



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

Ирена Пушица

**Утицај састојака енергетских напитака на функцију
миокарда и оксидативни стрес у изолованом срцу и крви
пацова**

докторска дисертација

Ментор: Проф. др Душица Ђорђевић

КРАГУЈЕВАЦ, 2019.

За израду докторске дисертације дугујем велику захвалност

- Изузетном и јединственом *Професору др Владимиру Јаковљевић*, на указаном поверењу, пруженој шанси и великој људској и стручној помоћи, да остварим своје амбиције везане за науку;
- Менторки, *Професорки др Душици Ђорђевић*, за неисцрпну покретачку енергију, за сву помоћ, труд и време које је посветила за осмишљавање, реализацију и обликовање ове дисертације;
- *Професору др Владимиру Живковић* и *Доценту др Ивану Срејовић* за огроман ангажман у експерименталном извођењу истраживања;
- *Доц. Др Тамари Николић*, *Асс. Др Јасмини Сретеновић*, *Асс. Мр Јовани Јеремић*, *Асс. Мр Јовани Брадић*, *Асс. Мр Маји Јовановић* и *Асс. мр Катарини Радоњић*, које су поред обимног стручног ангажмана учиниле да време проведено у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију Факултета медицинских наука, остане у мом најлепшем могућем сећању;
- Мојим родитељима, *Слађани* и *Љубинку Петровић*, и брату *Игору* за подршку и оптимизам које сам добила у току школовања;
- Мом супругу, *Александру*, за несебичну помоћ и залагање да успем у остварењу свих својих снова, па и овог....

Дисертацију посвећујем мојој *дечици*, која ми својим осмесима улепшавају сваки дан

Валерији, Милутину, Драгутину

САДРЖАЈ

I	УВОД	1
.....		
1.1	ЕНЕРГЕТСКА ПИЋА	2
1.1.1	Састав енергетских пића	5
1.1.1.1	Кофеин	5
1.1.1.2	Таурин	11
1.1.1.3	Угљени хидрати	15
.....		
1.1.1.4	D-глукуроно-γ-лактон	16
1.1.1.5	Комплекс витамина Б	17
.....		
1.1.1.6	Други витамини и минерали	20
.....		
1.1.1.7	Гинсенг.....	21
1.1.1.8	Гуарана	21
1.1.1.9	L-карнитин	22
1.1.1.10	Гинко Билоба	23
.....		
1.1.1.11	Конзерванси и вештачке боје у енергетским пићима	24
.....		
1.1.2	Ефекти енергетских пића	24
.....		

1.2	КАРДИОДИНАМИКА	29
1.2.1	Инотропна (контрактилна) својства срца	34
1.2.2	Лузитропна (релаксатна) својства срца	42
1.2.3	Коронарни проток	46
1.2.4	Кардиодинамика и енергетска пића	50
1.2.4.1	Утицај енергетских пића на електричну активност срца	54
1.2.4.2	Утицај појединачних састојака енергетских пића на кардиодинамику	59
	...	
1.3	ОКСИДАТИВНИ СТРЕС	65
1.3.1	Прооксидативне врсте	66
1.3.1.1	Супероксид ањон радикал	68
1.3.1.2	Водоник пероксид	71
1.3.1.3	Хидроксил радикал	72
1.3.1.4	Липидна пероксидација	73
1.3.1.5	Азот моноксид	76
1.3.2.	Антиоксидативни систем	80
1.3.2.1	Супероксид дисмутаза	82
1.3.2.2	Каталаза	83
1.3.2.3	Глутатион и ензими глутатионског редокс циклуса	84
1.3.3.	Оксидативни стрес и енергетска пића	89
1.3.3.1	Утицај појединачних састојака енергетских пића на оксидативни стрес	95

..

II	ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	99
III	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	101
3.1	ЕТИЧКИ АСПЕКТИ	102
3.2	ИСПИТАНИЦИ	102
3.3	ПРОТОКОЛ ИЗВОЂЕЊА СТУДИЈЕ	102
3.3.1.	Тренажни протокол	103
3.3.2.	Састав испитиваног енергетског пића	103
3.3.3.	Жртвовање животиња и испитивање ефеката енергетског пића	105
3.4	КАРДИОДИНАМСКА МЕРЕЊА	108
3.4.1.	Изоловање срца пацова	108
3.4.2.	Ретроградна перфузија срца по Лангендорфу	109
3.5	ПАРАМЕТРИ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА	111
3.5.1.	Одређивање нивоа супероксид анјон радикала	112
3.5.2.	Одређивање нивоа водоник пероксида	113
3.5.3.	Одређивање нивоа азот монооксида	114
3.5.4.	Одређивање нивоа липидне пероксидације	115
3.6	БИОХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ	116
3.6.1.	Одређивање активности супероксид дисмутазе	116
3.6.2.	Одређивање активности каталазе	117

3.6.3.	Одређивање редукованог глутатиона	118
3.7	СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА	119
IV	РЕЗУЛТАТИ	120
4.1	КАРДИДИНАМИКА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	121
4.1.1.	Максимална стопа промене притиска у левој комори	121
4.1.2.	Минимална стопа промене притиска у левој комори	122
4.1.3.	Систолни притисак леве коморе	123
4.1.4.	Дијастолни притисак леве коморе	124
4.1.5.	Срчана фреквенца	125
4.1.6.	Коронарни проток	126
4.2	ОКСИДАТИВНИ СТРЕС У КОРОНАРНОМ ЕФЛУЕНТУ ПАЦОВА	127
4.2.1.	Супероксид анјон радикал	127
4.2.2.	Водоник пероксид	128
4.2.3.	Индекс липидне пероксидације	129
4.2.4.	Азот моноксид (нитрити)	130
4.3	ОКСИДАТИВНИ СТРЕС У КРВИ ПАЦОВА	131
4.3.1.	Антиоксидативна одбрана (супероксид дисмутаза, каталаза, редуковани глутатион)	131
4.3.2.	Прооксидативне врсте (супероксид анјон радикал, водоник пероксид, индекс липидне пероксидације, азот моноксид-нитрити)	132
4.4.	ЕФЕКТИ ЕП-а НА КАРДИДИНАМИКУ КОД НЕАКТИВНИХ ЖИВОТИЊА	133
4.4.1	Ефекти акутне администрације ЕП-а	133

4.4.2	Ефекти директне администрације ЕП-а	134
4.5	ЕФЕКТИ ЕП-а НА КАРДИОДИНАМИКУ КОД АКТИВНИХ ЖИВОТИЊА	135
4.5.1	Ефекти акутне администрације ЕП-а	135
4.5.2	Ефекти директне администрације ЕП-а	136
4.6	ЕФЕКТИ ХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕП-А НА КАРДИОДИНАМИКУ КОД НЕАКТИВНИХ ЖИВОТИЊА	137
4.7	ЕФЕКТИ ХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕП-А НА КАРДИОДИНАМИКУ КОД АКТИВНИХ ЖИВОТИЊА	138
4.8	ЕФЕКТИ ЕП-А НА КАРДИОДИНАМИКУ КОД НЕАКТИВНИХ ЖИВОТИЊА КОЈЕ СУ ХРОНИЧНО КОНЗУМИРАЛЕ ЕП-А	140
4.8.1	Ефекти акутне администрације ЕП-а	140
4.8.2	Ефекти директне администрације ЕП-а	141
4.9	ЕФЕКТИ ЕП-А НА КАРДИОДИНАМИКУ КОД АКТИВНИХ ЖИВОТИЊА КОЈЕ СУ ХРОНИЧНО КОНЗУМИРАЛЕ ЕП-А	142
4.9.1	Ефекти акутне администрације ЕП-а	142
4.9.2	Ефекти директне администрације ЕП-а	143
4.10	ЕФЕКТИ ЕП-а НА ОКСИДАТИВНИ СТРЕС У КОРОНАРНОМ ЕФЛУЕНТУ И КРВИ КОД НЕАКТИВНИХ ЖИВОТИЊА	144
4.10.1	Ефекти акутне администрације ЕП-а	144
4.10.2	Ефекти директне администрације ЕП-а	146
4.11	ЕФЕКТИ ЕП-а НА ОКСИДАТИВНИ СТРЕС У КОРОНАРНОМ ЕФЛУЕНТУ И КРВИ КОД АКТИВНИХ ЖИВОТИЊА	147
4.11.1	Ефекти акутне администрације ЕП-а	147
4.11.2	Ефекти директне администрације ЕП-а	149
4.12	ЕФЕКТИ ХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕП-А НА ОКСИДАТИВНИ СТРЕС У КОРОНАРНОМ ЕФЛУЕНТУ И КРВИ КОД НЕАКТИВНИХ ЖИВОТИЊА	149
4.13	ЕФЕКТИ ХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕП-А НА ОКСИДАТИВНИ СТРЕС У КОРОНАРНОМ ЕФЛУЕНТУ И	152

	КРВИ КОД АКТИВНИХ ЖИВОТИЊА	
4.14	ЕФЕКТИ ЕП-А НА ОКСИДАТИВНИ СТРЕС У КОРОНАРНОМ ЕФЛУЕНТУ И КРВИ КОД НЕАКТИВНИХ ЖИВОТИЊА КОЈЕ СУ ХРОНИЧНО КОНЗУМИРАЛЕ ЕП-А	154
4.14.1	Ефекти акутне администрације ЕП-а	154
4.14.2	Ефекти директне администрације ЕП-а	156
4.15	ЕФЕКТИ ЕП-А НА ОКСИДАТИВНИ СТРЕС У КОРОНАРНОМ ЕФЛУЕНТУ И КРВИ КОД АКТИВНИХ ЖИВОТИЊА КОЈЕ СУ ХРОНИЧНО КОНЗУМИРАЛЕ ЕП-А	157
4.15.1	Ефекти акутне администрације ЕП-а	157
4.15.2	Ефекти директне администрације ЕП-а	159
V	ДИСКУСИЈА	161
5.1	УТИЦАЈ ЕНЕРГЕТСКОГ ПИЋА НА КАРДИОДИНАМИКУ	162
5.2	УТИЦАЈ ЕНЕРГЕТСКОГ ПИЋА НА ОКСИДАТИВНИ СТРЕС И АНТИОКСИДАТИВНУ ОДБРАНУ	166
VI	ЗАКЉУЧЦИ	171
VII	ЛИТЕРАТУРА	174
VIII	СПИСАК СКРАЋЕНИЦА	207

I

УВОД

1.1 ЕНЕРГЕТСКА ПИЋА

Енергетска пића (ЕП-а) се дефинишу као функционална пића са стимулативним ефектима и јединственом комбинацијом карактеристичних састојака који укључују кофеин, таурин, витамине и друге супстанце са нутритивним или физиолошким ефектима. У ужем смислу, ЕП-а представљају пића са садржајем кофеина већим од 150 mg/L (BSDA, 2015). Термин функционална пића, подразумева да их не треба третирати као носиоце воде, односно као пића за гашење жеђи (Sadowska, 2012). Називају се још и стимулативна пића (Finnegan, 2003). Енергетски шотови су пића мале запремине, од 30 до 60 ml, која садрже већу концентрацију кофеина него класична ЕП-а, обично у опсегу од 100-350 mg (око 90-171 mg/30ml) (Arria & O'Brien, 2011). ЕП-а не треба поистовећивати са спортским пићима, која представљају комбинацију угљених хидрата и електролита, и формулисана су у сврху побољшања спортских перформанси и за рехидратацију, а за разлику од ЕП-а не садрже кофеин. Насупрот њима, због садржаја кофеина, конзумација ЕП-а се не сматра одговарајућим избором за поновно успостављање нормалних функција у телу након физичког тренинга (нпр. за успостављање нормалне вредности срчане фреквенце) (Rotstein et al, 2013). Такође, концентрација угљених хидрата у ЕП-има је много већа (10-12%) него у спортским пићима (6-8%). Већи нивои угљених хидрата, у облику глукозе, могу да успоре апсорпцију воде у телу, што чини ова пића неприкладним за употребу током или након физичке активности (Finnegan, 2003).

Слика 1. Најпопуларнија ЕП-а (преузето са <https://cspinet.org>)



ЕП-а су настала у Европи и Азији током 60-их година прошлог века (Reissig et al., 2009). Од 2002. године популарност ЕП-а је у знатном порасту (Candow et al., 2009), а Red Bull® (RB) се сматра за једно од ЕП-а које се највише конзумира (Candow et al., 2009, Franks et al, 2012). RB је први пут произведен у Аустрији 1987. године (Reissig et al., 2009). ЕП-а су производи дизајнирани за повремену конзумацију од стране особа које су

изложене интензивном психофизичком напору (*Sadowska, 2012*). Користе се од стране потрошача у сврху обезбеђивања додатне енергије, повећања когнитивних и физичких перформанси, повећања/продолжавања будности, одржавања пажње, побољшања расположења, као и у сврху губитка телесне тежине (*McLellan & Lieberman, 2012, Ishak et al., 2012*). На почетку, спортисти су били највећи потрошачи ЕП-а, међутим данас највеће потрошаче представљају тинејџери и млади од 18 до 34 године, услед брзог начина живота и пријемчивости за рекламе за ову врсту производа (*Heckman et al., 2010a*). ЕП-а су лако доступна млађој популацији (*De Sanctis et al., 2017*), па је занимљива изјава једног од тинејџера - да се у свакој продавници, изузев продавница за животиње и намештај, продају ЕП-а (*Visram et al., 2017*).

Процењује се да око 65% конзумента ЕП-а има између 13 и 35 година и 65% су мушког пола (*Alsunni, 2011*). Око 34% младих особа конзумира ЕП-а редовно (*Heckman et al., 2010a*). Велики број конзумента ЕП-а није свестан садржаја кофеина, а ни осталих ефективних супстанци у ЕП-има и потенцијалним опасностима по здравље (*Trabulo et al., 2011, Chang et al., 2017*). Овакви подаци сугеришу неопходан развој превентивних мера у циљу смањења конзумације ЕП-а од стране адолесцената, као и лонгитудиналне студије у вези узрочних ефеката ЕП-а и утицаја на здравље (*Holubcikova et al., 2017*). Због тога се намеће потреба за спровођењем едукације јавности, а нарочито младих особа, о садржају ЕП-а и о могућим последицама услед њиховог прекомерног конзумирања (*El-Sabban, 2016*). Регулатором *EU 1169/2011* прописано је обележавање и стваљање у промет ЕП-а. Амбалажа ЕП-а треба да садржи ознаку на којој је наведен садржај кофеина, као и упозорење да се не препоручује деци, трудницама, дојиљама и особама које су осетљиве на кофеин (*Burrows et al., 2013, BSDA, 2015*). Међутим, законска регулатива ЕП-а је варијабилна широм света (*Burrows et al., 2013*), па на пример у Сједињеним америчким државама (САД), ЕП-а нису подложна ригорозним прописима јер се декларишу као дијететски суплементи (*Burrows et al., 2013, Mangi et al., 2017*), и на тај начин не захтевају одобрење од стране Food and Drug Administration (*Mangi et al., 2017*).

Упркос залагањима стручњака који креирају здравствену политику да продаја ЕП-а треба да буду забрањена особама млађим од 18 година, представници компанија која производе ЕП-а пропагирају став да су ЕП-а безбедна за тинејџере и одрасле (*Harris &*

Munsell, 2015). Запажа се енорман пораст броја хитних случајева повезаних са конзумацијом ЕП-а (*Shah et al., 2016*), док су до јуна 2014. године забележена 34 смртна исхода (<https://cspinet.org>). Сматра се да су за здраве особе ЕП-а релативно безбедна, ако се конзумирају умерено и одвојено од осталих стимуланаса као што је на пример алкохол. Наводи се да је велики број забележених озбиљних ризика по здравље услед конзумације ЕП-а, настао услед прекомерне конзумације ових напитака у кратком временском периоду или услед комбинације ових пића са другим стимулансима. Савет научника упућен компанијама које производе ЕП-а, је да би било корисно да истакну упозорење на овим производима за избегавање таквих навика (*Wassef et al., 2017*). Оквирне препоруке које се односе на конзумацију ЕП-а код адолесцената базирају се на ограничењу уноса на 250 ml ЕП-а дневно (*Sanchis-Gomar et al., 2015*), као и на избегавање конзумације ЕП-а пре, током и након физичких активности, а посебан опрез се препоручује особама са кардиоваскуларним обољењима (*Sanchis-Gomar et al., 2015, www.nfhs.org*).

Постоје бројна ограничења, у смислу да је већина истраживања о ЕП-има дизајнирана као студија пресека, што отежава одређивање узрочно последичне везе. Такође, узорак у многим истраживањима обухвата малу хомогену популацију коју чине здрави млади људи до оних у средњим годинама, што ограничава генерализацију резултата (*Al-Shaar et al., 2017*). Истраживања чији су предмет дуготрајна употреба ЕП-а су малобројна, због чега и не постоје јасно дефинисане дијететске препоруке у вези безбедног нивоа њихове конзумације. Упркос досадашњим превентивним мерама, пре свега везано за едукацију јавности и особа које пружају здравствену услугу, као и унапређењу законодавства у вези са стављањем у промет ЕП-а, потребне су додатне студије усмерене ка смањењу нежељених догађаја и смртних случајева повезаних са конзумацијом ЕП-а (*Thorlton & Colby, 2018*). Сугеришу се даља истраживања са већим величинама узорка, дужим периодима праћења, затим испитивање безбедности и ефикасности већих доза, као и даља испитивања комбинације ЕП-а са другим супстанцама (*Burrows et al., 2013*).

1.1.1 САСТАВ ЕНЕРГЕТСКИХ ПИЋА

У Табели 1 приказан је састав најпознатијих ЕП-а.

Табела 1: Састав најпознатијих ЕП-а (*McLellan & Lieberman, 2012*).

Енергетско пиће	Величина порције (ml)	Састојци (количина/величина порције)					
		Кофеин (mg)	Таурин (mg)	Глукурополактон (mg)	Угљени хидрати (g)	Витамини	Биљни суплементи и други састојци
Amp [®]	237	71	X	0	28	Б ₂ , Б ₃ , Б ₅ , Б ₆ , Б ₁₂	Гуарана (X) Гинсенг (X)
Cocaine [®]	248	280	750	0	18	Б ₆ , Б ₁₂	Гуарана (25 mg) Карнитин (50 mg)
Full Throttle [®]	237	100	X	0	29	Б ₃ , Б ₆ , Б ₁₂	Гуарана (X) Гинсенг (X) Карнитин (X)
Go Girl [®] (без угљених хидрата)	355	100	800	X	0	Б ₂ , Б ₃ , Б ₅ , Б ₆ , Б ₈ , Б ₁₂	<i>Garcinia Cambogia</i> (200 mg)
Monster [®]	237	80	1000	5	27	Б ₂ , Б ₃ , Б ₅ , Б ₁₂	Гуарана (100 mg) Гинсенг (200 mg)
No Fear [®]	237	87	1000	0	33	Б ₆ , Б ₉ , Б ₁₂	Гуарана (X) Гинсенг (50 mg) Карнитин (X)
Red Bull [®]	245	80	1000	600	27	Б ₃ , Б ₅ , Б ₆ , Б ₈ , Б ₁₂	/
Red Bull [®] (без угљених хидрата)	245	80	1000	600	0	Б ₃ , Б ₅ , Б ₆ , Б ₈ , Б ₁₂	/
Rockstar [®]	237	80	1000	0	31	Б ₂ , Б ₃ , Б ₅ , Б ₆ , Б ₁₂	Гуарана (25 mg) Гинсенг (25 mg) Карнитин (25 mg) <i>Ginkgo Biloba</i> (150 mg) Млечни чкаљ (20 mg)
Rockstar [®] (без угљених хидрата)	237	80	1000	0	0	Б ₂ , Б ₃ , Б ₅ , Б ₆ , Б ₁₂	Гуарана (25 mg) Гинсенг (25 mg) Карнитин (25 mg) <i>Ginkgo Biloba</i> (150 mg) Млечни чкаљ (20 mg)
Tab [®] Energy	310	95	785	0	0	Б ₃ , Б ₆ , Б ₁₂	Гуарана (0,9 mg) Гинсенг (116 mg) Карнитин (19 mg)
Venom [®] Energy	237	80	X	0	28	Б ₂ , Б ₃ , Б ₆ , Б ₁₂	Гуарана (X) Гинсенг (X) Карнитин (X)

*Ознака – X: необјављен податак, непознато

1.1.1.1. КОФЕИН

Кофеин (1,3,7-триметилксантин) је природан алкалоид који се налази у различитој количини у више од 60 биљака (*Heckman et al., 2010*). Сматра се фармаколошки активном

супстанцом која се највише конзумира широм света (Nawrot *et al.*, 2003). Присутан је у напцима (кафи, чају, газираним пићима), чоколади и одређеним лековима (Nawrot *et al.*, 2003). Хемијска формула кофеина је $C_8H_{10}N_4O_2$ (Tamamoto *et al.*, 2010) и не постоји хемијска разлика између синтетског кофеина и кофеина из природних извора (Heckman *et al.*, 2010). То је бео прах, без мириса, ниске солубилности и обично се комбинује са пуринима и пиримидинима ради повећања солубилности (Tamamoto *et al.*, 2010). Око 90% кофеина апсорбује се из гастроинтестиналног тракта унутар 20 минута (Heckman *et al.*, 2010, Rath, 2012), а пик концентрације у плазми достиже приближно за око 50-75 минута (Clauson *et al.*, 2008), односно за око 1 до 1,5 час (Heckman *et al.*, 2010). Брзо се дистрибуира у телу и лако пролази крвно-моздану и плаценталну баријеру (Rath, 2012). Метаболише се у јетри од стране микрозомалног цитохрома р450. Цитохром р450, CYP1A2, нарочито је важан за деметилацију кофеина и стварање параксантина, теобромина и теофилина (Zulli *et al.*, 2016)(Слика 2). Полувреме елиминације кофеина износи 3-8 h, и може бити смањено за 30-50% услед пушења цигарета или двоструко, уношењем оралних контрацептива или лекова који се метаболишу помоћу цитохрома р450 (Chrysant & Chrysant, 2015).

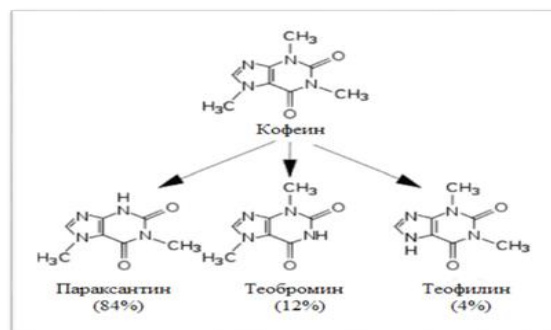
Слика 2. Метаболички производи кофеина:

1,7 диметилксантин (параксантин);

3,7 диметилксантин (теобромин);

1,3 диметилксантин (теофилин)

(Lee, 2000, Heckman, 2010, Zulli *et al.*, 2016).



Главна дејства кофеин остварује преко аденозинских рецептора A_1 , A_{2A} , A_{2B} и A_3 , на којима делује као неселективни антагонист (Zulli *et al.*, 2016). Ови рецептори су у великој мери ткивно специфични, и припадају трансмембранској фамилији рецептора повезаних са G протеином (Shearer & Graham, 2014). Аденозин је пурински нуклеозид који највећим делом настаје разградњом аденозин трифосфата (АТР-а), а у мањој мери метаболизмом S-аденозил хомоцистеина (Ciruela *et al.*, 2011). Моћан је вазодилататор који смањује ослобађање норадреналина из завршетака симпатичких нервних влакана (Hartley *et al.*, 2004).

У мозгу има улогу инхибиторног неуротрансмитера и на тај начин испољава седативно дејство. Активација A_{2A} рецептора инхибише допаминску трансмисију. Допамин је неуротрансмитер који игра кључну улогу код злоупотребе већине супстанци (Marczinski & Fillmore, 2014). Блокирајући аденозинске рецепторе, кофеин у стријатуму повећава ослобађање допамина (McKetin et al., 2015), и на тај начин смањује седацију и повећава стимулацију (Marczinski & Fillmore, 2014). Супротно томе, и код људи и код животиња, алкохол спречава преузимање аденозина, повећавајући његову активност, доводи до седације и осећаја поспаности (Marczinski & Fillmore, 2014). Поспаност, услед инхибиције активности допамина, ограничава даље конзумирање алкохола (Marczinski, 2014). Кофеин је најефикаснији када је активност аденозина највећа, па на тај начин блокира седативно дејство алкохола и делује стимулаторно (Marczinski & Fillmore, 2014). Кофеин, стимуланс кардиоваскуларног и нервног система (Iyadurai & Chung, 2007), у комбинацији са алкохолом (депресор) доприноси већој конзумацији алкохола услед смањеног ефекта седације, што има за последицу већу вероватноћу интоксикације алкохолом (Clauson, 2008., Goldfarb et al., 2014).

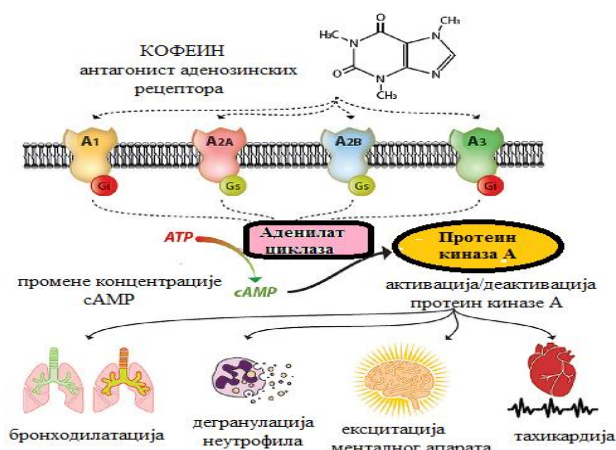
Табела 2. Ефекти аденозина на крвне судове (које блокира кофеин) (Echeverri et al., 2010).

Крвни судови	Ефекат	Рецептори
Коронарни	Вазодилатација	A2a
Пулмонални		
1. Пулмонална артерија	Вазоконстрикција	A1
	Вазодилатација	A2a
2. Микроциркулација	Вазодилатација	A2b
Мезентерички	Вазодилатација	Непознато
Ренални		
1. Општа циркулација	Вазодилатација	A2a
2. Аферентна артериола	Вазоконстрикција	A1
Аорта	Вазодилатација	A2b

Кофеин, компетитивно блокирајући аденозинске рецепторе, повећава и ниво аденозина у плазми и на тај начин повећава системске ефекте аденозина. На системском нивоу, аденозин стимулише хеморецепторе у циркулацији, што узрокује генерализовано

повећање симпатичког тонуса, повећање циркулишућих катехоламина, периферног васкуларног отпора и секреције ренина (Echeverri et al., 2010). Конзумација 300 mg кофеина доводи до повећања систолног артеријског притиска за 6-7,5 mmHg и дијастолног за 2,6 - 4 mmHg, што је забележено 60 минута након конзумације (Echeverri et al., 2010). Кофеин стимулацијом A_1 рецептора иницира тахикардију, стимулацијом A_{2A} менталну ексцитацију, стимулацијом A_{2B} бронходилатацију, а дејством на A_3 доводи до дегранулације неутрофила (Zulli et al., 2016). Код мушкараца, кофеин умањује вазодилаторно дејство аденозина повећавајући укупни периферни васкуларни отпор за око 12%, док код жена не испољава такав ефект пре менопаузе услед дејства естрогена, али се сугеришу даља истраживања (Hartley et al., 2004).

Слика 3. Дејство кофеина на аденозинске рецепторе (Zulli et al., 2016).



* G_i , G_s – инхибиторни, стимулаторни G протеин

Поред дејства на аденозинске рецепторе, кофеин испољава и следећа дејства:

- стимулација ослобађања ендогених катехоламина - реверзибилни инхибитор ензима моноаминоксидазе, што утиче на повећану доступност допамина, адреналина, норадреналина и серотонина;
- компетитивна инхибиција фосфодиестеразе, односно повећање цикличног аденозин монофосфата (cAMP) у ткивима, чиме остварује позитивно инотропно дејство (Wassef et al., 2017);

- ослобађање калцијума из саркоплазматског ретикулума и повећање осетљивости миофибрила на дејство калцијума;
- антагонист рецептора за γ -аминобутерну киселину GABA_A, на нивоу везних места за бензодиазепине;
- инхибише ензим ацетилхолинестеразу (на тај начин повећава ниво ацетилхолина) (Zulli et al., 2016).

Пораст катехоламина у плазми након конзумације кофеина, омогућава телу да се адаптира на стрес изазван физичком активношћу (повећање срчане фреквенце и снаге мишићних контракција, што доприноси повећању крвног притиска). Такође, повећава се искоришћавање слободних масних киселина као енергетског супстрата за мишићну активност, чиме се омогућава штедња гликогена и побољшање физичких перформанси (An et al., 2014). Ксантини инхибишу разградњу cAMP од стране фосфодиестеразе, па се на тај начин продужава и повећава стимулативно дејство cAMP у многим ткивима. (MacCornack, 1977). Ксантини доприносе хипергликемијском ефекту и повећаној мобилизацији слободних масних киселина због акумулације cAMP, због чега се повећава активност фосфорилазе, доводећи до гликогенолизе и производње глукозе. Ксантини имају аналоган ефекат на производњу липида - cAMP активира липазу триглицерида хидролизуюћи триглицериде у масном ткиву, што доводи до пораста нивоа слободних масних киселина у крви (MacCornack, 1977).

На анималном моделу показано је да кофеин може директно утицати на мишиће, или ослобађајући Ca из саркоплазматског ретикулума, или ангажовањем већег броја моторних јединица, инхибишући дејство аденозина у централном нервном систему (Del Coso et al., 2012). Кофеин је агонист ријанодинских рецептора, на основу чега доприноси ослобађању Ca из саркоплазматског ретикулума, што је кључни корак за настанак мишићне контракције, што је још један од разлога због чега се користи за повећање спортских перформанси (Zulli et al., 2016). Првобитно су ергогена дејства кофеина на физичке перформансе приписивана поменутој побољшаној оксидацији масних киселина од стране мишића и на тај начин већој штедњи гликогена. Међутим, касније је откривено да кофеин делује на исти начин и код краткотрајних активности где повећана оксидација масти или штедња угљених хидрата нису ограничавајући фактор за постизање бољих перформанси. Поред наведених дејстава на скелетне мишиће током физичког вежбања,

кофеин утиче и на побољшано преузимање глукозе и смањење акумулације лактата (Shearer & Graham, 2014).

У зависности од дозе, кофеин испољава дуалне ефекте. Иако, прецизан опсег доза није дефинисан, сматра се да код људи количина од 100 до 500 mg доприноси повољним стимулативним ефектима, док количина већа од 500 mg потенцира нежељене ефекте, као што су палпитације, узнемиреност и погоршање психомоторних перформанси (Kaplan et al, 1997). Дозе кофеина од 40-60 mg могу испољити позитиван утицај на когнитивне функције, док су за побољшање физичких перформанси потребне веће дозе које се примењују 1h пре вежбања (McLellan & Lieberman, 2012). Опсег доза за побољшавање спортских перформанси креће се од 3-6 mg/kg, а дозе ≥ 9 mg/kg не утичу на даље повећање перформанси (Campbell et al., 2013). Конзумирање дозе веће од 6 mg/kg доприноси сатурацији ензима у јетри одговорних за метаболизам кофеина (Shearer & Graham, 2014). У дозама од 2 до 5 mg/kg, физичке перформансе се повећавају за 3%, док у дозама већим од 5 mg/kg се повећавају за око 7% (Shearer & Graham, 2014). Максимална препоручена дневна доза за одрасле, која не доводи до нежељених ефеката код већине конзумента је 400 mg или 6 mg/kg (Yunisa & Ahmed, 2011, Hanan Israelit et al., 2012), што не важи за труднице (Seifert et al., 2011). Практично, ови подаци указују да уколико спортиста жели да побољша перформансе краткотрајног вежбања високог интензитета потребно је да минимално конзумира 3-4 лименке RB-а на 60 kg телесне тежине или 4-5 лименки на око 80 kg телесне тежине (око 5 mg/kg кофеина). Међутим, током конзумације 5 лименки RB-а да би се достигла доза кофеина која делује неуромускуларне перформансе, конзумира се и 135 g угљених хидрата, 5 g таурина, 3 g глукуронолактон, 0,175 g Б витамина. Због тога се сматра да када је потребна суплементација високим дозама кофеина, ЕП-а нису оптималан избор услед још увек непознате интеракције компоненти (Mora-Rodriguez & Pallarés, 2014). Доза кофеина од 10-14g (150-200mg/kg) обично доводи до вентрикуларне тахикардије (Clauson et al., 2008), а средња летална доза код пацова је 200-400 mg/kg (Berger & Alford, 2009). Наведени ефекти могу се појавити и при мањим дозама, у зависности од присутних фактора који су значајни за осетљивост на кофеин, као што је пушење, старосна доб, обољења срца и претходна употреба кофеина (Clauson et al., 2008), па тако потенцијална летална доза кофеина може бити и свака доза која је већа од 5g (Campbell et al., 2013). Резултати студија повезаности (linkage studies)

показали су да су полиморфизми гена за аденозински A_{2A} рецептор и аденозинску деаминазу повезани са индивидуалним разликама осетљивости појединаца на конзумацију кофеина (*Reissig et al., 2009*).

Кофеин узрокује релаксацију глатких мишића и стимулацију секреције желуца, смањује тонус езофагусног сфинктера и може довести до гастроезофагусног рефлука, горушице и езофагитиса (*Rath, 2012*). Такође, узрокује коронарну и церебралну вазоконстрикцију, релаксацију глатких мишића, стимулацију скелетних мишића, док на срце испољава хронотропни (повећава фреквенцу срца) и инотропни утицај (повећава снагу контракције) (*Seifert et al., 2011*) о чему ће бити речи у поглављу Кардиодинамика. Сумирани утицај умерене конзумације кофеина код здравих особа је следећи:

- повећава осећај енергије као и дневну потрошњу енергије,
- смањује умор и осећај напора током физичке активности,
- побољшава физичке моторне и когнитивне перформансе,
- повећава будност и смањује ментални замор,
- убрзава реакције и повећава прецизност реакција,
- повећава способност концентрације и фокусирање пажње
- побољшава краткорочно памћење,
- повећава способност у решавању задатака који захтевају размишљање,
- повећава могућност доношења исправних одлука
- побољшава неуромишићну координацију (*Glade, 2010*).

Кофеин се у форми кофеин цитрата, користи се у терапији апнеје и бронхопулмоналне дисплазије код превремено рођене одојчади (*Seifert et al., 2011*).

1.1.1.2 ТАУРИН

Таурин је први пут изолован из жучи вола, па је назив изведен из *Bos taurus* (*Huxtable, 1992*). Таурин (2-аминоетансулфонска киселина) је најзаступљенија семиесенцијална аминокиселина која садржи сумпор (*Sun et al., 2016*). У малој количини синтетише се у јетри из метионина или цистеина (*Wójcik et al., 2010*). Хемијска формула таурина је $C_2H_7NO_3$ (*Tamamoto et al., 2010*). Ипак, дефинисање таурина као аминокиселине

није прецизно у правом смислу те речи, односно таурин има структуру која је слична аминокиселинама, јер садржи сулфонску уместо карбоксилне киселине (*Eudy et al., 2013*).

Синтеза таурина почиње реакцијом метилације метионина која је катализована магнезијумом, при чему се формира хомоцистеин. Ова реакција је реверзибилна, и одвија се и у супротном правцу под утицајем ензима метионин синтетазе, који је зависан од витамина Б12 и фолата. Даље, из хомоцистеина се формира цистатион, и даље под утицајем пиридоксал 5' фосфата се формира цистеин. Од цистеина, у реакцији катализованом цистеин диоксигеназом која инкорпорира два молекула кисеоника, настаје цистеин сулфинска киселина, која се декарбоксилише помоћу декарбоксилазе цистеин сулфинске киселине и пиридоксал 5' фосфата у хипотаурин. Хипотаурин се оксидује у таурин помоћу хипотаурин дехидрогеназе. Алтернативно, од цистеин сулфинске киселине настаје цистеинска киселина, из које настаје таурин (*Wójcik et al., 2010*).

Здраве одрасле особе синтетишу таурин, али то се не односи на одојчад и болесне особе, код којих је потребно уносити путем хране или суплемената, због чега је и саставни део формула за бебе (*Clauson et al., 2008, Rath, 2012*). Ипак, сматра се да се код људи веома мала количина таурина синтетише у јетри, и да је главни извор таурина унос храном (*Wójcik et al., 2010, Schaffer et al., 2014*) због ниског нивоа декарбоксилазе цистеин сулфинске киселине (*Wójcik et al., 2010*). У храни је присутна у месу, млечним производима и риби, а просечан дневни унос путем хране је 20 до 200 mg (*Rath, 2012*). Унос таурина исхраном процењује се на око 400 mg/дан, док је конзумацијом ЕП-а унос процењен на око 3000 mg/дан (*SCF, 2003*). Међутим, постоји податак да је код особе са телесном тежином од 70 kg, око 70 g таурина дистрибуирано у телу што је 70 пута више од количине таурина присутне у једној лименци RB-а (*Tek et al., 2014*). Таурин транспортер *knockout* мишеви показују губитак телесне тежине, абнормалну срчану функцију и смањен капацитет вежбања (*Ito et al, 2010*).



Таурин се апсорбује у танком цреву методом активног транспорта на четкастој ивици ентероцита, одакле се даље порталном венном транспортује у јетру и даље у циркулацију (*Wójcik et al., 2010*). Сисари не поседују ензиме за разградњу таурина

(*Lambert et al., 2015*). Хумане студије су показале да се након уноса таурина храном, значајно повећање његове концентрације у плазми региструје након 90 минута, враћајући се на почетни ниво након 180-270 минута (*SCF, 2003*). Токсокинетичке студије на пацовима показале су пик концентрације након 60 минута од уноса таурина, са полувременом елиминације мањим од 1 часа, а терминално полувреме елиминације било је у опсегу од 8,7 до 40 часова (*SCF, 2003*). Велики део елиминише се урином, а стопа елиминације се драстично повећава након уноса веће концентрације таурина (*Schaffer et al., 2014*). Таурин, коњугован са жучним киселинама излучује се фецесом (*Lambert et al., 2015*).

Нормална концентрација таурина у плазми је ниска, а у високој концентрацији налази се у мозгу, срцу и скелетним мишићима (*McLellan & Lieberman, 2012, Higgins & Ortiz, 2014*). Таурин улази у ћелије помоћу натријум-хлорид зависног транспортера таурина (*Tappaz, 2004, Wójcik et al., 2010*) и претпоставља се да је мала вероватноћа да повећање таурина у плазми након уноса дијететских суплемената утиче на промену његове интрацелуларне концентрације. Чак и након суплементације током 2 недеље, у количини од 30-300 mg/kg таурина, региструју се мале промене концентрације таурина у мозгу и срцу, па је тешко објаснити биолошке ефекте посредоване његовим хроничним третманом, који се наводе за срце и мозак (*Schaffer et al., 2014*). Општи закључци у вези са суплементацијом таурином су следећи:

- док акутна суплементација таурином вероватно нема никакав утицај на интрацелуларни ниво таурина, хронични третман може довести до повећања нивоа таурина у срцу и мозгу;
- хронична суплементација таурином вероватно не мења концентрацију таурина на нивоу целог органа, али може утицати на промену концентрације у митохондријама у којима је таурин иначе заступљен мање него у цитоплазми и обавља различиту функцију;
- хронична суплементација таурином модулира експресију одређених гена;
- при високој екстрацелуларној концентрацији, таурин инхибира ензим фосфолипид N-метилтрансферазу, спречавајући конверзију фосфатидил-етаноламина у фосфатидилхолин, што доприноси мењању структуре и функције мембране (*Schaffer et al., 2014*).

Таурин остварује поменуто улогу у коњугацији жучних киселина- холне и деоксихолне, што је кључно за формирање мицела и апсорпцију масти (*Huxtable, 1992, Clauson et al., 2008, Higgins & Ortiz, 2014*). Коњуговане жучне киселине се излучују путем фецеса, тако да се значајна количина таурина губи на тај начин у форми таурихолне киселине (*Schaffer et al., 2014*). Битан је за правилан развој и функцију ретине (*Huxtable, 1992*), као и за развој чула слуха (*Chimezie, 2013*). Делује неуромодулаторно, као агонист ГАВА рецептора (*Huxtable, 1992, Schaffer et al., 2014*), делује као стабилизатор ћелијске мембране, а има бројна друга биолошка и физиолошка дејства (*Huxtable, 1992*). Познато је да алкохол има негативан утицај на хомеостазу таурина код људи. Код хронични зависника од алкохола, долази до значајног пораста концентрације таурина у плазми у фази апстиненције од алкохола (*Finnegan, 2003*).

Таурин је уобичајена компонента ЕП-а, а употребљава се и као самостални суплемент за побољшање спортских перформанси. Сматра се да повећава улазак воде у мишиће, увећавајући ћелијски волумен и доводи до хипертрофије мишића. Поред тога, повећава мишићну снагу, побољшава издржљивост, смањује физичким вежбањем индуковано оштећење дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК) и мишића, и убрзава опоравак после тренинга (*Eudy et al., 2013*). Истраживања на пацовима показала су да да виши ниво таурина у мишићима могу побољшати перформансе физичког тренинга, док у хуманој популацији то није доказано (*Tamamoto et al., 2010*).

Токсиколошке студије на пацовима у трајању од 13 недеља у којима је таурин примењен у дозама од 300 mg/kg, 600 mg/kg и 1000 mg/kg нису показале хистопатолошке промене, али су се услед дејства таурина на централни нервни систем регистровале значајне бихејвиоралне промене код оба пола, које су се испољавале на дозно зависан начин. Уочена је перзистентно повећана активност, најизраженија 1 сат након примене таурина, грицкање екстремитета, као и могуће смањење/оштећење моторних перформанси (*SCF, 2003*). Такође, наведено је да иако токсиколошким студијама није откривен канцерогени потенцијал таурина, ипак не постоје истраживања којима би се документовала безбедна дуготрајна конзумација таурина (*SCF, 2003*). Суплементација таурином у дози од 3 до 6 g дневно вршена је код великог броја људи (укључујући одрасле, децу, чак и одојчад) и за период до једне године нису забележени негативни

ефекти по здравље (*EFSA, 2009*). Међутим, иако расположиви подаци нису довољни да се утврди горњи безбедан ниво уноса таурина (*SCF, 2003*), сматра се да када се употребава као самостални суплемент, доза до 3 g/дан пре тренинга не изазива нежељене ефекте и то је максимална препоручена доза за суплементацију таурином (*Wójcik et al., 2010, Eudy et al., 2013*).

У терапијске сврхе користи се код одвикавања од алкохола, конгестивне срчане инсуфицијенције, цистичне фиброзе, палпитација/дисритмија, хипертензије, дијабетеса, конвулзивних поремећаја, хепатитиса (*Seifert et al., 2011*).

1.1.1.3 УГЉЕНИ ХИДРАТИ

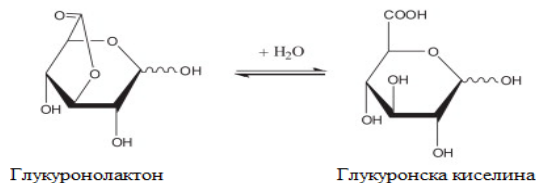
Осим верзије ЕП-а без угљених хидрата, остала ЕП-а садрже угљене хидрате у облику сахарозе, глукозе и/или високофруктозног сирупа од кукуруза. Садржај угљених хидрата варира у зависности од ЕП-а, али уобичајени опсег је између 21 g и 34 g (*Clauson et al., 2008*). У RB-у угљени хидрати су заступљени у облику глукозе и сахарозе, док верзија RB-а без угљених хидрата садржи фенилаланин (*Hill, 2012*). Глукоза је моносахарид, док је сахароза дисахарид који се састоји од глукозе и фруктозе. Конзумација глукозе или других угљених хидрата пре и током физичке активности одлаже настанак појве замора, штеди гликоген у мишићима и побољшава перформансе (*el-Sayed et al, 1997*). Глукоза је главни извор енергије за мозак, еритроците и друге ћелије, а есенцијална је за нормално функционисање централног нервног система, као и за организам у целини. Након ингестије, глукоза се користи или као енергетски супстрат, или се складишти у јетри и мишићима (*Mora-Rodriguez & Pallarés, 2014*). Релативно се мала количина глукозе може складиштити, тако да се тело ослања на континуирано снабдевање глюкозом која представља примарни извор енергије које се испоручује путем крвотока (*Clauson et al., 2008*). У RB-у угљени хидрати су заступљени у концентрацији од 11%, а осмолалност је 601 mOsmol • kg/H₂O (*Mora-Rodriguez & Pallarés, 2014*). Верзија RB-а без угљених хидрата има нула калорија и нижу осмолалност – 140 mOsmol • kg/H₂O, па је апсорпција већа у односу на стандардну верзију са угљеним хидратима (*Mora-Rodriguez & Pallarés, 2014*). Максимално препоручен унос је 30 g угљених хидрата на 2000 калорија, што представља укупно 7-8% укупног дневног калоријског уноса. ЕП-а у већој амбалажи

садрже око 60-90 g угљених хидрата, што је 2-3 пута више од максималног препорученог дневног уноса (Clauson *et al.*, 2008). Глукоза садржана у ЕП-има, код деце и адолесцената може допринети настанку прекомерне тежине, гојазности, дијабетес мелитуса типа 2, неправилне исхране, односно нездравих навика у исхрани, као и настанку каријеса и ерозије зуба (Costa *et al.*, 2014). Већина ЕП-а има рН у киселом опсегу (рН између 3 и 4) који је повезан са деминерализацијом зубне глеђи, а лимунска киселина која може бити у саставу ЕП-а је такође независни фактор који утиче на деминерализацију зубне глеђи (De Sanctis *et al.*, 2017). У верзијама ЕП-а која не садрже угљене хидрате, присутни су вештачки заслађивачи, чија се хронична употреба и њен утицај на здравље људи још увек евалуира (De Sanctis *et al.*, 2017).

1.1.1.4 D-ГЛУКУРОНО- γ -ЛАКТОН

D-глукуроно- γ -лактон је природна супстанца и главна компонента везивног ткива (Pray *et al.*, 2014). Представља метаболички продукт глукозе у јетри (McLellan & Lieberman, 2012, Mora-Rodriguez & Pallarés, 2014). Метаболише се преко пентозног пута код људи, а један од продуката тог пута, ксилитол, има важне физиолошке ефекте и представља секретатор инсулина. Код глодара, али не и код људи, из ксилитола настаје аскорбинска киселина (Pray *et al.*, 2014). На физиолошком рН, глукуронолактон је у равнотежи са глукуронском киселином (Слика 4). Многи фармацеутски препарати садрже глукуронолактон или глукуронску киселину у циљу лечења хипербилирубинемije (Ricciutelli *et al.*, 2014).

Слика 4. Глукуронолактон је у равнотежи са глукуронском киселином (Ricciutelli *et al.*, 2014).



Након ингестије, лако се апсорбује, након тога хидролизује (McLellan & Lieberman, 2012), а екскретује се урином као глукаринска киселина, ксилитол и L ксилулоза (Mora-Rodriguez & Pallarés, 2014). Један од хидролизата глукуронолактона, D - глукуронична киселина, игра главну улогу у реакцијама фазе II метаболизма лекова. У коњугацији са

ксенобиотицима и другим егзогеним једињењима формира хидрофилније супстанце које се лакше екскретују у урин (*Chen et al., 2015*). Токсикокинетички подаци добијени на пацовима, показују недостатак акумулације глукуронолактона, као и достизање пика концентрације у плазми 1-2 сата након оралне примене, што је у складу са оскудним подацима хуманих студија. Полувреме елиминације глукуронолактона је од 0,89 до 3,9 сати (*SCF, 2003*).

Скренута је пажња на глукуронолактон као састојак ЕП-а, јер током примене глукуронолактона у временском периоду од 13 недеља код пацова, дозе од 600 mg/kg и 1000 mg/kg утицале су на настанак инфламаторних промена у бубрезима женки, док доза од 300 mg/kg није проузроковала промене (*SCF, 2003*). Међутим, у наредном истраживању детаљним анализама урина и хистопатолошким испитивањима нису уочене промене при наведеним дозама (*EFSA, 2009*). Доза од 1g/kg представља највећу испитивану дозу код пацова (*EFSA, 2009*). Међутим, глодари нису одговарајући модел за екстраполацију добијених података на људе јер као што је већ наведено, могу метаболисати глукуронолактон у витамин Ц, што код примата укључујући и човека није случај (*SCF, 2003*) (Схема). Као и за таурин, не постоји довољно података на основу којих би се дефинисао горњи безбедан ниво за дневни унос глукуронолактона (*SCF, 2003*).

Уобичајен дневни унос глукуронолактона код људи је око 38 mg дневно, а код умерених конзумента ЕП-а је око 126 mg дневно, док је код високог уноса ЕП-а (конзумација која одговара нивоу 95. перцентила), унос прилично висок, око 840 до 900 mg дневно (*Pray et al., 2014*). Наведени садржај глукуронолактона одговара конзумацији 1,5 лименке RB-а дневно (*Mora-Rodriguez&Pallarés,2014*). Претпостављени хронични унос глукуронолактона путем ЕП-а 840 mg дневно, а акутни и до 1800 mg дневно, док је процењен унос исхраном само 1-2 mg дневно (*SCF, 2003*). Из наведених података произилази да је количина глукуронолактона у неким ЕП-има већа више од 250 пута од количине у другим изворима хране (*De Sanctis et al., 2017*).

У хуманој популацији не постоје истраживања у којима су проучавани ефекти глукуронолактона на регулацију течности или утицај на перформансе физичког тренинга (*Mora-Rodriguez&Pallarés,2014*). Показано је да висока доза глукуронолактона, 100 mg/kg три пута дневно, побољшава издржљивост код пацова процењену тестом пливања (*Tamura*

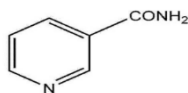
et al, 1968). Наведена укупна дневна доза би одговарала количини глукуронолактона која је садржана у 35 лименки RB-а примењених код човека просечне тежине 70 kg (*McLellan & Lieberman*, 2012). Не постоји много података о D-глукуроно-γ-лактону (*Pray et al.*, 2014), мада је мало вероватно да остварује интеракције са кофеином или таурином (*SCF*, 2003). Сматра се да се додаје ЕП-има у сврху побољшања расположења и смањења осећаја умора (*Pray et al.*, 2014).

1.1.1.5 КОМПЛЕКС ВИТАМИНА Б

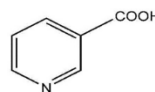
Комплекс витамина Б припада групи хидросолубилних витамина који имају улогу коензима и битни су за правилну функцију ћелија, нарочито за функцију митохондрија и продукцију енергије. Обзиром да ЕП-а садрже већу количину угљених хидрата, сматра се да су наведени витамини значајни за њихово адекватно енергетско искоришћавање (*Higgins et al*, 2010). Један литар RB-а садржи 150 mg Б витамина (*Mora-Rodriguez & Pallarés*, 2014).

Витамин Б3 (ниацин) присутан је у облику никотинамида и никотинске киселине (*Sauve*, 2008) (Схема). Прекурсор је никотинамид аденин динуклеотида (NAD) и никотинамид аденин динуклеотид фосфата (NADP), који су као коензими укључени у више од 500 ензимских реакција (*Depeint et al*, 2006a). Целокупна продукција енергије, укључујући гликолизу у цитоплазми, као и Кребсов циклус и оксидативну фосфорилацију у митохондријама, зависна је од наведених коензима (*Depeint et al*, 2006a). Значајан и за синтезу и разградњу масти (*Yunusa & Ahmed*, 2011). Ниацин је у RB-у присутан у форми никотинамида и додаје се због улоге у енергетском метаболизму (*Rotstein et al*, 2013).

Слика 5: Никотинамид



Никотинска киселина

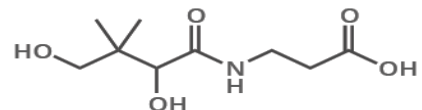


Никотинамид се синтетише из есенцијалне аминокиселине триптофан, као продукт кинуренинског пута, међутим у недовољној количини да обезбеди потребе организма (*Fukuwatari & Shibata*, 2013). Ниацин се изражава у ниацин еквивалентима, при чему 1 mg ниацин еквивалента одговара 1 mg ниацина и 60 mg триптофана. Препоручен дневни унос код особа од 19 до 25 година је 16 mg ниацин еквивалента за мушки пол и 13 mg ниацин

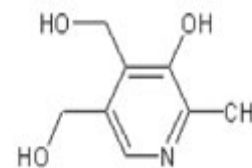
еквивалента за женски пол (*Strohm et al., 2016*). Недостатак ниацина доводи до настанка пелагре, чији су типични симптоми дијареја, дерматитис, деменција и на крају смрт (*Fukuwatari & Shibata, 2013*).

Суплементација ниацином се сматра ефикасном за повећање HDL холестерола (*high-density lipoprotein cholesterol*), а резултати истраживања којима су обухваћени пацијенти који не користе статине, показала су да утиче и на побољшање функције ендотелних ћелија (*Higgins & Ortiz, 2014*). Код пацијената са метаболичким синдромом утврђено је да изазива регресију дебљине интима-медије каротидне артерије, побољшава HDL холестерол, смањује LDL холестерол (*low-density lipoprotein cholesterol*) и триглицериде, побољшава функцију ендотелних ћелија, смањује васкуларну инфламацију што је процењено смањењем C-реактивног протеина (*Higgins & Ortiz, 2014*). Ниацин, између осталог испољава антиинфламаторна својства смањујући фосфолипазу A2 удружену са липопротеинима и C-реактивни протеин, повећава серумску концентрацију адипонектина, хормона са атеропротективним дејством што доприноси кардиопротективној улози (*Lavigne & Karas, 2013*).

Витамин Б5 (пантотенска киселина) је прекурсор коензима А, који је неопходан за 4% ензимских реакција, између осталог за синтезу хема, Кребсов циклус, као и за метаболизам липида (*Depeint et al., 2006a*). Адекватан унос витамина Б5 је око 5 mg/дан. Не постоје подаци за токсична дејства витамина Б5 код људи, изузев повремене дијареје и ретенције воде код примене изузетно високих доза, око 10-20 g/дан (*Rotstein et al., 2013*).

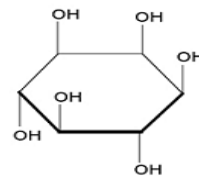


Витамин Б6 (у форми пиридоксин хидрохлорида) је коензим потребан за више од 100 есенцијалних биохемијских реакција које су укључене у метаболизам аминокиселина и хомоцистеина, метаболизам глукозе и липида, продукцију неуротрансмитера, као и синтезу ДНК и РНК (рибонуклеинске киселине) (*Spinneker et al., 2007*). Такође, има улогу у конверзији триптофана у ниацин (*Higgins et al., 2010*). Дефинисани горњи ниво уноса је 25 mg/дан. Неуротоксични ефекти се испољавају при уносу високих доза (>500 mg/дан), али се могу испољити и при уносу од 100 mg/дан током пролонгираног периода (*Rotstein et al., 2013*). Симптоми токсичности



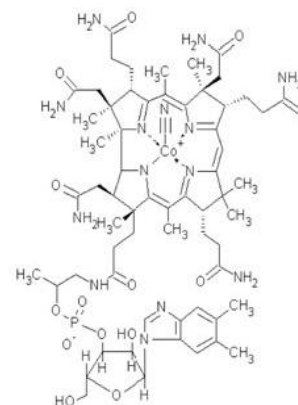
укључују периферну неуропатију са неуролошким дефицитом по типу „чарапе-рукавице”, прогресивну сензорну атаксију, тешко оштећење положаја и осећаја вибрације (*De Sanctis et al., 2017*).

Инозитол (раније класификован као витамин Б8) је по хемијској структури циклохексанхексол са укупно девет стереоизомера, од којих је најзаступљенији мио-инозитол (*Mitchell RH, 2008*). Саставни је део ћелијских мембрана у форми липида -

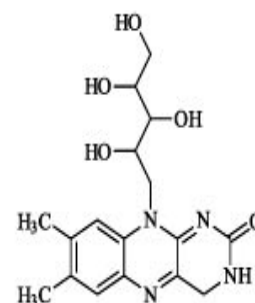


фосфатидилинозитола, а нарочито је важан за функцију мишићних и нервних ћелија, док као секундарни гласник представља регулатор хомеостазе Ca^{2+} , а у јетри је укључен у метаболизам липида (*Katayama 1999, Balla, 2009, Higgins & Ortiz, 2014*). Процењено је да адулти конзумирају 500 до 1000 mg инозитола дневно. Применом 18 g инозитола током 6 недеља код људи нису забележени нежељени ефекти (*Rotstein et al, 2013*).

Витамин Б12 (цијанокобаламин) је укључен у синтезу метионина из хомоцистеина, синтезу ДНК, а значајан је и за формирање еритроцита и метаболизам фолата, као и за нормалну функцију нервних ћелија (*Depeint et al, 2006b*) и за синтезу и поправку мијелина (*De Sanctis et al., 2017*). Препоручен дневни унос је 2,4 μg /дан, док се унос до 6 μg /дан односи на 95. перцентил конзумације. Нису забележени нежељени ефекти повезани са прекомерном конзумацијом витамина Б12 из хране или суплемената код здравих особа (*Rotstein et al, 2013*).



Витамин Б2 (рибофлавин) је прекурсор флавин аденин динуклеотида (FAD) и флавин мононуклеотида (FMN), који су кофактори у више од 150 редокс реакција (*Hustad et al., 2013*). Препоручени дневни унос износи 1,4 mg/дан за мушкарце и 1,1 mg/дан за жене (*Strohm et al., 2016*). Нису забележени нежељени ефекти витамина Б2, изузев благих гастроинтестиналних поремећаја, који нису прецизно/јасно повезани са конзумацијом витамина Б2 (*Rotstein et al, 2013*).



Витамин Б9 (фолна киселина) потребан је за синтезу ДНК, синтезу еритроцита и раст ћелија. Дневни унос фолне киселине код одраслих особа не би требао да буде већи

од 1000 μg . Веома високе дозе (веће од 15 000 $\mu\text{g}/\text{дан}$) могу проузроковати стомачне проблеме, проблеме са сном, кожне реакције и епи нападе (*De Sanctis et al., 2017*).

1.1.1.6 ДРУГИ ВИТАМИНИ И МИНЕРАЛИ

Многа ЕП-а садрже витамин Ц, калцијум и магнезијум (*De Sanctis et al., 2017*). Натријум-цитрат се користи као регулатор киселости (*Miles-Chan et al 2015*). Садржај натријума варира од 85 до 340 mg, док је садржај калијума у опсегу од 60 до 240 mg у 240 ml ЕП-а (*De Sanctis et al., 2017*).

1.1.1.7 ГИНСЕНГ

Гинсенг је доступан у различитим облицима (формама) и врстама (типовима): постоји у облику корена и облику праха, а најпознатије врсте су корејски и амерички црвени гинсенг (*Higgins & Ortiz, 2014*), од којих је најпроучаванији Корејски или Азијски гинсенг (*Panax ginseng*) (*Clauson et al., 2008*).

Гинсенг припада породици *Araliaceae* (*Tamamoto et al., 2010*) и за фармаколошка дејства гинсенга одговорни су гинсенозиди, панаксозиди и сапонини који се налазе у корену биљке, а при том су гинсенозиди одговорни у највећој мери (*Caron et al., 2002*). Гинсенозиди су активна једињења слична стероидима (*Tamamoto et al., 2010*), и присутни су у следећим фракцијама: Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rg₃, Rg1, Re и Rf (*Jovanovski et al., 2010*).

Сматра се да гинсенг поседује антиоксидантна својства и да делује благотворно код дијабетеса и на когнитивне функције (*Tamamoto et al., 2010*). Такође, стимулише имуну функцију, побољшава физичку издржљивост, когнитивне функције, концентрацију и меморију. Испољава дејства слична естрогену. Такође може довести до палпитација, тахикардије, хипертензије, едема, главобоље, вертига, еуфорије, маније. Нежељено дејство гинсенга које је најчешће и које је најбоље документовано је несаница. Терапијске дозе гинсенга крећу се у распону од 100 до 200 mg/дан, а чак се примењују дозе и од 2000 mg/дан. Многа најпопуларнија ЕП-а, међу којима је и RB не садрже гинсенг, док их већина садржи у концентрацији која је субтерапијска, а да би се достигла најмања

терапијска доза потребна је конзумација 2 до 4 лименке ЕП-а дневно (Clauson et al., 2008). Међутим, не постоје јаки експериментални докази којима се подржава била каква корист од присуства гинсенга у ЕП-има, у смислу побољшању физичких или когнитивних перформанси (McLellan & Lieberman, 2012, Higgins & Ortiz, 2014).

1.1.1.8 ГУАРАНА

Гуарана (*Paulinia cupana*) је биљка која расте у Бразилу, у регији Амазона (McLellan & Lieberman, 2012, Schimpl et al., 2013). Садржи кофеин, теобромин (испољава хронотропно дејство) и теофилин (испољава инотропно дејство) (Seifert et al., 2011). Састојак је већине ЕП-а, а његова активна компонента је кофеин у концентрацији од 3,6 до 5,8%, (гуарана у количини од 3-5g обезбеђује 250 mg кофеина, односно 1g гуаране еквивалентан је са око 40 mg кофеина) (Clauson et al., 2008, Yunusa & Ahmed, 2011, Rath M, 2012). Семе гуаране садржи 2-4% кофеина (Sanchis-Gomar et al., 2015), односно 2-15% (Higgins & Ortiz, 2014), док зрно кафе садржи 1-2% (Sanchis-Gomar et al., 2015).

Произвођачи ЕП-а нису у обавези да назначе садржај кофеина у овом састојку, тако да укупна доза кофеина може бити већа од назначене, ако ЕП-а садржи и гуарану (Seifert et al., 2011). Гуарана се употребљава практично у исту сврху као и кофеин, и испољава дејство блокадом аденозинских рецептора и инхибицијом фосфодиестеразе (Clauson et al., 2008). Међутим резултати експерименталних и клиничких истраживања сугеришу да гуарана највероватније може утицати на понашање и когнитивне перформансе механизмима дејства који су независни од кофеина, али могући ергогени ефекти нису још увек доказани код људи (McLellan & Lieberman, 2012). Будућа клиничка испитивања требало би да обухвате одређивање концентрације кофеина у плазми испитаника након узимања екстракта гуаране или суплемената, што ће допринети одређивању прецизне количине унетог кофеина. Поред тога, утврђивање антиоксидативних ефеката би било корисно, као мера ефекта компоненте танина у екстракту гуаране (McLellan & Lieberman, 2012).

У већим дозама, гуарана утиче на појаву несанице, раздражљивости, нервозе, палпитација и повећања систолног артеријског притиска (Meyer & Ball, 2004).

1.1.1.9 L – КАРНИТИН

Карнитин (3-хидрокси - 4N триметиламинобутират) је хидрофилни кватернарни амин који има важну улогу у интермедијерном метаболизму. Главна улога карнитина је транспорт масних киселина са дугим ланцима из цитоплзме у митохондрије, где подлежу β оксидацији. Карнитин је такође укључен у трансфер продуката β оксидације (укључујући и ацетил коензима А) из пероксизома у митохондрије за даљу оксидацију преко Кребсовог циклуса. Остале функције укључују модулацију односа ацил коензима А и коензима А, складиштење енергије као ацетил-карнитин, као и модулисање токсичних ефеката лоше метаболисаних ацил група, везујући их и екскретујући их у облику естра карнитина у урин (*El-Hattab & Scaglia, 2015*). У централном нервном систему, посредује у трансферу ацетил група за синтезу ацетилхолина и утиче на путеве сигналне трансдукције и генску експресију (*Solarska et al., 2010*). Уноси се храном и малим делом се синтетише у телу из лизина и метионина. Не метаболише се и урином се екскретује као слободан карнитин (*El-Hattab & Scaglia, 2015*). Укупна количина карнитина у телу човека је око 100 mmol (16g), и зависи од исхране, мишићне масе и старости. Мишићи садрже 98% укупног карнитина, док је 1,5% сконцентрисано у јетри, а 0,5% у осталим ткивима (*Lango et al., 2001*). Концентрација карнитина у срцу је око 4,2 $\mu\text{mol/g}$ ткива, што је 3 пута више од концентрације у попречно пругастим мишићима (1,26 $\mu\text{mol/g}$). Скелетни мишићи и срце немају могућност синтезе карнитина (*Lango et al., 2001*).

Још увек не постоје јаки експериментални докази који подржавају претпоставке да суплементација L- карнитином побољшава физичке или когнитивне перформансе. За изомер пропионил L- карнитин се сугерише да има повољан ефекат на артеријски зид испољавајући антипролиферативно, као и про-апоптотско дејство на глатке мишићне ћелије, што доприноси функционалном побољшању код периферних артеријских болести (*Higgins & Ortiz, 2014*). Суплементација карнитином утиче на појаву криза свести код особа са већ дијагностикованим кризама свести, али и на настанак *de novo* криза свести (*Suhrcke & Luzzi, 2012*). Показано је да се ниво карнитина смањује током старења (*Thangasamy et al., 2009*).

1.1.1.10 ГИНКО БИЛОБА

Гинко билоба је екстракт из листа гинка који се користи вековима у традиционалној кинеској медицини за лечење плућних обољења као што су астма и бронхитис, а и као лековито средство за кардиоваскуларна обољења (*Zheng et al, 2016*). Употребљава се за смањење тегоба везаних за интермитентне клаудикације, церебралну инсуфицијенцију и тинитус. Представља вазоактивни агенс за који се верује да има позитиван ефекат на функцију хода код пацијената са периферном артеријском болести. Међутим, резултати истраживања који су обухваћени ревијалним радом из 2013. године, показују да гинко доприноси само 64,5 m даљем ходу код особа које га користе, што није био значајан ефекат у поређењу са плацебо групом. Не постоје чврсти докази који потврђују да гинко билоба има значајан клинички утицај код пацијената са периферном артеријском болести (*Nicolaï et al., 2013*).

