табела 5) одређена је релативна експресија гена укључених у апоптозу (Bcl2, Bax), оксидациони стрес (SOD-1 или Cu/Zn SOD и SOD-2 или Mn SOD) и инфламацију (IL-17, Nf-kB). Сама процедура подразумевала је три одвојена корака:

1. изолацију укупне РНК из ткива миокарда
 - Ткива миокарда намењена за PCR анализу, чувана су на -80 °С, до момента одређивања. За одређивање релативне експресије гена из узорака ткива миокарда се употребом TRIzol-а издваја информациона РНК. Укупна РНК из леве коморе ткива миокарда изолована је коришћењем *Extractme Total RNA kit* (Blirt S.A., Gdansk, Poland, Каталошки број EM09.2, EM11.2) према упутству произвођача.
2. Реверзна транскрипција (превођење изоловане информационе РНК у комплементарну ДНК)
 - Реверзна транскрипција РНК (μg) спроведена је помоћу комплета за cDNA (*iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR*) (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA, Каталошки број 1708841) према инструкцијама наведеним у упутству произвођача.
3. Квантитативна полимеразна ланчана реакција у реалном времену (енгл. *real-time quantitative polymerase chain reaction*, RT-PCR)
 - PCR реакција изведена је помоћу *SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix* (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA, Каталошки број 172-5270) система и мРНК специфичних, комерцијално доступних прајмера за маркере оксидационог стреса SOD-1 и SOD-2, апоптозе Bax и Bcl-2 и инфламације NFkB и IL-17A (*Invitrogen, Carlsbad, CA*). Као housekeeping gene користили смо β -актин (*Invitrogen, Carlsbad, CA*). PCR је рађен у *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad), док су подаци накнадно анализирани и израчуната је релативна експресија гена према $2^{-\Delta\Delta C_t}$ методи коришћењем следеће формуле ():

$$\Delta C_t = C_t (\text{гена од интереса}) - C_t (\text{housekeeping gena})$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{експериментални аутоимунски миокардитис}) - \Delta C_t (\text{здрави срце})$$

$$2^{-\Delta\Delta C_t} = \text{релативна промена нивоа експресије гена од интереса у ЕАМ у односу на CTRL}$$

За сваки узорак узимана је средња вредност дупликата мерења, док је релативна експресија mRNA за сваки узорак представљена као количник експресије гена од интереса и експресије housekeeping гена (β -актина) (226).

Табела 5. Комерцијално доступни прајмери коришћени за RT-qPCR процедуру.

<i>маркер</i>	<i>Леви прајмер (sense)</i>	<i>Десни прајмер (antisense)</i>
<i>β-актин</i>	GATCAGCAAGCAGGAGTACGAT	GTAACAGTCCGCCTAGAAGCAT
<i>Bax</i>	GCTACAGGGTTTCATCCAGGAT	ATGTTGTTGTCCAGTTCATCGC
<i>Bcl-2</i>	GCAAAGCACATCCAATAAAAGCG	GТАCTTCATCACGATCTCCCGG
<i>SOD-1</i>	TGAAGAGAGGCATGTTGGAGAC	CACACGATCTTCAATGGACACA
<i>SOD-2</i>	AATCAACAGACCCAAGCTAGGC	CACAATGTCACTCCTCTCCGAA
<i>IL-17</i>	GCAAGAGATCCTGGTCCTGAAG	AGGTCTCTGTTTAGGACGCATG
<i>NF-κB</i>	GTTTGGTTTGAGACATCCCTGC	CTGTCTTATGGCTGAGGTCTGG

β -актин – *housekeeping* ген; Bax – Bcl-2 повезани протеин X; Bcl-2 – Б-ћелијски лимфом 2; SOD-1 – супероксид дизмутаза 1; SOD-2 - супероксид дизмутаза 2; IL-17A –интерлеукин 17A; NF- κ B – нуклеарни транскрипциони фактор капа бета.

3.3. Снага студије и величина узорка

Прорачун укупног узорка је базиран на резултатима претходно објављених студија. За прорачун је коришћен *t*-тест за везани узорак, уз претпоставку алфа грешке од 0,05 и снаге студије 0,8 (бета грешка 0,2) и уз коришћење одговарајућег рачунарског програма (70). Узимајући у обзир резултате ових студија као и опцију искључења неких пацова из студије, укупан број експерименталних животиња *Dark Agouti* је прорачунат на 170.

3.4. Статистичка обрада и анализа података

За статистичку обраду података коришћен је статистички пакет *IBM SPSS 22.0 for Windows*. Првенствено је испитивана нормалност расподеле коришћењем стандардних *Kolmogorov Smirnov* и *Shapiro Wilk* тестова, као и хистограм и *normal QQ plot*. У циљу идентификације статистички значајне разлике између испитиваних параметара, користили смо једнофакторску или двофакторску анализу варијансе (*One way ANOVA*; *Two-Way ANOVA*), а потом смо користили *Posthoc* тест *Bonfferoni* и *Tukey* да би се идентификовало између којих група постоји разлика која је статистички значајна. Као аналагни непараметарски тест коришћен је *Kruskal-Wallis* тест. Добијене вредности су приказиване у виду средње вредности (\bar{X}) \pm стандардна девијација (SD), а статистички значајном разликом сматрала се вредност $p < 0,05$. За креирање графикона и табела коришћен је *Microsoft Excel* за Mac рачунаре верзија 2016.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Принос добијених екстраката матичњака

У табели 6 су приказани добијени приноси екстраката матичњака на 100 g осушене биљне дроге, који су се разликовали у зависности од начина екстракције и особина (поларности) коришћених растварача.

Табела 6. Принос испитиваних екстраката матичњака

Узорак	Принос екстракта (g CE /100 g дроге)	Принос екстракта (%)
E ₁	0,30	1,5%
E ₂	5,37	26,8%
E ₃	1,66	8,3%

E₁ - етанолни мацерат матичњака; E₂ - водени екстракт под рефлуксом; E₃ - етанолни (70%) екстракт под рефлуксом. Принос је изражен у грамима сувог екстракта (g CE) на 100 g коришћене биљне дроге, као и процентуално.

Као што се и може уочити у табели, принос је вишеструко већи у случају воденог екстракта матичњака (26,8%), у односу на етанолни мацерат (1,5%) и етанолни екстракт матичњака добијен под рефлуксом растварача (8,3%) (Табела 6).

4.2. Укупни садржај фенола и флавоноида у испитиваним екстрактима матичњака

У табели 7 дат је приказ и поређење укупног садржаја фенола и укупног садржаја флавоноида у испитиваним екстрактима матичњака. Показано је да је водени екстракт E₂ садржи значајно већу количину укупних флавоноида у односу на два етанолна екстракта матичњака E₁ и E₃ ($p=0,000$; $p=0,000$). Није уочена статистички значајна разлика у нивоу укупног садржаја флавоноида између етанолног мацерата E₁ и етанолног екстракта под рефлуксом E₃ ($p>0,05$). Што се тиче укупног садржаја фенола у испитиваним екстрактима, може се уочити да етанолни екстракти E₁ и E₃ садрже нешто већу количину фенола у односу на водени екстракт матичњака, међутим ова разлика није статистички значајна ($p>0,05$; Табела 7).

Табела 7. Укупни садржај фенола и флавоноида у испитиваним екстрактима матичњака

Узорак	Укупан садржај фенола (mg GAE/g CE)	Укупан садржај флавоноида (mg QE/g CE)
E ₁	73,39 ± 6,25	6,229149 ± 0,39
E ₂	69,39 ± 6,79	10,948480 ± 0,48*
E ₃	73,19 ± 4,09	6,385199 ± 0,49 [#]

E₁ - етанолни мацерат матичњака; *E₂* - водени екстракт под рефлуксом; *E₃* - етанолни (70%) екстракт под рефлуксом; садржај фенола изражен је у милиграмима еквивалента галне киселине по граму сувог екстракта - mg GAE/g CE; садржај флавоноида изражен је у милиграмима еквивалента кверцетина по граму сувог екстракта - mg QE/g CE. * - Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0.05$ у односу на *E₁*; [#] - Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0.05$ у односу на *E₂*;

4.3. Хемијска карактеризација испитиваних екстраката матичњака

У табели 8 приказана је хемијска карактеризација, односно заступљеност одређених фенолних и флавоноидних компоненти у испитиваним екстрактима матичњака, одређена HPLC методом, док слика 1 приказује хроматограме сва три испитивана екстракта и детектованих једињења. У табели 9 приказани су параметри валидације HPLC методе за све испитиване стандарде (*trans*-циметна, кафена, *p*-кумаринска, хлорогена, розмаринска, ферулна и гална киселина, кверцетин, рутин и кверцитрин). Утврђено је да је најзаступљенији састојак сва три екстракта розмаринска киселина (РА), са значајно већим приносом у етанолним екстрактима *E₁* и *E₃* у односу на водени екстракт *E₂* ($p=0,000$; $p=0,000001$; **Слика 7**, **Табела 8**). Карактеристично је да етанолни екстракти *E₁* и *E₃* садрже значајно већи ниво фенолних киселина у поређењу са воденим екстрактом *E₂* (*trans*-циметна киселина ($p=0,000$; $p=0,000$), кафена киселина ($p=0,000$; $p=0,000$), *p*-кумаринска киселина ($p=0,000$; $p=0,000$), хлорогена киселина ($p=0,000$; $p=0,000$), РА и ферулна киселина ($p=0,000$; $p=0,000$)). Садржај галне киселине био је значајно виши у етанолном мацерату *E₁*, у поређењу са *E₂* и *E₃* ($p=0,000$; $p=0,000$). Додатно, измерена је значајно виша концентрација галне киселине у етанолном рефлукусу *E₃* у односу на водени екстракт *E₂* ($p=0,046$; **Табела 8**). Једина флавоноидна компонента пронађена у испитиваним екстрактима био је кверцетин, при чему је значајно виши садржај ове компоненте измерен у воденом екстракту *E₂* у односу на етанолне *E₁* и *E₃* ($p=0,000$; $p=0,000$; **Табела 8**). Такође, значајно виши ниво кверцетина измерен је у етанолном рефлукусу *E₃* у односу на етанолни мацерат *E₁* ($p=0,000$; **Табела 8**).

Табела 8. Хемијски састав испитиваних екстраката матичњака добијен HPLC анализом

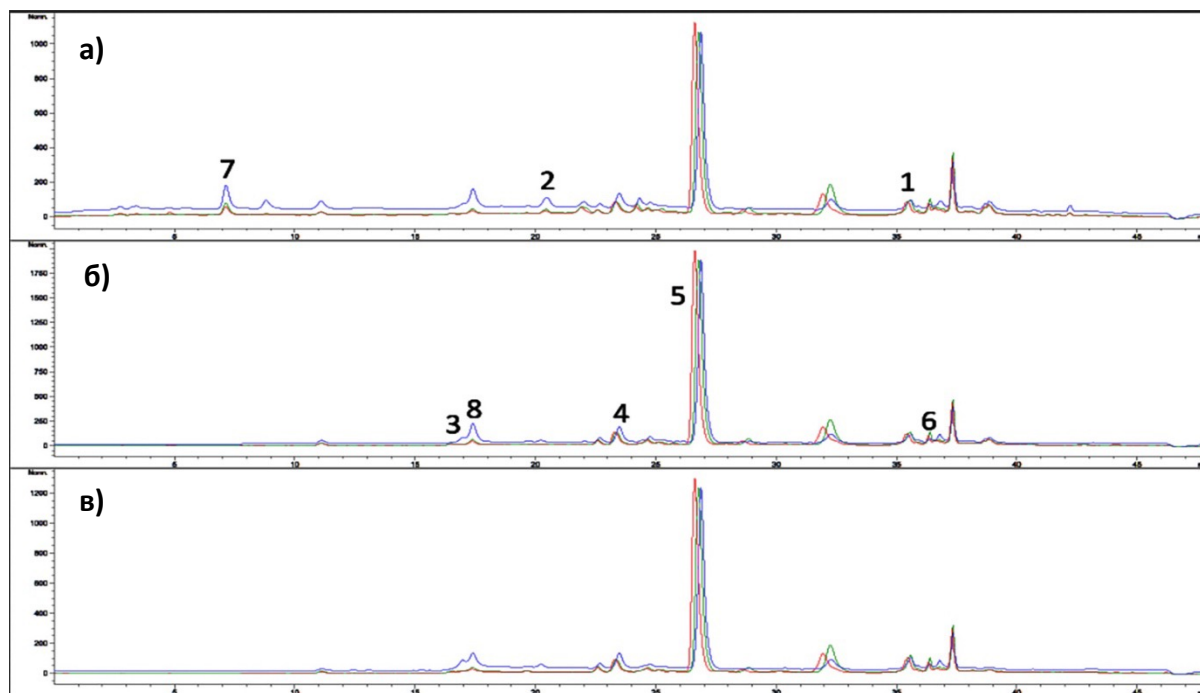
		E1		E2		E3	
		mg / g CE		mg / g CE		mg / g CE	
		X	U	X	U	X	U
Фенолне киселине	<i>trans</i> -циметна киселина	1,28	0,14	0,37	0,04 ^a	1,34	0,15 ^b
	кафена киселина	0,44	0,02	0,19	0,01 ^a	0,45	0,02 ^b
	<i>p</i> -кумаринска киселина	0,30	0,03	0,12	0,01 ^a	0,34	0,03 ^b
	хлорогена киселина	8,86	0,44	4,29	0,21 ^a	8,78	0,44 ^b
	розмаринска киселина	107,22	6,43	42,38	2,54 ^a	109,44	6,57 ^b
	ферулна киселина	0,34	0,02	0,22	0,01 ^a	0,36	0,02 ^b
Флавоноиди	гална киселина	0,77	0,12	0,07	0,01 ^a	0,11	0,02 ^{ab}
	кверцетин	0,69	0,05	1,84	0,13 ^a	1,08	0,08 ^{ab}
	рутин	<LOD		<LOD		<LOD	
	кверцитрин	<LOD		<LOD		<LOD	

*E*₁ - етанолни (70%) мацерат; *E*₂ - водени екстракт добијен под рефлуксом растварача. *E*₃ - етанолни (70%) екстракт добијен под рефлуксом растварача. CE - суви екстракт; LOD - лимит детекције; U - проширена мерна несигурност са фактором покривања $k = 2$; GAE - еквиваленти галне киселине; QE - еквиваленти кверцетина; ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p < 0.05$ у односу на *E*₁; ^bстатистички значајна разлика на нивоу $p < 0.05$ у односу на *E*₂.

Табела 9. Валидациони параметри HPLC методе

Компонента	Калибрациона крива	R ²	Range (µg/mL)	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)	U (%)
Гална киселина	$y=3,0497x+5,4494$	0,9986	0,3-18	0,06	0,30	15
<i>p</i> -кумаринска киселина	$y=5,5894x+12,473$	0,9900	0,2-12	0,03	0,20	10
Кафена киселина	$y=6,4807x+1,4900$	0,9999	0,2-12	0,03	0,20	7
Хлорогена киселина	$y=2,9003x+4,6870$	0,9995	0,3-30	0,10	0,30	5
Розмаринска киселина	$y=3,5125x+0,3320$	0,9983	0,5-30	0,15	0,50	6
<i>trans</i> -циметна киселина	$y=7,9398x+6,5650$	0,9997	0,1-60	0,05	0,10	11
Ферулинска киселина	$y=1,6072x-5,5120$	0,9979	0,2-36	0,10	0,20	6
Кверцитрин	$y=2,4017x-2,8372$	0,9995	0,5-30	0,15	0,50	5
Рутин	$y=2,1224x+5,4790$	0,9959	0,5-30	0,20	0,50	8
Кверцетин	$y=9,4489x+8,3990$	0,9981	0,18-10,80	0,03	0,18	5

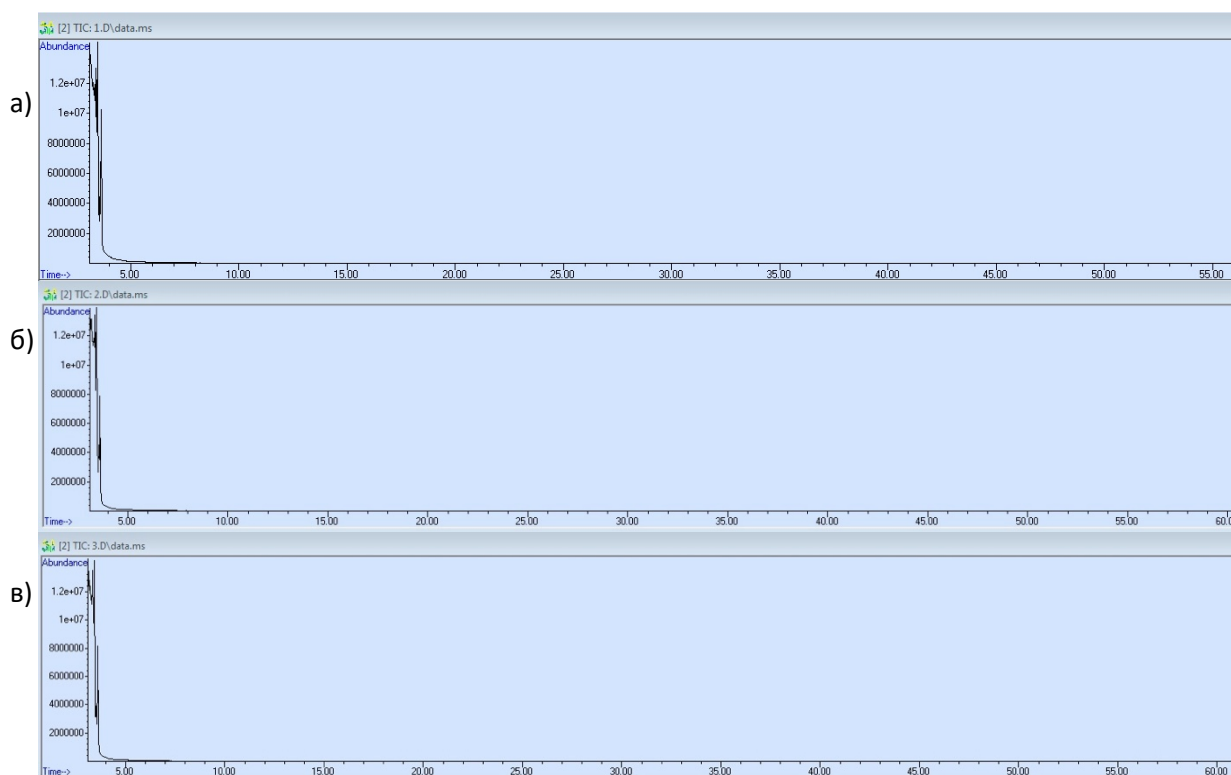
LOD – лимит детекције; LOQ – лимит квантификације; U- проширена мерна несигурност са фактором покривања $k = 2$.



Слика 7. Хроматограми испитиваних екстракта матичњака.

*E*₁ (плава линија), *E*₂ (црвена линија) и *E*₃ (зелена линија) са детекцијом на а) 280 nm, б) 330 nm, в) 350 nm. *E*₁- етанолни (70%) мацерат; *E*₂- водени екстракт добијен под рефлуксом растварача. *E*₃- етанолни (70%) екстракт добијен под рефлуксом растварача. Идентификована једињења: 1-*trans* циметна киселина, 2-кафена киселина, 3-*p*-кумаринска киселина, 4-хлорогена киселина, 5-розмаринска киселина, 6-ферулинска киселина, 7-гална киселина, 8-кверцетин.

На слици 8 приказани су хроматограми испитиваних екстраката матичњака добијени гасно-масеном хроматографијом. Гасно-масеном хроматографијом нису детектована испарљива једињења ни у једном од испитиваних екстраката (Слика 8).



Слика 8. Хроматограми испитиваних екстраката матичњака добијени GC/MS хроматографијом.

a) E₁ - етанолни (70%) мацерат; б) E₂ - водени екстракт добијен под рефлуксом растварача; в) E₃ - етанолни (70%) екстракт добијен под рефлуксом растварача.

4.4. Антиоксидациона активност испитиваних екстраката матичњака *in vitro*

У табели 10 представљен је антиоксидациони потенцијал испитиваних екстраката матичњака применом неколико различитих антиоксидационих тестова. Уочено је да екстракти матичњака добијени под рефлуксом E₂ и E₃ имају значајно већи потенцијал неутрализације DPPH радикала у односу на етанолни мацерат матичњака E₁ (p=0,006; p=0,003). Међутим, екстракт E₁ показао је бољи потенцијал да неутралише ОН хидроксилни радикал у односу на E₂ и E₃ (p=0,000; 0,001). Није уочена значајна разлика међу ефектима испитиваних екстракта на неутрализацију NO радикала (p>0,05). Етанолни екстракти E₁ и E₃ показали су већи потенцијал инхибиције липидне пероксидације у односу на водени екстракт матичњака E₂ (p=0,000; 0,000). Коришћењем FRAP теста уочено је да E₁ етанолни мацерат и E₂ водени екстракт имају већи потенцијал редукције гвожђа у односу на E₃ (p=0,004; p=0,010; Табела 10).

Ниједан од испитиваних екстраката није показао антиоксидациони потенцијал приближан стандардима попут аскорбинске киселине, пропил-галата и терцбутил-хидрокситолуена (Табела 10).

Табела 10. Антиоксидациони потенцијал испитиваних екстраката матичњака и позитивних контролних супстанци

Узорак	DPPH IC ₅₀	OH IC ₅₀	NO IC ₅₀	LP IC ₅₀	FRAP
	($\mu\text{g} / \text{mL}$)	($\mu\text{g} / \text{mL}$)	($\mu\text{g} / \text{mL}$)	($\mu\text{g} / \text{mL}$)	(mg AAE / g d.e.)
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
E ₁	9,95 \pm 0,39	39,99 \pm 3,14	36,67 \pm 3,75	50,54 \pm 4,16	341,71 \pm 42,69
E ₂	4,76 ^a \pm 0,48	55,97 ^a \pm 4,18	35,34 \pm 3,11	81,10 ^a \pm 6,47	329,06 \pm 23,75
E ₃	4,91 ^a \pm 0,49	61,34 ^a \pm 4,87	32,87 \pm 3,01	58,53 ^b \pm 5,15	294,39 ^{ab} \pm 11,67
AA	/	2,03 \pm 0,39*	/	/	/
PG	0,67 \pm 0,02*	8,94 \pm 0,45*	9,12 \pm 0,27*	/	/
BHT	/	0,04 \pm 0,00*	/	7,08 \pm 0,23*	/

E₁ - етанолни (70%) мацерат; E₂ - водени екстракт добијен под рефлуксом растварања; E₃ - етанолни (70%) екстракт добијен под рефлуксом растварања. DPPH - потенцијал испитиваних екстраката матичњака да неутралишу 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикал; OH - хидроксил радикал; NO - нитрозо радикал; LP - потенцијал за инхибицију липидне пероксидације; FRAP - потенцијал редуције гвожђа. IC₅₀ - концентрација екстракта неопходна за инхибицију 50% радикала. AAE - еквиваленти аскорбинске киселине; AA - аскорбинска киселина; PG - пропил-галат; BHT - терц-бутиловани-хидрокситолуен; \bar{X} - средња вредност; SD - стандардна девијација; ^aстатистички значајна разлика у односу на E₁ на нивоу p < 0,05; ^bстатистички значајна разлика у односу на E₂ на нивоу p < 0,05; *статистички значајна разлика између стандарда и сва три испитивана екстракта на нивоу p < 0,05.

4.5. Антиинфламаторни ефекти испитиваних екстраката матичњака

У табели 11 приказани су и поређени антиинфламаторни ефекти испитиваних екстраката матичњака на смањење едема шапице пацова индуковане применом карагенина, и то током шесточасовног периода посматрања.

Очекивано, у групи животиња третираних стандардним антиинфламаторним леком индометацином забележено је значајно смањење едема шапице у односу на контролну групу, и то почевши од другог сата па све до краја посматраног периода, шестог сата (p=0,000; p=0,000; p=0,005; p=0,001; p=0,001), при чему је најизраженији ефекат смањења едема постигнут у 5. и 6. сату посматрања (74,88% и 76,67%). Примена етанолног мацерата матичњака у дозама 50 и 100 mg/kg није значајно смањила едем шапице (p>0,05). Једино је највиша доза овог екстракта значајно смањила дијаметар едема у другом сату (p=0,031). Овај ефекат снижења едема шапице је перзистирао и у трећем, четвртном и петом сату посматрања, међутим то смањење није било статистички значајно, да би тек на крају посматраног периода у шестом сату био постигнут најизраженији ефекат смањења едема шапице (p=0,004). Овај ефекат био је сличан стандардном антиинфламаторном леку индометацину у шестом сату посматрања (63,89% vs. 76,67%), у свим осталим тренуцима забележени ефекти су били мањи у поређењу са ефектима који је остварио индометацин (p>0,05). С друге стране, водени екстракт је и у средњој дози E₂100 индуковао смањење едема у односу на CTRL, али тек у петом сату посматрања (p=0,025), забележени ефекат је перзистирао и

у шестом сату ($p=0,01$) и био је сличан као код IND групе (69,44% vs. 76,67%). Највиша доза овог екстракта E_2200 значајно је смањила едем шапице раније, у другом часу посматрања, сат након администрације карагенина и овај ефекат је трајао у трећем и четвртном сату посматраног периода ($p=0,000$; $p=0,044$), док је у петом сату посматрања и даље постојао тренд смањења едема шапице, међутим без статистички значајне разлике ($p>0,05$), да би на крају у последњој тачки мерења у 6. сату био забележено значајно смањен дијаметар шапице ($p=0,007$). У поменутом тренутку проценат инхибиције едема није се значајно разликовао у односу на IND групу (61,11% vs. 76,67%). Насупрот томе, када је у питању E_3 , само ниска и средња доза су испољиле ефекат смањења едема. E_350 и E_3100 су изазвали најбрже смањење едема шапице, већ у првом сату ($p=0,035$; $p=0,033$). Међутим, средња доза E_3100 постигла је континуирани ефекат смањења едема шапице од трећег сата након примене карагенина па све до краја посматраног периода тј. шестог сата ($p=0,035$; $p=0,040$; $p=0,041$; $p=0,023$) у односу на CTRL, док у односу на IND није било забележених разлика током целог периода посматрања. У случају ниске дозе E_350 , антиинфламаторни ефекат је перзистирао од првог до шестог сата ($p=0,038$; $p=0,049$; $p=0,016$; $p=0,025$; $p=0,021$). Такође ни у случају E_350 није било значајних разлика у односу на IND током целог периода посматрања ($p>0,05$; Табела 11).

Табела 11. *In vivo* антиинфламаторни потенцијал испитиваних екстраката матичњака
Смањење едема шапице(mm)
Инхибиција едема (%)

Група	1h	2h	3h	4h	5h	6h
E_150	0,52±0,08 13,89%	1,18±0,10 [#] 16,47%	0,97±0,08 [#] 20,55%	0,83±0,08 [#] 36,36%	0,58±0,08 [#] 18,60%	0,38±0,15 [#] 36,11%
E_1100	0,48±0,08 20,00%	1,30±0,14 [#] 8,24%	1,10±0,16 [#] 9,59%	0,89±0,15 [#] 2,91%	0,66±0,15 [#] 7,91%	0,36±0,09 [#] 40,00%
E_1200	0,60±0,13 0,00%	1,10±0,24 ^{*#} 22,35%	0,93±0,29 [#] 23,29%	0,73±0,25 [#] 20,00%	0,50±0,15 [#] 30,23%	0,22±0,20 [*] 63,89%
E_250	0,59±0,08 1,68%	1,38±0,10 [#] 2,35%	1,17±0,08 [#] 4,11%	0,90±0,10 [#] 2,91%	0,67±0,08 [#] 2,91%	0,48±0,08 [#] 19,44%
E_2100	0,35±0,29 41,67%	1,18±0,08 [#] 16,47%	1,17±0,08 [#] 4,11%	0,90±0,10 [#] 2,91%	0,33±0,23 [*] 53,49%	0,18±0,17 [*] 69,44%
E_2200	0,38±0,17 36,11%	0,70±0,26 [*] 50,59%	0,62±0,19 [*] 49,32%	0,48±0,19 [*] 47,27%	0,36±0,21 [#] 49,77%	0,23±0,23 [*] 61,11%
E_350	0,25±0,16 [*] 58,33%	0,95±0,34 [*] 32,94%	0,62±0,19 [*] 49,32%	0,53±0,36 [*] 41,82%	0,33±0,29 [*] 53,49%	0,27±0,10 [*] 55,56%
E_3100	0,25±0,16 [*] 58,33%	1,02±0,29 28,24%	0,80±0,25 [*] 34,25%	0,63±0,20 [*] 31,27%	0,47±0,23 [*] 34,88%	0,35±0,19 [*] 41,67%
E_3200	0,40±0,24 33,33%	0,98±0,26 30,82%	0,83±0,25 31,51%	0,63±0,25 25,82%	0,52±0,18 27,91%	0,42±0,19 30,56%
IND	0,56±0,11 6,67%	0,60±0,12 [*] 57,65%	0,44±0,11 [*] 63,84%	0,36±0,09 [*] 60,73%	0,18±0,13 [*] 74,88%	0,14±0,09 [*] 76,67%
CTRL	0,60±0,17	1,42±0,21 [#]	1,22±0,19 [#]	0,92±0,17 [#]	0,72±0,13 [#]	0,60±0,11 [#]

Вредности у табели представљају редуцију едема шапице (дијаметар леве – дијаметар десне шапе) изражен у mm. Инхибиција едема изражена у процентима. E_150 , E_1100 , E_1200 - пацови третирани етанолним (70%) мацератом матичњака у дози од 50, 100 или 200 mg/kg; E_250 , E_2100 , E_2200 – пацови третирани воденим екстрактом матичњака добијеног под рефлуксом растварача у дози од 50, 100 или 200 mg/kg; E_350 ,

E₃100, E₃200 – пацови третирани етанолним (70%) екстрактом матичњака добијеним под рефлуксом у дози од 50, 100 или 200 mg/kg. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$); *статистички значајна разлика у поређењу са контролном групом на нивоу $p < 0,05$; # статистички значајна разлика у поређењу са IND групом на нивоу $p < 0,05$.

4.6. Процена редокс статуса након карагенинског теста едема шапице

На графику 1 дат је приказ ефеката примењених екстракта матичњака на ниво прооксидационих параметара (нитрити, водоник-пероксид, индекс липидне пероксидације и супероксид анјон радикал) из узорак плазме, након спроведеног карагенинског теста едема шапице у односу на контролну групу и индометацин групу, док је у табели 7 дат приказ поређења ефеката на поменуте параметре, унутар групе и између група.

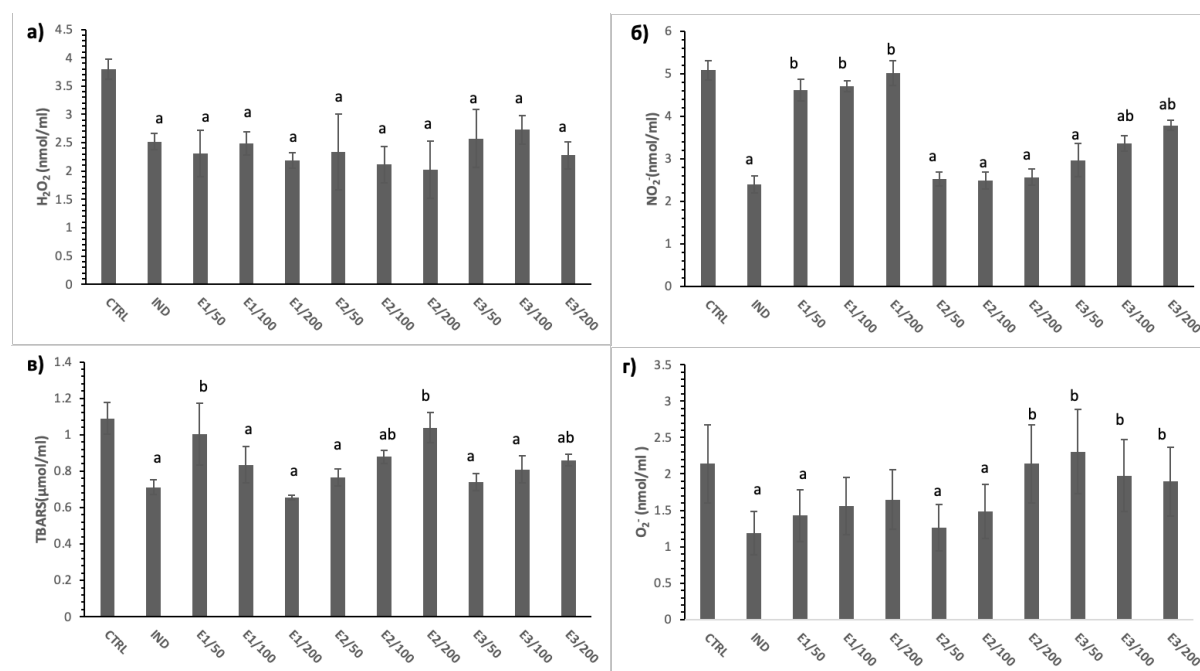


График 1. Ефекти примењених екстракта матичњака на прооксидационе параметре након карагенинског теста едема шапице.

а) H_2O_2 - водоник пероксид; б) NO_2^- - нитрити; в) TBARS – индекс липидне пероксидације; г) O_2^- – супероксид анјон радикал. *E₁/50, E₁/100, E₁/200*- пацови третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног (70%) маџерата матичњака; *E₂/50, E₂/100, E₂/200* – пацови третирани са 50, 100 или 200 mg/kg воденог екстракта матичњака добијеног под рефлуксом растварача; *E₃/50, E₃/100, E₃/200* – пацови третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака (70%) добијеног под рефлуксом растварача; ^aзначајна разлика у односу на контролну групу на нивоу $p < 0,05$; ^bзначајна разлика у односу на индометацин (IND) групу на нивоу $p < 0,05$. Подаци су приказани као средње вредности ± стандардна девијација ($X \pm SD$)

У групи животиња третираних индометацином примећено је значајно снижење нивоа водоник-пероксида (H_2O_2) у односу на контролну групу нетретираних животиња ($p=0,000$). Исти тренд забележен је и у случају све три дозе етанолног мацерата E_1 ($p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,000$), све три дозе воденог екстракта E_2 ($p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,000$), као и све три дозе етанолног екстракта матичњака под рефлуксом ($p=0,000$; $p=0,001$; $p=0,000$). Ефекти свих испитиваних екстраката на ниво H_2O_2 нису се значајно разликовали у односу на ефекат IND групе ($p>0,05$) (**График 1а**). Унутар E_1 групе, најизраженије снижење H_2O_2 постигнуто је дозом од 200 mg/kg, што је било значајно ниже у односу на средњу дозу E_1 од 100 mg/kg ($p=0,049$). У случају воденог екстракта средња и висока доза, постигле су значајније снижење водоник-пероксида у односу на ниску дозу овог екстракта ($p=0,040$; $p=0,033$), док је код екстракта E_3 , највиша доза била ефикаснија у односу на средњу дозу од 100 mg/kg ($p=0,041$). Поређењем ефеката ова три испитивана екстракта у истим, аналогним дозама примећено да је једино у случају средње дозе од 100 mg/kg, E_2 водени екстракт индуковао значајан пад H_2O_2 у односу на E_3 ($p=0,009$), док се ефекти ова три испитивана екстракта на ниво водоник-пероксида у ниској 50 mg/kg и високој дози од 200 mg/kg нису значајно разликовали ($p>0,05$; **График 1а**; **Табела 12**).

Концентрација нитрита (NO_2^-) била је значајно нижа у IND групи у односу на CTRL групу животиња ($p=0,000$), а исти овај ефекат постигнут је и у групама третираним воденим екстрактом E_2 ($p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,000$) и у групама третираним етанолним екстрактом под рефлуксом E_3 у све три дозе ($p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,000$). Ниво нитрита у E_1 групи био је сличан вредностима у контролној групи, а значајно виши у односу на индометацин групу, и то у све три испитиване дозе ($p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,000$). Иако су све три дозе екстракта E_3 значајно смањиле ослобађање нитрита у односу на CTRL, у групама третираним средњом и високом дозом $E_3/100$ и $E_3/200$ су вредности нитрита биле значајно више у односу на IND групу ($p=0,003$; $p=0,000$) (**График 1б**). У оквиру E_1 групе, најбољи ефекат показала је ниска доза овог екстракта, при чему је измерен ниво нитрита у овој групи био значајно нижи у односу на високу дозу ($p=0,020$). С друге стране, у E_3 групи, ниска и средња доза су биле ефикасније у односу на високу ($p=0,005$; $p=0,032$). Међутим, у случају E_2 групе, није било значајних разлика у нивоу нитрита поређењем три испитиване дозе овог екстракта ($p>0,05$). Поредивши ефекте ова три различита екстракта на ниво нитрита у аналогним дозама, примећено је да су највише вредности нитрита у све три дозе измерене код E_1 , у поређењу са E_2 и E_3 ($p=0,000$; $p=0,000$). Додатно, поређењем ефеката E_2 и E_3 примећено је да је у средњој и највишој дози примена воденог екстракта довела до смањења нитрита у односу на E_3 ($p=0,000$; $p=0,000$; **График 1б**; **Табела 12**).

Индекс липидне пероксидације мерен као TBARS био је значајно нижи у IND групи у односу на контролну групу, а исти ефекат је примећен и у групама $E_1/100$ $E_1/200$, $E_2/50$ $E_2/100$, $E_3/50$, $E_3/100$ и $E_3/200$ ($p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,000$, $p=0,001$; $p=0,000$, $p=0,000$; $p=0,000$). Супротно, примена најниже дозе E_1 екстракта, високе дозе E_2 , није успела да снизи ниво овог прооксидационог параметра у односу на CTRL. Међутим, у ове две групе, као и у групама $E_2/100$ и $E_3/200$ су вредности TBARS биле значајно више у односу на IND групу ($p=0,000$; $p=0,016$; $p=0,000$; $p=0,048$) (**График 1в**). Дозно-зависни ефекат примећен је у оквиру E_1 групе, при чему је највеће снижење TBARS забележено у случају високе дозе у односу на средњу и ниску дозу овог екстракта ($p=0,000$; $p=0,000$). Супротно запажање је забележено у оквиру E_2 групе, значајан пад TBARS забележен у групи третираној ниском дозом у односу на високу дозу ($p=0,000$), као и значајан пад TBARS групи третираној средњом дозом у односу на високу дозу E_2 ($p=0,000$). С друге стране, ефекти три испитиване дозе екстракта E_3 на TBARS били су слични ($p>0,05$). Ниске дозе екстракта E_2 и E_3 индуковале су значајан пад TBARS у

односу на исту дозу E_1 ($p=0,000$; $p=0,000$), а када је у питању средња доза није било значајних разлика у нивоу TBARS између испитиваних екстраката ($p>0,05$). На крају, посматрајући ефекте високе дозе, може се приметити значајно нижи ниво овог параметра у E_1 групи у односу на исту дозу E_2 и E_3 екстраката ($p=0,048$; $p=0,033$; **График 1в; Табела 12**).

Концентрација супероксид анјон радикала (O_2^-) била је значајно снижена у групи третираној стандардним антиинфламаторним леком индометацином ($p=0,000$), а такође и у групи третираној ниском дозом етанолног мацерата ($E_1/50$; $p=0,049$), и ниском и средњом дозом воденог екстракта ($E_2/50$ и $E_2/100$; $p=0,020$; $p=0,038$). Све три дозе екстракта E_3 ($p=0,000$; $p=0,003$; $p=0,014$), као и највиша доза E_2 ($p=0,000$) индуковали су значајно више ослобађање овог прооксиданса у односу на индометацин, док разлике у односу на CTRL није било ($p>0,05$). У оквиру E_1 није било значајних разлика у ефектима примењених доза на O_2^- , док када посматрамо водени екстракт E_2 може се приметити да су ниска и средња доза изазвала значајан пад O_2^- у односу високу дозу ($p=0,049$; $p=0,020$). Супротно, у случају E_3 екстракта, висока доза постигла је значајан пад овог параметра у односу на ниску дозу ($p=0,022$;). Поредивши ефекте аналогних доза испитиваних екстракта, уочено је да ниска и средња доза показују сличан тренд, значајно ниже вредности O_2^- у случају екстракта E_1 и E_2 у односу на ниску и средњу дозу E_3 ($p=0,016$; $p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,024$), док се код примене високе дозе уочава да су вредности O_2^- значајно ниже у E_1 групи у односу на исте дозе екстраката E_2 и E_3 ($p=0,025$; $p=0,043$; **График 1г; Табела 12**).

На графику 2 дат је приказ ефеката примењених екстракта матичњака на активност антиоксидационих ензима (супероксид-дизмутаза и каталаза) и редукованог глутатиона из узорака лизата еритроцита, након спроведеног карагенинског тест едема шапице у односу на контролну групу и индометацин групу, док је у табели 7 дат приказ поређења ефеката на исте параметре, унутар групе и између група.

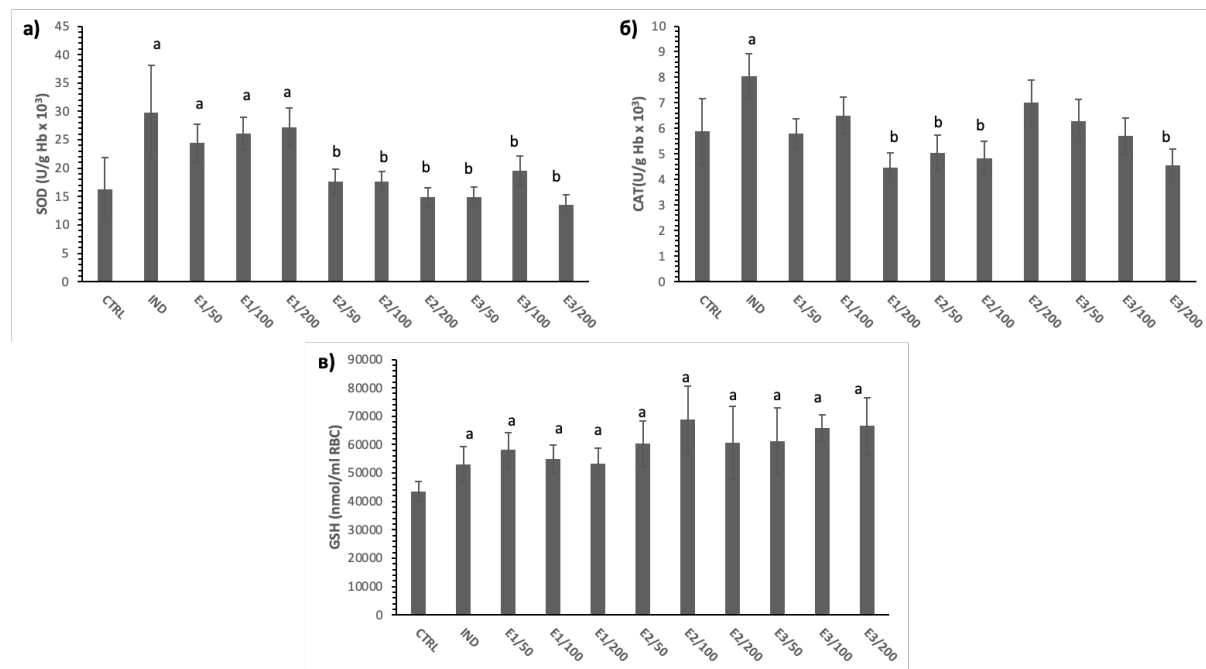


График 2. Ефекти примењених екстракта матичњака на параметре антиоксидационе заштите након карагенинског теста едема шапице.

a) SOD - супероксид дизмутаза ; б) CAT - каталаза ; в) GSH – редуковани глутатион. E₁/50, E₁/100, E₁/200- пацови третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног (70%) мацерата матичњака; E₂/50, E₂/100, E₂/200 – пацови третирани са 50, 100 или 200 mg/kg воденог екстракта матичњака добијеног под рефлуксом растварача; E₃/50, E₃/100, E₃/200 – пацови третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака (70%) добијеног под рефлуксом растварача; ^aзначајна разлика у односу на контролну групу на нивоу $p < 0,05$; ^bзначајна разлика у односу на индометацин (IND) групу на нивоу $p < 0,05$. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$)

Индометацин и све три дозе E_1 етанолног мацерата довеле су до значајног повећања активности SOD у поређењу са контролном групом ($p=0,000$; $p=0,011$; $p=0,020$; $p=0,038$). Активност овог ензима у свим дозама воденог екстракта E_2 ($p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,010$; и етанолног екстракта под рефлуксом E_3 ($p=0,000$; $p=0,030$; $p=0,002$) била је значајно нижа у односу на IND групу и слична вредностима у контролној групи. Није било значајних разлика у активности SOD унутар E_1 и E_2 група, док је унутар E_3 групе средња доза овог екстракта изазвала повећање SOD у односу на ниску и високу дозу ($p=0,050$; $p=0,042$). Етанолни мацерат био је ефикаснији у повећању активности SOD у односу на водени екстракт ($p=0,023$; $p=0,000$; $p=0,003$), као и у односу етанолни екстракт под рефлуксом ($p=0,021$; $p=0,045$; $p=0,000$) у све три испитиване дозе (**График 2а; Табела 13**).

Активност CAT је била значајно већа само у индометацин групи у поређењу са контролом ($p=0,049$), док је значајно нижа активност каталазе у односу на IND групу примећена у групама $E_1/200$, $E_2/50$, $E_2/100$, $E_3/200$ ($p=0,000$; $p=0,020$; $p=0,015$; $p=0,033$). Унутар групе E_1 повећање CAT забележено је у средњој дози у односу на високу ($p=0,048$), док је унутар групе E_2 висока доза била ефикаснија у односу на средњу и ниску ($p=0,012$; $p=0,028$), док је унутар групе E_3 ниска доза показала бољи ефекат у односу на високу дозу ($p=0,041$). Најнижа и средња доза екстракта E_1 , E_2 и E_3 имале су сличан ефекат на активност каталазе, без значајних разлика ($p>0,05$). С друге стране највиша доза екстракта E_2 индуковала је повећање CAT у односу на E_1 и E_3 ($p=0,030$; $p=0,22$; **График 2б; Табела 13**).

Сва три примењена екстракта E_1 ($p=0,049$; $p=0,049$; $p=0,041$), E_2 ($p=0,039$; $p=0,022$; $p=0,047$), и E_3 ($p=0,048$; $p=0,22$; $p=0,19$) у свим дозама, као и индометацин ($p=0,049$) индуковали су значајно повећавање нивоа GSH у односу на контролу. Није било значајних разлика између сви испитиваних екстракта у односу на IND групу ($p>0,05$). Нису забележене значајне разлике између доза унутар E_1 групе, као ни у оквиру E_3 групе ($p>0,05$), док је унутар E_2 групе уочен најизраженији пораст нивоа GSH у средњој дози, у односу на ниску и високу дозу овог екстракта ($p=0,049$; $p=0,038$). Значајан пораст GSH примећен је у средњим дозама у групама $E_2/100$ и $E_3/100$ у поређењу са $E_1/100$ ($p=0,021$; $p=0,034$). У највишој дози забележен је значајни пораст нивоа GSH у $E_3/200$ групи у односу на друга два екстракта $E_1/200$ ($p=0,010$; **График 2в; Табела 13**).

Табела 12. Ефекти испитиваних екстраката матичњака на ниво про-оксидационих параметара након теста едема шапице изазваног карагенином.

<i>Група</i>	H_2O_2 (nmol/ml)	NO_2^- (nmol/ml)	TBARS (nmol/ml)	O_2^- (nmol/ml)
<i>E₁/50</i>	2,31±0,41	4,62±0,26	1,00±0,17 ^{*#}	1,43±0,68
<i>E₁/100</i>	2,49±0,20	4,70±0,13	0,84±0,10	1,56±0,33
<i>E₁/200</i>	2,19±0,14 [*]	5,02±0,29 [*]	0,66±0,10 [*]	1,65±0,33
<i>E₂/50</i>	2,34±0,67 ^{*#}	2,53±0,16 ^a	0,76±0,05 ^{#a}	1,26±0,70 [#]
<i>E₂/100</i>	2,11±0,32	2,48±0,20 ^a	0,88±0,04	1,48±0,74
<i>E₂/200</i>	2,02±0,50	2,57±0,19 ^a	1,04±0,08 ^a	2,14±0,54 ^a
<i>E₃/50</i>	2,58±0,51	2,96±0,39 ^{#a}	0,74±0,05 ^a	2,31±0,47 ^{ab}
<i>E₃/100</i>	2,73±0,25 ^b	3,37±0,18 ^{ab}	0,81±0,08	1,98±0,49 ^{ab}
<i>E₃/200</i>	2,28±0,24 [*]	3,79±0,11 ^{*ab}	0,86±0,03 ^{ab}	1,89±0,38 ^{#a}

H_2O_2 - водоник пероксид; NO_2^- - нитрити; TBARS - индекс липидне пероксидације; O_2^- - супероксид анјон радикал; *E₁/50*, *E₁/100*, *E₁/200*- пацови третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног (70%) мацерата матичњака; *E₂/50*, *E₂/100*, *E₂/200* - пацови третирани са 50, 100 или 200 mg/kg воденог екстракта матичњака добијеног под рефлуксом растварача; *E₃/50*, *E₃/100*, *E₃/200* - пацови третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака (70%) добијеног под рефлуксом растварача. ^{*}значајна разлика у поређењу са 100 mg/kg унутар групе; [#]у поређењу са 200mg/kg унутар групе; ^aстатистички значајна разлика у поређењу са истом дозом *E₁*; ^bстатистички значајна разлика у поређењу са истом дозом *E₂*.

Табела 13. Ефекти испитиваних екстраката матичњака на ниво анти-оксидационих параметара након теста едема шапице изазваног карагенином.

