



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

**ЕФЕКТИ МОДУЛАЦИЈЕ N-МЕТИЛ-D-  
АСПАРТАТНИХ РЕЦЕПТОРА НА ИЗОЛОВАНОМ  
СРЦУ ПАЦОВА**

**ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА**

**др Иван Срејовић**

**Крагујевац, 2016. године**

**САДРЖАЈ**

1. УВОД .....	7
1.1 N-МЕТИЛ-D-АСПАРТАТНИ РЕЦЕПТОРИ И ЊИХОВА УЛОГА У ОРГАНИЗМУ. 8	
1.1.1 ВРСТЕ И ОСОБИНЕ ЈОНОТРОПНИХ ГЛУТАМАТНИХ РЕЦЕПТОРА.....	8
1.1.2 СТРУКТУРА NMDA РЕЦЕПТОРА.....	10
1.1.3 КОНТРОЛА ОТВАРАЊА NMDA РЕЦЕПТОРА .....	13
1.1.4 АЛОСТЕРНА РЕГУЛАЦИЈА.....	15
1.1.5 АГОНИСТИ И АНТАГОНИСТИ NMDA РЕЦЕПТОРА .....	22
1.1.6 УЛОГА МАГНЕЗИЈУМА У РЕГУЛАЦИЈИ ФУНКЦИЈЕ NMDA РЕЦЕПТОРА	26
1.1.7 NMDA РЕЦЕПТОРИ И ЦЕНТРАЛНИ НЕРВНИ СИСТЕМ .....	28
1.1.8 NMDA РЕЦЕПТОРИ И КАРДИОВАСКУЛАРНИ СИСТЕМ.....	31
1.1.9 NMDA РЕЦЕПТОРИ И ХОМОЦИСТЕИН.....	34
1.2 СЛОБОДНИ РАДИКАЛИ И РЕДОКС РАВНОТЕЖА .....	35
1.2.1 СЛОБОДНИ РАДИКАЛИ.....	35
1.2.2 СЛОБОДНИ РАДИКАЛИ И КАРДИОВАСКУЛАРНИ СИСТЕМ .....	38
1.2.3 ПОЈЕДИНИ ОБЛИЦИ РЕАКТИВНИХ ВРСТА КИСЕОНИКА - ROS И АЗОТА - -RNS .....	40
1.2.4 ЛИПИДНА ПЕРОКСИДАЦИЈА .....	46
1.2.5 МЕХАНИЗМИ АНТИОКСИДАЦИОНЕ ЗАШТИТЕ.....	48
2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА.....	54
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	56
3.1 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛ .....	57
3.1.1 Историјски осврт.....	57
3.1.2 Модели ретроградне перфузије: перфузија при константном притиску и перфузија при константном протоку .....	58
3.1.3 <i>Langendorff</i> апарат LF-01 F-P.....	59

3.2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ.....	61
3.3 БИОХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ.....	64
3.3.1 Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS) .....	64
3.3.2 Одређивање нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) .....	65
3.3.3 Одређивање супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ ).....	67
3.3.4 Одређивање водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).....	68
3.4 СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА.....	69
3.5 МАТЕРИЈАЛ.....	70
3.5.1 Реагенаси за припремање Крепс-Хенселејтовог ( <i>Krebs-Hensenleit</i> ) перфузионог раствора: .....	70
3.5.2 Реагенси за одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS): .....	70
3.5.3 Реагенси за одређивање азот-моноксида (NO) у облику нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ): .....	70
3.5.4 Реагенси за одређивање супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ ): .....	70
3.5.5 Реагенси за одређивање водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ):.....	71
4. РЕЗУЛТАТИ.....	72
4.1. ЕФЕКТИ МОДУЛАЦИЈЕ NMDA РЕЦЕПТОРА НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА .....	73
4.1.1. ДЕЈСТВО ГЛУТАМАТА ( $100 \mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА .....	73
4.1.2. ДЕЈСТВО ГЛИЦИНА ( $100 \mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА .....	75
4.1.3. ДЕЈСТВО КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ ГЛУТАМАТА ( $100 \mu\text{mol/l}$ ) И ГЛИЦИНА ( $100 \mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА.....	77
4.1.4. ДЕЈСТВО МК-801 ( $50 \mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА .....	79

4.1.5. ДЕЈСТВО КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ МК-801 (50 $\mu\text{mol/l}$ ) И ГЛУТАМАТА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА.....	81
4.1.6. ДЕЈСТВО КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ МК-801 (50 $\mu\text{mol/l}$ ) И ГЛИЦИНА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА.....	83
4.1.7. ДЕЈСТВО КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ МК-801 (50 $\mu\text{mol/l}$ ), ГЛУТАМАТА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) И ГЛИЦИНА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА .....	85
4.1.8. ДЕЈСТВО ВЕРАПАМИЛА (3 $\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА .....	87
4.1.9. ДЕЈСТВО КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ ВЕРАПАМИЛА (3 $\mu\text{mol/l}$ ) И ГЛУТАМАТА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА.....	89
4.1.10. ДЕЈСТВО КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ ВЕРАПАМИЛА (3 $\mu\text{mol/l}$ ) И ГЛИЦИНА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА.....	92
4.1.12. ДЕЈСТВО <i>N</i> -МЕТИЛ- <i>D</i> -АСПАРТАТА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА .....	98
4.1.13. ДЕЈСТВО DL-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА.....	100
4.1.14. ДЕЈСТВО МЕМАНТИН ХИДРОХЛОРИДА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА.....	103
4.1.15. ДЕЈСТВО ИФЕНПРОДИЛ ТАРТАРАТА (1 $\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА .....	105
4.2. ЕФЕКТИ МОДУЛАЦИЈЕ NMDA РЕЦЕПТОРА НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА.....	107
4.2.1. ДЕЈСТВО ГЛУТАМАТА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА .....	107
4.2.2. ДЕЈСТВО ГЛИЦИНА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА .....	109

4.2.3. ДЕЈСТВО КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ ГЛУТАМАТА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) И ГЛИЦИНА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА.....	111
4.2.4. ДЕЈСТВО МК-801 (50 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА.....	113
4.2.5. ДЕЈСТВО КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ МК-801 (50 $\mu\text{mol/l}$ ) И ГЛУТАМАТА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА .....	115
4.2.6. ДЕЈСТВО КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ МК-801 (50 $\mu\text{mol/l}$ ) И ГЛИЦИНА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА .....	117
4.2.7. ДЕЈСТВО КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ МК-801 (50 $\mu\text{mol/l}$ ), ГЛУТАМАТА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) И ГЛИЦИНА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА .....	119
4.2.8. ДЕЈСТВО ВЕРАПАМИЛА (3 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА .....	121
4.2.9. ДЕЈСТВО КОМБИНОВАНЕ ВЕРАПАМИЛА (3 $\mu\text{mol/l}$ ) И ГЛУТАМАТА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА .....	123
4.2.10. ДЕЈСТВО КОМБИНОВАНЕ ВЕРАПАМИЛА (3 $\mu\text{mol/l}$ ) И ГЛИЦИНА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА .....	125
4.2.11. ДЕЈСТВО КОМБИНОВАНЕ ВЕРАПАМИЛА (3 $\mu\text{mol/l}$ ), ГЛУТАМАТА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) И ГЛИЦИНА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА .....	127
4.2.12. ДЕЈСТВО <i>N</i> -МЕТИЛ- <i>D</i> -АСПАРТАТА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА.....	129
4.2.13. ДЕЈСТВО DL-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА .	131
4.2.14. ДЕЈСТВО МЕМАНТИН ХИДРОХЛОРИДА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА.....	133
4.2.15. ДЕЈСТВО ИФЕНПРОДИЛ ТАРТАРАТА (1 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА.....	135

5. ДИСКУСИЈА.....	137
6. ЗАКЉУЧЦИ .....	149
7. РЕФЕРЕНЦЕ .....	152

# **1. УВОД**

## 1.1 N-МЕТИЛ-D-АСПАРТАТНИ РЕЦЕПТОРИ И ЊИХОВА УЛОГА У ОРГАНИЗМУ

### 1.1.1 ВРСТЕ И ОСОБИНЕ ЈОНОТРОПНИХ ГЛУТАМАТНИХ РЕЦЕПТОРА

*N*-метил-*D*-аспартатни (NMDA) рецептори припадају групи јонотропних глутаматних рецептора, заједно са  $\alpha$ -амино-3-хидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионатним (AMPA), каинатним рецепторима и  $\delta$  рецепторима. Јонотропни глутаматни рецептори посредују у ексцитаторној синаптичкој трансмисији отварањем лиганд-зависних трансмембранских јонских канала, који су разврстани на основу својих фармаколошких својстава. Такође, сви јонотропни глутаматни рецептори су по структури интегрални мембрански протеини који су изграђени од четири велике субјединице које образују централни канал. Свака од субјединица глутаматних рецептора садржи четири домена: велики ванћелијски аминоксид терминални домен (ATD), који има кључну улогу у организацији рецептора (која је особена за подтип), транспорту и модулацији; ванћелијски лиганд-везујући домен (LBD), који везује специфичне агонисте и антагонисте; трансмембрански домен (TMD), који образује канал који се пружа кроз мембрану; и унутарћелијски карбокси терминални домен (CTD), који учествује у транспорту, покретљивости и регулацији рецептора (1, 2). Повезивањем трансмембранских домена (TMD) четири субјединице образује се један јонски канал, при чему су додирне површине између TMD знатно веће у односу на остале домене, што указује на снажан утицај јонског канала на стабилност тетрамерне структуре распоређених субјединица. На значај додирних површина TMD указује низ поремећаја, као што су поремећаји олигомеризације субјединица или поремећаји функционалних особина јонских канала (проводљивост, алостерна модулација, пропустљивост за  $\text{Ca}^{2+}$  или блок јонског канала), који настају као последица мутација у овом региону (2).

Све глутаматне рецепторе кодира укупно 18 гена, који се на основу профила везивања лиганда и секвенци нуклеинских киселина могу додатно поделити на седам подгрупа. AMPA и каинатни рецептори, као и GluN2 субјединице NMDA рецептора везују глутамат, док GluN1 и GluN3 субјединице NMDA рецептора и  $\delta$  рецептори везују глицин и *D*-серин (3).



**Табела 1.1** Називи неких субјединица јонотропних глутаматних канала у складу са NC-IUPHAR номенклатуром (1, 4).

Група рецептора	NC-IUPHAR назив субјединице	Назив хуманог гена	Локација на хуманим хромозомима
NMDA	GluN1	<i>GRIN1</i>	9q34.3
	GluN2A	<i>GRIN2A</i>	16p13.2
	GluN2B	<i>GRIN2B</i>	12p12
	GluN2C	<i>GRIN2C</i>	17q25
	GluN2D	<i>GRIN2D</i>	19q13.1
	GluN3A	<i>GRIN3A</i>	9q31.1
	GluN3B	<i>GRIN3B</i>	19p13.3
AMPA	GluA1	<i>GRIA1</i>	5q31.1
	GluA2	<i>GRIA2</i>	4q32–q33
	GluA3	<i>GRIA3</i>	Xq25–q26
	GluA4	<i>GRIA4</i>	11q22
Каинатни	GluK1	<i>GRIK1</i>	21q22.11
	GluK2	<i>GRIK2</i>	6q16.3–q21
	GluK3	<i>GRIK3</i>	1p34–p33
	GluK4	<i>GRIK4</i>	11q22.3
	GluK5	<i>GRIK5</i>	19q13.2
δ рецептори	GluD1	<i>GRID1</i>	10q22
	GluD2	<i>GRID2</i>	4q22

NC-IUPHAR - International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification

Све четири субјединице AMPA рецептора могу да се повезују образујући хомере или хетеромере. Субјединице каинатних рецептора такође могу да образују хомере или хетеромере, при чему субјединице GluK4 и GluK5 формирају функционалне канале само ако су у комбинацији са GluK1, GluK2 или GluK3 субјединицама. Субјединице δ рецептора (GluD1 и GluD2) могу да формирају хомерне рецепторе.

Да би NMDA рецептори били функционални неопходно је да садрже две GluN1 и две GluN2 субјединице, или једну GluN2 и једну GluN3 субјединицу. Пошто GluN1 и GluN3 субјединице везују глицин, а GluN2 глутамат, за активацију NMDA рецептора је неопходно дејство оба ко-агониста (1).

Регулација пропустљивости јонских канала подразумева низ конформационих промена које настају након везивања или отпуштања одговарајућег лиганда. Регистравањем јонских струја у целој ћелији након везивања глутамата као агонисте, утврђена су три одвојена процеса регулације пропустљивости јонских канала: активација, десензитизација и деактивација (2).

### 1.1.2 СТРУКТУРА NMDA РЕЦЕПТОРА

Као што је већ наведено, NMDA рецептори су изграђени од три различите врсте субјединица, које се означавају као GluN1, GluN2 и GluN3. Посттранслационом обрадом РНК за GluN1 настаје осам различитих „*splice*“ варијанти, док GluN2 (A – D) кодира четири, а GluN3(A и B) два различита гена. Функционални NMDA рецептори су хетеротетрамери који садрже две обавезне GluN1 субјединице и још две GluN2 и/или GluN3 субјединице (5).

Комбиновањем различитих GluN1 и GluN2 настају функционално различити типови NMDA рецептора. Различите „*splice*“ варијанте GluN1 детерминишу особине рецептора као што су модулација цинком, полиаминима и протеин киназом C, као везивање за унутарћелијске протеине (калмодулин, калмодулин-зависну протеин киназу II,  $\alpha$ -актинин-2) (6, 7). Врста GluN2 субјединице одређује биофизичке карактеристике канала као што су проводљивост канала, средње време отварања, осетљивост на волтаж-зависну блокаду магнезијумом ( $Mg^{2+}$ ) (7, 8). Комбинација GluN1 и GluN2 субјединица карактерише већу пропустљивост за  $Ca^{2+}$ , што одређује посебне улоге NMDA рецептора, пре свега у централном нервном систему, као што су синаптичка пластичност и неуротоксичност (9).

GluN3 субјединице везују глицин и нису у стању да самостално формирају функционалне јонске канале, комбиновањем GluN1 и GluN3 субјединица настају ексцитаторни рецептори које активира глицин, али овакви рецептори до сада нису откривени у неуронима која садрже GluN3 субјединицу (9, 10). Ако NMDA рецептор поред GluN1 и GluN2, садржи и GluN3A субјединицу, она узрокује смањење проводљивости канала и пропустљивост за  $Ca^{2+}$ , што је потврђено регистравањем јонских

струја које настају активацијом NMDA рецептора у неуронима у којима ови рецептори не садрже GluN3A субјединицу (11).

За сада су предложена три модела за склапање NMDA рецептора. Према првом моделу стварају се стабилни хомодимери GluN1-GluN1 и GluN2-GluN2, који се потом повезују и образују тетрамерни рецептор (12). На основу другог модела, прво се формира стабилни GluN1-GluN1 хомодимер, а затим се додају два GluN2 мономера, чиме настаје тетрамерна структура (13). Према трећем моделу, настају GluN1-GluN2 хетеродимери, који потом тетрамеризују (14). За сада нема довољно података на основу којих би се дала предност неком од предложених модела.

Попут осталих рецептора из ове групе, и субјединице NMDA рецептора се састоје из четири домена: аминокиселински терминални домен (ATD), лиганд-везујући домен (LBD), трансмембрански домен (TMD) и карбокси-терминални домен (CTD).

Ванћелијски лиганд-везујући домен (LBD) образују два ванћелијска низа аминокиселина, која се обележавају као S1 и S2 (15). Сви LBD имају облик „шкољке“, при чему полипептидни сегмент S1, који је повезан са M1 хеликсом трансмембранског домена, образује највећи део једне стране „шкољке“ (D1), а полипептидни сегмент S2, који се налази између M3 и M4 хеликса трансмембранског домена, образује највећи део друге стране „шкољке“ (D2). На тај начин се формира пукотина или „деп“ где се налази место везивања агониста. Одговарајући агонисти, глутамат и глицин у случају NMDA рецептора, садрже групе које се везују за  $\alpha$ -амино и  $\alpha$ -карбоксилне групе у LBD. Делови LBD који образују атомске везе са лигандом су у великој мери слични код свих глутаматних рецептора, и граде их углавном аминокиселински остаци који припадају D1 делу LBD. Везивање агониста за LBD изазива конформационе промене. Изучавањем структурних промена LBD субјединица глутаматних рецептора које су везале агонисту и оних које нису, откривено је да у слободном облику D1 и D2 су раздвојене и заузимају отворенију конформацију, док у везаном облику D1 и D2 заузимају затворенији конформациони облик (1).

Ванћелијски аминокиселински терминални домен (ATD) има улогу у регулацији функције рецептора, и није есенцијалан за повезивање субјединица и изградњу рецептора. Доказано је да ATD GluN2 субјединица NMDA рецептора контролише фармаколошка и кинетичка својства рецептора као што су: афинитет везивања агониста, време деактивирања,

вероватноћа отварања, средње трајање отварања и затварања (16). ATD, такође, садржи и везујућа места за двовалентне катјоне ( $Zn^{2+}$ ) и негативне алостерне модулаторе (ифенпродил), као и ванћелијске протеине (ванћелијски домен ефринских рецептора) (17). Описан је изглед ATD GluN2B субјединице, и слично LBD, има облик „шкољке“ и састоји се из два дела, R1 и R2. Ова два дела образују пукотину која садржи више места: 1) хидрофилно место везивања на спољашњем делу пукотине, изграђено од поларних аминокиселинских остатака који образују место везивања за  $Zn^{2+}$ , 2) хидрофобно место везивања, изграђено од хидрофобних аминокиселинских остатака, које се налази дубоко у самој пукотини и везује ифенпродил, и 3) место које везује јоне  $Na^+$  и  $Cl^-$ , чија улога није у потпуности расветљена (18). N-терминус се налази на врху R1 дела, док је R2 део повезан са LBD.

Трансмембрански домен (TMD) свих глутаматних рецептора је повезан са лиганд-везујућим доменом (LBD) помоћу три кратке везе. TMD садржи три трансмембранска хеликса, који се обележавају са M1, M3 и M4, и петље која улази у мембрану и обележава се као M2. Трансмембрански хеликси, M1, M3 и M4, сваке од четири субјединице рецептора образују трансмембрански канал, M2 петље ограничавају унутрашњу ивицу поре канала, док делови M3 хеликса ограничавају спољашњу ивицу поре канала. Делови M3 хеликса се пружају једни ка другима, вероватно образујући врата која спречавају проток јона када је рецептор неактиван. M1 и M3 хеликси формирају језгро канала, а M4 хеликс једне субјединице остварује везу са M1 и M3 хеликсима друге субјединице. Повезујући регион који се назива *preceding* M1 (*pre-M1*) образује кратак хеликс који је паралелан равни мембране и повезан је са карбокси- и аминоксидним крајевима трансмембранских хеликса M3 и M4. *Pre-M1* хеликси све четири субјединице, које улазе у састав рецептора, образују „манжетну“ око спољашњег отвора поре канала, чиме можда значајно утичу на регулацију канала (1).

Карбокси-терминални домен (CTD) се највише разликује, у погледу аминокиселинског састава, између субјединица које граде различите глутаматне рецепторе. Сматра се да CTD утиче на стабилизацију рецептора, посттранслационе модификације и означавање рецептора за разградњу. Ако се CTD избрише у GluN1 и GluN2A субјединицама не ремети се функција NMDA рецептора, али се мења регулација, јер CTD садржи места фосфорилације и везујућа места за унутарћелијске протеине који

учествују у регулацији функције (19). Готово све субјединице свих глутаматних рецептора везују неке од унутарћелијских протеина (цитоскелетни, везујући, структурни, сигнални и други протеини), при чему се неколико субјединица NMDA рецептора преко CTD повезује са  $\text{Ca}^{2+}$ /калмодулин зависном протеин киназом II, омогућавајући даље ширење локалног сигнала, чиме се омогућава просторна и временска специфичност регулације рецептора. Новије студије сугеришу могућност преношња сигнала преко NMDA рецептора без пропуштања  $\text{Ca}^{2+}$  управо везом између CTD и одговарајућих протеин-киназа (20).

