



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

Тања Шобот

**Утицај субхроничног оптерећења хомоцистеином на
коронарну хемодинамику и оксидациони стрес код
пацова: ефекти сумпоровитих аминокиселина
(метионина, N-ацетилцистеина и цистеина) и
неорганиског Na-хидрогенсулфида**

Докторска дисертација

Ментор: др сци. мед. Драган Ђурић, редовни професор

Крагујевац, 2019. године

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>
Име и презиме: Тања Шобот
Датум и место рођења: 24. април 1978. године, Бањалука, Република Српска, БиХ
Садашње запослење: Виши асистент на Катедри за физиологију, Медицински факултет Универзитета у Бањалуци
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: Утицај субхроничног оптерећења хомоцистеином на коронарну хемодинамику и оксидациони стрес код пацова: ефекти сумпоровитих аминокиселина (метионина, N-ацетилцистеина и цистеина) и неорганског Na-хидрогенсулфида
Број страница: 170
Број слика: 3 слике, 8 табела, 125 графикана
Број библиографских података: 200
Установа и место где је рад израђен: Лабораторија за кардиоваскуларну физиологију, Институт Факултета медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: др сци. мед. Драган Ђурић, редовни професор
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 08.12.2015.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-03-340/10 од 11.05.2016. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник; 2. Проф. др Владимир Живковић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан; 3. НС Душко Благојевић, научни саветник Института за билошка истраживања "Синиша Станковић" у Београду за ужу научну област Физиологија, члан.
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник; 2. Проф. др Владимир Живковић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан; 3. Проф. др Ненад Понорац, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци за ужу научну област Физиологија, члан.
Датум одбране дисертације:

САЖЕТАК

Увод: Све је већа истраживачка заинтересованост за деловање сумповитих једињења на кардиоваскуларни систем, под физиолошким и патолошким условима.

Циљ: Циљ ове експерименталне студије био је испитивање ефеката акутне примене сумповитих аминокиселина (L-метионина, L-цистеина, N-ацетилцистеина) и неорганског Na-хидрогенсулфида на кардиодинамске параметре, коронарни проток и редокс равнотежу код пацова са нормалним и повишеним вредностима хомоцистеина у крви.

Материјал и методе: Истраживање је обухватило 80 *Wistar albino* пацова које смо поделили у две групе: контролна група (двонедељни третман са 0,9 % NaCl) и експериментална група (субхронична примена DL-хомоцистеина, у дози од 0,45 $\mu\text{mol/g}$ телесне масе, два пута дневно, субкутано, у трајању од 14 дана). Након двонедељног третмана, пацови су жртвовани при чему су прикупљени узорци крви за анализу концентрација укупног хомоцистеина и биомаркера системског оксидационог стреса. Извршена је процедура изоловања срца пацова, у циљу успостављања ретроградне перфузије кроз срце методом по Лангендорфу и спровођења акутног третмана сумповитим аминокиселинама (L-Meth, L-Cys, NAC) и неорганским Na-хидрогенсулфидом (NaHS). Сумповите супстанце су примењене у истој дози од 0.5 mmol/L , у трајању од 5 минута. У левој комори су континуирано праћени параметри функције леве коморе: dp/dt_{max} , dp/dt_{min} , SLVP, DLVP и HR. Коронарни проток (CF) се одређивао флоуметријски. У узорцима крвне плазме и узорцима коронарног перфузата, спектрофотометријским методама, одређивани су биомаркери оксидационог стреса: индекс липидне пероксидације (TBARS), азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-), супероксид анјон радикал (O_2^-) и водоник пероксид (H_2O_2). У хемолизату еритроцита су мерени параметри антиоксидационог система заштите: каталаза (CAT), супероксид дисмутаза (SOD) и редуковани глутатион (GSH).

Резултати: Резултати истраживања су приказани кроз 6 табела и 125 графикона. Концентрације укупног хомоцистеина су биле значајно повишене у експерименталној у односу на контролну групу пацова, и као такве изазивају знатне промене у функцији кардиоваскуларног система. Такође, акутни ефекти примењених сумповитих супстанци су показали значајне разлике у односу на третман DL- хомоцистеином, на основу чега закључујемо да сумповите супстанце испољавају различито дејство на кардиоваскуларни систем у зависности од присуства хомоцистеина.

Закључци: Анализом резултата овог истраживања закључује се да ефекти сумповитих аминокиселина (L-Meth, L-Cys, NAC) и неорганског NaHS имају значајну улогу у патофизиологији кардиоваскуларног система при чему им је главна карактеристика дозно-зависан ефекат на функцију кардиоваскуларног система што је и основна карактеристика једињења која у свом саставу имају сумпор.

Кључне речи: хомоцистеин, коронарна хемодинамика, оксидациони стрес, сумповите аминокиселине, пацов

ABSTRACT

Introduction: There is growing interest in the activity of sulfur-containing compounds on cardiovascular system in physiological and pathological conditions.

Aim: Aim of this study was to assess possible differences in the effects of various sulfur-containing compounds on cardiodynamic parameters, coronary flow and redox balance of cardiovascular system, in its physiological state and in the early onset of hyperhomocysteinemia.

Material and methods: This study divided Wistar albino rats into two groups: saline treated (control group) and DL-homocysteine-treated (experimental group). Rats from experimental group were subjected to subchronic subcutaneous administration of DL-homocysteine at dose of 0.45 $\mu\text{mol/g}$ body weight, twice a day for 2 weeks. At the end of this period, rats were sacrificed, and blood samples were collected to be analysed for homocysteine concentration and biomarkers of systemic oxidative stress. Isolated rat hearts were excised and attached to the Langendorff apparatus. To assess the effects of acute administration of L-methionine, L-cysteine, N-acetylcysteine, and sodium hydrogen sulfide, the hearts were perfused individually with each of the mentioned substances at same single dose of 0.5 mmol/L for 5 min. Before, during and after perfusion of isolated rat heart (control, effect and washout) we continuously monitored (after insertion and placement a sensor in the left ventricle) the cardiodynamic parameters: a) dp/dt max - maximum rate of change of left ventricle pressure, b) dp/dt min - minimum rate of change of left ventricle pressure, v) SLVP - systolic left ventricular pressure, G) DLVP - diastolic left ventricular pressure and d) HR - heart rate. In the blood and effluent samples we measured biomarkers of oxidative stress: an index of lipid peroxidation (TBARS), nitric oxide in the form of nitrite (NO_2^-), superoxide anion radical (O_2^-), and hydrogen peroxide (H_2O_2), and the parameters of antioxidant protection system: catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and reduced glutathione (GSH).

Results: The research results are presented in 6 tables and 125 graphs. Total homocysteine level was significantly higher in the experimental group than in the control group, and the effects of applied sulfur-containing compounds were significantly different in experimental and control groups. DL-homocysteine induced considerable changes in functioning of cardiovascular system even before an increase in plasma homocysteine values, and action of sulfur-containing compounds varied depending on the presence of homocysteine.

Conclusions: After analyzing the results of this study, it is concluded that the effects of sulfuric amino acids (L-Meth, L-Cys, NAC) and inorganic NaHS play a significant role in the pathophysiology of the cardiovascular system, whereby their the main characteristic is the dose-dependent effect on the function of the cardiovascular system, which is the dominant quality of sulfur-containing compounds.

Key words: homocysteine, coronary haemodynamics, oxidative stress, sulfur amino acids, rat

Цијењени проф. др Драган Ђурић и проф. др Владимир Јаковљевић,

Два велика човјека, два неисцрпна научника су мој улаз у свијет науке....

Они су "срце и душа" ове докторске дисертације...

Бескрајно Вам хвала!

Мој ментор, проф. др Драган Ђурић ми је указао велико повјерење... не могу заборавити наш први сусрет када сам као "дете из Републике Српске" постала докторант и када је несебично пристао да ме води кроз научно-истраживачки рад...

Мој драги проф. др Владимир Јаковљевић, који ми је отворио врата Лабораторије за кардиоваскуларну физиологију, био рјешење сваког проблема... према коме осјећам искрено дивљење и поштовање...

Велику захвалност дугујем и драгим колегама Лабораторије за кардиоваскуларну физиологију у Крагујевцу, који су примјер вриједних, талентованих, амбициозних истраживача.... Тамара, Иване, Владо, Јована, Исидора, Предраже и све остале колеге, ...хвала Вам за гостопримство и несебичну помоћ...

Захвалност дугујем и својој матичној кући, Катедри за физиологију Медицинског факултета у Бањалуци...

И наравно, моји најмилији....мој извор живота...

... синови Јован и Марко, супруг Никола, мајка Јела, отац Саво, Жана, Мица.....хвала!

САДРЖАЈ

1. УВОД	10
1.1. Метионин	10
1.2. Метаболизам метионина	13
1.3. Хомоцистеин	15
1.3.1. Хемијске карактеристике хомоцистеина	15
1.3.2. Метаболизам хомоцистеина	17
1.4. Поремећај метаболизма метионина и хомоцистеина	20
1.4.1. Ензимски поремећаји метаболизма метионина и хомоцистеина	20
1.4.2. Неензимски поремећаји метаболизма метионина и хомоцистеина	22
1.5. Улога хомоцистеина у патофизиологији настанка и развоја кардиоваскуларних болести	27
1.6. Улога хомоцистеина у (дис)функцији ендотела	31
1.7. Улога оксидационог стреса у патофизиологији кардиоваскуларног система	33
1.8. Сумпоровите аминокиселине и неогрански NaHS-значај и примена	36
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	40
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	43
3.1. Материјал	43
3.1.1. Аминокиселине употребљене у студији	43
3.1.2. Супстанце за прављење сложеног Кребсовог раствора	43
3.1.3. Супстанце и реагенси за одређивање параметара оксидационог стреса	43
3.2. Етички аспекти	44
3.3. Протокол студије	44
3.4. Изоловање срца пацова	46
3.5. Лангендорф апарат	48
3.6. Протокол перфузије изолованог органа по Лангендорф техници	49
3.7. Биохемијске анализе	50
3.7.1. Одређивање хомоцистеина (Hcy)	50
3.7.2. Одређивање супероксид анјон радикала (O_2^-)	51
3.7.3. Одређивање водоник пероксида (H_2O_2)	51
3.7.4. Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS)	53
3.7.5. Одређивање азот монооксида у форми нитрита (NO_2^-)	54
3.7.6. Одређивање редукованог глутатиона (GSH)	56
3.7.7. Одређивање супероксид дисмутазе (SOD)	56
3.7.8. Одређивање каталазе (CAT)	56
3.8. Статистичка анализа података	57

4. РЕЗУЛТАТИ	58
4.1. Концентрација хомоцистеина у односу на третман DL-Нсу	58
4.2. Динамика кардиодинамских параметара унутар контролних група пацова	59
4.3. Динамика кардиодинамских параметара унутар експерименталних група пацова	81
4.4. Динамика прооксидационих маркера у коронарном венском ефлуенту унутар контролних група пацова	103
4.5. Динамика прооксидационих маркера у коронарном венском ефлуенту унутар експерименталних група пацова	118
4.6. Прооксидациони маркери у крвној плазми у односу на третман DL-Нсу	134
4.7. Маркери антиоксидационог система заштите	135
5. ДИСКУСИЈА	138
5.1. Ефекти сумповоритих једињења на биорасположивост укупног хомоцистеина	140
5.2. Ефекти сумповоритих једињења на функцију миокарда и коронарни проток	141
5.3. Ефекти сумповоритих аминокиселина на биомаркере оксидационог стреса	145
6. ЗАКЉУЧЦИ	151
7. ЛИТЕРАТУРА	154

СКРАЋЕНИЦЕ:

АТР, аденозин-трифосфат;
ADMA, асиметрични диметиларгинин;
Cys, цистеин;
CPP, коронарни перфузиони притисак;
CF, коронарни проток;
CAT, каталаза;
CBS, цистатион β -синтаза;
CGL, цистатион γ -лиаза;
GSH, редуковани глутатион;
DLVP, дијастолни притисак у левој комори;
 dp/dt_{max} , максимална стопа промене притиска у левој комори;
 dp/dt_{min} , минимална стопа промене притиска у левој комори;
Hcy, хомоцистеин;
Hhcy, хиперхомоцистеинемија;
 H_2O_2 , водоник пероксид;
 H_2S , водоник сулфид;
HR, срчана фреквенција;
HPLC, течна хроматографија под високим притиском;
5-MTHF, 5-метилтетрахидрофолат;
MTHFR, метилтетрахидрофолат-редуктаза;
MS, метионин синтаза;
MR, метионин редуктаза;
Meth, метионин;
NAC, N-ацетилцистеин;
NaHS, натријум-хидрогенсулфид;
 NO_2^- , нитрити;
NO, азот моноксид;
NOS, азот моноксид синтаза;
 O_2^- , супероксид анион радикал;
OH, хидроксил радикал;
PLP, пиридоксал 5'-пирофосфат;
PAR, протеаза-активирани рецептори;
ROS, реактивне кисеоничке врсте;
RNS, реактивне азотне врсте;
RSS, реактивне сумповите врсте;
SOD, супероксид дисмутаза;
SAM, S-аденозилметионин;
SAH, S-аденозилхомоцистеин;
SLVP, систолни притисак леве коморе.

УВОД

1. УВОД

1.1. Метионин као аминокиселина

Аминокиселине су једињења која у свом молекулу садрже амино и карбоксилну групу ($-\text{NH}_2$; $-\text{COOH}$), а у чији састав улазе елементи угљеник, водоник, азот и кисеоник. Аминокиселине имају важну улогу у многим биохемијско-метаболичким реакцијама и структурни су део протеина и органских молекула који изграђују ћелије, ткива и органе. У природи постоји више од пет стотина аминокиселина, али се протеини свих врста, од бактерија до људи, састоје од само њих двадесет. Одрастао човек може синтетисати све изузев девет аминокиселина које се називају есенцијалним аминокиселинама и морају се уносити егзогеним путем. Функционална сложеност протеина и варијабилност структура произилази из различитих комбинација аминокиселина које се везују у полимере (1-6).

Све аминокиселине које граде протеине су алфа аминокиселине, јер су амино и карбоксилна група аминокиселина везане за исти алфа атом угљеника. Структуру аминокиселина значајно детерминише и положај бочног ланца (R), који игра важну улогу у предиспозицији за одређене особине аминокиселина. Постоје ароматични и алифатични бочни ланци. Они у свом саставу могу имати различите реактивне групе, поларне, хидрофилне или хидрофобне и сл. (4-7).

Метионин (α -амино γ -метил тиобутерна киселина) је есенцијална аминокиселина која спада у тиоаминске киселине односно у аминокиселине које у својој структури садрже сумпор. Хемијска структура метионина је врло слична структури других аминокиселина, а различитост хемијске структуре је резултат различитих хемијских особина бочног низа R (Слика 1). У групу есенцијалних аминокиселина спада метионин, поред других као што су валин, леуцин, изолеуцин, треонин, лизин, фенилаланин и триптофан (8-11). У Табели 1 су приказане и упоређене хемијске карактеристике метионина са другим аминокиселинама.

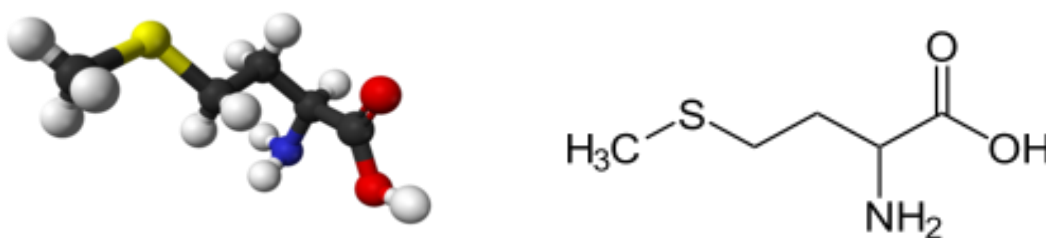
Табела 1. Хемијске особине метионина и других аминокиселина

Аминокиселина		M_r	pK_a			PI	Удео у протеинима (%)
			pK_1 (-COOH)	pK_2 (-NH ₃)	pK_r (R група)		
Неполарне, алифатичне R	Глицин	75	2,34	9,60		5,97	7,2
	Аланин	89	2,34	9,69		6,01	7,8
	Валин	117	2,32	9,62		5,97	6,6
	Леуцин	131	2,36	9,60		5,98	9,1
	Изолеуцин	131	2,36	9,68		6,02	5,3
	Метионин	149	2,28	9,21		5,74	2,3
Ароматичне R	Фенилаланин	165	1,83	9,13		5,48	3,9
	Тирозин	181	2,20	9,11	10,07	5,66	3,2
	Триптофан	204	2,38	9,39		5,89	1,4
Поларне неутралне R	Серин	105	2,21	9,15		5,68	6,8
	Пролин	115	1,99	10,96		6,48	5,2
	Треонин	119	2,11	9,62		5,87	5,9
	Цистеин	121	1,96	10,28	8,18	5,07	1,9
	Аспарагин	132	2,02	8,80		5,41	4,3
	Глутамин	146	2,17	9,13		5,65	4,2
Позитивне R	Лизин	146	2,18	8,95	10,53	9,74	5,9
	Хистидин	155	1,82	9,17	6,00	7,59	2,3
	Аргинин	174	2,17	9,04	12,48	10,76	5,1
Негативне R	Аспарагинска	133	1,88	9,60	3,65	2,77	5,3
	Глутаминска	147	2,19	9,67	4,25	3,22	6,3

Метионин има висок значај у организму јер учествује у синтези протеина, трансметилационим реакцијама, синтези цистеина и цистина односно других тиоаминских аминокиселина (9, 10). У низу трансметилационих реакција, метионин учествује као дозор метил групе. Учествује у реакцијама при чему настају биолошки важна једињења као што је креатин, адреналин, ансерин, саркозин, бетаин, карнитин, холин и полиамин. Метил група везана за сумпор као део метионина, у

трансметилационим реакцијама може се пренети на друго једињење. Реакција почиње учешћем аденозин-трифосфата (АТФ) у везивању аденозина за метионин, при чему настаје S-аденозилметионин (SAM) или активни метионин под утицајем ензима S-аденозилметионин трансферазе. Из овакве активне форме метионина, метил група се врло лако преноси на амино или хидроксилну групу примаоца (12, 13).

Слика 1. Хемијска структура метионина ($C_5H_{11}NO_2S$)



Метионин као есенцијална аминокиселина се налази у спољашњој средини, не ствара се у организму па се зато мора уносити путем хране. Предоминантно се налази у воћу и поврћу, посебно у спанаћу, пасуљу, пистаћима и лешницима, рибљем месу и сиру (14, 15).

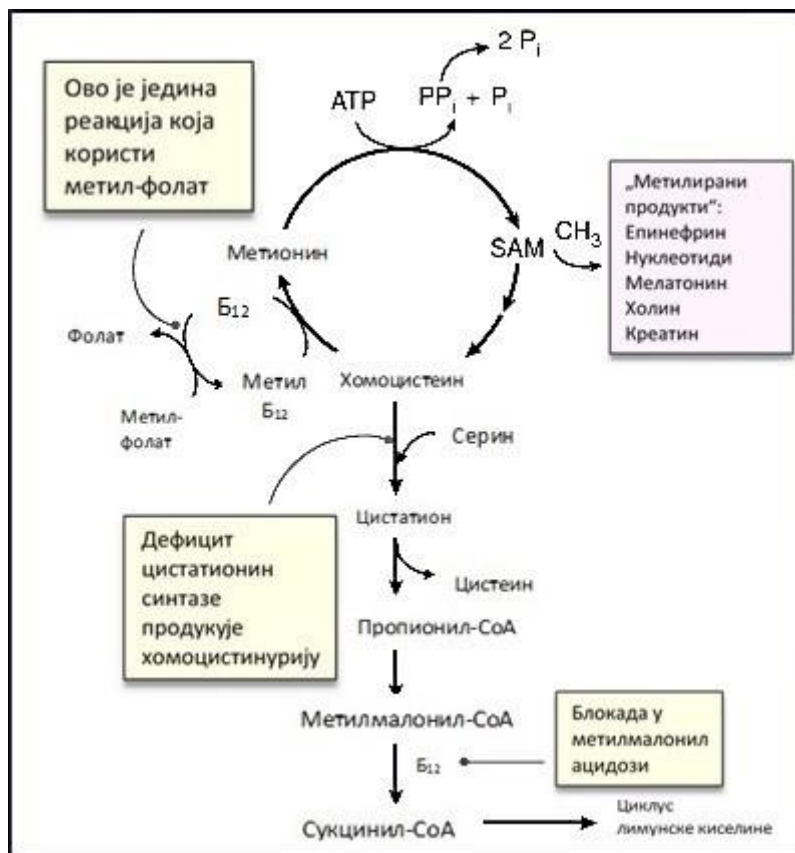
Након уношења метионина оралним путем, апсорпција метионина почиње у горњем делу гастроинтестиналног система, односно у почетном делу танког црева. Укупна количина метионина која се метаболише у гастроинтестиналном тракту након уношења оралним путем је око 20% од укупне унете количине. Метаболисана количина метионина се путем крви преноси до циљних ткива и органа при чему отпочиње процес биорасположивости метионина. Путем натријум зависних и независних транспортних канала метионин бива преузет у ћелију, након чега се користи даље за процесе синтетисања протеина и друге метаболичке процесе, у којима суделују и други чиниоци важни у метаболизму метионина, као што су витамини Б групе (16, 17).

1.2. *Метаболизам метионина*

Метаболизам метионина подразумева низ биохемијских реакција током којих настаје крајњи производ сукцинил-СоА (18). Слично метаболизму других аминокиселина као што су треонин, валин и изолеуцин, и метионин пролази сличан пут разградње и настанка крајњих продуката. Есенцијалне аминокиселине метионин, треонин, валин и изолеуцин разградњом дају пропионил-СоА, а оно што је заједничко катаболизму ових аминокиселина је да преводе пропионил-СоА у сукцинил-СоА. Пропионил-СоА такође настаје оксидацијом масних киселина са непарним бројем С-атома. Пропионил-СоА се карбоксилише у реакцији за коју је неопходан биотин и гради D-метилмалонил-СоА, који се затим рацемизује и даје L-метилмалонил-СоА, супстрат за реакцију у којој настаје сукцинил-СоА, интермедијер циклуса лимунске киселине (19-23).

Пут разлагања метионина започиње превођењем метионина у S-аденозилметионин (SAM) који предаје метил групу другим једињењима и тако прелази у S-аденозилхомоцистеин (SAH), а затим даље у хомоцистеин. При томе, превођењем SAM у SAM настају метилирани производи: епинефрин, нуклеотиди, мелатонин, холин, креатин. Разградња метионина до хомоцистеина је могућа једино уз присуство метил фолата и витамина B₁₂ (24, 25). Алтернативним путем се из хомоцистеина, у присуству пиридоксал-фосфат-зависних ензима, обезбеђује сумпор који се уграђује у цистеин. При томе се угљенични скелет хомоцистеина метаболише до алфа-кетобутирата, који се оксидативном декарбоксилацијом преводи у пропионил-СоА, а даље преко метилмалонил-СоА у присуству витамина B₁₂ у сукцинил-СоА. Заправо, метаболизам метионина као сумпоровите аминокиселине се заснива на синтези цистеина, која представља главни пут у метаболизму метионина (*Слика 2*) (26).

Слика 2. Превођење метионина у сукцинил-СоА преко метилмалонил-СоА.



1.3. *Хомоцистеин*

1.3.1. Хемијске карактеристике хомоцистеина

Хомоцистеин, квантитативно главни метаболит метионина, је аминокиселина чија је хемијска структура позната од 1932 године. Хомоцистеин је са чисто хемијског аспекта аминокиселина, а ако се са биохемијског аспекта појам аминокиселине персонификује са субјединицом у синтези протеина, хомоцистеин то заправо није, јер у поменутом процесу не учествује. Исти се наједноставније може назвати метаболитом есенцијалне аминокиселине метионина. Настанак хомоцистеина је сложен биохемијски процес, врло фино регулисан, који на свом значају добија, тек онда када се сагледа чињеница да учествује у реметилационом циклусу који поново води ка синтези, односно обнављању метионина. Метаболизам метионина започиње учешћем у синтези протеина, односно синтези активног S-аденозилметионина, који се понаша као донор метил групе за различите акцепторске молекуле (протеине, нуклеинске киселине, фосфолипиде, неуротрансмитере) уз настајање S-аденозилхомоцистеина, затим његовом хидролизом хомоцистеина. Метаболички пут бива, у наредној фази, затворен ресинтезом метионина из хомоцистеина, или један део хомоцистеина бива неповратно метаболисан до цистеина (27, 28).

Хомоцистеин се у организму налази слободан (редуковани облик) и у облику дисулфида (оксидоване форме). Слободног, или редукованог хомоцистеина, има 1–2% у односу на његову укупну количину. Хомоцистин представља оксидовани облик хомоцистеина, док остале оксидоване форме обухватају мешане дисулфиде са цистеинским и цистинским остацима пронађеним у протеинима. Заправо, најзаступљенији облик, који се у организму налази и до 80%, је хомоцистеин везан за протеине, првенствено албумине (29).

Хомоцистеин се заједно са цистеином, глутатионом и сл. убраја у карактеристична аминокиселина једињења организма сисара. Термин »тиоли« се односи на присуство сулфхидрилне (-SH) групе, која детерминише хемијске карактеристике ових једињења: рК вредност, односно оксидо-редукциони потенцијал као капацитет за формирање слободних радикала. Цистеин и хомоцистеин су мале молекуле мале молекулске масе ($M_r=121,2$, и $135,1$). Хомоцистеин има једну метиленску групу више. Глутатион је трипептид (γ -глутамил-цистеин-глицин) веће молекулске масе $M_r=307,3$, у коме је

цистеин извор тиол групе. И поред очигледне сличности у хемијском саставу аминокиселина, њихова улога у организму је различита (30, 31, 32). Генерално посматрано, тиолна једињења ступају лако у хемијске реакције због високе реактивности како сумпора тако и кисеоника. Сумпор и кисеоник се налазе у истој групи периодног система елемената, па тако деле многе сличности када су у питању хемијске особине. Одатле порекло бројних сличности у хемијском понашању тиолне (-SH) групе и алкохолне групе (-OH). Сумпор као мање електронегативан елемент од кисеоника има и мању енергију дисоцијације, што се односи и на тиолну у односу на алкохолну групу. Оваква разлика електронегативности атома сумпора и кисеоника није препрека за снажну експресију сумпорних анјона у различитим хемијским реакцијама. Са порастом рН, сулфхидрилна група брже подлеже оксидацији у односу на алкохолну групу, што је и велика разлика између ове две групе органских једињења (33, 34).

У физиолошким условима, тиоли се највећим делом оксидују до дисулфида (RSSR). Са хемијског аспекта могућност оксидације до сулфеничне (RSOH), сулфиничне (RSO₂H) и сулфоничне киселине (RSO₃H) је врло мала, јер је иста карактеристична за присуство јачих оксидационих агенаса, несвојствених физиолошким условима. Оксидо-редукциони потенцијал биолошки значајних тиола и дисулфида је сличан и креће се у распону од -0,2 до -0,4 V. Алифатични тиоли учествују у низу редокс реакција и интерагују са низом других биолошких једињења као што су флавопротеини, цитохроми, аскорбат као и реактивни кисеонични радикали. Код свих поменутих реакција тиоли се трансформишу у одговарајуће дисулфиде. Карактеристична је могућност оксидације тиола у присуству металних јона, као катализатора, која за последицу има надградњу нестабилног тиол радикала (RS·). Реакције тиола са халидима привлаче пажњу због могућег утицаја на биохемијске процесе васкуларног система (35, 36).

Посебну пажњу изазива специфично стварање цикличног хомоцистеин-тиолактона, који настаје искључиво из хомоцистеина. Хомоцистеин-тиолактон је значајан из разлога што његова разградња може мењати експресију других тиол-зависних ензима. Циклизација хомоцистеина се убрзава снижавањем рН, а значајна је и под физиолошким условима (37-39).

1.3.2. Метаболизам хомоцистеина

Посматрајући са хемијског аспекта хомоцистеин је аминокиселина. Међутим, са биохемијског аспекта када се посматрају биолошки процеси у којима учествују аминокиселине (синтеза протеина), онда кажемо да хомоцистеин није аминокиселина јер у тако виталним процесима не учествује (40, 41). Заправо, најтачнији назив за хомоцистеин је тај да је то метаболит есенцијалне аминокиселине метионина, а његов настанак је врло комплексан процес (41, 42). Сам процес синтезе хомоцистеина је строго регулисан процес, са фундаменталним значајем у реметилизацији која доводи до поновног стварања и обнављања метионина као есенцијалне аминокиселине. Сам процес разградње метионина започиње процесом синтезе S-аденозилметионина (SAM), који се понаша као донор метил групе уз издвајање S-аденозилхомоцистеина (SAH), тј. самог хомоцистеина (43). Крајњи процеси у метаболизму метионина јесу процеси ресинтезе метионина од хомоцистеина, при чему у зависности од присуства кофактора један део хомоцистеина бива разграђен до цистеина и елиминисан (43).

Кључан низ реакција у метаболизму хомоцистеина, али и метионина је циклус метионин-хомоцистеин-метионин, као сложен низ хемијских реакција у присуству мноштво ензима и кофактора. Две најважније реакције у овом циклусу су настајање SAM под утицајем метионин-аденозил-трансферазе, а друга је реметилација хомоцистеина до метионина. Ензим метионин-аденозил-трансфераза има три изоформе, од којих је једна са високом вредношћу K_m (Michaelis-Menten-ова константа) и која једина омогућава јетри да позитивно одговори на повишене вредности метионина у исхрани и самим тим у циркулацији, када јетра преузима примарну улогу у разградњи хомоцистеина (44, 45). Активни метионин или SAM се у трансметилационој реакцији понаша као донор метил групе за различите акцепторске молекуле (протеине, нуклеинске киселине, фосфолипиде, неуротрансмитере) уз настајање SAH, а затим његовом хидролизом хомоцистеина. Друга могућност је да SAM улази у процес декарбоксилације уз каталитичку активност ензима аденозил-метионин-декарбоксилазе, што има за последицу ресинтезу метионина. Само 10% SAM одлази на процес декарбоксилације, а остатак на синтезу хомоцистеина.. Дакле, око 90% је одвојено да буде извор метил групе, која под утицајем трансфераза и издвајање SAH бива предата различитим акцепторима. Можда најважнија трансфераза је глицин-метил-трансфераза, а најснажнији инхибитор трансметилације је SAH (43-45).

Кључно у овом сложенем метаболизму је правилна контрола вредности хомоцистеина, односно благовремена разградња SAH и то помоћу три пута (43). Први биохемијски пут подразумева разлагање SAH (ензим аденозил-хомоцистеиназа) на аденозин и хомоцистеин, што обезбеђује наставак циклуса метионин-хомоцистеин-метионин. Други пут је отклањање хомоцистеина помоћу везивања за протеине унутар ћелије, при чему се вишак SAH преноси и ван ћелије када се капацитет раградње превазиђе. Ово је веома важан детаљ, јер управо у овој фази сваки вишак SAH се таложи у бубрезима што може бити од клиничког значаја (43).

Трећи биохемијски пут елиминације хомоцистеина је реметилациони пут ресинтезе метионина из хомоцистеина, под утицајем два ензима. Деловањем ензима метилфолат хомоцистеин метилтрансферазе хомоцистеину се додаје метил група и поново настаје метионин. При овој трансметилационој реакцији дозор метил групе је 5-метилтетрахидрофолат (5-MTHF), а неизоставан кофактор је цијанокобаламин (витамин B₁₂). Друга хомоцистеин метилаза је бетаин хомоцистеин метилтрансфераза, ензим који катализује преношење метил групе са бетаина на хомоцистеин при чему настаје метионин (40-45).

Два претходно наведена метаболичка пута чине трансметилациони метаболички пут хомоцистеина, који је практично у сталној конкуренцији са транссулфурацијским метаболичким путем, којим се хомоцистеин иреверзибилно преводи у цистеин. Цистатион β-синтаза (CBS) је први и ограничавајући ензим у транссулфурацијском метаболичком путу, који преводи хомоцистеин у цистатион уз ослобађање водоник сулфида (H₂S). Цистатион γ-лиаза (CGL) катализује разлагање цистатиона до цистеина и α-кетобутирата. Цистеин се даље укључује у синтезу различитих протеина, таурина и глутатиона. Поменути ензими транссулфурацијског метаболичког пута су зависни од пиридоксал 5'-пирофосфата (PLP) односно витамина B₆ (46, 47).

Заправо, у ова два метаболичка процеса два механизма модулирају расподелу хомоцистеина (48). Први механизам се односи на разлике у афинитету ензима за супстрат, па су тако метилазе реда величине K_m 0,6 mmol хомоцистеина, док су за цистатион-β-синтазу и до 100 пута веће. Дакле, засићеност хомоцистеином је важна детерминанта. Други механизам се заснива на ефекторним карактеристикама SAM, SAH и 5-MTHF. SAM инактивира синтезу 5-MTHF и блокира бетаин-метилтрансферазу, уз супротно деловање на цистатион-β-синтазу. Дакле, са повећањем

концентрације SAM због повећаног уноса метионина исхраном, настаје активирање трансулфурационог пута и инхибирање метилације хоmocистеина, тако што се блокира синтеза адекватне количине 5-MTHF, што се преодминантно дешава у јетри. Последња истраживања наглашавају и потенцијалну инхибицију глицин-метилтрансферазе 5-MTHF-ом, као додатни механизам регулације у метаболизму хоmocистеина, омогућавајући на тај начин доминацију трансулфурацијског метаболичког пута (49-52).

1.4. Поремећај метаболизма метионина и хомоцистеина

Поремећај у метаболизму метионина је процес у коме долази до накупљања цистеина и његовог димера хомоцистеина, што може имати значајне клиничке последице као што су склоност ка тромбози, хипертензији, неким метаболичким и ендокриним поремећајима (53). Као међупродукт метаболизма метионина, хомоцистеин се или реметира што води у ресинтезу метионина или улази у процес транссулфурације како би настао цистатион, а потом цистеин који се уграђује у протеине, таурин и глутатион (54, 55).

1.4.1. Ензимски поремећаји метаболизма метионина и хомоцистеина

У свакој од наведених реакција у сложеном циклусу метаболизма метионина може настати поремећај, што за последицу има накупљање хомоцистеина и настанак болести. Управо у првом кораку у метаболизму метионина, односно у фази претварања у SAM, недостатак ензима метионин-аденозил-трансферазе доводи до накупљања метионина, које и није клинички видљиво али узрокује накупљање хомоцистеина у урину код новорођене деце (56, 57, 58). Хомоцистинурија је и поремећај узрокован аутозомно рецесивним недостатком цистатион- β -синтазе која је задужена на хемијску реакцију синтезе цистатиона из хомоцистеина и серина (58). Хомоцистеин се акумулира и формира димере од којих настаје дисулфид хомоцистин који се излучује путем урина. У оваквим ситуацијама реметилација је обично сачувана па се део хомоцистеина претвара опет у метионин, који се сада концентрише у крви и настаје хиперметионинемија. Повећана концентрација метионина у серуму је повезана са повећаном склоношћу за тромбозом и има негативне утицаје на везивно ткиво, нарочито у очима и костима.

Промене на васкуларном систему услед хиперхомоцистеинемеија могу се појавити у било ком животном добу. Ако се у тешкој форми јави у раном детињству врло често настају ментална заосталост и остеопороза праћена патолошким преломима костију. Описани су и случајеви Марфаноидног хабитуса. Дијагноза хиперхомоцистинурије код новорођених беба (58) се поставља детектовањем повишених концентрација метионина и хомоцистеина у серуму. Лечење се заснива на редукцији метионина у свакодневној исхрани у комбинацији са високим дозама пиридоксина који има улогу у регулацији

ензима цистатион- β -синтетазе и то у дози од 100 до 500 mg, једном дневно. Поред тога што је примена пиридоксина ефикасна у снижавању хомоцистеина у серуму, примена бетаина такође ће бити ефикасна јер појачава реметилацију и то у дози од 125 mg до 250 mg на дан. Фолати су такође незаобилазно терапијско решење у овом случају и то у високим дозама од 500-1000 mg на дан. Прогноза лечења је веома добра код свих пацијената са потпуним уклањањем свих симптома и поремећаја (56-58).

У литератури се описују и облици хомоцистинурије који настају због поремећаја реметилације из других разлога (59, 60). Главни кривци за поремећај пута реметилације су дефицити метионин синтазе (MS) и метионин редуктазе (MR), затим стварање метилкобаламина и аденозилкобаламина услед недостатка метилентетрахидрофолат-редуктазе (MTHFR) која је есенцијална за стварање 5-метилтетрахидрофолата (5-MTHF) неопходног за реакцију у којој учествује MS. Карактеристично за овај поремећај у метаболизму метионина је да се не могу потврдити високе вредности метионина у крви, па се из тог разлога и не дијагностикују тако често (61-66). Што се тиче клиничке слике, слична је у осталим поремећајима са појавом хомоцистинурије, која некада може бити удружена са неуролошким поремећајима и мегалобластном анемијом. Дефицит MTHFR се карактерише различитом симптоматологијом од менталне заосталости, психичких промена, слабости, атаксије до спастицитета. Ензимски поремећаји, дефицит MS и MR се дефинитивно дијагностикују и потврђују генетичким тестовима и анализом ДНК. Терапијски принципи ових ензимских поремећаја се заснивају на суплементацији хидрокобаламином (доза од 1 mg, интрамускуларна примена једном дневно) и фолатима у високим дозама, као што је већ претходно описано (61-66).

Цистатионинурија као други ензимски поремећај метаболизма хомоцистеина, је болест која се карактерише дефицитом цистатионазе која је задужена за конверзију цистатиона у цистеин. Услед тога, накупља се цистатион у урину, али без клиничких симптома (58, 60).

Следећи поремећај је дефицит сулфит-оксидазе која је задужена за конверзију сулфита у сулфате, што представља последњи корак разградње цистеина и метионина уз учешће молибдена као кофактора (64). Недостатак наведеног ензима или кофактора доводи до болести која се наслеђује аутозомно рецесивно. У врло тешки формама болести код новорођене деце могу настати конвулзије, хипотонија и миоклонус, па чак

и рана смрт. Блаже форме болести могу дати симптоме сличне церебралној парализи и хореиформне покрете. Дијагноза се поставља детектовањем високе концентрације сулфита у урину, а дефинитивна дијагноза се поставља мерењем нивоа ензима сулфит-оксидазе у фибробластима као и мерењем концентрације молибдена. Терапија је симптоматска (64).

1.4.2. Неензимски поремећаји метаболизма метионина и хомоцистеина

Осим претходно наведених ензимских поремећаја који обично дају и тежу клиничку слику и прогнозу болести, постоје и други поремећаји у метаболизму метионина и хомоцистеина, а који су последица егзогених чинилаца (66, 67).

Главни узроци високих вредности хомоцистеина (хиперхомоцистеинемија) се могу поделити на наследне и стечене (68-73).

Наследни узроци:

- поремећај транссулфурације
 - недостатак цистатион-β-синтазе
- поремећај реметилације
 - дефектан транспорт витамина B₁₂
 - дефектна синтеза витамин B₁₂ кофактора
 - дефектна метионин-синтаза
 - недостатак метилтетрахидрофолат-редуктазе (ретко) и термоллабилна варијанта ензима (често, у већини популације)

Стечени узроци:

- болести
 - хронична бубрежна инсуфицијенција
 - акутна лимфобластна леукемија
 - псоријаза
- дефицит витамина
 - витамин B₁₂
 - фолна киселина
 - витамин B₆

- лекови

- метотрексат (инхибитор дихидрофолат-редуктазе)
- фенитоин и карбамазепам (антагонисти фолата)
- азотни оксид (инактиватор метионин-синтазе)
- теофилин (антагонист витамина B₆)
- 6-азауридин-триацетат (антагонист витамина B₆)

Једноставан повећан унос метионина путем исхране данас се не сматра значајним узрочником хиперхомоцистеинемije. Учешће нутритивног фактора може бити значајно у погледу удруженог деловања са другим факторима за настанак хиперхомоцистеинемije, као што су неки генетски фактори или недовољна количина кофактора у ензимски катализованим реакцијама метаболичког пута метионина. У погледу поремећаја метаболизма метионина значајне су манифестације изазване генетским алтерацијама које се односе на правилну синтезу цистатион-β-синтазе и метилтетрахидрофолат-редуктазе, али и спорадичне грешке у метаболизму бетаин-хомоцистеин метилтрансферазе и метионин синтазе (67-70).

Појава хиперхомоцистеинемije (*Hhcy*) се односи на повишене вредности укупног хомоцистеина у крви, односно на пораст како слободног тако и везаног хомоцистеина. Концентрација укупног хомоцистеина (*tHcy*) представља збир свих облика хомоцистеина у крвној плазми/серуму. Нормалне вредности хомоцистеинемije су до 15 μmol/L. На основу измерених вредности хомоцистеина у плазми/серуму, хиперхомоцистеинемiju делимо на: умерену (16-30 μmol/L), средњу (31-100 μmol/L) и тешку (>100 μmol/L). Значајна удруженост између концентрације укупног хомоцистеина у плазми и клиничких последица је запажена при концентрацији хомоцистеина преко 15 μmol/L, те је концентрација *tHcy*>15μmol/L прихваћена као независан фактор ризика за кардиоваскуларна обољења (71).

Хиперхомоцистеинемija је стање које доводи до пораста интраћелијског SAM, што може бити каснији узрок биолошких и хемијских абнормалности. Данас се разматрају познати фактори ризика за настанак хиперхомоцистеинемije, али је и доста непознатих фактора који својим механизмом доводе до ове појаве. До данас, увидели смо да генетски, физиолошки, патолошки агенси и фармаколошки активне супстанце могу довести до хиперхомоцистеинемije (70-73).

Генетски фактори хиперхомоцистеинемије представљају форму ензимских поремећаја са генетском компонентом. У литератури се помиње око 50 случајева израженог дефицита МТНFR, са тешким неуролошким и васкуларним компликацијама, а који су последица мутације за синтезу овог ензима (72).

Генетска мутација која се чешће јавља у односу на остале (учесталост око 40%) је мутација ензима C677 на нуклеотидној позицији 677 гена за МТНFR (68,72). Хомозиготи за термолабилну форму МТНFR имају специфичну активност овог ензима 50% од нормалне активности, док хетерозиготи имају специфичну ензимску активност до 75%. Скорашње студије су показале да се хомозиготна форма ове мутације јавља код 4-10% особа у општој популацији. Овај полиморфизам изазива снижену ензимску активност и термолабилност и представља предуслов појаве благе и умерене хиперхомоцистеинемије, под условом сниженог статуса фолата (74).

Витамин В₁₂- метионин-синтаза је присутна у свим ћелијама и ткивима, али је учесталост јављања генетских грешака у синтези овог ензима мала. Проучавањем фибробласта пацијената са дефицијентном MS (70) дефинисана су 2 типа дефицијентне болести, познате као cbLE и cbLG тип. Тип cbLE се односи на редукцију самог ензима, док се cbLG тип односи на промену MS апоензима (70).

Описано је неколико стотина случајева дефицијента цистатион-β-синтазе (67), што је најчешћи узрок јављања хомоцистеинурије. Око 40 мутација је откривено на CBS гену, што води ка смањеном афинитету ензима за своје супstrate (пиридоксал-фосфат, серин и хомоцистеин). Сматра се да је 0,5-1,5% опште популације захваћено хетерозиготном формом CBS дефицијенције. Хомозиготни дефицит је удружен са повишеном концентрацијом метионина и благо повишеним вредностима хомоцистеина.

Физиолошки фактори који утичу на ниво хомоцистеина су пол, старост, исхрана и начин живота (74-87).

Са старењем се мењају концентрације укупног хомоцистеина у крви, при чему особе старије животне доби (изнад 65 година) имају скоро за 2 μmol/L виши ниво хомоцистеина од особа средње животне доби. Полне разлике такође имају значај. Концентрација укупног хомоцистеина код мушкараца је за око 25% виша него код пременопаузалних жена. У менопаузи се ова разлика смањује, али никада не нестаје. У трудноћи се јавља карактеристично смањење вредности хомоцистеина, због смањења концентрације циркулишућег албумина. Понекад су у трудноћи вредности

хомоцистеина чак и повишене, што се доводи у везу са трудноћом као хиперкоагубилним стањем и поремећајем ендотелне функције (74, 75).

Начин исхране је важна детерминанта која утиче на ниво хомоцистеина у крви, али обично нутритивни фактори нису узрок тешке хроничне хиперхомоцистеинемije. Концентрација укупног хомоцистеина се мења у зависности од начина исхране.. Наиме, након оралне апликације метионина, плазматска концентрација хомоцистеина и цистеина се након само два сата удвостручила, док је након шест сати достигла максималне вредности. Пушење, конзумирање кафе са кофеином, велике количине етанолa, као и пасиван начин живота доводе до повећање концентрације хомоцистеина. Прoлазна хиперхомоцистеинемija је обавезна код акутне интоксикације алкохолoм код особа без хепатопатије, док је код особа са оштећеном функцијом јетре хиперхомоцистеинемija перманентна. У хроничном етилизму плазматски ниво хомоцистеина је и до два пута виши. Настанак поремећаја метаболизма хомоцистеина се објашњава нарушавањем метаболизма фолата, карактеристичног за ову групу пацијената (75, 76).

Бројне студије су показале да је најчешћи разлог умерене хиперхомоцистеинемije недостатак витамина (67-80). Унос витамина B₁₂, B₆ и фолне киселине су у негативној корелацији са вредностима хомоцистеина, чак и код здравих, правилно храњених особа. Ова негативна корелација је израженија код старих, посебно за витамин B₁₂ и фолну киселину, али је присутна и код младих (79, 80). Утицај витамина B₆ је најслабије изражен (68).

Интолеранција глукозе, дијабетес мелитус тип 1, ренална инсуфицијенција, различити малигнитети, хипотиреоидизам, неке хроничне аутоимуне болести, повезане су са настанком хиперхомоцистеинемije (67-87).

Хомоцистеинемija директно корелира са концентрацијом креатинина и гломерулском филтрацијом (77). Чак и скроман пад у гломерулској филтрацији је повезан са повећањем хомоцистеина у плазми. Значајна хиперхомоцистеинемija је запажена код уремије, због последица поремећаја метаболизма хомоцистеина и процеса трансулфурације. Истраживања су показала да витаминска суплементација код ових пацијената благо смањује концентрацију хомоцистеина. Међутим, и поред адекватног терапијског приступа, оптималне вредности хомоцистеина <10 µmol/L се тешко

постижу код пацијената са бубрежним болестима. Исти ефекат витамини имају и код пацијената са трансплантираним бубрезима (70-86).

Низ фармаколошки активних супстанци, различитим механизмима, утичу на ниво хомоцистеинемije (87). Метотрексат као директни чинилац у метаболизму фолне киселине, омета реметилациони процес хомоцистеина и на тај начин изазива његове повишене вредности. Азотни оксиди, попут азот-субоксида и азот-моноксида, могу да доведу до хиперхомоцистеинемije. Азот-субоксид ступа у интеракцију са цијанокобаламином при чему се ослобађају хидроксилни радикали, који инактивирају активност метионин-синтазе везивањем за активно место ензима. L-допа већ у појединачној дози изазива хиперхомоцистеинемiju, док је хронично узимање поменутог лека одржава. Разлог за то је поремећај у расположивости SAM. И другу фармаколошки агенси утичу на концентрацију хомоцистеина, као што су азауридин (антиметаболит који делује као антагониста витамина B₆), фенитоин и карбамазепин, у чијој је основи поремећај метаболизма фолне киселине као главни механизам деловања (87).

Хормонска терапија се данас помиње као један од многобројних узрока настанка поремећаја у метаболизму хомоцистеина (78, 79). Идеја да ниво укупног хомоцистеина зависи од хормонског статуса жене потиче од сазнања о нижем нивоу хомоцистеинемije код пременопаузалних жена у односу на постменопаузалне жене. Оваква сазнања су потврђена вредностима хомоцистеина код жена у трудноћи, али и постменопаузалних жена са хормонском супституцијом (78, 79). Познато је естрогенски препарати доводе до повишења хомоцистеина само у периодима лучења хормона. Механизам којим би се објаснио настанак хиперхомоцистеинемije, односи се на смањење нивоа кобаламина и фолата, али без знакова хиповитаминозе. Супституција естроген антагонистима, на пример тамоксифеном, смањује ниво укупног хомоцистеина за око 30% у периоду од 6-12 месеци (78, 79). Међутим, тачан механизам настанка и патофизиолошки аспекти оваквих хормонски узрокованих поремећаја метаболизма хомоцистеина још увек нису довољни познати.

1.5. Улога хомоцистеина у патофизиологији настанка и развоја кардиоваскуларних болести

У погледу утицаја хомоцистеина на настанак и развој кардиоваскуларних болести доста се полемисхе (88-95). Оно што је сигурно је то да доказа о директном утицају хомоцистеина на стварање патолошких и анатомских промена у васкуларном систему још увек нема. Још давне 1976. године је забележена повећана учесталост коронарне болести срца код особа са хиперхомоцистеинемijом (92). Следећих петнаест година је било само спорадичних извештаја на ову тему, да би се 90-тих година повећало интересовање за изучавање деловања хомоцистеина на нивоу васкуларног система. У првој значајној клиничкој студији (1995) која је обухватила 4000 испитаника и која је испитивала повезаност хиперхомоцистеинемije са коронарном болешћу срца, хомоцистеин добија епитет фактора ризика за настанак кардиоваскуларних обољења (90, 91).

Међутим, имајући у виду многобројне друге факторе ризика за настанак кардиоваскуларних обољења, још увијек се не зна тачан међусобан однос свих тих фактора са хиперхомоцистеинемijом. Најзначајнији традиционални фактори (дислипидемија, хипертензија и конзумирање цигарета) позитивно корелирају са вредностима хомоцистеина. Посебно снажна и важна патофизиолошка корелација је утврђена између хипертензије и вредности укупног хомоцистеина у крви, док су подаци о повезаности пушења и хомоцистеина најоскуднији и углавном се ослањају на опасност од смањеног уноса важних нутритивних састојака, укључујући витаминске кофакторе метаболизма хомоцистеина (90-93).

Повезаност између повишених вредности хомоцистеина и васкуларних обољења примећена је откривањем хомоцистинурије, урођене аномалије метаболизма хомоцистеина код деце, а настаје услед недостатка цистатион β -синтазе (94-96). Седамдесетих година, посматрањем деце са хомоцистинуријом установљен је висок ризик од преране смрти управо због тешких поремећаја васкуларног система, односно настанка тромбо-емболијских догађаја опасних по живот (68). Европским акционим пројектом је усаглашено да је повећан ниво хомоцистеина у плазми независан фактор ризика за кардиоваскуларне поремећаје, и израчунато да је повећање Нсу од 5 $\mu\text{mol/L}$ повезано са повећањем релативног ризика за кардиоваскуларне болести од 1,35. Пораст

концентрације хомоцистеина у плазми је еквивалентан кардиоваскуларном ризику који остварује ниво холестерола већи од 19 mg/dl (95-99).

И друге опсежне студије, по дизајну мета анализа, доприносе овом сазнању и потврђују да чак и благо повећање концентрације хомоцистеина у крви дуплира ризик за настанак коронарне болести срца, као и стопу морталитета (94, 95, 100, 101). Од тада се новим доказима стално потврђује да је повишен ниво хомоцистеина у опсегу 15-25 $\mu\text{mol/l}$ у позитивној корелацији са коронарним болестима срца, можданим ударом, периферним артеријским стенозама, венском тромбозом и недостатком фолата (99, 100). Новија истраживања показују да хомоцистеин у култури ћелија повећава интрацелуларни и екстрацелуларни холестерол (102, 103). Како се хомоцистеин повећава нормално са старењем, ово води концепту примене малих доза статина у превенцији штетних атерогених ефеката хомоцистеина, чак и код пацијената код којих су липиди у оквиру нормалних вредности (104-106).

Поред повећаног ризика од кардиоваскуларних болести, наглашена је и неуротоксичност хомоцистеина која настаје због одсуства два главна пута у елиминацији хомоцистеина: бетаином посредована конверзија хомоцистеина у метионин и трансулфурација хомоцистеина у цистеин. Такође, доказано је да хомоцистеин може да индукује ометање крвно-мождане баријере услед неколико различитих процеса. Прво, хомоцистеин изазива неравнотежу између активности матрикс металопротеиназе 9 (ММП-9) и ткивног инхибитора металопротеиназе 4 (ТИМП-4), и то тако што повећава активност ММП-9 и смањује активност ТИМП-4. Затим, ММП-9 реагује са различитим компонентама крвно-мождане баријере и нарушава њихову структуру. Друго, хомоцистеин делује као ексцитаторни неуротрансмитер за GABA-A (γ -аминобутерна киселина) рецепторе, што доводи до повећане васкуларне пропустљивости, а делује и као ексцитаторни неуротрансмитер за NMDA (N-метил-D-аспартат) рецепторе (105-108).

Дакле, хиперхомоцистеинија је повезана и са неуролошким и психијатријским поремећајима (депресија, Алцхајмерова и Паркинсонова болест), хроничним болестима бубрега, повећаном активношћу окстеокласта и болестима коштаног система, са гастроинтестиналним болестима (опстипација, Кронова болест, инфламаторна болест црева, колоректални карцином), канцером (плућа, бубрег, дојка, дебело црево, бешика) и конгениталним малформацијама (68-75, 101).

Хиперхомоцистеинемија патолошко деловање испољава директно делујући на сулфхидрилне групе, тј. дисулфидне мостове различитих молекула и индиректно индукујући оксидативни стрес (68). Као резултат ових деловања настају морфолошке и функционалне лезије ендотела са свим последицама ендотелне дисфункције (вазоспазам, артеријска и венска тромбоза, исхемија), као и морфолошке и функционалне промене везивног ткива са утицајем на ћелијску пролиферацију и апоптозу. У стању хиперхомоцистеинемије сувишни хомоцистеин подлеже деловању метионил tRNK- синтазе, при чему настаје високо реактивни хомоцистеин-тиолактон. Он се везује за различите тиоле у организму, односно протеине који садрже цистеин или цистин. Везује се за дисулфидне везе тиола у процесу који се назива хомоцистеинилација (постранслациона модификација протеина), градећи N-хомоцистеин протеине. Овако модификовани протеини могу бити: протеини плазме, липопротеини, протеини везивног ткива. Ниво анти-N-хомоцистеин- протеин антитела корелише са нивоом CRP-а (C реактивни протеин), што указује на проинфламаторно деловање N-хомоцистеин протеина. N-хомоцистеин-албумин повећава везивање моноцита за ћелије ендотела и индукује експресију проинфламаторних цитокина VCAM1, ICAM1 и MCP1 на моноцитима и ћелијама ендотела (100-108).

Идентификовано је место N-хомоцистеинилације на месту Lys562 (лизин) на неструктурисаном региону N-хомоцистеин фибриногена, који се акумулира у циркулацији код CBS (цистатион- β -синтаза) дефицијентних пацијената чиме компромитује фибринолизу. N-хомоцистеин-LDL је високо имуноген и бива знатно брже преузет макрофазима него нативни LDL (102, 103).

Колаген је доминантна компонента везивног ткива и чини око 25-30% укупних протеина организма. Лизински остаци колагена укључени су у формирање ковалентних интрамолекуларних унакрсних пиридинолинских веза, што је кључно за стабилност и структуру колагена. N-хомоцистеинилација лизинских остатака преко хомоцистеин-тиолактона нарушава физиолошку структуру и функцију колагена. Хомоцистеин доводи до поремећаја везивног ткива дјелујући на колаген, фибрине и фибронектин (70-78).

Повишен ниво хомоцистеин-тиолактона у плазми и протеина модификованих N-хомоцистеинилацијом директна су последица генског дефекта у метаболизму хомоцистеина или исхране богате метионином. Анализом промена у генској

експресији, индуковане хоmocистеином и његовим производима, идентификовано је 47, 113 и 30 различитих mRNA регулисаних N-хоmocистеинилационих протеина, хоmocистеин-лактона и хоmocистеина. Сваки метаболит индукује јединствену групу генског експресионог профила (81,88).

1.6. Улога хомоцистеина у (дис)функцији ендотела

Ендотелна дисфункција се може описати као неравнотежа између вазодилататорних и вазоконстрикторних производа ендотела, која се сматра језгром системско патолошког процеса атеросклерозе и кардиоваскуларних болести. Ендотел се састоји из једног слоја ендотелних ћелија које облажу унутрашњу површину васкуларног лумена, између крви и васкуларних глатких мишићних ћелија, али чини и капиларе и лимфне судове. Ендотел има много виталних функција, укључујући регулацију васкуларног тонуса и инфламаторне равнотеже (109, 110, 111). Васкуларна дилатација као одговор на стрес делимично зависи од релаксационог фактора пореклом из ендотела, азот монооксида (NO). NO се заправо синтетише из аргинина од стране ендотелне изоформе NO-синтазе (eNOS), као одговор на одговарајући стимулус. Ендотелни NO се распршује по васкуларним глатким мишићним ћелијама где се активира цитосолна гуанилат-циклаза и повећава производња цикличног гуанозил-монофосфата, што доводи до релаксације глатких мишићних ћелија. Губитак ендотелом посредоване вазодилаторне способности се сматра једном од најранијих манифестација кардиоваскуларног оштећења и претходи формирању атеросклеротичних плакова (111, 112).

Опсежне експерименталне студије, *in vivo* и *in vitro*, добиле су убедљив доказ да висок ниво хомоцистеина значајно оштећује ендотел зависну вазодилатацију и смањује биорасположивост NO као одговор на дилатациони стимулус, попут ацетилхолина, сугеришући да хомоцистеином индукована ендотелна дисфункција бар делом потиче од губитка ендотел зависних релаксационих фактора. Постоје три потенцијална механизма којима хиперхомоцистеинемија може да оштети ендотел зависну дилатацију: 1) оксидативни стрес, 2) стрес ендоплазматског ретикулума са апоптозом ћелија ендотела и 3) хронична инфламација/протромбински услови (112-115).

Бројни патогенетски механизми, као што су смањена активност есенцијалних ензима у метаболизму хомоцистеина и/или измењени нутритивни однос могу довести до повећања вредности хомоцистеина у васкуларним ендотелним ћелијама. Испитивањима није откривено присуство активне цистатион- β -синтазе у култури хуманих аортних ендотелних ћелија и екстрактима хуманог кардиоваскуларног ткива. То показује да хумане ендотелне ћелије не могу метаболисати хомоцистеин трансулфурационим путем, стога, свако повећање концентрације хомоцистеина у

плазми може оштетити ендотелну функцију (116, 117). У једној *in vitro* студији добијена је смањена синтеза DNA у ендотелним ћелијама изложеним хомоцистеину, као и њихова смањена пролиферација. Овај ефекат је дозно зависан и примећен је код концентрације хомоцистеина од 10 $\mu\text{mol/L}$ (118).

У табели 2 су наведени потенцијални ефекти хомоцистеина на васкуларни ендотел, тромбоците и факторе коагулације (113-119).

Табела 2. Могући механизми настанка атеротромбозе услед хиперхомоцистеинемије

Ефекти на ендотел	Ефекти на тромбоците и факторе коагулације
цитотоксично оштећење при високим дозама	повећана синтеза тромбосана B_2 и других еикосаноида
	повећан ниво тромбосана A_2
абнормална синтеза простациклина	повећана адхезија и агрегација тромбоцита
	смањено преживљавање тромбоцита
	активација фактора коагулације XII
измењена продукција хемокина	снижен ниво антитромбина III
	активација фактора коагулације V
промене посредоване адхезивним молекулима	смањена активност протеина C
	инактивација продукције или активације тромбомодулина
	повећано инхибиторно деловање Lp(a) на активацију плазминогена
	инхибиција стварања и секреције Von Willebrand-овог фактора
	блокирање везивања t-рА за ендотелне ћелије

Хомоцистеин штетно делује и на васкуларне глатке мишићне ћелије, доводи до пролиферације мишићних ћелија у култури што може допринети хиперплазији *tunica intima* крвног суда (120). Такође, хомоцистеин може индуковати васкуларна оштећења протромбогеним деловањем - повећањем адхезије и агрегације тромбоцита уз ослобађање тромбоцитних фактора раста, активирањем фактора коагулације V, X и XII, инхибицијом активације протеина C, инхибицијом ћелијске површинске експресије тромбомодулина и смањењем активности ткивног активатора плазминогена. Осим тога, повећаним стварањем тромбосана и везивањем липопротеина за фибрин смањује фибринолизу (120-122).

1.7. Улога оксидационог стреса у патофизиологији кардиоваскуларног система

Неопходан услов за физиолошко функционисање свих ћелија организма је постојање контролисане равнотеже између оксидационих и антиоксидационих фактора. Оксидациони стрес се дефинише као неравнотежа између продукције слободних радикала и антиоксидационог система заштите организма. Дакле, оксидациони стрес настаје због повећаног стварања прооксидационих слободних радикала или смањене количине и/или активности антиоксидационих фактора. Слободни радикали су високо реактивни атоми или молекуле који садрже неспарене електроне у својој структури и генерално су подељени у групе (реактивне кисеоничке врсте - ROS, реактивне азотне врсте - RNS, реактивне сумпорне врсте – RSS, липидни слободни радикали..) Слободни радикали су производи сталних биолошких редокс процеса који се одвијају у ћелији током њеног аеробног метаболизма. Њихова реактивност доводи до оксидационих промена биогених молекула (протеина, липида, DNA) са врло штетним учинцима, који могу реверзибилно и/или летално деловати на живе ћелије. Аеробни организми су током еволуције развили сложен антиоксидациони систем заштите (ензимски и неензимски фактори), као одговор на евентуално штетно деловање оксидационих процеса (123).

Различите студије показују да редокс реакције могу бити кључни фактор за настанак атеросклерозе, васкуларне хипертрофије и тромбозе код животиња са хиперхомоцистеинемijом (88, 124).

Акумулација оксидованих биомолекула мења биолошку функцију многих ћелијских путева. Постоје неколико механизма којима хомоцистеин индукује оксидативни стрес (125, 126):

- 1) хомоцистеин аутооксидација,
- 2) инхибиција активности антиоксиданата у ћелији,
- 3) инхибиција активности супероксид дисмутазе (SOD) са ендотелних површина,
- 4) активирање ензима NADPH оксидазе,
- 5) активирање ензима азот-оксид синтазе (NOS).

Хомоцистеин као слободна аминокиселина може бити у редукованом и оксидованом облику. У крвној плазми доминира редуковани облик хомоцистеина. Он

лако подлеже оксидацији, при чему од два редукована хомоцистеина настаје дисулфид, 2H^+ и 2e^- . У присуству јона метала и кисеоника хомоцистеин се лако аутоксидује и даје слободне радикале: супероксид ањон радикал, хидроксилни радикал, водоник пероксид и тиолне слободне радикале. Тиоли у присуству јона гвожђа изазивају липидну пероксидацију, продукцију хидроксилног радикала и оксидативно модификованих протеина. Директно токсично дејство супероксид ањон радикала се огледа у његовој склоности ка оксидацији липопротеина мале густина (LDL) и утицају на повећано преузимање LDL честица од стране "скавенцер" ћелија. Хидроксилни радикал и супероксидни ањон се под утицајем супероксид дисмутазе или спонтано конвертују у водоник пероксид. Водоник пероксид и супероксидни радикали могу инактивирани NO и створити још јаче прооксиданте (насцентни кисеоник и пероксинитрите). Пероксинитрити воде ка нитритацији тирозина, који потом изазива промене у функцији протеина и индукује ћелијску дисфункцију (126, 127).

Хомоцистеин потенцира производњу тромбина у ендотелним ћелијама. Тромбин је потентни активатор протеаза-активираних рецептора (PAR), који припадају G протеин-куплованој фамилији рецептора. Идентификована су 4 типа PAR: PAR-1, PAR-2, PAR-3, PAR-4. PAR-1, PAR-2, PAR-3 се активирају тромбином, а PAR-2 и PAR-4 трипсином. Сви PAR су изражени у ендотелним ћелијама. Укључени су у васкуларни развој, функцију и низ биолошких процеса, укључујући ремоделирање. Активација PAR изазива стварање реактивних кисеоничних радикала уз усходну регулацију NADPH оксидазе у ендотелним ћелијама (68, 87, 127).

Хиперхомоцистеинемија је уско повезана са акумулацијом асиметричног диметиларгинина (ADMA), који је инхибитор ендотелне и индуцибилне азот-оксид синтазе. Висока концентрација ADMA умањује вазодилатацију и може значајно смањити NO биорасположивост (88, 124).

Важан заштитни механизам од оксидационог стреса индукованог хомоцистеином је преко активности антиоксидационог ензима, глутатион пероксидазе (GPX). Глутатион пероксидаза катализује редукцију водоник пероксида и липидних хидропероксида. Утврђено је да глутатион пероксидаза *in vitro* спречава оксидациону инактивацију NO. Овај антиоксидациони механизам нема значаја у току хроничне

хиперхомоцистеинемиије, јер активност ендотелне глутатион пероксидазе опада при дуготрајној изложености хомоцистеину (128).

Показано је да директно, тренутно дејство хомоцистеина нема ефекта на агрегациона својства тромбоцита, али ако је изложеност хомоцистеину продужена, агрегациони процес се убрзава. Уколико процес оштећења ендотела узме маха, на располагању је све мањи број ендотелних ћелија које могу да продукују NO, а то омогућава да цитотоксични ефекат хомоцистеина буде све израженији (129).