1.1.1.11 КОНЗЕРВАНСИ И ВЕШТАЧКЕ БОЈЕ У ЕНЕРГЕТСКИМ ПИЋИМА

Поред активних састојака ЕП-а садрже и друге компоненте које доприносе дужем року трајања и живописнијој боји (*De Sanctis et al., 2017*) и приказани су у Табели 3:

Табела 3. Конзерванси и вештачке боје у ЕП-има (*De Sanctis et al., 2017*).

Састојак	Дејство
Бензоична киселина	конзерванс
Плава 1	вештачка обојеност
Бромирано биљно уље	емулгатор
Калцијум - динатријум - EDTA	конзерванс и секвестрант
Карамел боја	обојеност хране
Лимунска киселина	обојеност хране
Естар гума	емулгатор
Гума арабика (арапска гума)	обојеност хране
Монокалијум - фосфат	пуферовање и неутралишуће средство
Калијум - бензоат	конзерванс
Калијум - сорбат	конзерванс
Натријум - цитрат	регулатор киселости
Натријум - хексаметафосфат	емулгатор
Сорбична киселина	конзерванс
Црвена 40	вештачка обојеност
Жута 5	вештачка обојеност
Жута 6	вештачка обојеност

1.1.2 ЕФЕКТИ ЕНЕРГЕТСКИХ ПИЋА

Ефекти ЕП-а повезани су са учесталашћу и количином конзумације, као и са концентрацијом и интеракцијом састојака (*Ishak et al., 2012*). Генерално, безбедност и утицај на здравље акутне и хроничне конзумације ЕП-а и даље је непозната (*Shah et al., 2016*). Подаци о утицају ЕП-а као целине на здравље су оскудни, па се процена њихове безбедности базира на утицају појединачних састојака. Основни активни састојак ових пића је кофеин, али је интеракција кофеина са осталим састојцима ЕП-а недовољно проучена (*Franks et al, 2012, Rotstein et al, 2013*). Према мишљењу неких експерата, не постоји *a priori* разлог да очекујемо токсикинетске интеракције између три главна једињења ЕП-а, кофеина, таурина и глукуронолактона, чак и при високом уносу, услед различите апсорпције, дистрибуције, метаболизма и екскреције ових једињења (*SCF, 2003*). Што се тиче токсодинамских интеракција, за глукуронолактон се сматра да не постоји *a priori* разлог да се очекује интеракција овог састојка (једино је показан већ наведени ефекат на бубреге код женки пацова), док и таурин и кофеин делују на централни нервни систем, кардиоваскуларни систем, бубреге па су токсодинамске интеракције ова два састојка вредне проучавања (*SCF, 2003*), али од значаја је и интеракција кофеина и угљених хидрата (*Pray et al., 2014*).

Међутим постоје и друга мишљења, у смислу да је непознато да ли други састојци ЕП-а и на који начин делују на брзину и/или количину апсорпције кофеина, па се сугеришу и њихове фармакодинамске али и фармакокинетске интеракције (*Franks et al, 2012*). Такође, количина кофеина у ЕП-има може варирати између 50 mg и 505 mg. Као таква, сва ЕП-а нису иста и не треба их третирати исто. Намеће се потреба да се ЕП-а категоризују у једну од 3 групе: са ниском, умереном или високом концентрацијом кофеина (*Ishak et al., 2012*). Став неких истраживача је да тренутно не постоје јаки докази којим се потврђује да би повећање физичке и менталне енергије услед конзумације ЕП-а могло да се припише осталим састојцима или њиховој комбинацији, изузев оних који се приписују кофеину у овим производима (*McLellan & Lieberman, 2012*), мада постоје публиковани резултати који то оповргавају (*Franks et al., 2012, Fletcher et al., 2014*). Демонстрирано је синергистичко дејство кофеина и таурина (*Baum & Weiß, 2001*), као и кофеина и угљених хидрата (*Miles-Chan et al., 2015*).

Од посебног значаја је чињеница да у седентарној популацији конзумација кофеина у комбинацији са простим угљеним хидратима може довести до инсулинске резистенције (Shearer & Graham, 2014). Резултати мета анализе показали су да акутна примена кофеина смањује инсулинску сензитивност код здравих испитаника (Shi et al., 2016), и то на дозно зависан начин, повећавајући за 5,8% вредност инсулина за повећање уноса 1 mg/kg кофеина (Alsunni, 2015). Инсулинска резистенција се дефинише као стање у коме инсулин остварује мањи одговор од очекиваног (Rains & Jain, 2011). Процењено је да је кофеин утиче на повећање инсулинске резистенције за око 30%. Обзиром да је време полуелиминације кофеина око 6 часова, овакви резултати сугеришу да конзумација ЕП-а која садрже кофеин утиче на регулацију глукозе неколико сати након конзумирања ЕП-а. Кофеин примењен у дози од 5 mg/kg током две недеље, код особа који нису конзументи кофеина, имао је негативан утицај на толеранцију глукозе још две недеље након престанка примене кофеина (Shearer & Graham, 2014). Хипертриглицидемија најчешће је повезана са оштећењем толеранције глукозе (Bukhar et al., 2012), што даље имплицира повећање атерогеног индекса (Bukhar et al., 2012). Континуирана и пролонгирана инсулинска резистенција повезана са хроничном конзумацијом ЕП-а која садрже кофеин од стране адолесцената може повећати метаболички ризик, укључујући настанак дијабетеса типа 2 и кардиоваскуларни болести код подложних особа у каснијем животном добу (Virtanen, 2015). ЕП-а могу довести до дисфункције аутономног нервног система, нарочито код гојазних особа (Majeed et al., 2017).

ЕП-а испољавају максималан ефекат 30-60 минута након ингестије, који је одржив најмање 90 минута након ингестије (Smit et al., 2004). Комбинација ЕП-а са алкохолом је изузетно популарна (Rotstein et al., 2013). Истовремена конзумација ЕП-а и алкохола, означава се скраћеницом AmEDs (*alcohol mixed with energy drinks*), нарочито има негативан утицај на кардиоваскуларни систем (Nowak & Jasionowski, 2016). Показано је да хронична конзумација алкохола повећава полувреме елиминације кофеина (*half-life*) чак за 72% (Goldfarb et al., 2014). Мета анализа је показала да конзумација AmEd утиче на повећање конзумације алкохола (Marczinski & Fillmore, 2014, Verster et al., 2018), што доприноси даљем наставку конзумације пића (Marczinski, 2014) и немогућности конзумента да перципира ниво интоксикације (Marczinski, 2015). Особе мушког и женског пола између 21 и 30 година су приликом конзумације ЕП-а у комбинацији са алкохолом током

двочасовног периода, учинили то за око 16 минута брже него када су конзумирали алкохолно пиће у комбинацији са контролним пићем без кофеина (*Marczinski et al., 2017*). Последица може бити непосредна (интоксикација алкохолом) (*Marczinski, 2015*), која може укључити атријалну фибрилацију и вентрикуларне аритмије (*Goldfarb et al., 2014*), али и дугорочна (зависност од алкохола) (*Marczinski, 2015*).

Конзумација ЕП-а, 5 дана недељно и дуже, повезана је са широким спектром менталних здравствених проблема укључујући депривацију сна, снажан (интензиван) стрес, депресивно расположење, суицидалност (*Park et al., 2016*). Неуробиолошки докази указују на то да постоји могућност да честа употреба ЕП-а може допринети повећаном ризику за настанак стања повезаних са употребом психоактивних супстанци, обзиром да кофеин потенцира адиктивна својства других психоактивних супстанци (*Arria et al., 2017*).

Досадашња истраживања ЕП-а у хуманој популацији, углавном се односе на њихов ергогени утицај којим се побољшавају физичке перформансе спортиста (*Campbell et al., 2013, Pérez-López et al., 2015 Del Coso et al., 2013, Lara et al., 2014, Del Coso et al., 2012a, Abian-Vicen et al., 2014, Rahnema et al., 2010, Ivy et al., 2009*), мада постоје истраживања у којима то није потврђено (*Astorino et al., 2012, Fernández-Campos et al., 2015*). Поред утицаја на спортски учинак, интензивно се испитује утицај на бихејвиоралне промене и централни нервни систем (*Alford et al., 2001, Kammerer et al., 2014, Mets et al., 2011, Umaña-Alvarado & Moncada-Jiménez, 2005*). Значајно поље истраживања је утицај на кардиоваскуларни систем, а последњих неколико година сагледава и њихов утицај на оксидативни статус. Међутим, постоји веома мало претклиничких истраживања у којима су проучавана дејства ЕП-а, а то се посебно односи на кардиоваскуларни систем.

Значајно претклиничко испитивање ефеката RB-а објављено је у Извешају Научног комитета за храну Европске уније 2003. године (*SCF, 2003*). Трајало је 13 недеља и обухватило је мишеве старости 6 недеља којима је апликован RB, неразблажен или разблажен са водом у концентрацијама 0%, 33%, 50% и 100 %. Примена RB-а утицала је на значајну редукцију у телесној тежини у свим испитиваним групама, што је највероватније била последица примећеног смањеног уноса хране. Знатно дозно зависно повећање уноса воде у опсегу од 27-115% забележено је у свим испитиваним групама у поређењу са контролама. Због ефеката на телесну масу у овом истраживању није било

могуће одредити максималну дозу која не изазива штетни ефекат (*SCF, 2003*). Већина наведених статистички значајних налаза који су забележени углавном у групи којој је апликован RB[®] у концентрацији од 100%, приписана су повећаном уносу течности и оптерећењу глукозом из RB-а (Табела 4). Поремећај у билансу течности, не очекује се да се јави код људи који конзумирају ЕП-а.

Табела 4. Утицај примене RB-а код мишева (*SCF, 2003*).

	Мужјаци мишева	Женке мишева
33% RB		значајно повећање гликемије
50% RB	смањење нивоа калцијума	значајно повећање гликемије
100% RB	значајно повећање гликемије смањење нивоа калцијума смањење нивоа натријума смањење средње концентрације корпускуларног хемоглобина, броја тромбоцита и ретикулоцита повећање нивоа алкалне фосфатазе смањење концентрације укупних протеина и албумина повећање специфичне тежине и осмолалности урина	значајно повећање гликемије смањење нивоа калцијума повећање нивоа хлорида смањење нивоа креатинина смањење концентрације укупних протеина и албумина

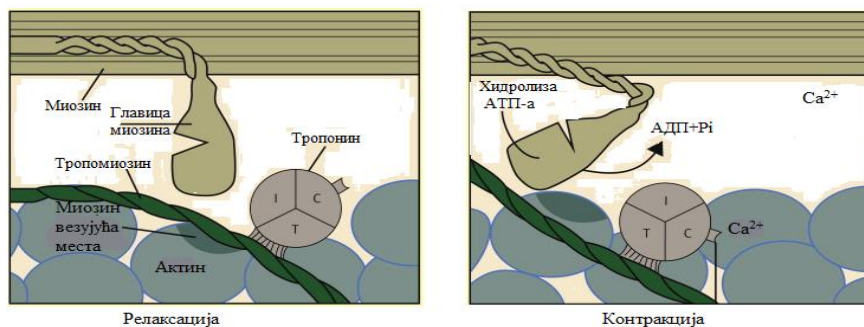
1.2 КАРДИДИНАМИКА

Термин кардиодинамика означава механичке догађаје који се генеришу током срчаних контракција. Срчани циклус обухвата и електричне (нпр. деполаризација ћелија миокарда) и механичке догађаје (нпр. скраћивање ћелија миокарда доводи до генерисања притиска и самим тим до промене волумена). Електрични догађаји претходе и иницирају механичке догађаје. Екситација-контракција купловање је термин који се користи да дефинише догађаје који повезују деполаризацију ћелијске мембране са контракцијом мишићних влакана (*Barsotii & Dini, 2003*). Ткиво срчаног мишића чине кардиомиоцити, фибробласти, крвни судови и екстрацелуларни матрикс, чија комплексна интеракција одређује биомеханичка својства срца (*Ferreira-Martins & Leite-Moreira, 2010*).

Ширење АП-а дуж мембране срчаног мишића, преноси се и на њене инвагинације, мембране трансверзалних (Т) тубула, који преносе АП радијално у унутрашњост влакана миокарда. Обзиром на блиски функционални контакт Т-тубула са саркоплазматским ретикулумом, сама деполаризација Т тубула узрокује отварање ријанодинских Ca^+ канала и тренутно ослобађање велике количине Ca^+ из лонгитудиналних саркоплазмних тубула (терминалне цистерне саркоплазминог ретикулума) у саркоплазму мишића. Количина Ca^+ која уђе у ћелију кроз Т- тубуле представља окидач (*trigger*) ослобађања Ca^+ из цистерни

саркоплазматског ретикулума, односно депоа калсеквестрина. Овај механизам повезаности екситација-контракција, укључује Ca^{+} индуковано ослобађање Ca^{+} (*Ca⁺-induced Ca⁺ release* - CICR), као и Ca^{+} сигнални пут посредовањем цикличне аденозин дифосфат рибозе (сADPR) и ријанодинских рецептора. Тако долази до повећања концентрације Ca^{+} у цитоплазми више од 10 пута (у стању мировања концентрација је око 0,1 mol/l, док је при екситацији и инфлуксу 1 mol/l). При високој концентрацији, тропонин везује четири Ca^{+} по молекулу. Тропонин мења облик, помера тропомиозин у страну и открива везна места за миозинске главице на актину, што омогућава формирање попречних мостова између актина и миозина. Главице молекула миозина везују се за актин под углом од 90 степени и завеслајем узрокују да актин клизи по миозину. Главице се затим одвоје и повежу на следећем везном месту, понављајући серијски овај процес. Сваки појединачни циклус припајања, завеслаја и одвајања скраћује мишић (скраћивањем саркомера) и повећава тензију. Енергија која се при томе користи настаје када аденозин трифосфатаза (АТФ-аза) локализована на попречним мостовима врши хидролизу АТФ на аденозин дифосфат (ADP) и неоргански фосфор (*Djukanovic et al., 2009, Chan-Dewar, 2012, Guyton & Hall, 2015*).

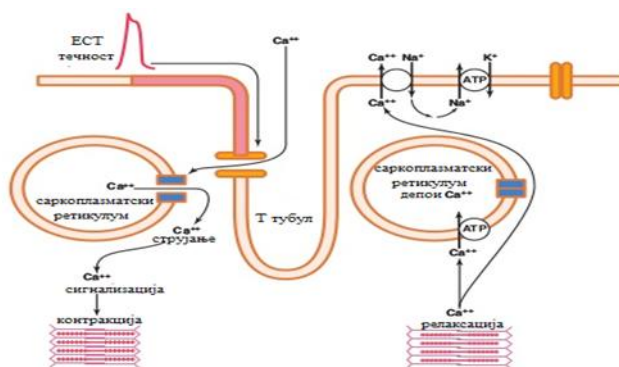
Слика 6. Распоред контрактилних протеина током релаксације и контракције кардиомиоцита (*Chan-Dewar, 2012*)



Повећањем броја попречних мостова, повећава се снага контракције, што се означава као повећан инотропизам или повећање контрактилности. Смањењем концентрације Ca^{+} у цитоплазми долази до завршетка контракције и настанка релаксације. Ca^{+} АТФ-азна пумпа у мембрани СР-а (SERCA), преузима Ca^{+} из цитоплазме и акумулира га у цистернама СР-а у облику калсеквестрина. Ова пумпа се активира фосфорилацијом фосфоламбина (мали модулаторни протеин унутар мембране СР-а) уз учешће сAMP

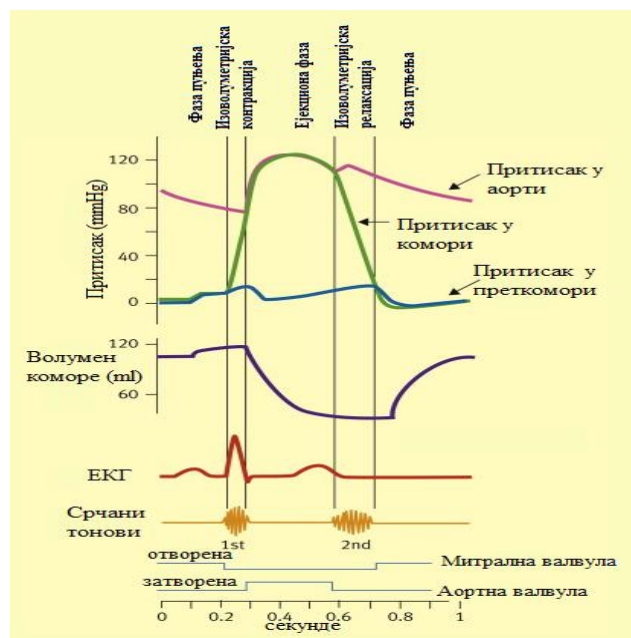
зависне протеин киназе. Такође, значајан је већ поменути, Na^+Ca^+ антипортни механизам у сарколеми кардиомиоцита, који за свака три убачена Na^+ у ћелију активно избацује један Ca^+ у екстрацелуларну течност (Djukanovic et al., 2009, Kapila & Mahajan, 2009, Pasipoularides, 2013, Guyton & Hall, 2015).

Слика 7. Механизам повезивања екситације и контракције и релаксација срчаног мишића (Guyton & Hall, 2015).



Срчани циклус обухвата период од почетка једне контракције срца до почетка следеће контракције срца. Састоји се од дијастоле (периода релаксације), за време којег се срце пуни крвљу и систоле (периода контракције). Трајање срчаног циклуса је реципрочно вредности срчане фреквенце, тако да повећање срчане фреквенце скраћује обе фазе срчаног циклуса, и систолу и дијастолу. Међутим, скраћење АП-а, односно систоле није изражено у тој мери као скраћење дијастоле, тако да при веома високој срчаној фреквенци не долази до комплетног пуњења срчаних комора пре следеће контракције (Khanorkar, 2012, Guyton & Hall, 2015).

Слика 8. Догађаји за време срчаног циклуса у левој половини срца: промене притиска у левој преткомори, левој комори и аорти, промена запремине леве коморе, ЕКГ и фонокардиограм (Chandewar, 2012).



Срчани циклус се може сагледати кроз догађаје који се дешавају у преткоморама и догађаје који се дешавају у коморама. Тако постоји, систола и дијастола преткомора, као и систола и дијастола комора. Срчани циклус почиње систолом преткомора, на коју се наставља дијастола преткомора. Дијастола преткомора се поклапа се систолом комора, и делом са дијастолом комора (*Khanorkar, 2012*).

Систола преткомора (траје 0,1 s) састоји се од прве половине у којој се одиграва максимална контракција и која се означава као динамичка фаза, и друге половине која се означава као адинамичка фаза. Дијастола преткомора (траје 0,7 s) се у прве 0,3 s преклапа са систолом комора, након чега почиње дијастола комора, атриовентрикуларне валвуле (трикуспидна и митрална) се отварају и крв прелази из преткомора и пуни коморе. На почетку дијастоле преткомора АВ валвуле се затварају што проузрокује настанак 1. срчаног тона. Преткоморе се пуне крвљу из венског система – из шупљих вена и пулмоналних вена (*Khanorkar, 2012*).

Фазе систоле комора су: фаза изволуметријске контракције (траје 0,05 s), фаза избацавања крви - ејекциона фаза (траје 0,25 s), која обухвата фазу брзог и спорог избацавања крви. Фазе дијастоле комора су: протодијастолична фаза (траје 0,04 s), фаза изволуметријске релаксације (траје 0,08 s), фаза пуњења (траје 0,38 s) која обухвата рану

фаза брзог пуњења, фазу спорог пуњења (дијастазе) и касну фазу брзог пуњења - контракцију преткомора (*Khanorkar, 2012*).

Систола комора:

- Фаза изоволуметријске контракције

На почетку систоле комора АВ валвуле се затварају, да би се спречила регургитација крви из комора у преткоморе, јер услед контракције коморске мускулатуре долази до повећања притиска у коморама, а семилунарне валвуле (пулмонална и аортна) се још нису отвориле (*Khanorkar, 2012*).

- Фаза избацивања крви (ејекциона фаза)

Када притисак у коморама порасте изнад притиска у аорти и плућној артерији (односно у левој комори достигне вредност изнад 80 mmHg, а у десној изнад 8 mmHg), семилунарни залисци се отварају и долази до избацивања крви из комора у артеријски систем. Око 60% волумена крви која се налази у коморама на крају дијастоле се избаци током систоле. У фази брзог избацивања која обухвата прву трећину ејекционе фазе избаци се око 70% наведеног волумена, док се у фази спорог избацивања која обухвата наредне две трећине ејекционе фазе избаци преосталих 30% (*Guyton & Hall, 2015*).

Дијастола комора:

- Протодијастолична фаза

Како почиње релаксација комора, тако долази до пада притиска у коморама у односу на артеријски систем и тенденције промене тока крви, односно враћања крви назад у коморе, што се спречава затварањем семилунарних залистака, што проузрокује настаanak 2. срчаног тона.

- Фаза изоволуметријске релаксације

Затварање семилунарних залистака и релаксација коморске мускулатуре у моменту док АВ-залисци нису отворени, доводи до знатног пада притиска у коморама, на ниво испод притиска у преткоморама, код којих је притисак растао у периоду дијастоле преткомора.

- Фаза пуњења

У овој фази долази до отварања АВ-залистака (што проузрокује настаanak 3. срчаног тона). У раној фази брзог пуњења долази до наглог преласка крви из преткомора у релаксиране коморе, услед великог градијента притиска. Око 70% од укупног волумена крви улази у

коморе током ове фазе. Обзиром да је велики део крви напустио преткоморе у фази спорог пуњења (дијастаза), притисак у преткоморама пада, док притисак у коморама расте и услед смањеног градијента притиска у овој фази у коморе улази око 10% волумена крви. Касна фаза брзог пуњења настаје као резултат систоле преткомора и у коморе прелази преосталих 20% волумена крви, што проузрокује настанак 4. срчаног тона (*Khanorkar, 2012*).

Притисак и волумен у коморама на крају систоле и дијастоле су детерминисани интеракцијом између срца и циркулације (*Katz, 1988*).

Енд-дијастолни притисак и волумен су под међусобним утицајем:

- лузитропног (релаксационог) стања зида комора и
- претходног оптерећења, *preload*-а, (зависи од венског прилива) и представља растезање мишића у мировању на крају дијастоле (*Katz, 1988*), односно оптерећење коморе на крају дијастоле, чији су индекси:
 - енд-дијастолни волумен,
 - енд-дијастолни притисак (најзначајнија мера у клиничким условима и може се проценити мерењем плућног капиларног оклузивног протока помоћу Swan-Ganz катетера који се пласира кроз десну комору у плућну артерију),
 - стрес зида коморе на крају дијастоле и
 - дужине саркомера на крају дијастоле (највероватније представљају најзначајнију меру, али није могуће одредити у интактном срцу) (*Burkhoff, 2002*).

Енд-систолни притисак и волумен су под међусобним утицајем:

- инотропног (контракtilног) стања миокарда и
- накнадног оптерећења, *afterload*-а (одређен својствима артеријског система) и представља притисак који се развија на почетку систоле (*Katz, 1988*), односно механичко оптерећење коморе током фазе ејекције, чији су индекси:
 - артеријски притисак,
 - стрес зида коморе током фазе ејекције - по La Place-овом закону ако се лева комора посматра као лопта, накнадно оптерећење је једнако притиску на

јединицу површине зида леве коморе током ејекције, односно производу притиска у левој комори и односа пречника и дебљине коморе ($\sigma \propto \frac{P r}{h}$)

- укупни периферни отпор (једнак односу разлике средњег артеријског притиска и централног венског притиска и минутног волумена) и
- артеријска импеданца (анализа односа пулсатилног протока и таласа притиска у артеријском систему) (*Burkhoff, 2002*).

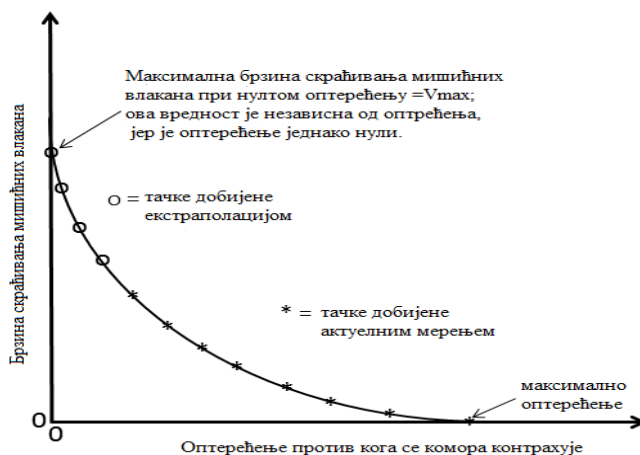
1.2.1 ИНОТРОПНА (КОНТРАКТИЛНА) СВОЈСТВА СРЦА

Контрактилност миокарда се дефинише као брзина завеслаја попречних мостова (главице тешког меромиозина). Контрактилност се може дефинисати као брзина скраћења миокардних влакана или као промена димензија коморе током контракције, када се влакна скраћују или када се комора контрахује без оптерећења (*Kijawornrat, 2013*). У клиничкој примени, контрактилност миокарда процењује се помоћу параметара систолне функције прилагођеним за *preload* и *afterload* (*Kijawornrat, 2013*). **Екситација-контракција купловање** представља физичко-хемијски процес током кога се електрофизиолошке промене (инициране деполаризацијом ћелија) преводе у механичке промене (манифестују се као комбинација контракције и генерисање тензије). Резултат овог процеса је ејекција крви из коморе у артеријско стабло и генерисање тензије (*Kijawornrat, 2013*).

За процену кардиоваскуларне функције код људи и на анималним моделима користе се: V_{\max} , *Syon-Frank-Starling*-ове криве, криве проток-волумен, $dp/dt \max$, QA интервал, ејекциона фракција (*Kijawornrat, 2013*).

- V_{\max} представља максималну брзину скраћивања миокардних влакана процењену у имагинарним условима скраћивања влакана без присуства оптерећења (Слика 9). V_{\max} представља максималну брзину завеслаја главица тешког меромиозина, односно контрактилност миокарда (*Kijawornrat, 2013*).

Слика 9. Однос између оптерећења против кога се комора контрахује и брзине скраћивања мишићних влакана (*Kijawornrat, 2013*).



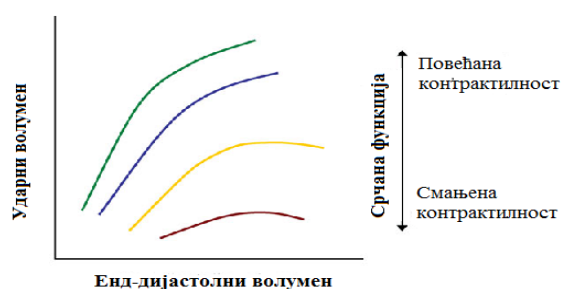
Апроксимација средње стопе циркуферентног скраћења миокардних влакана (V_{cf}) може бити извршена ехокардиографијом или ангиографијом и користи се за прецизну процену инотропне функције миокарда комора код здравих људи и људи са срчаним болестима (Kijawornrat, 2013). Mahler и сарадници су 1975. године код свесних паса показали да је V_{cf} неосетљив на оптерећење волуменом, а осетљив на оптерећење притиском, док је супротан ефект забележен за максималну стопу промене притиска у левој комори (dp/dt_{max}), о којој ће бити речи у наредном тексту (Mahler et al, 1975, Kijawornrat, 2013). V_{max} се сматра корисном индексом контрактилности, мада не апсолутно прецизним.

- Cyon-Frank-Starling-ове криве описују „закон срца” по коме почетна истегнутост мишићних влакана – претходно оптерећење (*preload*), директно утиче на снагу контракције, односно ударни волумен (Cyon, 1866.; Frank, 1899.; Starling, 1918.) (Zimmer, 2002, Kijawornrat, 2013). Повећање *preload*-а повећава снагу контракције и обрнуто.

Контрактилност миокарда се може проценити на основу Cyon-Frank-Starling-овог закона за чију примену је потребно познавање параметара који одређују систолну функцију (ударни волумен, минутни волумен, аортни притисак,...) и *preload*-а (зависи од венског прилива), али под условом да су други параметри кардиоваскуларне функције константни (између осталих срчана фреквенца, крутост аорте, комплијанса леве коморе) (Kijawornrat, 2013). Основна Cyon-Frank-Starling-ова крива представљена је на дијаграму, чија ордината садржи параметар систолне функције, а апсциса вредност *preload*-а. Веома често се за процену *preload*-а користи вредност енд-дијастолног волумена леве коморе.

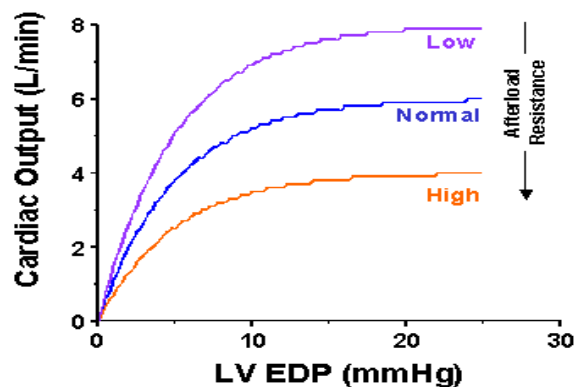
Међутим, *preload* је детерминисан поред енд-дијастолног волумена леве коморе и интраплеуралним притиском, као и крутошћу коморе. Примена лекова или одређена болест, ако утичу на контрактилност миокарда, генеришу нову криву на *Cyon-Frank-Starling*-овом дијаграму. У том случају, пореде се тачке са једнаком вредности *preload*-а на две криве. Ако тачки на другој кривој одговара већа вредност на ординати у односу на иницијалну криву, у питању је позитивно инотропно дејство, а ако јој одговара мања вредност на ординати, у питању је негативно инотропно дејство (*Kijawornrat, 2013*).

Слика 10. Криве вентрикуларне функције које приказују Франк-Старлингов однос (*Hanft et al., 2008*).



Енд-дијастолни волумен повезан је са енд-дијастолним притиском, па се *Cyon-Frank-Starling*-ова крива може представити и као нелинеаран однос енд-дијастолног притиска (такође се назива и притисак пуњења комора) и минутног волумена: када се притисак пуњења повећава, у опсегу ниских вредности долази до значајног повећања минутног волумена, док нагиб овог односа постаје мање оштар при већим притисцима пуњења. Међутим померање *Cyon-Frank-Starling*-ове криве није специфично само за контрактилност, јер поред контрактилности на дати процес утиче и *afterload*. Када је артеријски отпор повећан, минутни волумен се смањује за дати енд-дијастолни притисак, и обрнуто (Слика 11) (*Burkhoff, 2002*).

Слика 11. Утицај *afterload*-а на положај *Cyon-Frank-Starling*-ова криве (*Burkhoff, 2002*).



Дијаграм волумен-притисак у току срчаног циклуса леве коморе представља графичку анализу функције комора као пумпи (Слика 12).

Слика 12. Дијаграм волумен-притисак (Guyton & Hall, 2015).

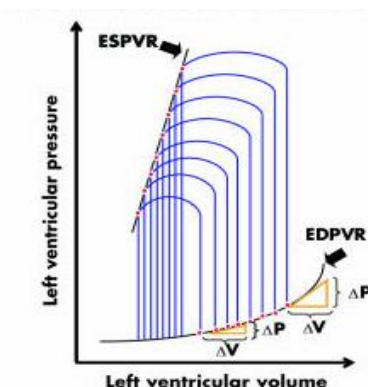


Петља коју чине црвене линије са стрелицама има четири фазе. Прва фаза представља период пуњења, када волумен коморе износи око 45 ml, што представља енд-систолни волумен (волумен заостао у комори након претходне контракције), а дијастолни притисак је око 0 mmHg. Како венска крв тече из преткомора у коморе, волумен коморе се повећа на око 115 ml, што представља енд-дијастолни волумен (волумен на крају дијастоле), а дијастолни притисак се повећава на око 5 mmHg. Друга фаза представља изоволуметријску контракцију, при чему се волумен комора не мења, док притисак расте све до висине притиска у аорти који износи 80 mmHg. У трећој фази, која представља период избацивања, комора се још јаче контрахује, притисак се повећава, а волумен коморе се смањује јер око 70 ml крви истиче из коморе у аорту, што представља ударни волумен, односно ејекциона фракција је 60% (део енд-дијастолног волумена који комора

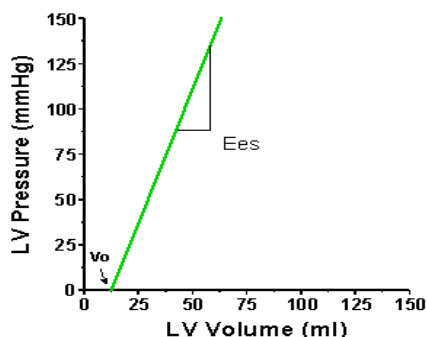
избаци). У четвртој фази, периоду изоволуметријске релаксације, када се затворе семилунарне валвуле долази до пада притиска уз непромењен волумен (*Guyton & Hall, 2015*).

Фамилије кривих притисак-волумен леве коморе настају бележењем појединачних кривих током кратког периода смањења венског прилива (инфлацијом балона у каудални део шупље вене) што доводи до смањења *preload*-а. Анализом фамилије кривих притисак-волумен леве коморе, може се на основу односа притиска и волумена на крају систоле, (*ESPVR, end-systolic pressure-volume relationship*) и *PRSW* (*Preload recruitable stroke work*), проценити контрактилност миокарда (*Kijawornrat, 2013*). Спајањем тачака односа притиска и волумена на крају систоле, *ESPVR*, добија се једна полуправа по којој се, за дату контрактилност при промени оптерећења, креће *ESPVR* и та права се назива еластанцом леве коморе (Слика 13) (*Jović et al, 2002*).

Слика 13. Крива притисак-волумен леве коморе при различитим *preload*-има и *afterload*-има (*Leite-Moreira, 2010*).



Нагиб те полуправе представља енд-сistolну еластанцу (*Ees*) која означава контрактилност миокарда (Слика 14) (*Burkhoff, 2002*). *Ees* представља максимални притисак који се развија из било ког/свих *preload*-а (*Kijawornrat, 2013*). Што је *Ees* већа, већа је и контрактилност и обрнуто. Јединица за *Ees* је mmHg/ml (*Burkhoff, 2002*). То је за сада најпрецизнији показатељ контрактилности миокарда, односно представља златни стандард (*Jović et al, 2002, Kijawornrat, 2013*), јер није под утицајем промена у артеријском систему, као ни промена у енд-дијастолном волумену (*Burkhoff, 2002*). Главни недостатак коришћења *Ees* у клиничким условима је веома тешко мерење вентрикуларног волумена (*Burkhoff, 2002*).

Слика 14. Енд-систолична еластанца (*Burkhoff, 2002*).

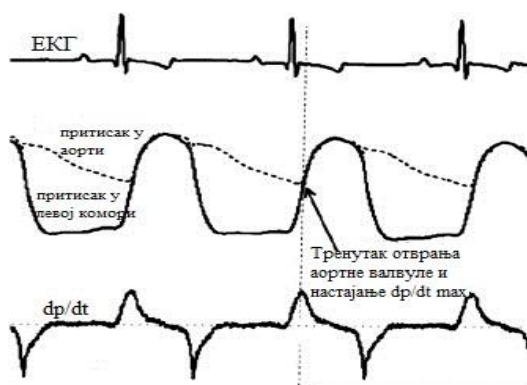
Контрактилност може бити процењена чак и боље, помоћу PRSW који представља линеарни однос за разлику од ESPVR који је нелинеаран (*Jović et al, 2002, Kijawornrat, 2013*). PRSW представља однос рада (радног индекса ударног волумена леве коморе) и волумена/димензије коморе на крају дијастоле (EDV). Обзиром да је ударни рад производ ударног волумена и средњег ејекционог притиска, мање је подложен променама при промени дотока крви (*preloada*). Даљи технолошки развој треба да омогући рутинску примену индекса PRSW у клиничким условима (*Jović et al, 2002*). Површина унутар криве притисак-волумен представља спољшњи механички рад који срце остварује ејекцијом ударног волумена, што се назива ударни рад (*stroke work, SW*). Ударни рад је веома мало под утицајем *afterloada*-а, али је веома осетљив на промене у *preload-u*, па је због тога процењивање односа енд-дијастолног волумена и ударног рада који се назива PRSW (*Preload recruitable stroke work*) погодније. То је линеарни однос чији нагиб одражава инотропно стање и може бити под утицајем геометрије срца и срчане фреквенце (*Rodriguez, 2015*).

- Максимална стопа промене притиска у левој комори ($dp/dt \max$), која се најчешће користи за процену контрактилности миокарда, настаје на крају изоволуметријске контракције, непосредно пре отварања аортне валвуле (Слика 15) (*Hamlin & del Rio, 2012*).

Трошкови потребни за утврђивање $dp/dt \max$ су релативно ниски, а техника сасвим једноставна у односу на златни стандард (криве притисак-волумен) (*Kijawornrat, 2013*). $dp/dt \max$ је детерминисан је са три фактора и то су:

1. контрактилност миокарда (нпр. брзина завеслаја миозинских главица (тежак меромиозин));
2. енд-дијастолни волумен (афинитет везивања Ca^{2+} за тропонин С и број завеслаја попречних мостова);
3. системског артеријског притиска (препрека за отварање аортне валвуле) (*Hamlin & del Rio, 2012*).

Слика 15. Приказ ЕКГ-а, притиска у аорти, притиска у левој комори и dp/dt max (*Hamlin & del Rio, 2012*).

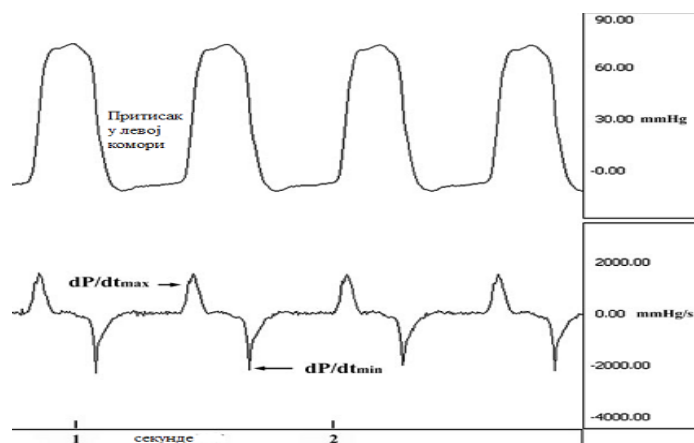


Самим тим, нетачно је да када се мења dp/dt max, да се нужно мења и контрактилност миокарда. Промена контрактилности миокарда јесте чест узрок промене dp/dt max, али није увек. Само онда када друге две наведене детерминанте нису промењене или су једнако промењене али супротно (па се поништавају), промена контрактилности миокарда се одражава на dp/dt max. Међутим, у фармаколошким студијама безбедности, када се тестира одређени лек који би потенцијално могао да утиче на промену *preload-a* и *afterload-a*, и на контрактилност миокарда, најчешће се термин dp/dt max користи да означи контрактилност миокарда (*Hamlin & del Rio, 2012*). На dp/dt max нарочито утичу промене у *preload*-у, па је веома значајно да се *preload* одржава константним, при одређивању овог параметра (*Walley, 2016, Kijawornrat, 2013*).

Када је притисак у аорти низак (као одговор на дилататоре артериола), лева комора генерише нижи притисак и dp/dt max се смањује, иако контрактилност миокарда није

промењена. Са друге стране, ако је енд-дијастолни притисак леве коморе повишен (као одговор на повећан венски прилив), који сам по себи, повећава dp/dt max преко Франк-Старлинговог механизма у том случају, dp/dt max представља равнотежу између повећаног везивања Ca^{2+} за тропонин С (што повећава dp/dt max) и скраћеног времена између почетка контракције леве коморе и отварања аортне валвуле (што смањује dp/dt max) (Hamlin & del Rio, 2012). На Слици 16 приказани су dp/dt max и dp/dt min (минимална стопа промене притиска у левој комори, дефинисана је у наставку текста).

Слика 16. Приказ dp/dt max и dp/dt min код анестезираних пацова (Kijawornrat, 2013).



Што је већа контрактилна сила срца, то је већи dp/dt max (Walley, 2016). Према Bowditch ефекту, dp/dt max и остали индекси контрактилности су под утицајем срчане фреквенце – повећањем срчане фреквенце повећава се и контрактилност миокарда (Kijawornrat, 2013). Код паса повећање срчане фреквенце за око 30 откуцаја/минуто повећава dp/dt max за око 20% (Schmidt et al, 1979, Kijawornrat, 2013).

- QA интервал представља време између настанка електричне активности у левој комори (појава Q таласа на ЕКГ-у) и иницијалне елевације аортног притиска. Представља индиректну меру трајања изоволуметријске контракције, без потребе за мерењем притиска у левој комори. Што је краћи QA интервал, контрактилност је већа (Kijawornrat, 2013).
- Ејекциона фракција је параметар који се најчешће користи за процену контрактилности миокарда у клиничким условима јер је једноставна за мерење, а одређује се електрокардиографски и нуклеарним имиџинг техникама. Представља однос ударног волумена (количина истиснуте крви токо сваког срчаног циклуса,

што представља разлику енд-дијастолног волумена и ендсistolног волумена) и енд-дијастолног волумена. Нормалне вредности су између 55 и 65 %. Главни недостатак овог индекса је зависност од својстава артеријског система (afterload-a) (*Burkhoff, 2002*).

Контрактилност комора је под утицајем количине Ca^{2+} који се ослобађа у миофиламентима, афинитета миофиламената за Ca^{2+} и броја миофиламената који учествују у процу контракције (*Burkhoff, 2002*). Контрактилност може бити модификована услед хуморалног утицаја и фармаколошким средствима – нпр. адренергички агонисти повећавају количину Ca^{2+} која се ослобађа у миофиламентима и на тај начин повећавају контрактилност. Супротно, адренергички антагонисти блокирају ефекте циркулишућег адреналина и норадреналина и смањују контрактилност. Патолошка стања као што је инфаркт миокарда смањују контрактилност услед губитка ткива миокарда (*Burkhoff, 2002*).

1.2.2 ЛУЗИТРОПНА (РЕЛАКСАНТНА) СВОЈСТВА СРЦА

На исти начин као што процес ексцитација-контракција купловање регулише инотропност, лузитропност је регулисана **реполаризација-релаксација купловањем**. Термин лузитропност се односи на релаксацију миокарда током почетка дијастоле, и као што је већ описано, то је активан, АТП зависан процес који обухвата секвестрацију Ca^{2+} из цитоплазме. Релаксација омогућава левој комори да се пуни и прилагоди венском приливу без значајног повећања притиска у њој (*Kapila & Mahajan, 2009*). Главне детерминанте дијастолне функције су: активна релаксација миокарда и пасивна својства коморе (односно ефективна комплијанса коморе) која су под утицајем крутости миокарда (*stiffness*), дебљине зида и геометрије комора (*Nishimura & Tajik, 1997, Ferreira-Martins & Leite-Moreira, 2010*). Друге детерминанте које одређују дијастолу су дијастолна сукција (услед еластичних својстава миокарда након отварања митралне валвуле притисак у левој комори пада, иако се волумен у левој комори повећава), еректилни коронарни ефект (пуњење коронарних артерија крвљу током дијастоле, доводи до дилатације комора хидрауличним механизмом), ограничења перикарда (перикардијалног „restraint“-а),

интеракције комора, срчане фреквенце и функције преткомора (*Nishimura et al., 1989, Nishimura & Tajik, 1997*).

Релаксација коморе је енергетски зависан процес, током кога се контрактилни елементи деактивишу и мишићи се враћају на њихову оригиналну дужину (пре контракције) (*Nishimura & Tajik, 1997*). Релаксација настаје раскидањем попречних мостова, а брзина релаксације одређена је активним пумпањем Ca^+ у саркоплазматски ретикулум од стране Ca^+ -АТП-азе, при чему се интрацелуларна концентрација Ca^+ смањује са 10^{-5} на 10^{-7} М (*Chemla et al., 2000*). Релаксација вентрикула почиње средином систоле и обухвата период прве трећине пуњења комора. Релаксација комора може се посматрати као брзина и трајање смањења притиска леве коморе након контракције у систоли. Минимална стопа промене притиска у левој комори, dP/dt min , изоволуметријско време релаксације (IVRT) и временска константа релаксације (τ) представљају прихваћене индексе стопе релаксације (*Leite-Moreira, 2006*).

- dP/dt min је тренутна вредност која одражава максималну брзину пада притиска у левој комори (*Davis et al, 1999*) (Слика 16). dP/dt min се региструје убрзо након затварања аортне валвуле, а недостатак овог параметра је што зависи и од максималне вредности (пика) аортног притиска и времена затварања аортне валвуле (*Davis et al, 1999, Constable et al., 1999*). Повећање dP/dt min ка позитивним вредностима (обзиром да има предзнак (-)) означава смањење релаксантне активности срца (*Živković, 2014*).
- Временска константа (изоволуметријске) релаксације, τ (τ , изражава се у ms) је најчешће коришћен индекс за евалуацију стопе смањења притиска у левој комори током изоволуметријске релаксације (*Nishimura & Tajik, 1997, Leite-Moreira, 2006*). τ је обрнуто сразмерна стопи/брзини пада притиска у левој комори, односно постаје краћа ако се пад притиска у левој комори убрзава, или дужа ако се пад притиска леве коморе успорава (*Leite-Moreira, 2006*). τ не зависи од пика аортног притиска, па је на тај начин поузданији показатељ ране дијастолне функције, међутим недостатак овог показатеља је тешко конзистентно мерење (*Davis et al, 1999*).

- Изоволуметријско време релаксације (IVRT) представља временски интервал од затварања аортне валвуле до отварања митралне валвуле (*Nagueh et al., 2009*). Када је релаксација миокарда оштећена притисак у левој комори се смањује спорије и потребно је дуже време да постане мањи од притиска у левој преткомори, па се митрална валвула касније отвара и IVRT је дуже (*Nagueh et al., 2009*). Међутим, овај показатељ није специфичан јер може такође бити пролонгиран и под утицајем повећања аортног притиска или смањења притиска у левој преткомори (*Constable et al., 1999*). Одређује се ехокардиографски и нормална вредност је око 70 ms (*Kapila & Mahajan, 2009*).

Ефективна комплијанса коморе означава пасивна својства леве коморе током протока крви кроз митралну валвулу (*Nishimura & Tajik, 1997*). Комплијанса се дефинише као однос промене стреса и резултујућег „strain”-а (*Lam & Redfield, 2007*). „Strain” представља меру (деформације миокарда) као одговор на примењену силу или стрес, а „strain rate” изражава промене деформације миокарда у јединици времена (*Hoit, 2011*). Ефективна комплијанса је термин који означава однос промене волумена према промени притиска (dV/dP) (*Burkhoff, 2002, Lam & Redfield, 2007*). Реципрочна вредност комплијансе је крутост или еластанца (*Lam & Redfield, 2007*). Крутост представља однос промене притиска и промене волумена, dP/dV (*Rosendorff, 2005*). Еластанца леве коморе варира током срчаног циклуса, па на крају систоле одражава систолне перформансе (E_{es}), док на крају дијастоле одражава дијастолну крутост или еластанцу (E_d) (*Lam & Redfield, 2007*). У сврху прилагођавања поређења еластичних својстава одређених структура са различитим иницијалним димензијама, комплијанса се може изразити у односу на иницијални волумен као коефицијент дистензибилности (D_i), дефинисан као $D_i = dV/DP V$, при чему dV/DP означава комплијансу, а V иницијални волумен (*London & Pannier, 2010*).

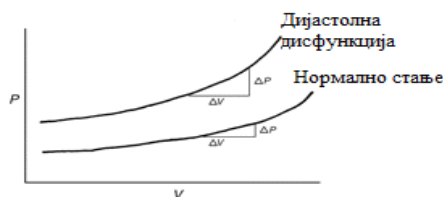
Пасивна својства зида коморе могу се евалуирати анализом позиције и облика криве која приказује однос притиска и волумена на крају дијастоле (EDPVR, *end-diastolic pressure-volume relationship*) (Слика 13). EDPVR представља експоненцијалну криву која се добија уцртавањем више притисак-волумен кривих добијених при различитим preload-има. EDPVR зависи од венстрикуларне дистензибилности (репрезентована променама у вертикалној позицији), величине венстрикула (репрезентована променама у хоризонталној позицији) и комплијансе венстрикула (репрезентована променама у нагибу криве)

(*Ferreira-Martins & Leite-Moreira, 2010*). Оперативна крутост у било којој тачки дуж експоненцијалне криве EDPVR, одговара нагибу тангенте на криву у тој тачки ($\Delta P/\Delta V$). Оперативна крутост се мења са пуњењем – крутост је нижа при мањим волуменима и виша при већим волуменима (промене дијастолног притиска и крутости **зависне** од волумена) (*Leite-Moreira, 2006*). Однос између $\Delta P/\Delta V$ и притиска је линеаран. Нагиб ове праве означава константу крутости коморе (K_c) и користи се за квантификавање крутости коморе. Када се укупна крутост комора повећа, крива притисак-волумен се помера навише и на лево, а нагиб односа $\Delta P/\Delta V$ и притиска постаје оштрији и K_c се повећава (промене дијастолног притиска и крутости **независне** од волумена) (*Leite-Moreira, 2006*). На тај начин, дијастолни притисак се може мењати услед волумен зависне промене оперативне крутости или волумен независне промене крутости комора (*Leite-Moreira, 2006*).

Енд-дијастолни притисак леве коморе зависи од притиска у преткомори на почетку контракције преткомора, контрактилности преткоморе и комплијансе леве коморе (*Nishimura & Tajik, 1997*). Комплијанса је највећа за мање волумене и најмања за веће волумене (*Burkhoff, 2002*). Како миокард постаје крући, комплијанса се смањује и дистензибилност миокарда је мања што доводи до срчане инсуфицијенције (*Rosendorff, 2005*). Смањену комплијансу коморе узрокују или повећање крутости миокарда, или екстринзички фактори срца као што је повећање перикардног restraint-а. Смањење комплијансе коморе доводи до повећања притиска пуњења леве коморе и средњег притиска леве преткоморе, што узрокује дијастолну дисфункцију (*Nishimura & Tajik, 1997*).

Поремећај релаксације миокарда или пасивног пуњења комора резултује у већем енд-дијастолном притиску леве коморе за дати енд-дијастолни волумен леве коморе (Слика 17). Поред тога, свака промена у волумену леве коморе ће индуковати већу промену у притиску леве коморе (*Kapila & Mahajan, 2009*). Око 40% пацијента са дијагнозом срчане инсуфицијенције, има очувану ејекциону фракцију, односно нормалну систолну функцију (*Kapila & Mahajan, 2009*). Дијастолна дисфункција је главна патофизиолошка абнормалност код ових пацијената, чија се инциденца драстично повећава са старосном доби (*Nishimura & Tajik, 1997*).

Слика 17. Притисак-волумен однос за леву комору током дијастоле (Kapila & Mahajan, 2009).

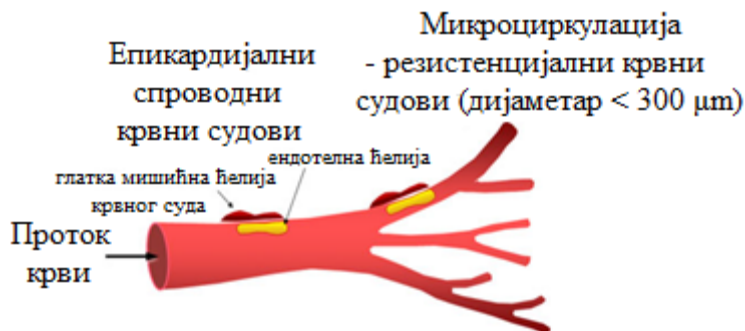


1.2.3 КОРОНАРНИ ПРОТОК

Ушћа две коронарне артерије настају из Валсалвиних синуса непосредно изнад аортне валвуле. Лева коронарна артерија дели се на предњу десцедентну коронарну артерију и циркумфлексну артерију, снабдева предње и латералне зидове леве коморе и предње две трећине интервентрикуларног септума. Десна коронарна артерија снабдева десну комору, задњи зид леве коморе и задњу трећину септума. Главне коронарне артерије деле се у епикардијалне артерије, од којих полазе интрамускуларне артерије које продиру у миокард под правим углом, и формирају субендокардни артеријски плексус. Највећи део венске крви одлази из миокарда леве коморе путем коронарог синуса, а из миокарда десне коморе путем малих предњих кардијалних вена, а оба пута се уливају у десну преткомору. Мала количина крви из коронарних судова улива се директно у срчане шупљине кроз Тебезијеве вене (Ramanathan & Skinner, 2005).

Коронарна циркулација се може поделити у два дела: спроводни део кога чине велике епикардијалне коронарне артерије и резистентни део, односно микроциркулацију кога чине артерије чији је дијаметар мањи од 300 μm . Док у спроводним судовима не постоји значајан отпор протицању крви, како се дијаметар крвног суда смањује - од 300 μm у малим артеријама до мање од 100 μm у артериолама, отпор протицању крви прогресивно расте. Размена супстрата између крви и ткива одиграва се на нивоу капилара (Schelbert, 2010).

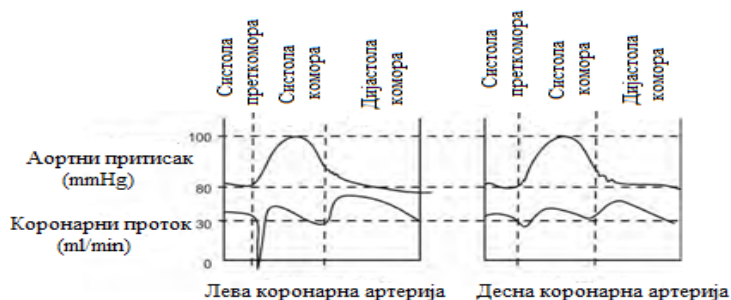
Слика 18. Приказ коронарне циркулације (Schelbert, 2010).



Срце има већу потрошњу кисеоника по маси ткива у односу на друге органе. Нормалан коронарни проток у миру износи 250 ml/min (0,8 ml/min/g миокарда), што представља 5% минутног волумена (*Ramanathan & Skinner, 2005*). Потрошња кисеоника по граму миокарда леве коморе је 20 пута већа од скелетних мишића, па је један од начина прилагођавања леве коморе, висок ниво екстракције кисеоника који износи 70-80% (у поређењу са скелетним мишићима где износи 30-40%). То је олакшано великом густином капилара која износи 3000-4000 mm², за разлику од скелетних мишића у којима износи 500-2000 mm². Обзиром на висок ниво екстракције кисеоника, произилази да повећање потрошње кисеоника које се јавља током физичког вежбања максималног интензитета настаје услед повећане испоруке кисеоника као последица повећаног коронарног протока крви. Упркос високом протоком у срцу током мировања 0.7-0,8 ml/min по граму миокарда, у поређењу са 0,05-0,10 ml/min по граму скелетних мишића, коронарни проток крви се може повећати још 4-5 пута током физичког вежбања (*Duncker & Merkus, 2004*).

Током срчаног циклуса, коронарни проток подлеже карактеристичној фазној варијацији (Слика 19) (*Khanorkar, 2012*). У левој комори, само 15-20 % коронарног протока се одвија током систоле, а 80-85% за време дијастоле. Супротно, венски проток крви (крв се из интрамуралних венула истискује у епикардиалне вене) је највећи током систоле (*Duncker & Merkus, 2004*).

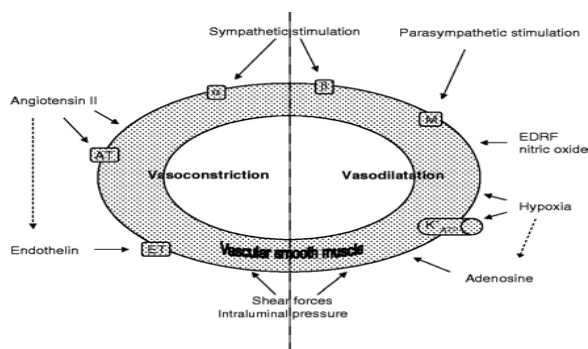
Слика 19: Проток крви кроз коронарне артерије током различитих фаза срчаног циклуса (*Khanorkar, 2012*.)



Током систоле, унутрашња половина миокарда (субендокард) прима мање крви у поређењу са спољашњом половином миокарда. Лева комора је дебља и притисак у њој је већи од аортног притиска током систоле. Због тога је проток у субендокардном делу леве коморе присутан само током дијастоле, због чега је лева комора подложна за исхемијско оштећење и представља најчешћу локализацију за инфаркт миокарда (*Khanorkar, 2012*), упркос низу протективних механизма развијених у овом региону (*Khurana, 2006*). У субендокардном региону леве коморе, густина капилара је већа ($1100 \text{ капилара/mm}^2$) у поређењу са епикардом ($750 \text{ капилара/mm}^2$), и на тај начин проток у дијастоли је знатно већи. Минимална дифузиона дистанца између капилара и ћелија миокарда је 20% краћа у субендокардном региону леве коморе ($16,5 \mu\text{m}$) у поређењу са регионом епикарда ($20,5 \mu\text{m}$). Садржај миоглобина, пигмента који чува (складишти) кисеоник, је већи у субендокарду него у епикарду леве коморе (*Khurana, 2006*). Перфузија субендокарда леве коморе је инверзно пропорционална срчаној фреквенци, односно тахикардија узрокује смањење протока у субендокарду леве коморе, док брадикардија има супротан ефекат (*Woerlee, 1988*). Десна комора је мање дебљине, па је током систоле компресија крвних судова мања и крвни проток се не смањује у великој мери (*Khanorkar, 2012*).

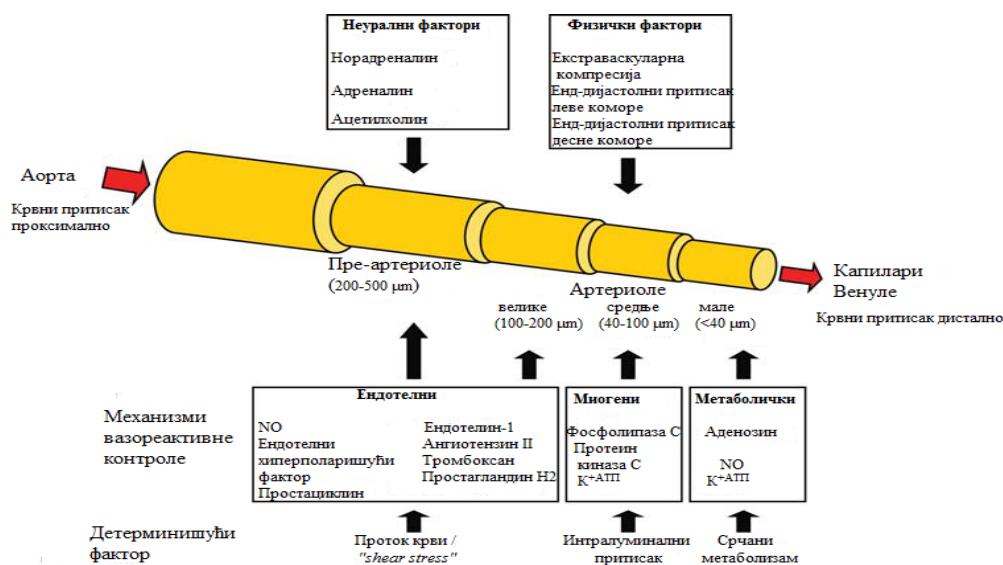
Коронарни проток је детерминисан односом перфузионог притиска и укупног васкуларног коронарног отпора (*Duncker & Merkus, 2004*). Коронарни перфузиони притисак представља разлику притиска у аорти и десној преткомори током дијастоле (*Reynolds et al., 2010*). Резултат интеракције различитих механизма који регулишу коронарни вазомоторни тонус, уобичајено је превага вазодилататорних ефеката над вазоконстрикторним (Слика 20) (*Ramanathan & Skinner, 2005*).

Слика 20. Фактори који утичу на коронарни вазомоторни тонус (*Ramanathan & Skinner, 2005*).



Коронарна ауторегулација подразумева интринзичку способност срца да одржи проток крви релативно константним као одговор на промену перфузионог притиска када је потреба миокарда за кисеоником константна (Dole, 1987). У мировању, коронарни проток је константан при вредности средњег артеријског притиска између 60 и 140 mmHg (Ramanathan & Skinner, 2005). Коронарни проток модулисан је физичким и неуралним факторима, а сваки сегмент микроциркулације је под утицајем различитог детерминишућег фактора односно физиолошког механизма (Herrmann et al, 2012).

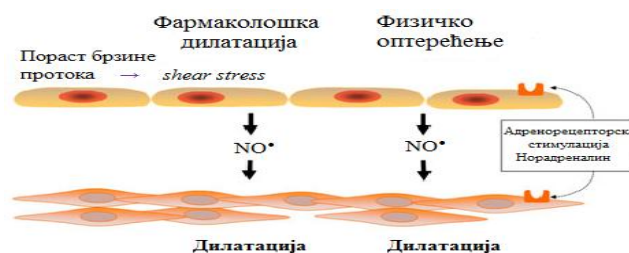
Слика 21. Регулација коронарног протока (Herrmann et al, 2012).



Пораст протока услед физичког оптерећења најчешће је инициран метаболички посредованим смањењем микроваскуларне резистенције, највероватније услед аденозина који настаје из аденозин монофосфата и доводи до релаксације глатких мишића крвних

судова. Такође, настали пораст протока се повећава услед деловања ендотел-зависних фактора – већа брзина протока узрокује већи *shear stress*, стимулацију ендотелне азот моноксид синтетазе (eNOS) и ослобађања азот монооксида (NO), који представља фактор релаксације пореклом из ендотела. Ендотелне ћелије су у блиској интеракцији са глатким мишићним ћелијама крвних судова у циљу прилагођавања дијаметра крвних судова променама брзине протока (протоком посредована дилатација) и на нивоу микроциркулације и на нивоу епикардијалних спроводних крвних судова. И ендотелне и глатке мишићне ћелије коронарних крвних судова поседују адренорецепторе, услед чега реагују на локалне и системске симпатичке стимулусе (Schelbert, 2010).

Слика 22. Интеракција ендотелних и глатких мишићних ћелија крвних судова током фармаколошке дилатације током физичког оптерећења (Schelbert, 2010).



1.2.4 КАРДИОДИНАМИКА И ЕНЕРГЕТСКА ПИЋА

Резултати истраживања у којима су испитивани ефекти ЕП-а на кардиоваскуларни систем су неконзистентни и са великим варијацијама (Al-Fares et al., 2015), и управо недоследности у актуелној литератури онемогућавају доношење чврстих закључака у вези са ефектима ЕП-а на параметре кардиоваскуларног система (Grasser et al., 2016). Недоследности су последица једним делом разлика у методологији, количини испитиваног ЕП-а, дужини трајања мерења варијабли након конзумације ЕП-а, као и због разлика у варијаблама испитаника (Grasser et al., 2016). Обзиром да је утицај ЕП-а на кардиоваскуларни систем углавном процењиван на основу приказа случајева, а на веома малом броју опсервационих студија и мета анализа (Mangi et al., 2017), адекватно дизајниране проспективне студије, рандомизоване, плацебо контролисане се намећу као решење за дефинитивни доказ повезаности ЕП-а са кардиоваскуларним догађајима (Mangi et al., 2017, Wassef et al., 2017).

Акутни кардиоваскуларни нежељени ефекти ЕП-а обухватају (Higgins et al., 2018):

- утицај на хемодинамику
- електрофизиолошке промене
- утицај на ендотелну функцију,
- повезаност са васкуларном патологијом (коронарни артеријски спазам, коронарна артеријска тромбоза, коронарна артеријска дисекција) (*Higgins et al., 2018*).

Табела 5. Кардиоваскуларне промене проузроковане ЕП-има (*Mangi et al., 2017*).

Кардиоваскуларне дијагнозе
Суправентрикуларне аритмије (атријална фибрилација, тахикардија уског комплекса)
Вентрикуларне аритмије (вентрикуларне тахикардија, вентрикуларна фибрилација, Torsade de Pointes)
Продужен QT интервал
Исхемија миокарда или инфаркт
Коронарни вазоспазам
Коронарна тромбоза
Кардиомиопатија
Дисекција аорте

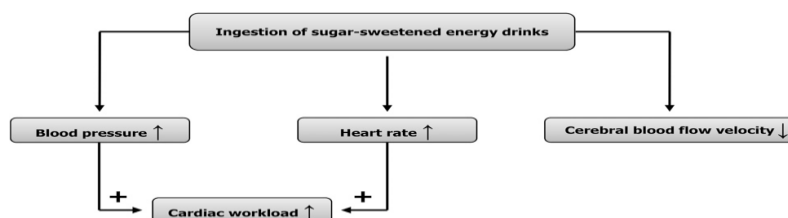
Већина истраживања у којима је проучавано дејство ЕП-а на кардиоваскуларни систем, односи се на њихов утицај на артеријски крвни притисак и срчану фреквенцу (*Grasser et al., 2016*). Резултати мета анализе, показују да ЕП-а значајно повећавају систолни и дијастолни артеријски притисак, док није показан значајан утицај на срчану фреквенцу (*Shah et al., 2016*). Већина биолошких ефеката ЕП-а посредована је позитивним инотропним дејством ЕП-а што подразумева повећање срчане фреквенце, минутног волумена и контрактилности миокарда, ударног волумена и артеријског притиска. Поред тога, ЕП-а утичу на повећање гликемије, укупног холестерола и LDL холестерола. Све наведене биолошке абнормалности утичу на повећање кардиоваскуларног ризика (*Lippi et al., 2016*).