<i>Група</i>	SOD (U/g Hbx10 ³)	CAT (U/g Hbx10 ³)	GSH (nmol/ml RBC)
<i>E₁/50</i>	24,42±3,32	5,79±0,58	58079,31±6096,09
<i>E₁/100</i>	26,05±2,87	6,50±0,71	54904,18±4885,96
<i>E₁/200</i>	27,13±3,53	4,46±0,58*	53148,98±5716,80
<i>E₂/50</i>	17,64±2,15 ^a	5,05±0,68 [#]	60248,66±8089,83
<i>E₂/100</i>	17,64±1,77 ^a	4,83±0,67 [#]	68728,83±11923,66 ^{#a}
<i>E₂/200</i>	14,92 ±1,59 ^a	7,00±0,89 ^{*a}	60643,09±12874,12 [*]
<i>E₃/50</i>	14,92±1,70 ^a	6,29±0,84 [#]	61234,73±11628,40
<i>E₃/100</i>	19,54±2,54 ^{a#}	5,70±0,72	65908,68±4515,11 ^a
<i>E₃/200</i>	13,57±1,70 ^a	4,54±0,64 ^b	66559,49±9884,11 ^a

SOD - супероксид-дизмутаза; *CAT* - каталаза; *GSH* - редуковани глутатион; *E₁/50*, *E₁/100*, *E₁/200*- пацови третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног (70%) маџерата матичњака; *E₂/50*, *E₂/100*, *E₂/200* - пацови третирани са 50, 100 или 200 mg/kg воденог екстракта матичњака добијеног под рефлуксом растварача; *E₃/50*, *E₃/100*, *E₃/200* - пацови третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака (70%) добијеног под рефлуксом растварача. *значајна разлика у поређењу са 100 mg/kg унутар групе; [#]у поређењу са 200mg/kg унутар групе; ^aстатистички значајна разлика у поређењу са истом дозом *E₁*; ^bстатистички значајна разлика у поређењу са истом дозом *E₂*.

4.7. Ефекти екстракта матичњака на телесну масу, Hw/Bw однос и Sw/Bw однос у ЕАМ моделу

У табели 14 приказан је утицај примене етанолног екстракта матичњака (у претходним поглављима описан као Е₃) на морфометријске параметре, телесну тежину животиња измерену на крају протокола пред жртвовање, а након жртвовања измерене су и тежине органа од интереса, срца и слезине у свим испитиваним групама са циљем израчунавања односа тежине срца и телесне тежине (Hw/Bw) (показатељ кардиомегалије), као и односа тежине слезине и телесне тежине (Sw/Bw) (показатељ спленомегалије).

Табела 14. Ефекти екстракта матичњака на телесну масу, масу срца и слезине, Hw/Bw и Sw/Bw однос у ЕАМ моделу.

Група	Bw (g)	Hw (mg)	Sw (mg)	Hw/Bw (mg/g)	Sw/Bw (mg/g)
<i>CTRL/3</i>	215,29±5,71	777,14±34,50	403,29±23,61	3,61±0,14	1,87±0,08
<i>EAM/3</i>	212,00±14,97	1014,47±110,89 ^a	447,57±15,08 ^a	4,81±0,80 ^a	2,12±0,17 ^a
<i>MOE50/3</i>	195,87±9,34	937,50±88,28 ^a	398,12±23,89 ^a	4,80±0,60 ^a	2,04±0,20 ^a
<i>MOE100/3</i>	191,5±8,43	760,22±67,17 ^{bc}	373,87±15,91 ^{bc}	3,91±0,26 ^{bc}	1,93±0,89 [*]
<i>MOE200/3</i>	194,25±6,13	782,34±29,73 ^{bc}	335,12±15,57 ^{bc}	4,00±0,21 ^{bc}	1,71±0,07 ^{bc}
<i>CTRL/6</i>	222,43±10,08	784,28±35,05	411,14±30,07	3,53±0,24	1,85±0,06
<i>EAM/6</i>	212,25±7,03	1009,12±70,43 ^a	500,62±17,51 ^{a*}	4,67±0,31 ^a	2,42±0,10 ^{a*}
<i>MOE50/6</i>	197,50±18,09	838,87±65,51 ^{b*}	404,62±44,68 ^b	4,26±0,36 ^{b*}	2,06±0,23 ^b
<i>MOE100/6</i>	196,12±7,02	822,87±86,92 ^b	419,00±30,61 ^{b*}	4,19±0,41 ^b	2,13±0,11 ^{b*}
<i>MOE200/6</i>	200,75±6,04	814,75±28,91 ^b	394,00±34,49 ^{b*}	4,06±0,13 ^b	1,97±0,22 ^{b*}

Bw – телесна тежина животиња у грамама; Hw – тежина срца у милиграмима; Sw – тежина слезине у милиграмима; Hw/Bw – однос тежине срца и телесне тежине у милиграмима по граму; Sw/Bw – однос тежине слезине и телесне тежине у милиграмима по граму. CTRL/3; CTRL/6 – здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; EAM/3; EAM/6- пацови са индикованим ЕАМ подвргнути протоколу од 3 или 6 недеље; MOE50/3, MOE50/6; MOE100/3, MOE100/6; MOE200/3; MOE200/6 - пацови са ЕАМ третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака 3 или 6 недеља. ^a статистички значајна разлика на нивоу $p < 0.05$ у поређењу са CTRL; ^b у поређењу са EAM; ^c у поређењу са MOE50; * статистички значајна разлика између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 недеље у односу на протокол од 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности ± стандардна девијација ($X \pm SD$).

Индукција експерименталног аутоимунског миокардитиса, као ни третман екстрактом матичњака нису утицали на промене телесне тежине животиња. Телесна тежина на крају експерименталног протокола се није значајно разликовала међу свим испитиваним групама, без обзира на дужину протокола ($p > 0,05$).

Када посматрамо тежину изолованог срца, може се приметити да је тежина срца значајно повећана у групама EAM/3 и EAM/6 у поређењу са здравим животињама CTRL/3 и CTRL/6 групе ($p=0,000$; $p=0,000$). Такође, тежина срца је била већа и у MOE50/3 у односу на CTRL/3 ($p=0,023$). Тронедельни третман средњом и високом дозом екстракта матичњака довео је до значајне редукције Hw у односу на EAM/3

($p=0,000$; $p=0,000$), а такође и у односу на ниску дозу (МОЕ50/3 група; $p=0,000$; $p=0,000$). Што се тиче шестонедељног протокола, све три испитиване дозе су значајно редуковале тежину срца у односу на ЕАМ/6 групу ($p=0,000$; $p=0,000$), без међусобних разлика ($p>0,05$). Једино је доза од 50mg/kg показала израженији ефекат на Hw уколико је третман дужи, шест недеља, у односу на три недеље третмана ($p=0,005$), док код осталих група није било различитости у погледу ефеката у зависности од дужине протокола ($p>0,05$). Очекивано, ЕАМ/3 и ЕАМ/6 групе пацова са индукованим аутоимунским миокардитисом показале су значајно повећан Hw/Bw однос у односу на здраве животиње ($p=0,000$; $p=0,000$), као и МОЕ50 ($p=0,000$; $p=0,000$) док су дозе од 100 и 200 mg/kg екстракта матичњака успеле да овај ефекат спрече, показујући значајно ниже вредности Hw/Bw односа у односу на ЕАМ групу и МОЕ50 у тронедељном протоколу ($p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,000$). Са друге стране, у шестонедељном протоколу, све три дозе су постигле овај ефекат ($p=0,016$; $p=0,002$; $p=0,000$). Искључиво је доза од 50mg/kg показала израженији ефекат на Hw/Bw однос уколико је третман дужи, шест недеља, у односу на три недеље третмана ($p=0,003$; **Табела 14**).

Сличан тренд је запажен и у случају анализе тежине изоловане слезине пацова, значајно увећање слезине у ЕАМ/3 и ЕАМ/6 у поређењу са здравим животињама CTRL/3 и CTRL/6 групе ($p=0,001$; $p=0,000$). У тронедељном протоколу, само средња и висока доза су успеле значајно да редукују тежину слезине у односу на ЕАМ/3 групу ($p=0,000$; $p=0,000$), при чему су ове две дозе биле значајно ефикасније у односу на ниску дозу МОЕ50/3 групу ($p=0,046$; $p=0,000$). С друге стране, код хроничног шестонедељног протокола, све три дозе екстракта су значајно смањиле тежину слезине у односу на ЕАМ/6 групу ($p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,000$), при чему се њихови ефекти нису значајно разликовали ($p>0,05$). Израженије повећање тежине слезине забележено је у ЕАМ/6, МОЕ100/6 и МОЕ200/6 групама у односу на аналогне групе подвргнуте краћем протоколу од три недеље ($p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,000$). Sw/Bw однос, као показатељ увећања слезине, био је значајно виши у ЕАМ у односу на CTRL групу, и то у оба посматрана протокола ($p=0,000$; $p=0,000$). Само висока доза екстракта је успела да снизи вредност Sw/Bw односа у односу на ЕАМ/3 групу у тронедељном третману ($p=0,000$), док су у случају протокола од шест недеља све три дозе значајно снизиле овај параметар у поређењу са ЕАМ/6 ($p=0,000$; $p=0,002$; $p=0,000$). Значајно више вредности Sw/Bw односа су забележене у ЕАМ/6, МОЕ100/6 и МОЕ200/6 групама у односу на аналогне групе животиња подвргнуте краћем протоколу од три недеље ($p=0,001$; $p=0,010$; $p=0,003$; **Табела 14**)

4.8. Ефекти екстракта матичњака на хемодинамске параметре у ЕАМ моделу

У сврхе потврде индукције аутоимунског миокардитиса, као и ефеката примене екстракта на хемодинамику, животињама су мерени систолни и дијастолни крвни притисак и срчана фреквенца и то на почетку експерименталног протокола (нултог дана пре индукције болести), а затим након 3 недеље (21. дана) и након 6 недеља (42. дана). У истим временским тачкама, животиње су биле подвргнуте ехокардиографији како би се утврдиле димензије леве коморе, фракционо скраћење, као и ејекциона фракција.

4.8.1. Ефекти екстракта матичњака на артеријски крвни притисак и срчану фреквенцу у ЕАМ моделу

У табели 15 приказане су измерене вредности и промене артеријског крвног притиска, систолног и дијастолног, и срчане фреквенце у ЕАМ моделу, у више тренутака мерења, на почетку нултог дана, 21. дана и 42. дана.

Табела 15. Ефекти екстракта матичњака на систолни и дијастолни крвни притисак, и срчану фреквенцу у ЕАМ моделу.

Група	Посматрани период	SBP (mmHg)	DBP (mmHg)	HR (beats/min)
CTRL/3	0. дан	129,00±6,78	81,50±7,98	368,00±43,84
	21. дан	133,60±7,60	81,40±4,93	367,60±17,62
EAM/3	0. дан	129,25±5,06	81,20±7,66	376,60±21,81
	21. дан	133,25±6,13	78,75±6,08	453,75±40,54 ^{*a}
MOE50/3	0. дан	123,20±7,12	83,00±6,82	361,40±16,58
	21. дан	124,75±5,85	79,25±8,42	373,50±18,73 ^{*b}
MOE100/3	0. дан	128,50±4,04	83,00±5,10	368,25±6,24
	21. дан	121,00±5,72	80,00±5,35	333,00±11,22 ^{*abc}
MOE200/3	0. дан	126,25±6,90	81,75±6,80	369,75±22,63
	21. дан	113,80±4,95 ^{*abc}	68,60±4,95 [*]	332,60±25,46 ^{*abc}
CTRL/6	0. дан	124,50±4,95	68,33±6,66	317,50±19,09
	42. дан	123,67±9,11 [#]	66,67±8,73 [#]	324,5±7,77 [#]
EAM/6	0. дан	128,00±7,52	70,55±15,55	296,00±16,97
	42. дан	106,00±3,53 ^{*#a}	75,00±11,31	375,00±43,21 ^{*#a}
MOE50/6	0. дан	126,00±5,67	75,25±6,67	320,5±21,33
	42. дан	125,17±8,67 ^b	77,50±6,42	369,83±30,67 [*]
MOE100/6	0. дан	125,00±9,78	76,80±7,89	315,25±20,67
	42. дан	127,00±8,94 ^b	79,67±8,52	361,00±33,59 [*]
MOE200/6	0. дан	129,50±7,86	76,45±8,23	313,75±24,12
	42. дан	128,00±8,53 ^{#b}	78,50±7,82 [#]	373,5±22,45 ^{*#}

SBP - систолни крвни притисак (mmHg); DBP - дијастолни крвни притисак (mmHg); HR - срчана фреквенца (број откуцаја по минути). CTRL/3; CTRL/6 - здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; EAM/3; EAM/6 - пацови са индукованим ЕАМ подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; MOE50/3; MOE50/6; MOE100/3; MOE100/6; MOE200/3; MOE200/6 - пацови са ЕАМ третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака. ^a статистички значајна разлика на нивоу $p < 0.05$ у поређењу са CTRL; ^b у поређењу са ЕАМ; ^c у поређењу са MOE50; ^{*} статистички значајна разлика унутар групе [#] статистички значајна разлика између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 недеље у односу на протокол од 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности ± стандардна девијација ($X \pm SD$).

Систолни крвни притисак на крају тронедељног протокола није се значајно разликовао између CTRL/3, EAM/3 као ни MOE50/3 и MOE100/3 ($p > 0,05$). Међутим тронедељна суплементација високом дозом екстракта матичњака је довела до значајног смањења SBP у односу на здраве CTRL/3 ($p = 0,000$), болесне животиње EAM/3 ($p = 0,000$), као и животиње третиране ниском MOE50/3 ($p = 0,016$). Када посматрамо шестонедељни протокол, може се уочити значајан пад SBP код болесних пацова EAM/6 у односу на контролну групу ($p = 0,000$), док је апликација све три дозе екстракта током 42 дана успела да ове вредности врати приближно вредностима контролне групе, без

међусобних разлика ($p > 0,05$). Када упоредимо ефекте третмана на SBP током 21 или 42 дана, примећују се значајно ниже вредности SBP у МОЕ200/3 у односу на МОЕ200/6 ($p = 0,000$), док су ефекти ниске и средње дозе били слични ($p > 0,05$). Додатно запажа се да дуже трајање болести код ЕАМ/6 пацова је повезано са падом SBP у односу на ЕАМ/3 ($p = 0,046$). Додатно, и код здравих животиња измерене су ниже вредности SBP 42. дана (CTRL/6) у односу на 21. дан (CTRL/3; $p = 0,048$; **Табела 15**).

Дијастолни крвни притисак на крају тронедељног протокола није се значајно разликовао између свих испитиваних група ($p > 0,05$). Такође, и у случају шестонедељног протокола није било разлика у DBP вредностима између група ($p > 0,05$). Једино у групи МОЕ200/3 забележен је нижи DBP 21. дана у односу на почетак 0. дана ($p = 0,001$), а додатно, ове вредности су биле су значајно ниже у односу на 42. дан у МОЕ200/6 групи ($p = 0,035$). Додатно, здраве животиње на крају тронедељног протокола CTRL/3 имале су нижи DBP у односу на CTRL/6 животиње 42. дана. Чак ни код болесних ЕАМ/6 животиња, као ни оних третираних средњом и високом дозом МОЕ током 6 недеља није било значајних разлика у вредностима DBP у односу на аналогне групе тронедељног протокола ($p > 0,05$; **Табела 15**).

Значајан пораст срчане фреквенце забележен је у групи болесних пацова (ЕАМ/3) у односу на контролну групу животиња CTRL/3 ($p = 0,000$), као и у односу на нулти дан ($p = 0,000$). Све три дозе МОЕ су успеле да сниже HR у односу на ЕАМ/3 ($p = 0,000$; $p = 0,000$; $p = 0,000$), као и у односу на одговарајући нулти дан. Израженије смањење HR у односу на ниску дозу постигле су средња и висока доза екстракта током ($p = 0,019$; $p = 0,020$), при чему су ове вредности биле значајно ниже чак и у односу на CTRL/3 групу ($p = 0,022$; $p = 0,018$). Када поредимо групе подвргнуте шестонедељном протоколу уочава се такође значајан пораст HR у ЕАМ/6 групи болесних животиња у односу здраве CTRL/6 ($p = 0,000$), али третман екстрактом матичњака ни у једној дози није успео да приближи ове вредности онима које су измерене код здравих животиња ($p > 0,05$). Пик пораста HR забележен је 21. дана код ЕАМ/3 групе, док су 42. дана ове вредности значајно биле ниже у ЕАМ/6 групи ($p = 0,000$). Третман високом дозом МОЕ током 21 дана снижио је HR у односу на 42-дневни третман истом овом дозом ($p = 0,003$), док у случају ниске и средње дозе МОЕ није било разлика у зависности од дужине третмана ($p > 0,05$). Међутим, чак и контролне вредности HR здравих пацова на крају шестонедељног протокола су биле ниже у односу на CTRL/3 вредности ($p = 0,048$), али унутар групе CTRL/3 и CTRL/6 измерене HR нису се разликовале на почетку и на крају протокола. У групама ЕАМ/6, као и све три дозе екстракта примењених током 6 недеља забележене су значајно више вредности срчане фреквенце на крају 42. дана у односу на почетне вредности 0. дана ($p = 0,000$; $p = 0,000$; $p = 0,001$; $p = 0,001$; **Табела 15**)

4.8.2. Ефекти екстракта матичњака на ехокардиографске параметре у ЕАМ моделу

У табелама 16 и 17 приказане су средње вредности измерених ехокардиографских параметара димензије леве коморе, као и ејекциона фракција и фракција скраћења, и то на почетку протокола нултог дана и на крају протокола 21. или 42. дана, док слика 9 приказује репрезентативне ехокардиограме испитиваних група на крају протокола, пред жртвовање (**Слика 9**).

Табела 16. Ефекти екстракта матичњака на димензије леве коморе, фракцију скраћења и ејекциону фракцију у ЕАМ моделу - тронедељни протокол

		<i>CTRL/3</i>	<i>EAM/3</i>	<i>MOE50/3</i>	<i>MOE100/3</i>	<i>MOE200/3</i>	
<i>IVSd</i> (<i>cm</i>)	0. дан	0,131±0,02					
	21. дан	7	0,116±0,010	0,132±0,021	0,121±0,016	0,128±0,015	
	дан	9	0,150±0,03	0,174±0,035*	0,145±0,032	0,148±0,018	0,140±0,012
<i>LVIDd</i> (<i>cm</i>)	0. дан	0,464±0,04					
	21. дан	9	0,440±0,042	0,496±0,083	0,434±0,047	0,429±0,029	
	дан	9	0,452±0,05	0,433±0,027	0,450±0,056	0,477±0,046	0,516±0,033*
<i>LVPWd</i> (<i>cm</i>)	0. дан	0,144±0,02	0,126±0,008		0,124±0,011	0,147±0,018	
	21. дан	5	0,193±0,029*	0,145±0,027	0,169±0,024 ^b	0,160±0,007 ^b	
	дан	7	^a	0,179±0,015 ^b	^c	^c	
<i>IVSs</i> (<i>cm</i>)	0. дан	0,142±0,05	0,114±0,009	0,135±0,026	0,116±0,009	0,133±0,210	
	21. дан	3	0,175±0,07	0,162±0,020*	0,141±0,012	0,160±0,033	0,154±0,017
	дан	3					
<i>LVIDs</i> (<i>cm</i>)	0. дан	0,247±0,03					
	21. дан	7	0,255±0,112	0,264±0,019	0,240±0,031	0,237±0,017	
	дан	1	0,228±0,04	0,338±0,030*	0,262±0,034	0,301±0,036	0,285±0,046
<i>LVPWs</i> (<i>cm</i>)	0. дан	0,139±0,01	0,136±0,015		0,134±0,018	0,136±0,007	
	21. дан	7	0,199±0,047*	0,149±0,023	0,171±0,024 ^b	0,161±0,007 ^b	
	дан	0	^a	0,179±0,029 ^b	^c	^c	
<i>FS</i> (%)	0. дан	46,818±5,7	43,500±4,882	45,860±7,109	44,500±5,199	46,900±6,26	
	21. дан	22	21,880±4,546	41,594±6,236	38,920±4,310	44,963±5,80	
	дан	94	^{*a}	^b	^{*b}	^{6bcd}	
<i>EF</i> (%)	0. дан	83,308±5,6	79,999±5,442	82,129±6,703	81,098±6,292	81,305±5,92	
	21. дан	82	50,329±7,937	53,891±4,85*	72,470±8,482	0	
	дан	39	^{*a}	^a	^{bc}	^{5bcd}	

IVSd, *IVSs* – дебљина зида интервентрикуларног септума на крају дијастоле или систоле (*cm*); *LVIDd*, *LVIDs* - унутрашња димензија леве коморе на крају дијастоле или систоле (*cm*); *LVPWd*, *LVPWs* - дебљина задњег зида леве коморе на крају дијастоле или систоле (*cm*); *FS* – проценат фракционог скраћења; *EF* – ејекциона фракција у процентима. *CTRL/3* – здрави пацови подвргнути протоколу од 3 недеље; *EAM/3*- пацови са индукованим ЕАМ подвргнути протоколу од 3 недеље; *MOE50/3*, *MOE100/3*, *MOE200/3*- пацови са ЕАМ третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака. ^a статистички значајна разлика на нивоу $p < 0.05$ у поређењу са *CTRL*; ^b у поређењу са *EAM*; ^c у поређењу са *MOE50*; ^d у поређењу са *MOE100*; * статистички значајна разлика унутар групе. Подаци су приказани као средње вредности ± стандардна девијација ($X \pm SD$).

Почетне *baseline* вредности (0 дан) свих приказаних параметара нису се значајно разликовале између свих испитиваних група ($p > 0,05$). Значајно смањена ејекциона фракција је примећена у групама ЕАМ/3 (за 29,67%; $p = 0,002$) и МОЕ50/3 (за 28,238%; $p = 0,006$) пацова и то 21. дана у поређењу са нултим даном у истој групи, али и у поређењу са CTRL/3 групом након завршеног протокола од 21 дана (50,33% и 53,89% наспрам 84,82%, $p = 0,000$; $p = 0,003$). Са друге стране средња МОЕ100/3 (72,47%) и висока доза екстракта МОЕ200/3 (81,44%) су значајно побољшале ЕФ након тронедељне суплементације у поређењу са ЕАМ/3 ($p = 0,011$; $p = 0,000$) и МОЕ50/3 групама ($p = 0,032$; $p = 0,045$). Наиме ове дозе МОЕ су успеле да нормализују ејекциону фракцију до нивоа сличних вредностима здравих CTRL/3 пацова. Ефекти суплементације екстрактом матичњака на очување ејекционе фракције били су дозно зависни (ЕАМ/3 vs. МОЕ50/3 vs. МОЕ100/3 vs. МОЕ200/3; 50,33% vs. 53,90% vs. 72,47% vs. 81,45%). Сличан тренд је примећен и у случају FS параметра, који је био значајно нижи код ЕАМ/3 пацова 21. дана у односу на CTRL/3 ($p = 0,022$), као и у односу на нулти дан ЕАМ/3 ($p = 0,032$), док су све три дозе МОЕ довеле до повећања фракционог скраћења у поређењу са ЕАМ/3 групом ($p = 0,045$; $p = 0,023$; $p = 0,034$). Такође, побољшање FS било је израженије у групи МОЕ200/3 у односу на МОЕ100/3 и МОЕ50/3 ($p = 0,040$; $p = 0,048$). Група нетретираних животиња са ЕАМ је такође била повезана са значајно већим задебљањем задњег зида леве коморе и на крају систоле и на крају дијастоле (LVPWd и LVPWs) 21. дана посматрања у поређењу са здравим срцима пацова ($p = 0,012$; $p = 0,022$), као и у односу на почетне вредности нултог дана ($p = 0,011$; $p = 0,021$). У контролној, као и у свим групама третираним МОЕ није било значајних разлика у измереним вредностим LVPWd и LVPWs на почетку и на крају 21-дневног протокола ($p > 0,05$). Међутим, на крају тронедељног протокола измерене су значајно ниже вредности ова два параметра у све три групе третиране екстрактом у односу на нетретирану групу ЕАМ (МОЕ50/3 - $p = 0,046$; $p = 0,049$; МОЕ100/3 - $p = 0,035$; $p = 0,039$; МОЕ200/3; $p = 0,011$; $p = 0,019$), и ове вредности су биле сличне онима измереним у контролној групи. Додатно, може се истаћи да је смањење LVPWd и LVPWs било израженије у групама третираним средњом и високом дозом МОЕ у односу на ниску дозу ($p = 0,032$; $p = 0,030$; $p = 0,029$; $p = 0,020$). Дебљина зида интервентрикуларног септума на крају систоле и дијастоле једино у ЕАМ/3 групи била је повећана 21. дана у односу на базичне вредности ($p = 0,045$; $p = 0,048$), док код осталих група није било разлика у измереним вредностима IVSs и IVSd нултог и 21. дана. Такође, ни на крају протокола, није било значајних разлика у вредностима ова два параметра између свих испитиваних група ($p > 0,05$). Што се тиче унутрашњих димензија леве коморе (LVIDd и LVIDs), нису забележене разлике међу испитиваним групама на крају протокола ($p > 0,05$). Међутим постојале су разлике у LVIDd и LVIDs између вредности измерених 0. и 21. дана у групама и то: повећање LVIDd у МОЕ200/3 групи 21. дана у односу на нулти, као и увећање LVIDs ЕАМ/3 групи 21. дана у односу на нулти. У осталим групама, нису забележене разлике у вредностима LVIDd и LVIDs нултог и 21. дана **Табела 16, Слика 9**; $p > 0,05$).

Табела 17. Ефекти екстракта матичњака на димензије леве коморе, фракцију скраћења и ејекциону фракцију у ЕАМ моделу – шестонедељни протокол.

		CTRL/6	EAM/6	MOE50/6	MOE100/6	MOE200/6
IVSd (cm)	0.	0,130±0,01	0,132±0,001	0,118±0,00		0,136±0,019
	дан	8	0,168±0,008	6	0,138±0,008	0,152±0,014
	42.	0,126±0,00	* _a	0,159±0,02	0,157±0,009 ^a	_a
	дан	3		1* _a		
LVIDd (cm)	0.	0,461±0,03	0,479±0,043	0,478±0,04		0,451±0,074
	дан	9	0,602±0,014	3	0,432±0,074	0,574±0,079
	42.	0,501±0,04	* _a	0,580±0,05	0,613±0,047* _a	* _{ab}
	дан	1		5* _a		
LVPWd (cm)	0.	0,129±0,00	0,147±0,015	0,117±0,00		0,116±0,004
	дан	9	0,172±0,022	1	0,129±0,012	0,160±0,032
	42.	0,148±0,02	* _a	0,155±0,01	0,158±0,048 ^{b*}	* _b
	дан	4		7* _b		
IVSs (cm)	0.	0,125±0,02	0,141±0,009	0,114±0,01		0,108±007
	дан	8	0,203±0,013	1	0,116±0,012	0,178±0,027
	42.	0,129±0,03	* _a	0,189±0,02	0,207±0,038* _a	* _a
	дан	2		9* _a		
LVIDs (cm)	0.	0,252±0,04	0,239±0,023	0,193±0,03		0,202±0,026
	дан	6	0,390±0,024	8	0,201±0,028	0,355±0,068
	42.	0,277±0,04	* _a	0,369±0,04	0,385±0,036* _a	* _b
	дан	2		3* _a		
LVPWs (cm)	0.	0,131±0,01	0,167±0,009	0,150±0,03		0,140±0,036
	дан	1	0,212±0,029	3	0,130±0,017	0,185±0,026
	42.	0,140±0,01	* _a	0,199±0,01	0,194±0,033* _a	* _{ab}
	дан	4		8 ^{a*}		
FS (%)	0.	44,957±10,	50,050±3,74	51,850±9,2		54,825±39,9
	дан	932	7	90	53,350±2,385	5
	42.	44,817±4,2	35,237±3,05	36,467±3,7	37,067±3,911* _a	39,95±5,125
	дан	35	6* _a	17* _a		*
EF (%)	0.	80,393±10,	86,214±2,77	87,112±7,6		89,705±3,32
	дан	962	4	06	88,863±1,668	5
	42.	81,569±4,0	70,744±3,81	72,491±4,6	72,840±4,638* _a	76,120±5,80
	дан	37	8* _a	49* _a		8* _a

IVSd; IVSs - дебљина зида интервентрикуларног септума на крају дијастоле или систоле (cm); *LVIDd, LVIDs* - унутрашња димензија леве коморе на крају дијастоле или систоле (cm); *LVPWd, LVPWs* - дебљина задњег зида леве коморе на крају дијастоле или систоле (cm); *FS* – проценат фракционог скраћења; *EF* – ејекциона фракција у процентима. CTRL/6 – здрави пацови подвргнути протоколу од 6 недеља; EAM/6- пацови са индукованим ЕАМ подвргнути протоколу од 6 недеља; MOE50/6, MOE100/6, MOE200/6- пацови са ЕАМ третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака. ^a статистички значајна разлика на нивоу $p < 0.05$ у поређењу са CTRL; ^b у поређењу са EAM; ^c у поређењу са MOE50; * статистички значајна разлика унутар групе. Подаци су приказани као средње вредности ± стандардна девијација ($X \pm SD$).

Такође, и у случају шестонедељног протокола, почетне *baseline* вредности (0 дан) свих приказаних параметара нису се значајно разликовале између свих испитиваних група (Табела 17). Значајно смањена ејекциона фракција је примећена код животиња које припадају ЕАМ/6 групи у односу са CTRL/6 након завршеног протокола од 42 дана (70,44% наспрам 81,57%, $p=0,049$). Третман екстрактом матичњака ни у једној од три испитиване дозе није успео да повећа ЕФ, већ су вредности ЕФ у третираним групама били слични оним у ЕАМ/6 групи ($p>0,05$), при чему се ни ефекти ниске, средње и високе дозе на ЕФ нису међусобно значајно разликовали ($p>0,05$). У свим групама са ЕАМ (ЕАМ/6, МОЕ50/6, МОЕ100/6, МОЕ200/6) ејекциона фракција је била нижа 42. дана у односу на базалне вредности ($p=0,011$; $p=0,019$; $p=0,024$; $p=0,027$).

Сличан тренд је примећен и у случају FS параметра, који је био значајно нижи код ЕАМ/6 пацова у односу на CTRL/6 групу ($p=0,015$), док третман екстрактом матичњака ни у једној од три испитиване дозе није успео да повећа вредности FS, већ су вредности FS у третираним групама били слични као у ЕАМ/6 групи ($p>0,05$), при чему се такође, ни ефекти ниске, средње и високе дозе на FS нису значајно разликовали ($p>0,05$). Такође, у свим групама оболелим од ЕАМ (ЕАМ/6, МОЕ50/6, МОЕ100/6, МОЕ200/6) фракција скраћења је била нижа 42. дана у односу на базалне вредности ($p=0,039$; $p=0,042$; $p=0,033$; $p=0,048$).

У групи нетретираних животиња ЕАМ/6 примећено је значајно веће задебљање задњег зида леве коморе и на крају систоле и на крају дијастоле (LVPWd и LVPWs) у поређењу са здравим животињама CTRL/6 групе ($p=0,033$; $p=0,030$). Дебљина задњег зида леве коморе у дијастоли 42. дана је била је значајно смањена у групама третираним МОЕ у све три дозе у односу на ЕАМ групу ($p=0,019$; $p=0,042$ $p=0,028$) до вредности сличних оним измереним у контролној групи ($p>0,05$). С друге стране, једино висока доза је значајно смањила дебљину задњег зида леве коморе у систоли у односу на ЕАМ групу ($p=0,030$), међутим те вредности су биле више него код здравих срца (CTRL/6) ($p=0,033$). Једино у контролној групи су измерене сличне вредности LVPWd и LVPWs 0. и 42. дана, док су у свим осталим групама са ЕАМ ове вредности биле више 42. дана у односу на почетак протокола како у систоли ($p=0,040$; $p=0,031$; $p=0,021$; $p=0,040$), тако и у дијастоли ($p=0,000$; $p=0,043$; $p=0,025$; $p=0,049$)

Што се тиче дебљине зида интервентрикуларног септума (IVSd и IVSs), код болесних нетретираних животиња које припадају ЕАМ/6 групи забележено је значајно повећање овог параметра у односу на здрава срца CTRL/6 групе и у систоли и у дијастоли ($p=0,000$; $p=0,000$). Шестонедељни третман екстратом матичњака није утицао на снижење ових вредности до вредности измерених у групи здравих животиња, без обзира на примењену дозу, већ су и у третираним групама измерене вредности више од контролних ($p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,000$). Једино у МОЕ50/6 и ЕАМ/6 забележене су разлике IVSd унутар групе, више вредности су измерене на крају 42. дана односу на почетне ($p=0,045$; $p=0,049$). Додатно, IVSs је био значајно повишен 42. дана у односу на базалне вредности 0. дана у свим групама, осим CTRL/6 ($p=0,049$; $p=0,040$; $p=0,034$; $p=0,045$).

Унутрашње димензије леве коморе на крају дијастоле и систоле (LVIDd и LVIDs) су биле значајно веће у групи ЕАМ/6 у поређењу са контролним здравим животињама на крају протокола, док је једино шестонедељна суплементација високом дозом екстракта од 200 mg/kg значајно снизила ове параметре у односу на ЕАМ/6 групу ($p=0,045$; $p=0,033$). Међутим, унутрашња димензија леве коморе у дијастоли, иако је била снижена у третираним групама у односу на ЕАМ/6 групу, ове вредности су се и даље разликовале од оних у CTRL/6 групи. У свим испитиваним група, осим у контролној,

вредности LVIDd и LVIDs биле су више 42. дана у односу на базалне вредности ($p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,000$; Табела 17, Слика 9).

На графицима 3, 4, 5 и 6 приказани су сви већ поменути ехокардиографски параметри и поређење истих између аналогних група подвргнутих тронедељном или шестонедељном протоколу на крају експерименталног протокола.

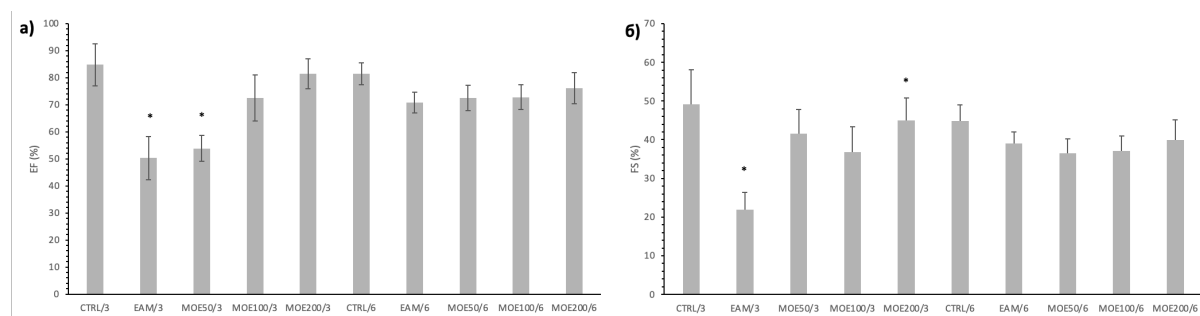


График 3. Ефекти екстракта матичњака на ејекциону фракцију и фракцију скраћења леве коморе у ЕАМ моделу – поређење тронедељног и шестонедељног протокола.

FS – проценат фракционог скраћења; *EF* – ејекциона фракција у процентима. CTRL/6 – здрави пацови подвргнути протоколу од 6 недеља; EAM/6 - пацови са индукованим експерименталним ауотимунским миокардитисом подвргнути протоколу од 6 недеља; MOE50/6, MOE100/6, MOE200/6 - пацови са експерименталним ауотимунским миокардитисом третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака. * статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 недеље у односу на протокол од 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

Најниже вредности ејекционе фракције леве коморе су примећене у EAM/3 групи 21. дана протокола, да би у EAM/6 групи овај проценат значајно порастао 42. дана протокола ($p=0,001$; График 3а, Слика 9), а исто запажање важи и за фракцију скраћења леве коморе, значајно ниже вредности су измерене у EAM/3 групи у односу на EAM/6 групу пацова ($p=0,019$; График 3б, Слика 9). Шестонедељна суплементација ниском дозом екстракта (MOE50/6) је значајно повисила проценат ејекционе фракције и била успешнија у односу на тронедељни третман истом дозом (MOE50/3; $p=0,044$), док у случају средње и високе дозе није било значајних разлика између тронедељног и шестонедељног третмана ($p > 0,05$; График 3а, Слика 9). Ниже вредности FS забележене су у групи животиња третираних високом дозом екстракта током 6 недеља у односу на тронедељни протокол ($p=0,049$), док код ниске и средње дозе дужина третмана није утицала на FS ($p > 0,05$; График 3б, Слика 9).

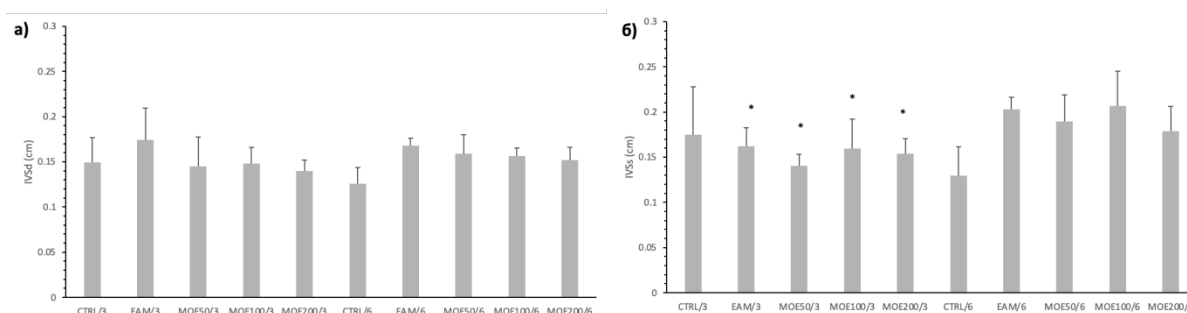


График 4. Ефекти екстракта матичњака на дебљину интервентрикуларног септума на крају систоле и дијастоле, у ЕАМ моделу – поређење тронедељног и шестонедељног протокола.

IVSd – дебљина интервентрикуларног септума на крају дијастоле у центиметрима; *IVSs* – дебљина интервентрикуларног септума на крају систоле у центиметрима. CTRL/6 – здрави пацови подвргнути протоколу од 6 недеља; EAM/6- пацови са индукованим експерименталним ауотимунским миокардитисом подвргнути протоколу од 6 недеља; MOE50/6, MOE100/6, MOE200/6 - пацови са експерименталним ауотимунским миокардитисом третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака. * статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 недеље у односу на протокол од 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

Дебљина интервентрикуларног септума на крају дијастоле није се значајно разликовала између аналогних група подвргнутих протоколу од три у односу на оне подвргнуте протоколу од шест недеља ($p > 0,05$; **График 4а**; **Слика 9**). Што се тиче *IVSs*, значајно више вредности забележене су у EAM/6 у односу на EAM/3 групу. Додатно, шестонедељни третман екстрактом у све три дозе индуковао је повећање *IVSs* у односу на тронедељну апликацију ових екстракта ($p = 0,000$; $p = 0,000$; $p = 0,001$; **График 4б**; **Слика 9**).

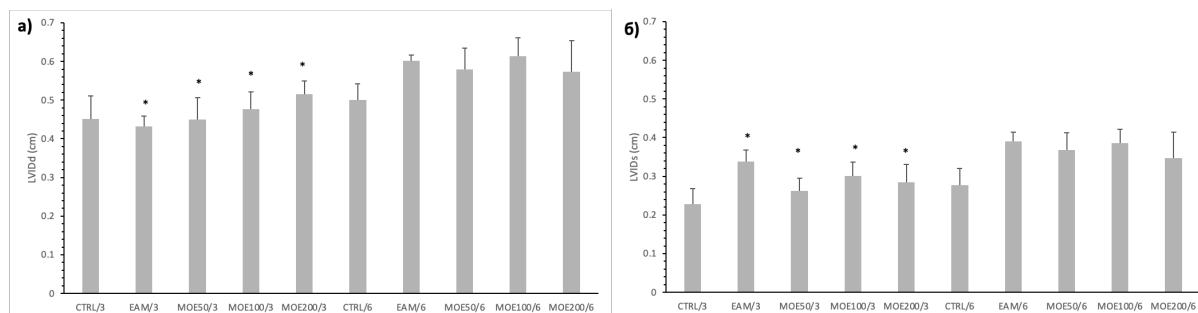


График 5. Ефекти екстракта матичњака на унутрашњу димензију леве коморе на крају систоле и дијастоле, у ЕАМ моделу – поређење тронедељног и шестонедељног протокола.

LVIDd – унутрашња димензија леве коморе на крају дијастоле у центиметрима; *LVIDs* – унутрашња димензија леве коморе на крају систоле у центиметрима. CTRL/6 – здрави пацови подвргнути протоколу од 6 недеља; EAM/6- пацови са индукованим експерименталним ауотимунским миокардитисом подвргнути протоколу од 6 недеља; MOE50/6, MOE100/6, MOE200/6 - пацови са експерименталним ауотимунским миокардитисом третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака. * статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 недеље у односу на протокол од 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

Унутрашња димензија леве коморе на крају дијастоле била је значајно виша у групама EAM/6, MOE50/6, MOE100/6 и MOE200/6 у односу на аналогне групе подвргнуте протоколу од три недеље ($p=0,011$; $p=0,49$; $p=0,025$; $p=0,017$; **График 5а**; **Слика 9**). Што се тиче LVIDs, примећен је исти тренд, значајно више вредности забележене су у EAM/6 у односу на EAM/3 групу ($p=0,000$). Додатно, шестонедељни третман екстрактом у све три дозе индуковао је повећање LVIDs у односу на тронедељну апликацију ових екстракта ($p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,000$; **График 5б**; **Слика 9**).

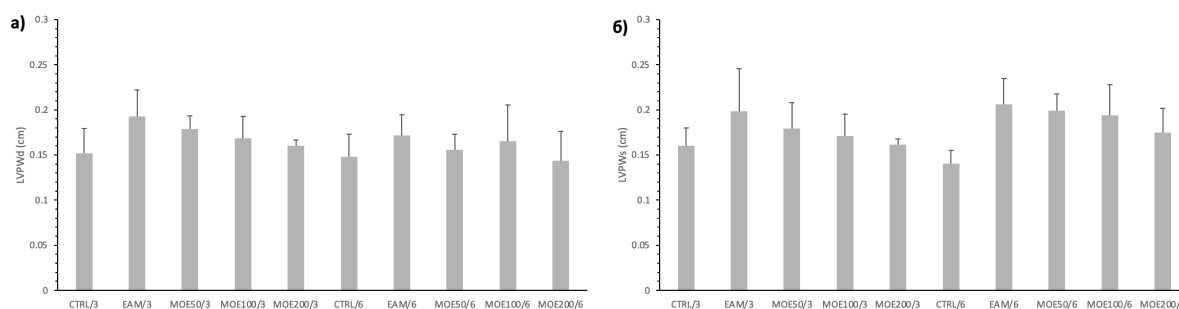
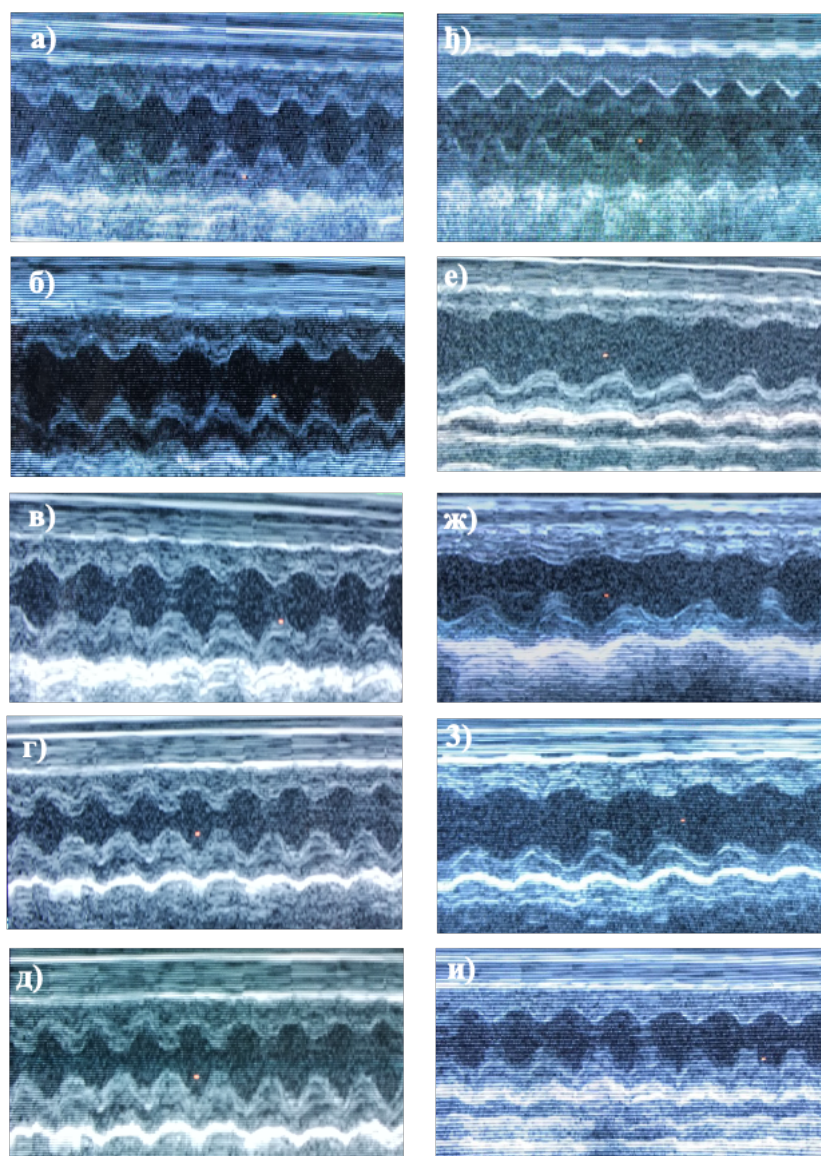


График 6. Ефекти екстракта матичњака на дебљину задњег зида леве коморе на крају систоле и дијастоле, у ЕАМ моделу – поређење тронедељног и шестонедељног протокола.

LVPWd – дебљина задњег зида леве коморе на крају дијастоле у сантиметрима; *LVPWs* - дебљина задњег зида леве коморе леве коморе на крају систоле у сантиметрима. CTRL/6 – здрави пацови подвргнути протоколу од 6 недеља; EAM/6- пацови са индукованим експерименталним ауотимунским миокардитисом подвргнути протоколу од 6 недеља; MOE50/6, MOE100/6, MOE200/6 - пацови са експерименталним ауотимунским миокардитисом третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака. * статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 недеље у односу на протокол од 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

Дебљина задњег зида леве коморе на крају дијастоле, као ни на крају систоле (*LVPWd*, *LVPWs*) није се значајно разликовала између аналогних група подвргнутих протоколу од три у односу на оне подвргнуте протоколу од шест недеља ($p > 0,05$; **График 6а и 6б**; **Слика 9**).



Слика 9. Приказ репрезентативних *M-mode* ехокардиограма свих испитиваних група у ЕАМ моделу.

Приказ ехокардиограма пацова који припадају следећим групама: а) CTRL/3; б) EAM/3; в) MOE50/3; г) MOE100/3; д) MOE200/3; њ) CTRL/6; е) EAM/6; ж) MOE50/6; з) MOE100/6; и) MOE200/6. CTRL/3 CTRL/6; – здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; EAM/3; EAM/6 - пацови са индукованим ЕАМ подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; MOE50/3; MOE50/6; MOE100/3; MOE100/6; MOE200/3; MOE200/6 - пацови са ЕАМ третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља.

4.9. Ефекти екстракта матичњака на срчане ензиме у ЕАМ моделу

На графику 7 приказани су ефекти тронедељног и шестонедељног третмана екстрактом матичњака (50 mg/kg, 100 mg/kg и 200 mg/kg) на серумску концентрацију ензима карактеристичних за оштећење миокарда креатинфосфокиназа-МБ (СКМБ), тропонин Т (TnT) и тропонин И (TnI).