1.8. Сумпоровите аминокиселине и неоргански натријум хидрогенсулфид - значај и примена

Посљедних година примена одређених сумпоровитих аминокиселина заокупљује све већи интерес научне јавности. Суплементација сумпоровитим аминокиселинама добија све већи значај као важна адјувантна, антиоксидациона терапија у превенцији шећерне болести (diabetes mellitus) и кардиоваскуларних болести (130, 131). Бројне студије извештавају о оштећењу метаболизма аминокиселина у дијабетесу и корисним ефектима ових аминокиселина, који су позитивној корелацији са порастом нивоа тих аминокиселина у плазми (130-136). Многи патофизиолошки поремећаји који у својој основи имају поремећену редокс равнотежу, повезују се са превентивном применом сумпоровитих једињења. Метионин, цистеин и хомоцистеин су три уобичајене аминокиселине које садрже сумпор, али испољавају различит утицај на редокс равнотежу. Поједине експерименталне и клиничке студије помињу модулаторне утицаје цистеина, N-ацетилцистеина и једињења са цистеин остатком у редукцији оксидационог стреса, дакле њихово антиоксидационо деловање (129-131).

Последњих година посебну пажњу истраживачима заокупљују сулфхидрилне фармаколошки активне супстанце које смањују ниво хомоцистеина. У ту групу спадају диметилцистеин, метал измењивачки агенс са применом у третману реуматоидног артритиса, N-ацетилцистеин (NAC), муколитичко средство и 2-меркаптоетан сулфонат, хемотерапеутски протектор (137). Једињења овог типа имају слободну сулфхидрилну групу и способност да граде дисулфиде у плазми, те у интеракцију овог типа ступају и са хомоцистеином снижавајући његову концентрацију. N-ацетилцистеин после перооралне примене смањује укупни хомоцистеин за око 20%, па чак и до 50% (135-141).

По хемијској структури N-ацетилцистеин (NAC) је сулфхидрилна супстанца, дериват цистеина при чему је једна ацетил група везана за атом азота. Дакле, уношењем NAC у организам обезбеђују се резерве аминокиселине цистеина, која је неопходна за бројне матаболичке процесе у организму. N-ацетилцистеин је регистрован као лек и суплемент. Првенствено се користи као муколитик, симптоматска терапија која помаже у разградњи густих секрета код респираторних поремећаја инфективне природе, али је регистрован и као антидот код предозирања парацетамолом (137, 138). Поред тога,

примену је нашао и код обољења која захтевају сулфатну надокнаду као што је аутизам. До сада су описане и антиоксидативне способности NAC, са преобладајућим хепатопротективним дејством. Међутим, и поред свега наведеног, још увек је једина прихваћена клиничка примена као снажног муколитика, па се примењује код упорног продуктивног кашља при чему раскида дисулфидне везе и разводњава густ секрет, као и примена у редуковању густе слузи код оболелих од цистичне и плућне фиброзе (134-140).

N-ацетилцистеин је нус-производ антиоксиданса глутатиона, популаран због својих цистеин остатака и улоге коју има у одржавању равнотеже и метаболизма глутатиона. NAC доказано повећава унутарћелијске концентрације редукованог глутатиона (GSH) пружањем додатног извора цистеина као прекурсора (134-140). NAC је посебно интересантан истраживачима у клиничким испитивањима као потенцијални антиоксиданс. Међутим, у условима благе хиперхомоцистеинемije мало се зна о утицају NAC-а на параметре оксидационог стреса и антиоксидационог система заштите, као и утицају на функционалне карактеристике миокарда (141).

Цистеин је сумпоровита неесенцијална аминокиселина. Налази се у већини високопротеинских извора хране. Под физиолошким условима, организам сисара може синтетисати цистеин. Хомоцистеин (метаболит метионина) је прекурсор за синтезу цистеина (трансулфурацијски метаболички пут хомоцистеина). Хомоцистеин и серин се спајају у цистатион, реакција катализована цистатион β -синтазом. Цистатион се затим деаминује и цијепа на α -кетобутират и цистеин, реакција катализована цистатион γ -лиазом. Оба ова ензима су пиридоксал-фосфатни ензими, односно кофактор им је витамин Б6. Због високе реактивности тиол групе цистеин остварује бројне биолошке функције. Као последица склоности тиола да подлежу редокс реакцијама, цистеин поседује антиоксидационе особине (142-145). Цистеин је количински-ограничавајући прекурсор унутарћелијске синтезе глутатиона (најобилнији унутарћелијски антиоксидант). Због редокс нестабилности, готово целокупан ванћелијски цистеин је присутан у оксидованом облику, цистину (дисулфидни цистеин). Тако је заправо ванћелијски цистин примарни извор унутарћелијског цистеина, неопходног за синтезу глутатиона. Такође, цистеин је кључни супстрат у синтези таурина (непротеинска, сумпоровита аминокиселина која, између осталог, има функцију антиоксиданта у многим телесним ткивима) (143,144).

Примена неорганских једињења итекако има своју примену у медицини и фармацији. Као представник и главни катјон ванђелијске течности, натријум има своју улогу у склопу многих неогранских једињења у клиничкој пракси. Налази се у облику хлорида, фосфата, карбоната и хидрогенкарбоната (146-149). Поред тога, велики број лекова који се налазе у облику слабих киселина су тешко растворљиви у води, па како би се повећала њихова растворљивост па самим тим и њихов фармаколошки ефекат примењују се у виду соли натријума, као на пример бензилпеницилин (149).

Натријум-хидрогенсулфид (NaHS) је једињење које настаје спајањем водоник сулфида (H_2S) и базе алкалног метала. Посебно је значајан као егзогени донор H_2S , гасотрансмитера са потенцијалним способностима у снижавању нивоа оксидационог стреса, али и као потенцијално терапеутско средство у третману многих васкуларних болести (150). Водоник сулфид је и метаболит хомоцистеина, па тако студије показују да егзогени NaHS као донор ендогеног H_2S значајно утиче на ниво хомоцистеина у крви, на васкуларни тонус и на смањење оштећења зида крвног суда (151, 152). Третман NaHS у експерименталним студијама на изолованом срцу пацова утиче на функционалне карактеристике миокарда, смањујући срчану фреквенцу и дијастолни притисак леве коморе (LVDP) (153).

На основу свега наведеног, познавајући са једне стране, улогу метионина и хомоцистеина у хомеостази кардиоваскуларног система и са друге стране, потенцијалне ефекте егзогене примене сумпоровитих аминокиселина цистеина, метионина, NAC, као и неорганског NaHS на поремећаје хемодинамике кардиоваскуларног система и редокс равнотеже, неопходно је прибавити нова сазнања о прецизним механизмима деловања сумпоровитих аминокиселина и неорганског натријум хидрогенсулфида.

ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

2.1. Општи циљеви

Циљ ове експерименталне студије био је испитивање утицаја субхроничне примене егзогеног хомоцистеина (DL-хомоцистеин) на кардиодинамику срца, коронарну циркулацију и оксидациони стрес код пацова, као и испитивање утицаја акутне примене сумпоровитих аминокиселина (L-метионина, L-цистеина, N-ацетилцистеина) и неорганског Na-хидрогенсулфида на кардиоваскуларни систем пацова са нормалним и повишеним вредностима хомоцистеина у крви.

2.2. Специфични циљеви:

1. Испитивање утицаја субхроничне примене DL-Hcy на функцију миокарда и коронарну циркулацију изолованог срца пацова праћењем параметара: а) $+dp/dt_{max}$ - максимална стопа промене притиска у левој комори (mmHg/s), б) dp/dt_{min} - минимална стопа промене притиска у левој комори (mmHg/s), в) SLVP - систолни притисак леве коморе (mmHg), г) DLVP - дијастолни притисак леве коморе (mmHg), д) HR - срчана фреквенца (bpm), ђ) CF – коронарни проток (ml/min);
2. Испитивање утицаја субхроничне примене DL-Hcy на биомаркере системског оксидационог стреса [индекс липидне пероксидације (TBARS), азот моноксид (NO) у облику нитрита (NO_2^-), супероксид анион радикал (O_2^-), водоник пероксид (H_2O_2),] и активност антиоксидационог система заштите [каталаза (CAT), супероксид дисмутаза (SOD) и редуковани глутатион (GSH)], у крвној плазми и еритроцитима пацова;
3. Испитивање утицаја директне, акутне примене сумпоровитих аминокиселина (L-метионина, L-цистеина, N-ацетилцистеина) и неорганског Na-хидрогенсулфида на функцију миокарда и коронарну циркулацију изолованог срца пацова у условима нормалних и повишених вредности хомоцистеина у крви;
4. Испитивање утицаја директне, акутне примене сумпоровитих аминокиселина (L-метионина, L-цистеина, N-ацетилцистеина) и неорганског Na-хидрогенсулфида

на динамику редокс равнотеже у коронарној циркулацији пацова, у физиолошким условима и условима повишених вредности хомоцистеина у крви; мерењем вредности прооксидационих параметара у коронарном венском ефлуенту: индекса липидне пероксидације (TBARS), азот монооксида (мерен у облику нитрита), супероксид анјон радикала (O_2^-) и водоник пероксида (H_2O_2).

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Материјал

У овој експерименталној студији су коришћене супстанце и реагенси високе чистоће, специјализоване за лабораторијску употребу, произвођача *Sigma Aldrich*, Немачка. Све анализе су урађене на специјализованим апаратима уз упуство произвођача и уз поштовање добре лабораторијске праксе.

3.1.1. Аминокиселине и неоргански Na-хидрогенсулфид употребљени у студији

DL-хомоцистеин ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$; каталошки број H4628-1G; MW: 135,18), L-метионин ($\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$; каталошки број M9625; MW: 149, 21), L-цистеин ($\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$; каталошки број 168149-25G; MW: 121,16), N-ацетил-L-цистеин ($\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NHCOCH}_3)\text{CO}_2\text{H}$; каталошки број: A7250-500G; MW: 163,19) и Na-хидрогенсулфид хидрат ($\text{NaSH}\cdot\text{xH}_2\text{O}$; каталошки број: 161527-100G; MW: 56,06 анхидровани).

3.1.2. Супстанце за прављење сложеног Кребс-Хенселејтовог раствора

Натријум хлорид (NaCl , 27.216 g/4L), калијум хлорид (KCl , 1.4 g/4L), магнезијум сулфат ($\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.636 g/4L), калијум дихидроген фосфат ($\text{KH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0644 g/4L), натријум бикарбонат (NaHCO_3 , 8.36g/4L), глукоза ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6\cdot\text{H}_2\text{O}$, 8.8g/4L) и калцијум хлорид ($\text{CaCl}_2(\text{anh.})$, 1.117 g/4L).

3.1.3. Супстанце и реагенси за одређивање параметара оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту (TBARS-а, азот монооксида, супероксид анјон радикала и водоник пероксида)

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

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

TRIS (Трис (хидроксиметил) аминотетан, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$), Mr 121.14; 37% хлороводонична киселина (HCl), $\rho=1,19\text{ gcm}^{-3}$, Mr 36.5; Na_2EDTA , Mr 372.24; Нитро-

тетразолијум плаво хлорид (NBT, $C_{40}H_{30}ClN_{10}O_6$), Mr 817.6; Желатин ($C_{15}H_{11}N_2 NaO_2$), Mr 61.5 kDa.

Калијум хидрогенфосфат дихидрат ($K_2HPO_4 \times 2H_2O$) Mr 214.23; калијум дихидрогенфосфат дихидрат ($KH_2PO_4 \times 2H_2O$) Mr 164.09; натријум хлорид (NaCl) Mr 58.44; водоник пероксид (H_2O_2), Mr 34.01; D(+)-глукоза монохидрат (декстроза), Mr 198.17; фенол црвено (phenol red, $C_{19}H_{14}O_5S$), Mr 354.4; пероксидаза из коњске ротквице (peroxidase from horse radish – HRPO EC 1.11.1.7), Mr 44 kDa.

3.2. *Етички аспекти студије*

По дизајну, ово истраживање је експериментална студија на анималном моделу и анималном материјалу *in vitro*. Студија је спроведена на Институту за кардиоваскуларну физиологију, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Одобрена је од стране институционалне Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука. При експерименталном раду поштовани су прописи о добробити лабораторијских животиња и правилник за рад са експерименталним животињама Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, који су усклађени са европском директивом у овој области.

3.3. *Протокол студије*

Приликом извођења експеримената у овом истраживању користио се модел ретроградне перфузије изолованог срца срца сисара по Лангендорфу при константном перфузионом притиску, чији је творац немачки физиолог Оскар Лангендорф (*Oskar Langendorff*, 1853-1908).

Спроведено истраживање је обухватило 80 пацова, *Wistar albino* соја, мушког пола, старости 16 недеља, просечне телесне масе 300-400 грама. Експерименталне животиње су чуване у строго контролисаним условима (температура простора $23 \pm 1^\circ C$, циклус светлост-тама 12:12 часова), док су вода и храна биле доступне у довољној количини тако да су их животиње могле узимати према потреби (*ad libitum*).

Животиње смо груписали у две (2) групе у зависности од субхроничног третмана DL-хомоцистеином; свака група је била подељена на пет подгрупа, у зависности од супстанце којом је акутно третирана; у свакој подгрупи је било по осам пацова:

- 1. контролна група пацова** (без субхроничног третмана DL-хомоцистеином), у оквиру које је постојало пет подгрупа:
 - I. контролна (CTRL), група третирана са 0.9 % NaCl
 - II. L- Meth, група третирана L-метионином у дози од 0,5 mmol/L
 - III. L-Cys, група третирана L-цистеином у дози од 0,5 mmol/L
 - IV. NAC, група третирана N-ацетилцистеином у дози од 0,5 mmol/L
 - V. NaHS, група третирана Na-хидрогенсулфидом у дози од 0,5 mmol/L
- 2. експериментална група пацова** (субхронично третирана DL-хомоцистеином), у оквиру које је постојало пет подгрупа:
 - VI. DL-Hcy, група третирана DL-Hcy+ 0.9 % NaCl
 - VII. DL-Hcy + L- Meth, група третирана DL-Hcy+ L-метионином у дози од 0,5 mmol/L
 - VIII. DL-Hcy + L- Cys, група третирана DL-Hcy+ L-цистеином у дози од 0,5 mmol/L
 - IX. DL-Hcy+ NAC, група третирана DL-Hcy+ N-ацетилцистеином у дози од 0,5 mmol/L
 - X. DL-Hcy+ NaHS, група третирана DL-Hcy+ Na-хидрогенсулфидом у дози од 0,5 mmol/L

Третман експерименталне групе пацова егзогеним DL-хомоцистеином је изведен по модификованом протоколу по Kaplan-у (154). DL-хомоцистеин се, у појединачној дози од 0,45 $\mu\text{mol/g}$ телесне масе, примењивао два пута дневно (дозни интервал 8 часова), субкутаном применом, у трајању од 14 дана. У исто време и на исти начин, животињама у контролној групи се примењивао физиолошки раствор (0.9 % NaCl), у појединачној дози од 0,5 ml, како би се изазвао исти ињекцијом-индукован стрес код пацова. Након тога, 15-ог дана (16 сати од администрације последње дозе DL-хомоцистеина/физиолошког раствора) животиње су жртвоване и извршена је процедура изоловања срца, у циљу успостављања ретроградне перфузије кроз изоловано срце методом по Лангендорфу и спровођења акутног експеримента сумповитим

аминокиселинама. Осим тога, у тренутку жртвовања цервикалном дислокацијом, од сваке животиње смо узели узорке крви искрвављењем. За анализу концентрације укупног хомоцистеина и биомаркера системског оксидационог стреса, крв смо скупљали у два различита вакутанера. Један је био чист, само узорак крви за припремање серума у коме смо одређивали концентрацију хомоцистеина. У други смо додавали антикоагулацно средство (EDTA) да бисмо издвојили плазму за одређивање прооксидационих маркера и хемолизат еритроцита за одређивање маркера антиоксидационог система заштите. У серуму смо одређивали укупни хомоцистеин-течном хроматографијом под високим притиском (HPLC). Крвну плазму и хемолизат еритроцита смо користили за процену системског редокс статуса; односно за спектрофотометријско мерење прооксидационих маркера у плазми [индекс липидне пероксидације (TBARS), азот моноксид (NO) у облику нитрита (NO_2^-), супероксид анијон радикал (O_2^-) и водоник пероксид (H_2O_2)] и маркера антиоксидационог система заштите у хемолизату еритроцита [ензими каталаза (CAT) и супероксид дисмутаза (SOD), и неензимски атиоксиданс, редуковани глутатион (GSH)].

3.4. *Изоловање срца пацова*

Изоловање срца представља инвазивну хируршку експерименталну методу која се споводи на малим животињама (најчешће на глодарима), са циљем проучавања дејства лекова и супстанци на функцију миокарда и коронарни проток.

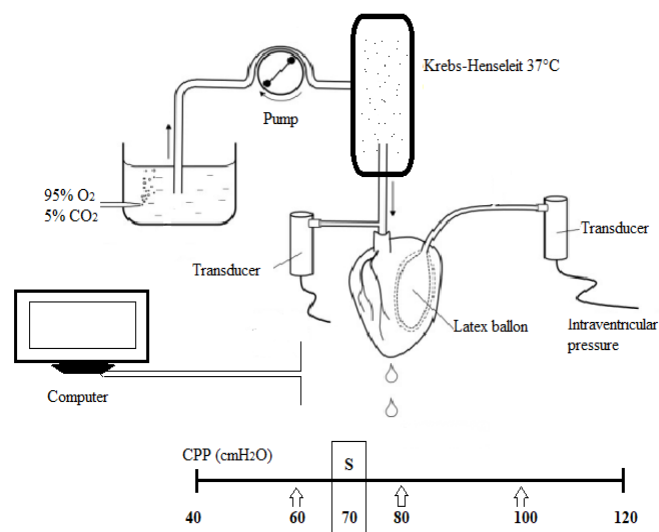
Први корак у низу активности изоловања органа је припрема животиње за општу анестезију и процес увођења у анестезију. Имајући у виду кардиодепресивне ефекте већине општих анестетика, нарочито након дуже експозиције и веће дозе, у нашој студији одлучили смо се за краткотрајну анестезију мешом ксилазин/кетамин у дози од 100/10 мг/кг телесне масе, која је обезбедила тоталну аналгезију и губитак свести пацова. Након цервикалне дислокације (Schedule 1 of the Animals/Scientific Procedures, Act 1986, UK) и узимања узорка крви пацова искрварењем, извело се отварање грудног коша, пресецање перикарда и изоловање срца. Целокупна процедура се радила уз континуирано преливање хладним физиолошким раствором ($+4^\circ\text{C}$), да би се изоловани орган потопио у ледени физиолошки раствор (-4°C до -10°C). Сврха овог поступка је свођење метаболичких потреба миокарда на минимум како би се добило довољно времена за препарацију срца и припремање за канулацију аорте без могућности

оштећења миокарда. Након потапања срца у ледени физиолошки раствор препарисали смо асцендентну аорту, кроз коју се врши ретроградна перфузија. Аорту смо потом концем причврстили за канилу Лангендорф апарата, након чега смо почели акутни експеримент. Свеукупна процедура, од жртвовања животиње до повезивања аорте са канилом, не би требало да траје дуже од 2 минута како би се обезбедио виталан рад и ритам срчаног мишића уз сталну детекцију и праћење истог.

3.5. Лангендорф апарат

Давне 1897. године Оскар Лангендорф је описао технику изолације срца које изван тела наставља са својом активношћу, при чему је могуће пратити различите параметре срчане функције. Модел се заснива на ретроградној перфузији срца хранљивим раствором кроз аорту и коронарни отвор у коронарне крвне судове, што и омогућава вантелесно очување срца. Постоје два модела ретроградне перфузије срца: перфузија при константном притиску и перфузија при константном протоку. У оба случаја друга варијабла је променљива, односно при константном притиску прати се промена протока, док се при константном протоку прати промена притиска. Током извођења нашег експеримента користила се метода изолованог срца по Лангендорфу при константном притиску (70 cmH₂O) (Слика 3).

Слика 3. Лангендорф систем за перфузију изолованог срца пацова



Лангендорф систем је данас стандардан модел за фармаколошко-физиолошка испитивања срчане функције у *in vitro* условима када желимо да искључимо нервно и хуморално дејство. То значи да је свака промена срчане активности резултат директног утицаја испитиване супстанце или агенса и није маскирана компензаторним механизмима организма. Посебна важност овог система је могућност испитивања исхемијско-реперфузијског модела и тиме пружа велике могућности у потрази за потенцијалним кардиопротективним агенсима.

Експериментална истраживања у нашој студији су спроведена на *Langendorff* апарату марке LF-01 F-P произвођача Experimetria Ltd, Budapest, (Мађарска).

Основне компоненте овог апарата су:

1. Две вертикалне стаклене цеви које су исте висине али различитог пречника (при чему се цев мањег пречника налази унутар цеви већег пречника). Цев мањег пречника се методом негативног притиска испуњава сложеним физиолошким раствором (у нашем случају Кребс-Хенселејтов раствор). Већа цев се системом бочних цеви испуњава водом, која је претходно загријана у воденом купатилу. Циркулишућа вода у цеви већег пречника се загријава тако да раствор у цеви мањег пречника на излазу из система има температуру 37 °C (оптималну телесну температуру). Цев мањег калибра се завршава излазом, на који се поставља препарат изолованог срца пацова;
2. Резервоар у коме се налази сложени Кребс-Хенселејтов раствор (запремина 4 литра). Овај сложени физиолошки раствор је по свом саставу веома сличан ванћелијској течности. рН раствора износи 7,4. Његова улога је да обезбеди одговарајућу исхрану срца и његов несметан рад. Резервоар је спојен са пумпом која раствор континуирано преноси до цеви мањег пречника. Са друге стране резервоар је спојен са боцом у којој се налази смеша кисеоника и угљен диоксида (O_2 и CO_2);
3. Боца у којој се налази смјеша O_2 (95%) и CO_2 (5%). Гасирањем Кребс-Хенселејтовог раствора постижу се физиолошке вредности парцијалних притисака O_2 и CO_2 артеријске крви ;
4. Канила, која спаја изводну цев система цеви и асцедентну аорту изолованог срца пацова;

5. Водено купатило које загрева воду између цеви већег и мањег пречника, чиме се омогућава одржавање константне температуре раствора на оптималној вредности од 37 °C (изотермичност);
6. Инфузиона пумпа, којом се испитавана супстанца адекватном брзином (у зависности од базалног коронарног протока) администрира на споју каниле и асцедентне аорте;
7. Сензори (трансдјусери). Њихова улога се огледа у континуираном регистровању функције миокарда леве коморе.
8. Рачунар са софтвером (Spel Advanced HaemoSys v3.24) преко кога се прате кардиодинамски параметри рада леве коморе срца. Рачунар је повезан са сензорима који су у вези са структурама изолованог срца пацова, што је начин континуираног праћења срчаног рада.

3.6. *Протокол перфузије изолованог органа по Лангендорф техници*

Након што смо причврстили аорту за канилу Лангендорф апарата, извршили смо уклањање леве аурикуле и просецање леве преткоморе, чиме се обезбедио приступ митралној валвули. Митрална валвула се прокида пинцетом ради пласирања сензора (transducer BS4 73-0184, Experimetria Ltd, Budapest, Hungary) у леву комору, што омогућава директно и континуирано праћење параметара функције леве коморе, односно кардиодинамских параметара:

- ✓ максимална стопа промене притиска у левој комори ($dp/dt \max$, изражен у mmHg/s) - параметар који одражава инотропну способност миокарда;
- ✓ минимална стопа промене притиска у левој комори ($dp/dt \min$, изражен у mmHg/s) - параметар који одражава луситропну способност миокарда;
- ✓ систолни притисак у левој комори (SLVP, изражен у mmHg);
- ✓ дијастолни притисак у левој комори (DLVP, изражен у mmHg);
- ✓ фреквенција срчаног рада (HR, изражена као број откуцаја срца у минути (bpm)).

Извршена је и анализа коронарног протока (coronary flow, CF), који је мерен флоуметријски (flowmetrically) и изражен у милилитрима сакупљеног коронарног венског ефлуента у минути (ml/min).

Након периода стабилизације у срчаном раду (једнаке вредности коронарног протока у три узастопна мерења, у просјеку траје око 25 минута), вршили смо администрацију одговарајуће сумпоровите супстанце у трајању од 5 минута (акутно, директно дејство). Након фазе ефекта следила је фаза опоравка срчане перфузије у трајању од око 10 минута. Дакле, мерење поменутих кардиодинамских параметара, коронарног протока и прикупљање узорак коронарног венског ефлуента вршено је у три тачке од интереса: на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања испитиване супстанце (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*).

3.7. Биохемијске анализе

У узорцима коронарног венског ефлуента прикупљеним на крају контролног периода, на крају апликовања испитиване супстанце и на крају периода опоравка (*control*, *effect*, *washout*), спектрофотометријским методама су одређивани биомаркери оксидационог стреса: индекс липидне пероксидације - мерен као TBARS, азот моноксид - мерен у форми нитрита (NO_2^-), супероксид ањон радикал (O_2^-) и водоник пероксид (H_2O_2). Спектрофотометрија је спроведена на апарату марке Shimadzu UV-1800 UV-VIS спектрофотометар, Јапан.

Из узорак крви прикупљених у тренутку жртвовања животиња добијали смо крвни серум и хемолизат еритроцита. У серуму смо одређивали ниво хомоцистеина - течном хроматографијом под високим притиском (HPLC). Хемоизат еритроцита смо користили за процену системског редокс статуса, односно за спектрофотометријско мерење маркера антиоксидационог система заштите: каталазе (CAT), супероксид дисмутазе (SOD) и редукованог глутатиона (GSH).

3.7.1. Одређивање хомоцистеина (Hcy)

Крв за одређивање хомоцистеина (3 – 4 ml) је сакупљана у епрувете без додатка антикоагуланса, у току жртвовања животиња, након чега је центрифугирана како би се издвојио серум. Након центрифугирања и сепаратисања узорци су замрзавани на -20°C , унутар једног сата од издвајања серума. Хомоцистеин је мерен на апарату ACL Elite Pro, методом течне хроматографије под високим притиском (HPLC- High Pressure Liquid Chromatography) према упутству произвођача.

3.7.2. Одређивање супероксид анјон радикала (O_2^-)

Одређивање количине супероксид анјон радикала (O_2^-) у коронарном венском ефлуенту заснива се на реакцији O_2^- са нитро тетразолијум плавим (Nitro Blue Tetrazolium - NBT) до нитроформазаан плавог (155, 156, 157). Спектрофотометријско мерење се врши на таласној дужини максималне апсорпције $\lambda_{max}=550nm$. Есејна смеша (“assay mixture”) садржи: 50 mM TRIS-HCl пуфера (pH=8.6), 0.1 mM EDTA, 0.1 mg/ml желатина и 0.1 mM NBT. Пре употребе смеша се претходно гасира азотом под притиском у трајању од једног часа.

У епрувете (12x100) је пипетирано 50 μ l коронарног венског ефлуента и 950 μ l есејне смеше, чиме реакција отпочиње. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћена је адекватна количина Кребс-Хенселејтовог раствора. На самом почетку реакције измери се екстинкција смеше и нотира се као екстинкција E_1 . Сваких 60 секунди се врши мешање пластичним штапићем и нотира екстинкција након мешања до своје стабилизације, што подразумева две узастопне приближно исте екстинкције. Последња екстинксија се означава као E_2 . Исти поступак се примењује и за слепу пробу.

1. Концентрација ослобођеног O_2^- добијена је на основу следећих једначина:

$$\Delta E_u = E_{2u} - E_{1u} \text{ (за узорак)}$$

$$\Delta E_{sp} = E_{2sp} - E_{1sp} \text{ (за слепу пробу)}$$

$$\Delta E = \Delta E_u - \Delta E_{sp}$$

$$\text{nmol } O_2^-/\text{ml ефлуента} = \Delta E / 0.015 \times 1 / 0.05$$

2. Количина ослобођеног O_2^- по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин:

$$\text{nmol } O_2^-/\text{минут/g} = \Delta E / 0.015 \times 1 / 0.05 \times CF/m_{\text{срца}}$$

3.7.3. Одређивање водоник пероксида (H_2O_2)

Одређивање количине водоник пероксида (H_2O_2) заснива се на оксидацији фенол црвеног помоћу водоник пероксида у реакцији која је катализована ензимом пероксидазом из коњске ротквице (HorserRadishPerOxidase - HRPO). Ова реакција резултује формирањем једињења чији је максимум апсорпције $\lambda_{max}=610nm$ (155, 156).

Ова метода омогућава детерминацију настајања и ослобађања H_2O_2 за временски интервал од 5-60 минута. У епрувете (12x100) је пипетирано 200 μ l коронарног венског ефлуента и 800 μ l свеже направљеног раствора фенол црвеног (Phenol Red Solution-PRS) који садржи 140 mM NaCl, 10 mM калијум фосфатног пуфера (pH =7), 5,5 mM D(+)-глукозе и 0,28 mM фенол црвеног. Узорцима се затим додавало 10 μ l (1:20) HRPO, припремљеног *ex tempore*. Узорци су остављани на собној температури 10 минута, а затим се подешавао pH \approx 12, помоћу 1M NaOH. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћена је адекватна количина Кребс-Хенселејтовог раствора. Концентрација ослобођеног H_2O_2 у коронарном венском ефлуенту израчунавана је на основу калибрационог дијаграма (стандардне криве), одређиваног за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве, користио се стандардни (Stock) раствор H_2O_2 , уз претходну проверу концентрације (A_{230} за 10 mM H_2O_2 износи 0,810). У три епрувете је пипетирано: 5, 10 и 20 μ l 1 mM раствора H_2O_2 , 200 μ l дестиловане воде, 800 μ l раствора фенол црвеног и 10 μ l (1:20) HRPO. Након инкубације од 10 минута на собној температури, подешен је pH \approx 12 помоћу 1M NaOH (10 μ l). Тако је финална концентрација H_2O_2 у три узорка стандарда износила: 2,75; 5,49; и 10,99 nmol/ H_2O_2 /ml. Мерење апсорбанце (A) спровођене су на таласној дужини максималне апсорпције $\lambda_{max}=610nm$, у стакленим киветама запремине 1 ml, на спектрофотометру LKB Biochrom. модел: Ulltrospec 4050. Од добијених апсорбанци одузима се вредност апсорбанце слепе пробе (B), чиме се добијала коначна апсорбанца (ΔA).

Концентрација, а затим и количина ослобођеног H_2O_2 у коронарном венском ефлуенту израчуната је на основу:

1. Фактор апсорбанце (F) по једном nmol-у водоник пероксида:

$$F = \Delta A / \text{nmol } H_2O_2 / \text{cuv}$$

2. На основу апсорбанце узорка на $\lambda_{max}=610nm$ (A_u) и њеног упоређивања са слепом пробом (A_{sp}) израчунава се финална апсорбанца (ΔA) ($A = A_u - A_{sp}$). Помоћу овако добијене апсорбанце, фактора F и количине коронарног венског ефлуента употребљеног у есеју (200 ml), израчуната је концентрација и количина H_2O_2 у коронарном венском ефлуенту по формули:

$$\text{nmol } H_2O_2 / \text{ml ефлуента} = \Delta A / F$$

3. Након тога, количина ослобођеног H_2O_2 по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин:

$$\text{nmol H}_2\text{O}_2/\text{ml /минут/g wt} = \Delta A/F \times CF/m_{\text{срца}}$$

3.7.4. Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS)

Индекс липидне пероксидације, као један од параметара оксидационог стреса, се одређује индиректно преко продукта реакције липидне пероксидације са тиобарбитурном киселином, одакле и потиче скраћеница TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances). У експериментима попут нашег истраживања, ниво TBARS-а у коронарном венском ефлуенту се одређује спектрофотометријски (158).

У епрувете (12x100) је пипетирано 800 μl коронарног венског ефлуента и 200 μl 1% ТВА у 0.05M NaOH. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћена је еквивалентна количина Кребс-Хенселејтовог раствора. Након пипетирања, узорци су инкубирани у воденом купатилу 15 минута на 100 °C. Након инкубације, узорци су прилагођени собној температури, а затим се одређивала концентрација ослобођених TBARS у коронарни венски ефлуент, спектрофотометријски на таласној дужини од $\lambda=530\text{nm}$.

1. Концентрација ослобођених TBARS добијена је на основу следеће једначине:

$$\mu\text{mol TBARS/ml ефлуента} = \Delta A (A_u - A_{sp})/1.56 \times 1.25,$$

при чему је A_u апсорбанца узорка, A_{sp} апсорбанца слепе пробе, док су 1.56 и 1.25 корекциони фактори за овај есеј.

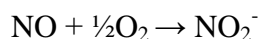
2. Након тога, количина ослобођених TBARS по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин:

$$\mu\text{mol TBARS/минуто/g wt} = \Delta A/1.56 \times 1.25 \times CF/m_{\text{срца}}$$

Важно је напоменути да се, за разлику од свих осталих биохемијских параметара, ниво TBARS изражава у μM , док је количина осталих молекула изражавана у nM. Разлог је у количини TBARS, која је за један ранг величина већа од свих осталих параметара. Овакав резултат је последица неспецифичности TBARS, као теста, јер он представља сумацију деловања готово свих реактивних кисеоничних и азотних врста, док сви остали параметри везани за појединачне реактивне кисеоничке/азотне молекуле, које имају специфичне механизме деловања.

3.7.5. Одређивање азот монооксида у форми нитрита (NO₂⁻)

Одређивање количине ослобођених нитрита у коронарном венском ефлуенту представљало је најадекватнију индиректну методу за одређивање функционалности ендотелног L-аргинин-азот моноксид (NO) система у коронарној циркулацији. У нашим условима истраживања методе за директно одређивање NO су недоступне, тако да је спектрофотометријска метода одређивања количине ослобођених нитрита (159) била наш избор, као довољно поуздана метода за ову процену. С обзиром да се у реакцији са молекуларним кисеоником ствара еквимоларна количина нитрита, можемо са великом сигурношћу тврдити да количина ослобођених нитрита у коронарном венском ефлуенту представља количину ослобођеног NO.



Биохемијски се ова метода заснива на употреби Griess-реагенса, који са нитритима гради диазо-комплекс, који даје љубичасту боју. Griess-ов реагенс се припрема *ex tempore*, непосредно пре аналитичког одређивања, мешањем једнаких запремина (v/v) 1 % сулфанилне киселине растворене у 5 % орто-фосфорној киселини и 0.1 % воденог раствора: N-(1-нафтил)-етилendiамин дихидрохлорида (NEDA), који се чува у тамној бочици на 4 °C, због своје високе фотохемијске реактивности.

У епрувете (12 x 100) је пипетирано 1 ml коронарног венског ефлуента, 250 µl свеже направљеног Griess-ов реагенса и 125 µl амонијачног пуфера (pH=9.0), кога сачињавају амонијум хлорид (NH₄Cl) и натријум тетраборат (Na₂B₄O₇). Амонијачни пуфер, који се у току припеме мора загревати, због изузетно слабе растворљивост натријум тетрабората, има за сврху стабилизацију диазо-комплекса. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћено је 1 ml Кребс-Хенселејтовог раствора.

Концентрација ослобођених нитрита у узорцима одређивана је на основу калибрационе криве. Калибрациона крива је конструисана на основу екстинкција узорака, који су у себи садржали познату концентрацију нитрита, након њихове реакције са Griess-овим реагенсом у присуству пуфера. Добијана је пипетирањем различитих количина воденог раствора 1 mM NaNO₂ у 1 ml Кребс-Хенселејтовог раствора и то: 3, 6, 12, 24 µl, чиме је добијена концентрација нитрита од: 2.18, 4.37, 8.73 и 17.34 nmol NO₂⁻/ml. Након стабилизације боје на собној температури од 5-10 минута приступа се мерењу концентрације ослобођених нитрита спектрофотометријски на таласној дужини од λ=550 nm.

Концентрација, а затим количина ослобођених нитрита добијана је на основу:

- Одређивања стандардног фактора (F) из следеће једначине; за сваки појединачни стандард (F1-F4), а затим добијањем њихове аритметичке средине.

Екстинкција стандарда-екстинкција слепе пробе

Концентрација NaNO_2 у стандарду

- Делењем разлике екстинкција узорка и слепе пробе са стандардом F:

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

- Након тога, количина ослобођених нитрита по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин:

$$\text{nmol NO}_2/\text{минут/g wt} = \Delta E/F \times CF \text{ (коронарни проток)/}m_{\text{срца}}$$

3.7.6. Одређивање редукованог глутатиона (GSH)

Активност редукованог глутатиона, антиоксидативног ензима заштите, је мерена у лизату еритроцита спектрофотометријском методом. Ова метода се базира на реакцији оксидације глутатиона са 5.5-дитио-бис-6.2-нитробензоичном киселином, методом по *Beutler-у* (160).

3.7.7. Одређивање супероксид дисмутазе (SOD)

Супероксид дисмутаза је одређивана епинефрин методом по *Beutler-у*. Мешањем 100 μl лизата еритроцита и 1 ml карбонатног пуфера се започиње процес, након чега се додаје 100 μl епинефрина. Мерење се врши спектрофотометријски на таласној дужини од $\lambda=470\text{nm}$ (161).

3.7.8. Одређивање каталазе (CAT)

Концентрација каталазе је такође одређивана у лизату еритроцита. Након дилуције лизата дестилованом водом у односу 1:7 и додавања етанола у односу 0,6:1 приступило се даљој процедури. 50 μl каталаза пуфера, 100 μl узорка и 1 ml 10 mM

H₂O₂ су стављени у епрувету и приступило се мерењу узорака на таласној дужини од $\lambda=360$ nm (162).

3.8. *Статистичка анализа података*

Прорачун укупног узорка је заснован на резултатима претходно објављене студије (14), (Каплан и група словачких истраживача, од 2011-2015. год.). За прорачун је коришћен Т-тест за везани узорак, двоструко, уз претпоставку алфа грешке од 0.05 и снаге студије 0.8 (бета грешка 0.2) и уз коришћење одговарајућег рачунарског програма (9). Узимањем у обзир резултате наведене студије, укупан број експерименталних животиња је прорачунат на 80 (две групе, свака подељена на пет подгрупа, у свакој подгрупи по осам животиња).

За статистичку обраду резултата употребљене су методе дескриптивне статистике (средња вредност, стандардна грешка, стандардна девијација и варијанса). За тестирање разлика између група употребљена је параметријска или непараметријска анализа варијансе са одговарајућим *posthoc* тестом (Bonferonni/Kruskall-Wallis/Tukey), а за тестирање разлика између група Wilcoxon-ов тест за везане узорке. За анализу података коришћени су статистички програми *SPSS 18.0 for Windows* и *MedCalc*.

РЕЗУЛТАТИ

4. РЕЗУЛТАТИ

Резултати истраживања, статистички анализирани, су приказани табеларно и графички. У студији су праћене концентрације укупног хомоцистеина у крвној плазми/серуму пацова, кардиодинамски параметри, биомаркери оксидационог стреса у коронарном перфузату и крвној плазми, и маркери антиоксидационог система заштите у хемолизату еритроцита пацова.

4.1. Концентрација хомоцистеина у односу на третман DL-Нсу

У Табели 3 приказане су концентрације укупног хомоцистеина у крвној плазми/серуму пацова (средња вредност \pm стандардна грешка) у групама у односу на третман DL-хомоцистеином. Примећено је статистички значајно ($p < 0,05$) повећање вредности хомоцистеина у експерименталној групи (животиње које су биле на третману DL-Нсу у трајању од 14 дана) у односу на контролну групу (животиње које нису биле на третману DL-Нсу).

Табела 3. Концентрације укупног хомоцистеина у крвној плазми/серуму пацова у контролној и експерименталној групи

Група	Хомоцистеин
Контролна група	8,11 \pm 1,28 $\mu\text{mol/l}$
Експериментална група (DL-Нсу)	12,64 \pm 1,53 $\mu\text{mol/l}$ *

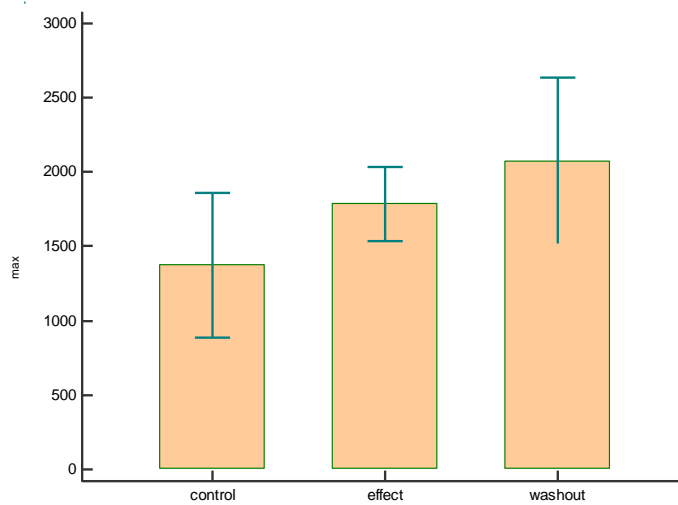
Вредности у табели су приказане као средња вредност измереног параметра \pm стандардна грешка

* $p < 0,05$ статистички значајна промена између двије групе од интереса

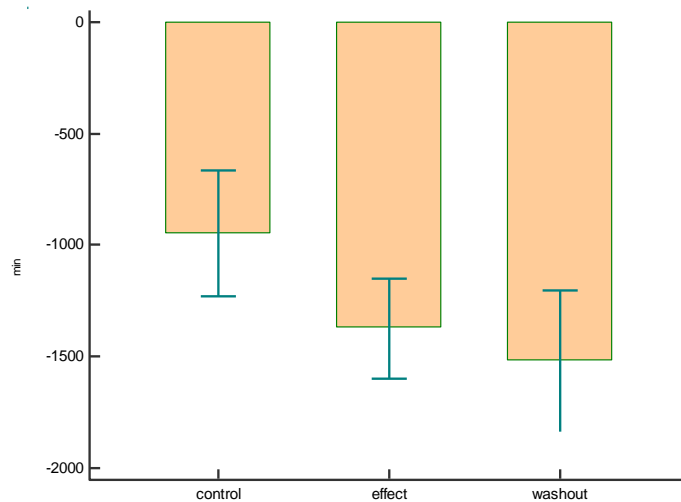
4.2. Динамика кардиодинамских параметара унутар контролних група пацова

4.2.1. Контролна група (CTRL)

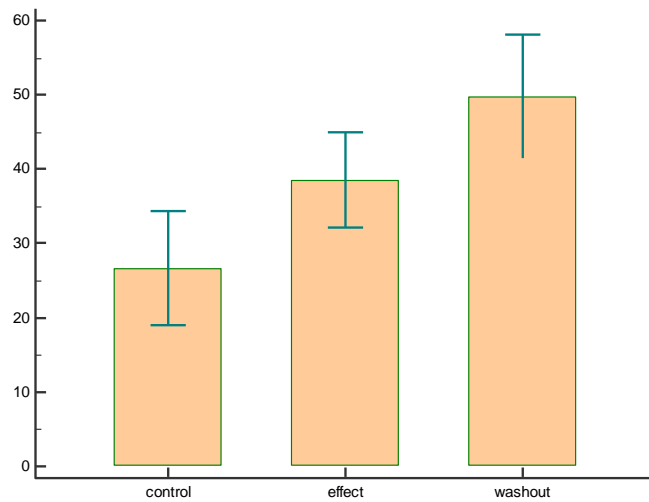
Графикон 1. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{\max}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у контролној групи пацова који нису третирани DL-Нсу



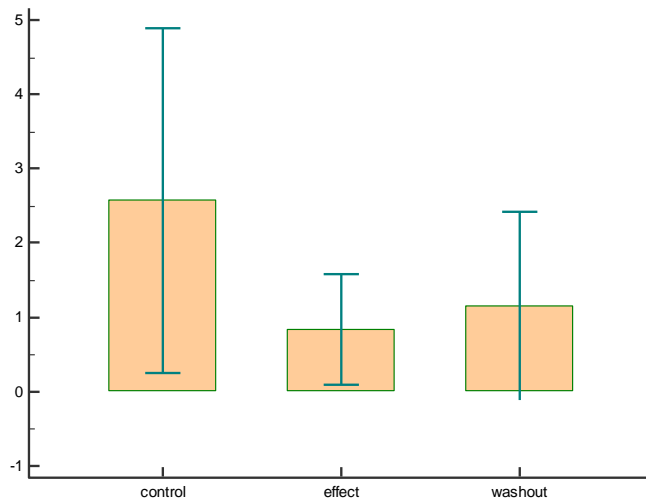
Графикон 2. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{\min}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у контролној групи пацова који нису третирани DL-Нсу



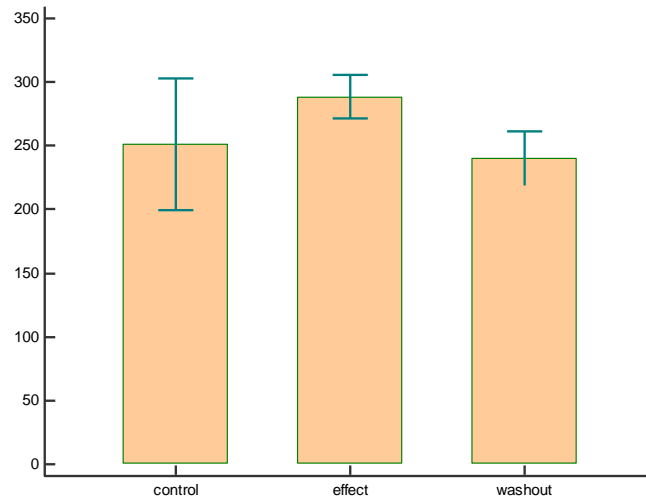
Графикон 3. Систолни притисак у левој комори (SLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у контролној групи пацова који нису третирани DL-Нсу



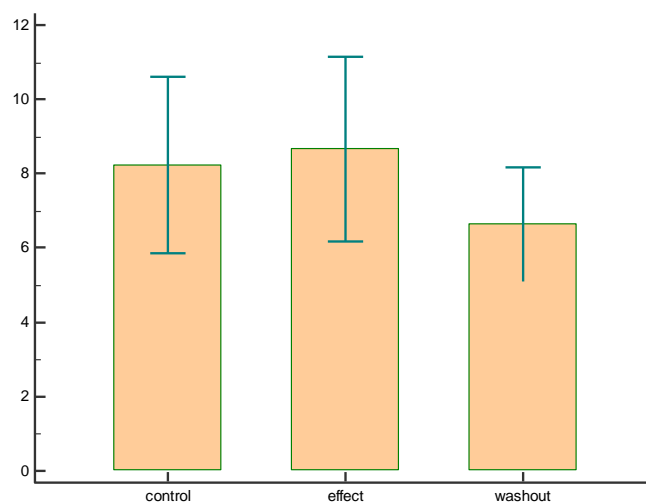
Графикон 4. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у контролној групи пацова који нису третирани DL-Нсу



Графикон 5. Срчана фреквенца леве коморе (HR) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у контролној групи пацова који нису третирани DL-Нсу

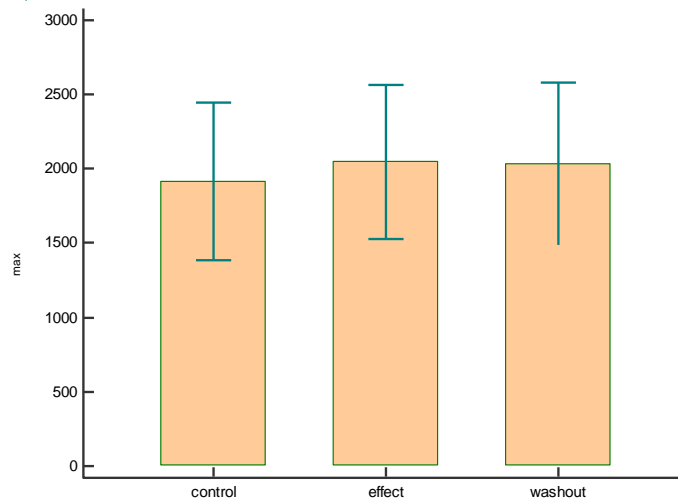


Графикон 6. Коронарни проток (CF) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у контролној групи пацова који нису третирани DL-Нсу

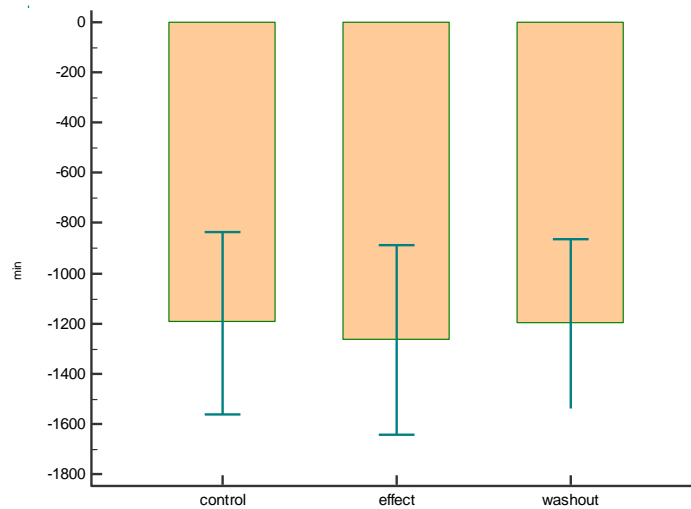


4.2.2. L-метионин група (L-Meth)

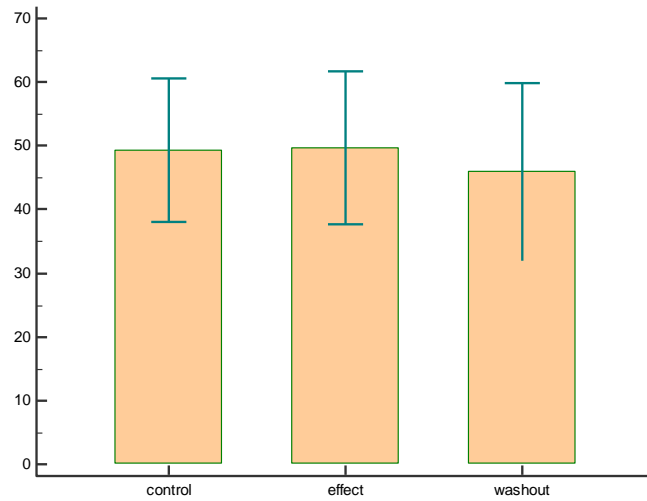
Графикон 7. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{\max}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Meth групи пацова



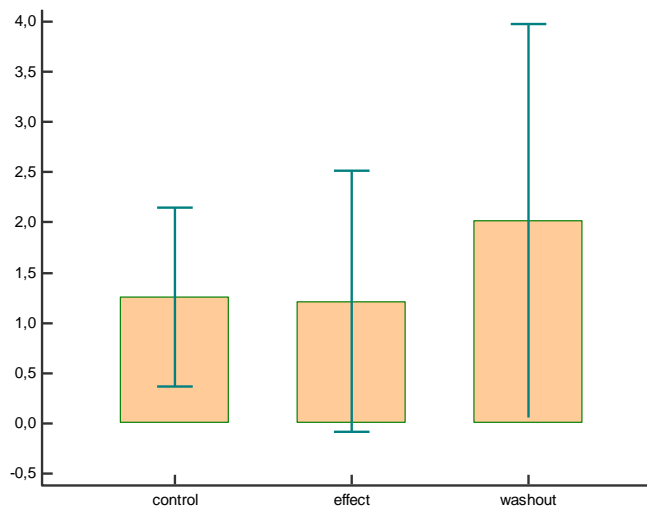
Графикон 8. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{\min}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Meth групи пацова



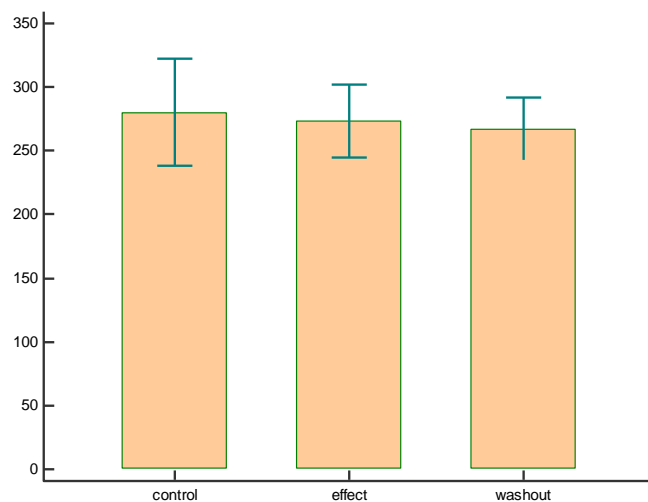
Графикон 9. Систолни притисак у левој комори (SLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Meth групи пацова



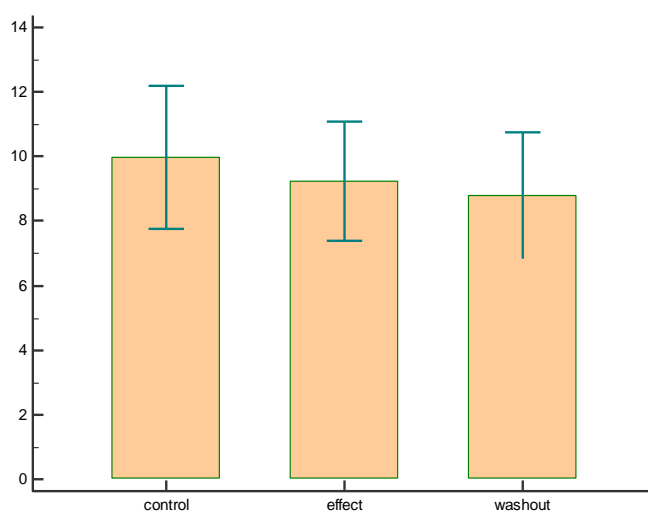
Графикон 10. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Meth групи пацова



Графикон 11. Срчана фреквенца леве коморе (HR) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Meth групи пацова

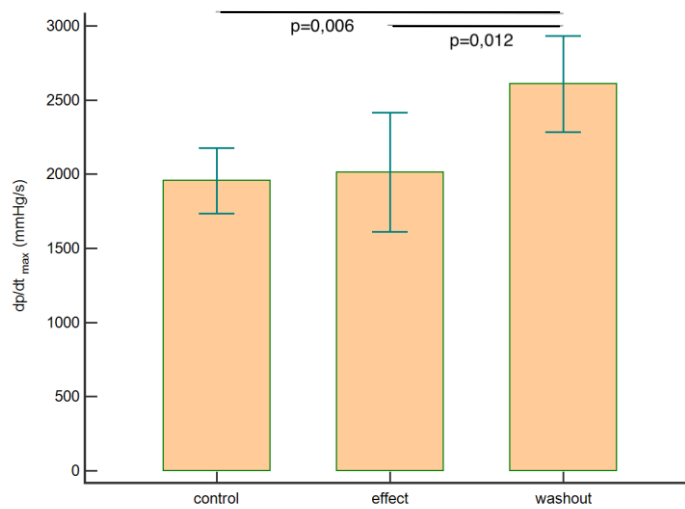


Графикон 12. Коронарни проток (CF) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Meth групи пацова

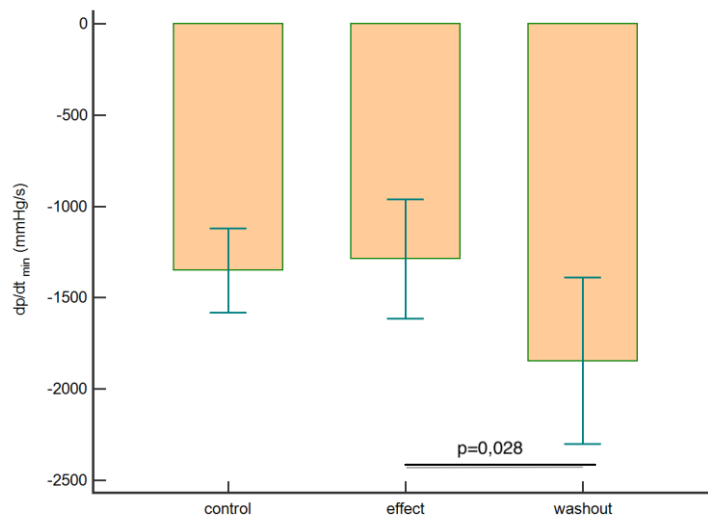


4.2.3. L-цистеин група (L-Cys)

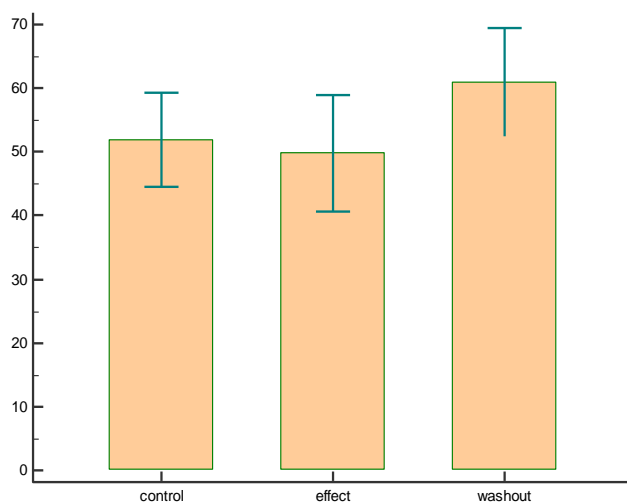
Графикон 13. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{max}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Cys групи пацова



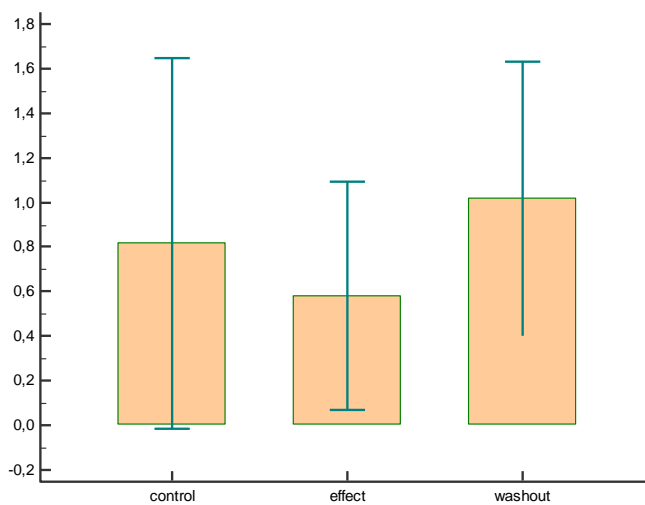
Графикон 14. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{min}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Cys групи пацова



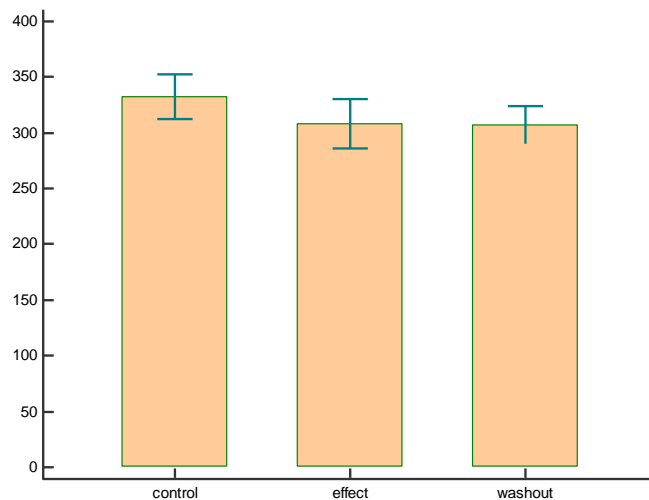
Графикон 15. Систолни притисак у левој комори (SLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Cys групи пацова



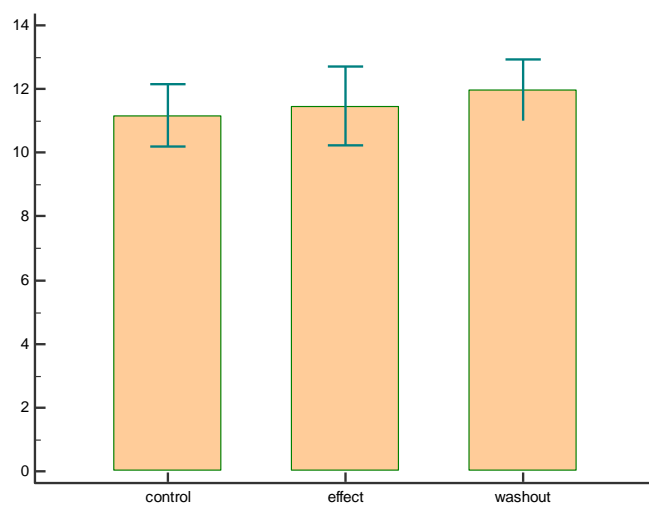
Графикон 16. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Cys групи пацова



Графикон 17. Срчана фреквенца леве коморе (HR) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Cys групи пацова

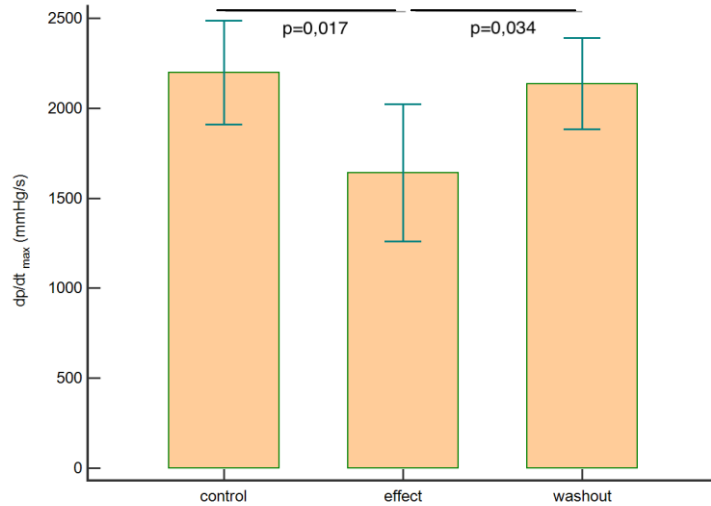


Графикон 18. Коронарни проток (CF) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Cys групи пацова

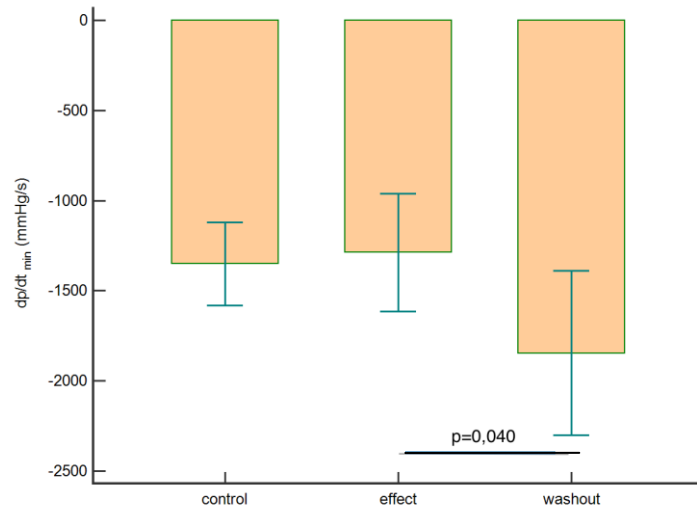


4.2.4. N-ацетилцистеин група (NAC)

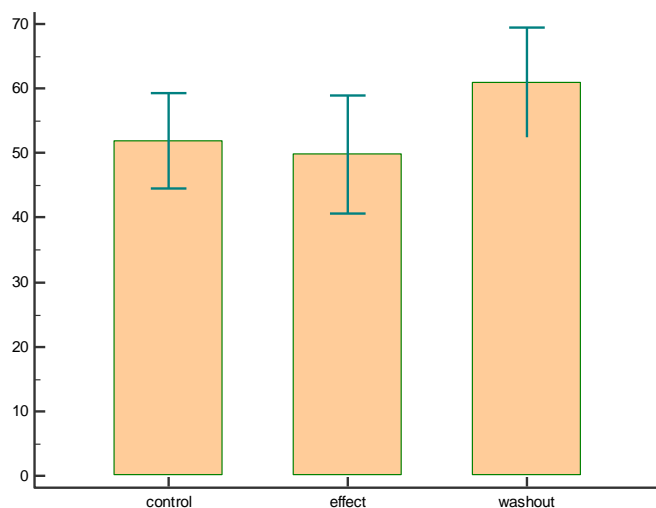
Графикон 19. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{\max}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NAC групи пацова



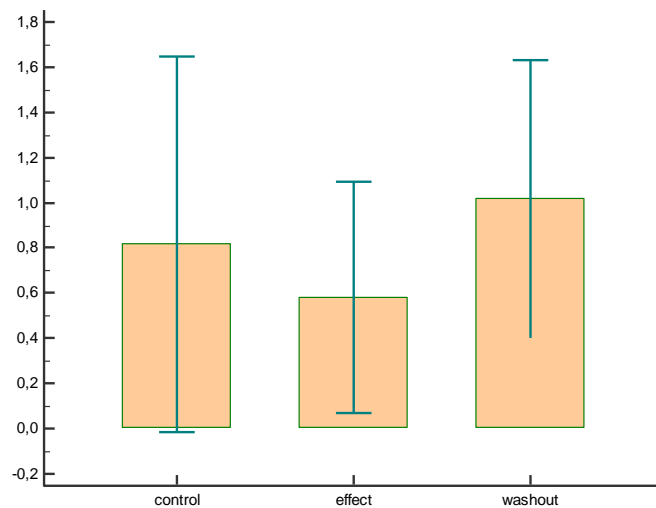
Графикон 20. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{\min}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NAC групи пацова



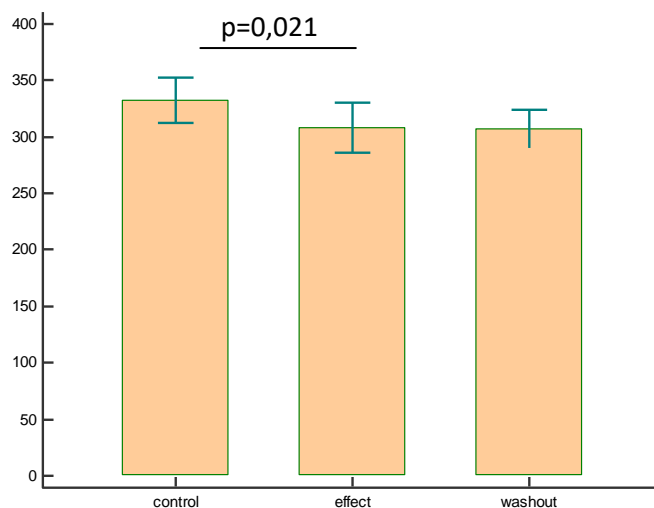
Графикон 21. Систолни притисак у левој комори (SLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања НАС (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у НАС групи пацова