### 1.1.3 КОНТРОЛА ОТВАРАЊА NMDA РЕЦЕПТОРА

Многе студије су се бавиле истраживањем механизма којим везивање лиганда изазива отварање поре глутаматних рецептора. Досадашње схватање функционисања овог механизма засновано је на структурним (крystalографска и NMR) и функционалним (UV и IR спектрометријска) истраживањима лиганд-везујућих домена (LBD) растворљивих у води и функционалних студија целих рецептора. Истраживањима која су доминантно вршена на AMPA и каинатним рецепторима, дошло се до закључка да је механизам везивања агониста и контроле рецептора исти за све подтипове глутаматних рецептора, и укључују најмање три корака који следе у низу: 1) иницијално везивање агонисте за одговарајуће везујуће место, 2) конформациона промена структуре у облику „шкољке“ LBD, чиме се спречава отпуштање агонисте, и 3) конформациона промена и отварање јонског канала коју изазива пропација промена LBD (5, 21-24).

Као што је већ претходно наведено, лиганд-везујући домен (LBD) се састоји из два домена, S1 и S2. Горњи домен, S1, једне субјединице се чврсто повезује са S1 доменом друге субјединице образујући димер LBD, што S1 домене чини врло ригидним. За разлику од тога, доњи S2 домени не учествују у формирању димера и услед тога остају релативно покретљиви (25). Померање доњих S2 домена услед везивања лиганда истовремено делује на везујуће регионе, који повезују LBD и TMD. Структурне особине повезујућих региона су врло битне за обликовање механизма контроле рецептора, а њихова специфичност се посебно огледа у промени двоструке симетрије LBD домена у четвороструку симетрију јонског канала.

И поред бројних студија које се баве кристалографским проучавањем трансмембранских протеина не може се са сигурошћу објаснити механизам контроле и отварања јонског канала NMDA рецептора. Међутим, структурне сличности између глутаматних рецептора и калијумских канала, и доступни подаци о структури калијумских канала у затвореном и отвореном стању, наводе на закључак да се јонски канал отвара ротацијом и померањем у страну дела М3 хеликса који се практично налази на централној оси канала коју образују М2 петље. Улога *pre*-М1, М1 и М4 хеликса још увек нису сасвим јасне (25).

У процесу контроле отварања канала, промене у М3 хеликсу омогућавају проходност централне шупљине канала. Централна шупљина канала ограничава пору која је селективна за јоне и која одређује основне особине канала – пропустљивост за јоне и укупна проводљивост канала. На врху М2 петље се налази QRN место које има кључну улогу у регулацији пропустљивости за  $\text{Ca}^{2+}$ . АМРА и кайнатни рецептори, који на овом месту садрже глутамин, су пропустљиви за  $\text{Ca}^{2+}$ , али током посттранслационе обраде иРНК за GluA2 и GluK1/2, глутамин се мења аргинином, што ове канале чини непропустљивим за  $\text{Ca}^{2+}$  (26). За разлику од наведених рецептора, NMDA рецептори на овом месту садрже аспарагин, што је узрок велике пропустљивости за  $\text{Ca}^{2+}$  у NMDA рецепторима. Наиме, замена аспарагина глутамином у GluN1 субјединици NMDA рецептора, значајно смањује пропустљивост за  $\text{Ca}^{2+}$  и благо смањује блокаду магнезијумом ( $\text{Mg}^{2+}$ ), док иста супституција у GluN2 субјединици значајно смањује блокаду магнезијумом и повећава пропустљивост за  $\text{Mg}^{2+}$ , а врло мало утиче на пропустљивост за  $\text{Ca}^{2+}$  (27).

Такође, пропустљивост за  $\text{Ca}^{2+}$  у NMDA рецепторима зависи од типа субјединица које учествују у изградњи рецептора. Тако рецептори који садрже GluN2A/GluN2B субјединице су најпропустљивији за  $\text{Ca}^{2+}$ , они који садрже GluN2C субјединице имају мању пропустљивост за  $\text{Ca}^{2+}$ , а рецептори који садрже GluN3 су најмање пропустљиви за  $\text{Ca}^{2+}$  (1).

### 1.1.4 АЛОСТЕРНА РЕГУЛАЦИЈА

Алостерни модулатори глутаматних рецептора привлаче велику пажњу у последње време због могућности финог утицаја на физиолошко функционисање рецептора, као и због могућности коришћења у терапијске сврхе. Позитивни и негативни алостерни модулатори имају низ терапијских предности у поређењу са агонистима и антагонистима глутаматних рецептора, укључујући и већу селективност за поједине субјединице које су у саставу рецептора. Сматра се да је боља подношљивост алостерних модулатора у клиничкој пракси, последица њиховог деловања на већ постојећи ниво и образац активности рецептора, за разлику од антагониста и агониста који изазивају или потпуну блокаду или претерану стимулацију.

Ванћелијски домени субјединица NMDA рецептора, ATD и LBD, су у великој мери хомологи са бактеријским периплазматским протеинима. ATD, који је састављен од првих 380 аминокиселина, је сличан такозваном леуцин-изолеуцин-валин-везујућем протеину (*leucine/isoleucine/valine-binding protein* - LIVBP), који поред значајне улоге у међусобном повезивању и организацији субјединица, образује и регулаторни домен који везује алостерне инхибиторе (28).

Многи двовалентни катјони утичу на инактивацију глутаматних рецептора, волтаж-зависни блок јонског канала и стопу дисоцијације агониста, чиме потенцирају или инхибирају одговор рецептора.

#### 1.1.4.1 Цинк ( $Zn^{2+}$ ) као алостерни модулатор NMDA рецептора

Цинк ( $Zn^{2+}$ ) је један од екстрацелуларних двовалентних катјона који испољава највећи потенцијал у инактивацији NMDA рецептора (29, 30). У нервним завршцима хипокампуса, амигдала, стријатума, неокортекса и кортекса,  $Zn^{2+}$  се пакује у синаптичке везикуле, и ослобађа се током нервне активности у синаптичку пукотину заједно са глутаматом (31).  $Zn^{2+}$  се везује за ATD GluN2A и GluN2B субјединица NMDA рецептора. Деловање  $Zn^{2+}$  као ендогеног модулатора NMDA рецептора зависи од његове концентрације. Криве инхибиције цинком GluN1/GluN2A рецептора имају бифазичан изглед, где постоји волтаж-независна инхибиција високог афинитета ( $IC_{50}$  10–30 nM), и волтаж-зависна инхибиција ниског афинитета ( $IC_{50}$  20–100  $\mu$ M) (1). Волтаж-зависна

инхибиција подразумева блокаду канала, док волтаж-независна инхибиција смањује вероватноћу отварања канала. Везивно место високог афинитета за  $Zn^{2+}$  се налази у пукотини АТД GluN2А субјединице, где постоји низ хистидинских аминокиселинских остатака које везују  $Zn^{2+}$  (32). Уклањање АТД GluN2А субјединице мутагенезом смањује или у потпуности спречава волтаж-независну инхибицију високог афинитета за  $Zn^{2+}$  (33). Волтаж-зависна инхибиција ниског афинитета за  $Zn^{2+}$  је условљена аминокиселинским остацима у М2 петљи, слично везујућем месту за магнезијум (1, 34). У GluN2В субјединицама  $Zn^{2+}$  изазива инхибицију на оба наведена начина. Кристалографским студијама је показано да  $Zn^{2+}$  стабилизује затворену конформацију пукотине у облику „шкољке“ у оквиру АТД GluN2В субјединице директним контактом са аминокиселинама His127 и Glu284. Претходне студије су указале на сличност инхибиције услед примене антагонисте GluN2В субјединице ифенпродила и инхибиције цинком, што сугерише исти механизам деловања (35). Међутим, мутације претходно поменутих аминокиселина не утичу на инхибицију ифенпродилом што наводи на закључак да ифенпродил и  $Zn^{2+}$  имају посебна места везивања у оквиру АТД GluN2В субјединице (18).

Трандукциона каскада која повезује везивање модуlatorног лиганда за АТД и инхибицију рецептора подразумева везивање цинка ( $Zn^{2+}$ ) у пукотини АТД, што изазива њено затварање. Ова конформациона промена повећава тензију у регионима који повезују АТД и LTD, чиме се изазива прекид везе између LTD субјединица, који иначе образују димере. Наведена промена смањује истезање трансмембранских делова рецептора, што, уз везивање протона, омогућава да рецептор остане затворен (28). Инхибиција NMDA рецептора који садрже GluN2В цинком не зависи од концентрације протона, што указује на потенцијално другачији механизам инхибиције цинком у овим рецепторима (36). Наведени механизам има сличне карактеристике са процесом брзе десензитизације АМРА и каинатних рецептора (37).

#### 1.1.4.2 Јони водоника ( $H^+$ ) и алостерна модулација NMDA рецептора

Водоникови јони (протони,  $H^+$ ) из ванћелијског простора инхибишу све врсте јонотропних глутаматних рецептора механизмом који не подразумева компетитивну инхибицију и јонизацију агонисте, што наводи на закључак да не делују као блокатори канала (28, 38).



Осетљивост NMDA рецептора на екстрацелуларне протоне зависи од типова субјединица које улазе у састав рецептора, при чему  $H^+$  делују и на GluN1 и на GluN2 субјединице. Рецептори који садрже GluN2C субјединице су најмање осетљиви на ванћелијске протоне ( $IC_{50} \sim pH$  6,5) (39). Рецептори састављени од GluN1 и GluN2A су средње осетљиви на присуство протона у ванћелијском простору ( $IC_{50} \sim pH$  6,9), док су рецептори који у свом саставу имају GluN1/GluN2B и GluN1/GluN2D субјединице најосетљивији ( $IC_{50} \sim pH$  7,4) (28, 39, 40). На основу наведених чињеница се закључује да су рецептори који се састоје од GluN1/GluN2B субјединица тонички инхибирани протонима при физиолошким вредностима pH (7,4), као и да благе промене pH вредности битно утичу на величину јонске струје која тече кроз ове рецепторе. И различите „*splice*“ варијанте GluN1 субјединице показују различиту осетљивост за протоне. Укључивање егзона 5 у састав GluN1 субјединице (GluN1b) смањује осетљивост за протоне, за разлику од варијанте која не садржи егзон 5 (GluN1a) (40).

Иако је показано да велики број аминокиселинских остатака и у GluN1 и у GluN2 субјединицама учествује у инхибицији протонима, тачна локализација „протонског сензора“ још увек није са сигурношћу утврђена. Мутагеним изменама аминокиселина утврђено је да су аминокиселине које имају највећи утицај на осетљивост на протоне густо груписане у два суседна региона који су повезани са активационим вратима NMDA рецептора (41). Протонски сензор је услед тога вероватно тесно повезан са покретима врата NMDA рецептора. Студије на појединачним GluN1/GluN2B NMDA рецепторима (*single-channel studies*) су указале на чињеницу да везивање протона повећава енергију активације за конформациону промену која претходи отварању поре. Везивање протона, практично, „закључава“ канал у затвореном стању и канал остаје у том стању док се протон не одвоји (5-9 ms), тако да протони делују тако што стабилизују затворено стање канала, уместо да дестабилизују отворено стање (42).

Промена осетљивости на протоне је заједнички механизам којим други алостерни модулатори делују на NMDA рецепторе. Поред претходно наведених механизма, цинк делује и тако што повећава осетљивост на протоне рецептора који садрже GluN2A субјединицу. Ифенпродил, полиамини и инсерција егзона 5 узрокују промену осетљивости на протоне рецептора који садрже GluN2B субјединицу (28, 32, 37).

### 1.1.4.3 Ифенпродил као алостерни модулатор NMDA рецептора

Први антагониста NMDA рецептора који функционише селективно у зависности од субјединице је фенилетаноламин ифенпродил. Ифенпродил и његови деривати, који чине велику групу сродних синтетских органских једињења, чине нову класу некомпетитивних, волтаж-независних парцијалних антагониста, који инхибирају NMDA рецепторе који садрже GluN2B субјединицу.

Ифенпродил је први пут описан као вазодилататор церебралних крвних судова, а касније је описано његово неуропротективно дејство услед некомпетитивне инхибиције NMDA рецептора (43, 44). Ифенпродил има велики афинитет за NMDA рецепторе који садрже GluN2B субјединицу, и од 200 до 400 пута има већи потенцијал за GluN1/GluN2B рецепторе ( $IC_{50} \sim 150$  nM) у поређењу са GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2C или GluN1/GluN2D рецепторима (45). Различите „*splice*“ варијанте GluN1 субјединице не утичу на инхибицију ифенпродилом рецептора који садрже GluN2B субјединицу, али трихетеромерни рецептори који садрже GluN1/GluN2A/GluN2B субјединице су мање осетљиви на ифенпродил од рецептора који садрже GluN1/GluN2B субјединице (46).

Одмах након открића ифенпродил се показао као врло користан алат при изучавању структуре и функције NMDA рецептора. Ифенпродил, такође привлачи велику пажњу са аспекта лечења појединих неуролошких и психијатријских поремећаја.

Низ студија на GluN2A/GluN2B субјединицама и изолованим АТД омогућило је локализацију везујућег места за ифенпродил на АТД GluN2B субјединице (47, 48). Пошто је инхибиција ифенпродилом некомплетна, чак и при концентрацијама које узрокују потпуно засићење рецептора, и пошто се ифенпродил везује за модулаторни домен, може се сматрати да је он негативни алостерни модулатор, мада се у великом делу литературе описује и као некомпетитивни антагониста NMDA рецептора (1).

Функционалне студије су показале да ифенпродил и цинк делују на међусобно искључив начин, због компетитивног везивања за места која се делимично преклапају (49). Слично цинку, који потенцира инхибиторно дејство протона на GluN2A субјединицу, ифенпродил повећава инхибиторни потенцијал протона на NMDA рецепторе који садрже GluN2B субјединицу (50).

У првом, експериментално валидном, моделу приказивања 3D изгледа везивног места за ифенпродил када је ифенпродил везан, показано је да се ифенпродил везује у пукотини која се налази на АТD, и да је у том случају пукотина у затвореном стању, при чему ифенпродил остварује везу са оба дела пукотине (R1 и R2) (51). Наведене чињенице подржавају становиште да везивање ифенпродила изазива затварање пукотине АТD GluN2B субјединице. Ифенпродил у пукотини АТD, где се налази његово везујуће место, заузима конформацију при којој његова бензил група реагује са хидрофобним аминокиселинском остацима у близини „шарке“ АТD, а фенолски остатак формира водоничне везе са поларним аминокиселинским остацима на самом улазу у пукотину. Централни пиперидински део се везује Ван дер Валсовим силама за фенилаланин на позицији 176 и јонским везама за аспарагинску киселину на позицији 101. Аспарагинска киселина на позицији 101 учествује у везивању цинка, чиме се објашњава немогућност истовременог везивања цинка и ифенпродила у пукотини АТD (28, 49).

Ифенпродил је представник нарастајуће групе GluN2B-селективних антагониста, која се у појединим изворима означава као „продили“. Једињења која припадају овој групи и која су досада најдетаљније испитана и најчешће се користе су: таксопродил, бензопродил и Ro 25-6981, који су око 10 пута потентнији од ифенпродила, као и радипродил, релативно скоро откривено једињење које може да се придружи овој групи (28).

Процес инхибиције NMDA рецептора који садрже GluN2B субјединицу ифенпродилом је вероватно сличан механизму инхибиције цинком рецептора који садрже GluN2A субјединицу, што је већ описано у претходном тексту. Чињеница која подржава ову тврдњу је да у оба наведена примера негативне алостерне модулације (цинк/GluN2B и ифенпродил/GluN2A), и цинк и ифенпродил потенцирају тоничку инхибицију протонима (37, 51).

#### **1.1.4.4 Полиамини као позитивни алостерни модулатори NMDA рецептора**

Полиамини су полибазни, алифатични амини, који су при физиолошким рН вредностима позитивно наелектрисани. Ендогени полиамини су спермин, спермидин и путресцин, који настају из орнитина у циклусу урее. Полиамини су широко распрострањени у организму и

постоје у високим концентрацијама унутар ћелије, где интерагују са нуклеинским киселинама и протеинима, укључујући јонске канале у ћелијској мембрани. Постоје докази да се у ЦНС-у полиамини налазе и у ванћелијском простору, на шта указује чињеница да се полиамини отпуштају током нервне активности механизмом који је регулисан  $\text{Ca}^{2+}$ , затим постоје системи за преузимање који имају висок афинитет за полиамине, и ванћелијски полиамини реагују са различитим јонским каналима и рецепторима, укључујући калцијумске канале и NMDA рецепторе (28, 52).

Ванћелијски полиамини, као што су спермин и спермидин, испољавају три различита ефекта на NMDA рецепторе, изазивају: волтаж-зависну блокаду рецептора, глицин-зависну потенцијацију и глицин-независну и волтаж-независну потенцијацију рецептора.

Волтаж-зависна блокада рецептора полиаминима је у великој мери слична блокади коју изазива ванћелијски магнезијум ( $\text{Mg}^{2+}$ ), и настаје услед уласка полиамина у пору рецептора и заустављања тока јона. Као и у случају  $\text{Mg}^{2+}$ , блокада полиаминима је у великој мери зависна од волтаже, па тако  $\text{IC}_{50}$  вредности спермина при  $-60 \text{ mV}$  износе  $350 \mu\text{M}$ , а при  $0 \text{ mV}$   $27 \text{ mM}$  (53). Блокада полиаминима показује сличне особине везане за различит састав субјединица које улазе у састав рецептора, као и блокада  $\text{Mg}^{2+}$ . Такође, мутације које захватају QRN место M2 петљи (богато аспарагинским аминокиселинским остацима) и које смањују интензитет блокаде  $\text{Mg}^{2+}$ , смањују и интензитет блокаде спермином, што указује да деле заједничко место везивања унутар поре NMDA рецептора (30).

Глицин-зависна потенцијација се одвија у NMDA рецепторима који садрже GluN2A и GluN2B субјединице, при чему везивање полиамина олакшава везивање глицина (48). „*Splice*“ варијанте GluN1 субјединице не утичу на глицин-зависну стимулацију полиаминима. Није сасвим утврђено где се тачно налази везујуће место за полиамине које учествује у глицин-зависној потенцијацији, али се вероватно налази на GluN1 субјединици где се налази и везујуће место за глицин. Постоји могућност да ово полиаминско везујуће место делимично заузимају  $\text{Ca}^{2+}$  и/или  $\text{Mg}^{2+}$ , јер ова два јона у милимоларним концентрацијама, такође, потенцирају везивање глицина (54).

Трећи ефекат полиамина подразумева потенцијацију која не зависи ни од промене волтаже ни од везивања глицина, јер се одвија и при позитивним и при негативним

вредностима мембранског потенцијала, као и при концентрацијама глицина које у потпуности засићују рецепторе (55). Ова глицин-независна и волтаж-независна потенцијација полиаминима се дешава искључиво у GluN1/GluN2B рецепторима, и заснива се на смањењу тоничке протонске инхибиције (40, 56, 57). Наиме, везивање полиамина узрокује померање  $pK_a$  протонског сензора ка киселијим вредностима, и услед тога у GluN1/GluN2B рецепторима постоји јака корелација између осетљивости на протоне и степена потенцијације полиаминима (40).

#### 1.1.4.5 Позитивна и негативна алостерна модулација неуростероида

Већина стероида су хормони које секретују ткива појединих ендокриних жлезда. Међутим и мозак поседује могућност синтезе стероида *de novo* (58). У физиолошким околностима у мозгу постоје наномоларне концентрације неуростероида, али се у појединим стањима (стрес) њихова концентрација знатно повећава.

За разлику од стероидних хормона који делују активирањем транскрипционих и транслационих механизма услед чега је потребно да прође више сати или дана до испољавања њихових ефеката, неуростероиди делују локално и испољавају дејство на ексциtabilност неурона за неколико секунди или неколико минута, што сугерише да имају директне модулаторне ефекте на протеине ћелијске мембране. Поред GABA<sub>A</sub> рецептора, који су практично циљни рецептори за неуростероиде, ова једињења учествују и у регулацији NMDA рецептора (28).

Само сулфатовани неуростероиди или неуростероиди који имају негативно наелектрисану групу на трећем С атому су у стању да модулирају активност NMDA рецептора, а да ли узрокују позитивну или негативну модулацију зависи од хемијских особина неуромодулатора, као и од субјединица које улазе у састав рецептора. Незасићени неуростероиди углавном потенцирају активност NMDA рецептора, док засићени неуростероиди, углавном имају инхибиторно дејство. Такође, геометрија неуростероида битно утиче на врсту модулаторног ефекта, па тако неуростероиди чији молекули имају повијену геометрију имају више инхибиторно дејство од неуростероида чији молекули су више равни (59). Дејство неуростероида у великој мери зависи и од типа субјединица које улазе у састав рецептора, па тако прегненолон сулфат (један од најзаступљенијих

неуростероида) потенцира дејство NMDA рецептора који садрже GluN2A и GluN2B субјединицу, док је ефекат на рецепторе који садрже GluN2C и GluN2D субјединице много мањи (60).