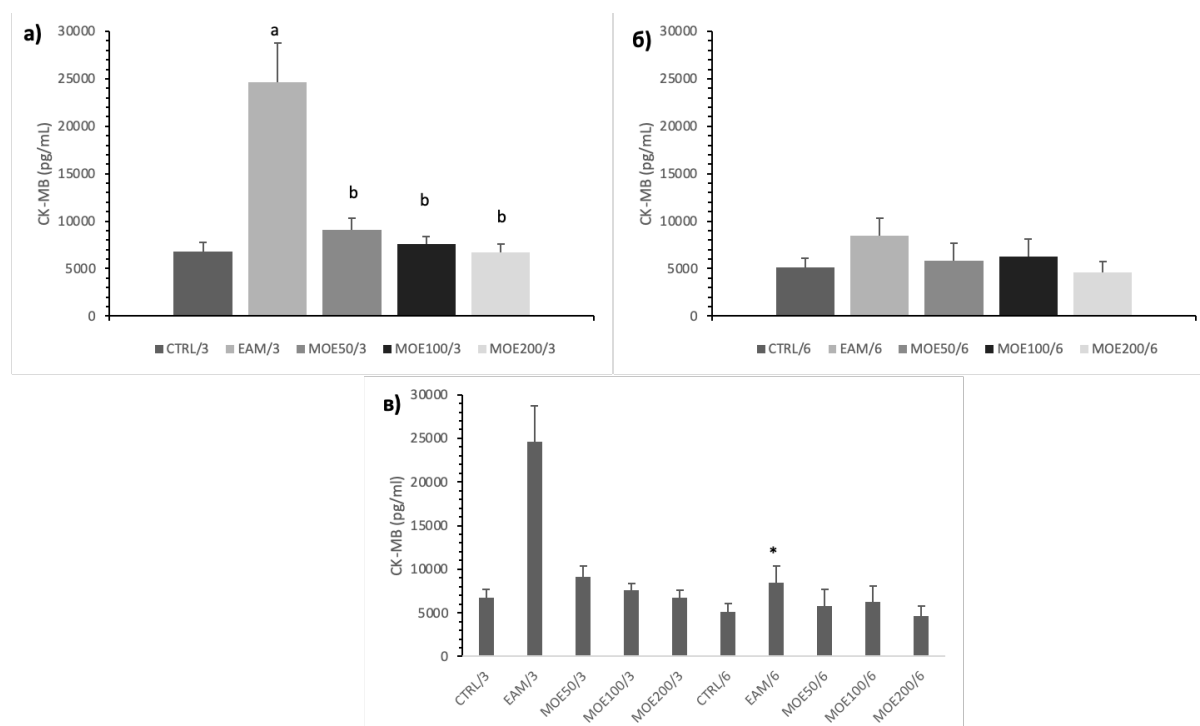


График 7. Ефекти екстракта матичњака на серумску концентрацију ензима креатинфосфокиназе изоформе МБ у ЕАМ моделу

а) протокол од 3 недеље б) протокол од 6 недеља; в) 3 недеље vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 - здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; EAM/3; EAM/6 - пацови са индукованим ЕАМ подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; MOE50/3; MOE50/6; MOE100/3; MOE100/6; MOE200/3; MOE200/6 - пацови са ЕАМ третирану са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p < 0.05$ у поређењу са CTRL; ^bу поређењу са ЕАМ; * статистички значајна разлика између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 недеље у односу на протокол од 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

Значајан пораст концентрације ензима креатинфосфокиназе изоформе МБ забележен је у групи пацова са ЕАМ на крају тронедељног протокола у односу на здраве животиње CTRL/3 групе ($p=0,000$), док је тронедељна примена све три дозе екстракта матичњака довела до значајног пада СК-МБ ($p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,000$), до вредности сличних контролним, при чему није било разлика у ефектима испитиваних доза (График 7а). Са друге стране, није било значајних разлика у нивоу СК-МБ између свих испитиваних група подвргнутих протоколу од 42 дана (График 7б). Поређењем тронедељног и

шестонедељног протокола, може се уочити да је пик концентрације СК-МВ забележен у ЕАМ групи након 3 недеље, док је овај ниво био значајно нижи у ЕАМ/6 групи након 42 дана ($p=0,000$) (График 7в). Измерене вредности СК-МВ биле су сличне у свим групама третираним екстрактом матичњака, без обзира на примењену дозу и дужину експозиције (График 7в; $p>0,05$).

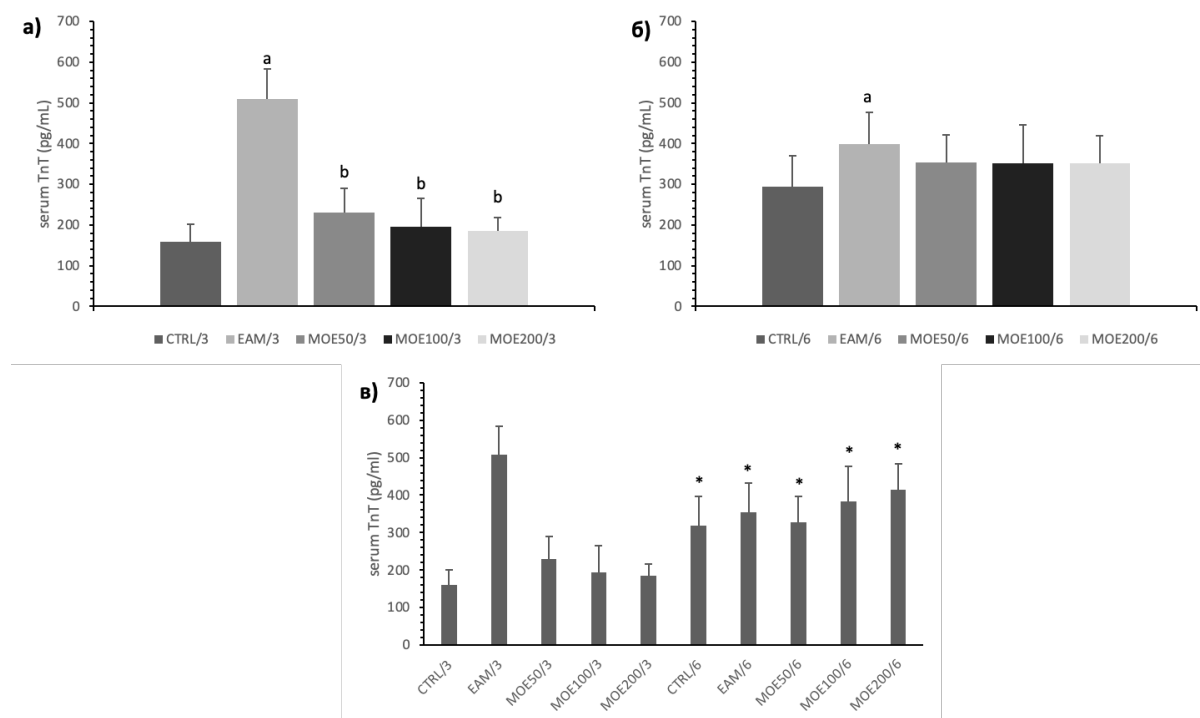


График 8. Ефекти екстракта матичњака на серумску концентрацију тропонина Т у ЕАМ моделу

а) протокол од 3 недеље б) протокол од 6 недеља; в) 3 недеље vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 - здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; EAM/3; EAM/6 - пацови са индукованим ЕАМ подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; MOE50/3; MOE50/6; MOE100/3; MOE100/6; MOE200/3; MOE200/6 - пацови са ЕАМ третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^астатистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са CTRL; ^бу поређењу са ЕАМ; * статистички значајна разлика између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 недеље у односу на протокол од 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

Сличан тренд се може приметити анализом концентрације тропонина Т, значајан скок концентрације ТнТ забележен је у групи ЕАМ/3 на крају тронедељног протокола у односу на CTRL/3 групу ($p=0,045$), док је тронедељна примена све три дозе екстракта матичњака довела до значајног пада овог параметра ($p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,000$), без разлика у ефектима испитиваних доза екстракта (График 8а). Анализом нивоа ТнТ свих испитиваних група подвргнутих протоколу од 42 дана, може се приметити да је ниво овог параметра био значајно виши само у ЕАМ/6 групи у односу на CTRL/6 ($p=0,005$), док третман екстрактом није довео до значајних промена у нивоу ТнТ, измерене вредности се нису разликовале у односу на вредности ТнТ у CTRL/6 (График 8б). Поређењем аналогних група подвргнутих тронедељном и

шестонедељном протоколу, може се уочити значајно виши ниво ТnТ у ЕАМ групи након 3 недеље у односу на ЕАМ/6 групу ($p=0,001$). Краћа администрација све три дозе екстракта матичњака је значајно снизила ТnТ у односу на шестонедељни третман ($p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,000$; **График 8в**).

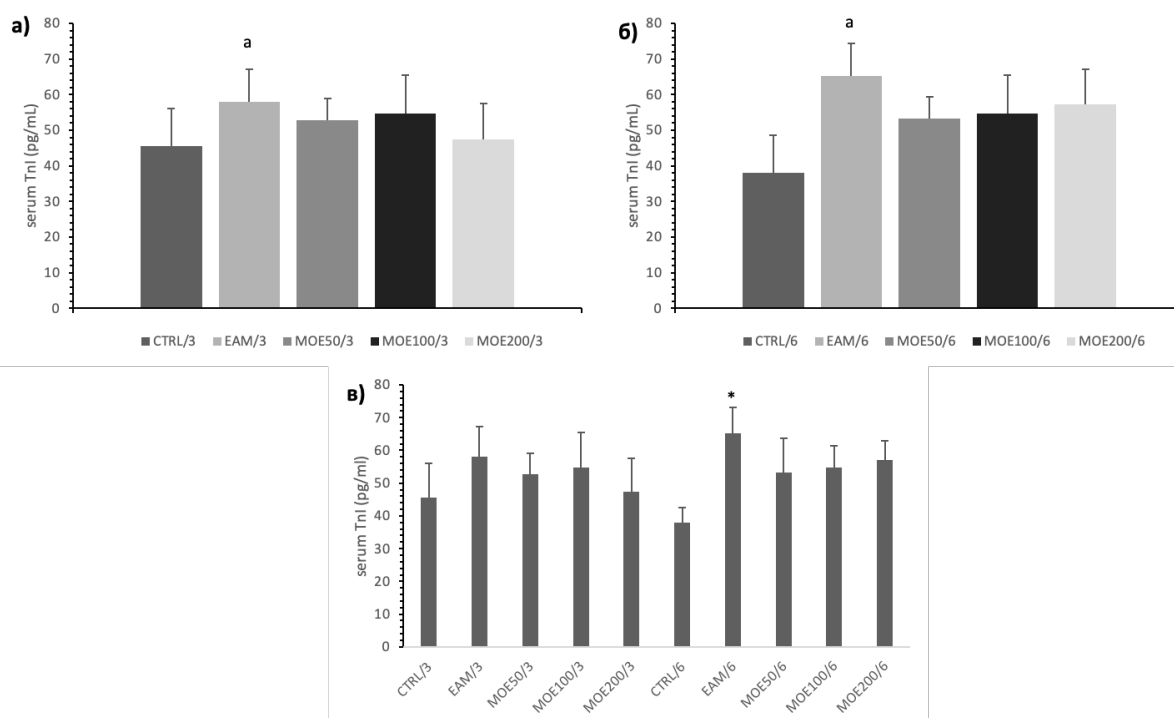


График 9. Ефекти екстракта матичњака на серумску концентрацију тропонина И у ЕАМ моделу

а) протокол од 3 недеље б) протокол од 6 недеља; в) 3 недеље vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 - здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; ЕАМ/3; ЕАМ/6 - пацови са индукованим ЕАМ подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; МОЕ50/3; МОЕ50/6; МОЕ100/3; МОЕ100/6; МОЕ200/3; МОЕ200/6 - пацови са ЕАМ третирану са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^астатистички значајна разлика на нивоу $p<0.05$ у поређењу са CTRL; *статистички значајна разлика између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 недеље у односу на протокол од 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

Концентрација ТnI била је значајно виша у ЕАМ/3 у односу на CTRL/3 групу ($p=0,011$) (**График 9а**), а иста појава је примећена у дужем протоколу више вредности ЕАМ/6 у односу на CTRL/6 групу ($p=0,029$) (**График 9б**). Међутим, третман испитиваним дозама екстракта није довео до побољшања овог параметра ни у тронедељном, ни у шестонедељном протоколу. Измерене вредности ТnI у третираним групама нису се значајно разликовале од CTRL и ЕАМ групе ($p>0,05$). Такође, једино у случају ЕАМ група примећено је да су значајно више вредности ТnI измерене након 6 недеља, у поређењу са 3 недеље ($p=0,044$; **График 9в**).

4.10. Ефекти екстракта матичњака на системски редокс статус у ЕАМ моделу

4.10.1. Ефекти екстракта матичњака на прооксидационе параметре у ЕАМ моделу

График 10 приказује утицај примене екстракта матичњака у ЕАМ моделу на ниво прооксидационог параметра супероксид анјон радикала након три и шест недеља третмана.

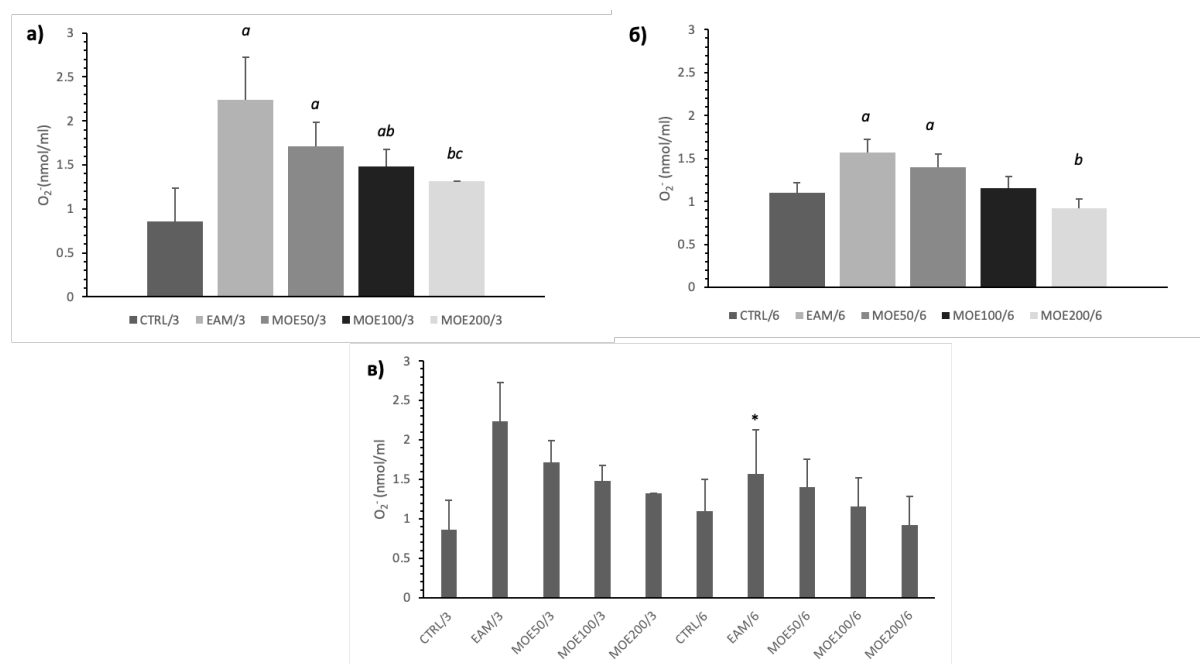


График 10. Ефекти екстракта матичњака на ниво супероксид анјон радикала у ЕАМ моделу

а) протокол од 3 недеље б) протокол од 6 недеља; в) 3 недеље vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 - здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; EAM/3; EAM/6 - пацови са индукованим ЕАМ подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; MOE50/3; MOE50/6; MOE100/3; MOE100/6; MOE200/3; MOE200/6 - пацови са ЕАМ третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p < 0.05$ у поређењу са CTRL; ^bу поређењу са ЕАМ; ^cу поређењу са MOE50; *статистички значајна разлика између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 недеље у односу на протокол од 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

Индукција експерименталног аутоимунског миокардитиса значајно је повећала ниво $O_2^{\cdot-}$ у ЕАМ/3 и ЕАМ/6 групама у односу на здраве животиње CTRL/3 и CTRL/6 групе ($p=0,000$; $p=0,017$). Средња и висока доза екстракта успеле су да сниже ниво овог прооксиданса у односу на ЕАМ групу током тронедељног третмана ($p=0,002$; $p=0,000$). Ниво $O_2^{\cdot-}$ у MOE200/3 групи био је значајно нижи у односу на MOE50/3 ($p=0,033$) и сличан контролним вредностима ($p > 0,05$; **График 10а**). У шестонедељном протоколу, забележена је повећана концентрација $O_2^{\cdot-}$ у ЕАМ/6 и MOE50/6 групи у односу на контролу ($p=0,000$; $p=0,010$), док је једино висока доза екстракта MOE200/6 успела да

значајно смањи ослобађање O_2^- у односу на ЕАМ/6 групу ($p=0,015$; **График 10б**). Само у случају ЕАМ/3, забележен је значајни пораст ослобађања супероксид анјон радикала у поређењу са ЕАМ/6 групом ($p=0,009$), док се измерене вредности O_2^- у групама третираним ниском, средњом и високом дозом нису разликовале поређењем протокола од три и шест недеља ($p>0,05$; **График 10в**).

График 11 приказује утицај примене екстракта матичњака у ЕАМ моделу на ниво прооксидационог параметра водоник пероксида након три и шест недеља третмана.

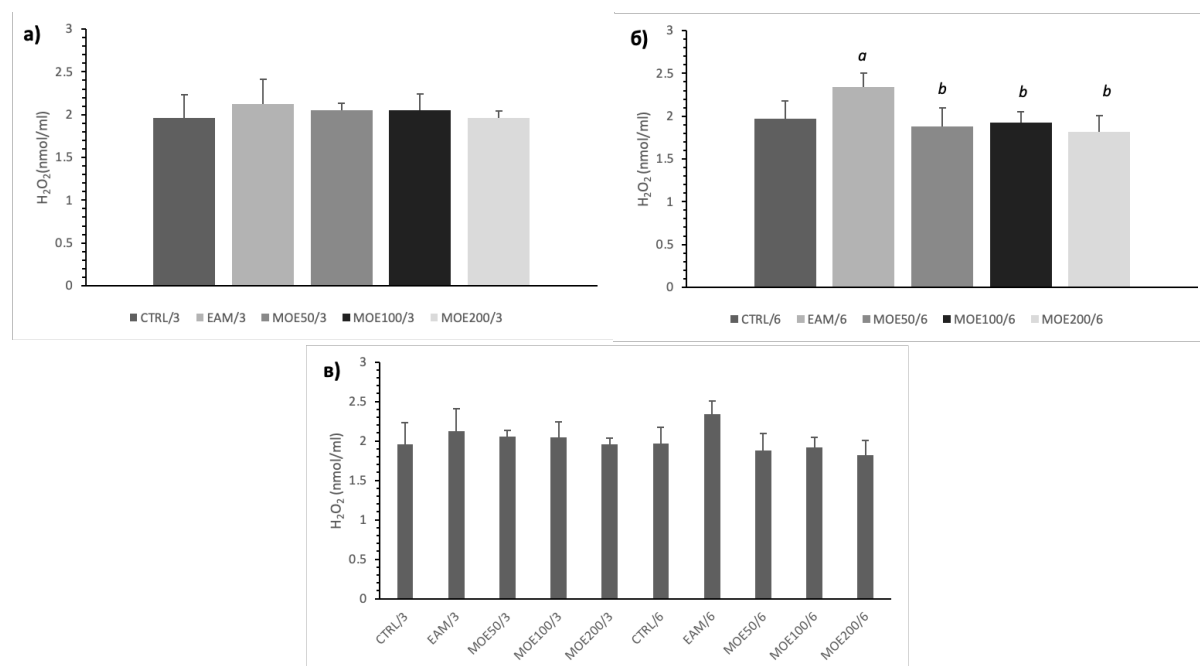


График 11 Ефекти екстракта матичњака на ниво водоник-пероксида у ЕАМ моделу

*а) протокол од 3 недеље б) протокол од 6 недеља; в) 3 недеље vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 - здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; EAM/3; EAM/6 - пацови са индукованим ЕАМ подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; MOE50/3; MOE50/6; MOE100/3; MOE100/6; MOE200/3; MOE200/6 - пацови са ЕАМ третиран са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p<0.05$ у поређењу са CTRL; ^bу поређењу са ЕАМ; * статистички значајна разлика између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 недеље у односу на протокол од 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).*

Концентрација ослобођеног водоник пероксида се није значајно разликовала између група подвргнутих тронедељном протоколу ($p>0,05$) (**График 11а**). Супротно, у шестонедељном режиму, забележено је значајно повећање нивоа H_2O_2 у ЕАМ/6 групи у односу на CTRL/6 групу ($p=0,005$). Примена све три испитиване дозе екстракта матичњака током шест недеља довела је до значајног пада ослобађања H_2O_2 у односу на ЕАМ/6 групу ($p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,000$), при чему се ови ефекти нису међусобно значајно разликовали ($p>0,05$) (**График 11б**). Нису уочене разлике у нивоу водоник пероксида између аналогних група у режиму од три и шест недеља ($p>0,05$; **График 11в**).

График 12 приказује утицај примене екстракта матичњака у ЕАМ моделу на ниво прооксидационог параметра нитрита након три и шест недеља третмана.

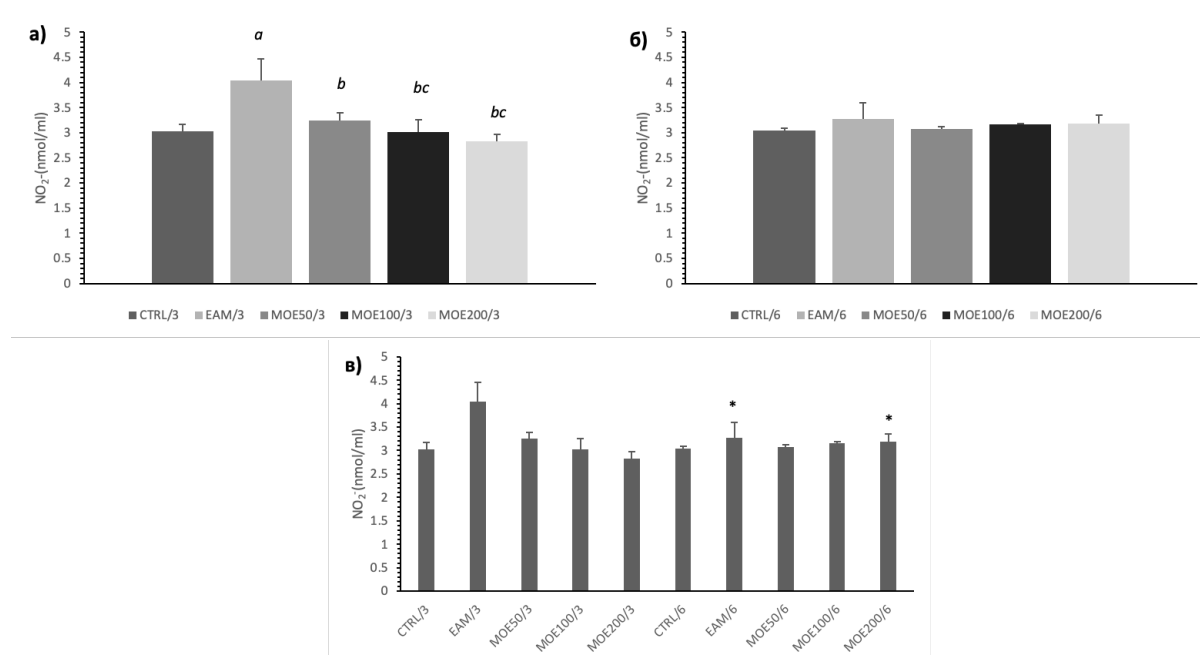


График 12. Ефекти екстракта матичњака на ниво нитрита у ЕАМ моделу

*a) протокол од 3 недеље б) протокол од 6 недеља; в) 3 недеље vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 - здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; EAM/3; EAM/6 - пацови са индукованим ЕАМ подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; MOE50/3; MOE50/6; MOE100/3; MOE100/6; MOE200/3; MOE200/6 - пацови са ЕАМ третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p < 0.05$ у поређењу са CTRL; ^bу поређењу са EAM; ^cу поређењу са MOE50; *статистички значајна разлика између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 недеље у односу на протокол од 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).*

Значајно виша концентрација нитрита забележена је у ЕАМ/3 групи у односу на групу здравих животиња (CTRL/3; $p=0,000$). Тронедељни третман екстрактом матичњака значајно је редуковао ниво ослобођених нитрита у односу на ЕАМ/3 групу, и то у све три апликоване дозе ($p=0,045$; $p=0,024$; $p=0,009$). Средња и висока доза екстракта индуковале су значајан пад овог параметра у односу на ниску дозу ($p=0,008$; $p=0,016$) (**График 12а**). Са друге стране, ниво нитрита између група подвргнутих шестонедељном протоколу није се значајно разликовао ($p > 0,05$; **График 12б**). У групи животиња са ЕАМ, ниво ослобођених нитрита био је значајно нижи након 6 недеља посматрања, у односу на 3 недеље ($p=0,000$). Једино у случају високе дозе од 200 mg/kg, забележено је значајно редуковано ослобађање нитрита у MOE200/3 групи у поређењу са MOE200/6 групом ($p=0,011$; **График 12в**).

График 13 приказује утицај примене екстракта матичњака у ЕАМ моделу на ниво прооксидационог параметра индекса липидне пероксидације након три и шест недеља третмана.

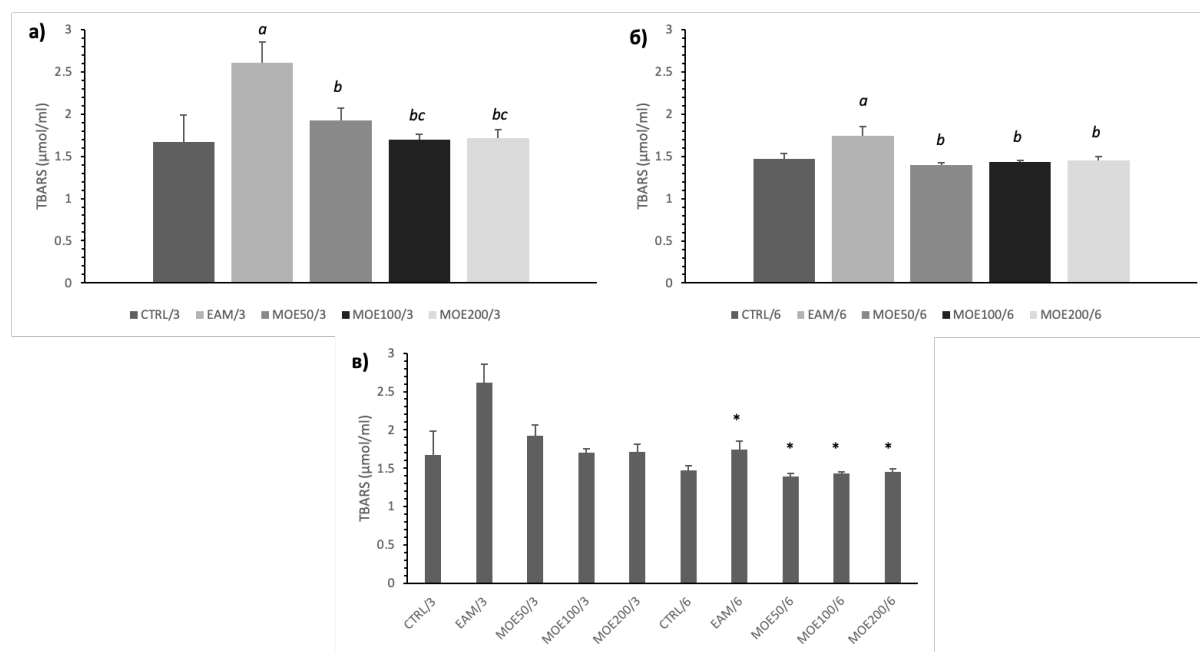


График 13. Ефекти екстракта матичњака на индекс липидне пероксидације мерен као TBARS у ЕАМ моделу

а) протокол од 3 недеље б) протокол од 6 недеља; в) 3 недеље vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 - здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; EAM/3; EAM/6 - пацови са индукованим ЕАМ подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; MOE50/3; MOE50/6; MOE100/3; MOE100/6; MOE200/3; MOE200/6 - пацови са ЕАМ третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p < 0.05$ у поређењу са CTRL; ^bу поређењу са ЕАМ; ^cу поређењу са MOE50; * статистички значајна разлика између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 недеље у односу на протокол од 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

Када посматрамо ниво TBARS-а, запажа се значајно виши ниво TBARS у ЕАМ/3 и ЕАМ/6 у односу на контролне групе здравих пацова (CTRL/3 и CTRL/6; $p=0,000$; $p=0,002$). Тронедељна примена екстракта матичњака у све три испитиване дозе довела је до значајног пада нивоа TBARS у односу на ЕАМ/3 групу ($p=0,026$; $p=0,031$; $p=0,009$), при чему је израженији пад овог параметра био индукован средњом и високом дозом екстракта у односу на ниску дозу ($p=0,045$; $p=0,032$) (График 13а). У случају шестонедељног протокола, све три дозе екстракта су значајно снизиле ослобађање TBARS у односу на ЕАМ ($p=0,049$; $p=0,040$; $p=0,34$), док дозно-зависних ефеката није било, све три испитиване дозе изазвале су сличне ефекте ($p > 0,05$) (График 13б). Поређењем ефеката аналогних доза екстракта у режиму од три недеље у односу на шест, може се приметити да су све три испитиване дозе екстракта индуковале већи пад TBARS у дужем протоколу ($p=0,000$; $p=0,013$; $p=0,025$; График 13в). Додатно, и у групи нетретираних ЕАМ/6 животиња измерене су значајно ниже вредности TBARS у односу на ЕАМ/3 групу ($p=0,000$; График 13в)

4.10.2. Ефекти екстракта матичњака на антиоксидационе параметре у ЕАМ моделу

График 14 приказује утицај примене екстракта матичњака у ЕАМ моделу на активност антиоксидационог ензима супероксид-дизмутазе током периода од три и током периода од шест недеља третмана.

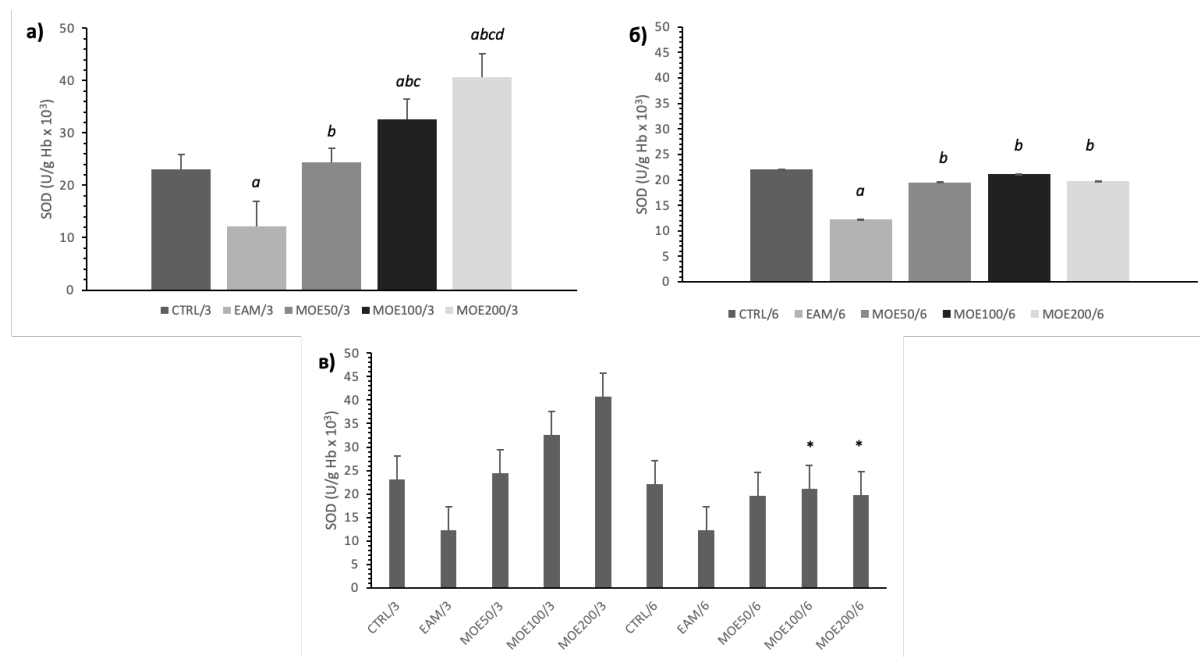


График 14. Ефекти екстракта матичњака на активност супероксид-дизмутазе у ЕАМ моделу

а) протокол од 3 недеље б) протокол од 6 недеља; в) 3 недеље vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 - здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; EAM/3; EAM/6 - пацови са индукованим ЕАМ подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; MOE50/3; MOE50/6; MOE100/3; MOE100/6; MOE200/3; MOE200/6 - пацови са ЕАМ третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p < 0.05$ у поређењу са CTRL; ^bу поређењу са EAM; ^cу поређењу са MOE50; ^dу поређењу са MOE100; *статистички значајна разлика између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 недеље у односу на протокол од 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

Примећено је да су животиње са ЕАМ (EAM/3 и EAM/6 групе) показале значајно нижу активност антиоксидационог ензима SOD ($p=0,048$; $p=0,035$; **График 14а и 14б**) у односу на здраве животиње одговарајуће контролне групе. Тронеделјни третман екстрактом матичњака у све три дозе индуковао је значајан пораст активности SOD ($p=0,043$; $p=0,020$; $p=0,000$) у односу на ЕАМ групу ($p < 0,05$; **График 14а**). Најизраженији пораст активности SOD постигнут је применом највише дозе екстракта (MOE200/3 група) у односу на средњу и нижу дозу, групе MOE100/3 и MOE50/3 ($p=0,012$; $p=0,041$; **График 14а**). Шестонедељни третман екстрактом матичњака у све три дозе значајно је повећао активност SOD ($p=0,041$; $p=0,016$; $p=0,000$), при чему су ефекти све три примењене дозе током шест недеља били слични ($p > 0,05$; **График 14б**). Поређењем ефеката третмана током три недеље у односу на шест недеља, може се

уочити да је у групама МОЕ100/6 и МОЕ200/6 ниво SOD виши у односу на МОЕ100/3 и МОЕ200/3 ($p=0,022$; $p=0,008$; **График 14в**).

График 15 приказује утицај примене екстракта матичњака у ЕАМ моделу на активност антиоксидационог ензима каталазе током периода од три и током периода од шест недеља третмана.

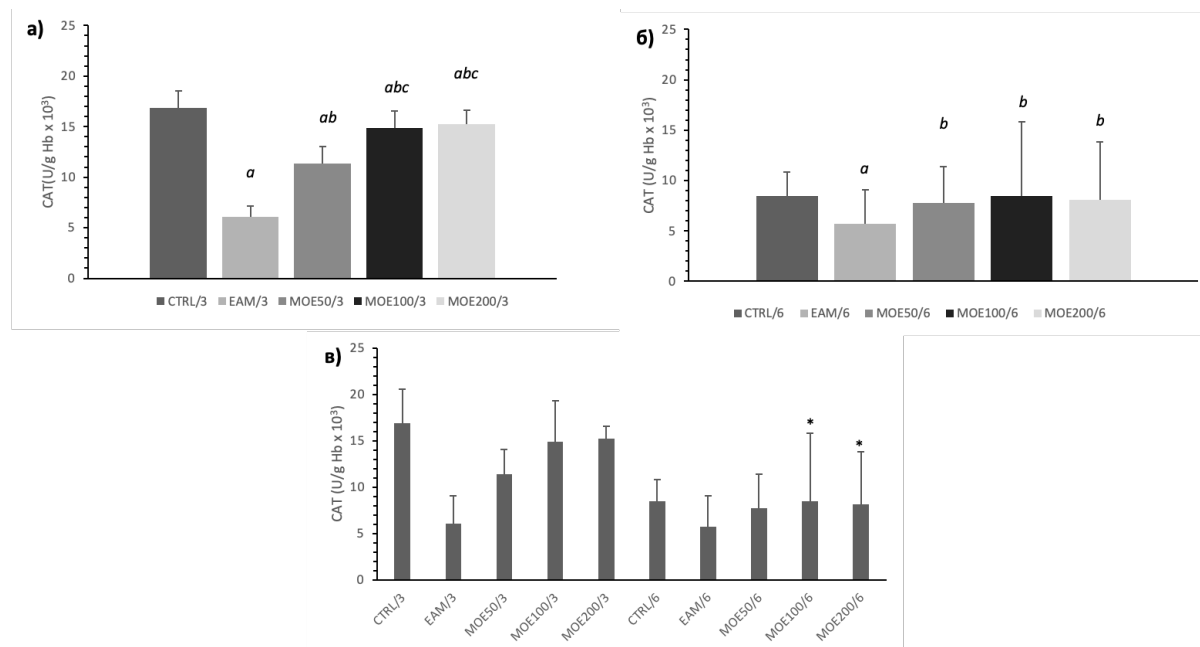


График 15. Ефекти екстракта матичњака на активност каталазе у ЕАМ моделу

а) протокол од 3 недеље б) протокол од 6 недеља; в) 3 недеље vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 - здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; EAM/3; EAM/6 - пацови са индукованим ЕАМ подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; MOE50/3; MOE50/6; MOE100/3; MOE100/6; MOE200/3; MOE200/6 - пацови са ЕАМ третирану са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p<0.05$ у поређењу са CTRL; ^bу поређењу са ЕАМ; ^cу поређењу са MOE50; *статистички значајна разлика између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 недеље у односу на протокол од 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

Животиње са ЕАМ (EAM/3 и EAM/6 групе) су показале значајно нижу активност антиоксидационог ензима CAT ($p=0,000$; $p=0,000$; **График 15а и 15б**) у односу на здраве животиње контролне групе. Тронедељни третман екстрактом матичњака у све три дозе индуковао је значајан пораст активности CAT ($p=0,037$; $p=0,000$; $p=0,000$) у односу на ЕАМ групу ($p<0,05$; **График 15а и 15б**). С друге стране, значајно виша активност CAT забележена је у МОЕ100/3 и МОЕ200/3 групама у односу на МОЕ50/3 групу пацова ($p=0,049$; $p=0,026$; **График 15а**). Шестонедељни третман екстрактом матичњака у све три дозе значајно је повећао активност CAT ($p=0,039$; $p=0,015$; $p=0,020$; **График 15б**) у односу на ЕАМ, при чему су ефекти све три примењене дозе током шест недеља били слични ($p>0,05$; **График 15б**). Активност каталазе била значајно нижа у групама третираним дозом од 100 mg/kg и 200 mg/kg екстракта током дужег протокола од 6 недеља, у односу на аналогне групе третиране током 3 недеље ($p=0,047$; $p=0,012$; **График 15в**).

График 16 приказује утицај примене екстракта матичњака у ЕАМ моделу на ниво редукованог глутатиона током периода од три и током периода од шест недеља третмана.

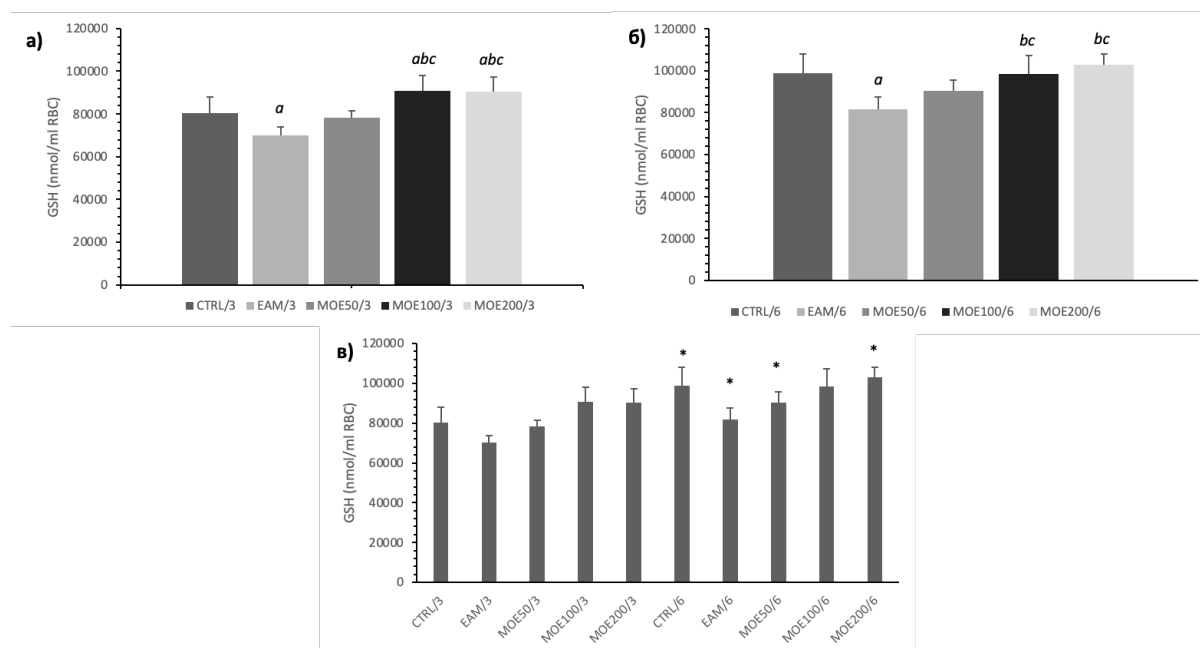


График 16. Ефекти екстракта матичњака на ниво редукованог глутатиона у ЕАМ моделу

а) протокол од 3 недеље б) протокол од 6 недеља; в) 3 недеље vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 - здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; EAM/3; EAM/6 - пацови са индукованим ЕАМ подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; MOE50/3; MOE50/6; MOE100/3; MOE100/6; MOE200/3; MOE200/6 - пацови са ЕАМ третирану са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p < 0.05$ у поређењу са CTRL; ^bу поређењу са EAM; ^cу поређењу са MOE50; * статистички значајна разлика између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 недеље у односу на протокол од 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

Што се тиче нивоа редукованог глутатиона, група животиња са индукованим ЕАМ показала је значајно нижи ниво глутатиона у односу на контролну групу животиња, како у тронедељном тако и у шестонедељном режиму ($p=0,026$; $p=0,000$) (График 16а и 16б). Додатно, тронедељни третман средњом и високом дозом екстракта матичњака значајно је повисио GSH ниво у односу на EAM/3 ($p=0,000$; $p=0,000$), као и CTRL/3 групу ($p=0,026$; $p=0,046$ График 16а). Такође, средња и висока доза MOE у тронедељном режиму примене индуковала је и значајан пораст нивоа GSH у односу на ниску дозу ($p=0,008$; $p=0,029$). Сличан тренд је примећен и у случају шестонедељног третмана, у MOE100/6 и MOE200/6 забележене су значајно више вредности редукованог глутатиона у односу на EAM/6 групу ($p=0,000$; $p=0,000$) и MOE50/6 групу ($p=0,000$; $p=0,000$; График 16в). Када се упореде ефекти тронедељне и шестонедељне примене екстракта на ниво GSH, може се уочити да се ефекти средње дозе нису значајно разликовали, док у случају ниске дозе од 50 mg/kg третман током 6 недеља значајно повећао овај параметар ($p=0,006$). Исти тренд забележен је у случају високе

дозе од 200 mg/kg, шестонедељни третман је био ефикаснији ($p=0,005$). Дрasticнији пад нивоа GSH примећен је у EAM групи у тронедељном, у односу на шестонедељни режим посматрања ($p=0,020$). Ниво GSH у контролној групи животиња био је виши након 6 недеља, у поређењу са CTRL/3 групом ($p=0,000$; **График 16в**)

4.11. Ефекти екстракта матичњака на инфламаторни статус у EAM моделу

4.11.1. Ефекти примењених екстраката матичњака на ниво Ц-реактивног протеина у серуму

На графику 17 приказане су концентрације Ц-реактивног протеина у серуму, након завршеног тронедељног и шестонедељног протокола.

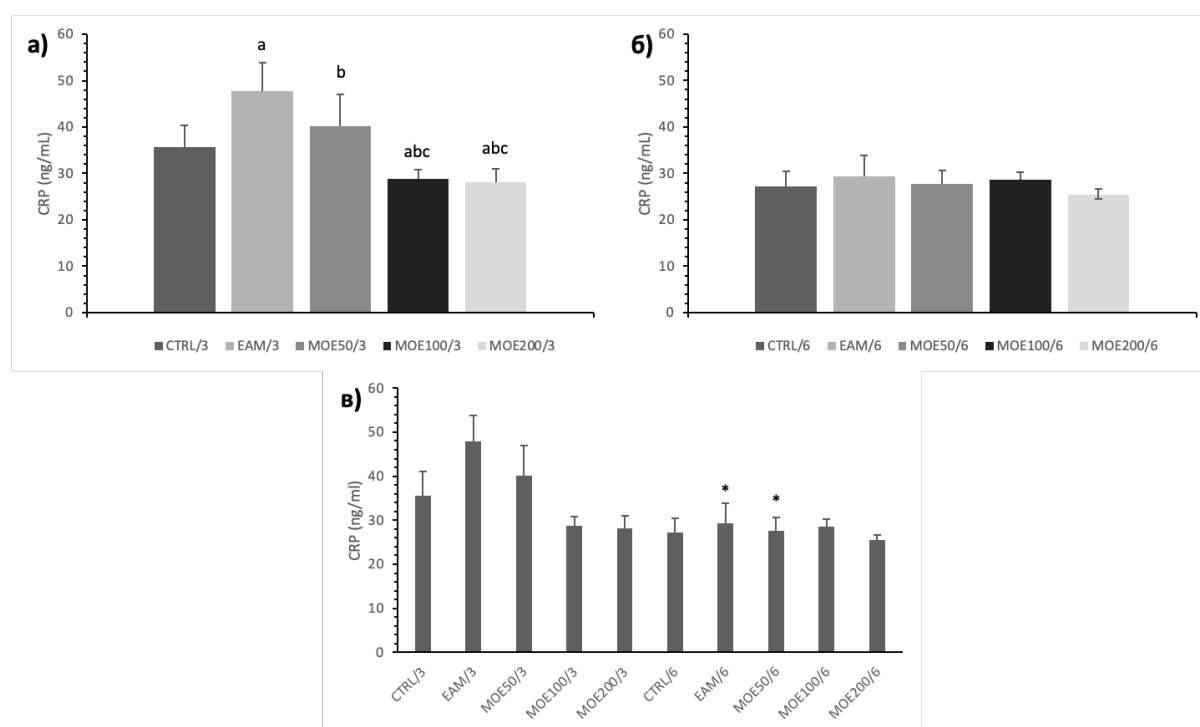


График 17. Ефекти МОЕ на концентрацију Ц-реактивног протеина у серуму у EAM моделу

а) протокол од 3 недеље; б) протокол од 6 недеља; в) поређење 3 недеље vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 – здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; EAM/3; EAM/6- пацови са индукованим EAM подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; MOE50/3; MOE50/6; MOE100/3; MOE100/6; MOE200/3; MOE200/6 - пацови са EAM третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p < 0.05$ у односу на CTRL групу; ^bу односу на EAM групу; ^cу односу на MOE50 групу; * између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 или 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности ± стандардна девијација ($X \pm SD$).

Значајно виши ниво CRP-а забележен је у EAM/3 групи у односу на CTRL/3 групу здравих пацова ($p=0,000$), док су све три дозе примењеног екстракта матичњака довеле до значајног пада CRP-а у односу на EAM/3 ($p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,000$), док су средња и висока доза индуковале значајан пад CRP-а (MOE100/3 и MOE200/3) и у односу на најнижу дозу ($p=0,000$; $p=0,000$), чак и у односу на контролу ($p=0,020$; $p=0,031$; **График 17а**). Ниво Ц-реактивног протеина се није значајно разликовао између група подвргнутих протоколу од 6 недеља ($p>0,05$; **График 17б**). Међутим, поредивши ефекте третмана у трајању од 3 и 6 недеља, може се уочити да је у групама EAM/6 и MOE50/6 забележен значајни пада CRP-а у односу на EAM/3 и MOE50/3 ($p=0,000$; $p=0,000$; **График 17в**).

4.11.2. Ефекти примењених екстракта матичњака на ниво Th1 цитокина у серуму

На графицима 18, 19 и 20 приказане су концентрације проинфламаторних цитокина интерлеукина 1 бета, интерлеукина 6 и фактора некрозе тумора алфа у серуму, медијатора Th1 имунског одговора, након завршеног тронедељног и шестонедељног протокола.

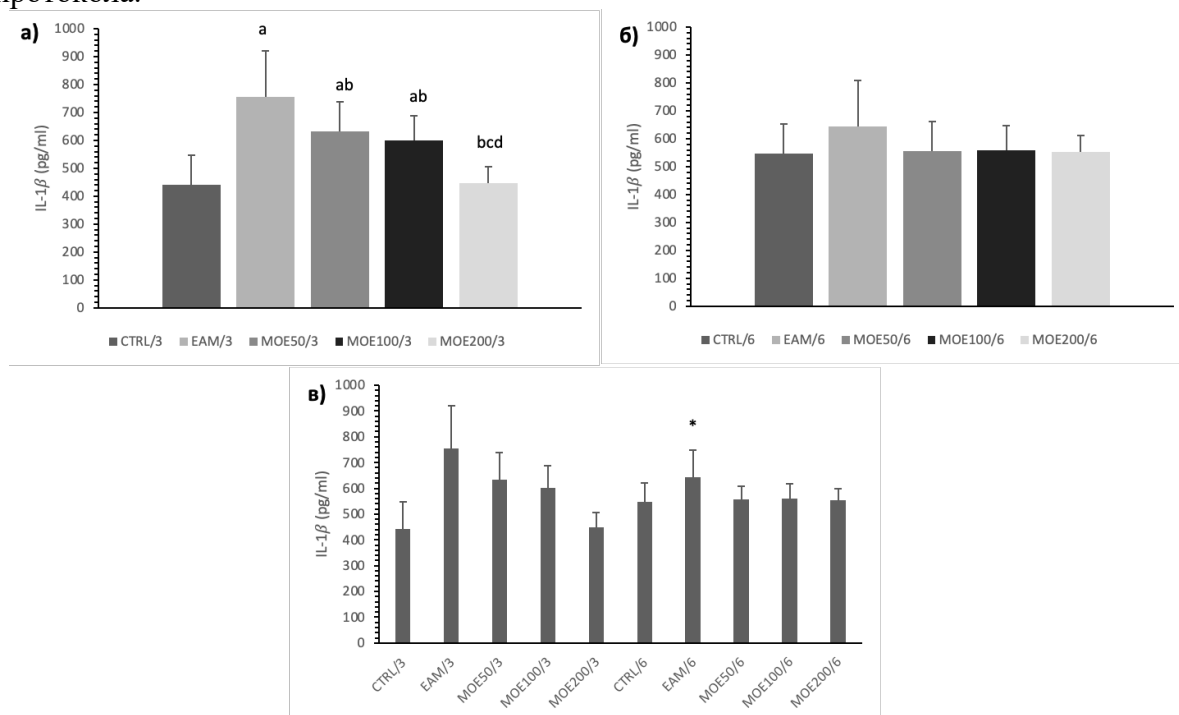


График 18. Ефекти МОЕ на концентрацију IL-1β у серуму у EAM моделу

а) протокол од 3 недеље; б) протокол од 6 недеља; в) поређење 3 недеље vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 – здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; EAM/3; EAM/6- пацови са индукованим EAM подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; MOE50/3; MOE50/6; MOE100/3; MOE100/6; MOE200/3; MOE200/6 – пацови са EAM третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на CTRL групу; ^bу односу на EAM групу; ^cу односу на MOE50 групу; ^dу односу на MOE100 групу * између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 или 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности ± стандардна девијација ($X \pm SD$).