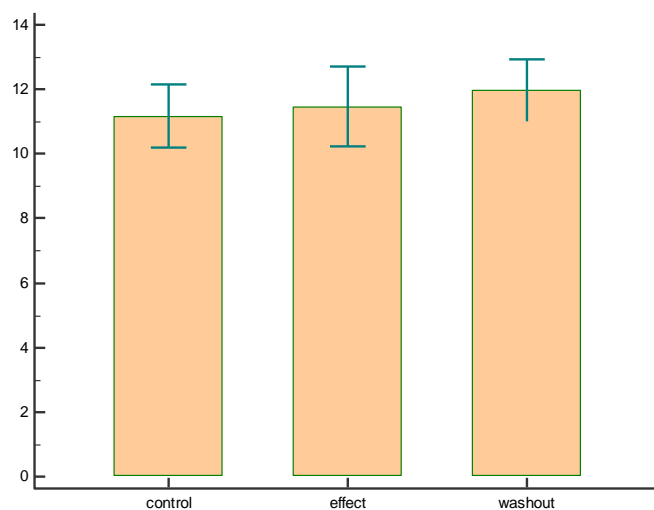
Графикон 22. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања НАС (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у НАС групи пацова



Графикон 23. Срчана фреквенца леве коморе (HR) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања НАС (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у НАС групи пацова

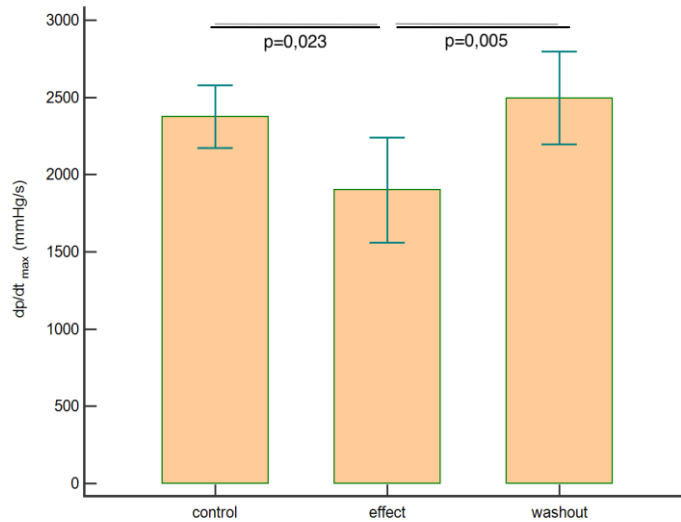


Графикон 24. Коронарни проток (CF) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања НАС (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у НАС групи пацова

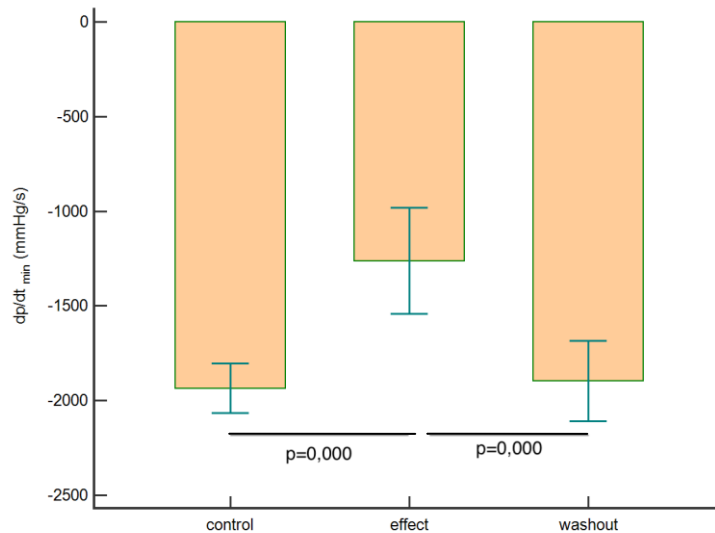


4.2.5. Na-хидрогенсулфид група (NaHS)

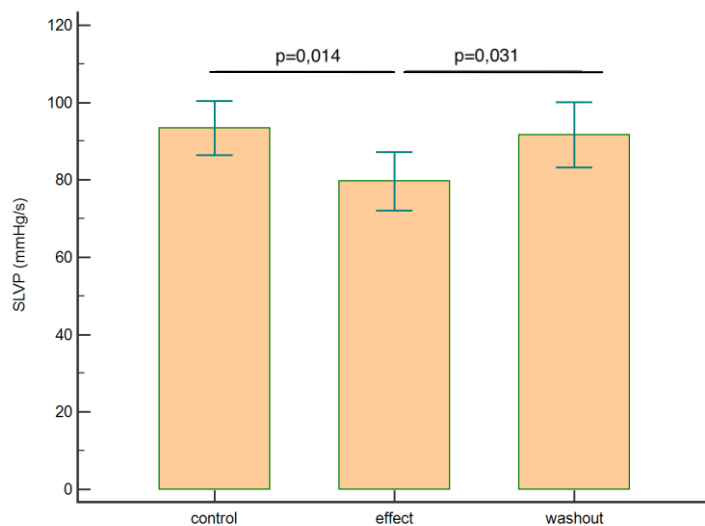
Графикон 25. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{max}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NaHS групи пацова



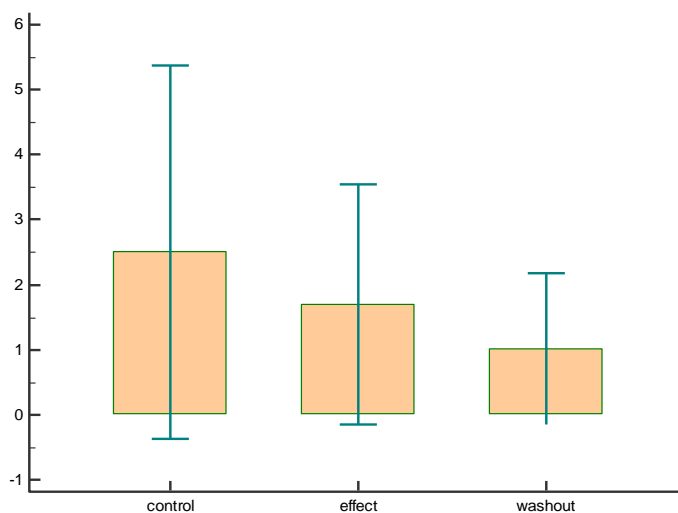
Графикон 26. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{min}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NaHS групи пацова



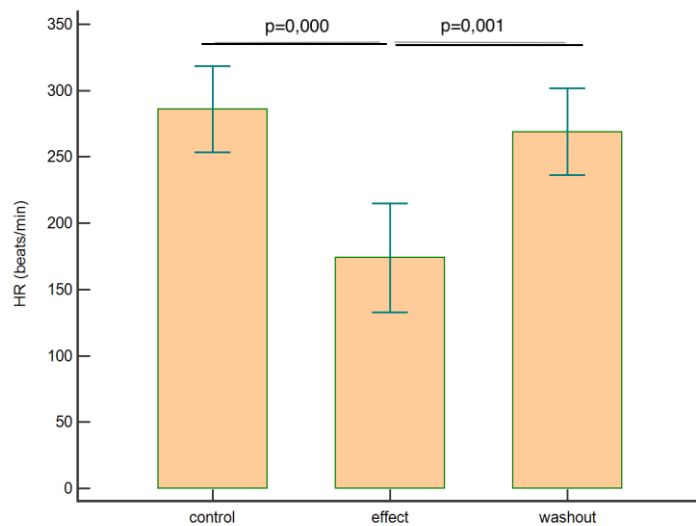
Графикон 27. Систолни притисак у левој комори (SLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NaHS групи пацова



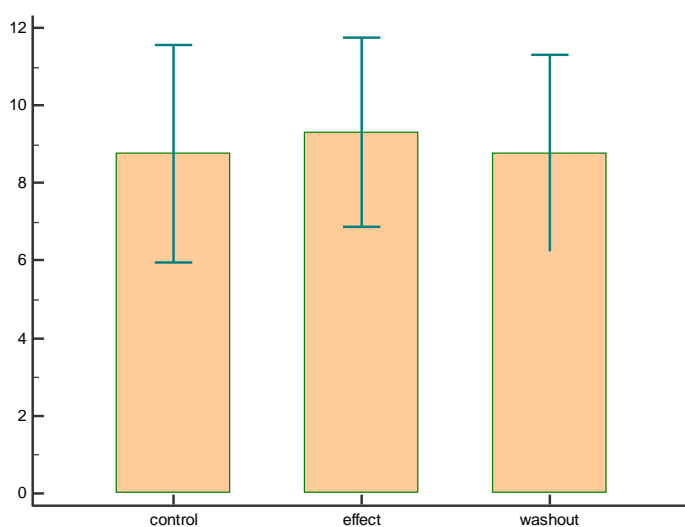
Графикон 28. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NaHS групи пацова



Графикон 29. Срчана фреквенца леве коморе (HR) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NaHS групи пацова



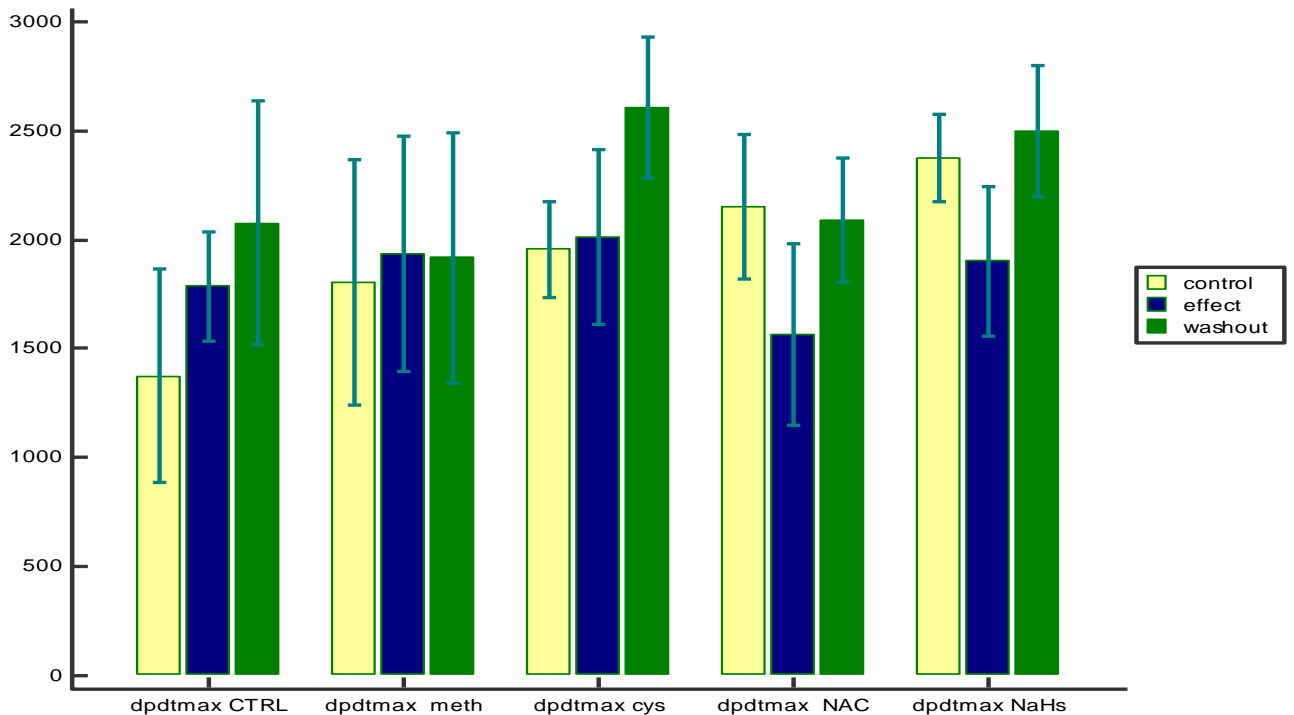
Графикон 30. Коронарни проток (CF) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NaHS групи пацова



4.2.6. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{max}) контролних група пацова у три времена мерења (*control, effect, washout*)

Поређењем вредности dp/dt_{max} унутар сваке контролне групе и посматрањем разлика овог параметра у односу на остале групе, примећено је да је примена L-Cys и NaHS допринела повећању овог маркера контрактилности (јаче инотропно дејство) у периоду опоравка, док је примена NAC довела до пада снаге контрактилности у периоду ефекта (Графикон 31). Статистичким анализама (Табела 4) потврђена је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) унутар L-Cys, NAC и NaHS групе.

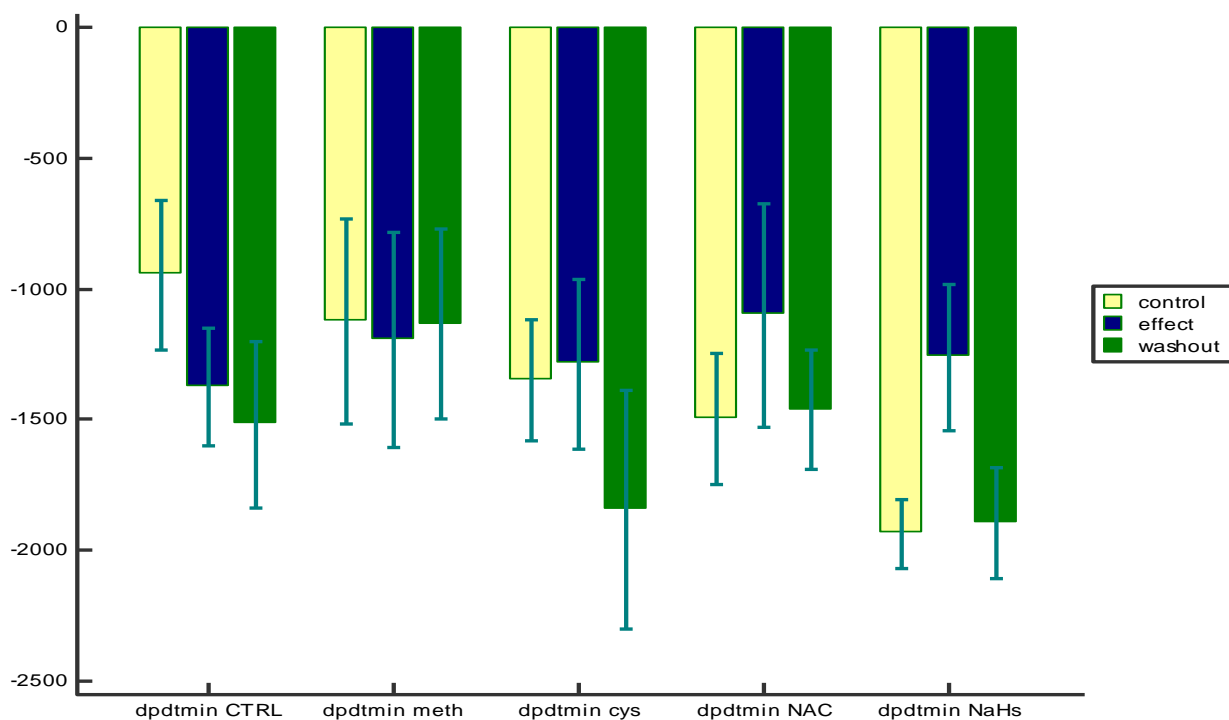
Графикон 31. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{max}) у CTRL, L-Meth, L-Cys, NAC и NaHS групи (*control, effect, washout*)



4.2.7. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{min}) контролних група пацова у три времена мерења (*control, effect, washout*)

Поређењем вредности dp/dt_{min} унутар сваке контролне групе и посматрањем разлика овог параметра у односу на остале групе, примећено је да је примена L-Cys и NaHS допринела порасту овог параметра на још негативније вредности (јаче луситропно, релаксирајуће дејство) у периоду опоравка, док је примена NAC довела до промене параметра у позитивном смеру (ослабљена релаксација) у периоду ефекта (Графикон 32). Статистичким анализама (Табела 4) потврђена је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) унутар L-Cys, NAC и NaHS групе.

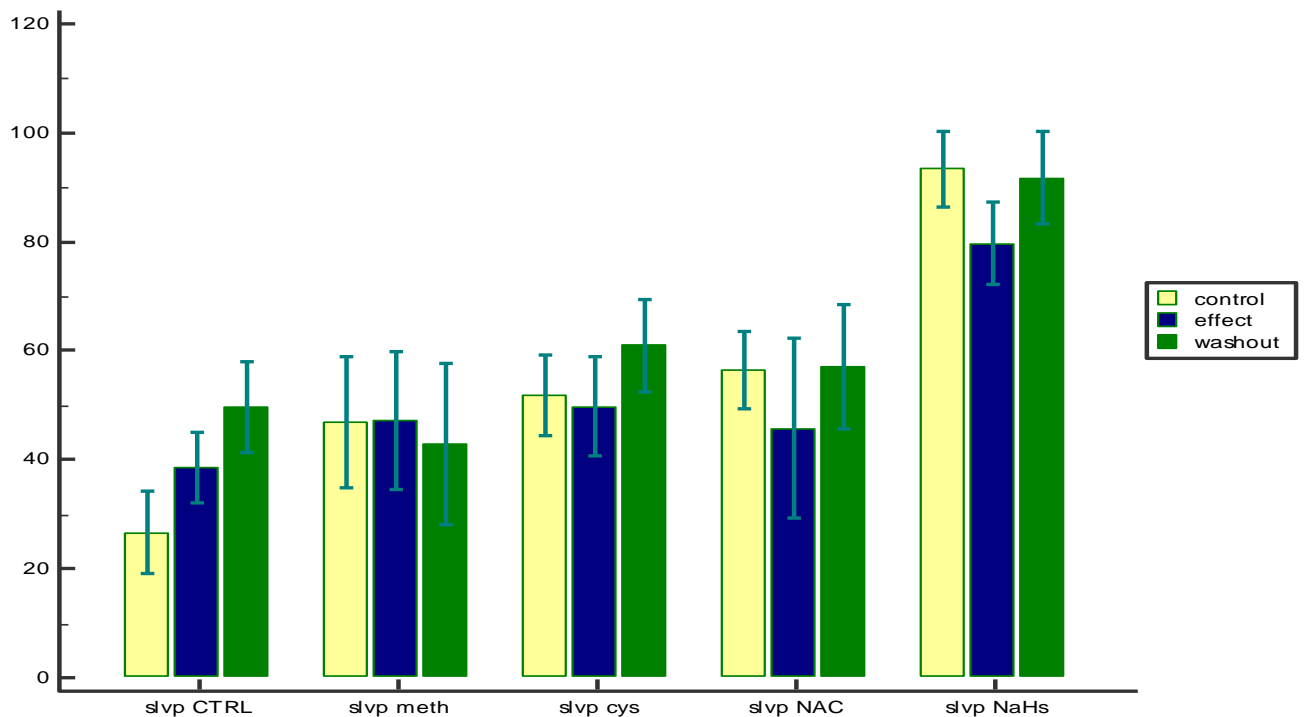
Графикон 32. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{min}) у CTRL, L-Meth, L-Cys, NAC и NaHS групи (*control, effect, washout*)



4.2.8. Систолни притисак у левој комори (SLVP) контролних група пацова у три времена мерења (*control, effect, washout*)

Поређењем вредности SLVP унутар сваке контролне групе и посматрањем разлика овог параметра у односу на остале групе, примећено је да је примена NaHS допринела смањењу овог маркера, у периоду ефекта (Графикон 33). Статистичким анализама (Табела 4) потврђена је статистички значајна разлика унутар NaHS групе ($p < 0,05$).

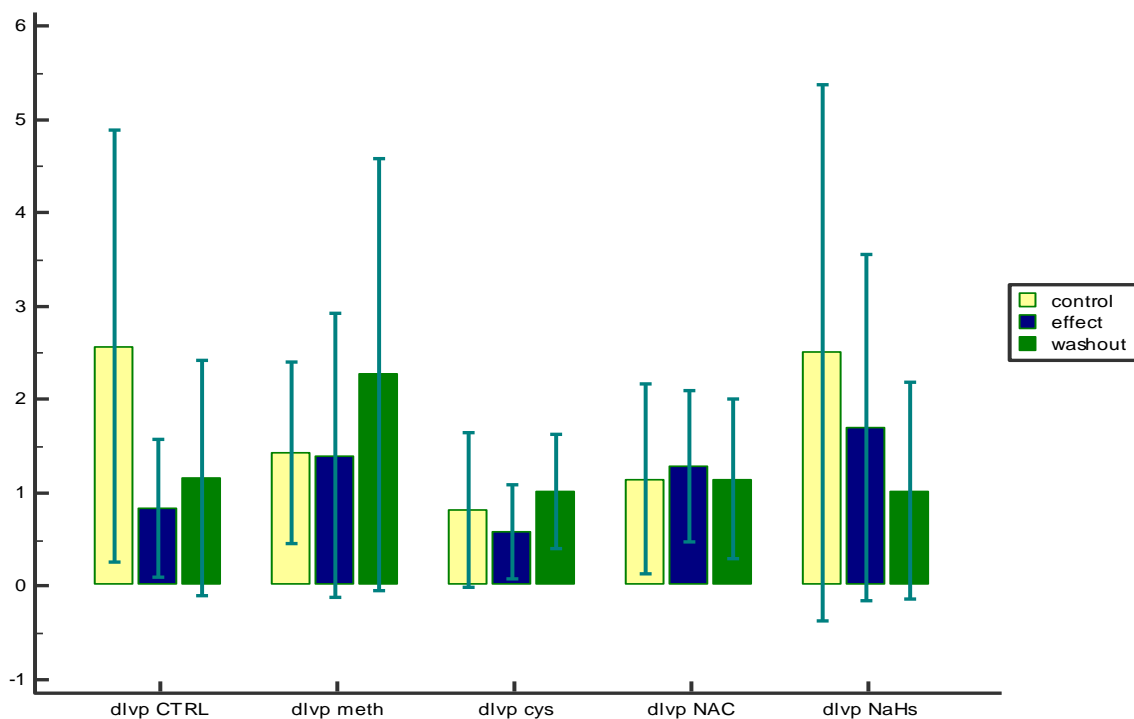
Графикон 33. Систолни притисак у левој комори (SLVP) у CTRL, L-Meth, L-Cys, NAC и NaHS групи (*control, effect, washout*)



4.2.9. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) контролних група пацова у три времена мерења (*control, effect, washout*)

Поређењем вредности DLVP унутар сваке контролне групе и посматрањем разлика овог параметра у односу на остале групе, примећено је да је примена NaHS допринела благом смањењу овог параметра у периоду ефекта и опоравка (Графикон 34). Међутим, статистичким анализама (Табела 4) није потврђена статистички значајна разлика ни у једној групи ($p > 0,05$).

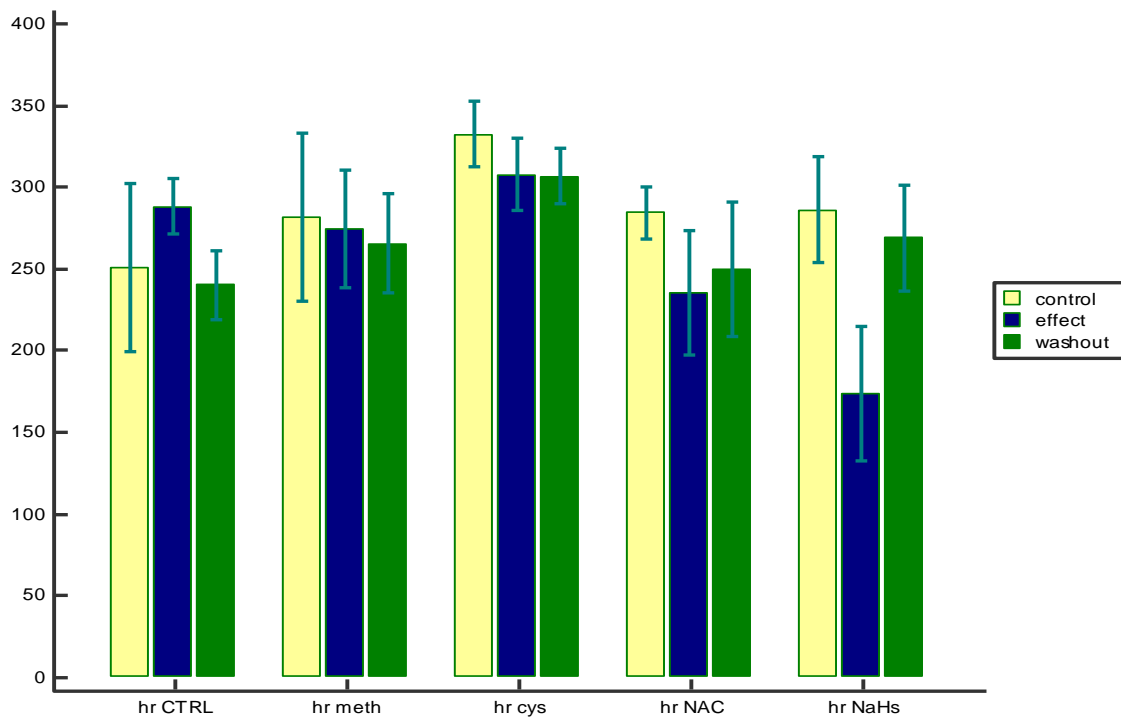
Графикон 34. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) у CTRL, L-Meth, L-Cys, NAC и NaHS групи (*control, effect, washout*)



4.2.10. Срчана фреквенца (HR) контролних група пацова у три времена мерења (*control, effect, washout*)

Поређењем вредности HR унутар сваке контролне групе и посматрањем разлика овог параметра у односу на остале групе, примећено је да је у примена NAC и NaHS допринела смањењу овог параметра у периоду ефекта (Графикон 35). Статистичким анализама (Табела 4) потврђена је статистички значајна разлика унутар NAC и NaHS група ($p < 0,05$).

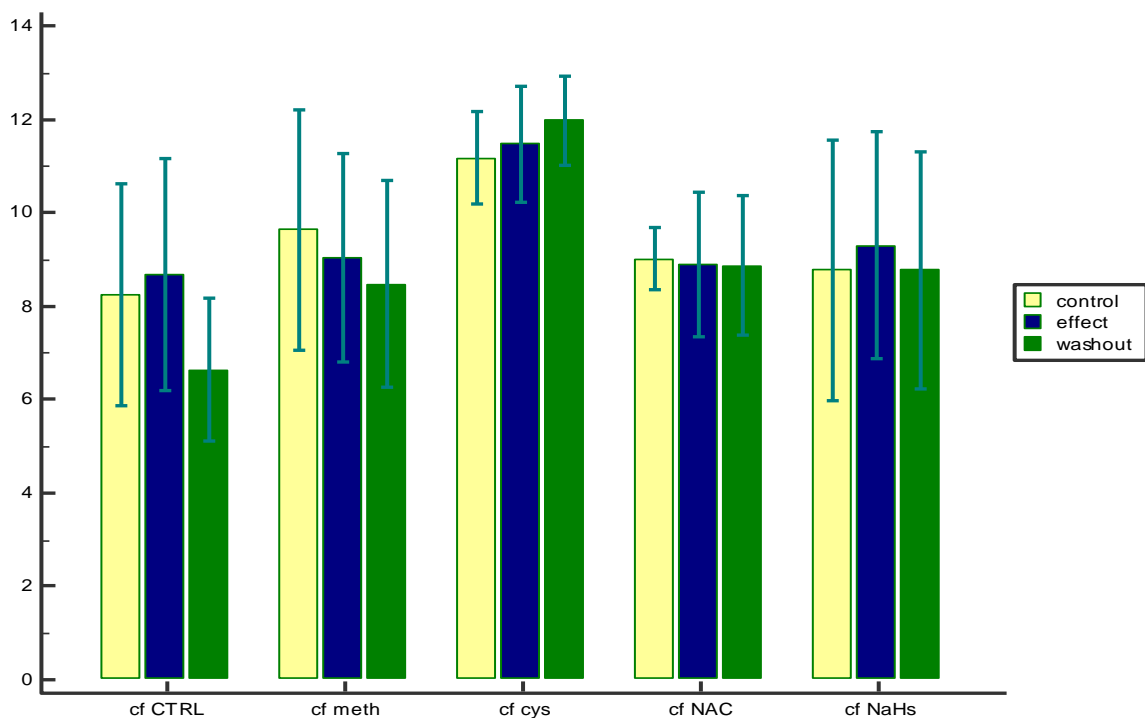
Графикон 35. Срчана фреквенца (HR) у CTRL, L-Meth, L-Cys, NAC и NaHS групи (*control, effect, washout*)



4.2.11. Коронарни проток (CF) контролних група пацова у три времена мерења (*control, effect, washout*)

Поређењем вредности CF унутар сваке контролне групе и посматрањем разлика овог параметра у односу на остале групе, примећено је да акутна примена тестираних сумпоровитих супстанци није изазвала значајне промене (Графикон 36). Статистичким анализама (Табела 4) није потврђена статистички значајна разлика ни у једној групи ($p > 0,05$).

Графикон 36. Коронарни проток (CF) у CTRL, L-Meth, L-Cys, NAC и NaHS групи (*control, effect, washout*)



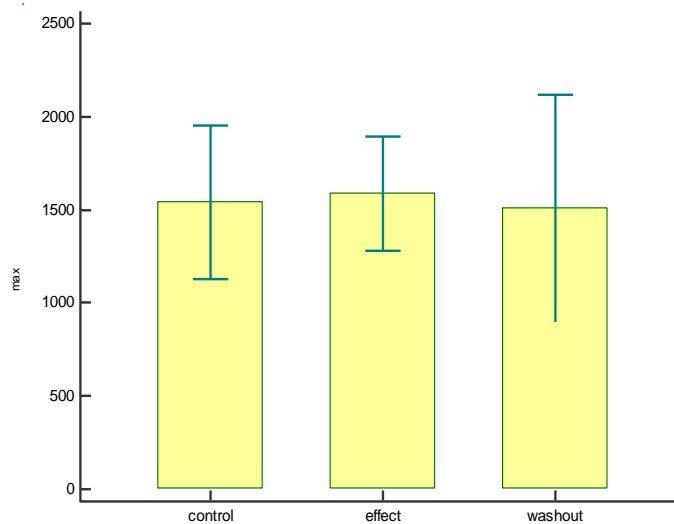
Табела 4. Статистичко поређење различитих мерења (на крају контролног периода – *control*, на крају периода администрације тест супстанце – *effect*, на крају периода опоравка – *washout*) унутар контролних група пацова за кардиодинамске параметре (dp/dt_{max} , dp/dt_{min} , *SLVP*, *DLVP*, *HR* и *CF*). Статистички значајна разлика утврђена је анализом варијансе (ANOVA) и одговарајућим *post hoc* тестом (*Tukey/Bonferroni*), уз 5% ниво статистичке значајности ($p < 0,05$).

	<i>Cardiodynamic parameters</i>	<i>dp/dt_{max}</i>	<i>dp/dt_{min}</i>	<i>SLVP</i>	<i>DLVP</i>	<i>HR</i>	<i>CF</i>
		<i>sig. p < 0,05</i>					
<i>Control</i>	Control vs. effect	0,256	0,035	0,029	0,148	0,145	0,930
	Control vs. washout	0,033	0,005	0,000	0,264	0,826	0,397
	Effect vs. washout	0,490	0,617	0,040	0,930	0,050	0,237
<i>L-Meth</i>	Control vs. effect	0,908	0,943	0,999	0,999	0,930	0,802
	Control vs. washout	0,920	1,000	0,887	0,646	0,769	0,584
	Effect vs. washout	0,999	0,949	0,862	0,615	0,941	0,929
<i>L-Cys</i>	Control vs. effect	0,943	0,944	0,892	0,803	0,100	0,868
	Control vs. washout	0,006	0,052	0,155	0,850	0,083	0,385
	Effect vs. washout	0,012	0,028	0,069	0,481	0,994	0,679
<i>NAC</i>	Control vs. effect	0,017	0,040	0,192	0,830	0,021	0,999
	Control vs. washout	0,937	0,919	0,976	0,963	0,146	0,997
	Effect vs. washout	0,034	0,086	0,268	0,680	0,588	0,993
<i>NaHS</i>	Control vs. Effect	0,023	0,000	0,014	0,769	0,000	0,926
	Control vs. Washout	0,727	0,943	0,915	0,420	0,668	1,000
	Effect vs. Washout	0,005	0,000	0,031	0,824	0,001	0,926

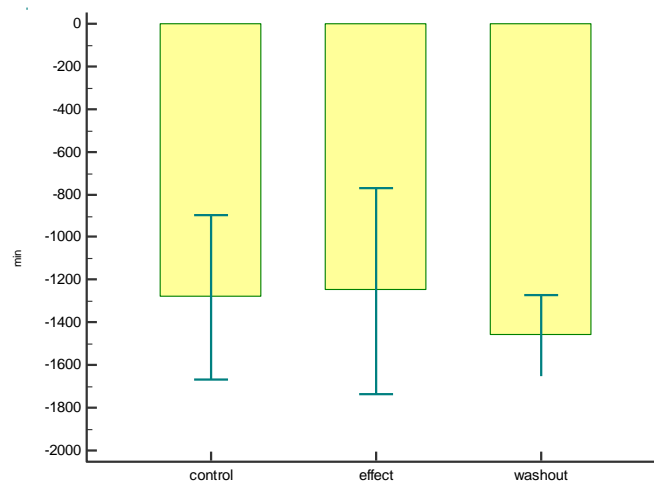
4.3. Динамика кардиодинамских параметара унутар експерименталних група пацова

4.3.1. DL-хомоцистеин група (DL-Нсу)

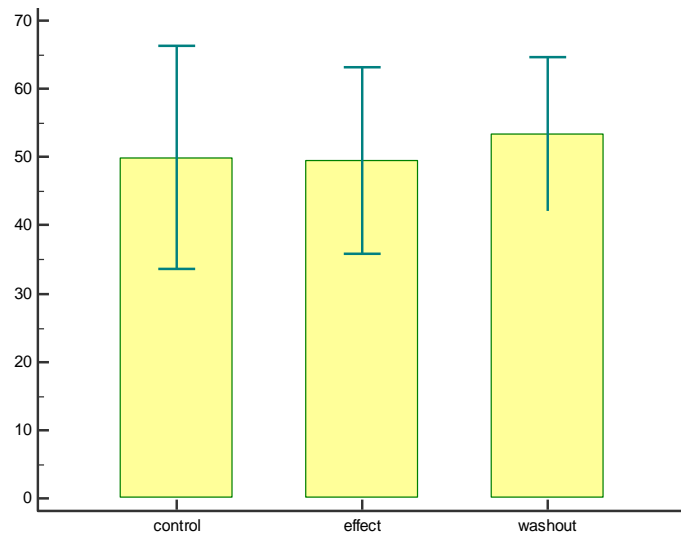
Графикон 37. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{max}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу групи пацова



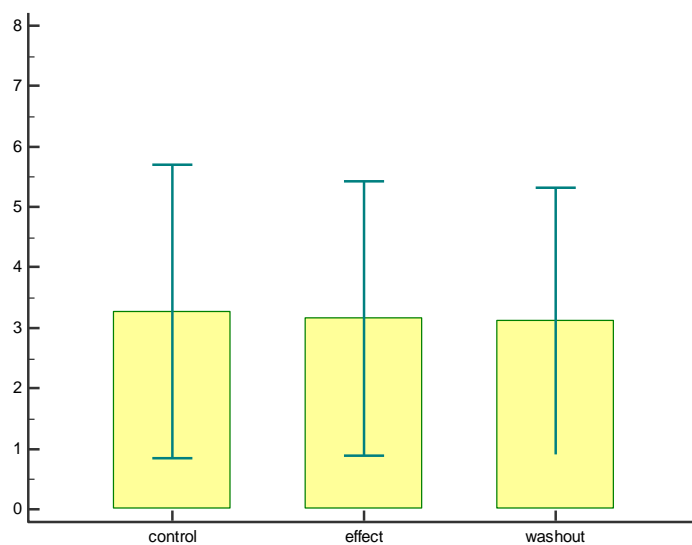
Графикон 38. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{min}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу групи пацова



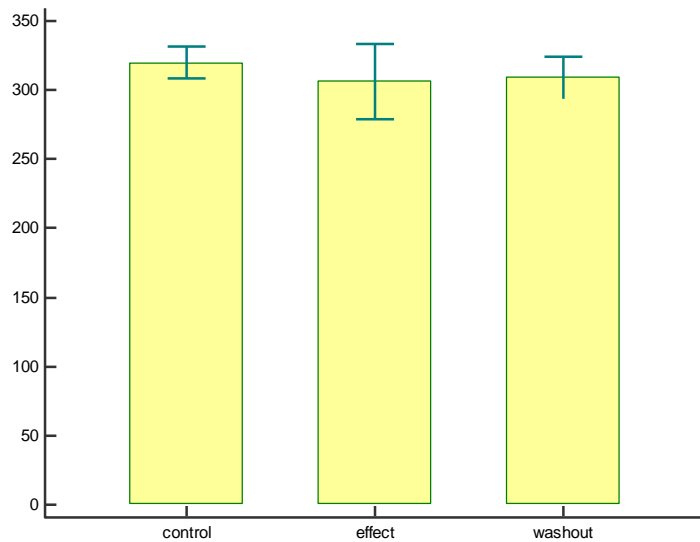
Графикон 39. Систолни притисак у левој комори (SLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу групи пацова



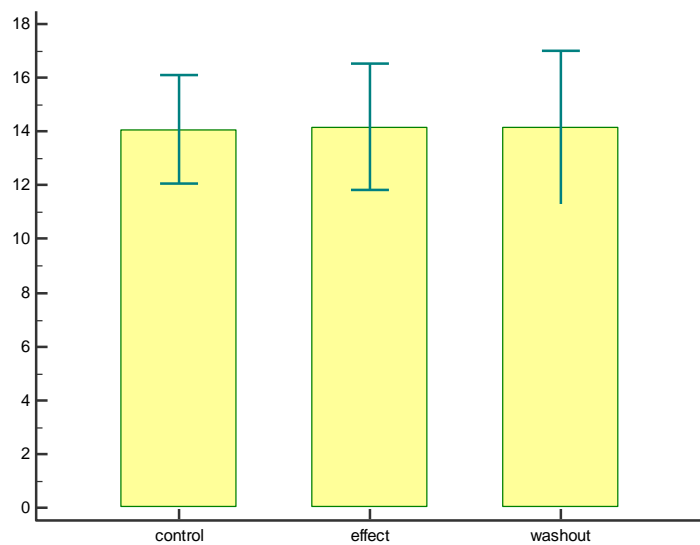
Графикон 40. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу групи пацова



Графикон 41. Срчана фреквенца леве коморе (HR) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу групи пацова

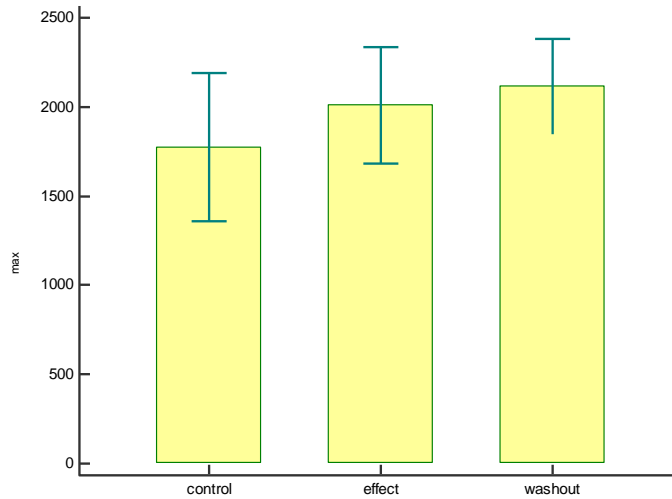


Графикон 42. Коронарни проток (CF) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу групи пацова

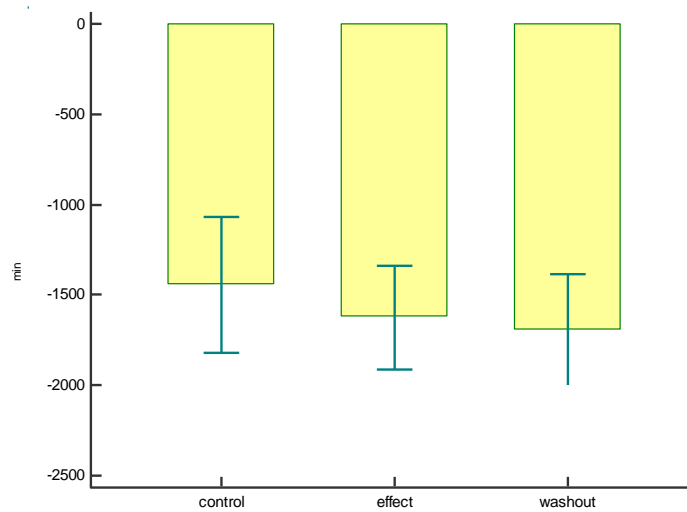


4.3.2. DL-хомоцистеин + L-метионин група (DL-Hcy+L-Meth)

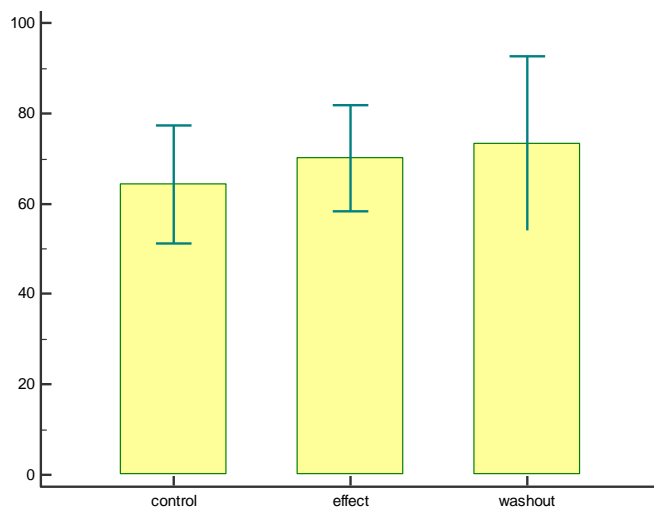
Графикон 43. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{max}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Meth групи пацова



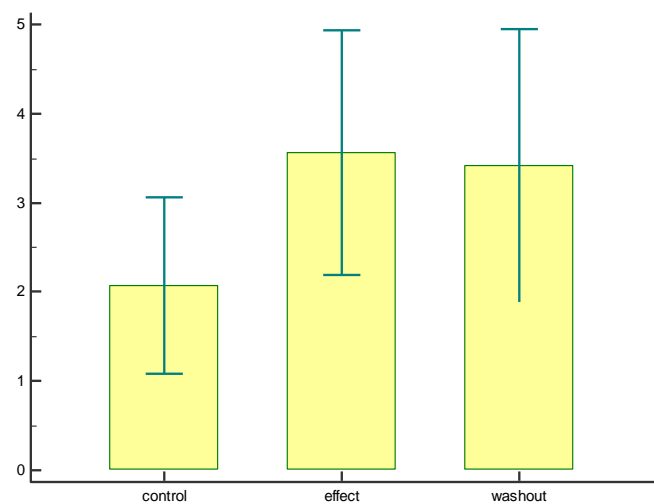
Графикон 44. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{min}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Meth групи пацова



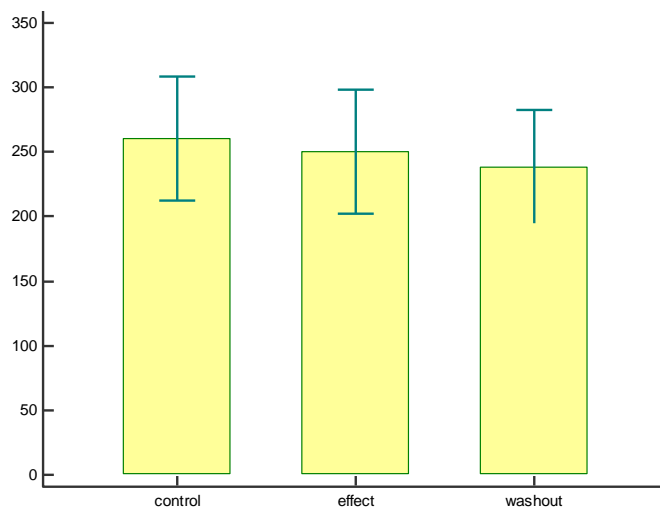
Графикон 45. Систолни притисак у левој комори (SLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Meth групи пацова



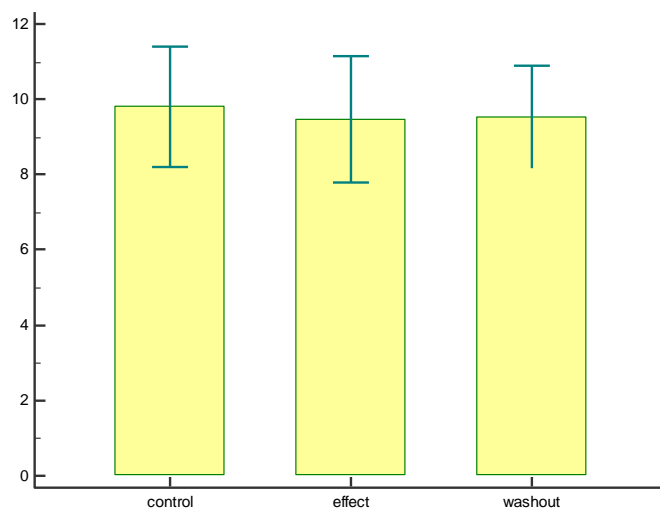
Графикон 46. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Meth групи пацова



Графикон 47. Срчана фреквенца леве коморе (HR) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Meth групи пацова

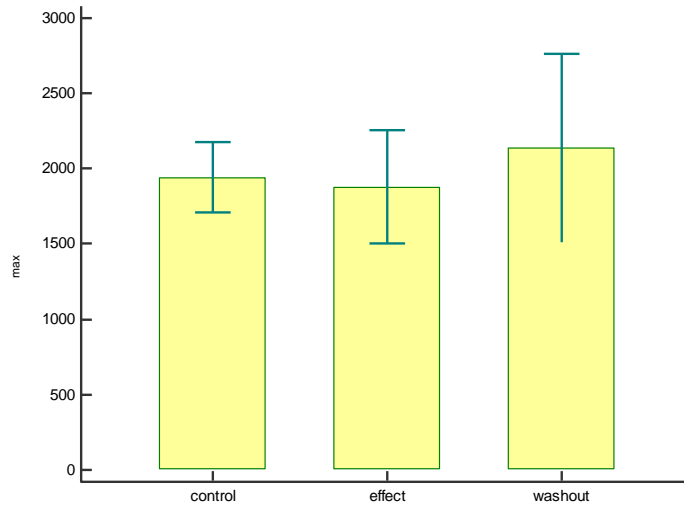


Графикон 48. Коронарни проток (CF) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Meth групи пацова

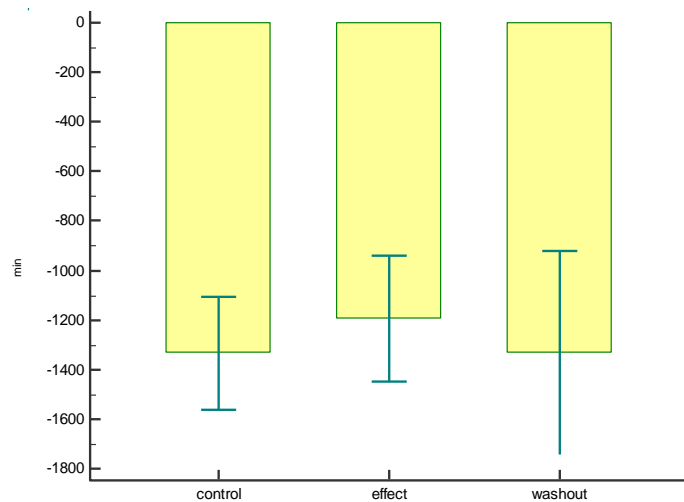


4.3.3. DL-хомоцистеин + L-цистеин група (DL-Hcy+L-Cys)

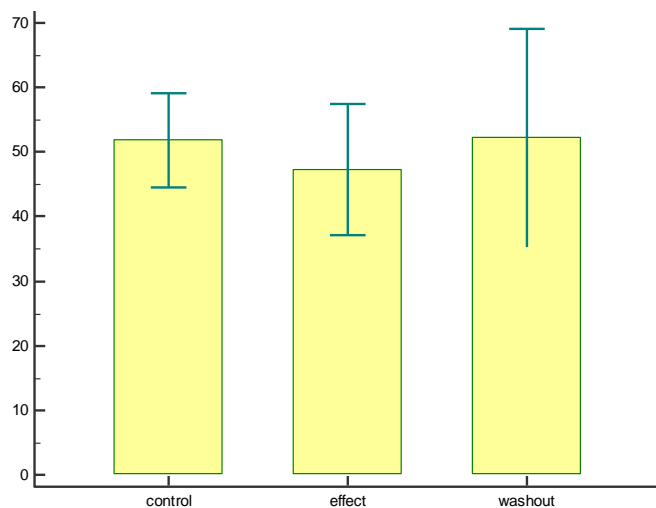
Графикон 49. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{max}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Cys групи пацова



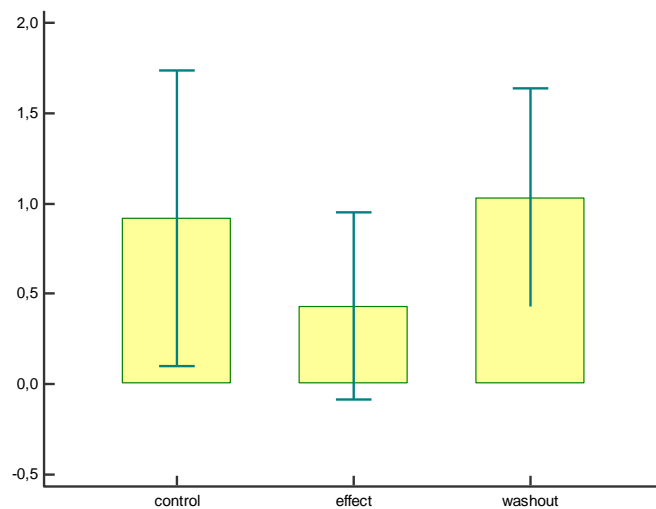
Графикон 50. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{min}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Cys групи пацова



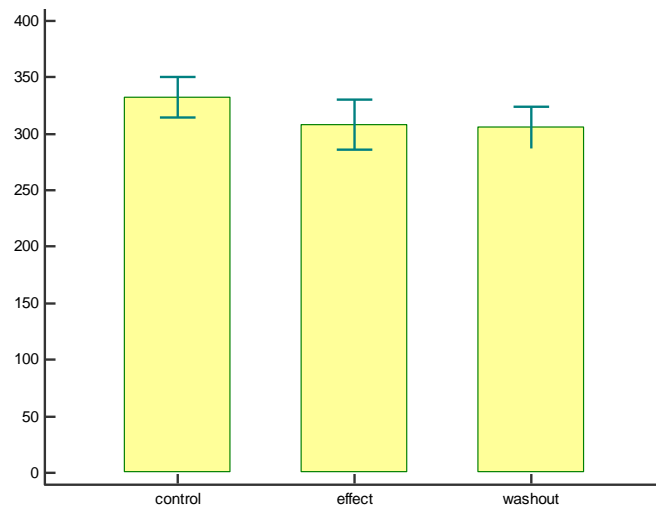
Графикон 51. Систолни притисак у левој комори (SLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Cys групи пацова



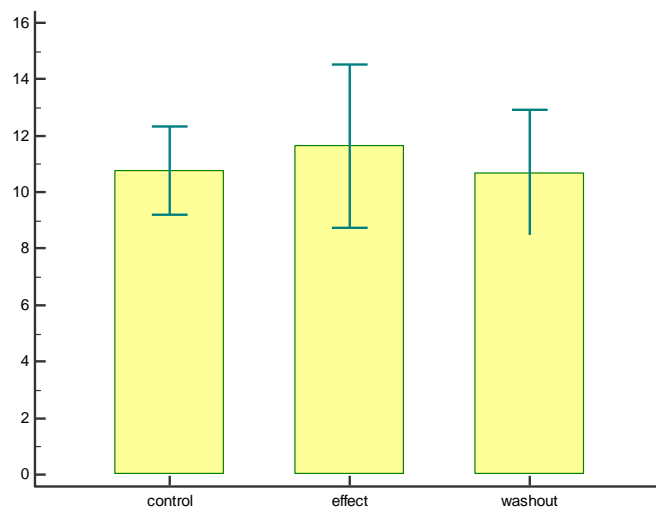
Графикон 52. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Cys групи пацова



Графикон 53. Срчана фреквенца леве коморе (HR) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Cys групи пацова

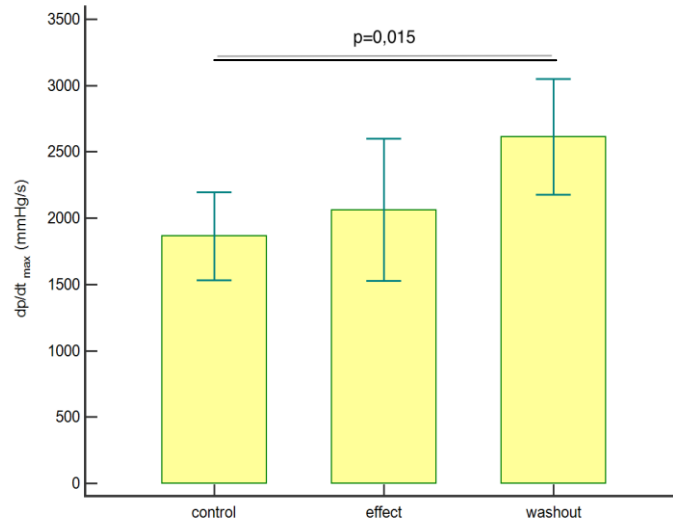


Графикон 54. Коронарни проток (CF) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Cys групи пацова

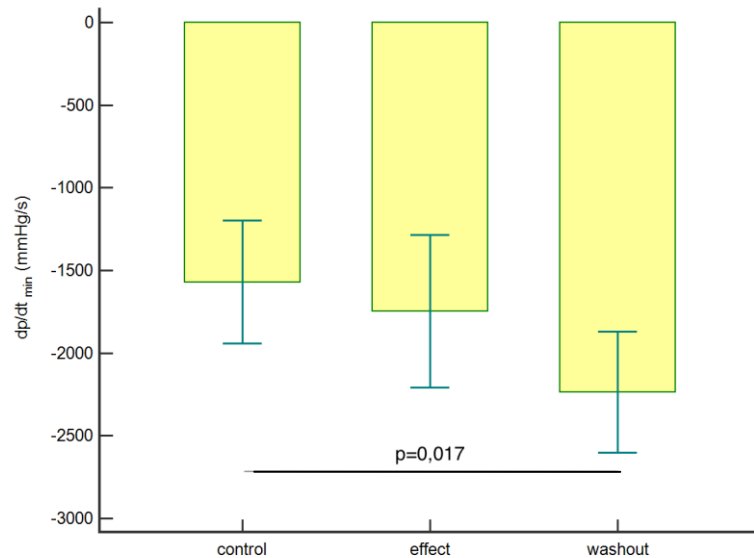


4.3.4. DL-хомоцистеин + N-ацетилцистеин група (DL-Нсу+NAC)

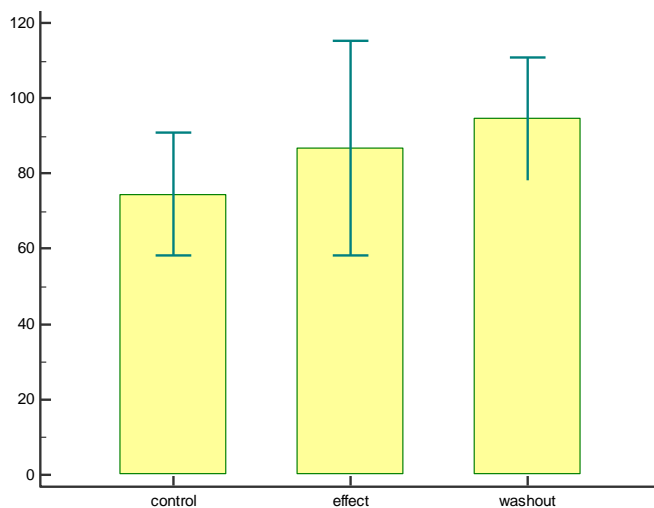
Графикон 55. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{max}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+NAC групи пацова



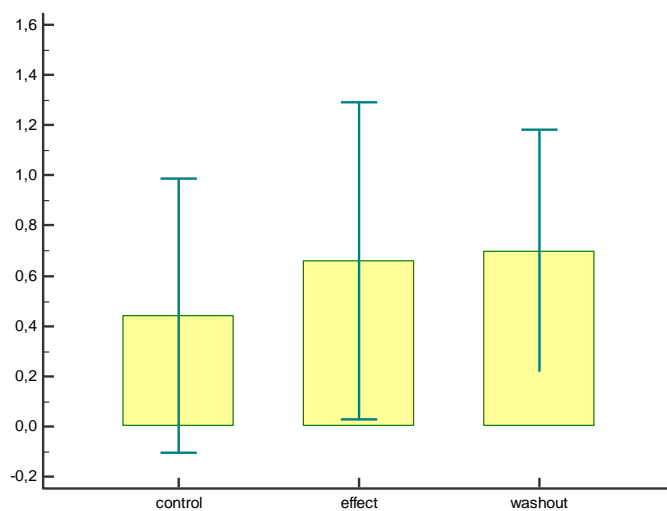
Графикон 56. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{min}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+NAC групи пацова



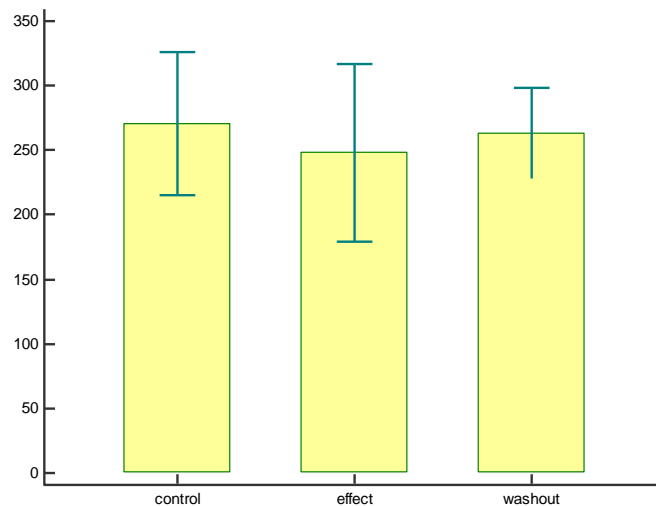
Графикон 57. Систолни притисак у левој комори (SLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+NAC групи пацова



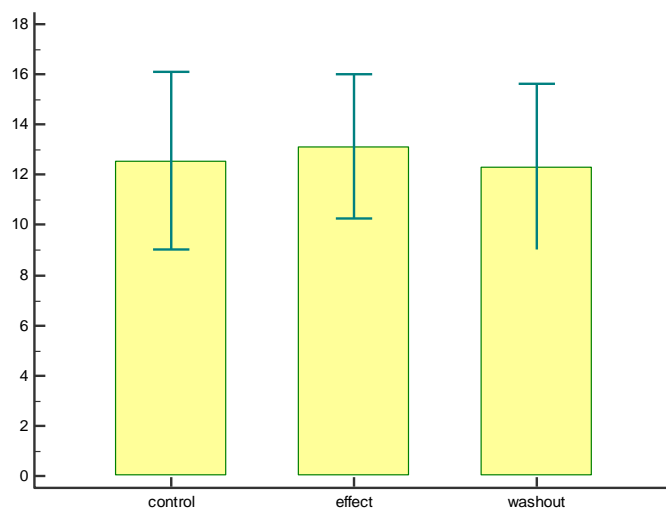
Графикон 58. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+NAC групи пацова



Графикон 59. Срчана фреквенца леве коморе (HR) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+NAC групи пацова

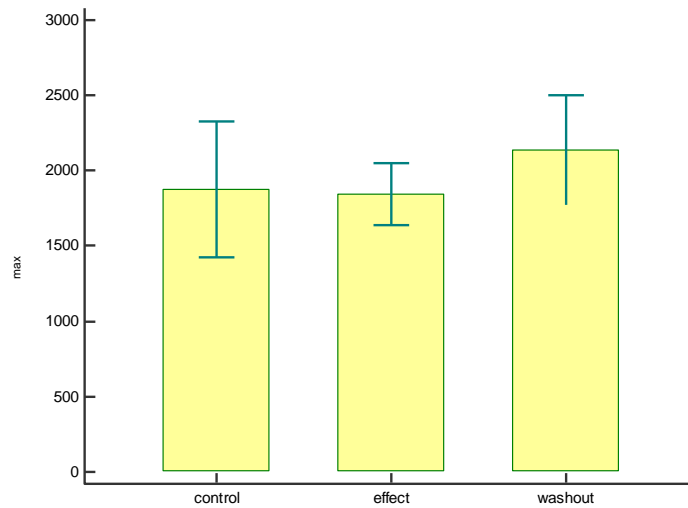


Графикон 60. Коронарни проток (CF) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+NAC групи пацова

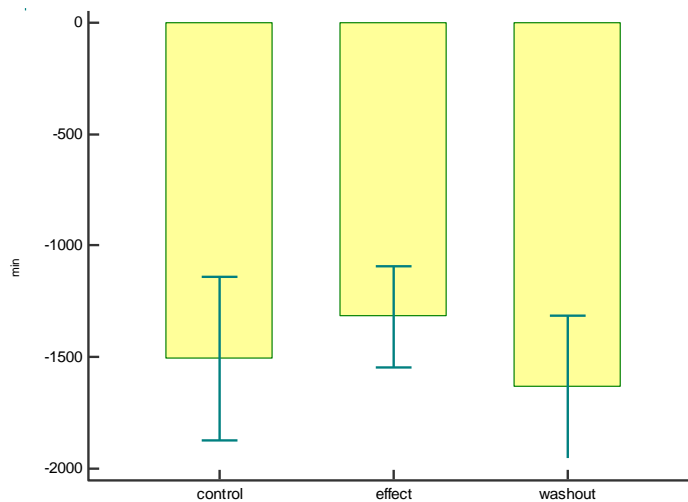


4.3.5. DL-хомоцистеин + Na-хидрогенсулфид (DL-Нсу+NaHS)

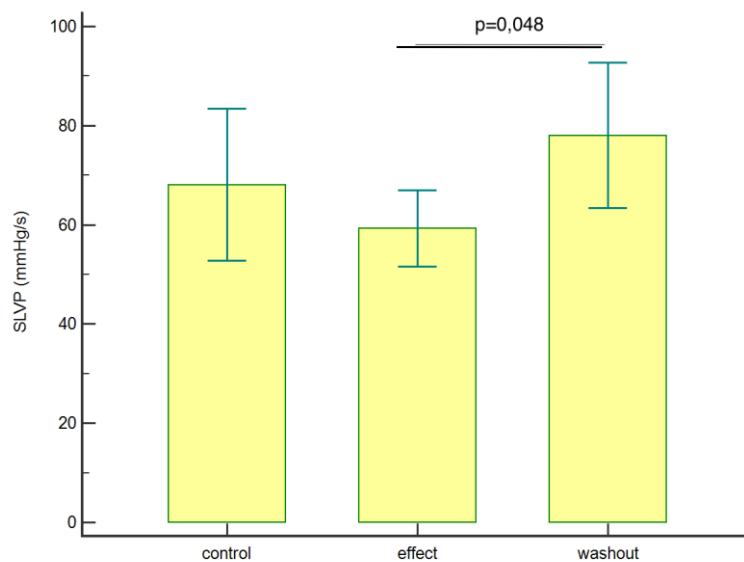
Графикон 61. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{max}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+NaHS групи пацова



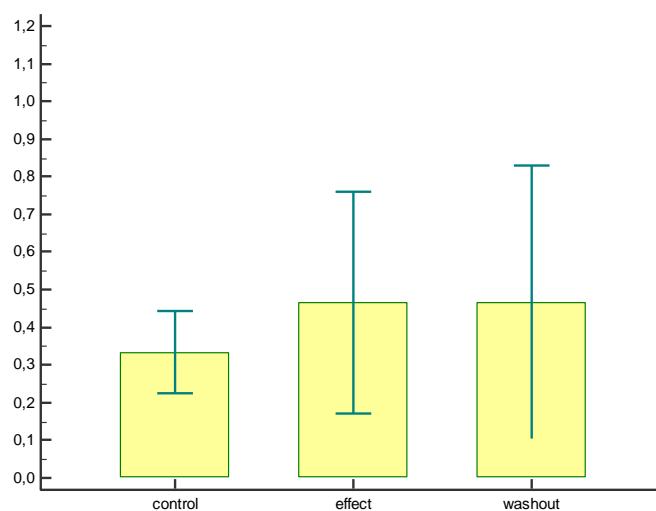
Графикон 62. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{min}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+NaHS групи пацова



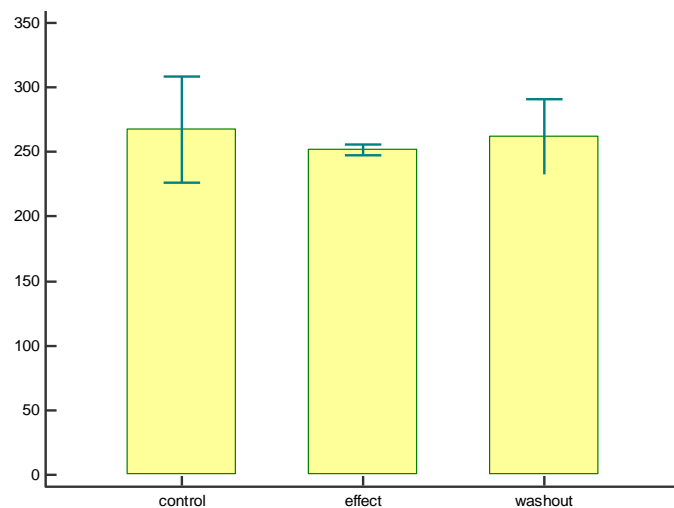
Графикон 63. Систолни притисак у левој комори (SLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+NaHS групи пацова



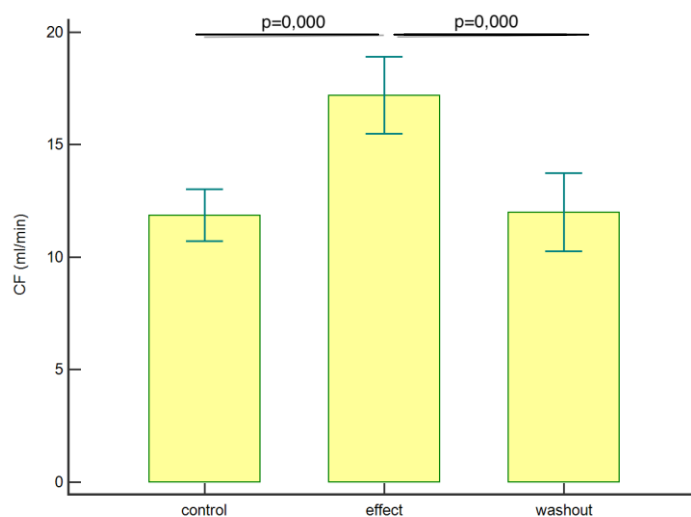
Графикон 64. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+NaHS групи пацова



Графикон 65. Срчана фреквенца леве коморе (HR) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+NaHS групи пацова



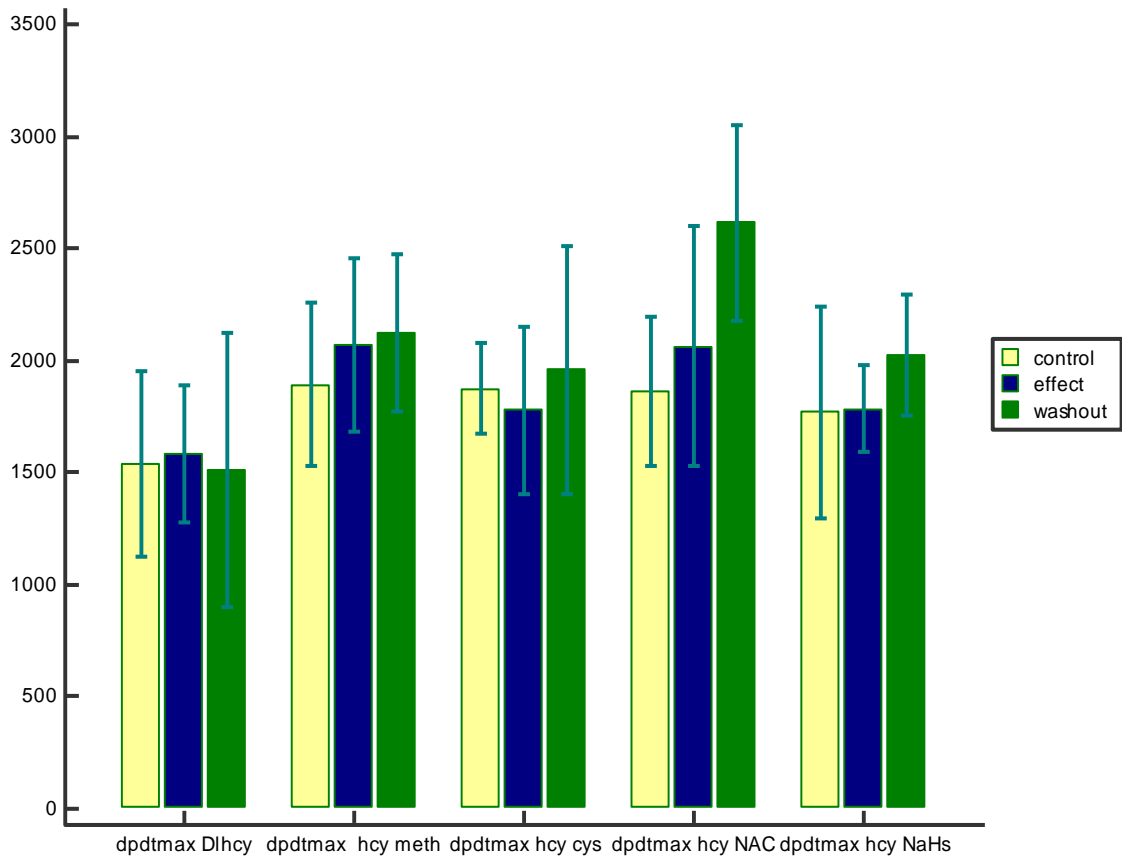
Графикон 66. Коронарни проток (CF) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+NaHS групи пацова



4.3.6. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{max}) експерименталних група пацова у три времена мерења (*control, effect, washout*)

Поређењем вредности dp/dt_{max} унутар сваке групе пацова третираних DL-Нсу и посматрањем разлика овог параметра у односу на групе, примећено је да је примена NAC допринела повећању овог маркера контрактилности у периоду опоравка (Графикон 67). Статистичким анализама (Табела 5) потврђена је статистички значајна разлика унутар NAC групе ($p < 0,05$).