Код здравих особа између 18 и 45 година, показано је да примена по 250 ml RB-а четири пута у току једног дана значајно повећава систолни, дијастолни и средњи артеријски крвни притисак праћен током 24h у поређењу са кофеином раствореним у води, у дози која је еквивалентна дози садржаној у RB-у (80 mg). Обзиром да је у питању иста доза кофеина, сугерише се да други састојци RB-а потенцирају утицај кофеина на крвни притисак или кроз фармакодинамске интеракције (интеракција кофеина са другим

састојцима ЕП-а) или кроз фармакокинетске интеракције (промене у апсорпцији, метаболизму и/или елиминацији кофеина) (*Franks et al., 2012*).

На Институту за физиологију, Универзитета у Фрибургу, у рандомизованом, плацебо контролисаном истраживању *cross-over* дизајна, у коме су испитаници били 24 младе здраве особе оба пола, показано је да конзумација 355 ml RB-а доводи до значајног повећања и систолног и дијастолног крвног притиска, срчане фреквенце и ударног волумена. Такође, ЕП-е утицало је и на значајно повећање двоструког производа, који представља индиректни показатељ потрошње кисеоника у миокарду (срчана фреквенца × систолни притисак), односно повећаног оптерећења срца у миру, а без утицаја на периферни васкуларни отпор.

Слика 23. Хемодинамске последице услед конзумације RB-а (*Grasser et al., 2016*).



У наредном/follow-up истраживању које је било плацебо контролисано и спроведено на 20 здравих испитаника, примењен је RB у истој количини од 355 ml, али пре изазивања менталног стреса (примена аритметичког теста). И примена RB-а, као и подвргавање испитаника аритметичком тесту, појединачно су утицали на параметре кардиоваскуларног система, али њиховом комбинацијом забележено је кумулативно дејство. Наведена комбинација изазвала је кумулативно кардиоваскуларно оптерећење, што се манифестовало повећањем систолног артеријског притиска за око 10 mmHg и дијастолног за 7 mmHg, а повећање срчане фреквенце било је око 20 откуцаја/минуту. Двоструки производ такође је био повећан. Комбинација ЕП-а и менталног стреса утицала је на смањење брзине церебралног протока крви за око -7cm/s (*Grasser et al., 2015*). Показано је и да је смањење брзине церебралног протока крви значајно израженије код жена него код мушкараца. Разлика у половима, као одговор на примену ЕП-а и утицај на церебрални проток, била је независна од телесне тежине испитаника, али и од концентрације CO₂ у издахнутом ваздуху (*Monnard et al., 2016*). Аутори сугеришу да у будућим истраживања треба испитати утицај ЕП-а код пацијената са вазовагалном синкопом и/или ортостатском

интолеранцијом. У вези са тим, кроз приказ случаја код младе професионалне одбојкашице описана је ортостатска интолеранција и транзијентни губици свести, услед синдрома постуралне тахикардије (повећање срчане фреквенце за 40 откуцаја/мин, без значајног смањења крвног притиска) накнадно компликоване рефлексном вазовагалном реакцијом. Ортостатски симптоми настала су једну недељу након почетка конзумирања 4-5 лименки RB-а дневно, а са престанком конзумације ЕП-а наведени симптоми су нестали (*Terlizzi et al., 2008*).

У истој лабораторији Универзитета у Фрибургу, испитиван је утицај RB-а, утицај RB-а без угљених хидрата и утицај раствореног кофеина на кардиоваскуларни систем. Сва три напитка (RB, RB без угљених хидрата и кофеин) утицали су на значајно повећање крвног притиска (за 3-4 mmHg) у поређењу са плацебом. Примена верзије RB-а са угљеним хидратима допринела је повећању ударног волумена, фреквенце срца, минутног волумена, контрактилности, као и двоструког производа, а утицала је и на смањење периферног васкуларног отпора. RB без угљених хидрата, као и кофеин утицали су на повећање периферног васкуларног отпора. На основу ових резултата сугерише се да и кофеин и RB са присуством угљених хидрата, испољавају исти ефекат на крвни притисак, али да је њихово дејство посредовано различитим хемодинамским путевима - верзија RB-а са присуством угљених хидрата делује примарно на миокард, док кофеин делује примарно на крвне судове (*Miles-Chan et al., 2015*). Из резултата овог истраживања произилази да је за инотропно дејство RB-а вероватно одговоран синергизам кофеина и угљених хидрата. Међутим, постоје публикације у којима се инотропно дејство са већом вероватноћом приписује синергистичком дејству таурина и кофеина. Једно од таквих истраживања спроведено је на Универзитету у Падерборну у Немачкој. Трајало је 12 недеља и било је двоструко слепо и *cross-over* дизајна. Испитанци су били спортисти (7 триатлонаца, 4 бициклиста, 2 атлетичара). Процењиван је утицај три напитка на ехокардиографске параметре: оригиналног RB-а (који садржи таурин и кофеин); пића које је било контрола и садржало само кофеин без таурина; и пића које је представљало плацебо и није садржало ни кофеин ни таурин. Ехокардиографски параметри су мерени пре конзумације пића, 40 минута након конзумације пића, а непосредно пре физичког вежбања и на крају, у тзв. регенеративном периоду након физичког вежбања (периоду опоравка) када је срчана фреквенца била око 70/min. Само након конзумације RB-а у регенеративном периоду, тј. у

периоду опоравка ударни волумен (параметар контрактилности леве коморе) био је значајно повећан са $80,4 \pm 21,4$ ml (пре конзумације пића) на $97,5 \pm 26,2$ ml. Контрактилност леве коморе је повећана услед значајног повећања фракционалног (миокардног) скраћења и значајно смањеног ендсistolног волумена и дијаметра леве коморе. Такође, након конзумације RB-а у периоду опоравка након физичког вежбања пик касног дијастолног инфлуksа био је значајно повећан у поређењу са вредношћу пре вежбања, што указује на повећану контрактилност леве преткоморе, што је забележено и након конзумације кофеина, али у мањој мери и без утицаја на вентрикуларну функцију (*Baum & Weiß, 2001*).

У истраживању *Doerner* и сарадника, за процену сегментне функције срца (контрактилности миокарда) код младих здравих испитаника, коришћена је магнетна резонанца и *strain* анализа, а акценат је био усмерен ка синергизму таурина и кофеина. Испитивање је вршено пре и 1 сат након конзумације комерцијално доступног ЕП-а (које је садржало таурин и кофеин) или конзумације само кофеина (контролна група). Утврђено је да је 1 сат након конзумације, ЕП-е утицало на повећање пика систолног *strain-a* (контрактилности леве коморе), док сам кофеин није имао утицаја (*Doerner et al., 2015*).

Обзиром да су акутна дејства ЕП-а прилично јасна, сматра се да даља истраживања нарочито треба да буду усмерена ка хроничној конзумацији ЕП-а (*Zeidán-Chuliá et al., 2013*).

1.2.4.1 УТИЦАЈ ЕНЕРГЕТСКИХ ПИЋА НА ЕЛЕКТРИЧНУ АКТИВНОСТ СРЦА

Постоји група истраживања чији резултати наглашавају утицај ЕП-а на промене електричне активности срца које су праћене помоћу електрокардиограма (ЕКГ-а). Електрокардиограм је брз, неинвазиван метод регистровања срчане активности, бележењем промена мембранског потенцијала током срчаног циклуса. Електрична активност нормалног срчаног циклуса обухвата позитиван Р талас који представља деполаризацију преткомора, након кога се региструје QRS комплекс (чине га негативан Q талас, позитиван R талас и негативан S талас), који представља деполаризацију комора, иза ког следи позитиван Т талас, који представља реполаризацију комора. Део ЕКГ-а од почетка Р таласа до почетка QRS комплекса назива се P-R интервал и нормално траје од

120 до 200 ms. Нормална ширина QRS комплекса је мања од 100 ms (*Tso et al., 2015*). Q-T интервал траје од почетака QRS комплекса до краја Т таласа (*Tso et al., 2015*). Кориговани QT интервал (QT_c интервал) рачуна се Bazzetov-ом формулом – $QT_c = \frac{QT}{\sqrt{RR}}$ (*Ninković & Ninković, 2012*) и представља вредност QT интервала кориговане за срчану фреквенцу (*Tso et al., 2015*). QT_c је продужен ако је вредност већа од 440 ms за мушкарце и већа од 460 ms за жене (*Здравковић, 2016*). Одређивање QT_c интервала је нарочито значајно код особа са повећаним ризиком за настанак аритмија (*Alsunni et al., 2015a*). Продужени QT_c интервал представља маркер повећаног ризика за настанак фаталних аритмија, па свако повећање преко 10 ms захтева посебну евалуацију. Продужетак QT/QT_c интервала већи од 60 ms у односу на базалну вредност или вредност већа од 500 ms, представља маркер за животно угрожавајућу аритмију (*Fletcher et al., 2017*).

Од 2005. године обавезна је процена свих нових молекуларних ентитета на евентуални утицај на QT_c (*Alsunni et al., 2015a*). Стечени продужени QT синдром је реверзибилна срчана каналопатија, која уколико перзистира представља предиспозицију за развој вентрикуларне аритмије, нарочито torsade de pointes, полиморфне вентрикуларне тахикардије која може довести до вентрикуларне тахикардије (*Kozik et al., 2016*). Иако трајање QT интервала у ЕКГ-у обухвата и деполаризацију и реполаризацију вентрикула, продужење QT интервала преvasходно је последица продужења фазе вентрикуларне реполаризације (*Здравковић, 2016*). Нарочито се наглашава утицај ЕП-а на промене у реполаризацији, са већом тенденцијом јављања у присуству повећане срчане фреквенце (*Kozik et al., 2016*). Конзумација ЕП-а код гојазних студената утицала је на значајно продужење QT_c интервала у 60. минути након конзумације у односу на базалне вредности (мада је вредност и даље била у границама нормале), као и на значајно повећање дијастолног притиска и средњег артеријског притиска у 30. минути (*Alsunni et al., 2015a*). И код здравих испитаника показано је да конзумација 1 L ЕП-а (2 лименке Monster[®]-а) доводи до продужења QT_c интервала, повећава систолни притисак и повећава ниво магнезијума и калцијума (*Kozik et al., 2016*). У истраживању *Elitok* и сарадника, које је обухватило 50 испитаника, акутна конзумација 355 ml RB-а утицала је на повећање систолног и дијастолног артеријског притиска и на повећање срчане фреквенце, али није утицала на реполаризацију леве коморе, као ни на остале фазе срчаног циклуса на основу процењених параметара ЕКГ-а (*Elitok et al., 2015*). Показано је да 946 ml ЕП-а продужава

QT_c интервал за око 10 ms два сата након конзумације, што је било значајно више у односу на контролно пиће које је садржало кофеин у дози од 320 mg. Такође, и ЕП-е и кофеин утицали су на иницијално повећање систолног артеријског притиска на сличан начин. Међутим након 6 сати благо повећање систолног притиска је и даље било присутно код испитаника који су конзумирали ЕП-е, док су код оних који су конзумирали кофеин регистроване вредности сличне почетним. Због чињенице да остали састојци у ЕП-има поред кофеина могу утицати на електрофизиолошка својства и хемодинамске параметре, потребна су даља испитивања њихове самосталне као и истовремене примене (*Fletcher et al., 2017*). ЕП-е није имало утицај на кориговани QT интервал (*Brothers et al., 2017*). Показан је значајан хемодинамски ефекат 2 лименке RB-а без шећера код испитаника са утврђеним фамилијарним синдромом дугог QT интервала. Забележено је значајно повећање систолног (максимално у 70. минути) и дијастолног крвног притиска (максимално у 60. минути) у односу на плацебо. Срчана фреквенца се није значајно разликовала између две групе, као ни свеукупне промене QT_c интервала (*Gray et al., 2017*).

Sachin Shah и сарадници са Универзитета у Пацифику објавили су више публикација о утицају ЕП-а на кардиоваскуларни систем. Показали су да, и акутна конзумација, а и конзумација током наредних 14 дана, 2 лименке ЕП-а (садржи укупно 320 mg кофеина) утичу на продужење QT_c интервала код здравих мушкараца (*Shah et al., 2014*). Такође, у рандомизованом, душло слепом, плацебо контролисаном истраживању, cross-over дизајна, конзумација 2 лименке од по 500 ml популарног ЕП-а од стране младих здравих људи, утицала је на повећање систолног артеријског притиска и продужење QT_c интервала у 2. сату након конзумације, док није имала значајан утицај на срчану фреквенцу, вредност дијастолног притиска, QT интервал и QRS интервал (*Shah et al. 2016a*). Резултати истраживања *Roshni Shah* са одељења кардиологије болнице Провиденс у Саутфилду, показали су да је ЕП-е утицало на повећање централног аортног систолног артеријског притиска, проширење пулсног притиска, повећање систолног и дијастолног брахијалног притиска, као и на значајно продужење QT интервала (*Shah et al., 2016b*).

Steinke и сарадници испитивали су утицај 500 ml ЕП-а на кардиоваскуларне параметре након акутне примене (1. дана), као и 7. дана свакодневне конзумације исте дозе. Резултати су показали да су вредности срчане фреквенце, као и вредности систолног крвног притиска значајно били повећани током 4. сата након конзумације ЕП и 1. и 7.

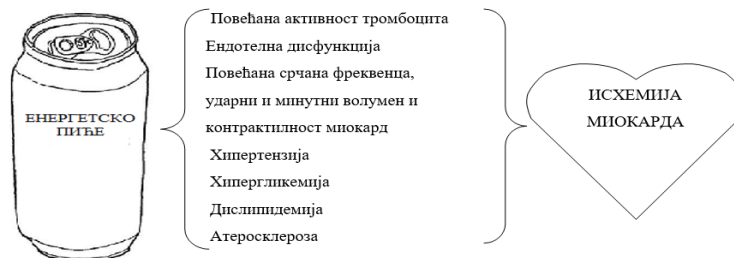
дана, док је значајно повећање вредности дијастолног притиска било 2. сата након конзумације ЕП-а само 1., али не и 7. дана. QTc интервал био је продужен у 4. сату, 1. и 7. дана у односу на базалне вредности, али не и статистички значајно. Као недостатак овог истраживања наводи се недостатак контролне групе (*Steinke et al., 2009*).

Варијабилност срчане фреквенце представља неинвазиван тест за евалуацију функције аутономног нервног система (*Alsunni et al., 2015a*) и одражава истовремени утицај симпатичког и парасимпатичког аутономног нервног система на срце (*An et al., 2014*). Смањена функција парасимпатичког нервног система или повећана функција симпатичког нервног система доводе до редуције варијабилности срчане фреквенце. Показано је да акутна конзумација кофеина смањује активност парасимпатикуса и на тај начин доводи до смањења варијабилности срчане фреквенце (*Alsunni et al., 2015a*). Физичка активност редукује варијабилност срчане фреквенце услед смањења активности парасимпатикуса и повећања активности симпатикуса, доводећи до повећања срчане фреквенце, ударног волумена и контрактилности миокарда. Након тренинга срчана фреквенца се брзо смањује услед вагусне реактивације, а варијабилност срчане фреквенце се постепено повећава, па се ризик за појаву аритмија повећава након физичке активности (*Wiklund et al., 2009*). Сматра се да се утицај ЕП-а на срчану функцију, може евалуирати и анализом овог параметра услед квантификације симпатовагалне равнотеже (*Nelson et al., 2014*). Код здравих испитаника оба пола, конзумација ЕП-а и алкохола пре максималног теста оптерећења на бицикл ергометру, у периоду опоравка након тренинга праћена је периодом спорије вагусне реактивације и споријег смањења активности симпатикуса, односно довела је до спорије аутономне срчане модулације (срчана фреквенца је била дуже смањена, односно било је израженије смањење варијабилности срчане фреквенце) у поређења са опоравком након примене само теста оптерећења. Закључак овог истраживања је да особе које имају урођену предиспозицију за настанак поремећаја ритма, имају повећан ризик за настанак малигних аритмија у сличним ситуацијама (*Wiklund et al., 2009*). Такође, варијабилност срчане фреквенце у 60. минути након конзумације ЕП-а, била је значајно мања код гојазних студената него код студената са нормалном телесном тежином (*Alsunni et al., 2015a*). Публиковани су и резултати којима није показан утицај ЕП-а на варијабилност срчане фреквенце (*Nelson et al., 2014, An et al., 2014*).

Под утицајем ЕП-а, поред продужења QT интервала, на ЕКГ-у бележи се и елевација ST сегмента (*Shah et al., 2016*). Значајно смањење срчане фреквенце, као и промене у ST-T сегмента на ЕКГ-у демонстриране су у истраживању *Hajsadeghi* и сарадника, код 44 здраве младе особе након примене 250 ml ЕП-а. Претпоставља се да је смањење срчане фреквенце настало услед централне стимулације *p. vagusa* од стране кофеина. Такође, наводи се да као узрок смањења срчане фреквенце, може бити и повећан ударни волумен услед повећања контрактилности миокарда леве коморе или услед повећања *preloada*-а. Аутори овог истраживања сугеришу даља истраживања на ову тему и сматрају да су наведене промене ST-T сегмента од великог клиничког значаја, обзиром да могу бити одраз субендокардног оштећења, а као могуће објашњење наводи се ексцесивно ослобађање катехоламина након конзумације ЕП-а (исход који је сличан променама на ЕКГ-у које настају због тзв. теорије „катехоламинске олује” код субарахноидалне хеморагије) (*Hajsadeghi, 2016*). Као образложење наводи се да је уобичајено да је повећана срчана фреквенца последица ослобађања катехоламина, али је у неким стањима могућа и комбинација смањења срчане фреквенце и ослобађања катехоламина – што је описано и за Кушингов рефлекс - хипертензија (услед активације симпатикуса) и смањена срчана фреквенца (услед активације *p.vagusa*) (*Geçmen, 2016*).

Конзумација ЕП-а доводи се у везу са повећаним ризиком за настанак исхемије миокарда услед ендотелне дисфункције (*Higgins & Ortiz, 2014*). О ендотелној дисфункцији, детаљније ће бити речи у поглављу Енергетска пића и оксидативни стрес. Недостатак рандомизованих и проспективних истраживања представља главну баријеру за немогућност успостављања недвосмислене повезаности између прекомерне конзумације ЕП-а и исхемије или инфаркта миокарда (*Lippi et al., 2016*).

Слика 24. Потенцијални биолошки механизми повезаности прекомерне конзумације ЕП-а и исхемије миокарда (прилагођено према *Lippi et al., 2016*).



Досадашњи докази који повезују конзумацију ЕП-а са исхемијом миокарда засновани су углавном на приказима случајева. Кроз приказе случаја представљене су младе особе конзументи ЕП-а, код којих је забележен опсежна коронарна тромбоза или акутни инфаркт миокарда са ST елевацијом (*ST elevation myocardial infarction, STEMI*) (*Solomin et al., 2015, Benjo et al., 2012, Ünal et al., 2015, Scott et al., 2011 Wilson et al., 2012 Hanan Israelit et al., 2012, Polat et al., 2013*). Занимљиво је насловљен приказ случаја „ЕП-а вам дају крила, али такође и абнормалн резултат теста физичког оптерећења“ у коме је описан пацијент са дијагностикованом коронарном артеријском болешћу, код кога је конзумација две лименке RB-а пре теста оптерећења на тредмилу, утицала на настанак лажно позитивног резултата теста (*Choudhury et al., 2017*). Описани су случајеви високо ризичних кардиоваскуларних пацијената код којих је након конзумације ЕП-а дошло до развоја дисекције аорте (*Mangi et al., 2017*). У ревијалном раду (*Goldfarb et al., 2014*), приказано је 17 случајева нежељених акутних кардиоваскуларних компликација у вези са конзумацијом ЕП-а.

Сумирано, описане кардиоваскуларне компликације које настају услед неадекватне акутне конзумације ЕП-а су следеће: повећање артеријског крвног притиска, повећање срчане фреквенце, продужење кориговане вредности QT интервала, вентрикуларне и суправентрикуларне аритмије, тромбоза коронарних артерија, спазам коронарних артерија, инфаркт миокарда са ST елевацијом, дисекција аорте, ендотелна дисфункција, као и изненадна смрт узрокована застојем рада срца. Хронична конзумација може бити узрок хипертензивне болести срца, болести коронарних артерија, цереброваскуларних болести, као и периферне артеријске болести (*Higgins et al., 2015*). Закључак је да ЕП-а имају утицај на повећање кардиоваскуларних потреба (*Wassef et al., 2017*). Док су акутни ефекти ЕП-а на кардиоваскуларни систем прилично разјашњени, хронични су знатно мање проучени и сугеришу се даља истраживања (*Higgins et al., 2015*).

1.2.4.2 УТИЦАЈ ПОЈЕДИНАЧНИХ САСТОЈАКА ЕНЕРГЕТСКИХ ПИЋА НА КАРДИОДИНАМИКУ

Обзиром да су аденозински рецептори распоређени кроз читаво тело, **кофеин** делује на кардиоваскуларни систем на више нивоа: директно на миокард (на контрактилност и

кондукцију), крвне судове (на васкуларни тонус и ендотелно ткиво) и на аутономни нервни систем (*Wilson et al., 2012, Zulli et al., 2016*). Ксантини стимулишу миокард директно, мада су неки од ових ефеката маскирани због истовремене стимулације једара *n.vagusa* у *meduli oblongati*. Мале дозе кофеина (5-200 mg) углавном проузрокују брадикардију због преовладавања стимулације *n.vagusa*. Применом веће дозе кофеина (200-500 mg) преовладава стимулација миокарда што доводи до тахикардије. Одређени појединци реагују и на мање дозе кофеина тахикардијом (*MacCornack, 1977*). Међутим, постоје и сугестије да је наведени недвосмислен утицај одређених доза кофеина на срчану фреквенцу заснован на малом броју опсервација (*Whitsett et al., 1984*).

Директна стимулација миокарда ксантинима, нарочито теофилином, узрокује повећање минутног волумена, уз пратеће смањење венског крвног притиска, због ефикаснијег пражњења срчаних комора. Док директна стимулација миокарда и централна вазомоторна стимулација повећавају системски крвни притисак, централна стимулација вагуса и периферна вазодилатација га смањују. Крајњи резултат је обично благи пораст тензије, обично не више од 10 mmHg (*MacCornack, 1977*). Резултати клиничких студија показују да кофеин повећава укупни периферни отпор, без повећања ударног или минутног волумена и мада долази до смањења срчане фреквенце као *feedback* механизма (*Zulli et al., 2016*), не сматра се клинички релевантним (*Nawrot et al., 2003*).

Дозе од 80-240 mg кофеина повећавају систолни артеријски притисак за око 4-9 mmHg, а дијастолни за око 2-4 mmHg (*Grasser et al., 2016*). Акутна примена доза већих од 250 mmHg, доводи до повећања систолног притиска за 5-15 mmHg, и /или дијастолног за 5-10 mmHg. Ефекти су највише изражени код старијих особа, особа са хипертензијом као и код особа који уобичајено не конзумирају кофеин (*Nawrot et al., 2003*). Показано је да код особа које не конзумирају кофеин, односно које га конзумирају у врло малим количинама долази до три пута већег пораста систолног крвног притиска у односу на редовне конзументе кофеина (7,18 mmHg наспрам 2,40 mmHg редом), 1h након конзумације енергетског шота (*Cheung et al., 2016*). Међутим сматра се да конзумација кофеина у количини од 500 mg може утицати на акутно повећање крвног притиска, док су хронични ефекти минимални и да се након неколико дана редовне конзумације развија толеранција и крвни притисак успоставља првобитни ниво (*Schaffer et al., 2014*). Особе

који не конзумирају кофеин сваког дана, су у већем ризику да се интоксичирају кофеином услед конзумације ЕП-а, у поређењу са особама које су редовни конзументи кофеина, због одсуства фармаколошке толеранције (Reissig et al., 2009) повезане са аденозинским рецептором (Echeverri et al., 2010). Хронично блокирање аденозинских рецептора доводи до њихове усходне регулације (up-regulation), што се манифестује повећањем броја и сензитивности рецептора. Управо је усходна регулација аденозинских рецептора одговорна за апстиненцијални синдром који се карактерише главобољом, замором, анксиозношћу. Када редовни конзументи, напрасно престану са конзумацијом кофеина, велики број доступних аденозинских рецептора доприноси вазодилатацији и настанку наведених симптома (Echeverri et al., 2010).

Кофеин индукује активацију β_1 рецептора симпатичког нервног система, па тако испољава позитивно инотропно и хронотропно дејство (Cappelletti et al., 2015). Кофеин се везује за β адренергичке рецепторе на површини кардиомиоцита што доводи до повећања сАМР-а унутар ћелије (као што је већ наведено блокира ензим који разграђује сАМР), што изазива ефекте сличне дејству адреналина (који се везује за рецепторе на ћелијама и доводи до активације продукције сАМР-а). сАМР делује као секундарни гласник и активира велики број протеин киназа А. Свеукупан ефекат је повећање стопе гликолизе и повећање количине АТП-а доступног за мишићну контракцију и релаксацију (Chimezie, 2013). На овај начин повећавајући сАМР, кофеин испољава директно инотропно дејство, а такође то чини и индиректно блокирајући аденозинске рецепторе, чиме спречава негативне инотропне ефекте аденозина (блокира вазодилататорне ефекте аденозина, дејства аденозина на ниво катехоламина, ослобађање ренина и на липолизу, као и инхибиторне ефекте аденозина на агрегацију тромбоцита) (Wassef et al., 2017). На тај начин акутна администрација кофеина утиче на повећање крвног притиска, повећање нивоа катехоламина, ренина и слободних масних киселина (Wassef et al., 2017).

На пацовима је показано да апликација **таурина** у вентрикуларни систем мозга утиче дозно зависно на смањење срчане фреквенце и средњег артеријског притиска. Такође, апликација таурина у вентрикуларни систем мозга утицала је на значајно потенцирање брадикардије, што није уочено након интравенске примене (у v. femoralis). На основу тога је закључено да таурин на централном нивоу потенцира еферентну вагусну

активност и/или инхибише преганглијску еферентну активност симпатикуса што доводи до брадикардије и хипотензије (*Yang & Lin, 1983*). Ниво таурина у плазми је у негативној корелацији са крвним притиском код хипертензивних пацијената (*Sun et al., 2016*). Начин на који таурин испољава хипотензивни ефекат проучава се дуго времена. Доступни подаци сугеришу да за хипотензивни ефекат таурина није одговоран један специфичан механизам већ је реч о мултиплим механизмима (*Sun et al., 2016*). За разлику од кофеина који појачава дејство ангиотензина II (*SCF, 2003*), хипотензивно дејство таурина објашњава се управо супресијом активности система ренин-ангиотензин-алдостерон, појачавањем дејства каликреина у крви и периферним ткивима (*Wójcik et al., 2010, Sun et al., 2016*), диуретском и натриуретском активности и вазорелаксантном активности (*Sun et al., 2016*).

Таурин смањује ниво холестерола подстичући његову екскрецију, а такође смањује и његову апсорпцију у дигестивном тракту (*Ahn, 2009*). У неколико клиничких студија показано је да исхрана богата таурином може смањити кардиоваскуларни ризик (*Sun et al., 2016*), па се примена таурина у комбинацији са конвенционалном терапијом сматра безбедном и ефикасном у лечењу пацијената са конгестивном срчаном инсуфицијенцијом (*Azuma et al., 1985*). Суплементација таурином током 4 недеље код жена средње животне доби утицала је на смањење хомоцистеина, независног предиктора кардиоваскуларног ризика (*Ahn, 2009*). Може се рећи да таурин смањује факторе ризика за кардиоваскуларне болести, али ипак недостају проспективне епидемиолошке студије које то потврђују (*Wójcik et al., 2010*). Упркос бројним истраживањима у којима је демонстриран хипотензивни ефекат таурина, докази да суплементација таурином смањује крвни притисак код особа са хипертензијом још увек су недовољни (*Sun et al., 2016*).

У наведеном извештају Научног комитета за храну Европске уније из марта 2003. године, у коме су сумирана истраживања о потенцијалним интеракцијама састојака у ЕП-има, наводи се да на нивоу кардиоваскуларног система, „ако постоји **интеракција између таурина и кофеина**, у том случају таурин ублажава дејство кофеина” (*SCF, 2003*). Постоји и други став, у смислу да таурин потенцира физиолошка дејства кофеина (*Scott et al., 2011*). Таурин се генерално сматра антиаритмиком, а тај ефекат се приписује регулацији катјонског транспорта (*Schaffer et al., 2014*). Ефекти таурина који подразумевају превенцију аритмија обухватају регулисање нивоа калијума, калцијума и

натријума, у крви и ткивима и регулисање ексцитабилности миокарда, вероватно модификацијом пропустљивости мембране за калијум (*Eby & Halcomb, 2006*), док кофеин испољава проаритмогено дејство услед повећања интрацелуларне концентрације калцијума (*Mangi et al., 2017*). Настанак аритмија се повезује са конзумацијом ЕП-а, међутим нису потврђена синергистичка дејства таурина и кофеина на електричну активност срца (*Schaffer et al., 2014*). Гуарана садржи велику концентрацију кофеина и због тога може, као што је већ наведено, појачати ефекте кофеина (*Higgins et al., 2010*).

Не постоје подаци о утицају **глукуронолактона** на било коју компоненту кардиоваскуларног система, па се сугерише испитивање нарочито ове компоненте на забележене кардиоваскуларне промене услед примене ЕП-а (*Grasser et al., 2016*).

Претпоставља се да **угљени хидрати** садржани у ЕП-има утичу на кардиоваскуларни систем на бази калоријског уноса хране, који је генерално праћен повећањем срчане фреквенце, минутног волумена и стопе плућне вентилације (сви доприносе термогеним ефектима калоријског уноса) (*Grasser et al., 2016*). Конзумација глукозе индукује брзо повећање инсулина у плазми, за разлику од уноса фруктозе која индукује знатно нижи одговор инсулина. Фруктоза се даље конвертује у глукозу у јетри, која се само делимично ослобађа у циркулацију. Инсулин на дозно зависан начин повећава минутни волумен, али такође и смањује укупни периферни отпор (*Grasser et al., 2016*). У овом контексту, системска инсулинска резистенција може настати услед адренергичке стимулације што се делимично може објаснити појачаним дејством симпатикуса као одговор на повећање концентрације инсулина у плазми (*Grasser et al., 2016*).

Код младих здравих људи показано је да конзумација фруктозе (60 или 30 g) повећава дијастолни артеријски притисак у већој мери од уноса 60 g глукозе или сахарозе. Ингестија сахарозе или глукозе повећала је минутни волумен, индекс контрактилности и ударни волумен, али је утицала на смањење укупног периферног отпора, док је фруктоза тежила повећању укупног периферног отпора. На овај начин показано је да иако се сахароза састоји од глукозе и фруктозе, кардиоваскуларни систем је под већим утицајем дејства глукозе него фруктозе (*Grasser et al., 2014a*). Сахароза, глукоза и фруктоза повећавају срчану фреквенцу и то на временски зависан начин, па се

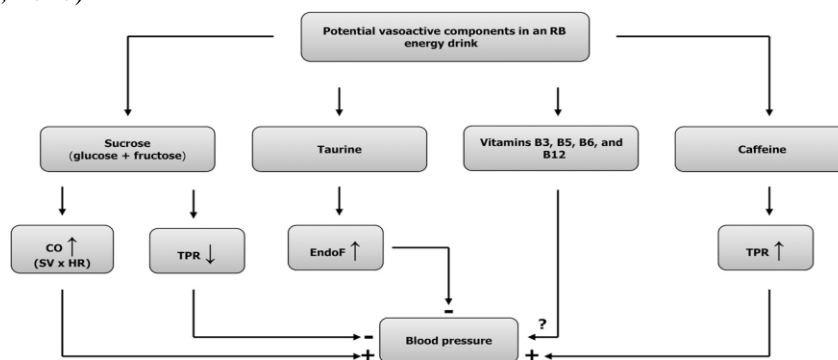
значајан пораст очекује тек 45 минута након уноса, док су максималне вредности срчане фреквенце забележене у 120. минути након уноса (*Grasser et al., 2016*). Генерално сматра се да угљени хидрати као састојак ЕП-а испољавају проинфламаторно дејство, доприносе дислипидемији, повећању телесне тежине и настанку инсулинске резистенције (*Mangi et al., 2017*).

Низак ниво **витамина Б комплекса** доводи до поремећаја реметилације хомоцистеина у метионин и повећања нивоа хомоцистеина, па наведени витамини представљају есенцијалне кофакторе у хомоцистеин-метионин метаболизму (*Mangge et al., 2014*). Хомоцистеин представља независни ризични маркер за кардиоваскуларне болести, и повезан је са настанком možданог удара код старијих особа (*Mangge et al., 2014*). Повећан ниво хомоцистеина има негативан утицај на кардиоваскуларни систем, услед протромботичког деловања и ослобађања фактора раста из васкуларног ендотела (*Stough et al., 2014*). Међутим, резултати мета анализе нису показали да суплементација витаминима Б комплекса испољава бенефитни ефекат у превенцији кардиоваскуларних обољења (*Ntaios et al., 2009, Wassef et al., 2017*), док је мета анализом потврђено да суплементација витаминима Б комплекса смањује ниво хомоцистеина и има протективан утицај на настанак možданог удара (*Wassef et al., 2017*).

Хемодинамски ефекти **гинсенга** нису адекватно евалуирани, а резултати досадашњих истраживања сугеришу да гинсенозид Rg1, повећава крвни притисак стимулацијом централног нервног система, док други конституент Rb1, снижава крвни притисак депресијом централног нервног система. Гинсенг доводи до повећања концентрације NO и релаксације глатких мишића што може изазвати хипотензивне ефекте, док на супрот томе, стимулише ослобађање кортизола (који узрокује ретенцију натријума и течности) и утиче на деградацију ендотелина (вазоконстрикторно дејство) што има за последицу хипертензивни ефекат (*Caron et al., 2002*). *Shah* и сарадници су разматрали да *Panax ginseng* као састојак ЕП-а има потенцијал да неутралише ефекте кофеина, односно да смањи елевацију крвног притиска (*Shah et al., 2016*), међутим то нису потврдили, јер *Panax ginseng* у дози од 800 mg није испољио утицај на крвни притисак и на параметре ЕКГ-а (*Shah et al., 2016a*). **Гуарана** повећава систолни артеријски притисак, а њене компоненте су и даље активне у крви 150 минута након конзумације (*Meyer & Ball,*

2004). Постоје сугестије да **карнитин** и пропионил-L-карнитин имају позитиван ефекат на миокард код исхемијског обољења срца и срчане инсуфицијенције (повећава контрактилност срца и смањује настанак вентрикуларних аритмија), међутим услед конфликтних резултата потребна су даља истраживања пре рационалне примене карнитина као протективног агенса (*Lango et al., 2001*). Ефекти **Гинко билобе** на кардиоваскуларни систем подразумевају утицај на јонске канале и промену сигналне трансдукције. Утиче и на смањење вискозности крви и као што је већ поменуто смањује агрегацију тромбоцита (*Zhou et al., 2004*).

Слика 25. Потенцијални хемодинамски утицај појединачних састојака RB-а (прилагођено према *Grasser et al., 2016*)



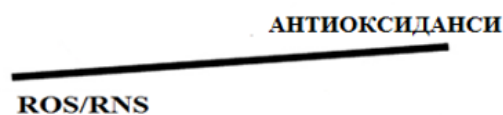
1.3 ОКСИДАТИВНИ СТРЕС

Живот у аеробним условима, подразумева изложеност оксидансима, који су подељени у две главне групе хемијски реактивних молекула (*Pitocco et al., 2010*):

- реактивне кисеоничне врсте (*reactive oxygen species, ROS*) - садрже кисеоник
- реактивне нитрогене врсте (*reactive nitrogen species, RNS*) – садрже азот.

Заједнички термин којим се обухватају обе наведене групе је RONS (*reactive oxygen and nitrogen species*). Већина RONS садржи неспарене електроне који се у том случају називају слободни радикали (*Weidinger & Kozlov, 2015*). Од 1954. године познато је да слободни радикали имају важну улогу у биолошким системима, а 1956. године *Denham Harman* их је довео у везу са процесом старења (*Harman, 1956, Kohen & Nyska, 2002*). RONS се стварају екстрацелуларно, као резултат еволуцијски развијеног урођеног имуног система да делује бактерицидно и интрацелуларно, као споредни производи метаболичких процеса и представљају важну компоненту интрацелуларне сигнализације (*Weidinger & Kozlov, 2015*). RONS реагују са ћелијским молекулима као што су протеини, липиди, нуклеинске киселине и изазивају реверзибилне или иреверзибилне оксидативне модификације (*Pitocco et al., 2010, Wang et al., 2013*). RONS се непрекидно стварају током нормалног аеробног метаболизма и уклањају различитим биолошким антиоксидансима. Антиоксидативна заштита никада није у потпуности ефикасна, а када продукција слободних радикала надмаши антиоксидативну одбрану (било у случају повећања слободних радикала или смањења антиоксиданата), настају стања која се означавају као оксидативни стрес и нитрозативни стрес (*Gutteridge 1995, Ridnour et al., 2004*). Процењено је да је оксидативни стрес повезан са више од 100 обољења, било као њихов узрок било као последица (*Pisoschi & Pop, 2015*).

Слика 26. Стање оксидативног стреса (прилагођено према *Atukeren 2011*).

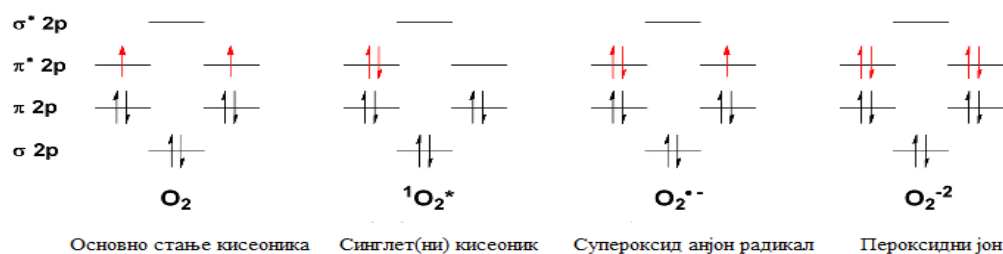


1.3.1 ПРООКСИДАТИВНЕ ВРСТЕ

Реактивне кисеоничне врсте, ROS обухватају низ молекула и слободних радикала који настају од молекуларног кисеоника (*Toro & Rodrigo, 2009*). Молекуларни кисеоник у основном стању представља бирадикал, јер садржи два неспарена електрона у спољшњој орбитали и релативно је нереактиван (*Scandalios, 2005, Turrens, 2003*). Међутим, током нормалне метаболичке активности, а и као последица различитих негативних утицаја

настају врло реактивна једињења кисеоника, као што су слободни радикали и деривати (*Scandalios, 2005*). Оксидативна моћ кисеоника је ограничена јер два неспарена електрона имају паралелни спин и могу реаговати само са другим врстама чији је спин антипаралелан у односу на та два неспарена електрона у овом двоатомском молекулу (Слика 27)(*Scandalios, 2005, Turrens, 2003*). Реактивност кисеоника и његова оксидативна моћ повећавају се уклањањем наведеног спинског ограничења, што се постиже додавањем електрона или довођењем енергије кисеонику од стране фотосинтисајзера (хлорофил, једињења која садрже флавин) (*Scandalios, 2005*). Ако се један од два неспарена електрона ексцитира и промени спин, настаје хемијска врста, позната као синглет кисеоник, $^1\Delta g O_2$, који је моћан оксиданс са два електрона са супротним спиновима, који веома брзо ступају у интеракцију са другим паровима електрона, нарочито двоструким везама (*Gutteridge, 1995, Turrens, 2003*). Поред $^1\Delta g O_2$, синглет кисеоник постоји и у другом стању, $^1\Sigma g^+$, које је екстремно енергетско и у биолошким системима се брзо распада у $^1\Delta g$ форму (*Gutteridge, 1995*).

Слика 27. Молекуларно орбитални дијаграми (прилагођено према *Krumova & Cosa, 2016*).



Реактивне врсте азота, RNS могу функционисати као сигнални молекули или проузроковати нитрозативни стрес. Од азот монооксида $\cdot NO$, који се продукује током метаболизма аргинина, настају остала реактивна једињења ове групе (*Wang & Hai, 2016*). Једноелектронском оксидацијом $\cdot NO$ настаје нитрозонијум катјон (NO^+), док његовом редукцијом настаје нитроксилни анјон (NO^-) (*Stamler et al., 1992, Kohen & Nyska, 2002*). NO^- може реаговати са $\cdot NO$, што доприноси настанку N_2O и OH^- (*Beckman & Koppenol, 1996, Kohen & Nyska, 2002*). Пероксинитрити ($ONOO^-$), настају у реакцији $\cdot NO$ са супероксид анјон радикалом и у могућности су да реагују са свим главним класама биомолекула (*Patel et al., 1999*). У Табели 6 приказане су две главне класе реактивних

врста, ROS и RNS, у које се убрајају слободни радикали, али и нерадикалски облици који су нестабилна једињења.

Табела 6. Реактивне слободнорадикалске и нерадикалске врсте кисеоника и азота (*Halliwell, 2006*).

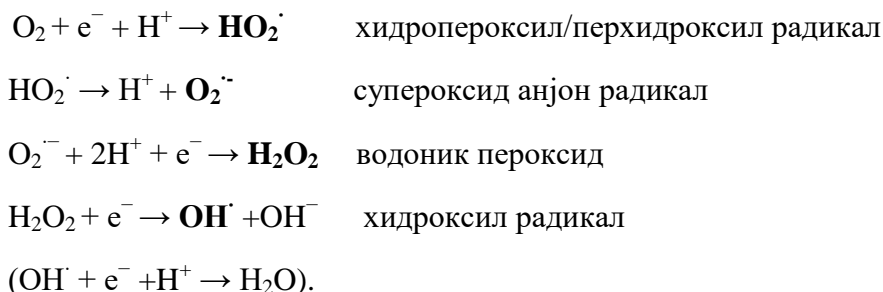
РЕАКТИВНЕ ВРСТЕ КИСЕОНИКА-ROS		РЕАКТИВНЕ ВРСТЕ АЗОТА-RNS	
СЛОБОДНИ РАДИКАЛИ	НЕРАДИКАЛСКИ ОБЛИЦИ	СЛОБОДНИ РАДИКАЛИ	НЕРАДИКАЛСКИ ОБЛИЦИ
Супероксид анјон радикал, $O_2^{\cdot-}$	Водоник пероксид, H_2O_2	Азот-моноксид, NO	Азотаста киселина, HNO_2
Хидроксил радикал, OH^{\cdot}	Хипобромна киселина, HOBr	Азот-диоксид, NO_2	Нитрозил катјон, NO^+
Хидропероксил радикал, HO_2^{\cdot}	Хипохлорна киселина, HOCl		Нитроксил анјон, $NO^{\cdot-}$
Пероксил радикал, RO_2^{\cdot}	Озон, O_3		Азот (IV) - оксид, N_2O_4
Алкоксил радикал, RO^{\cdot}	Синглет(ни) кисеоник, $^1\Delta_g$ 1O_2		Азот (III) - оксид, N_2O_3
Карбонатни радикал, $CO_3^{\cdot-}$	Органски пероксиди, ROOH		Пероксинитрит, $ONOO^{\cdot-}$
Угљендиоксидни радикал, $CO_2^{\cdot-}$	Пероксинитрит, $ONOO^{\cdot-}$		Пероксинитрат, $O_2NOO^{\cdot-}$
Синглет(ни) кисеоник, $^1\Sigma_g$ 1O_2	Пероксинитрат, $O_2NOO^{\cdot-}$		Пероксинитритна киселина, ONOOH
	Пероксинитритна киселина, ONOOH		Нитронијум (нитрил) катјон, NO_2^+
	Пероксимонокарбонат, $HOOCO_2^{\cdot-}$		Алkil пероксинитрити, ROONO
			Алkil пероксинитрати, RO_2ONO
			Нитрил (нитронијум) хлорид, NO_2Cl
			Пероксиацетил нитрат, $CH_3CO(O)OOONO_2$

ROS се генеришу пре свега у митохондријама, као неизбежни споредни продукти нормалног ћелијског метаболизма. Синтеза АТП-а одвија се у електронском транспортном ланцу, при чему долази до четвороелектронске редукције молекуларног кисеоника до воде посредством цитохром оксидазе (комплекс IV електронског респираторног ланца): (*Ortiz et al., 2013, Bergendi et al., 1999, Davies, 1995*).



У нормалним условима, ћелије метаболишу око 95% O_2 у воду на овај начин, без формирања токсичних интермедијера. Међутим, око 5% O_2 подлеже редукцији са мање од

4 електрона при чему настају ROS (*Toro & Rodrigo, 2009, Gutteridge, 1995, Pisoschi & Pop, 2015*):



1.3.1.1 СУПЕРОКСИД АНЈОН РАДИКАЛ

Супероксид анјон радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$) представља продукт једноелектронске редукције молекуларног кисеоника. Прекурсор је већине ROS и медијатор у оксидативним ланчаним реакцијама. $\text{O}_2^{\cdot-}$ настаје ензимским или не-ензимским процесом (*Turrens, 2003*).

Ензимским путем настаје дејством следећих ензима:

- Никотинамид аденин динуклеотид фосфат оксидазе (NADPH оксидазе) која је присутна у полиморфонуклеарним леукоцитима, моноцитима и макрофагима (*DeLeo & Quinn, 1996, Birben et al., 2012*) и катализује реакцију редукције кисеоника једним електроном у којој настаје $\text{O}_2^{\cdot-}$, док NADPH представља извор електрона (*Toro & Rodrigo, 2009, DeLeo & Quinn, 1996*).



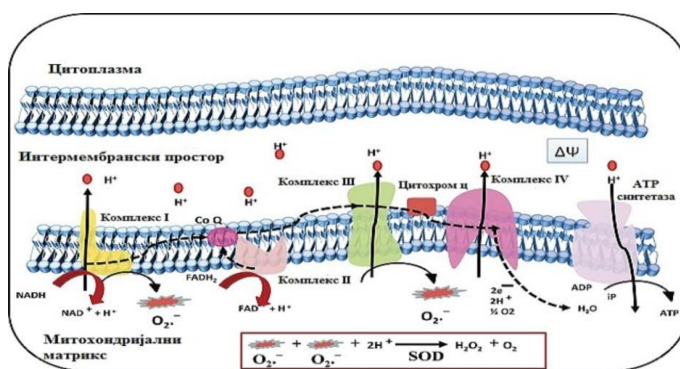
Овај ензим има сложену функцију која се најлакше сагледава у контексту активације фагоцита (неутрофила и макрофага), који у интеракцији са проинфламаторним агенсима, подлежу такозваном респираторном праску при чему долази до брзе активације NADPH оксидазе и стварања великих количина $\text{O}_2^{\cdot-}$ и других ROS важних за бактерицидно деловање (*Toro & Rodrigo, 2009, Kruidenier & Verspaget, 2002*).

- Ензима из фамилије цитохрома р450 (CYP 450) од којих су неки укључени у детоксификацију ксенобиотика и као резултат тог процеса настаје $\text{O}_2^{\cdot-}$ (*Namazi, 2009*).

- Ксантин оксидазе у пероксисомима, која се активира током реоксигенације ткива након хипоксије (*Toro & Rodrigo, 2009, Buonocore et al., 2010, Kruidenier L & Verspaget, 2002*), а такође катализује и реакцију разградње пурина - оксидацију хипоксантина у ксантин и оксидацију ксантина у мокраћну киселину при чему настаје $O_2^{\cdot-}$ (*Valko et al., 2004*).

Не-ензимски начин настајања обухвата директан пренос електрона на кисеоник помоћу коензима у редукованој форми или простетичних група (нпр. флавини или гвожђе сумпорни кластери) или ксенобиотика који су претходно редуковани одређеним ензимима (*Turrens, 2003*). Такође, $O_2^{\cdot-}$ настаје аутооксидацијом оксигемоглобина у метхемоглобин (*Misra & Fridovich, 1972*). Неки неуротрансмитери имају способност аутооксидације. Допамин, његов прекурсор L-допа, серотонин и норадреналин реагују са O_2 стварајући не само $O_2^{\cdot-}$, већ и хиноне/семихиноне који смањују резерве редукованог глутатиона и везују се за сулфхидрилне групе протеина (*Jovanović & Jovanović, 2011*). Као што је већ поменуто, $O_2^{\cdot-}$ настају током преноса електрона дуж електронског транспортног ланца на унутрашњој мембрани митохондрија где долази до „цурења електрона”, са њихових носача и директног преноса на молекуларни кисеоник (*Fariss et al., 2005, Valko et al., 2007, Kruidenier L & Verspaget, 2002*).

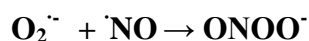
Слика 28. Стварање $O_2^{\cdot-}$ у електронском транспортном ланцу (*Agrawal & Mabalirajan, 2016*).



Главна места настанка $O_2^{\cdot-}$ у респираторном ланцу предствљају комплекс I (на нивоу $NADH$ дехидрогеназе) и комплекс III (на нивоу убихинон- цитохром ц редуктазе), с тим да се сматра да је производња $O_2^{\cdot-}$ у комплексу I примарна у митохондријама мозга у нормалним условима као и у разним патолошким стањима, док је у комплексу III примарна у митохондријама срца и плућа у нормалним условима

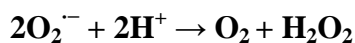
(Turrens, 2003). На тај начин, митохондрије представљају главни ендогени извор O_2^- у неинфламаторним стањима (Kruidenier & Verspaget, 2002). Егзогени извори O_2^- као што су пушење цигарета и јонизујуће зрачење нарочито су важни у патогенези плућних болести и радијационој болести (Kruidenier & Verspaget, 2002).

O_2^- доводи до брзе оксидације гвожђе сумпорних кластера [4Fe-4S] у саставу дехидратаза, као што су аконитазе, што има за последицу ослобађање Fe^{2+} и њихову инактивацију (Fridovich, 1997). Иако је несумњиво да је генерисање O_2^- од стране фагоцита есенцијално за адекватну одбрану домаћина од инфекције, његова континуирана хиперпродукција током инфламаторних процеса може изазвати обимно оштећење ткива (Kruidenier & Verspaget, 2002). У реакцији два слободна радикала може доћи до стварања ковалентне везе (образовањем заједничког електронског пара), па тако у реакцији O_2^- са азот моноксидом ($\cdot NO$) који је такође слободан радикал, настају већ поменути пероксинитрити ($ONOO^-$) (Halliwell, 1994):



На физиолошком pH, $ONOO^-$ доводе до директног оштећења протеина, и разлажу се у токсичне продукте укључујући азотдиоксид ($\cdot NO_2$) и хидроксил радикал ($\cdot OH$) (Halliwell, 1994).

Упркос енормном потенцијалу ћелија за продукцију O_2^- , сам по себи се не сматра изузетно реактивним интермедијером. Не пролази брзо кроз липидну двослојну мембрану и може дисмутирати спонтано или у реакцији катализованој супероксид дисмутазом (SOD). Парадоксално, опасност од O_2^- лежи у његовој неутрализацији, која представља прву реакцију у каскади осталих оксидативних реакција (Turrens, 2003, Kruidenier & Verspaget, 2002). У реакцији дисмутације учествују два молекула O_2^- при чему се један оксидује до O_2 , а други редукује до H_2O_2 , и ова реакција се сматра најважнијом реакцијом O_2^- (Kohen & Nyska, 2002).



Настали H_2O_2 може бити потпуно редукован у воду или делимично редукован у $\cdot OH$, који је један од најјачих оксиданата у природи (Kruidenier & Verspaget, 2002).

1.3.1.2 ВОДОНИК ПЕРОКСИД

Сваки настанак $O_2^{\cdot -}$ прати и настанак H_2O_2 , као резултат описане реакције дисмутације (*Gutteridge, 1995*). У пероксисомима се под нормалним условима продукује H_2O_2 услед велике потрошње кисеоника, али не продукује се и $O_2^{\cdot -}$ (*Valko et al., 2004*). Пероксисоми садрже ензим каталазу, која спречава накупљање овог токсичног једињења, а у случајевима када дође до оштећења пероксисома, H_2O_2 се отпушта у цитоплазму и проузрокује оксидативни стрес (*Valko et al., 2007*). Ензими као што су уратна оксидаза, оксидаза глукозе, D- аминокиселинска оксидаза, стварају H_2O_2 директно вршећи трансфер два електрона на кисеоник (двоелектронска редукција кисеоника) (*Gutteridge, 1995*). До ослобађања H_2O_2 долази и током оксидације биогених амина, што је под каталичким утицајем моноаминооксидаза типа А и В које су локализоване на спољашњој мембрани митохондрија (*Andreyev, 2005*). H_2O_2 лако дифундује кроз мембране, слаб је оксиданс и слабо редуктивно средство, тако да је релативно стабилан у одсуству јона прелазних метала (*Gutteridge, 1995*). Међутим, иако је слаб оксиданс, директним дејством H_2O_2 може:

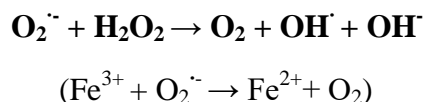
- реаговати са хем-протеинима, као што су миоглобин и цитохром ц, што може имати за последицу ослобађање гвожђа,
- оксидовати тиол (-SH) групе у активним центрима ензима као што је нпр. глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа,
- оксидовати ДНК, липиде и кето киселине (*Kohen & Nyska, 2002, Stocker & Keaney, 2004*).

H_2O_2 учествује у Фентоновој реакцији (у интеракцији са Fe^{2+}) и Haber-Weiss-овој реакцији (у интеракцији са $O_2^{\cdot -}$), у којима долази до стварања изузетно реактивног OH^{\cdot} :

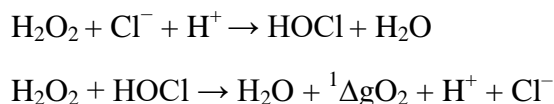
- **Фентонова реакција** - реакција је позната од 1894. године и сматра се једном од најснажнијих оксидационих реакција (*Toro & Rodrigo, 2009, Kruidenier L & Verspaget, 2002*):



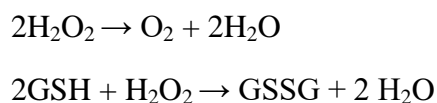
- **Хабер - Вајсова реакција** - обједињује Фентонову реакцију и редукцију тровалентног гвожђа (Fe^{3+}) до двовалентног (Fe^{2+}):



Ензим мијелопероксидаза (МРО), продукује НОСл из H_2O_2 и хлоридног анјона (Cl^-) током респираторног праска у неутрофилима и захтева хем као кофактор (*Gutteridge, 1995, Toro & Rodrigo, 2009*). НОСл (позната као избељивач), је 100 до 1000 пута токсичнија од $\text{O}_2^{\cdot -}$ и H_2O_2 (*Kruidenier L & Verspaget, 2002*). Реакција НОСл са H_2O_2 представља један од класичних начина за настанак синглет(ног) кисеоника (*Miyamoto et al., 2006, Bauer, 2013*), а мијелопероксидазни систем (МРО - H_2O_2 - Cl^-) представља најснажнији антибактеријски и цитотоксични систем у хуманим леукоцитима (*Bergendi et al., 1999*).



Формирање OH^{\cdot} из H_2O_2 може бити заобиђено двоелектронском редукцијом H_2O_2 до воде дејством каталазе или се H_2O_2 редукује помоћу глутатион пероксидазе, GSH-Px, док се редуковани глутатион оксидише (*Halliwell, 1995, Kruidenier & Verspaget, 2002*):

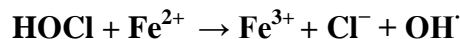
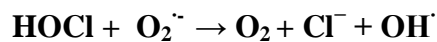


1.3.1.3 ХИДРОКСИЛ РАДИКАЛ

Хидроксил радикал (OH^{\cdot}) је неутрална форма хидроксидног јона (*Valko et al., 2007*). Сматра се најреактивнијим ROS и има способност да инактивира кључни митохондријални ензим, пируват дехидрогеназу, деполимеризује муцин у гастроинтестиналном тракту и директно проузрокује ДНК оштећења (*Kruidenier & Verspaget, 2002*). Екстремно је јак оксидант, поседује веома кратак полуживот, приближно око 10^{-9}s *in vivo* и ствара изузетно штетне секундарне радикале (*Valko M et al., 2007*). Представља главни продукт који проистиче из високо енергетске јонизације воде (радиолиза) (*Gutteridge, 1995*):



Поред описане Фентонове и Хабер Вајсове реакције, OH^\cdot настаје и у следећим интеракцијама (Kruidenier & Verspaget, 2002, Gutteridge, 1995):

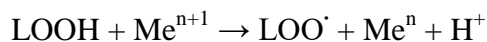


Нису познати ензими који доприносе процесу уклањања OH^\cdot , али сматра се да оштећења ткива индукована од стране OH^\cdot могу спречити албумини, церулоплазмин, феритин, трансферин и металотионеини (Kruidenier & Verspaget, 2002). Металотионеини су протеини који имају способност везивања јона метала преко тиолних (-SH) група цистеинских остатака, градећи метал-тиолатне групе (Carpenè et al., 2007, Sakulsak, 2012).

1.3.1.4 ЛИПИДНА ПЕРОКСИДАЦИЈА

Термин липидна пероксидација означава оксидативни катаболизам липида (Yoshida, 2013, Gutteridge, 1995), а у биолошким системима оксидација полинезасићених масних киселина (*polyunsaturated fatty acid*, PUFA) и холестерола одвија се неензимским путем (који је посредован слободним радикалима) и ензимским путем (Yoshida, 2013).

Током липидне пероксидације која се одвија неензимским путем, слободни радикали реагују са PUFA фосфолипидног двослоја ћелијских мембрана, које су изразито осетљиве на оксидацију (Bhattacharjee, 2014). Најчешћи иницијатор је екстремно реактивни OH^\cdot и HO_2^\cdot (Ayala et al., 2014). Прелазни метали или метални комплекси, а нарочито јони гвожђа и бабра имају велики утицај на иницијацију липидне пероксидације, утичући поред продукције OH^\cdot , такође и на стварање алкоксил (LO^\cdot) и пероксил (LOO^\cdot) радикала током разградње липидних хидропероксида, што доприноси даљој реиницијализацији липидне пероксидације (Halliwell, 2006, Bhattacharjee, 2014, Ayala et al., 2014).



Слободнорадикалска оксидација PUFA одвија се кроз три фазе: иницијацију, пропацију и терминацију.

Иницијација започиње уклањањем атома H[•] из метиленске групе (–CH₂–), PUFA, при чему настаје алкил радикал (L[•]). Обзиром да атом водоника садржи само један електрон, његовим уклањањем остаје један неспарени електрон на угљенику (–[•]CH–). Присуство двоструке везе слаби C–H везу на атому угљеника суседне двоструке везе, што олакшава уклањање H[•]. Због тога су бочни ланци полинезасићених масних киселина у саставу мембранских липида нарочито осетљиви на пероксидацију (*Gutteridge, 1995*).

Током **пропације** долази до интрамолекуларског премештања двоструке везе и стварања коњугованог диена који са кисеоником гради пероксил радикал (LOO[•]). Пероксил радикал уклања атом H[•] из друге PUFA, и на тај начин започиње ланчану реакцију, при чему настаје липидни хидропероксид (LOOH) (*Gutteridge, 1995*), који се преводи у алкоксил(ни) радикал (LO[•]), затим у епоксиде, алдехиде, кетоне, угљоводонике као што је етан и пентан (*Bhattacharjee, 2014, Halliwell, 2006*). Нарочито токсични алдехиди су малонилалдехид (MDA), који се користи као маркер липидне пероксидације и настаје пероксидацијом линолеинске, арахидонске и докозахексаенске киселине и 4-хидрокси 2-ноненал (HNE), који се формира из пероксида линолеинске и арахидонске киселине. Оба се везују за мембранске протеине, инактивишу ензиме и рецепторе и директним дејством на ДНК доводе до мутагених лезија (*Halliwell, 2006*).

Терминација обухвата међусобне интеракције слободних радикала, на основу чега настају димери и полимери који представљају стабилне продукте.

Слика 29. Ланчана реакција пероксидације липида OH[•] радикалом (*Bhattacharjee, 2014*)



Током липидне пероксидације која се одвија посредством слободних радикала настају и једињења која се сматрају златним стандардом за процену липидне пероксидације *in vivo*: F2-изопростани (једињења слична простагландинима F2), који настају од арахидоната и F4-неуропростани, који настају од докозахексаеноата (Roberts, 2005, Niki et al., 2005, Yen et al., 2013) и представљају сензитивније и селективније маркере за оксидативно оштећења неурона (Roberts 2005, Yen et al., 2013). Оксидацијом холестерола настају оксистероли који су присутни *in vivo* у различитим облицима. 7β-хидроксихолестерол представља маркер оксидације холестерола под утицајем слободних радикала (Yoshida et al., 2013).

Други начин одвијања липидне пероксидације је ензимским путем. Оксидативни метаболизам арахидонске киселине одвија се помоћу ензима циклооксигеназе и липооксигеназе, при чему настају простагландини и леукотријени (Speed & Blair, 2011). Ензимска оксидација холестерола одвија се под утицајем ензима из фамилије цитохрома p450 (Meunier et al., 2004).

Интензивна липидна пероксидација у биолошким мембранама доводи до губитка флуидности, смањења вредности мембранског потенцијала, повећане пермеабилности за H^+ и друге јоне, а у крајњем случају може доћи и до руптуре мембране са ослобађањем ћелијског садржаја у ванћелијски простор (Gutteridge, 1995). Липидна пероксидација се одвија и у патолошким и у физиолошким условима, а један од најважнијих алдехидних

продуката липидне пероксидације 4-HNE модулише експресију многих гена укључених у контролу ћелијске пролиферације и диференцијације, а такође има потврђену улогу у индукцији апоптозе (*Barrera et al., 2008*). 4-HNE утиче на сигналне механизме на дозно зависан начин тј. нижи нивои 4-HNE индукују ћелијску пролиферацију, док виши нивои индукују диференцијацију и апоптозу (*Yang et al., 2003, Chapple et al., 2013*).

1.3.1.6 АЗОТ МОНОКСИД

Азот моноксид, (NO) је био познат као безбојан, отрован гас и загађивач ваздуха до 1987. године (*Habib & Ali, 2011*), када је утврђено да је релаксирајући фактор кога секретује ендотел (*endothelium-derived relaxing factor, EDRF*) заправо NO (*Moncada & Higgs, 2006*), да би *Ignarro LJ, Furchgott RF* и *Murad F*, 1998. године били награђени Нобеловом наградом због идентификовања NO као сигналног молекула (*Habib & Ali, 2011*). NO је мали, липофилан молекул са високом стопом дифузије и кратким полуживотом, а такође садржи један неспарен електрон што га чини слободним радикалом (*Valko, 2007, Muntané & la Mata, 2010*). Укључен је у бројне регулаторне функције кардиоваскуларног, нервног и имуног система (*Wink & Mitchell, 1998*). Сматра се да при ниским концентрацијама NO испољава протективно дејство на ћелије одржавајући физиолошку хомеостазу, док у већим концентрацијама делује цитотоксично (*Wink & Mitchell, 1998, Habib & Ali, 2011*).

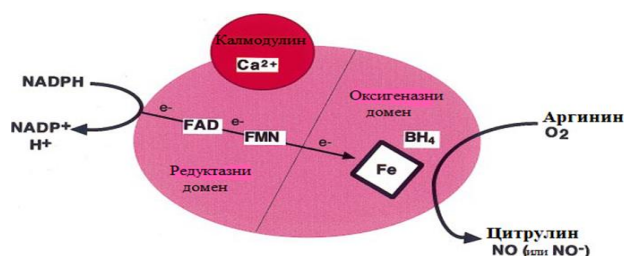
Слика 30. Вишеструка биолошка улога NO (прилагођено према *Wink & Mitchell, 1998*).



NO настаје из L аргинина под каталитичким дејством фамилије ензима NO синтаза (NOS), при чему се ствара и L цитрулин као допунски продукт (*Forstermann & Sessa,*

2012). NO синтазе су присутне у три главне изоформе, од којих су две конститутивне - неуронска (nNOS или NOSI) и ендотелна (eNOS или NOSIII), а једна је индуцибилна (iNOS или NOSII), а поред тога се наводи и постојање митохондријалне NOS, у мембрани митохондрија (Alderton *et al.*, 2001). Везивање калмодулина (једног од кофактора) за конститутивне изоформе ензима (nNOS и iNOS) зависно је од калцијума и одиграва се само у условима његове високе интрацелуларне концентрације, док је везивање калмодулина за индуцибилну NOS независно од концентрације калцијума (Forstermann & Sessa, 2012).

Слика 31. Структура NOS и синтеза NO (прилагођено према Alderton, 2001).



nNOS се конститутивно експримира у одређеним деловима мозга, док је eNOS највећим делом експримирана у ендотелним ћелијама, док се iNOS се експримира у ћелијама тек након индуковања од стране липополисахарида бактерија, цитокина и других агенаса. iNOS се примарно идентификује у макрофагима, али експримирање овог ензима може бити стимулирано готово у било којој ћелији или ткиву под условом да постоји одговарајући агенс за индукцију (Forstermann & Sessa, 2012).

Слика 32. Важне функције NOS изоформи (Forstermann & Sessa, 2012)



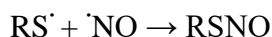
Биолошки механизми деловања NO могу се сврстати у два пута, од којих је један везан за продукцију цикличног гуанозин монофосфата (сGMP) па се назива сGMP зависан, а други је сGMP независан. При том оба пута су повезана и са физиолошким и са патолошким стањима (*Brüne et al., 1998*).