Пример неуростероида који делује као позитивни модулатор NMDA рецептора је прегненолон сулфат. На основу експерименталних података је закључено да дејство прегненолон сулфата није повезано са утицајем на степен инхибиције протонима и да трансмембрански М3 сегмент има кључну улогу у потенцирајућим ефектима прегненолон сулфата (вероватно овај сегмент садржи аминокиселинске остатке који директно везују прегненолон сулфат) (61). Са друге стране, аналог прегненолон сулфата, 3 $\alpha$ -хидрокси-5 $\beta$ -прегнан-20-оне сулфат (3 $\alpha$ 5 $\beta$ S), има инхибиторно дејство на NMDA рецепторе, при чему испољава малу селективност према типу субјединица које улазе у састав рецептора. 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S делује независно од промене волтаже и на некомпетитиван начин, што сугерише да се везује ван поре канала и ван места за које се везују агонисти (62). На тај начин прегненолон сулфат и 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S, и поред велике структурне сличности имају супротна дејства на NMDA рецепторе, први је позитивни, а други негативни алостерни модулатор.

### 1.1.5 АГОНИСТИ И АНТАГОНИСТИ NMDA РЕЦЕПТОРА

NMDA рецептори су јединствени у групи глутаматних рецептора јер је неопходно истовремено везивање глицина за GluN1 субјединице и глутамата за GluN2, како би се рецептор активирао (63).

#### 1.1.5.1 Агонисти NMDA рецептора

У извесним изворима литературе глицин се наводи као модулатор NMDA рецептора, како би се разликовао од L-глутамата, који је специфичан агониста читаве групе рецептора. Међутим, пошто су њихова везивна места структурно слична, вероватно имају подједнаке улоге у активацији рецептора. Међутим, у физиолошким условима глицин и глутамат ипак имају различите улоге у активацији NMDA рецептора. Док се L-глутамат ослобађа из нервних завршетака у синаптичку пукотину и представља „активан“ неуротрансмитер, сматра се да је мала количина глицина, која иначе постоји у синаптичкој пукотини,

довољна за активацију рецептора (64). Показано је да у извесним деловима мозга астроцити ослобађају D-серин који се везује за везивно место за глицин и учествује у активацији рецептора (65).

Као што је већ наведено, кристалографска испитивања LBD GluN1 субјединице су показала да се глицин и одговарајући аналози везују унутар пукотине коју образују D1 и D2 домени везујућег региона (LBD). Унутар везујућег места  $\alpha$ -карбоксилна група глицина образује водоничне везе са аминокиселинама аргинином на позицији 522 (Arg522), треонином на позицији 518 (Thr518) и серином на позицији 688 (Ser688). Амино-група глицина реагује са карбонилном групом пролина на позицији 516 (Pro516), хидроксилном групом треонина на позицији 518 (Thr518) и кисеоником карбоксилне групе аспарагинске киселине на положају 732 (Asp732) (1, 66).

Поред глицина, за његово везујуће место могу да се вежу и D и L-изомери серина и аланина и да се понашају као агонисти GluN1 субјединице NMDA рецептора (67). D-серин је знатно потентнији у односу на L-серин и вероватно представља примарни лиганд за GluN1 субјединице у појединим деловима мозга, као што су супраоптичка једра (68).

Глутамат се везује за GluN2 субјединице.  $\alpha$ -карбоксилатна група глутамата реагује са аргинином на позицији 518 (Arg518), а  $\gamma$ -карбоксилна група глутамата се везује за тирозин на позицији 730 (Tyr730), при чему између домена настају водоничне везе које се формирају између тирозина на позицији 730 (Tyr730) и глутаминске киселине на позицији 413 (Glu413) (24).

У ендогене агонисте GluN2 субјединице, поред глутамата, спадају и D и L-аспартат, хомоцистеин и цистеин-сулфат (69-71). Још увек нису откривени агонисти који се везују за поједине подтипове GluN2 субјединице.

GluN3 субјединице, попут GluN1 субјединица, везују глицин, али између њих постоје извесне разлике.  $\alpha$ -карбоксилна група глицина унутар везујућег места GluN3 субјединице остварује везе са аргинином на позицији 638 (Arg638), серином на позицији 633 (Ser633) и серином на позицији 801 (Ser801), док се  $\alpha$ -амино група глицина повезује са аспарагинском киселином на позицији 845 (Asp845), серином на позицији 631 (Ser631) и серином на позицији 633 (Ser633) (72). Иако обе наведене субјединице везују глицин постоји само 30% сличности између њих, а афинитет за глицин изоловане GluN3 је око 600 пута већи у односу на GluN1 субјединицу (1).

### 1.1.5.2 Компетитивни антагонисти NMDA рецептора

Постоји велики број компетитивних антагониста NMDA рецептора који су специфични за GluN1 субјединицу, попут 7-хлорокинуренске киселине и њеног аналога 5,7-дихлорокинуренске киселине (5,7-DCKA) (63). 5,7-DCKA се везује за GluN1 субјединицу, при чему се везе које успоставља са аминокиселинским остацима у пукотини везујућег места LBD остварују углавном са D1 доменом (66).

Анестетичка дејства ксенона нису условљена дејством на GABA-ергичку нервну трансмисију, већ зависе од инхибиције NMDA рецептора (73). У истраживању које се бавило испитивањем дејства ксенона, показано је да се инхибиција NMDA рецептора ксеноном повећава како се концентрација глицина смањује, што указује на чињеницу да се ксенон везује за везујуће место глицина. Испитивањем мутираних рецептора који имају већи афинитет за глицин показано је смањено инхибиторно дејство ксенона, које се опет повећава смањењем концентрације глицина (74).

Компетитивни антагонисти GluN2 субјединица, као што је (R)-2-амино-5-фосфопентаноат, се користе у циљу раздвајања ефеката NMDA рецептора од других јонотропних глутаматних рецептора (пре свега AMPA рецептора) (75). Међутим, велику тешкоћу представља немогућност синтезе једињења које би вршило селективну инхибицију појединих подтипова GluN2 субјединица, што је последица високог степена хомологије између LBD GluN2 субјединица. Од 39 аминокиселина које окружују везујуће место, само осам се разликује у подтиповима GluN2 субјединица (од GluN2A до GluN2D), док су 10 аминокиселина у самом везујућем месту, које остварују везе са глутаматом, потпуно идентичне (24).

### 1.1.5.3 Некомпетитивни антагонисти NMDA рецептора

У групи некомпетитивних антагониста разликујемо антагонисте који блокирају рецепторе док су затворени (енгл. *noncompetitive antagonists*) и антагонисте за чије је деловање неопходно да канал буде отворен, како би могли да приђу до свог везујућег места и блокирају канал (енгл. *uncompetitive antagonists*).



Као пример прве групе се у појединим изворима литературе наводи ифенпродил, мада се чешће наводи као алостерни модулатор, па је овде објашњен у оквиру алостерних модулатора активности NMDA рецептора. У ову групу антагониста се сврставају етанол и динорфини. Дејство етанола зависи од подтипа GluN2 субјединице, па тако етанол инхибише рецепторе који садрже GluN2B субјединицу (76). Дејство динорфина, такође, зависи од подтипа GluN2 субјединице, тако да у највећој мери инхибишу рецепторе који садрже GluN2A субјединицу, као и од дужине пептидног ланца динорфина, па су динорфини са дужим пептидним ланцем потентнији инхибитори NMDA рецептора (77).

Некомпетитивни антагонисти NMDA рецептора који делују када је канал отворен могу да остану унутар канала када се канал затвори („заробљени“ у каналу), као што је дизоцилпин малеат (МК-801) и блокаторе који могу делимично да буду „заробљени“, као што је мемантин. Када канал блокирају антагонисти који остају у каналу, потребно је да се агонисти вежу за рецептор, како би се из канала ослободио антагониста и канал поново активирао (1, 78).

Ранија испитивања ефеката дизоцилпина (МК-801) и глутамата на хипокампадне неуроне пацова су показала да коапликација ове две супстанце узрокује краткотрајно отварање канала под дејством глутамата, које је праћено блокадом канала коју изазива МК-801 (79).

Блокатори који бивају делимично „заробљени“, као што је мемантин, се такође везују након отварања канала, али се такође и брзо отпуштају са рецептора (80). Постоји више потенцијалних везивних места за мемантин, од којих се једно налази у близини ванћелијског отвора поре GluN1/GluN2A рецептора (81). Везивање мемантина показује велику зависност од промене волтаже мембране, при чему се мемантин знатно брже везује, спорије отпушта, и при томе омогућава ефикаснију блокаду, ако је мембрана хиперполаризована. Везивно место за мемантин се преклапа са везивним местом за јон магнезијума ( $Mg^{2+}$ ), због чега мемантин и  $Mg^{2+}$  испољавају конкуренцију за везивање у пори NMDA рецептора (82).

Мемантин је супстанца која је регистрована као лек у Европи и Сједињеним Америчким Државама, и користи се у терапији Алцхајмерове болести. Бета-амилоид, који се сматра главним узрочником синаптичке дисфункције у Алцхајмеровој болести, ремети хомеостазу глутамата, а такође постоје подаци да бета-амилоид директно активира NMDA

рецепторе који садрже GluN2A субјединицу (83, 84). Клиничка корист употребе мемантина у терапији Алцхајмерове болести је умерена, али обухвата деловање на више поремећаја који настају током болести (82).

Већина блокатора NMDA рецептора је неселективна или благо селективна у зависности од подтипа GluN2 субјединице, па тако МК-801 око 10 пута снажније инхибира рецепторе који садрже GluN2A или GluN2B субјединицу, у односу на рецепторе који садрже GluN2C или GluN2D субјединицу. Такође је значајно да потенцијал за блокаду антагониста NMDA рецептора зависи од рН вредности и парадоксално делује чињеница да киселије вредности рН повећавају степен везивања МК-801, који се везује унутар самог канала, јер киселије рН вредности смањују вероватноћу отварања јонског канала NMDA рецептора. Овај податак указује на чињеницу да се МК-801 везује за структурне елементе који учествују у изградњи поре канала (83).

### 1.1.6 УЛОГА МАГНЕЗИЈУМА У РЕГУЛАЦИЈИ ФУНКЦИЈЕ NMDA РЕЦЕПТОРА

Јединствена особина NMDA рецептора у односу на друге лиганд-зависне јонске канале је двојна регулација њихове функције, и везивање два агониста и промена вредности мембранског потенцијала. Зависност функције NMDA рецептора од промене волтаже ћелијске мембране је директна последица блокаде поре јонског канала NMDA рецептора јоном магнезијума ( $Mg^{2+}$ ). Наиме, током мировног мембранског потенцијала већина подтипова NMDA рецептора је блокирана  $Mg^{2+}$  из ванћелијског простора, који у великој мери онемогућава проток јона кроз канал. Услед деполаризације ћелије, волтаж-зависна блокада NMDA рецептора магнезијумом ( $Mg^{2+}$ ) се отклања омогућавајући проток јона кроз проходне поре NMDA рецептора. Последици улазак  $Ca^{2+}$  покреће низ унутарћелијских сигналних каскада, којима се мења функционисање ћелије активацијом различитих киназа и фосфатаза (85). Блокада магнезијумом зависи од субјединица које улазе у састав рецептора, па су тако рецептори који у свом саставу имају GluN2C око десет пута мање осетљиви на блокаду магнезијумом у односу на NMDA рецепторе који су изграђени од GluN2A и GluN2B субјединица (86, 87). Главно место за које се везује  $Mg^{2+}$  узрокујући блокаду се налази приближно на половини поре канала. Додатну зависност од промене волтаже узрокују и везивна места за јоне која су локализована на

спољашњем и унутрашњем отвору поре канала. За ова везивна места се везују јони  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  који мењају степен везивања и отпуштања јона  $\text{Mg}^{2+}$  и самим тим утичу на степен блокаде канала (88). Особине наведених везивних места се разликују између појединих подтипова GluN2 субјединица, што вероватно представља узрок разлика у осетљивости на блокаду магнезијумом NMDA рецептора који садрже различите GluN2 субјединице (89). Сматрало се да се везивање и отпуштање магнезијума (блокада и деблокада) одвија тренутно, што није у складу са функцијама које врше NMDA рецептори. Међутим, новија истраживања указују на постојање брзе и споре компоненте током везивања  $\text{Mg}^{2+}$ , чије се трајање разликује у зависности од GluN2 субјединице. Услед тога се блокада магнезијумом NMDA рецептора који садрже GluN2C или GluN2D субјединице прекида знатно брже у односу на NMDA рецепторе који садрже GluN2A или GluN2B субјединице (90).

Позната је улога модулације NMDA рецептора магнезијумом у процесима одржавања синаптичке пластичности и асоцијативног учења. Структурне компоненте које утичу на блокаду рецептора магнезијумом из ванћелијског простора су врло сличне компонентама које одређују пропустљивост за  $\text{Ca}^{2+}$ . Аминокиселине које доминантно утичу на блокаду ванћелијским  $\text{Mg}^{2+}$  сврставају се у две групе: аминокиселине које изграђују поларно QRN место и аминокиселине које изграђују оближње хидрофобно место. Замена аминокиселина које улазе у састав QRN места GluN1 или GluN2 субјединице смањују блокаду  $\text{Mg}^{2+}$ . Наиме, замена аспарагина аргинином на позицији 616 на GluN1 субјединици знатно смањује блокаду магнезијумом, као и слична супституција на GluN2 субјединици, што указује на чињеницу да аспарагин учествује у везивању  $\text{Mg}^{2+}$  (87).

Аминокиселина триптофан која се налази у M2 петљи GluN2 субјединице такође утиче на блокаду магнезијумом. Замена триптофана на позицији 607 (Trp607) GluN2B субјединице, као и триптофана на позицији 606 (Trp606) GluN2A субјединице, неком неароматичном аминокиселином знатно смањује блокаду магнезијумом. Сличне промене на GluN1 субјединици не утичу на процес блокаде магнезијумом (91).

$\text{Mg}^{2+}$  из цитоплазме такође може да изазове волтаж-зависну блокаду, при чему се унутарћелијски  $\text{Mg}^{2+}$  не везује за исто место као и  $\text{Mg}^{2+}$  из ванћелијског простора (92). Наиме, мутације којима се замењују аминокиселине које учествују у изградњи везивног

места за ванћелијски  $Mg^{2+}$  не утичу на везивање унутарћелијског  $Mg^{2+}$  (Gly618 на GluN1), док мутације које захватају везивно место за унутарћелијски  $Mg^{2+}$  врло мало утичу на везивање ванћелијског  $Mg^{2+}$  (Glu621 на GluN1 или Gln620 и Asn621 на GluN2), чиме се практично потврђује чињеница да су места за везивање ванћелијског и унутарћелијског  $Mg^{2+}$  одвојена (87). Чињеница да је унутарћелијска концентрација  $Mg^{2+}$  при којој је половина NMDA рецептора блокирана при вредности мембранског потенцијала од 0 mV (8 mmol), врло слична концентрацији ванћелијског  $Mg^{2+}$  (8,8 mmol) која изазива исти ефекат, указује на сличност везивних места за унутарћелијски и ванћелијски  $Mg^{2+}$ . Али стопе везивања и отпуштања  $Mg^{2+}$  које се знатно разликују такође говоре у прилог о постојању два различита везивна места, јер указују на различите особине везивних места (92).

### 1.1.7 NMDA РЕЦЕПТОРИ И ЦЕНТРАЛНИ НЕРВНИ СИСТЕМ

Физиолошка улога NMDA рецептора се пре свега везује за функционисање централног нервног система (ЦНС). NMDA рецептори, уз друге јонотропне глутаматне рецепторе (AMPA и каинатни) имају кључну улогу у брзој регулацији синаптичке пластичности, укључујућу дуготрајну потенцијацију и дуготрајну депресију, које представљају ћелијску основу процеса памћења и учења (93, 94). Један од највише проучаваних облика синаптичке пластичности је дуготрајна потенцијација у хипокамусу, где активација NMDA рецептора у синапси изазива уградњу AMPA рецептора у синаптичку мембрану механизмима који обухватају: улазак  $Ca^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ /калмодулин зависну протеинску киназу II (CaMKII) и екстрацелуларним сигналом регулисану киназу (Ras-ERK). Улазак  $Ca^{2+}$  кроз NMDA рецепторе активира и сигналну каскаду посредовану митогеном-активираним протеинском киназом (ERK-MAPK). Активирање овог сигналног пута узрокује фосфорилацију cAMP зависно-везујућег протеина (енгл. *cAMP-responsive element-binding protein*, CREB), који даље узрокује транскрипцију више „гена повезаних са синапсом” који су неопходни за консолидацију памћења (95, 96).

NMDA рецептори који се састоје од различитих субјединица су различито дистрибуирани у различитим деловима мозга, а њихова експресија се разликује и у зависности од животног доба. Рецептори који садрже GluN2B субјединицу су

заступљенији у мозгу током раних фаза развоја, а њихов број почиње да се смањује од периода адолесценције, док се број NMDA рецептора који садрже GluN2A субјединицу повећава током старења (97). Још увек није утврђен механизам којим се мења састав субјединица NMDA рецептора током старења, као ни ефекти тих промена на когнитивне функције (98). Једно од објашњења је промена експресије појединих субјединица NMDA, при чему се смањује експресија GluN1, GluN2B и GluN3A субјединица, док се повећава експресија GluN2A и GluN3B субјединица. Различити аутори говоре у прилог овом становишту на основу регистрованог смањења мРНК за GluN1 у појединим деловима мозга, као што су базални хипоталамус, префронтални кортекс, ако и инсуларни, орбитални и соматосензорни кортекс (99-101). Такође су уочене промене у експресији различитих GluN2 субјединица, пре свега у хипокампусу, при чему промене у саставу GluN2 имају огроман значај са физиолошког аспекта јер у великој мери утичу на особине рецептора, као што су средње време отварања рецептора и проводљивост рецептора (98, 102).

Алтернатива овом ставу је могућност промене локализације рецептора у смислу уградње рецептора у мембрану или померања рецептора из вансинаптичких делова мембране у саму синапсу. Истраживања на мишевима су показала да се у фронталном кортексу смањује експресија GluN2B субјединице у синаптичкој мембрани, али не и у хомогенату можданог ткива, што наводи на закључак да је смањење садржаја GluN2B субјединице можда последица секвестрације NMDA рецептора који садрже ову субјединицу у вансинаптичком делу мембране (103). Механизми који се такође доводе у везу са променом састава субјединица NMDA рецептора су и транслационе модификације, оксидациони стрес и утицај микроглије (98). Наведене промене се доводе у везу са поремећајима памћења, пре свега просторног памћења, које настају током процеса старења (104, 105).

Синаптичка пластичност у визуелном кортексу одраслих особа је посредована NMDA рецепторима, и то NMDA рецепторима који садрже GluN2A субјединицу. Потврда за ово становиште је чињеница да ни селективни блокатори NMDA рецептора који садрже GluN2B субјединицу, као ни стимулација ових рецептора, не утичу на дуготрајне потенцијације у визуелном кортексу (97, 106). Бржа кинетика NMDA рецептора који садрже GluN2A субјединицу је кључна за брзо процесуирање визуелних информација и

адекватну реакцију неурона на сензону стимулацију, што је вероватно узрок доминацији ове врсте рецептора у визуелном кортексу (107).

Као што је наведено у претходном тексту, NMDA рецептори имају кључну улогу у памћењу, и то пре свега у краткорочном памћењу или радној меморији, за коју је опет кључна функција дорзолатералног префронталног кортекса (dlPFC). За разлику од сензорног кортекса, dlPFC омогућава менталне активности независно од сензорних стимулуса и представља основу за радну меморију – памћење које је активно врло кратко, само неколико секунди, и представља основу за комплексније облике памћења. Снимањем нервне активности dlPFC код мајмуна, уочена је континуирана активност неурона, при чему овакву активност неурона, која омогућава памћење, изазива повратна активација пирамидалних неурона (108, 109). Наведену континуирану активност неурона омогућава деловање NMDA рецептора, и то пре свега NMDA рецептора који садрже GluN2B субјединицу, јер имају спору кинетику и најпогоднији су за функционисање неуронске мреже у dlPFC без сензорних стимулуса (110). Блок NMDA рецептора, пре свега који садрже GluN2B субјединицу, у великој мери смањује активност неурона у dlPFC, док блокирање активности AMPA рецептора не утиче на нервну активност у овом делу мозга. Међутим, у том случају се поставља питање како се превазилази блокада магнезијумом NMDA рецептора, а одговор на то питање је вероватно друга врста рецептора, као што су никотински  $\alpha 7$  рецептори. Никотински  $\alpha 7$  рецептори су локализовани у постсинаптичким задебљањима глутаматних синапси, и блокирање активности ових рецептора онемогућава екситацију NMDA рецептора, а како се ацетилхолин ослобађа у будном стању (али не и током дубоког сна), стимулација никотинских  $\alpha 7$  рецептора омогућава свесне мисли (107, 111).