Ниво проинфламаторног цитокина IL-1 β био је очекивано повишен у групи животиња са ЕАМ 21. дана у односу на здраве пацове CTRL/3 групе ($p=0,000$). Двадесетједнодневни третман екстрактом матичњака (све три дозе) индуковао је значајан пад IL-1 β у поређењу са ЕАМ/3 групом ($p=0,039$; $p=0,010$; $p=0,000$), при чему је највиша доза значајно смањила нивоа овог интерлеукина у односу на остале дозе ($p=0,000$; $p=0,007$; **График 18а**), тако да се вредности овог интерлеукина нису разликовале у МОЕ200/3 и CTRL/3 ($p>0,05$). У хроничном протоколу, такође је ниво Нису забележене значајне разлике у нивоу IL-1 β између група подвргнутих шестонедељном протоколу ($p>0,05$; **График 18б**). Поређењем аналогних група подвргнутих тронедељном и шестонедељном протоколу, може се приметити да је у групи ЕАМ/6 концентрација IL-1 β била значајно нижа у односу на исту групу тронедељног протокола ($p=0,048$), док се измерене вредности у контролној групи, као ни у експерименталним групама третираним екстрактом нису значајно разликовале у зависности од дужине протокола ($p>0,05$; **График 18в**).

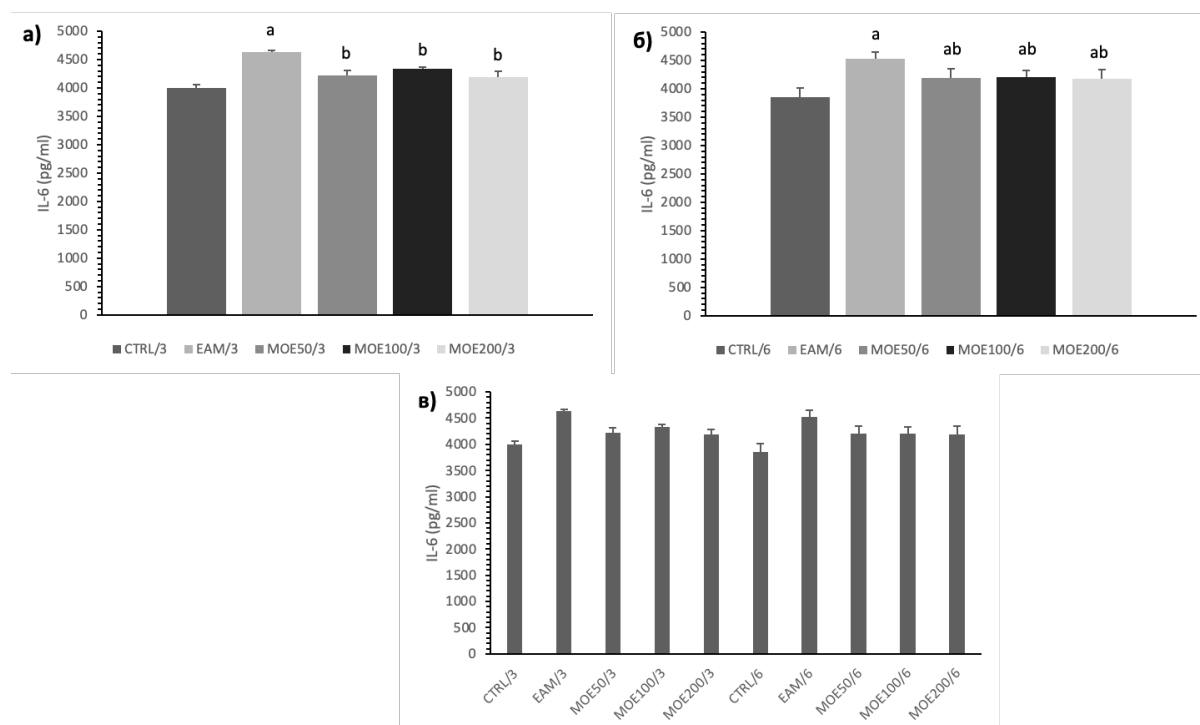


График 19. Ефекти МОЕ на концентрацију IL-6 у серуму у ЕАМ моделу

а) протокол од 3 недеље; б) протокол од 6 недеља; в) поређење 3 недеље vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 – здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; EAM/3; EAM/6- пацови са индукованим ЕАМ подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; МОЕ50/3; МОЕ50/6; МОЕ100/3; МОЕ100/6; МОЕ200/3; МОЕ200/6 - пацови са ЕАМ третиран са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p < 0.05$ у односу на CTRL групу; ^bу односу на ЕАМ групу; * између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 или 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

Концентрација проинфламаторног интерлеукина 6 је била очекивано повишена у ЕАМ/3 групи у односу на CTRL/3 групу ($p=0,000$), док је тронедељна примена све три дозе МОЕ значајно снизила IL-6 концентрацију у поређењу са ЕАМ/3 ($p=0,000$; $p=0,032$; $p=0,000$), до вредности сличних оним измереним у контроли. Сличан тренд уочава се и у шестонедељном протоколу, значајан скок IL-6 у ЕАМ/6 групи у односу на CTRL/6, при чему је примена свих доза МОЕ током 6 недеља значајно снизила IL-6 у односу на ЕАМ/6 групу ($p=0,046$; $p=0,012$; $p=0,000$), међутим ове вредности су биле више у односу на контролне ($p=0,000$; $p=0,013$; $p=0,041$; **График 19б**). Нису забележене значајне разлике између аналогних група подвргнутих протоколу од три недеље у односу на шест недеља ($p>0,05$; **График 19в**)

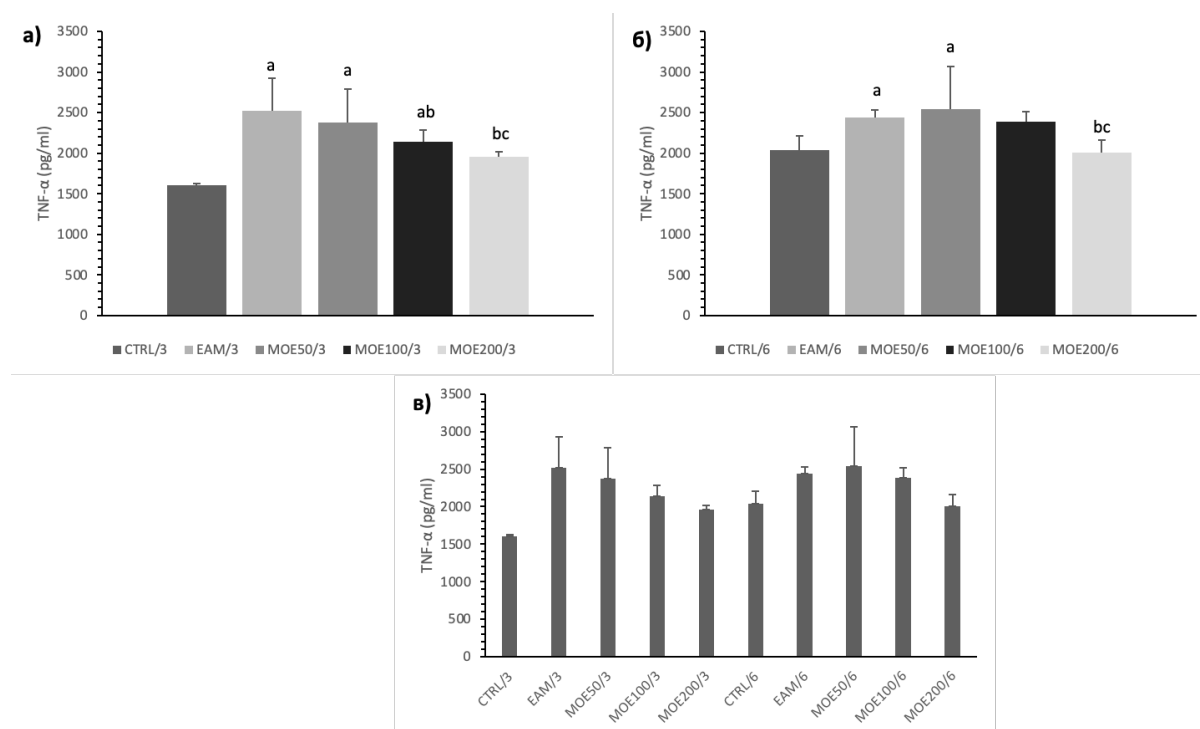


График 20. Ефекти МОЕ на концентрацију TNF-α у серуму у ЕАМ моделу

а) протокол од 3 недеље; б) протокол од 6 недеља; в) поређење 3 недеље vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 – здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; ЕАМ/3; ЕАМ/6- пацови са индикованим ЕАМ подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; МОЕ50/3; МОЕ50/6; МОЕ100/3; МОЕ100/6; МОЕ200/3; МОЕ200/6 - пацови са ЕАМ третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p < 0.05$ у односу на CTRL групу; ^bу односу на ЕАМ групу; ^cу односу на МОЕ50 групу; * између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 или 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

Индукција ЕАМ индуковала је значајан пораст концентрације TNF-α након 21 дана (ЕАМ/3) у односу на здраве животиње CTRL/3 групе ($p=0,000$), а исти тренд је запажен и у МОЕ50/3 групи ($p=0,000$). Тронедељни третман средњом и високом дозом МОЕ индуковао је пад нивоа TNF-α у односу на нетретиране болесне животиње ЕАМ/6 групе ($p=0,045$; $p=0,000$), при чему је третман дозом од 200 mg/kg снизио TNF-α до вредности сличних контролним ($p>0,05$), а значајно нижим у односу на МОЕ50/3 групу ($p=0,032$; **График 20а**). У хроничном протоколу, може се уочити значајан пораст TNF-

α концентрације у групама ЕАМ/6 и МОЕ50/6 у односу на CTRL/6 групу ($p=0,046$; $p=0,030$), док је једино третман високом дозом МОЕ успео да значајно снизи концентрацију овог параметра у односу на ЕАМ/6 и МОЕ50/6 групе ($p=0,024$; $p=0,017$; **График 20б**). Није било значајних разлика у нивоу TNF- α између аналогних група подвргнутих протоколу од три у односу на протокол од шест недеља ($p>0,05$; **График 20в**).

4.11.3. Ефекти примењених екстраката матичњака на ниво Th2 цитокина у серуму

На графицима 21 и 22 приказане су концентрације интерлеукина 4 и интерлеукина 10 у серуму, медијатора Th2 имунског одговора, након завршеног тронедељног и шестонедељног протокола.

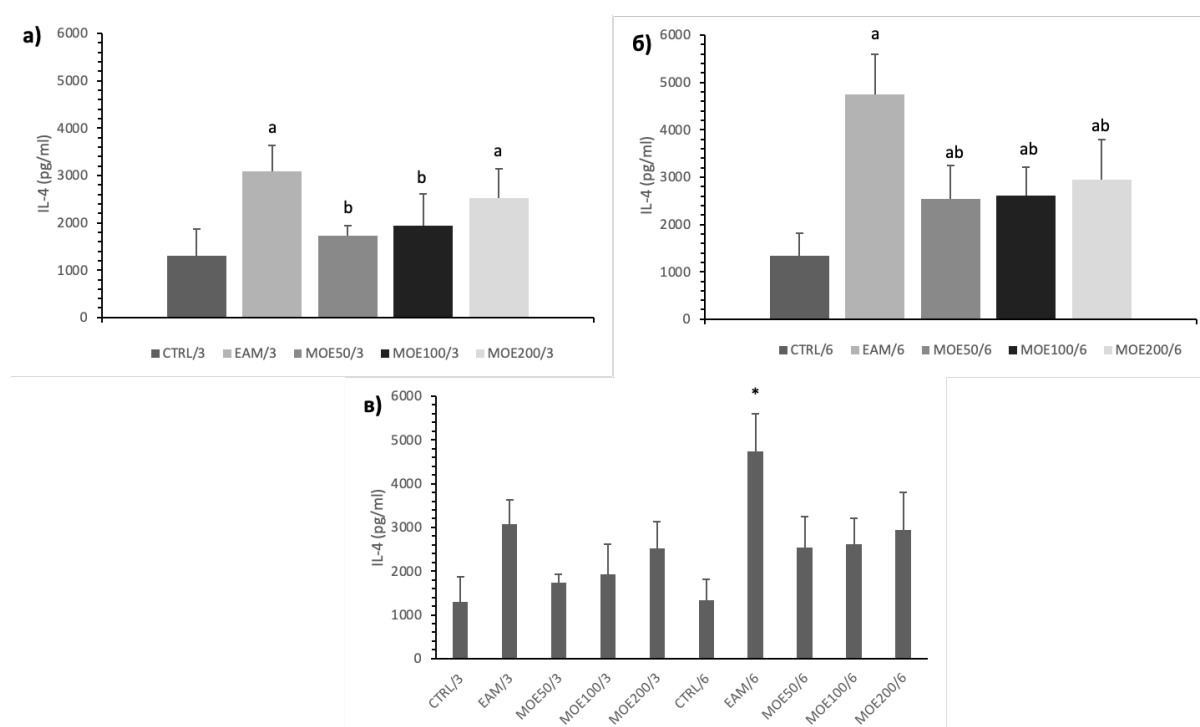


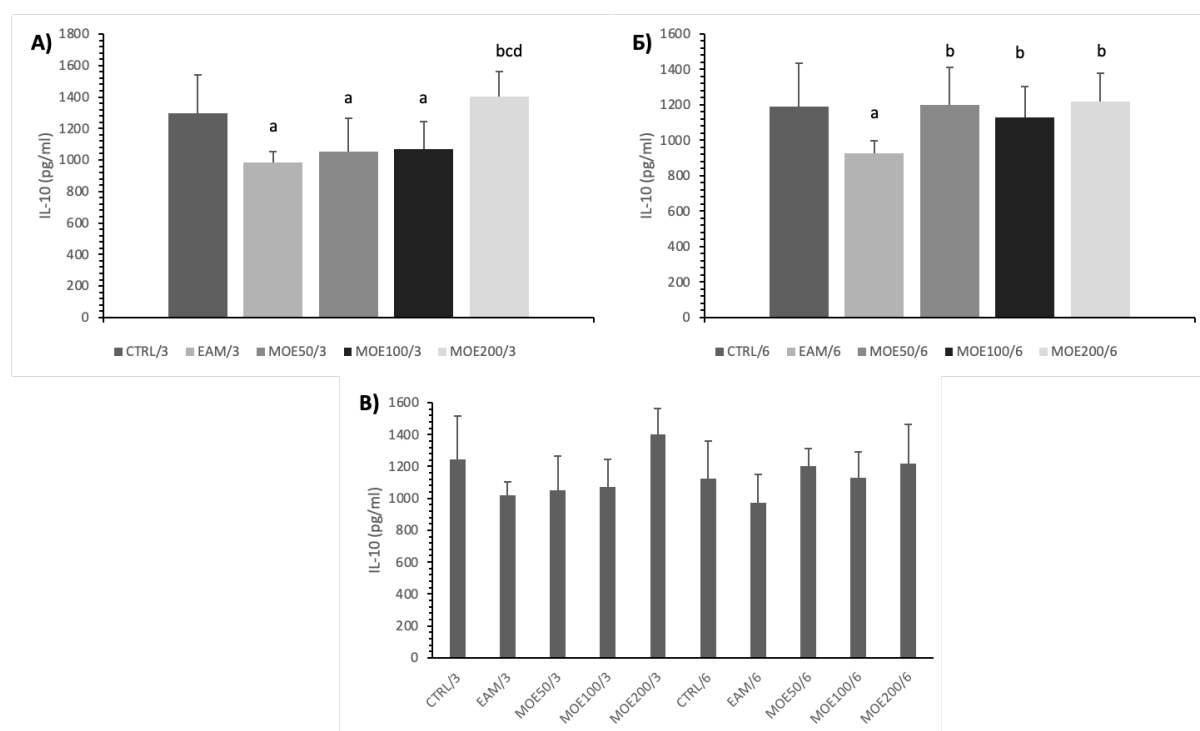
График 21. Ефекти МОЕ на концентрацију интерлеукина 4 (IL-4) у серуму у ЕАМ моделу

а) протокол од 3 недеље; б) протокол од 6 недеља; в) поређење 3 недеље vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 – здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; EAM/3; EAM/6- пацови са индукованим ЕАМ подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; MOE50/3; MOE50/6; MOE100/3; MOE100/6; MOE200/3; MOE200/6 - пацови са ЕАМ третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p < 0.05$ у односу на CTRL групу; ^bу односу на ЕАМ групу; * између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 или 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

Концентрација IL-4 била је значајно повећана у групи болесних пацова ЕАМ/3 у поређењу са здравим животињама CTRL/3 групе ($p=0,000$), док је тронедељни третман ниском и средњом дозом индуковао значајно снижење нивоа IL-4 у односу на ЕАМ/3

($p=0,003$; $p=0,049$) групу до вредности сличних контролним. С друге стране измерене вредности IL-4 у групи третираној високом дозом су биле сличне онима у EAM/3 групи ($p>0,05$), а значајно више у односу на CTRL/3 групу ($p=0,023$; **График 21а**). У шестонедељном режиму је индукција EAM такође индуковала значајан пораст IL-4 у односу на CTRL/6 групу ($p=0,000$). Међутим, све три дозе екстракта су успеле да значајно сниже ниво IL-4 у односу на EAM/6 групу ($p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,000$), при чему су измерене вредности у овим групама биле више од CTRL/6 групе ($p=0,006$; $p=0,002$; $p=0,000$; **График 21б**). Измерене вредности овог интерлеукина биле су сличне у свим контролним и третираним групама, без обзира на примењену дозу и дужину третмана ($p>0,05$). Једино у EAM групи, дужи протокол био је повезан са значајним повећањем концентрације IL-4 у односу на краћи, тронедељни протокол ($p=0,000$; **График 21в**).

График 22. Ефекти МОЕ на концентрацију интерлеукина 10 (IL-10) у серуму у EAM моделу



а) протокол од 3 недеље; б) протокол од 6 недеља; в) поређење 3 недеље vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 – здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; EAM/3; EAM/6- пацови са индукованим EAM подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; MOE50/3; MOE50/6; MOE100/3; MOE100/6; MOE200/3; MOE200/6 - пацови са EAM третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на CTRL групу; ^bу односу на EAM групу; ^cу односу на MOE50 групу; ^dу односу на MOE100 групу; * између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 или 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности ± стандардна девијација ($X \pm SD$).

У EAM групама је забележен значајно нижи ниво IL-10 у односу на здраве животиње, независно од дужине протокола ($p=0,039$; **График 22А**; $p=0,043$; **График 22Б**). Тронедељна примена МОЕ у највишој дози од 200 mg/kg индуковала је значајан пораст

концентрације антиинфламаторног цитокина IL-10 у серуму у односу на нетретиране ЕАМ животиње, као и у односу на оне третиране средњом и ниском дозом МОЕ ($p=0,009$; $p=0,017$; $p=0,022$; **График 22А**). Међутим, суплементација МОЕ током 6 недеља је успела да значајно повећа IL-10 у односу на ЕАМ/6 групу у све три испитиване дозе ($p=0,024$; $p=0,048$; $p=0,039$; **График 22Б**). Измерене вредности овог антиинфламаторног цитокина биле су сличне у свим аналогним групама, без обзира на примењену дозу и дужину третмана ($p>0,05$; **График 22в**)

4.11.4. Ефекти примењених екстраката матичњака на ниво Th17 цитокина у серуму

На графицима 23 и 24 приказане су концентрације интерлеукина 17 и трансформишућег фактора раста бета у серуму, медијатора Th17 имунског одговора, након завршеног тронедељног и шестонедељног протокола.

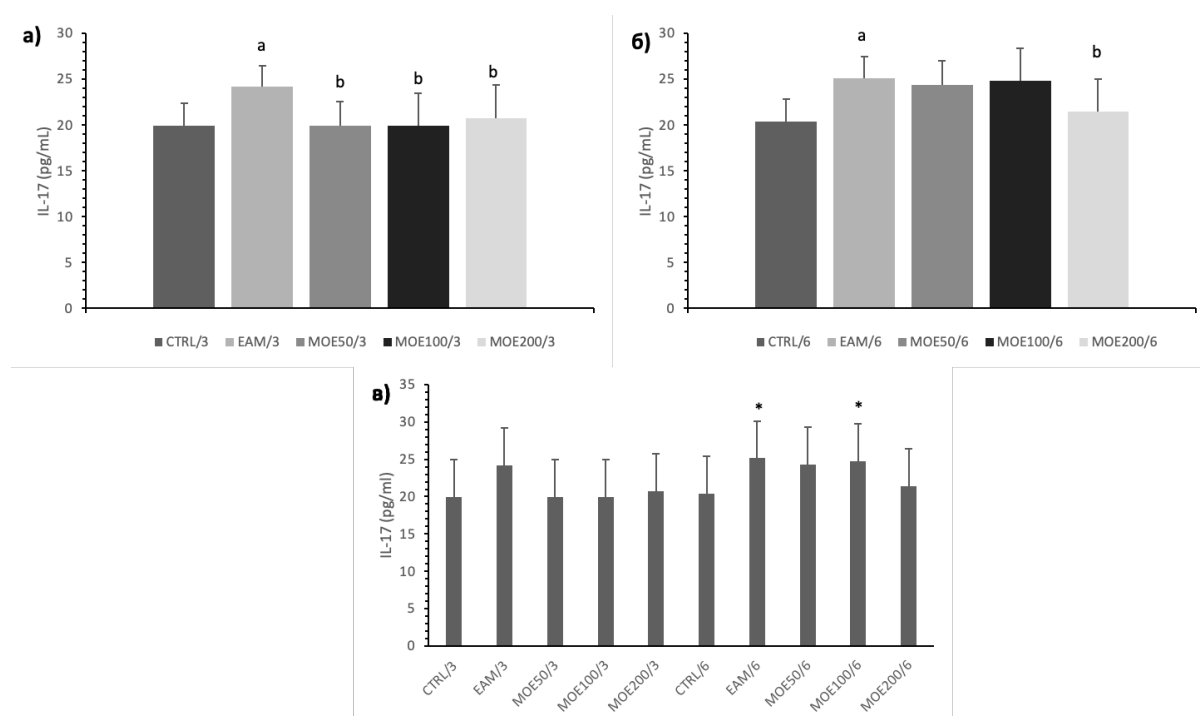


График 23. Ефекти МОЕ на концентрацију интерлеукина 17 (IL-17) у серуму у ЕАМ моделу

а) протокол од 3 недеље; б) протокол од 6 недеља; в) поређење 3 недеље vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 - здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; EAM/3; EAM/6- пацови са индукованим ЕАМ подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; MOE50/3; MOE50/6; MOE100/3; MOE100/6; MOE200/3; MOE200/6 - пацови са ЕАМ третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p < 0.05$ у односу на CTRL групу; ^bу односу на ЕАМ групу; ^{*}између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 или 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

Значајно повећана концентрација интерлеукина 17 забележена је у групи ЕАМ/3 у односу на CTRL/3 групу ($p=0,011$; **График 23а**), а исти тренд је примећен и код

хроничног протокола, виши ниво IL-17 у ЕАМ/6 групи у односу на CTRL/6 групу ($p=0,000$; **График 23б**). Тронедељна суплементација екстрактом матичњака у све три дозе индуковала је значајно мање ослобађање IL-17 у односу на ЕАМ/3 ($p=0,021$; $p=0,012$; $p=0,004$), при чему није било значајних разлика у ефектима примењених доза ($p>0,05$; **График 23а**). Међутим, шестонедељни третман екстрактом показао се ефикасним само у највишој дози од 200mg/kg која је значајно снизила концентрацију IL17 у односу на ЕАМ/6 ($p=0,032$; **График 23б**). Поредивши ефекте третмана у трајању од 3 и 6 недеља, може се уочити да је у хроничној фази болести (ЕАМ/6) повећано ослобађање IL-17 у односу на ЕАМ/3 групу ($p=0,032$). Примена екстракта матичњака у средњој дози довела је до израженијег пада IL-17 након 3 недеље у односу на 6 недеља ($p=0,016$), док се у групама пацова третираних ниском и највишом дозом екстракта ниво IL17 не разликује значајно ($p>0,05$; **График 23в**).

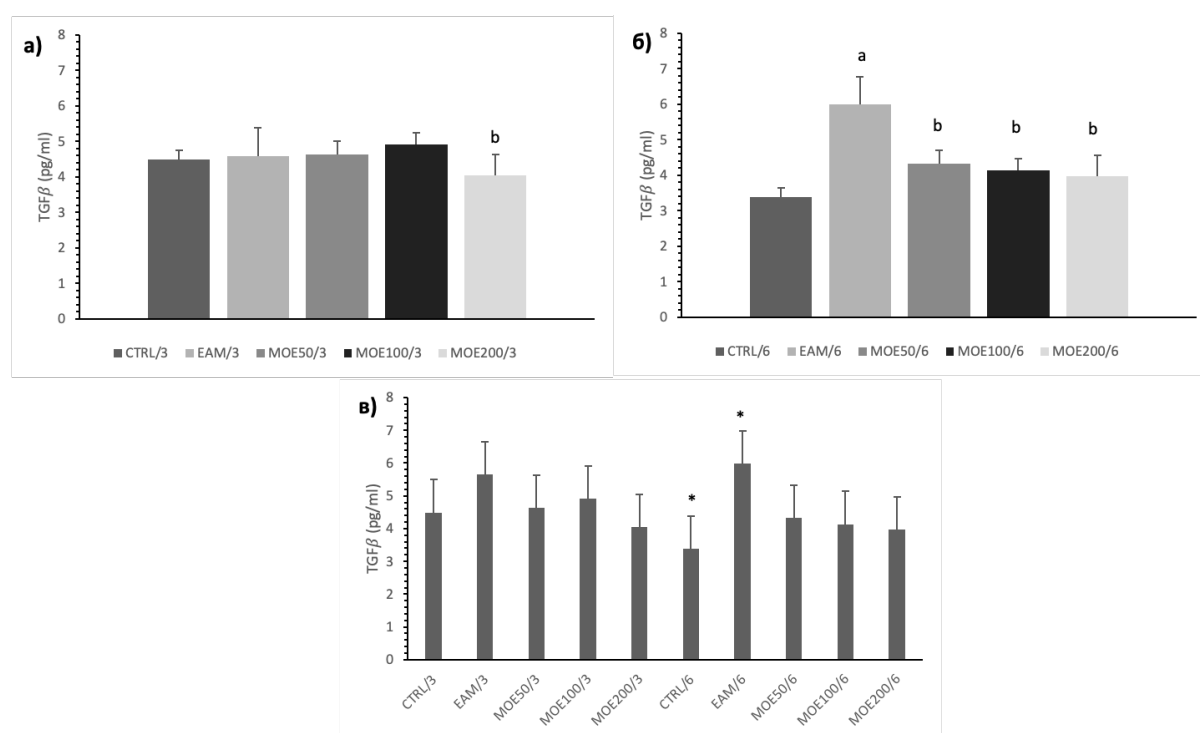


График 24. Ефекти МОЕ на концентрацију трансформишућег фактора раста бета (TGFβ) у серуму у ЕАМ моделу

*а) протокол од 3 недеље; б) протокол од 6 недеља; в) поређење 3 недеље vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 – здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; ЕАМ/3; ЕАМ/6- пацови са индукованим ЕАМ подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; МОЕ50/3; МОЕ50/6; МОЕ100/3; МОЕ100/6; МОЕ200/3; МОЕ200/6 - пацови са ЕАМ третирану са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p < 0.05$ у односу на CTRL групу; ^bу односу на ЕАМ групу; * између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 или 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).*

У тронедељном протоколу, једино је третман високом дозом екстракта значајно смањило ниво TGFβ у односу на болесне животиње ЕАМ/3 групе ($p=0,004$), док између осталих група није било значајних разлика у вредностима овог параметра ($p>0,05$;

График 24а). Међутим, након 42 дана измерена је значајно виша концентрација $TGF\beta$ у ЕАМ/6 групи у односу на контролу групу CTRL/6, а шестонедељна експозиција екстракту матичњака у све три испитиване дозе индуковала је значајан пад $TGF\beta$ у односу на ЕАМ/6 ($p=0,002$; $p=0,016$; $p=0,000$; **График 24б**). Група животиња са ЕАМ имала је значајно виши ниво $TGF\beta$ након шест недеља, у поређењу са истом групом подвргнутом протоколу од три недеље ЕАМ/3 ($p=0,048$), док је ниво $TGF\beta$ био нижи код здравих пацова након шест недеља у односу на протокол од три недеље ($p=0,006$). Измерене вредности овог фактора раста биле су сличне у свим третираним групама, без обзира на примењену дозу и дужину третмана ($p>0,05$; **График 24в**)

4.12. Ефекти екстракта матичњака на патохистолошке

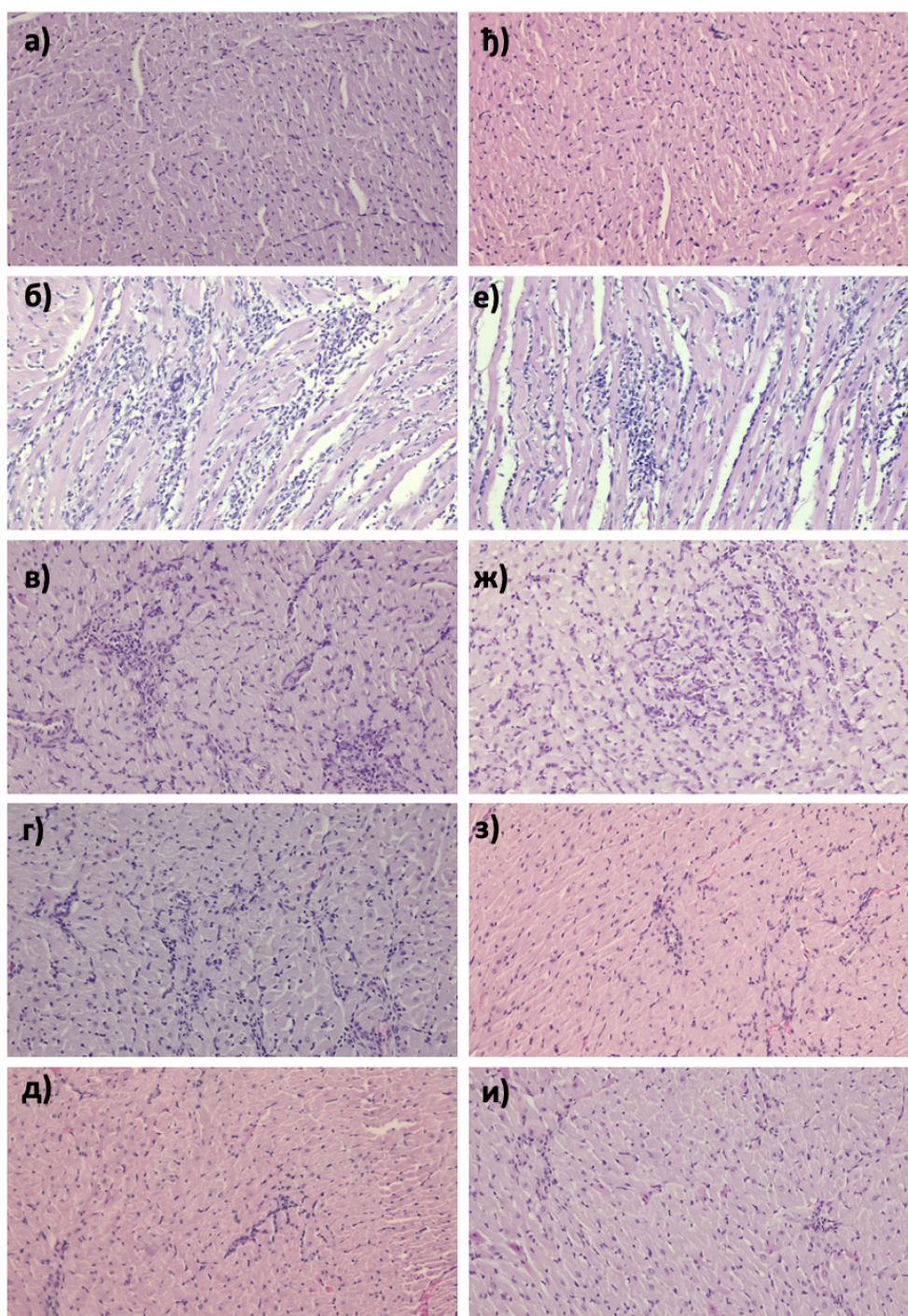
карактеристике миокарда у ЕАМ моделу

4.12.1. Ефекти екстракта матичњака на структуру миокарда у ЕАМ моделу – Н/Е бојење

Слика 10 приказује репрезентативне слике структуре миокарде добијене Н/Е бојењем, док је на графику 25 приказана и квантификована густина ћелијских инфилтрата у пресецима срца испитиваних група.

Очувана структура миокарда без некрозе и дегенерације кардиомиоцита уочена је у CTRL/3 и CTRL/6 групама здравих неимунизованих пацова (**Слика 10а и 10ђ**). Н/Е обојени пресеци ЕАМ/3 групе пацова потврдили су присуство тешког миокардитиса који карактерише масивна инфламаторна ћелијска инфилтрација, дифузног типа, деструкција влакана миокарда, некроза и бубрење кардиомиоцита, едем интерстицијума и цитоплазматска хиперезинофилија (**Слика 10б**). Сличан налаз уочен је и у ЕАМ/6 групи при чему је инфламаторни инфилтрат нешто мањег интензитета након 6 недеља. Инфламаторни инфилтрат се састојао од различитих леукоцита, укључујући моноклеарне ћелије, полиморфонуклеарне неутрофиле и вишенуклеарне циновске ћелије, карактеристичне за аутоимунски миокардитис, које су углавном локализоване у епикарду вентрикуларног зида. Међутим, МОЕ третман, нарочито високом дозом од 200 mg/k, побољшао је структуру срца након тронедељног и након шестонедељног третмана (**Слика 10д и 10и**).

На графику 25 приказана је квантификација густине ћелијског инфилтрата у пресецима свих група, и поређени су ефекти МОЕ на смањење инфилтрата у зависности од дужине протокола. На пресецима срчаног ткива ЕАМ/3 групе примећено је значајно присуство инфламаторног инфилтрата у поређењу са CTRL/3 здравим срцима ($p=0,000$). Наиме, све три дозе МОЕ (МОЕ50/3, МОЕ100/3, МОЕ200/3) значајно су смањиле густину инфламаторног инфилтрата (за 44,38%, 71,37% и 88,46%) у поређењу са групом ЕАМ/3 ($p=0,011$; $p=0,020$; $p=0,000$). Поред тога, забележени ефекти били су дозно-зависни, најизраженије смањење процента инфламаторног инфилтрата примећено је у групи животиња третираних високом дозом МОЕ, наспрам средње и ниске дозе ($p=0,001$; $p=0,000$). Додатно, и средња доза МОЕ значајно је снизила % инфламаторног инфилтрата у односу на тронедељни третман ниском дозом ($p=0,034$; **График 25а**). Сличан тренд је забележен и у случају шестонедељног протокола, значајно већа густина ћелијског инфилтрата у ЕАМ/6 срцима у односу на здрава срца CTRL/6 групе ($p=0,000$), док је шестонедељна примена екстракта у све три дозе успела да снизи густину ћелијског инфилтрата у односу на ЕАМ/6 групу ($p=0,022$; $p=0,015$; $p=0,000$). Такође, израженији ефекти су постигнути у групама третираним високом и средњом дозом МОЕ у односу на ниску дозу ($p=0,000$; $p=0,011$; **График 25б**). Поређењем оба протокола, може се приметити да се густина инфилтрата значајно смањила у ЕАМ групи након 6 недеља у односу на 3 недеље, која се сматра пиком инфламације ($p=0,001$). Додатно, измерена густина ћелијског инфилтрата у групи третираној ниском дозом екстракта била је виша након 3 недеље у односу на протокол од 6 недеља ($p=0,033$; **График 25в**).



Слика 10. Репрезентативне слике пресека миокарда добијених хематоксилин еозин бојењем у ЕАМ моделу.

a) CTRL/3 - контролна група, протокол од 3 недеље; б) ЕАМ/3 - животиње са ЕАМ, протокол од 3 недеље; в) МОЕ50/3 - животиње са ЕАМ третиране са 50 mg/kg МОЕ током 3 недеље г) МОЕ100/3 - животиње са ЕАМ третиране са 100 mg/kg МОЕ током 3 недеље д) МОЕ200/3 - животиње са ЕАМ третиране са 200 mg/kg МОЕ током 3 недеље; њ) CTRL/6 - контролна група, протокол од 6 недеља; е) ЕАМ/6 - животиње са ЕАМ, протокол од 6 недеља; ж) МОЕ50/6 - животиње са ЕАМ третиране са 50 mg/kg МОЕ током 6 недеља; з) МОЕ100/6 - животиње са ЕАМ третиране са 100 mg/kg МОЕ током 6 недеља; и) МОЕ200/6 - животиње са ЕАМ третиране са 100 mg/kg МОЕ током 6 недеље. Увеличање 200 x; скала 5 mm.

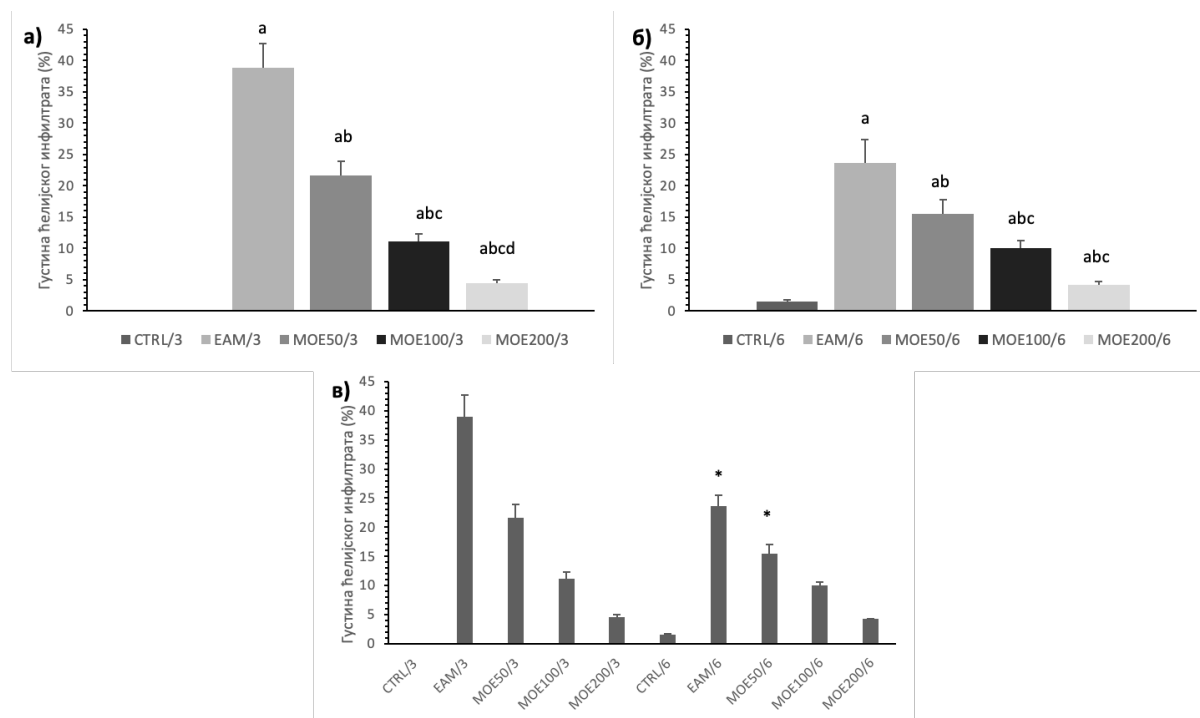


График 25. Ефекти МОЕ на густину ћелијског инфилтрата у ЕАМ моделу.

а) протокол од 3 недеље; б) протокол од 6 недеља; в) поређење 3 недеље vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 – здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; EAM/3; EAM/6- пацови са индукованим ЕАМ подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; MOE50/3; MOE50/6; MOE100/3; MOE100/6; MOE200/3; MOE200/6 - пацови са ЕАМ третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p < 0.05$ у односу на CTRL групу; ^bу односу на EAM групу; ^cу односу на MOE50 групу; ^dу односу на MOE100 групу; * између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 или 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

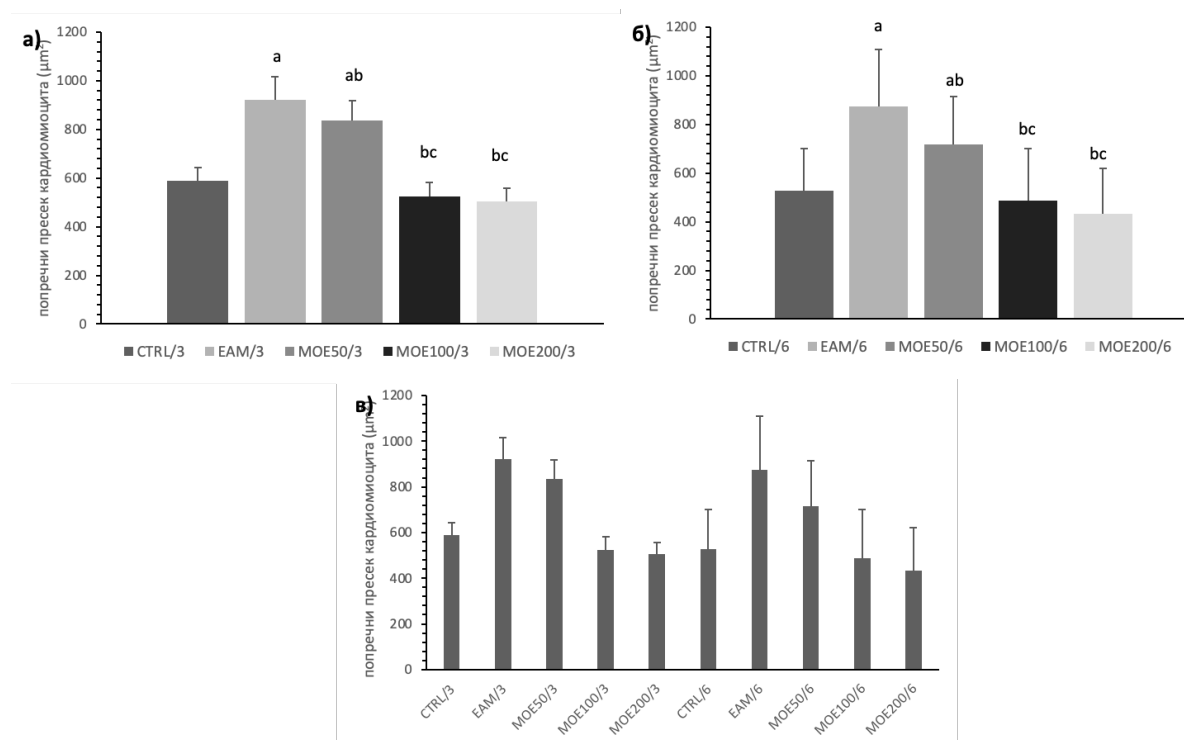


График 26. Ефекти МОЕ на површину попречног пресека кардиомиоцита у ЕАМ моделу.

а) протокол од 3 недеље; б) протокол од 6 недеља; в) поређење 3 недеље vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 – здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; EAM/3; EAM/6- пацови са индукованим ЕАМ подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; MOE50/3; MOE50/6; MOE100/3; MOE100/6; MOE200/3; MOE200/6 - пацови са ЕАМ третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p < 0.05$ у односу на CTRL групу; ^bу односу на ЕАМ групу; ^cу односу на MOE50 групу; * између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 или 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

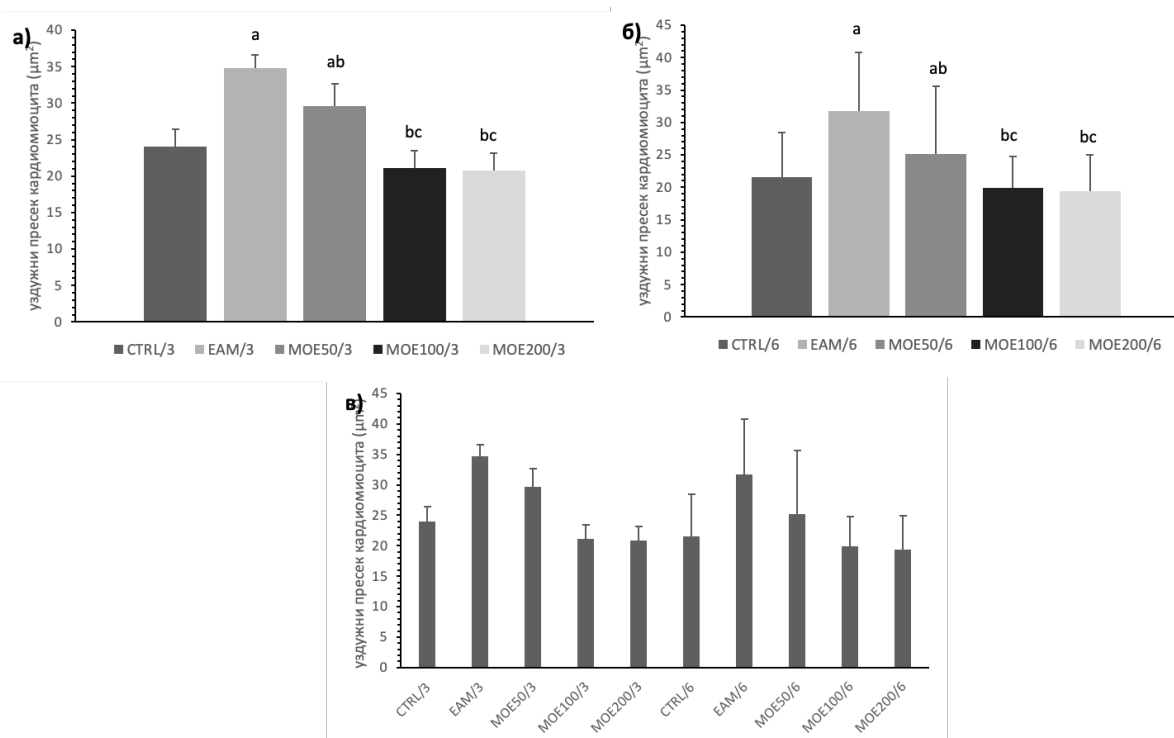


График 27. Ефекти МОЕ на уздужни пресек кардиомиоцита у ЕАМ моделу.

а) протокол од 3 недеље; б) протокол од 6 недеља; в) поређење 3 недеља vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 – здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; EAM/3; EAM/6- пацови са индукованим ЕАМ подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; MOE50/3; MOE50/6; MOE100/3; MOE100/6; MOE200/3; MOE200/6 - пацови са ЕАМ третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p < 0.05$ у односу на CTRL групу; ^bу односу на EAM групу; ^cу односу на MOE50 групу; * између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 или 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

На графицима 26 и 27 приказане су морфометријски параметри кардиомиоцита, мерени након Н/Е бојења и то површина попречног пресека као и уздужни лонгитудинални пресек кардиомиоцита. Може се уочити да је и површина попречног пресека и уздужни пресек кардиомиоцита био значајно увећан код ЕАМ пацова у односу на здрава CTRL срца, без обзира на дужину протокола (График 26а; CTRL/3 vs. EAM/3 $p=0,000$ и График 27а CTRL/6 vs. EAM/6 $p=0,000$). Тронедельна примена МОЕ у све три испитиване дозе је смањила и попречни и уздужни пресек кардиомиоцита у односу на нетретиране ЕАМ/3 животиње (График 26а; $p=0,042$; $p=0,012$; $p=0,003$ и График 27а; $p=0,039$; $p=0,020$; $p=0,005$), при чему су средња и висока доза МОЕ смањиле вредности ова два параметра у односу на најнижу дозу (График 26а; $p=0,024$; $p=0,030$; и График 27а; $p=0,036$; $p=0,040$). Исти тренд забележен је и код шестонедељног режима, за оба параметра: значајно више вредности у ЕАМ/6 него у CTRL/групи (График 26б; CTRL/3 vs. EAM/3 $p=0,000$ и График 27б CTRL/6 vs. EAM/6 $p=0,000$), као и смањење вредности након третмана МОЕ у све три дозе у односу на ЕАМ/6 (График 26б; $p=0,040$; $p=0,021$; $p=0,013$ и График 27б; $p=0,038$; $p=0,013$; $p=0,015$), са најизраженијим ефектом средње и високе дозе МОЕ у односу на ниску дозу (График 26б; $p=0,044$; $p=0,032$; и График 27б; $p=0,026$; $p=0,030$).

Нису забележене значајне разлике у попречном и уздушном пресеку кардиомиоцита између аналогних група подвргнутих тронедељном у односу на шестонедељни протокол (**Графици 26в и 27в**; $p > 0,05$).