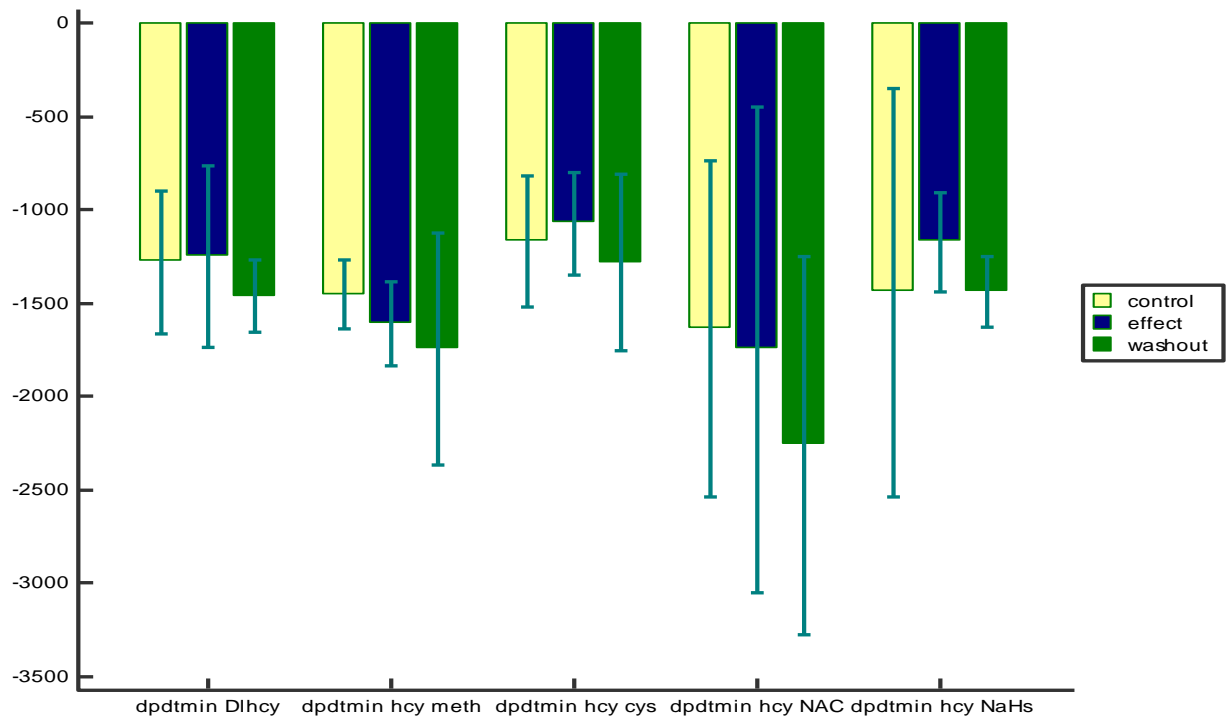
Графикон 67. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{max}) у DL-Нсу, DL-Нсу+L-Meth, DL-Нсу+L-Cys, DL-Нсу+ NAC и DL-Нсу+NaHS групама (*control, effect, washout*)



4.3.7. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{\min}) експерименталних група пацова у три времена мерења (*control, effect, washout*)

Поређењем вредности dp/dt_{\min} унутар групе пацова третираних DL-Hcy и посматрањем разлика овог параметра у односу на групе, примећено је да је примена NAC допринела повећању овог маркера релаксације ка негативнијим вредностима у периоду опоравка (Графикон 68). Статистичким анализама (Табела 5) потврђена је статистички значајна разлика унутар NAC групе ($p < 0,05$).

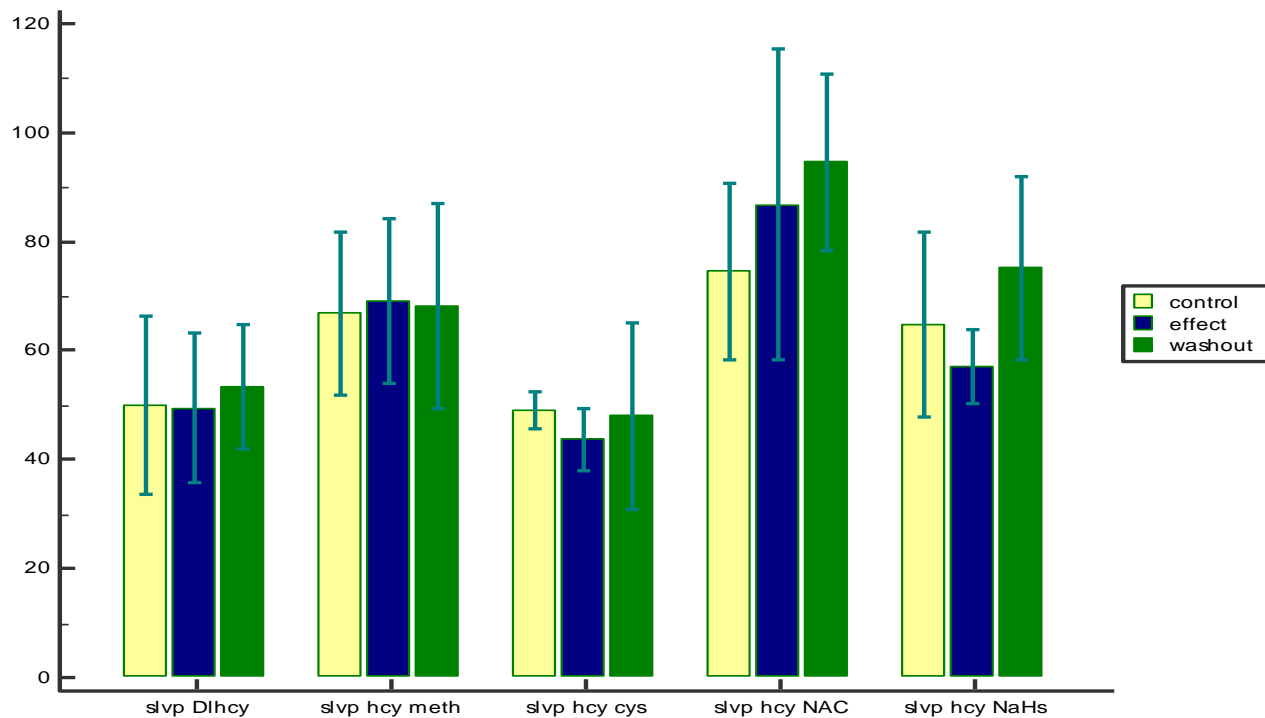
Графикон 68. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{\min}) у DL-Hcy, DL-Hcy+L-Meth, DL-Hcy+L-Cys, DL-Hcy+NAC и DL-Hcy+NaHS групама (*control, effect, washout*)



4.3.8. Систолни притисак у левој комори (SLVP) експерименталних група пацова у три времена мерења (*control, effect, washout*)

Поређењем вредности SLVP унутар сваке групе пацова третираних DL-Нсу и посматрањем разлика овог параметра у односу на остале групе, примећено је да је примена NaHS допринела повећању овог параметра у периоду опоравка, након блажег пада у периоду ефекта (Графикон 69). Статистичка сигнификантност је потврђена унутар NaHS групе ($p < 0,05$), (Табела 5).

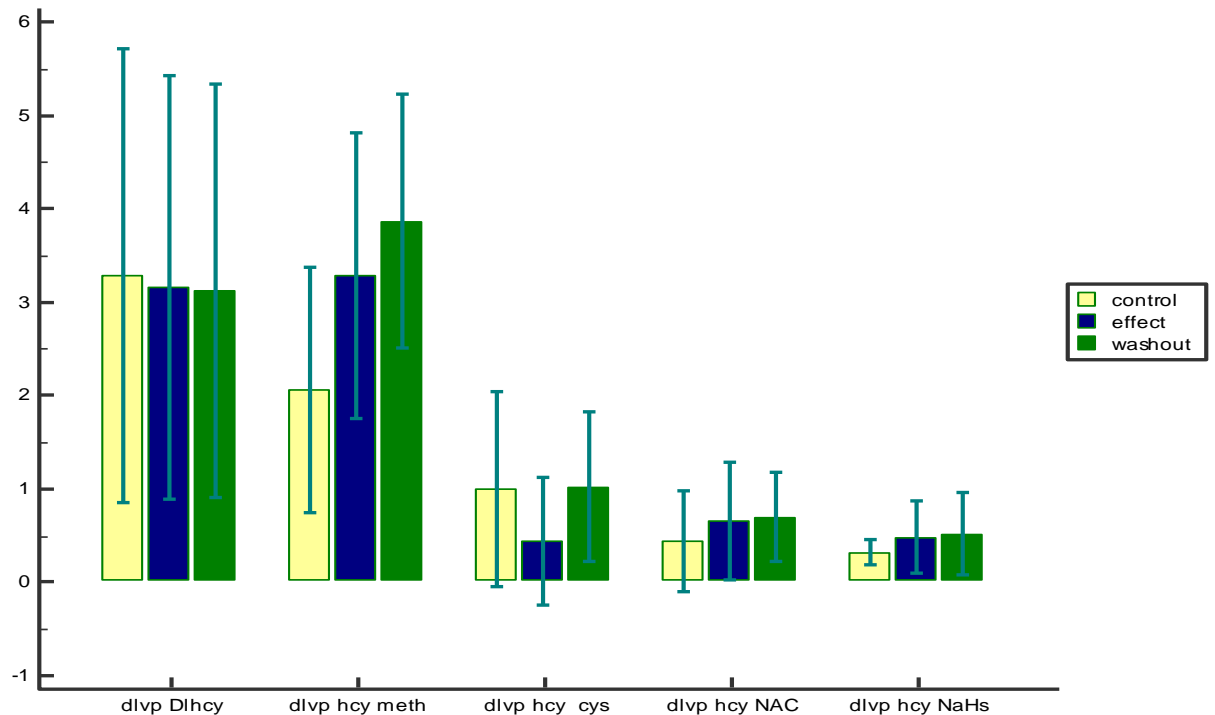
Графикон 69. Систолни притисак у левој комори (SLVP) у DL-Нсу, DL-Нсу+L-Meth, DL-Нсу+L-Cys, DL-Нсу+ NAC и DL-Нсу+NaHS групама (*control, effect, washout*)



4.3.9. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) експерименталних група пацова у три времена мерења (*control, effect, washout*)

Поређењем вредности DLVP унутар сваке групе пацова третираних DL-Hcy и посматрањем разлика овог параметра у односу на остале групе, примећено је да је примена L-Cys изазвала благо снижење овог маркера у периоду ефекта, а примена L-Meth благо повећање у периоду ефекта и опоравка (Графикон 70). Међутим, статистичким анализама (Табела 5) није потврђена статистички сигнификантна разлика унутар поменутих експерименталних група ($p>0,05$).

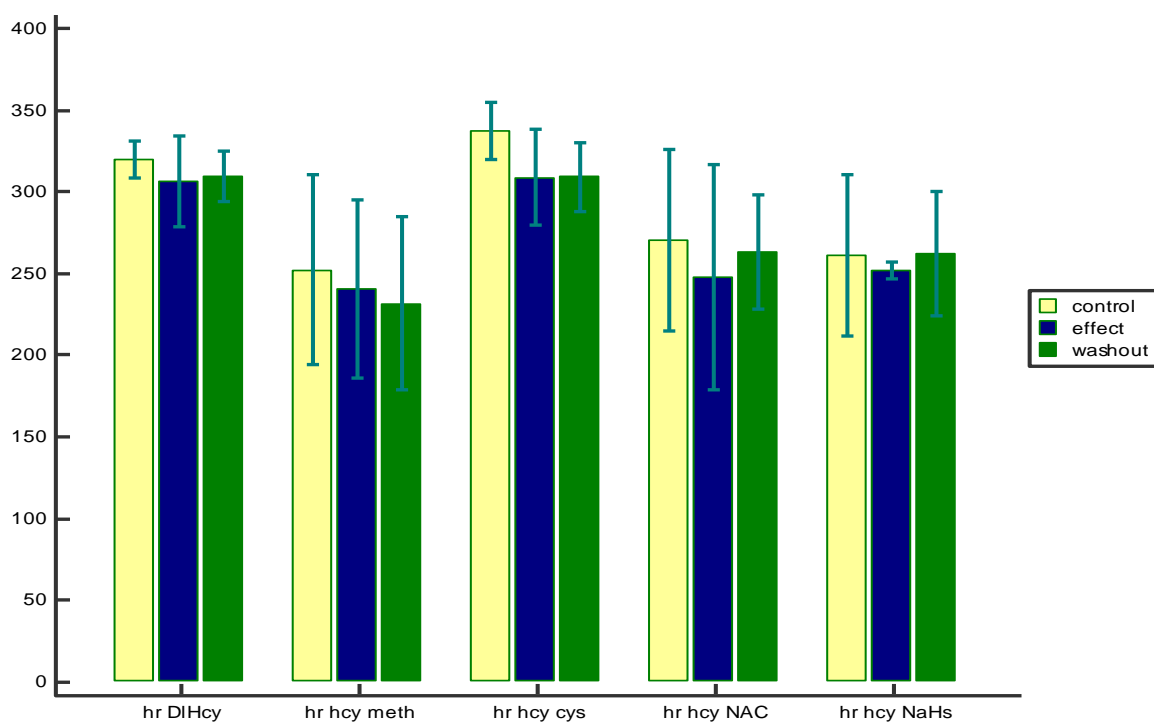
Графикон 70. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) у DL-Hcy, DL-Hcy+L-Meth, DL-Hcy+L-Cys, DL-Hcy+ NAC и DL-Hcy+NaHS групама (*control, effect, washout*)



4.3.10. Срчана фреквенца (HR) експерименталних група пацова у три времена мерења (*control, effect, washout*)

Поређењем вредности HR унутар сваке групе пацова третираних DL-Hcy и посматрањем разлика овог параметра у односу на остале групе, нису примећене промене (Графикон 71). Статистичким анализама (Табела 5) није потврђена статистички значајна разлика ни у једној групи ($p > 0,05$).

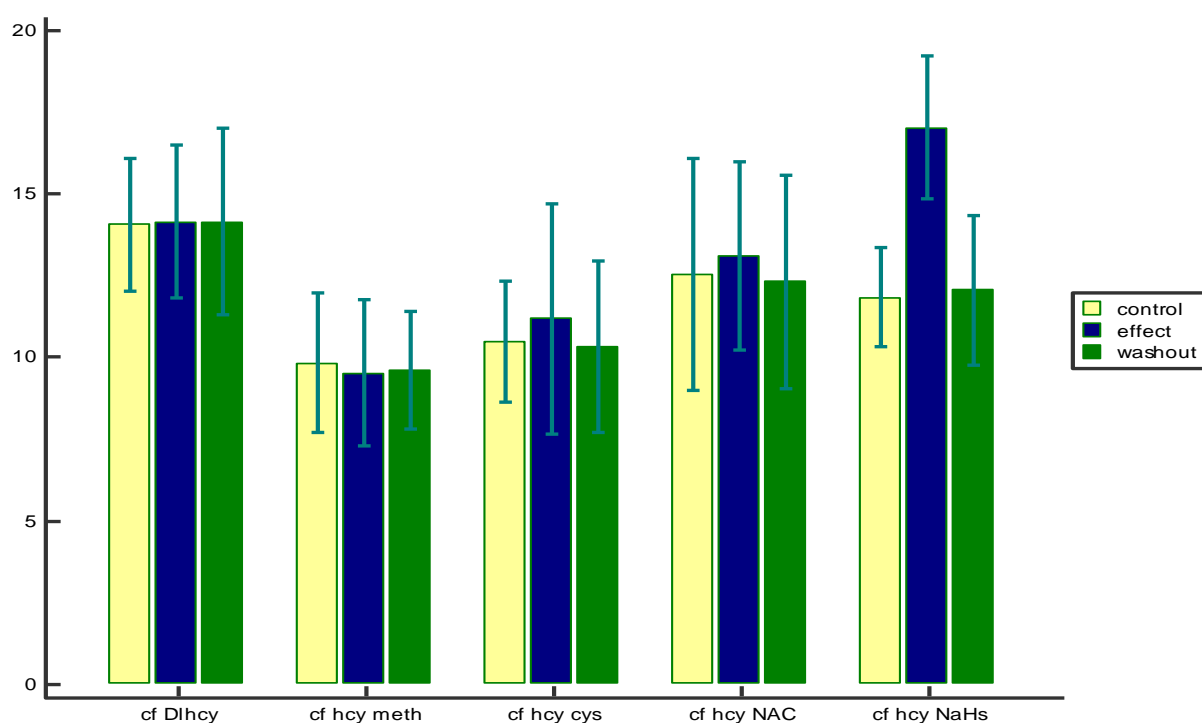
Графикон 71. Срчана фреквенца (HR) у DL-Hcy, DL-Hcy+L-Meth, DL-Hcy+L-Cys, DL-Hcy+ NAC и DL-Hcy+NaHS групама (*control, effect, washout*)



4.3.11. Коронарни проток (CF) експерименталних група пацова у три времена мерења (*control, effect, washout*)

Поређењем вредности CF унутар сваке групе пацова третираних DL-Нсу и посматрањем разлика овог параметра у односу на остале групе, примећено је да је примена NaHS изазвала веома значајно повећање овог параметра у периоду ефекта (Графикон 72). Статистичким анализама (Табела 5) потврђена је статистички значајна разлика унутар NaHS групе ($p < 0,05$).

Графикон 72. Коронарни проток (CF) у DL-Нсу, DL-Нсу+L-Meth, DL-Нсу+L-Cys, DL-Нсу+ NAC и DL-Нсу+NaHS групама (*control, effect, washout*)



Табела 5. Статистичко поређење различитих мерења (на крају контролног периода – *control*, на крају периода администрације тест супстанце – *effect*, на крају периода опоравка – *washout*) унутар експерименталних група пацова за кардиодинамске параметре (dp/dt_{max} , dp/dt_{min} , *SLVP*, *DLVP*, *HR* и *CF*). Статистички значајна разлика утврђена је анализом варијансе (ANOVA) и одговарајућим *post hoc* тестом (*Tukey/Bonferroni*), уз 5% ниво статистичке значајности ($p < 0,05$).

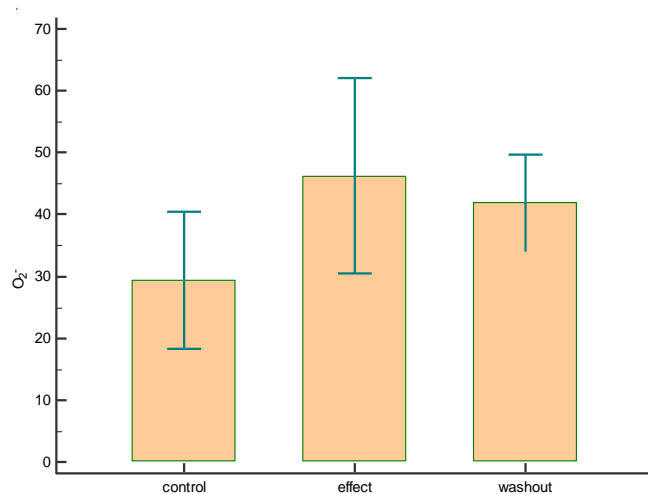
	<i>Cardiodynamic parameters</i>	<i>dp/dt_{max}</i>	<i>dp/dt_{min}</i>	<i>SLVP</i>	<i>DLVP</i>	<i>HR</i>	<i>CF</i>
		<i>sig. p < 0,05</i>					
<i>DL-Hcy</i>	Control vs. effect	0,979	0,970	0,998	0,994	0,380	0,998
	Control vs. washout	0,990	0,369	0,879	0,990	0,546	0,998
	Effect vs. washout	0,942	0,279	0,847	0,999	0,950	1,000
<i>DL-Hcy + L-Meth</i>	Control vs. effect	0,440	0,589	0,767	0,130	0,917	0,921
	Control vs. washout	0,195	0,371	0,538	0,184	0,681	0,948
	Effect vs. washout	0,837	0,920	0,923	0,977	0,896	0,997
<i>DL-Hcy + L-Cys</i>	Control vs. effect	0,964	0,696	0,776	0,398	0,100	0,774
	Control vs. washout	0,702	1,000	0,998	0,945	0,062	0,998
	Effect vs. washout	0,547	0,702	0,741	0,253	0,962	0,743
<i>DL-Hcy + NAC</i>	Control vs. effect	0,662	0,672	0,509	0,724	0,713	0,939
	Control vs. washout	0,015	0,017	0,191	0,639	0,966	0,988
	Effect vs. washout	0,073	0,080	0,754	0,989	0,851	0,880
<i>DL-Hcy + NaHS</i>	Control vs. Effect	0,983	0,520	0,455	0,662	0,596	0,000
	Control vs. washout	0,388	0,741	0,371	0,662	0,942	0,987
	Effect vs. washout	0,306	0,185	0,048	1,000	0,791	0,000

БИОМАРКЕРИ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА

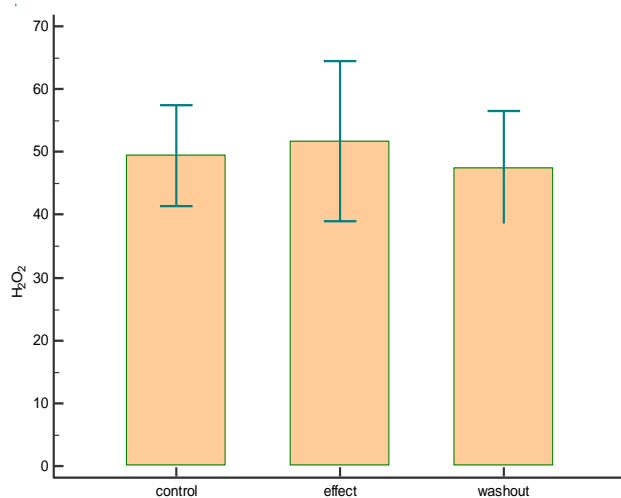
4.4. Динамика прооксидационих маркера у коронарном венском ефлуенту унутар контролних група пацова

4.4.1. Контролна група (CTRL)

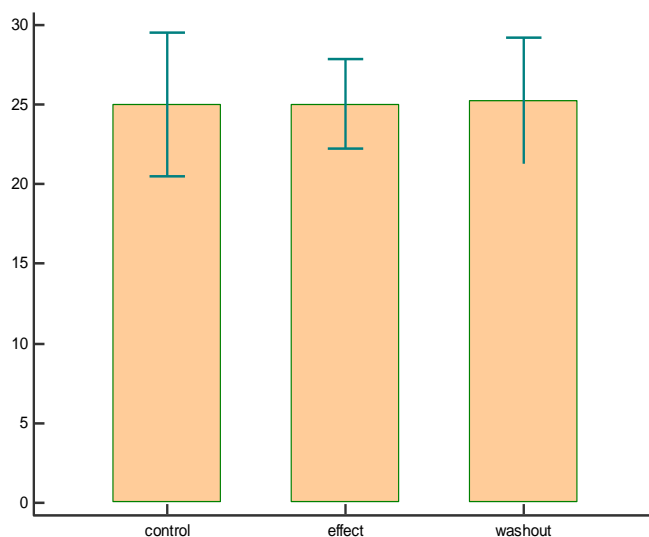
Графикон 73. Супероксид анјон радикал (O_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у контролној групи пацова који нису третирани DL-Нсу



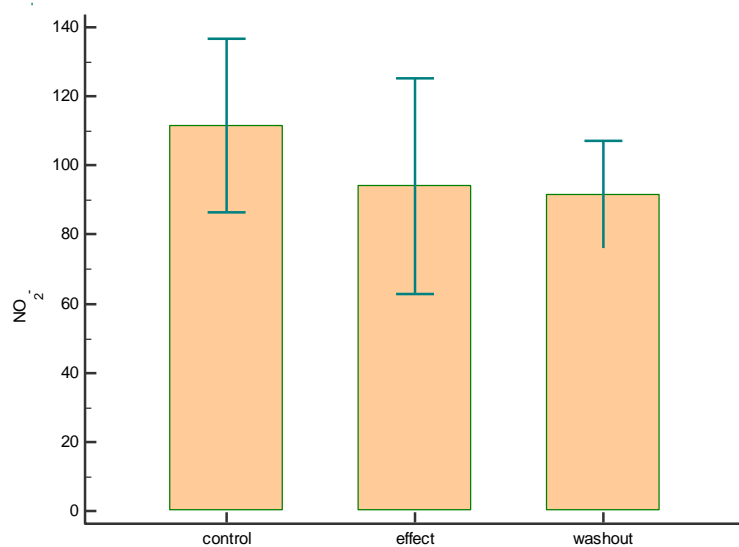
Графикон 74. Водоник пероксид (H_2O_2) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у контролној групи пацова који нису третирани DL-Нсу



Графикон 75. Индекс липидне пероксидације (TBARS) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у контролној групи пацова који нису третирани DL-Нсу

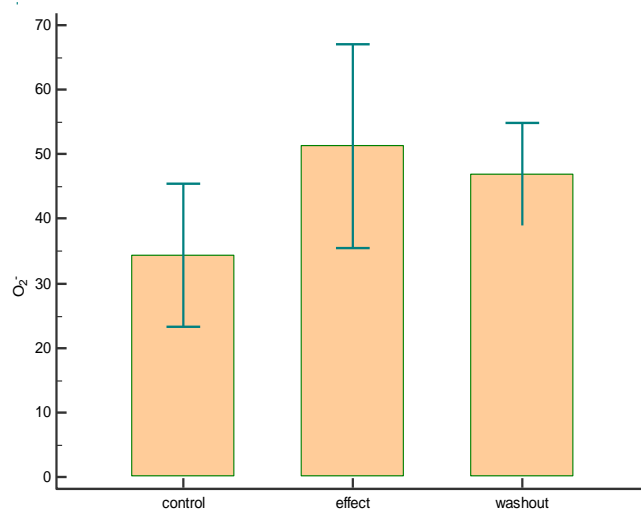


Графикон 76. Азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у контролној групи пацова који нису третирани DL-Нсу

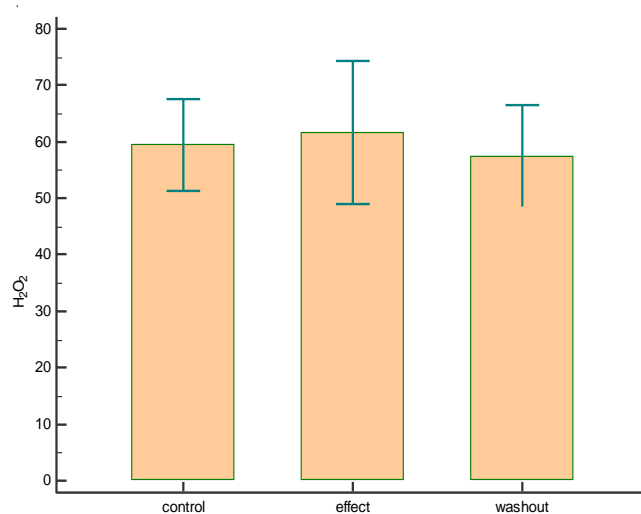


4.4.2. L-метионин група (L-Meth)

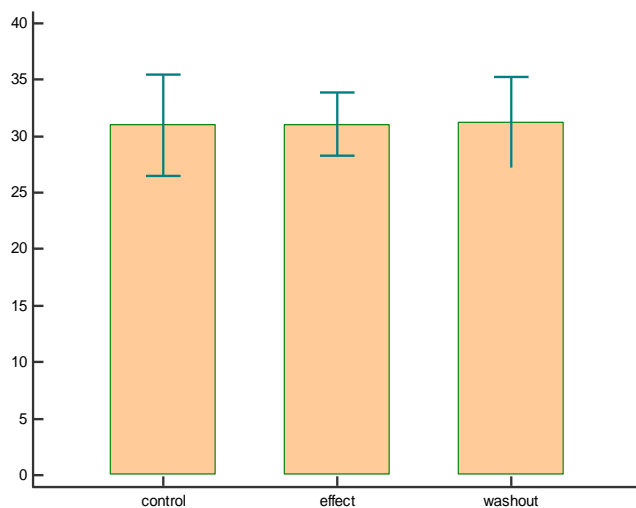
Графикон 77. Супероксид анјон радикал (O_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Meth групи пацова



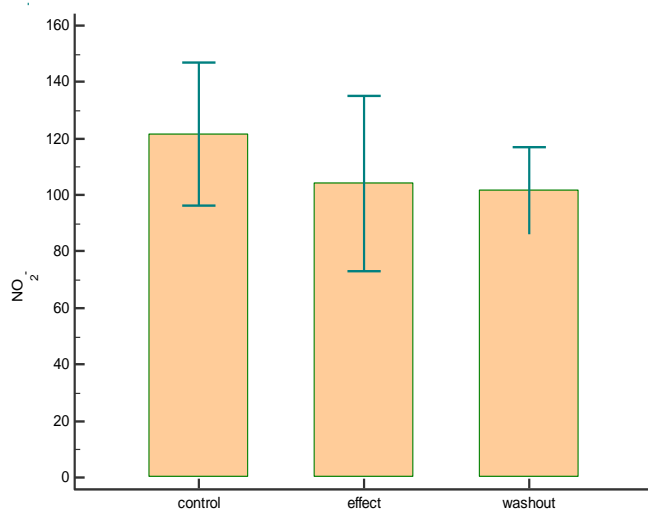
Графикон 78. Водоник пероксид (H_2O_2) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Meth групи пацова



Графикон 79. Индекс липидне пероксидације (TBARS) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Meth групи пацова

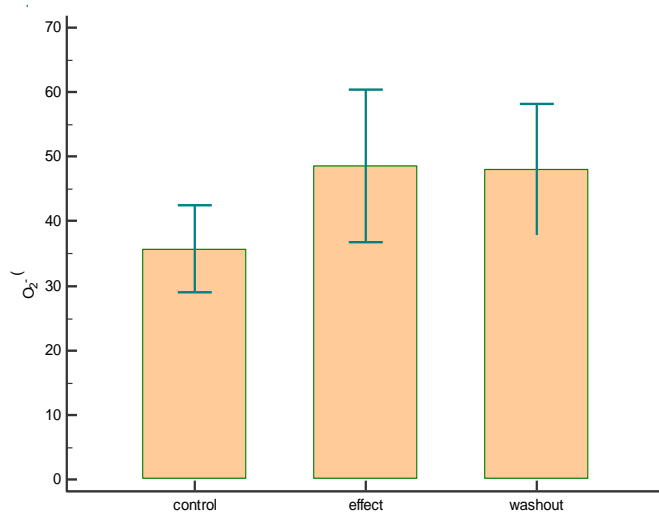


Графикон 80. Азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Meth групи пацова

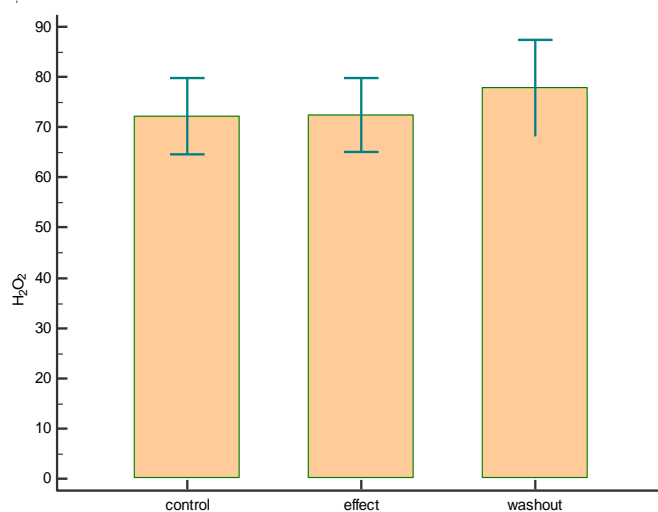


4.4.3. L-цистеин група (L-Cys)

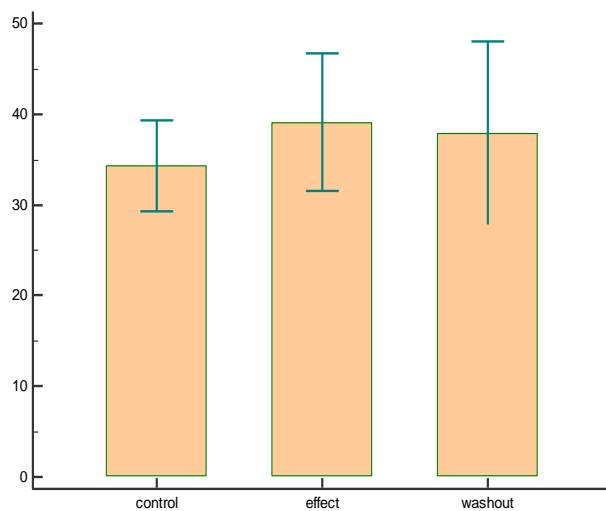
Графикон 81. Супероксид анјон радикал (O_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Cys групи пацова



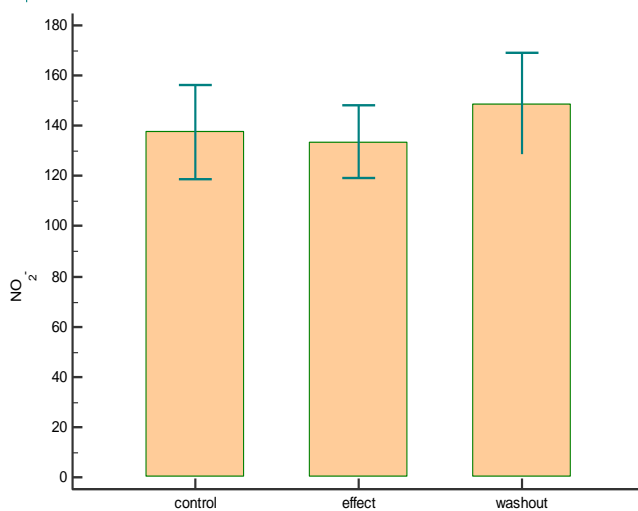
Графикон 82. Водоник пероксид (H_2O_2) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Cys групи пацова



Графикон 83. Индекс липидне пероксидације (TBARS) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Cys групи пацова

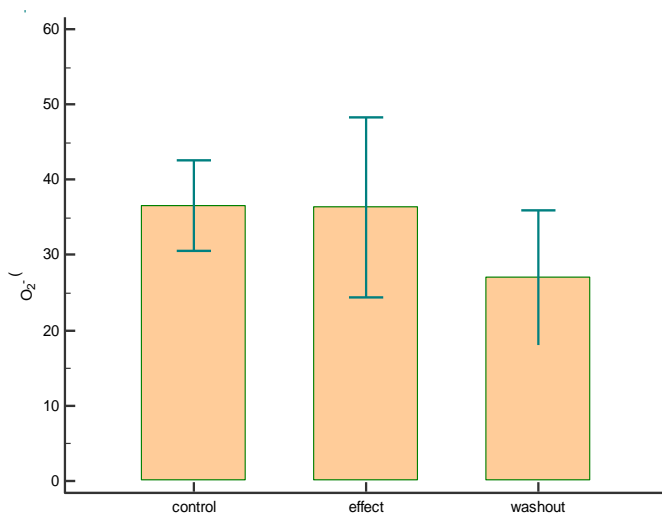


Графикон 84. Азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Cys групи пацова

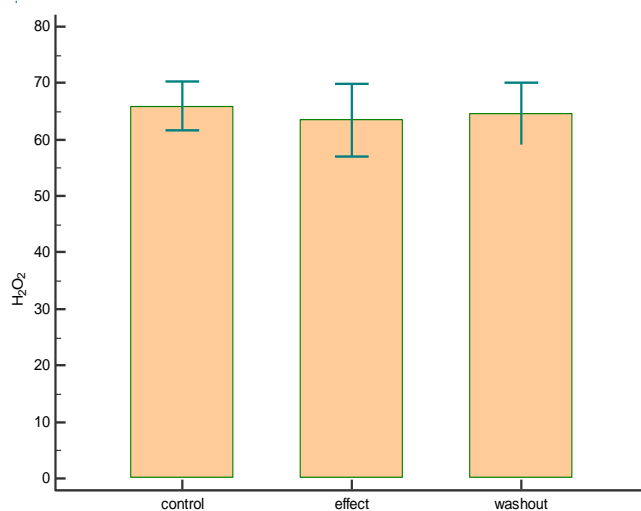


4.4.4. N-ацетилцистеин група (NAC)

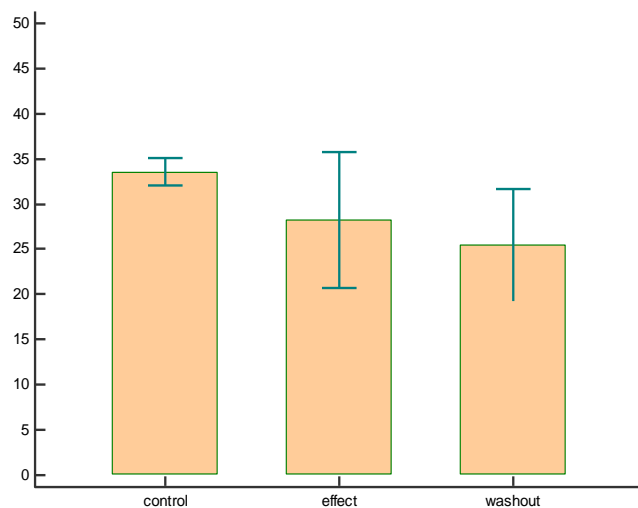
Графикон 85. Супероксид анјон радикал (O_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NAC групи пацова



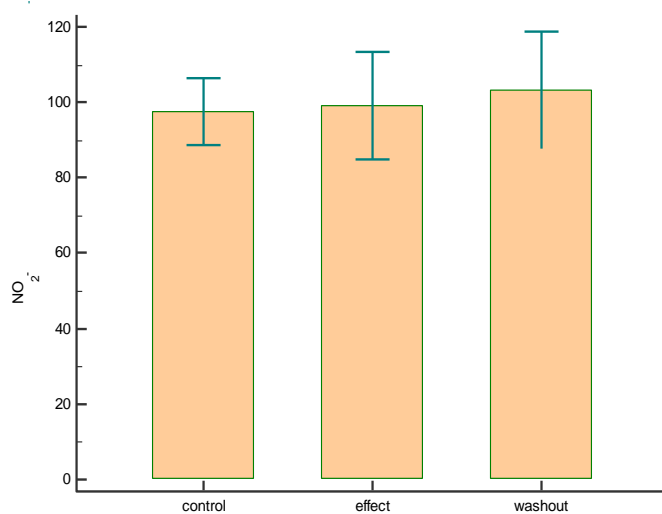
Графикон 86. Водоник пероксид (H_2O_2) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NAC групи пацова



Графикон 87. Индекс липидне пероксидације (TBARS) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NAC групи пацова

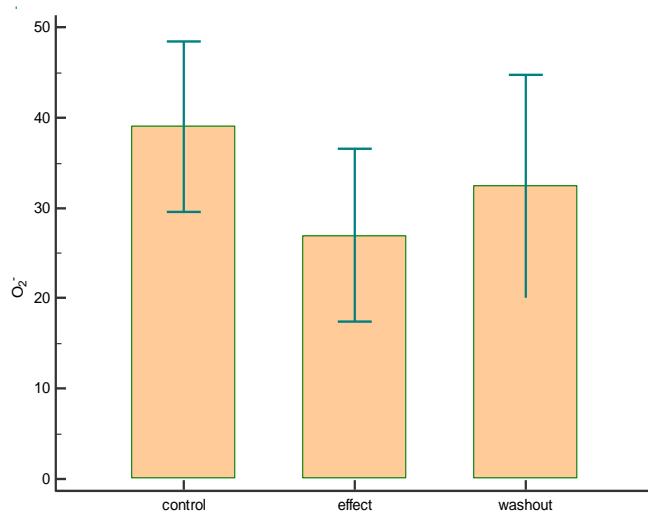


Графикон 88. Азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NAC групи пацова

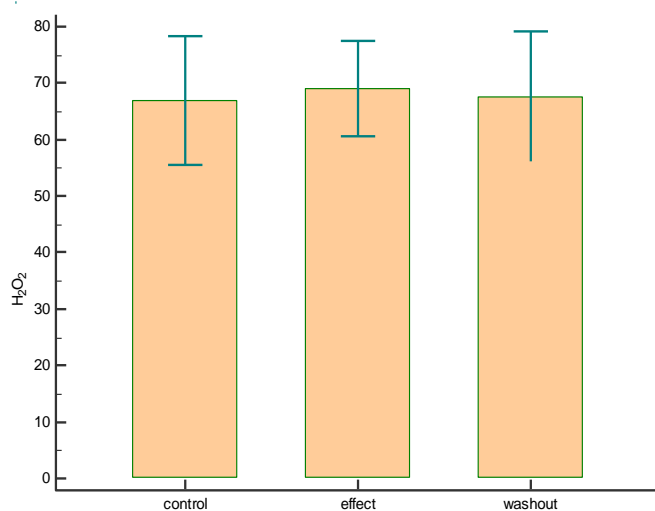


4.4.5. Na-хидрогенсулфид група (NaHS)

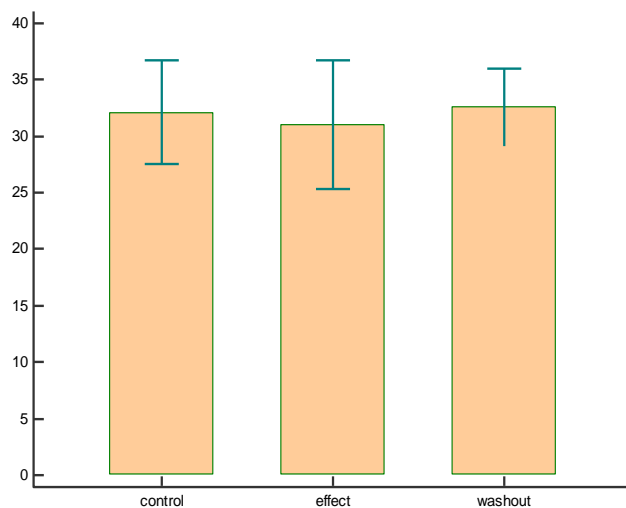
Графикон 89. Супероксид анјон радикал (O_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NaHS групи пацова



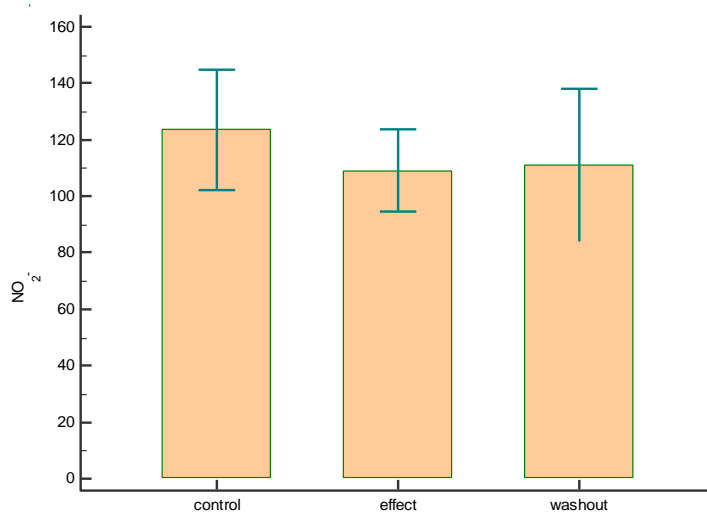
Графикон 90. Водоник пероксид (H_2O_2) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NaHS групи пацова



Графикон 91. Индекс липидне пероксидације (TBARS) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NaHS групи пацова



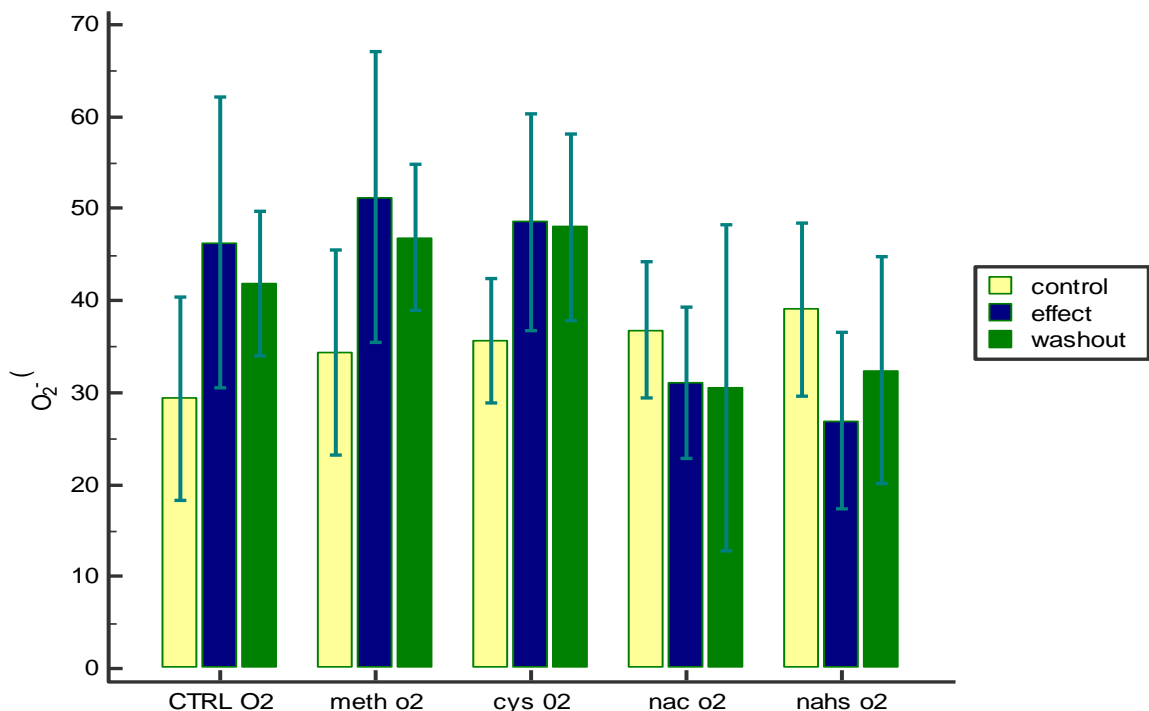
Графикон 92. Азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NaHS групи пацова



4.4.6. Вредности супероксид анјон радикала (O_2^-) контролних група пацова у три времена мерења (*control, effect, washout*)

Поређењем вредности O_2^- унутар сваке контролне групе и посматрањем разлика овог параметра у односу на остале групе, примећено је да је примена L-Meth и L-Cys допринела благом повећању овог прооксидационог маркера у периоду ефекта и опоравка, а примена NaHS благом смањењу у периоду ефекта (Графикон 93). Међутим, статистичким анализама (Табела 6) није потврђена статистички значајна разлика ни у једној групи ($p > 0,05$).

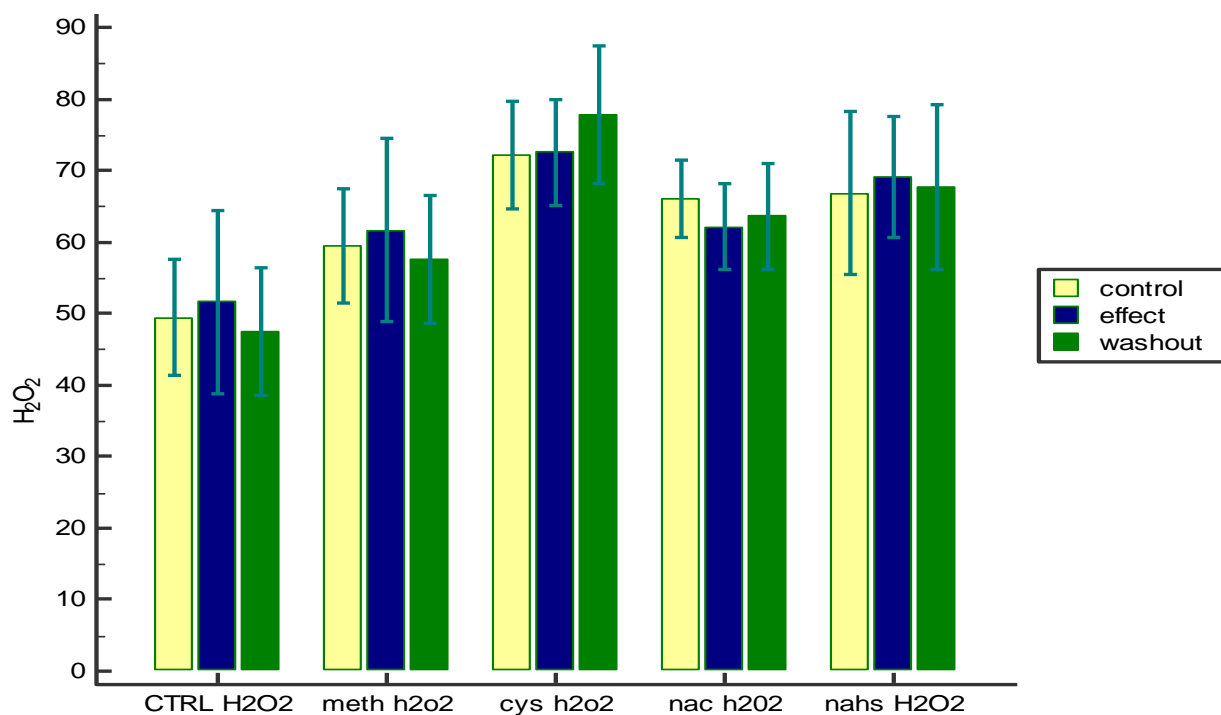
Графикон 93. Вредности супероксид анјон радикала (O_2^-) у CTRL, L-Meth, L-Cys, NAC и NaHS групи (*control, effect, washout*)



4.4.7. Вредности водоник пероксида (H_2O_2) контролних група пацова у три времена мерења (*control, effect, washout*)

Поређењем вредности H_2O_2 унутар сваке контролне групе и посматрањем разлика у овом маркеру у односу на остале групе, примећено је да је примена L-Cys допринела благом повећању овог прооксидационог маркера у периоду опоравка (Графикон 94). Међутим, статистичким анализама (Табела 6) није потврђена статистички значајна разлика ни у једној групи ($p > 0,05$).

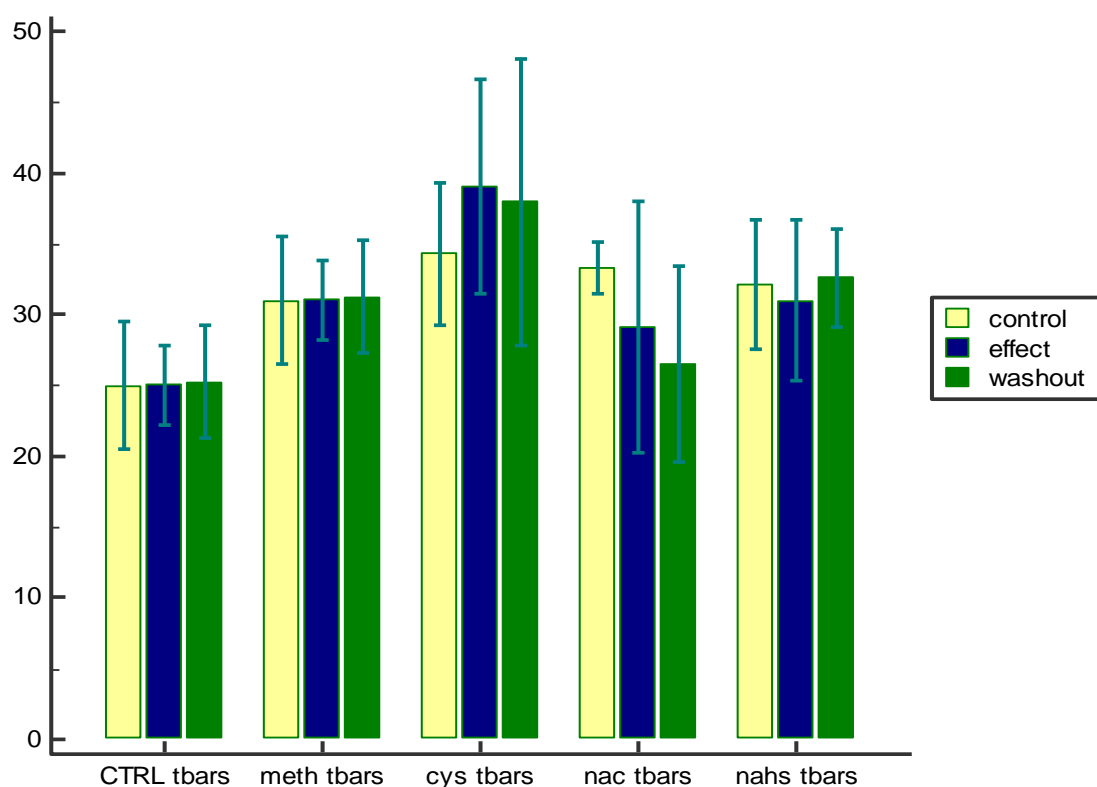
Графикон 94. Вредности водоник пероксида (H_2O_2) у CTRL, L-Meth, L-Cys, NAC и NaHS групи (*control, effect, washout*)



4.4.8. Вредности индекса липидне пероксидације (TBARS) контролних група пацова у три времена мерења (*control, effect, washout*)

Поређењем вредности TBARS унутар сваке контролне групе и посматрањем разлика у овом маркеру у односу на остале групе, примећено је да је примена NAC допринела благом смањењу овог маркера у периоду ефекта, а нарочито опоравка (Графикон 95). Међутим, статистичким анализама (Табела 6) није потврђена статистички значајна разлика ни у једној групи ($p > 0,05$).

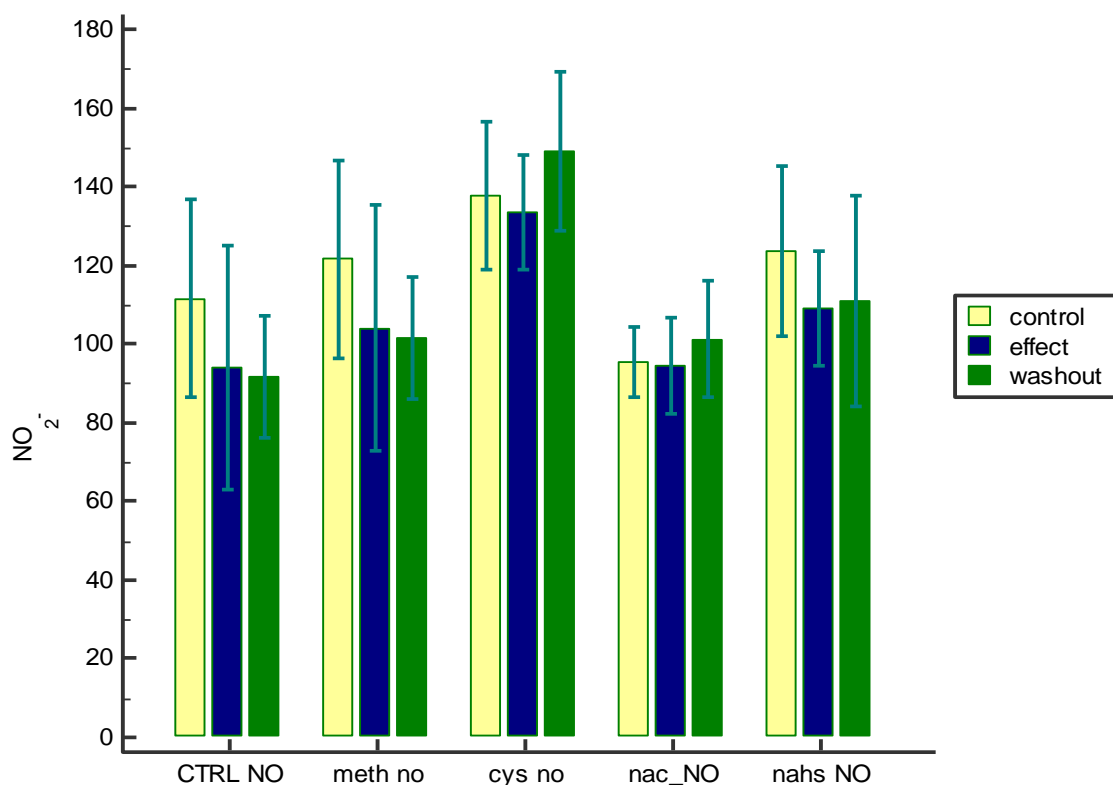
Графикон 95. Вредности индекса липидне пероксидације (TBARS) у CTRL, L-Meth, L-Cys, NAC и NaHS групи (*control, effect, washout*)



4.4.9. Вредности азот монооксида у форми нитрита (NO_2^-) контролних група пацова у три времена мерења (*control, effect, washout*)

Такође, поређењем вредности NO_2^- унутар сваке контролне групе и посматрањем разлика у овом маркеру у односу на остале групе, примећено је да је примена L-Meth и NaHS допринела благом смањењу овог маркера у периоду ефекта и опоравка (Графикон 96). Међутим, статистичким анализама (Табела 6) није потврђена статистички значајна разлика ни у једној групи ($p > 0,05$).

Графикон 96. Вредности азот монооксида у форми нитрита (NO_2^-) у CTRL, L-Meth, L-Cys, NAC и NaHS групи (*control, effect, washout*)



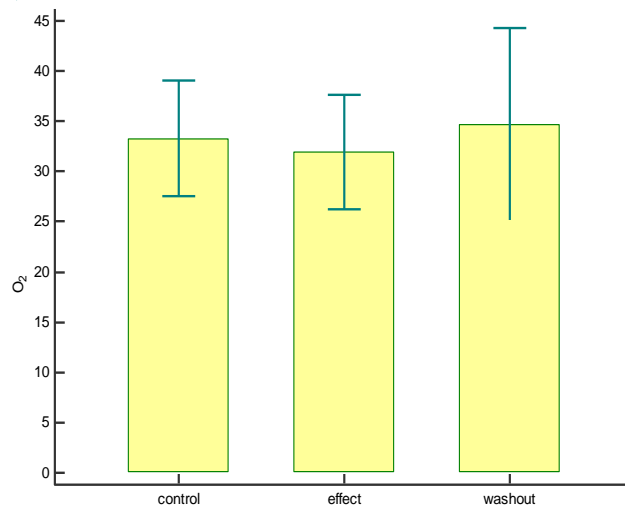
Табела 6. Статистичко поређење различитих мерења (на крају контролног периода – *control*, на крају периода администрације тест супстанце – *effect*, на крају периода опоравка – *washout*) унутар контролних група пацова за прооксидационе маркере (O_2^- , H_2O_2 , TBARS и NO_2^-). Статистички значајна разлика утврђена је анализом варијансе (ANOVA) и одговарајућим *post hoc* тестом (*Tukey/Bonferroni*), уз 5% ниво статистичке значајности ($p < 0,05$).