Поремећај активности NMDA рецептора се доводи у везу са великим бројем неуролошких обољења. Кључни поремећај у Алцхајмеровој болести је неадекватна регулација активности NMDA рецептора коју изазива амилоид бета ( $A\beta$ ). Са једне стране  $A\beta$  изазива ендоцитозу и интернализацију синаптичких NMDA рецептора, а са друге стране изазива хиперактивност екстрасинаптичких NMDA рецептора, тако што спречава преузимање глутамата из ванћелијског простора, чиме се изазива неуротоксичност (112). Синаптичка дисфункција коју изазива  $A\beta$  зависи од претеране стимулације NMDA рецептора, што за последицу има повећање концентрације  $Ca^{2+}$  у цитоплазми неурона,

што даље изазива активацију више сигналних механизма, а крајњи резултат су поремећај функције митохондрија, дисфункција и губитак синапси, оштећење дуготрајних потенцијација и опадање когнитивних функција (113). Ендоцитоза NMDA рецептора коју изазива A $\beta$  укључује и никотинске  $\alpha 7$  рецепторе, као и друге чиниоце (протеинска фосфатаза 2B и тирозин фосфатаза STEP), а примена мемантина, као некомпетитивног антагонисте NMDA рецептора, има неуропротективно дејство које се испољава преко више маханизма (114, 115).

Генетски поремећаји који узрокују смањено функционисање NMDA рецептора се доводе у везу са повећаним ризиком за оболевање од схизофреније, и анимални модели схизофреније се заснивају на примени некомпетитивних антагониста NMDA рецептора (фенциклидин, дизоцилпин – МК-801, кетамин), јер њихова примена изазива оштећење неурона у цингулатном кортексу (116, 117). Међутим, кључна структура мозга за коју се везују симптоми који се јављају у психозама је таламус. Обдукционим налазима код оболелих од схизофреније утврђено је смањење броја NMDA рецептора у релејним неуронима таламуса који се пружају до кортекса (118). Једра таламуса су посебно осетљива на деловање антагониста NMDA рецептора, а механизам којим ове супстанце оштећују функционисање кортекса је веровано повећано ослобађање глутамата из таламокортикалних пројекција (119, 120).

### **1.1.8 NMDA РЕЦЕПТОРИ И КАРДИОВАСКУЛАРНИ СИСТЕМ**

Као што је већ наведено NMDA рецептори имају кључну улогу у функционисању централног нервног система (ЦНС), међутим пре неколико деценија су поједини аутори указали на могућност њиховог постојања и ван нервних ткива (121, 122). Постоје подаци о њиховој распрострањености у већем броју ткива и органа, а везано за срце су први пут откривени у кардиомиоцитима пацова (123).

У експериментима који су се заснивали на клонирању комплементарне ДНК (кДНК) хумане GluN2C, утврђено је 88% сличности са GluN2C пацова, као и велика распрострањеност ове субјединице, како у појединим деловима нервног ткива, тако и у другим ткивима, а пре свега у срцу (124). Истраживањем временске и просторне ткивне дистрибуције радиоактивно обележених антагониста NMDA рецептора ( $[^3\text{H}]$ CGS и

[<sup>3</sup>H]МК-801) утврђена је широка распрострањеност ових рецептора у већем броју органа, као што је срце, плућа, бубрези и желуцац (125). Истраживањем појединачних субјединица NMDA рецептора, уочена је висока заступљеност GluN1 субјединице у срцу пацова, док исти аутори нису детектовали GluN2 субјединице, и њихов закључак се своди на евентуално постојање хомоолигомерних NMDA рецептора који се састоје од GluN1 субјединица (126). Изучавањем развојне заступљености појединих субјединица NMDA рецептора у срцу пацова, регистрована је заступљеност GluN2B субјединице која се детектује у срчаном ткиву од раних развојних фаза све до десете недеље постнаталног живота (127). Међутим, у овом истраживању, није уочено постојање GluN1 субјединице у било којој фази развоја. Резултати наведених истраживања нису конзистентни и у појединим својим деловима су контрадикторни.

Такође, постоје докази о постојању NMDA рецептора у ендотелу крвних судова у различитим деловима организма. Примена глутамата и D-серина (који се везује за глицинско везујуће место) узрокује активацију NMDA рецептора, који активирају ендотелну азот-моноксид синтазу (eNOS) услед чега се повећава продукција азот-моноксида (NO) и настаје вазодилатација у можданим артеријама. У овој каскади посредују астроцити који складиште глутамат и D-серин, и ослобађају их у зависности од нервне активности (128, 129). Изучавање утицаја хомоцистеина и механизма преко којих испољава своје негативно дејство на кардиоваскуларни систем, указало је на постојање GluN1 и GluN2A субјединица у каротидним артеријама пацова, као и на експресију свих субјединица NMDA рецептора у ендотелу аорте пацова. У истом истраживању је, такође, регистровано повећање експресије GluN1 субјединице под дејством хомоцистеина и повећање пролиферације ћелија, као и смањење пролиферације уз претходну примену МК-801 (130).

Концентрација глутамата у цереброспиналној течности пацова износи 11,4  $\mu\text{mol/L}$ , док су концентрације у плазми знатно веће (131, 132). На основу наведене чињенице би могао да се донесе закључак да су периферни NMDA рецептори под тоничком, константном активацијом. Међутим, апликација активатора ових рецептора у периферним ткивима повећава њихову активност (133-135). Једно од могућих објашњења је да интерстицијумске концентрације глутамата нису исте као концентрације у плазми. У ЦНС-у се концентрације глутамата у интерстицијуму одржавају у врло уском опсегу



деловањем специфичних глутаматних транспортера, ЕААТ (енгл. *excitatory amino acid transporters*), који уклањају глутамат из синаптичке пукотине, спречавајући претерану стимулацију неурона и последичну неуротоксичност (136). Пошто су различите изоформе ових транспортера откривене у периферним ткивима, између осталог и у кардиоваскуларном систему, постоји могућност да концентрацију глутамата у ванћелијском простору ових ткива регулишу ЕААТ (137, 138). Додатно објашњење пружа могућност евентуалне мање осетљивости NMDA рецептора на периферији, односно мањег афинитета за глутамат и глицин у односу на NMDA рецепторе у ЦНС-у. На овакав закључак наводе подаци истраживања који указују да је константа дисоцијације ( $K_d$ ) глутамата који се везује за NMDA рецепторе остеобласта вишеструко већа у односу на NMDA рецепторе у нервном ткиву (139).

Све је више доказа о значају NMDA рецептора у регулацији електричне активности срца (140). Такође, све више истраживања се бави утицајем претеране стимулације ових рецептора на срце и кардиоваскуларни систем, при чему хронична активација ових рецептора неким од агониста изазива знатне електрофизиолошке поремећаје и повећава вероватноћу настајања коморских аритмија (141). Механизам патофизиолошких поремећаја насталих услед високих концентрација хомоцистеина се доводе у везу са активацијом NMDA рецептора (142).

Инхибиција NMDA рецептора смањује вероватноћу аритмија које настају током реперфузије, као и акумулацију  $Ca^{2+}$  у митохондријама (143, 144). Повећање концентрације  $Ca^{2+}$  услед активације NMDA рецептора изазива повећање оксидационог стреса, а ови цитотоксични ефекти могу да се спрече применом блокатора ових рецептора (145). У истраживањима где је извршена делеција GluN1 субјединице у кардиомиоцитима, уочена је смањена продукција реактивних врста кисеоника (ROS) под дејством хомоцистеина, као и смањена концентрација NO и матриксне металопротеиназе 9 (MMP-9) у митохондријама срца (146, 147). Додатна истраживања указују на протективну улогу блокаде NMDA рецептора у срцу. Блокада NMDA рецептора мемантином смањује редукцију једара у кардиомиоцитима леве коморе животиња које су изложене стресу изазваним хладноћом (148).

Наведене чињенице указују на значај NMDA рецептора у регулацији физиолошких активности, као и у механизмима настајања патолошких процеса у кардиоваскуларном систему.

### 1.1.9 NMDA РЕЦЕПТОРИ И ХОМОЦИСТЕИН

Хомоцистеин (Hcy) представља непротеинску сумповиту аминокиселину која у организму настаје током метаболизма метионина. Ензими цистатион  $\beta$ -синтаза (CBS) и цистатион  $\gamma$ -лиаза (CGL), користе сумповите аминокиселине, цистеин и Hcy, за синтезу водоник сулфида ( $H_2S$ ). Шездесетих година прошлог века Килмер Мек Кули је описао да у случају урођеног недостатка ензима CBS рано настаје атеросклероза и да пацијенти врло рано умиру услед тромбоза у виталним органима, и практично поставио, такозвану, хомоцистеинску теорију атеросклерозе (149-151). Хиперхомоцистеинемија представља повећање концентрације Hcy изнад  $15 \mu\text{mol/l}$  и сматра се независним фактором ризика за настајање кардиоваскуларних болести, као и цереброваскуларних болести, деменције и Алцхајмерове болести (152-155).

Хиперхомоцистеинемија индукује интерстицијалну фиброзу миокарда, услед чега се развија систолна и дијастолна дисфункција срца и хронична срчана инсуфицијенција (156). Претпостављени механизам наведених патолошких промена подразумева активацију NMDA рецептора, а ова претпоставка утемељење налази у чињеници да блокатори NMDA рецептора смањују оксидациони стрес изазван Hcy (157). У претходном тексту је већ наведено да кардиомиоцити испољавају NMDA рецепторе. Активација NMDA рецептора у кардиомиоцитима индукује оксидациони стрес и накопљање калцијума у митохондријама, али функционалне последице активације NMDA рецептора у срцу нису у потпуности јасне. Претпоставља се да активација NMDA рецептора у мишићним ћелијама срца изазива активацију матриксних маталопротеиназа (MMP), ендопептидаза које садрже цинк, чиме се индукује промена састава ванћелијског матрикса у миокарду. Активација MMP услед хиперхомоцистеинемије смањује еластин/колаген однос, повећава таложење колагена у интерстицијуму (фиброза) између ендотела и миоцита, услед чега делује проаритмогено, док примена антагониста NMDA рецептора спречава активацију MMP (147, 158).

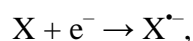
Хиперхомоцистеинемија узрокује и каскаду реакција које изазивају поремећај функције ендотела и повећано накупљање ванћелијског матрикса, а механизми који посредују у овим поремећајима укључују повећање продукције реактивних врста кисеоника и азота (159-162).

## 1.2 СЛОБОДНИ РАДИКАЛИ И РЕДОКС РАВНОТЕЖА

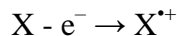
Процеси оксидације и редукције се континуирано одвијају у свим живим биолошким системима. Током процеса оксидације настају слободни радикали, односно молекули, атоми или јони који имају један или више неспарених електрона у својој структури, тако да се налазе између оксидованог и редукованог стања. У физиолошким условима, продукција слободних радикала и њихова елиминација су у међусобној равнотежи, чиме се обезбеђује редукована средина за одвијање метаболичких процеса. Слободни радикали у малим, физиолошким концентрацијама имају низ значајних улога у организму, али њихова продукција у великим количинама може да превазиђе способност антиоксидационог система организма да их елиминише, услед чега настаје оштећење макромолекула и поремећај у функционисању ћелија (163). Поремећај равнотеже прооксиданата и антиоксиданата, у корист прооксиданата, индукује оксидациони стрес.

### 1.2.1 СЛОБОДНИ РАДИКАЛИ

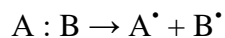
Слободни радикали су молекули, атоми или јони који имају један или више неспарених електрона у последњој орбитали, што их чини углавном врло реактивним, мада њихова реактивност у великој мери варира (164). Најједноставнији облик слободних радикала је атом водоника, јер има само један електрон. У живим системима постоји велики број слободних радикала, од којих неки имају позитивне улоге и учествују у процесима сигналне трансдукције, док други изазивају оштећење макромолекула и поремећаје у функционисању биолошких система, мада њихов утицај зависи од њихове концентрације. Слободни радикали могу да настану додавањем електрона нерадикалским облицима, при чему настају **радикалски анјони**, радикали који су негативно наелектрисани (електрони су носиоци негативног наелектрисања):



или губљењем једног електрона, при чему настају **радикалски катјони**, који су имају вишак позитивног наелектрисања:

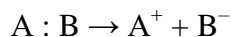


Један од начина којим настају слободни радикали је цепање ковалентне везе када сваки од атома задржава по један електрон из заједничког електронског пара, такозвана **хомолитичка фисија**.



Пример за хомолитичку фисију је цепање везе измађу два молекула кисеоника у водоник пероксиду ( $H_2O_2$ ) под дејством ултраљубичастог (UV) зрачења, при чему настају хидроксил радикали ( $OH^{\bullet}$ ), или цепање молекула воде при чему настају водоник радикал ( $H^{\bullet}$ ) и хидроксил радикал ( $OH^{\bullet}$ ) (165, 166).

За разлику од хомолитичке фисије, током хетеролитичке фисије један од атома задржава оба електрона, и постаје негативно наелектрисан, а други постаје позитивно наелектрисан:



Хетеролитичком фисијом воде настају јон водоника (водоник јон,  $H^{+}$ ) и хидроксидни (или како се често обележава, хидроксил) јон ( $OH^{-}$ ).

Еволуција слободних радикала може да се подели практично у три фазе: фаза иницијације, фаза пропације и фаза терминације.

- фаза иницијације подразумева додавање или одузимање једног електрона нерадикалским облицима, при чему им се мењају физичке и хемијске карактеристике и постају знатно реактивнији;
- фаза пропације обухвата период током кога настали слободни радикал реагује са околним молекулима (циљни молекул) и узима им један електрон, при чему он сам постиже стабилно стање, али циљни молекул постаје слободан радикал. Настали слободни радикали даље делују са околним молекулима, узрокујући настајање нових слободних радикала, чиме се број слободних радикала у кратком периоду вишеструку повећава;
- током фазе терминације слободни радикали се неутралишу деловањем ензимских и неензимских компоненти антиоксидационог система, при чему се спречава њихова даља пропација.

У биолошким системима постоји велики број слободних радикала, али су свакако најзначајнији кисеонични слободни радикали, или реактивне врсте кисеоника (енгл. *Reactive Oxygen Species* - ROS), као и азотни слободни радикали (енгл. *Reactive Nitrogen Species* - RNS), а поред њих постоје и реактивне врсте угљеника (енгл. *reactive carbon species* - RCS) и реактивне врсте сумпора (енгл. *reactive sulfur species* - RSS) (Табела 1.2) (167).

### Реактивне врсте кисеоника - ROS

#### Радикалски облици

Супероксид анјон радикал -  $O_2^{\bullet -}$

Хидроксил радикал -  $OH^{\bullet}$

Пероксил радикал -  $ROO^{\bullet}$

Алкоксил радикал -  $RO^{\bullet}$

Хидропероксил радикал -  $HOO^{\bullet}$

#### Нерадикалски облици

Водоник пероксид -  $H_2O_2$

Хипохлорна киселина -  $HOCl$

Озон -  $O_3$

Синглет кисеоник -  $^1O_2$

### Реактивне врсте азота - RNS

#### Радикалски облици

Азот-моноксид радикал -  $NO^{\bullet}$

Азот-диоксид радикал -  $NO_2^{\bullet}$

#### Нерадикалски облици

Азот-диоксид анјон -  $NO_2^-$

Азот-триоксид -  $N_2O_3$

Нитронијум јон -  $NO_2^+$

Пероксинитрит анјон -  $OONO^-$

Алкил пероксинитрит -  $ROONO$

Нитроксил анјон -  $NO^-$

Нитрозил катјон -  $NO^+$

Нитрил хлорид -  $NO_2Cl$

### Реактивне врсте угљеника - RCS

Алкил радикал -  $R^{\bullet}$

Алкоксил радикал -  $RO^{\bullet}$

Пероксил радикал -  $ROO^{\bullet}$

### Реактивне врсте сумпора - RSS

Тиол радикал -  $RS^{\bullet}$

Глутатион радикал -  $GS^{\bullet}$

Диглутатион-дисулфид анјон радикал -  $GSSG^{\bullet -}$

## 1.2.2 СЛОБОДНИ РАДИКАЛИ И КАРДИОВАСКУЛАРНИ СИСТЕМ

Продукција и елиминација ROS/RNS у срцу зависи од ензима који учествују у синтези ROS/RNS и одговарајућих антиоксидационих система и одвија се углавном у митохондријама, саркоплазматском ретикулуму у сарколеми (168). У свим ћелијама, па и у кардиомиоцитима продукција слободних радикала се у физиолошким условима доминантно одвија у митохондријама током процеса оксидативне фосфорилације, односно током синтезе АТФ-а. У миоцитима митохондрије заузимају 30% до 40% запремине, и синтетишу више од 90% АТФ-а. С обзиром на постојање велике количине антиоксидационих ензима у митохондријама (као што је супероксид дисмутаза - SOD), највећи број слободних радикала се преводи у водоник пероксид ( $H_2O_2$ ), који се потом под дејством различитих пероксидаза редукује до воде (169, 170).  $H_2O_2$  може из митохондрија да дифундује у цитоплазму, где учествује у редокс-зависној сигналној трансдукцији. У условима повећане продукције ROS у митохондријама, део  $H_2O_2$  се у Фентоновој реакцији преводи у врло реактивни хидроксил радикал ( $OH^{\bullet}$ ).

Поред митохондрија, слободни радикали настају и у саркоплазматском ретикулуму и сарколеми. У саркоплазматском ретикулуму, поред ROS, као што су супероксид анион радикал ( $O_2^{\bullet-}$ ) и  $H_2O_2$ , постоји и азот-моноксид (NO), који припада RNS. Ензими који су укључени у синтезу наведених молекула су у међусобној спрези, па тако активност ензима неуроналне азот-моноксид синтазе (nNOS или NOS1), који катализује синтезу NO, у физиолошким условима смањује активност ензима ксантин оксидоредуктазе (XOR), који катализује синтезу  $O_2^{\bullet-}$ , чиме се концентрација  $O_2^{\bullet-}$  одржава на ниском нивоу (170, 171). Главни извор  $O_2^{\bullet-}$  у сарколеми је ензим NADPH оксидаза 2 (NOX2), који редукује  $O_2$  у  $O_2^{\bullet-}$ , који се избацује ван ћелије, где брзо подлеже дисмутацији под дејством ензима SOD, при чему настаје  $H_2O_2$  (173-175).

$O_2^{\bullet-}$  који настаје у сарколеми и саркоплазматском ретикулуму може да реагује са NO, при чему настаје нешто мање реактиван радикал пероксинитрит ( $ONOO^{\bullet}$ ), или дисмутацијом, под дејством цитоплазматског облика SOD (Cu/ZnSOD, SOD1), формира  $H_2O_2$ .  $ONOO^{\bullet}$  се даље неутралише реакцијама са NO,  $CO_2$ , мокраћном киселином или редукованим глутатионом (GSH), док се настали  $H_2O_2$  редукује деловањем

пероксиредоксина (тиоредоксинаска пероксидаза, Prx) или пероксидаза које учествују у метаболизму глутатиона (168).

Поред nNOS, у миокарду постоји и ендотелна азот-моноксид синтаза (eNOS, NOS3) а оба наведена ензима су конститутивно заступљена у срцу. Ови ензими су углавном локализовани у сарколеми и мембрани саркоплазматског ретикулума, мада њихова локализација може да се мења под дејством различитих стимулуса (176).

У физиолошким условима ROS/RNS учествују у регулацији функције срца, а врста редокс биомолекула која се укључује у поједине регулационе процесе зависи од више фактора као што су: редокс потенцијал биомолекула (има један или два неспарена електрона), дужина полуживота редокс биомолекула, као и редокс потенцијал окружења. Наведени фактори утичу на број циљних молекула на који редокс биомолекули могу да делују, удаљеност на којој могу да остваре своје дејство, и врсту модификације коју одређени ROS/RNS биомолекул може да изврши (168).