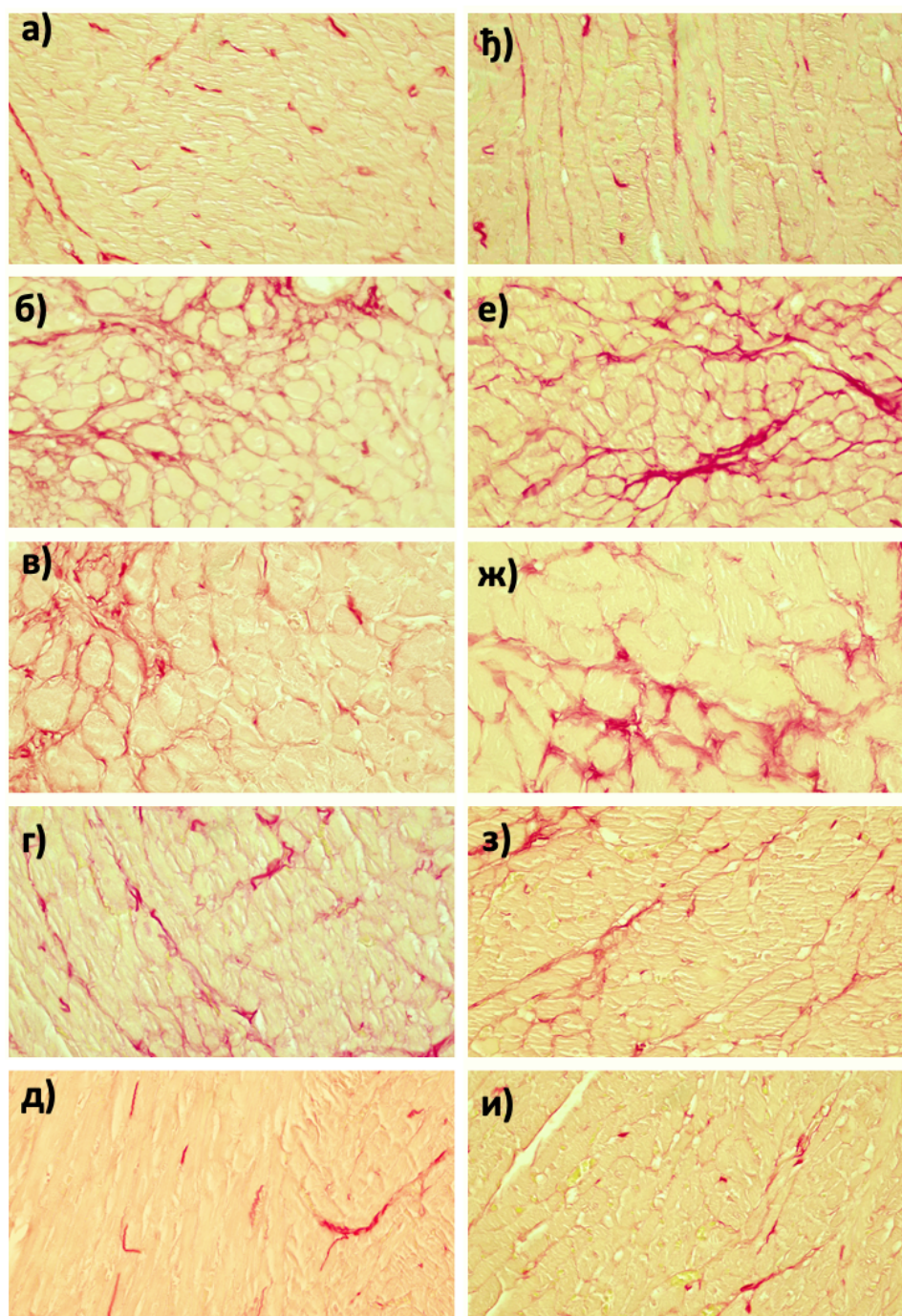
4.12.2. Ефекти екстракта матичњака на садржај колагена у ткиву миокарда у ЕАМ моделу – **Sirius Red** и **Masson Trichrome** бојења

Слика 11 приказује ткива миокарда обојена *Sirius red* методом у циљу испитивања ефеката примене екстракта матичњака на садржај колагена, фиброзу и ремоделовање миокарда карактеристично за ЕАМ модел.

Као што се може и приметити на **Слици 11**, колагена влакна обојена су црвеном бојом, при чему се јасно уочавају депонована колагена влакна у групама имунизованих нетретираних пацова са ЕАМ (ЕАМ/3 и ЕАМ/6 групе), док је код здравих животиња ова промена скоро неуочљива. Третман са све три дозе МОЕ, у оба протокола, довео је до смањења количине колагених влакана у односу на болесне ЕАМ животиње, при чему је најизраженији ефекат примећен у МОЕ200/6 и МОЕ200/3 групама. Ова визуелна запажања су потврђена и након квантификације садржаја колагена у ткивима миокарда добијених у одговарајућем софтверу. Наиме, код имунизованих пацова са ЕАМ измерен је значајно већа количина депонованог колагена у односу на здраве животиње, и то у оба протокола, независно од дужине посматраног периода ($p = 0,000$; $p = 0,000$; **График 28а и 28б**). Интересантно је да дуже трајање болести индукује појачано депоновање колагена указујући на фиброзу миокарда, карактеристичну за ЕАМ-индуковану кардиомиопатију у хроничној фази болести (ЕАМ/3 vs. ЕАМ/6; $p = 0,034$; **График 28в**). Тронедељни третмани екстрактом матичњака (све три дозе) довели су до значајног смањења садржаја колагена у миокарду пацова у односу ЕАМ/3 групу ($p = 0,005$; $p = 0,001$; $p = 0,000$), уз јасно уочљив дозно-зависни ефекат. Наиме висока доза од 200 mg/kg индуковала је израженији пад садржаја колагених влакана у односу на средњу и ниску дозу ($p = 0,010$; $p = 0,000$), и ове вредности су биле приближне контролним ($p > 0,05$; **График 28а**). Исти тренд је забележен и у шестонедељном режиму, све три дозе МОЕ довеле су до пада ове варијабле у односу на ЕАМ/6 ($p = 0,002$; $p = 0,000$; $p = 0,000$), такође најизраженије смањење садржаја колагена измерено је у МОЕ200/6 групи у односу на МОЕ50/6 и МОЕ100/6 групу ($p = 0,000$; $p = 0,002$; **График 28б**). Додатно, значајно ниже вредности колагена измерене су у МОЕ100 групи у односу на МОЕ50, у оба протокола ($p < 0,009$; $p = 0,007$; **График 26а и 26б**). Измерене вредности колагена у групама третираним екстрактом матичњака током 3 недеље биле су сличне вредностима измереним у аналогним групама третираним током шест недеља ($p > 0,05$; **График 28в**).

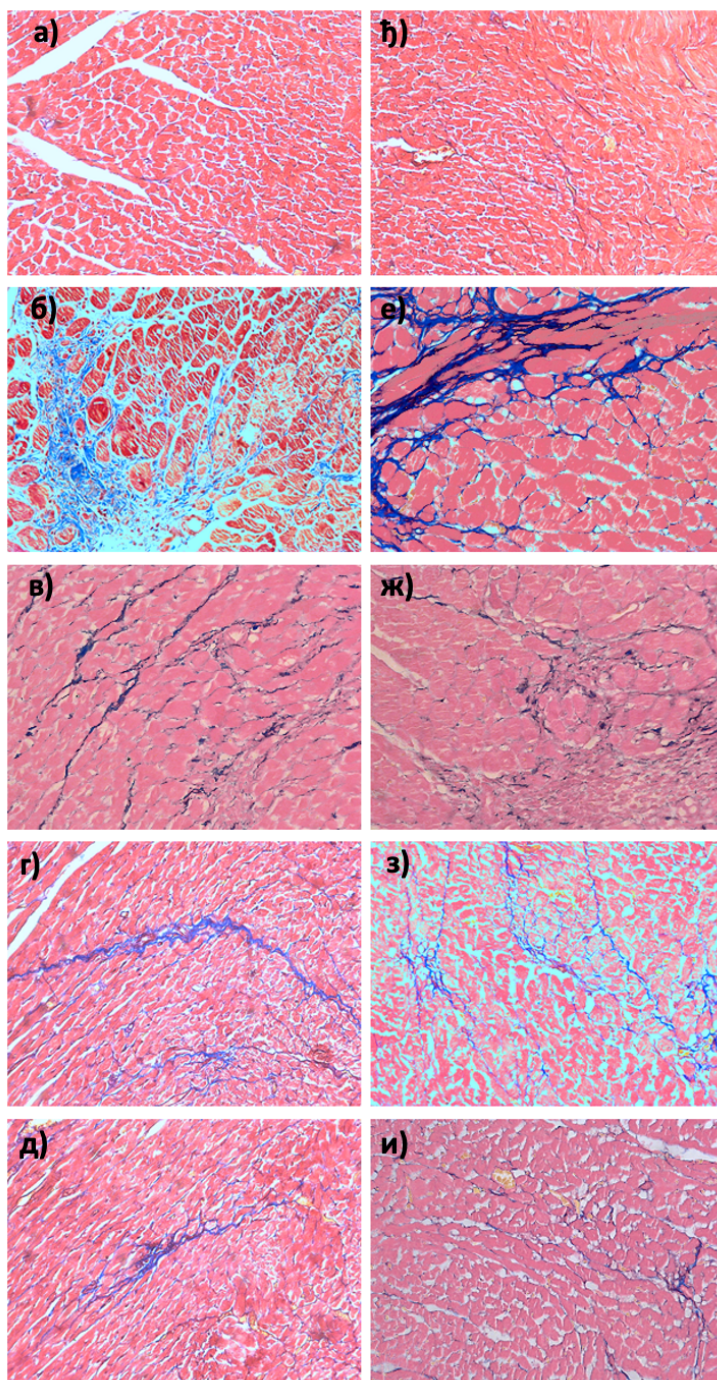
На слици 12 приказана ткива миокарда обојена *Masson Trichrome* методом, такође у циљу испитивања ефеката примене екстракта матичњака на садржај колагена, фиброзу и ремоделовање миокарда карактеристично за ЕАМ модел.

Овом методом, дошли смо до сличних запажања, изразитији депои колагених влакана могу се приметити у ЕАМ/3 и ЕАМ/6 групама (**Слика 12б и 12е**) у односу на здрава срца где се минимално примећују колагена влакна (**Слика 12а и 12ђ**). Третман МОЕ је визуелно смањио количину колагених влакана, а најизраженије смањење уочава се у групи третираној дозом од 200 mg/kg (**Слика 12д и 12и**).



Слика 11. Репрезентативне слике пресека миокарда добијених *Sirius red* бојењем - ефекти МОЕ на депоновање колагена у ткиву миокарда у ЕАМ моделу.

а) CTRL/3 - контролна група, протокол од 3 недеље; б) ЕАМ/3 - животиње са ЕАМ, протокол од 3 недеље; в) МОЕ50/3 - животиње са ЕАМ третиране са 50 mg/kg МОЕ током 3 недеље г) МОЕ100/3 - животиње са ЕАМ третиране са 100 mg/kg МОЕ током 3 недеље д) МОЕ200/3 - животиње са ЕАМ третиране са 200 mg/kg МОЕ током 3 недеље; њ) CTRL/6 - контролна група, протокол од 6 недеља; е) ЕАМ/6 - животиње са ЕАМ, протокол од 6 недеља; ж) МОЕ50/6 - животиње са ЕАМ третиране са 50 mg/kg МОЕ током 6 недеља; з) МОЕ100/6 - животиње са ЕАМ третиране са 100 mg/kg МОЕ током 6 недеља; и) МОЕ200/6 - животиње са ЕАМ третиране са 100 mg/kg МОЕ током 6 недеље. Увеличање 200 x; скала 5 mm.



Слика 12. Репрезентативне слике пресека миокарда добијених *Masson Trichrome* бојењем- ефекти МОЕ на депоновање колагена у ткиву миокарда у ЕАМ моделу.

a) CTRL/3 - контролна група, протокол од 3 недеље; б) ЕАМ/3 - животиње са ЕАМ, протокол од 3 недеље; в) МОЕ50/3 - животиње са ЕАМ третиране са 50 mg/kg МОЕ током 3 недеље г) МОЕ100/3 - животиње са ЕАМ третиране са 100 mg/kg МОЕ током 3 недеље д) МОЕ200/3 - животиње са ЕАМ третиране са 200 mg/kg МОЕ током 3 недеље; њ) CTRL/6 - контролна група, протокол од 6 недеља; е) ЕАМ/6 - животиње са ЕАМ, протокол од 6 недеља; ж) МОЕ50/6 - животиње са ЕАМ третиране са 50 mg/kg МОЕ током 6 недеља; з) МОЕ100/6 - животиње са ЕАМ третиране са 100 mg/kg МОЕ током 6 недеља; и) МОЕ200/6 - животиње са ЕАМ третиране са 100 mg/kg МОЕ током 6 недеље. Увеличање 200 x; скала 5 mm.

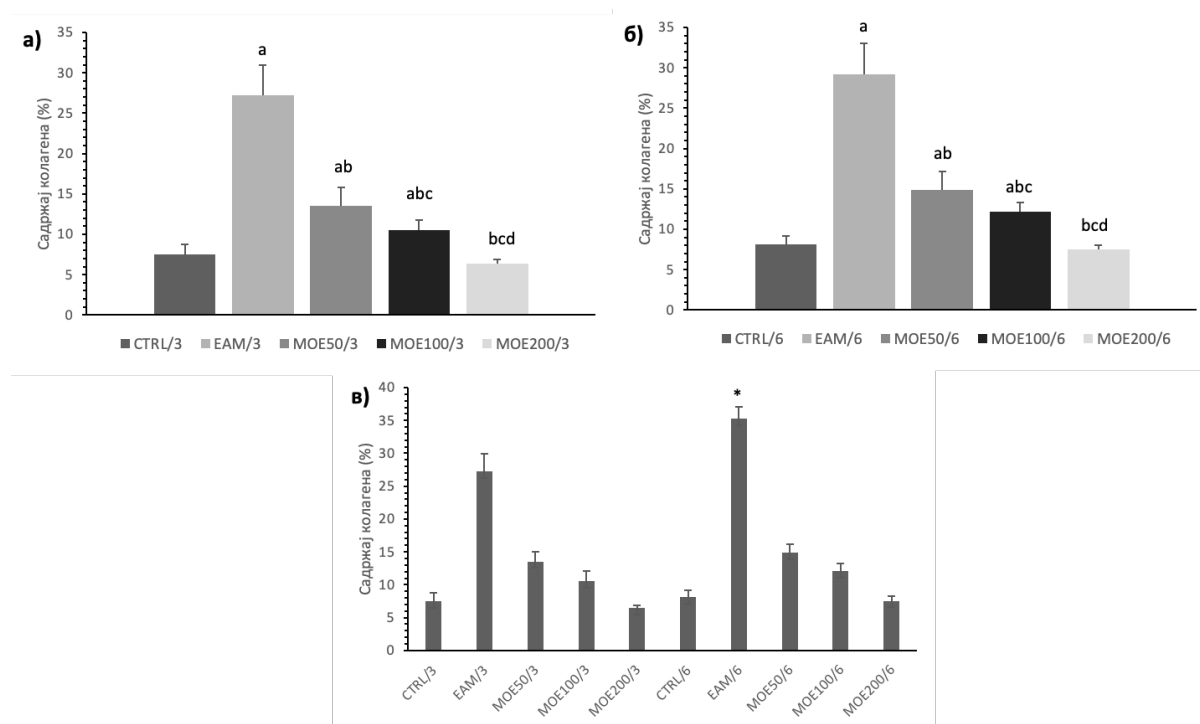
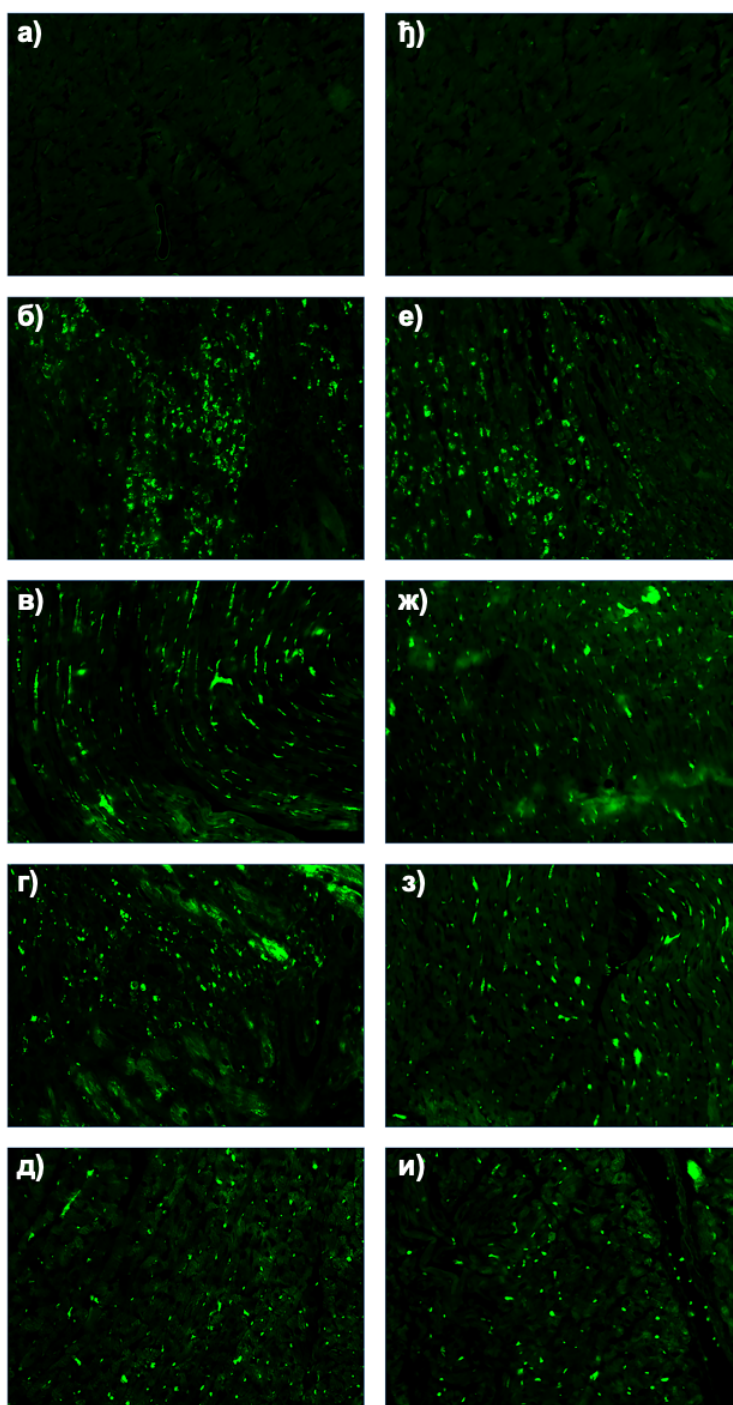


График 28. Ефекти МОЕ на садржај колагена у миокарду у ЕАМ моделу.

а) протокол од 3 недеље; б) протокол од 6 недеља; в) поређење 3 недеље vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 – здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; EAM/3; EAM/6- пацови са индукованим ЕАМ подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; MOE50/3; MOE50/6; MOE100/3; MOE100/6; MOE200/3; MOE200/6 - пацови са ЕАМ третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p < 0.05$ у односу на CTRL групу; ^bу односу на EAM групу; ^cу односу на MOE50 групу; ^dу односу на MOE100 групу; * између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 или 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

4.12.3. Ефекти екстракта матичњака на апоптозу у ткиву миокарда у ЕАМ моделу –Tunel assay бојење

Слика 13 приказује ткива миокарда обојена *Tunel assay* методом у циљу обележавања апоптотских ћелија (*Tunel* позитивних) и испитивања ефеката примене екстракта матичњака на апоптозу у миокарду у ЕАМ моделу. *Tunel* позитивна једра обележена су флуоресцентно зеленом бојом. Очекивано, у групама здравих животиња (CTRL/3 и CTRL/6) нису уочена флуоресцентни сигнали, тј. није било промена у смислу присуства *Tunel* позитивних ћелија (Слика 13а и 13ђ). С друге стране, код срца нетретираних животиња са ЕАМ, 21. дана уочено је највише *Tunel* позитивних ћелија, и то у пределима инфламаторног инфилтрата (Слика 13б), док је код третираних животиња са МОЕ примећено мање сигнала, при чему су најизраженије промене биле у MOE200/3 групи (Слика 13в, 13г и 13д). Исти тренд примећен је и код шестонедељног протокола, третман МОЕ, а нарочито МОЕ у највишој дози смањило је број *Tunel* позитивних ћелија миокарда у односу на EAM/6 животиње (Слика 13е, 13ж, 13з и 13и).



Слика 13. Репрезентативне слике пресека миокарда добијених *TUNEL assay* методом-ефекти МОЕ на апоптозу у ткиву миокарда у ЕАМ моделу.

а) CTRL/3 - контролна група, протокол од 3 недеље; б) ЕАМ/3 - животиње са ЕАМ, протокол од 3 недеље; в) МОЕ50/3 - животиње са ЕАМ третиране са 50 mg/kg МОЕ током 3 недеље г) МОЕ100/3 - животиње са ЕАМ третиране са 100 mg/kg МОЕ током 3 недеље д) МОЕ200/3 - животиње са ЕАМ третиране са 200 mg/kg МОЕ током 3 недеље; њ) CTRL/6 - контролна група, протокол од 6 недеља; е) ЕАМ/6 - животиње са ЕАМ, протокол од 6 недеља; ж) МОЕ50/6 - животиње са ЕАМ третиране са 50 mg/kg МОЕ током 6 недеља; з) МОЕ100/6 - животиње са ЕАМ третиране са 100 mg/kg МОЕ током 6 недеља; и) МОЕ200/6 - животиње са ЕАМ третиране са 100 mg/kg МОЕ током 6 недеље. Увеличање 200 x; скала 5 mm.

4.13. Ефекти екстракта матичњака на експресију одређених гена у миокарду у ЕАМ моделу

4.13.1. Ефекти екстракта матичњака на експресију гена укључених у апоптозу у миокарду

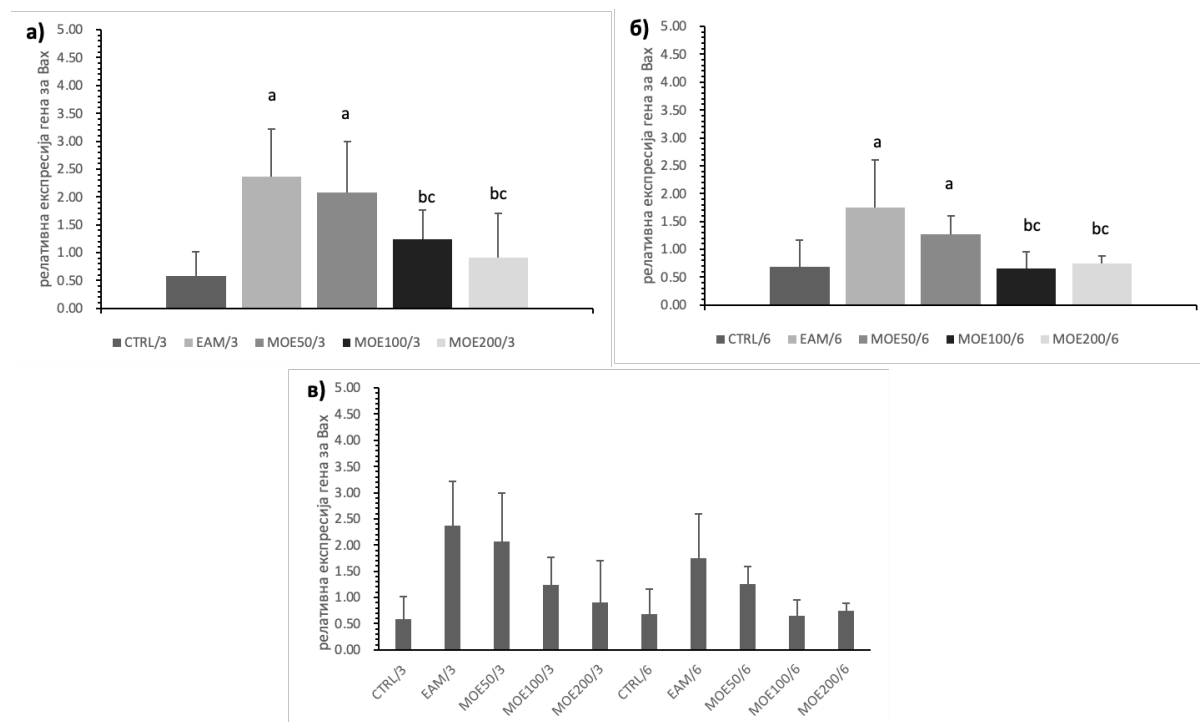


График 29. Ефекти МОЕ на релативну експресију проапоптотског гена Вах у миокарду у ЕАМ моделу

а) протокол од 3 недеље; б) протокол од 6 недеља; в) поређење 3 недеље vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 – здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; EAM/3; EAM/6- пацови са индукованим ЕАМ подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; MOE50/3; MOE50/6; MOE100/3; MOE100/6; MOE200/3; MOE200/6 - пацови са ЕАМ третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p < 0.05$ у односу на CTRL групу; ^bу односу на EAM групу; ^cу односу на MOE50 групу; * између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 или 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

На Графику 29. приказан је ефекат тронедељне и шестонедељне апликације МОЕ на релативну експресију проапоптотског гена Вах у левој комори миокарда у ЕАМ моделу, док График 28. приказује ефекте МОЕ на на релативну експресију антиапоптотског гена Bcl-2 у левој комори миокарда у ЕАМ моделу.

Индукција ЕАМ била је повезана је са значајно вишом експресијом Вах гена у односу на здраве животиње, како у тронедељном ($p=0,001$; **График 29а**) тако и у шестонедељном протоколу ($p=0,043$; **График 29б**). Суплементација средњом и високом дозом МОЕ током три недеље довела је до значајног смањења релативне

експресије Вах у односу на ЕАМ/3 нетретиране животиње са индукованим ЕАМ, као и у односу на МОЕ50/3 групу (**График 29а**; $p=0,026$; $p=0,01$; $p=0,40$; $p=0,036$). Међутим, експресија Вах у групи третираној ниском дозом МОЕ од 50 mg/kg била је слична ЕАМ/3 групи ($p>0,05$; **График 29а**) и значајно виша од контролних вредности ($p=0,034$; **График 29а**). Исти тренд је запажен и у случају хроничног протокола од 6 недеља, средња и ниска доза МОЕ значајно су редуковала експресију Вах у односу на ЕАМ/6 и МОЕ50/6 пацове (**График 29б**; $p=0,048$; $p=0,049$; $p=0,033$; $p=0,042$), док третман ниском дозом није довео до промена овог маркера апоптозе у односу на ЕАМ/6 пацове (**График 29б**; $p>0,05$). Поређењем аналогних група подвргнутих тронедељном и шестонедељном протоколу нису уочене значајне разлике (**График 29в**; $p>0,05$).

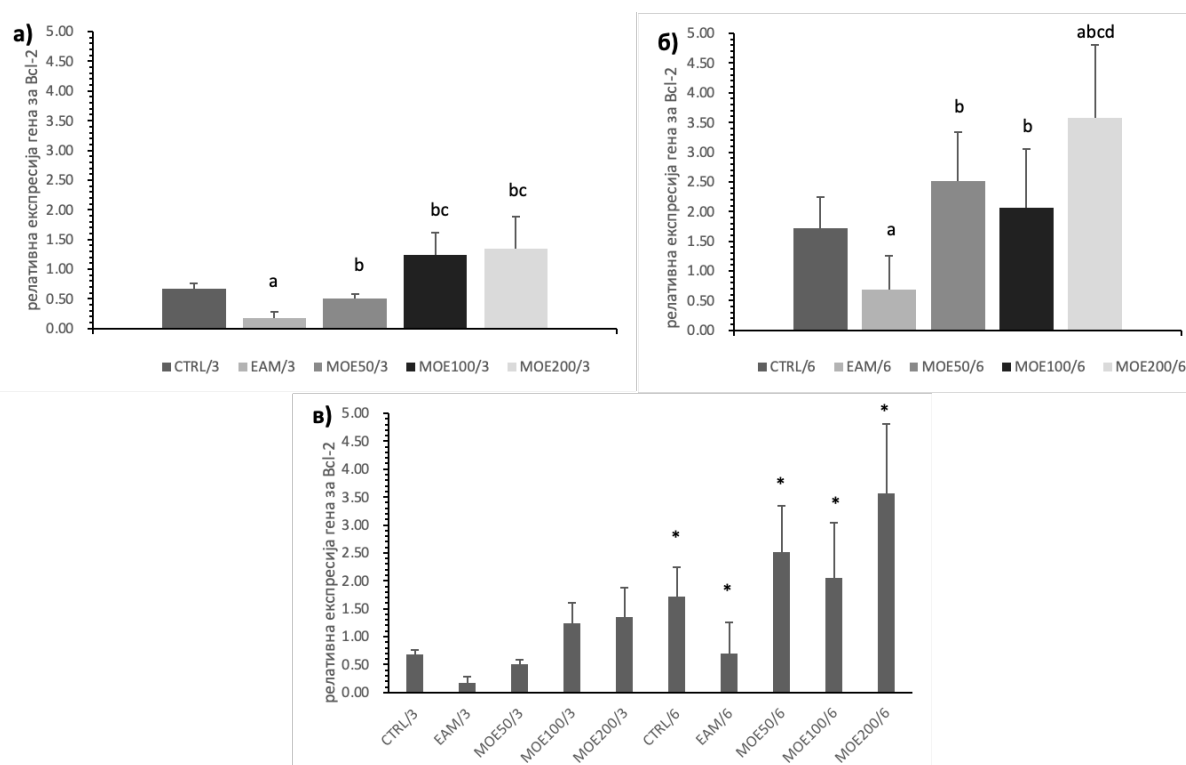


График 30. Ефекти МОЕ на релативну експресију антиапоптотског гена Bcl-2 у миокарду у ЕАМ моделу

*а) протокол од 3 недеље; б) протокол од 6 недеља; в) поређење 3 недеље vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 – здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; ЕАМ/3; ЕАМ/6- пацови са индукованим ЕАМ подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; МОЕ50/3; МОЕ50/6; МОЕ100/3; МОЕ100/6; МОЕ200/3; МОЕ200/6 - пацови са ЕАМ третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^астатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на CTRL групу; ^бу односу на ЕАМ групу; ^ву односу на МОЕ50 групу; ^ду односу на МОЕ100 групу * између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 или 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).*

Имунизоване животиње ЕАМ/3 групе имале су значајно нижу експресију антиапоптотског гена Bcl-2 у миокарду у односу на здраве CTRL/3 животиње ($p=0,045$; **График 30а**), док је тронедељни третман МОЕ у све три испитиване дозе довео до појачане експресије Bcl-2 у миокарду у односу на ЕАМ/3 групу ($p=0,023$;

$p=0,36$; $p=0,040$; **График 30а**). Експресија овог гена у групи третираној ниском дозом МОЕ од 50 mg/kg била је нижа у односу на средњу и високу дозу ($p=0,039$; $p=0,046$; **График 30а**). Сличан тренд је забележен и у случају хроничног протокола од 6 недеља, болесне нетретиране животиње ЕАМ/6 група имала је смањену релативну експресију Vcl-2 у односу здраве контроле ($p=0,022$; **График 30б**), а хронична примена све три дозе МОЕ значајно је повисила експресију Vcl-2 у односу на ЕАМ/6 пацове (**График 30б**; $p=0,048$; $p=0,049$; $p=0,033$; $p=0,042$). Најизраженије повећање уочено је у МОЕ200/6 групи у којој су забележене вредности експресије овог гена веће у односу на све остале испитиване групе – CTRL/6, ЕАМ/6, МОЕ50/6 и МОЕ100/6 (**График 30б**; $p=0,001$; $p=0,000$; $p=0,039$; $p=0,009$). Поређењем аналогних група подвргнутих тронедељном и шестонедељном протоколу може се уочити да су у хроничном протоколу значајно повишене вредности Vcl-2 експресије у свим групама (**График 30в**; $p=0,049$; $p=0,040$; $p=0,016$; $p=0,011$; $p=0,008$)

4.13.2. Ефекти екстракта матичњака на релативну експресију гена маркера оксидационог стреса у миокарду у ЕАМ моделу

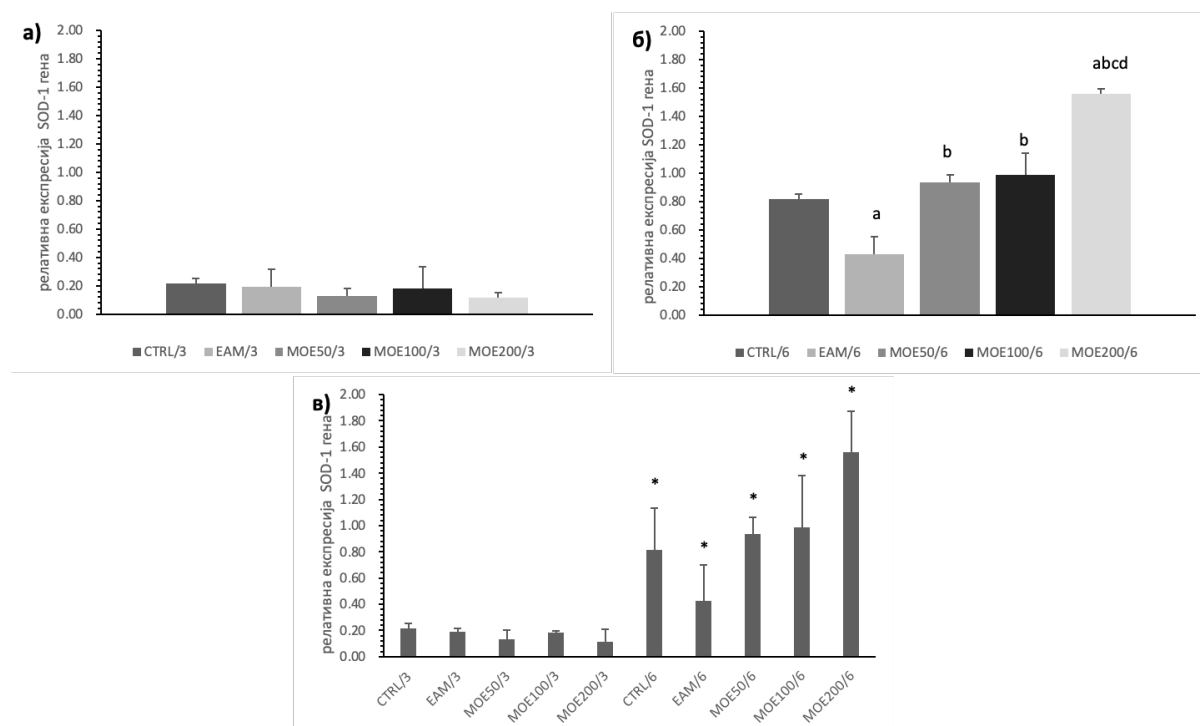


График 31. Ефекти МОЕ на релативну експресију SOD-1 гена у миокарду у ЕАМ моделу

а) протокол од 3 недеље; б) протокол од 6 недеља; в) поређење 3 недеље vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 – здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; EAM/3; EAM/6- пацови са индукованим ЕАМ подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; MOE50/3; MOE50/6; MOE100/3; MOE100/6; MOE200/3; MOE200/6 - пацови са ЕАМ третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p < 0.05$ у односу на CTRL групу; ^bу односу на ЕАМ групу; ^cу односу на MOE50 групу; ^dу односу на MOE100 групу * између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 или 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

Експресија SOD-1 гена у миокарду се није значајно разликовала између испитиваних група подвргнутих тронедељном протоколу (График 31а; $p > 0,05$). С друге стране, у шестонедељном протоколу, експресија SOD-1 у миокарду имунизованих пацова била је значајно нижа у односу CTRL/6 групу пацова ($p = 0,000$), а 42-дневна суплементација МОЕ у све три испитиване дозе довела је до значајног пораста експресије овог гена у односу на EAM/6 срца (График 31б; $p = 0,010$; $p = 0,003$; $p = 0,000$). Најизраженији пораст вредности SOD-1 гена уочен је у групи третираној највишом дозом, при чему је уочена и значајна разлика у односу на MOE100/6 и MOE50/6 групу (График 31б; $p = 0,000$; $p = 0,000$). Поређењем аналогних група подвргнутих тронедељном и шестонедељном протоколу може се приметити значајан скок вредности SOD-1 експресије у хроничном протоколу у свим групама (График 31в; $p > 0,05$; $p = 0,010$; $p = 0,000$; $p = 0,000$; $p = 0,000$;

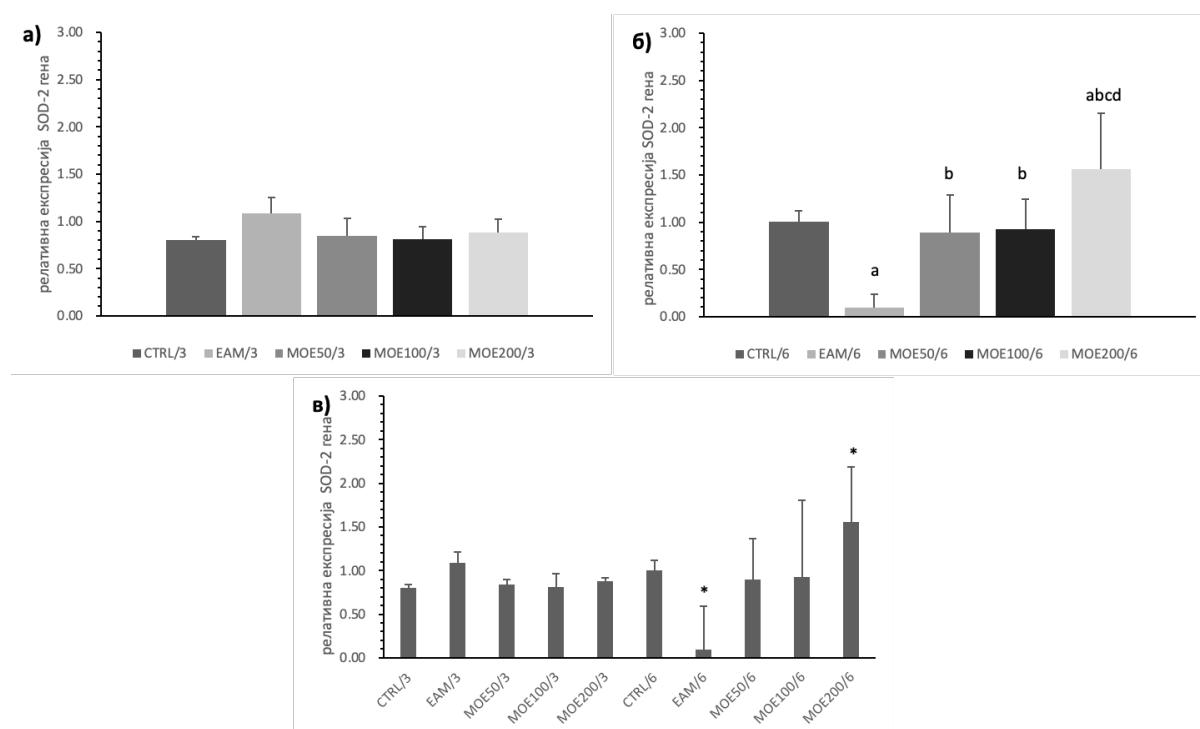


График 32. Ефекти МОЕ на релативну експресију SOD-2 гена у миокарду у EAM моделу

а) протокол од 3 недеље; б) протокол од 6 недеља; в) поређење 3 недеље vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 – здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; EAM/3; EAM/6- пацови са индукованим EAM подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; MOE50/3; MOE50/6; MOE100/3; MOE100/6; MOE200/3; MOE200/6 - пацови са EAM третирану са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на CTRL групу; ^bу односу на EAM групу; ^cу односу на MOE50 групу; ^dу односу на MOE100 групу * између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 или 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

Нису уочене промене у нивоу експресије SOD-2 (Mn SOD) гена након тронедељног третмана екстрактом матичњака у односу на имунизоване и здраве нетретиране

животиње, ни у једној од апликованих доза (**График 32а**; $p > 0,05$). Међутим, у шестонедељном протоколу, забележена је значајно нижа експресија SOD-2 у срцима EAM/6 пацова у односу на здраве пацове CTRL/6 групе ($p = 0,001$), док је хронични третман екстрактом матичњака у све три испитиване дозе индуковао значајно повећање експресије SOD-2 у односу на срца нетретираних пацова са EAM ($p = 0,001$; $p = 0,000$; $p = 0,000$), при чему су у групи MOE200/6 измерене вредности SOD-2 експресије значајно више у односу на ниску и средњу дозу MOE ($p = 0,004$; $p = 0,003$), као и у односу на контролну групу (**График 32б**; $p = 0,022$). Имунизоване нетретирание животиње подвргнуте хроничном протоколу имале су значајно нижу експресију SOD-2 гена у миокарду у односу на оне подвргнуте акутном протоколу (EAM/3; **График 32в**; $p = 0,000$), а највиша доза MOE значајно је повећала експресију SOD-2 након 6 недеља суплементације у односу на тронедељни режим ($p = 0,001$). Експресија овог гена у свим осталим аналогним групама се није значајно разликовала (**График 32в**; $p > 0,05$).

4.13.3. Ефекти екстракта матичњака на експресију гена укључених у инфламацију у миокарду у EAM моделу

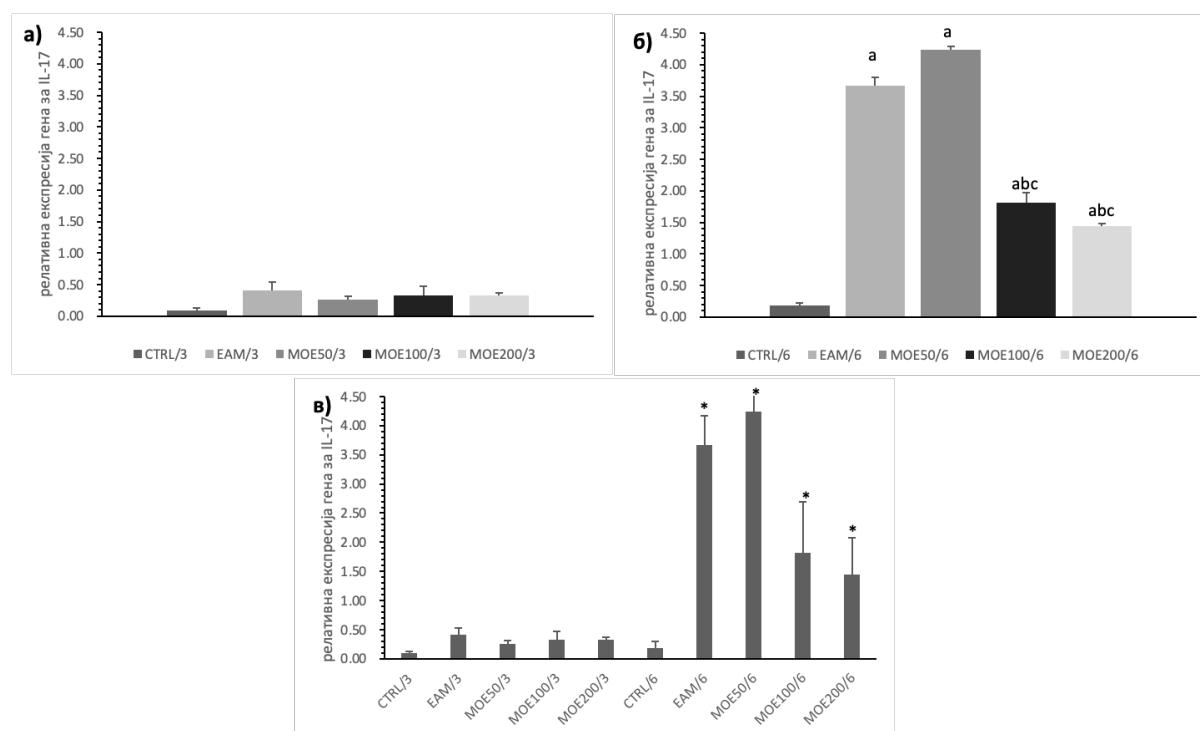


График 33. Ефекти MOE на релативну експресију гена за IL-17 у миокарду у EAM моделу

а) протокол од 3 недеље; б) протокол од 6 недеља; в) поређење 3 недеље vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 – здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; EAM/3; EAM/6- пацови са индукованим EAM подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; MOE50/3; MOE50/6; MOE100/3; MOE100/6; MOE200/3; MOE200/6 - пацови са EAM третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на CTRL групу; ^bу односу на EAM групу; ^cу односу на MOE50 групу; ^oу односу на MOE100 групу * између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 или 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

Експресија гена за IL-17 у миокарду 21. дана није се значајно разликовала између испитиваних група (**График 33а**; $p > 0,05$). С друге стране, код хроничног 42-дневног протокола, експресија IL-17 била је значајно повишена у групи имунизованих нетретираних ЕАМ/6 животиња, као код оних третираних најнижом дозом МОЕ у поређењу са здравим неимунизованим животињама (**График 33б**; $p = 0,000$; $p = 0,000$), док је шестонедељни третман МОЕ у средњој и високој дози индуковао значајно смањење експресије овог цитокина у миокарду у поређењу са нетретираним ЕАМ/6 животињама, као и у поређењу са групом животиња третираном најнижом дозом МОЕ (**График 33б**; $p = 0,000$; $p = 0,000$). Додатно, када упоредимо експресију IL-17 између аналогних група подвргнутих тронедељном vs. шестонедељном протоколу, експресија IL-17 је била значајно виша код свих имунизованих животиња 42. дана, и третираних (МОЕ50/6, МОЕ100/6, МОЕ200/6) и нетретираних (ЕАМ/6) (**График 33в**; $p = 0,000$; $p = 0,000$; $p = 0,000$).

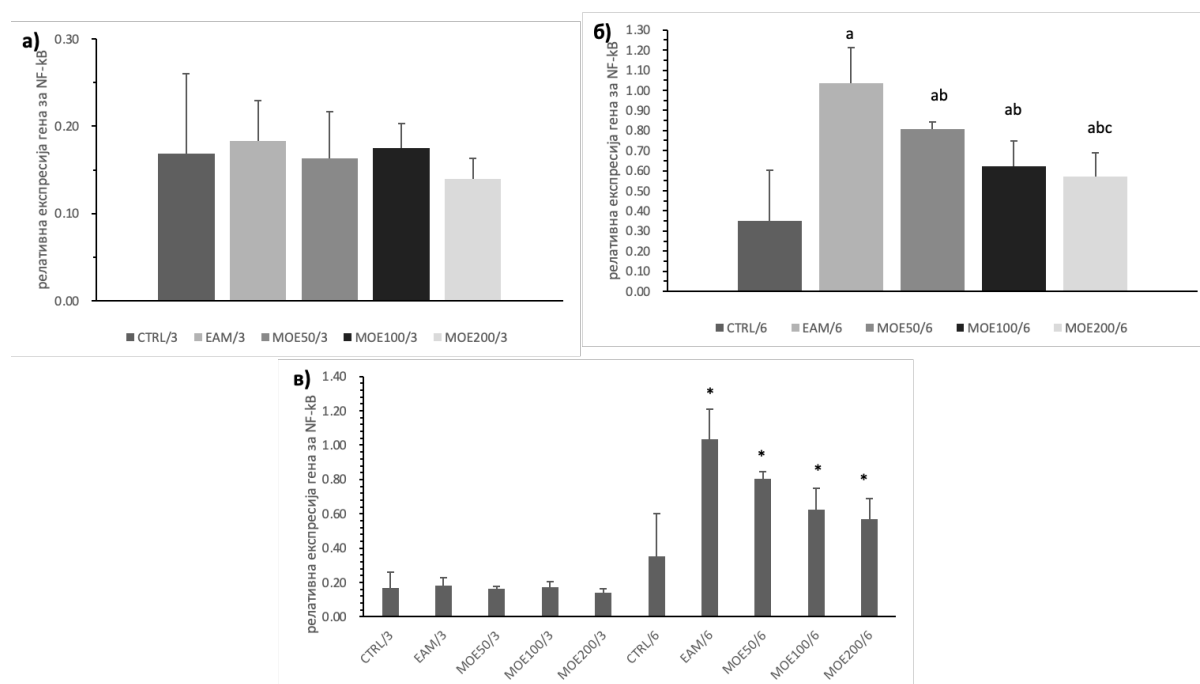


График 34. Ефекти МОЕ на релативну експресију гена за NF-κB у миокарду у ЕАМ моделу

а) протокол од 3 недеље; б) протокол од 6 недеља; в) поређење 3 недеље vs. 6 недеља. CTRL/3; CTRL/6 – здрави пацови подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; EAM/3; EAM/6- пацови са индукованим ЕАМ подвргнути протоколу од 3 или 6 недеља; MOE50/3; MOE50/6; MOE100/3; MOE100/6; MOE200/3; MOE200/6 - пацови са ЕАМ третирани са 50, 100 или 200 mg/kg етанолног екстракта матичњака током 3 или 6 недеља. ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p < 0.05$ у односу на CTRL групу; ^bу односу на EAM групу; ^cу односу на MOE50 групу; * између аналогних група подвргнутих протоколу од 3 или 6 недеља. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

Нису забележене значајне разлике у експресији NF-κB у миокарду међу групама подвргнутих тронедељном протоколу (**График 34а**; $p > 0,05$). Међутим, срца имунизованих нетретираних пацова ЕАМ/6 групе испољила су значајно вишу експресију NF-κB у односу на здрава CTRL/6 срца, док је 42-дневни третман

екстрактом матичњака у све три испитиване дозе успео да значајно редукује NF-κB експресију у односу на ЕАМ/6 (**График 34б**; $p=0,016$; $p=0,000$; $p=0,000$). Најприметније снижење NF-κB експресије уочено је у МОЕ200/6 групи у односу МОЕ50/6 групу (**График 34б** $p=0,010$). У срцима свих имунизованих животиња подвргнутих шестонедељном протоколу, како третираних, тако и нетретираних, измерена је значајно виша експресија гена за NF-κB у односу на аналогне групе подвргнуте краћем протоколу од три недеље (**График 34в**; $p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,000$).

