



Општи подаци и протокол истраживања

Назив Пројекта :

ЕФЕКТИ ХОМОЦИСТЕИНА И ХОМОЦИСТЕИНУ-СРОДНИХ СУПСТАНЦИ НА ИЗОЛОВАНО СРЦЕ ПАЦОВА: УЛОГА ГАСНИХ ТРАНСМИТЕРА NO, H₂S I CO

Кључне речи :

хомоцистеин, кардиоваскуларни систем, NO, H₂S и CO, хиперхомоцистеинија, оксидативни стрес

Предмет, садржај и циљ истраживања

Сажетак

Циљ овог истраживања је да на моделу ретроградно перфундованог изолованог срца по Лангендорфу утврди ефекте акутне администрације хомоцистеина и хомоцистеину-сродних супстанци (DL homocysteina и DL homocistein tiolaktona), као и ефекте хроничне хиперхомоцистеиније, на срчани мишић и коронарну циркулацију пацова, као и могуће механизме добијених ефеката. Од могућих механизма пре свега ће се испитивати учешће гасних сигналних ендогених молекула - NO, H₂S и CO, применом одговарајућих инхибитора (за NO: L-NAME, инхибитор NO синтазе; за CO: цинкпротопорфирин/ZnPP IX, инхибитор HO 1 хем оксигеназе; за H₂S: DL propargilglycin, инхибитор CSE), а затим и различитих параметара оксидативног стреса (нитрита (NO₂-), супероксид ањон радикала (O₂-), липидних пероксида (TBARS), супероксид дисмутазе (SOD), каталазе (CAT), глутатион пероксидазе (GSHPx) и глутатион редуктазе (GR)), који учествују у одржавању нормалне функције и структуре кардиоваскуларног система. Добијени резултати ће послужити бољем сагледавању ефеката хомоцистеина и хомоцистеину-сродних супстанци на кардиоваскуларни систем. У добијеним одговорима ће се проценити допринос гасних, ендогено синтетисаних сигналних молекула NO, H₂S и CO, као и појединих параметара оксидативног стреса, односно утврдити њихов значај у кардиоваскуларној хомеостази.



Циљ истраживања

Циљ овог истраживања је да на моделу ретроградно перфундованог изолованог срца по Лангендорфу утврди ефекте акутне администрације хомоцистеина и хомоцистеину-сродних супстанци (DL homocisteina i DL homocistein tiolaktona), као и ефекте хроничне хиперхомоцистеинемике, на срчани мишић и коронарну циркулацију пацова, као и могуће механизме добијених ефеката. Од могућих механизма пре свега ће се испитивати учешће гасних сигналних ендогених молекула - NO, H₂S и CO, применом одговарајућих инхибитора (за NO: L-NAME, инхибитор NO синтазе; за CO: цинкпротопорфирин/ZnPP IX, инхибитор HO 1 хем оксигеназе; за H₂S: DL propargilglycin, инхибитор CSE), а затим и различитих параметара оксидативног стреса (нитрита (NO₂-), супероксид анјон радикала (O₂-), липидних пероксида (TBARS), супероксид дисмутазе (SOD), каталазе (CAT), глутатион пероксидазе (GSHPx) и глутатион редуктазе (GR)), који учествују у одржавању нормалне функције и структуре кардиоваскуларног система.