сGMP-зависни пут сигнализације подразумева везивање NO за хем групу рецептора солубилне гуанилил циклазе (sGC), која се на тај начин активира. Активирана sGC врши конверзију гуанозин триофосфата GTP у сGMP који делује као секундарни гласник (*Ignarro, 1990, Bryan, 2011*). сGMP активира сGMP-зависне протеин киназе, фосфодиестеразе регулисане сGMP-ом и цикличним нуклеотидима контролисани јонски канали (*Muntané & la Mata, 2010, Habib & Ali, 2011*). сGMP инхибише активацију фосфолипазе Ц, стварање инозитол 1,4,5 трифосфата и мобилизацију калцијума у тромбоцитима и глатким мишићним ћелијама крвних судова (*Wang et al., 1998*). На овај начин NO индукује вазодилатацију услед сGMP-зависног смањења калцијума у глатким мишићним ћелијама крвних судова будући да су киназе лакних ланаца миозина калцијум/ калмодулин зависни ензими. Такође, активација сGMP-зависних протеин киназа, односно протеин киназе G представља каскадну реакцију која доводи до дефосфорилације лакних ланаца миозина и до релаксације крвних судова (*Blatter & Wier, 1994, Madamanchi & Runge, 2013*). Такође, протеин киназа G активира дефосфатазе лакних ланаца миозина, што опет доводи до релаксације крвног суда (*Madamanchi & Runge, 2013*). сGMP- преко протеин киназе G доводи до инхибиције адхезије, секреције и агрегације тромбоцита (*Wang et al., 1998*).

сGMP-независни пут сигнализације подразумева реакцију NO са јонима прелазних метала што се означава као нитрозиловање или реакцију са тиолним групама остатака цистеина што је означено као S–нитрозовање, а при том настају нитрозотиоли. Нитрозиловање представља посттранслациону модификацију чиме се регулише активност многих протеина и транскрипционих фактора (*Muntané & la Mata, 2010, Pisoschi & Pop, 2015*). Приликом формирања нитрозотиола, NO је најчешће у форми NO^+ , обзиром да се директна реакција NO са органским једињењима одвија на следећи начин (*Beckman & Corpeol, 1996*):

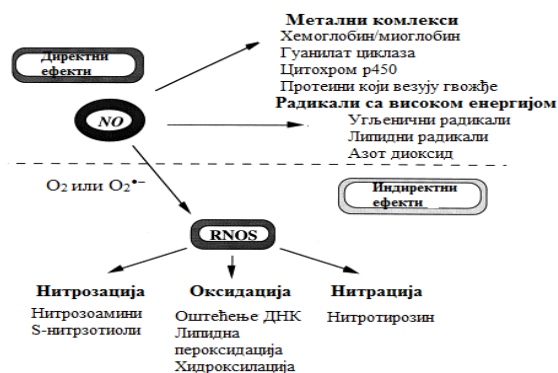


За наведену реакцију потребан је кофактор као акцептор електрона, и њега углавном представља азот-диоксид или јони прелазних метала. Тиоли, као што је глутатион о коме ће бити речи у наредном делу текста, оксидују се у тилил радикале, који са $\cdot\text{NO}$ граде нитозотиоле (*Beckman & Koppenol, 1996*).



На Слици 33 приказани су ефекти $\cdot\text{NO}$ који се деле на директне и индиректне. Директни ефекти означавају директну интеракцију $\cdot\text{NO}$ са биолошким молекулима, док индиректни ефекти означавају реакцију $\cdot\text{NO}$ са $\text{O}_2^{\cdot-}$ или O_2 и стварање RONS (*Wink & Mitchell, 1998*). Такође, директни ефекти подразумевају ниску концентрацију $\cdot\text{NO}$ ($<1\mu\text{M}$), док индиректни ефекти подразумевају високу концентрацију $\cdot\text{NO}$ ($>1\mu\text{M}$) (*Wink & Mitchell, 1998*). Индиректни ефекти $\cdot\text{NO}$ се остварују реакцијама оксидације и нитрозације што доводи до стања оксидативног и нитрозативног стреса (*Habib & Ali, 2011*).

Слика 33. Директни и индиректни ефекти $\cdot\text{NO}$ (прилагођено према *Wink & Mitchell, 1998*)



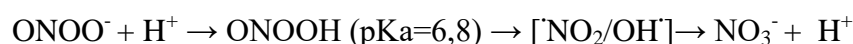
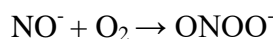
NO реагује са хемоглобином и кроз реакцију нитрозилације и кроз реакцију S-нитрозације (*Pisoschi & Pop, 2015*). $\cdot\text{NO}$ у реакцији са оксихемоглобином ствара мет-хемоглобин и нитрате (NO_3^-) (*Habib & Ali, 2011*), што представља главни начин његове елиминације in vivo (*Beckman & Koppenol, 1996*).



NO реагује са молекуларним кисеоником у гасној и течној фази, при чему настаје исто једињење азот диоксид $\cdot\text{NO}_2$, с том разликом што је $\cdot\text{NO}_2$ у гасној фази стабилно једињење, док у раствору није (*Habib & Ali, 2011*). Због тога се сматра да у воденим

растворима настаје азот-триоксид (N_2O_3) који подлеже хидролизи и стварају се нитрити, док у хидрофобној средини настају NO_2 и N_2O_3 (Stocker & Keaney, 2004).

Као што је већ наведено, у реакцији NO са супероксид ањоном долази до стварања пероксинитрита ($ONOO^-$), снажног оксиданса (Habib & Ali, 2011). Пероксинитрити настају и у реакцији NO^- са молекуларним кисеоником (Beckman & Koppenol, 1996). Протонизацијом $ONOO^-$ настаје пероксинитритна киселина, која се распада преко реактивних интермедијера NO_2 и OH^- , највећим делом до NO_3^- (Heinrich et al., 2013):



$ONOO^-$ може да утиче на промену функције протеина, тако што врши нитровање остатака тирозина протеина (Muntané & la Mata, 2010). 3-нитротирозин се користи као маркер формирања $ONOO^-$ *in vivo* (Walker et al., 2001) и у вези је са многим обољењима као што су хронична инфламаторна обољења и атеросклероза (Habib & Ali, 2011).

1.3.2 АНТИОКСИДАТИВНИ СИСТЕМ

Антиоксиданси су супстанце које неутралишу слободне радикале или њихова дејства (Devasagayam et al., 2004). Антиоксиданс је свака супстанца која је у могућности да у малим концентрацијама у поређењу са супстратом који се оксидише, значајно одложи или спречи његову оксидацију, односно која успорава, спречава или отклања оксидативно оштећење циљног молекула (Shebis et al., 2013).

У антиоксидативну заштиту, укључена су бројна једињења ендогеног и егзогеног порекла која функционишу интерактивно и синергистички и могу се поделити у следеће групе (Krishnamurthy & Wadhvani, 2012):

1. Ендогени антиоксиданти

- Билирубин
- Тиоли (нпр. глутатион, липоична киселина, N-ацетил цистеин)
- NADPH и NADH

- Убихинон (коензим Q10)
- Мокраћна киселина
- Ензими
 - супероксид дисмутаза, SOD (бакар, цинк и манган зависна)
 - каталаза, САТ (гвожђе зависна)
 - глутатион пероксидаза, GPx (селен зависна)

2. Антиоксиданти пореклом из хране

- Витамин Ц
- Витамин Е
- Бета каротен и други каротеноиди и оксикаротеноиди (нпр. ликопен и лутеин)
- Полифеноли (нпр. флавоноиди, флавонони)

3. Протеини који везују метале

- Албумин (Cu)
- Церулоплазмин (Cu)
- Металотионеини (Cu)
- Феритин (Fe)
- Миоглобин (Fe)
- Трансферин (Fe) (*Ђорђевић, 2011, Krishnamurthy & Wadhvani, 2012*).

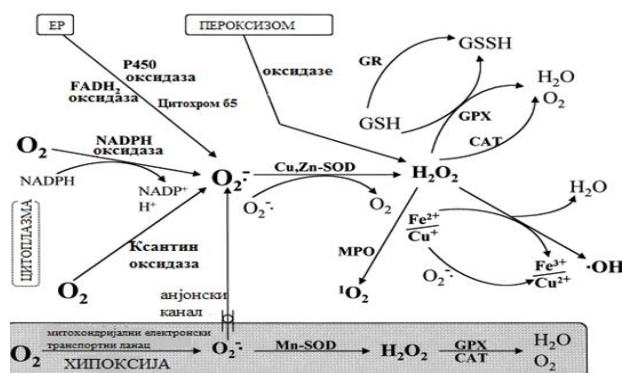
Неензимске компоненте антиоксидативне заштите су ендеогеног порекла или се апсорбују из природних супстанци. Деле се хидросолубилне антиоксидансе (нпр. витамин Ц, липоична киселина, мокраћна киселина) и липосолубилне антиоксидансе (нпр. бета каротен, витамин Е, коензим Q) (*Wang & Hai, 2016*).

Табела 7. Различити ROS и одговарајући неутралишући антиоксиданти (*Ђорђевић, 2011, Krishnamurthy & Wadhvani, 2012*).

ROS	НЕУТРАЛИШУЋИ АНТИОКСИДАнти
OH [•]	Витамин Ц, глутатион, флавоноиди, липоична киселина
O ₂ ^{•-}	Витамин Ц, глутатион, флавоноиди, супероксид дисмутаза
H ₂ O ₂	Витамин Ц, глутатион, бета каротен, витамин Е, флавоноиди, липоична киселина
Липидни пероксиди	Бета каротен, витамин Е, убихинон, флавоноиди, глутатион пероксидаза

Антиоксидативна заштита се дели и на примарну и секундарну (Cadenas, 1989). Примарна обухвата ензимске и неензимске компоненте, док секундарна обухвата репараторе и дезинтеграторе који поправљају, односно уништавају настала оштећења (Ђорђевић, 2011).

Слика 34. Генерисање ROS и ензимска антиоксидативна одбрана (Matés et al., 1999)



1.3.2.1 СУПЕРОКСИД ДИСМУТАЗА

Супероксид дисмутаза (SOD) катализује дисмутацију високо реактивног супероксид анјон радикала (O₂^{•-}) у мање реактивни водоник пероксид, док каталаза и глутатион пероксидаза уклањају настали водоник пероксид (Mates, 1999).



У наведеној реакцији дисмутације O₂^{•-} долази до узастопних реакција редукције и оксидације јона прелазног метала у активном центру ензима пинг-понг механизмом, изразито великом брзином реакције (Mates, 1999). Ткива сисара садрже три изоформе SOD, који имају различиту субцелуларну локализацију и ткивну дистрибуцију: бакар-цинк садржавајућу супероксид дисмутазау, CuZn-SOD, манган садржавајућу супероксид дисмутазау, Mn-SOD и екстрацелуларну супероксид дисмутазау, EC-SOD.

CuZn-SOD је хомодимер са молекулском масом од 32 kDa и две протеинске субјединице од којих свака садржи атом бакра и цинка у активном центру (Mates, 1999). Углавном је локализована у цитоплазми, а мања фракција је присутна и у интермембранском простору митохондрија, једру, лизозомима и пероксизомима (Fukai &

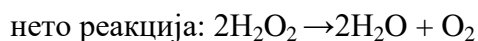
Ushio-Fukai, 2011). CuZn-SOD и EC-SOD су осетљиве на дејство цијанида, на основу чега се разликује од Mn-SOD која је релативно отпорна (*Fukai & Ushio-Fukai, 2011*). За CuZn-SOD се сматра да игра главну улогу у првој линији антиоксидативне одбране (*Mates, 1999*). Хумани ген за CuZn-SOD налази се на дугом (q) краку 21. хромозома и због тога је код особа са Дауновим синдромом (присутна тризомија 21. хромозома) повећана активност CuZn-SOD за око 50% (*Fukai & Ushio-Fukai, 2011*). Улога CuZn-SOD у овом синдрому је нејасна, али сматра се да њена повећана активност утиче на повећање H₂O₂ који испољава токсично дејство (*Fukai & Ushio-Fukai, 2011*).

Mn-SOD је хомотетрамер са молекулском масом од 96 kDa, са по једним атомом мангана по субјединици (*Mates, 1999*). Mn-SOD је локализована у митохондријама, а обзиром да респираторни ланац у митохондријама представља важан извор O₂^{•-}, Mn-SOD има значајну улогу у његовом уклањању (*Fukai & Ushio-Fukai, 2011, Mates, 1999*). Повећана експресија Mn-SOD, око 6 до 10 пута изнад нормалног нивоа, доводи до развојних поремећаја и смањеног фертилитета код мишева (*Andreyev, 2005*). Код мишева је показано да је присуство Mn-SOD неопходно за преживљавање, док то није случај са CuZn-SOD. Код CuZn-SOD ген *knockout* мишева абнормалности се испољавају тек након излагања трауматској повреди (*Mates, 1999*), док Mn-SOD ген *knockout* мишеви не преживљавају дуже од 2-3 недеље (*Mates, 1999, Melov et al., 1999*). Грубо процењено садржај Mn-SOD у хуманим ткивима одговара половини садржаја CuZn-SOD (*Mates, 1999*).

EC-SOD је тетрамер, секреторни гликопротеин, молекулске масе 135 kDa и садржи по један атом бакра и цинка у активном центру сваке субјединице (*Mates, 1999, Fukai & Ushio-Fukai, 2011, Petersen et al., 2003*). Присутна је у интерстицијалним просторима ткива и екстрацелуларној течности, а највећу активност испољава у плазми, лимфи и синовијалној течности (*Mates, 1999*). Висок ниво експресије EC-SOD присутан је у крвним судовима, плућима, бубрезима, утерусу (*Fukai & Ushio-Fukai, 2011*). Показује велики афинитет за гликозоаминогликане као што су хепарин и хепарин сулфат. Сматра се да активност овог ензима није индукована оксидансима, већ је регулисана цитокинима (*Mates, 1999*).

1.3.2.2 КАТАЛАЗА

Каталаза је ензим који катализује двостепену конверзију водоник пероксида у воду и молекулски кисеоник, помоћу гвожђа или мангана као кофактора (*Mehta & Gowder, 2015*). На тај начин, кофактор се оксидује у присуству једног молекула водоник пероксида, а затим се регенерише преносећи везани кисеоник на други молекулски супстрат (*Chance et al., 1979, Mehta & Gowder, 2015*)



У овом случају, H_2O_2 делује и као акцептор и као донор атома водоника, а реакција се назива каталазна и одвија се у случају када је H_2O_2 присутан у високој концентрацији (*Scandalios, 2005*). У случају када је присутан у ниској концентрацији ($<1 \mu\text{M}$) одвија се пероксидазна реакција за коју су потребни супстрати као што су феноли, алкохол, мравља киселина, аскорбинска киселина (*Scandalios, 2005, Finaud et al., 2006*):



Каталаза је тетрамерни ензим и има молекулску масу око 240 kDa. Састоји од четири идентичне тетраедарски постављене протеинске субјединице, од којих свака садржи ферипротопорфиринску групу и молекул NADPH (*Mehta & Gowder, 2015*). У великој мери, заступљена је у пероксизомима, који такође садрже већину ензима који врше генерисање водоник пероксида. Највећа активност им је у јетри и еритроцитима (*Mehta & Gowder, 2015*). Каталаза је један од најефикаснијих ензима, јер не може бити сатурисан H_2O_2 , без обзира на његову концентрацију (*Kruidenier & Verspaget, 2002*).

Ген за каталазу налази се на кратком краку 11. хромозома и мутације у овом гену доводе до акаталаземије (активност каталазе мања од 10%) и хипокаталаземије (активност каталазе мања од 50%). Акаталаземија је први пут описана код Јапанаца 1948. године и сматра се релативно благим обољењем. Повезана је са оралним улцерацијама и гангреном (као резултат дејства H_2O_2) - тзв. Такахара болест (*Góth et al., 2004*).

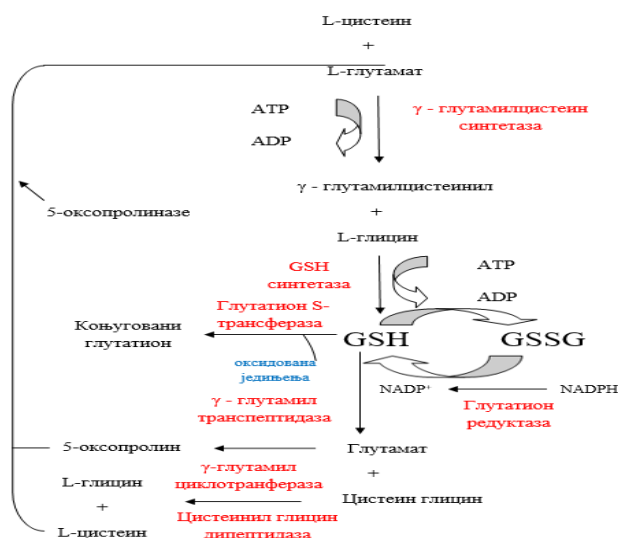
1.3.2.3 ГЛУТАТИОН И ЕНЗИМИ ГЛУТАТИОНСКОГ РЕДОКС ЦИКЛУСА

Примарни целуларни одбрамбени ензимски систем за спречавање настанка оштећења које узрокују водоник пероксид и липидни хидропероксиди, обухвата глутатион редокс циклус, тиоредоксин циклус и каталазу (Imai & Nakagawa, 2003). Систем глутатиона обухвата глутатион, глутатион редуктазу, глутатион пероксидазе и глутатион S-трансферазе (Mehta & Gowder, 2015).

Глутатион

Редуковани глутатион (GSH) је важан чинилац неензимске антиоксидативне одбране, присутан у милимоларној концентрацији интрацелуларно (van Haafthen et al., 2003). Глутатион је високо заступљен у у цитоплазми, једру и митохондријама и представља најзначајнији солубилни антиоксиданс у овим ћелијским одељцима (Valko, 2007). Митохондрије садрже 10-12% укупног интрацелуларног GSH, али због њиховог релативно малог волумена, концентрација GSH је нешто већа у матриксу митохондрија него у цитоплазми (Andreyev et al., 2005). Чини најмање 90% непротеинских тиола ниске молекулске тежине у ћелијама. Релативно је једноставан трипептид који се састоји од глутаминске киселине, цистеина и глицина (L- γ -глутамил- L- цистеинил-глицин). Редокс циклус глутатиона приказан је на Слици 35:

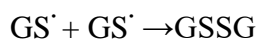
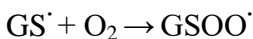
Слика 35. Редокс циклус глутатиона (прилагођено према Cano-Europa et al., 2015)



GSH се синтетише у цитоплазми секвенцијалним деловањем глутамат-цистеин лигазе (γ - глутамилцистеин синтетеза) и глутатион синтетезе (van Haafthen et al., 2003,

Valko, 2007), а важан регулатор синтезе GSH је цинк (Ruttkay-Nedecky et al., 2013). Да би GSH доспео у митохондрије потребан је трансмембрански транспорт који се одвија помоћу два антипортна протеинска носача – дикарбоксилатног и 2-оксоглутаратног, преузимање GSH од стране митохондрија одвија се насупрот концентрационом градијенту (Valko, 2007).

У реакцијама глутатиона са слободним радикалима долази до стварања тилил радикала (GS[•]) који у присуству кисеоника формирају сулфонил-пероксо радикале који инактивишу ензиме лизозома и трипсин. Анихилацијом два тилил радикала настаје оксидована форма глутатиона, глутатион дисулфид (GSSG), који чини мање од 5% укупног глутатиона у ћелијама (Cadenas, 1989, van Haafte et al., 2003).

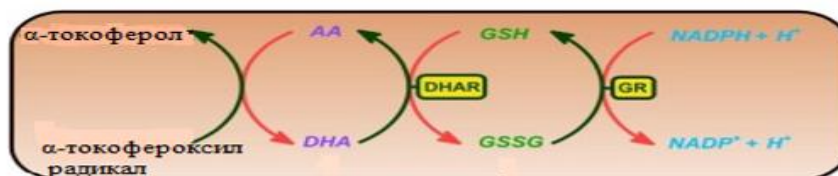


GSH у једру одржава редокс стање протеинских сулфхидрилних група које су потребне за поправку и експресију ДНК. Оксидовани глутатион се акумулира у ћелијама и однос GSH/GSSG је добра мера оксидативног стреса организма. Превисока концентрација GSSG може оксидативно оштетити многе ензимске системе (Valko, 2007). Поред тога што делује као хватач (*scavenger*) реактивних врста, GSH је укључен у разне друге метаболичке активности као што је репарација ДНК, активација транскрипционих фактора, регулација ћелијског циклуса, модулација хомеостазе калцијума и регулација ензимске активности (van Haafte et al., 2003). Већина ових функција глутатиона је повезана са његовом способношћу да одржава редуковану средину у ћелији. Глутатион има значајну улогу у интрацелуларном транспорту и детоксификацији бакра (Bi et al., 2007, Maryon et al., 2013), као у транспорту аминокиселина кроз плазма мембрану (Valko, 2007). Главне протективне, антиоксидативне улоге глутатиона су засноване на чињеници да се користи као супстрат/кофактор од стране ензима укључених у ћелијску одбрану, као што су глутатион пероксидаза (GPx), глутатион редуктаза (GR), гама – глутамилтранспептидаза (GGT) и глутатион трансферазе (GST) (van Haafte et al., 2003).

Редуковани глутатион је битан за одржавање активних форми витамина Ц и витамина Е. α-токоферол (витамин Е) зауставља ланчану реакцију липидне пероксидације,

при чему се конвертује у α -токофероксил радикал, који се редукује назад у форму α -токоферола помоћу аскорбинске киселине (Dadheech et al., 2006). Аскорбинска киселина (витамин Ц) је важан кофактор многих ензимских реакција, а због својих особина сматра се „савршеним антиоксидансом”. У стању пролонгираног оксидативног стреса смањује се концентрација аскорбинске киселине у ћелијама са истовременим повећањем дихидроаскорбинске киселине (двовалентни оксидациони продукт) (Maellaro et al., 1994, Ishikawa et al., 1998, Pompella et al., 2003). Дихидроаскорбат редуктаза зависна од глутатиона, регенерише аскорбинску киселину из оксидативног продукта, користећи глутатион као донор електрона. Ово представља кључни механизам за одржавање целуларног нивоа аскорбинске киселине, независно од *de novo* синтезе и дијететског уноса и назива се „рециклирање аскорбата” (Pompella et al., 2003), а нарочито је важан код људи и примата који је не могу синтетисати и зависни су од дијететског уноса (Ishikawa et al., 1998).

Слика 36. Регенерисање активних форми витамина Ц и Е помоћу глутатиона (прилагођено према Szarka et al., 2012).



Глутатион пероксидаза

Глутатион пероксидаза (GP_x) катализује редукцију H_2O_2 у воду (чија је реакција већ наведена) и редукцију органских хидропероксида у одговарајуће мање реактивне алкоhole, помоћу GSH који се оксидише у GSSG (van Haafte et al., 2003, Herbette et al., 2007).

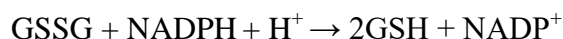


Постоји шест описаних изоензима GP_x у ткивима сисара, који су подељени на основу аминокиселинске секвенце, супстратне специфичности и субцелуларне локализације (Herbette et al., 2007). GP_x1 , GP_x2 и GP_x3 су тетрамерни протеини, код којих свака од 4 субјединице садржи селено-цистеин у свом активном центру (Herbette et al.,

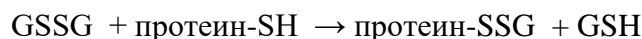
2007). GP_x4 (фосфолипид хидропероксид глутатион пероксидаза) је мономерни протеин (Imai & Nakagawa, 2003) који директно редукује фосфолипидне хидропероксиде, хидропероксиде масних киселина и хидропероксиде холестерола који настају услед липидне пероксидације мембране и оксидације липопротеина (Matés et al, 1999). GP_x5 је селен-независна, и уместо селеноцистеина присутан је само цистеин (Matés et al, 1999, Herbette et al., 2007). GP_x6 је присутна у олфакторном епителу, и код људи је идентификована као селеноензим, док код мишева и пацова селен није присутан (Herbette et al., 2007).

Глутатион редуктаза

Глутатион редуктаза (GR) је ензим у форми димера који се састоји од две идентичне подјединице од којих свака садржи по један молекул флавин аденин динуклеотида, FAD и дисулфидну везу у каталитичком центру (Carlberg & Mannervik, 1975, van Haafte et al., 2003). Функција ензима GR је да одржава редокс хомеостазу у ћелији тј. адекватан однос GSH/ GSSG (van Haafte et al., 2003, Ithayaraja, 2011). То се постиже помоћу NADPH као коензима у реакцији редукције GSSG у GSH (van Haafte et al., 2003).



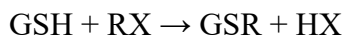
У нормалним условима редукција GSSG од стране глутатион редуктазе је релативно брза, али у случају оксидативног стреса долази до акумулације GSSG (van Haafte et al., 2003). У том случају GSSG се или транспортује из ћелија или са сулфхидрилним групама протеина гради протеин-глутатион мешане дисулфиде (протеин-SSG), чији је полуживот дужи од GSSG (Dickinson & Forman, 2002, van Haafte et al., 2003):



Глутатион S-трансферазе

Глутатион S-трансферазе (GST) су суперфамилија ензима 2. фазе биотрансформације ксенобиотица (тзв. 2. фаза метаболизма), чије се реакције означавају као реакције коњугације, а такође учествују и у трансформацији ендобиотица (van Haafte et al., 2003). Хумане глутатион S-трансферазе су подељене у три фамилије: цитосолну, микрозомалну и

митохондријалну (*van Haafte et al., 2003, Hayes et al., 2005*). Нови назив за овај ензим је глутатион трансфераза, а скраћеница изведена од претходног назива – GST, задржана је у употреби (*Oakley, 2005*). Најважнија функција ензима је коњугација штетних електрофилних једињења са GSH (у сврху смањења њихове реактивности са ћелијским макромолекулама), при чему настаје GSH коњугат (*Eaton & Bammler, 1999, van Haafte et al., 2003*).

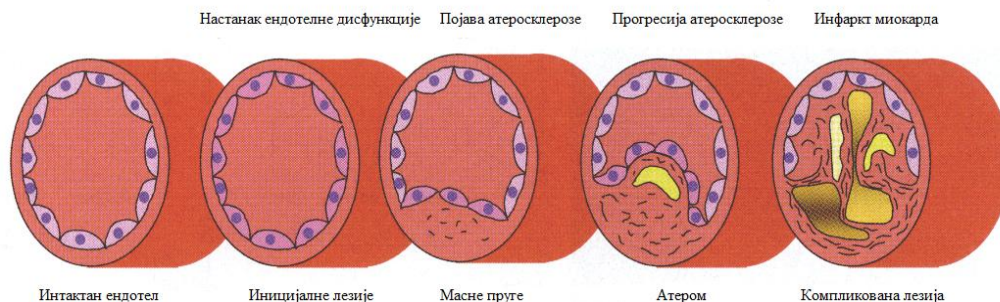


1.3.3 ОКСИДАТИВНИ СТРЕС И ЕНЕРГЕТСКА ПИЋА

Повећан оксидативни стрес игра кључну улогу у кардиоваскуларним болестима као што су хипертензија и атеросклероза (*Alexander, 1995*). Утицај ЕП-а на хипертензију описан је у поглављу Кардиодинамика и ЕП-а. Досадашња истраживања у којима је испитиван утицај примене ЕП-а на оксидативни стрес у целини, вршена су углавном у правцу испитивања утицаја ЕП на функцију ендотела, нарочито на ендотел-зависну вазодилатацију и на агрегацију тромбоцита, као и на вредност гликемије као фактора који утиче на ендотелну функцију. Ендотел представља највећи ендокрини орган у телу човека и има важну улогу у регулацији васкуларног тонуса, функције тромбоцита и коагулације, адхезије леукоцита, пролиферације глатких мишићних ћелија крвних судова (*Heitzer et al, 2001, Higashi et al, 2009, Madamanchi & Runge, 2013*). Сматра се да је ендотелна функција барометар васкуларног здравља (*Higgins et al., 2018*).

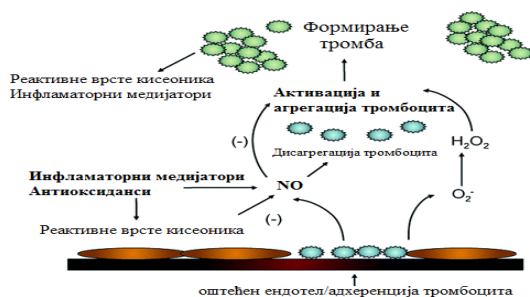
Поремећај регулације наведених процеса означава се термином – **ендотелна дисфункција**. Ендотелна дисфункција представља губитак антикоагулантних и антиинфламаторних својстава ендотела, као и поремећај у регулацији васкуларног раста и ремоделовања. У ужем смислу, овај термин означава оштећење ендотел-зависне вазодилатације услед губитка биоактивности NO у зиду крвног суда, што се манифестује у оштећењу вазодилатације као одговор на ендотел зависне вазодилататоре, као што је ацетилхолин. Ендотелна дисфункција има за последицу развој атеросклерозе и настанак коронарне артеријске болести (*Cai & Harrison, 2000, Heitzer et al, 2001, Madamanchi & Runge, 2013*).

Слика 37. Од ендотелне дисфункције до кардиоваскуларних компликација: прогресија атеросклерозе (прилагођено према *Higashi et al, 2009*).



У експерименталним анималним моделима атеросклерозе, хиперхолестеролемије, хипертензије и дијабетеса утврђена је повезаност оксидативног стреса и ендотелне дисфункције. Међу бројним патолошким променама које се дешавају у зиду крвног суда, као доминантни се наводе смањена биорасположивост NO и повећан ниво O_2^- , у спреси са ендотелном вазомоторном дисфункцијом. Оксидативни стрес у крвним судовима повезан је са реверзбилним губитком активности cGMP зависне протеин киназе, доводећи до смањења NO /cGMP зависне релаксације (Heitzer *et al.*, 2001). Поред испољавања вазодилаторних ефеката што је већ поменуто, NO је и инхибитор агрегације тромбоцита, са антиинфламаторним и антипролиферативним својствима (Motley *et al.*, 2007, Higgins & Ortiz, 2014). У нормалним условима, ендотел инхибира адхезију и активацију тромбоцита, између осталог продукујући простаглицин и NO (Freedman, 2008). Простаглицин настаје из арахидонске киселине, помоћу ензима циклооксигеназе, и као и NO представља хемијски нестабилно једињење са кратким полуживотом. За разлику од NO остварује дејство активирајући аденилат циклазу, што доводи до интрацелуларног повећања cAMP. (Celermajer, 1997). Оксидативни стрес утиче на измењену функцију тромбоцита, што је приказано на Слици 38 (Freedman, 2008).

Слика 38. Улога оксидативног стреса у формирању тромба (Freedman, 2008)



Смањење биорасположивости NO може бити узроковано на више начина: смањењем експресије ендотелне NO синтазе (eNOS), услед недостатка супстрата или кофактора за eNOS, услед измена у ћелијској сигнализацији што утиче да се eNOS не активира на адекватан начин, као и услед убрзане деградације NO под утицајем ROS (*Cai & Harrison, 2000*). У настанку оштећења ендотел-зависне вазодилатације доминантнију улогу има повећана деградација NO под утицајем ROS, него смањење продукције NO (*Higashi et al, 2009*). Три најважнији извора ROS у ћелијама крвних судова су ксантин оксидаза, NADH/NADPH оксидаза и eNOS (*Cai & Harrison, 2000*).

Реакција NO и $\text{O}_2^{\cdot-}$ одиграва се великом брзином - $6,7 \times 10^9 \text{ mol/L}^{-1} \text{ s}^{-1}$, што је 3 пута брже од реакције $\text{O}_2^{\cdot-}$ са SOD. Обзиром на овако велику брзину реакције, одређена количина $\text{O}_2^{\cdot-}$ увек реагује са NO унутар ћелије и у екстрацелуларном простору, с тим да у нормалним физиолошким условима ендогена антиоксидативна одбрана своди наведену реакцију на минимум. Током одређених патолошких стања већа количина $\text{O}_2^{\cdot-}$ реагује са NO , смањујући његову биодоступност и доводећи до оштећења ендотел зависне вазодилатације, што је доказано код зечева са хиперхолестеролемијом, као и на анималним моделима хипертензије и дијабетеса. Такође, значајно је да оксидовани LDL, али не и нативни, инхибише ендотел зависну вазодилатацију услед процеса липидне пероксидације (*Cai & Harrison, 2000*). У случају смањене продукције NO , дефицијенција супстрата L-аргинина или кофактора тетрахидробиоптерина (BH_4) за eNOS, доводи до раздвајања оксидо-редуктазне функције eNOS, која се у том случају означава као „uncoupling NOS” и производи $\text{O}_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 уместо NO (*Madamanchi & Runge, 2013*).

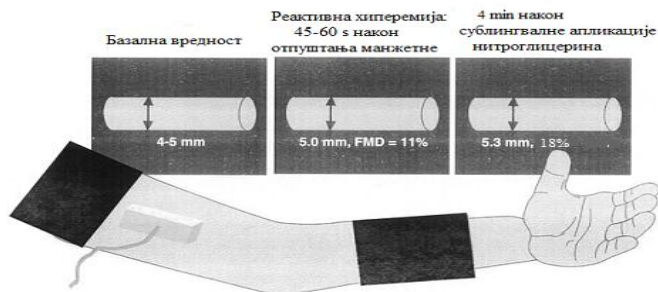
Агрегација тромбоцита повезана је са знатним повећањем оксидованог глутатиона, GSSG, услед повећане продукције $\text{O}_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 који настају током агрегације, а услед дејства циклооксигеназа, липооксигеназа, па чак и NADPH оксидаза. Тромбоцити могу бити изложени ROS који потичу из зида крвног суда услед процеса атеросклерозе, или утврђених фактора ризика као што је хиперхолестеролемија. Ефекти H_2O_2 на агрегацију тромбоцита су двојаки. Присуство H_2O_2 у ниским концентрацијама (на нивоу микромола) инхибише агрегацију, док веће концентрације (на нивоу милимола) стимулишу агрегацију (*Stocker & Keaney, 2004*). За процену функције тромбоцита користе се између осталог ендогени агонисти као што су колаген, тромбин, адреналин, ADP, арахидонска киселина.

Неинвазивна, ултразвучна метода која се најчешће користи за процену ендотелне функције је метода протоком посредоване вазодилатације (*flow mediated dilation, FMD*). Протоком посредована вазодилатација је ендотел-зависна и њоме се процењује ослобађање NO. Најчешће се изводи на брахијалној артерији. Манжетна сфингоманомера се поставља на надлактици или подлактици, а сонда изнад *fossa antecubitalis*. Манжетна се надувава до вредности притиска који је најмање 50 mmHg изнад систолног артеријског притиска особе која се испитује. Попуштањем манжетне, настаје реактивна хиперемиа и долази до краткотрајног повећања брзине протока крви. Повећање брзине протока крви узрокује стварање тангенцијалне силе смицања *shear stress*-а, што представља стимулус за ослобађање NO из ендотела и нормално настаје вазодилатација. Смањена вазодилатација представља смањену биодоступност NO и присутност ендотелне дисфункције (*Raitakari & Celermajer, 2000, Corretti et al., 2002*). Смањен коронарни проток може бити последица ендотелне дисфункције и након излагања стресу (ендогеном или егзогеном), немогућност адекватне дилатације коронарних артерија може довести до дисбаланса између снабдевања и потребе миокарда за кисеоником, односно спазма коронарних артерија, што потенцијално доводи до исхемије миокарда и/или срчане аритмије, о чему је било речи у поглављу Кардиодинамика (*Higgins, 2013*). Сматра се да FMD брахијалне артерије представља снажан предиктор кардиоваскуларних догађаја, односно да је у корелацији са статусом ендотела коронарних артерија (*Higgins & Ortiz, 2014*).

Ендотел-независна вазодилатација процењује се применом егзогеног донора NO, најчешће нитроглицерина (0,4 mg) сублингвално, чиме се процењује функција глатких мишића крвних судова (*Raitakari & Celermajer, 2000, Corretti et al., 2002*).

FMD се изражава у процентима и израчунава се помоћу следеће формуле (*Parati et al., 2005*): $FMD (\%) = \frac{[(\text{дијаметар током хиперемие} - \text{базални дијаметар}) / \text{базални дијаметар}] \times 100$

Слика 39. Дијаметар брахијалне артерије у основном стању и стањима након ендотел-зависне и ендотел-независне вазодилатације (*Raitakari & Celermajer, 2000, Corretti et al., 2002*).



Обзиром на значајну количину угљених хидрата у ЕП-има, значајно је да **хипергликемија** доприноси повећању маркера оксидативног стреса (Слика 40), и показано је да је степен липидне пероксидације у еритроцитима директно пропорционалан концентрацији глукозе *in vitro*, као и гликемији дијабетичара. Хипергликемија изазива оксидативни стрес директном продукцијом ROS, као и променом редокс равнотеже. Експериментални и клинички подаци указују на повезаност оксидативног стреса и инсулинске резистенције. Хронично излагање оксидативном стресу утиче на активацију фамилије серин/треонин киназа што има негативан ефекат на сигнални пут инсулина и доводи до настанка инсулинске резистенције (*Rains & Jain, 2011*)

Слика 40. Метаболички путеви укључени у развој ендотелне дисфункције индуковане хипергликемијом (прилагођено према *De Vriese et al., 2000, Hadi & Suwaidi, 2007*)



Утицај ЕП-а на ендотелну функцију

Резултати истраживања утицаја ЕП-а на ендотелну функцију процењену помоћу индекса реактивне хиперемije (измереног помоћу FMD) су контрадикторни. Постоје истраживања која су показала негативно дејство ЕП-а у смислу повећане агрегације тромбоцита и ендотелне дисфункције, а такође постоје истраживања у којима је

регистровано побољшање ендотелне функције. Сумиран утицај појединачних састојака ЕП-а на ендотелну функцију приказан је у Табели 8.

Табела 8. Утицај састојака ЕП-а на ендотелну функцију (*Higgins & Ortiz, 2014*)

Састојак ЕП-а	Утицај на ендотелну функцију
L-карнитин	Повећава
Гуарана	Непознато
Инозитол	Непознато
Глукуронолактон	Непознато
Таурин	Повећава
Гинсенг	Повећава / нема утицај
Глукоза	Смањује
Кофеин	Смањује
Рибофлавин	Непознато
Ниацин	Повећава / нема утицај
Пиридоксин	Повећава / нема утицај
Цијанокобаламин	Нема утицај

На изолованој аорти пацова показано је да кофеин индукује вазодилатацију на два начина, тј. ендотел зависним и ендотел независним механизмом (*Hatano et al., 1995*). Кофеин у миру повећава интрацелуларну концентрацију калцијума ослобађајући калцијум из ендоплазматског ретикулума кроз ријанодин сензитивне калцијумове канале, што доводи до повећања експресије ендотелне азот моноксид синтетазе (eNOS) и стимулације продукције NO (*Hatano et al., 1995, Echeverri et al., 2010*). NO дифундује у глатке мишићне ћелије крвних судова и изазива вазодилатацију (*Echeverri et al., 2010*). У глатким мишићним ћелијама крвних судова, кофеин делује пре свега као инхибитор фосфодиестеразе 3', 5'-цикличних-нуклеотида, што доводи до акумулације cAMP и вазодилатације (*Hatano et al., 1995, Echeverri et al., 2010*). Сумирано, утицај кофеина на регулацију функције крвних судова манифестује се кроз равнотежу вазоконстрикторног дејства (антагонист рецептора аденозина) и вазодилаторног дејства (*Umemura et al., 2006*). Може се закључити да у миру, кофеин или не утиче на ендотелну функцију (*Higgins & Babu, 2013*) или је побољшава (*Umemura et al., 2006*), док је смањује током физичке активности (*Higgins & Babu, 2013*). Прикупљени подаци сугеришу да ЕП-а у мировању смањују ендотелну функцију (*DeSciscio et al., 2008, Worthley et al., 2010, Higgins JP, 2013, Higgins et al., 2017*), мада је демонстрирано да ја конзумација RB-а утицала на значајно повећање вазодилатације посредоване ацетилхолином у поређењу са плацебом, док није

било утицаја на вазодилатацију посредовану натријум нитропрусидом (*Grasser et al., 2014*). Занимљиво је пилот истраживање названо SHADE-ONE (Study of Heart effects from Adults Drinking Energy beverages: ON Endothelial function) чији је испитаник био *John Higgins*, кардиолог из Научног здравственог центра, Универзитета у Тексасу, који се бави проучавањем ефеката ЕП-а, које је показало да 90 минута након примене 500 ml ЕП-а у миру, долази до погоршања реактивне хиперемije (*Higgins, 2013*). Претпоставља се да глукуронолактон и глукоза као састојци ЕП-а доприносе оштећењу функције тромбоцита и ендотелној дисфункцији (*Worthley et al., 2010, Ibrahim & Iftikhar, 2014*). Занимљиви су резултати истраживања *Molnar & Somberg* у коме је испитиван акутни утицај 3 врсте ЕП-а: 250 ml RB-а (садржи 80 mg кофеина), 57ml 5-hour Energy® (садржи 230 mg кофеина и не садржи угљене хидрате), 355 ml NOS® (садржи 120 mg кофеина) и 473 ml кафе (садржи 240 mg кофеина) на ендотелну функцију код младих здравих особа. На побољшање ендотелне функције значајно су утицали (у смислу значајног повећања индекса реактивне хиперемije) само RB и 5-hour Energy. Обзиром да RB садржи знатно мању количину кофеина, у односу на 5-hour Energy и кафу који садрже приближно исту количину, аутори овог истраживања сматрају да за наведени утицај на ендотелну функцију није одговоран кофеин, већ други састојци ЕП-а (*Molnar & Somberg, 2015*).

Резултати претходних истраживања показују да акутна администрација ЕП-а индукује липидну пероксидацију и оксидативни стрес у јетри и мозгу пацова (*Reis et al., 2017*) и да хронична конзумација доводи до токсичности, инфламаторног одговора и оксидативног стреса (*Mubarak, 2012, Khayyat et al., 2012, Khayyat et al., 2014, Ayuob & ElBeshbeishy, 2016, Díaz et al., 2016, Valle et al., 2018, Kassab & Tawfik, 2018*). Међутим, показано је да апликација RB-а током 14 дана убрзава растање меког ткива, што је приписано антиоксидативним састојцима RB-а (*Tek et al., 2014*).

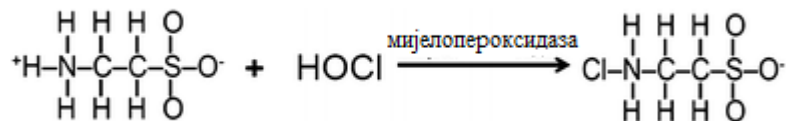
У *in vitro* истраживању на неуронским ћелијама показан је неензимски антиоксидативни потенцијал најчешћих састојака ЕП-а, гуаране, кофеина и таурина. Наведене супстанце, а нарочито њихова комбинација утицале су на морфолошке и биохемијске промене третираних ћелија, смањујући базалне нивое слободних радикала и смањујући активност SOD и CAT. Ћелије третиране гуараном, и у комбинацији са кофеином и/или таурином подлегле су апоптози. Едем неурона је детектован приликом третирања већим дозама кофеина, које су еквивалентне концентрацији садржаним у ЕП-

има. Резултати овог истраживања сугеришу да прекомерно уклањање интрацелуларних реактивних врста кисеоника, до нефизиолошких нивоа (односно "антиоксидативни стрес"), може бити узрок *in vitro* токсичности изазване овим супстанцама (*Zeidán-Chuliá et al., 2013*).

1.3.3.1 УТИЦАЈ ПОЈЕДИНАЧНИХ САСТОЈАКА ЕНЕРГЕТСКИХ ПИЋА НА ОКСИДАТИВНИ СТРЕС

Ефекти **кофеина** на оксидативни стрес су двосмислени, односно демонстрирана су и антиоксидативна (*Paşaoğlu et al., 2011, Demirtas et al., 2012, Barcelos et al., 2014, Çakır et al., 2016, Ehichioya et al., 2016*) и прооксидативна својства кофеина (*Gülçin, 2008*), као и неиспољавање утицаја на оксидативни стрес (*Olcina et al., 2006, Mahdavi et al., 2012 Zeraatpishe et al., 2015*). Антикancerогени и радиопротективни ефекти кофеина су доказани, па се антиоксидативна улога приписује кофеину *per se* или његовим метаболичким продуктима. Познато је да кофеин делује као хватач (*scavenger*) хидроксил радикала у милимоларним концентрацијама, док то није потврђено за физиолошке релевантне микроларне концентрације (*Lee, 2000*). *In vitro*, главни метаболити кофеина, 1-метилксантин и 1-метилурична киселина (настају деметилацијом диметилксантина под утицајем CYP1A2), у микроларним концентрацијама (40µmol/l) су у могућности да спрече оксидацију LDL (*Lee, 2000*). Оксидовани LDL има проатерогена својства, тј. оксидација LDL представља кључни догађај у развоју атеросклерозе (*Yukawa et al., 2004*). Антиоксидативни потенцијал 1-метилксантина је еквивалентан аскорбинској киселини, док је антиоксидативни потенцијал 1-метилуричне киселина еквивалентан мокраћној киселини (*Lee, 2000*).

Таурин испољава антиоксидативно, антиинфламаторни и антиатерогени ефекат, па услед тога делује цитопротективно (*Huxtable, 1992, Nonaka et al., 2001, Ripps & Shen, 2012*). Директним антиоксидативним и антиинфламаторним својствима таурина доприноси ковалентна реакција таурина и хипохлорне киселине, катализована мијелопероксидазом у неутрофилима (*Schaffer et al., 2014*).



Не само да таурин хлорамин има мање цитотоксично дејство од HOCl, већ таурин хлорамини такође регулишу и инфламаторне процесе нисходном регулацијом инфламаторних медијатора као што су цитокини, циклооксигеназа-2 и индуцибилна NO синтаза (Schaffer et al., 2014). Тауролидин, дериват таурина, у великој мери блокира продукцију туморског фактора некрозе-алфа, проинфламаторног цитокина (Wójcik et al., 2010). Таурин се коњује са митохондријалном транспортном рибонуклеинском киселином (tRNK) за леуцин при чему настаје тауринометилуридин-tRNK (Schaffer et al., 2009). На тај начин испољава индиректно антиоксидативно дејство, јер делује као регулатор синтезе митохондријалних протеина битних за омогућавање ефикасног функционисања електронског транспортног ланца, чије су компоненте кодиране од стране митохондријалне ДНК.

Услед недостатка таурина, долази до смањења протока електрона кроз електронски транспортни ланац, акумулације донора електрона и преусмеравања електрона директно на кисеоник, при чему настаје O₂⁻, а смањује се синтеза АТП-а (Schaffer et al., 2009). У *in vitro* истраживању на изолованим кардиомиоцитима пацова показано је повећање оксидативног стреса услед примене β- аланина, који је антагонист таурина (Jong et al., 2012). Таурин анатагонизује ефекат хомоцистеина који индукује стрес ендоплазматског ретикулума (акумулација неправилно савијених протеина у лумену ендоплазматског ретикулума) обнављајући секрецију и експресију EC-SOD у глатким мишићним ћелијама крвних судова пацова (Nonaka et al., 2001). Показано је да таурин утиче на смањење продукције ROS и делимично повећање активности Mn- SOD и CAT, као и на повећање преузимања калцијума и повећање активности Ca-АТП-азе (Chang et al., 2004, Wójcik et al., 2010). Суплементација таурином побољшава ендотел зависну вазодилатацију, утичући позитивно на васкуларну редокс хомеостазу и побољшање биодоступности NO (Maia et al., 2014). Таурин делује протективно смањујући токсичност глутамата, јер инхибише глутамат посредовано оптерећење калцијумом и оксидативно оштећење (Schaffer et al., 2014), што има повољан утицај код пацијената са дијабетес мелитусом типа, код којих је документовано је смањење ендогеног таурина (Sirdah, 2015). Таурин има хипогликемијски

ефекат, односно испољава дејство слично инсулину и смањује крајње продукте гликације (Schaffer et al., 2009, Sirdah, 2015).

Обзиром да је ендотелна дисфункција и оштећење функције тромбоцита повезано са повећаним нивоом глукозе, **глукуронолактон** као њен метаболит, би могао такође штетно утицати на ендотелну функцију и функцију тромбоцита (McLellan & Lieberman, 2012, Higgins & Ortiz, 2014). Показано је да код пацова, глукуронолактон у дози од 75 mg/kg испољава хепатопротективно дејство, смањује ниво инфламаторних медијатора и повећава активност антиоксидативних ензима (Chen et al., 2015). Сугерише се антиканцерогено дејство глукаричне киселине (Walaszek et al., 1997). Као што је већ наведено сугерише се да је виши ниво **угљених хидрата** у вези са настанком оксидативног стреса и ендотелне дисфункције (Higgins & Ortiz, 2014). **Витамини Б комплекса** испољавају антиоксидативно дејство (Das & Vasudevan, 2006, Taş et al., 2014). Антиоксидативна дејства **гинсенга** демонстрирана су *in vitro* (Dong et al., 2013), код пацова (Fu & Ji, 2003, Ramesh et al., 2012, Voces et al., 2004) и код људи (Kim et al., 2012), али су подаци хуманих студија малобројни (Lee et al., 2017). Екстракт **гуаране** садржи сапонине и танине који поседују антиоксидативна својства, као и флавоноиде - катехин и епикатехин, који смањују агрегацију тромбоцита (McLellan & Lieberman, 2012). Не постоје истраживања у којима је показан утицај гуаране на функцију ендотелних ћелија, било самостално било у комбинацији са другим супстанцама (Higgins & Ortiz, 2014). **L- карнитин** испољава антиоксидативно дејство, што је између осталог показано *in vitro* (Solaraska et al., 2010), код пацова (Canbolat et al., 2017) и код људи (Fatouros et al., 2010). Екстракт **гинка билобе** садржи флавоноиде који доприносе антиоксидативним својствима. Гинколиди, компоненте терпеноида, смањују агрегацију тромбоцита, дегранулацију неутрофила и спречавају продукцију слободних кисеоничних радикала (Nicolai et al., 2013).

II

ЦИЉЕВИ

ИСТРАЖИВАЊА

Циљеви овог истраживања били су следећи:

1. Испитивање ефекта акутне и директне администрације ЕП-а на параметре кардиодинамике код неактивних животиња
2. Испитивање ефекта акутне и директне администрације ЕП-а на параметре кардиодинамике код активних животиња
3. Испитивање ефекта хроничне администрације ЕП-а на параметре кардиодинамике код неактивних животиња
4. Испитивање ефекта хроничне администрације ЕП-а на параметре кардиодинамике код активних животиња
5. Испитивање ефекта акутне и директне администрације ЕП-а на параметре кардиодинамике код неактивних животиња које су хронично конзумирала ЕП-а
6. Испитивање ефекта акутне и директне администрације ЕП-а на параметре кардиодинамике код активних животиња које су хронично конзумирала ЕП-а
7. Утврђивање ефекта акутне и директне администрације ЕП-а на оксидативни стрес у коронарном ефлуенту и крви код неактивних животиња
8. Утврђивање ефекта акутне и директне администрације ЕП-а на оксидативни стрес у коронарном ефлуенту и крви код активних животиња
9. Утврђивање ефекта хроничне администрације ЕП-а на оксидативни стрес у коронарном ефлуенту и крви код неактивних животиња
10. Утврђивање ефекта хроничне администрације ЕП-а на оксидативни стрес у коронарном ефлуенту и крви код активних животиња
11. Утврђивање ефекта акутне и директне администрације ЕП-а на оксидативни стрес у коронарном ефлуенту и крви код неактивних животиња које су хронично конзумирала ЕП-а
12. Утврђивање ефекта акутне и директне администрације ЕП-а на оксидативни стрес у коронарном ефлуенту и крви код активних животиња које су хронично конзумирала ЕП-а

III
МАТЕРИЈАЛ
И МЕТОДЕ

3.1 ЕТИЧКИ АСПЕКТИ

Ова студија одобрена је од стране Етичког комитета Факултета медицинских наука као и од Управе за ветерину Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде. Студија је извођена према принципима Добре лабораторијске праксе и правилима о добробити животиња (Директива 2010/63/EU Европског парламента и савета за заштиту животиња које се користе за научне сврхе). Спроведена је у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

3.2 ИСПИТАНИЦИ

У овом истраживању коришћени су пацови Вистар албино соја ($n=72$), мушког пола, старости 8 недеља који су на почетку експеримента имали телесну масу око 200-250 грама. Након набављања животиња из Одељења за узгој лабораторијских и експерименталних животиња на Војномедицинској академији, животиње су пребачене у Виваријум Института за физиологију, Факултет медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу). Током трајања експерименталног периода, пацови су били смештени у кавезе (по 8 пацова у једном кавезу). У просторији у којој су боравили, температура је одржавана на 25 степени, и 12:12 часова циклус светлост:тама. За конзумацију им је била доступна комерцијална храна за пацове (20% протеинска храна, Ветеринарски завод Суботица) и вода *ad libitum*.

Величина узорка израчуната је на основу претходно публикованог истраживања у коме су испитивани ефекти суплементације кофеином на оксидативни стрес у јетри пацова (*Barcelos et al, 2014*). Уз коришћење одговарајућег рачунарског програма (*Faul et al., 2007*), за прорачун величине узорка коришћен је Т-тест за независне узорке, двоструко, уз претпоставку алфа грешке од 0.05 и снагу студије 0.8 (бета грешка 0.2)

3.3 ПРОТОКОЛ ИЗВОЂЕЊА СТУДИЈЕ

Студија је трајала 4 недеље. На почетку студије, пацови су методом случајног избора подељени у 2 групе (у зависности од конзумације ЕП-а), а свака група подељена је у 2 подгрупе (у зависности од физичке активности):

1. контроле које не конзумирају ЕП-е (n=36):

а) нетренирани (седентарни) пацови (n=18);

б) тренирани пацови: пацови који су пливали 1 час дневно, 5 дана у недељи (n=18).

2. пацови који су током 4 недеље, 5 дана недељно интрагастричном гаважом конзумирали умерену дозу (3.75ml/kg) ЕП-а (n=36):

а) нетренирани пацови: пацови који су након конзумације ЕП-а остајали у кавезу (n=18);

б) тренирани пацови: пацови који су 30 минута након конзумације ЕП-а пливали 1 час дневно, 5 дана у недељи (n=18).

3.3.1 ТРЕНАЖНИ ПРОТОКОЛ

Тренирани пацови су 5 дана у недељи били подвргнути тренингу пливања. Пливање се одвијало у стакленом базену за експерименталне животиње чије су димензије 80 x 60 x 100cm. Помоћу електричног грејача, температура воде у базену била је подешена на 34 С°. У свом саставу, базен има уграђену пумпу која је константно правила таласе, и на тај начин пацовима се онемогућавало плутање током тренинга. Током пливања животиње су непрестано надзиране.

Слика 41: Тренинг пливања



3.3.2 САСТАВ ИСПИТИВАНОГ ЕНЕРГЕТСКОГ ПИЋА

У студији је коришћен Red Bull. Наведена количина ЕП-а од 3.75ml/kg одабрана је на основу претходно објављених студија у којима је вршена суплементација кофеином и ЕП-ем (Sadowska 2012, Barcelos et al, 2014, Ugwuja 2014). У њој се налази око 1 mg кофеина, односно доза кофеина блиска максималној препорученој (око 6 mg/kg телесне масе), а детаљан опис састојака RB-а приказан је у Табели 9.

Табела 9: Састав и количина појединачних састојака енергетског пића Red Bull® (Alford et al., 2001, Higgins et al., 2010, Miles-Chan et al., 2015)

Појединачни састојци енергетског пића Red Bull®		Количина у 250ml ЕП (стандардна лименка Red Bull-a®)	Количина у 3,75 ml ЕП (примењена доза у овом истраживању)
Газирана вода			
Кофеин		80 mg	1,2 mg
Таурин		1000 mg	15 mg
Угљени хидрати	Сахароза	21,5 g	322,5 mg
	Глукоза	5,25 g	78,75 mg
Глукуронолактон		600 mg	9 mg
Витамини Б групе	Б3 ниацинамид	20 mg	0,3 mg
	Б5 калцијум пантотенат	5 mg	0,075 mg
	Б6 пиридоксин хидрохлорид	5 mg	0,075 mg
	Б8 инозитол	50 mg	0,75 mg
	Б12 цијанокобаламин	5 µg	0,075 µg
Натријум цитрат		100 mg	1,5 mg
Ароме (природне и вештачке)		Присутне	
Боје		Карамел, рибофлавин	

3.3.3 ЖРТВОВАЊЕ ЖИВОТИЊА И ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА ЕНЕРГЕТСКОГ ПИЊА

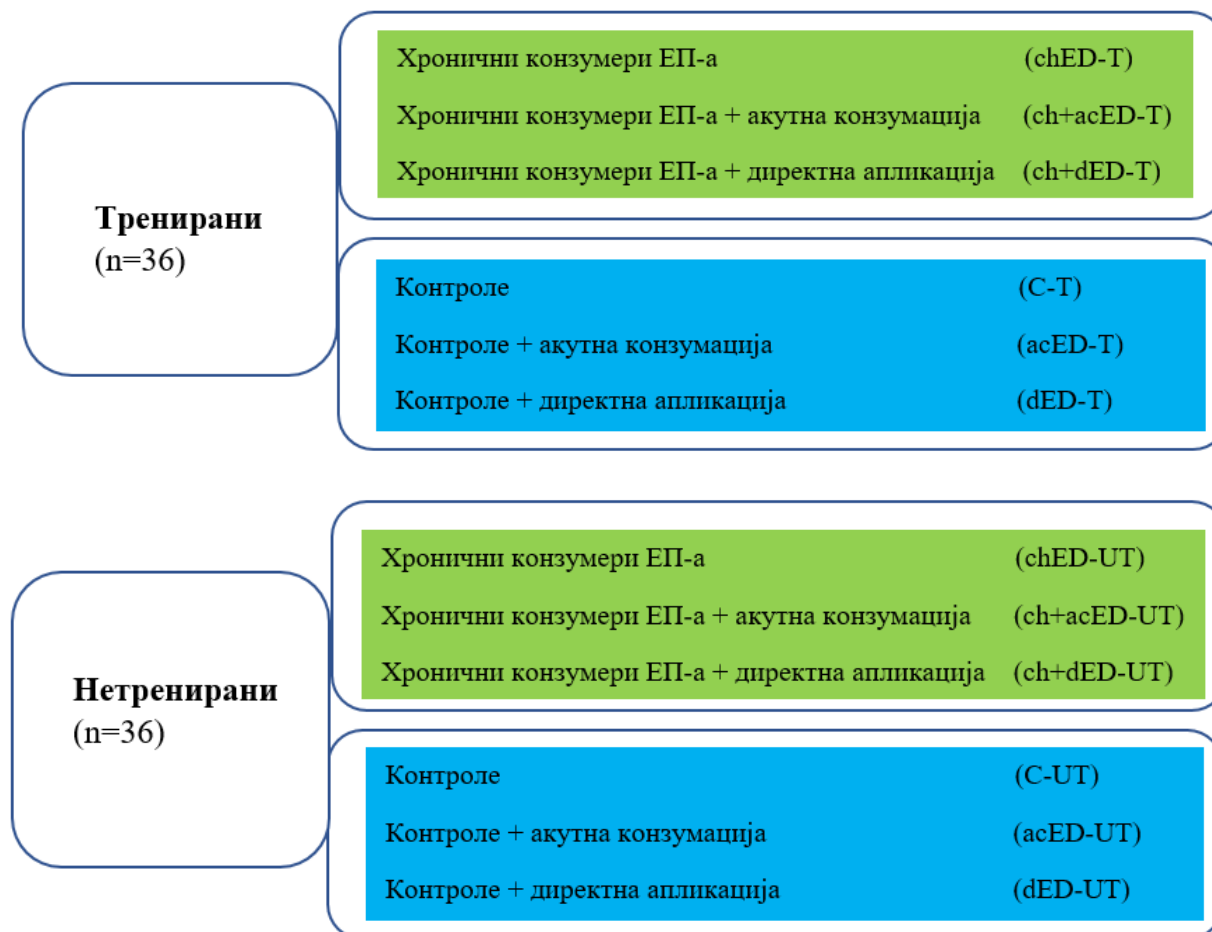
Након жртвовања животиња, које је изведено декапитацијом, животињама је из југуларне вене узет узорак венске крви, ради одређивања редокс статуса у плазми (супероксид анјон радикал, водоник пероксид, азот моноксид, тиобарбитурне реактивне супстанце) и еритроцитима (супероксид дисмутаза, каталаза, редуковани глутатион). Након тога, срца су изолована и перфундована методом ретроградне перфузије по Лангендорфу. У оквиру испитивања ефеката ЕП-а на кардиодинамске параметре и параметре оксидативног стреса у коронарном ефлуенту вршиле су се следеће серије експеримената:

1. испитивање ефеката хроничне конзумације ЕП-а: обухваћени су пацови ($n=6$ из сваке подгрупе) који 24ч пре жртвовања нису конзумирали ЕП-е, а кроз изоловано срце на Лангендорфу био је перфундован Krebs-Hensenleit-ов физиолошки раствор;
2. испитивање ефеката акутне конзумације ЕП-а: обухваћени су пацови ($n=6$ из сваке подгрупе) који су 30 минута пре жртвовања конзумирали 3.75ml/kg ЕП-а, а кроз изоловано срце на Лангендорфу био је перфундован Krebs-Hensenleit-ов физиолошки раствор;
3. испитивање ефеката директне администрације ЕП-а у срце: обухваћени су пацови ($n=6$ из сваке подгрупе) који 24ч пре жртвовања нису конзумирали ЕП-е, а кроз изоловано срце на Лангендорфу био је перфундован Krebs-Hensenleit-ов физиолошки раствор у коме је било растворено 150 μ mol ЕП-а (*Fujii et al, 1998*).

Табела 10. Начин додељивања третмана испитиваним животињама (тренинг пливања и примена ЕП-а)

Групе	Експериментална <i>(пацови који су конзумирали умерену дозу (3,75ml/kg) ЕП-а током 4 недеље)</i>	Контролна <i>(пацови који нису конзумирали ЕП-е током 4 недеље)</i>
<u>Тренирани</u> <i>(пацови који су пливали 1 час дневно, током 4 недеље)</i>	24 h пре жртвовања нису конзумирали ЕП-е (група: chED-T) n=6	нису конзумирали ЕП-е (група: C-T) (n=6)
	30 минута пре жртвовања конзумирали су 3.75 ml/kg ЕП-а (група: ch+acED-T) (n=6)	30 минута пре жртвовања конзумирали су 3.75 ml/kg ЕП-а (група: acED-T) (n=6)
	директна администрација ЕП-а у срце (*24 ч пре жртвовања нису конзумирали ЕП) (група: ch+dED-T) (n=6)	директна администрација ЕП-а у срце (група: dED-T) (n=6)
<u>Нетренирани</u> <i>(пацови који су били седентарни)</i>	24 ч пре жртвовања нису конзумирали ЕП-е (група: chED-UT) (n=6)	нису конзумирали ЕП-е (група: C-UT) (n=6)
	30 минута пре жртвовања конзумирали су 3.75 ml/kg ЕП-а (група: ch+acED-UT) (n=6)	30 минута пре жртвовања конзумирали су 3.75 ml/kg ЕП-а (група: acED-UT) (n=6)
	директна администрација ЕП-а у срце (*24 ч пре жртвовања нису конзумирали ЕП) (група: ch+dED-UT) (n=6)	директна администрација ЕП-а у срце (група: dED-UT) (n=6)

Слика 42: Подела животиња у групе



3.4 КАРДИДИНАМСКА МЕРЕЊА

Одмах након торакотомије, срца пацова су изолована и перфундована методом ретроградне перфузије по Лангендорфу. Током коронарне ауторегулације мерен је коронарни проток (CF) и праћени су следећи параметри функције леве коморе:

- 1) $dp/dt \max$ - максимална стопа промене притиска у левој комори (mmHg/s),
- 2) $dp/dt \min$ - минимална стопа промене притиска у левој комори (mmHg/s),
- 3) SLVP - систолни притисак у левој комори (mmHg),
- 4) DLVP - дијастолни притисак у левој комори (mmHg),
- 5) HR - срчана фреквенца (bpm).

3.4.1 ИЗОЛОВАЊЕ СРЦА ПАЦОВА

Након хирушког отварања абдомена, дијафрагма је пресечена лучно, с лева на десно. Грудни кош је затим брзо отворен, бочно, дуж мамиларне линије, након чега је пресечен перикард на врху срца. На тај начин срце је било спремно за изоловање, а током трајања ових процедура, да би се одржала релативна хомеостаза, срце је преливано физиолошким раствором (+4°C). Након пресецања перикарда, приступило се ресецирању крвних судова на бази срца, после чега је орган извађен из грудног коша и одмах стављен у леден физиолошки раствор (од -4 до -10 °C). Тим поступком су импровизирана тзв. „физиолошка клешта“ да би метаболички процеси у миокарду сведени на минимум.

Непосредно након стављања органа на лед, приступило се тупој препарацији базе срца, која је подразумевала отклањање свих елемената, осим асцендентне аорте, кроз коју се одвија ретроградна перфузија. Препарисана аорта је концем причвршћена за канилу за ретроградну перфузију чиме је изоловано срце постављено на апарат по Лангендорфу. Ова хирушка процедура трајала је веома кратко, 2-3 минута. Затим је лева преткомора пресечена у пределу леве аурикуле, што је омогућило приступ митралној валвули. Митрални залисци су разорени пинцетом чиме је притисак у левој преткомори сведен на

нулу и искључен сваки утицај на коронарну циркулацију, који не зависи од функције леве коморе. Након прокидања митралне валвуле постављен је сензор у леву комору уз помоћ кога је праћена функција срчаног мишића. Наведени поступци су омогућили постизање оптималних услова за ретроградну перфузију изолованог срца. Ток перфузионог раствора има следећи смер: аорта - лева преткомора - лева комора - коронарни синус - коронарне артерије - коронарне вене, чиме је постигнут фокус на срце и коронарну циркулацију.