	<i>Coronary venous effluent</i>	O_2^-	NO_2^-	TBARS	H_2O_2
		<i>sig. p < 0,05</i>			
<i>Control</i>	Control vs. effect	0,055	0,425	0,999	0,918
	Control vs. washout	0,177	0,334	0,991	0,937
	Effect vs. washout	0,787	0,982	0,995	0,744
<i>L-Meth</i>	Control vs. effect	0,055	0,425	0,999	0,918
	Control vs. washout	0,177	0,334	0,991	0,937
	Effect vs. washout	0,787	0,982	0,995	0,744
<i>L-Cys</i>	Control vs. effect	0,076	0,915	0,524	0,997
	Control vs. washout	0,092	0,510	0,684	0,452
	Effect vs. washout	0,994	0,304	0,962	0,490
<i>NAC</i>	Control vs. effect	0,669	0,993	0,482	0,505
	Control vs. washout	0,624	0,667	0,173	0,762
	Effect vs. washout	0,997	0,598	0,756	0,903
<i>NaHS</i>	Control vs. effect	0,126	0,466	0,898	0,925
	Control vs. washout	0,503	0,554	0,984	0,990
	Effect vs. washout	0,622	0,987	0,814	0,968

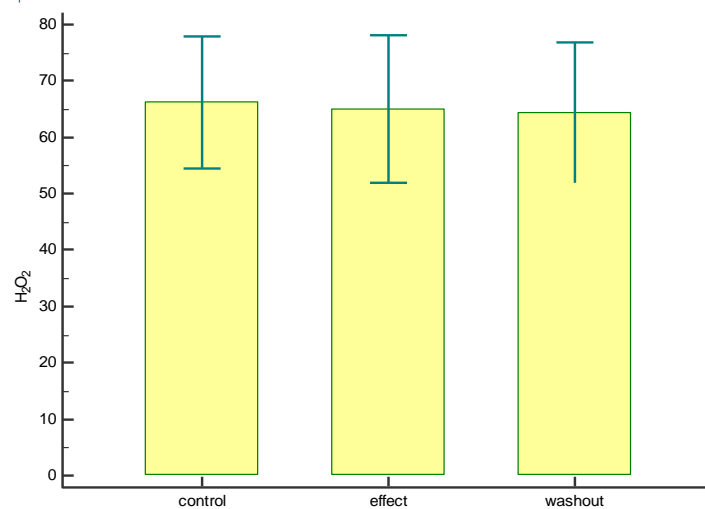
4.5. Динамика прооксидационих маркера у коронарном венском ефлуенту унутар експерименталних група пацова

4.5.1. DL-хомоцистеин група (DL-Hcy)

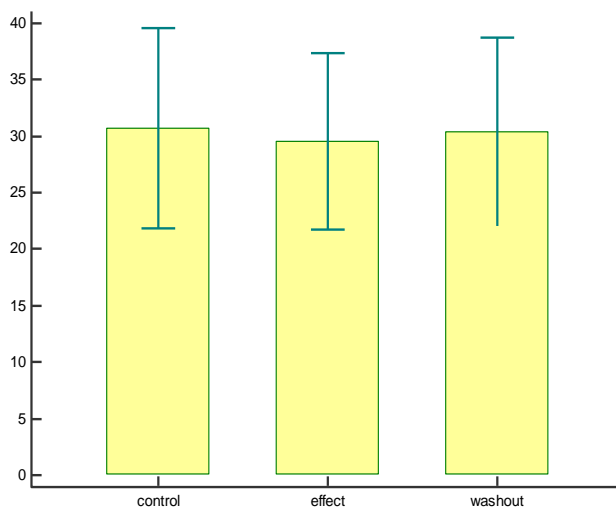
Графикон 97. Супероксид анјон радикал (O_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy групи пацова



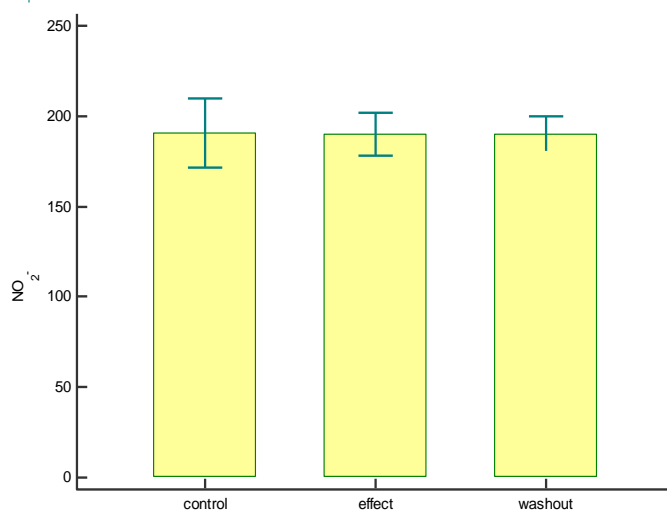
Графикон 98. Водоник пероксид (H_2O_2) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy групи пацова



Графикон 99. Индекс липидне пероксидације (TBARS) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу групи пацова

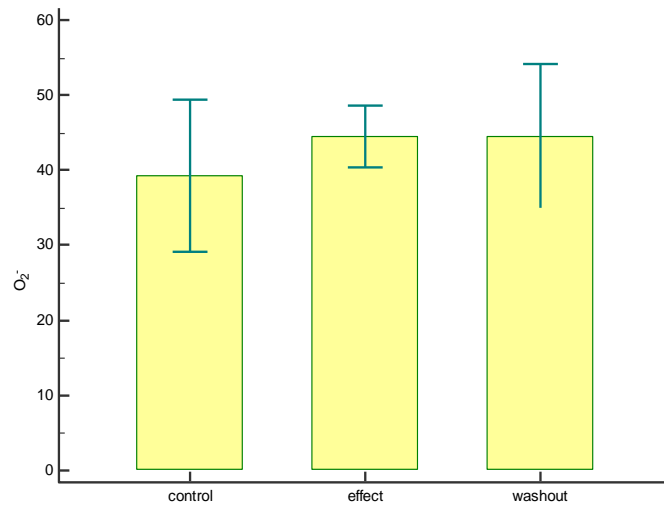


Графикон 100. Азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу групи пацова

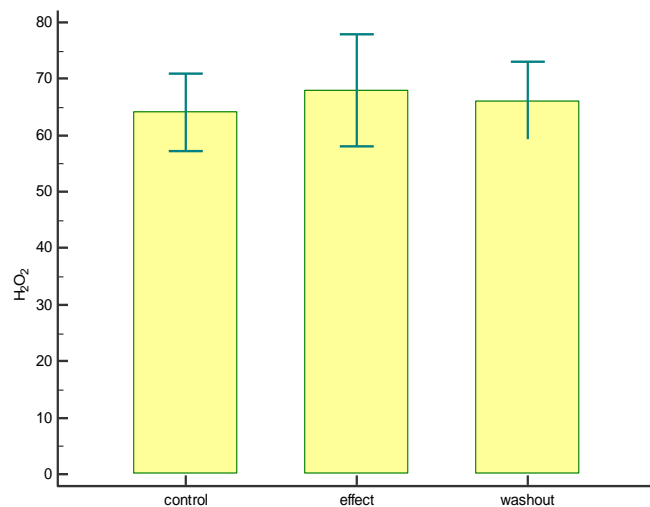


4.5.2. DL-хомоцистеин + L-метионин група (DL-Hcy+L-Meth)

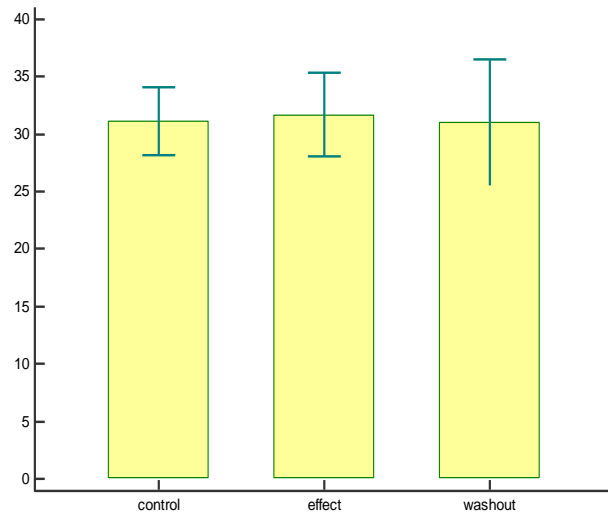
Графикон 101. Супероксид анјон радикал (O_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Meth групи пацова



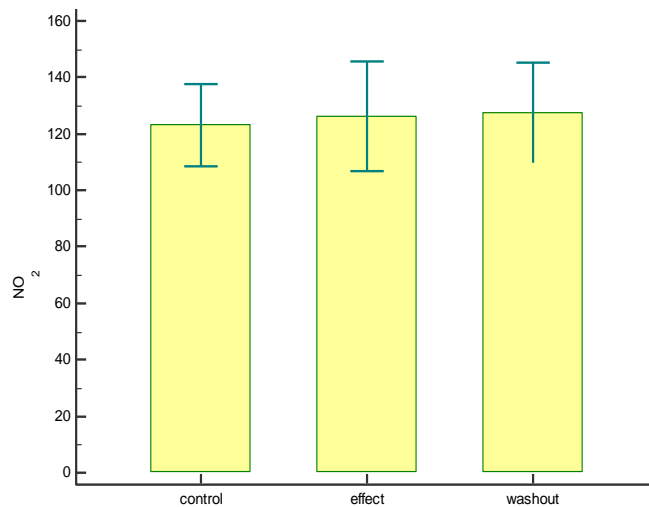
Графикон 102. Водоник пероксид (H_2O_2) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Meth групи пацова



Графикон 103. Индекс липидне пероксидације (TBARS) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+L-Meth групи пацова

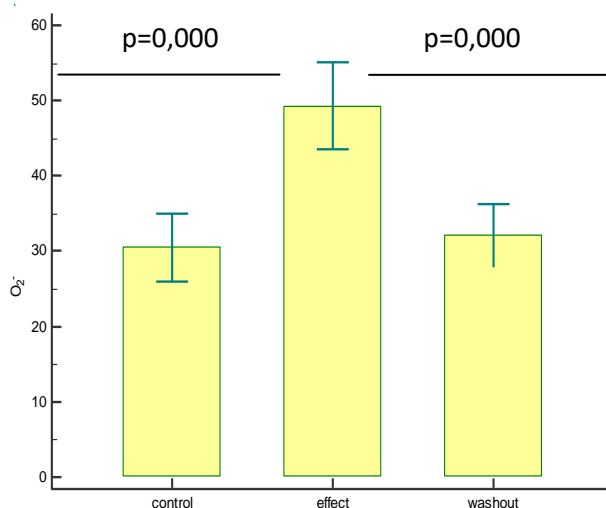


Графикон 104. Азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+L-Meth групи пацова

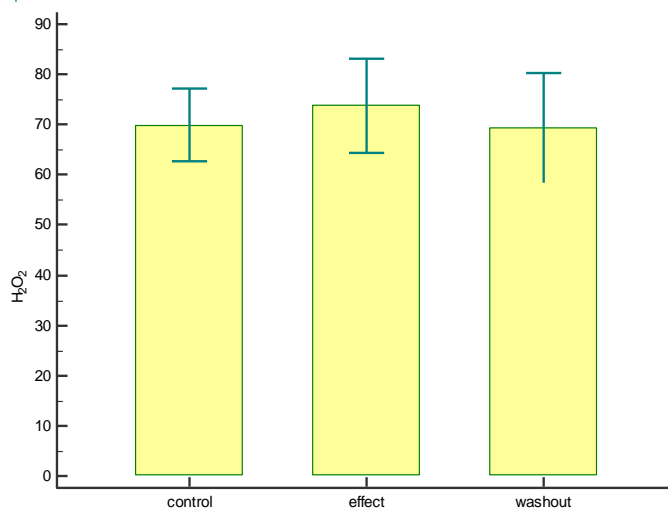


4.5.3. DL- хомоцистеин + L-цистеин група (DL-Hcy+L-cys)

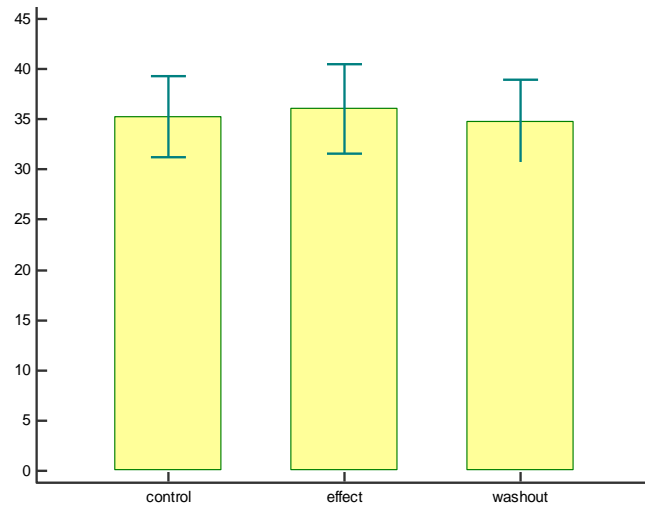
Графикон 105. Супероксид анјон радикал (O_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Cys групи пацова



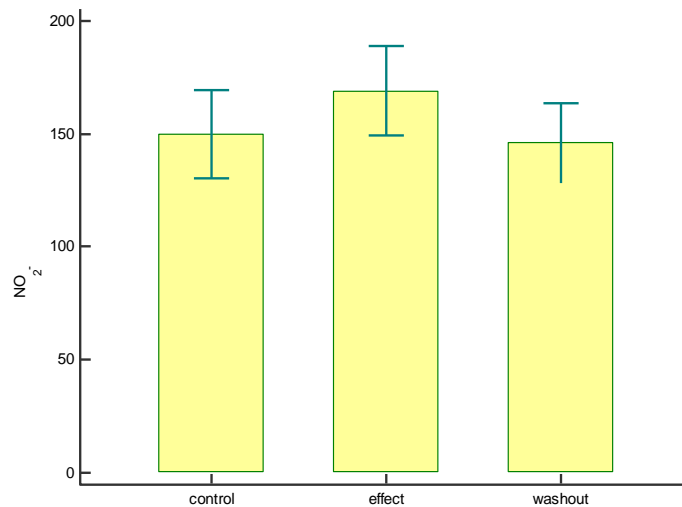
Графикон 106. Водоник пероксид (H_2O_2) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Cys групи пацова



Графикон 107. Индекс липидне пероксидације (TBARS) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+ L-Cys групи пацова

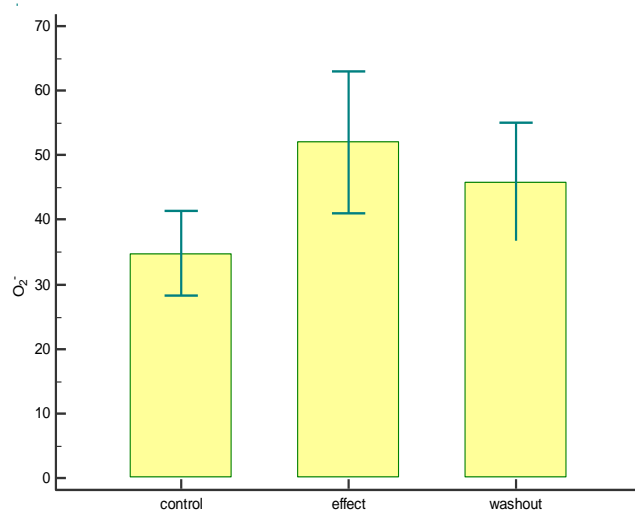


Графикон 108. Азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+ L-Cys групи пацова

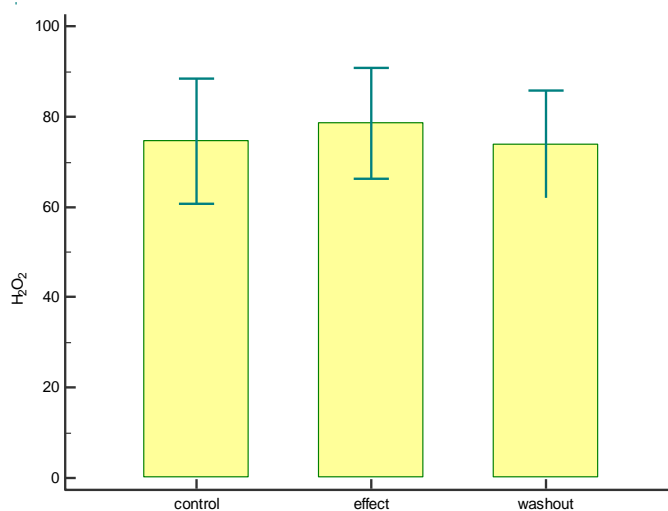


4.5.4. DL-хомоцистен + N-ацетилцистеин група (DL-Hcy+NAC)

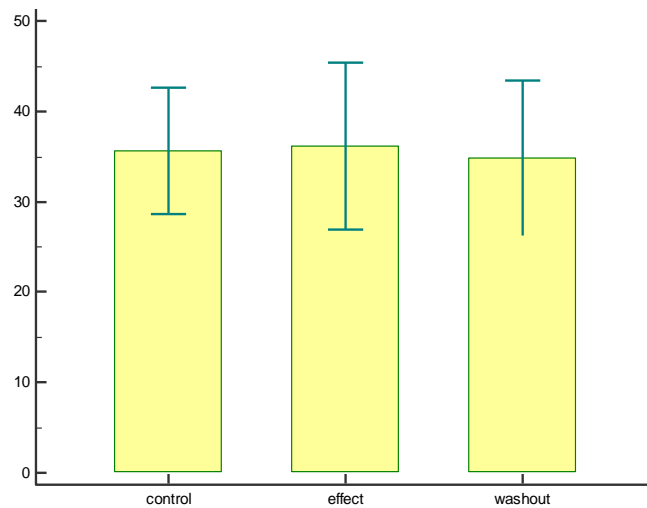
Графикон 109. Супероксид анјон радикал (O_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+ NAC групи пацова



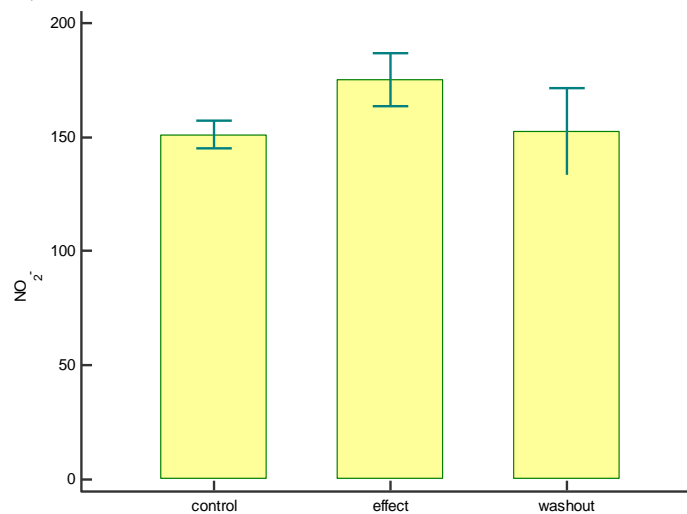
Графикон 110. Водоник пероксид (H_2O_2) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+ NAC групи пацова



Графикон 111. Индекс липидне пероксидације (TBARS) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+ NAC групи пацова

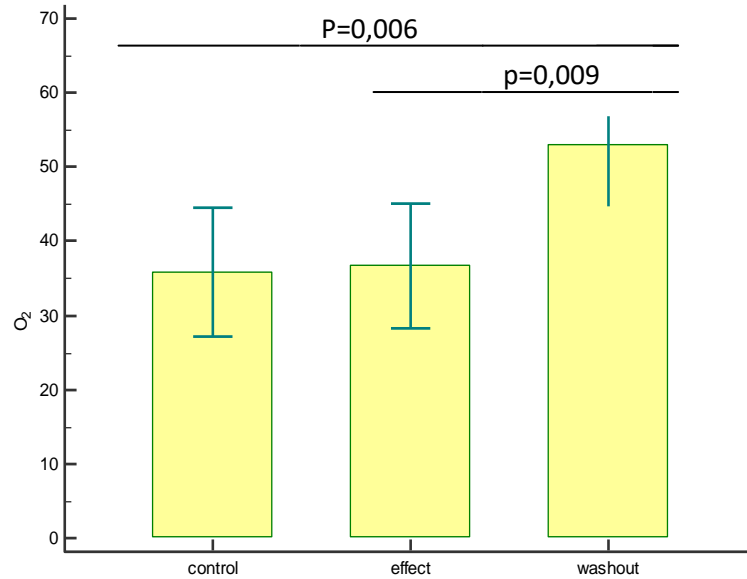


Графикон 112. Азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+NAC групи пацова

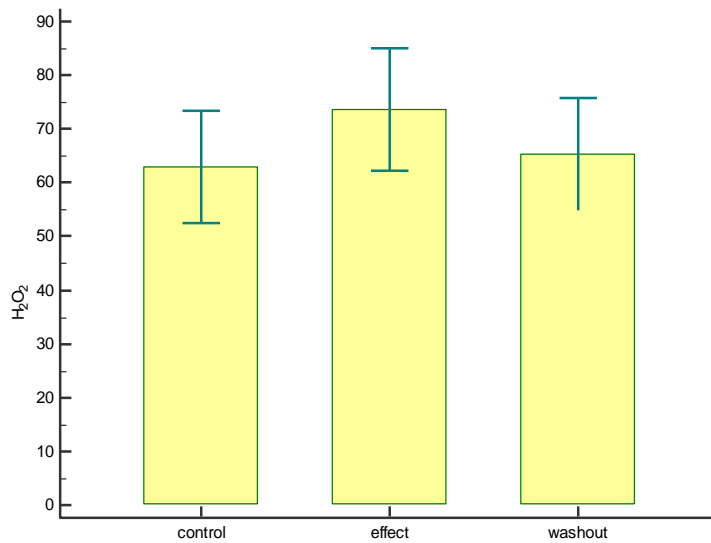


4.5.5. DL-хомоцистеин + Na-хидрогенсулфид (DL-Нсу+NaHS)

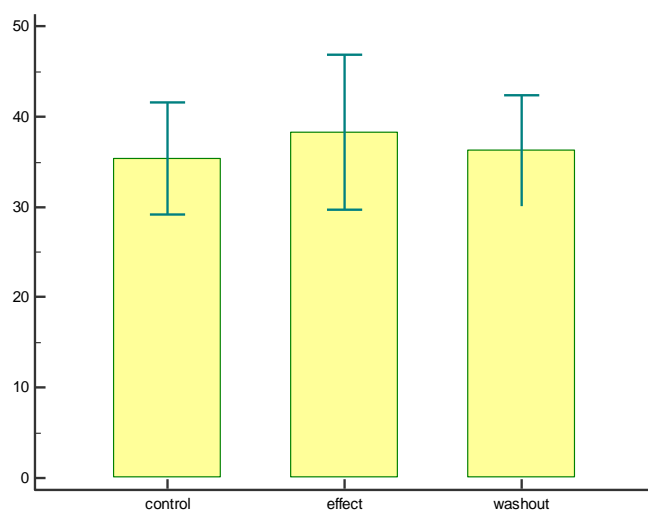
Графикон 113. Супероксид анјон радикал (O_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+NaHS групи пацова



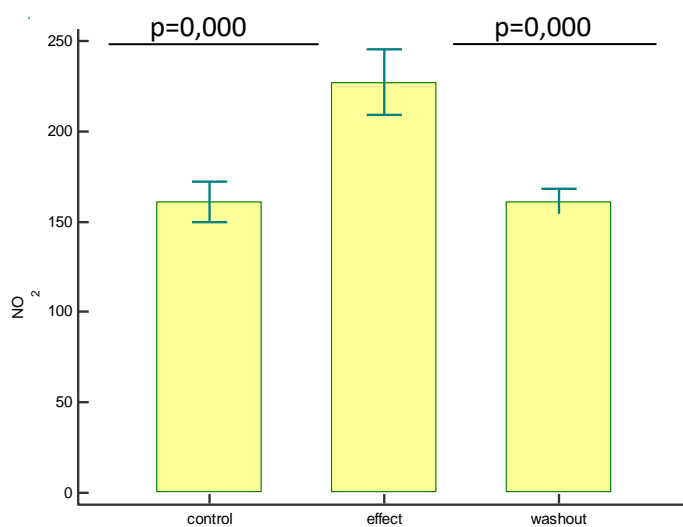
Графикон 114. Водоник пероксид (H_2O_2) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+NaHS групи пацова



Графикон 115. Индекс липидне пероксидације (TBARS) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+ NaHS групи пацова



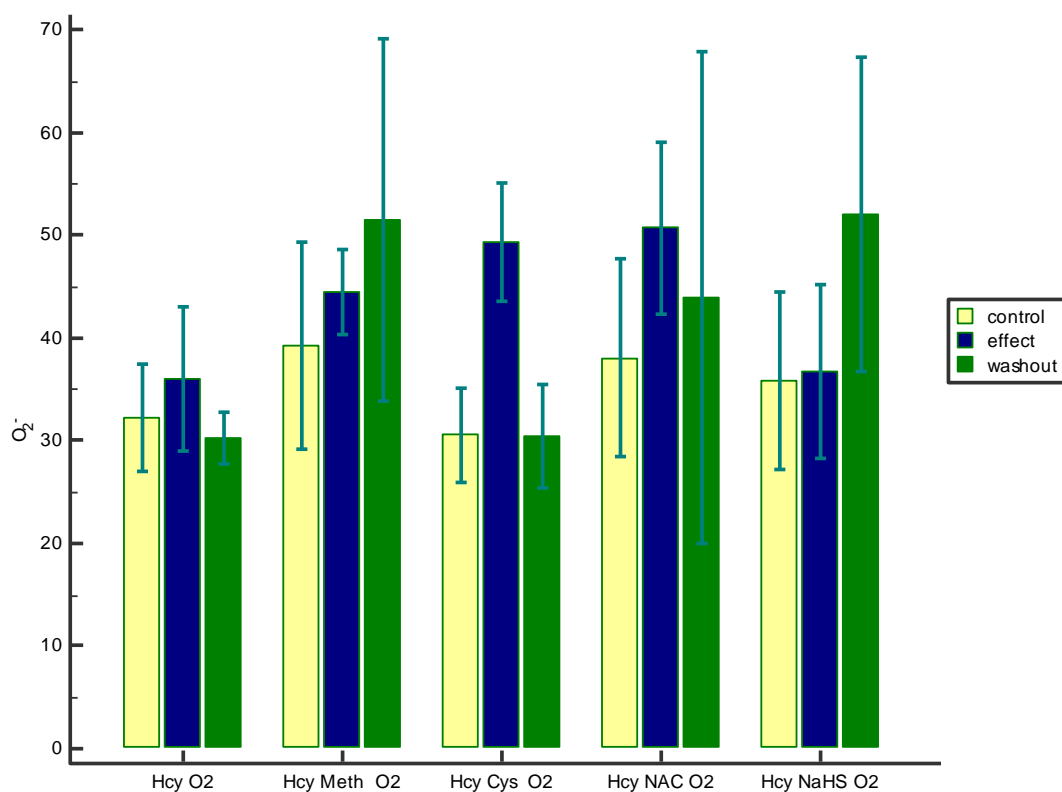
Графикон 116. Азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+ NaHS групи пацова



4.5.6. Вредности супероксид анјон радикала (O_2^-) експерименталних група пацова у три времена мерења (*control, effect, washout*)

Поређењем вредности O_2^- унутар сваке групе пацова третираних DL-Нсу и посматрањем динамике овог маркера у односу на остале групе, примећено је да је примена L-Cys и NaHS допринела значајном повећању овог маркера (L-Cys у периоду ефекта; NaHS у периоду опоравка) (Графикон 117). Статистичким анализама (Табела 7) потврђена је статистички значајна разлика у поменутим групама ($p < 0,05$).

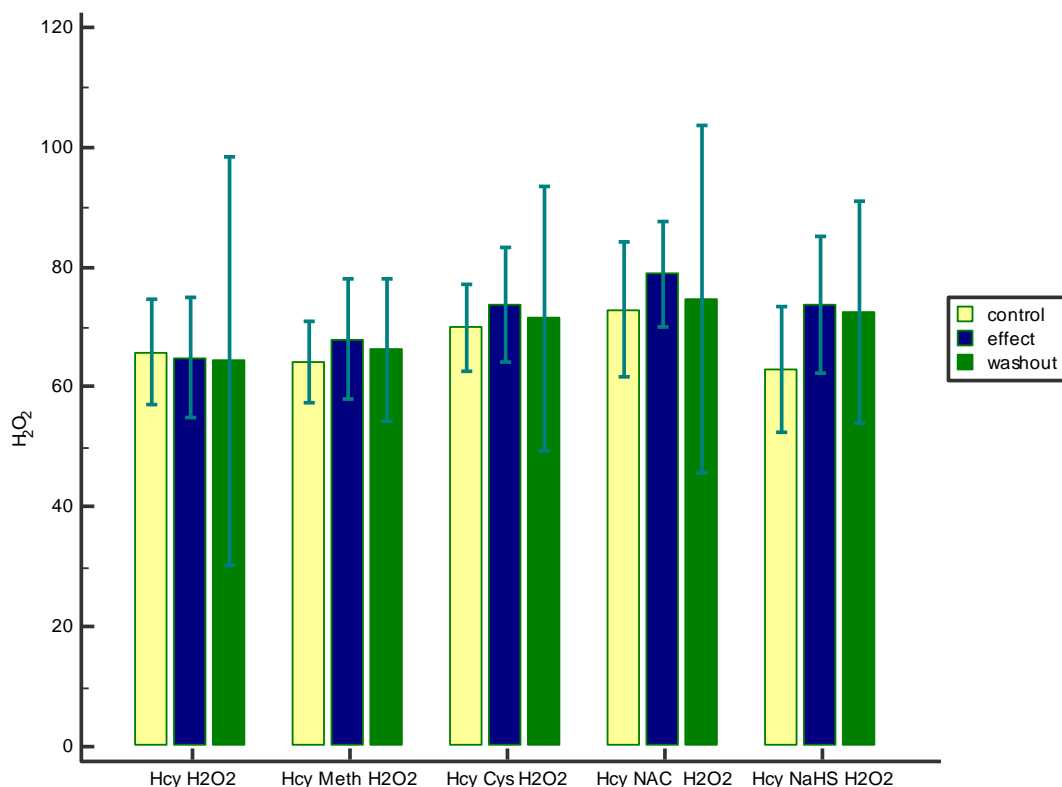
Графикон 117. Вредности супероксид анјон радикала (O_2^-) у DL-Нсу, DL-Нсу+L-Meth, DL-Нсу+L-Cys, DL-Нсу+NAC и DL-Нсу+NaHS групама (*control, effect, washout*)



4.5.7. Вредности водоник пероксида (H_2O_2) експерименталних група пацова у три времена мерења (*control, effect, washout*)

Поређењем вредности H_2O_2 унутар сваке групе пацова третираних DL-Нсу и посматрањем динамике овог маркера у односу на остале групе, примећено је да је само примена NaHS допринела благом повећању овог маркера у периоду ефекта и опоравка (Графикон 118). Статистичким анализама (Табела 7) није потврђена статистички значајна разлика ни у једној групи ($p>0,05$).

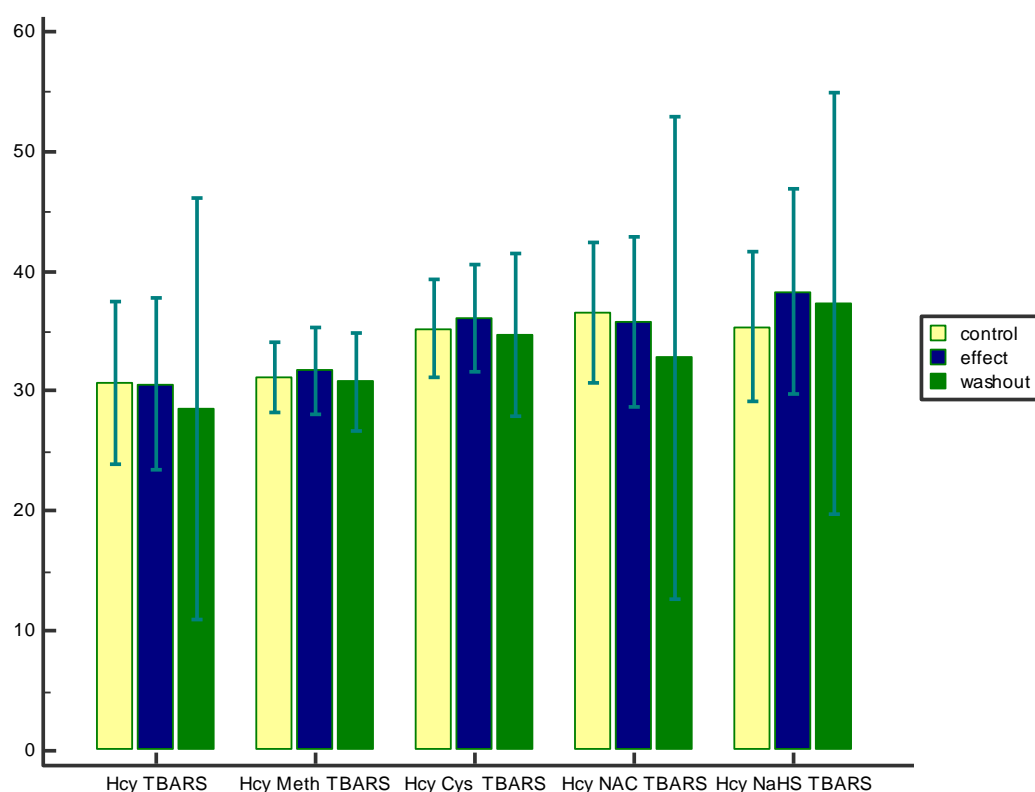
Графикон 118. Вредности водоник пероксида (H_2O_2) у DL-Нсу, DL-Нсу+L-Meth, DL-Нсу+L-Cys, DL-Нсу+NAC и DL-Нсу+NaHS групама (*control, effect, washout*)



4.5.8. Вредности индекса липидне пероксидације (TBARS) експерименталних група пацова у три времена мерења (*control, effect, washout*)

Поређењем вредности TBARS унутар сваке групе пацова третираних DL-Нсу и посматрањем динамике овог маркера, примећено је да ни једна од акутно тестираних супстанци није допринела значајној промени овог маркера (Графикон 119). Статистичким анализама (Табела 7) није потврђена статистички значајна разлика ни у једној групи ($p > 0,05$).

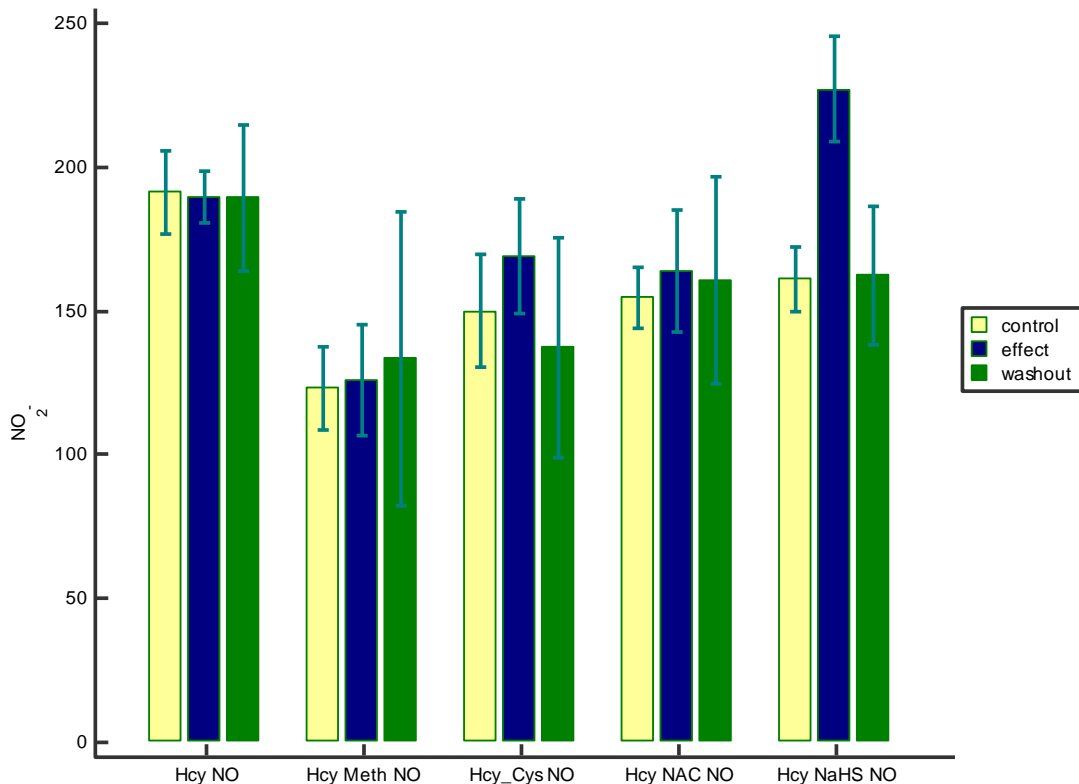
Графикон 119. Вредности индекса липидне пероксидације (TBARS) у DL-Нсу, DL-Нсу+L-Meth, DL-Нсу+L-Cys, DL-Нсу+NAC и DL-Нсу+NaHS групама (*control, effect, washout*)



4.5.8. Вредности азот монооксида у форми нитрита (NO_2^-) експерименталних група пацова у три времена мерења (*control, effect, washout*)

Поређењем вредности NO_2^- унутар сваке групе пацова третираних DL-Нсу и посматрањем динамике овог маркера у односу на остале групе, примећено је да је примена NaHS узроковала значајно повећање нитрита у периоду директне администрације (Графикон 120). Статистичким анализама (Табела 7) потврђена је статистички значајна разлика у NaHS групи ($p < 0,05$). Такође, примена L-Cys и NAC доприноси благом повећању овог маркера у периоду ефекта, али без потврђене статистичке значајности.

Графикон 120. Вредности азот монооксида у форми нитрита (NO_2^-) у DL-Нсу, DL-Нсу+L-Meth, DL-Нсу+L-Cys, DL-Нсу+NAC и DL-Нсу+NaHS групама (*control, effect, washout*)



Табела 7. Статистичко поређење различитих мерења (на крају контролног периода – *control*, на крају периода администрације тест супстанце – *effect*, на крају периода опоравка – *washout*) унутар експерименталних група пацова за прооксидационе маркере (O_2^- , H_2O_2 , TBARS и NO_2^-). Статистички значајна разлика утврђена је анализом варијансе (ANOVA) и одговарајућим *post hoc* тестом (*Tukey/Bonferroni*), уз 5% ниво статистичке значајности ($p < 0,05$).

	<i>Coronary venous effluent</i>	O_2^-	NO_2^-	TBARS	H_2O_2
		<i>sig. p < 0,05</i>			
<i>DL-Hcy</i>	Control vs. effect	0,466	0,963	0,999	0,986
	Control vs. washout	0,857	0,966	0,895	0,977
	Effect vs. washout	0,314	0,999	0,907	0,997
<i>DL-Hcy + L-Met</i>	Control vs. effect	0,509	0,952	0,970	0,652
	Control vs. washout	0,507	0,896	0,998	0,883
	Effect vs. washout	1,000	0,988	0,954	0,909
<i>DL-Hcy + L-Cys</i>	Control vs. effect	0,000	0,196	0,928	0,742
	Control vs. washout	0,830	0,922	0,985	0,993
	Effect vs. washout	0,000	0,102	0,855	0,674
<i>DL-Hcy + NAC</i>	Control vs. effect	0,067	0,595	0,979	0,580
	Control vs. washout	0,620	0,863	0,700	0,967
	Effect vs. washout	0,538	0,955	0,793	0,831
<i>DL-Hcy + NaHS</i>	Control vs. Effect	0,979	0,000	0,734	0,201
	Control vs. Washout	0,006	1,000	0,972	0,911
	Effect vs. Washout	0,009	0,000	0,858	0,368

На крају, статистичким поређењем група у односу на третман DL-хомоцистеином, утврђена је статистички значајна разлика прооксидационих биомаркера коронарног перфузата у свим групама пацова (Табела 8). У групама које су третиране DL-хомоцистеином, директна примена NAC је довела до статистички значајне промене H_2O_2 и TBARS, јачине ($\eta_p^2=0,230-0,358$), у односу на групе које нису третиране DL-хомоцистеином. Осим тога, у групама третираним DL-хомоцистеином, утврђена је статистички значајна разлика у концентрацији O_2^- у току примене L-Cys, NAC и NaHS у односу на групе нетретиране егзогеним хомоцистеином. Најинтензивније промене уочене су у вредностима NO_2^- , у току акутне примене свих тестираних сумпоровитих супстанци, а у односу на третман DL-хомоцистеином. (Табела 8).

Табела 8. Статистичко поређење вредности прооксидационих маркера коронарног перфузата у односу на третман DL-хомоцистеином. Статистички значајна разлика утврђена је анализом варијансе (ANOVA) и одговарајућим *post hoc* тестом (Tukey/Bonferroni), уз 5% ниво значајности ($p<0,05$). Степен разлике утврђен је квадратном етом (η_p^2).

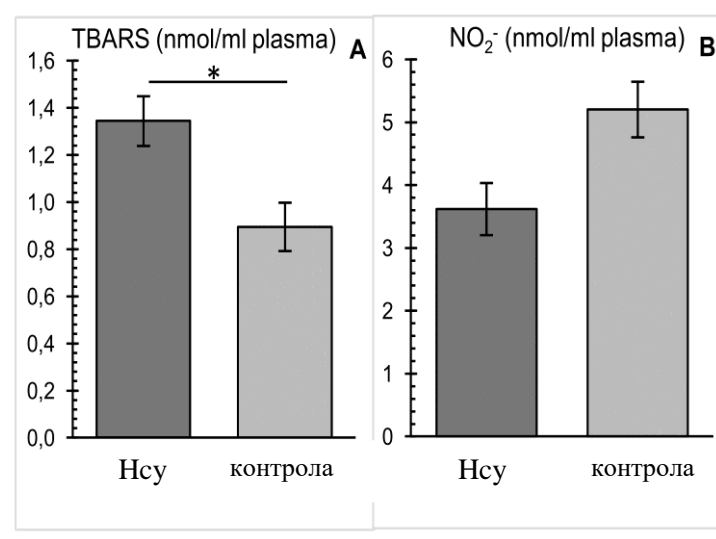
	TBARS		NO_2^-		O_2^-		H_2O_2	
	Sig.	η_p^2	Sig.	η_p^2	Sig.	η_p^2	Sig.	η_p^2
L-methionine DL-Hcy treatment	0,859	0,001	<u>0,017</u>	0,160	0,507	0,013	0,078	0,084
L-cysteine DL-Hcy treatment	0,397	0,024	<u>0,016</u>	0,178	<u>0,010</u>	0,202	0,264	0,041
N-acetylcysteine DL-Hcy treatment	<u>0,005</u>	0,230	<u>0,001</u>	0,860	<u>0,001</u>	0,298	<u>0,001</u>	0,358
NaHS DL-Hcy treatment	0,059	0,121	<u>0,001</u>	0,830	<u>0,006</u>	0,228	0,867	0,001

4.6. Прооксидациони маркери у крвној плазми у односу на третман Нсу

4.6.1. Индекс липидне пероксидације и нитрити (крвна плазма)

Вредности TBARS мерене у крвној плазми су се статистички значајно повећале ($p < 0,05$) код пацова који су били на третману DL-хомоцистеином у односу на контролне пацове. Са друге стране, запажено је смањење вредности NO_2^- код пацова који су били на третману DL-хомоцистеином у односу на контролне пацове, али без статистичке значајности (Графикон 121).

Графикон 121. Вредности индекса липидне пероксидације и нитрита у односу на третман Нсу (крвна плазма)

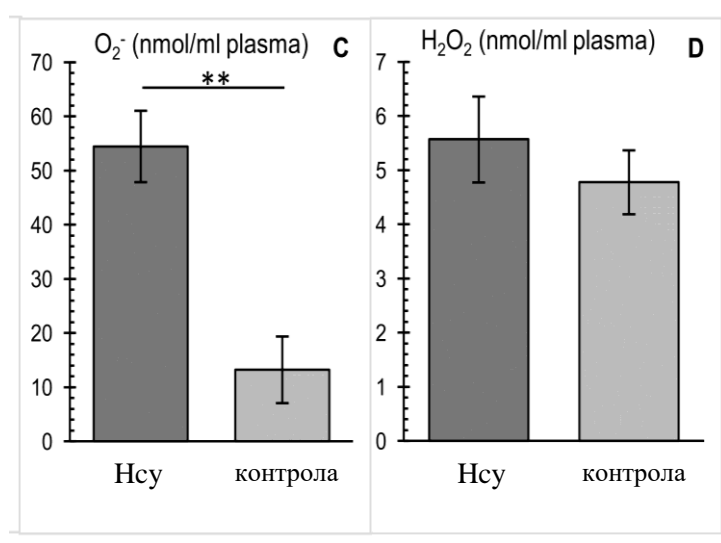


* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

4.6.2. Супероксид анјон радикал и водоник пероксид (крвна плазма)

Вредности O_2^- мерене у крвној плазми су се статистички веома значајно повећале ($p < 0,01$) код пацова који су били на третману DL-хомоцистеином у односу на контролне пацове. Такође, добио се и пораст вредности H_2O_2 код пацова који су били на третману DL-хомоцистеином у односу на контролне пацове, али без статистичке значајности (Графикон 122).

Графикон 122. Вредности супероксид анјон радикала и водоник пероксида у односу на третман Нсу (крвна плазма)



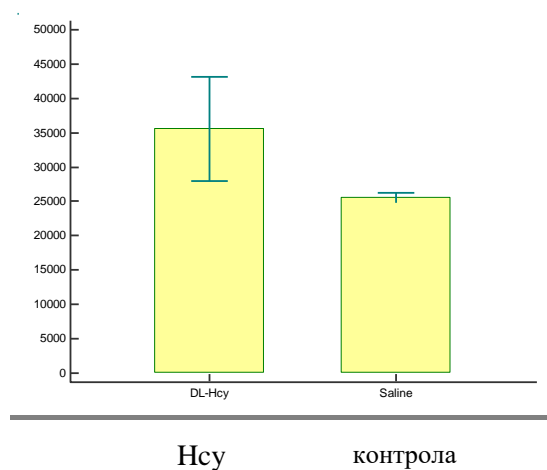
* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

4.7. Маркери антиоксидационог система заштите

4.7.1. Редуковани глутатион (GSH)

Концентрација редукованог глутатиона у хемализату еритроцита није се статистички значајно разликовала ($p > 0,05$) код пацова који су били на третману DL-хомоцистеином у односу на контролне пацове (Графикон 123).

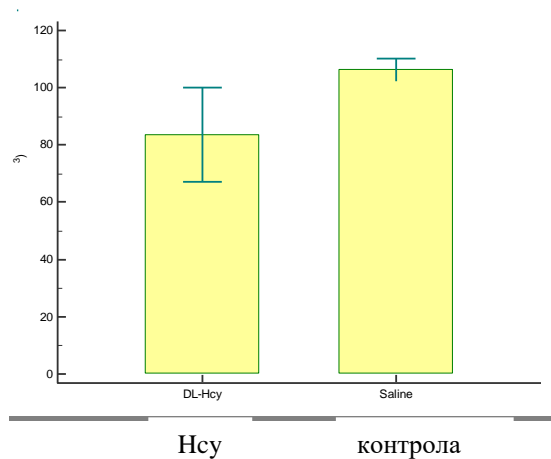
Графикон 123. Вредности редукованог глутатиона (GSH) у хемализату еритроцита у контролној групи (контрола) и групи која је била на субхроничном третману DL-хомоцистеином (Нсу)



4.7.2. Супероксид дисмутаза (SOD)

Активност супероксид дисмутазе у хемолизату еритроцита пацова није се статистички значајно разликовала ($p > 0,05$) код пацова који су били на третману DL-хомоцистеином у односу на контролне пацове (Графикон 124).

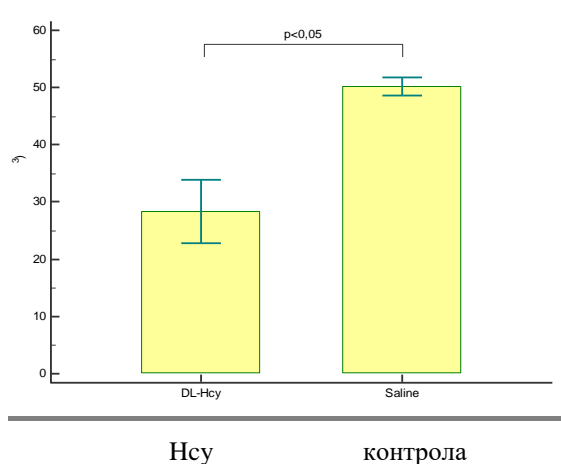
Графикон 124. Вредности супероксид дисмутазе (SOD) у хемолизату еритроцита у контролној групи (контрола) и групи која је била на субхроничном третману DL-хомоцистеином (Hcy)



4.7.3. Каталаза (CAT)

Активност каталазе у хемолизату еритроцита се статистички значајно разликовала ($p < 0,05$) код пацова који су били на третману DL-хомоцистеином у односу на контролне пацове, са значајним снижењем активности овог антиоксидационог маркера у групи третираној Hcy (Графикон 125).

Графикон 125. Активност каталазе (CAT) у хемолизату еритроцита у контролној групи (контрола) и групи која је била на субхроничном третману DL-хомоцистеином (Hcy)



ДИСКУСИЈА

5. ДИСКУСИЈА

Примарни задатак нашег истраживања био је испитивање утицаја директне примене сумпоровитих аминокиселина (L-метионина, L-цистеина, N-ацетилцистеина) и неорганског једињења које садржи сумпор (Na-хидрогенсулфида) на функционалне карактеристике изолованог срца пацова и биомаркере оксидационог стреса, у присуству и одсуству егзогене субхроничне примене DL-хомоцистеина у трајању од 14 дана. Посебан акценат ове студије стављен је на процену ефеката двонедељне примене хомоцистеина и његове улоге на реакције изолованог срца на акутну примену поменутих сумпоровитих једињења.

У првом делу истраживања пратили смо утицај двонедељне егзогене примене DL-хомоцистеина на промене концентрације укупног хомоцистеина у крвној плазми/серуму пацова.

Затим, у другом делу истраживања процењивали смо утицај акутне, директне администрације поменутих сумпоровитих аминокиселина и неорганског Na-хидрогенсулфида, са или без коадминистрације DL-хомоцистеина, на динамику параметара функционалности срца. Дакле, у лабораторијским условима, по јасно утврђеном протоколу, пратили смо ефикасност и квалитет срчаног рада и то праћењем функције и динамике леве коморе као највеће и најдоминантније шупљине срчаног мишића. Пратили смо промене систолног (SLVP) и дијастолног (DLVP) притиска леве коморе, срчану фреквенцу (HR), максималну (dp/dt_{max}) и минималну (dp/dt_{min}) стопу промене притиска у левој комори. Пратили смо и вредности коронарног протока (CF), маркера коронарне циркулације. Максимална (dp/dt_{max}) и минимална (dp/dt_{min}) стопа промене притиска у левој комори су параметри који се користе за индиректну процену снаге срчане контракције (dp/dt_{max}), односно адекватну релаксацију срца (dp/dt_{min}). Смањење контрактилне снаге срца, поред осталих показатеља, уочавамо снижењем вредности dp/dt_{max} , односно, губитак релаксантне активности срца снижењем dp/dt_{min} ка позитивнијим вредностима (обзиром на негативан предзнак), и обрнуто. У кардиодинамском смислу ови параметри су изузетно важни показатељи ефикасности фаза срчаног циклуса – dp/dt_{max} показује очуваност фазе систоле, способност адекватне контракције леве коморе (инотропно својство), док је dp/dt_{min} користан у процени фазе дијастоле, показатељ очуваности процеса релаксације леве коморе (луситропно

својство). Тако да систолну дисфункцију региструјемо снижењем вредности dp/dt_{\max} , док дијастолну дисфункцију уочавамо снижењем dp/dt_{\min} (постаје позитивнији).

На крају, у трећем делу студије вршили смо процену ефеката администрације сумпоровитих једињења (са или без коадминистрације DL-хомоцистеина) на редокс равнотежу, одређивањем прооксидационих и антиоксидационих биомаркера.

Ово истраживање је врло значајно из више разлога. Као прво, процена поменутих варијабли би требала да донесе нова сазнања о улози хомоцистеина у патофизиологији кардиоваскуларног система, пре свега миокарда и коронарне циркулације. Имајући у виду досадашња сазнања експерименталних и клиничких студија о повезаности хиперхомоцистеинемije и настанка оштећења на кардиоваскуларном систему, још увек није тачно дефинисан механизам којим хомоцистеин, и у ком степену, утиче на васкулатуру самог срчаног мишића, а нарочито у садејству са другим органским и неорганским једињењима тиолне структуре.

Ради изучавања промена у функционалности срчаног мишића и утицаја на редокс равнотежу услед примене сумпоровитих једињења, одлучили смо се за модел ретроградно перфундованог изолованог срца који је најадекватнији модел за овакву врсту испитивања јер нам омогућава уклањање хуморалних и нервних утицаја на хемодинамику и кардиодинамику, а оставља нам на очиглед резултат директног утицаја супстанци од интереса на функцију миокарда. Поред тога, овакве претпоставке апсолутне су потврђене литературним подацима и сазнањима других аутора (26-45, 142-150).

Између осталог, значај ове студије се огледа и у клиничком бенефиту самог истраживања, с обзиром да је јасно да експерименталне студије попут ове могу бити полазна тачка за будућа клиничка истраживања и развијање потенцијалних терапеутских решења у домену кардиоваскуларних болести. На значају ове студије се добија још више имајући у виду веома висок епидемиолошки и социоекономски значај обољења кардиоваскуларног система.

5.1. *Ефекти сумпоровитих једињења на биорасположивост укупног хомоцистеина*

У првом делу истраживања испитивали смо утицај двонедељне примене DL-хомоцистеина (основни облик хомоцистеина) на концентрацију укупног хомоцистеина у крвној плазми/серуму пацова. На основу биохемијских анализа, потврдили смо да субхронична примена DL-хомоцистеина у дози од 0,45 $\mu\text{mol/g}$ телесне масе пацова, два пута дневно у трајању од 14 дана, доводи до статистички значајног повишења укупног хомоцистеина у плазми/серуму у односу на животиње које нису биле изложене овом третману (Табела 3). Међутим, значајно је напоменути да овим моделом нисмо изазвали хиперхомоцистеинемију, али јесмо пораст хомоцистеина и достигли граничне вредности, што такође има значај у клиничком смислу.

Ови резултати су у складу са резултатима *Timkova et al.*, који су спровели истраживање уз употребу истог експерименталног модела (154). Поменути резултати су посебно значајни из разлога што потенцирају недвосмислену повезаност повишених вредности укупног хомоцистеина и поремећаја функције леве коморе након субхроничног оптерећења хомоцистеином. Повишене концентрације хомоцистеина су нађене код пацијената са оштећеном систолном функцијом леве коморе (100, 101, 146, 163), а механизми укључени у ово патофизиолошко стање су још увек недовољно познати. Клиничка проспективна и рандомизирана Фрамингамска студија је известила сличне резултате и потврдила везу хомоцистеина и поремећаја функције леве коморе испитаника (164).

У литератури се углавном описују ефекти хроничне примене хомоцистеина или метионина на вредности укупног хомоцистеина у плазми/серуму, са освртом на неке од патофизиолошких поремећаја и то најчешће кардиоваскуларних обољења. У нашем претходном истраживању пратили смо ефекте хроничне примене метионина путем исхране на вредности хомоцистеина у крви и доказана је јака позитивна корелација између исхране обогаћене метионином и настанка тешке форме хиперхомоцистеинемије након само 4 недеље третмана (165). Са друге стране, акутна примена DL-Нсу у нашем претходном истраживању (166) је довела до одређених кардиодинамских промена.

5.2. *Ефекти сумповитих једињења на функцију миокарда и коронарни проток*

На основу добијених резултата у нашем истраживању, осврнућемо се на појединачни ефекат сумповитих аминокиселина (L-метионина, L-цистеина, N-ацетилцистеина) и неорганског сумповитог једињења, у истој дози, на функцију миокарда и коронарни проток, код пацова са или без субхроничног оптерећења DL-хомоцистеином.

У контролним условима, поређењем вредности dp/dt_{max} и dp/dt_{min} унутар група и посматрањем динамике ових параметара у односу на остале групе, примећено је да је примена L-Cys и NaHS допринела повећању маркера контрактилности и релаксације у периоду опоравка, док је примена NAC довела до пада снаге контракције и ослабљене релаксације, односно систолне и дијастолне дисфункције, у периоду ефекта (Графикони 31 и 32). Статистичким анализама (Табела 4) за оба параметра потврђена је статистички значајна разлика у групама L-Cys, NAC и NaHS ($p < 0,05$).

Затим, поређењем вредности SLVP унутар контролних група и посматрањем промена овог параметра у односу на остале групе, примећено је да је примена NaHS допринела повећању овог маркера, у периоду опоравка (Графикон 33). Статистичким анализама (Табела 4) потврђена је статистички значајна разлика у групи NaHS ($p < 0,05$). Под контролним условима, акутна примена испитиваних сумповитих једињења није изазвала значајне промене у DLVP (Графикон 34, Табела 4).

Поређењем вредности HR унутар и између контролних група примећено је да је примена NAC и NaHS у периоду ефекта изазвала негативно хронотропно дејство (Графикон 35), али без статистичке значајности (Табела 4). Такође, статистичким анализама (Табела 4) добијених контролних вредности CF (Графикон 36), није потврђена статистички значајна разлика за у L-Cys групи, иако је акутна примена ове аминокиселине изазвала благо повећање коронарног протока.

Из наведених резултата закључујемо да у контролним условима (без субхроничног оптерећења DL-хомоцистеином) сумповити агенси доводе до значајних промена у контрактилности и релаксацији срца, што се у функционалном смислу одражава на систолу и дијастолу. Такође, под утицајем тестираних супстанци у

контролним условима настају делимичне промене коронарног протока. Наведене промене превасходно настају под дејством неорганског натријум-хидрогенсулфида.

У сличном истраживању (167) које је спроведено непосредно пре овог, на пацовима су испитивани ефекти субхроничног третмана сумпоровитим аминокиселинама (Meth, Meth+L-Cys, Meth+NAC), у трајању од три недеље. Радила се хистолошка анализа срчаног и аортног ткива, биохемијске крвне анализе (хомоцистеин, фолати, витамин B₁₂, фибриноген, D-димер, vonWillebrandov фактор). Примећен је значајан ефекат Meth+L-Cys и Meth+NAC апликације на све испитиване варијабле, што нам је била додатана стимулација да испитамо да ли и акутна примена сумпоровитих аминокиселина има утицај на миокард. Током наведене студије наглашен је значај интеракције ових аминокиселина са медијаторима запаљења као и директне прокоагулационе способности ових једињења у организму.

Како бисмо проверили ефекте директне примене сумпоровитих аминокиселина на кардиодинамске параметре у патофизиолошким условима, исте варијабле смо мерили и у експерименталним групама (DL-Hcy групе), односно након двонедељне примене егзогеног DL-Hcy.

Поређењем вредности dp/dt_{max} и dp/dt_{min} унутар експерименталних група и посматрањем динамике ових параметара у односу на остале групе, примећено је да је примена NAC и L-Meth допринела благом повећању ових маркера контрактилности и релаксације у периоду ефекта, уз повећање у NAC групи и у периоду опоравка (Графикони 67 и 68). Статистичким анализама (Табела 5) за оба параметра потврђена је статистички значајна разлика у NAC групи ($p < 0,05$).

Поређењем вредности SLVP унутар експерименталних група и посматрањем промена овог параметра у односу на остале групе, примећено је да је у односу на остале групе примена NAC и L-Meth допринела благом повећању овог параметра у периоду ефекта, уз повећање у NAC групи и у периоду опоравка (Графикон 69), али без статистичке значајности унутар поменутих група. Статистичка сигнификантност је потврђена унутар NaHS групе ($p < 0,05$).

Затим, поређењем вредности DLVP унутар сваке експерименталне групе пацова третираних DL-Hcy и посматрањем разлика овог параметра у односу на остале групе,

примећено је да је примена L-Cys, NAC и NaHS изазвала снижење овог маркера у периоду ефекта и опоравка (Графикон 70). Међутим, статистичким анализама (Табела 5) није потврђена статистички сигнификантна разлика унутар експерименталних група ($p > 0,05$).

Поређењем вредности HR унутар сваке експерименталне групе пацова третираних DL-Hсу и посматрањем разлика овог параметра у односу на остале групе, примећено је да је примена L-Cys изазвала благо повећање срчане фреквенце у периоду ефекта и опоравка (Графикон 71), али статистичким анализама (Табела 5) није потврђена статистички значајна разлика нити у једној групи ($p > 0,05$).

Поређењем вредности CF унутар експерименталних група пацова и посматрањем разлика овог параметра у односу на остале групе, примећено је да је у односу на остале групе примена NaHS, и у мањој мери NAC, изазвала благо повећање овог параметра у периоду ефекта (Графикон 72). Статистичким анализама (Табела 5) потврђена је статистички значајна разлика унутар NaHS групе ($p < 0,05$).

Дакле, у групама које су биле подвргнуте администрацији DL-Hсу дошло је до промене контрактилности и релаксације миокарда као у контролним условима, и то готово после истих сумпоровитих аминокиселина односно након примене L-Meth, L-Cys, NAC и NaHS. Међутим, интересантно је да у експерименталним групама у односу на контролне групе није дошло до промене коронарног протока под утицајем сумпоровитих аминокиселина и примене неорганског NaHS. На основу тога закључујемо да је акутна примена сумпоровитих аминокиселина успела да "оштећења" настала услед сунхроничне примене хомоцистеина врати на првобитне вредности, односно да делује протективно.

Овде опет долазимо на питање још увек недовољно расветљених механизма којима хомоцистеин егзогено примењен или ендогено створен изазива директна оштећења срчаног мишића и последице у смислу поремећаја функције миокарда. Наиме, хомоцистеин као тиол стимулише накупљање мастоцита и интерстицијалног колагена, чиме доводи до интерстицијалне и периваскуларне фиброзе и ремети однос колагених/еластичних влакана који је од великог значаја за контрактилну способност миокарда (168, 169). Мењањем структуре миокарда, хомоцистеин на овај начин слаби

његову радну ефикасност. Молекуларни механизми који започињу читав процес измене грађе миокарда су нејасни, али према неким ауторима, укључују активацију матриксних металопротеиназа (MMPs) и слободних радикала (168, 169).

Са друге стране, сумпор је важан елемент биолошких система са есенцијалном улогом у биохемијским процесима као градивни елемент протеина, витамина и других круцијалних биомолекула. За људе главни извор сумпора представљају биљке (бијели лук, кошчице грожђа..) које садрже обиље неорганског сумпора неопходног за биосинтезу сумпоровитих аминокиселина (метионин, цистеин, хомоцистеин, таурин). Метионин и цистеин су основни структурни елементи телесних протеина. Сумпоровите аминокиселине су укључене и у синтезу снажних интраћелијских антиоксиданаса, глутатиона и N-ацетилцистеина. Осим тога су и природни детоксификатори, који се често користе у превенцији токсичних ефеката металних јона (131).

Дакле, запажамо да сумпоровите аминокиселине као и неоргански натријум хидрогенсулфид, као једињења која садрже сумпор, у директном акутном дејству показују протективно дејство на функцију срца, ублажавајући оштећења миокарда настала услед примене токсичног хомоцистеина. Значајно је да уочити да поменута сумпоровита једињења, након акутне примене, нису способна да утичу на коронарни проток на изолованом срцу пацова. Вероватно би дужа експозиција сумпоровитим агенсима могла да допринесе већој кардиопротекцији и отклањању оштећења услед токсичних дејстава хомоцистеина.

5.3. *Ефекти сумповитих аминокиселина на биомаркере оксидационог стреса*

У другом делу студије пратили смо ефекте субхроничне примене DL-хомоцистеина на системски редокс статус пацова (пратили смо прооксидационе и антиоксидационе маркере у крвној плазми/еритроцитима пацова), као и ефекте акутне и директне администрације органских и неорганских сумповитих супстанци (L-Meth, L-Cys, NAC, NaHS) на прооксидационе параметре у коронарном перфузату изолованог срца пацова, у условима нормалних и повишених вредности укупног хомоцистеина у крви. Циљ нам је био уочити ране промене редокс равнотеже под утицајем хомоцистеина, а затим мерити како акутна примена тестираних супстанци утиче на те промене.

Када су у питању ефекти субхроничне примене DL-Нсу на системски редокс статус, наши резултати указују да је двонедељна примена DL-Нсу у дози од 0,45 $\mu\text{mol/g}$ телесне масе, два пута дневно у трајању од 14 дана, изазвала повећање вредности TBARS, O_2^- и H_2O_2 , и редуковала вредности NO_2^- у крвној плазми пацова (Графикони 121 и 122). Статистичка значајност се добила за вредности O_2^- ($p < 0,01$) и TBARS ($p < 0,05$), без статистичке значајности за H_2O_2 и NO_2^- ($p > 0,05$). Сличне резултате је објавио и *Kolling et al* (170). Они су показали да је хронична примена DL-хомоцистеина (два пута дневно, 0,3-0,6 $\mu\text{mol/g}$ телесне масе, 22 дана) значајно повећала вредности TBARS и смањила расположивост NO у срцима младих Вистар албино пацова. TBARS вредности су такође у сагласности са раније поменути резултатима *Timkova et al.* (154). Смањење вредности NO_2^- односно смањење биорасположивости NO указује на поремећену функцију ендотела. Редукција биорасположивог NO може да настане тројако: услед његове смањене синтезе, поремећаја активности биолошки активног NO, или његове повећане инактивације. Смањена производња овог вазодилатора током хиперхомоцистеиније је последица смањење активности конститутивних изоформи азот моноксид синтазе (eNOS и nNOS), уз повећану активност индуцибилне азот моноксид синтазе (iNOS) и "uncoupling" eNOS, што последично повећава продукцију O_2^- (171). Хомоцистеин, као и сви тиоли, лако подлеже просецима ауто-оксидације, чиме ствара дисулфиде (хомоцистин и хомоцистеин-тиолактон). Током оксидације сулфхидрилне групе настају реактивне кисеоничке врсте (ROS), првенствено O_2^- и H_2O_2 , који се и сматрају доминантним узрочницима ендотелне цитотоксичности током

H₂O₂. Поред директног оштећења ендотелних ћелија, створени O₂⁻ ступа у интеракцију са већ сниженим NO, што за последицу има стварање једног од најреактивнијих и најтоксичнијег представника реактивних азотних врста, пероксинитрита (ONOO⁻). Под утицајем ONOO⁻ се наставља оштећење ендотелних ћелија, и даље се смањује биорасположивост NO што ремети контролу васкуларног тонуса, односно физиолошку вазодилатацију. Сви наведени процеси заједно, механизмом позитивне повратне спреге, на крају доводе до настанка ендотелне дисфункције (172-182).

Chang et al. (183), су добили повећану продукцију ROS у васкуларним глатким мичићним ћелијама (VSMC) пацова, након инкубације VSMC са 0,5 и 1mmol/L хомоцистеина. У истој студији се добила редукована CAT активност у VSMC третираним хомоцистеином, што је у складу са нашим резултатима за овај антиоксидациони ензим.