5. ДИСКУСИЈА

5.1. Карактеризација испитиваних екстраката матичњака

5.1.1. Разлике у приносу испитиваних екстраката матичњака

Многи фактори утичу на ефикасност екстракције и принос добијеног биљног екстракта, а као главни фактори издвајају се: метод екстракције, температура, однос растварача и биљне дроге, дужина екстракције, састав и поларност растварача, као и притисак на ком се одвија екстракција (15). Међутим, вода, етанол и њихове комбинације у различитим односима, имају различит поларитет и вискозитет, па стога као растварачи интерагују са различитим природним једињењима, што се неизбежно одражава на биолошка својства припремљених екстраката (227). Управо због тога су вода и 70% етанол одабрани као растварачи за екстракцију матичњака у нашој студији, са циљем добијања оптималног састава и најизраженијег кардиопротективног потенцијала. У нашој студији, највећи принос добијен је екстракцијом водом као најполарнијим растварачем, под рефлуксом (26,8%; **Табела 6**), што је у складу са другим истраживањима водених МОЕ различитог порекла: из Немачке, Француске и Туниса (26,5-31%) (228). Коришћењем 70% етанола као растварача приноси су били знатно мањи и разликовали су се од примењене технике екстракције. Наиме, већи принос екстракта је добијен када је коришћена екстракција под рефлуксом (8,3%) него када је коришћена мацерација (1,5%; **Табела 6**), што се може објаснити чињеницом да се екстракција под рефлуксом растварача на тачки кључања сматра једном од најефикаснијих метода за изолацију антиоксидационих компоненти биљака (15, 229).

5.1.2. Разлике у фитохемијском саставу испитиваних екстраката матичњака

Подаци о укупном садржају фенола и флавоноида који су овде приказани (**Табела 7**) су у сагласју са резултатима других истраживачких група које су испитивале водене и етанолне МОЕ (64). Међутим, постоје и студије са другачијим запажањима. На пример, садржај фенола у етанолном мацерату у нашој студији ($73,39 \pm 6,25$ GAE/g CE; **Табела 7**) је значајно виши у односу на етанолни мацерат испитиван у публикацији *Safaiean* и сарадника, ($28,84 \pm 4,04$ GAE/g CE), највероватније услед различитог порекла МО (Иран) (93). Такође, услови мацерације (температура и трајање) могу утицати на садржај фенола. Ова тврдња је потврђена чињеницом да је у једном истраживању пронађено да етанолни (40%) мацерат екстрахује скоро троструко већу количину фенолних компоненти у односу на резултат ове студије ($73,39 \pm 6,25$ GAE/g CE vs. $191,75 \pm 29,76$ GAE/g CE). Међутим, наведени екстракт матичњака мацерован је на температури 30-35 °C током 24 часа и пореклом је из Техерана, за разлику од овдашњег где је коришћен 70% етанол и собна температура током 72 часа (230). У складу са другим истраживањима МОЕ, у испитиваним екстрактима смо детектовали фенолне киселине као што су розмаринска киселина (РА), *trans*-циметна, хлорогена, гална, ферулна, *p*-кумаринска и кафена киселина заједно са флавоноидом кверцетином (**Табела 8**). У овој студији, примењено је да је РА главно и најзаступљеније једињење у сва три испитивана МО екстракта, што је у складу са резултатима других истраживача (231). Највећи садржај РА забележен је у етанолном екстракту Е₃ (109,44 mg/g d.e.), док нижи садржај РА у воденом екстракту Е₂ (42,28 mg/g d.e.) може бити резултат њене веће растворљивости у етанолу него у води. Иако је укупни принос био највећи у воденом екстракту Е₂, утврђено је да је садржај РА највећи у Е₃ етанолном екстракту, што указује да је вода као растварач екстраховала и друге компоненте осим фенолних

(Табела 6 и Табела 8). Разлог томе може бити чињеница да вода као универзални поларни растварач екстрахује више баластних материја попут угљених хидрата и протеина него етанол, што се може приписати већој растворљивости протеина и угљених хидрата у води него у етанолу (232, 233). Поред РА, и остале фенолне киселине (*trans*-циметна, хлорогена, гална, ферулна, *p*-кумаринска и кафена киселина) су биле присутне у значајно вишој концентрацији у етанолним МОЕ Е₁ и Е₃, за разлику од воденог Е₂ (Табела 8).

Највећи садржај флавоноида пронађен је у воденом екстракту, док је најзаступљенија флавоноидна компонента заправо био кверцетин, са највећим садржајем у воденом екстракту Е₂ (Табела 8). Међутим, други аутори који су истраживали водени МОЕ нису детектовали кверцетин, већ друге флавоноиде као што су хесперетин, рутин, који нису били присутни у испитиваним МОЕ Е₁, Е₂ и Е₃ у нашој студији (234). Поред тога, за разлику од других студија које су забележиле присуство флавоноидних гликозида рутина и кверцитрина (14), ова једињења нису детектована у испитиваним екстрактима матичњака у овој студији.

Терпенска испарљива једињења су присутна у листу матичњака у склопу етарског уља, и сматрају се јако важним и одговорним за поједине биолошке активности ове биљке. Ова група једињења се циљано изолује приликом добијања етарског уља матичњака различитим методама. Иако наш циљ није био испитивати етарско уље матичњака, желели смо да истражимо да ли методе екстракције које смо користили могу изоловати и ове компоненте у одређеној мери, уз феноле и флавоноиде који су били примарни циљ. С обзиром да већина метода екстракције биљака растварачем подразумева и евапорацију истог на температурама преко 50 °С, у том кораку може доћи до испаравања терпенских једињења или њихове разградње оксидацијом, рацемизацијом или хидролизом. Стога, на пример, етанолни, метанолни, водени и други екстракти не садрже или врло мало садрже ове компоненте. Уколико се као метода користи мацерација на собној температури, могуће је екстраховати део ових једињења, нарочито ако се користе органски растварачи попут етра и хлороформа који успешно растварају липофилна угљоводонична терпенска једињења (229). У овом истраживању, испарљива терпенска једињења нису детектована гасно-масеном хроматографијом ни у једном од испитиваних екстраката матичњака (Слика 8). С обзиром да су водени екстракт Е₂ и етанолни Е₃ екстракт матичњака добијени екстракцијом под рефлуксом растварача, методом која подразумева примену температуре кључања растварача воде или етанола, 70 и 100 °С, потенцијално објашњење би било да су на овако високим температурама терпенска једињења испарила, те нису детектована у екстрактима. Са друге стране, што се тиче Е₁ етанолног мацерата матичњака, због спровођења мацерације на собној температури очекивало се и изоловање термолабилних компоненти (235), међутим ова једињења нису детектована.

5.1.3. Антиоксидациони ефекти испитиваних екстраката матичњака

МО је биљка која је врло добро позната у литератури по свом антиоксидационом деловању, које је описано и истражено у великом броју студија, како *in vitro*, тако и *in vivo* код различитих патологија посредованих оксидационим стресом (8, 62). Управо због тога, један од циљева био је процена капацитета испитиваних МОЕ за уклањање слободних радикала *in vitro*, али и *in vivo* након карагенинског теста едема шапице. Коришћењем базичног теста за процену антиоксидационе активности екстраката МО, DPPH, забележен је виши потенцијал неутрализације DPPH радикала E₂ и E₃ воденим и етанолним екстрактима добијеним под рефлуксом, у односу на E₁ етанолни мацерат МОЕ (Табела 10). Овај резултат може се објаснити разликама у методи екстракције, јер се сматра да екстракција под рефлуксом растварача боље изолује једињења одговорна за антиоксидациону активност. Ови налази корелирају са другим студијама где је такође потврђен одличан капацитет неутрализације DPPH радикала етанолним и воденим екстрактима МО добијеним под рефлуксом растварача (29, 68). Међутим, други истраживачи показали су значајно виши потенцијал неутрализације DPPH радикала у односу на наше екстракте највероватније услед различитог порекла биљке, Румунија (44).

Потенцијал истраживаних екстраката МО као "чистача" слободног радикала азот-моноксида (NO) је од великог значаја за опште здравље, јер се сматра да NO има кључну улогу у патофизиологији и прогресији многих болести и патологија повезаних са оксидационим стресом попут кардиоваскуларних болести (атеросклероза, исхемијско-реперфузиона повреда), метаболичке болести (дијабетес), неуро-дегенеративни поремећаји, старење и карциноми. У овој студији, показано је да водени E₂ и етанолни E₃ екстракти матичњака поседују капацитет уклањања NO *in vitro*, али и *in vivo* након карагенинског теста едема шапице, у виду смањења NO₂⁻, док E₁ етанолни мацерат МО није имао утицаја на NO₂⁻ *in vivo* након карагенинског теста, већ само *in vitro* (Табела 10 и График 16). Могући разлог оваквих резултата може бити повезан са разликама у саставу примењених екстраката. Наиме, с обзиром да је E₁ имао најнижи садржај кверцетина, за који је доказано да има повољан утицај на здравље механизмима екстрацелуларног уклањања NO и повећања интрацелуларне биолошке активности NO (236). Поред тога, у групама пацова третираним етанолним екстрактима матичњака E₁ и E₃ примећена је инхибиција липидне пероксидације, док је водени екстракт E₂ редуковао TBARS само у малим и средњим дозама (График 1в), вероватно због чињенице да флавоноиди као што је кверцетин, који је најзаступљенији у E₂, такође парадоксално могу деловати и прооксидантно и токсично у високим дозама (237). Резултати теста *in vitro* инхибиције липидне пероксидације корелирају са овим (Табела 10). Други аутори такође истичу кардиопротективни потенцијал етанолног (70%) МО мацерата у анималном моделу кардиотоксичности изазване доксорубицином механизмом смањења продукције малондиалдехида (MDA) и последичног ублажавања оксидационог стреса (69). Додатно, доказано је да водени МОЕ у дозама од 50, 100, 200 и 400 mg/kg снижавају ниво MDA у моделу едема шапе изазваног карагенином, док је у нашој студији запажено значајно смањење TBARS само у нижим дозама E₂50 и E₂100, али не и E₂200 mg/kg (79). Поред тога, сва три дозе екстракта МО смањила су формирање H₂O₂ *in vivo* (График 1а), што је у корелацији са претходним истраживањем које је открило протективни ефекат МО у моделу H₂O₂-индуковане токсичности на ћелијским линијама (93). Штавише, доказано је да водени и етанолни екстракти МО повећавају активност антиоксидационих ензима у различитим анималним моделима (238, 239). Додатно, налаз једне студије указује на то да водени

МОЕ у дозама од 100, 200 и 400 mg/kg повећава ниво редукованог GSH након апликације карагенина, што је у складу са резултатима ове студије (**График 2в** и **Табела 13**) (238). Додатно, у нашој студији није уочен ефекат МО екстракта на активност антиоксидационог ензима каталазе (CAT), што је супротно резултатима добијеним у другим студијама (**График 2б**). Од сва три екстракта једино је етанолни мацерат МО (E₁) повећао активност SOD (**График 2а**). Повећање активности SOD у E₁ групи може се приписати највећем садржају галне киселине (240).

5.1.4. Анти-инфламаторни ефекти испитиваних екстракта матичњака

Да би се темељно истражио терапеутски потенцијал испитиваних МО екстракта, још један специфичан циљ ове студије био је да се утврди њихов *in vivo* анти-инфламаторни потенцијал. У ту сврху користили смо анимални модел едема шапице изазван карагенином, који представља један од најчешће коришћених модела за одређивање антиинфламаторног потенцијала природних производа као што су биљни екстракти и етарска уља (241).

Формирање едема шапе након апликације карагенина описује се као двофазни инфламаторни догађај (241). Наиме, почетна рана фаза се јавља 0-2,5 часова након инјекције карагенина и повезује се са ослобађањем медијатора као што су хистамин, серотонин и леукотриени и повећаном васкуларном пермеабилношћу (78, 242). Леукоцити, ендотелне ћелије и сензорне нервне ћелије продукују још један медијатор азот-моноксид (NO) на месту запаљења (243). Друга фаза се дешава 2,5-6 часова након инјекције карагенина и приписује се ослобађању простагландина и проинфламаторних цитокина (IL-1 β , IL-6, IL-10 и TNF- α), што доводи до стварања едема заједно са накупљањем брадикинина и инфилтрацијом неутрофила. Сматра се да је пик експресије COX-2 један сат након локалне примене карагенина (243). Ово је у сагласју са нашим резултатима, наиме и у нашем истраживању је показано да 2. сат представља пик формирања едема у свим групама (**Табела 11**), што потврђује развој локалне и акутне инфламаторне реакције (244). Поред тога, у нашој студији етанолни мацерат E₁ у дози од 200 mg/kg, водени екстракт E₂ у дози од 100 mg/kg и 200 mg/kg и етанолни рефлукс E₃ у дозама од 50 и 100 mg/kg, су изазвали најизраженије смањење едема у шестом сату након карагенина. Такође, примећени ефекти екстракта зависе од времена, јер је најмања инхибиција едема шапе примећена у првим сатима, док се тек након истека 6. сата манифестује најизраженије смањење едема. Међутим, само највеће дозе E₁200 и E₂100 изазвале су сличан степен инхибиције едема шапе постигнут референтним леком индометацином.

Birdane и сарадници, који су испитивали *in vivo* анти-инфламаторни ефекат воденог МОЕ, користећи исти модел, показали су да водени МОЕ у свим дозама од 50, 100, 200 и 400 mg/kg значајно смањује инфламаторни одговор пет сати након инјекције карагенина (79). Међутим, у нашој студији је показано да само дозе од 100 и 200 mg/kg воденог екстракта E₂ смањују инфламаторни одговор, и да је то смањење најизраженије у шестом сату посматрања, након примене карагенина и слично дејству стандардном анти-инфламаторном леку индометацину (**Табела 11**). С обзиром да је мало података у литератури у вези са утицајем водених и етанолних МО екстракта на инфламацију у разматрање смо узели све релевантне студије које су се бавиле утицајем и другачијих типова екстракта матичњака на инфламацију. Једна од студија се бавила испитивањем антиинфламаторног потенцијала етарског уља МО (200 и 400 mg/kg). У овој студији је показан значајан антиинфламаторни потенцијал етарског уља МО (61,76% и 70,58% у шестом сату), смањење и инхибицију формирања едема шапе индуковане карагенином у раној и касној фази инфламације, при чему се сматра да је

највероватније за овај ефекат одговорна терпеноидна компонента цитрал (нерал и гераниал). Ова компонента доказано може инхибирати настанак TNF-алфа, међутим у екстрактима испитиваним у овој студији, та једињења нису откривена, јер су то оксигенисани испарљиви монотерпени присутни у етарском уљу матичњака (78). Поред тога, недавно је испитиван и *in vivo* антиинфламаторни потенцијал метанолног (70%) мацерата матичњака пореклом из Египта, коришћењем истог модела карагенином индукованог едема шапице пацова, при чему је показан одличан антиинфламаторни потенцијал. Добијени резултати показују да овај мацерат има сличан антиинфламаторни потенцијал као и лек диклофенак-натријуму, који је коришћен као стандард (80).

С обзиром на то да нема довољно података о механизмима антиинфламаторне активности МОЕ, уочени ефекат у нашој студији може се сматрати последицом синергистичког деловања присутних фенолних и флавоноидних компоненти. РА је главно и најзаступљеније једињење МОЕ, за које се зна да поседује плејотропна антиинфламаторна својства као што је смањење продукције проинфламаторних медијатора TNF- α и NF- κ B (62, 244). Поред тога, розмаринска киселина је тестирана и *per se* и доказано је да индукује смањење едема шапе индуковане карагенином за преко 60% у 6. сату, слично стндарду индометацину у дозно-зависном маниру, најбољи ефекат постигнут је у дози од 40 mg/kg (245, 246). Још једна компонента која је могла да допринесе смањењу едема шапе, посебно након примене воденог МО екстракта је флавоноид кверцетин и то путем инхибиције ензима циклооксигеназе (COX) и липоксигеназе (LOX) (247). Хлорогена киселина, такође присутна у испитиваном екстракту, може бити одговорна за антиинфламаторни ефекат вероватно због синергистичког ефекта различитих механизма као што је снажна инхибиција COX-2, заједно са јаким антиоксидационим дејством и снажном активацијом NF- κ B (248). Додатно, гална киселина, такође присутна у испитиваним екстрактима, поседује антиинфламаторно дејство преко неколико механизма који укључују MAPK и NF- κ B сигналне путеве, као и редукују ослобађања инфламаторних цитокина, хемокина, адхезионих молекула и смањену ћелијску инфилтрацију (249). Након екстензивне претраге литературе, може се рећи да је ова студија прва која се бави поређењем својстава водених и етанолних МОЕ, дајући нове информације о томе како различити поларни растварачи и тип екстракције утичу на биолошке активности МОЕ. До данас, не постоји довољно података о анти-инфламаторним својствима МОЕ у литератури, тако да ова студија може помоћи у расветљавању могућег механизма који интерферира са антиоксидационим деловањем. Међутим, додатна истраживања су неопходна како би се разјаснио тачан молекулски механизам овог ефекта.

5.2. Ефекти примене МОЕ на ублажавање ЕАМ и превенцију настанка и прогресију болести

5.2.1. Ефекти МОЕ на морфометријске, хемодинамске параметре и функцију срца у ЕАМ моделу

Експериментални аутоимунски миокардитис код пацова је повезан са тешким променама у архитектури миокарда, укључујући масивну инфилтрацију инфламаторних ћелија и поремећену срчану функцију, што за последицу може имати ремоделовање срца и настанак ДКМ у хроничној фази. ДКМ подразумева дилатацију вентрикула, што може пореметити систолну функцију (109). Као последица систолне дисфункције може доћи до неповратних оштећења влакана, фиброзе и на крају срчане инсуфицијенције, остављајући трансплантацију срца као једину терапијску опцију (129).

Морфометријски налази ове студије указују на увећање масе срца и слезине, Hw/Bw и Sw/Bw односа у групама нетретираних имунизованих пацова са ЕАМ у оба тренутка посматрања, и 21. и 42. дана (**Табела 14**). Оваква појава је карактеристична за ЕАМ модел, примећена је у више студија и омогућава потврду успешног индуковања ЕАМ код пацова (250, 251). Тронедељни третман високом дозом МОЕ (МОЕ200/3) смањило је масу срца, слезине, као и Hw/Bw и Sw/Bw , додатно и шестонедељни третман у све три дозе МОЕ (МОЕ50/6, МОЕ100/6, МОЕ200/6) постигао је исти ефекат (**Табела 14**). Увећање масе срца карактеристичан је налаз за ЕАМ индуковану инфламаторну дилатативну кардиомиопатију, док увећање слезине највероватније потиче од акумулације великог броја лимфоцита који се продукују у ЕАМ. Ехокардиографска мерења су имплицирала да је ЕАМ група 21. дана посматрања била повезана са озбиљним падом ејекционе фракције (EF), фракционог скраћења (FS) и задебљањем задњег зида леве коморе (LVPWd, LVPWs) (**Табела 16**). Заједно са морфометријским променама, тј. увећањем срца показано повишеним Hw/Bw односом, и повећањем површине попречног пресека и уздужног пречника кардиомиоцита код ЕАМ пацова, све наведено указује на поремећену морфологију леве коморе, смањену функцију срца и почетак карактеристичне ДКМ изазване ЕАМ (**Табеле 14 и 16; Графици 26 и 27**). Слични налази у погледу смањења FS и EF су карактеристични за ЕАМ модел и потврђени су и у другим студијама које су овај модел користиле (198, 252). Још један важан ехокардиографски налаз у нашој студији јесте задебљање задњег зида леве коморе, како у систоли, тако и у дијастоли 21. дана код ЕАМ/3 пацова (**Табела 16**), што уз увећану масу срца указује на хипертрофију миокарда, што је на мишевима потврђено у студији *Mirna* и сарадници. Они су показали да у првој недељи након имунизације долази до дилатације леве коморе, кроз повећање LVIDd и LVIDs док након 21. дана доминира задебљање задњег зида леве коморе у складу са нашим резултатом. Додатно, након 3 недеље пронашли смо да та хипертрофија потиче од повећаног и уздужног и попречног дијаметра кардиомиоцита, али такође можемо хипотетисати да задебљање зида делимично може бити и последица инфламаторног инфилтрата и едема јер *Mirna* и сарадници нису пронашли разлику у попречном пресеку кардиомиоцита између ЕАМ и здравих животиња (140, 253). У прилог томе иде и чињеница да хистолошки квантификован масивни инфламаторни инфилтрат у ЕАМ групи заправо корелира с LVPW и тежином миокардитиса (**Табела 16; График 25; Слика 10**). Тронедељни МОЕ третман, нарочито у средњој и високој дози, је успео да побољша функцију и морфологију миокарда нормализацијом вредности EF, FS и

смањењем дебљине зида леве коморе, уз смањење површине и дужине кардиомиоцита и масе срца те је на тај начин спречио ремоделовање леве коморе и прогресију до ДКМ и могуће срчане инсуфицијенције након миокардитиса. Занимљиво, када смо спровели ехокардиографско мерење 42. дана од имунизације, у ЕАМ групи смо такође забележили пад EF, FS у односу на здраве животиње, међутим не у толикој мери као 21. дана, затим дилатацију леве коморе кроз повећање LVIDs LVIDd, и такође задебљање задњег зида леве коморе LVPWs LVPWd, што указује на постојање и хипертрофије и дилатације леве коморе и смањене функције миокарда карактеристично за хроничну фазу ЕАМ (**Табеле 16 и 17; Графици 3, 5 и 6**). Овакав ехокардиографски налаз у хроничној фази ЕАМ 42. дана од имунизације, потврдили су и Shimada и коаутори, који су такође указали на нарушену функцију миокарда кроз смањење FS и EF, и повећање LVID и LVPW код ЕАМ мишева (254). Шестонедељни третман МОЕ није утицао на EF и FS, али је смањио унутрашње димензије леве коморе (LVIDs, LVIDd) у највишој дози МОЕ200/6, као и дебљину задњег зида леве коморе у средњој и високој дози (МОЕ100/6 и МОЕ200/6; **Табела 17**), што може бити последица антиинфламаторног и антиоксидационог ефекта ове биљке, детаљно објашњеним у наредним поглављима. Такође када упоредимо акутну у хроничну фазу ЕАМ, интересантно је да су EF и FS 42. дана порасли у односу на 21. дан, као и унутрашња димензија леве коморе и у систоли и у дијастоли, а дебљина задњег зида је перзистирала. Ово указује на ремоделовање миокарда у погледу дилатације и хипертрофије миокарда, док благо побољшана EF може бити повезана за резолуцијом инфламације и доминантном фиброзом и стварањем ожиљног ткива у миокарду у хроничној фази. Додатно, једно истраживање је показало да у хроничној фази ЕАМ 35. дана долази до благог опоравка EF у односу на 21. дан, али наравно не до нивоа базалних вредности, што корелира са нашим резултатима. При том, ова студија је користила исти ЕАМ протокол као у нашој студији (имунизациона доза миозина 0,25 mg) што је чини још компарабилнијом (255). Додатно, постоје докази да се код мишева са ЕАМ у хроничној фази (56. дана од имунизације) побољшава EF у односу на 21. дан ЕАМ, при чему аутори ове студије сматрају да се због пика инфламације у 21. дану, тада највише испољавају и промене у функцији срца, док касније са резолуцијом инфламације коју замењује фиброза, функција се може побољшати (256). Побољшање FS је показано и 42. дана од имунизације као у овој студији (257).

Три недеље након имунизације пацова, нисмо приметили значајне промене систолног и дијастолног крвног притиска између ЕАМ и здравих животиња (**Табела 15**), што је у складу са налазима студија које је такође користила ЕАМ модел на пацовима и 21-дневни протокол (258). Међутим, други аутори су пак показали да ЕАМ животиње имају смањен SBP у односу на контролну групу, супротно нашим налазима у тронедељном протоколу (251, 259, 260). Ова минорна разлика може потицати и од разлика међу сојевима пацова, *Lewis* и *Dark Agouti* које смо у овој студији користили, или пак друге имунизационе дозе миозина коришћене за индукцију ЕАМ. Када говоримо о примени МОЕ код пацова са ЕАМ, можемо приметити да је једино висока доза МОЕ200 показала хипотензивни ефекат у односу на ЕАМ/3 групу (**Табела 15**), што се може објаснити претходно описаним вазорелаксантним ефектом МОЕ кроз блокаду Ca^{2+} , азот-моноксид-зависног пута, али и путеве простаглицина и EDHF (91, 92). Међутим, након 6 недеља измерени систолни крвни притисак у ЕАМ групи пацова био је значајно нижи у односу на све остале групе, као и у односу на ЕАМ животиње након 3 недеље праћења, док је МОЕ третман у свим дозама повратио SBP вредности на вредности сличне контролним (**Табела 15**). Клиничке студије истичу да је снижен SBP код пацијената са суспектним миокардитисом предиктор лошег исхода и настанка ДКМ и срчане инсуфицијенције, што је у нашој студији такође и потврђено – низак SBP

био је повезан и са сниженом EF, FS и дилатацијом леве коморе у ЕАМ/6 групи (Табеле 15 и 17) (134). Неке студије сугеришу да је код акутно декомпензоване хроничне срчане инсуфицијенције, регрутовање контрактилне резерве неопходно за одржавање крвног притиска, док пацијенти са адекватним SBP најчешће имају очуване компензаторне механизме и стога би могли бити мање погођени делимично одржаваном контрактилном резервом. Хипотетички, ово би требало да важи и за пацијенте са суспектним миокардитисом (134). Штавише, ЕАМ животиње имале су значајно повећану срчану фреквенцу у односу на здраве животиње, нарочито у тронедељном протоколу. Овај резултат је конзистентан са студијом где је испитивана примена куркумина на ублажавање ЕАМ (135, 136). Међутим, важно је напоменути да је срчана фреквенца варијабилна у патологији миокардитиса, па нека клиничка истраживања истичу могућност настанка и тахиаритмија и брадиаритмија код пацијената са миокардитисом (261). Број откуцаја срца у ЕАМ након 3 недеље је значајно смањен МОЕ третманом у све три дозе (Табела 15), и овај негативни хронотропни ефекат МОЕ може се приписати доказаној способности МО да делује као антиаритмички агенс путем активације мускаринских M2 рецептора у срцу, блокаде Ca²⁺ и K⁺ канала и успоравањем вентрикуларне проводљивости (86, 88). Вредности HR биле су више код ЕАМ пацова у акутној фази у односу на хроничну, што се може објаснити смањеном функцијом срца као пумпе у хроничној фази услед последица фиброзе и настанка ДКМ. Међутим, ипак МОЕ третман током 6 недеља није индуковао промене HR у односу на ЕАМ (Табела 15).

5.2.2. Ефекти МОЕ на биохемијске параметре срчаног оштећења

Серумске концентрације стандардних биохемијских параметра срчаног оштећења СК-МВ, TnI и TnT су такође процењиване у овој студији. Резултати су показали повећану концентрацију сва три маркера у ЕАМ групи 21. дана од имунизације, док је 42. дана перзистирао повишен ниво TnI и TnT, али не и СК-МВ (Графици 7, 8 и 9) (262). Клиничко истраживање показало је да повишен ниво TnI може бити користан предиктивни маркер инфламаторне болести срца неисхемијског порекла у комбинацији са повишеним CRP.

Повишен ниво TnT код пацова са ЕАМ 21. дана од имунизације пронашли су и други аутори (182, 250), а такође је и на мишевима потврђен повишен ниво TnI 21. дана од имунизације (263) када се сматра да је оштећење миокарда инфламацијом највеће. Још пре скоро три деценије, научници су испитивали динамику ослобађања срчаних ензима СК-МВ и TnT у ЕАМ моделу на мишевима и дошли до закључка да се циркулишући ниво ова два маркера мења кроз ток болести. Наиме, у овој студији је показано да је највећа сензитивност ових маркера 16-21 дана од имунизације, када је оштећење миокарда некрозом и инфламацијом најјаче, да би након 23. дана ниво ових маркера опао у сермуму услед фиброзе која замењује инфламацију у хроничној фази. Додатно, аутори сугеришу да је TnT сензитивнији маркер оштећења миокарда инфламацијом у односу на СК-МВ (264). Наши резултати корелирају с овим тврдњама, с обзиром да су нивои и СК-МВ и TnT опали у хроничној фази ЕАМ 42. дана посматрања (Графици 7 и 8). Такође, потврђен је значајан пораст СК-МВ у ЕАМ моделу и на другом соју пацова *Sprague Dawley*, након 3 недеље од имунизације миозином, као у овој студији (203). Само тронедељни МОЕ третман је индуковао значајан пад нивоа СК-МВ, TnT, и минорно смањење TnI у све три дозе (МОЕ50/3; МОЕ100/3; МОЕ200/3) у односу на нетретиране ЕАМ/3 пацове, без примећених дозно-зависних ефеката. Супротно, шестонедељни третман МОЕ није утицао на ниво СК-МВ, TnT и TnI, ни у једној од примећених доза (Графици 7, 8 и 9). Иако не постоје

докази о ефектима ове биљке у инфламаторним болестима срца, доказано је да 14-дневна примена МОЕ у дозама од 50 и 100 mg/kg може смањити ниво циркулишућег TnI код пацова подргнутих LAD-индукованом И/Р повреди миокарда, при чему се ублажавање оштећења миокарда постигнуто МОЕ такође објашњава њеним потентним антиоксидационим и антиинфламаторним својствима (70).

5.2.3. Ефекти МОЕ на системски оксидациони стрес у ЕАМ моделу

Важан аспект у патофизиологији аутоимунског миокардитиса је веза између инфламације и прекомерне производње реактивних врста кисеоника и азота, односно оксидационог стреса, што је такође био предмет проучавања у овој студији. РОС и РНС не само да учествују у убијању патогена, већ посредују и у преносу сигнала у путевима који се активирају као одговор на стрес, а уско су повезани и са урођеним и са стеченим имунитетом. Оксидациони стрес који настаје у стању тешке инфламације додатно погоршава инфламацију и оштећује ткиво миокарда и посредује у прогресији ЕАМ до ДКМ (169). Три недеље након имунизације, у ЕАМ групи забележено је значајно повећање производње прооксиданаса O_2^- , NO_2^- и TBARS, без промена у нивоу H_2O_2 , и смањен антиоксидациони капацитет (смањена активност SOD и CAT и ниво GSH) (Графици 10-16). Ово је у складу са ранијим студијама које су пријавиле пораст нивоа различитих маркера оксидационог стреса у овој болести, као што су супероксид анјон радикал (265), производи липидне пероксидације малондиалдехид и 4-хидроксиноненал и TBARS (266, 267). Чак и код ЕАМ индукованог липополисахаридом, забележена је повишена продукција O_2^- дихидроетидијум бојењем, као и појачано ослобађање производа липидне пероксидације, што се повезује са појачаним инфламаторним одговором и прогресијом ЕАМ до ДКМ, слично нашим резултатима (Графици 10 и 13) (266). Додатно, постоје и докази о прекомерној продукцији NO, као и нитротирозина који представља индикатор ослобађања токсичних пероксинитрита, у ЕАМ моделу. Наиме, вишак NO који производи индуцибилна NO синтаза (iNOS) као одговор на повишене концентрације проинфламаторних цитокина може бити цитотоксичан за ткиво миокарда у ЕАМ и допринети погоршању и прогресији болести (268). У овој студији такође је пронађен повишен ниво нитрита тј. индиректно мереног NO, међутим ослобађање пероксинитрита није мерено. МОЕ третман током 3 недеље значајно је смањео ниво NO_2^- у све три испитиване дозе, док у хроничној фази није било разлика између група у нивоу NO_2^- (График 12). Третман МОЕ током 3 недеље довео је до дозно-зависног пада ослобађања прооксиданаса O_2^- , NO_2^- и TBARS (Графици 10а, 12а и 13а), што се може објаснити великим антиоксидационим потенцијалом ове биљке и њених фенолних компоненти. Додатно, у складу са овим је и резултат *in vitro* антиоксидативне способности МОЕ против NO радикала (Табела 10). Различите студије су показале способност МОЕ да смање оксидациони стрес у различитим кардиоваскуларним моделима, чак и у случају краће експозиције МОЕ (7 или 14 дана) него у овој студији (70, 72, 266). Додатно, повећана стопа липидне пероксидације мерена у виду TBARS у овој студији потврђена је и у акутној и хроничној фази ЕАМ (График 13), уз смањен ниво GSH (График 16) који је недовољан да неутралише продукте липидне пероксидације у ЕАМ. Ови налази су потврђени у ЕАМ патологији и у другим студијама, где је опсервиран значајан пораст ослобађања TBARS и MDA (269). Способност МОЕ да инхибира липидну пероксидацију потврђена је *in vitro*, али и *in vivo* у моделу изопротеренолом индукованог инфаркта миокарда (72), затим у LAD моделу исхемије миокарда (70), као и у моделу доксорубицином индуковане кардиотоксичности (69). Прекомерна производња РОС, као што је супероксид анјон

радикал, индукована инфламаторним стимулусима се често среће код срчане слабости, док код аутоимунски посредоване срчане инсуфицијенције РОС заправо индукују оштећење миокарда. Оксидациони стрес оштећује готово све биомолекуле, преваходно ДНК и протеине, и интерферира са инфламацијом и апоптозом кардиомиоцита у ЕАМ. Чак и у хроничној фази ЕАМ, ДКМ, параметри оксидационог стреса могу бити повишени (268). Наиме, постојање оксидационог стреса доказано је код пост-ЕАМ пацова са ДКМ (8 недеља након индукције ЕАМ), кроз екстензивно бојење O_2^- *in situ* у ткиву миокарда, дихидроетидијум бојењем као и повећаном експресијом NADPH оксидазе подјединица р67phox миокарда (265). NADPH оксидаза катализује пренос електрона са NADPH на молекуларни кисеоник при чему настају РОС (H_2O_2 и O_2^-), а њихова повишена експресија повезује се кардиоваскуларним патологијама укључујући и хипертрофију миокарда и срчану слабост (270). Ови резултати корелирају са нашим налазима повишене концентрације H_2O_2 и O_2^- у хроничној фази ЕАМ, након 6 недеља праћења. Резултати ове студије показали су да МОЕ третман у све три испитиване дозе значајно смањује ниво ова два прооксиданса без дозно-зависног ефекта (**Графици 10б и 11б**), што се може приписати јаком антиоксидационом дејству његове главне флавоноидне компоненте кверцетину чија је примена индуковала смањење продукције O_2^- у миокарду и смањење експресије NADPH оксидазе подјединица р67phox код пацова у хроничној фази ЕАМ (265). Открили смо да МОЕ третман побољшава системски антиоксидативни статус ЕАМ пацова кроз значајно повећање активности антиоксидационих ензима SOD, CAT као и нивоа редукованог GSH, у акутној и хроничној фази ЕАМ. Међутим, важно је напоменути да је примећено дозно-зависно повећање SOD и CAT ензима након 3 недеље примене МОЕ у све три дозе, док у хроничном протоколу тренд дозне-зависности не постоји већ су све три дозе МОЕ повећале активност ових антиоксидационих ензима без међусобних разлика (**Графици 14 и 15**). С друге стране, једино средња и висока доза МОЕ су индуковале повећање нивоа GSH код ЕАМ пацова, у оба посматрана протокола (**График 16**). МОЕ третман у све три испитиване дозе је поред повећања системског нивоа SOD, индуковао и повећање експресије SOD1 и SOD2 гена локално у миокарду у хроничној фази аутоимунског миокардитиса, при чему се издваја најупечатљивији пораста ових двају маркера у највишој дози МОЕ од 200 mg/kg (**Графици 31б и 32б**). SOD представљају металопротеине који катализују трансформацију супероксидног анјона (O_2^-) у водоник пероксид (H_2O_2), и уједно се сматрају најефикаснијим антиоксидационим ензимима код људи. Управо детоксикацијом O_2^- , SOD инхибирају његову реакцију са NO и последично стварање токсичних пероксинитрита ($ONOO^-$). Постоје три изоформе SOD ензима различите субћелијске локализације: цитосолна SOD1, митохондријска SOD2 и екстрацелуларна SOD3. У литератури је описана улога SOD у различитим кардиоваскуларним болестима. Тако, на пример, инхибиција експресије SOD2 изазива митохондријски оксидациони стрес и хипертрофију кардиомиоцита, што корелира и са нашим налазима јер је у ЕАМ групи пацова након 6 недеља праћења измерена смањена експресија митохондријског SOD2 гена уз функционалне промене које указују на ДКМ (271, 272). Штавише, друге студије показале су да мишеви са недостатком SOD2 умиру од кардиомиопатије у року од 10 дана од рођења, док хетерозиготни SOD2 (+/-) мишеви показују структурно оштећење миокарда и митохондрија, индуковано повећаним оксидационим стресом, као и активацијом сигналних путева укључених у апоптозу у срцу (273), што је такође потврђено у овој студији. Резултати других студија подржавају наше налазе, с обзиром да постоје докази да МОЕ могу побољшати антиоксидациони капацитет, углавном преко повећања активности SOD у моделима LAD *in vivo* регионалне И/Р повреде и доксорубицином индуковане

кардиотоксичности. Поред тога, постоје докази *in vitro* испитивања МОЕ која су потврдила његова снажна својства уклањања слободних радикала попут DPPH, ABTS, O_2^- и NO_2^- радикала, али и активност хелата гвожђа (II) која потенцира његова антиоксидативна својства (69). Поред наведених антиоксидационих ефеката МОЕ, важно је нагласити да розмаринска киселина, доминантна фенолна компонента ове биљке, сама по себи има снажан ефекат у ублажавању оксидационог стреса код различитих поремећаја (274). Антиоксидациона моћ розмаринске киселине углавном се заснива на њеној способности да стабилизује мембране и заустави кретање слободних радикала, чиме се спречава оксидација мембрана (275). Поред SOD, третман МОЕ успео је да повећа активност CAT и концентрацију редукованог GSH, чија је активност компромитована у ЕАМ, како у акутној, тако и хроничној фази. Редуковани глутатион је „чистач“ РОС који има вишеструку улогу, инхибира пероксидацију липида, а такође има улогу у детоксикацији водоник пероксида глутатион пероксидазама. Постоје докази да је функција овог антиоксидационог система угрожена у срцима животиња са ДКМ, али и код пацијената са ДКМ (276), где претерана продукција РОС (повишени нивои H_2O_2 , TBARS, O_2^-) превазилази капацитете GSH, што се карактерише једним општим прооксидантним стањем и у хроничној фази ЕАМ, што смо нашим налазима и потврдили (**Графици 106, 116, 136 и 166**). Иако ефекти МО на активност антиоксидационих ензима у миокардитису нису до сада испитани, постоје докази да МО може појачати антиоксидациони одбрамбени систем организма у другим кардиоваскуларним болестима, што корелира са нашим резултатима. Недавна студија је показала да је шестонедељна примена етанолног МОЕ у моделу кардиотоксичности индуковане блеомицином индуковала значајан пораст активности CAT и концентрације GSH, међутим коришћена доза МОЕ (450 mg/kg) била је значајно виша него у нашој студији (277). Ово је потврђено и у моделу доксорубицином индуковане кардиотоксичности, где је свега 10 дана примене етанолног мацерата МОЕ побољшало SOD и CAT активност у дози од 750 mg/kg (69). С друге стране, двонедељна примена нижих доза МОЕ 25 и 50 mg/kg нису утицале на ниво SOD, CAT и Gpx у миокарду животиња подвргнутих регионалној исхемији миокарда, док је доза од 100 mg/kg повећала активност SOD 5 дана након реперфузије (70).

5.2.4. Ефекти МОЕ на параметре инфламације у ЕАМ моделу

Узевши у обзир патогенезу аутоимунског миокардитиса (**Поглавље 1.2.6.**), један од главних циљева овог истраживања био је евалуирати антиинфламаторна својства МОЕ у ЕАМ моделу, као и објаснити механизам антиинфламаторног дејства тј. како МОЕ утиче на аспекте Th1, Th2 и Th17 имунског одговора.

Првенствено, анализирали смо ниво CRP, општег маркера инфламације акутне фазе и уочили значајан пораст овог маркера у акутној фази 21. дана, када се сматра да постоји пик инфламације, док је 42. дана ниво CRP-а био сличан међу свим испитиваним групама (**График 17а и 17б**). Тронедељни третман МОЕ индуковао је значајно снижење CRP-а у све три дозе, при чему је снижење било изразитије у групама МОЕ200/3 и МОЕ100/3 (**График 17а**). Наравно, повишене вредности CRP корелирају са откривањем инфламације патохистолошки, и врло често, према неким ауторима, корелирају и са повишеним вредностима тропонина, као у нашој студији (**Графици 8, 9, 17 и Слика 10**). Иако је у студијама потврђено да је CRP-а виши у групи пацијената са неисхемијском срчаном слабошћу и инфламацијом миокарда потврђеном биопсијом (миокардитисом) него код пацијената са неисхемијским оштећењем миокарда без потврде инфламације ткива, морамо напоменути да је сензитивност hsCRP у

постављању дијагнозе миокардитиса свега 50,1%, док је специфичност 80,7%. Разлог овоме јесте да су повишене вредности CRP присутне и код исхемијских болести срца, акутног инфаркта миокарда или код реуматске болести валвула, те је важно тумачити ниво CRP искључиво заједно са срчаним тропонином. Штавише, према неким студијама, сматра се да су граничне вредности за TnI и CRP код миокардитиса више у поређењу са граничним вредностима које се користе за дијагнозу акутног коронарног синдрома (262, 278).

Као што је и објашњено у **Поглављу 1.2.6.** баланс између продукције Th1 и Th2 цитокина, као и Th17, утичу на исход болести. Током почетне прогресивне фазе акутног миокардитиса доминирају Th1 ћелије и проинфламаторни цитокини IL-1, IL-6 TNF- α и достиже се пик инфламације, док касније у хроничној фази или фази опоравка доминирају Th2 цитокини IL-4, IL-10 и IL-13 и фиброзне промене. Велики број претклиничких и клиничких студија истиче штетну улогу проинфламаторних цитокина у патогенези кардиоваскуларних болести и активацији аутоимунског одговора код миокардитиса. Нивои циркулишућих проинфламаторних цитокина IL-1, IL-6 и TNF- α као и експресија гена који кодирају продукцију ових цитокина у миокарда су повишени у ЕАМ моделу, показано у више истраживања (197-199). Чак се сугерише да степен експресије ових цитокина корелира са озбиљношћу болести, тј. да њихова прекомерна производња може довести до погоршања болести (251, 279). У овој студији показан је повишен ниво цитокина IL-1, IL-6 и TNF- α у ЕАМ групи пацова након 3 недеље у акутној фази, док је третман МОЕ успео да снизи нивое сва три наведена маркера инфламације. Међутим, иако су све три дозе МОЕ снизиле нивое ових цитокина након 3 недеље, само у случају IL-1 и TNF- α су ефекти дозно-зависни (**Графици 18а, 19а, 20а**). Антиинфламаторна својства МОЕ у миокарду су већ показана у другим кардиоваскуларним анималним моделима, па тако постоје докази да примена смањује продукцију проинфламаторног цитокина TNF- α у срцу у моделу доксорубицином индуковане кардиотоксичности (69). С друге стране, важне компоненте МОЕ, кверцетин и хлорогена киселина, самостално примењене у ЕАМ моделу доводе до смањења продукције ових проинфламаторних Th1 цитокина IL-1, IL-6 TNF- α , те препостављамо да могу бити одговорне за постигнут ефекат МОЕ у овој студији (197, 199). Међутим, интересантно је да су значајно повишени нивои IL-6 и TNF- α , и благо повишен IL-1 перзистирали и након 6 недеља посматрања (**Графици 18б, 19б и 20б**). Разлог овоме може бити чињеница да Th1 цитокини IL-1 и IL-6 продуктовани од стране моноцита имају и додатну улогу, а то је да могу индуковати продукцију IL-17 од стране меморијских или наивних Т-лимфоцита. Једно истраживање је управо показало да је код хуманог миокардитиса и ДКМ повишен ниво Th17 субпопулације Т-лимфоцита повезан са повишеним нивоом проинфламаторних цитокина IL-17, IL-6 и IL-23, а смањеном функцијом и нивоом T_{reg} (145).

Фактор некрозе тумора-алфа (TNF- α) је опште познат проинфламаторни цитокин који има кључну улогу у патолошким процесима болести срца, а нарочито срчане инсуфицијенције. Још 90-их година XX века, показана је позитивна корелација између нивоа TNF- α у циркулацији и степена срчане инсуфицијенције, односно да је повишен ниво TNF- α независни предиктор морталитета код ових пацијената (280-282). Додатно, хронично повишен ниво овог цитокина повезује се са прогресивним ремоделовањем леве коморе, хипертрофијом, последичном дисфункцијом и кардиомиопатијом (283). Наши налази корелирају са овим тврдњама, с обзиром да је повишен ниво TNF- α перзистирао и у хроничној фази ЕАМ (**График 20**), где је потврђена хемодинамски и патохистолошки дисфункција, ремоделовање миокарда и постојање ДКМ. Додатно, наши резултати показали су да је ДКМ настала у хроничној фази ЕАМ праћена повећаним нивоом TNF- α , али и апоптозом (појачана експресија Вах; **Графици 20б и**

296). У складу са овим налазима је чињеница да TNF- α индукује апоптозу кардиомиоцита комплексним механизмом. Један од могућих начина којим TNF- α испољава проапоптотско дејство јесте да након везивања за TNF рецептор покреће интрацелуларну сигналну трансдукцију преко MAPK и NF- κ B сигналних путева. Активација NF- κ B (повишена експресија у миокарду у ЕАМ/6 групи) повезује се са TNF- α -индукованом апоптозом (повишен ниво TNF- α и Вах у ЕАМ/6 групи) и патолошким ремоделовањем миокарда у хроничној фази ЕАМ (**Графици 206, 296 и 346**). Међутим, МОЕ третман није смањио концентрацију TNF- α у плазми у хроничној фази ЕАМ, осим у највишој дози МОЕ200/6, те можемо спекулисати да антиапоптотско дејство МОЕ није нужно посредовано TNF супресијом, већ на првом месту антиоксидационим ефектом тј. смањењем продукције ROS.

NF- κ B је транскрипциони фактор јако важне функције у миокарду, јер регулише низ гена који учествују у есенцијалним физиолошким процесима попут преживљавања ћелија, инфламације и имунског одговора. Његова улога у срцу је контроверзна, јер постоје докази и о протективном дејству ране активације NF- κ B код акутне краткотрајне хипоксије миокарда, али и томе да хронична активација NF- κ B доприноси оштећењу миокарда и развоју срчане слабости. Заправо, трајна активација NF- κ B покреће сигналне путеве који доводе до хроничне инфламације кроз повећање продукције TNF- α , што за последицу доводи до смрти ћелије. TNF- α активира канонски NF- κ B сигнални пут преко p50 подјединице, што је показано у анималној студији где су мишеви са дефицијенцијом p50 подјединице NF- κ B имали побољшану срчану функцију након инфаркта миокарда тј. били резистентни на TNF- α индуковану кардиомиопатију (284). Додатно, бројни циљни гени NF- κ B су проинфламаторни, укључујући и IL-1 и IL-6, чији смо ниво такође процењивали у овој студији. Истраживања су показала да хроничном инхибицијом NF- κ B сигнализације код мишева, долази до смањеног лучења проинфламаторних цитокина (IL-1 β , IL-6 и TNF- α) и смањеног нивоа апоптозе, а самим тим и смањења морталитета од срчане инсуфицијенције (285). Наши налази подржавају хипотезу да хронична активација NF- κ B сигнализације (повишена експресија NF- κ B гена у миокарду ЕАМ/6 пацова;) резултује хроничним инфламаторним стањем и смрћу кардиомиоцита апоптозом и прогресијом ка ДКМ и срчаној инсуфицијенцији, док је МОЕ третман у све три испитиване дозе успео да ублажи ове ефекте на дозно-зависни начин, уз најизраженије смањење експресије NF- κ B у МОЕ200/6 групи (**График 346**).