3.4.2 РЕТРОГРАДНА ПЕРФУЗИЈА СРЦА ПО ЛАНГЕНДОРФУ

За спровођење експерименталних истраживања коришћен је апарат по Лангендорфу (*LF-01 F-P Experimentria Ltd, 1062 Budapest, Hungary*), чије су основне компоненте следеће:

- 1) две вертикалне стаклене цеви, исте висине, од којих се цев мањег калибра налази у цеви већег калибра, а између површине ове две цеви циркулише вода; вода се загрева у воденом купатилу до одређене температуре, а затим се убацује у цев већег калибра путем бочних цеви и система црева; методом негативног притиска у цев мањег калибра убацује се комплексан физиолошки раствор (*Krebs-Henseleit*-ов раствор), који има сличне перформансе као екстрацелуларна течност; вода која циркулише у цеви већег калибра загрева се тако да раствор у цеви мањег калибра на излазу из система има оптималну телесну температуру - 37 °C; на излазу цеви мањег калибра поставља се препарат изолованог срца;
- 2) резервоар, у коме се налази комплексни *Krebs-Henseleit*-ов раствор, запремине четири литра, који је спојен са унутрашњом цеви мањег калибра са једне стране и са боцом у којој се налази смеша гасова O_2/CO_2 са друге стране; састав комплета реагенаса за припремање *Krebs-Henseleit*-овог раствора (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany*) је следећи: натријум хлорид ($NaCl$, 27.216 g/4L), калијум хлорид (KCl , 1.4 g/4L), магнезијум сулфат ($MgSO_4 \times 7H_2O$, 1.636 g/4L), калијум дихидроген фосфат ($KH_2PO_4 \times 2H_2O$, 0.0644 g/4L), натријум бикарбонат ($NaHCO_3$, 8.36g/4L), глюкоза ($C_6H_{12}O_6 \times H_2O$, 8.8g/4L) и калцијум хлорид ($CaCl_{2(anh.)}$, 1.117 g/4L);

Табела 11. Састав *Krebs-Henseleit*-овог раствора.

Супстанца	Количина (mmol/L)
NaCl	118
KCl	4.7

MgSO₄	1.66
KH₂PO₄	1.18
NaHCO₃	24.88
C₆H₁₂O₆	5.55
CaCl₂	2.52
*pH раствора = 7.4	

- 3) боца са смешом гасова у односу O₂ : CO₂ = 95 % : 5 %; боца је спојена са резервоаром у коме се налази *Krebs-Henseleit*-ов раствор, а уз помоћ ње се постиже физиолошки парцијални притисак O₂ и CO₂ какав постоји у артеријској крви, а такође обзиром да ствара негативан притисак у резервоару, боца има функцију и да убацује раствор у унутрашњу цев система цеви;
- 4) канила, чија је функција спајање изводне цеви система цеви и асцедентне аорте изолованог срца пацова;
- 5) водено купатило, које загрева воду у спољашњој цеви чиме се индиректно постиже температура физиолошког раствора од 37 °C;
- 6) инфузиона пумпа, којом се жељени агенс адекватном брзином, а у зависности од базалног коронарног протока, администрира непосредно на споју каниле и асцедентне аорте;
- 7) рачунар са одговарајућим софтвером (*Spel Advanced HaemoSys v3.24*, који је повезан са сензорима преко којих добија податке о раду срца и који омогућава континуирано праћење параметара кардиодинамике;
- 8) сензори (трансдјусери) који повезују различите структуре изолованог срца са рачунаром на основу чега се врши континуирано регистровање функције миокарда; сензор, који служи праћење кардиодинамских параметара (*transducer BS4 73-0184*), повезан је са лучно савијеном, танком металном цеви на чијем крају се налази балончић (пречника 5 mm, latex/најлон фолија) испуњен дестилованом водом; након пресецања митралне валвуле, балончић се убацује у леву комору и надува се; на овај начин, сензор директно региструје притиске и срчану фреквенцу из ове шупљине срца (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP и HR); обзиром да је лева комора доминантнија и морфолошки и функционално, праћењем наведених параметара може се објективно испитати функција срца у целини.

Проток крви кроз коронарне крвне судове (CF) изражава се у ml/min и мери се флоуметријском методом на основу сакупљених капи перфузионог раствора који излазе из коронарних крвних судова и срца.

У овом истраживању, за проучавање кардиодинамике и коронарног протока, користили смо модификовани Лангендорфов модел изолованог срца, у коме се ретроградна перфузија изолованог срца врши при константном протоку кроз коронарно васкуларно корито, док је коронарни перфузиони притисак (CPR) променљив. CPR, који се региструје на писачу посебним системом преносника - трансдјусера, је постепено повећаван ради успостављања коронарне ауторегулације. Срца су прво перфундована при константном CPR на 70 cmH₂O, да би након стабилизације срца, CPR мењан следећим редоследом: 1) 60 cmH₂O 2) 80 cmH₂O 3) 100 cmH₂O 4) 120 cmH₂O и 5) 40 cmH₂O. Вредности кардиодинамских параметара и коронарни проток бележени су током пет различитих вредности CPR-а: 40, 60, 80, 100, 120 cmH₂O.

3.5 ПАРАМЕТРИ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА

Током коронарне ауторегулације, односно сваког нивоа CPR-а (40, 60, 80, 100, 120 cmH₂O) сакупљан је коронарни венски ефлуент, који је коришћен за анализу нивоа реактивних кисеоничних и азотних врста.

У узорцима коронарног ефлуента, одређивани су следећи параметри оксидативног стреса, спектрофотометријском методом на апарату марке -*Analytic Jena Specord S 600*, UK:

- 1) супероксид анјон радикал (O₂^{•-}),
- 2) водоник пероксид (H₂O₂),
- 3) азот моноксид (NO),
- 4) индекс липидне пероксидације (TBARS).

За одређивање параметара оксидационог статуса, коришћени су комерцијални реагенси *pro analysis* квалитета произвођача *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany*.

- Комплет реагенаса за детерминацију супероксид анјон радикала

TRIS (Трис (хидроксиметил) аминоетан, $C_4H_{11}NO_3$), 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.

- Комплет реагенаса за детерминацију водоник пероксида

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 (Horseradish peroxidase – HRPO EC 1.11.1.7), Mr 44 kDa.

- Комплет реагенаса за детерминацију нитрита (азот монооксида)

Сулфанилна киселина (4-амино бензенсулфонска киселина, $C_6H_7NO_3S$), Mr 173.19; N-(1-нафтил)-етилендиамин дихидрохидрат (NEDA, $C_{12}H_{15}C_{12}N$), Mr 259.18; амонијум хлорид (NH_4Cl), Mr 53.49; Боракс ($Na_2B_4O_7 \times 10H_2O$), Mr 381.4; 85% орто-фосфорна киселина (H_3PO_4), $\rho=1,685 \text{ gcm}^{-3}$; натријум нитрит ($NaNO_2$), Mr 69.00.

- Комплет реагенаса за детерминацију индекса липидне пероксидације

2-тиобарбитурна киселина (ТВА, $C_4H_4N_2O_2S$), Mr 144.15; натријум хидроксид (NaOH) Mr 40.00.

3.5.1 ОДРЕЂИВАЊЕ НИВОА СУПЕРОКСИД АНЈОН РАДИКАЛА

Одређивање концентрације супероксид анјон радикала ($O_2^{\cdot-}$) у коронарном ефлуенту заснива се на реакцији $O_2^{\cdot-}$ са нитро тетразолијум плавим (*Nitro Blue Tetrazolium - NBT*) до нитроформазан плавог (*Auclair & Voisin, 1985*). Мерење се врши на таласној дужини максималне апсорпције $\lambda_{max}=550 \text{ nm}$. Есејна смеша 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 раствор се претходно гасира азотом под притиском у трајању од једног часа.

У епрувете (12 x 100) се пипетира 50 μ l коронарног ефлуента и 950 μ l есејне смеше, чиме реакција отпочиње. Као слепа проба уместо коронарног ефлуента користи се адекватна количина *Krebs-Hensenleit*-овог 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 екстинкција се означава као E_2 . Исти поступак се примењује и за слепу пробу. Концентрација ослобођеног $O_2^{\cdot -}$ (изражен у *nmol*) добија се на основу следећих једначина:

$$\Delta E_u = \Delta E_{2u} - E_{1u} \text{ (за узорак); } \Delta E_{sp} = E_{2sp} - E_{1sp} \text{ (за слепу пробу); } \Delta E = \Delta E_u - \Delta E_{sp};$$

$$\frac{\text{nmol } O_2}{\text{ml коронарног ефлуента}} = \frac{\Delta E}{0.015} \times \frac{1}{0.05} .$$

3.5.2 ОДРЕЂИВАЊЕ НИВОА ВОДОНИК ПЕРОКСИДА

Детерминација количине водоник пероксида (H_2O_2) заснива се на оксидацији фенол-црвеног помоћу водоник пероксида, реакцијом која је катализована ензимом HRPO (*Pick & Keisari, 1980*). Ова реакција резултује формирањем једињења чији је максимум апсорпције на $\lambda_{\text{max}} = 610 \text{ nm}$. Линеарна зависност апсорбанце на 610 nm од концентрације H_2O_2 је постојана за $1 - 60 \text{ mM}$ опсег концентрација ($1 - 60 \text{ nmol/ml}$). Наведена метода омогућује детерминацију настајања и ослобађања H_2O_2 за временски интервал од $5 - 60$ минута. У епрувете (12×100) се пипетира $200 \mu\text{l}$ коронарног ефлуента и $800 \mu\text{l}$ свеже направљеног раствора фенол црвеног (*Phenol Red Solution – PRS*) који садржи 140 mM NaCl, 10 mM калијум фосфатног пуфера ($\text{pH} = 7$), 5.5 mM D(+)-глукозе и 0.28 mM фенол-црвеног. Узорцима се затим дода $10 \mu\text{l}$ ($1 : 20$) HRPO, припремљен *ex tempore*. Узорци се остављају на собној температури 10 минута, а затим се подеси $\text{pH} \approx 12$, помоћу 1 M NaOH. Као слепа проба користи се адекватна количина *Krebs-Hensenleit*-овог раствора.

Концентрација ослобођеног H_2O_2 у коронарном ефлуенту израчунава се на основу калибрационог дијаграма (стандардне криве), који се одређује за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве користи 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 пипетира се, уместо коронарног ефлуента, $5, 10$ и 20 ml 1 mM раствора H_2O_2 , 200 ml дестиловане воде, 800 ml раствора фенол-црвеног и 10 ml ($1 : 20$) HRPO. Након инкубације од 10 минута на собној температури, подеси се $\text{pH} \approx 12$, помоћу 1 M NaOH (10 ml). Тако је финална концентрација H_2O_2 у три узорка стандарда износила: $2.75, 5.49$, и $10.99 \text{ nmol/ } H_2O_2/\text{ml}$.

Концентрација, а затим и количина ослобођеног H_2O_2 у коронарном ефлуенту израчунава се на основу фактора апсорбанце (F)/nmol H_2O_2 :
$$F = \frac{\Delta A}{\text{nmol H}_2\text{O}_2/\text{cuv}} .$$

На основу апсорбанце узорка (A_u) на $\lambda_{\text{max}} = 610 \text{ nm}$ и њеног упоређивања са апсорбанцом слепе пробе (A_{sp}), израчунава се финална апсорбанца (ΔA) ($A = A_u - A_{sp}$). Помоћу овако добијене апсорбанце, фактора F и количине коронарног ефлуента употребљеног у есеју (200 ml) израчунава се концентрација и количина H_2O_2 (изражен у nmol) у коронарном ефлуенту по формули:
$$\frac{\text{nmol H}_2\text{O}_2}{\text{ml коронарног ефлуента}} = \frac{\Delta A}{F} .$$

3.5.3 ОДРЕЂИВАЊЕ НИВОА АЗОТ МОНОКСИДА

Одређивање количине ослобођених нитрита (NO_2^-) у коронарном венском ефлуенту представљало нам је најдоступнију индиректну методу за одређивање функционалности ендотелног L-аргинин/NO система у коронарној циркулацији. Обзиром да су методе за директно одређивање азотног монооксида (NO) нама за сада недоступне, спектрофотометријска метода одређивања количине ослобођених нитрита представља доступну и довољно поуздану методу за ову процену (*Green et al., 1982*). Имајући у виду да се у реакцији са молекуларним кисеоником ствара еквимоларна количина нитрита, можемо са веома великом сигурношћу тврдити да количина ослобођених нитрита у коронарном венском ефлуенту представља количину ослобођеног NO:
$$\text{NO} + \frac{1}{2} \text{O}_2 \longrightarrow \text{NO}_2^- .$$

Биохемијски ова метода се 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 (може се чувати на собној температури) и 0.1 % воденог раствора: N-(1-нафтил)-етилендиамин дихидрохлорида (NEDA), који се чува у тамној бочици на 4 °C, због своје високе фотохемијске реактивности.

У епрувете (12 x 100) пипетира се 0.1 ml екстракта коронарног ефлуента, 250 μl свеже направљеног *Griess*-ов реагенса и 125 μl амонијачног пуфера (pH = 9.0), кога сачињавају амонијум хлорид (NH_4Cl) и натријум тетраборат ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$). Амонијачни

пуфер, који се у току припреме мора загревати, због изузетно слабе растворљивости натријум тетрабората, има за сврху стабилизацију диазо-комплекса. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћено је 1 ml *Krebs-Hensenleit*-овог раствора.

Концентрација ослобођених нитрита у узорцима одређује се на основу калибрационе криве. Калибрациона крива конструише се на основу екстинкција узорака, који у себи садрже познату концентрацију нитрита, након њихове реакције са *Griess*-овим реагенсом у присуству пуфера. Добија се пипетирањем различитих количина воденог раствора 1 mM NaNO_2 у 1 ml *Krebs-Hensenleit*-овог раствора и то: 3, 6, 12, 24 μl , чиме се добија концентрација нитрита од 2.18, 4.37, 8.73 и 17.34 $\text{nmol NO}_2^-/\text{ml}$. Након стабилизације боје на собној температури 5 - 10 минута приступа се детерминисању концентрације ослобођених нитрита спектрофотометријски на таласној дужини од $\lambda = 550 \text{ nm}$.

Концентрација, а затим количина ослобођених нитрита (изражени у *nmol*), добија се на основу одређивања стандардног фактора (F), за сваки појединачни стандард (F1-F4), а затим добијањем њихове аритметичке средине:

$$F = \frac{\text{Екстинкција стандарда} - \text{екстинкција слепе пробе}}{\text{Концентрација NaNO}_2 \text{ у стандарду}} ; \frac{\text{nmol NO}_2}{\text{ml екстракта}} = \frac{\Delta E (E_u - E_{sp})}{F}$$

3.5.4 ОДРЕЂИВАЊЕ НИВОА ЛИПИДНЕ ПЕРОКСИДАЦИЈЕ

Ниво липидне пероксидације одређиван је индиректно, преко продукта реакције липидне пероксидације са тиобарбитурном киселином, одакле и потиче скраћеница TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*). Метода се заснива на одређивању нивоа липидних пероксида на основу реакције једног од њих, малонилдиалдехида (MDA) са ТВА. Метода је описана од стране *Ohkawa*-е и сарадника (1979).

У епрувете (12x100) пипетирано је 800 μl коронарног венског ефлуента и 200 μl 1% ТВА у 0.05 M NaOH. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћена је еквивалентна количина *Krebs-Hensenleit*-овог раствора. Након пипетирања, узорци су инкубирани у воденом купатилу 15 минута на 100 °C. Након инкубације, узорци су прилагођени собној температури, па се приступа детерминисању концентрације ослобођених TBARS у коронарном венском ефлуенту, спектрофотометријски, на таласној дужини од $\lambda = 530 \text{ nm}$.

Концентрација ослобођених TBARS (изражени у μM) добија се на основу следеће једначине:
$$\frac{\mu\text{M TBARS}}{\text{ml коронарног ефлуента}} = \frac{\Delta A(A_u - A_{sp})}{1.56 \times 1.25}$$
, при чему је A_u - апсорбанца узорка, A_{sp} - апсорбанца следеће пробе, а 1.56 и 1.25 су корекциони фактори за овај есеј.

3.6 БИОХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ

Крв за анализу нивоа редокс параметара узимана је из југуларне вене непосредно након жртвовања. Узорци крви сакупљани су у *Vacutainer* епрувете са натријум цитратом као антикоагулантом. Основна обрада узорка састојала се од одвајања еритроцита од плазме центрифугирањем (10 min на 5000 rpm, 4 °C). Исталожени еритроцити су ресуспендовани и три пута испрани физиолошким раствором уз центрифугирање 10 min на 5000 rpm, а затим замрзнути на $-20\text{ }^\circ\text{C}$ до анализе.

У узорцима венске крви одређивани су следећи параметри редокс статуса, спектрофотометријском методом на апарату марке - *Analytic Jena Specord S 600, UK*:

1. прооксидативни параметри: супероксид анјон радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$), водоник пероксид (H_2O_2), азот моноксид (NO) и индекс липидне пероксидације (TBARS), на исти начин као што су одређени и у коронарном венском ефлуенту;
2. параметри ендogene антиоксидативне заштите: супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT) и редуковани глутатион (GSH).

3.6.1 ОДРЕЂИВАЊЕ АКТИВНОСТИ СУПЕРОКСИД ДИСМУТАЗЕ

Одређивање активности SOD врши се адреналинском методом. Ова метода припада групи метода „негативног“ типа, јер се прати смањење брзине аутооксидације адреналина у алкалној средини, која је зависна од $\text{O}_2^{\cdot-}$ (*Misra & Fridovich, 1972*). Присутна SOD уклања $\text{O}_2^{\cdot-}$ и при томе инхибира реакцију аутооксидације адреналина.

Брзина аутооксидације адреналина прати се спектрофотометријски преко промене апсорбанце на 480 nm. Пораст апсорбанце на 480 nm потиче од акумулације адренохрома. Брзина аутооксидације адреналина једнака је нагибу линеарног дела пораста апсорпције. Процент инхибиције користи се као мера каталитичке активности ензима. Брзина аутооксидације адреналина у одсуству ензима узима се као референтна (контролна), а брзина аутооксидације у присуству SOD, односно протеина у цитосолу представља део референтне вредности.

У 3.2 ml реакционе смеше коју чине: 3 ml карбонатног пуфера, pH = 10.2 и 0.1 ml раствора адреналина, додаје се 0.01 ml раније припремљеног супернатанта. Аутооксидација адреналина прати се у току четири минута на 480 nm. Реакција је стабилна у температурном опсегу од 26 – 30 °C. Упоредо се ради и контролна реакција.

Процент инхибиције аутооксидације адреналина у присуству SOD из узорка, у односу на контролну реакцију аутооксидације адреналина користи се за израчунавање SOD активности. Количина SOD изражена је у јединицама SOD активности по граму Hb (јед/gHb). Јединица SOD активности дефинисана је као запремина, односно количина протеина која узрокује 50 % инхибиције брзине аутооксидације адреналина у линеарном делу пораста апсорпције.

Израчунавање се врши по следећој једначини: $SOD - 1 = \frac{2(\Delta K - \Delta A) \times R}{V \times Hb \times \Delta K}$, при чему је ΔK - промена апсорпције контролне реакције у минути, ΔA - промена апсорпције реакције са узорком у минути, V - запремина узорка која се сипа у реакциону смешу (ml), Hb - количина хемоглобина (g/100ml лизата), R – разблажење.

3.6.2 ОДРЕЂИВАЊЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЕ

Активност каталазе у сонификату одређује се по методи *Beutler*-а (1982). Метода се састоји у спектрофотометријском праћењу брзине разградње водоник пероксида у присуству каталазе на 230 nm. На тој таласној дужини водоник пероксид апсорбује светлост. Тачна концентрација водоник пероксида одређује се на следећи начин: у односу на апсорпцију разблаженог раствора пуфера (1 : 10), као нула, читава се апсорпција раствора састављеног од 0.9 ml разблаженог пуфера и 0.1 ml разблаженог 30 % раствора H₂O₂ (1:100). Концентрација водоник пероксида израчунава се на основу

екстинкционог коефицијента, који је за H_2O_2 , на 230 nm, 0.071, по формули: $C = \frac{\Delta A}{0.071}$.

Добијена концентрација затим се разблажује до 10 mM.

Реакциона смеша: у кварцну кивету у којој се налази 50 μl пуфера додаје се између 5 и 50 μl узорка (зависно од активности каталазе). Реакција почиње додатком 1 ml 10 mM раствора водоник пероксида. Пад апсорбанце прати се на 230 nm у току три минута. Активност се изражава у јед/mg протеина, а јединица је дефинисана као количина редукованог H_2O_2 , изражена у μM , у минути.

Израчунавање се врши према следећој једначини: $\text{CAT} = \frac{\Delta A \times R}{0.071 \times \text{Low} \times V}$,

при чему је ΔA – промена апсорбанце у минути, R – разблажење, V – запремина узорка (ml), Low – количина протеина (mg/ml сонификата).

3.6.3 ОДРЕЂИВАЊЕ РЕДУКОВАНОГ ГЛУТАТИОНА

Ниво редукованог глутатиона (GSH) у плазми одређује се спектрофотометријски по методи *Beutler*-а (1982), а заснива се на оксидацији глутатиона GSH помоћу 5,5–дитио-бис-6,2-нитробензеовом киселином (DTNB).

GSH се екстрахује тако што се у 0.1 ml 0.1 %EDTA дода 0.4 ml плазме и 0.75 ml раствора за преципитацију (1.67 g метафосфорне киселине, 0.2 g EDTA, 30 g NaCl, допунити до 100 ml дестилованом водом; раствор је стабилан три недеље на +4 $^{\circ}\text{C}$). После мешања на *Vortex* мешалици, смеша се екстрахује 15 минута на леду и центрифугира 10 минута на 4000 rpm. Мерење се врши у кварцним киветама запремине 1 ml. У епрувете (12 x 100) пипетира се 300 μl венског ефлуента, 750 μl Na_2HPO_4 и 100 μl DTNB (1 mg DTNB/ml 1 % натријум цитрата). Као слепа проба користи се дестилована вода.

Концентрација, а затим и количина редукованог глутатиона у венском ефлуенту одређује се на основу калибрационог дијаграма (стандардне криве), који се одређује за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве користи се стандардни (Stock) раствор редукованог глутатиона концентрације 1.5 mmol/l. У четири епрувете се пипетира (уместо венског ефлуента) 10, 20, 30 и 40 μl 1 mM раствора GSH, 300 μl хладног перфузионог *Krebs-Hensenleit*-овог раствора. Тако се одреди концентрација нитрита у узорцима

стандарда (nmol/GSH/ml). Мерење апсорбанце (A) врши се на таласној дужини максималне апсорпције $\lambda_{\max} = 420 \text{ nm}$. Од добијених апсорбанци одузима се вредност апсорбанце слепе пробе (B), чиме се добија коначна апсорбанца (ΔA). Помоћу овако добијене апсорбанце, стандардног фактора (F), и количине венског ефлуента употребљеног у есеју израчунава се концентрација глутатиона у венском ефлуенту по

формули:
$$F = \frac{\Delta A}{\text{nmol GSH} / \text{cuv}} ; \quad \frac{\text{nmol GSH}}{\text{ml плазме}} = \frac{\Delta A}{F} .$$

3.7 СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Статистичка обрада података рађена је у статистичком пакету SPSS 23.0 for Windows.

За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, коришћене су методе дескриптивне статистике, графичко и табеларно приказивање. Резултати у табелама и на графицима приказани су као средња вредност \pm стандардна грешка ($X \pm SE$).

У зависности од расподеле, за анализу података користио се одговарајући параметријски (t-тест) или непараметријски тест (Mann Whitney). Статистичка значајност разлике постављена је на нивоу од $p < 0.05$.

IV

РЕЗУЛТАТИ

4.1 КАРДИОДИНАМИКА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

У нашој студији мерено је пет кардиодинамских параметара (dp/dt max, dp/dt /min, SLVP, DLVP, HR) и коронарни проток (CF).

4.1.1 МАКСИМАЛНА СТОПА ПРОМЕНЕ ПРИТИСКА У ЛЕВОЈ КОМОРИ

Просечне вредности максималне стопе промене притиска у левој комори изолованог срца пацова по групама приказане су у Табели 12.

Табела 12. Максимална стопа промене притиска у левој комори изолованог срца ($X \pm SE$).

Група CPP	dp/dt max (mmHg)				
	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
C-UT	1451.05±115.11	1737.32±133.68	1973.45±160.84	2024.10±130.37	2174.65±122.67
C-T	1670.47±115.75	1928.68±79.12	2040.07±90.14	2230.19±88.43	2349.59±74.79
dED-UT	1595.30±48.23	1880.12±76.84	2159.92±163.91	2289.80±196.36	2531.52±197.67
dED-T	1067.90±30.94	1360.30±34.60	1509.13±69.15	1685.88±53.09	1840.92±27.98
acED-UT	1704.72±179.25	1878.06±158.46	2046.32±120.39	2231.98±96.86	2288.87±105.17
acED-T	2154.38±111.95	2286.19±111.57	2474.83±127.31	2631.82±104.49	2766.95±82.96
chED-UT	1331.26±115.59	1436.69±118.29	1634.29±101.66	1746.31±138.64	1855.89±121.93
chED-T	2021.75±210.75	2030.16±161.93	2210.08±205.24	2405.32±203.33	2566.63±220.85
ch+dED-UT	1334.85±158.31	1331.48±138.87	1474.13±154.45	1646.32±171.08	1923.00±191.73
ch+dED-T	1041.80±108.28	1202.78±103.53	1339.50±96.52	1480.88±92.89	1609.70±98.26
ch+acED-UT	1108.97±66.30	1318.98±82.12	1409.78±95.74	1493.56±103.26	1522.91±123.60
ch+acED-T	1753.98±127.93	1977.13±120.85	2172.01±132.35	2310.30±160.81	2423.95±156.12

4.1.2 МИНИМАЛНА СТОПА ПРОМЕНЕ ПРИТИСКА У ЛЕВОЈ КОМОРИ

Просечне вредности минималне стопе промене притиска у левој комори изолованог срца пацова по групама приказане су у Табели 13.

Табела 13. Минимална стопа промене притиска у левој комори изолованог срца ($X \pm SE$).

Група CPP	dp/dt min (mmHg)				
	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
C-UT	-1208.10±108.67	-1558.72±74.44	-1790.53±56.25	-2003.55±57.25	-2067.87±32.41
C-T	-946.07±74.13	-981.13±45.68	-1096.76±46.17	-1161.49±54.57	-1225.07±57.60
dED-UT	-1208.10±76.89	-1559.00±121.39	-1702.04±105.81	-1925.46±98.09	-1992.24±100.11
dED-T	-671.48±32.62	-890.93±24.92	-936.83±58.23	-1042.42±58.83	-1137.80±39.75
acED-UT	-1121.72±109.54	-1251.54±131.70	-1361.41±124.73	-1561.01±134.22	-1672.87±138.86
acED-T	-1207.73±96.09	-1390.98±89.34	-1575.31±94.30	-1721.93±84.79	-1759.45±90.27
chED-UT	-909.58±138.62	-1037.29±118.92	-1201.60±99.05	-1263.05±131.59	-1307.93±130.78
chED-T	-1200.58±145.69	-1198.18±109.44	-1354.42±118.82	-1506.98±131.06	-1671.54±169.32
ch+dED-UT	-1017.80±112.01	-1052.60±89.32	-1208.60±77.63	-1256.55±70.76	-1258.53±66.01
ch+dED-T	-542.03±100.69	-691.98±87.91	-788.28±81.57	-927.90±89.75	-1018.63±95.41
ch+acED-UT	-634.07±86.78	-871.18±120.46	-959.84±119.28	-991.53±106.67	-976.11±132.89
ch+acED-T	-1178.42±121.94	-1277.93±78.38	-1543.52±128.72	-1648.43±137.06	-1753.55±146.10

4.1.3 СИСТОЛНИ ПРИТИСАК ЛЕВЕ КОМОРЕ

Просечне вредности систолног притиска у левој комори изолованог срца пацова по групама приказане су у Табели 14.

Табела 14. Систолни притисак леве коморе изолованог срца пацова ($X \pm SE$).

Група CPP	SLVP (mmHg)				
	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
C-UT	37.08±1.60	41.95±1.84	45.88±2.31	51.45±2.36	55.75±2.68
C-T	40.73±5.03	41.53±2.19	46.28±2.12	50.63±1.97	55.48±2.27
dED-UT	42.90±2.23	49.88±2.46	55.20±2.34	58.40±1.64	65.56±2.22
dED-T	30.22±0.58	35.83±1.28	37.93±2.86	43.52±1.93	48.25±1.03
acED-UT	41.86±5.05	47.64±5.24	51.89±5.91	57.20±7.50	58.41±6.31
acED-T	48.67±3.09	56.21±4.21	60.22±4.74	62.91±4.69	63.90±5.21
chED-UT	36.88±3.63	37.88±3.17	40.94±1.87	43.23±2.80	46.23±3.30
chED-T	54.28±4.85	54.54±4.63	57.57±4.83	62.83±5.01	69.66±5.19
ch+dED-UT	31.88±2.04	34.75±1.20	40.05±2.09	41.22±2.16	42.20±2.26
ch+dED-T	25.43±3.66	30.28±3.61	35.22±3.43	38.42±4.07	41.18±4.06
ch+acED-UT	31.15±2.84	32.18±1.42	33.99±0.93	35.60±0.70	36.31±1.48
ch+acED-T	48.67±3.64	54.95±4.75	60.40±4.95	63.95±5.28	66.79±5.18

4.1.4 ДИЈАСТОЛНИ ПРИТИСАК ЛЕВЕ КОМОРЕ

Просечне вредности дијастолног притиска у левој комори изолованог срца пацова по групама приказане су у Табели 15.

Табела 15. Дијастолни притисак леве коморе изолованог срца пацова ($X \pm SE$).

Група CPP	DLVP (mmHg)				
	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
C-UT	1.32±0.09	2.02±0.12	2.08±0.13	2.27±0.12	2.45±0.10
C-T	3.43±0.29	3.72±0.19	3.92±0.17	4.08±0.19	4.16±0.17
dED-UT	1.90±0.14	1.99±0.15	2.09±0.14	2.17±0.16	2.31±0.22
dED-T	2.05±0.10	2.18±0.05	2.15±0.02	2.22±0.03	2.18±0.03
acED-UT	2.51±0.13	2.56±0.14	2.61±0.14	2.63±0.17	2.96±0.17
acED-T	1.95±0.26	2.11±0.29	2.27±0.31	2.33±0.35	2.30±0.31
chED-UT	3.62±0.72	3.71±0.54	3.69±0.58	3.54±0.68	3.75±0.62
chED-T	2.45±0.21	2.63±0.15	2.72±0.12	2.75±0.21	2.86±0.23
ch+dED-UT	3.47±0.34	3.28±0.35	3.57±0.34	3.62±0.35	3.57±0.26
ch+dED-T	2.10±0.30	2.25±0.36	2.23±0.31	2.25±0.28	2.40±0.29
ch+acED-UT	3.03±0.42	2.99±0.42	3.10±0.38	3.01±0.44	3.04±0.40
ch+acED-T	3.07±0.35	3.12±0.35	3.15±0.36	3.29±0.32	3.29±0.37

4.1.5 СРЧАНА ФРЕКВЕНЦА

Просечне вредности срчане фреквенце изолованог срца пацова по групама приказане су у Табели 16.

Табела 16. Срчана фреквенца изолованог срца пацова ($X \pm SE$).

Група СРР	HR (bpm)				
	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
C-UT	267.00±9.84	280.33±6.70	287.17±4.69	299.33±3.71	299.25±5.94
C-T	230.40±10.73	241.65±9.90	247.22±8.93	251.18±9.63	257.65±9.49
dED-UT	267.30±7.56	268.78±7.22	271.76±12.10	289.42±8.63	297.56±10.26
dED-T	228.73±4.29	238.75±3.41	245.40±3.68	251.85±4.07	261.97±3.31
acED-UT	251.20±9.69	258.82±11.37	290.20±11.65	301.20±4.38	312.50±2.98
acED-T	273.65±10.01	274.84±5.83	279.76±5.81	290.08±7.03	294.01±8.39
chED-UT	271.92±15.05	287.00±18.88	289.70±18.05	295.99±15.12	297.71±15.33
chED-T	260.48±5.44	268.39±5.55	280.32±5.96	284.63±5.99	293.30±5.56
ch+dED-UT	286.40±10.02	299.78±7.66	304.62±7.39	306.17±8.61	304.83±7.65
ch+dED-T	230.80±10.58	227.22±17.41	241.58±15.12	251.78±8.88	254.80±7.63
ch+acED-UT	261.22±14.70	269.25±11.50	272.88±12.03	283.51±12.36	300.08±9.85
ch+acED-T	263.13±7.44	277.09±7.67	281.60±6.60	293.04±8.10	291.98±7.22

4.1.6 КОРОНАРНИ ПРОТОК

Просечне вредности коронарног протока изолованог срца пацова по групама приказане су у Табели 17.

Табела 17. Коронарни проток изолованог срца пацова ($X \pm SE$).

Група ССР	CF (ml/min)				
	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
C-UT	7.63±0.29	8.10±0.34	8.60±0.47	9.20±0.63	10.17±1.10
C-T	8.90±0.44	9.13±0.50	10.47±0.70	11.82±0.77	9.48±0.54
dED-UT	7.20±0.26	7.74±0.34	7.52±0.25	7.64±0.21	7.95±0.25
dED-T	8.10±0.26	10.37±0.20	11.63±0.32	12.97±0.28	14.50±0.21
acED-UT	10.08±0.73	10.99±0.45	13.10±1.03	15.18±1.64	16.06±1.65
acED-T	9.91±0.42	10.74±0.46	12.69±0.57	14.51±0.78	11.49±0.53
chED-UT	7.08±0.52	8.72±0.29	10.54±0.30	11.74±0.54	13.42±0.94
chED-T	10.32±0.38	10.78±0.27	12.80±0.32	14.58±0.37	11.36±0.18
ch+dED-UT	8.13±0.97	9.87±1.10	11.63±1.02	13.17±1.14	14.3±0.98
ch+dED-T	6.93±0.77	8.70±0.97	10.17±1.12	11.18±1.26	12.30±1.33
ch+acED-UT	6.93±0.51	9.15±0.79	11.60±1.12	12.60±0.98	14.30±1.18
ch+acED-T	9.40±0.41	10.45±0.57	12.67±0.90	14.13±0.90	11.27±0.75

4.2 ОКСИДАТИВНИ СТРЕС У КОРОНАРНОМ ЕФЛУЕНТУ ПАЦОВА

У нашој студији мерено је четири прооксидативна параметра у коронарном ефлуенту ($O_2^{\cdot-}H_2O_2$, NO , ТВАРС).

4.2.1 СУПЕРОКСИД АНЈОН РАДИКАЛ

Просечне вредности супероксид анјон радикала у коронарном ефлуенту изолованог срца пацова по групама приказане су у Табели 18.

Табела 18. Супероксид анјон радикал у коронарном ефлуенту изолованог срца ($X \pm SE$).

Група СРР	$O_2^{\cdot-}$ (nmol/ml)				
	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
C-UT	36.20±3.64	42.50±3.35	46.80±4.25	55.60±5.03	63.20±3.81
C-T	51.04±16.71	54.86±6.67	68.09±8.34	90.63±10.24	79.86±12.86
dED-UT	37.80±1.28	45.74±2.54	49.72±4.83	60.90±6.84	69.48±7.54
dED-T	49.13±10.89	140.82±55.66	61.18±28.04	133.30±43.85	171.74±69.58
acED-UT	62.30±1.16	75.20±2.16	112.50±3.06	113.08±3.09	111.50±2.29
acED-T	89.76±30.29	107.41±26.45	128.01±24.27	148.47±43.83	161.75±48.38
chED-UT	24.36±9.01	66.97±35.26	71.70±38.29	31.56±7.89	50.51±17.28
chED-T	74.57±16.74	145.37±22.98	142.12±30.94	146.41±32.76	221.56±23.22
ch+dED-UT	19.89±5.00	29.62±20.54	17.83±7.46	16.83±4.11	18.38±3.69
ch+dED-T	61.17±14.53	70.25±18.65	39.92±10.65	60.79±17.61	130.91±89.58
ch+acED-UT	35.64±16.96	65.29±32.34	90.55±28.87	87.87±31.49	136.62±38.69
ch+acED-T	63.92±16.21	118.98±24.39	161.05±32.37	130.78±28.29	167.81±37.03

4.2.2 ВОДОНИК ПЕРОКСИД

Просечне вредности водоник пероксида у коронарном ефлуенту изолованог срца пацова по групама приказане су у Табели 19.

Табела 19. Водоник пероксид у коронарном ефлуенту изолованог срца ($X \pm SE$).

Група СРР	H_2O_2 (nmol/ml)				
	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
C-UT	14.20±1.26	15.60±0.90	17.80±0.55	19.20±1.22	25.68±0.91
C-T	24.72±1.41	34.50±2.40	42.34±3.26	42.88±4.75	54.06±3.94
dED-UT	16.80±2.06	17.94±1.04	22.38±1.30	26.96±1.84	29.20±2.11
dED-T	22.16±3.23	27.56±2.65	36.54±3.59	37.57±3.42	39.92±3.09
acED-UT	18.20±1.16	22.30±0.82	30.36±1.30	45.20±1.61	52.90±1.11
acED-T	21.85±1.71	32.54±2.67	35.56±4.21	43.31±3.68	53.08±7.31
chED-UT	12.94±0.95	16.61±0.93	20.40±0.78	22.72±1.02	26.55±1.70
chED-T	32.80±4.32	43.62±2.83	51.30±5.93	58.07±3.62	68.63±2.39
ch+dED-UT	21.56±2.21	25.00±2.86	28.59±4.81	29.54±3.04	31.17±3.35
ch+dED-T	29.74±2.79	41.32±4.68	52.30±6.85	56.67±5.02	59.32±5.69
ch+acED-UT	16.68±1.72	22.79±2.46	28.27±2.33	29.65±1.50	35.49±2.13
ch+acED-T	29.40±3.69	36.41±2.19	39.81±2.15	51.08±2.96	56.91±5.02

4.2.3 ИНДЕКС ЛИПИДНЕ ПЕРОКСИДАЦИЈЕ

Просечне вредности индекса липидне пероксидације у коронарном ефлуенту изолованог срца пацова по групама приказане су у Табели 20.

Табела 20. Индекс липидне пероксидације у коронарном ефлуенту изолованог срца ($X \pm SE$).

Група CPP	TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)				
	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
C-UT	22.50±1.66	19.90±1.44	26.50±0.92	30.20±1.25	32.50±2.22
C-T	10.06±1.07	13.58±1.79	15.72±2.29	18.64±2.66	21.34±3.17
dED-UT	23.60±1.25	28.40±2.10	28.06±1.44	31.12±1.00	36.50±1.96
dED-T	18.29±0.92	22.65±1.18	23.80±0.67	27.71±1.10	31.74±1.78
acED-UT	15.60±0.42	20.20±1.30	23.27±0.82	24.20±0.58	29.90±0.51
acED-T	14.79±0.76	21.13±1.79	24.50±1.15	28.06±1.26	32.95±2.08
chED-UT	13.29±3.80	15.74±1.97	18.63±2.66	19.30±1.83	24.65±4.29
chED-T	18.38±0.64	27.74±0.90	30.88±1.28	33.01±0.76	39.52±0.94
ch+dED-UT	6.50±0.83	9.42±1.65	9.12±1.59	9.98±2.03	12.14±1.70
ch+dED-T	18.75±2.55	27.43±3.44	28.21±3.43	32.27±3.73	35.18±4.94
ch+acED-UT	9.54±1.26	12.35±1.69	14.48±1.37	16.09±1.39	18.42±1.64
ch+acED-T	19.51±1.37	26.08±2.00	31.72±2.33	37.74±0.80	42.49±3.84

4.2.4 АЗОТ МОНОКСИД (НИТРИТИ)

Просечне вредности азот монооксида (нитрита) у коронарном ефлуенту изолованог срца пацова по групама приказане су у Табели 21.

Табела 21. Азот моноксид (нитрити) у коронарном ефлуенту изолованог срца ($X \pm SE$).

Група СРР	NO (NO ₂ ⁻) (nmol/ml)				
	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
C-UT	53.20±1.78	55.60±1.82	69.60±3.36	71.87±5.41	85.60±2.95
C-T	72.30±2.81	104.29±7.70	113.08±7.49	130.01±8.80	145.64±10.62
dED-UT	65.60±1.01	71.98±1.84	79.58±2.57	88.12±2.32	96.68±2.01
dED-T	70.82±4.00	82.63±15.97	100.28±5.45	112.46±4.72	137.16±4.15
acED-UT	63.40±1.62	75.20±1.08	85.20±0.97	90.10±1.48	110.20±2.05
acED-T	77.19±4.43	112.48±5.26	132.64±9.70	155.54±8.57	175.62±14.73
chED-UT	61.59±11.31	88.31±4.66	102.65±14.82	127.99±14.89	135.61±22.03
chED-T	63.11±3.18	83.64±3.76	107.16±3.05	119.86±3.76	138.29±5.45
ch+dED-UT	78.12±8.34	107.76±10.52	122.93±9.78	146.67±8.47	146.12±16.20
ch+dED-T	57.84±9.14	74.27±11.44	81.85±11.20	94.92±16.30	103.24±16.23
ch+acED-UT	85.58±7.45	107.84±7.95	139.34±15.66	145.29±14.13	164.64±14.83
ch+acED-T	51.86±6.23	79.26±24.17	75.09±10.72	79.03±11.50	93.16±14.55

4.3 ОКСИДАТИВНИ СТРЕС У КРВИ ПАЦОВА

У нашој студији мерене су три врсте антиоксиданата у еритроцитима пацова (SOD, CAT, GSH) и четири прооксидативна параметра у плазми (O_2^- , H_2O_2 , NO, TBARS).

4.3.1 АНТИОКСИДАТИВНА ОДБРАНА (СУПЕРОКСИД ДИСМУТАЗА, КАТАЛАЗА, РЕДУКОВАНИ ГЛУТАТИОН)

Нивои антиоксиданата у еритроцитима пацова по групама приказани су у Табели 22.

Табела 22. Нивои антиоксиданата у еритроцитима пацова ($X \pm SE$)

Група	SOD (J/g Hb x 10 ³)	CAT (J/g Hb x 10 ³)	GSH (nmol/ml плазме)
C-UT	28.20±0.99	15.72±0.93	128550.33±2246.16
C-T	10.96±1.68	5.08±1.10	104909.68±1501.08
dED-UT	35.20±0.89	17.80±0.39	145689.00±2904.08
dED-T	21.30±1.27	6.58±0.33	136789.17±8106.32
acED-UT	20.20±1.04	12.30±0.94	121236.00±6073.94
acED-T	18.99±5.82	3.25±0.44	99172.04±4188.21
chED-UT	15.60±1.17	7.60±0.37	107997.67±2460.52
chED-T	19.00±1.44	10.85±0.82	98769.67±1670.37
ch+dED-UT	16.28±1.78	7.56±0.49	174895.81±8640.38
ch+dED-T	12.21±1.82	2.42±0.73	93830.11±4213.37
ch+acED-UT	20.35±3.49	10.62±0.91	125885.79±4806.79
ch+acED-T	26.05±3.05	3.75±0.35	103514.84±4100.86

4.3.2 ПРООКСИДАТИВНЕ ВРСТЕ (СУПЕРОКСИД АНЈОН РАДИКАЛ, ВОДОНИК ПЕРОКСИД, ИНДЕКС ЛИПИДНЕ ПЕРОКСИДАЦИЈЕ, АЗОТ МОНОКСИД-НИТРИТИ)

Нивои прооксиданата у плазми пацова по групама приказани су у Табели 23.

Табела 23. Нивои прооксиданата у плазми пацова ($X \pm SE$).

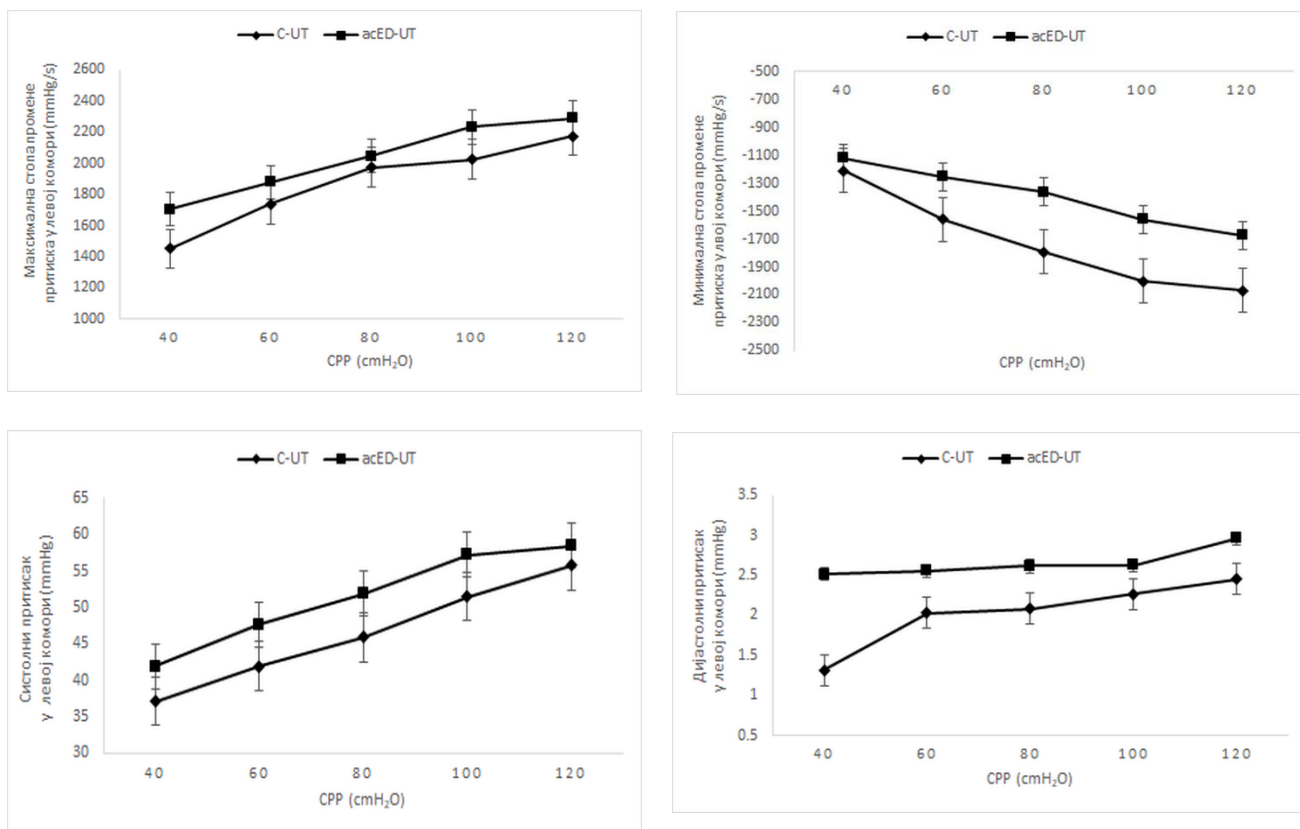
Група	$O_2^{\cdot -}$ (nmol/ml)	H_2O_2 (nmol/ml)	TBARS (μ mol/ml)	NO_2^- (nmol/ml)
C-UT	29.52±0.53	2.42±0.11	0.76±0.09	2.30±0.14
C-T	32.46±2.02	4.92±0.49	1.11±0.06	2.64±0.11
dED-UT	35.60±1.65	3.10±0.11	1.12±0.03	2.80±0.22
dED-T	42.60±1.51	4.20±0.21	1.69±0.25	3.65±0.20
acED-UT	34.50±0.53	3.40±0.29	0.98±0.17	2.87±0.36
acED-T	29.38±8.30	3.39±0.17	0.92±0.02	2.59±0.05
chED-UT	54.60±3.89	5.98±0.11	1.96±0.11	2.60±0.13
chED-T	33.85±0.95	3.60±0.14	3.16±0.10	1.11±0.06
ch+dED-UT	30.88±1.40	3.36±0.26	1.90±0.01	3.26±0.02
ch+dED-T	33.39±5.96	3.95±0.44	0.92±0.01	2.49±0.02
ch+acED-UT	28.81±1.16	2.88±0.04	1.88±0.09	3.50±0.12
ch+acED-T	31.24±6.70	3.38±0.27	0.93±0.01	2.68±0.10

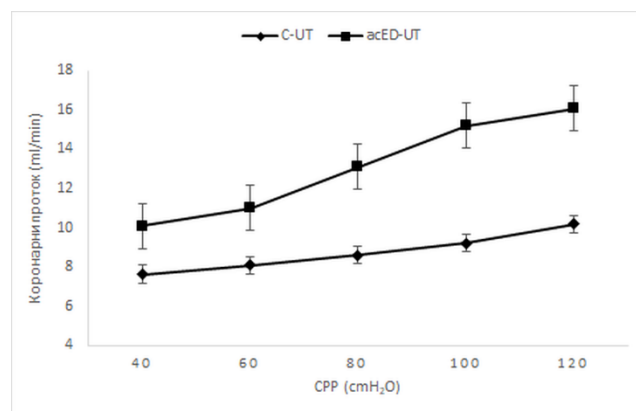
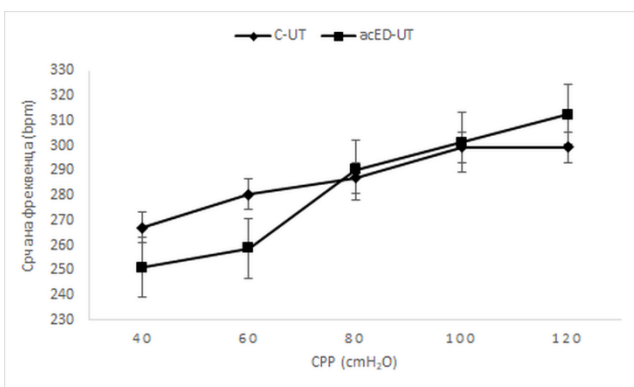
4.4. ЕФЕКТИ ЕП-а НА КАРДИОДИНАМИКУ КОД НЕАКТИВНИХ ЖИВОТИЊА

4.4.1 ЕФЕКТИ АКУТНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕП-А

У поређењу са C-UT групом, у асED-UT групи забележено је следеће (График 1): на свим CPP, статистички значајно виши ниво CF ($p < 0.05$), виши ниво DLVP (статистички значајно на CPP 40-80 и 120 cmH₂O) ($p < 0.05$), виши нивои dp/dt max и SLVP (без статистичке значајности, $p > 0.05$), нижи ниво dp/dt min (статистички значајно на CPP 80-120 cmH₂O) ($p < 0.05$). Није било значајне разлике у нивоу HR између ове две групе ($p > 0.05$).

График 1: Разлика у вредностима кардиодинамских параметара ($X \pm SE$) након акутне администрације ЕП-а код неактивних животиња

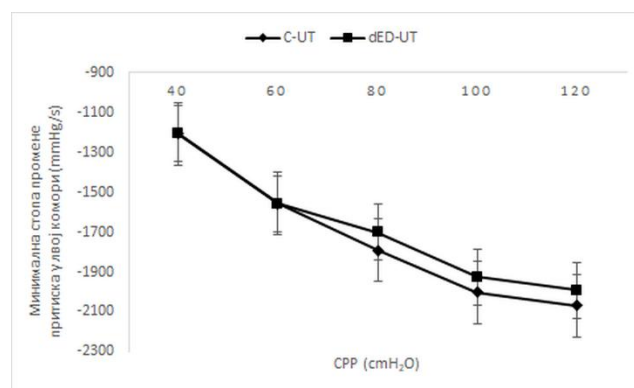
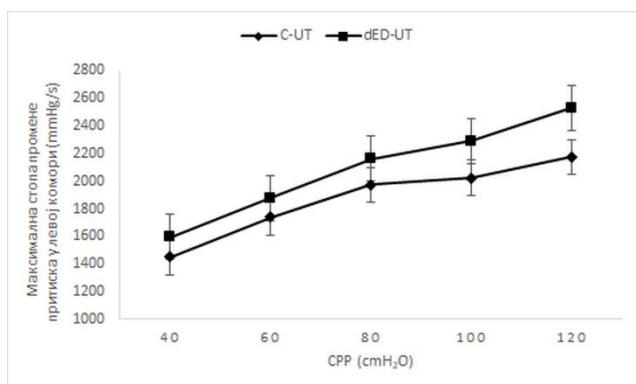


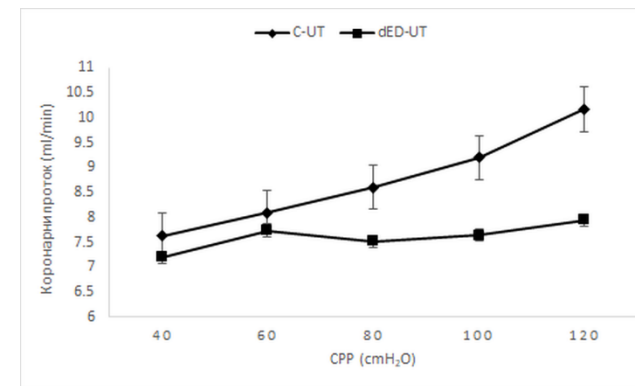
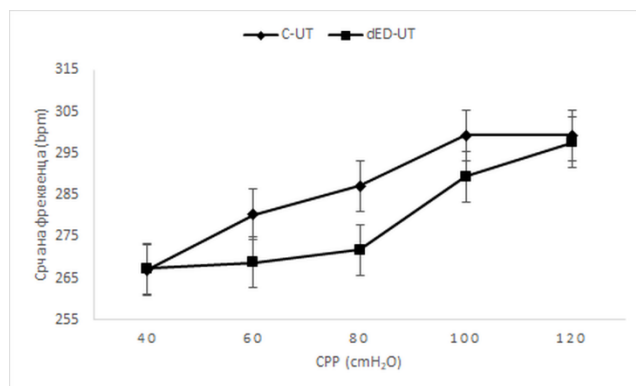
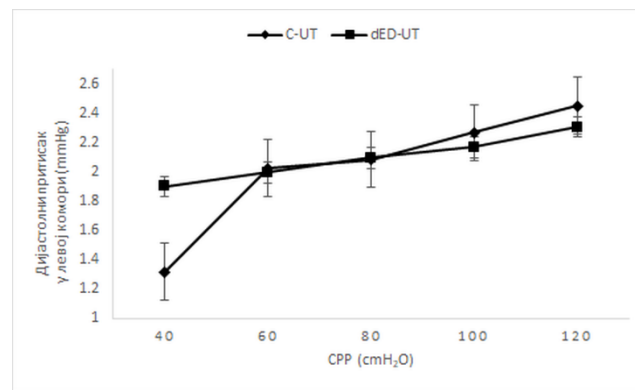
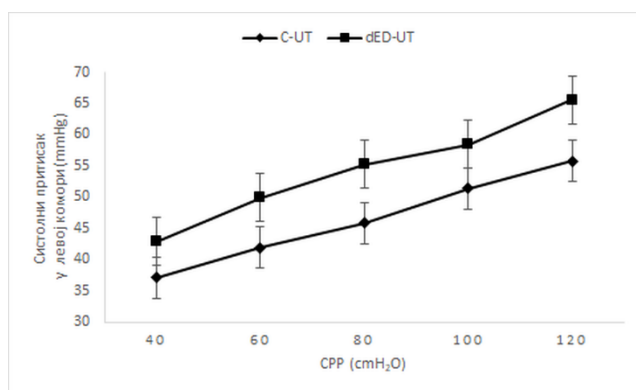


4.4.2 ЕФЕКТИ ДИРЕКТНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕП-А

У поређењу са C-UT групом, у dED-UT групи забележено је следеће (График 2): на свим CPP, виши ниво SLVP (статистички значајно на CPP 60-120 cmH₂O) ($p < 0.05$), виши ниво $dp/dt \max$ (без статистичке значајности) ($p > 0.05$) и нижи ниво CF (статистички значајно на CPP 100-120 cmH₂O) ($p < 0.05$). Није било значајне разлике у нивоу $dp/dt \min$ и HR између ове две групе ($p > 0.05$). Ниво DLVP био је статистички значајно виши при CPP 40 cmH₂O у dED-UT групи у поређењу са C-UT групом ($p < 0.05$), док на осталим CPP није било значајне разлике ($p > 0.05$).

График 2: Разлика у вредностима кардиодинамских параметара ($X \pm SE$) након директне администрације ЕП-а код неактивних животиња



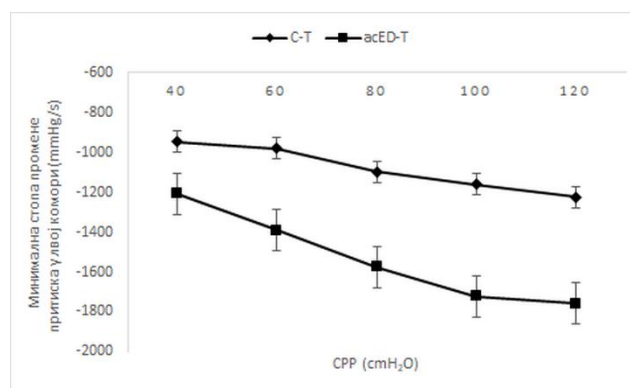
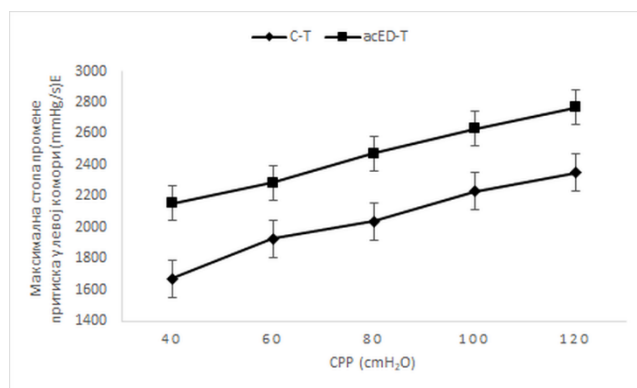


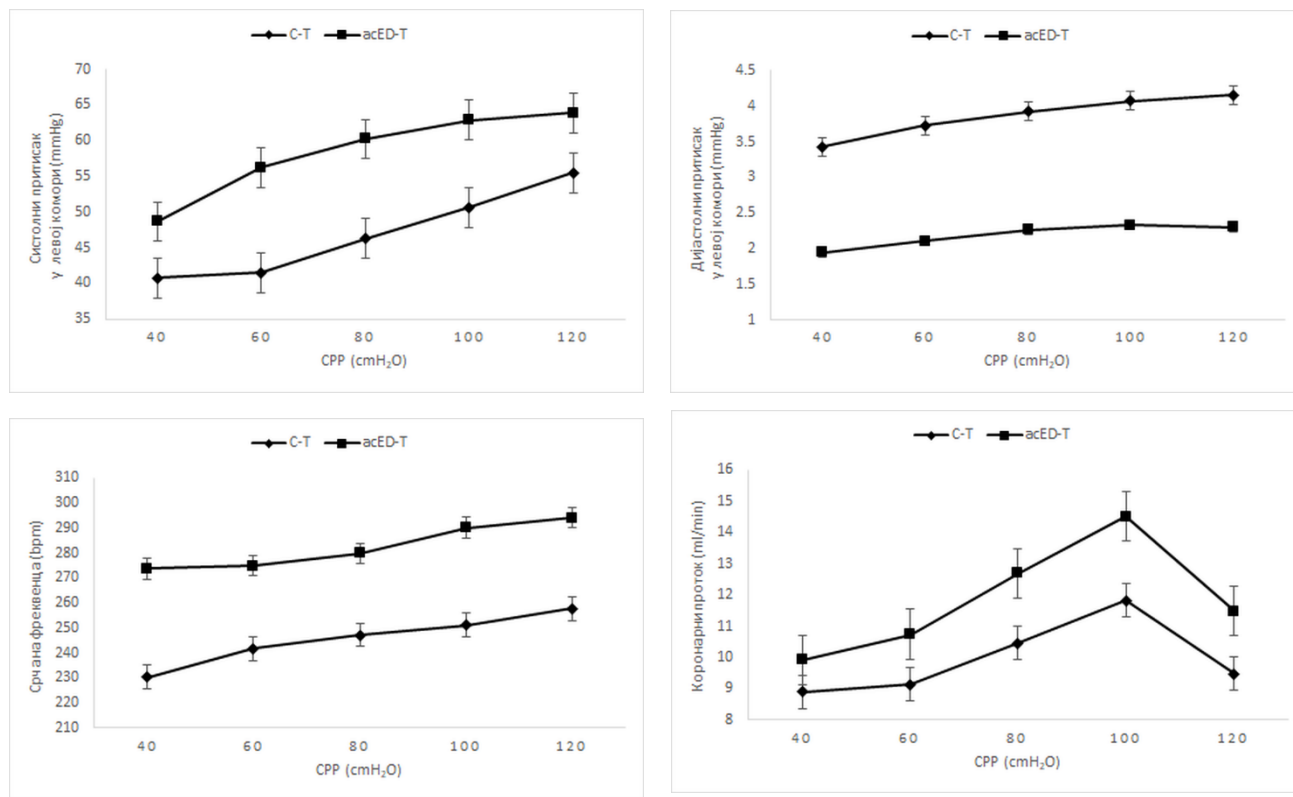
4.5 ЕФЕКТИ ЕП-а НА КАРДИДИНАМИКУ КОД АКТИВНИХ ЖИВОТИЊА

4.5.1 ЕФЕКТИ АКУТНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕП-А

У поређењу са С-Т групом, у асЕД-Т групи забележено је следеће (График 3): на свим CPP, статистички значајно виши нивои dp/dt max и HR ($p < 0.05$), виши нивои dp/dt min и CF (статистички значајно на CPP 60-120 cmH₂O) ($p < 0.05$), виши ниво SLVP (статистички значајно на CPP 60-100 cmH₂O) ($p < 0.05$) и статистички значајно нижи ниво DLVP ($p < 0.05$).

График 3: Разлика у вредностима кардиодинамских параметара ($X \pm SE$) након акутне администрације ЕП-а код активних животиња

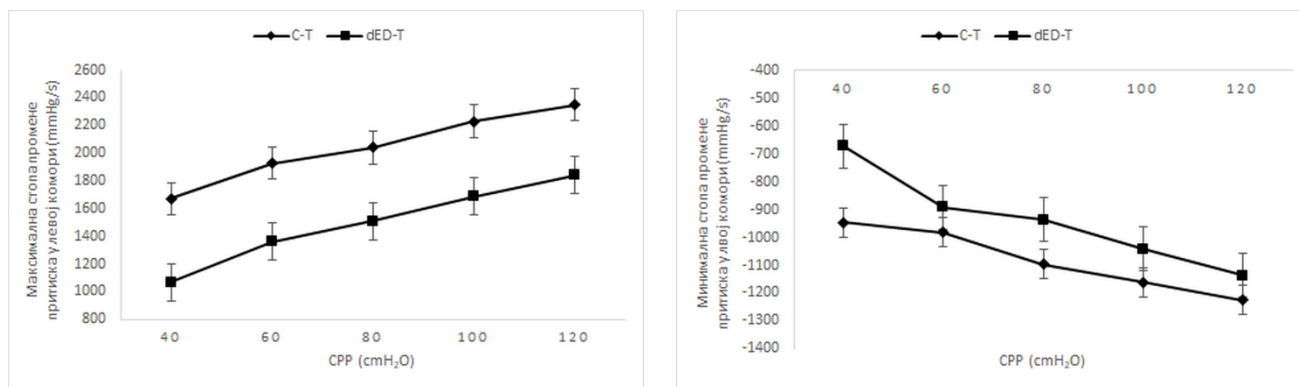


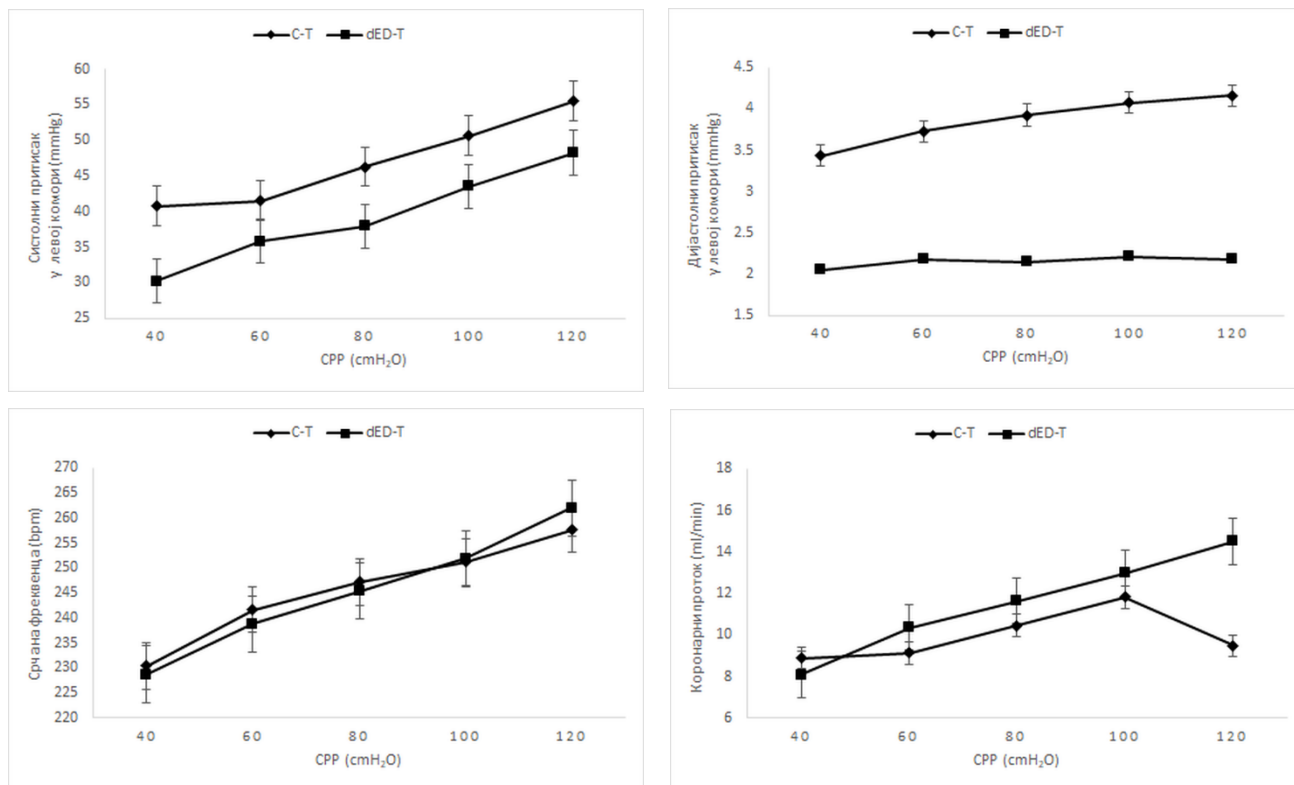


4.5.2 ЕФЕКТИ ДИРЕКТНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕП-А

У поређењу са С-Т групом, у dED-T групи забележено је следеће (График 4): на свим CPP, статистички значајно нижи нивои dp/dt max и DLVP ($p < 0.05$), нижи ниво dp/dt min (статистички значајно само на CPP 40 cmH₂O) ($p < 0.05$), нижи ниво SLVP (статистички значајно на CPP 60-120 cmH₂O) ($p < 0.05$). Није било значајне разлике у нивоу HR између ове две групе ($p > 0.05$). Ниво CF био је значајно виши при CPP 120 cmH₂O у dED-T групи у поређењу са С-Т групом ($p < 0.05$), док на осталим CPP није било значајне разлике ($p > 0.05$).