Оксидациони агенси испољавају своје биолошко дејство реверзбилном модификацијом протеина, и то пре свега аминокиселина које садрже сумпор, као што су цистеин или метионин. Повратне модификације цистеина обухватају реакције S-нитрозилације, S-сулфенилације и образовање дисулфидних веза, било између два цистеина или између цистеина и глутатиона (S-глутатионилација). Наведене промене мењају функционисање захваћеног протеина, било да тај протеин постаје функционалан или да се његова функционалност смањује или престаје, а такође наведене промене могу да служе као заштита протеина од трајног оксидационог оштећења (168, 177). Редокс биомолекули могу да учествују у преношењу сигнала из једног у други одељак ћелије на више начина: деловањем на редокс-осетљиве транскрипционе факторе, транснаитрозилацијом протеина, или деловањем на друге сигналне молекуле као што су фосфатазе или киназе (178).

Поред наведене физиолошке улоге ROS/RNS биомолекула, повећана продукција ROS/RNS, односно оксидациони стрес, се доводи у везу са великим бројем поремећаја, међу којима знатан удео чине и поремећаји функције срца и кардиоваскуларног система. Атеросклероза, као један од најзначајних патолошкох ентитета данашњице, са великим бројем компликација које изазива, се директно доводи у везу са оксидационим стресом, односно са метаболизмом оксидованог LDL-а (179). Поремећаји ритма срчаног рада, као

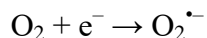
што је фибрилација преткомора, се такође доводе у везу са оксидационим стресом (173, 180).

### 1.2.3 ПОЈЕДИНИ ОБЛИЦИ РЕАКТИВНИХ ВРСТА КИСЕОНИКА - ROS И АЗОТА -RNS

Молекулски кисеоник ( $O_2$ ) може да се сматра слободним радикалом јер има два неспарена електрона, међутим ови електрони имају исте спинове, и овај облик кисеоника је његов најстабилнији облик у коме се налази у ваздуху. Кисеоник може да делује као оксидациони агенс, односно везује за себе и одузима електроне са другог молекула (или одузима водоник, или додаје кисеоник). За разлику од оксидационих агенаса, редукциони агенси предају своје електроне другом молекулу (или додају водоник, или одузимају кисеоник) (164).

#### 1.2.3.1 Супероксид анјон радикал - $O_2^{\bullet-}$

Супероксид анјон радикал ( $O_2^{\bullet-}$ ) настаје када се један електрон дода молекулском кисеонику, односно редуковањем молекулског кисеоника једним електроном:



Додавањем још једног електрона, добио би се пероксидни јон ( $O_2^{2-}$ ) у коме је веза између два кисеоника знатно слабија, и који није радикал јер нема неспарених електрона, а додавањем још два електрона веза између два кисеоника се потпуно уклања при чему се добијају два оксидна јона ( $O^{2-}$ ). У биолошким системима, редукција молекулског кисеоника се два електрона даје водоник пероксид ( $H_2O_2$ ), а редукцијом молекулског кисеоника са четири електрона добија се вода (165, 181).

Супероксид анјон радикал ( $O_2^{\bullet-}$ ) може да настане на више начина, пре свега током процеса респирације, непотпуном редукцијом молекулског кисеоника на мембранама митохондрија. Наиме, у митохондријама се више од 95% унетог  $O_2$  редукује до воде. Комплекс I и комплекс III респираторног ланца митохондрија учествују у транспорту протона у интермембрански простор, при чему се електрони транспортују преко неколико кофактора како би се избегло нежељено стварање ROS. Међутим, како је потребно четири



електрона за редукцију молекулског кисеоника до воде, није могуће да се сва четири електрона додају кисеонику истовремено, тако да  $O_2^{\bullet-}$  вероватно представља нормалан интермедијарни каталитички производ комплекса I и III (165, 182). Еквивалентно наведеном механизму,  $O_2^{\bullet-}$  код биљака, алги и цијанобактерија настаје током процеса фотосинтезе (183).

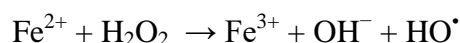
Још два ензима која имају значајну улогу у продукцији  $O_2^{\bullet-}$  су NADPH оксидаза и ксантин оксидаза (184, 185). Повећање активности наведених ензима представља механизам деловања појединих цитостатика (186).

Реакцијом два молекула  $O_2^{\bullet-}$ , један молекул  $O_2^{\bullet-}$  се редукује, други се оксидује, при чему настаје водоник пероксид:

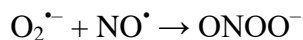


Наведена реакција је при киселим рН вредностима спонтана, док је у неутралној рН средини која је углавном заступљена у биолошким системима катализује ензим супероксид дисмутаза (187, 188).

Супероксид анјон радикал ( $O_2^{\bullet-}$ ) је релативно нетоксичан, међутим његова потенцијална штетност се огледа у реакцији са другим метаболитима, при чему може да пређе у друге, потенцијално реактивније, а самим тим у токсичније реактивне врсте. У Фентоновој реакцији, у присуству прелазних метала у редукованом стању (феро гвожђе,  $Fe^{2+}$ )  $H_2O_2$  који настаје дисмутацијом  $O_2^{\bullet-}$  даје знатно реактивнији хидроксил радикал ( $HO^{\bullet}$ ) (189):



Такође, у реакцији са  $NO^{\bullet}$ ,  $O_2^{\bullet-}$  даје пероксинитрит:



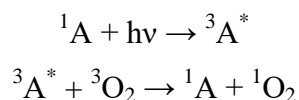
### 1.2.3.2 Синглет кисеоник - $^1O_2$

Синглет кисеоник ( $^1O_2$ ) не спада у слободне радикале, већ у нерадикалске облике и настаје додавањем енергије молекулском кисеонику при чему се реорганизују електрони у валентној орбитали. Наиме у синглет кисеонику један електрон у последњој орбитали мења спин, при чему се оксидациони потенцијал знатно повећава, услед чега  $^1O_2$  може да врши директну оксидацију великог броја биомолекула, укључујући ДНК, протеине и липиде (190). Услед промене спина у валентној орбитали молекула кисеоника настају два

облика синглет кисеоника: делта синглет кисеоник ( $^1\Delta gO_2$ ) и сигма синглет кисеоник ( $^1\Sigma g^+O_2$ ).  $^1\Sigma g^+O_2$  је знатно нестабилнији у односу на  $^1\Delta gO_2$ , тако да практично у биолошким системима постоји само  $^1\Delta gO_2$  и када се каже синглет кисеоник мисли се на  $^1\Delta gO_2$  (164).

Од 20 аминокиселина које улазе у састав протеина  $^1O_2$  реагује са хистидином, цистеином, метионином, тирозином и триптофаном, при чему је хистидин главни циљни молекул оксидације синглет кисеоником (191). У физиолошким условима  $^1O_2$  се ствара у малим количинама и делује као сигнални молекул у процесима експресије гена и иницирања апоптозе (192-194).

Најчешћи начин настајања  $^1O_2$  у биолошким системима су такозване фотосензитивне реакције. За одвијање фотосензитивне реакције је неопходно присуство кисеоника, светлости одговарајуће таласне дужине и фотосензитивног једињења, које има могућност да апсорбује енергију фотона, а затим ту енергију преда кисеонику који прелази у побуђено стање синглет кисеоника ( $^1O_2$ ). Постоје два облика фотосензитивних реакција, тип I и тип II. Деловањем светлости ( $h\nu$ ) на фотосензитивно једињење (A), оно прелази у побуђено стање. Пошто је ово стање нестабилно, овако побуђена фотосензитивна једињења теже да предају вишак енергије околним молекулима, како би поново постигла стабилно стање. У типу I фотосензитивних реакција одвија се трансфер електрона између побуђеног фотосензитивног једињења и супстрата, при чему настају слободни радикали, који у реакцији са кисеоником дају реактивне врсте кисеоника, а у типу II фотосензитивних реакција  $^1O_2$  настаје услед трансфера енергије током судара побуђеног фотосензитивног једињења и триплет кисеоника (195):



Наведене фотосензитивне реакције се у физиолошким условима одвијају код биљака током процеса фотосинтезе, где је фотосензитивно једињење хлорофил, а код животиња се одвија у кожи и у мрежњачи ока (фотосензитивна једињења су меланин и ретинол) (196, 197).

Две јединствене особине  $^1O_2$  су његов изузетно кратак полуживот ( $\mu s$ ) као и кратко растојање (nm) на коме може да делује на друге молекуле, што  $^1O_2$  чини врло ефикасним у елиминисању појединих протеина и ћелија са великом временском и просторном

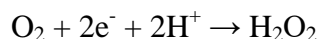
прецизношћу (194). Наведена чињеница представља основу фотодинамске терапије, која подразумева осветљавање циљног ткива које је претходно третирано фотосензитивним једињењима, услед чега се ствара  $^1\text{O}_2$  који изазива оштећење циљних ћелија комбинацијом апоптозе, некрозе и имунских реакција (194). Фотодинамска терапија се користи у лечењу великог броја карцинома, као што су карциноми коже, карциноми дојке, карциноми уринарног система, при чему се као фотосензитивна једињења најчешће користе порфирини, а додатна карактеристика ове терапије је врло мали број нежељених ефеката (198-201).

### 1.2.3.3 Водоник пероксид - $\text{H}_2\text{O}_2$

Водоник пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) је један од најстабилнијих реактивних врста кисеоника, и као што је већ наведено настаје дисмутацијом супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) у реакцији која је у биолошким системима катализована неком од изоформи ензима супероксид дисмутазе:

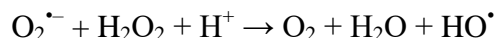


Водоник пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) такође може да настане и непотпуном редукцијом молекулског кисеоника са два електрона и два протона:

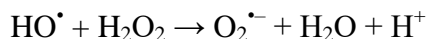


Највећи део  $\text{H}_2\text{O}_2$  који се продукује на овај начин настаје у митохондријама, где се  $\text{O}_2^{\bullet-}$  преводи у  $\text{H}_2\text{O}_2$  деловањем ензима супероксид дисмутазе 1 (SOD1, Cu/ZnSOD) у интермембранском простору митохондрија и супероксид дисмутазе 2 (SOD2 - MnSOD) у матриксу митохондрија (202). Органела која производи највећу количину  $\text{H}_2\text{O}_2$  су вероватно пероксисоми, при чему  $\text{H}_2\text{O}_2$  има низ значајних функција неопходних за адекватно функционисање, како појединачних ћелија, тако и организма у целини (203).  $\text{H}_2\text{O}_2$  има врло битну улогу у процесима сигналне трансдукције, мењајући функционисање одређених молекула променом њиховог оксидационог стања (204). Показано је такође да  $\text{H}_2\text{O}_2$  има кључну улогу у процесима зарастања рана. Наиме, рана продукција  $\text{H}_2\text{O}_2$  након настајања ране смањује ризик од настајања инфекције, активира сигналне путеве у епителу који омогућавају регенерацију епидерма и учествује у привлачењу неутрофила и других леукоцита у подручје ране (205).

Штетна дејства  $\text{H}_2\text{O}_2$  заснивају се на реакцији  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{O}_2^{\bullet-}$  при чему настаје врло реактиван хидроксил радикал ( $\text{HO}^\bullet$ ):



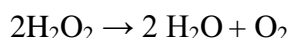
и



Наведена реакција представља Хабер-Вејсову (*Haber-Weiss*) реакцију, која може да се одвија под каталитичким дејством прелазних метала – Фентонова (*Fenton*) реакција (189, 206, 207):

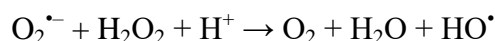


Велики број студија који се бавио проучавањем деловања  $\text{H}_2\text{O}_2$  је показао да су концентрације  $\text{H}_2\text{O}_2$  изнад  $100 \mu\text{mol}$  цитотоксичне за велики број ћелијских култура иако  $\text{LD}_{50}$  варира у зависности од врсте ћелија, дужине излагања и других фактора (164, 208). Постоји више ензимских система који су укључени у регулацију концентрације  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Каталазе су ензими који су заступљени углавном у пероксизомима и разграђују  $\text{H}_2\text{O}_2$  који настаје деловањем оксидаза, али ови ензими не спадају у најзначајније ензиме који су укључени у катаболизам  $\text{H}_2\text{O}_2$  имајући у виду да нису заступљени у митохондријама где се доминантно ствара  $\text{H}_2\text{O}_2$  (209). Доскоро се сматрало да су ензими који спадају у породицу глутатион-пероксидаза најзначајнији за катаболизам  $\text{H}_2\text{O}_2$ , међутим вероватно су то пероксиредоксини (165, 210, 211). Основна реакција коју катализују ензими при разградњи  $\text{H}_2\text{O}_2$  је:



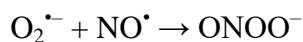
#### 1.2.3.4 Хидроксил радикал - $\text{HO}^\bullet$

Хидроксил радикал ( $\text{HO}^\bullet$ ) је један од најреактивнијих и најтоксичнијих слободних радикала. Као што је већ наведено настаје у Хебер-Вајсовој и Фентоновој реакцији од  $\text{H}_2\text{O}_2$  (189, 206, 207):

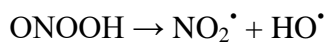


$\text{HO}^\bullet$  врло брзо реагује са молекулима из окружења, тако да је његово равнотежно стање практично 0.  $\text{HO}^\bullet$  представља извор оштећења у митохондријама, јер ту у највећој мери

настаје, као и у ћелији уопште, а повећана продукција  $\text{HO}^\bullet$  се доводи у везу са великим бројем поремећаја и болести (212). Због своје велике реактивности  $\text{HO}^\bullet$  лако ступа у реакцију са полинезасићеним масним киселинама ћелијских мембрана иницирајући на тај начин каскаду липидне пероксидације. У условима смањене доступности кисеоника у ткивима повећава се продукција азот-моноксида ( $\text{NO}^\bullet$ ), који је и сам слободан радикал, који ступа у реакцију са  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , при чему настаје пероксинитрит ( $\text{ONOO}^-$ ):



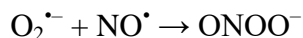
$\text{ONOO}^-$  при физиолошким вредностима pH врло брзо узима један протон, при чему се наглађује пероксинитритна киселина ( $\text{ONOOH}$ ), која је и сама снажно оксидационо средство и може директно да оштети протеине, липиде и ДНК, а такође подлеже процесу хомолитичке фисије при чему настају азот-диоксид ( $\text{NO}_2^\bullet$ ) и хидроксил радикал ( $\text{HO}^\bullet$ ) (165, 213):



### 1.2.3.5 Азот-моноксид - $\text{NO}^\bullet$

Азот-моноксид ( $\text{NO}^\bullet$ ) представља врло важан међућелијски гласник код кичмењака и учествује у регулацији великог броја врло важних процеса попут: регулације протока крви, тромбозе и нервне активности, као и неспецифичне имуности (213).  $\text{NO}^\bullet$  врло лако и брзо дифундује кроз ћелијске мембране, што је од кључног значаја за разумевање његове биолошке активности.

Иако има једна неспарен електрон у валентној орбитали, због чега се убраја у слободне радикале, степен оксидације органских молекула азот-моноксидом у аеробним условима је готово исти као и степен оксидације који узрокује молекулски кисеоник (213, 214). Токсичност  $\text{NO}^\bullet$  се заснива на реакцији са другим слободним радикалима, при чему настају високо реактивна једињења, као што је пероксинитрит ( $\text{ONOO}^-$ ), што је већ објашњено у претходном тексту:

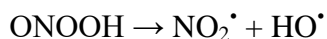


$\text{NO}^\bullet$  синтетише ензим азот-моноксид синтаза (NOS), који постоји у три изоформе, ендотелна, нервна и индуцибилна азот-моноксид синтаза (eNOS, nNOS, iNOS). Синтеза  $\text{NO}^\bullet$  може да се подели у две фазе, у првој фази NOS катализује хидролизу L-аргинина до

$N^{\circ}$ -хидроксил-L-аргинина, који остаје везан за ензим, а у другој фази NOS оксидује  $N^{\circ}$ -хидроксил-L-аргинин до L-цитрулина и  $NO^{\bullet}$  (215):



Док су eNOS и nNOS конститутивни ензими и катализују синтезу малих количина  $NO^{\bullet}$ , проинфламаторни медијатори активирају iNOS, услед чега се продукција  $NO^{\bullet}$  повећава (216, 217). Такође, у условима инфламације се повећава продукција  $O_2^{\bullet-}$ , који у реакцији са  $NO^{\bullet}$  даје  $ONOO^-$ .  $ONOO^-$  се лако протонује дајући пероксинитритну киселину ( $ONOOH$ ), при чему је веза између два атома кисеоника изузетно лабилна, тако да хомолитичком фисијом настају два високореактивна слободна радикала, азот-диоксид ( $NO_2^{\bullet}$ ) и хидроксил радикал ( $HO^{\bullet}$ ) (165, 213):



Још једну важну реакцију пероксинитрита катализују прелазни метали, укуључујући металне центре супероксид дисмутазе и мијелопероксидазе. Прелазни метали катализују хетеролитичку фисију пероксинитрита, при чему настају хидроксил анијон ( $OH^-$ ) и нитронијум јон ( $NO_2^+$ ) (213).

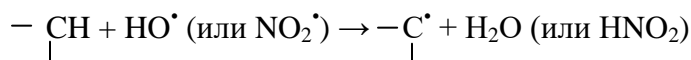
Један од заштитних механизма који спречавају деловање пероксинитрита је и реакција мокраћне киселине и слободних радикала који настају реаговањем пероксинитрита и угљен-диоксида ( $CO_2$ ) (218):



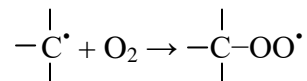
Мокраћна киселина је завршни продукт разградње пуринских база код виших примата (код осталих животиња је то алантоин), а производи реакције пероксинитрита и  $CO_2$  су  $NO_2^{\bullet}$  и карбонатни радикал ( $CO_3^{\bullet-}$ ) (219).

#### 1.2.4 ЛИПИДНА ПЕРОКСИДАЦИЈА

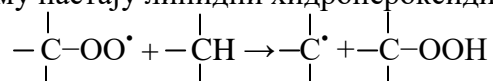
Липидна пероксидација је процес који се одвија и у физиолошким условима, и вероватно представља један од највише проучаваних последица деловања ROS. Полинезасићене масне киселине (енгл. *polyunsaturated fatty acids* - PUFA), које су саставни део липида ћелијских мембрана, су врло осетљиве на процес липидне пероксидације. Реактивни слободни радикали (попут  $HO^{\bullet}$  или  $NO_2^{\bullet}$ ) могу да одузму водоник из везе C-H, на пример, из PUFA ћелијске мембране. Пошто водоник има само један електрон ( $H^{\bullet}$ ), на угљенику остаје један неспарен електрон (164):



На тај начин настају слободни радикали који у центру имају угљеник и који као и други слободни радикали врло брзо реагују са кисеоником, при чему настају пероксил радикали:



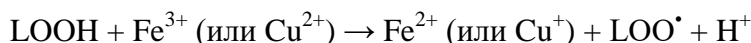
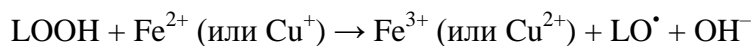
Настали пероксил радикали су врло реактивни и врло брзо оксидују и мембранске протеине и ступају у реакцију са околним PUFA услед чега се иницира ланчана реакција која се шири даље, при чему настају липидни хидропероксиди (164):



Уколико је ланац PUFA довољно дугачак пероксил радикал може да веже и уклони  $\text{H}^\bullet$  из исте PUFA, при чему настају циклични пероксиди (220).

Почетно уклањање  $\text{H}^\bullet$  из угљеничног ланца PUFA може да настане на било ком месту, при чему настају сложене смеше пероксида.  $^1\text{O}_2$  може директно да реагује са PUFA дајући различите хидропероксиде, при чему је полуживот  $^1\text{O}_2$  у хидрофобном окружењу ћелијских мембрана знатно дужи у односу на хидрофилно окружење (164, 189).