Регулаторни Т-лимфоцити јесу специфична популација Т-лимфоцита, одговорна за имунолошку хомеостазу и толеранцију, као и ограничавање аутоимунске активације у ЕАМ. T_{reg} делују имуносупресивно преко различитих механизма укључујући и продукцију IL-10 и TGF- β чији смо ниво у серуму мерили. IL-10, као снажан антиинфламаторни Th2 цитокин такође снажно деактивира моноците и супримира продукцију различитих проинфламаторних медијатора и активацију Th1 ћелија. Наши резултати показали су значајно нижи ниво IL-10 код ЕАМ животиња, у односу на здраве пацове без обзира на дужину трајања болести, 3 или 6 недеља (**График 22**). Овакав је налаз је очекиван и потврђен у студијама које су користиле ЕАМ модел (199, 202, 203). Међутим, неке студије сугеришу да је учешће IL-10 важније у хроничној фази ЕАМ, што пак овде није потврђено јер су измерени слични нивои овог цитокина у акутној и хроничној фази ЕАМ (286). Тронедельни третман МОЕ је само у највишој дози (МОЕ200/3) индуковао значајан пораст концентрације антиинфламаторног IL-10 у серуму ЕАМ пацова, док је суплементација МОЕ током 6 недеља индуковала пораст IL-10 нивоа у хроничној фази, без обзира на примењену дозу (МОЕ50/6, МОЕ100/6, МОЕ200/6). Пад IL-10 у хроничној фази ЕАМ/6 пацова био је праћен и повишеним нивоом TGF- β , док је хронична примена МОЕ у све три дозе (МОЕ50/6, МОЕ100/6,

МОЕ200/6) смањила продукцију TGF- β и повећала IL-10 продукцију без међусобних разлика, што указује на потентна имуномодулаторна својства МОЕ да ублажи последице ЕАМ и прогресију до ДКМ кроз превенцију ремоделовања миокарда (смањење TGF- β и синтезе колагена) као и подстицањем природних механизма за имunosупресију у условима ауотимунске активације (повећање IL-10 указује на активацију T_{reg}). Да би се испитао ефекат МОЕ на Th2 имунски одговор у ЕАМ, поред IL-10, мерили смо и ниво проинфламаторног Th2 цитокина IL-4. Сматра се да је IL-4 ефектор Th2 ћелија и да је јако важан у активацији и регрутовању еозинофила и продубљивању инфламације, који такође инфилтрирају миокард у ЕАМ, што смо хистолошки и потврдили јер је инстерстицијум миокарда ЕАМ пацова био испуњен и еозинофилима. Ово корелира и са измереним повишеним нивоом IL-4 код ЕАМ животиња, и у акутној и у хроничној фази што су и други аутори већ потврдили. Међутим, МОЕ суплементација је такође успела да снизи IL-4 ниво код ЕАМ животиња, без обзира на трајање болести и примењену дозу. Наиме шестонедељни третман МОЕ у све три дозе је снизио IL-4 ниво, без разлика у зависности од дозе, док је у акутном протоколу смањење нивоа IL-4 постигнуто само ниском и средњом дозом МОЕ (**График 21**). Постигнути ефекти МОЕ на снижење IL-4 указују на могућност ове биљке да модулира Th2 одговор у ЕАМ. Међутим, не постоје доступни подаци за поређење који су испитивали утицај МОЕ на Th2 имунски одговор. Свакако, розмаринска киселина као главна компонента засигурно је допринела постигнутим ефектима МОЕ јер постоје докази да примена ове киселине код алергијских болести смањује продукцију Th2 цитокина IL-4 и IL-13, као и број еозинофила (287, 288). Додатно, доказано је и да флавоноид МОЕ кверцетин такође може модулирати Th2 одговор код алергијских болести смањењем IL-4. Поред тога, одређени фитоконституенси МОЕ попут кверцетина, апигенина, розмаринске киселине, олеанолне и хлорогене киселине су већ испитивани у ЕАМ моделу, где је показано њихово антиинфламаторно дејство кроз повећање нивоа IL-10 системски или локално у миокарду, што објашњава и могућност МОЕ да утиче на ниво овог цитокина у ЕАМ (197, 199, 201). *De facto* је улога Th2 у ЕАМ патологији од великог значаја, јер су *Peng et al.* показали узрочно-последичну везу између хронично повишених нивоа IL-4 и срчане фиброзе, што корелира и са нашим резултатима (289).

Важност Th17 лимфоцита у патогенези аутоимунског миокардитиса је истакнута од стране многих аутора (167, 168, 290). Сматра се да је Th17/T_{reg} однос од круцијалног значаја за прогресију миокардитиса до ДКМ. Системска концентрација, као и локална експресија у миокарду главног ефекторног Th17 цитокина IL-17 је стога процењена у нашој студији. Занимљиво, ниво IL-17 у серуму био је повишен како у акутној, тако и у хроничној фази ЕАМ у односу на здраве животиње, међутим када упоредимо акутну и хроничну фазу ЕАМ, након 6 недеља праћења ниво овог цитокина био је знатно виши. Када анализирамо и упоредимо системску и локалну продукцију овог цитокина, можемо видети да је експресија гена за IL-17 у миокарду такође била знатно виша у хроничној фази ЕАМ у односу на акутну фазу (**Графици 23 и 33**). Ово корелира са резултатима других студија. На пример, *Baldeviano et al.* су показали да IL-17A дефицијентни мишеви развијају миокардитис, међутим, без последичног ремоделовања миокарда и прогресије до ДКМ, за разлику од *wild-type* мишева. Поред тога, децијенција IL-17A није ублажила фулминатни миокардитис код мишева са дефицијенцијом IFN- γ , што указује на то да је учешће IL-17A од минималног значаја током акутног миокардитиса (144, 168). IL-17 има и профибротско дејство јер стимулише пролиферацију фибробласта и делује заједно са фибробластима који луче факторе раста (GM-CSF) те на тај начин утиче на развој тежег облика болести и прогресију до ДКМ и срчане инсуфицијенције. Претклиничке и клиничке студије

сугеришу да виши нивои Th17 Т-лимфоцита доприносе прогресији ДКМ (145, 153). Хронично повишен ниво IL-17 и системски и локално, заправо је корелирао и са другим резултатима који указују на развој ДКМ попут повишеног нивоа TGF- β , повећане количине колагених влакана тј. фиброзе у ткиву миокарда као и повећаних димензија леве коморе, и смањене EF у ЕАМ/6 групи (**Графици 236, 246, 336; Табела 17**). Повишен ниво IL-17 може оштетити миокард и индукцијом апоптозе, с обзиром да је показано да IL-17А делује проапоптотски на кардиомиоците *in vitro* кроз активацију p38-МАРК-p53-Вах сигналног пута. И у нашој студији постојала је позитивна корелација експресије IL-17А и проапоптотског гена Вах у миокарду ЕАМ пацова, док је шестонедељни третман високом и средњом дозом МОЕ ублажио ове ефекте (291). Занимљиво, системски ниво IL-17А био је повишен и 21. и 42. дана у ЕАМ групама, док је локална експресија овог цитокина у миокарда била повишена само у хроничној фази. Серумски ниво IL-17А значајно се смањио применом све три дозе МОЕ на 3 недеље, док је у хроничном протоколу једино била ефикасна висока доза МОЕ. Додатно, повишен ниво IL-17 код ЕАМ животиња може се повезати и појачаном експресијом гена за NF- κ B у миокарду у хроничној фази коју смо показали у овој студији. Наиме, IL-17 везивањем за своје ефекторе индукује сигналну трансдукцију управо преко NF- κ B-зависног сигналног пута, нарушавајући контрактилну функцију кардиомиоцита услед инхибиције транскрипције SERCA2а пумпе неопходне за преузимање Ca²⁺ из цитосола у саркоплазматски ретикулум и адекватну релаксацију кардиомиоцита. Ово тврдња је потврђена у студији *Xue* и сарадника где је показано да се код IL-17А *knock-out* мишева подвргнутих трансорталној констрикцији у циљу индуковања срчане слабости уочава боља контрактилност кардиомиоцита, кроз повишену експресију гена за SERCA2а пумпу важну за релаксацију, као и Cav1.2. гена за L-тип Ca²⁺ канала важних за контракцију, услед активације NF- κ B. С друге стране третман кардиомиоцита IL-17 индуковао је потпуно супротне ефекте, тј. поремећај хомеостазе калцијума и контрактилне функције кардиомиоцита и последичну хипертрофију (291). *Liu* и сарадници су испитивали механизам којим IL-17 доприноси фибрози миокарда у ЕАМ моделу, и закључили да IL-17 заправо повећава фосфорилацију PKC β и Erk1/2 и активира NF- κ B у фибробластима миокарда (292). Сходно томе, један од механизма кардиопротекције постигнуте МОЕ третманом посредован је инхибицијом IL17-зависне активације NF- κ B, нарочито у хроничној фази ЕАМ која је ублажила ремоделовање миокарда и последичну ДКМ, као и дисфункцију миокарда изазвану ЕАМ.

5.2.5. Ефекти МОЕ на апоптозу миокарда у ЕАМ моделу

Већ је познато у литератури да кардиомиоцити у ЕАМ одумиру некрозом и/или апоптозом. Ово је потврђено и у нашој студији, где је највећа стопа TUNEL позитивних ћелија идентификована у групи нетретираних пацова са ЕАМ 21. дана, а највећи степен некрозе такође у истој ЕАМ/3 групи (**Слике 10 и 13**). Такође, значајно виши број TUNEL позитивних ћелија измерен је у ЕАМ/3 групи у односу на ЕАМ/6 групу, док је третман МОЕ на дозно зависни начин смањио број TUNEL позитивних сигнала (**Слика 13**). Додатно, верификовали смо присуство апоптозе у миокарду ЕАМ пацова мерењем експресије проапоптотског гена Вах и антиапоптотског гена Bcl-2. Индукција ЕАМ узроковала је значајно повећање експресије Вах и снижење Bcl-2 гена, док је третман екстрактом матичњака супримирао алтерације ова два маркера апоптозе, при чему су само средња и висока доза смањили експресију Вах без међусобних разлика, а све три дозе МОЕ су индуковале пораст експресије Bcl-2 гена, уз најизраженији ефекат високе дозе МОЕ (**Графици 29 и 30**). Ови резултати указују

на то да је један од механизма кардиопротекције индуковане МОЕ заправо антиапоптотски ефекат и то преко инхибиције унутрашњег (интринзичког) пута апоптозе. Повишена експресија Вах и смањена Bcl-2 гена у миокарду у ЕАМ моделу нађена у нашој студији корелира са налазима многих других анималних студија (177, 250, 293). Интересантно је да код ДКМ, која настаје у хроничној фази ЕАМ, кардиомиоцити превасходно изумиру апоптозом у односу на дегенерацију и некрозу. Важно је и напоменути да програмирана ћелијска смрт није ограничена само на кардиомиоците већ утиче и захвата интерстицијумске фибробласте, који су превасходно присутни у хроничној фази ЕАМ и ДКМ, где долази до ремоделовања и стварања оживљеног ткива (295, 294). Ово објашњава наш налаз у погледу изражене апоптозе (повишен Вах, смањен Bcl-2) у ЕАМ групи у хроничном протоколу (**Графици 296 и 306**).

Организам се бори против оштећења ћелија кроз неколико различитих механизма спасавања кардиомиоцита, а исти ови механизми су уједно и циљеви терапије. Првенствено, инхибицијом продукције проинфламаторних цитокина IL-1 и TNF-алфа који иначе могу покренути и активирати каскаду интрацелуларних каспаза и последичну апоптозу кардиомиоцита (296-298). Може се претпоставити да овај механизам интерферира са антиапоптотским ефектом МОЕ испољеним у нашој студији, јер је показано да је продукција ових цитокина редукована услед МОЕ третмана у ЕАМ моделу (**Графици 18, 20, 29 и 30**). Додатно, смањење апоптозе у миокарду индуковано суплементацијом МОЕ може се објаснити и повезати са антиоксидационим ефектима МОЕ односно смањењем продукције РОС у ЕАМ моделу. Наиме, прекомерна продукција РОС присутна у ЕАМ (кроз повећање O_2^- , H_2O_2 , NO и TBARS у нашој студији; **Графици 10-13**) може активирати и унутрашњи и спољашњи пут апоптозе (299). С обзиром да је МОЕ третман смањио продукцију РОС у ЕАМ моделу, то се може повезати и са постигнутим антиапоптотским ефектом МОЕ. Прекомерна продукција РОС повећава пермеабилност спољашње мембране митохондрија тако што активира проапоптотске протеине укључене у унутрашњи пут апоптозе, који припадају суперфамилији Bcl-2 (Вах, Вак и Вад) (299, 300). Сходно томе, смањење експресије овог проапоптотског гена Вах у миокарду у групама третираним МОЕ може бити последица смањене продукције прооксиданса.

Подаци о ефектима екстракта МО у кардиоваскуларним патологијама, као и у аутоимунским болестима до данас су врло ограничени и оскудни. У доступној литератури, може се издвојити антиапоптотски ефекат МОЕ постигнут у анималном моделу доксорубицином-индуковане кардиотоксичности, при чему је десетодневна *per os* примена МОЕ значајно смањила експресију проапоптотских протеина Вах и каспазе-3, чија је експресија индукована применом доксорубицина. Ова запажања су конзистентна са нашим налазима, иако су у нашој студији коришћене ниже дозе МОЕ (50, 100 и 200 mg/kg vs. 250, 500 и 750 mg/kg) (69). Поред тога, постоје докази о антиапоптотском дејству МОЕ на нервни систем, које је у основи неуропротективног дејства ове биљке (42). Антиапоптотски ефекти МОЕ постигнути у овој студији могу се делимично приписати и њеном главном састојку розмаринској киселини, јер је доказано да примена РА *per se* смањује апоптозу, у различитим патологијама попут исхемијско-реперфузионе повреде плућа (301), доксорубицином-индуковане кардиотоксичности (83) и то пре свега смањењем експресије Вах и каспазе-3, као и повећањем експресије Bcl-2 гена, као и смањењем TUNEL-позитивних ћелија. Додатно, када се говори о ткиву миокарда, розмаринска киселина делује антиапоптотски како на кардиомиоците, тако и на срчане фибробласте (83). Поред розмаринске киселине, постоје докази о антиапоптотском деловању других фенолних и флавоноидних компоненти МОЕ у кардиоваскуларним болестима, укључујући

кверцетин (302-304), хлорогену киселину (305), галну киселину (306) и циметну киселину (307), што сугерише одличан синергистичан антиапоптозни ефекат свих поменутих компоненти МОЕ у ЕАМ моделу. Међутим, додатне студије су свакако неопходне у циљу расветљавања тачног молекулског механизма антиапоптозног ефекта МОЕ, нарочито у спољашњем путу апоптозе.

5.2.6. Ефекти МОЕ на очуваност структуре миокарда у ЕАМ моделу

У нашој студији, индукција ЕАМ је хистопатолошки потврђена карактеристичном тешком инфламаторном инфилтрацијом и фиброзом ткива срца у ЕАМ/3 и ЕАМ/6 групама (Слике 10, 11 и 12; Графици 25 и 28), што је у складу са другим студијама коришћењем ЕАМ модела пацова (197, 200, 252). Такође, у литератури је познато да се пик инфламације у ЕАМ моделу јавља у 3. недељи од имунизације животиња, док даље у хроничној фази може доћи до смањења инфламације, док фиброза постаје доминантни процес који води ка развоју ДКМ (176, 265, 280). Ове тврдње су конзистентне са нашим налазима, јер смо забележили виши проценат инфламаторног инфилтрата у ЕАМ/3 групи у односу на ЕАМ/6 групу квантификован Н/Е бојењем (График 25), док је већи садржај колагена измерен у хроничном протоколу ЕАМ/6 у односу на ЕАМ/3 групу *Sirius red* и *Masson Trichrome* бојењем (График 28). Поред вишег садржаја колагена у хроничној фази ЕАМ, на постојање ДКМ указују и функционалне промене миокарда измерене ехокардиографски (хипертрофија и дилатације леве коморе, уз смањену EF и FS; Табела 17), али и значајан пораст нивоа $TGF\beta$ у односу на здраве животиње, а још важније у односу на ЕАМ пацове подвргнуте краћем тронедељном протоколу (График 24). Занимљиво је да је тронедељни третман са МОЕ у све три дозе значајно побољшао архитектуру миокарда и смањио густину инфламаторног инфилтрата на дозно-зависни начин, са најизраженијим побољшањем у МОЕ200 групи, како у акутном, тако и у хроничном протоколу (Слика 10, График 25). Такође, хронични МОЕ третман је смањио садржај колагена у све три дозе, на дозно-зависни начин, и ниво $TGF\beta$ у све три дозе, без разлике у ефектима (График 24 и 28), што опет сугерише да МОЕ може спречити фиброзу изазвану миокардитисом и накнадно ремоделирање срца, тј. спречити прогресију аутоимунског миокардитиса до ДКМ. Антифиброзни ефекат МОЕ доказан у овој студији, потврђен је у другим кардиоваскуларним болестима попут анималних модела кардиотоксичности индуковане доксорубицином или блеомицином, као и у моделима И/Р повреде миокарда смањењем садржаја колагених влакана у миокарду, или смањењем експресије $TGF\beta$ (69, 70, 277). Након повреде миокарда, профибротски медијатори као што су $TGF\beta$, ангиотензин II и ендотелин-1 истовремено активирају срчане фибробласте, што резултује пролиферацијом и миграцијом фибробласта, таложењем протеина екстрацелуларног матрикса и диференцијацијом миофибробласта, што све на крају доводи до настанка фиброзног ткива. Као последица фиброзе може се јавити широк спектар срчаних поремећаја, укључујући контрактилну дисфункцију, ремоделовање срца и срчану инсуфицијенцију (308). Међутим, с обзиром да је ово прва студија која је испитивала ефекте МОЕ у аутоимунској болести срца нема доступних података за поређење. Може се претпоставити да постигнута својства ублажавања фиброзе у ЕАМ могу бити повезана са синергистичким деловањем његових једињења, посебно розмаринске киселине и других фенолних киселина; тритерпеноида олеанолне и урсолне киселине; и флавоноида кверцетина, рутина, мирицетина, катехина и епигалокатехина. Наиме, показано је да хлорогена киселина, олеанолна киселина и кверцетин смањују фиброзу миокарда у ЕАМ моделу (199, 201, 265), док розмаринска киселина такође испољава антифиброзно дејство на кардиомиоцитима у условима

дуготрајног оптерећења притиском, у моделу лигације аорте пацова (309). Механизми антифиброзног дејства ових компонената МОЕ у миокарду су вишеструки. Олеанолна киселина, на пример, смањује фиброзу миокарда кроз смањење локалне продукције инфламаторних медијатора (IL-17A, IL-6, TNF- α , Gal-3) у миокарду ЕАМ мишева, који су повезани са развојем срчане повреде, што корелира и са нашим резултатима јер је МОЕ смањио ниво IL-17A, IL-6, и TNF- α у плазми ЕАМ пацова. Ови цитокини, произведени од стране инфламаторних ћелија које инфилтрирају срце директно утичу на функцију кардиомиоцита и играју битну улогу у ремоделовању ткива миокарда. Поред тога, фиброза се може приписати како пролиферацији фибробласта, тако и таложењу колагена који се јавља након смрти миоцита као одговор на инфламаторне медијаторе. Прекомерна депозиција фибриларног колагена заузврат може довести до таложења калцијума у ћелије миокарда тј. настанка дистрофичне калцификације, које је олеанолна киселина успешно смањила у срцима ЕАМ мишева (199). С друге стране, хлорогена киселина ублажава фиброзу и прогресију ЕАМ кроз смањење експресије адхезионог молекула ICAM-1 (201), док розмаринска киселина пак остварује антифибно дејство на кардиомиоците активацијом AMPK α , фосфорилацијом и транслокацијом Smad3 *in vitro* и *in vivo* (309). Додатно, флавоноид МОЕ кверцетин такође донекле доприноси антиброзном дејству МОЕ у ЕАМ моделу, јер је доказано да може супримирати експресију ендотелина-1 у миокарду, модулацијом MAPK пута (265).

Када говоримо о инфламаторном инфилтрату у ткиву миокарда ЕАМ пацова, овај инфилтрат се пре свега састојао из мононуклеара, полиморфонулеара, али и циновских вишеједарних ћелија карактеристичних за ЕАМ, дифузног типа. Додатно, у ЕАМ срцима видели смо дегенерацију и некрозу кардиомиоцита, едем интерстицијума, бубрење кардиомиоцита и цитоплазматска хиперезинофилију. Важно запажање је да је инфламаторни инфилтрат ЕАМ животиња у хроничној фази био мањег степена, што указује на делимичну резолуцију инфламације и испољавање њених последица тј. фиброзе и ДКМ. Овакав хистопатолошки налаз је корелира са многим студијама које су користиле ЕАМ модел. МОЕ третман је значајно смањио инфламаторни инфилтрат у ткиву миокарда ЕАМ/3 и ЕАМ/6 пацова. Поменути ефекти постигнути применом МОЕ највероватније су повезани са његовим јаким антиинфламаторним својствима доказаним *in vivo* у моделу едема шапе изазваног карагенином у овој, и у претходним студијама (79), али такође и на другим моделима кардиоваскуларних болести (62). Додатно, показали смо да МОЕ смањује продукцију проинфламаторних цитокина у ЕАМ (IL-1, IL-6, IL-4, IL-17, TNF- α) што објашњава налаз мањег степена инфламаторног инфилтрата у третираним групама. Иако МОЕ нису истражени у патологији ЕАМ, у овој студији су забележени ефекти ублажавања структурног оштећења миокарда као последица миокардитиса. Може се претпоставити да постигнута својства највероватније потичу од синергистичког деловања његових активних компоненти, посебно розмаринске киселине и других фенолних киселина; тритерпеноида олеанолне и урсолне киселине; и флавоноида кверцетина, рутина, мирицетина, катехина и епигалокатехина. Доказано је да је розмаринска киселина, најзаступљеније једињење МОЕ, веома моћно антиинфламаторно средство, као што је показано у различитим моделима аутоимунских инфламаторних болести попут реуматоидног артритиса, колитиса и атопијског дерматитиса. Могући механизми овог деловања су смањена експресија COX-2 и смањено ослобађање проинфламаторних цитокина IL-1, IL-6 и TNF-алфа (310). Такође, у условима И/Р повреде миокарда, показало се да розмаринска киселина сузбија експресију проинфламаторних цитокина и побољшава оштећење срца активацијом PPAR- γ и смањењем NF- κ B-посредованих путева (84). Кверцетин је такође важна флавоноидна компонента МОЕ која је можда

допринела његовим ефектима побољшања ЕАМ-а у нашој студији, пошто је показано да кверцетин може заштитити срце од структурног оштећења у ЕАМ условима. Механизми ових ефеката подразумевају супресију ослобађања проинфламаторних TNF- α и IL-17 и повећање продукције антиинфламаторног цитокина IL-10 (197, 265). Ова студија је такође користила сој пацова *Dark Agouti*, што је чини више упоредивом са нашом студијом. Потентна антиинфламаторна својства кверцетина су такође потврђена код других аутоимунских болести (311). Још једна флавоноидна компонента МОЕ, катехин, такође је показала да заштитне ефекте у моделу ЕАМ пацова смањењем ремоделовања срца, инфламаторног инфилтрата и фиброзе, могуће преко смањене експресије NF- κ B и ICAM-1 (252). Додатна истраживања су неопходна како би се идентификовале врсте инфламаторних ћелија у ЕАМ, на које примена МОЕ утиче, с обзиром да то није било у фокусу ове студије.

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу приказаних резултата можемо извести следеће закључке:

1. Највиши принос екстракта матичњака добијен је коришћењем воде као растварача методом екстракције под рефлуксом.
2. Вода као растварач екстраховала је већи садржај флавоноида у односу на етанолне екстракте, док је насупрот томе већи садржај фенола забележен код етанолних екстраката.
3. HPLC-анализом показано је да је главни састојак испитиваних МОЕ розмаринска киселина, без обзира на примењену методу екстракције и коришћени растварач, са највећим приносом забележеним у етанолном МОЕ добијеним под рефлуксом. Поред ове компоненте, изоловане су и друге фенолне киселине (хлорогена, кафена, ферулна, *trans*-циметна киселина, *p*-кумаринска киселина, гална киселина) и флавоноиди (кверцетин).
4. Сви испитивани МОЕ показали су умерени антиоксидациони потенцијал *in vitro*, при чему је етанолни мацерат МО показао највећи капацитет неутрализације хидроксилних радикала и највећи потенцијал редукције гвожђа, док су етанолни и водени екстракти добијени под рефлуксом показали већи потенцијал неутрализације DPPH радикала. Етанолни екстракти МО показали су већи потенцијал инхибиције липидне пероксидације.
5. Сва три испитивана МОЕ су успела да ублаже инфламаторну реакцију шапице индуковану карагенином, без дозно-зависних ефеката. Најизраженији антиинфламацијски ефекти забележени су у случају воденог екстракта у високој и средњој дози, и етанолног екстракта добијеног под рефлуксом у ниској и средњој дози.
6. Примена екстраката МОЕ утицала је на редокс статус пацова након карагенином индукованог едема шапице, у погледу смањења продукције прооксиданаса и појачане продукције антиоксиданаса, при чему су најизраженији ефекти забележени у случају примене воденог и етанолног екстракта под рефлуксом.
7. Тронедељна примена МОЕ ублажила је хемодинамске алтерације у акутној фази ЕАМ, у погледу побољшања ејекционе фракције и фракције скраћења, као и нормализације димензија леве коморе, уз изражен хипотензивни ефекат и негативни хронотропни ефекат у високој дози.
8. У хроничној фази ЕАМ, МОЕ третман није утицао на ејекциону фракцију и фракцију скраћења, као ни на крвни притисак и срчану фреквенцу, већ је доминантни ефекат у овој фази подразумевао смањење задебљања зида леве коморе тј. спречавање хипертрофије миокарда и прогресије ЕАМ до ДКМ.
9. Тронедељна примена МОЕ ублажила је морфолошке промене миокарда изазване ЕАМ у акутној фази болести, у погледу смањења Hw/Bw односа, инфламаторног инфилтрата и депозиције колагена при чему је највиша доза МОЕ показала најбољи ефекат.
10. У хроничној фази ЕАМ, доминирала је појава фиброзе миокарда у односу на инфламацију карактеристично за ДКМ и увећање масе срца, а шестонедељни третман МОЕ у све три дозе је смањио депозицију колагених влакана и фиброзу миокарда, уз смањење и инфламаторног инфилтрата на дозно-зависни начин. Висока доза МОЕ показале је најбоље ефекте на очување структуре миокарда.
11. Тронедељна примена МОЕ ублажила је оксидациони стрес у акутној фази ЕАМ и то кроз дозно-зависно снижење продукције прооксиданаса (O_2^- , H_2O_2 , NO_2^- , TBARS) и повећање продукције антиоксидантних молекула (SOD, CAT, GSH).

12. У хроничној фази ЕАМ, примена МОЕ постигла је сличне ефекте, али без утицаја на ниво H_2O_2 , NO_2 , и без забележених дозно зависних ефеката. Додатно, у хроничној фази примена МОЕ повећала је релативну експресију антиоксидационих гена у миокарду.
13. У акутној фази ЕАМ, примена МОЕ модулирала је имунски одговор у погледу смањења системске продукције проинфламаторних Th1, Th2 и Th17 цитокина, и повећања продукције проинфламаторног цитокина IL-10, без забележених дозно зависних ефеката.
14. У хроничној фази, третман МОЕ ублажио је ослобађање свих мерених проинфламаторних цитокина изузев IL1. Додатно, хронични третман је успео да смањи продукцију IL17 системски, али и локално у миокарду смањењем експресије гена за IL17, као и Nf-kB.
15. Третман МОЕ испољио је антиапоптотски ефекат и у акутној и у хроничној фази ЕАМ кроз смањење експресије проапоптског и повећање експресије антиапоптског гена у миокарду, уз смањење броја ћелија одумрлих апоптозом у ткиву миокарда имунохистохемијски. Најбољи ефекти забележени су применом средње и високе дозе МОЕ.
16. Постигнути кардиопротективни ефекти МОЕ у акутној и хроничној фази ЕАМ могу се сматрати последицом комплексних синергистичких антиинфламацијских, антиоксидационих и антиапоптотских ефеката МОЕ.
17. У складу са резултатима ове студије, МОЕ се може сматрати одличним кандидатом за клиничку студију у којој би се испитивала ефикасност овог екстракта као адјуватне терапије код пацијената са аутоимунским миокардитисом.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Abdellatif F, Akram M, Begaa S, Messaoudi M, Benarfa A, Egbuna C, et al. Minerals, Essential Oils, and Biological Properties of *Melissa officinalis* L. *Plants* (Basel). 2021;10(6):1066.
2. Moradkhani H, Sargsyan E, Bibak H, Naseri B, Sadat-Hosseini M, Fayazi-Barjin A, et al. *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A review. *J Med Plants Res*. 2010;4:2753–9.
3. Ashori A, Hamzeh Y, Amani F. Lemon balm (*Melissa officinalis*) stalk: Chemical composition and fiber morphology. *J Polym Environ*. 2011;19(1):297-300.
4. Abdellatif F, Boudjella H, Zitouni A, Hassani A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of Algerian *Melissa officinalis* L. *EXCLI J*. 2014;13:772.
5. Canadanović-Brunet J, Cetković G, Djilas S, Tumbas V, Bogdanović G, Mandić A, et al. Radical scavenging, antibacterial, and antiproliferative activities of *Melissa officinalis* L. extracts. *J Med Food*. 2008;11(1):133–43.
6. Aharizad S, Rahimi MH, Moghadam M, Mohebalipour N. Study of genetic diversity in lemon balm (*Melissa officinalis* l.) populations based on morphological traits and essential oils content. *Ann Biol Res*. 2012;3:5748–53.
7. Abdel-Naime WA, Fahim JR, Fouad MA, Kamel MS. Botanical studies of the leaf of *Melissa officinalis* L., Family: labiatae, cultivated in Egypt. *J Pharm Phytochem*. 2016;5:98–104.
8. Shakeri A, Sahebkar A, Javadi B. *Melissa officinalis* L. - A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol*. 2016;188:204–28.
9. Plants database: *Melissa officinalis* L. Доступно на: <https://plants.sc.egov.usda.gov/home/plantProfile?symbol=MEOF2>. Последњи пут посећено 5.4.2023.
10. NCBI Taxonomy Browser: *Melissa officinalis* L. Доступно на: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=39338>. Последњи пут посећено 5.4.2023.
11. Ulbricht C, Brendler T, Gruenwald J, Kligler B, Keifer D, Abrams TR, et al. Natural Standard Research Collaboration. Lemon balm (*Melissa officinalis* L.): an evidence-based systematic review by the Natural Standard Research Collaboration. *J Herb Pharmacother*. 2005;5(4):71-114.
12. Sharifi-Rad J, Quispe C, Herrera-Bravo J, Akram M, Abbaass W, Semwal P, et al. "Phytochemical Constituents, Biological Activities, and Health-Promoting Effects of the *Melissa officinalis*". *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021: Article ID 6584693.
13. Ibragic S, Salihovic M, Tahirovic I, Toromanovic J. Quantification of some phenolic acids in the leaves of *Melissa officinalis* L. from Turkey and Bosnia. *Bull Chem Tech Bosnia and Herzegovina*. 2014;42:47-50.
14. Arceusz A, Wesolowski M, Ulewicz-Magulska B. Flavonoids and Phenolic Acids in Methanolic Extracts, Infusions and Tinctures from Commercial Samples of Lemon Balm. *Nat Prod Commun*. 2015;10(6):977-81.
15. Yoo G, Lee IK, Park S, Kim N, Park JH, Kim SH. Optimization of Extraction Conditions for Phenolic Acids from the Leaves of *Melissa officinalis* L. Using Response Surface Methodology. *Pharmacogn Mag*. 2018;14(54):155-61.
16. Hanganu D, Vlase L, Filip L, Sand C, Mirel S, Indrei LL. The study of some polyphenolic compounds from *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae). *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2008;112(2):525-9.
17. Patora J, Klimek B. Flavonoids from lemon balm (*Melissa officinalis* L., Lamiaceae). *Acta Pol Pharm*. 2002;59(2):139-43.

18. Fierascu I, Georgiev MI, Ortan A, Fierascu RC, Avramescu SM, Ionescu D, et al. Phyto-mediated metallic nano-architectures via *Melissa officinalis* L.: Synthesis, characterization and biological properties. *Sci. Rep.* 2017;7:12428.
19. Pereira RP, Boligon AA, Appel AS, Fachineto R, Ceron CS, Tanus-Santos JE, et al. Chemical composition, antioxidant and anticholinesterase activity of *Melissa officinalis*. *Ind Crops Prod*; 2014;53:34–45.
20. Chebil L, Humeau C, Anthoni J, Dehez F, Engasser JM, Ghoul M. Solubility of Flavonoids in Organic Solvents. *J Chem Eng Data.* 2007;52(5):1552–6.
21. Ferreira O, Pinho SP. Solubility of Flavonoids in Pure Solvents. *Ind Eng Chem Res.* 2012;51(18):6586–90.
22. Ilić ZS, Milenković L, Tmušić N, Stanojević Lj, Stanojević J, Cvetković D. Essential oils content, composition and antioxidant activity of lemon balm, mint and sweet basil from Serbia. *LWT*; 2022;153:112210.
23. Mokhtarzadeh S, Demirci B, Goger G, Mahmood Khawar K, Kirimer N. Characterization of volatile components in *Melissa officinalis* L. under in vitro conditions, *J Es Oil Res*, 2017;29(4):299-303.
24. Ehsani A, Alizadeh O, Hashemi M, Afshari A, Aminzare M. Phytochemical, antioxidant and antibacterial properties of *Melissa officinalis* and *Dracocephalum moldavica* essential oils. *Vet Res Forum.* 2017;8:223–9.
25. Cosge B, Ipek A, Gurbuz BGC. MS analysis of herbage essential oil from lemon balm (*Melissa officinalis* L) grown in Turkey. *J Appl Bio Sci.* 2009;3:149–52.
26. Mimica-Dukic N, Bozin B, Sokovic M, Simin N. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (*Lamiaceae*) essential oil. *J Agric Food Chem.* 2004;52(9):2485-9.
27. Chizzola R, Lohwasser U, Franz C. Biodiversity within *Melissa officinalis*: Variability of Bioactive Compounds in a Cultivated Collection. *Molecules.* 2018;23(2):294.
28. Nurzyńska-Wierdak R, Bogucka-Kocka A, Szymczak G. Volatile constituents of *Melissa officinalis* leaves determined by plant age. *Nat Prod Commun.* 2014;9(5):703-6.
29. Mencherini T, Picerno P, Scesa C, Aquino R. Triterpene, Antioxidant, and Antimicrobial Compounds from *Melissa officinalis*. *J Nat Prod.* 2007;70:1889–94.
30. Ghiulai R, Avram S, Stoian D, Pavel IZ, Coricovac D, Oprean C, et al. Lemon Balm Extracts Prevent Breast Cancer Progression In Vitro and In Ovo on Chorioallantoic Membrane Assay. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2020;2020:6489159.
31. Ashori A, Hamzeh Y, Amani F. Lemon Balm (*Melissa officinalis*) Stalk: Chemical Composition and Fiber Morphology. *J Polym Environ.* 2011;19:297–300.
32. Dias MI, Barros L, Sousa MJ, Ferreira IC. Systematic comparison of nutraceuticals and antioxidant potential of cultivated, in vitro cultured and commercial *Melissa officinalis* samples. *Food Chem Toxicol.* 2012;50:1866–73.
33. Tantry MA, Bhat GA, Idris A, Dar JA, Al Omar SY, Masoodi KZ, et al. Sulfated triterpenes from Lemon balm. *Helv Chim Acta.* 2014;97:1497–506.
34. Abdel-Naime W, Fahim J, Abdelmohsen U, Fouad M, Al-Footy K, Abdel-Lateff A, et al. New antimicrobial triterpene glycosides from lemon balm (*Melissa officinalis*). *S Afr J Bot.* 2019;125:161–7.
35. Barros L, Dueñas M, Dias MI, Sousa MJ, Santos-Buelga C, Ferreira IC. Phenolic profiles of cultivated, in vitro cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions. *Food Chem.* 2013;136:1–8.
36. European Medicine Agency; EMA/HMPC/196745/2012 Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC); Community herbal monograph on *Melissa officinalis* L., folium. Доступно на: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal->

[monograph/final-community-herbal-monograph-melissa-officinalis-l-folium_en.pdf](#)

Последњи пут посећено: 6.4.2023.

37. Šarić-Kundalić, B, Dobeš C, Klatte-Asselmeyer V, Saukel J. Ethnobotanical survey of traditionally used plants in human therapy of east, north and north-east Bosnia and Herzegovina. *J Ethnopharmacol.* 2011;133(3):1051-76.
38. Ivanova D, Gerova D, Chervenkov T, Yankova T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2005;96(1-2):145-50.
39. Bonet MA, Parada M, Selga A, Valles J. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the regions of L'Alt Emporda and Les Guilleries (Catalonia, Iberian Peninsula). *J Ethnopharmacol.* 1999;68(1-3):145-68.
40. NourEddine D, Miloud S, Abdelkader A. Effect of lead exposure on dopaminergic transmission in the rat brain. *Toxicology.* 2005;207:363-8.
41. Haybar H, Javid AZ, Haghizadeh MH, Valizadeh E, Mohaghegh SM, Mohammadzadeh A. The effects of *Melissa officinalis* supplementation on depression, anxiety, stress, and sleep disorder in patients with chronic stable angina. *Clin Nutr ESPEN.* 2018;26:47-52.
42. Ghazizadeh J, Sadigh-Eteghad S, Marx W, Fakhari A, Hamedeyazdan S, Torbati M, et al. The effects of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) on depression and anxiety in clinical trials: A systematic review and meta-analysis. *Phytother Res.* 2021;35(12):6690-705.
43. Zarei A, Changizi-Ashtiyani S, Taheri S, Hosseini N. A brief overview of the effects of *Melissa officinalis* L. extract on the function of various body organs. *Zahedan J Res Med Sci.* 2015;15:29-34.
44. Moacă EA, Farcaș C, Ghițu A, Coricovac D, Popovici R, Cărăba-Meiță NL, et al. A comparative study of melissa *officinalis* leaves and stems ethanolic extracts in terms of antioxidant, cytotoxic, and antiproliferative potential. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2018;2018:7860456.
45. Soulimani R, Fleurentin J, Mortier F, Misslin R, Derrieu G, Pelt JM. Neurotropic action of the hydroalcoholic extract of *Melissa officinalis* in the mouse. *Planta Med.* 1991;57:105-9.
46. Noguchi-Shinohara M, Ono K, Hamaguchi T, Nagai T, Kobayashi S, Komatsu J, et al. Safety and efficacy of *Melissa officinalis* extract containing rosmarinic acid in the prevention of Alzheimer's disease progression. *Sci Rep.* 2020;10(1):18627.
47. Awad R, Levac D, Cybulska P, Merali Z, Trudeau VL, Arnason JT. Effects of traditionally used anxiolytic botanicals on enzymes of the gamma-aminobutyric acid (GABA) system. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007;85:933-42.
48. Ibarra A, Feuillere N, Roller M, Lesburgere E, Beracochea D. Effects of chronic administration of *Melissa officinalis* L. extract on anxiety-like reactivity and on circadian and exploratory activities in mice. *Phytomedicine.* 2010;17:397-403.
49. Aubert P, Guinobert I, Blondeau C, Bardot V, Ripoché I, Chalard P, et al. Basal and Spasmolytic Effects of a Hydroethanolic Leaf Extract of *Melissa officinalis* L. on Intestinal Motility: An *Ex Vivo* Study. *J Med Food.* 2019;22(7):653-62.
50. Sadraei H, Ghannadi A, Malekshahi K. Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions. *Fitoterapia.* 2003;74:445-52.
51. Miraj S, Rafieian-Kopaei, Kiani S. *Melissa officinalis* L: a review study with an antioxidant prospective. *J Evid Based Complement Altern. Med.* 2017;22:385-94.
52. Astani A, Reichling J, Schnitzler P. *Melissa officinalis* extract inhibits attachment of herpes simplex virus in vitro. *Chemotherapy.* 2012;58:70-7.
53. Wolbling RH, Leonhardt K. Local therapy of herpes simplex with dried extract from *Melissa officinalis*. *Phytomedicine.* 1994;1:25-31.

54. Jahanban-Esfahlan A, Modaeinama S, Abasi M, Abbasi MM, Jahanban-Esfahlan R. Anti Proliferative Properties of *Melissa officinalis* in Different Human Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(14):5703-7.
55. Kuo TT, Chang HY, Chen TY, Liu BC, Chen HY, Hsiung YC, et al. *Melissa officinalis* Extract Induces Apoptosis and Inhibits Migration in Human Colorectal Cancer Cells. *ACS Omega.* 2020;5(49):31792-800.
56. Weidner C, Rousseau M, Plauth A, Wowro SJ, Fischer C, Abdel-Aziz H, et al. *Melissa officinalis* extract induces apoptosis and inhibits proliferation in colon cancer cells through formation of reactive oxygen species. *Phytomedicine.* 2015;22:262–70.
57. Encalada MA, Hoyos KM, Rehecho S, Berasategi I, de Ciriano MG, Ansorena D, et al. Anti-proliferative effect of *Melissa officinalis* on human colon cancer cell line. *Plant Foods Hum Nutr.* 2011;66:328–34.
58. Jun HJ, Lee JH, Jia Y, Hoang MH, Byun H, Kim KH, et al. *Melissa officinalis* essential oil reduces plasma triglycerides in human apolipoprotein E2 transgenic mice by inhibiting sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent fatty acid synthesis. *J Nutr.* 2012;142:432–40.
59. Asadi A, Shidfar F, Safari M, Malek M, Hosseini AF, Rezazadeh S, et al. Safety and efficacy of *Melissa officinalis* (lemon balm) on ApoA-I, Apo B, lipid ratio and ICAM-1 in type 2 diabetes patients: A randomized, double-blinded clinical trial. *Complement Ther Med.* 2018;40:83-8.
60. Chung MJ, Cho SY, Bhuiyan MJ, Kim KH, Lee SJ. Anti-diabetic effects of lemon balm (*Melissa officinalis*) essential oil on glucose- and lipid-regulating enzymes in type 2 diabetic mice. *Br J Nutr.* 2010;104:180–8.
61. Shin Y, Lee D, Ahn J, Lee M, Shin SS, Yoon M. The herbal extract ALS-L1023 from *Melissa officinalis* reduces weight gain, elevated glucose levels and β -cell loss in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *J Ethnopharmacol.* 2021;264:113360.
62. Draginic N, Jakovljevic V, Andjic M, Jeremic J, Srejovic I, Rankovic M, et al. *Melissa officinalis* L. as a Nutritional Strategy for Cardioprotection. *Front Physiol.* 2021;12:661778.
63. Lamaison J, Petitjean-Freytet C, Carnat A. Medicinal Lamiaceae with antioxidant properties, a potential source of rosmarinic acid [in French]. *Pharm Acta Helv.* 1990;66(7):185–8.
64. García-Risco MR, Mouhid L, Salas-Pérez L, López-Padilla A, Santoyo S, Jaime L, et al. Biological Activities of Asteraceae (*Achillea millefolium* and *Calendula officinalis*) and Lamiaceae (*Melissa officinalis* and *Origanum majorana*) Plant Extracts. *Plant Foods Hum Nutr.* 2017;72(1):96-102.
65. Pereira RP, Fachineto R, de Souza Prestes A, Puntel RL, Santos da Silva GN, Heinzmann BM, et al. Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Neurochem Res.* 2009;34(5):973-83.
66. Spiridon I, Colceru S, Anghel N, Teaca CA, Bodirlau R, Armatu A. Antioxidant capacity and total phenolic contents of oregano (*Origanum vulgare*), lavender (*Lavandula angustifolia*) and lemon balm (*Melissa officinalis*) from Romania. *Nat Prod Res.* 2011;25(17):1657-61.
67. Miron TL, Herrero M, Ibáñez E. Enrichment of antioxidant compounds from lemon balm (*Melissa officinalis*) by pressurized liquid extraction and enzyme-assisted extraction. *J Chromatogr A.* 2013;1288:1-9.
68. Luță EA, Biță A, Moroșan A, Mihaiescu DE, Ghica M, Mihai DP, et al. The Influence of Phytosociological Cultivation and Fertilization on Polyphenolic Content of *Menthae* and *Melissae folium* and Evaluation of Antioxidant Properties through In Vitro and In Silico Methods. *Plants (Basel).* 2022;11(18):2398.

69. Hamza AA, Ahmed MM, Elwey HM, Amin A. Melissa officinalis protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats and potentiates its anticancer activity on MCF-7 cells. PLoS One. 2016;11:e0167049.
70. Sedighi M, Faghihi M, Rafieian-Kopaei M, Rasouljan B, Nazari A. Cardioprotective effect of ethanolic leaf extract of melissa officinalis L against regional ischemia-induced arrhythmia and heart injury after five days of reperfusion in rats. Iran J Pharm Res. 2019;18:1530–42.
71. Talebi S, Rahmati B, Jorjani M, Emadi F, Ghaffari F, Naseri M. Synergistic effects of Nepeta menthoides and Melissa officinalis aqueous extracts on reserpine-induced depressive-like behaviors in mice. Phytother Res. 2022;36(6):2481-94.
72. Joukar S, Asadipour H, Sheibani M, Najafipour H, Dabiri S. The effects of Melissa officinalis (lemon balm) pretreatment on the resistance of the heart to myocardial injury. Pharm Biol. 2016;54:1005–13.
73. Javid AZ, Haybar H, Dehghan P, Haghhighizadeh MH, Mohaghegh SM, Ravanbakhsh M, et al. The effects of Melissa officinalis (lemon balm) in chronic stable angina on serum biomarkers of oxidative stress, inflammation and lipid profile. Asia Pac J Clin Nutr. 2018;27(4):785-91.
74. Draginic N, Milosavljevic I, Andjic M, Jeremic J, Nikolic M, Sretenovic J, et al. Short-Term Administration of Lemon Balm Extract Ameliorates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: Focus on Oxidative Stress. Pharmaceuticals (Basel). 2022;15(7):840.
75. Zeraatpishe A, Oryan S, Bagheri MH, Pilevarian AA, Malekirad AA, Baeri M, et al. Effects of Melissa officinalis L. on oxidative status and DNA damage in subjects exposed to long-term low-dose ionizing radiation. Toxicol Ind Health. 2011;27(3):205-12.
76. Furman D, Campisi J, Verdin E, Carrera-Bastos P, Targ S, Franceschi C, et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. Nat Med. 2019 Dec;25(12):1822-32.
77. Patil KR, Mahajan UB, Unger BS, Goyal SN, Belemkar S, Surana SJ, et al. Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of Phytopharmaceuticals. Int J Mol Sci. 2019a;20(18):4367.
78. Bounihi A, Hajjaj G, Alnamer R, Cherrah Y, Zellou A. In Vivo Potential Anti-Inflammatory Activity of Melissa officinalis L. Essential Oil. Adv Pharmacol Sci. 2013;2013:101759.
79. Birdane YO, Buyukokuroglu ME, Birdane FM, Cemek M, Yavuz H. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of Melissa officinalis L. in rodents. Rev Med Vet. 2007;158(02):75–81.
80. Seif El-Dein N, AbdAlhady N, Temraz A, Abd-Elatiff D, Ibrahim M. Phytochemical and Biological Study of Melissa officinalis (Family Lamiaceae) Cultivated in Egypt. Azhar Int J Pharm Med Sci. 2023; 3(1): 132-43.
81. Travel A, Petit A, Barat P, Collin A, Bourrier-Clairat C, Pertusa M, et al. Methodologies to Assess the Bioactivity of an Herbal Extract on Immunity, Health, Welfare and Production Performance in the Chicken: The Case of *Melissa officinalis* L. Extract. Front Vet Sci. 2021;8:759456.
82. Choi BR, Cho IJ, Jung SJ, Kim JK, Park SM, Lee DG, et al. Lemon balm and dandelion leaf extract synergistically alleviate ethanol-induced hepatotoxicity by enhancing antioxidant and anti-inflammatory activity. J Food Biochem. 2020;44(8):e13232.

83. Zhang X, Zhu JX, Ma ZG, Wu HM, Xu SC, Song P, et al. Rosmarinic acid alleviates cardiomyocyte apoptosis via cardiac fibroblast in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Int J Biol Sci.* 2019;15(3):556-67.
84. Han J, Wang D, Ye L, Li P, Hao W, Chen X, et al. Rosmarinic Acid Protects against Inflammation and Cardiomyocyte Apoptosis during Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Activating Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. *Front Pharmacol.* 2017;8:456.
85. Ghazizadeh J, Hamedeyazdan S, Torbati M, Farajdokht F, Fakhari A, Mahmoudi J, et al. *Melissa officinalis* L. hydro-alcoholic extract inhibits anxiety and depression through prevention of central oxidative stress and apoptosis. *Exp Physiol.* 2020;105(4):707-20.
86. Gazola R, Machado D, Ruggiero C, Singi G, Macedo Alexandre M. *Lippia alba*, *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*: effects of the aqueous extracts on the isolated hearts of rats. *Pharmacol Res.* 2004;50:477–80.
87. Joukar S, Zarisfi Z, Sepehri G, Bashiri A. Efficacy of *Melissa officinalis* in suppressing ventricular arrhythmias following ischemia-reperfusion of the heart: a comparison with amiodarone. *Med Princ Pract.* 2014;23:340–5.
88. Joukar S, Asadipour H. Evaluation of *Melissa officinalis* (Lemon Balm) effects on heart electrical system. *Res Cardiovasc Med.* 2015;4:e27013.
89. Gupta A, Lawrence AT, Krishnan K, Kavinsky CJ, Trohman RG. Current concepts in the mechanisms and management of drug-induced QT prolongation and torsade de pointes. *Am Heart J.* 2007;153:891–9.
90. Akhondali Z, Dianat M, Radan M. Negative chronotropic and antidysrhythmic effects of hydroalcoholic extract of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) on CaCl₂-induced arrhythmias in rats. *Electron Physician.* 2015;7:971–6.
91. Ersoy S, Orhan I, Turan NN, Sahan G, Ark M, Tosun F. Endothelium-dependent induction of vasorelaxation by *Melissa officinalis* L. ssp. *officinalis* in rat isolated thoracic aorta. *Phytomedicine.* 2008;15:1087–92.
92. Devi RC, Sim SM, Ismail R. Effect of *cymbopogon citratus* and citral on vascular smooth muscle of the isolated thoracic rat aorta. *Evid Based Complement Altern Med.* 2012;2012:539475.
93. Safaeian L, Sajjadi SE, Javanmard SH, Montazeri H, Samani F. Protective effect of *Melissa officinalis* extract against H₂O₂-induced oxidative stress in human vascular endothelial cells. *Res Pharm Sci.* 2016;11:383–9.
94. Huang SS, Zheng RL. Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action in vitro. *Cancer Lett.* 2006;239:271–80.
95. Alijaniha F, Naseri M, Afsharypuor S, Fallahi F, Noorbala A, Mosaddegh M, et al. Heart palpitation relief with *Melissa officinalis* leaf extract: double blind, randomized, placebo controlled trial of efficacy and safety. *J Ethnopharmacol.* 2015;164:378–84.
96. Asadi A, Shidfar F, Safari M, Hosseini AF, Fallah Huseini H, Heidari I, et al. Efficacy of *Melissa officinalis* L. (lemon balm) extract on glycemic control and cardiovascular risk factors in individuals with type 2 diabetes: A randomized, double-blind, clinical trial. *Phytother Res.* 2019;33:651–9.
97. Fung G, Luo H, Qiu Y, Yang D, McManus B. Myocarditis. 2016;118:496–514
98. Suresh A, Martens P, Tang WHW. Biomarkers for Myocarditis and Inflammatory Cardiomyopathy. *Curr Heart Fail Rep.* 2022;19(5):346-55.
99. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, et al. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019: update from the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol.* 2020;76:2982–3021.