График 4: Разлика у вредностима кардиодинамских параметара ($X \pm SE$) након директне администрације ЕП-а код активних животиња

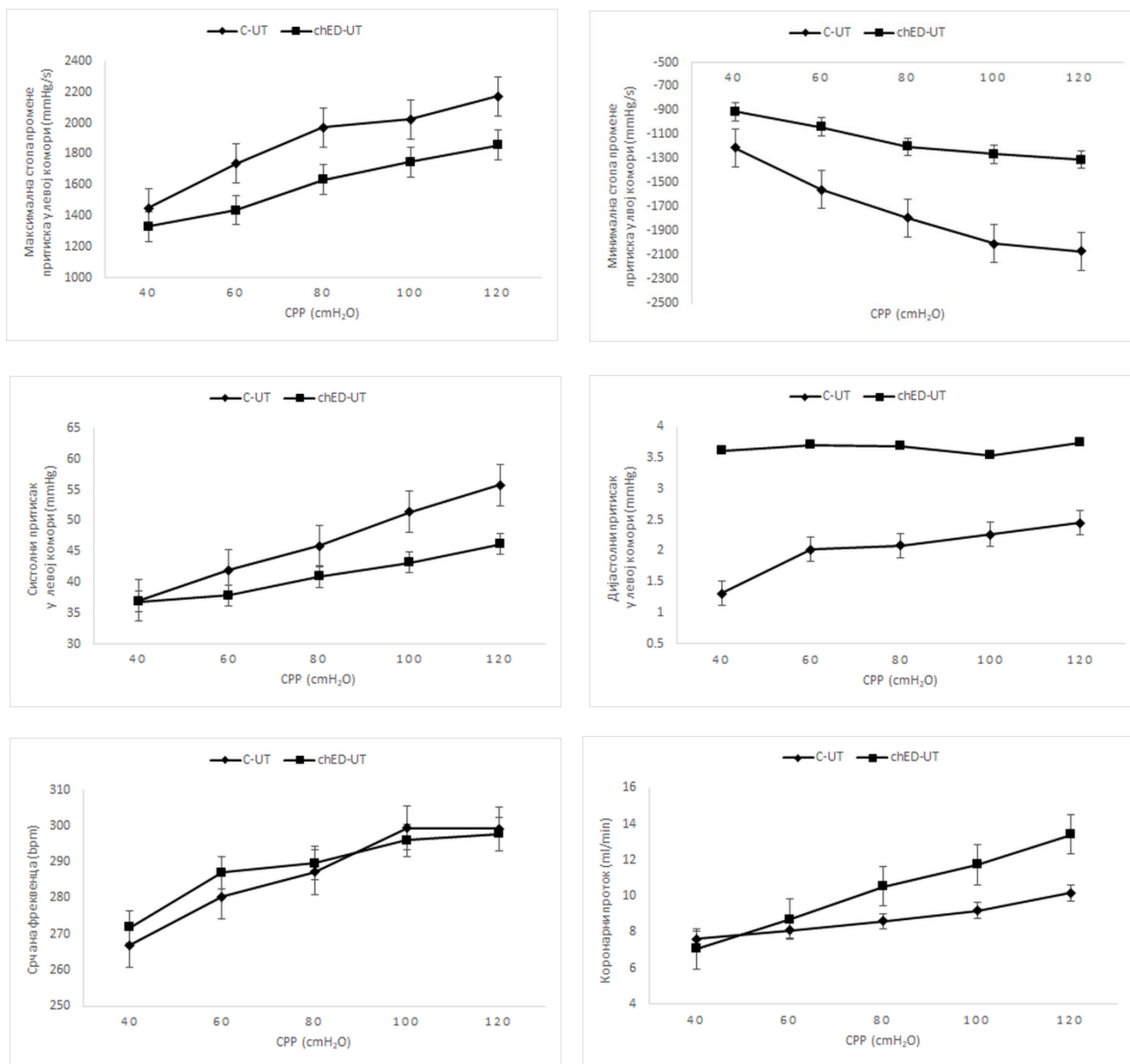




4.6 ЕФЕКТИ ХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕП-А НА КАРДИОДИНАМИКУ КОД НЕАКТИВНИХ ЖИВОТИЊА

У поређењу са С-УТ групом, у shED-УТ групи забележено је следеће (График 5): на свим CPP, нижи ниво $dp/dt \min$ (статистички значајно само на CPP 60-120 cmH₂O) ($p < 0.05$), нижи нивои $dp/dt \max$ и SLVP (без статистичке значајности) ($p > 0.05$), виши ниво DLVP (статистички значајно на CPP 40-80 cmH₂O) ($p < 0.05$). Није било значајне разлике у нивоу HR између ове две групе ($p > 0.05$). Ниво CF био је значајно виши на CPP 80-120 cmH₂O у shED-УТ групи у поређењу са С-УТ групом ($p < 0.05$), док на осталим CPP није било значајне разлике ($p > 0.05$).

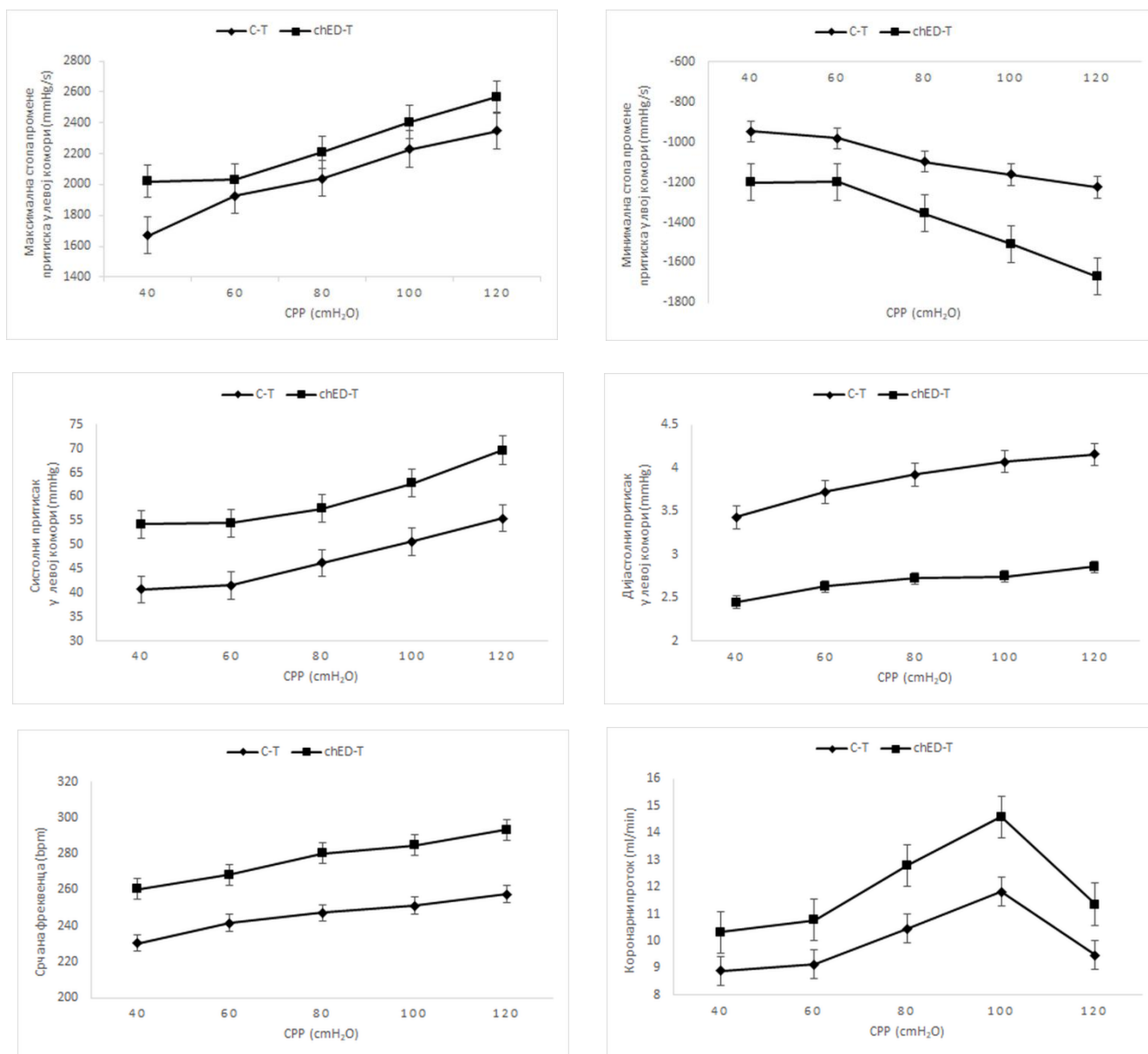
График 5: Разлика у вредностима кардиодинамских параметара ($X \pm SE$) након хроничне администрације ЕП-а код неактивних животиња



4.7 ЕФЕКТИ ХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕП-А НА КАРДИОДИНАМИКУ КОД АКТИВНИХ ЖИВОТИЊА

У поређењу са C-T групом, у chED-T групи забележено је следеће (График 6): на свим CPP, статистички значајно виши ниво HR ($p < 0.05$), виши ниво $dp/dt \min$ (статистички значајно на CPP 100-120 cmH_2O) ($p < 0.05$), виши ниво SLVP (статистички значајно на CPP 60, 100-120 cmH_2O) ($p < 0.05$), виши ниво CF (статистички значајно само на CPP 60-120 cmH_2O) ($p < 0.05$), виши ниво $dp/dt \max$ (без статистичке значајности) ($p > 0.05$) и статистички значајно нижи ниво DLVP ($p < 0.05$).

График 6: Разлика у вредностима кардиодинамских параметара ($X \pm SE$) након хроничне администрације ЕП-а код активних животиња

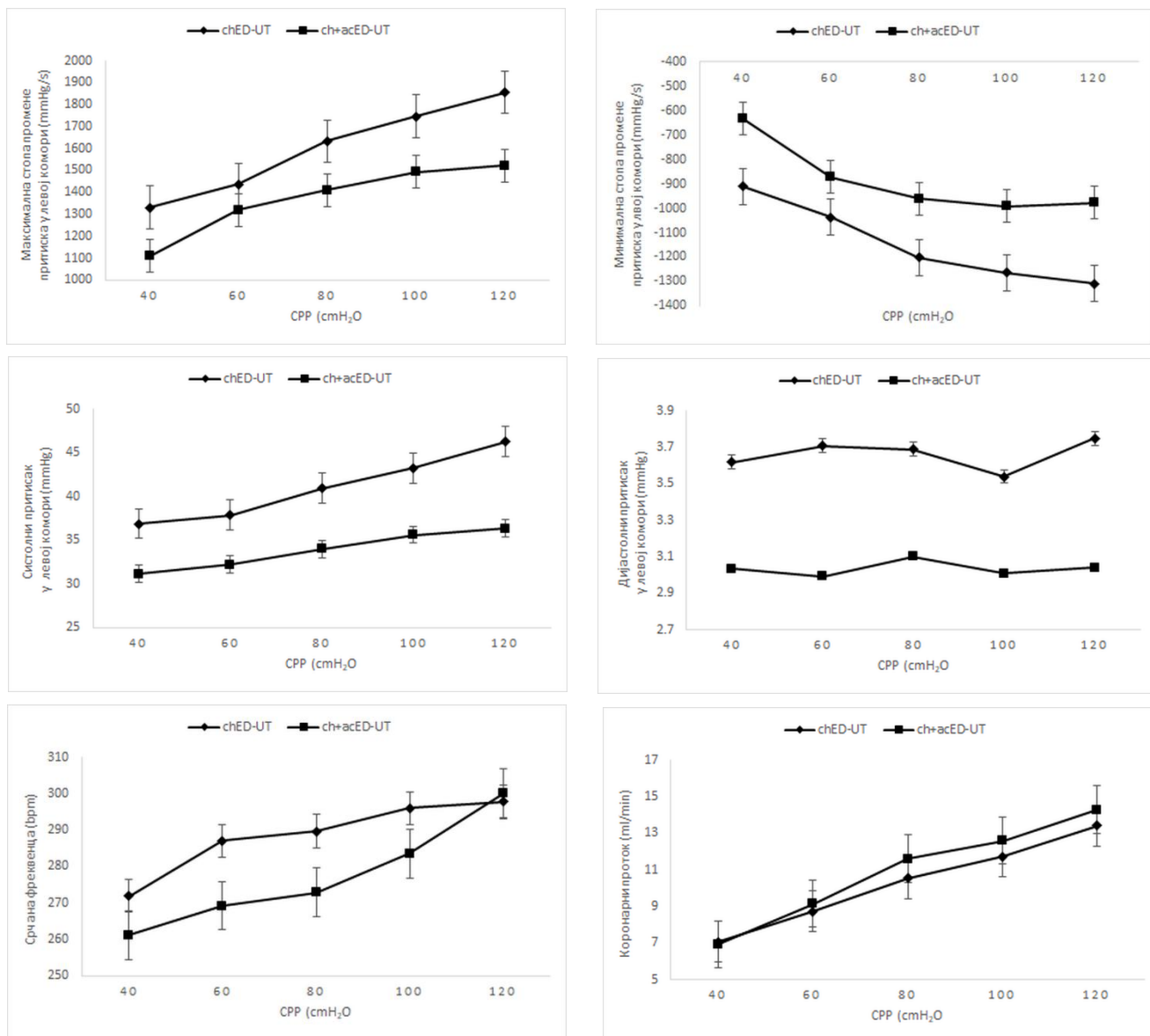


4.8 ЕФЕКТИ ЕП-А НА КАРДИОДИНАМИКУ КОД НЕАКТИВНИХ ЖИВОТИЊА КОЈЕ СУ ХРОНИЧНО КОНЗУМИРАЛЕ ЕП-А

4.8.1 ЕФЕКТИ АКУТНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕП-А

У поређењу са chED-UT групом, у ch+acED-UT групи забележено је следеће (График 7): на свим CPP, статистички значајно нижи ниво SLVP (статистички значајно на CPP 80-120 cmH₂O) ($p < 0.05$) и нижи нивои dp/dt max, dp/dt min и DLVP (без статистичке значајности) ($p > 0.05$). Није било значајне разлике у нивоу HR и CF између ове две групе ($p > 0.05$).

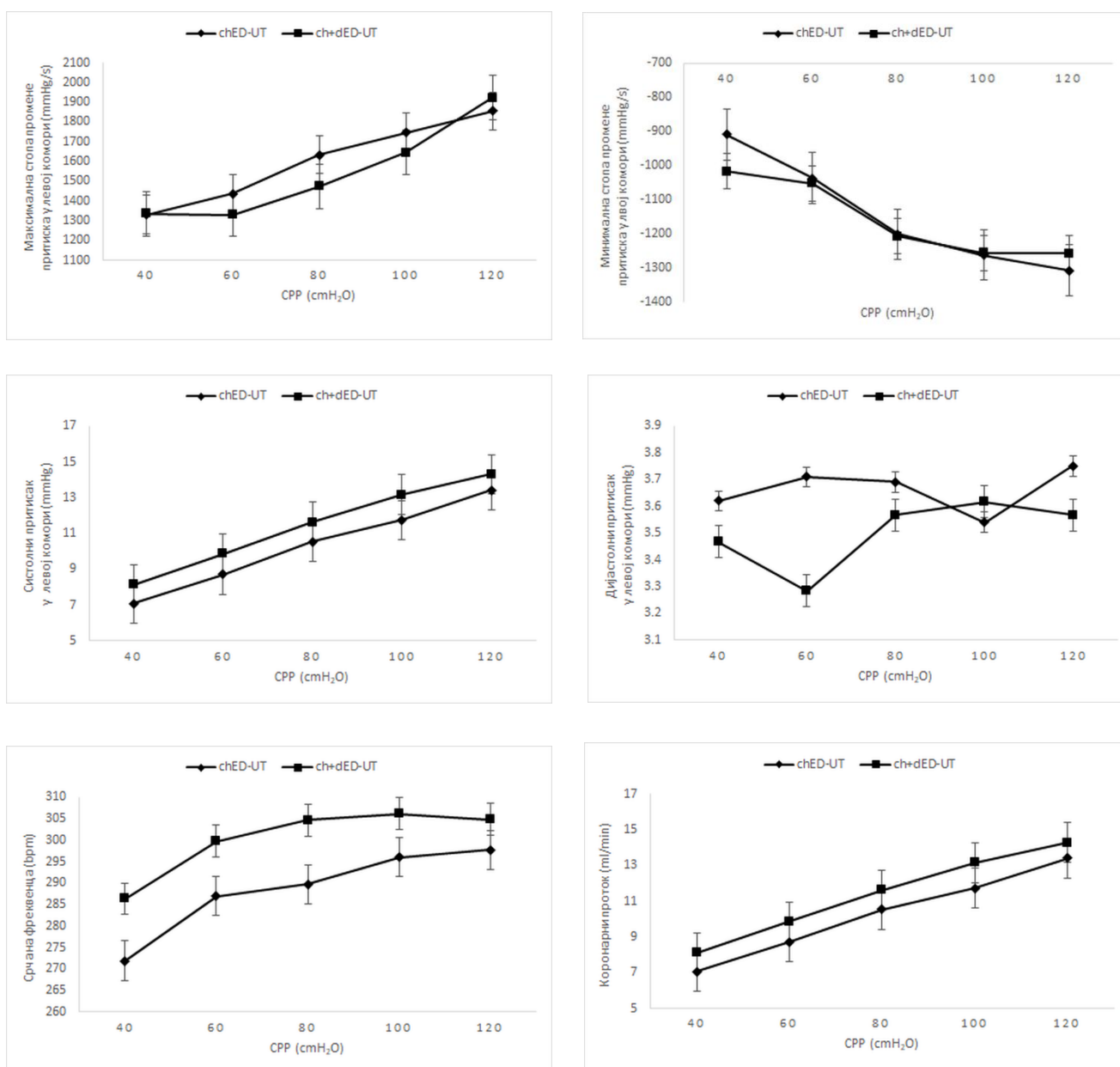
График 7: Разлика у вредностима кардиодинамских параметара ($X \pm SE$) након акутне администрације ЕП-а код неактивних животиња које су хронично конзумирале ЕП-а



4.8.2 ЕФЕКТИ ДИРЕКТНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕП-А

У поређењу са chED-UT групом, у ch+dED-UT групи забележено је следеће (График 8): на свим CPP, виши нивои HR и CF и нижи ниво SLVP (без статистичке значајности) ($p > 0.05$). Није било значајне разлике у нивоу $dp/dt \max$, $dp/dt \min$ и DLVP између ове две групе ($p > 0.05$).

График 8: Разлика у вредностима кардиодинамских параметара ($X \pm SE$) након директне администрације ЕП-а код неактивних животиња које су хронично конзумирале ЕП-а

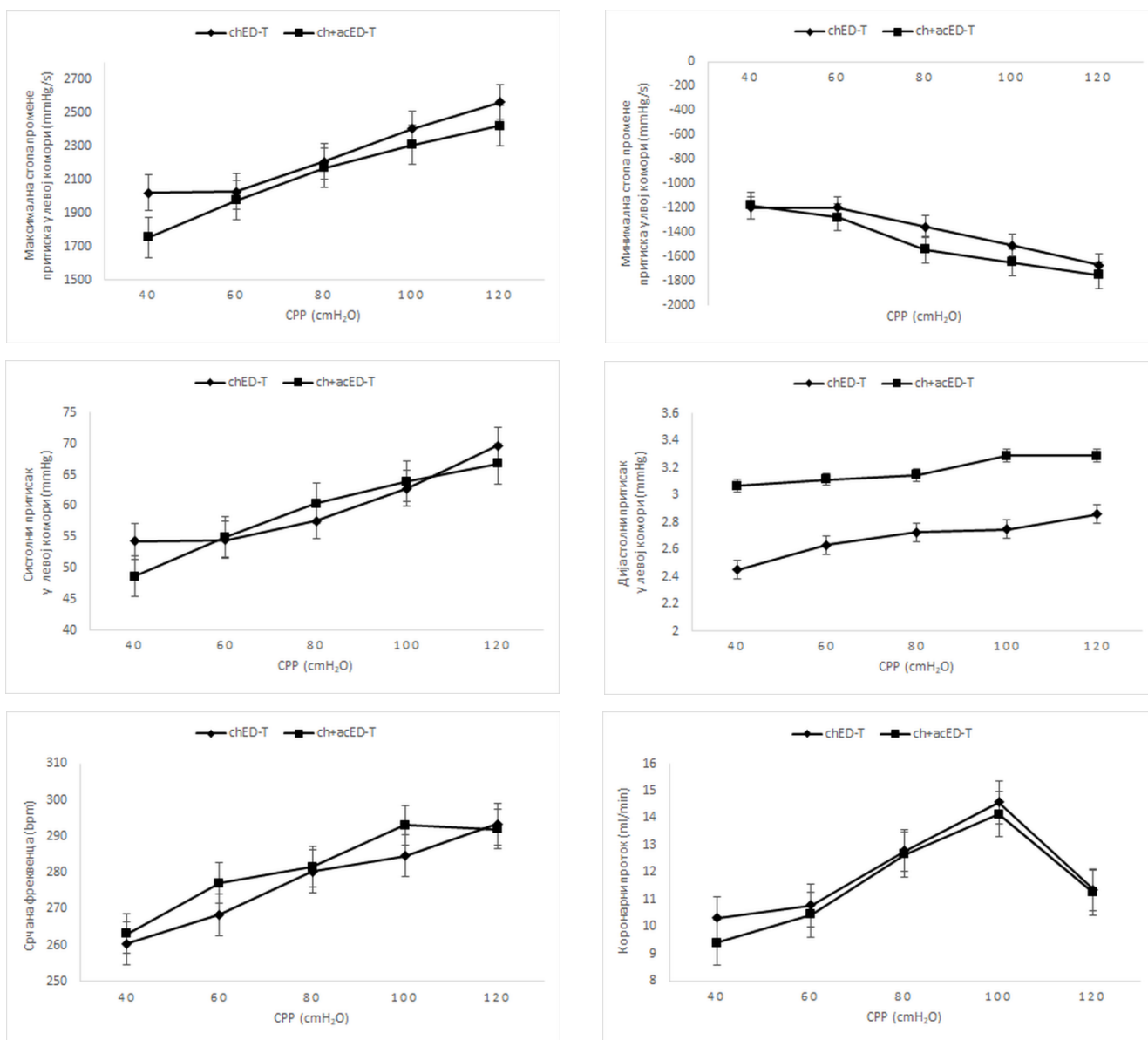


4.9 ЕФЕКТИ ЕП-А НА КАРДИОДИНАМИКУ КОД АКТИВНИХ ЖИВОТИЊА КОЈЕ СУ ХРОНИЧНО КОНЗУМИРАЛЕ ЕП-А

4.9.1 ЕФЕКТИ АКУТНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕП-А

У поређењу са chED-T групом, у ch+acED-T групи забележено је следеће (График 9): на свим CPP, нижи нивои dp/dt_{max} и CF и виши ниво DLVP (без статистичке значајности) ($p > 0.05$). Није било значајне разлике у нивоу dp/dt_{min} , SLVP и HR између ове две групе ($p > 0.05$).

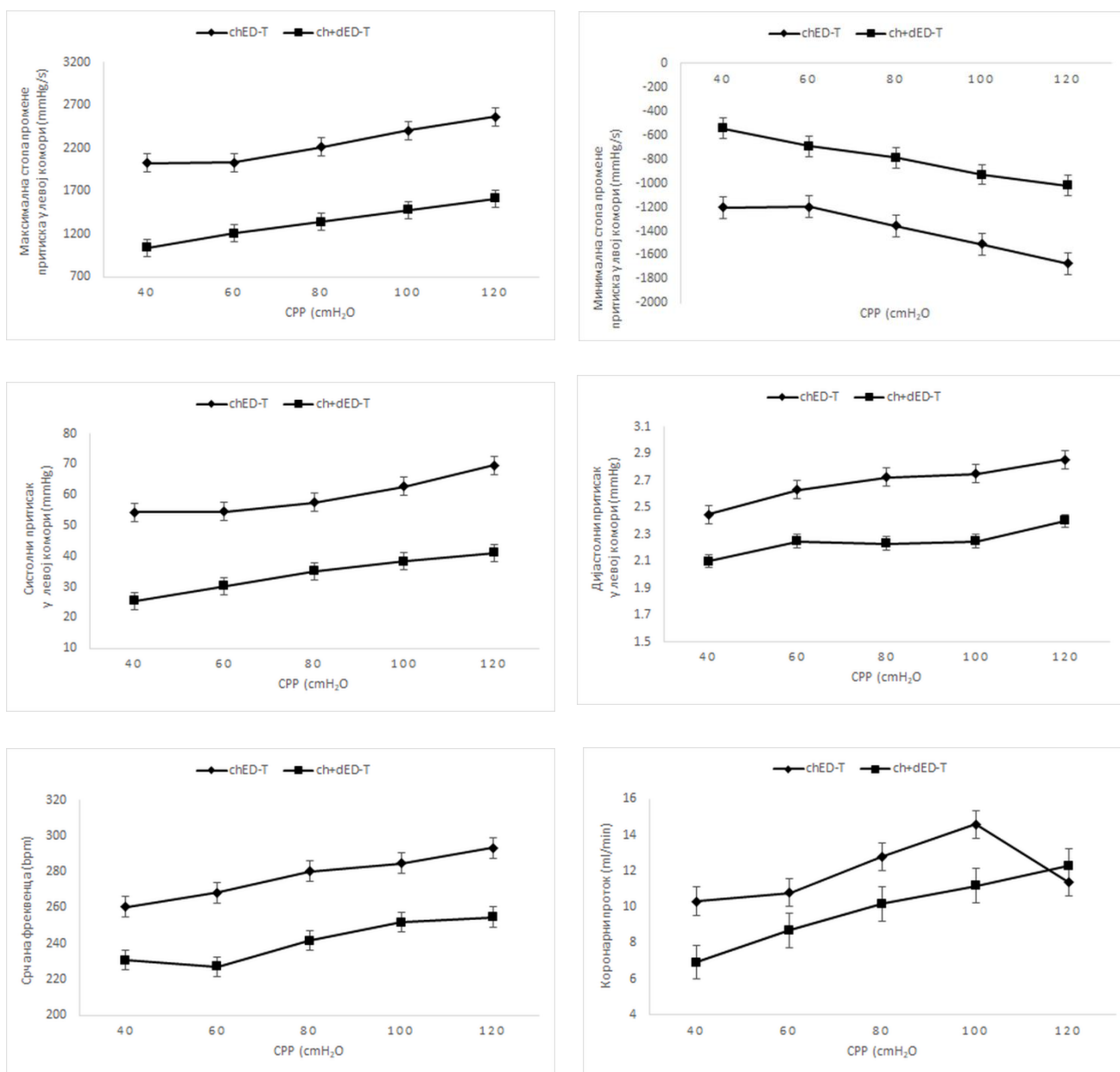
График 9: Разлика у вредностима кардиодинамских параметара ($X \pm SE$) након акутне администрације ЕП-а код активних животиња које су хронично конзумирале ЕП-а



4.9.2 ЕФЕКТИ ДИРЕКТНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕП-А

У поређењу са chED-T групом, у ch+dED-T групи забележено је следеће (График 10): на свим CPP, статистички значајно нижи нивои dp/dt max, dp/dt min, SLVP и HR ($p < 0.05$), и нижи ниво DLVP, али без статистичке значајности ($p > 0.05$). Ниво CF био је значајно нижи на CPP 40 cmH₂O у ch+dED-T групи у поређењу са chED-T групом ($p < 0.05$), док на осталим CPP није било значајне разлике ($p > 0.05$).

График 10: Разлика у вредностима кардиодинамских параметара ($X \pm SE$) након директне администрације ЕП-а код активних животиња које су хронично конзумирала ЕП-а



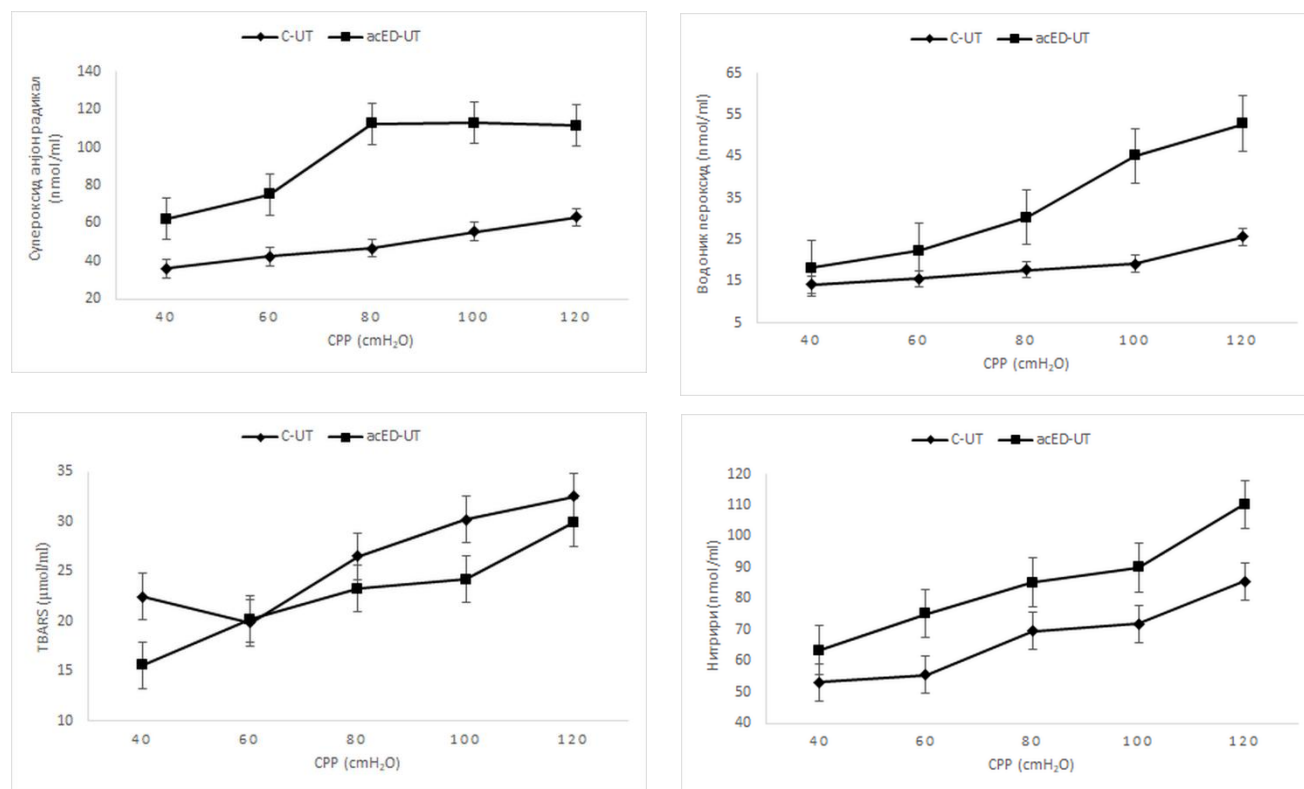
4.10. ЕФЕКТИ ЕП-а НА ОКСИДАТИВНИ СТРЕС У КОРОНАРНОМ ЕФЛУЕНТУ И КРВИ КОД НЕАКТИВНИХ ЖИВОТИЊА

4.10.1 ЕФЕКТИ АКУТНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕП-А

Оксидативни стрес у коронарном ефлуенту

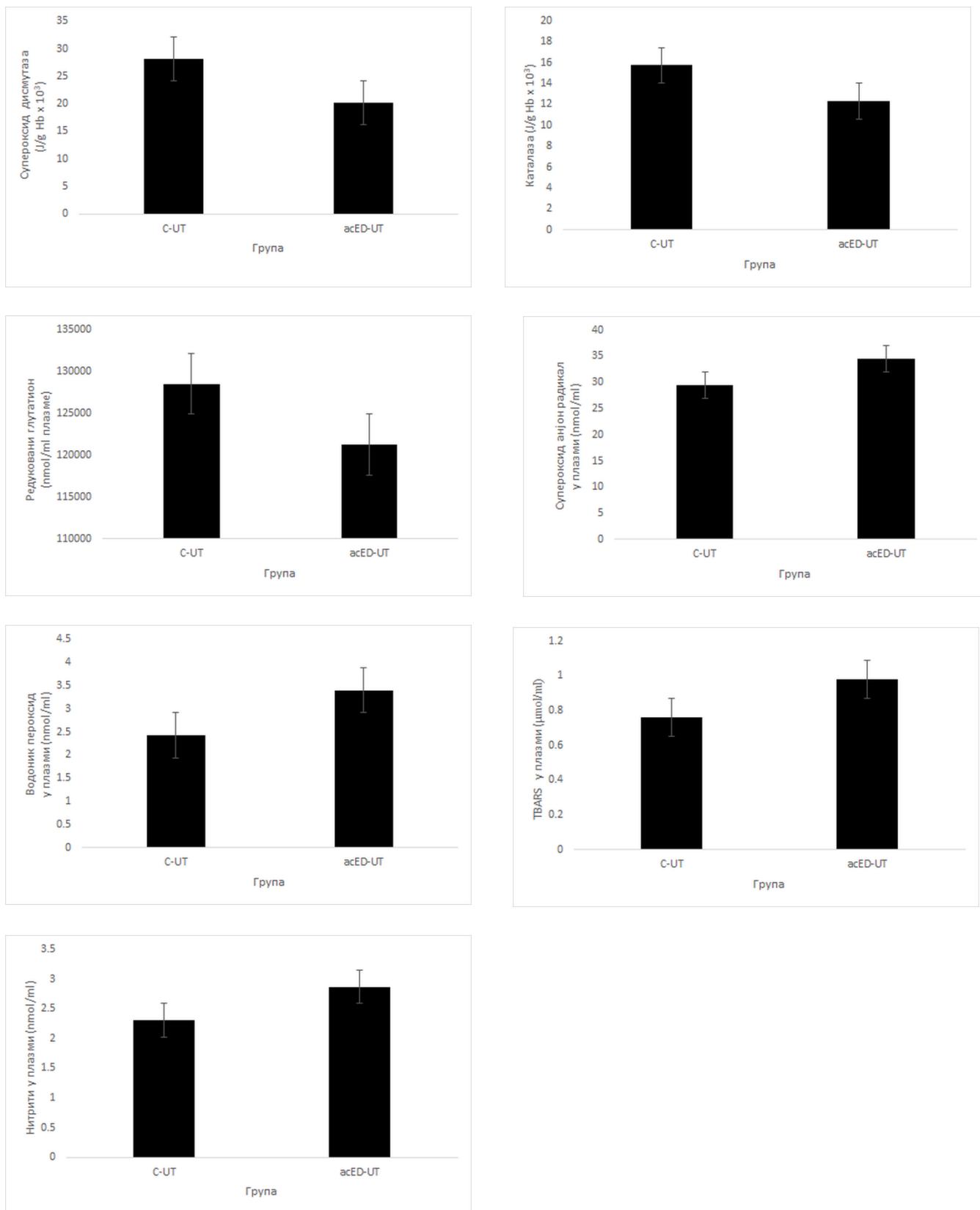
У поређењу са C-UT групом, у асED-UT групи забележено је следеће (График 11): на свим CPP, статистички значајно виши нивои O_2^- , H_2O_2 и NO (NO_2^-) ($p < 0.05$). Ниво TBARS био је значајно нижи при CPP 40 и 100 cmH_2O у асED-UT групи у поређењу са C-UT групом ($p < 0.05$), док на осталим CPP није било значајне разлике ($p > 0.05$).

График 11: Разлика у нивоима прооксиданата у коронарном ефлуенту ($X \pm SE$) након акутне администрације ЕП-а код неактивних животиња



Оксидативни стрес у крви

У поређењу са C-UT групом, у асED-UT забележено је следеће (График 12): статистички значајно нижи нивои SOD и CAT ($p < 0.05$) и нижи ниво GSH (без статистичке значајности) ($p > 0.05$); статистички значајно виши нивои O_2^- и H_2O_2 ($p < 0.05$) и виши нивои TBARS и NO (NO_2^-) (без статистичке значајности) ($p > 0.05$).

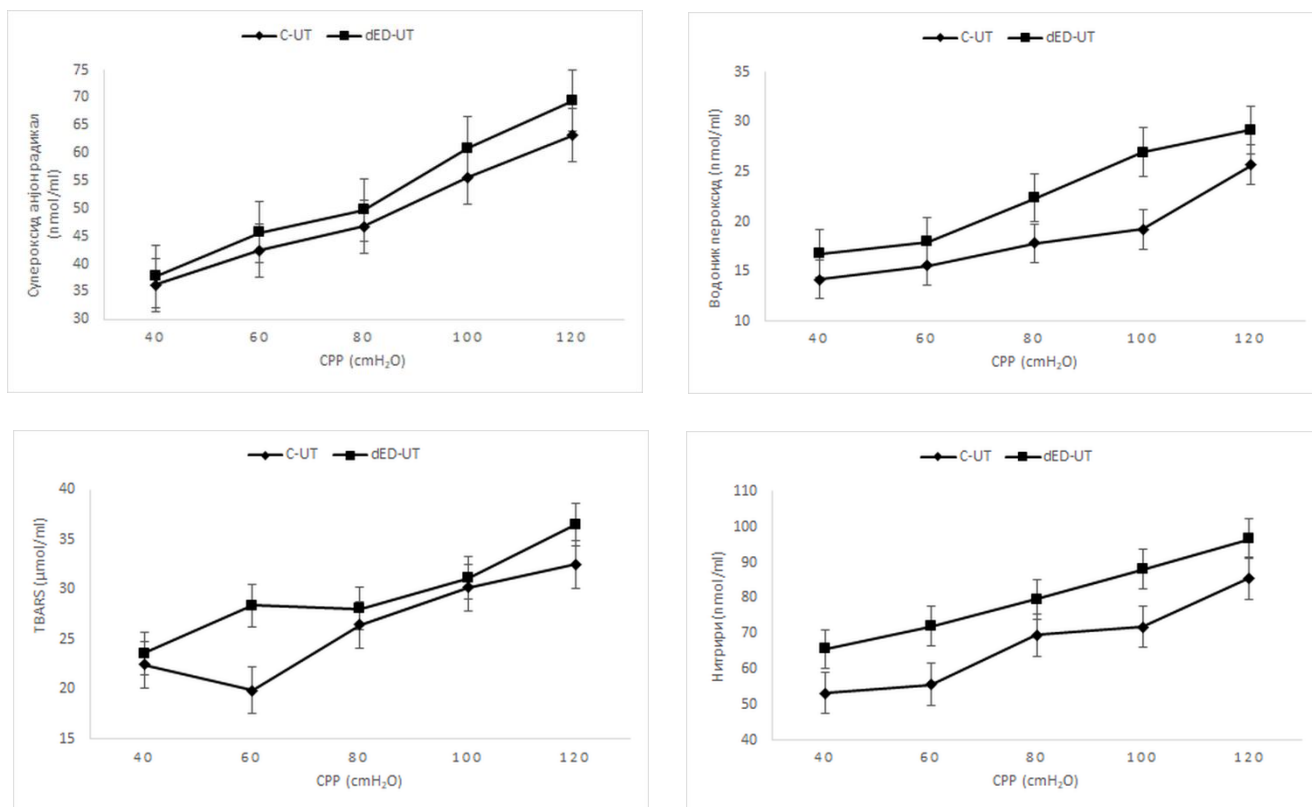
График 12: Разлика у нивоима антиоксиданата и прооксиданата у крви ($X \pm SE$) након акутне администрације ЕП-а код неактивних животиња

4.10.2 ЕФЕКТИ ДИРЕКТНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕП-А

Оксидативни стрес у коронарном ефлуенту

У поређењу са C-UT групом, у dED-UT групи забележено је следеће (График 13): на свим CPP, статистички значајно виши ниво NO (NO_2^-) ($p < 0.05$), виши ниво H_2O_2 (статистички значајно на CPP 80-100 cmH_2O) ($p < 0.05$), виши ниво TBARS (статистички значајно само на CPP 60 cmH_2O) ($p < 0.05$). Није било значајне разлике у нивоу O_2^- између ове две групе ($p > 0.05$).

График 13: Разлика у нивоима прооксиданата у коронарном ефлуенту ($X \pm SE$) након директне администрације ЕП-а код неактивних животиња



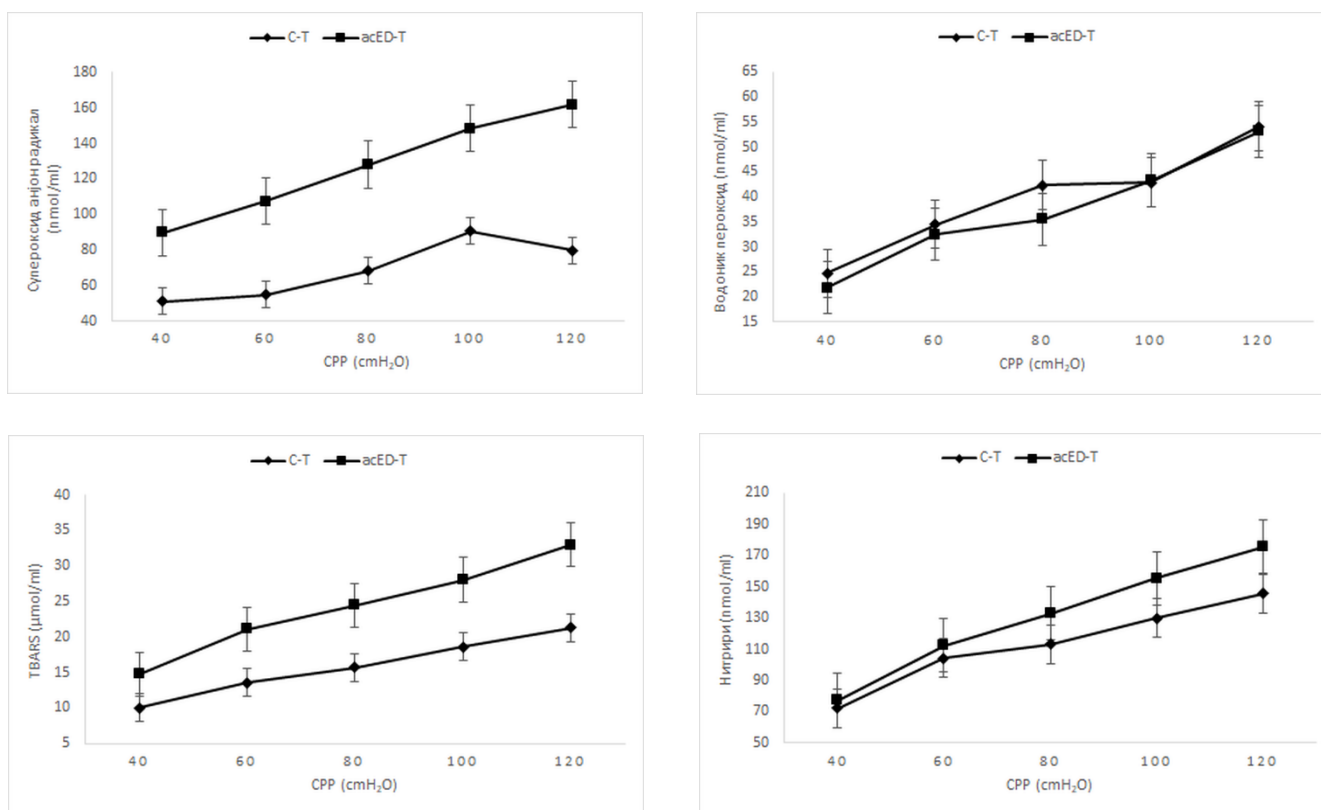
4.11 ЕФЕКТИ ЕП-а НА ОКСИДАТИВНИ СТРЕС У КОРОНАРНОМ ЕФЛУЕНТУ И КРВИ КОД АКТИВНИХ ЖИВОТИЊА

4.11.1 ЕФЕКТИ АКУТНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕП-А

Оксидативни стрес у коронарном ефлуенту

У поређењу са С-Т групом, у асЕД-Т групи забележено је следеће (График 14): на свим CPP, статистички значајно виши ниво ТВАРS ($p < 0.05$), виши нивои $O_2^{\cdot -}$ и NO ($NO_2^{\cdot -}$) и нижи ниво H_2O_2 (без статистичке значајности) ($p > 0.05$).

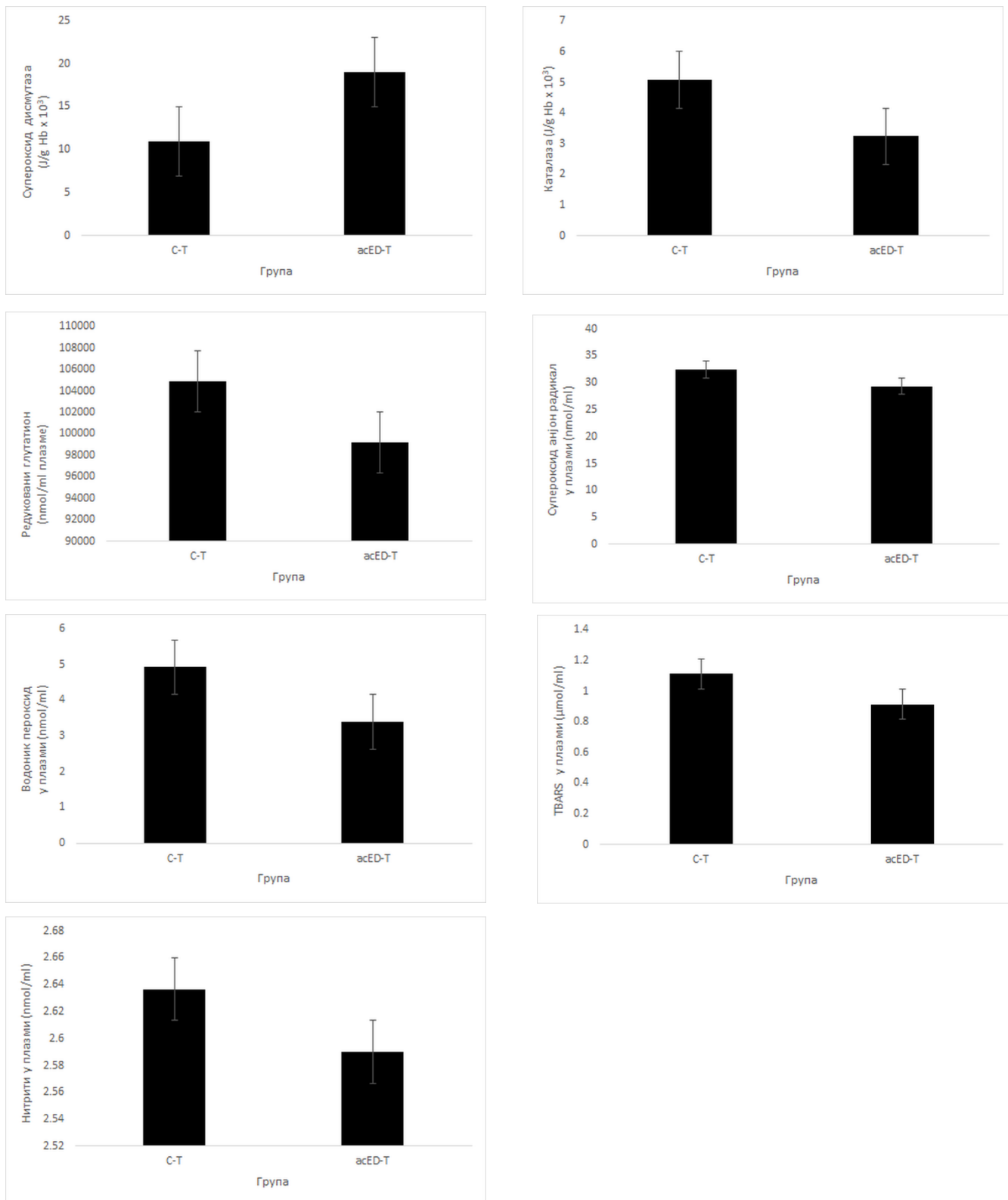
График 14: Разлика у нивоима прооксиданата у коронарном ефлуенту ($X \pm SE$) након акутне администрације ЕП-а код активних животиња



Оксидативни стрес у крви

У поређењу са С-Т групом, у асЕД-Т групи забележено је следеће (График 15): виши ниво SOD и нижи нивои CAT и GSH, без статистичке значајности ($p > 0.05$); статистички значајно нижи нивои H_2O_2 и ТВАРS ($p < 0.05$), и нижи нивои $O_2^{\cdot -}$ и NO ($NO_2^{\cdot -}$) (без статистичке значајности) ($p > 0.05$).

График 15: Разлика у нивоима антиоксиданата и прооксиданата у крви ($X \pm SE$) након акутне администрације ЕП-а код активних животиња

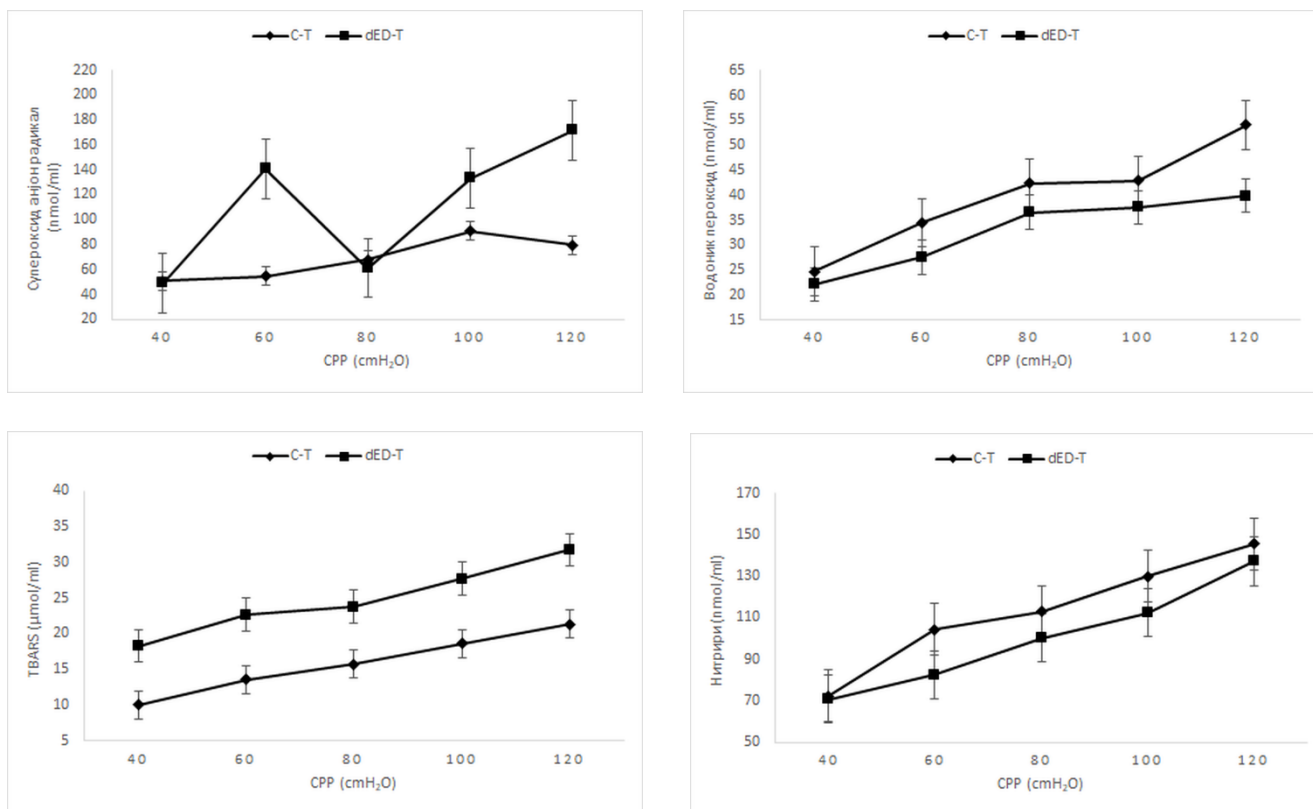


4.11.2 ЕФЕКТИ ДИРЕКТНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕП-А

Оксидативни стрес у коронарном ефлуенту

У поређењу са С-Т групом, у dED-Т групи забележено је следеће (График 16): на свим CPP, статистички значајно виши ниво TBARS ($p < 0.05$), нижи ниво H_2O_2 (статистички значајно само на CPP 120 cmH₂O) ($p < 0.05$) и нижи ниво NO (NO_2^-) (без статистичке значајности) ($p > 0.05$). Није било значајне разлике у нивоу O_2^- између ове две групе ($p > 0.05$).

График 16: Разлика у нивоима прооксиданата у коронарном ефлуенту ($X \pm SE$) након директне администрације ЕП-а код активних животиња



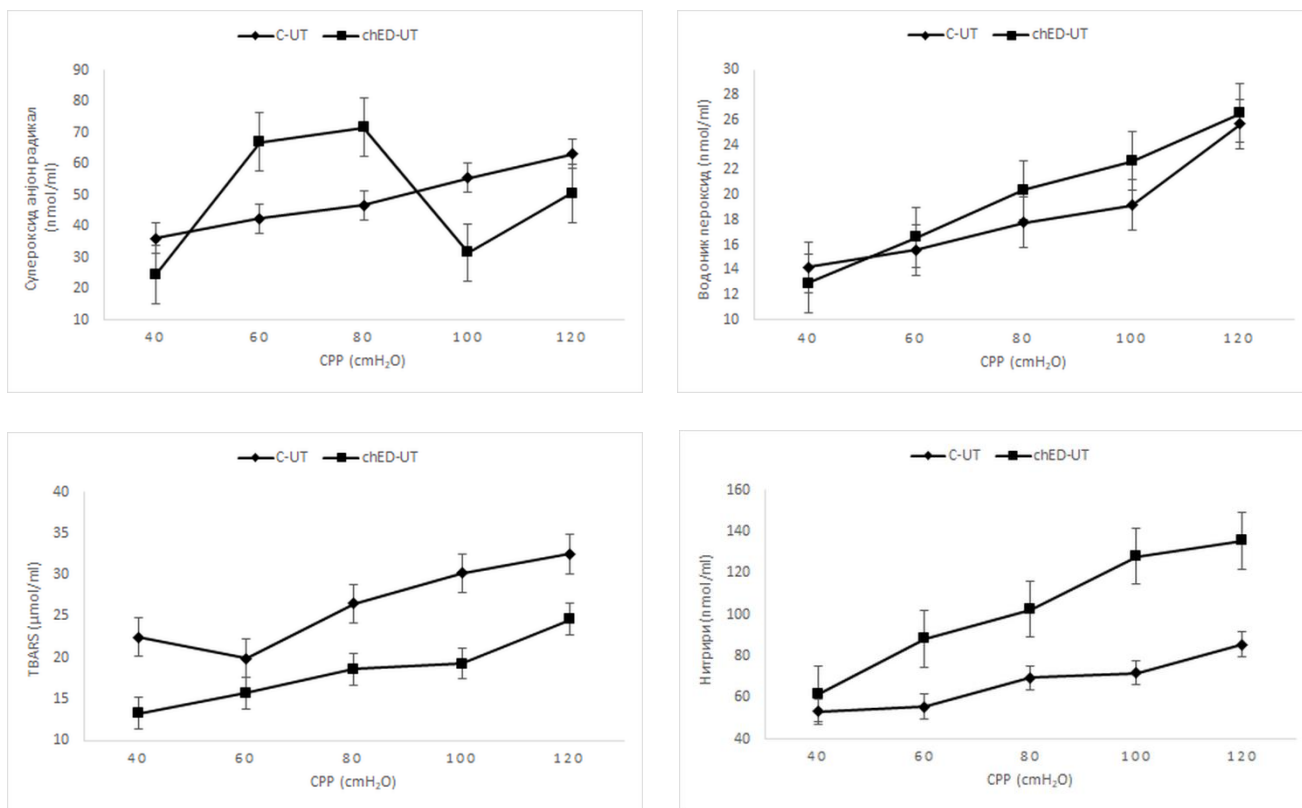
4.12 ЕФЕКТИ ХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕП-А НА ОКСИДАТИВНИ СТРЕС У КОРОНАРНОМ ЕФЛУЕНТУ И КРВИ КОД НЕАКТИВНИХ ЖИВОТИЊА

Оксидативни стрес у коронарном ефлуенту

У поређењу са С-УТ групом, у chED-УТ групи забележено је следеће (График 17): на свим CPP, виши ниво NO (NO_2^-) (статистички значајно на 60 и 100 cmH₂O) ($p < 0.05$),

нижи ниво TBARS (статистички значајно на 80-100 cmH₂O) ($p < 0.05$). Није било значајне разлике у нивоу O₂⁻ између ове две групе ($p > 0.05$). Ниво H₂O₂ био је значајно виши на CPP 80 cmH₂O у chED-UT групи у поређењу са C-UT групом ($p < 0.05$), док на осталим CPP није било значајне разлике ($p > 0.05$).

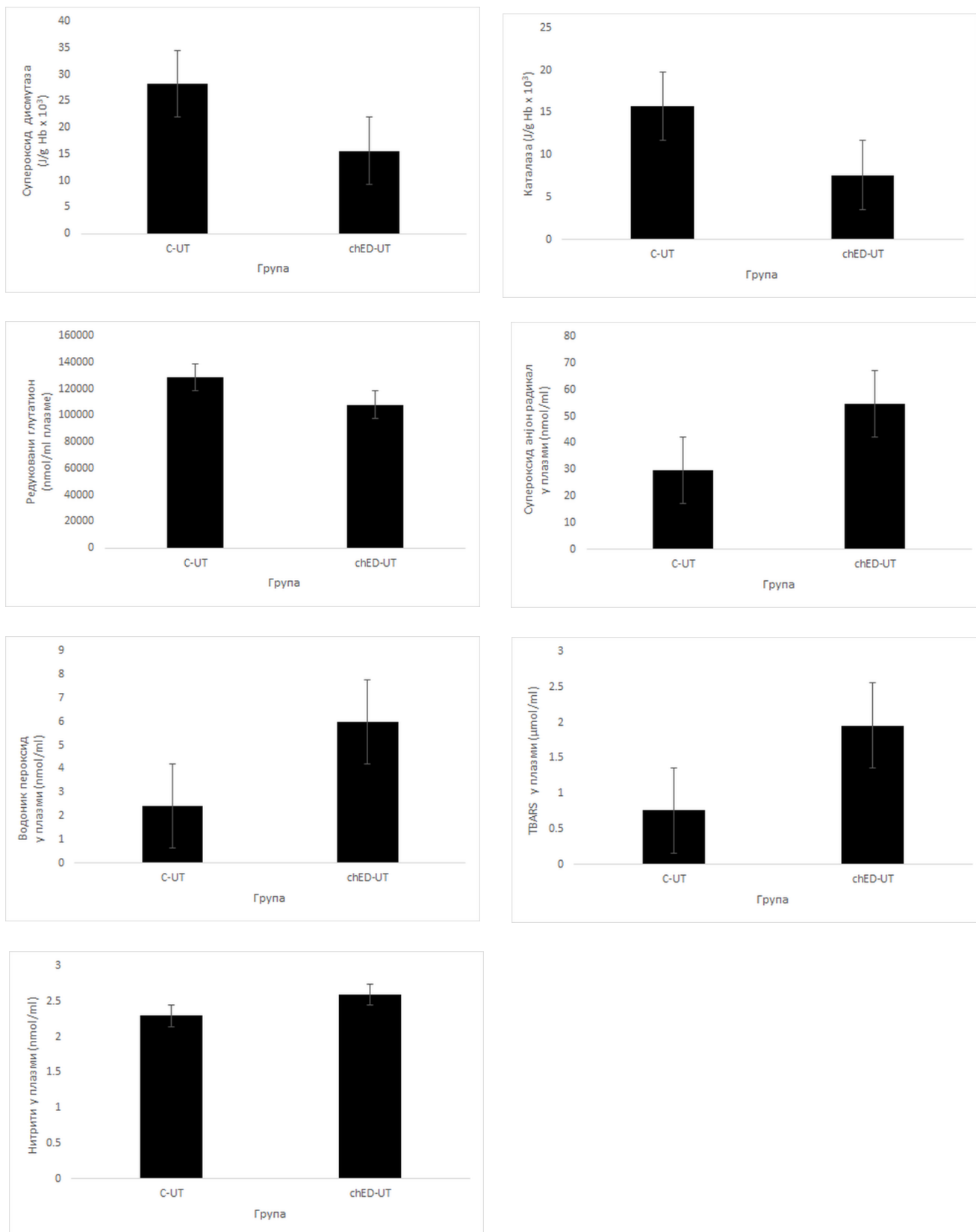
График 17: Разлика у нивоима прооксиданата у коронарном ефленту (X±SE) након хроничне администрације ЕП-а код неактивних животиња



Оксидативни стрес у крви

У поређењу са C-UT групом, у chED-UT групи забележено је следеће (График 18): статистички значајно нижи нивои SOD, CAT и GSH ($p < 0.05$); статистички значајно виши нивои O₂⁻, H₂O₂, TBARS ($p < 0.05$) и виши ниво NO (NO₂⁻), али без статистичке значајности ($p > 0.05$).

График 18: Разлика у нивоима антиоксиданата и прооксиданата у крви ($X \pm SE$) након хроничне администрације ЕП-а код неактивних животиња

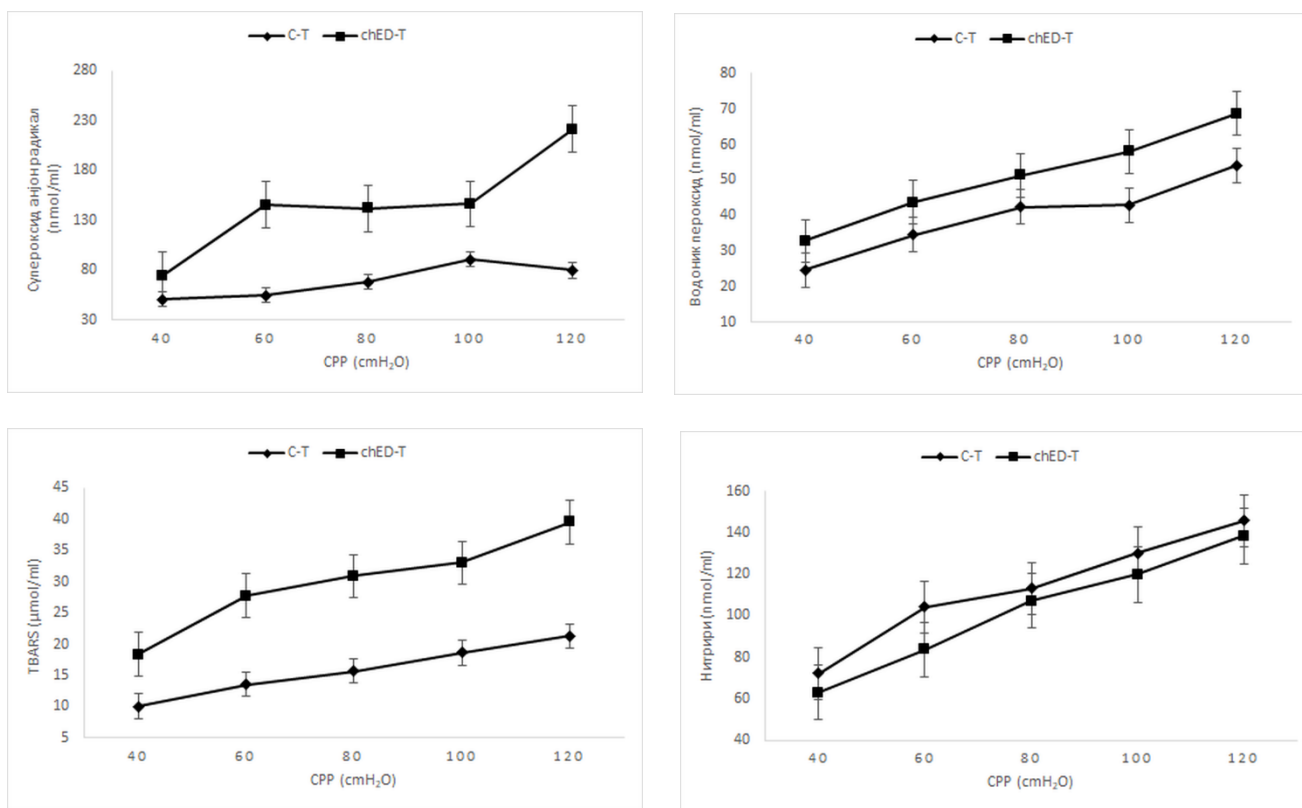


4.13 ЕФЕКТИ ХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕП-А НА ОКСИДАТИВНИ СТРЕС У КОРОНАРНОМ ЕФЛУЕНТУ И КРВИ КОД АКТИВНИХ ЖИВОТИЊА

Оксидативни стрес у коронарном ефлуенту

У поређењу са С-Т групом, у chED-T групи забележено је следеће (График 19): на свим CPP, статистички значајно виши ниво TBARS ($p < 0.05$), виши ниво O_2^- (статистички значајно само на CPP 60- 80 и 120 cmH_2O) ($p < 0.05$), виши ниво H_2O_2 (статистички значајно само на CPP 60 cmH_2O) ($p < 0.05$), нижи ниво NO (NO_2^-) (без статистичке значајности) ($p > 0.05$).