Актуелност истраживања

Дуго времена се веровало да је хиперхомоцистеинемична независан фактор ризика за атеросклерозу, међутим многобројне клиничке студије нису са сигурношћу потврдиле овакав закључак. Истовремено утврђени су многобројни штетни ефекти хомоцистеина, а који су између осталог јасно повезани са оксидативним стресом, као и са „хомоцистеинилизацијом протеина“ (нежељено формирање веза између СН група аминокиселина). Ранија истраживања су показала да је хронична хиперхомоцистеинемична удружена са штетним ремоделовањем и слабошћу срчаног мишића. Осим тога, постоји неколико референци које указују да акутно администрирани хомоцистеин доводи до смањења контракције срчаног мишића, али и коронарне вазодилатације, ефеката у којима не учествују NO или продукти ензима циклооксигеназе, али делимично учествује аденозин. Гасни трансмитер NO (продукт аминокиселине L-arginina) је познат као секундарни гласник у многим хомеостатским процесима, али је, између осталог, повезан и са дисфункцијом ендотела и ендокарда. Ендотелна и ендокардна дисфункција се јављају услед деловања фактора ризика (између осталих и хомоцистеина), али и као резултат дисбаланса у продукцији/разградњи NO и O₂-. Терапијске стратегије које имају циљ да повећају продукцију NO (и/или смање његову разградњу) и на друге начине побољшају функције ендотела, односно да смање продукцију O₂- (и/или повећају његову разградњу) представљају рационалан основ за истраживање на експерименталним моделима, као и за примену код људи. Гасни трансмитер H₂S је у физиолошком смислу секундарни гласник, који се ствара у ћелијама сисара у метаболизму аминокиселине L-cisteina. Његова токсичност је описана још 1713. године. Показано је да стимулише K(ATP) канале у васкуларним глатким мишићним ћелијама, остварујући функцију ендогеном отварача K(ATP) канала и делујући протективно у исхемичном миокарду и септичком шоку. Значајне количине H₂S стварају се у мозгу, активношћу ензима цистатион бета синтазе (CBS), или у кардиоваскуларном системуи глаткој мускулатури, активношћу ензима цистатион гама лиазае (CSE), где синергистички са NO доводи до релаксације глатке мускулатуре, вазодилатације и хипотензије, такође делујући антиоксидантно и антипролиферативно. Ови ефекти су значајни за одржавање вредности артеријског крвног



притиска и структуре крвних судова у физиолошким границама. Хронична администрација CSE инхибитора доводи до артеријске хипертензије код пацова, док је смањена продукција H_2S доказана у глаткој мускулатури спонтано хипертензивних пацова, затим у експерименталној хипертензији индукованој блокадом ензима NO синтазе и у хипоксичној плућној хипертензији. Дефицит H_2S доприноси атерогенези код неких пацијената са хиперхомоцистеинемом, а доприноси и развоју Алцхајмерове болести, док на другој страни ексцесивна продукција доводи до менталне ретардације код Дауновог синдрома и доприноси хипотензији изазваној септичким шоком. Описано је да H_2S инхибира оштећење срчаног мишића насталог акутном администрацијом хомоцистеина код пацова (интересантно је да и једна и друга супстанца садрже сумпор) мењајући активност миокардног митохондријалног респираторног ланца (ензими: сукцинат дехидрогеназа, цитохром оксидаза и манган супероксид дисмутаза). У регулацији активности H_2S укључени су C adenosil L metionin (SAM) и piridoksal 5 fosfat (витамин Б6), који су такође значајни регулатори метаболизма хомоцистеина. Гасни трансмитер CO се такође ендогено синтетиче дејством специфичног ензима хем оксигеназе (HO 1), и укључен је у одржавање структуре и функције кардиоваскуларног система, али и у патофизиологији кардиоваскуларних обољења, заједно са NO и H_2S . Сматра се да HO 1 има позитивне улоге у хомеостази кардиоваскуларног система, имајући у виду продукцију антиоксидантних и вазомодуларних супстанци које настају активацијом овог ензима. Описано је да модулација кључних ензима у синтези NO и H_2S значајно мења експресију HO 1 и продукцију CO.

Предмет и опис истраживања:

Предмет нашег истраживања је евалуација ефеката акутне администрације хомоцистеина и хомоцистеину-сродних супстанци, као и ефеката хроничне хиперхомоцистеинемие, на срчани мишић и коронарну циркулацију пацова, као и могуће механизме добијених ефеката. Наша пажња је посебно усмерена на гасне сигналне молекуле NO, H_2S и CO, који не учествују само у одржавању нормалне функције и структуре кардиоваскуларног система, већ показују и значајне штетне ефекте у патогенези кардиоваскуларних болести, као што је хипертензија, плућна хипертензија, септички шок и атеросклероза. Како се ради о супстанцама са физиолошким дејством и секундарним гласницима, кратког полуживота трајања, процена акутних ефеката администрације супстанци је метода избора.