Јони гвожђа и бакра убрзавају процес липидне пероксидације на два начина. Први начин подразумева већ поменути Фентонову реакцију (када је  $\text{Fe}^{2+}$  у питању), када прелазни метал раскида везу између атома кисеоника у  $\text{H}_2\text{O}_2$  при чему настаје  $\text{HO}^\bullet$ , а други аналогну реакцију када прелазни метал цепа везу између два атома кисеоника карбоксилне групе масних киселина (LOOH), при чему настају алкоксил радикали ( $\text{LO}^\bullet$ ), али и пероксил радикали ( $\text{LOO}^\bullet$ ), који настављају ланчану реакцију липидне пероксидације (164, 189, 221):



Последице липидне пероксидације подразумевају смањење флуидности мембране, повећавање пропустљивости мембране за супстанце које у физиолошким условима пролазе искључиво кроз одговарајуће јонске канале или посредством других мембранских протеина (рецимо  $\text{K}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ ), поремећај структуре и функције мембранских протеина, инактивацију рецептора, ензима и јонских канала (164). Продужена оксидација PUFA које улазе у састав фосфолипида ћелијских мембрана изазивају њихову фрагментацију, што даље изазива руптуру ћелијских мембрана, као што су мембране лизозома или мембране

централних вакуола. Поред тога, неки од продуката липидне пероксидације су у стању да директно оштете друге молекуле, као на пример изопростани, односно циклични пероксиди који настају од PUFA са најмање три двогубе везе у угљеничном низу (арахидонска киселина, еикозапентаенска киселина, докозахексаенска киселина, линолеинска киселина) (164, 220).

Разлагањем липидних пероксида под дејством прелазних метала настају токсични продукти попут: еоксида, засићених и незасићених алдехида, угљоводоника, као што су етан и пентан. Посебно токсичан алдехид је малондиалдехид који настаје пероксидацијом линолеинске, арахидонске и еикозапентаенске киселине (164, 222).

Одређивање малондиалдехида и TBARS-а су методе које се најчешће користе у процени оксидационог стреса (енгл. thiobarbituric acid reactive substances - TBARS) (223).

### 1.2.5 МЕХАНИЗМИ АНТИОКСИДАЦИОНЕ ЗАШТИТЕ

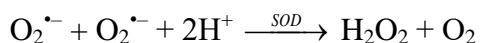
У циљу контроле продукције ROS и других реактивних врста, како би се ћелије заштитиле од погубних ефеката оксидационог стреса, развиле су се бројне методе антиоксидационе заштите. Систем антиоксидационе заштите може да се подели у неколико нивоа (224):

- елементе **примарне** антиоксидационе заштите чине ензими који имају улогу у разградњи слободних радикала (супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион пероксидаза (GPx) и глутатион редуктаза (GR)), као и поједина неензимска једињења, попут глутатиона (GSH), аскорбинске киселине,  $\beta$ -каротена,  $\alpha$ -токоферола (167, 202, 225);
- **секундарни** ниво антиоксидационе заштите обухвата специфичне оксидоредуктазе, као што су тиол трансферазе, протеин-ADP-рибозилтрансферазе, и АТР и  $\text{Ca}^{2+}$  независне трансферазе, пигменте (као што је мелатонин), и неке стабилне липидне молекуле (LDL);
- **терцијарни** ниво антиоксидационе заштите обухвата протеине који везују прелазне метале (церулоплазмин који везује бакар, апоферитин који везује гвожђе) (167, 226).



### 1.2.5.1 Супероксид дисмутаза - SOD

Супероксид дисмутаза (SOD) је металопротеин који 10.000 пута убрзава реакцију дисмутације супероксид анјон радикала ( $O_2^{\bullet-}$ ) у водоник пероксид ( $H_2O_2$ ) (227, 228):

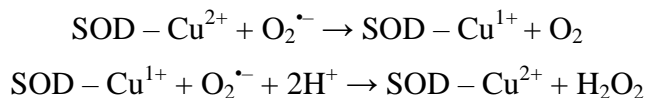


SOD постоји у свим аеробним организмима, и у свим одељцима ћелије где постоји продукција ROS. У зависности од врсте метала који има улогу кофактора постоји више врста SOD (202, 229, 230):

- Cu,Zn-SOD, за чију је активност неопходно присуство бакра и цинка, и која се налази у интермембранском простору митохондрија и цитоплазми ћелија;
- Mn-SOD или митохондријска SOD, чији активни центар садржи манган, и који се налази у матриксу митохондрија;
- EC-SOD или екстрацелуларна SOD; и
- Fe-SOD, која садржи гвожђе и постоји у хлоропластима биљака.

Све облике SOD кодирају гени у једру који су осетљиви на промене у окружењу, пре свега на стварање појединих облика ROS и сигналне механизме које покрећу (231). Наведени облици SOD се у великој мери разликују по протеинској структури, металима који имају улогу кофактора, локализацији одговарајућег гена на хромозомима (*sod1* ген - 4p15.1–15.3, *sod2* ген - 6q25.3, *sod3* ген - 21q22.11), али сви катализују реакцију која је претходно наведена (232).

Cu,Zn-SOD је супероксид дисмутаза која је откривена, и прво је названа еритрокупреин или хемокупреин (230, 233). Налази се у цитоплазми, једру, микрозомима и интермембранском простору митохондрија (230, 234). У активности Cu,Zn-SOD,  $Cu^{2+}$  учествује у процесима оксидације и редукције, док  $Zn^{2+}$  омогућава одржавање стабилности ензима (202):



Испитивањем узрока настајања фамилијарне амиотрофичке склерозе дошло се до закључка да мутације гена за Cu,Zn-SOD имају везе са настајањем ове болести (235, 236). Испитивањем мишева којима недостаје ензим Cu,Zn-SOD утврђено је да ови мишеви у

почетку делују нормално, мада су знатно осетљивији на деловање токсина који индукују продукцију ROS, али како постају старији знатно чешће настају неуролошки поремећаји, губитак слуха и карциноми (пре свега карцином јетре). Такође су често стерилни и имају поремећај функције кардиоваскуларног система (165, 237).

Такође, испитивањем мишева са недостатком ензима Mn-SOD дошло се до закључка да је овај ензим још значајнији за функционисање организма. Наиме, мишеви са недостатком овог ензима углавном су умирали током првих десет дана од рођења због поремећаја у функционисању срца, накопљања масти у скелетним мишићима и јетри, метаболичке ацидозе, и тешког поремећаја у функцији митохондрија, пре свега у срцу, а и у другим ткивима (165, 238). Такође је показано да већи број врста туморских ћелија има смањену активност Mn-SOD, као и да повећање експресије Mn-SOD смањује туморски потенцијал ћелијских линија малигног меланома, карцинома дојке и глиома (239-244). Услед тога се Mn-SOD сматра убиквитарним металоензимом који је есенцијалан за одражавање живота код свих аеробних организама, од бактерија до човека (245, 246).

EC-SOD је примарни ензим антиоксидационе заштите који делује у ванћелијском простору. Као и Cu,Zn-SOD, и ова изоформа SOD садржи бакар и цинк, и постоји у високим концентрацијама у појединим ткивима као што су крвни судови, срце, плућа, бубрези, постељица и ванћелијске течности. EC-SOD учествује у регулацији крвног притиска и васкуларног тонуса, тако што утиче на концентрацију  $O_2^{\bullet-}$ , а самим тим на доступност  $NO^{\bullet}$  (247-249). Генерално, постоји различита дистрибуција изоформи SOD у појединим ткивима, при чему је дефинитивно Cu,Zn-SOD (или SOD1) најзаступљенија. Међутим, у васкуларном ткиву, поготову у зиду артерија EC-SOD (или SOD3) чини велики удео од укупне количине SOD. Рецимо у хуманој аорти од укупне активности SOD, EC-SOD чини половину (250, 251).

Повећање активности EC-SOD и последично смањење концентрације  $O_2^{\bullet-}$  показало је позитивне ефекте у већем броју болести. Тако је позитиван ефекат активности овог ензима регистрован у дијабетесу индукованом стрептозотоцином где побољшава еректилну функцију, смањује васкуларну дисфункцију узроковану старењем, смањује периферни васкуларни отпор и смањује крвни притисак код спонтано хипертензивних пацова (252-254). На експресију и активност EC-SOD утиче више фактора. Хепарин, поред својих познатих ефеката, примењен интравенски ослобађа EC-SOD из везе са

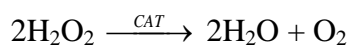
протеогликанима и знатно повећава његову активност у плазми (249, 255, 256). Естроген повећава експресију гена за ЕС-SOD, док прогестерон има супротан ефекат (257). Ангиотензин II повећава експресију ЕС-SOD, што може да буде последица повећања продукције  $O_2^{\cdot-}$  и смањења укупне активности SOD, које изазива ангиотензин II, а такође постоји позитивна корелација између концентрације хомоцистеина у плазми и активности ЕС-SOD (258-260).

На активност SOD наслања се деловање ензима чија је улога разлагање насталог  $H_2O_2$ , као што је каталаза (CAT), глутатион пероксидаза (GPx) и глутатион редуктаза (GR).

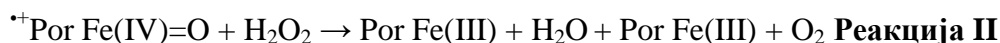
### 1.2.5.2 Каталаза - CAT

Водоник пероксид ( $H_2O_2$ ) је један од најзаступљенијих молекула који се сврставају у реактивне врсте, мада није слободан радикал јер нема неспарених електрона. Имајући у виду његову синтезу, брза разградња и уклањање су од кључног значаја у свим аеробним ћелијама (202, 208). Хидропероксидазе, где спадају каталазе и пероксидазе, су убиквитарне оксидоредуктазе које катализују хетеролитичко цепање везе између два атома кисеоника како у  $H_2O_2$ , тако и у малим органским пероксидима (261). Каталазе могу да се поделе у неколико група. Две групе каталаза садрже хем, такозване типичне, „монофункционалне“ каталазе и каталазе-пероксидазе. Обе групе испољавају велику каталазну активност, али се и у великој мери разликују у погледу аминокиселинског састава, активног места ензима, терцијарне и кватернарне структуре. Постоје и каталазе које уместо хема садрже манган, али за разлику од претходних које су заступљене и у прокариотским и у еукариотским ћелијама, каталазе које садрже манган постоје само у прокариотским ћелијама (261).

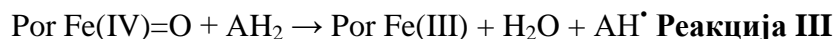
Каталитичка реакција подразумева разградњу два молекула  $H_2O_2$  при чему настају два молекула воде и молекул кисеоника:



Наведена реакција се одвија у два корака, при чему се два молекула  $H_2O_2$  везују за активно место ензима, односно хем (261):



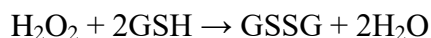
Каталазе испољавају и пероксидазну активност, при чему се доноси електрона ( $\text{AH}_2$ ) оксидују и настају радикали ( $\text{AH}^\bullet$ ). Овакав пероксидазни циклус се одвија кроз три корака, и доста је спор (261):



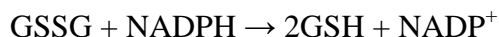
Каталазе (CAT) не спадају у најзначајније ензиме који разлажу  $\text{H}_2\text{O}_2$ , из простог разлога што нијесу заступљене у митохондријама где се у највећој мери синтетише  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , а самим тим и  $\text{H}_2\text{O}_2$  (164). Каталазе се углавном налазе у пероксизомима (209).

### 1.2.5.3 Глутатион пероксидаза (GPx) и глутатион редуктаза (GR)

Глутатион пероксидазе (GPx) се сврставају у ензиме који су најзначајнији за разградњу  $\text{H}_2\text{O}_2$  код животиња. GPx садрже селен и катализују редукцију  $\text{H}_2\text{O}_2$  и липидних хидропероксида до  $\text{H}_2\text{O}$  и липидних алкохола у реакцији у којој се као редукциони косупстрат користи редуковани глутатион (GSH) (165, 232, 262):



Као производ реакције настаје оксидовани глутатион (GSSH), који се састоји од два молекула GSH повезаних дисулфидним мостом, и који се враћа у редуковано стање дејством ензима глутатион редуктазе (GR) (263):



GPx може да редукује и пероксинитрит (ONOO). Постоји пет познатих облика GPx: GPx-1, односно класична форма ензима која је заступљена у свим ћелијама, GPx-2, овај облик ензима је заступљен у ћелијама гастроинтестиналног система, GPx-3, форма ензима која се налази у плазми, GPx-4, или фосфолипидна GPx која катализује редукцију фосфолипидних хидропероксида, и snGPx, која се налази у семеној течности (232). Губитак активности ензима GPx-1 се доводи у везу са ендотелном дисфункцијом, срчаном инсуфицијенцијом и структурним поремећајима миокарда и крвних судова (264). Штетни ефекти хиперхомоцистеинемије се доводе у везу са смањењем експресије GPx-1 и последичним повећањем оксидационог стреса у васкуларним ткивима и атеротромбозом (232). GPx-3 је ванћелијска GPx која има кључни значај у смањењу оксидационог стреса. Смањена количина GPx-3 је повезана са смањењем количине азот-мооксида који је

доступан ткивима, и повећањем протромботске активности тромбоцита. Смањена активност GPx-3 је регистрована у стањима попут повећане активности тромбоцита и цереброваскуларне тромбозе (232, 265).

## **2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА**

На основу претходно изнетих података и резултата истраживања већег броја аутора, постављени су следећи циљеви овог истраживања:

1. Испитивање утицаја акутне примене различитих агониста и антагониста NMDA рецептора на функцију миокарда изолованог срца пацова.
2. Испитивање утицаја акутне апликације агониста и антагониста NMDA рецептора на коронарну циркулацију изолованог срца пацова.
3. Утврђивање динамике ослобађања различитих параметара оксидационог стреса (индекс липидне пероксидације - TBARS, нитрити -  $\text{NO}_2^-$ , супероксид анјон радикал -  $\text{O}_2^-$ , водоник пероксид -  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) током примене испитиваних агониста и антагониста NMDA рецептора.
4. Процена значаја NMDA рецептора у регулацији функције миокарда.
5. Ефекти оксидационог стреса услед модулације NMDA рецептора на функцију миокарда и коронарни проток.

# **3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**



### 3.1 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛ

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

#### 3.1.1 Историјски осврт

У другој половини 19. века више истраживача се бавило усавршавањем методе изучавања изолованог срца сисара, попут Карла Лудвига (*Carl Ludwig*) и Елијаса Циона (*Elias Cyon*), али је немачки физиолог Оскар Лангендорф, 1895. године, (*Oskar Langendorff*) практично поставио методу проучавања изолованог срца сисара која је коришћена у експериментима у саставу овог истраживања. Током више од једног века ова метода је постала и остала, уз новије методе генске манипулације и регистравања експресије протеина, једна од најрелевантнијих метода за разумевање физиологије миокарда и сигналних путева у срцу. Од изучавања основа физиологије срца, попут механизма контракције кардиомиоцита, преко електрофизиологије и проучавања аритмија, функције и регулације коронарне циркулације, до разумевања патофизиолошких механизма и њихове везе са клиничким стањима, као што су хипертензија, дијабетес или срчана слабост, Лангендорфов модел представља једно од најидеалнијих научних оруђа (266).

Пратећи Лангендорфово оригинално објашњење, види се да се основа примењене методе до данас није променила (267). Услед ретроградног уласка перфузионог раствора кроз аорту, насупрот физиолошком току крви, аортни записци остају затворени. Пошто перфузиони раствор испуњава аорту, а аортни записци остају затворени под притиском перфузионог раствора, перфузиони раствор испуњава коронарне артерије чија се ушћа, десно и лево, налазе на самом почетку усходне аорте, Перфузиони раствор пролази кроз коронарно васкуларно корито, и преко коронарних вена се дренира у коронарни синус десне преткоморе. Услед тога препарат изолованог срца функционише иако никаква течност не испуњава коморе, које практично остају „суве“.

Откриће и објашњење једног овако генијалног експерименталног модела остало је у сенци значајних открића у области медицинских наука исте године, попут открића X-зрака или Рендгенских зрака које је открио Вилхем Конрад Рендген (*Wilhelm Conrad Röntgen*), електрокардиографије чију је основу поставио Ејнтховен (*Willem Einthoven*) и основног принципа функције срца чије постулате је објаснио Ото Франк (*Otto Frank*).

### 3.1.2 Модели ретроградне перфузије: перфузија при константном притиску и перфузија при константном протоку

Постоје два модела ретроградне перфузије срца: перфузија при константном притиску и перфузија при константном протоку. У оба наведена случаја друга варијабла је променљива, односно при константном притиску прати се промена протока, док се при константном протоку прати промена притиска. Промена протока при задатом константном перфузионом притиску се региструје мерењем запремине коронарног венског ефлуента у одређеном временском интервалу, док се промене притиска при задатом константном протоку региструју на писачу помоћу одговарајућих преносника (трансдјусера).

Током извођења експеримената у овом истраживању користила се метода изолованог срца по Лангендорфу при константном притиску (70 cmH<sub>2</sub>O). Константан перфузиони притисак се постиже одржавањем хидростатског притиска под којим перфузиони раствор улази у коронарне крвне судове на одговарајућем нивоу. Новије методе подразумевају употребу перфузионих пумпи које омогућавају прелазак са једног на други модел перфузије.

За све праћене параметре се узима средња вредност, имајући у виду да апсолутне вредности не могу да се узму као потпуно поуздане, с обзиром да се у извесном малом опсегу стално мењају. Разлог такве променљивости се налази у самој природи срчаног рада, попут различитог трајања систоле и дијастоле и сталне променљивости срчане фреквенције, као и услова околине, као што су минималне промене температуре перфузионог раствора.

Однос притиска и протока у експерименталном моделу који је примењен у овом истраживању је дак једначином:

$$p = \text{const} / \text{protok} = 1 / \text{radijus}^4$$

Предности модела перфузије при константном притиску који је примењен у овом истраживању у односу на модел са константним протоком се огледају пре свега у једноставности примењеног модела, као и више физиолошког приступа где перфузиона течност улази и коронарне артерије при константном притиску. Такође, ова метода омогућава испитивање васкуларне ауторегулације тонууса коронарних крвних судова, као и патогенезу промена које настају као последица индуковања глобалне или регионалне исхемије и реперфузије (266, 268).

### 3.1.3 *Langendorff* апарат LF-01 F-P

Експерименти у овом истраживању су спроведени на *Langendorff* апарату марке LF-01 F-P произвођача Experimetria Ltd, Budapest, (Мађарска).

Наведени апарат се састоји из следећих компоненти:

1. Две вертикалне стаклене цеви, исте висине и различитог пречника, при чему се цев мањег пречника налази у цеви већег пречника. Између ових цеви струји вода која се у воденом купатилу загрева до жељене температуре. У лумен мање цеви се методом негативног притиска убације комплексан физиолошки раствор (Крепс-Хенселејтов (*Krebs-Henseleit*) раствор у случају експеримената ове студије). Вода која циркулише између две цеви загрева раствор у лумену цеви мањег калибра, тако да температура раствора на излазу из цистема цеви буде  $37^{\circ}\text{C}$ , односно до оптималне телесне температуре. Унитар цеви мањег пречника се налази танка стаклена цев чијим се вертикалним померањем регулише хидростатски притисак под којим раствор улази у коронарне крвне судове. Ова танка стаклена цев је повезана са резервоаром и преко ње се вишак перфузионог раствора враћа у резервоар. Цев мањег пречника се завршава излазом, на који се поставља препарат изолованог срца;
2. Резервоара у коме се налази комплексни Крепс-Хенселејтов раствор и који је спојен са пумпом која раствор континуирано преноси до цеви мањег полупречника и са малом стакленом цеви преко које се вишак раствора из цеви мањег пречника враћа у резервоар. Резервоар је спојен и са боцом у којој се налази смеша  $\text{O}_2$  и  $\text{CO}_2$ .
3. Боце у којој се налази смеша  $\text{O}_2$  и  $\text{CO}_2$  у односу 95%:5% и која је повезана са резервоаром у коме се налази Крепс-Хенселејтов раствор. Гасирањем Крепс-

Хенселејтовог раствора постижу се парцијални притисци  $O_2$  и  $CO_2$  у раствору који су еквивалентни парцијалним притисцима  $O_2$  и  $CO_2$  у артеријској крви;

4. Каниле, која спаја изводну цев система цеви и асцедентну аорту изолованог срца пацова;
5. Воденог купатила које загрева воду која струји између цеви већег и мањег пречника, чиме се омогућава константно одржавање температуре Крепс-Хенселејтовог раствора на оптималној вредности од  $37^\circ C$  (изотермичност);
6. Инфузионе пумпе, којом се испитивана супстанца одговарајућом брзином (која зависи од базалног коронарног протока) апликује непосредно на споју каниле и асцедентне аорте;
7. Сензора - трансдјусера који су са једне стране повезани са различитим структурама изолованог срца, а са друге стране са рачунаром. Улога сензора се огледа у континуираном регистровању функције миокарда леве коморе. На моделу *Langendorff* апарата који се користи у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу и на коме су рађени експерименти у оквиру овог истраживања постоје три сензора:
  - сензор (*transducer* BS4 73-0184) који је повезан са лучно савијеном металном цевчицом испуњеном дестилованом водом на чијем врху се налази балончић (пречник 5mm, latex/ најлон фолија) испуњен такође дестилованом водом. Овај балончић се након прокидања митралних залистака убацује у леву комору надува, и омогућава сензору директно регистровање притисака и срчане фреквенце из ове шупљине срца. На овај начин се региструју следећи параметри функције леве коморе:  $dp/dt \max$  – максимална стопа промене притиска у левој комори, (mmHg/s),  $dp/dt \min$  – минимална стопа промене притиска у левој комори, (mmHg/s), SLVP – систолни притисак у левој комори, (mmHg), DLVP – дијастолни притисак у левој комори, (mmHg), и HR – фреквенца рада срца, (bpm).
  - сензор којим се континуирано региструје притисак под којим перфузиони раствор улази и аорту (*perfusion pressure transducer*). У овом истраживању се помоћу овог сензора пратио средњи перфузиони притисак у аорти – MBP (mmHg).