График 19: Разлика у нивоима прооксиданата у коронарном ефлуенту ($X \pm SE$) након хроничне администрације ЕП-а код активних животиња

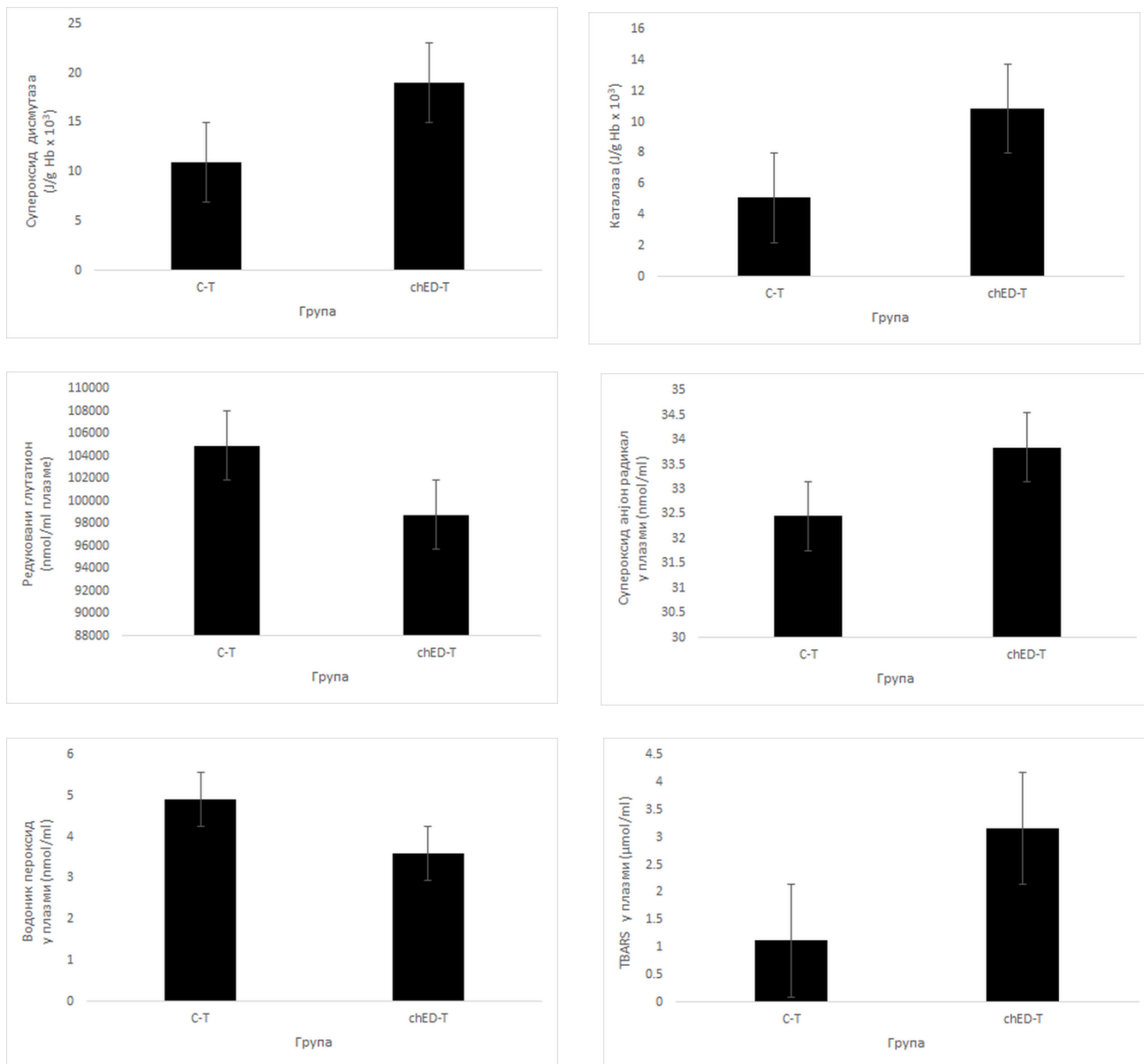


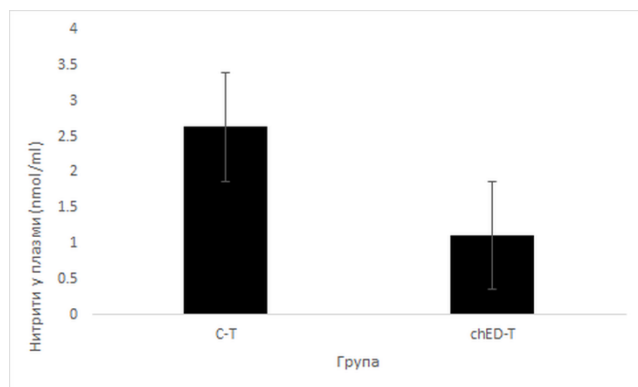
Оксидативни стрес у крви

У поређењу са С-Т групом, у chED-T групи забележено је следеће (График 20): статистички значајно виши нивои SOD и CAT ($p < 0.05$) и статистички значајно нижи ниво GSH ($p < 0.05$); статистички значајно виши ниво TBARS ($p < 0.05$), виши ниво O_2^-

(без статистичке значајности) ($p > 0.05$) и статистички значајно нижи нивои H_2O_2 и NO (NO_2^-)($p < 0.05$).

График 20: Разлика у нивоима антиоксиданата и прооксиданата у крви ($X \pm SE$) након хроничне администрације ЕП-а код активних животиња





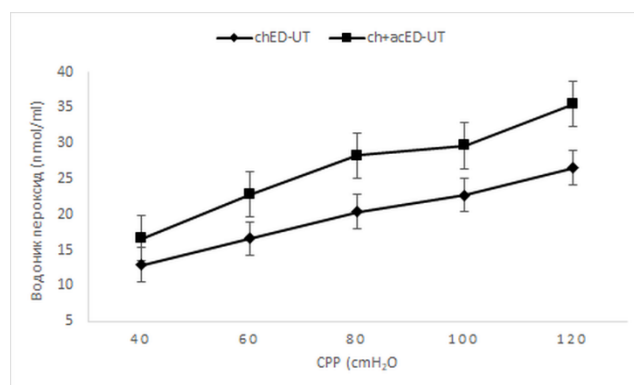
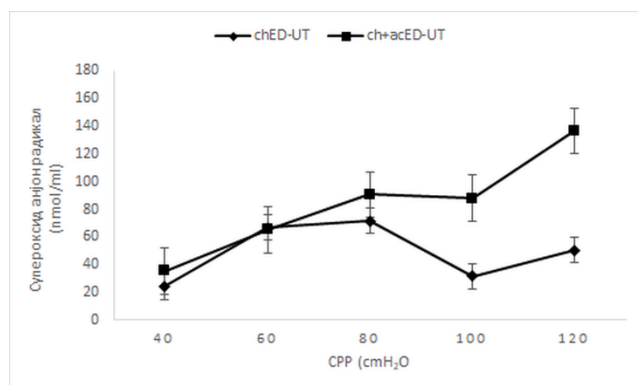
4.14 ЕФЕКТИ ЕП-А НА ОКСИДАТИВНИ СТРЕС У КОРОНАРНОМ ЕФЛУЕНТУ И КРВИ КОД НЕАКТИВНИХ ЖИВОТИЊА КОЈЕ СУ ХРОНИЧНО КОНЗУМИРАЛЕ ЕП-А

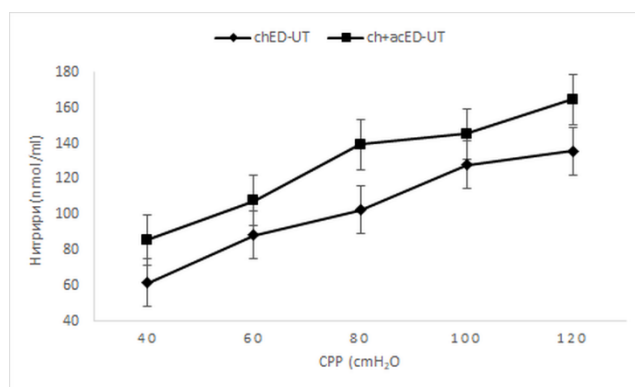
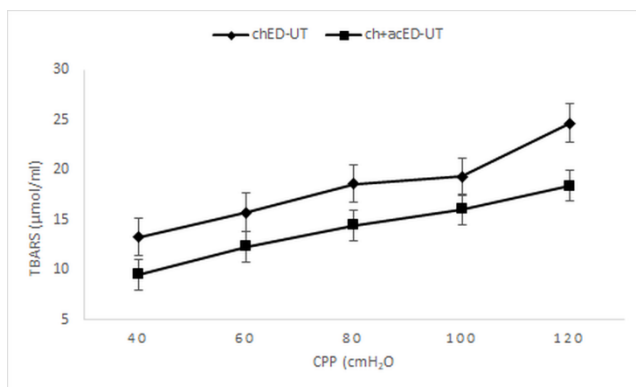
4.14.1 ЕФЕКТИ АКУТНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕП-А

Оксидативни стрес у коронарном ефлуенту

У поређењу са chED-UT групом, у ch+acED-UT групи забележено је следеће (График 21): на свим CPP, виши ниво H_2O_2 (статистички значајно на CPP 80-120 cmH_2O) ($p < 0.05$), виши ниво NO (NO_2^-) (без статистичке значајности) ($p > 0.05$) и нижи ниво TBARS (без статистичке значајности) ($p > 0.05$). Није било значајне разлике у нивоу O_2^- између ове две групе ($p > 0.05$).

График 21: Разлика у нивоима прооксиданата у коронарном ефлуенту ($X \pm SE$) након акутне администрације ЕП-а код неактивних животиња које су хронично конзумирала ЕП-а

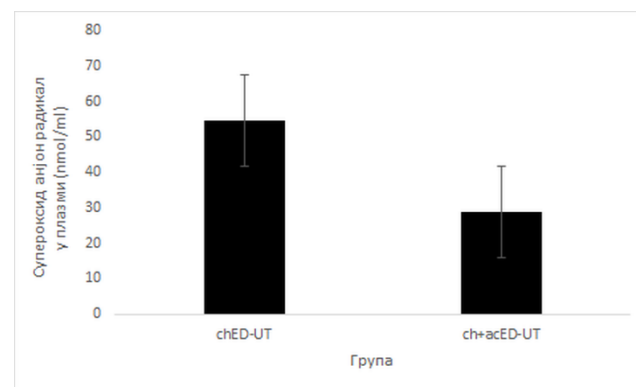
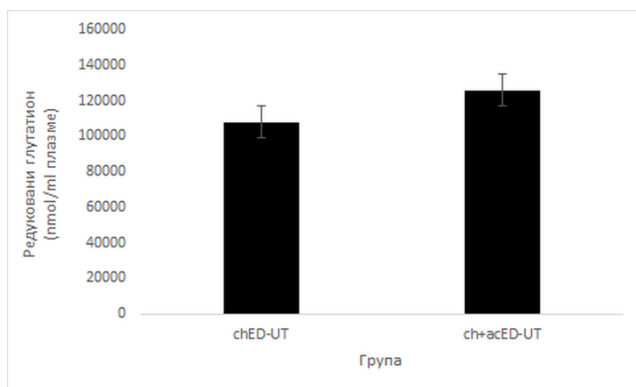
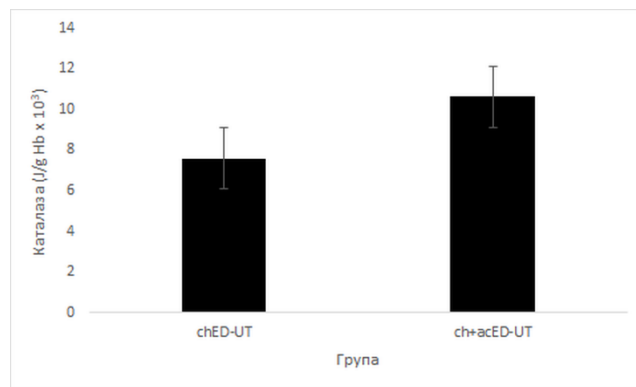
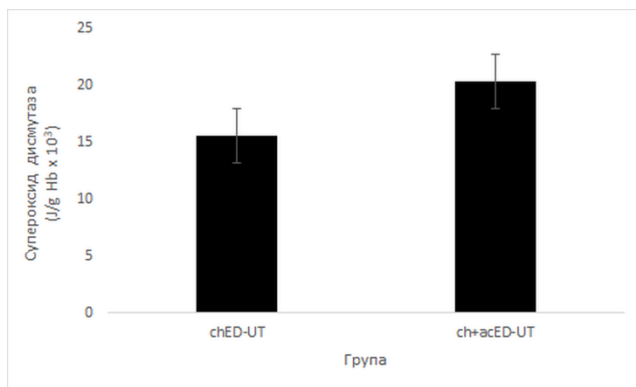


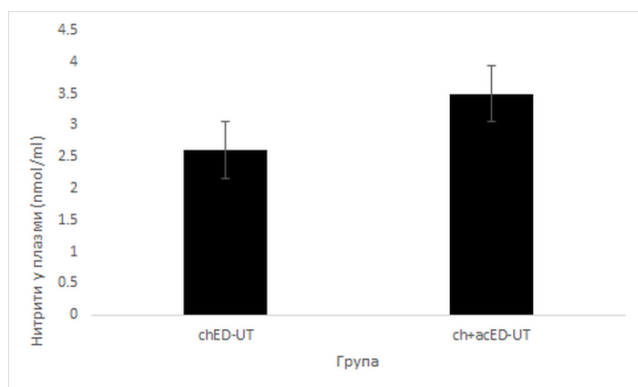
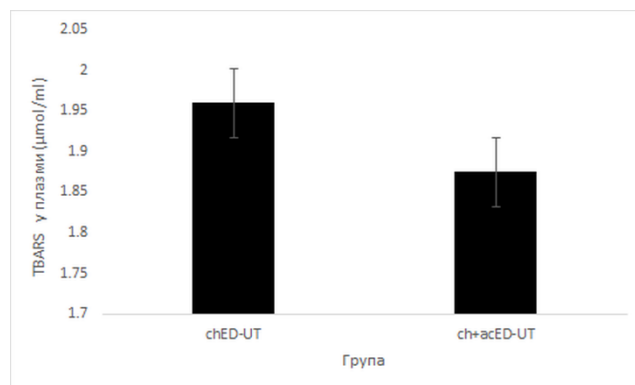
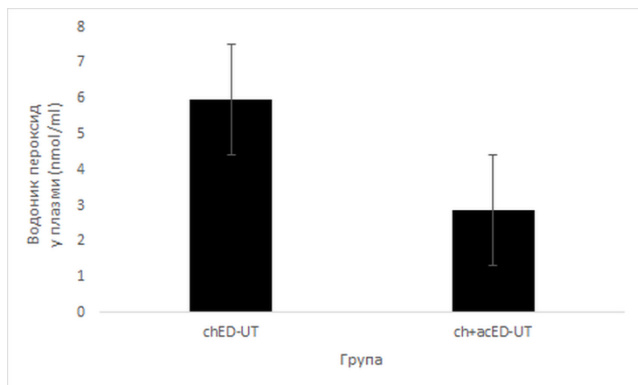


Оксидативни стрес у крви

У поређењу са chED-UT групом, у ch+acED-UT групи забележено је следеће (График 22): статистички значајно виши нивои CAT и GSH ($p < 0.05$), виши ниво SOD (без статистичке значајности) ($p > 0.05$); статистички значајно виши ниво NO (NO_2^-), статистички значајно нижи нивои O_2^- и H_2O_2 ($p < 0.05$) и нижи ниво TBARS (без статистичке значајности) ($p > 0.05$).

График 22: Разлика у нивоима антиоксиданата и прооксиданата у крви ($X \pm SE$) након акутне администрације ЕП-а код неактивних животиња које су хронично конзумирала ЕП-а



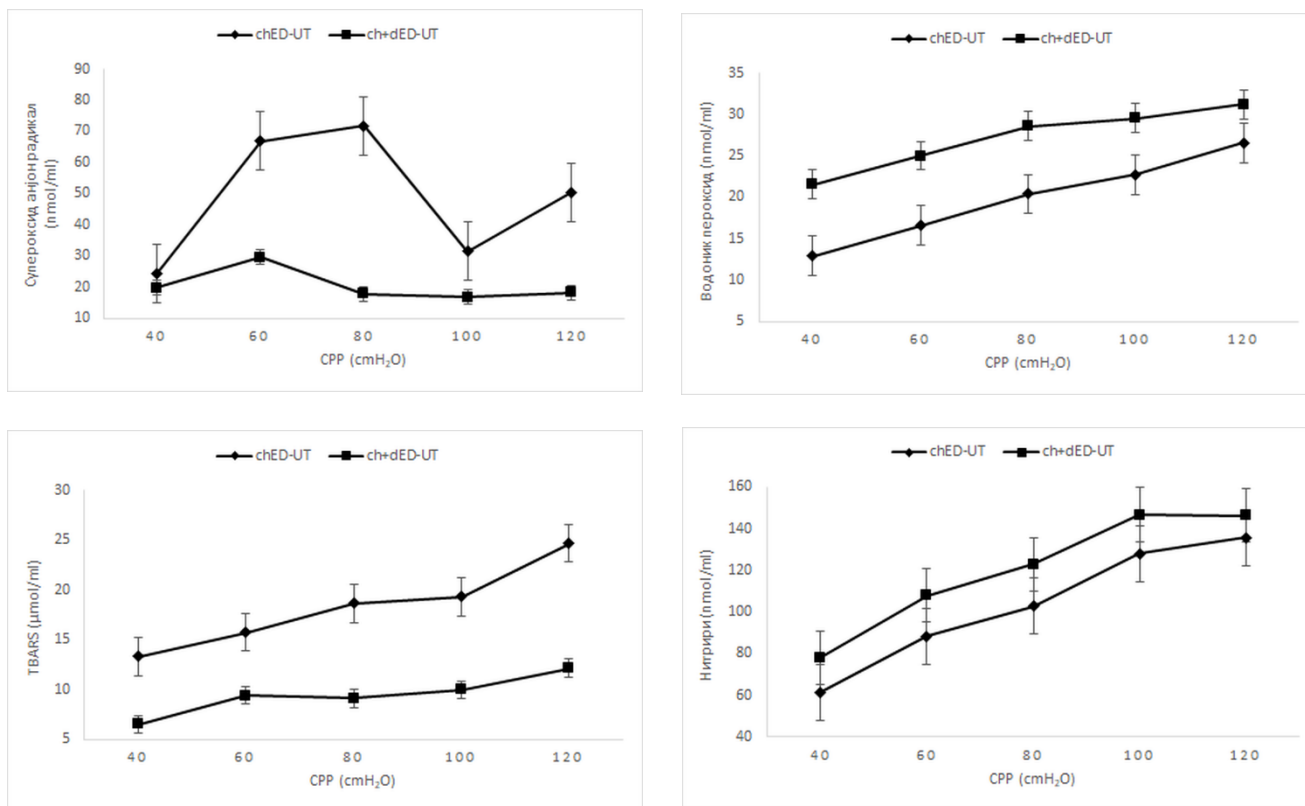


4.14.2 ЕФЕКТИ ДИРЕКТНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕП-А

Оксидативни стрес у коронарном ефлуенту

У поређењу са chED-UT групом, у ch+dED-UT групи забележено је следеће (График 23): на свим CPP, виши ниво H_2O_2 (статистички значајно на CPP 40-60 cmH₂O) ($p < 0.05$), виши ниво NO (NO_2^-) (без статистичке значајности) ($p > 0.05$), нижи ниво TBARS (статистички значајно само на CPP 60-120 cmH₂O) ($p < 0.05$) и нижи ниво O_2^- (без статистичке значајности) ($p > 0.05$).

График 23: Разлика у нивоима прооксиданата у коронарном ефлуенту ($X \pm SE$) након директне администрације ЕП-а код неактивних животиња које су хронично конзумирала ЕП-а



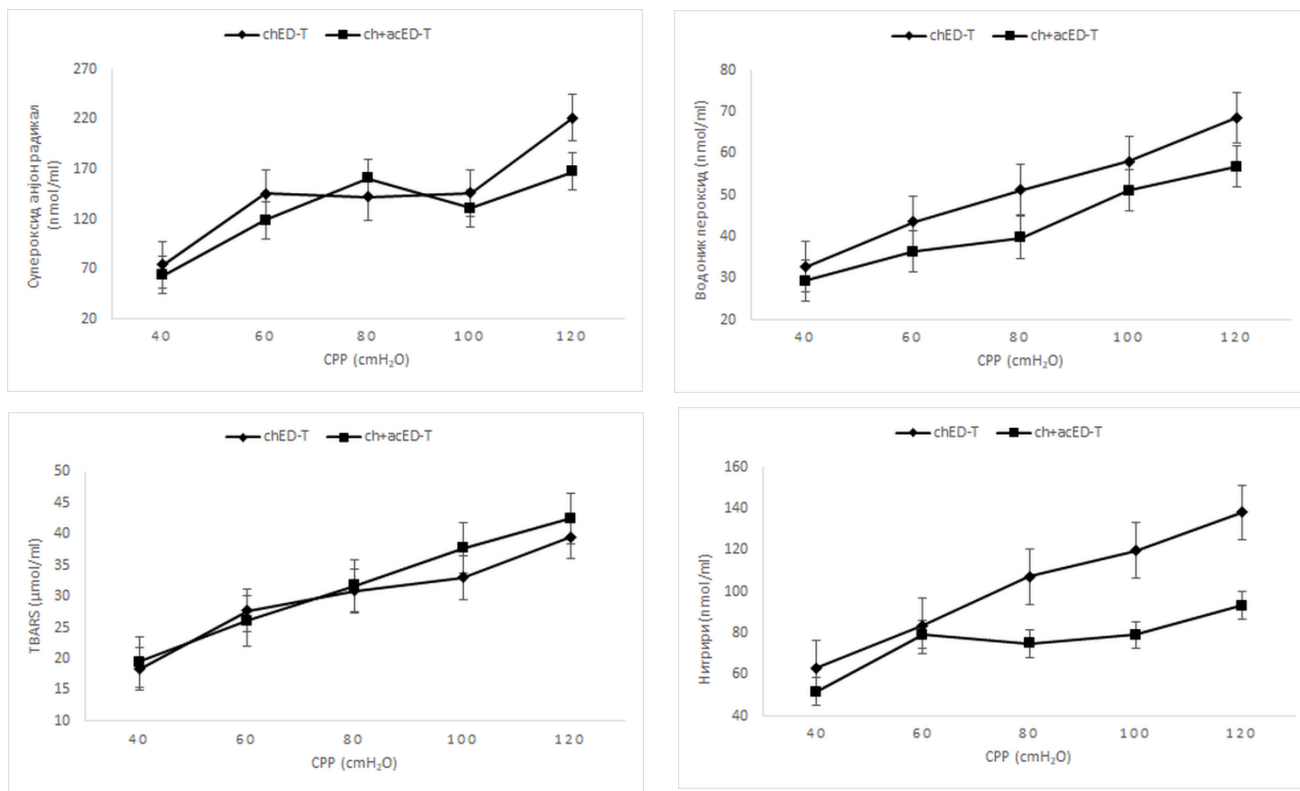
4.15 ЕФЕКТИ ЕП-А НА ОКСИДАТИВНИ СТРЕС У КОРОНАРНОМ ЕФЛУЕНТУ И КРВИ КОД АКТИВНИХ ЖИВОТИЊА КОЈЕ СУ ХРОНИЧНО КОНЗУМИРАЛЕ ЕП-А

4.15.1 ЕФЕКТИ АКУТНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕП-А

Оксидативни стрес у коронарном ефлуенту

У поређењу са chED-T групом, у ch+acED-T групи забележено је следеће (График 24): на свим CPP, нижи ниво NO (NO_2^-) (статистички значајно на CPP 80-120 cmH₂O) ($p < 0.05$), нижи ниво H_2O_2 и виши ниво TBARS (без статистичке значајности) ($p > 0.05$). Није било значајне разлике у нивоу O_2^- између ове две групе ($p > 0.05$).

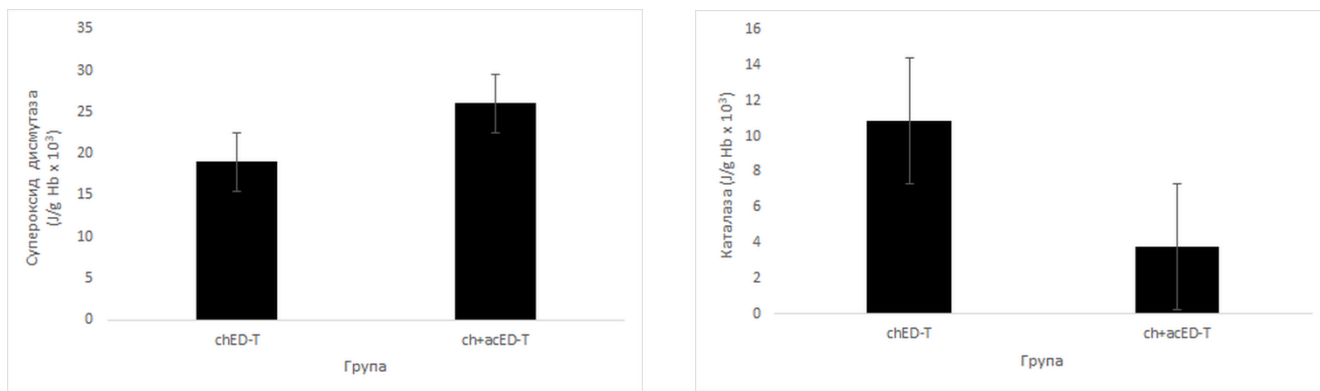
График 24: Разлика у нивоима прооксиданата у коронарном ефленту ($X \pm SE$) након акутне администрације ЕП-а код активних животиња које су хронично конзумирала ЕП-а

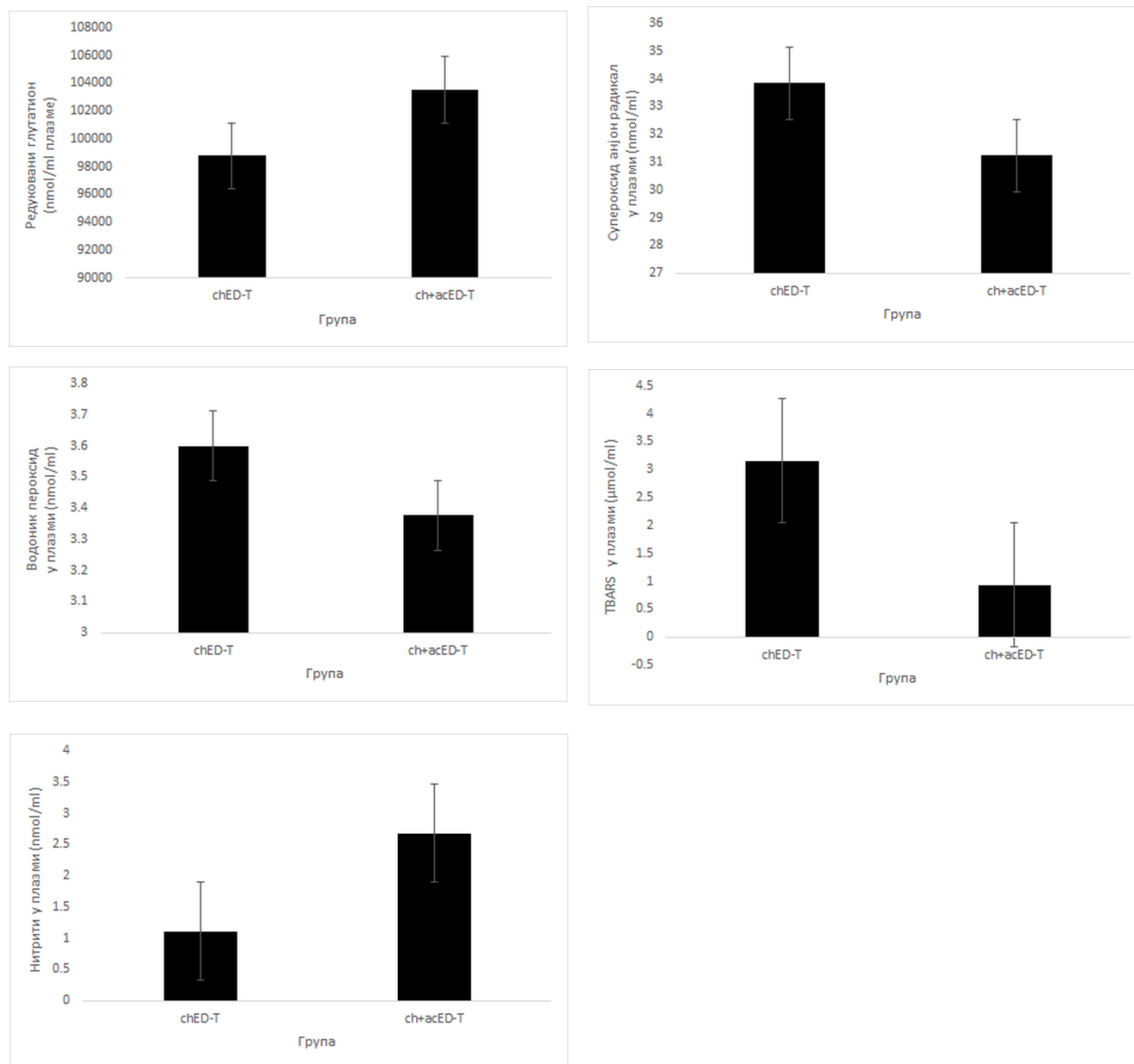


Оксидативни стрес у крви

У поређењу са chED-T групом, у ch+acED-T групи забележено је следеће (График 25): статистички значајно нижи ниво CAT ($p < 0.05$) и виши нивои SOD и GSH (без статистичке значајности) ($p > 0.05$); статистички значајно виши ниво NO (NO_2^-) ($p < 0.05$), статистички значајно нижи ниво TBARS ($p < 0.05$) и нижи нивои O_2^- и H_2O_2 (без статистичке значајности) ($p > 0.05$).

График 25: Разлика у нивоима антиоксиданата и прооксиданата у крви ($X \pm SE$) након акутне администрације ЕП-а код активних животиња које су хронично конзумирала ЕП-а



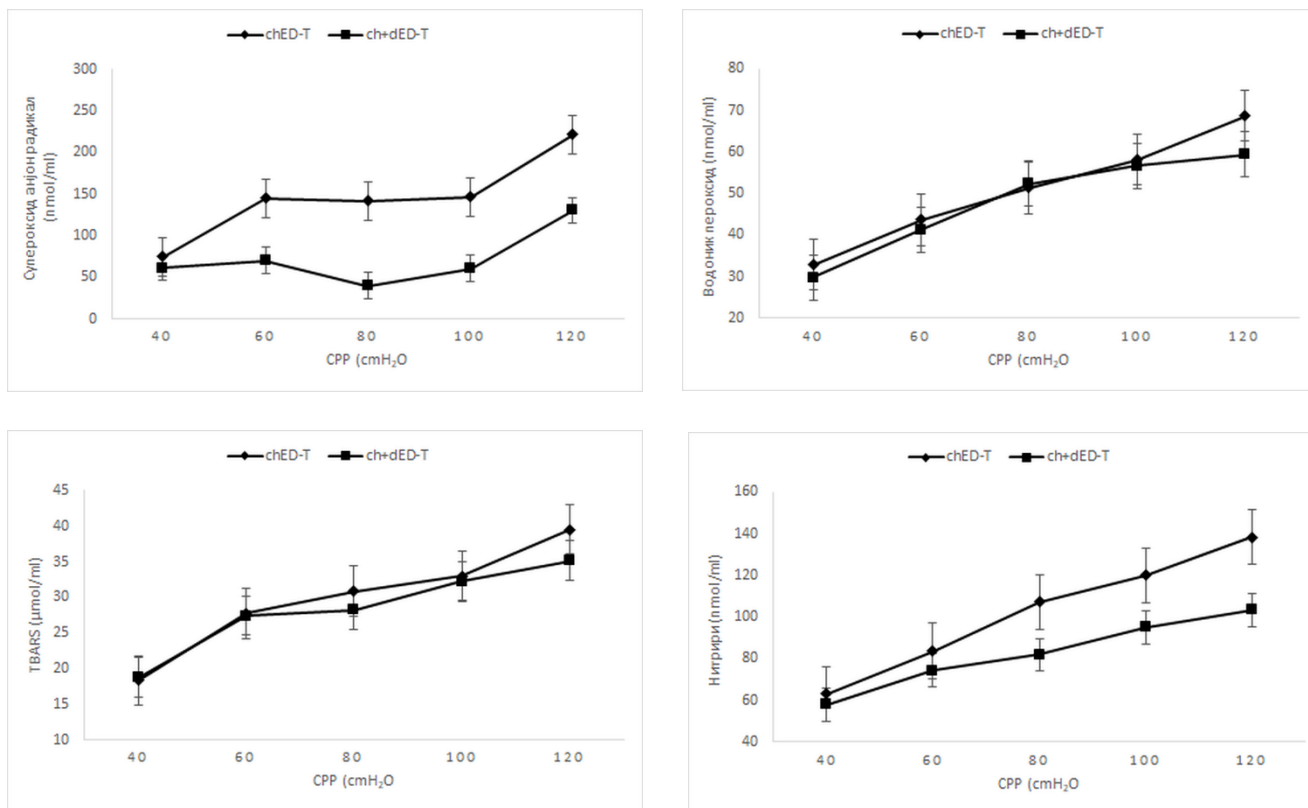


4.15.2 ЕФЕКТИ ДИРЕКТНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕП-А

Оксидативни стрес у коронарном ефлуенту

У поређењу са chED-T групом, у ch+dED-T групи забележено је следеће (График 26): на свим CPP, нижи ниво $O_2^{\cdot -}$ (статистички значајно само на CPP 80 cmH₂O) ($p < 0.05$) и нижи ниво $\cdot NO$ (NO_2^-) (без статистичке значајности) ($p > 0.05$). Није било значајне разлике у нивоу H_2O_2 и TBARS између ове две групе ($p > 0.05$).

График 26: Разлика у нивоима прооксиданата у коронарном ефлуенту ($X \pm SE$) након директне администрације ЕП-а код активних животиња које су хронично конзумирале ЕП-а



IV

ДИСКУСИЈА

5.1 ЕФЕКТИ ЕНЕРГЕТСКОГ ПИЋА НА КАРДИОДИНАМИКУ

Утицај ЕП-а на кардиоваскуларни систем је актуелна истраживачка тема, а међу публокованим резултатима постоје значајне дискрепанце. У досадашњим истраживањима процењиван је утицај ЕП-а на хемодинамске параметре и електрофизиолошке промене (*Hajsadeghi et al., 2016*). Енергетска пића повећавају потребу миокарда за кисеоником, односно доприносе већем кардиоваскуларном оптерећењу што се може повећати током изложености стресу (*Grasser et al., 2015*).

Код нетренираних животиња, запажен је негативан утицај ЕП-а на срчану функцију, који је испољен различито у зависности да ли је администрација ЕП-а била акутна, хронична или директна. Резултати показују да су нетренирани пацови који су конзумирали акутно RB имали значајно нижи ниво $dp/dt \min$, а више нивое DLVP и CF у поређењу са контролном групом. Исти утицај на кардиодинамику испољен је и након хроничне примене RB-а код нетренираних животиња, што указује на смањење дијстолне функције леве коморе код нетренираних конзумера ЕП-а, обзиром на комбиновани ефекат смањене стопе релаксације миокарда и повишеног нивоа DLVP. Познато је да је смањена релаксација миокарда може бити праћена повећањем дебљине зида миокарда (*Ha & Oh, 2009*). Обзиром да је коронарна циркулација јединствена по томе што се највећи део коронарног протока одвија у дијастоли, виши ниво дијастолног крвног притиска је у позитивној корелацији са (коллатералним) коронарним протоком (*Shu et al., 2013*), што наши резултати потврђују. Повећање дијастолног и средњег артеријског притиска, без утицаја на систолни притисак након акутне конзумације ЕП-а забележено је и код неспортиста у хуманим студијама (*Brothers et al., 2017, Cavka et al., 2015*). Резултати хуманих студија су неконзистентни у погледу утицаја ЕП-а на крвни притисак. Код неспортиста показано је и да акутна примена ЕП-а утиче на значајно повећање артеријског притиска (*Svatikova et al., 2015, Steinke et al., 2009, Worthley et al., 2010, Elitok et al., 2015*), а постоје и истраживања у којима није показан утицај ЕП-а на крвни притисак (*Alford et al., 2001, Ragsdale et al., 2010, Hajsadeghi, 2016*).

Администрација ЕП-а директно у срце код нетренираних животиња, утицала је у овом случају на значајно повећање нивоа SLVP и смањење CF у односу на контролну групу. Као последица хипертензије, долази до повећања afterload-а (накнадног

оптерећења) и током времена срчана мускулатура хипертрофише. Услед повећања мишићне масе повећава се потреба миокарда за кисеоником и смањује се коронарни проток услед повећаног вентрикуларног притиска (*Rehman & Rehman, 2019*). Код младих здравих људи акутно дејство ЕП-а (1 сат након конзумације) утицало је на повећање функције миокарда леве и десне коморе, односно испољило је позитивно инотропно дејство (*Menci et al., 2013*).

За разлику од нетренираних животиња, у групи тренираних пацова који су акутно конзумирали RB забележени су значајно виши ниво CF и параметара кардиодинамике ($dp/dt \max$, $dp/dt \min$, SLVP, HR), изузев нижег нивоа DLVP у поређењу са контролном групом. Резултати истраживања у коме су испитаници били спортисти, показали су повећање контрактности леве преткоморе спортиста након конзумације RB-а у периоду опоравка након физичког вежбања (*Baum & Weiß, 2001*). Исти ефекат као и након акутне примене, забележен је и групи тренираних пацова који су хронично конзумирали RB, са једином разликом што виши ниво $dp/dt \max$ није достигао статистичку значајност у поређењу са контролном групом. Код тренираних конзумера RB-а повећана инотропност, лузитропност и хронотропност, сугеришу да акутна и хронична конзумације ЕП-а делују у смислу побољшања кардиодинамских параметара. Физички тренинг је најважнији физиолошки подстицај за повећање потреба миокарда за кисеоником, односно за повећање коронарног протока, што даље имплицира повећање минутног волумена и резултира повећањем срчане фреквенце, контрактилности миокарда и вентрикуларног рада (*Duncker & Bache, 2008*). Резултати истраживања *Lockwood* и сарадника, сугеришу да примена ЕП-а може значајно да побољша физиолошке адаптације везане за физички тренинг. Код седентарних мушкарца примена комерцијално доступног ЕП-а 15 минута пре почетка физичког вежбања током 10 недеља, утицала је значајно на побољшање структуре тела (смањење процента телесних масти), као и на побољшање кардиореспираторног фитнеса у поређењу само са вежбањем или само са конзумацијом ЕП-а (*Lockwood et al., 2010*).

Супротан ефекат имала је директна администрација RB -а у срце тренираних пацова. Забележено је смањење стопе контрактилности и релаксације, односно депресија срчане функције (значајно нижи ниво $dp/dt \max$, $dp/dt \min$, SLVP и DLVP) у групи животиња којима је апликован RB директно у срце у поређењу са контролном групом. На овом

моделу показано је да директан утицај ЕП-а на срце поништава беневитни ефекат редовног тренинга. Сличан ефекат директног дејства ЕП-а на срце примећен је и код хроничних конзумера. Трениране животиње које су хронично конзумирале RB, па им је и директно администриран RB у срце имале су значајно нижи ниво $dpdt_{max}$, $dpdt_{min}$, HR и SLVP у поређењу са тренираним животињама које су хронично конзумирале RB.

Код нетренираних животиња које су хронично конзумирале RB након акутне примене RB-а забележен је нижи ниво SLVP у поређењу са мечованим контролама (нетренираним животињама које су хронично конзумирале RB). Наведени ефекат сугерише да код нетренираних животиња хронична конзумација ЕП-а мења одговор на акутну конзумацију што може бити и услед смањене реактивности на састојке RB-а услед адаптације индуковане дневном конзумацијом. Међутим, наведена претпоставка није потврђена након директне примене RB-а код нетренираних животиња које су хронично конзумирале RB, обзиром да није забележена разлика у кардиодинамским параметрима у поређењу са мечованим контролама (нетренираним животињама које су хронично конзумирале RB). Такође, код тренираних животиња које су хронично конзумирале RB након акутне примене RB-а није забележена разлика у кардиодинамским параметрима у поређењу са мечованим контролама (тренираним животињама које су хронично конзумирале RB). За разлику од нетренираних, хронична конзумација ЕП-а код тренираних животиња није утицала на промену кардиоваскуларног одговора на акутну конзумацију.

Подаци из литературе су неконзистентни у погледу утицаја ЕП-а на HR. У нашем истраживању значајан утицај ЕП-а на HR испољен је само код животиња које су тренирале. Код нетренираних животиња није било утицаја ЕП-а на HR, што је забележено и код неспортиста (неиспољаване утицаја ЕП-а на HR) (Alford et al., 2001, Ragsdale et al., 2010, Worthley et al., 2010, Svatikova et al., 2015, Brothers et al., 2017), али такође је регистровано и повећање HR по утицајем ЕП-а (Alford et al., 2001, Steinke et al., 2009, Elitok et al., 2015), а чак и снижење (Hajsadeghi, 2016). Код младих здравих особа акутна конзумација ЕП-а проузроковала је значајно повећање HR у стању мировања, као и током и након вежбања умереног интензитета (Cavka et al., 2015). Наши резултати показују повећање нивоа HR након акутне и хроничне примене RB-а у поређењу са контролама, док

је директна апликација RB-а код хроничних тренираних конзумера имала за последицу нижу вредност срчане фреквенце у поређењу са контролама, што може бити и последица адаптације на ЕП-е.

Код људи, за хетерогеност резултата везаних за утицај ЕП-а на HR и крвни притисак и остале кардиодинамске параметре, могу бити одговорни и цитохроми р450 у јетри, посебно CYP1A2, важни за метаболизам кофеина у људском организму. Могуће је да полиморфизам CYP1A2 може да утиче на кардиоваскуларни одговор на ЕП-а (*Wassef et al., 2017*). Сугеришу се даља адекватно дизајнирана и контролисана истраживања ради испитивања повећане учесталости нежељених догађаја која се приписују конзумацији ЕП-а. Претпоставља се да већина здравих одраслих особа може конзумирати једну дозу ЕП-а без нежељених ефеката. Међутим, неке здраве одрасле особе могу имати генетску предиспозицију или осетљивост на њихове састојке што може довести до нежељених ефеката и након конзумирања само једне дозе (*Higgins et al., 2018*). С обзиром на популарност ЕП-а, комбинацију њихове потрошње и изложеност тренингу, као и пораст броја посета хитној служби у вези са њиховом потрошњом, важно је да се разјасне специфични физиолошки ефекти које ЕП-а остварују (*Higgins et al., 2017*).

5.2 ЕФЕКТИ ЕНЕРГЕТСКОГ ПИЋА НА ОКСИДАТИВНИ СТРЕС У ЕФЛУЕНТУ И КРВИ

Токсиколошки ризици конзумације ЕП-а и даље су непознати и представљају тему вредну проучавања. Обзиром да ЕП-а представљају комбинацију различитих фармаколошки активних супстанци, удруженост супстанци са сличним или супротним дејствима може антагонизовати, повећати или потенцирати њихова фармаколошка дејства, што би за последицу могло имати неочекиваних реакције. Хомеостаза у организму између осталог зависи од баланса антиоксидативне одбране и продукције прооксидативних врста. У вишку ROS и RNS, доводе до оштећења протеина, ДНК, липида и на тај начин утичу на све ћелијске функције. Важан антиоксидативни механизам одбране је дисмутација $O_2^{\cdot-}$, под утицајем SOD при чему се формира H_2O_2 и O_2 , као и трансформација H_2O_2 у H_2O помоћу GPx или у O_2 и H_2O помоћу CAT, што спречава формирање OH^{\cdot} (Valle et al., 2018). За правилну функцију GPx потребан је GSH који се користи као супстрат/кофактор (van Haafden et al., 2003).

У нашем истраживању нетренирани пацови који су конзумирали акутно RB имали су значајно више нивое прооксидативних параметара у ефлуенту ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 и $\cdot NO$), као и у плазми (значајно виши ниво $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_{2p}) у поређењу са контролном групом. Обзиром да је и ниво ендogene антиоксидативне заштите био значајно нижи код акутних нетренираних RB конзумера у поређењу са контролном групом (значајно нижи ниво SOD и CAT), добијени резултати сугеришу прооксидативни утицај ЕП-а. Прекомерни ниво $O_2^{\cdot-}$ може да ступи у реакцију са $\cdot NO$, што доводи до стварања изузетно токсичног $ONOO^{\cdot-}$ (Patel et al., 1999). У овој групи животиња CF је био очуван, што је у складу са повишеним $\cdot NO$ у ефлуенту. Код нетренираних животиња којима је директно администриран RB, забележен је виши ниво прооксидативних параметара у поређењу са контролном групом. У коронарном ефлуенту, слично као и код акутне примене забележени су значајно виши нивои прооксидативних параметара, у овом случају H_2O_2 и TBARS, а такође и ниво $\cdot NO$ је био виши.

У групи тренираних пацова који су акутно конзумирали RB забележен је значајно виши ниво TBARS у ефлуенту у поређењу са контролном групом. Међутим, супротно тренирани пацови су након акутне конзумације у крви имали нижи $H_2O_2_p$ и $TBARS_p$ у поређењу са контролном групом. Обзиром на повећан рад срца након акутне конзумације ЕП-а, очекивало се повећање нивоа оксидативних параметара пореклом из ендокарда леве коморе и ендотела коронарне циркулације. Адаптивни процес као последица хроничног физичког тренинга има могућност да заштити трениране индивидуе и спречи оксидативно оштећење у већини ситуација након излагања тренингу. Неуспех у откривању било какве промене нивоа липидне пероксидације или било које врсте оштећења, може сугерисати да је дошло до компензаторних промена у антиоксидативном систему тренираних особа као што је усходну регулација ензима GPx и SOD у скелетним мишићима и еритроцитима, док су у погледу CAT, резултати у супротности (*Schneider & Oliveira, 2004*). Наши резултати показују да није било значајне разлике у нивоу антиоксиданата између ове две групе, а може се претпоставити да је акутна конзумација ЕП-а утицала на смањење оксидативног стреса изазваног вежбањем у крви, што се манифестовало побољшањем редокс статуса. Слично као код акутног дејства, у групи тренираних пацова којима је директно администриран RB забележени су виши ниво TBARS (мада и нижи ниво H_2O_2 , али само при CPP 120) у ефлуенту у поређењу са контролном групом, што иде у прилог прооксидативном акутном утицају RB-а.

Док је у групи нетренираних пацова који су хронично конзумирали RB у ефлуенту забележен виши ниво NO и нижи ниво TBARS у поређењу са контролном групом, што може означити повољан утицај ЕП-а на редокс статус нетренираних конзумера обзиром и на повишен CF у овој групи, супротан утицај ЕП-е је испољило на редокс статус у крви, где су забележени виши нивои прооксиданата, O_2^- , H_2O_2 и TBARS као и нижи нивои свих мерених антиоксиданата (SOD, CAT и GSH). Наши резултати су у складу са резултатима претходних истраживања хроничне примене ЕП-а на пацовима (*Mubarak, 2012, Khayyat et al., 2012, Khayyat et al., 2014, Ayuob & ElBeshbeishy, 2016, Díaz et al., 2016, Valle et al., 2018, Kassab & Tawfik, 2018*). У овом случају, код хроничних нетренираних конзумера, RB-а је испољио антиоксидативни утицај у срцу, док је у крви деловао прооксидативно. Обзиром да је и након акутне конзумације код тренираних пацова уочена иста неподударност ефекта ЕП-а на параметре оксидативног стреса у ефлуенту и крви (са том

разликом да је код тренираних испољен супротан ефекат – антиоксидативан утицај у крви, а прооксидативан у ефлуенту), може се закључити да конзумација ЕП-а делује различито код тренираних и нетренираних испитаника на модулацију редокс статуса у срцу и крви.

У групи тренираних пацова који су хронично конзумирали RB забележени су значајно виши нивои прооксиданаса, $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 и TBARS у ефлуенту у поређењу са тренираном контролном групом. Иста група животиња у крви је имала значајно виши ниво CAT, док је ниво H_2O_2 био нижи, што може бити објашњено његовом декомпозицијом у H_2O и O_2 . Хронични тренирани конзумери имали су значајно виши ниво SOD у поређењу са тренираним контролама, а зна се да и тренинг може утицати на повећање SOD (*Kawamura & Muraoka, 2018, Wang et al., 2018*). SOD представља једини ензим који уклања $O_2^{\cdot-}$ и спречава стварање $ONOO^{\cdot-}$, чија декомпозиција доводи до стварања такође токсичних једињења као што је OH^{\cdot} (*Wang et al., 2018*). Код хроничних тренираних конзумера забележен је виши ниво TBARS_p и у складу са тим нижи ниво GSH у поређењу са контролном групом. И физички тренинг може изазвати пероксидацију липида ћелијске мембране и повећан ниво TBARS у плазми као и смањење нивоа GSH, док се његова оксидована форма GSSG повећава (*Kawamura & Muraoka, 2018*). Однос GSH/GSSG је добра мера оксидативног стреса организма, обзиром да превисока концентрација GSSG делује прооксидативно (*Valko, 2007*). Оксидативна модификација састојака плазме може бити одраз оксидативног оштећења које потиче из ткива, што је последица „цурења“ пероксида из ткива у плазму, нарочито из мишића (*Ilhan et al., 2004*). Сумирано, код хроничних тренираних конзумера, RB је испољио различит утицај на редокс статус у ефлуенту и крви. Може се претпоставити да је у крви утицао на потенцирање ефеката тренинга на редокс статус. Ниво $^{\cdot}NO$ је био значајно нижи у плазми код хроничних тренираних конзумера у поређењу са контролама, док је ниво $^{\cdot}NO$ у ефлуенту био нижи али не статистички значајно, а интересантно CF је био значајно виши.

Код нетренираних животиња које су хронично конзумирале RB након акутне примене RB-а забележен је виши ниво H_2O_2 у ефлуенту у поређењу са мечованим контролама (нетренираним животињама које су хронично конзумирале RB), чиме је наглашен прооксидативни утицај акутне конзумације ЕП-а код хроничних конзумера. Међутим у крви хроничних нетренираних конзумера након акутне конзумације

регистрован је значајно нижи ниво прооксиданата, $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , као и виши нивои антиоксиданата, CAT и GSH у поређењу са нетренираним хроничним конзумерима. У складу са нижим $O_2^{\cdot-}$ у крви, хронични нетренирани конзумери након акутне конзумације имали су и виши ниво $\dot{N}O$ у крви, односно нижи потенцијал за стварање $ONOO^-$ (Wang *et al.*, 2018). Хемијски, $\dot{N}O$ није суштински реактивнији од кисеоника, нити је сам по себи високо токсичан. Међутим, $ONOO^-$ је јак оксиданс и релативно стабилан у физиолошким условима, а може да дифундује и за неколико ћелијских дојаметара, што га чини далеко токсичнијим (Wang *et al.*, 2018). Код нетренираних животиња које су хронично конзумирале RB након директне примене RB-а забележен је значајно виши ниво H_2O_2 и нижи ниво TBARS у ефлуенту у поређењу са мечованим контролама (нетренираним животињама које су хронично конзумирале RB).

Код тренираних животиња које су хронично конзумирале RB након акутне примене RB-а забележен је нижи ниво $\dot{N}O$ у ефлуенту у поређењу са мечованим контролама (тренираним животињама које су хронично конзумирале RB), што ипак није утицало на вазорелаксацију обзиром да није било разлике у нивоу CF. У плазми је било супротно, код тренираних хроничних конзумера након акутне примене регистрован је виши ниво $\dot{N}O$ и нижи ниво CAT у поређењу са тренираним животињама које су хронично конзумирале RB. Након акутне примене код хроничних тренираних конзумера забележен је нижи ниво TBARS у крви. На пацовима је показано да ЕП-е утиче на повећање нивоа TBARS у јетри и то на дозно зависан начин (Reis *et al.*, 2017), док тренинг утиче на повећање TBARS или не испољава утицај (Zhang *et al.*, 2004).

Наши резултати показују да је $\dot{N}O$ био повишен у ефлуенту нетренираних животиња након акутне, хроничне и директне примене RB-а, док је у плазми био повишен након акутне примене код хроничних конзумера RB-а и нетренираних и тренираних у поређењу са контролним групама. Код хроничних конзумера RB-а забележено је смањење $\dot{N}O$ у плазми код тренираних у поређењу са контролном групом, а такође је $\dot{N}O$ био смањен и у ефлуенту код тренираних хроничних конзумера након акутне конзумације у поређењу са мечованом контролном групом (тренирани хронични конзумери). Обзиром да $\dot{N}O$ испољава вазодилататорно дејство, смањена биорасположивост $\dot{N}O$ може утицати на настанак ендотелне дисфункције (Heitzer *et al.*, 2001). Физички тренинг повећава ендотел

зависну вазодилатацију на пољу коронарне микроциркулације, што може бити резултат повећане експресије NO синтазе (NOS) (Duncker & Bache, 2008). Показано је да ЕП-а у миновању смањују ендотелну функцију (Worthley et al., 2010, Higgins JP, 2013,), мада је демонстрирано да је конзумација RB-а утицала на значајно повећање вазодилатације посредоване ацетилхолином (Grasser et al., 2014). Сматра се да под различитим околностима, кофеин може деловати и као вазоконстриктор и као вазодилататор (Umemura et al., 2006). Трениране животиње које су хронично конзумирале RB након директне примене RB-а имале су у ефлуенту значајно нижи ниво O_2^- (али само на CPP 80) у поређењу са мечованим контролама (тренираним животињама које су хронично конзумирале RB).

Интересантно је да је ниво TBARS у ефлуенту био повишен код тренираних животиња након акутне, директне и хроничне примене, док је код нетренираних био снижен након хроничне примене RB-а, као и након директне примене код хроничних нетренираних конзумера. Ови резултати указују да ЕП-е испољава различит утицај на редокс статус у зависности од тренажног статуса.

За разлику од анималних модела у којима је могуће приступити готово свим ткивима, у већини хуманих студија, оксидативни стрес се процењује углавном у узорцима крви и резултати се екстраполирају на ткива, обзиром да већина биомаркера оксидативног стреса који се често мере у крви дају добар показатељ оксидативних промена које се дешавају у срцу (Margaritelis et al., 2015). Дискрепанца у редокс статусу у крви и ефлуенту у неким случајевима у нашем истраживању је вероватно интеракције ЕП-а и тренажног статуса. Сматра се да постоји снажна повезаност у редокс статусу еритроцита и плазме и да је мерење редокс биомаркера само у плазми довољно да се опишу промене у редокс статусу еритроцита и обрнуто (Margaritelis et al., 2015), што је у нашем истраживању у великој мери потврђено. Поређење резултата наше студије са резултатима других студија не може бити изведено обзиром да не постоје студије сличног дизајна. Због потенцијалне повезаности конзумације ЕП-а са настанком ендотелне дисфункције и потенцијалног морбидитета у комбинацији са физичким вежбањем, потребна су даља истраживања за расветљавање механизма дејства ЕП-а и значаја њихових ефеката (Higgins et al., 2017).

VI

ЗАКЉУЧЦИ

На основу добијених резултата у овом истраживању можемо закључити следеће:

1. Код нетренираних животиња, запажен је негативан утицај акутне и директне примене ЕП-а на функцију срца. Акутна примена ЕП-а је утицала на смањење дијастолне функције леве коморе, док је директна примена била повезана са изолованом систолном хипертензијом и смањењем коронарног протока.
2. Акутна конзумација ЕП-а код тренираних животиња имала је за последицу повећање коронарног протока и свих кардиодинамских параметара, осим дијастолног притиска у левој комори, док је директна администрација RB-а утицала на смањење стопе контрактилности и релаксације, односно била је повезана са депресијом срчане функције.
3. Након хроничне примене ЕП-а код нетренираних животиња, запажен је исти ефекат као након акутне примене - смањење дијастолне функције леве коморе.
4. Код тренираних животиња, након хроничне примене ЕП-а, запажен је сличан ефекат као након акутне примене - повећање коронарног протока и већине кардиодинамских параметара.
5. Хронична конзумација ЕП-а код нетренираних животиња утицала је на промену кардиоваскуларног одговора на акутну конзумацију, док није показан утицај хроничне конзумације при директној примени ЕП-а.
6. Код тренираних животиња хронична конзумација ЕП-а није утицала на промену кардиоваскуларног одговора при акутној конзумацији, док је код хроничних конзумера директна примена ЕП-а имала за последицу депресију срчане функције.
7. Акутна примена ЕП-а код нетренираних животиња остварила је прооксидативни утицај и у коронарном ефлуенту и у крви, а такође и директна примена ЕП-а деловала је прооксидативно у коронарном ефлуенту.
8. Акутна и директна конзумација ЕП-а код тренираних пацова испољили су прооксидативни потенцијал у коронарном ефлуенту, док је у крви запажен антиоксидативни утицај након акутне конзумације ЕП-а.

9. Хронична примена ЕП-а код нетренираних животиња није утицала негативно на редокс статус у коронарном ефлуенту, док је у крви запажен прооксидативни утицај.
10. Хронична примена ЕП-а код тренираних животиња испољила је прооксидативан утицај у коронарном ефлуенту, док је у крви забележен и прооксидативни и антиоксидативни потенцијал.
11. Код нетренираних животиња које су хронично конзумирале ЕП-а, акутна конзумација допринела је погоршању редокс статуса у коронарном ефлуенту, док је супротно у крви утицала на његово побољшање. Директна примена ЕП-а код нетренираних хроничних конзумента испољила је у коронарном ефлуенту и прооксидативни и антиоксидативни потенцијал.
12. Акутна примена ЕП-а код тренираних хроничних конзумента утицала је на смањење биодоступности NO у коронарном ефлуенту што није испољило утицај на коронарни проток, јер супротно томе у крви је регистровано повећање биодоступности NO , док директна примена ЕП-а није утицала на погоршање редокс статуса.

VII

ЛИТЕРАТУРА

1. Abian-Vicen J, Puente C, Salinero JJ, et al. (2014). A caffeinated energy drink improves jump performance in adolescent basketball players. *Amino Acids* 46(5): 1333-41.
2. Agrawal A, Mabalirajan U (2016). Rejuvenating cellular respiration for optimizing respiratory function: targeting mitochondria. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 310(2): L103-13.
3. Ahn CS (2009). Effect of taurine supplementation on plasma homocysteine levels of the middle-aged Korean women. *Adv Exp Med Biol* 643: 415-22.
4. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357(Pt 3): 593-615.
5. Alexander RW. Theodore Cooper Memorial Lecture (1995). Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension* 25(2): 155-61.
6. Al-Fares MN, Alsunni AA, Majeed F, Badar A (2015). Effect of energy drink intake before exercise on indices of physical performance in untrained females. *Saudi medical journal* 36(5): 580-6.
7. Alford C, Cox H, Wescott R (2001). The effects of red bull energy drink on human performance and mood. *Amino Acids* 21(2): 139-50.
8. Al-Shaar L, Vercaemmen K, Lu C, Richardson S, Tamez M, Mattei J (2017). Health Effects and Public Health Concerns of Energy Drink Consumption in the United States: A Mini-Review. *Front Public Health* 5: 225.
9. Alsunni A, Majeed F, Yar T, AlRahim A, Alhawaj AF, Alzaki M (2015a). Effects of energy drink consumption on corrected QT interval and heart rate variability in young obese Saudi male university students. *Ann Saudi Med* 35(4): 282-7.
10. Alsunni AA (2011). Are energy drinks Physiological? *Pakistan Journal of Physiology* 7: 44-49.
11. Alsunni AA (2015). Energy Drink Consumption: Beneficial and Adverse Health Effects. *Int J Health Sci (Qassim)* 9(4): 468-74.

12. An SM, Park JS, Kim SH (2014). Effect of energy drink dose on exercise capacity, heart rate recovery and heart rate variability after high-intensity exercise. *J Exerc Nutrition Biochem* 18(1): 31-9.
13. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* 70(2): 200-14.
14. Arria AM, Caldeira KM, Bugbee BA, Vincent KB, O'Grady KE (2017). Trajectories of energy drink consumption and subsequent drug use during young adulthood. *Drug Alcohol Depend* 179: 424-432.
15. Arria AM, O'Brien MC (2011). The "high" risk of energy drinks. *JAMA* 305(6): 600-1.
16. Astorino TA, Matera AJ, Basinger J, Evans M, Schurman T, Marquez R (2012). Effects of red bull energy drink on repeated sprint performance in women athletes. *Amino Acids* 42(5): 1803-8.
17. Atukeren P (2011). The Impact of Redox Balance in Brain Tumors. In Garami M (Ed.) *Molecular Targets of CNS Tumors*. InTech, Rijeka, pp 663-74.
18. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA, editor. *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton, 1985, pp 123-32.
19. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014: 360438.
20. Ayuob N, ElBeshbeishy R (2016). Impact of an Energy Drink on the Structure of Stomach and Pancreas of Albino Rat: Can Omega-3 Provide a Protection? *PLoS One* 11(2): e0149191.
21. Azuma J, Sawamura A, Awata N et al. (1985). Therapeutic effect of taurine in congestive heart failure: a double-blind crossover trial. *Clin Cardiol* 8(5): 276-82.
22. Balla T (2009). Regulation of Ca²⁺ entry by inositol lipids in mammalian cells by multiple mechanisms. *Cell Calcium* 45(6): 527-34.
23. Barcelos RP, Souza MA, Amaral GP, et al. (2014). Caffeine supplementation modulates oxidative stress markers in the liver of trained rats. *Life Sci* 96(1-2): 40-5.
24. Barrera G, Pizzimenti S, Dianzani MU (2008). Lipid peroxidation: control of cell proliferation, cell differentiation and cell death. *Mol Aspects Med* 29(1-2): 1-8.

25. Barsotii A, Dini FL (2003). From left ventricular dynamics to the pathophysiology of the failing heart. In: Pedrizzetti G & Perktold K (Eds.). Cardiovascular fluid mechanics. Wien; New York: Springer c, pp 235-47.
26. Bauer G (2013). HOCl-dependent singlet oxygen and hydroxyl radical generation modulate and induce apoptosis of malignant cells. *Anticancer Res* 33(9): 3589-602.
27. Baum M, Weiss M (2001). The influence of a taurine containing drink on cardiac parameters before and after exercise measured by echocardiography. *Amino Acids* 20(1): 75-82.
28. Beckman JS, Koppenol WH (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271(5 Pt 1): C1424-37.
29. Benjo AM, Pineda AM, Nascimento FO, Zamora C, Lamas GA, Escolar E (2012). Left main coronary artery acute thrombosis related to energy drink intake. *Circulation* 125(11): 1447-8.
30. Bergendi L, Benes L, Duracková Z, Ferencik M (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 65(18-19): 1865-74.
31. Berger AJ, Alford K (2009). Cardiac arrest in a young man following excess consumption of caffeinated "energy drinks". *Med J Aust* 190(1): 41-3.
32. Beutler E (1982). Red cell metabolism, a manual of biochemical methods. New York: Grune and Stratton.
33. Bhattacharjee S (2014). Membrane lipid peroxidation and its conflict of interest: the two faces of oxidative stress. *Curr Sci* 107: 1811-23.
34. Bi WX, Kong F, Hu XY, Cui X (2007). Role of glutathione in detoxification of copper and cadmium by yeast cells having different abilities to express cup1 protein. *Toxicol Mech Methods* 17(6): 371-8.
35. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 5(1): 9-19.
36. Blatter LA, Wier WG (1994). Nitric oxide decreases $[Ca^{2+}]_i$ in vascular smooth muscle by inhibition of the calcium current. *Cell Calcium* 15(2): 122-31.
37. Brothers RM, Christmas KM, Patik JC, Bhella PS (2017). Heart rate, blood pressure and repolarization effects of an energy drink as compared to coffee. *Clin Physiol Funct Imaging* 37(6): 675-81.