Истраживање ће се радити на изолованом срцу пацова (Вистар, мушког пола, телесне масе 250 ± 50 г) методом ретроградне перфузије по Лангендорфу (раствор специјализованог састава за срце). Истраживање ће се радити у 9 експерименталних група (10 животиња у групи):

- 1) Контрола (физиолошки раствор)
- 2) DL homocistein ($10 \mu\text{mol/l}$)
- 3) DL homocistein tiolakton ($10 \mu\text{mol/l}$)
- 4) L-NAME ($30 \mu\text{mol/l}$)
- 5) ZnPP IX ($10 \mu\text{mol/l}$)
- 6) DL propargilglicin ($10 \mu\text{mol/l}$)
- 7) DL homocistein ($10 \mu\text{mol/l}$) + L-NAME ($30 \mu\text{mol/l}$)
- 8) DL homocistein ($10 \mu\text{mol/l}$) + ZnPP IX ($10 \mu\text{mol/l}$)



9) DL homocistein ($10\mu\text{mol/l}$) + DL propargilglicin ($10\mu\text{mol/l}$)

Супстанце ће се администрирати континуираном перфузијом (минимално 5мин) док се не постигне стабилни коронарни проток.

Од параметара оксидативног стреса спектрофотометријским методама ће се одређивати нитрити (по методи Green et al.), супероксид анјон радикал (по методи Auclair and Voisin), липидни пероксиди – TBARS (по методи Ohkawa et al.), супероксид дисмутаза (Misra and Fridovich), каталаза (Beutler), глутатион пероксидаза (Paglia and Valentine) и глутатион редуктаза (Glatzle et al.). Биохемијским методама ће се одређивати вредности укупног хомоцистеина (ELISA метод), хемоглобин (по Rabkin-у), метхемоглобин по Nailmayer-у).

Хронична хиперхомоцистеинемја - животиње ће током 8 недеља добијати храну:

- 1) богату метионином и дефицијентну фолном киселином, витамином Б₆ и Б₁₂ (Harlan Teklad TD97345, Harlan Teklad);
- 2) храну богату метионином са високим нивоом фолном киселином, витамином Б₆ и Б₁₂ (Harlan Teklad TD98002, Harlan Teklad);
- 3) стандардну храну за глодаре

Конципирано истраживање је експерименталног типа и припада групи основних истраживања. При експерименталном раду биће поштовани прописи о добробити лабораторијских животиња и правилник за рад са експерименталним животињама Медицинског факултета, Универзитета у Крагујевцу.

Статистичка обрада експерименталних података вршиће се на следећи начин:

- 1) За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, користиће се: фреквенција, проценти, узорачка средња вредност, узорачка медијана, узорачка стандардна девијација, ранг и 95% интервали поверења.
- 2) За испитивање нормалности расподеле користиће се тестови *Kolmogorov Smirnov* и *Shapiro Wilk*, и графици: хистограм и *normal QQ plot*.
- 3) За тестирање разлика између параметара, у зависности од њихове природе, користиће се Студентов т-тест, *Mann-Whitney* тест, Фишеров тест апсолутне вероватноће, једнофакторска или двофакторска анализа варијансе. Приликом тестирања разлика између параметара, у случају постојања више подгрупа, користиће се *Bonferroni* тест.
- 4) Статистичка обрада података ће се радити у статистичком пакету *SPSS 10.0 for Windows*.

Значај истраживања

Добијени резултати ће послужити бољем сагледавању ефеката хомоцистеина и хомоцистеину-сродних супстанци на кардиоваскуларни систем, што може бити од интереса имајући у виду физиолошки и клинички значај хомоцистеина. У добијеним одговорима ће се проценити допринос гасних, ендогено синтетисаних сигналних молекула NO, H₂S и CO, као и појединих параметара оксидативног стреса, односно утврдити њихов значај у кардиоваскуларној хомеостази.



Временски оквир

Планирано је да истраживање траје 2 године.

Литература

- 1) De Vriese AS, Blom HJ, Heil SG, Mortier S, Kluijtmans LA, Van de Voorde J, Lameire NH. Endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated renal vasodilatory response is impaired during acute and chronic hyperhomocysteinemia. *Circulation* 2004;109(19): 2331-6.
- 2) Auclair C, Voisin E. Handbook of methods for oxygen radical research; Greenvald, R. A, Ed.; Boca Raton, CRC Press: Inc, 1985: 123-132.
- 3) Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980; 38:161-70.
- 4) Green LC, Wagner, DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126: 131-138.
- 5) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
- 6) Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide-anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247: 3170-3175.
- 7) Beutler E. Catalase. In: Beutler E. Red cell metabolism, a manual of biochemical methods. New York: Grune and Stratton 1982; p.105-6.
- 8) Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70: 158-696.
- 9) Glatzle D, Vnillennier JP, Weber F, Decker U. Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia* 1974; 30: 665-667.