Наши резултати антиоксидационог система заштите, са статистички значајном редукацијом CAT активности ($p < 0,05$), су такође веома слични резултатима већ поменуте студије *Kolling et al* (170). Смањење антиоксидационе активности може да представља још један механизам одговоран за оксидациони стрес индукован хомоцистеином.

Даље, испитивали смо акутне ефекте сумповитих једињења (L-Meth, L-Cys, NAC, NaHS), у дози 0,5mmol/L у трајању од 5 минута, на редокс статус у коронарном венском ефлуенту пацова третираних и нетретираних DL-Hcy.

У нашој студији под контролним условима, акутна администрација сумповитих аминокиселина (L-Meth, L-Cys, NAC) и неорганског NaHS није резултовала значајним ефектима на параметре оксидационог стреса у коронарном перфузату изолованог срца пацова (Табела 6). У групама пацова са повишеним вредностима хомоцистеина, директна примена L-Meth није изазвала значајне ефекте на прооксидационе параметаре у коронарном перфузату. Директна апликација L-Cys је изазвала статистички веома значајно повећање O₂⁻ у периоду ефекта, као и блаже повећање NO₂⁻. Такође, блажи пораст NO₂⁻ настао је и при директној примени NAC. Акутна примена NaHS код хомоцистеином третираних пацова је изазвала значајно повећање NO₂⁻ у периоду ефекта, значајно повећање O₂⁻ у периоду опоравка и благи пораст H₂O₂ при директној администрацији (Табела 7).

Резултати наше студије су показали да је у групама пацова са повишеним вредностима хомоцистеина (тј. двонедељни третман DL-Нсу), директна примена NAC довела до значајне промене H_2O_2 и TBARS у односу на групе које нису третиране DL-Нсу. У групама третираним DL-Нсу, утврђена је значајна разлика у концентрацији O_2^- у току примене L-Cys, NAC и NaHS, у односу на групе које нису биле на третману хомоцистеином. Најинтензивније промене у односу на третман DL-Нсу уочене су у вредностима нитрита (Табела 8).

Soares et al., су испитивали ефекте акутне администрације метионина (у дози од 0,4 g/kg, субкутана примена) на параметре оксидационог стреса у церебралном кортексу младих пацова. Резултати ове студије су указали на значајно повећање продукције ROS, чак 3 сата после администрације, и повећање активности SOD, док је активност CAT била значајно смањења након примене метионина (184).

In vivo студија спроведена од стране Costa et al., која се заснивала на акутној примени метионина, показала је да је метионин узроковао значајне промене липидне пероксидације као и вредности ROS, али и активности SOD и CAT у ткиву јетре (185).

Претходна студија спроведена од стране аутора Hogg et al., сматра да повишени нивои хомоцистеина изазивају оксидациони стрес који је строго зависан од прооксидационог потенцијала и превођења хомоцистеина у цистин и цистеин (186). Са друге стране, неки литературни подаци сугеришу заштитну улогу L-Cys, наглашавајући двоструку улогу тиолне групе, у смислу антиоксидационих или прооксидационих карактеристика. Из тог разлога јасно је да смер деловања сумпоровитих аминокиселина у погледу оксидационог стреса променљив и веома зависи од других чинилаца које треба испитати.

Shackebaei et al. су показали и доказали заштитне ефекте L-Cys у срцу, које је пре дуготрајне исхемије прекондиционирано L-Cys у концентрацији од 0,5mmol/L и тиме предложили неколико потенцијалних механизма (187). Међутим имајући у виду физиолошки концепт прекондиционарања, могуће је да благо повећање слободних радикала повећава и постисхемијско преживљавање ћелија и бржи опоравак у фази реперфузије, па из тог разлога не може се са сигурношћу тврдити да је L-Cys деловао протективно.

У нашој студији добијено повећање нитрита под утицајем директне примене NAC у групи пацова третираних DL-Нсу, указује на повећану продукцију азот монооксида, што може бити један од директних заштитних механизма NAC. Познато је да је NAC антиоксиданс, али тачан механизам деловања још увек није прецизно разјашњен. Делује као скавенџер слободних радикала и обнавља интарцелуларне нивое редукованог глутатиона . Поред тога, и други аутори су потврдили да NAC може повећати продукцију NO, узроковати вазодилатацију и тиме ублажити ендотелну дисфункцију насталу услед хиперхомоцистеинемije (188-195).

Zhang и сарадници су индуковали дисфункцију срца са једном дозом изопреналина и након тога испитивали ефекте NaHS на биомаркере оксидационог стреса (196). Дошли су до закључка да примена неорганског натријум хидроген сулфида може да ублажи изопреналином индуковане промене у миокарду које су посредоване слободним радикалима, тако што смањује њихову продукцију. Наиме, NaHS смањује активност NADPH оксидазе што доводи до смањења реактивних кисеоничних врста и нивоа оксидационог стреса (197-199). Дакле, резултати ових студија су у сагласности са антиоксидативним способностима NaHS. У нашој студији такав ефекат није остварен. Са друге стране, *Jiang et al.* су применом NaHS у дози од 1 mmol/L изазвали смањење потрошње кисеоника у кортикалним неуронима, примарним фибробластима и бубрежним ћелијама мајмуна и предложили два потенцијална механизма за пораст оксидационог стреса под таквим околностима. Први механизам се односи на директну реакцију сулфида из NaHS са кисеоником при чему се формирају ROS. Други механизам се односи на то да сулфид може послужити као супстрат за комплекс II митохондријалног транспортног ланца електрона(200). На основу ових резултата и резултата нашег истраживања, закључили смо да NaHS може имати заштитни или штетни ефекат у зависности од начина примене и примењене дозе.

Све разлике у литературним подацима везано за ефекте сумповитих аминокиселина проистичу од варијабилности експерименталних протокола који се примењују, дужине примене, дозе и начина примене, као и одабира самог експерименталног модела. Такође, важно је напоменути и да тренутак мерења биомаркера такође има важну улогу у правилном интрепретирању резултата обзиром да

су сумпоровите аминокиселине метаболички врло активне супстанце и зависне од многих ензимских система.

Осим тога, на основу добијених резултата, закључили смо да хомоцистеин изазива значајне промене у функцији кардиоваскуларног система и пре значајних повећања вредности хомоцистеина у плазми. Хомоцистеин утиче на редокс равнотежу, повећава производњу реактивних кисеоничких врста, смањује антиоксидациону одбрану и делује као укупни прооксидант. Пошто се ефекти испитиваних једињења која садрже сумпор значајно разликују у зависности од дејства хомоцистеина, нека од њих могу дати потпуно супротне ефекте у зависности од тога да ли делују у присуству хомоцистеина.

ЗАКЉУЧЦИ

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу претходно изнетих резултата ове студије, могу се извести следећи закључци:

- 1) Акутна администрација сумповитих аминокиселина (L-Meth, L-Cys, NAC) и неорганског NaHS резултује у контролним условима слабије израженим ефектима на кардиодинамске варијабле (у периоду ефекта и у периоду опоравка) и на параметре оксидационог стреса у коронарном перфузату изолованог срца пацова, док су побројани ефекти значајније изражени у условима повишених вредности хомоцистеина.
- 2) У одсуству повишених вредности хомоцистеина, а у зависности од врсте једињења, сумповита једињења утичу на промену контрактилне способности изолованог срца пацова уз неизмењени коронарни проток.
- 3) У присуству повишених вредности хомоцистеина, директна примена сумповитих аминокиселина (L-Meth и NAC) испољава благо протективно дејство и ублажава оштећења контрактилности услед кардионхибиторних ефеката хомоцистеина.
- 4) На побољшање коронарног протока израженији ефекат остварују NAC и неоргански NaHS, у односу на остале испитиване супстанце.
- 5) У контролним условима, акутна администрација сумповитих аминокиселина (L-Meth, L-Cys, NAC) и неорганског NaHS није резултовала значајним ефектима на параметре оксидационог стреса у коронарном перфузату изолованог срца пацова (у периоду ефекта и у периоду опоравка).
- 6) У групама са повишеним вредностима хомоцистеина (тј. третман DL-хомоцистеином), директна примена NAC је довела до значајне промене H_2O_2 и TBARS-а у коронарном перфузату, у односу на групе које нису третиране DL-хомоцистеином. У групама третираним DL-хомоцистеином, утврђена је значајна разлика у концентрацији O_2^- у току примене L-Cys, NAC и NaHS-а, у односу на групе које нису биле на третману хомоцистеином. Најинтензивније промене уочене су у вредностима нитрита.
- 7) Повишена вредност хомоцистеина је изазвала значајно повећање вредности TBARS, O_2^- и блаже повећање H_2O_2 , али и смањила вредности NO_2^- у крвној плазми, у односу на контролну групу пацова.

- 8) Пoвишeнa вpeднoст хoмoцистeинa нe утицaлa нa aктивнoсти aнти-oкcidaциoних eнзимa (рeдукoвани глутaтиoн и супeрoкcid дисмутазa), aли je рeгистрoвaнa смaњeнa aктивнoст кaтaлaзe у eритрoцитимa, у oднoсу нa кoнтрoлну грyпу пaцoвa.

ЛИТЕРАТУРА

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Lin S, Yang X, Jia S, Weeks AM, Hornsby M, Lee PS, Nichiporuk RV, Iavarone AT, Wells JA, Toste FD, Chang CJ. Redox-based reagents for chemoselective methionine bioconjugation. *Science*. 2017;355(6325):597-602.
2. Keylor MH, Park JE, Wallentin C, Stephenson CRJ. *Tetrahedron* 2014; 70: 4264–4269.
3. Tyson E, Ament MS, Yoon TP. *J. Org. Chem.* 2013;78:2046–2050.
4. Zhao G, Kaur S, Wang T. *Org. Lett.* 2017;19:3291–3294.
5. Tyson EL, Niemeyer ZL, Yoon TP. *J. Org. Chem.* 2014;79:1427–1436.
6. DeForest CA, Anseth KS, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012; 51:1816–1819.
7. Kim SW. *Amino Acids and Immune Function*. Vienna, Austria: Springer; 2003.
8. Grimble RF. The effects of sulfur amino acid intake on immune function in humans. *Journal of Nutrition*. 2006;136(6):1660S–1665.
9. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*. 2009;37(1):1–17.
10. Brosnan J. T., Brosnan M. E. The sulfur-containing amino acids: an overview. *Journal of Nutrition*. 2006;136(6):1636S–1640S.
11. Yin J, Ren W, Liu G, et al. Birth oxidative stress and the development of an antioxidant system in newborn piglets. *Free Radical Research*. 2013;47(12):1027–1035.
12. Stadtman E R., Van Remmen H, Richardson A, Wehr NB, Levine RL. Methionine oxidation and aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2005;1703(2):135–140.
13. Ruan H., Tang X. D., Chen M.-L., et al. High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(5):2748–2753.
14. Kim G., Weiss S. J., Levine R. L. Methionine oxidation and reduction in proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2014;1840(2):901–905.
15. Malmi M., Davey G., Tipton K. F., Meini A. Taurine, taurine analogues, and mitochondrial function and dysfunction. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2006;583:469–479.

16. Wen C., Jiang X. Y., Ding L. R., Wang T., Zhou Y. M. Effects of dietary methionine on growth performance, meat quality and oxidative status of breast muscle in fast- and slow-growing broilers. *Poultry Science*. 2017;96(6):1707–1714.
17. Atmaca G. Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids. *Yonsei Medical Journal*. 2004;45(5):776–788.
18. McBean G. J. The transsulfuration pathway: a source of cysteine for glutathione in astrocytes. *Amino Acids*. 2012;42(1):199–205.
19. Broderick JB, Duffus BR, Duschene KS, Shepard EM. Radical S-adenosylmethionine enzymes. *Chem Rev*. 2014;114:4229–4317.
20. Mehta AP, Abdelwahed SH, Mahanta N, Fedoseyenko D, Philmus B, Cooper LE, Liu Y, Jhulki I, Ealick SE, Begley TP. Radical S-adenosylmethionine (SAM) enzymes in cofactor biosynthesis: a treasure trove of complex organic radical rearrangement reactions. *J Biol Chem*. 2015;290:3980–3986.
21. Grell TAJ, Goldman PJ, Drennan CL. SPASM and twitch domains in S-adenosylmethionine (SAM) radical enzymes. *J Biol Chem*. 2015;290:3964–3971.
22. Struck AW, Thompson ML, Wong LS, Micklefield J. S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferases: highly versatile enzymes in biocatalysis, biosynthesis and other biotechnological applications. *ChemBioChem*. 2012;13:2642–2655.
23. Zhang Q, van der Donk WA, Liu W. Radical-mediated enzymatic methylation: A tale of two SAMs. *Acc Chem Res*. 2012;45:555–564.
24. Fujimori DG. Radical SAM-mediated methylation reactions. *Curr Opin Chem Biol*. 2013;17:597–604.
25. Bauerle MR, Schwalm EL, Booker SJ. Mechanistic diversity of radical S-adenosylmethionine (SAM)-dependent methylation. *J Biol Chem*. 2015;290:3995–4002
26. Konno M, Asai A, Kawamoto K, Nishida N, Satoh T, Doki Y, Mori M, Ishii H. The one-carbon metabolism pathway highlights therapeutic targets for gastrointestinal cancer (Review). *Int J Oncol*. 2017;50(4):1057-1063.
27. Jakubowski H. Homocysteine Editing, Thioester Chemistry, Coenzyme A, and the Origin of Coded Peptide Synthesis. *Life (Basel)*. 2017;7(1).
28. Jakubowski H., Goldman E. Editing of errors in selection of amino acids for protein synthesis. *Microbiol. Rev*. 1992;56:412–429.

29. Jakubowski H, Głowacki R. Chemical biology of homocysteine thiolactone and related metabolites. *Adv Clin Chem.* 2011;55:81-103.
30. Jakubowski H. Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. *J. Biol. Chem.* 1997;272:1935–1942.
31. Jakubowski H. Protein homocysteinylation: Possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *FASEB J.* 1999;13:2277–2283.
32. Jakubowski H. Homocysteine in Protein Structure/Function and Human Disease—Chemical Biology of Homocysteine-containing Proteins. Springer; Wien, Austria: 2013.
33. Jakubowski H. The determination of homocysteine-thiolactone in biological samples. *Anal. Biochem.* 2002;308:112–119.
34. Jakubowski H., Guranowski A. Metabolism of homocysteine-thiolactone in plants. *J. Biol. Chem.* 2003;278:6765–6770.
35. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am. J. Pathol.* 1969; 56:111–128.
36. McCully KS. Homocysteine thiolactone metabolism in malignant cells. *Cancer Res.* 1976;36:3198–3202.
37. McCully KS. Chemical pathology of homocysteine. II. Carcinogenesis and homocysteine thiolactone metabolism. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1992; 24:27–59.
38. McCully KS. Chemical pathology of homocysteine. III. Cellular function and aging. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1992; 24:134–152.
39. McCully KS. Hyperhomocysteinemia and arteriosclerosis: historical perspectives. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2005;43:980–986.
40. McCully KS. Chemical pathology of homocysteine. IV. Excitotoxicity, oxidative stress, endothelial dysfunction, and inflammation. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2009;43:301–314.
41. McCully KS. Chemical pathology of homocysteine. V. Thioretinamide, thioretinaco and cystathionine synthase function in degenerative diseases. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2011; 39:301–314.

42. McCully KS. The active site of oxidative phosphorylation and the origin of hyperhomocysteinemia in aging and dementia. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2015; 45:222–225.
43. McCully KS. Homocysteine metabolism, atherosclerosis and diseases of aging. *Compr. Physiol.* 2016; 6:471–505.
44. McCully KS. Homocysteine, infections, polyamines, oxidative metabolism, and the pathogenesis of dementia and atherosclerosis. *J. Alzheimers Dis.* 2016; 54:1283–1290.
45. McCully KS. Homocysteine, thioretinaco ozonide, oxidative phosphorylation, biosynthesis of phosphoadenosine phosphosulfate and the pathogenesis of atherosclerosis. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2016; 46: 701–704.
46. Hultberg B. Modulation of extracellular homocysteine concentration in human cell lines. *Clin Chim Acta.* 2003;330:151–159.
47. Sakamoto A, Nishimura Y, Ono H, Sakura N. Betaine and homocysteine concentrations in foods. *Pediatr Int.* 2002;44:409–413.
48. Nygård O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* 1997;337:230–237.
49. Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy. *J Lab Clin Med.* 1989;114:473–501.
50. Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, D'Agostino RB, Wilson PW, Belanger AJ, O'Leary DH, Wolf PA, Schaefer EJ, Rosenberg IH. Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *N Engl J Med.* 1995;332:286–291.
51. Streifler J, Rosenberg N, Chetrit A, Eskaraev R, Sela B, Dardik R, Zivelin A, Ravid B, Davidson J, Seligsohn U. Cerebrovascular events in patients with significant stenosis of the carotid artery are associated with hyperhomocysteinemia and platelet antigen-1 (Leu33Pro) polymorphism. *Stroke.* 2001;32:2753–2758.
52. Munshi MN, Stone A, Fink L, Fonseca V. Hyperhomocysteinemia following a methionine load in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and macrovascular disease. *Metabolism.* 1996;45:133–135.
53. Rothenbacher D, Fischer H, Hoffmeister A, Hoffmann M, März W, Bode G, Rosenthal J, Koenig W, Brenner H. Homocysteine and methylenetetrahydrofolate

- reductase genotype: association with risk of coronary heart disease and relation to inflammatory, hemostatic, and lipid parameters. *Atherosclerosis*. 2002;162:193–200.
54. Xiao Y, Zhang Y, Wang M, Li X, Xia M, Ling W. Dietary protein and plasma total homocysteine, cysteine concentrations in coronary angiographic subjects. *Nutr J*. 2013;12:144.
55. Chambers JC, Obeid OA, Kooner JS. Physiological increments in plasma homocysteine induce vascular endothelial dysfunction in normal human subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:2922–2927.
56. Case 19471 — Marked Cerebral Symptoms Following a Limp of Three Months' Duration. *N Engl J Med*. 209:1063-1066, November 23, 1933.
57. Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med*. 1991;324:1149–1155.
58. Keller R, Chrastina P, Pavlíková M, Gouveia S, Ribes A. Newborn screening for homocystinurias: Recent recommendations versus current practice. *J Inherit Metab Dis*. 2019; 42(1):128-139.
59. Jakubowski H. Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. *J Biol Chem*. 1997;272:1935–1942.
60. Undas A, Perła J, Łacinski M, Trzeciak W, Kaźmierski R, Jakubowski H. Autoantibodies against N-homocysteinylated proteins in humans implications for atherosclerosis. *Stroke*. 2004;35:1299–1304.
61. Harker LA, Slichter SJ, Scott CR, Ross R. Homocystinemia: vascular injury and arterial thrombosis. *N Engl J Med*. 1974;291:537–543.
62. Endo N, Nishiyama K, Otsuka A, Kanouchi H, Taga M, Oka T. Antioxidant activity of vitamin B 6 delays homocysteine-induced atherosclerosis in rats. *Br J Nutr*. 2006;95:1088–1093.
63. Kang S-S, Wong PW, Malinow MR. Hyperhomocyst (e) inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu Rev Nutr*. 1992;12:279–298.
64. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem*. 1993;39:1764–1779.

65. McIlroy SP, Dynan KB, Lawson JT, Patterson CC, Passmore AP. Moderately elevated plasma homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase genotype, and risk for stroke, vascular dementia, and Alzheimer disease in Northern Ireland. *Stroke*. 2002;33:2351–2356
66. Hiraoka M, Kagawa Y. Genetic polymorphisms and folate status. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2017;57(5):142-149.
67. Kluijtmans LA, Young IS, Boreham CA et al. 2003. Genetic and nutritional factors contributing to hyperhomocysteinemia in young adults. *Blood* 101:2483–2488.
68. Anderson CA, Beresford SA, McLerran D et al. Response of serum and red blood cell folate concentrations to folic acid supplementation depends on methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype: results from a crossover trial. *Mol Nutr Food Res* 2013; 57:637–644.
69. Bottiglieri T. Homocysteine and folate metabolism in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005; 29:1103–1112.
70. Gaughan DJ, Kluijtmans LA, Barbaux S. The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. *Atherosclerosis* 2001; 157:451–456.
71. Bauer AK. Hypercoagulable states. In: Hoffman R, Benz JE Jr, Shattil JS, Furie B, Silberstein EL, McGlave P, Heslop H, editors. *Hematology: Basic Principles and Practice*, 5 th ed. Philadelphia:Churchill Livingstone Elsevier; 2009. p.2033.
72. Hiraoka M. Folate intake, serum folate, serum total homocysteine levels and methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in young Japanese women. *J Nutr Sci Vitaminol* 2004; 50:238–245.
73. Hiraoka M, Kato K, Saito Y, Yasuda K, Kagawa Y. Gene nutrient and gene interactions of controlled folate intake by Japanese women. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316:1210–1216.
74. McIlroy SP, Dynan KB, Lawson JT, Patterson CC, Passmore AP. Moderately elevated plasma homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase genotype, and risk for stroke, vascular dementia, and Alzheimer disease in Northern Ireland. *Stroke*. 2002;33:2351–2356.
75. Rueda-Clausen C, Córdoba-Porras A, Bedoya G, Silva F, Zarruk J, López-Jaramillo P, Villa L. Increased plasma levels of total homocysteine but not asymmetric

- dimethylarginine in Hispanic subjects with ischemic stroke FREC-VI sub-study. *Eur J Neurol.* 2012;19:417–425.
76. Herrmann M, Widmann T, Herrmann W. Homocysteine—a newly recognised risk factor for osteoporosis. *Clinical Chemical Laboratory Medicine.* 2005;43:1111–1117.
77. Perna AF, Sepe I, Lanza D, Pollastro RM, De Santo NG, Ingrosso D. Hyperhomocysteinemia in chronic renal failure: alternative therapeutic strategies. *J Ren Nutr.* 2012;22:191–194.
78. Golbahar J, Aminzadeh MA, Kassab SE, Omrani GR. Hyperhomocysteinemia induces insulin resistance in male Sprague–Dawley rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;76:1–5.
79. Qi X, Zhang B, Zhao Y, Li R, Chang H-M, Pang Y, Qiao J. Hyperhomocysteinemia promotes insulin resistance and adipose tissue inflammation in PCOS mice through modulating M2 macrophage polarization via estrogen suppression. *Endocrinology.* 2017;158:1181–1193.
80. Liu J, Zuo SW, Li Y, Jia X, Jia SH, Zhang T, Song YX, Wei YQ, Xiong J, Hu YH. Hyperhomocysteinemia is an independent risk factor of abdominal aortic aneurysm in a Chinese Han population. *Sci Rep.* 2016;6:17966(1-9).
81. Warsi A, Davies B, Morris-Stiff G, Hullin D, Lewis M. Abdominal aortic aneurysm and its correlation to plasma homocysteine, and vitamins. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2004;27:75–79.
82. Brunelli T, Prisco D, Fedi S, Rogolino A, Farsi A, Marcucci R, Giusti B, Pratesi C, Pulli R, Gensini GF. High prevalence of mild hyperhomocysteinemia in patients with abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg.* 2000;32:531–536.
83. Yang N, Yao Z, Miao L, Liu J, Gao X, Fan H, Hu Y, Zhang H, Xu Y, Qu A. Novel clinical evidence of an association between homocysteine and insulin resistance in patients with hypothyroidism or subclinical hypothyroidism. *PLoS One.* 2015;10:e0125922.
84. Sun C-F, Haven TR, T-L W, Tsao K-C, JT W. Serum total homocysteine increases with the rapid proliferation rate of tumor cells and decline upon cell death: a potential new tumor marker. *Clin Chim Acta.* 2002;321:55–62.
85. Zhang D, Lou J, Zhang X, Zhang L, Wang F, Xu D, Niu N, Wang Y, Wu Y, Cui W. Hyperhomocysteinemia results from and promotes hepatocellular carcinoma via CYP450 metabolism by CYP2J2 DNA methylation. *Oncotarget.* 2017;8:15377.

86. Givvimani S, Munjal C, Narayanan N, Aqil F, Tyagi G, Metreveli N, Tyagi SC. Hyperhomocysteinemia decreases intestinal motility leading to constipation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2012;303:G281–G290.
87. Desouza C, Keebler M, McNamara DB, Fonseca V. Drugs affecting homocysteine metabolism. *Drugs*. 2002;62:605–616.
88. Genoud V, Lauricella AM, Kordich LC, Quintana I. Impact of homocysteine-thiolactone on plasma fibrin networks. *J Thromb Thrombolysis*. 2014;38(4):540-5.
89. Lentz SR, Rodionov RN, Dayal S. Hyperhomocysteinemia, endothelial dysfunction, and cardiovascular risk: the potential role of ADMA. *Atheroscler Suppl*. 2003;4:61–65.
90. C-C W, Zheng C-M, Lin Y-F, Lo L, Liao M-T, K-C L. Role of homocysteine in end-stage renal disease. *Clin Biochem*. 2012;45:1286–1294.
91. Yajnik C, Deshpande S, Jackson A, Refsum H, Rao S, Fisher D, Bhat D, Naik S, Coyaji K, Joglekar C. Vitamin B12 and folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in the offspring: the Pune maternal nutrition study. *Diabetologia*. 2008;51:29–38.
92. Li Y, Jiang C, Xu G, Wang N, Zhu Y, Tang C, Wang X. Homocysteine upregulates resistin production from adipocytes in vivo and in vitro. *Diabetes*. 2008;57:817–827.
93. Li Y, Zhang H, Jiang C, Xu M, Pang Y, Feng J, Xiang X, Kong W, Xu G, Li Y. Hyperhomocysteinemia promotes insulin resistance by inducing endoplasmic reticulum stress in adipose tissue. *J Biol Chem*. 2013;288:9583–9592.
94. Investigators HOPE Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med*. 2006;2006:1567–1577.
95. Bønaa KH, Njølstad I, Ueland PM, Schirmer H, Tverdal A, Steigen T, Wang H, Nordrehaug JE, Arnesen E, Rasmussen K. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006;354:1578–1588
96. Toole JF, Malinow MR, Chambless LE, Spence JD, Pettigrew LC, Howard VJ, Sides EG, Wang C-H, Stampfer M. Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the vitamin intervention for stroke prevention (VISP) randomized controlled trial. *JAMA*. 2004;291:565–575.

97. Group VTS B vitamins in patients with recent transient ischaemic attack or stroke in the VITamins TO prevent stroke (VITATOPS) trial: a randomised, double-blind, parallel, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology*. 2010;9:855–865.
98. Jernerén F, Elshorbagy AK, Oulhaj A, Smith SM, Refsum H, Smith AD. Brain atrophy in cognitively impaired elderly: the importance of long-chain ω -3 fatty acids and B vitamin status in a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2015;102:215–221.
99. Azad M. A. K., Huang P., Liu G., et al. Hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease in animal model. *Amino Acids*. 2017 doi: 10.1007/s00726-017-2503-5.
100. Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA*. 2002;288(16):2015-22.
101. Wang WW, Wang XS, Zhang ZR, He JC, Xie CL. A Meta-Analysis of Folic Acid in Combination with Anti-Hypertension Drugs in Patients with Hypertension and Hyperhomocysteinemia. *Front Pharmacol*. 2017;8:585.
102. Higgins JP, Altman DG, Gøtzsche PC, Jüni P, Moher D, Oxman AD. The Cochrane Collaboration's tool for assessing risk of bias in randomised trials. *BMJ* 2011; 343:d5928.
103. Huo Y, Li J, Qin X, Huang Y, Wang X, Gottesman RF. Efficacy of folic acid therapy in primary prevention of stroke among adults with hypertension in China: the CSPPT randomized clinical trial. *JAMA* 2005; 313, 1325–1335.
104. Golbahar J, Mostafavi E. Association between low red blood cell 5-methyltetrahydrofolate and hyperhomocysteinaemia with hypertension: a cross-sectional study. *High Blood Press Cardiovasc. Prev*. 2002;19:229–235.
105. Hu D, Xu X. Prevention of stroke relies on valid control H-type hypertension. *Chin. J. Intern. Med*. 2008; 47:976–977.
106. Ganguly P, Alam SF. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutr. J*. 2005;14:6.
107. Huo Y, Qin X, Wang J, Sun N, Zeng Q, Xu X. Efficacy of folic acid supplementation in stroke prevention: new insight from a meta-analysis. *Int. J. Clin. Pract*. 2012; 66, 544–551.
108. Wang X, Qin X, Demirtas H, Li J, Mao G, Huo Y. Efficacy of folic acid supplementation in stroke prevention: a meta-analysis. *Lancet* 2007; 369: 1876–1882.

109. Mangoni AA, Sherwood RA, Swift CG, Jackson SH. Folic acid enhances endothelial function and reduces blood pressure in smokers: a randomized controlled trial. *J. Int. Med.* 2002; 252, 497–503.
110. Lai WK, Kan MY. Homocysteine-Induced Endothelial Dysfunction. *Ann Nutri Metab.* 2015;67(1):1-12.
111. Czerska M, Mikołajewska K, Zieliński M, Gromadzińska J, Wąsowicz W. Today's oxidative stress markers. *Med Pr.* 2015;66(3):393-405.
112. Cheng Z, Yang X, Wang H: Hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction. *Curr Hypertens Rev* 2009;5:158-165.
113. Den Heijer M, Rosendaal FR, Blom HJ, Gerrits WB, Bos GM: Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis. *Thromb Haemost* 1998;80:874-877.
114. Bellamy MF, McDowell IF, Ramsey MW, Brownlee M, Newcombe RG, Lewis MJ: Oral folate enhances endothelial function in hyperhomocysteinaemic subjects. *Eur J Clin Invest* 1999;29:659-662.
115. Towfighi A, Arshi B, Markovic D, Ovbiagele B: Homocysteine-lowering therapy and risk of recurrent stroke, myocardial infarction and death: the impact of age in the VISP trial. *Cerebrovasc Dis* 2014;37:263-267.
116. Stankevicius E, Kevelaitis E, Vainorius E, Simonsen U: [Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors]. *Medicina (Kaunas)* 2003;39:333-341.
117. Jacobsen DW: Hyperhomocysteinemia and oxidative stress: time for a reality check? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1182-1184.
118. Endemann DH, Schiffrin EL: Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1983-1992.
119. Hayden MR, Tyagi SC: Homocysteine and reactive oxygen species in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atheroscleropathy: the pleiotropic effects of folate supplementation. *Nutr J* 2004;3:4.
120. Tyagi N, Sedoris KC, Steed M, Ovechkin AV, Moshal KS, Tyagi SC: Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H2649-H2656.
121. Taniyama Y, Griendling KK: Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 2003;42:1075-1081.

122. Leiper JM, Vallance P: The synthesis and metabolism of asymmetric dimethylarginine (ADMA). *Eur J Clin Pharmacol* 2006;62:33-38.
123. Sharifpanah F, Sauer H. Reactive oxygen species, oxidative stress, and cardiovascular diseases. In: Donald Armstrong and Robert D. Stratton, editors. *Oxidative stress and antioxidant protection*. New Jersey: Wiley Blackwell; 2016. Chapter 17.
124. Forstermann U, Munzel T: Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 2006;113:1708-1714.
125. Austin RC, Lentz SR, Werstuck GH. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. *Cell Death Differ.* 2004;11 Suppl 1:S56-64.
126. Lentz SR. Homocysteine and cardiovascular physiology In *Homocysteine in Health and Disease* Carmel R, Jacobsen DW (eds). Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2001.
127. Qin X, Huo Y, Xie D, Hou F, Xu X, Wang X. Homocysteine-lowering therapy with folic acid is effective in cardiovascular disease prevention in patients with kidney disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Nutr.* 2013; 32, 722–727.
128. Cai H and Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 2000; 87: 840–844
129. Kanani PM, Sinkey CA, Browning RL, Allaman M, Knapp HR and Haynes WG. Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans. *Circulation* 1999; 100: 1161–1168.
130. Drugs and Lactation Database (LactMed). Sulfur. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2006-. Доступно на:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500941/>
131. Colovic MB, Vasic VM, Djuric DM, Krstic DZ. Sulphur-containing Amino Acids: Protective Role Against Free Radicals and Heavy Metals. *Curr Med Chem.* 2018;25(3):324-335.
132. Tappia PS, Adameova A, Dhalla NS. Attenuation of Diabetes-induced Cardiac and Subcellular Defects by Sulphur-containing Amino Acids. *Curr Med Chem.* 2018;25(3):336-345.

133. Hrnčić D, Rasić-Marković A, Macut D, Mladenović D, Susić V, Đurić D, Stanojlović O. Sulfur - Containing Amino Acids in Seizures: Current State of the Art. *Curr Med Chem*. 2018; 25(3):378-390.
134. Kruger WD, Gupta S. The effect of dietary modulation of sulfur amino acids on cystathionine β synthase-deficient mice. *Ann N Y Acad Sci*. 2016;1363:80-90.
135. Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, et al. N-Acetylcysteine--a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Current opinion in pharmacology*. 2007;7:355–359.
136. Manna P, Das J, Sil PC. Role of sulfur containing amino acids as an adjuvant therapy in the prevention of diabetes and its associated complications. *Curr Diabetes Rev*. 2013;9(3):237-48.
137. Dauletbaev N, Fischer P, Aulbach B, et al. A phase II study on safety and efficacy of high-dose N-acetylcysteine in patients with cystic fibrosis. *Eur J Med Res*. 2009;14:352–358.
138. De Rosa SC, Zaretsky MD, Dubs JG, et al. N-acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection. *Eur J Clin Invest*. 2000;30:915–929.
139. Souza GA, Ebaid GX, Seiva FR, et al. N-Acetylcysteine an Allium plant compound improves high-sucrose diet-induced obesity and related effects. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2008;2011:643269.
140. Kim JR, Ryu HH, Chung HJ, et al. Association of anti-obesity activity of N-acetylcysteine with metallothionein-II down-regulation. *Exp Mol Med*. 2006;38:162–172.
141. Joseph J, Joseph L, Devi S, Kennedy RH Effect of anti-oxidant treatment on hyperhomocysteinemia induced myocardial fibrosis and diastolic dysfunction. *J Heart Lung Transplant* 2008; 27:1237–1241.
142. Zang B, Mustafa A, Gupta S, et al. Methionine-deficient diet induces post-transcriptional downregulation of cystathionine beta-synthase. *Nutrition*. 2010;26:1170–1175.
143. Atmaca G. Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids. *Yonsei Med J*. 2004 oct 31;45(5):776-88.

144. Tappia PS, Xu YJ, Rodriguez-Leyva D, Aroutiounova N, Dhalla NS. Cardioprotective effects of cysteine alone or in combination with taurine in diabetes. *Physiol Res.* 2013; 62(2):171-8.
145. Tang LD, Sun JZ, Wu K, Sun CP, Tang ZM. Beneficial effects of N-acetylcysteine and cysteine in stunned myocardium in perfused rat heart. *Br J Pharmacol.* 1991;102(3):601-6.
146. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2008;22:659–661.
147. Sakamoto A, Sakura N. Limited effectiveness of betaine therapy for cystathionine beta synthase deficiency. *Pediatr Int.* 2003;45:333–338.
148. Gomez J, Sanchez-Roman I, Gomez A, Sanchez C, Suarez H, Lopez-Torres M, Barja G. Methionine and homocysteine modulate the rate of ROS generation of isolated mitochondria in vitro. *J Bioenerg Biomembr* 2011; 43:377–386.
149. Kerksick C, Willoughby D. The antioxidant role of glutathione and N-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *J Int Soc Sports Nutr* 2005; 2: 38–44.
150. Vacek TP, Rehman S, Neamtu D, Yu S, Givimani S, Tyagi SC. Matrix metalloproteinases in atherosclerosis: role of nitric oxide, hydrogen sulfide, homocysteine, and polymorphisms. *Vasc Health Risk Manag.* 2015 ;11:173-83.
151. Yang G, Li H, Tang G, et al. Increased neointimal formation in cystathionine gamma-lyase deficient mice: role of hydrogen sulfide in $\alpha 5\beta 11$ -integrin and matrix metalloproteinase-2 expression in smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52(3):677–688.
152. Bełtowski J, Jamroz-Wiśniewska A. Hydrogen sulfide and endothelium-dependent vasorelaxation. *Molecules.* 2014;19(12):21183-99.
153. Hussain A, Maddock H, Al-Rajaibi H, Carson RJ. Effects of hydrogen sulphide on the isolated perfused rat heart. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2011 May;11(2):236-44.
154. Timkova V, Tatarkova Z, Lehotsky J, Racay P, Dobrota D, Kaplan P. Effects of mild hyperhomocysteinemia on electron transport chain complexes, oxidative stress, and protein expression in rat cardiac mitochondria. *Mol Cell Biochem.* 2016 Jan;411(1-2):261-70.

155. Wendel A. Measurement of in vivo lipid peroxidation and toxicological significance. *Free Radic Biol Med.* 1987;3(5):355-8.
156. Auclair C, Voisin E. in: *Handbook of Methods for oxygen radical research*, Greenvald R.A. Ed., CRC Press Une, Boca Raton 1985; p.123.
157. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA, eds. *Handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton, CRC Press. 1985; 123-132.
158. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95:351-358.
159. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15 N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982; 126:131-138.
160. Beutler E, Duron O, Kelly BM (1963) Improved method for the determination of blood. Glutathione. *J Lab Clin Med.* 61:882–888.
161. Beutler E. Superoxide dismutase. In: Beutler E, eds. *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*. Philadelphia, Grune & Stratton:PA. 1984; 83-85.
162. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology.* 1984; 105:121-126.
163. Bokhari SW, Bokhari ZW, Zell JA, et al. Plasma homocysteine levels and the left ventricular systolic function in coronary artery disease patients. *Coron Artery Dis*, May 2005; 16(3): pp 153-161.
164. Sundström J, Sullivan L, Selhub J, et al. Relations of plasma homocysteine to left ventricular structure and function: the Framingham Heart Study *Eur Heart J*, 2004; 25 (6): 523-530.
165. Jeremic J, Nikolic Turnic T, Zivkovic V, Jeremic N, Milosavljevic I, Srejovic I, Obrenovic R, Jancic S, Rakocevic M, Matic S, Djuric D, Jakovljevic V. Vitamin B complex mitigates cardiac dysfunction in high-methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2018;45(7):683-693.
166. Zivkovic V, Jakovljevic V, Pechanova O, Srejovic I, Joksimovic J, Selakovic D, Barudzic N, Djuric DM. Effects of DL-homocysteine thiolactone on cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers in the isolated rat heart: the role of different gasotransmitters. *Biomed Res Int.* 2013;2013:318471.

167. Kostić S, Mićović Ž, Andrejević L, Cvetković S, Stamenković A, Stanković S, Obrenović R, Labudović-Borović M, Hrnčić D, Jakovljević V, Djurić D. The effects of L-cysteine and N-acetyl-L-cysteine on homocysteine metabolism and haemostatic markers, and on cardiac and aortic histology in subchronically methionine-treated Wistar male rats. *Mol Cell Biochem.* 2018; doi: 10.1007/s11010-018-3391-z.
168. Milovanovic P, Hrcic D, Radotic K, Stankovic M, Mutavdzic D, Djonic D, Rasic-Markovic A, Djuric D, Stanojlovic O, Djuric M. Moderate hyperhomocysteinemia induced by short-term dietary methionine overload alters bone microarchitecture and collagen features during growth. *Life Sci.* 2017;191:9-16.
169. Djuric D, Jakovljevic V, Zivkovic V, Srejovic I. Homocysteine and homocysteine-related compounds: an overview of the roles in the pathology of the cardiovascular and nervous systems. *Can J Physiol Pharmacol.* 2018;96(10):991-1003.
170. Kolling J, Scherer EB, da Cunha AA, da Cunha MJ, Wyse AT. Homocysteine induces oxidative-nitrative stress in heart of rats: prevention by folic acid. *Cardiovasc Toxicol.* 2010;11(1):67-73.
171. Pushpacumar S, Kundu S, Sen U. Endothelial dysfunction: The link between homocysteine and hydrogen sulfide. *Curr Med Chem.* 2014 ; 21(32): 3662–3672.
172. Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H., editor. *Oxidative Stress.* Academic Press; London: 1985. pp. 1–8.
173. Sies H (Ed.), *Oxidative Stress,* Academic Press, London, 1985, pp. 1–507.
174. Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition.* 1986;25(12):1058–1071. (in German) Sies H. Biochemie des oxidativen Stress. *Angewandte Chemie.* 1986;98(12):1061–1075.
175. Sen CK, Sies H, Baeuerle PA (Eds.), *Antioxidant and Redox Regulation of Genes,* Academic Press, London, 2000, pp. 1–562.
176. Gitler C, Danon A(Eds.), *Cellular Implications of Redox Signaling,* Imperial College Press, London, 2003, pp. 1–427.
177. Herrmann JM, Dick TP. Redox biology on the rise. *Biological Chemistry.* 2012;393(9):999–1004.
178. Sies H, Jones D. Oxidative stress. In: Fink G., editor. 2nd ed. Vol. 3. Elsevier; Amsterdam: 2007. pp. 45–48.

179. Mujumdar VS, Aru GM, Tyagi SC. Induction of oxidative stress by homocysteine impairs endothelial function. *J Cell Biochem.* 2001;82:491–500.
180. Ramakrishnan S, Sulochana KN, Lakshmi S, Selvi R, Angayarkanni N. Biochemistry of homocysteine in health and diseases. *Indian J Biochem Biophys.* 2006;43:275–283
181. Cahill M, Karabatzaki M, Meleady R, et al. Raised plasma homocysteine as a risk factor for retinal vascular occlusive disease. *Br J Ophthalmol.* 2000;84:154–157.
182. Brown BA, Marx JL, Ward TP, et al. Homocysteine: a risk factor for retinal venous occlusive disease. *Ophthalmology.* 2002;109:287–290.
183. Chang L, Xu J, Zhao J, Pang Y, Tang C, et al. Taurine antagonized oxidative stress injury induced by homocysteine in rat vascular smooth muscle cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2004;25(3):341-46.
184. Soares MSP, Viau CM, Saffi J, Costa MZ, da Silva TM, Oliveira PS, Azambuja JH, Barschak AG, Braganhol E, S Wyse AT, Spanevello RM, Stefanello FM. Acute administration of methionine and/or methionine sulfoxide impairs redox status and induces apoptosis in rat cerebral cortex. *Metab Brain Dis.* 2017;32(5):1693-1703.
185. Costa MZ, da Silva TM, Flores NP, Schmitz F, da Silva Scherer EB, Viau CM, Saffi J, Barschak AG, de Souza Wyse AT, Spanevello RM, Stefanello FM. Methionine and methionine sulfoxide alter parameters of oxidative stress in the liver of young rats: in vitro and in vivo studies. *Mol Cell Biochem.* 2013;384(1-2):21-8.
186. Hogg N, Broniowska KA, Novalija J, Kettenhofen NJ, Novalija E. Role of S-nitrosothiol transport in the cardioprotective effects of S-nitrosocysteine in rat hearts. *Free Radic Biol Med.* 2007;43(7):1086-94.
187. Shackebaei D, King N, Shukla B, Suleiman MS. Mechanisms underlying the cardioprotective effect of L-cysteine. *Mol Cell Biochem.* 2005;277(1-2):27-31.
188. Groitl B, Jakob U. Thiol-based redox switches. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2014;1844(8):1335–1343.
189. D'Autréaux B., Toledano M.B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2007;8(10):813–824.
190. Zheng M., Aslund F., Storz G. *Science.* 1998;279(5357):1718–1721.
191. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry.* 1993;215(2):213–219.

192. Lushchak V.I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*. 2014;224C:164–175.
193. Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*. 1936;138(3479):32.
194. Selye H. Stress and disease. *Science*. 1955;122(3171):625–631.
195. Levonen A.-L., Hill B.G., Kansanen E., Zhang J., Darley-USmar V.M. Redox regulation of antioxidants, autophagy, and the response to stress: implications for electrophile therapeutics. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014;71:196–207
196. Zhang Z, Jin S, Teng X, Duan X, Chen Y, Wu Y. Hydrogen sulfide attenuates cardiac injury in takotsubo cardiomyopathy by alleviating oxidative stress. *Nitric Oxide*. 2017;67:10-25.
197. Jato H, Shibata H, Shimizu T, Shibata S, Toriumi H, Ebine T. Differential cellular localization of antioxidant enzymes in the trigeminal ganglion. *Neuroscience*. 2013;248:345–358.
198. Navarro-Yepes J, Zavala-Flores L, Anandhan A, Wang F, Skotak M, Chandra N. Antioxidant gene therapy against neuronal cell death. *Pharmacology & Therapeutics*. 2014;142:206–230.
199. Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T, Palaniswami R, Gnanadhas EN, Lakshminarasiah U. Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta*. 2014;436:332–347.
200. Jiang J, Chan A, Ali S, Saha A, Haushalter K, Parker J et al. Hydrogen-sulfide mechanisms of Toxicity and Development of an antidote. *Sci. Rep*. 2016;6:20831.

БИОГРАФИЈА

Тања Шобот је рођена 24.04.1978. године у Бања Луци, Босна и Херцеговина.

Медицински факултет Универзитета у Бања Луци завршила је 2009. године, са просечном оценом 8,27 и стекла звање доктора медицине.

У 2019. години је уписала 3. годину докторских академских студија на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу – смер Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином.

2011. године изабрана је за сарадника у настави на Катедри за физиологију на Медицинском факултету Универзитета у Бања Луци, а 2012. године изабрана је за асистента.

Члан је Коморе доктора Републике Српске и Друштва доктора Републике Српске.

БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Sobot T**, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic J, Nikolic Turnic T, Ponorac N, Petkovic A, Jakovljevic V, Djuric D. The effects of sulfur-containing compounds on redox status in homocysteine-treated rats. *Acta Poloniae Pharmaceutica ñ Drug Research* 2019;76(1):147-57.
2. Bradic J, Zivkovic V, Srejovic I, Jakovljevic V, Petkovic A, Turnic TN, Jeremic J, Jeremic N, Mitrovic S, **Sobot T**, Ponorac N, Ravic M, Tomovic M. Protective Effects of Galium verum L. Extract against Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury in Spontaneously Hypertensive Rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:4235405.
3. **Šobot T**, Matavulj A, Jakovljević V, Nikolić T, Živković V, Jeremić N, Đurić D. The effects of L-arginine and L-name on coronary flow and oxidative stress in isolated rat heart. *Ser J Exp Clin Res.* 2015;16(4):297-304.

ПРИЛОГ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број – РБ:

Идентификациони број – ИБР:

Тип документације – ТД: Монографска публикација

Тип записа – ТЗ: Текстуални штампани материјал

Врста рада – ВР: Докторска дисертација

Аутор – АУ: Тања Шобот

Ментор/коментор – МН: проф. др Драган Ђурић

Наслов рада – НР: Утицај субхроничног оптерећења хомоцистеином на коронарну хемодинамику и оксидациони стрес код пацова: ефекти сумповоритих аминокиселина (метионина, N-ацетилцистеина и цистеина) и неорганског Na-хидрогенсулфида

Језик публикације – ЈП: српски/ћирилица

Језик извода – ЈИ: српски/енглески

Земља публикавања – ЗП: Република Србија

Уже географско подручје – УГП: Централна Србија

Година – ГО: 2019. година

Издавач – ИЗ: Ауторски репринт

Место и адреса – МС: 34 000 Крагујевац, Светозара Марковића 69, Република Србија

Физичи опис рада – ФО: 170 страна, 3 слике, 8 табела, 125 графикана

Научна област – УДК: Медицина

Научна дисциплина – ДИ: Физиологија

Предметна одредница/кључне речи – ПО: хомоцистеин, коронарна хемодинамика, оксидациони стрес, сумповорите аминокиселине, пацов

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

Важна напомена – ВН:

Извод – ИД:

Увод: Све је већа истраживачка заинтересованост за деловање сумпоровитих једињења на кардиоваскуларни систем, под физиолошким и патолошким условима.

Циљ: Циљ ове експерименталне студије био је испитивање ефеката акутне примене сумпоровитих аминокиселина (L-метионина, L-цистеина, N-ацетилцистеина) и неорганског Na-хидрогенсулфида на кардиодинамске параметре, коронарни проток и редокс равнотежу код пацова са нормалним и повишеним вредностима хомоцистеина у крви.

Материјал и методе: Истраживање је обухватило 80 *Wistar albino* пацова које смо поделили у две групе: контролна група (двонедељни третман са 0,9 % NaCl) и експериментална група (субхронична примена DL-хомоцистеина, у дози од 0,45 $\mu\text{mol/g}$ телесне масе, два пута дневно, субкутано, у трајању од 14 дана). Након двонедељног третмана, пацови су жртвовани при чему су прикупљени узорци крви за анализу концентрација укупног хомоцистеина и биомаркера системског оксидационог стреса. Извршена је процедура изоловања срца пацова, у циљу успостављања ретроградне перфузије кроз срце методом по Лангендорфу и спровођења акутног третмана сумпоровитим аминокиселинама (L-Meth, L-Cys, NAC) и неорганским Na-хидрогенсулфидом (NaHS). Сумпоровите супстанце су примењене у истој дози од 0.5 mmol/L , у трајању од 5 минута. У левој комори су континуирано праћени параметри функције леве коморе: dp/dt_{max} , dp/dt_{min} , SLVP, DLVP и HR. Коронарни проток (CF) се одређивао флоуметријски. У узорцима крвне плазме и узорцима коронарног перфузата, спектрофотометријским методама, одређивани су биомаркери оксидационог стреса: индекс липидне пероксидације (TBARS), азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-), супероксид анјон радикал (O_2^-) и водоник пероксид (H_2O_2). У хемолизату еритроцита су мерени параметри антиоксидационог система заштите: каталаза (CAT), супероксид дисмутаза (SOD) и редуковани глутатион (GSH).

Резултати: Резултати истраживања су приказани кроз 6 табела и 125 графикона. Концентрације укупног хомоцистеина су биле значајно повишене у експерименталној у односу на контролну групу пацова, и као такве изазивају знатне промене у функцији кардиоваскуларног система. Такође, акутни ефекти примењених сумпоровитих супстанци су показали значајне разлике у односу на третман DL- хомоцистеином, на основу чега закључујемо да сумпоровите супстанце испољавају различито дејство на кардиоваскуларни систем у зависности од присуства хомоцистеина.

Закључци: Анализом резултата овог истраживања закључује се да ефекти сумпоровитих аминокиселина (L-Meth, L-Cys, NAC) и неорганског NaHS имају значајну улогу у патофизиологији кардиоваскуларног система при чему им је главна карактеристика дозно-зависан ефекат на функцију кардиоваскуларног система што је и основна карактеристика једињења која у свом саставу имају сумпор.

Кључне речи: хомоцистеин, коронарна хемодинамика, оксидациони стрес, сумпоровите аминокиселине, пацов

Датум прихватања теме од стране ННВ – ДП: 26.04.2016.

Датум одбране – ДО:

Чланови комисије – КО:

1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Физиологија, председник;
2. **Проф. др Владимир Живковић**, ванредни професор Факултета физичке културе и спорта Универзитета у Нишу, ужа научна област Физиологија, члан;
3. **Проф. др Ненад Понорац**, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци, ужа научна област Физиологија, члан

KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

Accession number – ANO:

Identification number – INO:

Documentation type – DT: Monographic publication

Type of record – TR: Textual printed material

Contents code – CC: Ph. D. Thesis

Author – AU: Tanja Šobot

Menthor/co-mentor – MN: Full professor Dragan Djurić, M.D. Ph.D.

Title – TI: The influence of subchronic homocysteine load on coronary haemodynamics and oxidative stress in rats: effects of sulfuric amino acids (methionine, N-acetylcysteine and cysteine) and inorganic Na-hydrogen sulphide

Language of text – LT: Serbian / Cyrillic

Language of abstract: Serbian / English

Country of publication – CP: Republic of Serbia

Locality of publication – LP: Central Serbia

Publication year – PY: 2019

Publisher – PU: Author reprint

Publication place – PP: 34 000 Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Republic of Serbia

Physical description – PD: 170 pages, 3 pictures, 8 tables, 125 charts

Scientific field – SF: Medicine

Scientific discipline – SD: Physiology

Subject/key words – SKW: homocysteine, coronary haemodynamics, oxidative stress, sulfur amino acids, rat

UDC:

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

Note – N:

Abstract – AB:

Introduction: There is growing interest in the activity of sulfur-containing compounds on cardiovascular system in physiological and pathological conditions.

Aim: Aim of this study was to assess possible differences in the effects of various sulfur-containing compounds on cardiodynamic parameters, coronary flow and redox balance of cardiovascular system, in its physiological state and in the early onset of hyperhomocysteinemia.

Material and methods: This study divided Wistar albino rats into two groups: saline treated (control group) and DL-homocysteine-treated (experimental group). Rats from experimental group were subjected to subchronic subcutaneous administration of DL-homocysteine at dose of 0.45 $\mu\text{mol/g}$ body weight, twice a day for 2 weeks. At the end of this period, rats were sacrificed, and blood samples were collected to be analysed for homocysteine concentration and biomarkers of systemic oxidative stress. Isolated rat hearts were excised and attached to the Langendorff apparatus. To assess the effects of acute administration of L-methionine, L-cysteine, N-acetylcysteine, and sodium hydrogen sulfide, the hearts were perfused individually with each of the mentioned substances at same single dose of 0.5 mmol/L for 5 min. Before, during and after perfusion of isolated rat heart (control, effect and washout) we continuously monitored (after insertion and placement a sensor in the left ventricle) the cardiodynamic parameters: a) dp/dt max - maximum rate of change of left ventricle pressure, b) dp/dt min - minimum rate of change of left ventricle pressure, v) SLVP - systolic left ventricular pressure, G) DLVP - diastolic left ventricular pressure and d) HR - heart rate. In the blood and effluent samples we measured biomarkers of oxidative stress: an index of lipid peroxidation (TBARS), nitric oxide in the form of nitrite (NO_2^-), superoxide anion radical (O_2^-), and hydrogen peroxide (H_2O_2), and the parameters of antioxidant protection system: catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and reduced glutathione (GSH).

Results: The research results are presented in 6 tables and 125 graphs. Total homocysteine level was significantly higher in the experimental group than in the control group, and the effects of applied sulfur-containing compounds were significantly different in experimental and control groups. DL-homocysteine induced considerable changes in functioning of cardiovascular system even before an increase in plasma homocysteine values, and action of sulfur-containing compounds varied depending on the presence of homocysteine.

Conclusions: After analyzing the results of this study, it is concluded that the effects of sulfuric amino acids (L-Meth, L-Cys, NAC) and inorganic NaHS play a significant role in the pathophysiology of the cardiovascular system, whereby their main characteristic is the dose-dependent effect on the function of the cardiovascular system, which is the dominant quality of sulfur-containing compounds.

Key words: homocysteine, coronary haemodynamics, oxidative stress, sulfur amino acids, rat

Accepted by the Scientific Board on – ASB: 26th April 2016.

Defended on – DE:

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

1. **Full Professor Vladimir Jakovljević**, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific field Physiology, chairman;
2. **Associate Professor Vladimir Živković**, M.D, Ph.D, Faculty of Physical Culture and Sport, University of Niš, scientific field Physiology, member;
3. **Associate Professor Nenad Ponorac**, Ph.D, Medical Faculty, University of Banja Luka, scientific field Physiology, member.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, ТАЊА ШОБОТ, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Утицај субхронског оштрећења хомацисистема на коронарну хемодинамику и оксидациони стрес код мацова: ефекти сумпоровичних аминокиселина (метионина, N-ацетилцистеина и цистеина) и георганског Na-хидротенсулфида

која је одбрањена на Факултету медицинских наука,

Универзитета у Крагујевцу представља оригинално ауторско дело настало као резултат сопственог истраживачког рада.

Овом Изјавом такође потврђујем:

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

у Крагујевцу, 24.06.2019 године.

Тана Шобот

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, ТАЊА ШОБОТ,

дозвољавам

не дозвољавам

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

Утицај судоркиног амтеретња халогенације на коронарну хемодинамику и оксидациони статус код мицова: ефекти сумпорвоних аминокиселина (метионина, N-ацетилцистеина и цистеина) и неортанског Na-хидротенсулфа

која је одбрањена на Филозофском факултету Медицинских наука

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

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

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

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














у Крагујевцу, 24.06.2019. године,

Јаска Младеновић
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/>

Research Article

Protective Effects of *Galium verum* L. Extract against Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury in Spontaneously Hypertensive Rats

Jovana Bradic ¹, Vladimir Zivkovic ², Ivan Srejovic ², Vladimir Jakovljevic ^{2,3},
Anica Petkovic ¹, Tamara Nikolic Turnic ¹, Jovana Jeremic ¹, Nevena Jeremic ¹,
Slobodanka Mitrovic ⁴, Tanja Sobot ⁵, Nenad Ponorac ⁵, Marko Ravic ¹,
and Marina Tomovic ¹

¹University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacy, Svetozara Markovica 69, 34 000 Kragujevac, Serbia

²University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Physiology, Svetozara Markovica 69, 34 000 Kragujevac, Serbia

³University IM Sechenov, 1st Moscow State Medical, Department of Human Pathology, Trubetskaya Street 8, 119991 Moscow, Russia

⁴University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Pathology, Svetozara Markovica 69, 34 000 Kragujevac, Serbia

⁵University of Banja Luka, Faculty of Medicine, Department of Physiology, Save Mrkalja 14,
78000 Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

Correspondence should be addressed to Vladimir Jakovljevic; drvladakgbg@yahoo.com

Received 27 September 2018; Revised 27 November 2018; Accepted 27 December 2018; Published 4 February 2019

Academic Editor: Claudia Penna

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

Galium verum L. (*G. verum*, lady's bedstraw) is a perennial herbaceous plant, belonging to the Rubiaceae family. It has been widely used throughout history due to multiple therapeutic properties. However, the effects of this plant species on functional recovery of the heart after ischemia have still not been fully clarified. Therefore, the aim of our study was to examine the effects of methanol extract of *G. verum* on myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury in spontaneously hypertensive rats (SHR), with a special emphasis on the role of oxidative stress. Rats involved in the research were divided randomly into two groups: control (spontaneously hypertensive rats (SHR)) and *G. verum* group, including SHR rats treated with the *G. verum* extract (500 mg/kg body weight per os) for 4 weeks. At the end of the treatment, *in vivo* cardiac function was assessed by echocardiography. Rats were sacrificed and blood samples were taken for spectrophotometric determination of systemic redox state. Hearts from all rats were isolated and retrogradely perfused according to the Langendorff technique. After a stabilization period, hearts were subjected to 20-minute ischemia, followed by 30-minute reperfusion. Levels of prooxidants were spectrophotometrically measured in coronary venous effluent, while antioxidant enzymes activity was assessed in heart tissue. Cell morphology was evaluated by hematoxylin and eosin (HE) staining. 4-week treatment with *G. verum* extract alleviated left ventricular hypertrophy and considerably improved *in vivo* cardiac function. Furthermore, *G. verum* extract preserved cardiac contractility, systolic function, and coronary vasodilatory response after ischemia. Moreover, it alleviated I/R-induced structural damage of the heart. Additionally, *G. verum* extract led to a drop in the generation of most of the measured prooxidants, thus mitigating cardiac oxidative damage. Promising potential of *G. verum* in the present study may be a basis for further researches which would fully clarify the mechanisms through which this plant species triggers cardioprotection.

1. Introduction

Acute myocardial infarction (AMI) is one of the most common causes of disability and mortality worldwide [1]. Although timely restoration of blood flow to an ischemic heart is essential for limiting the infarct size, it can

paradoxically exacerbate tissue damage. This phenomenon is known as ischemia/reperfusion (I/R) injury and occurs in several forms such as reperfusion-induced arrhythmias, myocardial stunning, microvascular obstruction, and reperfusion-induced cardiomyocyte death [2]. The exact mechanisms underlying progression of I/R injury have been

under intense investigation for more than four decades with the aim to open the way to novel effective strategies for myocardial salvage [3]. Factors that have been proven to mostly contribute to myocardial dysfunction are increased generation of prooxidants, pronounced inflammatory response, and intracellular and mitochondrial Ca^{2+} overload [3, 4]. Presence of hypertension, as one of the most common risk factors for cardiovascular diseases, may worsen I/R outcome due to high myocardial load/mechanical stress [5].

Ischemic preconditioning is a successful maneuver for reaching cardioprotection by exposing the heart to brief episodes of ischemia and reperfusion prior to prolonged ischemia. Due to its limited clinical application, recent researches have focused its attention on agents that might be pharmacological mimetics of ischemic preconditioning [4]. Growing evidence suggest benefits of dietary intake of medicinal plants rich in polyphenols in lowering the incidence of coronary diseases [6, 7]. Polyphenols are biologically active constituents found in vegetables, fruits, wines, etc., with great potential to attenuate the deleterious impact of I/R via antioxidant and anti-inflammatory activities and preservation of nitric oxide [7].

Galium verum (*G. verum*, lady's bedstraw) is a perennial herbaceous plant, belonging to the Rubiaceae family and has been widely recognized throughout history due to its multiple therapeutic properties [8]. It has been used as a sedative, an anticancer agent, in the treatment of gout and epilepsy; nevertheless, effects of this plant species on cardiac function have not been clarified yet [9]. Phytochemical investigations revealed the presence of iridoid glycosides, phenolic compounds (such as chlorogenic and caffeic acids, hyperoside), anthraquinones, and triterpenes in *G. verum* extracts [8, 9]. Therefore, we hypothesized that *G. verum* extract might be involved in the alleviation of harmful effects of I/R injury on functional and morphological properties of the heart.

Regarding above-mentioned data the aim of our study was to assess the effects of methanol extract of *G. verum* on myocardial I/R injury in spontaneously hypertensive rats (SHR), with a special emphasis on the role of oxidative stress.

2. Materials and Methods

2.1. Ethical Approval. This investigation was carried out in the laboratory for cardiovascular physiology of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. The study protocol was approved by the Ethical Committee for the welfare of experimental animals of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. All experiments were performed according to the EU Directive for the welfare of laboratory animals (86/609/EEC) and the principles of Good Laboratory Practice (GLP).

2.2. Plant Material and Extract Preparation. The whole plant *G. verum* was collected on July 5th, 2017 in the village *Dobroselica* on the southern cliff of *Mt. Zlatibor* (GPS coordinates: 43° 42' 59.99" N and 19° 41' 59.99" E). Identification and classification of the plant material were performed at the Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Kragujevac and at the Institute of Botany and Botanical

garden "Jevremovac", University of Belgrade. A voucher specimen (number 17417) was kept in a herbarium of the Institute of Botany and Botanical garden "Jevremovac". The collected material was dried under the shade and powdered (sieve 0.75). The methanol extract was prepared to extract 100 g of the aerial part of the plant with 500 ml of methanol by heat reflux extraction [10]. The mixture was filtered through a filter paper (Whatman, No. 1), and the dry extract was obtained after removing the solvent by evaporation under reduced pressure (RV05 basic IKA, Germany). Afterwards, the residue (16.03 g) was stored in a dark glass bottle at +4°C until use. Once daily just before administration to experimental animals, extract was dissolved in the tap water.

2.3. Animals. Twenty spontaneously hypertensive rats (males, eight weeks old, body weight 150 ± 30 g) were included in the study. They consumed commercial rat food (20% protein rat food, Veterinary Institute Subotica, Serbia) *ad libitum* and were housed at a temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$, with 12 hours of automatic illumination daily. The rats were divided into two groups as follows:

(1) *Control Group.* Rats who drank only tap water

(2) *G. verum Group.* Rats who drank tap water containing 500 mg/kg of methanol extract of *G. verum*

In order to provide a precise amount of drug for every animal, rats were kept in separate cages (one animal per cage). Considering that animals drink approximately 50 ml of water per day, we dissolved individual dose of extract adjusted to body weight (500 mg/kg) in this volume of water. The same procedure was repeated every day of the experimental protocol.

2.4. Assessment of In Vivo Cardiac Function. Transthoracic echocardiograms were performed after accomplishing drinking protocol. A mixture of ketamine 50 mg/kg (100 mg/mL; *Ketaset*, Fort Dodge, IA) and xylazine 10 mg/kg (100 mg/mL; *AnaSed*, Lloyd Laboratories, Shenandoah, IA) intraperitoneally was used as anesthesia. Echocardiograms were performed using a Hewlett-Packard Sonos 5500 (Andover, Massachusetts) sector scanner equipped with a 15.0 MHz phased array transducer as previously described [11]. From the parasternal long-axis view in a 2-dimensional mode, M-mode cursor was positioned perpendicularly to the interventricular septum and posterior wall of the left ventricle (LV) at the level of the papillary muscles and M-mode images were obtained. Interventricular septal wall thickness at end diastole (IVSd), LV internal dimension at end diastole (LVIDd), LV posterior wall thickness at end diastole (LVPWd), interventricular septal wall thickness at end systole (IVSs), LV internal diameter at end systole (LVIDs), and LV posterior wall thickness at end systole (LVPWs) were recorded with M-mode. Fractional shortening percentage (FS%) was calculated from the M-mode LV diameters using the equation: $[(\text{LVEDd} - \text{LVESd})/\text{LVEDd}] \times 100\%$.

2.5. Preparation of Isolated Rat Hearts. Following 4 weeks of *G. verum* extract treatment, after short-term narcosis induced

by intraperitoneal application of ketamine (10 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg) and premedication with heparin as an anticoagulant, animals were sacrificed by decapitation. Then the chest was opened via midline thoracotomy, the hearts were immediately removed and immersed in cold saline, and the aortas were cannulated and retrogradely perfused under a constant perfusion pressure (CPP) of 70 cmH₂O according to the *Langendorff* technique. The composition of Krebs–Henseleit buffer used for retrograde perfusion was as follows (mmol/L): NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ × 2H₂O 2.5, MgSO₄ × 7H₂O 1.7, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, glucose 11, pyruvate 2, equilibrated with 95% O₂ plus 5% CO₂, and warmed to 37°C (pH 7.4).