- сензор којим се региструје температура раствора који улази у аорту (*temperature transducer*).

Последња два сензора имају фиксну локализацију и не мењају положај током експеримената.

8. Рачунара са одговарајућим софтвером (*Spel Advanced HaemoSys v3.24*) преко кога се континуирано прате и региструју кардиодинамски параметри срчаног рада. Рачунар је повезан са сензорима преко којих добија податке о раду срца.

Овакав експериментални модел, помоћу сензора који се пласира у леву комору, омогућава регистровање и анализу следећих кардиодинамских параметара:

1. максимална стопа промене притиска у левој комори –  $dp/dt \max$ , изражава се у mmHg/s, параметар који рефлектује инотропну способност миокарда;
2. минимална стопа промене притиска у левој комори –  $dp/dt \min$ , изражава се у mmHg/s, параметар који рефлектује луситропну способност миокарда;
3. систолни притисак у левој комори – SLVP, изражава се у mmHg;
4. дијастолни притисак у левој комори – DLVP, изражава се у mmHg;
5. фреквенција срчаног рада – HR, изражава се као број откуцаја срца у минути (bpm).

Коронарни проток (CF) је мерен флоуметријски (*flowmetrically*), и изражен је у ml коронарног венског ефлуента у минути (ml/минут).

### 3.2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ

Све експерименталне процедуре у оквиру предвиђеног експерименталног протокола су изведене у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. За експерименте се користила метода изолованог срца пацова *Wistar albino* соја, који су по својим карактеристика најадекватнији за проблематику која се испитивала у спроведеним експериментима. Пацови су били стари осам недеља, мушког пола и телесне масе  $250 \pm 30$  g. Животиње су чуване у стандардним лабораторијским условима (температура ваздуха  $23,1^\circ\text{C}$ , релативна влажност ваздуха 50%, 12:12 часова циклус светлост:тама, (са почетком светлог периода у 9:00 ч часова) и са слободним приступом води и храни (*ad libitum*). Животиње су биле подељене у шеснаест (16) експерименталних група (15 животиња у групи).

При експерименталном раду су поштоване одредбе прописаних аката (*EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC*) и принципа етичности. Експериментални протокол је одобрен од стране Етичког одбора за добробит експерименталних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

Животиње се жртвују након интраперитонеалне анестезије комбинацијом анестетика кетамина и ксилазида цервикалном дислокацијом (*Schedule 1 of the Animals/Scientific Procedures, Act 1986, UK*). Након тога, уследило је хируршко отварање абдомена, дијафрагма је пресечена лучно, с лева на десно, а затим је грудни кош отворан, брзо, бочно, дуж мамиларне линије.

Током наведених процедура срце се континуирано прелива хладним физиолошким раствором (+4°C). Након отварања грудног коша врши се пресецање перикарда при врху срца и почиње се ексцизија срца. Након пресецања перикарда врши се пресецање крвних судова базе срца, срце се вади из грудне дупље и потапа се у леден физиолошки раствор (-4°C – -10°C). Сврха овог поступка је свођење метаболичких потреба миокарда на минимум („физиолошка клешта“), како би се добило довољно времена за препарацију срца и припремање за канулацију аорте без могућности оштећења миокарда.

Након потапања срца у ледени физиолошки раствор препаришу се крвни судови базе срца, уз отклањање свих елемената изузев усходне аорте, кроз коју се врши ретроградна перфузија. Аорта се потом концем причвршћује за канилу *Langendorff* апарата, након чега почиње експеримент. Свеукупна процедура, од жртвовања животиње до повезивања аорте са канилом *Langendorff* апарата, не би требало да траје дуже од 2 минута како би се очувала виталност препарата и обезбедила поузданост добијених резултата.

Када се срце постави на *Langendorff* апарат врши се уклањање леве аурикуле и пресецање леве преткоморе, чиме се омогућава приступ митралним залисцима. Затим се пинцетом прокидају митрални залисци, што има двојаку улогу:

- притисак у левој преткомори се своди на нулу, чиме се искључује било какав утицај на коронарну циркулацију и омогућавање адекватних услова за ретроградну перфузију;

- омогућава се пласирање сензора *transducer* BS4 73-0184 у леву комору, чиме се омогућава континуирано регистровање кардиодинамских параметара који рефлектују функцију миокарда ( $dp/dt \max$  – максимална стопа развоја притиска у левој комори [mmHg/s],  $dp/dt \min$  – минимална стопа развоја притиска у левој комори [mmHg/s], SLVP – систолни притисак у левој комори [mmHg], DLVP – дијастолни притисак у левој комори [mmHg], и HR – фреквенција рада срца [број откуцаја срца у минути]).

Као што је већ наведено сензор који прати кардиодинамске параметре се повезан са софтвером, чиме се омогућава њихово континуирано праћење и снимање на монитору, као и обележавање пресека вредности кардиодинамских параметара у једном одређеном тренутку или снимање одеђених сегмената током трајања експеримента. Проток крви кроз коронарне крвне судове (CF) се изражава у ml/min и мери се сакупљањем коронарног венског ефлуента који излази из коронарних крвних судова срца, флуорометријском методом.

После успостављања стабилног срчаног рада, који подразумева непромењене вредности коронарног протока након више узастопних мерења и вредности кардиодинамских параметара које се одржавају на приближно истом нивоу, у периоду од око 25 минута, створени су услови за испитивање функције изолованог срца. Преко инфузионе пумпе се убације супстанца растворена у Крепс-Хенселејтовом раствору, чији се ефекат на срце испитује.

Након контролног протокола испитиване су супстанце чији је ефекат на срце био предмет испитивања ове студије, континуираном апликацијом у трајању од пет минута, до успостављања стабилног коронарног протока, након чега је следио период опоравка у трајању од 10 минута.

Истраживање је било подељено у шеснаест (16) експерименталних група:

1. контролна група (перфузија комплексним Крепс-Хенселејтовим физиолошким раствором),
2. апликација DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10  $\mu\text{mol/l}$ ),
3. апликација глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ),
4. апликација глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ),
5. ко-апликација глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ),

6. апликација МК801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ),
7. апликација мемантин-хидрохлорида (100  $\mu\text{mol/l}$ ),
8. апликација ифенпродил-тартарата (1  $\mu\text{mol/l}$ )
9. апликација *N*-метил-*D*-аспартат (NMDA) (100  $\mu\text{mol/l}$ ),
10. ко-апликација МК801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ),
11. ко-апликација МК801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ) и глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ),
12. ко-апликација МК801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ), глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ),
13. апликација верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ),
14. ко-апликација верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ),
15. ко-апликација верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ) и глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ),
16. ко-апликација верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ), глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ).

### 3.3 БИОХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ

Биохемијски параметри су одређивани у коронарном венском ефлуенту који је сакупљан на крају контролног периода (*Control*), на крају апликовања испитиване супстанце (*Effect*), и на крају периода опоравка (*Wash-out*). Сви реактивни молекули, који су били од интереса за наше истраживање су мерени спектрофотометријском методом на апарату марке *Shimadzu UV-1800* спектрофотометар, Северна Америка.

#### 3.3.1 Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS)

Индекс липидне пероксидације, као један од параметара оксидационог стреса, је одређиван индиректно преко продуката реакције липидне пероксидације са тиобарбитурном киселином, одакле и потиче скраћеница TBARS (**T**hio**B**arbituric **A**cid **R**eactive **S**ubstances). У експериментима током овог истраживања вредности TBARS-а у коронарном венском ефлуенту су одређиване спектрофотометријском методом (269).

У епрувете је пипетирано 800  $\mu\text{l}$  коронарног венског ефлуента и 200  $\mu\text{l}$  1% ТВА у 0,05 М NaOH. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћена је еквивалентна количина Крепс-Хенселејтовог раствора. Након пипетирања, узорци су



инкубирани у воденом купатилу 15 минута на 100°C. Након инкубације, узорци су прилагођени собној температури, па се приступило одређивању концентрације ослобођених TBARS у коронарни венски ефлуент спектрофотометријски на таласној дужини од  $\lambda=530\text{nm}$ .

- Концентрација ослобођених TBARS добијана је на основу следеће једначине:

$$\text{nmol TBARS/ml ефлуента} = \Delta A (A_u - A_{sp}) / 1,56 \times 1,25$$

при чему је  $A_u$  апсорбанца узорка, док је  $A_{sp}$  апсорбанца слепе пробе, док су 1,56 и 1,25 корекциони фактор за овај есеј.

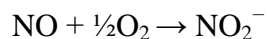
- Количина ослобођених TBARS по граму срчаног ткива одређивала се на следећи начин:

$$\text{nmol TBARS/минуто/g wt} = \Delta A / 1,56 \times 1,25 \times CF/m_{\text{срца}}$$

Важно је напоменути да се, за разлику од свих осталих биохемијских параметара који су праћени у овом истраживању, ниво TBARS изражава у  $\mu\text{M}$ , док је количина осталих молекула који рефлектују оксидационо оштећење, изражавана у  $\text{nM}$ . Разлог је у количини TBARS, која је за један ранг величина већа од свих осталих параметара, услед неспецифичности TBARS-а, који представља сумацију деловања готово свих кисеоничких (ROS) и азотних реактивних врста (RNS), док су остали параметри везани за појединачне ROS/RNS молекуле, који имају специфичне механизме деловања.

### 3.3.2 Одређивање нитрита ( $\text{NO}_2^-$ )

Одређивање количине ослобођених нитрита у коронарном венском ефлуенту представљало је најдоступнију индиректну методу за одређивање функционалности ендотелног L-аргинин-NO система у коронарној циркулацији, током извођења експеримената овог истраживања. Имајући у виду да методе за директно одређивање NO нису биле доступне спектрофотометријска метода одређивања количине ослобођених нитрита (270) представља доступну и довољно поуздану методу за ову процену. С обзиром да се у реакцији са молекулским кисеоником ствара еквимоларна количина нитрита:



може се са великом поузданошћу тврдити да количина ослобођених нитрита у коронарном венском ефлуенту представља количину ослобођеног NO.

Биохемијски се ова метода заснива на употреби *Griess*-реагенса, који са нитритима гради диазо-комплекс, који даје љубичасту боју. *Griess* 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) је пипетирано 1 ml коронарног венског ефлуента, 250 µl свеже направљеног *Griess* реагенса и 125 µl амонијачног пуфера (pH=9,0), кога сачињавају амонијум хлорид (NH<sub>4</sub>Cl) и натријум тетраборат (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>). Амонијачни пуфер, који се у току припеме мора загревати због изузетно слабе растворљивости натријум тетрабората, има за сврху да стабилизује диазо-комплекс. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћено је 1 ml Крепс-Хенселејтовог раствора.

Концентрација ослобођених нитрита у узорцима одређивана је на основу калибрационе криве. Калибрациона крива је конструисана на основу екстинкција узорака, који су у себи садржале познату концентрацију нитрита, након њихове реакције са *Griess*-овим реагенсом у присуству пуфера. Добијана је пипетирањем различитих количина воденог раствора 1 mM NaNO<sub>2</sub> у 1 ml Крепс-Хенселејтовог раствора и то: 3, 6, 12, 24 µl, чиме је добијена концентрација нитрита од: 2,18, 4,37, 8,73 и 17,34 nmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/ml. Након стабилизације боје на собној температури, током 5 до 10 минута, приступа се одређивању концентрације ослобођених нитрита спектрофотометријски на таласној дужини од λ=550 nm. Концентрација, а затим количина ослобођених нитрита добијана је на основу:

1. Одређивања стандардног фактора (F), који се добијао из једначине:

**Екстинкција стандарда – екстинкција слепе пробе**

**Концентрација NaNO<sub>2</sub> у стандарду**

за сваки појединачни стандард (F1-F4), а затим добијањем њихове аритметичке средине.

2. Дељењем разлике екстинкција узорка и слепе пробе са стандардом F:

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

3. Након тога, **количина** ослобођених нитрита по граму срчаног ткива се одређивала на једначином:

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

### 3.3.3 Одређивање супероксид анион радикала ( $\text{O}_2^-$ )

Одређивање количине супероксид анион радикала ( $\text{O}_2^-$ ) у коронарном венском ефлуенту заснива се на реакцији  $\text{O}_2^-$  са нитро тетразолијум плавим (**N**itro **B**lue **T**etrazolium - **NBT**) до нитроформазан плавог (271). Мерење се врши на таласној дужини максималне апсорпције  $\lambda_{\text{max}}=550\text{nm}$ . Есејна смеша („assay mixture“) садржи: 50 mM TRIS-HCl пуфера (pH=8,6), 0,1 mM EDTA, 0,1 mg/ml желатина и 0,1 mM NBT. Пре употребе раствор се претходно гасира азотом под притиском у трајању од једног часа.

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

1. Концентрација ослобођеног  $\text{O}_2^-$  добијена је на основу једначина:

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

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

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

$$\text{nmol O}_2^-/\text{ml ефлуента} = \Delta E/0.015 \times 1/0.05$$

2. Након тога, количина ослобођеног  $\text{O}_2^-$  по граму срчаног ткива се одређивала помоћу једначине:

$$\text{nmol O}_2^-/\text{минут/g} = \Delta E/0.015 \times 1/0.05 \times \text{CF}/m_{\text{срца}}$$

### 3.3.4 Одређивање водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

Одређивање количине водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) се заснива на оксидацији фенол црвеног помоћу водоник пероксида у реакцији коју катализује ензим пероксидаза из коњске ротквице (**H**orse**R**adish **P**er**O**xidase - HRPO). Резултат ове реакције је формирање једињења чији је максимум апсорпције  $\lambda_{\text{max}}=610\text{nm}$  (272). Линеарна зависност апсорбанце 610 nm од концентрације  $\text{H}_2\text{O}_2$  је постојана за опсег концентрација од 1  $\mu\text{M}$  до 60  $\mu\text{M}$  (1–60 nmol/ml). Примена ове методе омогућава одређивање  $\text{H}_2\text{O}_2$  за временски интервал од 5 до 60 минута. У епрувете (12x100) пипетирано је 200  $\mu\text{l}$  коронарног венског ефлуента и 800  $\mu\text{l}$  свеже направљеног раствора фенол црвеног (**P**henol **R**ed **S**olution - PRS) који садржи 140 mM NaCl, 10 mM калијум фосфатног пуфера (pH=7), 5,5 mM D(+)-глукозе и 0,28 mM фенол црвеног. Узорцима је потом додавано 10  $\mu\text{l}$  (1:20) HRPO, припремљеног *ex tempore*. Узорци су отављани на собној температури 10 минута, а затим се помоћу 1 M NaOH pH вредност подеси на вредности око 12 (pH $\approx$ 12). Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћена је еквивалентна количина Крепс-Хенселејтовог раствора.

Концентрација ослобођеног  $\text{H}_2\text{O}_2$  у коронарном венском ефлуенту израчунавана је на основу калибрационог дијаграма (стандардне криве), одређиваног за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве, користи се стандардни (*Stock*) раствор  $\text{H}_2\text{O}_2$ , уз претходну проверу концентрације ( $A_{230}$  за 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  износи 0,810). У 3 епрувете је пипетирано: (уместо коронарног венског ефлуента) 5  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{l}$  и 20  $\mu\text{l}$ , 1 mM раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 200  $\mu\text{l}$  дестиловане, 800  $\mu\text{l}$  раствора фенол црвеног и 10  $\mu\text{l}$  (1:20) HRPO. Након инкубације од 10 минута на собној температури, подешена је pH  $\approx$ 12 помоћу 1 M NaOH (10  $\mu\text{l}$ ). Тако је финална концентрација  $\text{H}_2\text{O}_2$  у 3 узорка стандарда износила: 2,75; 5,49; и 10,99 nmol/ $\text{H}_2\text{O}_2$ /ml. Апсорбанца (A) је мерена на таласној дужини максималне апсорпције  $\lambda_{\text{max}}=610\text{nm}$ , на спектрофотометру, у стакленим киветама запремине 1 ml. Од добијених апсорбанци одузима се вредност апсорбанце следеће пробе (B), чиме се добија коначна апсорбанца ( $\Delta A$ ).

Концентрација, а затим и количина ослобођеног  $\text{H}_2\text{O}_2$  у коронарном венском ефлуенту израчунавана је на основу:

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

$$F = \Delta A / \text{nmol } \text{H}_2\text{O}_2 / \text{cuv}$$

2. На основу вредности апсорбанце узорка при  $\lambda_{\max}=610\text{nm}$  ( $A_u$ ) и њеног упоређивања са слепом пробом ( $A_{sp}$ ) израчунава се финална апсорбанца ( $\Delta A$ ) ( $A=A_u-A_{sp}$ ). Помоћу овако добивене апсорбанце, фактора  $F$  и количине коронарног венског ефлуента употребљеног у есеју ( $200 \mu\text{l}$ ) и израчунавана је концентрација и количина  $\text{H}_2\text{O}_2$  у коронарном венском ефлуенту по формули:

$$\text{nmol H}_2\text{O}_2/\text{ml ефлуента} = \Delta A / F$$

3. Након тога, количина ослобођеног  $\text{H}_2\text{O}_2$  по граму срчаног ткива се одређивала помоћу једначине:

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

### 3.4 СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Статистичка обрада експерименталних података је спроведена на следећи начин:

1. За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, користила се: фреквенција, проценти, узорачка средња вредност, узорачка медијана, узорачка стандардна девијација, ранг и 95% интервали поверења.
2. За испитивање нормалности расподеле употребљени су тестови *Kolmogorov Smirnov* и *Shapiro Wilk*, и графици: хистограм и *normal QQ plot*.
3. За тестирање разлика између параметара, у зависности од њихове природе, користио се Студентов  $t$ -тест, *Mann-Whitney* тест, Фишеров тест апсолутне вероватноће, једнофакторска или двофакторска анализа варијансе. Приликом тестирања разлика између параметара, у случају постојања више подгрупа, употребљавао се *Bonferroni* тест.
4. Статистичка обрада података је рађена у статистичком пакету *SPSS 19.0 for Windows*.

Статистичка обрада података добијених након завршених експеримената обухватила је три тачке од инетреса и то: завршетак стабилизације (*Control*), завршетак апликације супстанце чији се ефекат испитује (*Effect*), и завршетак периода опоравка након примењене супстанце (*Wash-out*).

### 3.5 МАТЕРИЈАЛ

За припрему перфузионих раствора, пуфера и раствора за биохемијске анализе коришћени су комерцијални раствори, *pro analysis* квалитета произвођача *Sigma–Aldrich Chemie GmbH*, (Немачка):

#### 3.5.1 Реагенаси за припремање Крепс-Хенселејтовог (*Krebs-Hensenleit*) перфузионог раствора:

Натријум хлорид ( $\text{NaCl}$ , 27,216 g/4L), калијум хлорид ( $\text{KCl}$ , 1,4 g/4L), магнезијум сулфат ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,636 g/4L), калијум дихидроген фосфат ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,0644 g/4L), натријум бикарбонат ( $\text{NaHCO}_3$ , 8,36g/4L), глукоза ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \times \text{H}_2\text{O}$ , 8,8g/4L) и калцијум хлорид ( $\text{CaCl}_2(\text{anh.})$ , 1,117 g/4L).