100. Ammirati E, Buono A, Moroni F, Gigli L, Power JR, Ciabatti M, et al. State-of-the-Art of Endomyocardial Biopsy on Acute Myocarditis and Chronic Inflammatory Cardiomyopathy. *Curr Cardiol Rep.* 2022;24(5):597-609.
101. Global Burden of Disease Study C. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the global burden of disease study 2013. *Lancet.* 2015;386:743–800.
102. Ammirati E, Frigerio M, Adler ED, Basso C, Birnie DH, Brambatti M, et al. Management of Acute Myocarditis and Chronic Inflammatory Cardiomyopathy: An Expert Consensus Document. *Circ Heart Fail.* 2020;13(11):e007405.
103. Ammirati E, Frigerio M, Adler ED, Basso C, Birnie DH, Brambatti M, et al. Management of Acute Myocarditis and Chronic Inflammatory Cardiomyopathy: An Expert Consensus Document. *Circ Heart Fail.* 2020;13(11):e007405.
104. Golpour A, Patriki D, Hanson PJ, McManus B, Heidecker B. Epidemiological Impact of Myocarditis. *J Clin Med.* 2021;10(4):603.
105. Dai H, Lotan D, Much AA, Younis A, Lu Y, Bragazzi NL, et al. Global, Regional, and National Burden of Myocarditis and Cardiomyopathy 1990-2017. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:610989.
106. Frisancho-Kiss S, Nyland JF, Davis SE, Frisancho JA, Barrett MA, Rose NR, et al. Sex differences in coxsackievirus B3-induced myocarditis: IL-12R β 1 signaling and IFN- γ increase inflammation in males independent from STAT4. *Brain Res.* 2006;1126:139–47.
107. Fairweather D, Cooper LTJr, Blauwet LA. Sex and gender differences in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Curr Probl Cardiol.* 2013;38:7–46.
108. Iorga A, Cunningham CM, Moazeni S, Ruffenach G, Umar S, Eghbali M. The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. *Biol Sex Differ.* 2017;8(1):33.
109. Bracamonte-Baran W, Čiháková D. Cardiac Autoimmunity: Myocarditis. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1003:187-221.
110. Fabián O, Štěchovský C. Histopathological diagnosis of myocarditis. *Cesk Patol.* 2019;55(4):218-23.
111. Ganji M, Ruiz-Morales J, Ibrahim S. Acute lymphocytic myocarditis. *J Geriatr Cardiol.* 2018;15(7):517-8.
112. Caforio AL, Pankuweit S, Arbustini E, Basso C, Gimeno-Blanes J, Felix SB, et al. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J.* 2013;34(33):2636-48.
113. Oflazer P. Giant cell myositis and myocarditis revisited. *Acta Myol.* 2020;39(4):302-6.
114. Ekström K, Lehtonen J, Kandolin R, Räisänen-Sokolowski A, Salmenkivi K, Kupari M. Long-term outcome and its predictors in giant cell myocarditis. *Eur J Heart Fail.* 2016;18(12):1452-8.
115. Cihakova D, Rose NR. Pathogenesis of myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Adv Immunol.* 2008;99:95–114.
116. Mathai SV, Patel S, Jorde UP, Rochlani Y. Epidemiology, Pathogenesis, and Diagnosis of Cardiac Sarcoidosis. *Methodist Debakey Cardiovasc J.* 2022;18(2):78-93.
117. Gilotra NA, Griffin JM, Pavlovic N, Houston BA, Chasler J, Goetz C, et al. Sarcoidosis-Related Cardiomyopathy: Current Knowledge, Challenges, and Future Perspectives State-of-the-Art Review. *J Card Fail.* 2022;28(1):113-32.
118. Zhong Z, Yang Z, Peng Y, Wang L, Yuan X. Diagnosis and treatment of eosinophilic myocarditis. *J Transl Autoimmun.* 2021;4:100118.

119. Arima M, Kanoh T. Eosinophilic myocarditis associated with dense deposits of eosinophil cationic protein (ECP) in endomyocardium with high serum. ECP Heart. 1999;81:669–
120. Caforio AL, Marcolongo R, Jahns R, Fu M, Felix SB, Iliceto S. Immune-mediated and autoimmune myocarditis: clinical presentation, diagnosis and management. Heart Fail Rev. 2013;18(6):715-32.
121. Leuschner F, Katus HA, Kaya Z. Autoimmune myocarditis: past, present and future. J Autoimmun. 2009;33(3-4):282-9.
122. Caforio ALP, Calabrese F, Angelini A, Tona F, Vinci A, Bottaro S, et al. A prospective study of biopsy-proven myocarditis: prognostic relevance of clinical and etiopathogenetic features at diagnosis. Eur Heart J. 2007;28(11):1326–33.
123. Schultheiss HP, Kühl U, Cooper LT. The management of myocarditis. Eur Heart J. 2011;32(21):2616–25.
124. Baughman KL. Diagnosis of myocarditis: death of Dallas criteria. Circulation. 2006;113(4):593-5.
125. Vidusa L, Kalejs O, Maca-Kaleja A, Strumfa I. Role of Endomyocardial Biopsy in Diagnostics of Myocarditis. Diagnostics (Basel). 2022;12(9):2104.
126. Ferreira VM, Schulz-Menger J, Holmvang G, Kramer CM, Carbone I, Sechtem U, et al. Cardiovascular Magnetic Resonance in Nonischemic Myocardial Inflammation: Expert Recommendations. J Am Coll Cardiol. 2018;72(24):3158-76.
127. Harding D, Chong MHA, Lahoti N, Bigogno CM, Prema R, Mohiddin SA, et al. Dilated cardiomyopathy and chronic cardiac inflammation: Pathogenesis, diagnosis and therapy. J Intern Med. 2023;293(1):23-47.
128. Towbin JA, Lowe AM, Colan SD, Sleeper LA, Orav EJ, Clunie S, et al. Incidence, causes, and outcomes of dilated cardiomyopathy in children. JAMA. 2006;296(15):1867-76.
129. Kindermann I, Barth C, Mahfoud F, Ukena C, Lenski M, Yilmaz A, et al. Update on myocarditis. J Am Coll Cardiol. 2012;59(9):779-92.
130. Frantz S, Falcao-Pires I, Balligand JL et al. The innate immune system in chronic cardiomyopathy: A European Society of Cardiology (ESC) scientific statement from the Working Group on myocardial function of the ESC. Eur J Heart Fail 2018;20:445–59.
131. Caforio AL, Mahon NG, Baig MK, Tona F, Murphy RT, Elliott PM, et al. Prospective familial assessment in dilated cardiomyopathy: cardiac autoantibodies predict disease development in asymptomatic relatives. Circulation. 2007;115(1):76-83.
132. Jefferies JL, Towbin JA. Dilated cardiomyopathy. Lancet. 2010;375(9716):752-62.
133. Nohria A, Tsang SW, Fang JC, Lewis EF, Jarcho JA, Mudge GH, et al. Clinical assessment identifies hemodynamic profiles that predict outcomes in patients admitted with heart failure. J Am Coll Cardiol. 2003;41:1797–804.
134. Mahfoud F, Ukena C, Kandolf R, Kindermann M, Böhm M, Kindermann I. Blood pressure and heart rate predict outcome in patients acutely admitted with suspected myocarditis without previous heart failure. J Hypertens. 2012;30(6):1217-24.
135. Gao S, Zhou J, Liu N, Wang L, Gao Q, Wu Y, et al. Curcumin induces M2 macrophage polarization by secretion IL-4 and/or IL-13. J Mol Cell Cardiol. 2015;85:131-9.
136. Suzuki J, Ogawa M, Futamatsu H, Kosuge H, Tanaka H, Isobe M. A cyclooxygenase-2 inhibitor alters Th1/Th2 cytokine balance and suppresses autoimmune myocarditis in rats. J Mol Cell Cardiol. 2006;40(5):688-95.
137. Felker GM, Boehmer JP, Hruban RH, Hutchins GM, Kasper EK, Baughman KL, et al. Echocardiographic findings in fulminant and acute myocarditis. J Am Coll Cardiol. 2000;36:227–32.

138. Mason JW, O'Connell JB, Herskowitz A, Rose NR, McManus BM, Billingham ME, et al. A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis. The Myocarditis Treatment Trial Investigators. *N Engl J Med.* 1995;333(5):269-75.
139. Phoon C, Turnbull DH. Cardiovascular Imaging in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2016;6(1):15-38.
140. Mirna M, Paar V, Kraus T, Sotlar K, Wernly B, Pistulli R, et al. Autoimmune myocarditis is not associated with left ventricular systolic dysfunction. *Eur J Clin Invest.* 2019;49(8):e13132.
141. Hofmann U, Frantz S. Role of lymphocytes in myocardial injury, healing, and remodeling after myocardial infarction. *Circ Res.* 2015;116(2):354–67.
142. Afanasyeva M, Wang Y, Kaya Z, Park S, Zilliox MJ, Schofield BH, et al. Experimental autoimmune myocarditis in A/J mice is an interleukin-4-dependent disease with a Th2 phenotype. *Am J Pathol.* 2001;159(1):193–203.
143. Rangachari M, Mauermann N, Marty RR, Dirnhofer S, Kurrer MO, Komnenovic V, et al. T-bet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin 17. *J Exp Med.* 2006;203(8):2009–19.
144. Barin JG, Baldeviano GC, Talor MV, Wu L, Ong S, Fairweather D, et al. Fatal eosinophilic myocarditis develops in the absence of IFN- γ and IL-17A. *J Immunol.* 2013;191(8):4038-47.
145. Myers JM, Cooper LT, Kem DC, Stavrakis S, Kosanke SD, Shevach EM, et al. Cardiac myosin-Th17 responses promote heart failure in human myocarditis. *JCI Insight.* 2016;1(9):e85851.
146. Xie Y, Chen R, Zhang X, Yu Y, Yang Y, Zou Y, et al. Blockade of interleukin-17A protects against coxsackievirus B3-induced myocarditis by increasing COX-2/PGE2 production in the heart. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012 Apr;64(3):343-51.
147. Ong S, Ligons DL, Barin JG, Wu L, Talor MV, Diny N, et al. Natural killer cells limit cardiac inflammation and fibrosis by halting eosinophil infiltration. *The American Journal of Pathology* 2015;185:847-61.
148. Tahto E, Jadric R, Pojskic L, Kicic E. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and its relation with markers of inflammation and myocardial necrosis in patients with acute coronary syndrome. *Med Arch.* 2017;71:312–5.
149. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res.* 2014;2:1.
150. Hou X, Chen G, Bracamonte-Baran W, Choi HS, Diny NL, Sung J, et al. The Cardiac Microenvironment Instructs Divergent Monocyte Fates and Functions in Myocarditis. *Cell Rep.* 2019;28(1):172-189.e7.
151. Pappritz K, Savvatis K, Koschel A, Miteva K, Tschöpe C, Van Linthout S. Cardiac (myo)fibroblasts modulate the migration of monocyte subsets. *Sci Rep.* 2018;8(1):5575.
152. Simms MG, Walley KR. Activated macrophages decrease rat cardiac myocyte contractility: importance of ICAM-1-dependent adhesion. *Am J Physiol.* 1999;277(1):H253-60.
153. Bruestle K, Hackner K, Kreye G, Heidecker B. Autoimmunity in Acute Myocarditis: How Immunopathogenesis Steers New Directions for Diagnosis and Treatment. *Curr Cardiol Rep.* 2020;22(5):28.
154. Kurrer MO, Kopf M, Penninger J, Eriksson U. Cytokines that regulate autoimmune myocarditis. *Swiss Med Wkly.* 2002;132(29-30):408-13.
155. Kubota T, Bonoutas GS, Miyagishima M, Kadokami T, Sanders VJ, Bruton C, et al. Soluble tumor necrosis factor receptor abrogates myocardial inflammation but not hypertrophy in cytokine-induced cardiomyopathy. *Circulation* 2000;101:2518–25.

156. Yokoseki O, Suzuki J, Kitabayashi H, Watanabe N, Wada Y, Aoki M, et al. Cis element decoy against nuclear factor-kappaB attenuates development of experimental autoimmune myocarditis in rats. *Circ Res.* 2001;89:899–906.
157. Fontes JA, Rose NR, Čiháková D. The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure. *Cytokine*, 2015;74(1):62–68.
158. De Luca G, Cavalli G, Campochiaro C, Tresoldi M, Dagna L. Myocarditis: An Interleukin-1-Mediated Disease? *Front Immunol.* 2018;9:1335.
159. Chang H, Wang Y, Wu W, Li G, Hanawa H, Zou J. Hydrodynamics-based delivery of an interleukin-1 receptor II fusion gene ameliorates rat autoimmune myocarditis by inhibiting IL-1 and Th17 cell polarization. *Int J Mol Med.* 2013;31(4):833-40.
160. Abbate A. The heart on fire: inflammasome and cardiomyopathy. *Exp Physiol.* 2013;98(2):385.
161. Pinsky DJ, Cai B, Yang X, Rodriguez C, Sciacca RR, Cannon PJ. The lethal effects of cytokine-induced nitric oxide on cardiac myocytes are blocked by nitric oxide synthase antagonism or transforming growth factor beta. *J Clin Invest.* 1995;95(2):677-85.
162. Diny NL, Baldeviano GC, Talor MV, Barin JG, Ong S, Bedja D, et al. Eosinophil-derived IL-4 drives progression of myocarditis to inflammatory dilated cardiomyopathy. *J Exp Med.* 2017;214(4):943-57.
163. Afanasyeva M, Wang Y, Kaya Z, Stafford EA, Dohmen KM, Sadighi Akha AA, et al. Interleukin-12 receptor/STAT4 signaling is required for the development of autoimmune myocarditis in mice by an interferon-gamma-independent pathway. *Circulation.* 2001;104(25):3145–51.
164. Nakano A, Matsumori A, Kawamoto S, Tahara H, Yamato E, Sasayama S, et al. Cytokine gene therapy for myocarditis by *in vivo* electroporation. *Hum Gene Ther.* 2001;12:1289–97
165. Watanabe K, Nakazawa M, Fuse K, Hanawa H, Kodama M, Aizawa Y, et al. Protection against autoimmune myocarditis by gene transfer of Interleukin-10 by electroporation. *Circulation.* 2001;104:1098–100.
166. Milenković M, Arsenović-Ranin N, Stojić-Vukanić Z. Miokarditis - značaj eksperimentalnih modela i autoimunskih mehanizama u etiopatogenezi bolesti. *Arh farm.* 2010;60: 13–25.
167. Liu Y, Zhu H, Su Z, Sun C, Yin J, Yuan H, et al. IL-17 contributes to cardiac fibrosis following experimental autoimmune myocarditis by a PKC β /Erk1/2/NF- κ B-dependent signaling pathway. *Int Immunol.* 2012;24(10):605-12.
168. Baldeviano GC, Barin JG, Talor MV, Srinivasan S, Bedja D, Zheng D. Interleukin-17A is dispensable for myocarditis but essential for the progression to dilated cardiomyopathy. *Circ Res.* 2010;106(10):1646-55.
169. Tada Y, Suzuki J. Oxidative stress and myocarditis. *Curr Pharm Des.* 2016;22(4):450-71.
170. Rowe GT, Eaton LR, Hess ML. Neutrophil-derived, oxygen free radical-mediated cardiovascular dysfunction. *J Mol Cell Cardiol.* 1984;16:1075-9.
171. DiFranco E, Subbanagounder G, Kim S, Murthi K, Taneda S, Monnier VM, et al. Formation and stability of pyrrole adducts in the reaction of levuglandin E2 with proteins. *Chem Res Toxicol.* 1995;8(1):61-7.
172. Balakumar P, Singh M. Possible role of poly(ADP-ribose)polymerase in pathological and physiological cardiac hypertrophy. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2006;28:683-9.
173. Pacher P, Szabo C. Role of the peroxynitrite-poly(ADP-ribose)polymerase pathway in human disease. *Am J Pathol.* 2008;173:2-13

174. Tada Y, Ogawa M, Watanabe R, Zempo H, Takamura C, Suzuki J, et al. Neovascularization induced by hypoxia inducible transcription factor is associated with the improvement of cardiac dysfunction in experimental autoimmune myocarditis. *Expert Opin Investig Drugs*. 2014;23(2):149-62.
175. Suzuki K, Izumi T, Iwanaga T, Fujita T, Shibata A. Multinucleated giant cells undergoing apoptosis in experimental autoimmune myocarditis. *Arch Histol Cytol*. 1995;58(2):231-41.
176. Arumugam S, Mito S, Thandavarayan RA, Giridharan VV, Pitchaimani V, Karuppagounder V, et al. Mulberry leaf diet protects against progression of experimental autoimmune myocarditis to dilated cardiomyopathy via modulation of oxidative stress and MAPK-mediated apoptosis. *Cardiovasc Ther*. 2013;31(6):352-62.
177. Chang H, Wang Y, Wu Y, Ma P, Song Y, Liu C, et al. Cardiac apoptosis caused by elevated cholesterol level in experimental autoimmune myocarditis. *Exp Cell Res*. 2020;395(1):112169.
178. Kytö V, Saraste A, Saukko P, Henn V, Pulkki K, Vuorinen T, et al. Apoptotic cardiomyocyte death in fatal myocarditis. *Am J Cardiol*. 2004;94(6):746-50.
179. Kaplan MH. Immunologic studies of heart tissue. I. Production in rabbits of antibodies reactive with an autologous myocardial antigen following immunization with heterologous heart tissue. *J Immunol*. 1958;80: 254-67.
180. Neu N, Rose NR, Beisel KW, Herskowitz A, Gurri-Glass G, Craig SW. Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice. *J Immunol*. 1987;139:3630-6.
181. Li HS, Ligons DL, Rose NR. Genetic complexity of autoimmune myocarditis. *Autoimmun Rev*. 2008;7(3):168-73.
182. Myers JM, Fairweather D, Huber SA, Cunningham MW. Autoimmune myocarditis, valvulitis, and cardiomyopathy. *Curr Protoc Immunol*. 2013;15:15.14.1-51.
183. Kaya Z, Katus HA, Rose NR. Cardiac troponins and autoimmunity: their role in the pathogenesis of myocarditis and of heart failure. *Clin Immunol*. 2010;134(1):80-8.
184. Göser S, Andrassy M, Buss SJ, Leuschner F, Volz CH, Ottl R, et al. Cardiac troponin I but not cardiac troponin T induces severe autoimmune inflammation in the myocardium. *Circulation*. 2006;114(16):1693-702.
185. Kaya Z, Goser S, Buss SJ, Leuschner F, Ottl R, Li J, Volkens M, et al. Identification of cardiac troponin I sequence motifs leading to heart failure by induction of myocardial inflammation and fibrosis. *Circulation*. 2008;118:2063-72.
186. albach C, Kaya Z. Cardiac Troponin I autoantibodies and their potential role in cardiac remodelling. *EBioMedicine*. 2019;48:11-12.
187. Chen RJ, Rui QL, Wang Q, Tian F, Wu J, Kong XQ. Shenfu injection attenuates lipopolysaccharide-induced myocardial inflammation and apoptosis in rats. *Chin J Nat Med*. 2020;18(3):226-33.
188. Sturgess DJ, Morrison S, Haluska B, Gobe GC, Jones MA, Volante S, et al. Left Ventricular Impaired Relaxation and Interstitial Myocarditis Identified in Sepsis-Associated Cardiac Dysfunction: Use of a Rodent Model. *Med Sci Monit*. 2021;27:e929512.
189. Watanabe Y, Shibata R, Ouchi N, Kambara T, Ohashi K, Jie L, et al. Adiponectin ameliorates endotoxin-induced acute cardiac injury. *BioMed res internat*. 2014;2014:382035.
190. Lane JR, Neumann DA, Lafond-Walker A, Herskowitz A, Rose NR. LPS promotes CB3-induced myocarditis in resistant B10.A mice. *Cell Immunol*. 1991;136(1): 219-33.
191. Tschöpe C, Ammirati E, Bozkurt B, Caforio ALP, Cooper LT, Felix SB, et al. Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: current evidence and future directions. *Nat Rev Cardiol*. 2021;18(3):169-93.

192. Merken J, Hazebroek M, Van Paassen P, Verdonschot J, Van Empel V, Knackstedt C, et al. Immunosuppressive therapy improves both short- and long-term prognosis in patients with virus-negative nonfulminant inflammatory cardiomyopathy. *Circ Heart Fail.* 2018;11(2):e004228.
193. Maleszewski JJ, Orellana VM, Hodge DO, Kuhl U, Schultheiss HP, Cooper LT. Long-term risk of recurrence, morbidity and mortality in giant cell myocarditis. *Am J Cardiol.* 2015;115(12):1733–8.
194. Jensen LD, Marchant DJ. Emerging pharmacologic targets and treatments for myocarditis. *Pharmacol Ther.* 2016;161:40–51.
195. Javadi B, Sahebkar A. Natural products with anti-inflammatory and immunomodulatory activities against autoimmune myocarditis. *Pharmacol Res.* 2017;124:34-42
196. Enayati A, Banach M, Jamialahmadi T, Sahebkar A; endorsed by the International Lipid Expert Panel (ILEP). Protective role of nutraceuticals against myocarditis. *Biomed Pharmacother.* 2022;146:112242.
197. Milenković M, Arsenović-Ranin N, Stojić-Vukanić Z, Bufan B, Vučićević D, Jančić I. Quercetin ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats. *J Pharm Pharm Sci.* 2010;13(3):311-9.
198. Zhang S, Liu X, Sun C, Yang J, Wang L, Liu J, et al. Apigenin Attenuates Experimental Autoimmune Myocarditis by Modulating Th1/Th2 Cytokine Balance in Mice. *Inflammation.* 2016;39(2):678-86.
199. Martín R, Cordova C, San Román JA, Gutierrez B, Cachafeiro V, Nieto ML. Oleanolic acid modulates the immune-inflammatory response in mice with experimental autoimmune myocarditis and protects from cardiac injury. Therapeutic implications for the human disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;72:250-62.
200. Yoshida Y, Shioi T, Izumi T. Resveratrol ameliorates experimental autoimmune myocarditis. *Circ J.* 2007;71(3):397-404.
201. Zempo H, Suzuki J, Ogawa M, Watanabe R, Tada Y, Takamura C, et al. Chlorogenic Acid Suppresses a Cell Adhesion Molecule in Experimental Autoimmune Myocarditis in Mice. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem.* 2013;13(3):232-6.
202. Mito S, Watanabe K, Harima M, Thandavarayan RA, Veeraveedu PT, Sukumaran V, et al. Curcumin ameliorates cardiac inflammation in rats with autoimmune myocarditis. *Biol Pharm Bull.* 2011;34(7):974-9.
203. D'Amico R, Fusco R, Cordaro M, Interdonato L, Crupi R, Gugliandolo E, et al. Modulation of NRF-2 Pathway Contributes to the Therapeutic Effects of *Boswellia serrata* Gum Resin Extract in a Model of Experimental Autoimmune Myocarditis. *Antioxidants (Basel).* 2022;11(11):2129.
204. Zhao P, Su G, Xiao X, Hao E, Zhu X, Ren J. Chinese medicinal herb Radix Astragali suppresses cardiac contractile dysfunction and inflammation in a rat model of autoimmune myocarditis. *Toxicol Lett.* 2008;182(1-3):29-35.
205. Hijazi A, Al Masri DS, Farhan H, Nasser M, Rammal H, Annan H. Effect of different ethanol concentrations, using different extraction techniques, on the antioxidant capacity of Lebanese *Eryngium creticum*. *IJPCBS.* 2015; 3(2): 262-71.
206. Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Anackov G, Igić R. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae) *Food Chem.* 2008;111:925–9.
207. Bozin B, Kladar N, Grujić N, Anackov G, Samojlik I, Gavarić N, et al. Impact of origin and biological source on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant properties of some St. John's wort species (*Hypericum* spp., Hypericaceae) from the Central Balkans. *Molecules.* 2013;18(10):11733–50.

208. Salaj N, Kladar N, Conic BS, Jeremic K, Barjaktarovic J, Hitl M, et al. Stabilization of sunflower and olive oils with savory (*Satureja kitaibelii*, Lamiaceae). *J Food Nutr Res.* 2020;59(3):259–71.
209. Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G. Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J Agric Food Chem.* 2006;54(5):1822–8.
210. Bozin B, Kladar N, Grujic N, Anackov G, Samojlik I, Gavaric N, et al. Impact of origin and biological source on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant properties of some St. John's wort species (*Hypericum* spp., Hypericaceae) from the Central Balkans. *Molecules.* 2013;18(10):11733–50.
211. Nezić L, Skrbić R, Dobrić S, Stojiljković MP, Jačević V, Satara SS, Milovanović ZA, Stojaković N. Simvastatin and indomethacin have similar anti-inflammatory activity in a rat model of acute local inflammation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2009;104(3):185-91.
212. Morris CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol Biol.* 2003;225:115-21.
213. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research.* CRC Press Une, Boca Raton. 1985; 123–32.
214. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods.* 1980; 38(1-2): 161-70.
215. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982; 126(1): 131-8.
216. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95(2): 351-8.
217. Beutler E. Catalase. In: Beutler E, ed. *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods.* New York: Grune and Stratton 1982; 105-106.
218. Beutler E. Superoxide dismutase. In: Beutler E, ed. *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods.* Philadelphia: Grune and Stratton; 1984:83-85.
219. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972; 247(10): 3170-5.
220. Beutler E. Reduced glutathione (GSH). In: Beutler E, ed. *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods.* New York: Grune and Stratton; 1975;112-114.
221. Smith SC. Autoimmune myocarditis. *Curr Protoc Immunol.* 2001; Chapter 15, Unit 15.14. (Suppl 31), 1–19.
222. Schmerler P, Jeuthe S, O h-Ici D, Wassilew K, Lauer D, Kaschina E, et al. Mortality and morbidity in different immunization protocols for experimental autoimmune myocarditis in rats. *Acta Physiol (Oxf).* 2014;210(4):889-98.
223. Jakovljevic V, Milic P, Bradic J, Jeremic J, Zivkovic V, Srejovic I, et al. Standardized *Aronia melanocarpa* Extract as Novel Supplement against Metabolic Syndrome: A Rat Model. *Int J Mol Sci.* 2018;20(1):6.
224. Stypmann J, Engelen MA, Troatz C, Rothenburger M, Eckardt L, Tiemann K. Echocardiographic assessment of global left ventricular function in mice. *Lab Anim.* 2009;43(2):127-37.
225. Sretenovic J, Zivkovic V, Srejovic I, Milosavljevic Z. The effects of high doses of nandrolone decanoate on cardiac muscle tissue. *Ser J Exp Clin Res.* 2016;17(4):303–308.
226. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.

227. Bljajić K, Petlevski R, Vujić L, Čačić A, Šoštarić N, Jablan J, et al. Chemical Composition, Antioxidant and α -Glucosidase-Inhibiting Activities of the Aqueous and Hydroethanolic Extracts of *Vaccinium myrtillus* Leaves. *Molecules*. 2017;22(5):703.
228. Souihi M, Ben Ayed R, Trabelsi I, Khammassi M, Ben Brahim N, Annabi M. Plant Extract Valorization of *Melissa officinalis* L. for Agroindustrial Purposes through Their Biochemical Properties and Biological Activities. *J Chem*. 2020;2020:1–12.
229. Zhang QW, Lin LG, Ye WC. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med*. 2018;13:20.
230. Naseri M, Arabi Mianroodi R, Pakzad Z, Falahati P, Borbor M, Azizi H, et al. The effect of *Melissa officinalis* L. extract on learning and memory: Involvement of hippocampal expression of nitric oxide synthase and brain-derived neurotrophic factor in diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 2021;276:114210.
231. Lin J, Chen Y, Lee Y, Rolis Hou C, Chen F, Yang D. Antioxidant, anti-proliferative and cyclooxygenase-2 inhibitory activities of ethanolic extracts from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *LWT*. 2012;49(1):1–7.
232. Jahani R, Behzad S, Saffariha M, Toufan Tabrizi N, Faizi M. Sedative-hypnotic, anxiolytic and possible side effects of *Salvia limbata* C. A. Mey. Extracts and the effects of phenological stage and altitude on the rosmarinic acid content. *J Ethnopharmacol*. 2022;282:114630.
233. Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S, et al. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *J Food Drug Anal*. 2014;22(3):296–302.
234. Ordaz JJ, Hernández JM, Ramírez-Godínez J, Castañeda-Ovando A, González-Olivares LG, Contreras-López E. Bioactive compounds in aqueous extracts of lemon balm (*Melissa officinalis*) cultivated in Mexico. *Arch Latinoam Nutr*. 2018;68(3):79–90.
235. Abubakar AR, Haque M. Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *J Pharm Bioallied Sci*. 2020;12(1):1-10.
236. Lopez-Lopez G, Moreno L, Cogolludo A, Galisteo M, Ibarra M, Duarte J, et al. Nitric oxide (NO) scavenging and NO protecting effects of quercetin and their biological significance in vascular smooth muscle. *Mol Pharmacol*. 2004;65(4):851–9.
237. Skibola CF, Smith MT. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic Biol Med*. 2000;29(3-4):375–83.
238. Saberi A, Abbasloo E, Sepehri G, Yazdanpanah M, Mirkamandari E, Sheibani V, et al. The Effects of Methanolic Extract of *Melissa officinalis* on Experimental Gastric Ulcers in Rats. *Iran Red Crescent Med J*. 2016;18(7) :e24271.
239. Martins EN, Pessano NT, Leal L, Roos DH, Folmer V, Puntel GO, et al. Protective effect of *Melissa officinalis* aqueous extract against Mn-induced oxidative stress in chronically exposed mice. *Brain Res Bull*. 2012;87(1):74–9.
240. Sohrabi F, Dianat M, Badavi M, Radan M, Mard SA. Does gallic acid improve cardiac function by attenuation of oxidative stress and inflammation in an elastase-induced lung injury? *Iran J Basic Med Sci*. 2020;23(9):1130–8.
241. Cong HH, Khaziakhmetova VN, Zigashina LE. Rat paw oedema modeling and NSAIDs: Timing of effects. *Int J Risk Saf Med*. 2015;27(1):76–7.
242. Ding S, Jiang H, Fang J. Regulation of Immune Function by Polyphenols. *J Immunol Res*. 2018;2018:1264074.
243. Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, Rossi A, Parente L, Sautebin L, et al. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br J Pharmacol*. 2004;142(2):331–8

244. Saini AK, Goyal R, Gauttam VK, Kalia AN. Evaluation of anti-inflammatory potential of *Ricinus communis* Linn leaves extracts and its flavonoids content in Wistar rats. *J Chem Pharm Res.* 2010;2(5):690–5.
245. Rocha J, Eduardo-Figueira M, Barateiro A, Fernandes A, Brites D, Bronze R, et al. Anti-inflammatory effect of rosmarinic acid and an extract of *Rosmarinus officinalis* in rat models of local and systemic inflammation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2015;116(5):398–413.
246. Lucarini R, Bernardes WA, Ferreira DS, Tozatti MG, Furtado R, Bastos JK, et al. In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of *Rosmarinus officinalis* aqueous extracts, rosmarinic acid and its acetyl ester derivative. *Pharm Biol.* 2013;51(9):1087-90.
247. Morikawa K, Nonaka M, Narahara M, Torii I, Kawaguchi K, Yoshikawa T, et al. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sci.* 2003;74(6):709–21.
248. Mitrea DR, Malkey R, Florian TL, Filip A, Clichici S, Bidian C, et al. Daily oral administration of chlorogenic acid prevents the experimental carrageenan-induced oxidative stress. *J Physiol Pharmacol.* 2020;71(1).
249. Bai J, Zhang Y, Tang C, Hou Y, Ai X, Chen X, et al. Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. *Biomed Pharmacother.* 2021;133:110985.
250. Zhong C, Wu Y, Chang H, Liu C, Zhou L, Zou J, et al. Effect of PKC inhibitor on experimental autoimmune myocarditis in Lewis rats. *Oncotarget* 2017;8(33):54187–98.
251. Sukumaran V, Watanabe K, Veeraveedu PT, Gurusamy N, Ma M, Thandavarayan RA, et al. Olmesartan, an AT1 antagonist, attenuates oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and cardiac inflammatory mediators in rats with heart failure induced by experimental autoimmune myocarditis. *Int J Biol Sci.* 2011;7(2):154-67.
252. Suzuki J, Ogawa M, Futamatsu H, Kosuge H, Sagesaka YM, Isobe M. Tea catechins improve left ventricular dysfunction, suppress myocardial inflammation and fibrosis, and alter cytokine expression in rat autoimmune myocarditis. *Eur J Heart Fail.* 2007;9(2):152-9.
253. Escher F, Tschöepe C, Lassner D, Schultheiss H-P. Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: from diagnosis to treatment. *Turk Kardiyol Dern Arsivi-Archives Turkish Soc Cardiol.* 2015;43(8):739-48.
254. Shimada K, Okabe TA, Mikami Y, Hattori M, Fujita M, Kishimoto C. Therapy with granulocyte colony-stimulating factor in the chronic stage, but not in the acute stage, improves experimental autoimmune myocarditis in rats via nitric oxide. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49(3):469-81.
255. Jeuthe S, Wassilew K, O H-Ici D, da Silva TF, Münch F, Berger F, et al. Myocardial T1 maps reflect histological findings in acute and chronic stages of myocarditis in a rat model. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2016;18:19.
256. Wu Y, Zheng Z, Cao X, Yang Q, Norton V, Adini A, et al. RIP1/RIP3/MLKL Mediates Myocardial Function Through Necroptosis in Experimental Autoimmune Myocarditis. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:696362.
257. Camporeale A, Marino F, Papageorgiou A, Carai P, Fornero S, Fletcher S, et al. STAT3 activity is necessary and sufficient for the development of immune-mediated myocarditis in mice and promotes progression to dilated cardiomyopathy. *EMBO Mol Med.* 2013;5(4):572-90.
258. Liu X, Zhu X, Wang A, Fan H, Yuan H. Effects of angiotensin-II receptor blockers on experimental autoimmune myocarditis. *Int J Cardiol.* 2009;137(3):282-8.

259. Liu H, Li W, Gu W, Kong Y, Yang N, Chen L. Immunoregulatory effects of carvedilol on rat experimental autoimmune myocarditis. *Scand J Immunol.* 2010;71(1):38-44.
260. Hirose S, Takahashi M, Ogawa R, Morimoto H, Izawa A, Sato H, et al. Erythropoietin attenuates the development of experimental autoimmune myocarditis. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2007;21(1):17-27.
261. Guang-Yi C, Li-Sha G, Yue-Chun L. Role of Heart Rate Reduction in the Management of Myocarditis. *Curr Pharm Des.* 2018;24(3):365-378.
262. Schwuchow-Thonke S, Göbel S, Emrich T, Schmitt VH, Fueting F, Klank C, et al. Increased C reactive protein, cardiac troponin I and GLS are associated with myocardial inflammation in patients with non-ischemic heart failure. *Sci Rep.* 2021;11(1):3008.
263. Machino-Ohtsuka T, Tajiri K, Kimura T, Sakai S, Sato A, Yoshida T, et al. Tenascin-C aggravates autoimmune myocarditis via dendritic cell activation and Th17 cell differentiation. *J Am Heart Assoc.* 2014;3(6):e001052.
264. Bachmaier K, Mair J, Offner F, Pummerer C, Neu N. Serum cardiac troponin T and creatine kinase-MB elevations in murine autoimmune myocarditis. *Circulation.* 1995;92(7):1927-32.
265. Arumugam S, Thandavarayan RA, Arozal W, Sari FR, Giridharan VV, Soetikno V, et al. Quercetin offers cardioprotection against progression of experimental autoimmune myocarditis by suppression of oxidative and endoplasmic reticulum stress via endothelin-1/MAPK signalling. *Free Radic Res.* 2012;46(2):154-63.
266. Wu B, Li J, Ni H, Zhuang X, Qi Z, Chen Q, et al. TLR4 Activation Promotes the Progression of Experimental Autoimmune Myocarditis to Dilated Cardiomyopathy by Inducing Mitochondrial Dynamic Imbalance. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:3181278.
267. Yuan Z, Shioji K, Kihara Y, Takenaka H, Onozawa Y, Kishimoto C. Cardioprotective effects of carvedilol on acute autoimmune myocarditis: anti-inflammatory effects associated with antioxidant property. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286(1):H83-90.
268. Ishiyama S, Hiroe M, Nishikawa T, Abe S, Shimojo T, Ito H, et al. Nitric oxide contributes to the progression of myocardial damage in experimental autoimmune myocarditis in rats. *Circulation.* 1997;95(2):489-96.
269. Pamukcu O, Baykan A, Bayram LC, Narin F, Cetin N, Narin N, et al. Anti-inflammatory role of obestatin in autoimmune myocarditis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2016;43(1):47-55.
270. Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, Cave AC, Samuel JL, Hasenfuss G, et al. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(12):2164-71.
271. Dubois-Deruy E, Cuvelliez M, Fiedler J, Charrier H, Mulder P, Hebbbar E, et al. MicroRNAs regulating superoxide dismutase 2 are new circulating biomarkers of heart failure. *Sci Rep.* 2017;7(1):14747.
272. Sharma S, Bhattarai S, Ara H, Sun G, St Clair DK, Bhuiyan MS, et al. SOD2 deficiency in cardiomyocytes defines defective mitochondrial bioenergetics as a cause of lethal dilated cardiomyopathy. *Redox Biol.* 2020;37:101740.
273. Strassburger M, Bloch W, Sulyok S, Schüller J, Keist AF, Schmidt A, et al. Heterozygous deficiency of manganese superoxide dismutase results in severe lipid peroxidation and spontaneous apoptosis in murine myocardium in vivo. *Free Radic Biol Med.* 2005;38(11):1458-70.
274. Khojasteh A, Mirjalili MH, Alcalde MA, Cusido RM, Eibl R, Palazon J. Powerful Plant Antioxidants: A New Biosustainable Approach to the Production of Rosmarinic Acid. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(12):1273.

275. Pérez-Fons L, Garzón MT, Micol V. Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid order. *J Agric Food Chem.* 2010;58(1):161–71.
276. Lynch TL, Sivaguru M, Velayutham M, Cardounel AJ, Michels M, Barefield D, et al. Oxidative Stress in Dilated Cardiomyopathy Caused by MYBPC3 Mutation. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:424751.
277. Ali HM, Ashry M. Potential Ameliorative Effect of Melissa Officinalis Ethanolic Extract on Bleomycin Induced Cardiotoxicity in Rats. *J Home Econ.* 2023;33(1):113-27.
278. Liu Y, Huang X, Liu Y, Li D, Zhang J, Yang L. Application value of hypersensitive C-reactive protein, lactic acid and myoglobin in the combined detection of myocarditis. *Exp Ther Med.* 2019;17(6):4471-76.
279. Watanabe K, Sukumaran V, Veeraveedu PT, Thandavarayan RA, Gurusamy N, Ma M, et al. Regulation of inflammation and myocardial fibrosis in experimental autoimmune myocarditis. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2011;10(3):218-25.
280. Gullestad L, Ueland T, Vinge LE, Finsen A, Yndestad A, Aukrust P. Inflammatory cytokines in heart failure: mediators and markers. *Cardiology.* 2012;122:23–35.
281. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med.* 1990;323:236-41.
282. Feldman AM, Combes A, Wagner D, Kadakomi T, Kubota T, Li YY, McTiernan C. The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35(3):537-44.
283. Mann D. Recent insights into the role of tumor necrosis factor in the failing heart. *Heart Fail Rev.* 2001;6:71-80.
284. Gordon JW, Shaw JA, Kirshenbaum LA. Multiple facets of NF- κ B in the heart: to be or not to NF- κ B. *Circ Res.* 2011;108(9):1122-32.
285. Hamid T, Guo SZ, Kingery JR, Xiang X, Dawn B, Prabhu SD. Cardiomyocyte NF- κ B p65 promotes adverse remodelling, apoptosis, and endoplasmic reticulum stress in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2011;89:129–38.
286. Watanabe K, Nakazawa M, Fuse K, Hanawa H, Kodama M, Aizawa Y, et al. Protection against autoimmune myocarditis by gene transfer of interleukin-10 by electroporation. *Circulation.* 2001;104(10):1098-100.
287. Zhou L, Huang Y, Han Z, Wang J, Sun N, Zhang R, et al. Effects of rosmarinic acid on the inflammatory response in allergic rhinitis rat models after PM2.5 exposure. *J Clin Lab Anal.* 2022;36(4):e24316.
288. Jang AH, Kim TH, Kim GD, Kim JE, Kim HJ, Kim SS, et al. Rosmarinic acid attenuates 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Int Immunopharmacol.* 2011;11(9):1271-7.
289. Peng H, Sarwar Z, Yang XP, Peterson EL, Xu J, Janic B, et al. Profibrotic Role for Interleukin-4 in Cardiac Remodeling and Dysfunction. *Hypertension.* 2015;66(3):582-9.
290. Vdovenko D, Eriksson U. Regulatory Role of CD4⁺ T Cells in Myocarditis. *J Immunol Res.* 2018;2018:4396351.
291. Xue GL, Li DS, Wang ZY, Liu Y, Yang JM, Li CZ, et al. Interleukin-17 upregulation participates in the pathogenesis of heart failure in mice via NF- κ B-dependent suppression of SERCA2a and Cav1.2 expression. *Acta Pharmacol Sin.* 2021;42(11):1780-9.
292. Liu Y, Zhu H, Su Z, Sun C, Yin J, Yuan H, et al. IL-17 contributes to cardiac fibrosis following experimental autoimmune myocarditis by a PKC β /Erk1/2/NF- κ B-dependent signaling pathway. *Int Immunol.* 2012;24(10):605-12.

293. Long Q, Li L, Yang H, Lu Y, Yang H, Zhu Y, et al. SGLT2 inhibitor, canagliflozin, ameliorates cardiac inflammation in experimental autoimmune myocarditis. *Int Immunopharmacol.* 2022;110:109024.
294. Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell death are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest.* 1996;74:86–107.
295. Hong BK, Kwon HM, Byun KH, Kim D, Choi EY, Kang TS, et al. Apoptosis in dilated cardiomyopathy. *Korean J Intern Med.* 2000;15(1):56-64.
296. Frustaci A, Chimenti C, Pieroni M, Salvatori L, Morgante E, Sale P, et al. Cell death, proliferation and repair in human myocarditis responding to immunosuppressive therapy. *Mod Pathol.* 2006;19(6):755-65.
297. Kim PK, Kwon YG, Chung HT, Kim YM. Regulation of caspases by nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;962:42-52.
298. Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene.* 1999;18(54):7719-30.
299. Xu T, Ding W, Ji X, Ao X, Liu Y, Yu W, et al. Oxidative Stress in Cell Death and Cardiovascular Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:9030563.
300. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(9):621-32.
301. Luo W, Tao Y, Chen S, Luo H, Li X, Qu S, et al. Rosmarinic Acid Ameliorates Pulmonary Ischemia/Reperfusion Injury by Activating the PI3K/Akt Signaling Pathway. *Front Pharmacol.* 2022;13:860944.
302. Barteková M, Šimončíková P, Fogarassyová M, Ivanová M, Okruhlicová Ľ, Tribulová N, et al. Quercetin improves postischemic recovery of heart function in doxorubicin-treated rats and prevents doxorubicin-induced matrix metalloproteinase-2 activation and apoptosis induction. *Int J Mol Sci.* 2015;16(4):8168-85.
303. Liu CJ, Yao L, Hu YM, Zhao BT. Effect of Quercetin-Loaded Mesoporous Silica Nanoparticles on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Rats and Its Mechanism. *Int J Nanomedicine.* 2021;16:741-752.
304. Jing Z, Wang Z, Li X, Li X, Cao T, Bi Y, et al. Protective effect of quercetin on posttraumatic cardiac injury. *Sci Rep.* 2016;6:30812.
305. Yu BW, Li JL, Guo BB, Fan HM, Zhao WM, Wang HY. Chlorogenic acid analogues from *Gynura nepalensis* protect H9c2 cardiomyoblasts against H₂O₂-induced apoptosis. *Acta Pharmacol Sin.* 2016;37(11):1413-22.
306. Jin L, Piao ZH, Liu CP, Sun S, Liu B, Kim GR, et al. Gallic acid attenuates calcium calmodulin-dependent kinase II-induced apoptosis in spontaneously hypertensive rats. *J Cell Mol Med.* 2018;22(3):1517-26.
307. Koczurkiewicz-Adamczyk P, Kłaś K, Gunia-Krzyżak A, Piska K, Andrysiak K, Stępniewski J, et al. Cinnamic Acid Derivatives as Cardioprotective Agents against Oxidative and Structural Damage Induced by Doxorubicin. *Int J Mol Sci.* 2021;22(12):6217.
308. Parichatikanond W, Luangmonkong T, Mangmool S, Kurose H. Therapeutic Targets for the Treatment of Cardiac Fibrosis and Cancer: Focusing on TGF- β Signaling. *Front Cardiovasc Med.* 2020;7:34.
309. Zhang X, Ma ZG, Yuan YP, Xu SC, Wei WY, et al. Rosmarinic acid attenuates cardiac fibrosis following long-term pressure overload via AMPK α /Smad3 signaling. *Cell Death Dis.* 2018;9(2):102.
310. Luo C, Zou L, Sun H, Peng J, Gao C, Bao L, et al. A Review of the Anti-Inflammatory Effects of Rosmarinic Acid on Inflammatory Diseases. *Front Pharmacol.* 2020;11:153.

311. Shen P, Lin W, Deng X, Ba X, Han L, Chen Z, et al. Potential Implications of Quercetin in Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 2021;12:689044.

БИОГРАФИЈА

Мр фарм Невена Лазаревић (дев. Драгинић) рођена је 18.02.1993. у Крагујевцу, Република Србија. Завршила је основну школу и Другу крагујевачку гимназију као носилац дипломе „Вук Караџић“. Школске 2012/2013 уписала је Факултет медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, Интегрисане академске студије фармације, а дипломирала је 12.07.2017. са просечном оценом 9,65 као добитник стипендије „Доситеја“ Фонда за младе таленте. Као учесник SEP програма провела је месец дана стручне праксе на Факултету *Collegium medicum* у Бидгошчу, Универзитет Никола Коперникус, Пољска. Септембра 2017. уписала је Докторске академске студије и од тада се активно бави научно истраживачким радом у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију којом руководи проф. др Владимир Јаковљевић. Обавила је приправнички стаж и положила стручни испит пред комисијом Министарства здравља априла 2018. Од децембра 2018. запослена је као истраживач-приправник Министарства просвете, науке и технолошког развоја на Факултету медицинских наука, ужа научна област Фармацеутска биотехнологија. Јануара 2021. изабрана је у звање сарадника у настави, а од децембра 2021. носи звање асистента. Школске 2020/2021 уписала је специјалистичке студије Медицинске биохемије, Факултета медицинских наука. Тренутно је студент треће године Докторских академских студија, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје – Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином. Положила је све програмом предвиђене испите са просечном оценом 10,00, као и усмени докторски испит са оценом 10. Говори, чита и пише енглески језик и одлично познаје рад на рачунару. Била је учесник више домаћих и међународних научних конгреса. У библиографији до сада има 30 радова објављених у целини, од којих је 24 са SCI листе.

БИБЛИОГРАФИЈА

- **Draginic ND**, Jakovljevic VL, Jeremic JN, Srejovic IM, Andjic MM, Rankovic MR, Sretenovic JZ, Zivkovic VI, Ljubic BT, Mitrovic SL, Bolevich SS, Bolevich SB, Milosavljevic IM. *Melissa officinalis* L. Supplementation Provides Cardioprotection in a Rat Model of Experimental Autoimmune Myocarditis. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:1344946. doi: 10.1155/2022/1344946.
- **Draginić N**, Anđić M, Jeremić J, Živković V, Kocović A, Tomović M, Božin B, Kladar N, Bolevich S, Jakovljević V, Milosavljević I. Anti-inflammatory and Antioxidant Effects of *Melissa officinalis* Extracts: A Comparative Study. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2022; 21(1):e126561. DOI: 10.5812/ijpr-126561.
- **Draginic N**, Jakovljevic V, Andjic M, Jeremic J, Srejovic I, Rankovic M, Tomovic M, Nikolic Turnic T, Svistunov A, Bolevich S, Milosavljevic I. *Melissa officinalis* L. as a Nutritional Strategy for Cardioprotection. *Front Physiol*. 2021 Apr 22;12:661778. doi: 10.3389/fphys.2021.6617

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

" Утицај хроничне администрације екстракта матичњака (*Melissa officinalis, Lamiaceae*) на развој и прогресију експерименталног аутоимунског миокардитиса пацова " представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 17.5.2023 године,



потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:
"Утицај хроничне администрације екстракта матичњака (*Melissa officinalis*, *Lamiaceae*)
на развој и прогресију експерименталног аутоимунског миокардитиса пацова"
истоветне.

У Крагујевцу, 17.5.2023. године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, **Невена Лазаревић,**

дозвољавам

не дозвољавам

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

" Утицај хроничне администрације екстракта матичњака (*Melissa officinalis*, *Lamiaceae*) на развој и прогресију експерименталног аутоимунског миокардитиса пацова "

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

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

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.

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

У Крагујевцу, 17.5.2023 године,



потпис аутора

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