2.6. Assessment of Ex Vivo Cardiac Function. After placing the sensor (transducer BS473-0184, Experimetria Ltd., Budapest, Hungary) in the left ventricle, the following parameters of myocardial function have been measured during stabilization and during reperfusion: maximum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt max), minimum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt min), systolic left ventricular pressure (SLVP), diastolic left ventricular pressure (DLVP), and heart rate (HR). Coronary flow (CF) was measured flowmetrically.

At first, the hearts underwent a 30-minute perfusion at CPP of 70 cmH₂O in order to achieve a stable rhythm. After a stabilization period, the hearts were exposed to global ischemia (perfusion was totally stopped) for 20 minutes, followed by 30 minutes of reperfusion. All cardiodynamic parameters and coronary flow were measured in intervals of 5 minutes during the period of reperfusion (30 minutes) (RP1–RP7).

2.7. Biochemical Analysis. After sacrificing, blood samples for biochemical analysis were collected from a jugular vein in order to test the systemic redox state. After centrifugation of heparinized venous blood, plasma and erythrocytes were separated. In plasma, the following prooxidants were determined: the levels of superoxide anion radical (O₂^{•-}), nitrites (NO₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂), and index of lipid peroxidation (measured as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)). Parameters of the antioxidative defense system such as activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) and level of reduced glutathione (GSH) were determined in erythrocyte samples. Cardiac oxidative stress markers were determined in coronary venous effluent and heart tissue. After heart stabilization and in the intervals of 5 minutes during the period of reperfusion, coronary venous effluent was collected and used for spectrophotometric determination of levels of TBARS, O₂^{•-}, H₂O₂, and NO₂⁻. Analyses of the prooxidants were performed using the same methods as when analyzing plasma samples and coronary venous effluent except for NO₂⁻ where the protocol differs. The activity of antioxidant enzymes such as CAT and SOD was determined in heart tissue.

2.7.1. Superoxide Anion Radical Determination (O₂^{•-}). The level of superoxide anion radical (O₂^{•-}) was determined using nitro blue tetrazolium (NBT) reaction in TRIS-buffer combined with plasma sample or coronary venous effluent. The

measurement was performed at a wavelength of 530 nm. Krebs–Henseleit solvent was used as the blank control for O₂^{•-} determination in coronary venous effluent, while distilled water for plasma samples [12].

2.7.2. Hydrogen Peroxide Determination (H₂O₂). The protocol for measurement of hydrogen peroxide (H₂O₂) is based on oxidation of phenol red in the presence of horseradish peroxidase. 200 μl sample with 800 μl PRS (phenol red solution) and 10 μl POD (horseradish peroxidase) were combined (1:20). The level of H₂O₂ was measured at 610 nm. Krebs–Henseleit solvent was used as the blank control for the determination of this parameter in coronary venous effluent, while distilled water was used for plasma samples [13].

2.7.3. Nitrite Determination (NO₂⁻). Nitric oxide (NO) decomposes rapidly to form stable metabolite nitrite/nitrate products. Nitrite (NO₂⁻) was determined as an index of nitric oxide production with Griess reagent. For NO₂⁻ determination in plasma 0.1 ml 3 N PCA (perchloric acid), 0.4 ml 20 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 0.2 ml plasma were put on ice for 15 min, then centrifuged for 15 min at 6000 rpm. After pouring off the supernatant, 220 μl K₂CO₃ was added. Nitrites were measured at 550 nm. Distilled water was used as a blank probe.

In order to determine NO₂⁻ level in coronary venous effluent, 0.5 ml of the perfusate was precipitated with 200 μl of 30% sulfosalicylic acid, mixed for 30 min, and centrifuged at 3000 × g. Equal volumes of the supernatant and Griess reagent were mixed and stabilized for 10 min in the dark, and then the sample was measured spectrophotometrically at a wavelength of 543 nm. The nitrite concentrations were determined using sodium nitrite as the standard [14].

2.7.4. Determination of the Index of Lipid Peroxidation Measured as TBARS. The degree of lipid peroxidation in the sample (plasma and coronary venous effluent) was estimated by measuring of TBARS using 1% TBA (thiobarbituric acid) in 0.05 NaOH, incubated with sample at 100°C for 15 min, and read at 530 nm. TBA extract was obtained by combining 0.8 ml sample and 0.4 ml trichloro acetic acid (TCA); afterwards, the samples were put on ice for 10 min and centrifuged for 15 min at 6000 rpm. For TBARS determination in coronary venous effluent, the Krebs–Henseleit solvent was used as a blank control, while in the case of plasma sample distilled water was used [15].

2.7.5. Determination of Antioxidant Enzymes (CAT, SOD). Isolated RBCs were washed three times with three volumes of ice-cold 0.9 mmol/l NaCl, and hemolysates containing about 50 g Hb/l [16] were used for the determination of CAT activity [17]. Moreover, hearts from all animals were frozen at -80°C. Additionally, 0.5 section of each tissue was homogenized in 5 ml phosphate buffer (pH 7.4) on ice, and homogenates were centrifuged at 1200 × g for 20 min at 4°C. The resulting supernatants were used for the determination of cardiac activity of CAT and SOD. CAT buffer, prepared sample (hemolysates or heart tissue), and 10 mM H₂O₂ were used for CAT determination. Detection was performed at 360 nm. The amount of CAT was expressed as U/g

tissue and in hemolysate as $U/g \text{ Hb} \times 10^3$ [17, 18]. SOD activity was determined by the epinephrine method. Heart tissue or hemolysate was mixed with carbonate buffer, and then epinephrine was added. Detection was performed at 470 nm. The amount of SOD in heart tissue was expressed as U/g tissue and in hemolysate as $U/g \text{ Hb} \times 10^3$ [19, 20].

2.7.6. Determination of Reduced Glutathione (GSH). The level of reduced glutathione (GSH) was determined based on GSH oxidation via 5,5-dithiobis-6,2-nitrobenzoic acid. GSH extract was obtained by combining 0.1 ml 0.1% EDTA, 400 μl hemolysate, and 750 μl precipitation solution (containing 1.67 g metaphosphoric acid, 0.2 g EDTA, 30 g NaCl, and filled with distilled water until 100 ml; the solution is stable for 3 weeks at $+4\text{C}^\circ$). After mixing in the vortex machine and extraction on cold ice (15 min), it was centrifuged at 4000 rpm (10 min). Distilled water was used as a blank probe. The level of GSH was measured at 420 nm. The concentration is expressed as nanomoles per milliliter of red blood cells (RBCs) [21].

2.8. Histological Analysis. In order to evaluate the effects of *G. verum* on cell morphology after I/R, hematoxylin-eosin staining (HE) was performed for hearts according to the previously reported method [22].

2.9. Statistical Analysis. For statistical analysis of data within and between the control and *G. verum* group, IBM SPSS Statistics 20.0 for Windows was used. Three measured points were statistically analyzed: the first point was stabilization (S), the second was the first, and the last point of 30-minute reperfusion period (R1 and R7). Values were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Shapiro–Wilk test was used to check the distribution of data. Additionally, data was analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) and the post hoc Bonferroni test for multiple comparisons. Values of $p < 0.05$ were considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Effects of *G. verum* Extract on Morphological Variables. Values of body weight (BW), heart weight (HW), and HW/BW ratio in both groups of rats are shown in Table 1. The HW/BW ratio was significantly lower in the *G. verum* group.

3.2. Effects of *G. verum* Extract on In Vivo Cardiac Function. LVIDd, LVIDs, and LVPWd were significantly decreased after *G. verum* treatment, while IVSd remained unchanged. Furthermore, midwall fractional shortening was significantly increased in the *G. verum* group in comparison to control (Table 2).

3.3. Effects of *G. verum* Extract on Ex Vivo Cardiac Function. There was a statistically significant increase in the value of the maximum rate of left ventricular pressure development (dp/dt max) at RP1 in comparison to S and RP7 in the control group and a decrease in RP7 in comparison to S point. In the *G. verum* group, the value of this parameter remained constant during the observed period. Furthermore, the values

TABLE 1: Effects of *G. verum* extract on body and heart weight measurements.

	BW (g)	HW (mg)	HW/BW ratio
Control	266.65 \pm 14.75	1.08 \pm 0.07	4.95 \pm 0.25
<i>G. verum</i>	235.75 \pm 17.78	1.02 \pm 0.1	4.32 \pm 0.83*

Values are shown as means \pm SD. *Statistical significance at the level of $p < 0.05$ between the control and *G. verum* group; BW = body weight; HW = heart weight; HW/BW = heart weight to body weight.

TABLE 2: Effects of *G. verum* extract on *in vivo* cardiac function.

	Control	<i>G. verum</i>
IVSd (cm)	0.203 \pm 0.011	0.208 \pm 0.016
LVIDd (cm)	0.709 \pm 0.003	0.458 \pm 0.013*
LVPWd (cm)	0.251 \pm 0.013	0.176 \pm 0.046*
LVIDs (cm)	0.432 \pm 0.01	0.186 \pm 0.034*
LVPWs (cm)	0.302 \pm 0.002	0.297 \pm 0.03
FS (%)	39.0 \pm 2.34	59.3 \pm 3.54*

Values are shown as means \pm SD. *Statistical significance at the level of $p < 0.05$ between the control and *G. verum* group; IVSd = end-diastolic interventricular septal thickness; LVIDd = left ventricular internal diameter end diastole; LVPWd = left ventricular end-diastolic posterior wall thickness; LVIDs = left ventricular internal diameter end systole; LVPWs = left ventricular posterior wall thickness; FS = fractional shortening.

noticed in S and RP7 points were higher in *G. verum* than in the control group (Figure 1(a)). There was a drop in the value of the minimum rate of left ventricular pressure development (dp/dt min) at RP7 in comparison to RP1 and S points in the control group. Markedly, higher value of this parameter was noticed in the *G. verum* group both at RP1 and at RP7 compared to control conditions (Figure 1(b)).

A significant drop in systolic blood pressure in the left ventricle (SLVP) was found in the control group at RP7 when compared to RP1, while in the *G. verum* group SLVP value did not vary significantly. In the *G. verum* extract pretreated group, higher SLVP was observed at RP7 (Figure 1(c)). There was no statistically significant change in the value of diastolic blood pressure in the left ventricle (DLVP) both within and between groups (Figure 1(d)).

In the control group, a drop in heart rate (HR) was noticed at RP7 in comparison to S point. When compared to *G. verum* and control group, higher HR was noticed at RP7 and S points (Figure 1(e)). Coronary flow (CF) decreased at RP7 compared to S in the control group, and the value of the observed parameter was lower in this group in all points in comparison to the *G. verum* group (Figure 1(f)).

3.4. Effects of *G. verum* Extract on Systemic Redox State. The levels of oxidative stress markers, such as O_2^- , NO_2^- , and TBARS, were decreased in the *G. verum* group in comparison to the control group, while there was no difference in the level of H_2O_2 (Figure 2). Regarding the parameters of antioxidant defense system, there was an increase in SOD activity in the *G. verum* group, while the activity of CAT and level of GSH were not changed compared to the control group (Figure 3).

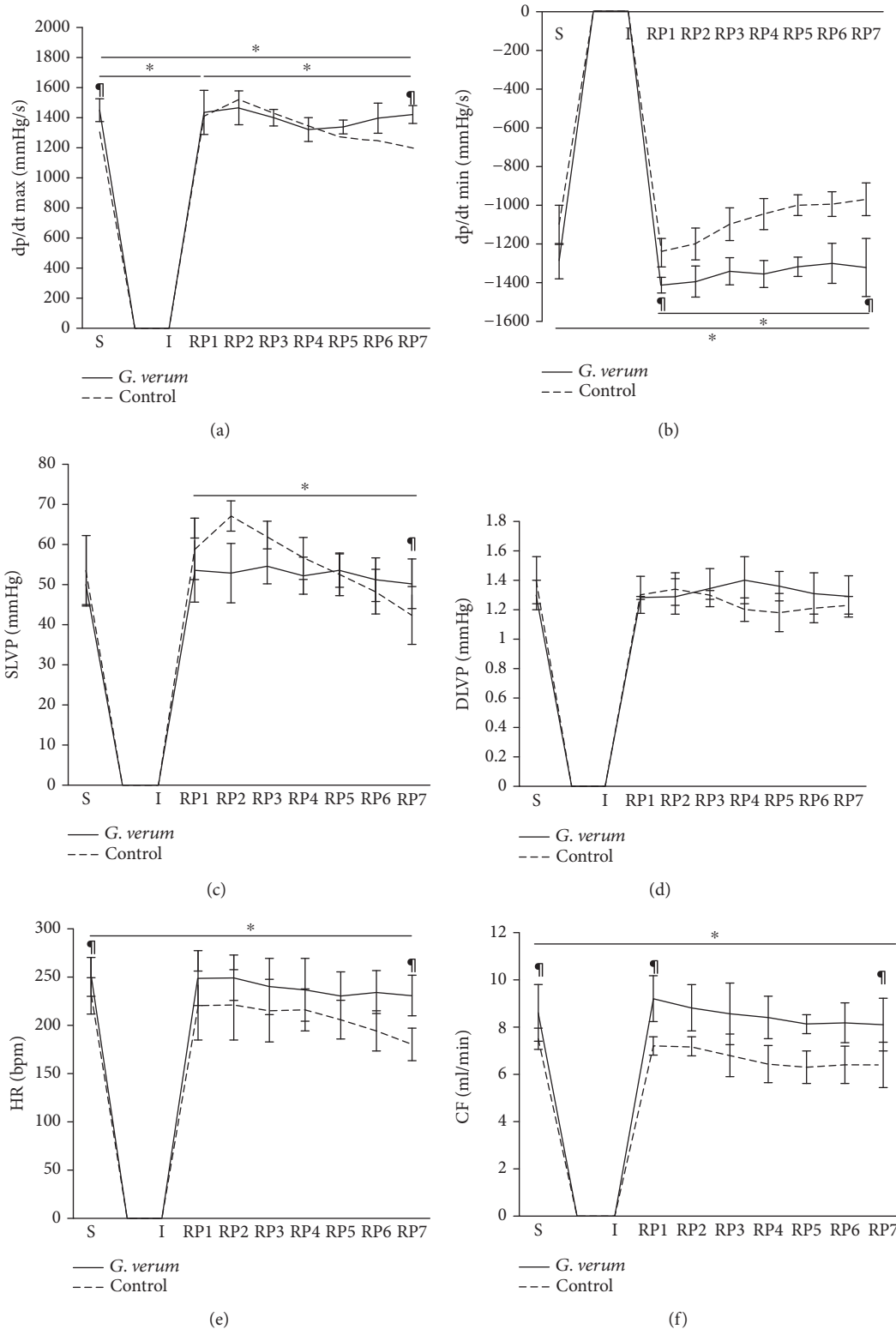


FIGURE 1: Effects of *G. verum* pretreatment on ex vivo cardiac function. (a) Comparison within and between groups in the value of dp/dt max, (b) comparison within and between groups in the value of dp/dt min, (c) comparison within and between groups in the value of SLVP, (d) comparison within and between groups in the value of DLVP, (e) comparison within and between groups in the value of heart rate, and (f) comparison within and between groups in the value of coronary flow. *Statistical significance at the level of $p < 0.05$ within the control group; # statistical significance at the level of $p < 0.05$ within the *G. verum* group; † statistical significance at the level of $p < 0.05$ between the control and *G. verum* group. Data are presented as means \pm SD. R1, first minute of reperfusion. R7, last minute of reperfusion.

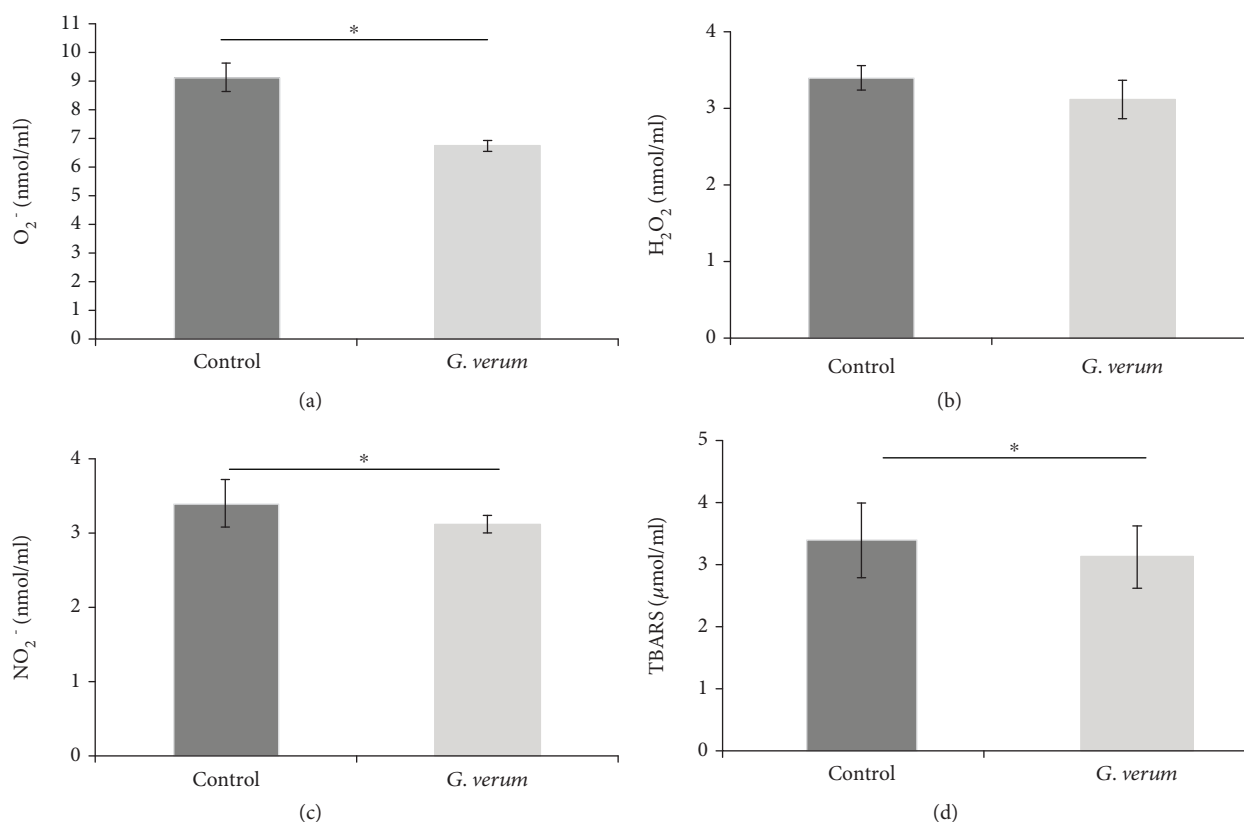


FIGURE 2: Effects of *G. verum* pretreatment on the level of prooxidants determined in plasma samples. (a) Comparison between groups in the value of O_2^- , (b) comparison between groups in the value of H_2O_2 , (c) comparison between groups in the value of NO_2^- , and (d) comparison between groups in the value of TBARS. *Statistical significance at the level of $p < 0.05$ between the control and *G. verum* group. Data are presented as means \pm SE.

3.5. Effects of *G. verum* Extract on Cardiac Redox State

3.5.1. Superoxide Anion Radical (O_2^-). There was a rise in O_2^- at RP7 in comparison to S point in the control group. Furthermore, *G. verum* extract led to an increase in the level of this parameter in RP1 compared to S; however, it significantly decreased at RP7 and reached the values similar from the S point. The levels of O_2^- both at S and RP7 moments were significantly higher in the control group (Figure 4(a)).

3.5.2. Hydrogen Peroxide (H_2O_2). A significantly elevated level of H_2O_2 was noticed in RP7 compared to S and RP1 in the control group, while in the *G. verum* group this parameter did not change during the time. A pronounced rise in the level of this oxidative stress marker was detected in the control group in comparison to *G. verum* at RP7 (Figure 4(b)).

3.5.3. Nitrites (NO_2^-). In the control group, there was an increase in the level of NO_2^- in RP7 in comparison to S point. On the other hand, in the *G. verum* group an increase in the level of this parameter was noticed in RP1 compared to S and RP7 and in RP7 compared to the S point. In S and RP1 moments, the level of NO_2^- was higher in the group pretreated with *G. verum* extract (Figure 4(c)).

3.5.4. Index of Lipid Peroxidation Measured as TBARS. The level of TBARS was elevated in RP7 compared to S in the

control group. Additionally, the level of this marker in the *G. verum* group in RP7 was significantly lower than in the control group (Figure 4(d)).

3.5.5. Catalase (CAT) and Superoxide Dismutase (SOD). The cardiac activity of CAT and SOD was significantly increased in the *G. verum* group (Figure 5).

3.6. Effects of *G. verum* Extract on Heart Morphology. Hypertrophy of the cardiac muscle fibers, edema, necrosis, and degenerative changes were observed in both groups. However, in the control group, degenerative changes were more prominent involving zonal necrosis of higher number of cardiomyocytes, with hyper eosinophilia, fragmentation of the fibers, and loss of nucleus. Moreover, focal necrosis of lower number of cardiomyocytes or unicellular was found in the *G. verum* group (Figure 6).

4. Discussion

It is well established that hypertension may lead to left ventricular hypertrophy development, thus increasing mortality from AMI and vulnerability of myocardium to I/R injury [23, 24]. Advances in understanding the complexity of mechanisms involved in the pathogenesis of myocardial I/R injury points to a central role of oxidative stress. Therefore, growing scientific attention was focused on the

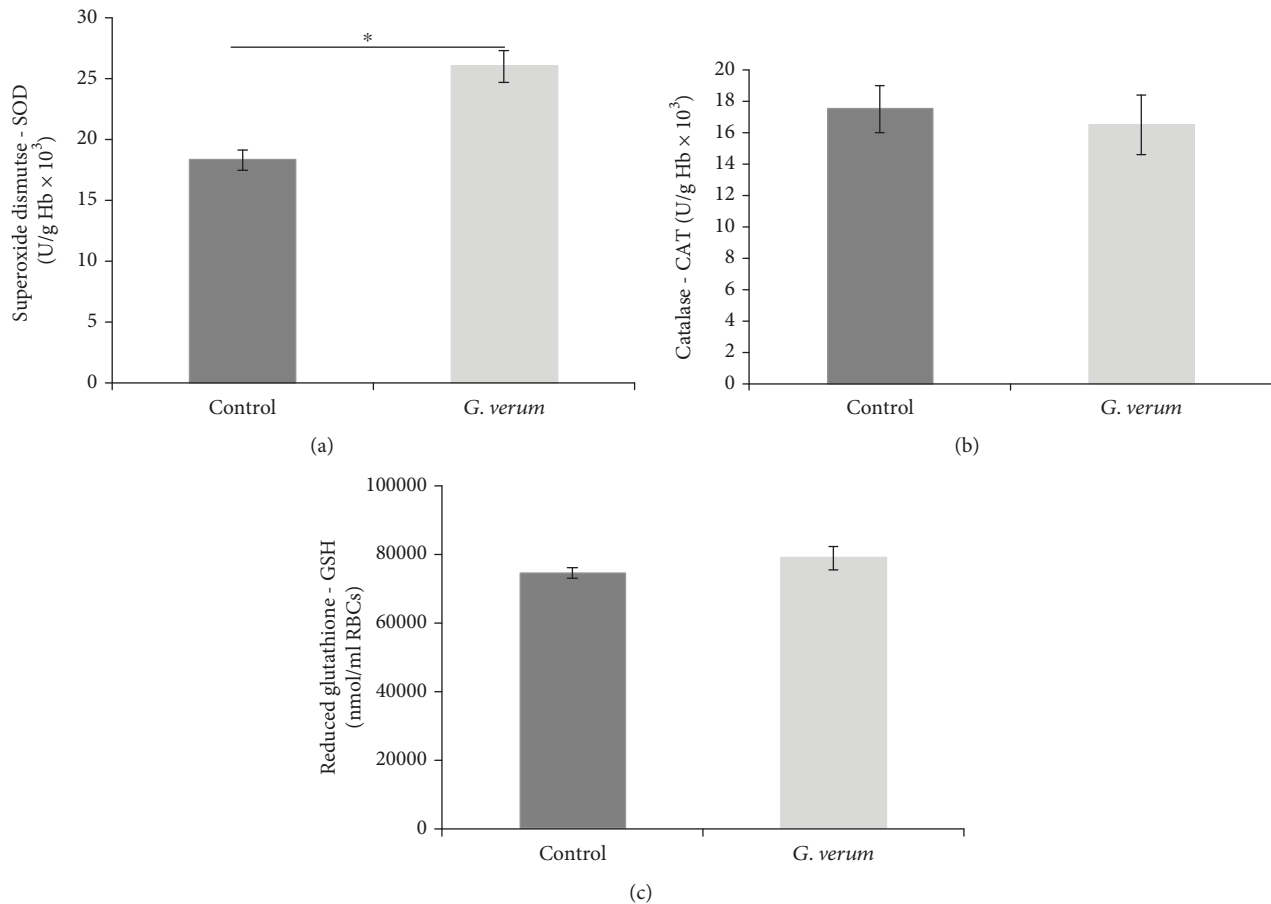


FIGURE 3: Effects of *G. verum* pretreatment on parameters of antioxidant defense system determined in erythrocytes samples. (a) Comparison between groups in the activity of SOD, (b) comparison between groups in the activity of CAT, and (c) comparison between groups in the level of GSH. *Statistical significance at the level of $p < 0.05$ between the control and *G. verum* group. Data are presented as means \pm SE.

modulation of redox homeostasis with plants and plant-derived products rich in natural antioxidants, thus reducing postischemic myocardial dysfunction [6]. Previous investigations have proven the antioxidant activity of *G. verum* extract *in vitro* [8, 25]. However, to our best knowledge, there is no data regarding its effects on heart function and potential of *G. verum* extract to attenuate myocardial damage, and diminish oxidative stress is open to discussion. We hypothesized that *G. verum* extract treatment might help salvage the ischemic-reperfused heart.

An echocardiographic examination of heart function demonstrated that 4-week *G. verum* treatment decreased LVIDD, LVIDs, and LVPWd and increased FS compared to the untreated SHR group, thus mitigating left ventricular hypertrophy and considerably improving cardiac function. This is in line with previous findings showing that natural substances belonging to a group of flavonoids might ameliorate endothelial dysfunction and cardiac hypertrophy in the spontaneously hypertensive rats [26, 27]. Additionally, the beneficial effect of isoflavones on overall cardiovascular markers in models of LV dysfunction, involving enhancement of percent FS, has been proven so far [28].

Our results clearly show that 20-minute *ex vivo* ischemia on *Langendorff* apparatus impaired myocardial function

manifested as a marked reduction in dp/dt max, dp/dt min, SLVP, HR, and CF in the control group. However, in the *G. verum* group, values of dp/dt max and dp/dt min were unchanged during the reperfusion period, enabling the cardiac muscle to contract and relax without variations in force. In support of this finding, it was found that protective effects on ventricular contractility may be reached by either application of flavonoids alone or plant extracts containing polyphenolics, flavonoids, iridoids, and terpenoids [29, 30]. Moreover, in animals receiving *G. verum*, systolic function was not only preserved but even improved, as evidenced by an increase in SLVP. *G. verum* extract consumption prevented I/R-induced decline in HR, so unaltered HR provided enough time for the heart to contract strongly. Additionally, prolonged ischemia led to a coronary vascular dysfunction reflected in reduced CF in the control group. In the *G. verum* extract pretreated group, coronary flow was slightly but not significantly changing over 30 min recovery period, so at the end of reperfusion it returned to baseline values. This fact suggested that preconditioning with *G. verum* preserved the coronary vasodilatory response to I/R.

The presence of flavonoids in *G. verum* extracts was confirmed in previous studies [8, 9]. Striking evidence indicate that flavonoids have the potential to improve

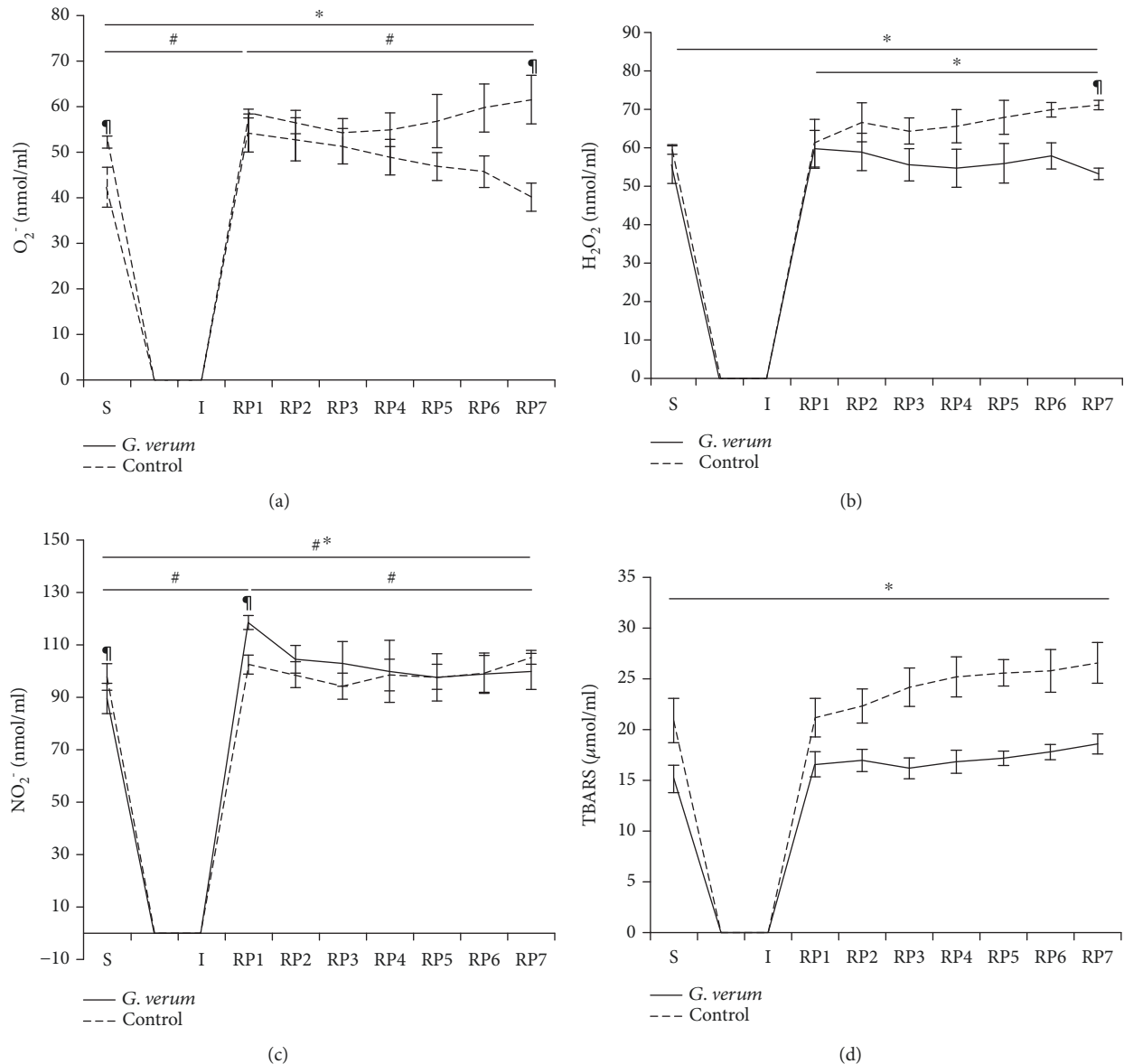


FIGURE 4: Effects of *G. verum* pretreatment on the level of cardiac prooxidants. (a) Comparison within and between groups in the value of O_2^- , (b) comparison within and between groups in the value of H_2O_2 , (c) comparison within and between groups in the value of NO_2^- , and (d) comparison within and between groups in the value of TBARS. *Statistical significance at the level of $p < 0.05$ within the control group; #statistical significance at the level of $p < 0.05$ within the *G. verum* group; †statistical significance at the level of $p < 0.05$ between the control and *G. verum* group. Data are presented as means \pm SE. R1, first minute of reperfusion. R7, last minute of reperfusion.

postischemic heart functionality [29, 30]. Polyphenols might inhibit endothelial NADPH oxidase (NOX), leading to a decrease in O_2^- release and formation of peroxynitrite, thus preventing endothelial dysfunction [31]. Moreover, these compounds may activate endothelial nitric oxide synthase (eNOS), resulting in increase bioavailability of nitrogen monoxide (NO), the most potent endogenous vasodilator [32]. Therefore, we may speculate that the protective effects of *G. verum* extract on the maintenance of coronary vasodilator tone and coronary circulation may be attributed to the presence of total phenols.

Furthermore, we evaluated whether 4-week treatment with *G. verum* affects systemic redox homeostasis and alters

systemic production of prooxidants, as well as the capacity of the antioxidant defense system. Our results showed that *G. verum* extract consumption exerted benefits referring to systemic redox state, leading to a drop in the plasma levels of O_2^- , NO_2^- , and TBARS. Moreover, we observed an increase in the activity of SOD, as the first line of cellular defense against oxidative injury, which is in line with a decrease in O_2^- level. In fact, we may hypothesize that probably O_2^- formed in mitochondria was converted to H_2O_2 in a reaction catalyzed by SOD. Our observation that there was no difference in the level of plasma H_2O_2 between groups is in accordance with unchanged CAT activity since the rise in H_2O_2 level would have led to a higher activity of CAT [33].

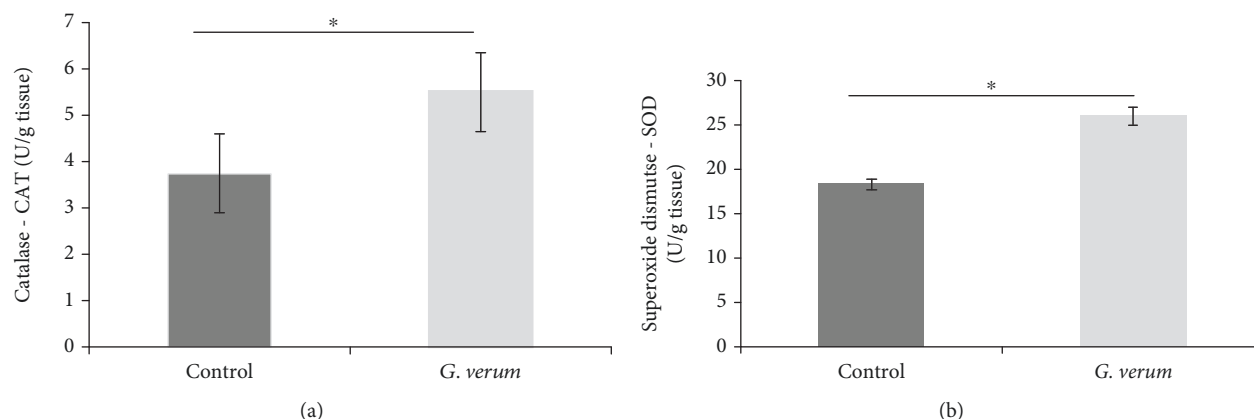


FIGURE 5: Effects of *G. verum* pretreatment on cardiac antioxidant enzymes activity. (a) Comparison between groups in the activity of CAT and (b) comparison between groups in the activity of SOD. *Statistical significance at the level of $p < 0.05$ between the control and *G. verum* group. Data are presented as means \pm SE.

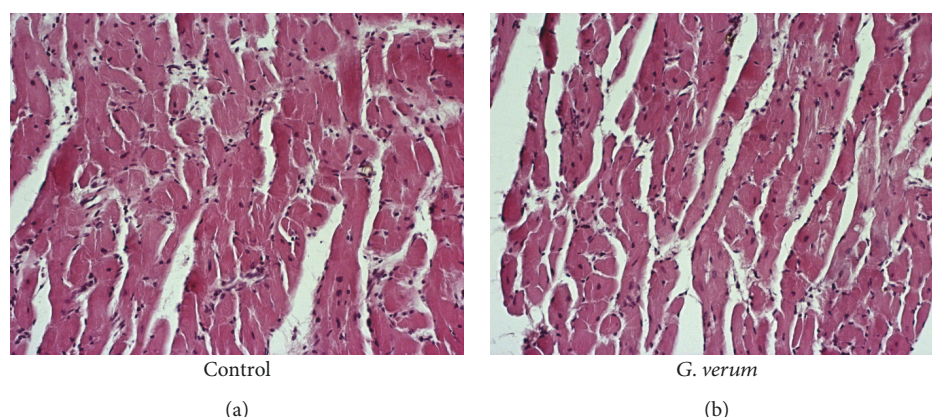


FIGURE 6: Histopathological changes in the myocardium following reperfusion (*magnification*, $\times 200$). Control group: hypertrophy of the cardiac muscle fibers, edema, necrosis, and zonal necrosis of higher number of cardiomyocytes, with hyper eosinophilia, fragmentation of the fibers, and loss of nucleus. *G. verum* group: hypertrophy of the cardiac muscle fibers, edema, necrosis, focal necrosis of lower number of cardiomyocytes or unicellular, and less prominent degenerative changes.

It has been proposed that polyphenols may preserve mitochondrial function and modulate redox signalling via inhibition of enzymes involved in ROS production such as xanthine oxidase (XO) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (NOX). Another way to exert antioxidant effect is via chelation of iron ions which catalyze several free radical-generating reactions [7].

In our research, I/R led to a rise in the generation of all cardiac prooxidants, which is consistent with the previous reports that during reperfusion of ischemic tissue the reversal of oxygen to oxygen-starved myocardium is associated with a burst of ROS generation. The main sources of prooxidants involve mitochondrial respiratory electron transport chain and activation of XO, resulting in enhanced production of very reactive species such as O_2^- and H_2O_2 [34]. Nevertheless, pretreatment with *G. verum* extract was capable of preventing an increase in the levels of most of the markers of myocardial oxidative damage. Markedly, higher levels of TBARS, O_2^- , and H_2O_2 in coronary venous effluent in the control group compared to the *G. verum* group were noticed

after 30 min restoration of blood flow, thus suggesting that *G. verum* extract attenuated oxidative stress derived from the endocardium of the left ventricle and endothelium of the coronary circulation. Increased activity of myocardial antioxidant enzymes supports a decline in cardiac production of prooxidants. In fact, enhanced SOD activity might be responsible for a decrease in O_2^- levels, while lower level of H_2O_2 may be explained by its decomposition to water and oxygen catalyzed by CAT. In our study, *G. verum* treatment was associated with enhanced both systemic and myocardial SOD activity and diminished systemic and cardiac production of O_2^- , thus indicating that initial modulation of this antioxidant enzyme is involved in the action of *G. verum*. Consistent with these results, striking evidence indicate that polyphenols are able to activate endogenous antioxidant defense system, particularly SOD and CAT, thus alleviating oxidative stress-induced myocardial damage. In that sense, we may assume that this is one of the mechanisms through which polyphenol-containing extracts such as *Galium verum* extract may exert its antioxidant effects. Additionally,

antioxidant potential of these natural compounds involves their ability to act as direct free radical scavengers as well [35, 36]. In addition to the aforementioned mechanisms, it has been known that flavonoids might alleviate I/R-induced oxidative stress by inhibiting the xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase system [37]. Promising potential of *G. verum* extract in a decrease of oxidative damage may be mostly attributed to the additive and synergistic effects of bioactive molecules belonging to polyphenols.

Histological assessment suggested that ischemia altered the myocardial structure in both groups manifested as hypertrophy of cardiac muscle fibers, edema, necrosis, and degenerative changes. However, *G. verum* consumption alleviated I/R-induced deleterious effects on heart morphology and confirmed its potential to preserve both myocardial function and structure under ischemic conditions.

Our research highlighted for the first time that methanol extract of *G. verum* improved *in vivo* cardiac function and exerted benefits on systemic redox homeostasis. Additionally, it preserved the functional and morphological properties of the heart and prevented coronary vascular dysfunction after ischemia. Moreover, *G. verum* modulated the cardiac generation of prooxidants, thus alleviating oxidative stress-induced heart damage. Obvious protective effects of this plant species on myocardial I/R injury in our study provide a scientific basis for its use in triggering cardioprotection. However, further studies are certainly necessary for better understanding the underlying mechanisms.

Data Availability

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

Disclosure

The results of this manuscript were presented at the 8th International Congress of Pathophysiology – Satellite Symposium, held on September 03, 2018 in Kragujevac, Serbia.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors would like to express gratitude to the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for Grant No. JP 06/17.

References

- [1] M. Neri, I. Riezzo, N. Pascale, C. Pomara, and E. Turillazzi, "Ischemia/reperfusion injury following acute myocardial infarction: a critical issue for clinicians and forensic pathologists," *Mediators of Inflammation*, vol. 2017, Article ID 7018393, 14 pages, 2017.
- [2] D. J. Hausenloy and D. M. Yellon, "Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target,"

- The Journal of Clinical Investigation*, vol. 123, no. 1, pp. 92–100, 2013.
- [3] T. Kalogeris, C. P. Baines, M. Krenz, and R. J. Korthuis, "Ischemia/reperfusion," *Comprehensive Physiology*, vol. 7, no. 1, pp. 113–170, 2016.
- [4] W. Li, N. Wu, W. Shu, D. Jia, and P. Jia, "Pharmacological preconditioning and postconditioning with nicorandil attenuates ischemia/reperfusion-induced myocardial necrosis and apoptosis in hypercholesterolemic rats," *Experimental and Therapeutic Medicine*, vol. 10, no. 6, pp. 2197–2205, 2015.
- [5] M. S. Mozaffari, J. Y. Liu, W. Abebe, and B. Baban, "Mechanisms of load dependency of myocardial ischemia reperfusion injury," *American Journal of Cardiovascular Disease*, vol. 3, no. 4, pp. 180–196, 2013.
- [6] L. Testai, A. Martelli, M. Cristofaro, M. C. Breschi, and V. Calderone, "Cardioprotective effects of different flavonoids against myocardial ischaemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 65, no. 5, pp. 750–756, 2013.
- [7] J. Debnath and L. K. Nath, "A review on pathophysiology of ischemic-reperfusion injury of heart and ameliorating role of flavonoids and polyphenols," *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 8, no. 16, pp. 607–614, 2014.
- [8] N. S. Lakić, N. M. Mimica-Dukić, J. M. Isak, and B. N. Božin, "Antioxidant properties of *Galium verum* L. (Rubiaceae) extracts," *Central European Journal of Biology*, vol. 5, no. 3, pp. 331–337, 2010.
- [9] L. Ö. Demirezer, F. Gürbüz, Z. Güvenalp, K. Ströch, and A. Zeeck, "Iridoids, flavonoids and monoterpene glycosides from *Galium verum* subsp. *verum*," *Turkish Journal of Chemistry*, vol. 30, pp. 525–534, 2006.
- [10] A. Hijazi, D. S. Al Masri, H. Farhan, M. Nasser, H. Rammal, and H. Annan, "Effect of different ethanol concentrations, using different extraction techniques, on the antioxidant capacity of Lebanese *Eryngium creticum*," *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, vol. 3, pp. 262–271, 2015.
- [11] I. I. Joffe, K. E. Travers, C. L. Perreault-Micale et al., "Abnormal cardiac function in the streptozotocin-induced non-insulin-dependent diabetic rat: noninvasive assessment with Doppler echocardiography and contribution of the nitric oxide pathway," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 34, no. 7, pp. 2111–2119, 1999.
- [12] C. Auclair and E. Voisin, "Nitroblue tetrazolium reduction," in *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, R. A. Greenwald, Ed., pp. 123–132, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1985.
- [13] E. Pick and Y. Keisari, "A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture," *Journal of Immunological Methods*, vol. 38, no. 1-2, pp. 161–170, 1980.
- [14] L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum, "Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids," *Analytical Biochemistry*, vol. 126, no. 1, pp. 131–138, 1982.
- [15] H. Ohkawa, N. Ohishi, and K. Yagi, "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction," *Analytical Biochemistry*, vol. 95, no. 2, pp. 351–358, 1979.
- [16] J. M. McCord and I. Fridovich, "The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and

- oxygen," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 244, no. 22, pp. 6056–6063, 1969.
- [17] E. Beutler, "Catalase," in *Red Cell Metabolism, a Manual of Biochemical Methods*, E. Beutler, Ed., pp. 105–106, Grune and Stratton, New York, NY, USA, 1982.
- [18] H. Aebi, "Catalase in vitro," *Methods in Enzymology*, vol. 105, no. 25, pp. 121–126, 1984.
- [19] H. P. Misra and I. Fridovich, "The role of superoxide-anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 247, no. 10, pp. 3170–3175, 1972.
- [20] E. Beutler, "Superoxide dismutase," in *Red Cell Metabolism, a Manual of Biochemical Methods*, E. Beutler, Ed., pp. 83–85, Grune and Stratton, Philadelphia, PA, USA, 1984.
- [21] E. Beutler, "Reduced glutathione (GSH)," in *Red Cell Metabolism, a Manual of Biochemical Methods*, E. Beutler, Ed., pp. 112–114, Grune and Stratton, New York, NY, USA, 1975.
- [22] Y. Zhang, C. Yuan, H. Fang, J. Li, S. Su, and W. Chen, "Total flavonoid extract from *Coreopsis tinctoria* Nutt. protects rats against myocardial ischemia/reperfusion injury," *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, vol. 19, no. 9, pp. 1016–1023, 2016.
- [23] S. Mølgaard, B. Faricelli, M. Salomonsson, T. Engstrøm, and M. Treiman, "Increased myocardial vulnerability to ischemia-reperfusion injury in the presence of left ventricular hypertrophy," *Journal of Hypertension*, vol. 34, no. 3, pp. 513–523, 2016.
- [24] P. Pagliaro and C. Penna, "Hypertension, hypertrophy, and reperfusion injury," *Journal of Cardiovascular Medicine*, vol. 18, no. 3, pp. 131–135, 2017.
- [25] L. Vlase, A. Mocan, D. Hanganu, D. Benedec, A. Gheldiu, and G. Crişan, "Comparative study of polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of four *Galium* species (*Rubiaceae*)," *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, vol. 9, no. 3, pp. 1085–1094, 2014.
- [26] J. I. Randriamboavonjy, G. Loirand, N. Vaillant et al., "Cardiac protective effects of *Moringa oleifera* seeds in spontaneous hypertensive rats," *American Journal of Hypertension*, vol. 29, no. 7, pp. 873–881, 2016.
- [27] L. Yan, J. D. Zhang, B. Wang et al., "Quercetin inhibits left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats and inhibits angiotensin II-induced H9C2 cells hypertrophy by enhancing PPAR- γ expression and suppressing AP-1 activity," *PLoS One*, vol. 8, no. 9, article e72548, 2013.
- [28] L. Leung, J. B. Martin, T. Lawmaster, K. Arthur, T. L. Broderick, and L. Al-Nakkash, "Sex-dependent effects of dietary genistein on echocardiographic profile and cardiac GLUT4 signaling in mice," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2016, Article ID 1796357, 10 pages, 2016.
- [29] Y. Kanno, R. Watanabe, H. Zempo, M. Ogawa, J. Suzuki, and M. Isobe, "Chlorogenic acid attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction in mice," *International Heart Journal*, vol. 54, no. 3, pp. 176–180, 2013.
- [30] S. Srimachai, S. Devaux, C. Demougeot et al., "*Bacopa monnieri* extract increases rat coronary flow and protects against myocardial ischemia/reperfusion injury," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 17, no. 1, p. 117, 2017.
- [31] M. Akhlaghi and B. Bandy, "Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia-reperfusion injury," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 46, no. 3, pp. 309–317, 2009.
- [32] J. Duarte, V. Francisco, and F. Perez-Vizcaino, "Modulation of nitric oxide by flavonoids," *Food & Function*, vol. 5, no. 8, pp. 1653–1668, 2014.
- [33] A. M. Petkovic, V. L. Jakovljevic, J. V. Bradic et al., "The effects of potassium cyanide on the functional recovery of isolated rat hearts after ischemia and reperfusion: the role of oxidative stress," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2018, Article ID 5979721, 10 pages, 2018.
- [34] D. N. Granger and P. R. Kvietys, "Reperfusion injury and reactive oxygen species: the evolution of a concept," *Redox Biology*, vol. 6, pp. 524–551, 2015.
- [35] R. Mattera, M. Benvenuto, M. Giganti et al., "Effects of polyphenols on oxidative stress-mediated injury in cardiomyocytes," *Nutrients*, vol. 9, no. 5, p. 523, 2017.
- [36] X. L. Louis, S. J. Thandapilly, W. Kalt et al., "Blueberry polyphenols prevent cardiomyocyte death by preventing calpain activation and oxidative stress," *Food & Function*, vol. 5, no. 8, pp. 1785–1794, 2014.
- [37] Y. W. Chen, H. C. Chou, S. T. Lin et al., "Cardioprotective effects of quercetin in cardiomyocyte under ischemia/reperfusion injury," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, Article ID 364519, 16 pages, 2013.

THE EFFECTS OF SULFUR-CONTAINING COMPOUNDS ON REDOX STATUS IN HOMOCYSTEINE-TREATED RATS

TANJA S. SOBOT¹, VLADIMIR I. ZIVKOVIC^{2*}, IVAN M. SREJOVIC², JOVANA N. JEREMIC³,
TAMARA R. NIKOLIC TURNIC³, NENAD D. PONORAC¹, ANICA M. PETKOVIC³,
VLADIMIR Lj. JAKOVLJEVIC^{2,4} and DRAGAN M. DJURIC⁵

¹Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Banja Luka,
Save Mrkalja 14, Banja Luka 78000, Bosnia and Herzegovina

²Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac,
Svetozara Markovica 69, Kragujevac 34000, Serbia

³Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac,
Svetozara Markovica 69, Kragujevac 34000, Serbia

⁴Department of Human Pathology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University
(Sechenov University), Trubetskaya st. 8, Moscow 119991, Russia

⁵Institute of Medical Physiology “Richard Burian”, Faculty of Medicine, University of Belgrade,
Visegradska 26, Belgrade 11000, Serbia

Abstract: There is growing interest in the activity of sulfur-containing compounds on redox balance in physiological and pathological conditions, considering that some of these compounds have not only antioxidative but also pro-oxidative activities. The aim of this study was to assess possible differences in the effects of various sulfur-containing compounds on redox balance of cardiovascular system in its physiological state and in the early onset of hyperhomocysteinemia. This experimental study divided *Wistar* albino rats into two groups: saline-treated (control) and DL-homocysteine-treated (experimental group). Rats from experimental group were subjected to subchronic subcutaneous administration of DL-homocysteine at dose of 0.45 mmol/g body weight twice a day for 2 weeks. At the end of this period, rats were sacrificed, and blood samples were collected to be analyzed for homocysteine concentration and systemic oxidative stress. Isolated rat hearts were excised and attached to the Langendorff apparatus. To assess the effects of acute administration of L-methionine, L-cysteine, N-acetylcysteine, and sodium hydrogen sulfide, the hearts were perfused individually with each of the mentioned substances at the same single dose of 0.5 mmol/L for 5 min. In collected samples of coronary venous effluent oxidative stress biomarkers were determined using spectrophotometry. Total homocysteine level was significantly higher in the experimental group than in the control group, and the effects of applied sulfur-containing compounds were significantly different in experimental and control groups. DL-homocysteine induced considerable changes in the functioning of a cardiovascular system even before an increase in plasma homocysteine values, and action of sulfur-containing compounds varied depending on the presence of homocysteine.

Keywords: sulfur amino acids; L-methionine; L-cysteine; N-acetylcysteine; homocysteine; oxidative stress

Abbreviations: CPP, Coronary perfusion pressure; CF, Coronary flow; CAT, Catalase; GSH, Reduced glutathione; GSSG, Glutathione disulfide; DNA, Deoxyribonucleic acid; Hcy, Homocysteine; H₂O₂, Hydrogen peroxide; HPLC, High-performance liquid chromatography; Meth, Methionine; Cys, Cysteine; NAC, N-acetylcysteine; H₂S, Hydrogen sulfide; NaHS, Sodium hydrogen sulfide; NO₂⁻, Nitrites; NO, Nitric oxide; O₂⁻, Superoxide anion radicals; OH, Hydroxyl radical; ROS, Reactive oxygen species; RNS, Reactive nitrogen species; RNOS, Reactive nitrogen oxygen species; RSS, Reactive sulfur species; SOD, Superoxide dismutase; SEM, Standard error mean; SD, Standard deviation; SAM, S-adenosylmethionine; SAH, S-adenosylhomocysteine; TBARS, Reactive thiobarbituric substances; VSMC, Vascular smooth muscle cells

INTRODUCTION

Oxidative stress is usually defined as an imbalance in the production and elimination of free radicals, where they accumulate due to either increased

production or insufficient elimination. Some free radicals are commonly produced in various concentrations in different places in the cell, primarily in mitochondria, and these physiological concentrations are easily disintegrated by scavenger enzymes

* Corresponding author: e-mail: vladimirziv@gmail.com

and antioxidants but also have an important role in cell signaling (1). The oxidative stress induced by excessive accumulation of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), two of the most important types of free radicals, plays a primary role in numerous diseases and disorders, including cardiovascular diseases (2, 3). On the other hand, the significance of cardiovascular diseases and their prevention is reflected by the fact that these diseases are the most common cause of death in the modern world (4).

There is a growing interest in the activity of different sulfur-containing compounds on redox balance in physiological and pathological conditions, considering that some of these compounds can exert not only antioxidative but also pro-oxidative activities (5, 6). In addition to the ability of some sulfur-containing compounds to induce increased production of ROS and RNS, the third group of redox active molecules containing sulfur, usually termed as reactive sulfur species (RSS), have a similar harmful potential to oxidize organic compounds, causing peroxidation of membranes and DNA damage (7).

Homocysteine (Hcy) is a nonprotein sulfur-containing amino-acid byproduct in methionine metabolism and is connected with a variety of pathological disorders in increased concentrations (hyperhomocysteinemia, HHcy) (8, 9). Although previous studies have depicted the role of Hcy in various cardiovascular disorders and in changing cellular function and structure in the cardiovascular system, the mechanisms of these modifications have not been fully elucidated (10).

Bearing in mind all the abovementioned facts, the aim of this investigation was to assess the effects of Hcy on cardiovascular redox state during the onset of HHcy, as well as the effects of various sulfur-containing compounds on ROS balance.

EXPERIMENTAL

Animals

All research procedures in this investigation were carried out in accordance with the European Directive No. 86/609/EEC on the protection of animals used for laboratory purposes and principles of good laboratory practice and approved by the ethical committee of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia.

The present study was carried out using 80 adult male Wistar albino rats (aged 16 weeks; body weight, 300-400 g). The animals were housed under standard controlled environmental conditions, with a temperature of $23 \pm 1^\circ\text{C}$ and a 12/12 h light/dark

cycle. Food and water were provided *ad libitum*. All animals were obtained from the Military Medical Academy (Belgrade, Serbia).

The animals were divided into two groups: control (healthy, saline-treated rats) and experimental (DL-homocysteine-treated rats). Rats from the experimental group were subjected to the subchronic administration of a subcutaneous injection of DL-homocysteine (DL-Hcy) at a dose of $0.45 \mu\text{mol/g}$ body weight twice a day (every day at the same time) for 2 weeks. Rats from the control group were subjected to the administration of a subcutaneous injection of saline twice a day for 2 weeks to achieve the same injection-induced stress effect on rats.

Each group was divided into 4 subgroups (10 animals each), depending on the acute treatment with sulfur-containing compounds (in the same single dose of 0.5 mmol/L).

Control (saline-treated) group:

1. L-Meth subgroup (acute administration of L-methionine);
2. L-Cys subgroup (acute administration of L-cysteine);
3. NAC subgroup (acute administration of N-acetylcysteine);
4. NaHS subgroup (acute administration of inorganic sodium hydrogen sulfide).

Experimental (DL-Hcy-treated rats) group:

5. DL-Hcy + L-Meth subgroup (acute administration of L-methionine);
6. DL-Hcy + L-Cys subgroup (acute administration of L-cysteine);
7. DL-Hcy + NAC subgroup (acute administration of N-acetylcysteine);
8. DL-Hcy + NaHS subgroup (acute administration of inorganic sodium hydrogen sulfide).

Doses of the above substances were chosen empirically in accordance with previously published data (11-13).

Experimental protocol (sample preparation and biochemical analyses)

After subchronic administration of DL-Hcy or saline, rats from both groups (experimental and control) were exposed to short ketamine/xylazine-induced narcosis and sacrificed by decapitation. For analysis of the Hcy concentration and systemic oxidative stress, blood was collected into two different types of vacutainer tubes. The first type was a plain tube for serum preparation to measure Hcy concentration; the second contained EDTA as an anticoagulant for the assay of pro-oxidative markers in plasma and antioxidant markers in erythrocyte lysate.

Total serum Hcy concentrations were measured with high-performance liquid chromatography (HPLC) procedure with reverse-phase separation and fluorescence detection, as described previously (14).

Furthermore, for examining the effect of sub-chronic DL-Hcy administration on redox status, we used the blood samples to compare values of pro-oxidative and antioxidative markers between the control and experimental (DL-Hcy-treated) groups. Collected blood samples were centrifuged to separate plasma and erythrocytes. In the plasma samples, the following markers of oxidative stress were measured spectrophotometrically: index of lipid peroxidation (measured as TBARS-thiobarbituric acid reactive substances), nitrites (NO_2^-), superoxide anion radical (O_2^-), and hydrogen peroxide (H_2O_2). In the lysate of erythrocytes, we determined the activity of the enzymatic defense system by evaluating catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) concentration, as well as the activity of non-enzymatic antioxidants such as reduced glutathione (GSH).

Immediately after venous blood sampling, quick thoracotomy was performed, followed by rapid cardiac arrest via superfusion with ice-cold isotonic saline; then, the hearts were promptly excised and attached to the Langendorff apparatus (Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary) via aortic cannulation. The hearts were retrogradely perfused under a constant perfusion pressure (CPP) of 70 cm H_2O with complex Krebs-Henseleit solution containing the following compounds (in mmol/L): NaCl, 118; KCl, 4.7; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.7; NaHCO_3 , 25; KH_2PO_4 , 1.2; glucose, 11; pyruvate, 2; equilibrated with 95% O_2 plus 5% CO_2 at 37°C (pH 7.4). After a stabilization period (the same values of coronary flow in three consecutive measurements, approximately lasting for 25 min), a sample of coronary venous effluent was collected (control value, C), and the experimental protocol was initiated. To assess the effects of acute administration of L-Meth, L-Cys, NAC, and NaHS, the hearts were perfused individually with each of the mentioned substances at the same single dose of 0.5 mmol/L for 5 min. During the last minute of treatment, a sample of coronary venous effluent was collected (effect value, E). After the treatment with experimental substances, the washout period of heart perfusion followed, lasting for 10 min. At the end of this period, a sample of coronary venous effluent was collected (washout value, W). In the collected samples of coronary venous effluent (control, effect, and washout), the same oxidative stress

biomarkers as in plasma were determined: index of lipid peroxidation (TBARS), nitrite (NO_2^-), superoxide anion radicals (O_2^-), and hydrogen peroxide (H_2O_2).

All biochemical parameters were determined spectrophotometrically using Shimadzu UV 1800 spectrophotometer (Japan).

Determination of TBARS

The degree of lipid peroxidation in the plasma and coronary venous effluent was estimated by measuring TBARS. Each sample was incubated with 1% thiobarbituric acid in 0.05 M NaOH at 100°C for 15 min and then measured at 530 nm. In the plasma samples, distilled water solution with 1% thiobarbituric acid in 0.05 NaOH served as a blank probe. In the coronary venous effluent samples, Krebs-Henseleit solution was used as a blank probe (15).

Determination of nitrites (NO_2^-)

Nitric oxide (NO) decomposes rapidly to form stable metabolite nitrite (NO_2^-) or nitrate products. The nitrite level (NO_2^-) was determined as an index of NO production with Griess reagent (16).

To detect nitrite in plasma, 0.1 mL of 3 N perchloric acid, 0.4 mL of 20 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and 0.2 mL of plasma were placed on ice for 15 min and then centrifuged for 15 min at 6000 rpm. After pouring off the supernatant, 220 μL of K_2CO_3 was added. NO_2^- was measured at 550 nm, and distilled water was used as a blank probe.

To detect nitrite in the coronary venous effluent, a total of 0.5 mL of perfusate was precipitated with 200 μL of 30% sulfosalicylic acid, vortexed for 30 min, and centrifuged at 3000 \times g. Equal volumes of the supernatant and Griess reagent, containing 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid/0.1% naphthalene ethylenediamine dihydrochloride, were added and incubated for 10 min in the dark and measured at 543 nm. The nitrite levels were calculated using sodium nitrite as the standard (16).

Determination of superoxide anion radical (O_2^-)

The concentration of the superoxide anion radical (O_2^-) was measured after the reaction of nitro blue tetrazolium in TRIS buffer with the plasma or coronary effluent samples at 530 nm. Krebs-Henseleit solution was used as a blank probe (17).

Determination of hydrogen peroxide (H_2O_2)

The measurement of hydrogen peroxide (H_2O_2) was based on the oxidation of phenol red by hydro-

gen peroxide, in a reaction catalyzed by horseradish peroxidase (HRPO) (15). For each sample, 200 μ L of plasma or coronary effluent was precipitated with 800 μ L of freshly prepared phenol red solution, followed by the addition of 10 μ L of (1 : 20) HRPO (made ex tempore). For the blank, an adequate volume of Krebs–Henseleit solution was used. The level of H_2O_2 was measured at 610 nm (18).

Determination of antioxidant enzymes (CAT, SOD)

Isolated erythrocytes were washed three times with 3 volumes of ice-cold 0.9 mmol/l NaCl. Haemolysates containing approximately 50 g of Hb/L (prepared according to McCord and Fridovich (19)) were used for the determination of CAT activity. CAT activity and the levels of reduced glutathione (GSH) were determined according to Beutler (20). Lysates were diluted with distilled water (1 : 7 v/v) and treated with chloroform-ethanol

(0.6 : 1 v/v) to remove hemoglobin (21). Then, 50 μ L of CAT buffer, 100 μ L of samples, and 1 mL of 10 mmol/L H_2O_2 were added to the samples. Detection was performed at 360 nm, and distilled water was used as a blank probe. SOD activity was determined by the epinephrine method of Misra and Fridovich (22). Briefly, 100 μ L of lysate and 1 ml of carbonate buffer were mixed, and then 100 μ L of epinephrine was added. Detection was performed at 470 nm.

Determination of GSH

The level of reduced glutathione (GSH) in plasma was determined spectrophotometrically, based on GSH oxidation via 5,5-dithiobis-6,2-nitrobenzoic acid. GSH extract was obtained by combining 0.1 mL of 0.1% EDTA, 400 μ L of plasma, and 750 μ L of precipitation solution (containing 1.67 g of metaphosphoric acid, 0.2 g of EDTA, 30 g of NaCl, and filled with distilled water until 100 mL;

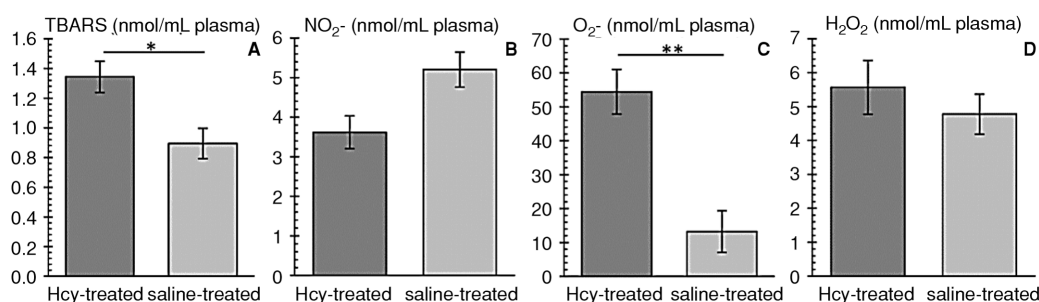


Figure 1. The values of oxidative stress biomarkers (TBARS, NO_2^- , O_2^- , H_2O_2) in the plasma of saline- and DL-Hcy-treated rats. Data are expressed as the means \pm SE; * p < 0.05, ** p < 0.01

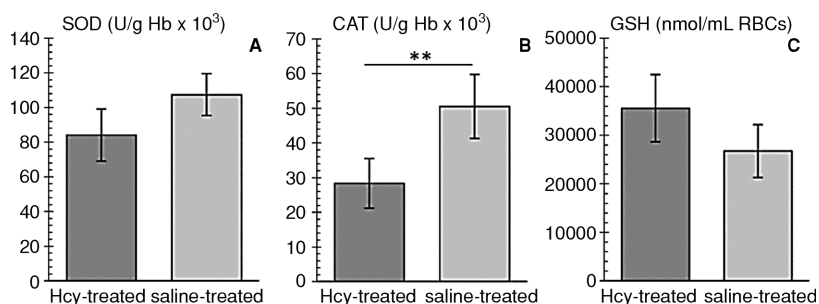


Figure 2. The values of enzymatic (SOD, CAT) and non-enzymatic (GSH) antioxidants in erythrocytes lysate of saline- and DL-Hcy-treated rats. Data are expressed as the means \pm SE; * p < 0.05, ** p < 0.01

Table 1. Differences in serum concentrations of homocysteine in saline- and DL-Hcy-treated rats. Data are expressed as the means \pm SE.

Effects of 2 weeks of treatment with DL-homocysteine on plasma homocysteine concentration	
Group	Values of total Hcy in plasma
Saline-treated	8.11 \pm 1.28 μ mol/L
DL-Homocysteine-treated	12.64 \pm 1.53 μ mol/L*

*Statistical significance compared with previous value (*p < 0.05, **p < 0.01)

the solution was stable for 3 weeks at +4°C). After mixing in the vortex machine and extracting on cold ice (15 min), the sample was centrifuged at 4000 rpm (10 min).

Detection was performed at 420 nm, and distilled water was used as a blank probe (20).

Drugs

All drugs used in this experimental protocol were provided by Sigma-Aldrich Chemie GmbH Eschenstr. 5, 82024 Taufkirchen, Germany.