38. Brüne B, von Knethen A, Sandau KB (1998). Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol* 351(3): 261-72.
39. Bryan NS (2011). Application of nitric oxide in drug discovery and development. *Expert Opin Drug Discov* 6(11): 1139-54.
40. BSDA (2015). Code of practice on energy drinks. London: British Soft Drinks Association. (http://www.britishsoftdrinks.com/write/MediaUploads/Soft%20Drinks/Revised_Energy_Drinks_Code_of_Practice_270415.pdf)
41. Bukhar HM, El Sawy NA, Header EA (2012). Biological effect of high energy drink on normal and hyperglycemic rats. *Pak J Nutr* 11(4): 301-9.
42. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med* 15(4): 186-90.
43. Burkhoff D (2002). Mechanical properties of the heart and its interaction with the vascular system. *The Heart Simulator*, <http://www.columbia.edu/itc/hs/medical/heartsim> (Burkhoff, D. (2002). Mechanical properties of the heart and its interaction with the vascular system. Course Material, Columbia University, New York, USA.)
44. Burrows T, Pursey K, Neve M, Stanwell P (2013). What are the health implications associated with the consumption of energy drinks? A systematic review. *Nutr Rev* 71(3): 135-48.
45. Cadenas E (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem*.58: 79-110.
46. Cai H, Harrison DG (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87(10): 840-4.
47. Çakır ÖK, Ellek N, Salehin N et al. (2017). Protective effect of low dose caffeine on psychological stress and cognitive function. *Physiol Behav* 168: 1-10.
48. Campbell B, Wilborn C, La Bounty P et al. (2013). International Society of Sports Nutrition position stand: energy drinks. *J Int Soc Sports Nutr* 10(1): 1.
49. Canbolat EP, Sagsoz N, Noyan V, Yucel A, Kisa U (2017). Effects of l-carnitine on oxidative stress parameters in oophorectomized rats. *Alex J Med* 53: 55–60.
50. Candow DG, Kleisinger AK, Grenier S, Dorsch KD (2009). Effect of sugar-free Red Bull energy drink on high-intensity run time-to-exhaustion in young adults. *J Strength Cond Res* 23(4): 1271-5.

51. Cano-Europa E, Blas-Valdivia V, Franco-Colin M, Ortiz-Butron R (2015). Regulation of the Redox Environment. In: Gowder SGT (Ed.), Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress. InTech, Croatia. pp 3-15.
52. Cappelletti S, Piacentino D, Sani G, Aromatario M (2015). Caffeine: cognitive and physical performance enhancer or psychoactive drug? *Curr Neuropharmacol* 13(1): 71-88.
53. Carlberg I, Mannervik B (1975). Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* 250(14): 5475-80.
54. Caron MF, Hotsko AL, Robertson S, Mandybur L, Kluger J, White CM (2002). Electrocardiographic and hemodynamic effects of *Panax ginseng*. *Ann Pharmacother* 36(5): 758-63.
55. Carpenè E, Andreani G, Isani G (2007). Metallothionein functions and structural characteristics. *J Trace Elem Med Biol* 21 Suppl 1: 35-9.
56. Cavka A, Stupin M, Panduric A et al. (2015). Adrenergic System Activation Mediates Changes in Cardiovascular and Psychomotoric Reactions in Young Individuals after Red Bull (©) Energy Drink Consumption. *Int J Endocrinol* 2015: 751530. doi: 10.1155/2015/751530.
57. Celermajer DS (1997). Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol* 30(2): 325-33.
58. Chance B, Sies H, Boveris A (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59(3): 527–605.
59. Chan-Dewar F (2012). The cardiac cycle. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* 13:8 391- 396
60. Chang L, Xu J, Yu F, Zhao J, Tang X, Tang C (2004). Taurine protected myocardial mitochondria injury induced by hyperhomocysteinemia in rats. *Amino Acids* 27(1): 37-48.
61. Chang YJ, Peng CY, Lan YC (2017). Consumption of Energy Drinks among Undergraduate Students in Taiwan: Related Factors and Associations with Substance Use. *Int J Environ Res Public Health* 14(9).

62. Chapple SJ, Cheng X, Mann GE (2013). Effects of 4-hydroxynonenal on vascular endothelial and smooth muscle cell redox signaling and function in health and disease. *Redox Biol* 1:319-31.
63. Chemla D, Coirault C, Hébert JL, Lecarpentier Y (2000). Mechanics of Relaxation of the Human Heart. *News Physiol Sci* 15: 78-83.
64. Chen PJ, Chiu CH, Tseng JK, Yang KT, Chen YC (2015). Ameliorative effects of D-glucuronolactone on oxidative stress and inflammatory/fibrogenic responses in livers of thioacetamide-treated rats. *J Funct Foods* 14: 154- 62.
65. Cheung M, Quach J, Chan A, Nguyen NN, Shah SA (2016). Effects of Energy Shots on Blood Pressure in Caffeine-Naive Versus Caffeine-Consuming Healthy Volunteers. *Journal of Caffeine Research* 6 (4): 148-153.
66. Chimezie OS (2013). Effects of Bullet Energy Drink on Creatininephosphokinase (CPK) and Lactate Dehydrogenase (LDH) Level of Albino Rat. *Journal of Natural Sciences Research* 3(3): 15-17.
67. Choudhury TR, Abdool MA, Galasko G (2017). Energy drinks give you wings but also an abnormal exercise test. *BMJ Case Rep* 2017.
68. Chrysant SG, Chrysant GS (2015). Cardiovascular complications from consumption of high energy drinks: recent evidence. *J Hum Hypertens* 29(2): 71-6.
69. Ciruela F, Gómez-Soler M, Guidolin D et al. (2011). Adenosine receptor containing oligomers: their role in the control of dopamine and glutamate neurotransmission in the brain. *Biochim Biophys Acta* 1808 (5): 1245-55.
70. Clauson KA, Shields KM, McQueen CE, Persad N (2008). Safety issues associated with commercially available energy drinks. *J Am Pharm Assoc* (2003) 48(3): e55-63.
71. Constable P, Muir W, Sisson D (1999). Clinical assessment of left ventricular relaxation. *J Vet Int Med* 13: 5-13.
72. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ et al. (2002). International Brachial Artery Reactivity Task Force. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 39(2): 257-65.
73. Costa BM, Hayley A, Miller P (2014). Young adolescents' perceptions, patterns, and contexts of energy drink use. A focus group study. *Appetite* 80: 183-9.

74. Dadheech G, Mishra S, Gautam S, Sharma P (2006). Oxidative stress, α -tocopherol, ascorbic acid and reduced glutathione status in schizophrenics. *Indian J Clin Biochem* 21(2): 34-8.
75. Das SK, Vasudevan DM (2006). Modulation of lecithin activity by vitamin-B complex to treat long term consumption of ethanol induced oxidative stress in liver. *Indian J Exp Biol* 44(10): 791-801.
76. Davies KJ (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* 61:1-31.
77. Davis KL, Mehlhorn U, Schertel ER, et al. (1999). Variation in tau, the time constant for isovolumic relaxation, along the left ventricular base-to-apex axis. *Basic Res Cardiol* 94(1): 41-8.
78. De Sanctis V, Soliman N, Soliman AT et al. (2017). Caffeinated energy drink consumption among adolescents and potential health consequences associated with their use: a significant public health hazard. *Acta Biomed* 88(2): 222-231.
79. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM (2000). Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 130(5): 963-74.
80. Del Coso J, Muñoz-Fernández VE, Muñoz G et al. (2012a). Effects of a caffeine-containing energy drink on simulated soccer performance. *PLoS One* 7(2): e31380.
81. Del Coso J, Portillo J, Muñoz G, Abián-Vicén J, Gonzalez-Millán C, Muñoz-Guerra J (2013). Caffeine-containing energy drink improves sprint performance during an international rugby sevens competition. *Amino Acids* 44(6): 1511-9.
82. Del Coso J, Salinero JJ, González-Millán C, Abián-Vicén J, Pérez-González B (2012). Dose response effects of a caffeine-containing energy drink on muscle performance: a repeated measures design. *J Int Soc Sports Nutr* 9(1): 21.
83. DeLeo FR, Quinn MT (1996). Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukoc Biol* 60(6): 677-91.
84. Demirtas C, Ofluoglu E, Hussein A, Pasaoglu H (2012). Effects of caffeine on oxidant-antioxidant mechanisms in the rat liver. *Gazi Med J* 23:13-8.
85. Depeint F, Bruce WR, Shangari N, Mehta R, O'Brien PJ (2006a). Mitochondrial function and toxicity: role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism. *Chem Biol Interact* 163(1-2): 94-112.

86. Depeint F, Bruce WR, Shangari N, Mehta R, O'Brien PJ (2006b). Mitochondrial function and toxicity: role of B vitamins on the one-carbon transfer pathways. *Chem Biol Interact* 163(1-2): 113-32.
87. DeSciscio P, Prabhu A, Worthley M, Roberts-Thomson R, Sanders P, Willoughby S (2008). Acute Effects of Red Bull on Platelet and Endothelial Function. *Heart, Lung and Circulation* 17(3): S23-S24.
88. Devasagayam TP, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India* 52: 794-804.
89. Díaz A, Treviño S, Guevara J et al. (2016). Energy Drink Administration in Combination with Alcohol Causes an Inflammatory Response and Oxidative Stress in the Hippocampus and Temporal Cortex of Rats. *Oxid Med Cell Longev* 2016: 8725354.
90. Dickinson DA, Forman HJ (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 64 (5-6): 1019-26.
91. Djukanovic N, Jakovljevic V, Mujovic MV (2009). Evaluation of relaxation of myocardium in conditions of cardiac remodelling. *Med Pregl LXII* (11-12): 555-68.
92. Doerner JM, Kuetting DL, Luetkens JA, et al (2015). Caffeine and taurine containing energy drink increases left ventricular contractility in healthy volunteers. *Int J Cardiovasc Imaging* 31(3): 595-601.
93. Dole WP (1987). Autoregulation of the coronary circulation. *Prog Cardiovasc Dis* 29(4): 293-323.
94. Dong GZ, Jang EJ, Kang SH, et al. (2013). Red ginseng abrogates oxidative stress via mitochondria protection mediated by LKB1-AMPK pathway. *BMC Complement Altern Med* 13: 64.
95. Doyle W, Shide E, Thapa S, Chandrasekaran V (2012). The effects of energy beverages on cultured cells. *Food Chem Toxicol* 50(10): 3759-68.
96. Duncker DJ, Bache RJ (2008). Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiol Rev* 88(3):1009-86.
97. Duncker DJ, Merkus D (2004). Regulation of coronary blood flow. Effect of coronary artery stenosis. *Arch Mal Coeur Vaiss* 97(12): 1244-50.

98. Eaton DL, Bammler TK (1999). Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol Sci* 49(2): 156-64.
99. Eby G, Halcomb WW (2006). Elimination of cardiac arrhythmias using oral taurine with l-arginine with case histories: Hypothesis for nitric oxide stabilization of the sinus node. *Med Hypotheses* 67(5): 1200-4.
100. Echeverri D, Montes FR, Cabrera M, Galán A, Prieto A (2010). Caffeine's Vascular Mechanisms of Action. *Int J Vasc Med* 2010: 834060.
101. Ehichioya DE, Oyesola TO, Ogbonna RC , Oyesola OA, Ajiboye KI (2016). Habitual caffeine consumption and its influence on myocardial fibers, blood pressure and oxidative status in pregnant albino Wistar rats. *Int J Adv Res* 4(10): 1845-54.
102. El-Hattab AW, Scaglia F (2015). Disorders of carnitine biosynthesis and transport. *Mol Genet Metab* 116(3): 107-12.
103. Elitok A, Öz F, Panc C, et al. (2015). Acute effects of Red Bull energy drink on ventricular repolarization in healthy young volunteers: a prospective study. *Anatol J Cardiol* 15(11): 919-22.
104. El-Sabban F (2016). Perspectives on Energy Drinks. *J Clin Nutr Diet* 2(2): 9.
105. el-Sayed MS, MacLaren D, Rattu AJ (1997). Exogenous carbohydrate utilisation: effects on metabolism and exercise performance. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 118(3):789-803.
106. Eudy AE, Gordon LL, Hockaday BC, et al. (2013). Efficacy and safety of ingredients found in preworkout supplements. *Am J Health Syst Pharm* 70(7): 577-88.
107. EFSA, European Food Safety Authority, (2009). The use of taurine and D-glucuronogamma-lactone as constituents of theseo-called “energy” drinks/Scientific Opinion of the Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to food. *The EFSA Journal* 935: 1-31 (<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/935.htm>)
108. Fariss MW, Chan CB, Patel M, Van Houten B, Orrenius S (2005). Apr Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Mol Interv* 5(2): 94-111.
109. Fatouros IG, Douroudos I, Panagoutsos S, et al. (2010). Effects of L-carnitine on oxidative stress responses in patients with renal disease. *Med Sci Sports Exerc* 42(10): 1809-18.

110. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A (2007). G Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods* 39: 175-191.
111. Fernández-Campos C, Dengo AL, Moncada-Jiménez J (2015). Acute Consumption of an Energy Drink Does Not Improve Physical Performance of Female Volleyball Players. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 25(3): 271-7.
112. Ferreira-Martins J, Leite-Moreira AF (2010). Physiologic basis and pathophysiologic implications of the diastolic properties of the cardiac muscle. *J Biomed Biotechnol* 2010: 807084.
113. Finaud J, Lac G, Filaire E (2006). Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Med* 36(4): 327-58.
114. Finnegan D (2003). The health effects of stimulant drinks. *Br Nutr Found Nut Bull* 28:147–55.
115. Fletcher EA, Lacey CS, Aaron M, Kolasa M, Occiano A, Shah SA (2017). Randomized Controlled Trial of High-Volume Energy Drink Versus Caffeine Consumption on ECG and Hemodynamic Parameters. *J Am Heart Assoc* 6(5).
116. Fletcher EA, Lacey CS, Shah SA (2014). Impact of high volume energy drink consumption of electrocardiographic and blood pressure parameters. *Circulation* 130: A15885.
117. Förstermann U, Sessa WC (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33(7): 829-37, 837a-837d.
118. Franks AM, Schmidt JM, McCain KR, Fraer M (2012). Comparison of the effects of energy drink versus caffeine supplementation on indices of 24-hour ambulatory blood pressure. *Ann Pharmacother* 46(2):192-9.
119. Freedman JE (2008). Oxidative stress and platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(3): s11-6.
120. Fridovich I (1997). Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 272(30): 18515-7.
121. Fu Y, Ji LL (2003). Chronic ginseng consumption attenuates age-associated oxidative stress in rats. *J Nutr* 133(11): 3603-9.

122. Fujii W, Takaki M, Yoshida A, Ishidate H, Ito H, Suga H (1998). Effects of intracoronary caffeine on left ventricular mechanoenergetics in Ca²⁺ overload failing rat hearts. *Jpn J Physiol* 48(5): 373-81.
123. Fukai T, Ushio-Fukai M (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal* 15(6): 1583-606.
124. Fukuwatari T, Shibata K (2013). Nutritional aspect of tryptophan metabolism. *Int J Tryptophan Res* 6(Suppl 1): 3-8.
125. Geçmen Ç (2016). Authors Reply. *Anatol J Cardiol* 16(7): 550-550
126. Glade MJ (2010). Caffeine-Not just a stimulant. *Nutrition* 26(10): 932-8.
127. Goldfarb M, Tellier C, Thanassoulis G (2014). Review of published cases of adverse cardiovascular events after ingestion of energy drinks. *Am J Cardiol* 113(1): 168-72.
128. Góth L, Rass P, Páy A (2004). Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Mol Diagn* 8(3):141-9.
129. Grasser EK, Dulloo A, Montani JP (2014a). Cardiovascular responses to the ingestion of sugary drinks using a randomised cross-over study design: Does glucose attenuate the blood pressure-elevating effect of fructose? *Br J Nutr* 112(2): 183-92.
130. Grasser EK, Dulloo AG, Montani JP (2015). Cardiovascular and cerebrovascular effects in response to red bull consumption combined with mental stress. *Am J Cardiol* 115(2): 183-9.
131. Grasser EK, Miles-Chan JL, Charrière N, Loonam CR, Dulloo AG, Montani JP (2016). Energy Drinks and Their Impact on the Cardiovascular System: Potential Mechanisms. *Adv Nutr* 7(5): 950-60.
132. Grasser EK, Yepuri G, Dulloo AG, Montani JP (2014). Cardio- and cerebrovascular responses to the energy drink Red Bull in young adults: a randomized cross-over study. *Eur J Nutr* 53(7): 1561-71.
133. Gray B, Ingles J, Medi C, Driscoll T, Semsarian C (2017). Cardiovascular Effects of Energy Drinks in Familial Long QT Syndrome: A Randomized Cross-Over Study. *Int J Cardiol* 231:150-154.
134. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126(1): 131-8.

135. Gülçin I (2008). In vitro prooxidant effect of caffeine. *J Enzyme Inhib Med Chem* 23(1): 149-52.
136. Gutteridge JM (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 41(12 Pt 2): 1819-28.
137. Guyton AC, Hall JE (2015). *Textbook of Medical physiology*. 13.ed. Philadelphia: Elsevier.
138. Habib S, Ali A (2011). Biochemistry of nitric oxide. *Indian J Clin Biochem* 26(1): 3-17.
139. Hadi HA, Suwaidi JA (2007). Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Manag* 3(6): 853-76.
140. Hajsadeghi S, Mohammadpour F, Manteghi MJ, et al. (2016). Effects of energy drinks on blood pressure, heart rate, and electrocardiographic parameters: An experimental study on healthy young adults. *Anatol J Cardiol* 16(2): 94-9.
141. Halliwell B (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344(8924): 721-4.
142. Halliwell B (1995). Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. *Ann Rheum Dis* 54(6): 505-10.
143. Halliwell B. Reactive species and antioxidants (2006). Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141(2): 312-22.
144. Hamlin RL, del Rio C (2012). dP/dt(max)--a measure of 'baroinometr y'. *J Pharmacol Toxicol Methods* 66(2): 63-5.
145. Hanan Israelit S, Strizevsky A, Raviv B (2012). ST elevation myocardial infarction in a young patient after ingestion of caffeinated energy drink and ecstasy. *World J Emerg Med* 3(4): 305-7.
146. Hanft LM, Korte FS, McDonald KS (2008). Cardiac function and modulation of sarcomeric function by length. *Cardiovasc Res* 77(4): 627-36.
147. Harman D (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11(3): 298-300.
148. Harris JL, Munsell CR (2015). Energy drinks and adolescents: what's the harm? *Nutr Rev* 73(4): 247-57.

149. Hartley TR, Lovallo WR, Whitsett TL (2004). Cardiovascular effects of caffeine in men and women. *Am J Cardiol* 93(8): 1022-6.
150. Hatano Y, Mizumoto K, Yoshiyama T, Yamamoto M, Iranami H (1995). Endothelium-dependent and -independent vasodilation of isolated rat aorta induced by caffeine. *Am J Physiol* 269(5 Pt 2): H1679-84.
151. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR (2005). Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 51-88.
152. Heckman MA, Sherry K, Gonzalez De Mejia EG (2010a). Energy drinks: An assessment of their market size, consumer demographics, ingredient profile, functionality, and regulations in the United States. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 9: 303-317.
153. Heckman MA, Weil J, Gonzalez de Mejia E (2010). Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *J Food Sci* 75(3): R77-87.
154. Heinrich TA, da Silva RS, Miranda KM, Switzer CH, Wink DA, Fukuto JM (2013). Biological nitric oxide signalling: chemistry and terminology. *Br J Pharmacol* 169(7): 1417-29.
155. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T (2001). Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 104(22): 2673-8.
156. Herbette S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR (2007). Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *FEBS J* 274(9): 2163-80.
157. Herrmann J, Kaski JC, Lerman A (2012). Coronary microvascular dysfunction in the clinical setting: from mystery to reality. *Eur Heart J* 33(22): 2771-2782b.
158. Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y (2009). Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 73(3): 411-8.
159. Higgins JP (2013). Endothelial function acutely worse after drinking energy beverage. *Int J Cardiol* 168(2): e47-9.
160. Higgins JP, Babu K, Deuster PA, Shearer J (2018). Energy Drinks: A Contemporary Issues Paper. *Curr Sports Med Rep* 17(2): 65-72.

161. Higgins JP, Babu KM (2013). Caffeine reduces myocardial blood flow during exercise. *Am J Med* 126(8): 730. e1-8.
162. Higgins JP, Ortiz BL (2014). Energy drink ingredients and their effect on endothelial function: A Review. *Int J Clin Cardiol* 1:1–6.
163. Higgins JP, Tuttle TD, Higgins CL (2010). Energy beverages: content and safety. *Mayo Clin Proc* 85(11): 1033-41.
164. Higgins JP, Yang B, Herrin NE, et al. (2017). Consumption of energy beverage is associated with attenuation of arterial endothelial flow-mediated dilatation. *World J Cardiol* 9(2):162-66.
165. Higgins JP, Yarlagadda S, Yang B (2015). Cardiovascular complications of energy drinks. *Beverages* 1: 104-26.
166. Hill ME (2012). *Marketing Strategy: The Thinking Involved*. SAGE Publications, Inc.
167. Hoit BD (2011). Strain and strain rate echocardiography and coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Imaging* 4(2): 179-90.
168. Holubcikova J, Kolarcik P, Madarasova Geckova A, Reijneveld SA, van Dijk JP (2017). Regular energy drink consumption is associated with the risk of health and behavioural problems in adolescents. *Eur J Pediatr* 176(5): 599-605.
169. <https://cspinet.org/news/documents-link-more-deaths-energy-drinks-20140625>. Center for Science in the Public Interest.
170. Hustad S, Schneede J, Ueland PM. Riboflavin and Methylenetetrahydrofolate Reductase. In: *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-13.
171. Huxtable RJ (1992). Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 72(1): 101-63.
172. Ibrahim NK, Iftikhar R (2014). Energy drinks: Getting wings but at what health cost? *Pak J Med Sci* 30(6): 1415-9.
173. Ignarro LJ (1990). Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension* 16(5): 477-83.
174. Ilhan N, Kamanli A, Ozmerdivenli R, Ilhan N (2004). Variable effects of exercise intensity on reduced glutathione, thiobarbituric acid reactive substance levels, and glucose concentration. *Arch Med Res* 35(4): 294-300.

175. Imai H, Nakagawa Y (2003). Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* 34(2):145-69.
176. Ishak WW, Ugochukwu C, Bagot K, Khalili D, Zaky C (2012). Energy drinks: psychological effects and impact on well-being and quality of life-a literature review. *Innov Clin Neurosci* 9(1): 25-34.
177. Ishikawa T, Casini AF, Nishikimi M (1998). Molecular cloning and functional expression of rat liver glutathione-dependent dehydroascorbate reductase. *J Biol Chem* 273(44): 28708-12.
178. Ithayaraja CM (2011). Mini-review: Metabolic functions *and* molecular structure of glutathione reductase. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 9(2):104-15.
179. Ito T, Oishi S, Takai M, et al. (2010). Cardiac and skeletal muscle abnormality in taurine transporter-knockout mice. *J Biomed Sci* 17: S20.
180. Ivy JL, Kammer L, Ding Z, et al. (2009). Improved cycling time-trial performance after ingestion of a caffeine energy drink. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 19(1): 61-78.
181. Iyadurai SJ, Chung SS (2007). New-onset seizures in adults: possible association with consumption of popular energy drinks. *Epilepsy Behav* 10(3): 504-8.
182. Jong CJ, Azuma J, Schaffer S (2012). Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: prevention of mitochondrial oxidant production. *Amino Acids* 42(6): 2223-32.
183. Jovanović Z, Jovanović S (2011). Otpornost nervnih ćelija na oksidativna oštećenja. *Medicinski pregled* 64 (7-8): 386-91.
184. Jovanovski E, Jenkins A, Dias AG, et al. (2010). Effects of Korean red ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) and its isolated ginsenosides and polysaccharides on arterial stiffness in healthy individuals. *Am J Hypertens* 23(5): 469-72.
185. Jović M, Popović Z, Nežić DG, i ostali (2002). Uloga Swan-Ganz PA katetera u proceni hemodinamskih promena tokom hirurške revaskularizacije miokarda u bolesnika sa oslabljenom funkcijom leve komore. *Acta chirurgica iugoslavica* 49 (1): 27-35.
186. Kallergis EM, Goudis CA, Simantirakis EN, Kochiadakis GE, Vardas PE (2012). Mechanisms, risk factors, and management of acquired long QT syndrome: a comprehensive review. *ScientificWorldJournal* 2012: 212178.

187. Kapila R, Mahajan RP (2009). Diastolic dysfunction. Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain 9: 29-33.
188. Kaplan GB, Greenblatt DJ, Ehrenberg BL, et al. (1997). Dose-dependent pharmacokinetics and psychomotor effects of caffeine in humans. J Clin Pharmacol 37(8): 693-703.
189. Katayama T (1999). Hypolipidemic action of phytic acid (IP6): prevention of fatty liver. Anticancer Res 19(5A): 3695-8.
190. Katz AM (1988). Influence of altered inotropy and lusitropy on ventricular pressure-volume loops. J Am Coll Cardiol 11(2): 438-45.
191. Kawamura T, Muraoka I (2018). Exercise-Induced Oxidative Stress and the Effects of Antioxidant Intake from a Physiological Viewpoint. Antioxidants (Basel) 7(9). pii: E119.
192. Khanorkar SV (2012). Insights in physiology. 1st ed. New Delhi, India: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd/JP Medical Ltd.
193. Khayyat L, Essawy A, Sorour J, Al Rawi M (2014). Impact of Some Energy Drinks on the Structure and Function of the Kidney in Wistar Albino Rats. Life Sci J 11(10): 1131-8.
194. Khayyat L, Rawi ML, Essawy A (2012). Histological, Ultrastructural and Physiological Studies on the Effect of Different Kinds of Energy Drinks on the Liver of Wistar albino Rat. J Amer Sci 8(8): 688-97.
195. Khurana I (2006): Textbook of Medical Physiology. Elsevier, India.
196. Kijawornrat A (2013). Indices of Myocardial Contractility. Thai J Vet Med 43(2): 167-78.
197. Kim JY, Park JY, Kang HJ, Kim OY, Lee JH (2012). Beneficial effects of Korean red ginseng on lymphocyte DNA damage, antioxidant enzyme activity, and LDL oxidation in healthy participants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Nutr J 11:47.
198. Kohen R, Nyska A (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicol Pathol 30(6): 620-50.

199. Kozik TM, Shah S, Bhattacharyya M, et al. (2016). Cardiovascular responses to energy drinks in a healthy population: The C-energy study. *Am J Emerg Med* 34(7): 1205-9.
200. Krishnamurthy P, Wadhvani A (2012). Antioxidant enzymes and human health. In: El-Missiry MA (Ed). *Antioxidant enzyme*. 1st ed.: InTech, Rijeka pp3-18.
201. Kruidenier L, Verspaget HW (2002). Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease--radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol Ther* 16(12): 1997-2015.
202. Krumova K, Cosa G (2016) Overview of reactive oxygen species, in singlet oxygen: applications in biosciences and nanosciences. In: Nonell A, Flors C (Eds) *Singlet oxygen: applications in biosciences and nanosciences*. *Roy Soc Chem Lond* 1:1–21.
203. Lam CSP, Redfield MM. Heart failure with normal ejection fraction. In: Hosenpud JD, Greenberg BH (eds.). *Congestive heart failure*. 3rd Ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2007.
204. Lambert IH, Kristensen DM, Holm JB, Mortensen OH (2015). Physiological role of taurine--from organism to organelle. *Acta Physiol (Oxf)* 213(1):191-212.
205. Lango R, Smolenski RT, Narkiewicz M, Suchorzewska J, Lysiak-Szydłowska W (2001). Influence of L-carnitine and its derivatives on myocardial metabolism and function in ischemic heart disease and during cardiopulmonary bypass. *Cardiovasc Res* 51(1): 21-9.
206. Lara B, Gonzalez-Millán C, Salinero JJ, et al. (2014). Caffeine-containing energy drink improves physical performance in female soccer players. *Amino Acids* 46(5): 1385-92.
207. Lavigne PM, Karas RH (2013). The current state of niacin in cardiovascular disease prevention: a systematic review and meta-regression. *J Am Coll Cardiol* 61(4): 440-6.
208. Lee C (2000). Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clin Chim Acta* 295(1-2): 141-54.
209. Lee YM, Yoon H, Park HM, Song BC, Yeum KJ (2017). Implications of red *Panax ginseng* in oxidative stress associated chronic diseases. *J Ginseng Res* 41(2):113-9.
210. Leite-Moreira AF (2006). Current perspectives in diastolic dysfunction and diastolic heart failure. *Heart* 92(5): 712-8.

211. Lippi G, Cervellin G, Sanchis-Gomar F (2016). Energy Drinks and Myocardial Ischemia: A Review of Case Reports. *Cardiovasc Toxicol* 16(3): 207-12.
212. Lockwood CM, Moon JR, Smith AE, et al. (2010). Low-calorie energy drink improves physiological response to exercise in previously sedentary men: a placebo-controlled efficacy and safety study. *J Strength Cond Res* 24(8): 2227-38.
213. London GM, Pannier B (2010). Arterial functions: how to interpret the complex physiology. *Nephrol Dial Transplant* 25(12): 3815-23.
214. Lorist MM, Tops M (2003). Caffeine, fatigue, and cognition. *Brain Cogn* 53(1): 82-94.
215. MacCornack FA (1977). The effects of coffee drinking on the cardiovascular system: experimental and epidemiological research. *Prev Med* 6(1): 104-19.
216. Madamanchi NR, Runge MS (2013). Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free Radic Biol Med* 61:473-501.
217. Maellaro E, Del Bello B, Sugherini L, Santucci A, Comporti M, Casini AF (1994). Purification and characterization of glutathione-dependent dehydroascorbate reductase from rat liver. *Biochem J* 301 (Pt 2): 471-6.
218. Mahdavi R, Daneghian S, Homayouni A, Jafari A (2012). Effects of caffeine supplementation on oxidative stress, exercise-induced muscle damage and leukocytosis. *J Pharmac* 18 (3): 177-82.
219. Mahler F, Ross J Jr, O'Rourke RA, Covell JW (1975). Effects of changes in preload, afterload and inotropic state on ejection and isovolumic phase measures of contractility in the conscious dog. *Am J Cardiol* 35(5): 626-34.
220. Maia AR, Batista TM, Victorio JA, et al. (2014). Taurine supplementation reduces blood pressure and prevents endothelial dysfunction and oxidative stress in post-weaning protein-restricted rats. *PLoS One* 9(8): e105851.
221. Majeed F, Yar T, Alsunni A, Alhawaj AF, AlRahim A, Alzaki M (2017). Synergistic effect of energy drinks and overweight/obesity on cardiac autonomic testing using the Valsalva maneuver in university students. *Ann Saudi Med* 37(3):181-8.
222. Mangge H, Becker K, Fuchs D, Gostner JM (2014). Antioxidants, inflammation and cardiovascular disease. *World J Cardiol* 6(6): 462-77.
223. Mangi MA, Rehman H, Rafique M, Illovsy M (2017). Energy Drinks and the Risk of Cardiovascular Disease: A Review of Current Literature. *Cureus* 9(6):e1322.

224. Margaritelis NV, Veskoukis AS, Paschalis V, et al. (2015). Blood reflects tissue oxidative stress: a systematic review. *Biomarkers* 20(2): 97-108.
225. Marczinski CA (2014). Combined alcohol and energy drink use: hedonistic motives, adenosine, and alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 38(7): 1822-5.
226. Marczinski CA (2015). Can energy drinks increase the desire for more alcohol? *Adv Nutr* 6(1): 96-101.
227. Marczinski CA, Fillmore MT (2014). Energy drinks mixed with alcohol: what are the risks? *Nutr Rev* 72 Suppl 1: 98-107.
228. Marczinski CA, Fillmore MT, Maloney SF, Stamatates AL (2017). Faster self-paced rate of drinking for alcohol mixed with energy drinks versus alcohol alone. *Psychol Addict Behav* 31(2):154-61.
229. Maryon EB, Molloy SA, Kaplan JH (2013). Cellular glutathione plays a key role in copper uptake mediated by human copper transporter 1. *Am J Physiol Cell Physiol* 304(8): C768-79.
230. Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32(8): 595-603.
231. McKetin R, Coen A, Kaye S (2015). A comprehensive review of the effects of mixing caffeinated energy drinks with alcohol. *Drug Alcohol Depend* 151: 15-30.
232. McLellan TM, Lieberman HR (2012). Do energy drinks contain active components other than caffeine? *Nutr Rev* 70(12): 730-44.
233. Mehta SK, Gowder SGT (2015). Members of Antioxidant Machinery and Their Functions. In: Gowder SGT (Ed.), *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*. InTech, Croatia pp 59-85.
234. Melov S, Coskun P, Patel M, et al. (1999). Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci US A* 96(3): 846-51.
235. Menci D, Righini FM, Cameli M, et al. (2013). Acute effects of an energy drink on myocardial function assessed by conventional echo-Doppler analysis and by speckle tracking echocardiography on young healthy subjects. *J Amino Acids* 2013: 646703.
236. Mets MA, Ketzer S, Blom C, et al. (2011). Positive effects of Red Bull® Energy Drink on driving performance during prolonged driving. *Psychopharmacology (Berl)* 214(3): 737-45.

237. Meunier B, de Visser SP, Shaik S (2004). Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes. *Chem Rev* 104(9): 3947-80.
238. Meyer K, Ball P (2004). Psychological and cardiovascular effects of guarana and yerba mate: A comparison with coffee. *Interam J Psychol* 38: 87–94.
239. Michell RH (2008). Inositol derivatives: evolution and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(2): 151-61.
240. Miles-Chan JL, Charriere N, Grasser EK, Montani JP, Dulloo AG (2015). The blood pressure-elevating effect of Red Bull energy drink is mimicked by caffeine but through different hemodynamic pathways. *Physiol Rep* 3(2): e12290
241. Misra HP, Fridovich I (1972). The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J Biol Chem* 247(21): 6960-2.
242. Miyamoto S, Martinez GR, Rettori D, Augusto O, Medeiros MH, Di Mascio P (2006). Linoleic acid hydroperoxide reacts with hypochlorous acid, generating peroxy radical intermediates and singlet molecular oxygen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(2): 293-8.
243. Molnar J, Somberg JC (2015). Evaluation of the Effects of Different Energy Drinks and Coffee on Endothelial Function. *Am J Cardiol* 116(9): 1457-60.
244. Moncada S, Higgs EA (2006). The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1: S193-201.
245. Monnard CR, Montani JP, Grasser EK (2016). Cerebro- and Cardio-vascular Responses to Energy Drink in Young Adults: Is there a Gender Effect? *Front Physiol* 7: 346.
246. Mora-Rodriguez R, Pallarés JG (2014). Performance outcomes and unwanted side effects associated with energy drinks. *Nutr Rev* 72 Suppl 1: 108-20.
247. Motley ED, Eguchi K, Patterson MM, Palmer PD, Suzuki H, Eguchi S (2007). Mechanism of endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and activation by thrombin. *Hypertension* 49(3): 577-83.
248. Mubarak R (2012). Effect of red bull energy drink on Rat's submandibular salivary glands (Light and Electron microscopic study). *J Amer Sci* 8(1): 366-372.
249. Muntané J, la Mata MD (2010). Nitric oxide and cancer. *World J Hepatol* 2(9): 337-44.

250. Nagueh SF, Appleton CP, Gillebert TC, et al. (2009). Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography. *Eur J Echocardiogr* 10(2): 165-93.
251. Namazi MR (2009). Cytochrome-P450 enzymes and autoimmunity: expansion of the relationship and introduction of free radicals as the link. *J Autoimmune Dis* 6: 4.
252. Nawrot P, Jordan S, Eastwood J, Rotstein J, Hugenholtz A, Feeley M (2003). Effects of caffeine on human health. *Food Addit Contam* 20(1): 1-30.
253. Nelson MT, Biltz GR, Dengel DR (2014). Cardiovascular and ride time-to-exhaustion effects of an energy drink. *J Int Soc Sports Nutr* 11(1): 2.
254. Nicolai SP, Kruidenier LM, Bendermacher BL, et al. (2013) Ginkgo biloba for intermittent claudication. *Cochrane Database Syst Rev* 6 (6):CD006888.
255. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N (2005). Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun* 338(1): 668-76.
256. Ninković V, Ninković S (2012). Poremećaji QT intervala kod pacijenata sa autonomnom dijabetesnom neuropatijom. *Med Čas* 46: 24-9.
257. Nishimura RA, Housmans PR, Hatle LK, Tajik AJ (1989). Assessment of diastolic function of the heart: background and current applications of Doppler echocardiography. Part I. Physiologic and pathophysiologic features. *Mayo Clin Proc* 64(1):71-81.
258. Nishimura RA, Tajik AJ (1997). Evaluation of diastolic filling of left ventricle in health and disease: Doppler echocardiography is the clinician's Rosetta Stone. *J Am Coll Cardiol* 30(1): 8-18.
259. Nonaka H, Tsujino T, Watari Y, Emoto N, Yokoyama M (2001). Taurine prevents the decrease in expression and secretion of extracellular superoxide dismutase induced by homocysteine: amelioration of homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress by taurine. *Circulation* 104(10): 1165-70.
260. Nowak D, Jasionowski A (2016). Analysis of Consumption of Energy Drinks by a Group of Adolescent Athletes. *Int J Environ Res Public Health* 13(8). pii:E768.
261. Ntaios G, Savopoulos C, Grekas D, Hatzitolios A (2009). The controversial role of B-vitamins in cardiovascular risk: An update. *Arch Cardiovasc Dis* 102(12): 847-54.
262. Oakley AJ (2005). Glutathione transferases: new functions. *Curr Opin Struct Biol* 15(6): 16-23.

263. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95(2): 351-8.
264. Olaleru F, Odeigah PGC (2015). Effects of Energy Drink on Sperm Morphology, Haematological Parametres and Behaviour of Adult Male Mice. *Annual Research & Review in Biology* 6(5): 288-96.
265. Olcina GJ, Muñoz D, Timón R, et al. (2006). Effect of caffeine on oxidative stress during maximum incremental exercise. *J Sports Sci Med* 5(4): 621-8.
266. Papamichael CM, Aznaouridis KA, Karatzis EN, et al. (2005). Effect of coffee on endothelial function in healthy subjects: the role of caffeine. *Clin Sci (Lond)* 109(1): 55-60.
267. Park S, Lee Y, Lee JH (2016). Association between energy drink intake, sleep, stress, and suicidality in Korean adolescents: energy drink use in isolation or in combination with junk food consumption. *Nutr J* 15(1): 87.
268. Paşaoğlu H, Ofluoğlu E, Demirtaş C, Hussem A, Paşaoğlu OT (2011). The effect of caffeine on oxidative stress in liver and heart tissues of rats. *Turk J Med Sci* 41(4): 665-71.
269. Pasipoularides A (2013). Right and left ventricular diastolic pressure-volumerelations: a comprehensive review. *J Cardiovasc Transl Res* 6(2): 239-52.
270. Patel RP, McAndrew J, Sellak H, et al. (1999). Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta* 1411(2-3): 385-400.
271. Pérez-López A, Salinero JJ, Abian-Vicen J, et al. (2015). Caffeinated energy drinks improve volleyball performance in elite female players. *Med Sci Sports Exerc* 47(4): 850-6.
272. Petersen SV, Oury TD, Valnickova Z, Thøgersen IB, Højrup P, Crapo JD, Enghild JJ (2003). The dual nature of human extracellular superoxide dismutase: one sequence and two structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(24): 13875-80.
273. Pick E, Keisari Y (1980). A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 38(1-2): 161-70.
274. Pisoschi AM, Pop A (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem* 97: 55-74.

275. Pitocco D, Zaccardi F, Di Stasio E, et al. (2010). Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *Rev Diabet Stud* 7(1): 15-25.
276. Polat N, Ardiç I, Akkoyun M, Vuruşkan E (2013). Spontaneous coronary artery dissection in a healthy adolescent following consumption of caffeinated "energy drinks". *Turk Kardiyol Dern Ars* 41(8): 738-42.
277. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* 66(8): 1499-503.
278. Pray L, Pankevich D, Yaktine A (IOM, Institute of Medicine) (2014). *Caffeine in Food and Dietary Supplements: Examining Safety: Workshop Summary*. Washington DC: The National Academies Press.
279. Ragsdale FR, Gronli TD, Batool N, et al. (2010). Effect of Red Bull energy drink on cardiovascular and renal function. *Amino Acids* 38(4): 1193-200.
280. Rahnema N, Gaeini AA, Kazemi F (2010). The effectiveness of two energy drinks on selected indices of maximal cardiorespiratory fitness and blood lactate levels in male athletes. *J Res Med Sci* 15(3): 127-32.
281. Rains JL, Jain SK (2011). Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med* 50(5): 567-75.
282. Raitakari OT, Celermajer DS (2000). Flow-mediated dilatation. *Br J Clin Pharmacol* 50(5): 397-404.
283. Ramanathan T, Skinner H (2005): Coronary blood flow. *Cont Educ Anaesth Crit Care Pain* 5 (2): 61-64.
284. Ramesh T, Kim SW, Hwang SY, Sohn SH, Yoo SK, Kim SK (2012). Panax ginseng reduces oxidative stress and restores antioxidant capacity in aged rats. *Nutr ResSep* 32(9): 718-26.
285. Rath M (2012). Energy drinks: what is all the hype? The dangers of energy drink consumption. *J Am Acad Nurse Pract* 24(2): 70-6.
286. Rehman S, Rehman A. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; Treasure Island (FL): Jan 13, 2019. Physiology, Coronary Circulation.
287. Reis R, Charehsaz M, Sipahi H, et al. (2017). Energy Drink Induced Lipid Peroxidation and Oxidative Damage in Rat Liver and Brain When Used Alone or Combined with Alcohol. *J Food Sci* 82(4):1037-43.

288. Reissig CJ, Strain EC, Griffiths RR (2009). Caffeinated energy drinks--a growing problem. *Drug Alcohol Depend* 99(1-3): 1-10.
289. Reynolds JC, Salcido DD, Menegazzi JJ (2010). Coronary perfusion pressure and return of spontaneous circulation after prolonged cardiac arrest. *Prehosp Emerg Care* 14(1): 78-84.
290. Ricciutelli M, Caprioli G, Cortese M, et al. (2014). Simultaneous determination of taurine, glucuronolactone and glucuronic acid in energy drinks by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (triple quadrupole). *J Chromatogr A* 1364: 303-7.
291. Ridnour LA, Thomas DD, Mancardi D, et al. (2004). The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biol Chem* 385(1): 1-10.
292. Ripps H, Shen W (2012). Review: taurine: a "very essential" amino acid. *Mol Vis* 18: 2673-86.
293. Roberts LJ 2nd, Fessel JP, Davies SS (2005). The biochemistry of the isoprostane, neuroprostane, and isofuran Pathways of lipid peroxidation. *Brain Pathol* 15(2): 143-8.
294. Rodriguez, D. Left Ventricular Pressure-Volume Analysis: An Example of Function Assessment on a Sheep. Ph.D. Thesis, Université Paris Sud, Paris, France, 2015.
295. Rosendorff C (2005). *Essential Cardiology: Principles and Practice*. 2nd Edn., Humana Press, Totowa, New York, p53.
296. Rotstein J, Barber J, Strowbridge C, Hayward S, Huang R, Godefroy SB (2013). Energy Drinks: An Assessment of the Potential Health Risks in the Canadian Context. *International Food Risk Analysis Journal* 3 (5): 1-29.
297. Ruttkay-Nedecky B, Nejdil L, Gumulec J, et al. (2013). The role of metallothionein in oxidative stress. *Int J Mol Sci* 14(3): 6044-66.
298. Sadowska J (2012). Evaluation of the effect of consuming an energy drink on the concentration of glucose and triacylglycerols and on fatty tissue deposition. A model study. *Acta Sci Pol Technol Aliment* 11(3): 311-8.
299. Sakulsak N (2012). Metallothionein: an overview on its metal homeostatic regulation in mammals. *Int. J. Morphol* 30(3): 1007-12.

300. Sanchis-Gomar F, Pareja-Galeano H, Cervellin G, Lippi G, Earnest CP (2015). Energy drink overconsumption in adolescents: implications for arrhythmias and other cardiovascular events. *Can J Cardiol* 31(5): 572-5.
301. Sauve AA (2008). NAD⁺ and vitamin B3: from metabolism to therapies. *J Pharmacol Exp Ther* 324(3): 883-93.
302. Scandalios JG (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res*;38(7):995-1014.
303. Schaffer SW, Azuma J, Mozaffari M (2009). Role of antioxidant activity of taurine in diabetes. *Can J Physiol Pharmacol* 87(2): 91-9.
304. Schaffer SW, Shimada K, Jong CJ, Ito T, Azuma J, Takahashi K (2014). Effect of taurine and potential interactions with caffeine on cardiovascular function. *Amino Acids* 46(5): 1147-57.
305. Schelbert HR (2010). Anatomy and physiology of coronary blood flow. *J Nucl Cardiol* 17(4): 545-54.
306. Schimpl FC, da Silva JF, Gonçalves JF, Mazzafera P (2013). Guarana: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. *J Ethnopharmacol* 150(1): 14-31.
307. Schmidt HD, Hoppe H, Muller KD (1979). The effect of changes in cardiac frequency on left and right ventricular dP/dtmax at different contractile states of the myocardium. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 42(3): 183-98.
308. Schneider CD, Oliveira AR (2004). Oxygen free radicals and exercise: mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training [in Brazilian Portuguese]. *Rev Bras Med Esporte*, 10(4): 308-13.
309. Scientific Committee on Food (SCF). European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General. Opinion of the Scientific Committee on Food on additional information on “energy” drinks. Published March 5, 2003. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out169_en.pdf.
310. Scott MJ, El-Hassan M, Khan AA (2011). Myocardial infarction in a young adult following the consumption of a caffeinated energy drink. *BMJ Case Rep* 2011.
311. Seifert SM, Schaechter JL, Hershorin ER, Lipshultz SE (2011). Health effects of energy drinks on children, adolescents, and young adults. *Pediatrics* 127(3): 511-28.

312. Shah R, Gholkar G, Steigerwalt S, Machado S (2016). Evaluation of Hemodynamic and Electrocardiographic Effects of an Energy Drink in Healthy Adults. *The Journal of Innovations in Cardiac Rhythm Management* 7: 2330–35.
313. Shah SA, Chu BW, Lacey CS, Riddock IC, Lee M, Dargush AE (2016). Impact of Acute Energy Drink Consumption on Blood Pressure Parameters: A Meta-analysis. *Ann Pharmacother* 50(10): 808-15.
314. Shah SA, Dargush AE, Potts V, et al. (2016). Effects of Single and Multiple Energy Shots on Blood Pressure and Electrocardiographic Parameters. *Am J Cardiol* 117(3): 465-8.
315. Shah SA, Lacey CS, Bergendahl T, Kolasa M, Riddock IC (2014). QTc interval prolongation with high dose energy drink consumption in a healthy volunteer. *Int J Cardiol* 172(2): e336-7.
316. Shah SA, Occiano A, Nguyen TA, et al. (2016a). Electrocardiographic and blood pressure effects of energy drinks and Panax ginseng in healthy volunteers: A randomized clinical trial. *Int J Cardiol*. 218: 318-23.
317. Shearer J, Graham TE (2014). Performance effects and metabolic consequences of caffeine and caffeinated energy drink consumption on glucose disposal. *Nutr Rev* 72 (Suppl 1): 121-36.
318. Shebis Y, Iluz D, Kinel-Tahan Y, Dubinsky Z, Yehoshua Y (2013). Natural Antioxidants: Function and Sources. *Food Nutri Sci* 4: 643-9.
319. Shi X, Xue W, Liang S, Zhao J, Zhang X (2016). Acute caffeine ingestion reduces insulin sensitivity in healthy subjects: a systematic review and meta-analysis. *Nutr J* 15(1): 103.
320. Sirdah MM (2015). Protective and therapeutic effectiveness of taurine in diabetes mellitus: a rationale for antioxidant supplementation. *Diabetes Metab Syndr* 9(1): 55-64.
321. Smit HJ, Cotton JR, Hughes SC, Rogers PJ (2004). Mood and cognitive performance effects of "energy" drink constituents: caffeine, glucose and carbonation. *Nutr Neurosci* 7(3): 127-39.
322. Solarska K, Lewińska A, Karowicz-Bilińska A, Bartosz G (2010). The antioxidant properties of carnitine in vitro. *Cell Mol Biol Lett* 15(1): 90-7.

323. Solomin D, Borron SW, Watts SH (2015). STEMI Associated with Overuse of Energy Drinks. *Case Rep Emerg Med* 2015: 537689.
324. Speed N, Blair IA (2011). Cyclooxygenase- and lipoxygenase-mediated DNA damage. *Cancer Metastasis Rev* 30(3-4):4 37-47.
325. Spinneker A, Sola R, Lemmen V, Castillo MJ, Pietrzik K, González-Gross M (2007). Vitamin B6 status, deficiency and its consequences--an overview. *Nutr Hosp* 22(1): 7-24.
326. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258(5090): 1898-902.
327. Steinke L, Lanfear DE, Dhanapal V, Kalus JS (2009). Effect of "energy drink" consumption on hemodynamic and electrocardiographic parameters in healthy young adults. *Ann Pharmacother* 43(4): 596-602.
328. Stocker R, Keaney JF Jr (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 84(4): 1381-478.
329. Stough C, Simpson T, Lomas J, et al. (2014). Reducing occupational stress with a B-vitamin focussed intervention: a randomized clinical trial: study protocol. *Nutr J* 13(1): 122.
330. Strohm D, Bechthold A, Isik N, Leschik-Bonnet E, Hesecker H (2016). Revised reference values for the intake of thiamin (vitamin B1), riboflavin (vitamin B2), and niacin. *NFS Journal* 3: 20-4.
331. Suhrcke M, Luzi L (2012). The supply side of alcoholic and non-alcoholic beverages with potentially particular appeal to minors. Health effects, market share and possible regulations, within the HAPI Consortium project. In Anderson P, Suhrcke M, Brookes C. An overview of the market for alcohol beverages of potentially particular appeal to minors. London: HAPI.
332. Sun Q, Wang B, Li Y, et al. (2016). Taurine Supplementation Lowers Blood Pressure and Improves Vascular Function in Prehypertension: Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Hypertension* 67(3):541-9.
333. Svatikova A, Covassin N, Somers KR, Somers KV, Soucek F, Kara T, Bukartyk J (2015). A Randomized Trial of Cardiovascular Responses to Energy Drink Consumption in Healthy Adults. *JAMA* 314(19): 2079-82.

334. Szarka A, Tomasskovic B, Bánhegyi G (2012). The ascorbate-glutathione- α -tocopherol triad in abiotic stress response. *Int J Mol Sci* 13(4): 4458-83.
335. Tamamoto LC, Schmidt SJ, Lee SY (2010). Sensory profile of a model energy drink with varying levels of functional ingredients-caffeine, ginseng, and taurine. *J Food Sci* 75(6): S271-8.
336. Tamura S, Tsutsumi S, Ito H, Nakai K, Masuda M (1968). Effects of glucuronolactone and the other carbohydrates on the biochemical changes produced in the living body of rats by hard exercise. *Jpn J Pharmacol* 18(1):30-8.
337. Tappaz ML (2004). Taurine biosynthetic enzymes and taurine transporter: molecular identification and regulations. *Neurochem Res* 29: 83-96.
338. Taş S, Sarandöl E, Dirican M (2014). Vitamin B6 supplementation improves oxidative stress and enhances serum paraoxonase/arylesterase activities in streptozotocin-induced diabetic rats. *ScientificWorldJournal* 2014: 351598.
339. Tek M, Toptas O, Akkas I, et al. (2014). Effects of energy drinks on soft tissue healing. *J Craniofac Surg* 25(6): 2084-8.
340. Terlizzi R, Rocchi C, Serra M, Solieri L, Cortelli P (2008). Reversible postural tachycardia syndrome due to inadvertent overuse of Red Bull. *Clin Auton Res* 18(4): 221-3.
341. Thangasamy T, Jeyakumar P, Sittadjody S, Joyee AG, Chinnakannu P (2009). L-carnitine mediates protection against DNA damage in lymphocytes of aged rats. *Biogerontology* 10(2): 163-72.
342. Thorlton J, Colby DA (2018). Energy Drink Adverse Effects: What Is Being Done to Protect Public Health? *West J Nurs Res* 40(1):3-4.
343. Toro J, Rodrigo R (2009). Oxidative Stress: Basic Overview. In: Rodrigo R (Ed) *Oxidative Stress and Antioxidants-Their Role in Human Disease*. New York: Nova Biomedical Books, pp 1-24.
344. Trabulo D, Marques S, Pedroso E (2011). Caffeinated energy drink intoxication. *BMJ Case Rep* 2:2011.
345. Tso C, Currie GM, Gilmore D, Kiat H (2015). Electrocardiography: A Technologist's Guide to Interpretation. *J Nucl Med Technol* 43(4): 247-52.

346. Turrens JF (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552(Pt 2): 335-44.
347. Ugwuja EI (2014). Biochemical effects of energy drinks alone or in combination with alcohol in normal albino rats. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 4(1): 69–74.
348. Umaña-Alvarado M, Moncada-Jiménez J (2005). Consumption of an ‘Energy Drink’ does not Improve Aerobic Performance in Male Athletes. *International Journal of Applied Sports Sciences* 17: 26–34.
349. Umemura T, Ueda K, Nishioka K, et al. (2006). Effects of acute administration of caffeine on vascular function. *Am J Cardiol* 98(11): 1538-41.
350. Ünal S, Şensoy B, Yilmaz S, et al. (2015). Left main coronary artery thrombosis and acute anterior myocardial infarction related to energy drink. *Int J Cardiol* 179: 66-7.
351. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 266(1-2): 37-56.
352. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1): 44-84.
353. Valle MTC, Couto-Pereira NS, Lampert C, et al., (2018). Energy drinks and their component modulate attention, memory, and antioxidant defences in rats. *Eur J Nutr* 57(7):2501-11.
354. van Haaften RI, Haenen GR, Evelo CT, Bast A (2003). Effect of vitamin E on glutathione-dependent enzymes. *Drug Metab Rev* 35(2-3): 215-53.
355. Verster JC, Benson S, Johnson SJ, Alford C, Godefroy SB, Scholey A (2018). Alcohol mixed with energy drink (AMED): A critical review and meta-analysis. *Hum Psychopharmacol* 33(2): e2650.
356. Villars PS, Hamlin SK, Shaw AD, Kanusky JT (2004). Role of diastole in left ventricular function, I: Biochemical and biomechanical events. *Am J Crit Care* 13(5): 394-403.
357. Virtanen H. Abstract #1046. Presented at: World Diabetes Congress; Nov. 30-Dec. 4, 2015; Vancouver, British Columbia. -
<http://ucalgary.ca/achdiabetes/files/achdiabetes/caf-poster.pdf>

358. Visram S, Crossley SJ, Cheetham M, Lake A (2017). Children and young people's perceptions of energy drinks: A qualitative study. *PLoS One* 12(11): e0188668.
359. Voces J, Cabral de Oliveira AC, Prieto JG, et al. (2004). Ginseng administration protects skeletal muscle from oxidative stress induced by acute exercise in rats. *Braz J Med Biol Res* 37(12): 1863-71.
360. Walaszek Z, Szemraj J, Narog M, et al. (1997). Metabolism, uptake, and excretion of a D-glucaric acid salt and its potential use in cancer prevention. *Cancer Detect Prev* 21(2):178-90.
361. Walker LM, York JL, Imam SZ, Ali SF, Muldrew KL, Mayeux PR (2001). Oxidative stress and reactive nitrogen species generation during renal ischemia. *Toxicol Sci* 63(1): 143-8.
362. Walley KR (2016). Left ventricular function: time-varying elastance and left ventricular aortic coupling. *Crit Care* 20: 270.
363. Wang GR, Zhu Y, Halushka PV, Lincoln TM, Mendelsohn ME (1998). Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: in vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(9): 4888-93.
364. Wang X, Fang H, Huang Z, et al (2013). Imaging ROS signaling in cells and animals. *J Mol Med (Berl)* 91(8): 917-27.
365. Wang X, Hai C (2016). Novel insights into redox system and the mechanism of redox regulation. *Mol Biol Rep* 43(7): 607-28.
366. Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol* 217(6):1915-28.
367. Wassef B, Kohansieh M, Makaryus AN (2017). Effects of energy drinks on the cardiovascular system. *World J Cardiol* 9(11): 796-806.
368. Weidinger A, Kozlov AV (2015). Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules* 5(2): 472-84.
369. Whitsett TL, Manion CV, Christensen HD (1984). Cardiovascular effects of coffee and caffeine. *Am J Cardiol* 53(7): 918-22.

370. Wiklund U, Karlsson M, Oström M, Messner T (2009). Influence of energy drinks and alcohol on post-exercise heart rate recovery and heart rate variability. *Clin Physiol Funct Imaging* 29(1): 74-80.
371. Wilson RE, Kado HS, Samson R, Miller AB (2012). A case of caffeine-induced coronary artery vasospasm of a 17-year-old male. *Cardiovasc Toxicol* 12(2): 175-9.
372. Wink DA, Mitchell JB (1998). Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 25(4-5): 434-56.
373. Woerlee GM (1988). Common perioperative problems and the anaesthetist. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, p 68.
374. Wójcik OP, Koenig KL, Zeleniuch-Jacquotte A, Costa M, Chen Y (2010). The potential protective effects of taurine on coronary heart disease. *Atherosclerosis* 208: 19-25.
375. Worthley MI, Prabhu A, De Sciscio P, Schultz C, Sanders P, Willoughby SR (2010). Detrimental effects of energy drink consumption on platelet and endothelial function. *Am J Med* 123(2): 184-7.
376. www.nfhs.org/media/1014749/nfhs-smac-position-statement-for-use-of-energy-drinks-october-2014.pdf
377. Yang CP, Lin MT (1983). Amino acids injected into the cerebroventricular system induce an enhancement of reflex bradycardia in the rat. *Neuropharmacology* 22 (7): 919-22.
378. Yang Y, Sharma R, Sharma A, Awasthi S, Awasthi YC (2003). Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. *Acta Biochim Pol* 50(2): 319-36.
379. Yen HC, Wei HJ, Chen TW (2013). Analytical variables affecting analysis of F2-isoprostanes and F4-neuroprostanes in human cerebrospinal fluid by gas chromatography/mass spectrometry. *Biomed Res Int* 2013: 810915.
380. Yoshida Y, Umeno A, Shichiri M (2013). Lipid peroxidation biomarkers for evaluating oxidative stress and assessing antioxidant capacity in vivo. *J Clin Biochem Nutr* 52(1): 9-16.

381. Yukawa GS, Mune M, Otani H, et al. (2004). Effects of coffee consumption on oxidative susceptibility of low-density lipoproteins and serum lipid levels in humans. *Biochemistry (Mosc)* 69(1): 70-4.
382. Yunusa I, Ahmed IM (2011). Energy drinks: composition and health benefits. *Bayero J Pure Applied Sci* 4:186-91.
383. Zeidán-Chuliá F, Gelain DP, Kolling EA, et al. (2013). Major components of energy drinks (caffeine, taurine, and guarana) exert cytotoxic effects on human neuronal SH-SY5Y cells by decreasing reactive oxygen species production. *Oxid Med Cell Longev* 2013: 791795.
384. Zeraatpishe A, Malekirad AA, Nik-Kherad J, Jafari A, Yousefi Babadi S, Tanwir F, Espanani HR (2015). The Effects of Caffeine Supplements on Exercise-Induced Oxidative Damages. *Asian J Sports Med* 6(4): e23023.
385. Zhang M, Izumi I, Kagamimori S, et al. (2004). Role of taurine supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress in healthy young men. *Amino Acids* 26(2): 203-7.
386. Zheng B, Xing G, Bi Y, et al., (2016). Comparative pharmacokinetics of a proliposome formulation of Ginkgo biloba extract and Ginaton in rats by a sensitive ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *Saudi J Biol Sci* 23(1): 54-65.
387. Zhou W, Chai H, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, Chen C (2004). Clinical use and molecular mechanisms of action of extract of Ginkgo biloba leaves in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Drug Rev* 22(4): 309-19.
388. Zimmer HG (2002). Who discovered the Frank-Starling mechanism? *News Physiol Sci* 17: 181-4.
389. Zulli A, Smith RM, Kubatka P, et al. (2016). Caffeine and cardiovascular diseases: critical review of current research. *Eur J Nutr* 55(4): 1331-43.
390. Ђорђевић Д (2011). Утицај тренажног статуса на морфофункционалне карактеристике и редокс равнотежу код младих рукометаша. Докторска дисертација. Медицински факултет, Србија: Универзитет у Крагујевцу
391. Живковић В (2014). Ефекти хомоцистеина и супстанци сродних хомоцистеину на кардиодинамику и коронарни проток изолованог срца пацова: улога гасних

трансмitera и оксидационог стреса. Докторска дисертација, Универзитет у Крагујевцу: Факултет медицинских наука.

392. Здравковић М. Стања и болести у спорту по системима. У: Јаковљевић В & Дикић Н. Спортска медицина. Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, 2016.

VIII

СПИСАК

СКРАЋЕНИЦА

NO_2 - азот диоксид

NO – азот моноксид

$^1\text{O}_2$ - синглет кисеоник

AmEDs - *alcohol mixed with energy drinks*

АТФ – аденозин трифосфат

BH_4 - тетрахидробиоптерин

cAMP - циклични аденозин монофосфат

CAT – каталаза

CF - коронарни проток

cGMP- циклични гуанозин монофосфат

СРР - коронарни перфузиони притисак

CuZn-SOD - бакар-цинк садржавајућа супероксид дисмутаза

DLVP - дијастолни притисак леве коморе

dp/dt max - максимална стопа промене притиска у левој комори

dp/dt min - минимална стопа промене притиска у левој комори

DTNB - 5,5–дитио–бис–6,2–нитробензеова киселина

EC-SOD - екстрацелуларна супероксид дисмутаза

EDPVR - *end-diastolic pressure-volume relationship*, однос притиска и волумена на крају дијастоле

EDTA - *Ethylenediaminetetraacetic Acid*

Ees - енд-сistolна еластанца

eNOS или NOS III - ендотелна синтаза азот монооксида

ESPVR - *end-systolic pressure-volume relationship*

FAD - флавин аденин динуклеотид

FMD - flow mediated dilation, протоком посредована вазодилатација

FMN - флавин мононуклеотид

GABA - γ -аминобутерна киселина

GPx - глутатион пероксидаза

GR - глутатион-редуктаза

GS^\cdot - тилил радикал

GSH - редуковани глутатион

GSSG - оксидовани глутатион (глутатион дисулфид)
GST - глутатион-S-трансфераза
H₂O₂ - водоник пероксид
HCl - хлороводонична киселина
HDL холестерол - high-density lipoprotein cholesterol, липопротеини високе густине
HNE - 4-хидрокси 2-ноненал
HO₂[·] - хидропероксил радикал
HOCl – хипохлорна киселина
HR - срчана фреквенца
HRPO - Horseradish peroxidase (пероксидаза из коњске ротквице)
iNOS или NOS II - индуцибилна синтаза азот монооксида
L[·] - алкил радикал
LDL холестерол - low-density lipoprotein cholesterol, липопротеини ниске густине
LO[·] - алкоксил радикал
LOO[·] - пероксил радикал
LOOH - липидни хидропероксиди
MDA - малонилалдехид
Mn-SOD - манган садржавајућа супероксид дисмутаза
NAD - никотинамид аденин динуклеотид
NADP - никотинамид аденин динуклеотид фосфат
NBT - *Nitro Blue Tetrazolium*, нитро тетразолијум плавим
NEDA - N-(1-нафтил) - етилендиамин дихидрохлорид
nNOS или NOS I - неуронска синтаза азот монооксида
NO₂⁻ - нитрити
NO₃⁻ - нитрати
NOS - синтаза азот монооксида
NO⁻ - нитроксил анјон
NO⁺ - нитрозонијум катјон
O₂ - молекулски кисеоник
O₂^{-·} - супероксид анјон радикал
OH[·] - хидроксил радикал

ONOO ⁻	-	пероксинитрити	
PRS	-	<i>Phenol Red Solution</i> , раствор фенол црвеног	
PRSW	-	Preload recruitable stroke work	
PUFA	-	полинезасићене масне киселине (<i>polyunsaturated fatty acid</i> ,)	
QTc интервал	-	кориговани QT интервал	
RB	-	Red Bull [®]	
RNS	-	<i>reactive nitrogen species</i> , реактивне азотне врсте	
ROS	-	<i>reactive oxygen species</i> , реактивне кисеоничне врсте	
RONS	-	<i>Reactive Oxygen and Nitrogen Species</i> , реактивне врсте кисеоника и азота	
sGC	-	солубилна гуанилил циклаза	
SLVP	-	сistolни притисак леве коморе	
SOD	-	супероксид дисмутаза	
TBA	-	<i>Thiobarbituric Acid</i> , тиобарбитурна киселина	
TBARS	-	<i>thiobarbituric acid reactive substances</i> , индекс липидне пероксидације	
TRIS	-	Трис (хидроксиметил) аминометан	
TRIS-HCl	-	<i>Trichloro Acetic Acid</i>	
tRNK	-	транспортна рибонуклеинска киселина	
Vcf	-	средња стопа циркумферентног скраћења миокардних влакана	
A1, A2A, A2B и A3	-	аденозински рецептори	
ADP	-	аденозин дифосфат	
Asp	-	апсорбанца слепе пробе	
Au	-	апсорбанца узорка	
ДНК	-	дезоксирибонуклеинске киселине	
ЕКГ	-	електрокардиограм	
ЕП	-	енергетско пиће	
РНК	-	рибонуклеинска	киселина