Statistical analysis

The following basic descriptive statistics were determined for the experimental data: mean (\bar{x}), standard deviation (SD) and standard error mean (SEM). To test the normality of the distribution parameters, the Kolmogorov–Smirnov test was used. To test the statistical significance of the results and to confirm the hypothesis, Student's t-test (parametric test) was used for dependent and independent variables. A database analysis of the results was performed using software package SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A p-value = 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Homocysteine concentration

The total serum homocysteine concentration of DL-Hcy-treated rats was significantly higher than that of saline-treated animals (12.64 vs 8.11 μ mol/L) (Table 1).

Effects of DL-Hcy administration on systemic redox status

The values of TBARS and O₂⁻ were significantly higher while the value of CAT was significantly lower in the experimental group (subchronic administration of DL-Hcy) than in the control group (Figs. 1, 2).

Effects of L-methionine on biomarkers of oxidative stress

The application of L-methionine induced a significant decrease in NO₂⁻ levels and a significant increase in the production of O₂⁻ in saline-treated rats (control group). These levels also held during the washout period (Figs. 3B and 3C). On the other hand, L-methionine did not affect any examined oxidative stress biomarker in DL-Hcy-treated rats (Fig. 4).

Effects of L-cysteine on biomarkers of oxidative stress

The application of L-cysteine in the isolated hearts of control rats induced an increase in O₂⁻ production, while the values of H₂O₂ were significantly increased in the washout period compared with control values for that period (Figs. 3C and 3D). The administration of L-cysteine in the isolated hearts of DL-Hcy-treated rats induced a significant increase in NO₂⁻ and O₂⁻, and the values of both mentioned parameters decreased significantly during the washout period similar to the control values (Figs. 4B and 4C).

Effects of N-acetylcysteine (NAC) on biomarkers of oxidative stress

In the control group, the acute administration of N-acetylcysteine induced a decrease in TBARS, and this reduction continued during the washout period, with a statistically significant difference between the values at the end of the washout period and the control values (Fig. 3A). Furthermore, in DL-Hcy-treated rats, the administration of NAC induced a statistically significant increase in NO₂⁻ but did not change the values of any other oxidative stress biomarkers observed in this study (Fig. 4B).

Effects of inorganic sodium hydrogen sulfide (NaHS) on biomarkers of oxidative stress

The administration of NaHS induced a significant decrease in the control group and a significant

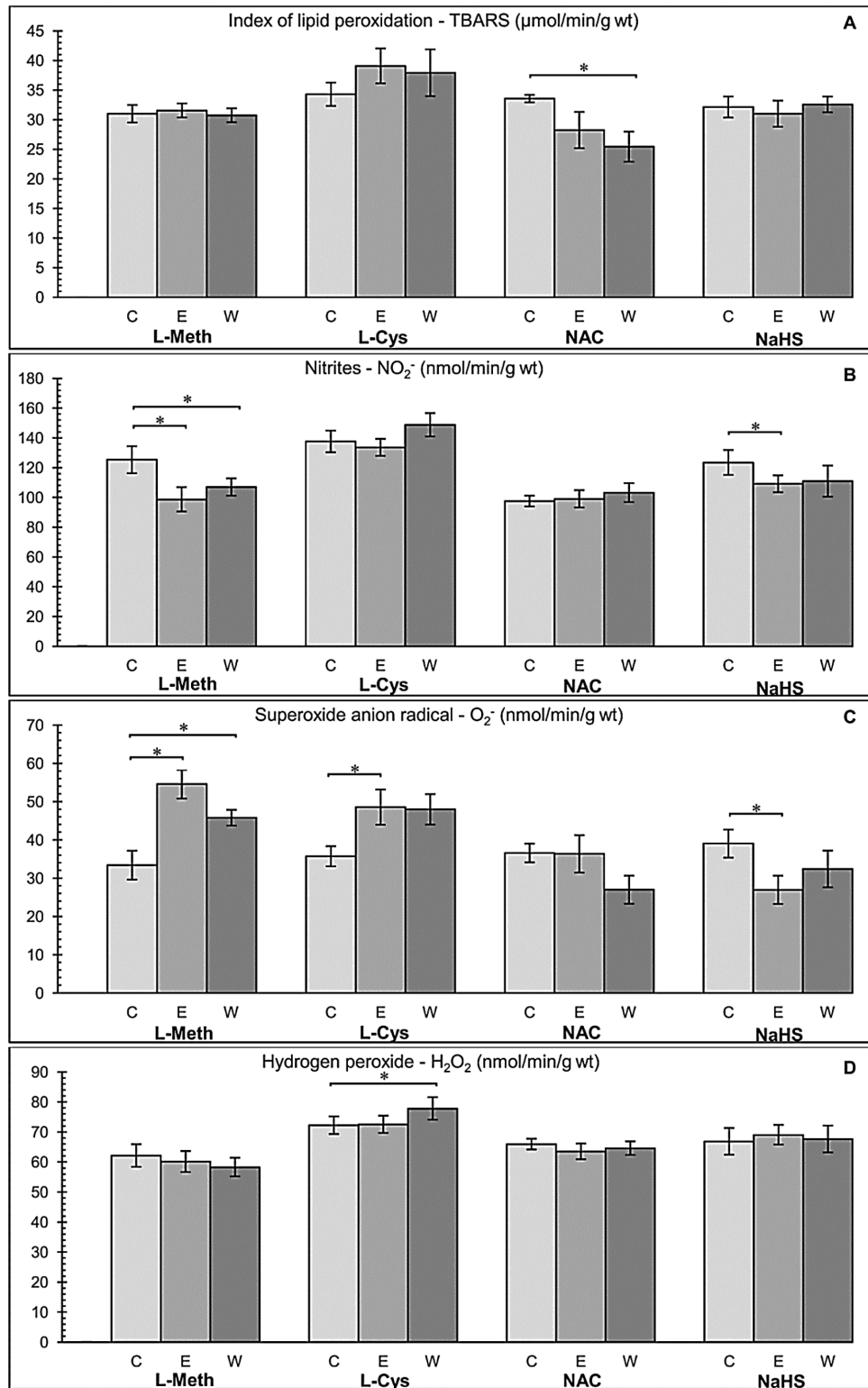


Figure 3. The values of oxidative stress biomarkers after acute administration of various sulfur-containing compounds (L-Meth, L-cysteine, NAC and NaHS) in saline-treated rats. The values were measured in 3 time periods (C, control; E, effect; W, washout). Data are expressed as the means \pm SE; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

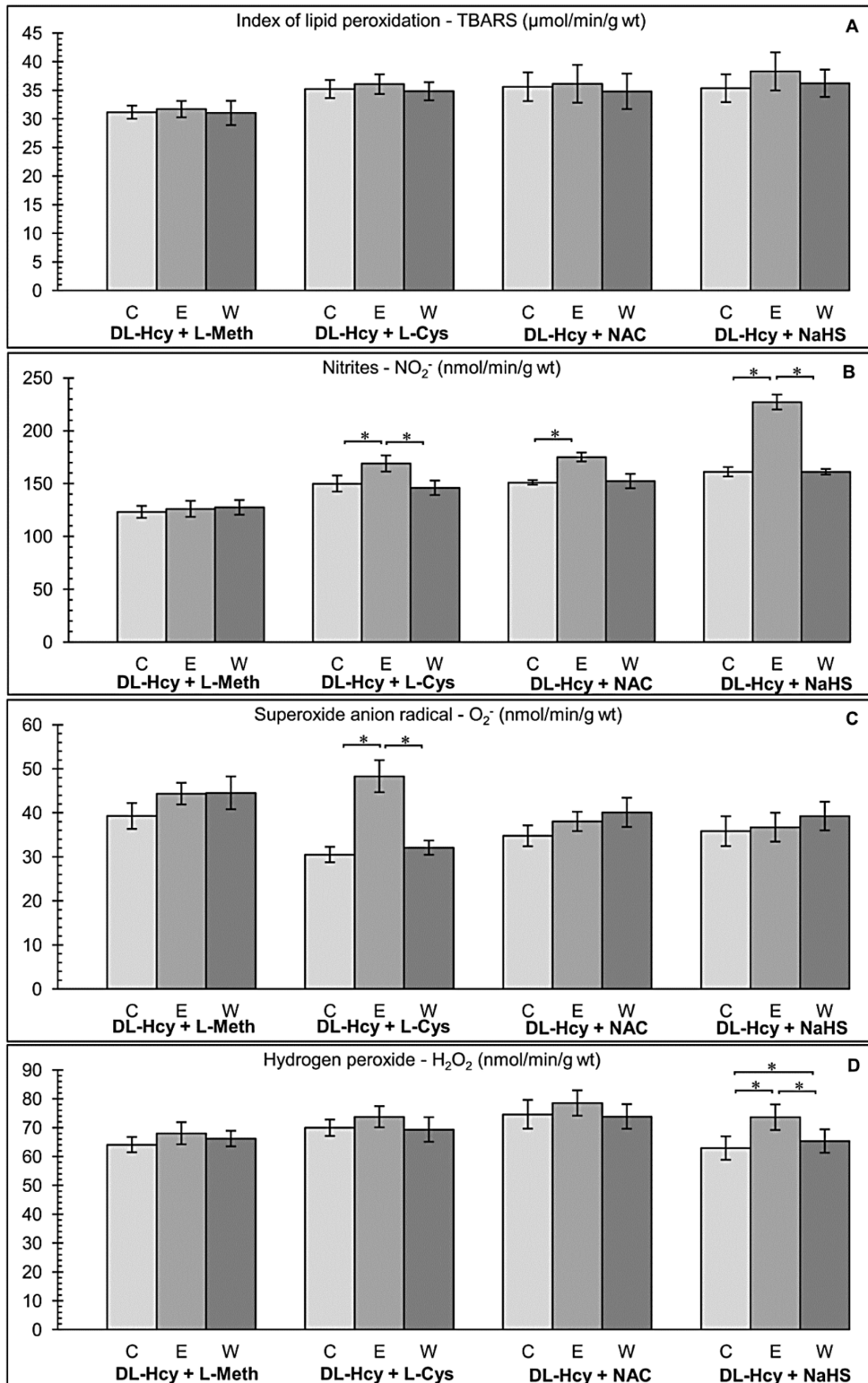


Figure 4. The values of oxidative stress biomarkers after acute administration of various sulfur-containing compounds (L-Meth, L-cysteine, NAC and NaHS) in DL-Hcy-treated rats. The values were measured in 3 time periods (C, control; E, effect; W, washout). Data are expressed as the means \pm SE; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

increase in NO₂⁻ in DL-Hcy-treated rats (Figs. 3B and 4B). During the washout period in DL-Hcy rats, the value of NO₂⁻ decreased significantly and reached values similar to those of the control group (Fig. 4B). Furthermore, the application of NaHS induced a significant reduction in O₂⁻ production in control rats and a significant increase in H₂O₂ production in DL-Hcy-treated rats (Figs. 3C and 4D). The values of H₂O₂ in DL-Hcy-treated rats decreased significantly during the washout period, but at the end of this period, these values were significantly higher than the control group (Fig. 4D).

Comparisons between groups depending on the effects of treatment of DL-Hcy and the point of sampling the effluent (control, effect or washout)

To estimate the effect of DL-Hcy treatment and point of sample collection (control, effect and washout) on observed parameters, as well as the effect size, data were analyzed by two-way ANOVA (Table 2). Effect size is shown through the parame-

ter partial eta squared (η_p^2). There was no statistically significant interaction between DL-Hcy treatment and point of sample collection on the value of any of the observed oxidative stress biomarkers regarding L-methionine application. On the other hand, NO₂⁻ varied significantly depending on the DL-Hcy treatment, while O₂⁻ varied significantly depending on the point of sample collection. In the case of L-cysteine application, there were statistically significant interactions between DL-Hcy treatment and point of sample collection on the values of NO₂⁻ and O₂⁻. Furthermore, NO₂⁻ varied significantly depending on the DL-Hcy treatment, and O₂⁻ varied significantly depending on both DL-Hcy treatment and point of sample collection. Similarly, there were statistically significant interactions between DL-Hcy treatment and point of sample collection on values of NO₂⁻ and O₂⁻ regarding NAC administration. However, in the case of NAC administration, all examined oxidative stress biomarkers varied depending on the DL-Hcy treatment. Analysis of

Table 2. Comparisons between groups depending on the DL-Hcy treatment and the point of sample collection (control, effect and washout).

L-methionine	TBARS		NO ₂ ⁻		O ₂ ⁻		H ₂ O ₂	
	Sig.	η_p^2	Sig.	η_p^2	Sig.	η_p^2	Sig.	η_p^2
DL-Hcy treatment	0.859	0.001	<u>0.017</u>	<u>0.160</u>	0.507	0.013	0.078	0.084
Sample collection time	0.867	0.009	0.289	0.072	<u>0.001</u>	0.334	0.860	0.009
DL-Hcy treatment and sample collection time interaction	0.998	0.001	0.132	0.115	0.069	0.150	0.596	0.031
L-cysteine	TBARS		NO ₂ ⁻		O ₂ ⁻		H ₂ O ₂	
	Sig.	η_p^2	Sig.	η_p^2	Sig.	η_p^2	Sig.	η_p^2
DL-Hcy treatment	0.397	0.024	<u>0.016</u>	<u>0.178</u>	<u>0.010</u>	<u>0.202</u>	0.264	0.041
Sample collection time	0.521	0.043	0.584	0.035	<u>0.001</u>	<u>0.497</u>	0.740	0.020
DL-Hcy treatment and sample collection time interaction	0.648	0.029	<u>0.040</u>	<u>0.193</u>	<u>0.031</u>	<u>0.207</u>	0.371	0.064
N-acetylcysteine	TBARS		NO ₂ ⁻		O ₂ ⁻		H ₂ O ₂	
	Sig.	η_p^2	Sig.	η_p^2	Sig.	η_p^2	Sig.	η_p^2
DL-Hcy treatment	<u>0.005</u>	<u>0.230</u>	<u>0.001</u>	<u>0.860</u>	<u>0.001</u>	<u>0.298</u>	<u>0.001</u>	<u>0.358</u>
Sample collection time	0.256	0.087	0.063	0.160	0.057	0.174	0.859	0.010
DL-Hcy treatment and sample collection time interaction	0.356	0.067	<u>0.039</u>	<u>0.194</u>	<u>0.021</u>	<u>0.227</u>	0.572	0.037
NaHS	TBARS		NO ₂ ⁻		O ₂ ⁻		H ₂ O ₂	
	Sig.	η_p^2	Sig.	η_p^2	Sig.	η_p^2	Sig.	η_p^2
DL-Hcy treatment	0.059	0.121	<u>0.001</u>	<u>0.830</u>	<u>0.006</u>	<u>0.228</u>	0.867	0.001
Sample collection time	0.922	0.005	<u>0.001</u>	<u>0.445</u>	<u>0.023</u>	<u>0.221</u>	0.285	0.080
DL-Hcy treatment and sample collection time interaction	0.634	0.030	<u>0.001</u>	<u>0.564</u>	<u>0.012</u>	<u>0.255</u>	0.560	0.038

NaHS application showed statistically significant interactions between DL-Hcy treatment and point of sample collection on values of NO_2^- and O_2^- , and both mentioned parameters significantly varied depending on the DL-Hcy treatment and point of sample collection. Values of η_p^2 followed the p values in all mentioned parameters. Namely, η_p^2 values were always higher in cases where the p -value indicated statistical significance.

DISCUSSION AND CONCLUSION

The aim of this study was to assess the effect of acute, direct administration of various sulfur-containing compounds (L-meth, L-cysteine, NAC and NaHS) on oxidative stress biomarkers in saline- and DL-Hcy-treated rats, distinguish the early changes of redox balance in the myocardium induced by Hcy, and measure the effects of applied sulfur-containing compounds on these changes.

Based on the biochemical evaluation at the termination of treatment, we confirmed that sub-chronic (2 weeks long) administration of DL-Hcy at the dose of 0.45 $\mu\text{mol/g}$ body weight twice a day led to a significant increase in plasma Hcy levels (Table 1) but did not induce hyperhomocysteinemia (HHcy). However, the values of plasma Hcy were lower than 15 $\mu\text{mol/L}$, which is defined as the limit value for HHcy (23). These results support those found by Timkova and colleagues who used the same experimental protocol and obtained similar values of Hcy (11).

In the first part of our study, we compared the systemic redox status of healthy rats and rats treated with DL-Hcy to examine the effects of the sub-chronic DL-Hcy administration. Our data showed that 2 weeks of subcutaneous DL-Hcy administration at a dose of 0.45 $\mu\text{mol/g}$ body weight twice a day induced an increase in TBARS levels and ROS, such as superoxide anion radicals (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2), but reduced NO_2^- levels (Fig. 1). Our results are consistent with the results obtained by Kolling and coauthors. They showed that chronic DL-Hcy application (twice a day, 0.3–0.6 $\mu\text{mol/g}$ body weight, 22 days) increased TBARS and decreased NO in the hearts of young Wistar albino rats (24). TBARS values were also compatible with the previously mentioned investigation by Timkova and colleagues (23). Decreased values of NO_2^- reflect decreased NO bioavailability and disturbed endothelial function. Decreased NO production during HHcy is a consequence of the decreased activity of constitutive isoforms of nitric oxide synthase (NOS), endothelial and neuronal, and the

increased activity of inducible NOS, uncoupling of endothelial NOS, and the consequent increase of O_2^- production, which reacts with NO and results in the production of one of the most toxic forms of ROS, peroxynitrite (ONOO^-) (25). Reactive oxygen species, such as O_2^- and H_2O_2 , are also generated during the oxidation and auto-oxidation of thiol groups in Hcy (26). These ROS are considered to be one of the primary causes for the endothelial cytotoxicity of DL-Hcy. Chang and coauthors showed stimulation of ROS generation by 0.5 and 1.0 mmol/L Hcy in rat vascular smooth muscle cells (VSMC) (27). The same study also demonstrated that CAT activity in VSMC was inhibited by Hcy, which is consistent with the results of our research. (Fig. 2). Our results for antioxidative enzymes activity are also similar to those of a previously mentioned study by Kolling and coauthors (24). The decrease of antioxidative enzyme activity may be another mechanism responsible for the oxidative stress injury induced by homocysteine.

In the next part of our study, we explored the effects of acute, direct administration of sulfur-containing amino acids (L-Meth, L-Cys, and NAC) or NaHS on redox status by measuring the levels of some oxidative stress parameters (TBARS, NO_2^- , O_2^- and H_2O_2) in the coronary venous effluent of saline- and DL-Hcy-treated rats.

Our data showed that acute application of L-Meth induced a decrease in NO_2^- and an increase in O_2^- in saline-treated rats, while the acute application of L-Meth did not affect the observed oxidative stress parameters in DL-Hcy-treated rats (Figs. 3B, 3C and 4). Soares and coworkers investigated the effects of acute Meth exposure (0.4 g/kg, subcutaneous injection) on oxidative stress parameters in the cerebral cortex of young rats. Their results showed a significant increase in ROS (3 h after) and SOD (1 h after), while CAT was reduced at 1 h and 3 h after Meth administration (28). Costa and coauthors also demonstrated that acute treatment with Meth alters lipid peroxidation, carbonyl content, ROS levels, and SOD and CAT activities in the liver of young rats (29). The difference in the effects of L-Meth between the control and DL-Hcy-treated groups may be the consequence of altered intracellular Hcy and L-Meth metabolic pathways.

The direct application of L-Cys induced an increase in the measured ROS values (during application: O_2^- ; during washout period: H_2O_2) in saline-treated rats and a significant increase in NO_2^- and O_2^- in DL Hcy-treated rats (Figs. 3C, 3D, 4B, and 4C). A previous study by Hogg proposed that the increased level of Cys induces thiol-dependent

oxidative stress due to this higher auto-oxidative potential and that Hcy reduces cystine to cysteine (30). On the other hand, some data suggests L-Cys has protective effects, indicating the double-edged sword of compounds containing thiol groups in terms of their antioxidant/pro-oxidant properties. Shackebaei and other authors showed the protective effects of L-Cys in the heart when preconditioned with 0.5 mmol/L L-Cys before long-term ischemia and suggested several potential mechanisms. However, considering the pathophysiological concept of preconditioning, it is possible that a mild increase in free radical production increases cell survival after ischemia and reperfusion (12, 13). Differences in the effects of L-Cys among the abovementioned studies may be the consequence of different experimental protocols, suggesting that L-Cys may exert various effects depending on the mechanism of administration or that our perception of its effects depends on the time of the measurement and the measured biomarkers.

The administration of NAC resulted in a significant decrease of TBARS in saline-treated rats and in a significant increase in NO_2^- in DL-Hcy-treated rats (Figs. 3A and 4B). NAC is an antioxidant, although its exact mechanisms of action are still unclear. Literature data suggest its sulfhydryl group sparing potentials are responsible for its cell-protecting properties. NAC is a scavenger of free radicals, binds to transition metals, and restores intracellular GSH levels (31). An increase in NO_2^- levels in DL-Hcy-treated rats suggest an increase in NO production, which may be the part of the protective mechanism of NAC. However, other authors also demonstrated that NAC can increase NO production and restore endothelial dysfunction induced by Hcy (32).

The acute administration of NaHS induced a significant decrease in NO_2^- and O_2^- in the saline-treated group and a significant increase in NO_2^- and H_2O_2 in DL-Hcy-treated rats (Figure 3B, 3C, 4B and 4D). Zhang and coworkers induced cardiac dysfunction with a single dose of isoprenaline (ISO) and concluded that the application of NaHS can mitigate ISO-induced changes in the myocardium by decreasing ISO-induced ROS production (33). Namely, NaHS decreases the activity of NADPH oxidase, resulting in a reduction in ROS formation and oxidative stress. The results of all these studies are consistent with those on the antioxidative effects of NaHS of saline-treated rats of this study, except that NaHS did not exhibit an antioxidative effect in Hcy-treated rats. On the other hand, Jiang and colleagues found that NaHS at a dose of 1 mmol/L induced a

decrease in oxygen consumption in hiPSC-derived cortical neurons, primary human fibroblasts, and COS-7 monkey kidney cells (34). These authors proposed two ways to explain the NaHS-increased oxidative stress observed: sulfide from NaHS can react directly with oxygen to form reactive oxygen species, and sulfide can serve as a substrate for complex II of the mitochondrial electron transport chain. Based on these results and results from our investigation, we concluded that NaHS may have a protective or harmful effect depending on the mode of administration and the administered dose.

Furthermore, based on our obtained results, we concluded that homocysteine induces considerable changes in the function of the cardiovascular system even before the increase in plasma homocysteine values. Homocysteine affects redox balance, increases ROS production, decreases antioxidative defenses and acts as an overall pro-oxidant. Because the effects of the investigated sulfur-containing compounds varied considerably depending on the action of homocysteine, some of them may yield completely opposite effects depending on whether they act in the presence of homocysteine.

Conflict of interest

All authors of the present paper disclose that they have no actual or potential conflicts of interest, including any financial, personal, or other relationships with people or organizations.

Acknowledgments

This project was supported by the Ministry of Science and Technical Development of the Republic of Serbia (Grant no. 175043) and the Junior Project 04/2011 of the Faculty of Medical Sciences at University of Kragujevac, Serbia.

REFERENCES

1. Pizzino G., Irrera N., Cucinotta M., Pallio G., Mannino F. et al.: *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017, 8416763 (2017).
2. Ooi B.K., Goh B.H., Yap W.H.: *Int. J. Mol. Sci.* 18, E2336 (2017).
3. Adameova A., Xu Y.J., Duhamel T.A., Tappia P.S., Shan L. et al.: *Curr. Pharm. Des.* 15, 3094 (2009).
4. Prabhakaran D., Anand S., Watkins D., Gaziano T., Wu Y. et al.: *Lancet* 391, 1224 (2018).
5. Xiao Y., Su X., Huang W., Zhang J., Peng C. et al.: *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 67, 158 (2015).

6. Chung H.S., Wang S.B., Venkatraman V., Murray C.I., Van Eyk J.E.: *Circ. Res.* 112, 382 (2013).
7. Schöneich C.: *Antioxid. Redox. Signal.* 26, 388 (2017).
8. Martínez Y., Li X., Liu G., Bin P., Yan W. et al.: *Amino. Acids.* 49, 2091 (2017).
9. Škovierová H., Vidomanová E., Mahmood S., Sopková J., Drgová A. et al.: *Int. J. Mol. Sci.* 17, E1733 (2016).
10. Steed M.M., Tyagi S.C.: *Antioxid. Redox. Signal.* 15, 1927 (2011).
11. Timkova V., Tatarkova Z., Lehotsky J., Racay P., Dobrota D. et al.: *Mol. Cell. Biochem.* 411, 261 (2016).
12. Shackebaei D., King N., Shukla B., Suleiman M.S.: *Mol. Cell. Biochem.* 277, 27 (2005).
13. Elsey D.J., Fowkes R.C., Baxter G.F.: *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 15, 53 (2010).
14. Ulbink J.B., Vermak W.J.H., Bissbort S.: *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* 565, 441 (1991).
15. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K.: *Anal. Biochem.* 95, 351 (1979).
16. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S. et al.: *Anal. Biochem.* 126, 131 (1982).
17. Auclair C., Voisin E.: in: *Handbook of Methods for oxygen radical research*, Greenvald R.A. Ed., p. 123, CRC Press Une, Boca Raton 1985.
18. Pick E., Keisari Y.: *J. Immunol. Methods.* 38, 161 (1980).
19. McCord J.M., Fridovich I.: *J. Biol. Chem.* 244, 6056 (1969).
20. Beutler E.: in: *Manual of biochemical Methods*, Beutler E. Ed. p. 105, Grune and Stratton, New York 1982.
21. Tsuchihashi M.: *Biochem. Z.* 140, 65 (1923).
22. Misra H.P., Fridovich I.: *J. Biol. Chem.* 247, 3170 (1972).
23. Cesari M., Rossi G.P., Sticchi D., Pessina A.C.: *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 15, 140 (2005).
24. Kolling J., Scherer E.B., Cunha A.A., Cunha M.J., Wyse A.T.: *Cardiovasc. Toxicol.* 11, 67 (2010).
25. Pushpakumar S., Kundu S., Sen U.: *Curr. Med. Chem.* 21, 3662 (2014).
26. Ramakrishnan S., Sulochana K.N., Lakshmi S., Selvi R., Angayarkanni N.: *Indian. J. Biochem. Biophys.* 43, 275 (2006).
27. Chang L., Xu J., Zhao J., Pang Y., Tang C. et al.: *Acta. Pharmacol. Sin.* 25, 341 (2004).
28. Soares M.S.P., Viau C.M., Saffi J., Costa M.Z., da Silva T.M. et al.: *Metab. Brain. Dis.* 32, 1693 (2017).
29. Costa M.Z., Silva T.M., Flores N.P., Schmitz F., Scherer E.B.S. et al.: *Mol. Cell. Biochem.* 384, 21 (2013).
30. Hogg N.: *Free. Radic. Biol. Med.* 27, 28 (1999).
31. Samuni Y., Goldstein S., Dean O.M., Berk M.: *Biochim. Biophys. Acta.* 1830, 4117 (2013).
32. Liu Y.H., You Y., Song T., Wu S.J., Liu L.Y.: *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 50, 155 (2007).
33. Zhang Z., Jin S., Teng X., Duan X., Chen Y. et al.: *Nitric. Oxide.* 67, 10 (2017).
34. Jiang J., Chan A., Ali S., Saha A., Haushalter K.J. et al.: *Sci. Rep.* 6, 20831 (2016).

Received: 20. 06. 2018

THE EFFECTS OF L-ARGININE AND L-NAME ON CORONARY FLOW AND OXIDATIVE STRESS IN ISOLATED RAT HEARTS

Tanja Sobot¹, Amela Matavulj¹, Vladimir Jakovljević², Tamara Nikolić³, Vladimir Živković², Ivan Srejšević³, Nevena Jeremić³ and Dragan Djurić⁴

¹Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Banja Luka, Republic of Srpska

²Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

³Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

⁴Institute of Medical Physiology "Richard Burian", Faculty of Medicine, University of Belgrade, Serbia

EFEKTI L-ARGININA I L-NAME NA KORONARNI PROTOK I OKSIDACIONI STRES IZOLOVANOG SRCA PACOVA

Tanja Šobot¹, Amela Matavulj¹, Vladimir Jakovljević², Tamara Nikolić³, Vladimir Živković², Nevena Jeremić³, Dragan Đurić⁴

¹Katedra za fiziologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Banja Luci, Republika Srpska

²Katedra za fiziologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Srbija

³Katedra za farmaciju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Srbija

⁴Institut za medicinsku fiziologiju "Rihard Burijan", Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija

Received / Priljubljen: 01.09.2015.

Accepted / Prihvaćen: 09.09.2015.

ABSTRACT

The aim of this experimental study was to assess the effects of the acute administration of L-arginine alone and in combination with L-NAME (a non-selective NO synthase inhibitor) on the coronary flow and oxidative stress markers in isolated rat hearts. The experimental study was performed on hearts isolated from Wistar albino rats ($n=12$, male, 8 weeks old, body mass of 180-200 g). Retrograde perfusion of the isolated preparations was performed using a modified method according to the Langendorff technique with a gradual increase in the perfusion pressure (40–120 cmH₂O). The following values were measured in the collected coronary effluents: coronary flow, released nitrites (NO production marker), superoxide anion radical and the index of lipid peroxidation (measured as thiobarbiturate reactive substances). The experimental protocol was performed under controlled conditions, followed by the administration of L-arginine alone (1 mmol) and L-arginine (1 mmol) + L-NAME (30 μmol). The results indicated that L-arginine did not significantly increase the coronary flow or the release of NO, TBARS and the superoxide anion radical. These effects were partially blocked by the joint administration of L-arginine + L-NAME, which indicated their competitive effect. Hence, the results of our study do not demonstrate significant effects of L-arginine administration on the coronary flow and oxidative stress markers in isolated rat hearts.

Key words: L-arginine, L-NAME, redox status, isolated heart, rats

SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja je bio procena efekata akutne administracije L-arginina na koronarni protok i markere oksidacionog stresa, samostalno i/ili u prisustvu L-NAME (neselektivni inhibitor NO sintaze), na izolovanim srcima pacova. Ovo je eksperimentalna studija, koja je sprovedena na izolovanom srcu Vistar albino soja pacova ($n = 12$, muški, 8 nedelja, telesna masa 180-200g). Retrogradna perfuzija izolovanih organa se sprovodila modifikovanom tehnikom prema Langendorffu, sa postepenim povećanjem perfuzionog pritiska (40–120 cmH₂O). Nakon izmerenog koronarnog protoka, u prikupljenim uzorcima koronarnog efluenta mereni su sledeći parametri: nivoi azot monoksida (u formi nitrita), superoksid anjon radikala i indeksa lipidne peroksidacije (meren kao TBARS). Eksperimentalni protokol je sproveden pod strogo kontrolisanim uslovima, i podrazumeva administraciju samo L-arginina (1 mmol), i administraciju L-arginina (1 mmol) u kombinaciji sa L-NAME (30 μmol). Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da L-arginin neznatno povećava koronarni protok, neznatno povećava nivo azot monoksida, TBARS-a i superoksid anjon radikala. Ovakav efekat je delimično blokiran u slučaju zajedničke administracije L-arginin+L NAME što ukazuje na njihovu kompetitivnost. Dakle, rezultati našeg istraživanja ne pokazuju statistički značajne efekte primene L-arginina na koronarni protok i markere oksidacionog stresa izolovanog srca pacova.

Ključne reči: L-arginin, L-NAME, redoks status, izolovano srce, pacovi

INTRODUCTION

L-arginine (2-amino-5-guanidinovaleric acid) is a basic, conditionally essential amino acid that enters an organism via the diet or is obtained by the degradation of body proteins or endogenous *de novo* synthesis (1). This semi-essential amino acid takes part in numerous key biochemical and physiological activities.

During the last decades of the 20th century, L-arginine was identified as a precursor of nitric oxide synthesis (NO) (2). Specifically, it represents the key source of NO synthase in many cells of an organism (3). NO is produced during the transformation of L-arginine to L-citrulline in a reaction catalysed by NO synthase (NOS) (4–7).



The L-arginine/NO system is one of the crucial players in the maintenance of microvascular homeostasis. Additionally, NO causes vasodilatation, improves microcirculation by stimulating endothelial proliferation and angiogenesis, and inhibits endothelial apoptosis, the release of endothelin-1, the proliferation of smooth muscular cells and thrombocyte aggregation and adhesion (8).

Endothelial dysfunction is one of the earliest markers of vascular abnormality. It is present in cardiovascular diseases linked to the increased production of reactive oxygen species (ROS) or the state of oxidative stress (9, 10). Cell damage caused by ROS (the most significant among which are the superoxide anion radical and hydroxyl radical) is a significant causal factor of heart diseases, particularly those that present with myocardial ischemia-reperfusion damage (11). Many authors have demonstrated the production and release of free radicals in the ischemic heart, including their intensive release during the reperfusion period (12, 13, 14). The rapid recovery of blood flow increases tissue oxygenation with a consequential secondary production of ROS, leading to reperfusion injury (15). One of the possible mechanisms underlying ROS-mediated cardiovascular diseases is the reduced production of endothelium-dependent vasodilatory substances (16), of which NO is the most significant (17). Moreover, the L-arginine-dependent enzyme arginase is up-regulated in response to the reduction in NO bioavailability during oxidative stress (9).

Because NO is an endothelial-dependent relaxing factor that plays an essential role in the regulation of the vascular tonus and haemodynamics, there has been interest for decades in the application of L-arginine for the prevention and treatment of cardiovascular diseases (18). L-arginine appears to provide "hope" for the treatment of cardiovascular diseases. Based on results obtained to date, oral or parenteral administration of this amino acid seems to recuperate endothelial function and improve coronary microcirculation. L-arginine affects atherosclerotic risk factors (hypercholesterolemia, hypertension, and smoking) by improving endothelial functions in these patients (8).

However, the exact role of the L-arginine/NO system within the coronary circulation is still unknown due to reports of controversial data.

The aim of the present study was to examine the effects of L-arginine alone or in combination with a non-selective NOS inhibitor (N^G -nitro-L-arginine monomethyl ester, L-NAME) on the coronary flow, oxidative stress markers and nitrites in hearts isolated from rats.

MATERIAL AND METHODS

Preparation of isolated rat hearts

Isolated hearts (total number $n=12$, 6 preparations for each experimental group; rejected hearts did not contribute to the total number) were obtained from Wistar albino rats (male, 8 weeks old, body mass of 180 - 200

g; obtained from the VMA - Military Medical Academy, Belgrade, Serbia) and perfused with a modified apparatus according to the method of Langendorff (Hugo-Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Germany). The animals were euthanised by cervical dislocation following administration of a short ether anaesthetic with the anticoagulant heparin (Schedule 1 of the Animals/Scientific Procedures, Act 1986, United Kingdom). Following the emergency thoracotomy and the induction of heart failure via the superfusion of cold physiological solvent, the heart was quickly prepared and isolated by the removal of all redundant parts (with the exception of ascending aorta, which was cannulated to provide retrograde perfusion under gradually increasing coronary perfusion pressure (CPP)). Krebs-Henseleit buffer was used for retrograde perfusion (in mmol/l: NaCl 118, KCl 4.7, $CaCl_2 \times 2H_2O$ 2.5, $MgSO_4 \times 7H_2O$ 1.7, $NaHCO_3$ 25, KH_2PO_4 1.2, glucose 11, and pyruvate 2). The buffer was balanced with 95% O_2 and 5% CO_2 , with a pH value of 7.4 and temperature of 37°C. In all preparations, an electrostimulator (Hugo-Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH) ensured the heart rate and its regularity (5 V, 320 bpm) via electrodes set in the atrial region.

Physiological examination and experimental protocol

Following the establishment of heart perfusion, the preparations were stabilised within 30 minutes with a basal coronary perfusion pressure of 60 cmH_2O . During the stabilisation of the preparations, the reactivity of the coronary blood vessels was examined by short occlusion of coronary flow (5-30 s) and bolus injection of 5 mmol/l adenosine (60 μ l at a flow rate of 10 ml/min to obtain the maximum flow). The preparations were rejected (approximately 25%) unless an increase in the flow of 100% was achieved compared to the control values for both tests. Following the stabilisation period, the perfusion pressure was reduced to 50 and 40 cmH_2O and then gradually increased to 70, 80, 90, 100, 110 and 120 cmH_2O to establish coronary autoregulation. At each given value of coronary perfusion pressure a value of flow was noted for at least 5 minutes. When the flow was determined to be stable, samples of coronary effluent were collected for each value of perfusion pressure. The correctly performed control experiment (control values in each experimental group) included the double examination of coronary perfusion pressure/coronary flow in the absence of any medication. The main goal was to confirm that the preparation was stable and that the response between the first and second series of changes in perfusion pressure were not significantly different. Following the control experimental protocol, the preparations were perfused with L-arginine (1 mmol) and L-arginine (1 mmol) plus an NO synthesis inhibitor (30 μ l L-NAME). Testing started immediately after the control experiment to avoid unwanted time-de-



pendent consequences. The administration of medicines lasted until the achievement of a stable flow but not under 5 minutes for each value of perfusion pressure. The results obtained during the experimental protocol (coronary flow, superoxide anion radical concentration, released nitrites and index of lipid peroxidation) were compared to the results obtained after the administration of L-arginine and L-arginine + L-NAME.

Biochemical analysis

Samples of coronary venous effluent were collected after the stabilisation of the coronary flow for each value of the gradually increased perfusion pressure. We performed the spectrophotometric determination of nitrites, superoxide anion radicals and the index of lipid peroxidation indirectly via reactive thiobarbituric substances (TBARS) for all samples.

Determination of nitrites

Nitric oxide quickly decomposes into stable metabolite nitrites/nitrates. Nitrites are used as an index of NO production via a spectrophotometric method using the Griess reagent. Briefly, 0.5 ml of the perfusate is precipitated with 200 μ l of 30% sulfosalicylic acid, mixed for 30 minutes and centrifuged at 3000 \times g. Equal volumes of the supernatant and Griess reagent are mixed and stabilised for 10 minutes in the dark, and then the sample is measured spectrophotometrically at a wavelength of 543 nm. The nitrite concentrations are determined using sodium nitrite as the standard (19).

Determination of superoxide anion radicals

Superoxide anion radical concentrations are measured using the NTB (Nitro Blue Tetrazolium) reagent in TRIS buffer (assay mixture) with coronary venous effluent. The measurement was performed at a wavelength of 530 nm. The Krebs-Henseleit solvent was used as the blank control (20).

Determination of the index of lipid peroxidation (TBARS)

The index of lipid peroxidation was determined indirectly by measuring the products of the reaction of lipid peroxidation with thiobarbituric acid (TBARS or Thiobarbituric Acid Reactive Substances). Briefly, 1% thiobarbituric acid (TBA) in 0.05 M NaOH is incubated with coronary venous effluent at 100°C for 15 minutes and then spectrophotometrically measured at a wavelength of 530 nm. The Krebs-Henseleit solvent was used as the blank control (21).

Reagents

The L-arginine and L-NAME solvents were obtained as a gift from the Biomedical Sciences Department of the

Academy of Sciences of Slovakia (Bratislava, Republic of Slovakia). A set of reagents for the spectrophotometric determination of nitrites (naphthyl ethylenediamine dihydrochloride and sulfosalicylic acid) were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Sulfanilamide, phosphorous acid, NTB, TRIS-puffer and TBA were purchased from Merck KGaA Company (Darmstadt, Germany).

Statistical analysis

Values were expressed as the arithmetic mean + S.E.M. A multifactorial analysis of variance with repeated measures was performed. In this model, different values of CPP were given as within-subject factors, whereas the application of a treatment was provided as a measurement of the difference between subjects. A *p* value less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Coronary flow

The coronary flow exhibited a significant increase that was proportional to the coronary perfusion pressure over the whole range of perfusion pressure values studied in both the control and study groups. Under the control conditions, the coronary flow varied in the range from 3.00 \pm 0.86 ml/min/g of tissue mass (wt) at 40 cmH₂O to 8.57 \pm 1.77 ml/min/g wt at 120 cmH₂O. L-arginine did not induce a significant change in the coronary flow (range from 3.65 \pm 1.02 at 40 cmH₂O to 10.93 \pm 2.80 ml/min/g wt at 120 cmH₂O) (Fig. 1).

L-arginine + L-NAME did not induce a significant reduction in the coronary flow compared to the control group. Under the control conditions, the coronary flow varied in the range from 3.15 \pm 0.66 ml/min/g wt at 40

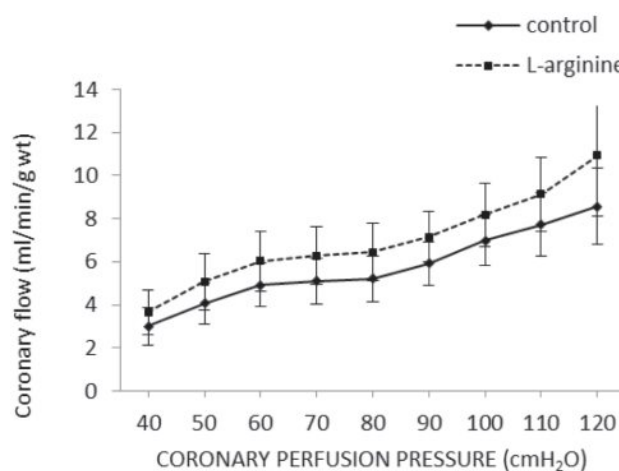


Figure 1. Effects of L-arginine (1 mmol) on the coronary flow at different coronary perfusion pressures (CPP). Each value represents the mean \pm SE and is expressed relative to the control. A *p* value < 0.05 was considered to be significant. **p* < 0.05.

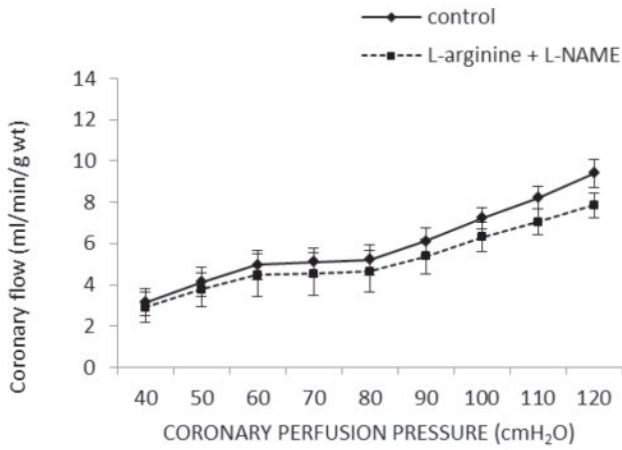


Figure 2. Effects of L-arginine + L-NAME (1 mmol + 30 μ mol) on the coronary flow at different coronary perfusion pressures (CPP). Each value represents the mean \pm SE and is expressed relative to the control. A p value $<$ 0.05 was considered to be significant. * p $<$ 0.05.

cmH₂O to 9.40 ± 0.67 ml/min/g wt at 120 cmH₂O. In the treated group, the flow ranged from 2.90 ± 0.72 ml/min/g wt at 40 cmH₂O to 7.85 ± 0.60 ml/min/g wt at 120 cmH₂O (Fig. 2).

Nitrite outflow

Under the control conditions, the nitrite outflow varied from 1.04 ± 0.32 nmol/min/g wt at 40 cmH₂O to 2.93 ± 0.90 nmol/min/g wt at 120 cmH₂O. L-arginine did not induce a significant increase in the nitrite outflow (range from 1.28 ± 0.48 nmol/min/g wt at 40 cmH₂O to 3.89 ± 1.23 nmol/min/g wt at 120 cmH₂O) (Fig. 3). Additionally, there was no significant difference between the groups in the dynamics of the increase in the nitrite outflow with increasing CPP.

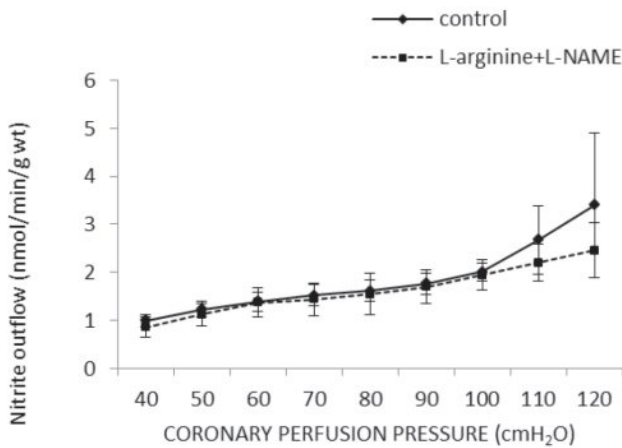


Figure 4. Effects of L-arginine + L-NAME (1 mmol + 30 μ mol) on the nitrite outflow at different coronary perfusion pressures (CPP). Each value represents the mean \pm SE and is expressed relative to the control. A p value $<$ 0.05 was considered to be significant. * p $<$ 0.05.

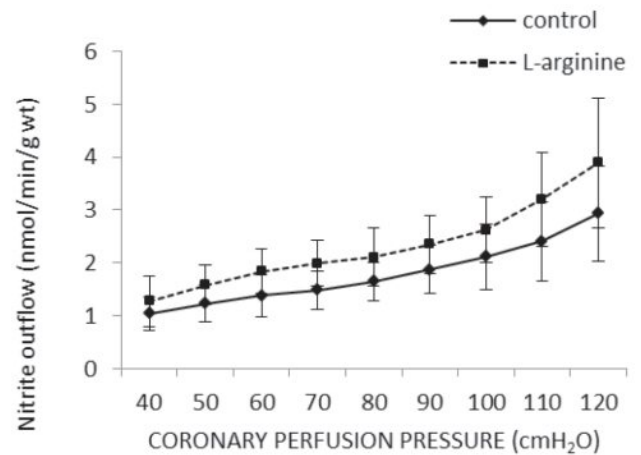


Figure 3. Effects of L-arginine (1 mmol) on the nitrite outflow at different coronary perfusion pressures (CPP). Each value represents the mean \pm SE and is expressed relative to the control. A p value $<$ 0.05 was considered to be significant. * p $<$ 0.05.

L-arginine + L-NAME induced a significant decrease in the nitrite outflow compared to the control group. Under the control conditions, the values changed in the range from 1.00 ± 0.13 nmol/min/g wt at 40 cmH₂O to 1.50 nmol/min/g wt at 120 cmH₂O; in the treated group, the values changed from 0.86 ± 0.21 nmol/min/g wt at 40 cmH₂O to 2.46 ± 0.58 nmol/min/g wt at 120 cmH₂O (Fig. 4). The nitrite concentrations increased as the CPP increased in both groups.

Superoxide anion production

L-arginine did not induce significant changes in the superoxide anion radical (O_2^-) levels. However, a significant increase in O_2^- levels was noted in both groups as the CPP increased. Under the control conditions, O_2^- production

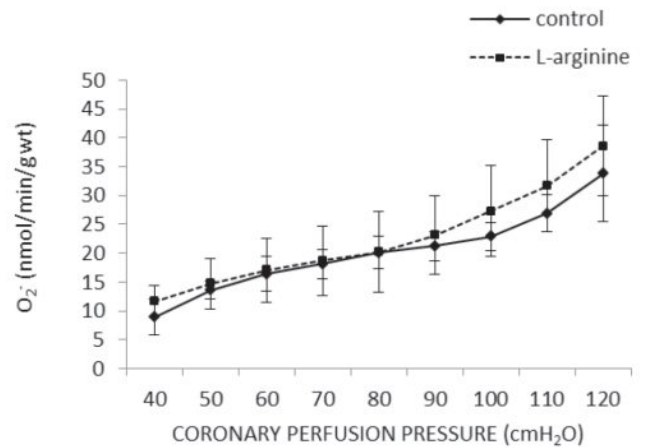


Figure 5. Effects of L-arginine (1 mmol) on superoxide anion production at different coronary perfusion pressures (CPP). Each value represents the mean \pm SE and is expressed relative to the control. A p value $<$ 0.05 was considered to be significant. * p $<$ 0.05.



varied from 8.90 ± 3.09 nmol/min/g wt at $40 \text{ cmH}_2\text{O}$ to 33.79 ± 8.40 nmol/min/g wt at $120 \text{ cmH}_2\text{O}$; in the treated group, O_2^- production varied from 11.63 ± 2.67 nmol/min/g wt at $40 \text{ cmH}_2\text{O}$ to 38.61 ± 8.67 nmol/min/g wt at $120 \text{ cmH}_2\text{O}$ (Fig. 5).

L-arginine + L-NAME also did not significantly affect superoxide anion production compared with the control values (Fig. 6).

Index of lipid peroxidation (TBARS production)

Under the control conditions, the TBARS production varied from 0.51 ± 0.40 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ wt at $40 \text{ cmH}_2\text{O}$ to 1.38 ± 0.69 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ wt at $120 \text{ cmH}_2\text{O}$. L-arginine did not significantly affect the TBARS production at any CPP value (range from 0.57 ± 0.16 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ wt at $40 \text{ cmH}_2\text{O}$ to 1.80 ± 0.88 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ wt at $120 \text{ cmH}_2\text{O}$) (Fig. 7).

Conversely, L-arginine + L-NAME significantly decreased the TBARS production compared with the control values (decreased from 32.7% at $40 \text{ cmH}_2\text{O}$ to 50.2% at $120 \text{ cmH}_2\text{O}$) (Fig. 8). Indeed, the difference in TBARS production between the groups increased concomitantly with the CPP values.

DISCUSSION

The present study was performed to assess the intracoronary effects of the acute administration of L-arginine and L-arginine in combination with L-NAME (a non-specific NO synthase inhibitor) on isolated rat hearts under different coronary perfusion pressure conditions ($40\text{--}120 \text{ cmH}_2\text{O}$). The results obtained under the control conditions were compared with those obtained after the administration of L-arginine and L-arginine + L-NAME. Variations in the tested parameters in different groups of animals under the control conditions were presented for the purpose of biological diversity.

Our results showed that the acute administration of L-arginine (compared to the control group for all values of applied CPP) did not significantly increase the coronary flow or any of the estimated oxidative stress parameters (NO, O_2^- , and TBARS) (Figs. 3-8).

The administration of L-arginine + L-NAME did not significantly reduce the coronary flow compared to the control group, although the differences were more evident at the higher CPP values (CPP $90\text{--}120 \text{ cmH}_2\text{O}$, which were out of the autoregulatory range). Moreover, the NO and O_2^- concentrations were not significantly reduced compared to the control group. However, L-arginine + L-NAME significantly reduced the TBARS value, especially at higher CPP values (CPP $90\text{--}120 \text{ cmH}_2\text{O}$).

The L-arginine/NO system plays an important role in the control of the basal tonus of coronary blood vessels and is involved in the coronary autoregulation of the

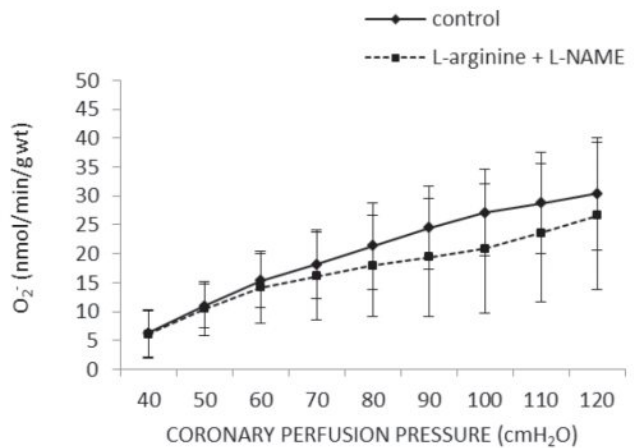


Figure 6. Effects of L-arginine + L-NAME (1 mmol + 30 μmol) on superoxide anion production at different coronary perfusion pressures (CPP). Each value represents the mean \pm SE and is expressed relative to the control. A p value < 0.05 was considered to be significant. * $p < 0.05$.

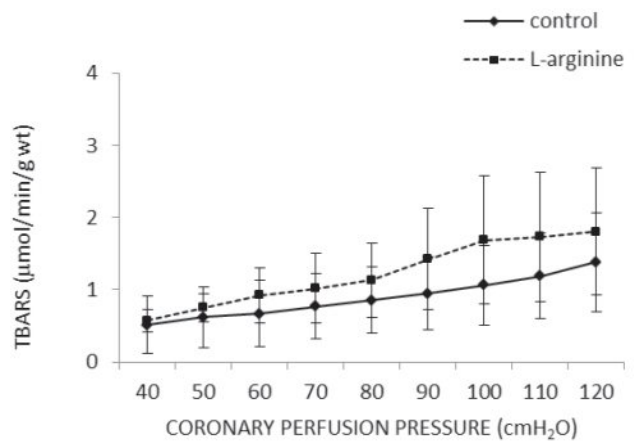


Figure 7. Effects of L-arginine (1 mmol) on TBARS production at different coronary perfusion pressures (CPP). Each value represents the mean \pm SE and is expressed relative to the control. A p value < 0.05 was considered to be significant. * $p < 0.05$.

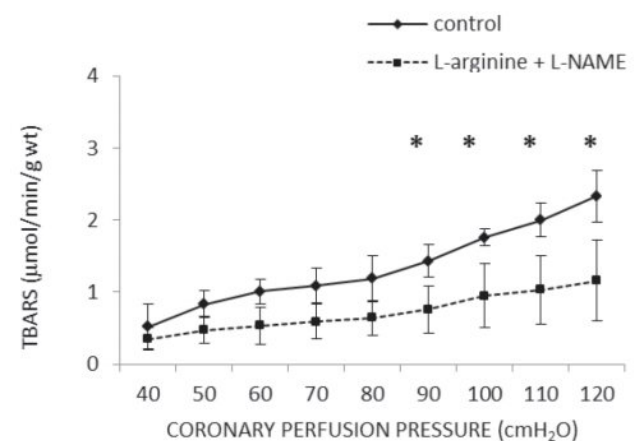


Figure 8. Effects of L-arginine + L-NAME (1 mmol + 30 μmol) on TBARS production at different coronary perfusion pressures (CPP). Each value represents the mean \pm SE and is expressed relative to the control. A p value < 0.05 was considered to be significant. * $p < 0.05$.



isolated rat heart. The isolated rat hearts exhibited autoregulation of the coronary flow between 50 and 80 cmH₂O of coronary perfusion pressure. Below the autoregulatory range the coronary flow slowly went down and above range the value more than doubled (22), which was in line with our results.

Our experimental data showed that the acute exogenous entry of arginine might increase the production of NO and NO-mediated vasodilatation despite the fact that the intracellular concentration of arginine was far beyond the *K_m* (*Michaelis-Menten constant*) for eNOS. The *K_m* for L-arginine is 2.9 μmol/l (8, 23–27). The intracellular concentration of arginine in endothelial cells is 0.8–2 mmol/l (8, 27), which suggests that the available intracellular L-arginine is more than sufficient for NO production. Based on this observation, intracellular arginine can provide full saturation of eNOS; thus, the endothelial production of NO should not depend on the extracellular concentration of L-arginine. However, the NO production increases in a dose-dependent manner when the concentration of L-arginine increases in endothelial cell cultures (28). Moreover, the increase in the plasmatric value of L-arginine is connected with the increase in vascular NO production. This biochemical phenomenon (or discrepancy) is designated the “arginine paradox”. Theories explaining the arginine paradox include the low basal values of L-arginine in diseased states such as hypertension and hypercholesterolemia, intracellular variations in the concentrations of L-arginine or the potential presence of enzyme inhibitors. Identified competitive inhibitors of NOS include N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA), N^G-nitro-L-arginine (L-NNA), N^G-nitro-L-arginine monomethyl ester (L-NAME) and asymmetric dimethylarginine (ADMA).

Extracellular L-arginine appears to play a significant role in NO synthesis through membrane-linked eNOS. The constitutive transport system that facilitates the entry of arginine into endothelial cells is a cation amino acid transporter (CAT-1). CAT-1 and eNOS are physically connected in the caveolae in endothelial cells (29), which suggests the existence of a direct supply of extracellular arginine to eNOS.

Whether extracellular L-arginine changes the rate of arginine transport to the cell and contributes to the improvement in NO synthesis or whether the intracellular concentration in the microdomains of a cell plays a more important role in the modulation of NO synthesis are unknown (30).

The vascular endothelium plays an important role in vascular physiology. Attention has especially been focused on the endothelial production of NO (endogenous messenger molecules), including the different endothelial-mediated physiological effects in the vascular system. Because endothelial dysfunction is the basis of numerous diseases (atherosclerosis, hypertension, and diabetes mellitus) and is linked with the reduced production of endothelial NO, supplementation with L-arginine (donor NO)

could be considered as therapeutic approach to these diseases. Therefore, many researchers are interested in the therapeutic possibilities of L-arginine, including whether supplementation with L-arginine can increase NO production and thereby improve vascular health. The effects of the oral or parenteral administration of L-arginine on vascular health and diseases have been examined in both human and animal models.

Böger et al (31) studied the clinical pharmacology of L-arginine and concluded that the response of the organism to the administration of L-arginine depended on the specific characteristics of the cardiovascular disease, vascular segments and morphology of the arteries of the examinee. Undesired effects of L-arginine administration are rare and are mainly mild and dose-dependent. The results obtained from a number of animal studies (animal models with damaged endothelial-dependent NO biological functions, including hypercholesterolemic rabbits, hypertensive rats, and hyperlipidemic monkeys) suggested that the administration of L-arginine *in vivo* improved vascular health by increasing NO production. Both acute and chronic administration of L-arginine improved endothelial-dependent vasodilatation, whereas chronic administration also modulated other NO-dependent vascular functions, such as the reduction of leukocyte adhesion, inhibition of thrombocyte aggregation and proliferation of smooth muscular cells.

In their review paper, Preli et al (27) summed up the results of studies (animal and human) involving the oral supplementation of L-arginine on the formation of atherosclerotic lesions. The results from hypercholesterolemic animals generally showed beneficial effects. L-arginine appeared to inhibit the progression of atherosclerotic plaques and protect endothelial functions. Moreover, L-arginine affected other mediators of atherosclerosis, including circulating inflammatory cells and thrombocytes. In contrast to the positive results obtained in the animal studies, differences were observed in the human studies.

Some previous experimental and clinical studies indicated that L-arginine could improve the antioxidant status (32–35). L-arginine was reported to act as a free radical scavenger, inhibit the activity of pro-oxidant enzymes and thus act as an antioxidant; these roles of L-arginine were mediated by NO. Tripathi et al (32) indicated that oral supplementation with L-arginine (3 g/day for 7 days) in ischemic patients increased the superoxide dismutase (SOD) level, total thiols (T-SH) and the plasma ascorbate levels, but these increases were not significant. This study demonstrates that L-arginine administration may be beneficial for patients with myocardial ischemic disorders, such as acute myocardial infarction and acute angina. Huang et al (36) suggested that L-arginine supplementation reduced the oxidative damage and inflammatory response of skeletal muscles, liver and kidneys caused by exhaustive exercise in young rats. The rats were fed with 2% L-



arginine diet for 30 days, and this supplementation increased the antioxidant enzyme level although the increase was not significant. In the study by Lucotti et al (33), oral supplementation with L-arginine (8.3 g/day) concurrent with a weight loss diet for 21 days increased the SOD levels in obese, insulin-resistant type 2 diabetic patients. The use of different doses and weight loss diets combined with L-arginine supplementation may explain the different results. Similarly, Jabeca et al (37) reported that the oral administration of L-arginine (2 g/day for 28 days) significantly increased the TAS (total antioxidant status) level in the plasma from patients with mild hypertension. This study confirms the hypothesis that augmented concentrations of L-arginine stimulate NO biosynthesis, which leads to a reduction in oxidative stress.

The results of our study clearly show a non-significant effect of L-arginine on the coronary flow and oxidative stress markers in isolated rat hearts. However, research interested in the application of L-arginine for the treatment of cardiovascular diseases should be continued. Long-term random clinical studies are necessary (27, 31) to obtain "broad and clear" scientific knowledge in the field.

Acknowledgments

This work was supported by the Ministry of Science and Technical Development of the Republic of Serbia (Grant No. 175043) and the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac (Junior Project 04/2011).

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Luiking YC, Ten Have GA, Wolfe RR, Deutz NE (2012) Arginine de novo and nitric oxide production in disease states. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303:E1177-E1189
2. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333:664-666
3. Signorello MG, Pascale R, Leoncini G (2003) Transport of L-arginine and nitric oxide formation in human platelets. *Eur J Biochem* 270(9):2005-12
4. Toda N, Tanabe S, Nakanishi S (2011) Nitric Oxide-Mediated Coronary Flow Regulation in Patients with Coronary Artery Disease: Recent Advances. *Int J Angiol* 20(3):121-134
5. Govers R, Rabelink TJ (2001) Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *AJP- Renal Physiology* 280:193-206
6. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109-42
7. Förstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33(7):829-837
8. Tousoulis D, Antoniadis C, Tentolouris C, Goumas G, Stefanadis C, Toutouzas P (2002) L-arginine in cardiovascular disease: dream or reality? *Vasc Med* 7(3):203-11
9. Kuo L, Hein TW (2013) Vasomotor Regulation of Coronary Microcirculation by Oxidative Stress: Role of Arginase. *Front Immunol* 4:237
10. Kuo L, Thengchaisui N, Hein TW (2012) Regulation of Coronary Vasomotor Function by Reactive Oxygen Species. *Mol Med Ther* 1(1):1000101
11. Vergely C, Perrin C, Laubriet A, Oudot A, Zeller M, Guillan JC, Rochette L (2001) Postischemic myocardial recovery and oxidative stress status of vitamin C deficient rat hearts. *Cardiovasc. Res* 51:89-99
12. Blasig IE, Shuter S, Garlic P, Slater T (1994) Relative time-profile for free radical trapping, coronary flow, enzyme leakage, arrhythmias and function during myocardial reperfusion. *Free Radic. Biol. Med* 16:35-41
13. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T (2000) Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 18:655-673
14. Guaiquil VH, Golde DW, Beckles DL, Mascareno EJ, Siddiqui MAQ (2004) Vitamin C inhibits hypoxia induced damage and apoptotic signaling pathways in cardiomyocytes and ischemic hearts. *Free Radic Biol Med* 37:1419-1429
15. Maxwell SR, Lip GY (1997) Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options 58:95-117
16. Ajay M, Mustafa MR (2006) Effects of ascorbic on impaired vascular reactivity in aortas isolated from age-matched hypertensive and diabetic rats. *Vascul Pharmacol* 45:127-133
17. Gewalting MT, Kojda G (2002) Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res* 55:250-260
18. Wu G, Meininger CJ (2000) Arginine Nutrition and Cardiovascular Function. *J Nutr* 130(11): 2626-2629
19. Green LC, Wagnwr DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite and (15 N) nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131-138
20. Auclair C, Voisin E (1985) Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA (ed) *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp123-132
21. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351-358
22. Kostic MM, Petronijevic MR, Jakovljevic VL (1996) Role of nitric oxide (NO) in the regulation of coronary circulation. *Physiol Res* 45(4):273-8



23. Shin S, Mohan S, Fung HL (2011) Intracellular L-arginine concentration does not determine No production in endothelial cells: implications on the “ L-arginine paradox”. *Biochem Biophys Res Commun* 414:660-3
24. Vukosavljevic N, Jaron D, Barbee KA, Buerk DG (2006) Quantifying the L-arginine paradox in vivo. *Microvasc Res* 71:48-54
25. Zhang C, Hein TW, Wang W, Chang CI, Kuo L (2001) Constitutive expression of arginase in microvascular endothelial cells counteracts nitric oxide- mediated vasodilatory function. *FASEB J* 15:1264-6
26. Flam BR, Eichler DC, Solomonson LP (2007) Endothelial nitric oxide production is tightly coupled to the citrulline – NO cycle. *Nitric Oxide* 17:115-21
27. Preli RB, Klein KP, Herrington DM (2002) Vascular effects of dietary L-arginine supplementation. *Atherosclerosis* 162:1-15
28. Harrison DG (1997) Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 100:2153-57
29. Mc Donald KK, Zharikov S, Block ER, Kilberg MS (1997) A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and eNOS may explain the “ Arginine paradox”. *J Biol Chem* 272:31213-16
30. Chin – Dusting JP, Willems L, Kaye DM (2007) L-arginine transporters in cardiovascular disease: A novel therapeutic target. *Pharmacol Ther* 116(3): 428-36
31. Böger RH, Boge-Böger SM (2001) The clinical pharmacology of L-arginine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:79-99
32. Tripathi P, Misra MK. Therapeutic role of L-arginine on free radical scavenging system in ischemic heart diseases. *Indian J Biochem Biophys.* 2009;46(6):498–502
33. Lucotti P, Setola E, Monti LD, Galluccio E, Costa S, Sandoli EP. et al. Beneficial effects of a long-term oral L-arginine treatment added to a hypocaloric diet and exercise training program in obese, insulin-resistant type 2 diabetic patients. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291(5):E906–12
34. Jabecka A, Ast J, Bogdaski P, Drozdowski M, Pawlak-Lemaska K, Cielewicz AR. et al. Oral L-arginine supplementation in patients with mild arterial hypertension and its effect on plasma level of asymmetric dimethyl-arginine, L-citrulline, L-arginine and antioxidant status. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*2012;16(12):1665–74
35. Ren W, Yin Y, Liu G, Yu X, Li Y, Yang G. et al. Effect of dietary arginine supplementation on reproductive performance of mice with porcine circovirus type 2 infection. *Amino Acids.* 2012;42(6):2089–94
36. Huang CC, Lin TJ, Lu YF, Chen CC, Huang CY, Lin WT. Protective effects of L-arginine supplementation against exhaustive exercise-induced oxidative stress in young rat tissues. *Chin J Physiol.*2009;52(5):306–15
37. Jabecka A, Ast J, Bogdaski P, Drozdowski M, Pawlak-Lemaska K, Cielewicz AR. et al. Oral L-arginine supplementation in patients with mild arterial hypertension and its effect on plasma level of asymmetric dimethyl-arginine, L-citrulline, L-arginine and antioxidant status. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*2012;16(12):1665–74