#### 3.5.2 Реагенси за одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS):

2-тиобарбитурна киселина (ТВА,  $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ), Mr 144,15; натријум хидроксид ( $\text{NaOH}$ ) Mr 40,00.

#### 3.5.3 Реагенси за одређивање азот-моноксида (NO) у облику нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ):

Сулфанилна киселина (4-амино бензенсулфонска киселина,  $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$ ), Mr 173,19; N-(1-нафтил)-етилендиамин дихидрохидрат (NEDA,  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{C}_{12}\text{N}$ ), Mr 259,18; амонијум хлорид ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), Mr 53,49; Боракс ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ ), Mr 381,4; 85% орто-фосфорна киселина ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ),  $\rho=1,685 \text{ gcm}^{-3}$ ; натријум нитрит ( $\text{NaNO}_2$ ), Mr 69,00.

#### 3.5.4 Реагенси за одређивање супероксид анион радикала ( $\text{O}_2^-$ ):

TRIS (Трис (хидроксиметил) аминометан,  $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ), Mr 121,14; 37% хлороводонична киселина ( $\text{HCl}$ ),  $\rho=1,19 \text{ gcm}^{-3}$ , Mr 36,5;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , Mr 372,24; Нитро-тетразолијум плаво хлорид (NBT,  $\text{C}_{40}\text{H}_{30}\text{ClN}_{10}\text{O}_6$ ), Mr 817,6; Желатин ( $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}_2 \text{NaO}_2$ ), Mr 61,5 kDa.

**3.5.5 Реагенси за одређивање водоник пероксида (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):**

Калијум хидрогенфосфат дихидрат (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O) M<sub>r</sub> 214,23; калијум дихидрогенфосфат дихидрат (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O) M<sub>r</sub> 164,09; натријум хлорид (NaCl) M<sub>r</sub> 58,44; водоник пероксид (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), M<sub>r</sub> 34,01; D(+)-глукоза монохидрат (декстроза), M<sub>r</sub> 198,17; фенол црвено (*phenol red*, C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>S), M<sub>r</sub> 354,4; пероксидаза из коњске ротквице (*horseradish peroxidase* – HRPO EC 1.11.1.7), M<sub>r</sub> 44 kDa.

## **4. РЕЗУЛТАТИ**



#### 4.1. ЕФЕКТИ МОДУЛАЦИЈЕ NMDA РЕЦЕПТОРА НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

##### 4.1.1. ДЕЈСТВО ГЛУТАМАТА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти примене глутамата у концентрацији од 100  $\mu\text{mol/l}$  на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су на Табелама 4.1А и 4.1Б и Графику 4.1.

Примена глутамата није изазвала статистички значајне промене посматраних кардиодинамских параметра, као ни коронарног протока.

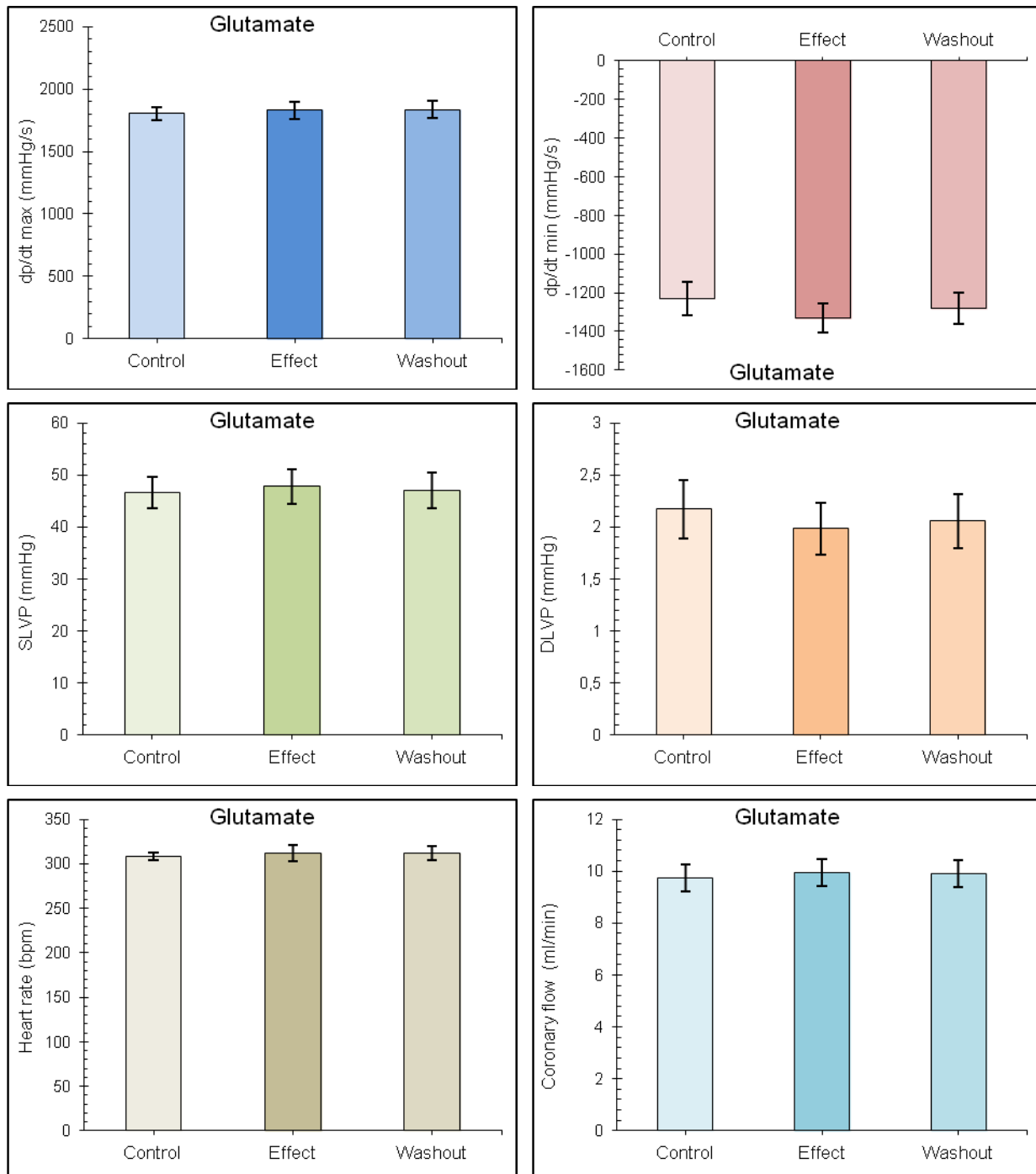
Табела 4.1А. Вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control* - **C**), током примене глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - **E**) и након периода опоравка (*Wash-out* - **W**).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SE)	Глутамат (X $\pm$ SE)	Опоравак (X $\pm$ SE)
<b>dp/dt max</b> (mmHg/s)	1802,04 $\pm$ 54,62	1829,24 $\pm$ 67,28	1834,8 $\pm$ 69,97
<b>dp/dt min</b> (mmHg/s)	-1227,66 $\pm$ 86,06	-1330,6 $\pm$ 75,12	-1281,54 $\pm$ 79,55
<b>SLVP</b> (mmHg)	46,61 $\pm$ 3,02	47,76 $\pm$ 3,25	47,01 $\pm$ 3,39
<b>DLVP</b> (mmHg)	2,17 $\pm$ 0,28	1,99 $\pm$ 0,25	2,06 $\pm$ 0,26
<b>HR</b> (bpm)	307,99 $\pm$ 4,49	311,6 $\pm$ 9,33	311,86 $\pm$ 8
<b>CF</b> (ml/min)	9,74 $\pm$ 0,52	9,94 $\pm$ 0,52	9,91 $\pm$ 0,52

Табела 4.1Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control* - **C**), током примене глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - **E**) и након периода опоравка (*Wash-out* - **W**).

Параметар	<b>C vs E</b>	<b>E vs W</b>	<b>C vs W</b>
<b>dp/dt max</b> (mmHg/s)	+1,51%; p>0,05	+0,3%; p>0,05	+1,82%; p>0,05
<b>dp/dt min</b> (mmHg/s)	+8,39%; p>0,05	-3,69%; p>0,05	+4,39%; p>0,05
<b>SLVP</b> (mmHg)	+2,45%; p>0,05	-1,56%; p>0,05	+0,86%; p>0,05
<b>DLVP</b> (mmHg)	-8,55%; p>0,05	+3,6%; p>0,05	-5,26%; p>0,05
<b>HR</b> (bpm)	+1,17%; p>0,05	+0,08%; p>0,05	+1,26%; p>0,05
<b>CF</b> (ml/min)	+2,05%; p>0,05	-0,29%; p>0,05	+1,76%; p>0,05

**График 4.1.** Ефекти глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на кардиодинамске параметре и коронарни проток ( $X \pm \text{SE}$ ) у контролном периоду (*Control*), током примене супстанце (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).



#### 4.1.2. ДЕЈСТВО ГЛИЦИНА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти примене глицина у концентрацији од 100  $\mu\text{mol/l}$  на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су на Табелама 4.2А и 4.2Б и Графику 4.2.

Примена глицина није изазвала статистички значајне промене посматраних кардиодинамских параметра, као ни коронарног протока.

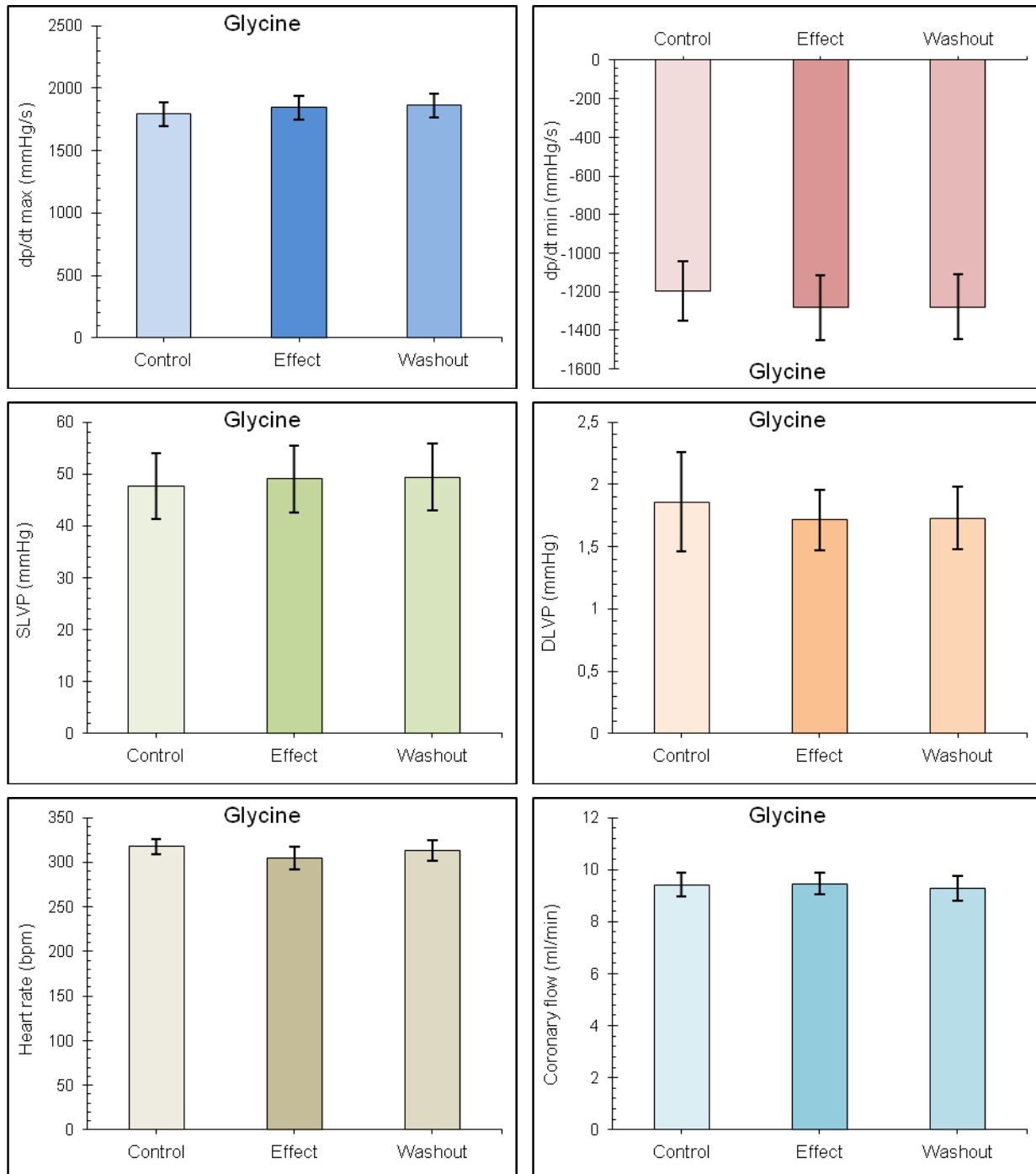
Табела 4.2А. Вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control* - **C**), током примене глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - **E**) и након периода опоравка (*Wash-out* - **W**).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SE)	Глицин (X $\pm$ SE)	Опоравак (X $\pm$ SE)
<b>dp/dt max (mmHg/s)</b>	1791,50 $\pm$ 93,85	1842,73 $\pm$ 94,37	1859,94 $\pm$ 92,38
<b>dp/dt min (mmHg/s)</b>	-1197 $\pm$ 154,47	-1282,51 $\pm$ 169,36	-1277,29 $\pm$ 166,86
<b>SLVP (mmHg)</b>	47,67 $\pm$ 6,29	49,03 $\pm$ 6,46	49,37 $\pm$ 6,42
<b>DLVP (mmHg)</b>	1,86 $\pm$ 0,4	1,71 $\pm$ 0,24	1,73 $\pm$ 0,25
<b>HR (bpm)</b>	317,64 $\pm$ 8,72	304,66 $\pm$ 12,61	313,3 $\pm$ 11,33
<b>CF (ml/min)</b>	9,41 $\pm$ 0,45	9,46 $\pm$ 0,42	9,29 $\pm$ 0,47

Табела 4.2Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control* - **C**), током примене глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - **E**) и након периода опоравка (*Wash-out* - **W**).

Параметар	<b>C vs E</b>	<b>E vs W</b>	<b>C vs W</b>
<b>dp/dt max (mmHg/s)</b>	+2,86%; p>0,05	+0,93%; p>0,05	+3,82%; p>0,05
<b>dp/dt min (mmHg/s)</b>	+7,14%; p>0,05	-0,4%; p>0,05	+6,7%; p>0,05
<b>SLVP (mmHg)</b>	+2,85%; p>0,05	+0,7%; p>0,05	+3,57%; p>0,05
<b>DLVP (mmHg)</b>	-7,69%; p>0,05	+0,83%; p>0,05	-6,92%; p>0,05
<b>HR (bpm)</b>	-4,09%; p>0,05	+2,84%; p>0,05	-1,37%; p>0,05
<b>CF (ml/min)</b>	+0,46%; p>0,05	-1,81%; p>0,05	-1,37%; p>0,05

**График 4.2.** Ефекти глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на кардиодинамске параметре и коронарни проток ( $X \pm \text{SE}$ ) у контролном периоду (*Control*), током примене супстанце (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).



#### 4.1.3. ДЕЈСТВО КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ ГЛУТАМАТА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) И ГЛИЦИНА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти комбиноване примене глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су на Табелама 4.3А и 4.3Б и Графику 4.3.

Истовремена примена глутамата и глицина је узроковала статистички значајно смањење максималне стопе промене притиска у левој комори ( $dp/dt \text{ max}$ ), минималне стопе промене притиска у левој комори ( $dp/dt \text{ min}$ ), фреквенције срца (HR) и коронарног протока (CF). Након периода опоравка (*Wash-out*) сви наведени параметри су се статистички значајно повећали, при чему није било статистички значајне разлике између почетних вредности и вредности након периода опоравка.

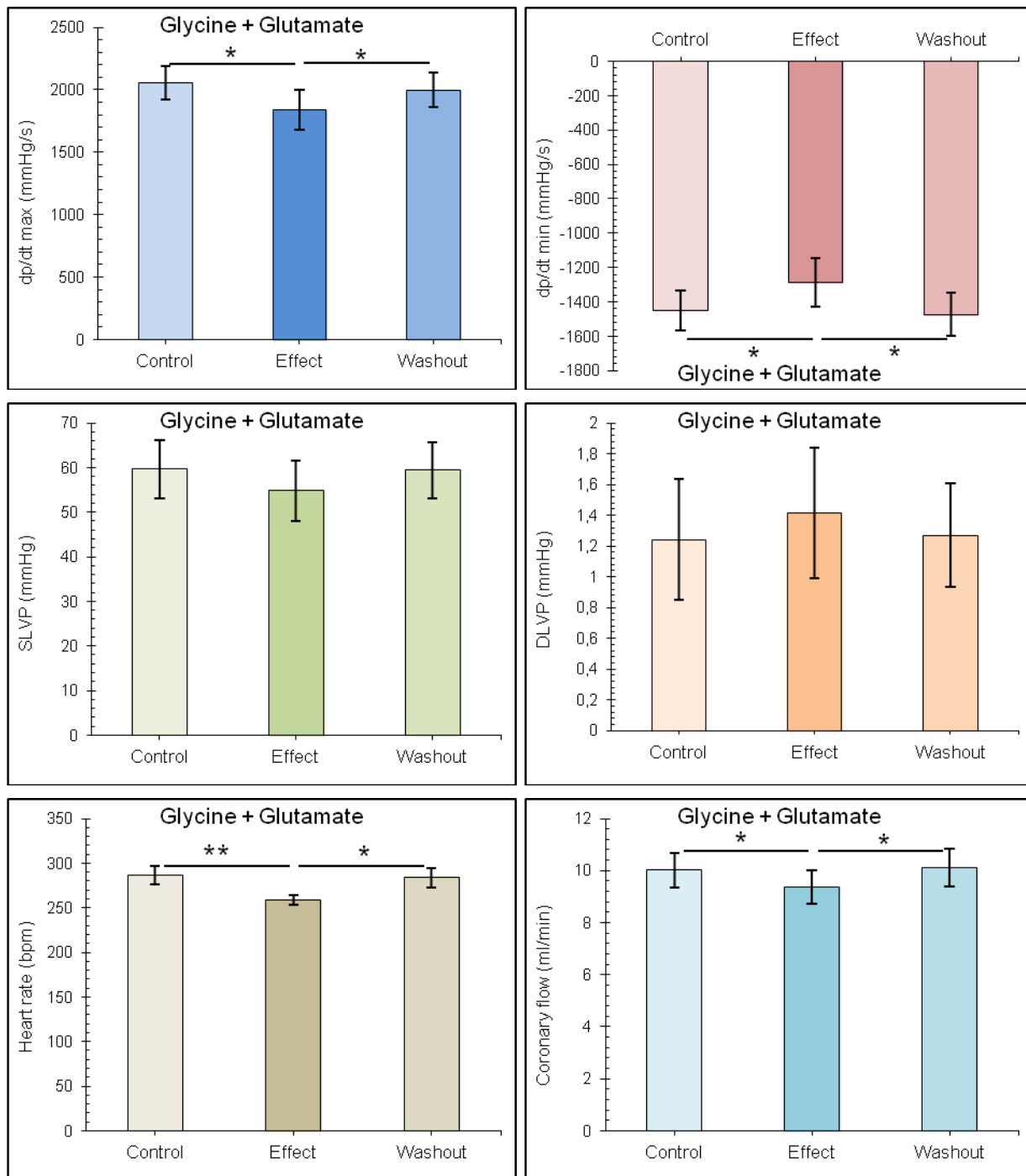
Табела 4.3А. Вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control - C*), током примене глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect - E*) и након периода опоравка (*Wash-out - W*).

Параметар	Контрола ( $X \pm SE$ )	Глутамат и глицин ( $X \pm SE$ )	Опоравак ( $X \pm SE$ )
<b>dp/dt max (mmHg/s)</b>	2053,37 $\pm$ 135,52	1841,91 $\pm$ 158,57	1996,29 $\pm$ 138,2
<b>dp/dt min (mmHg/s)</b>	-1449,5 $\pm$ 113,95	-1284,93 $\pm$ 139,94	-1472,37 $\pm$ 127,03
<b>SLVP (mmHg)</b>	59,61 $\pm$ 6,52	54,8 $\pm$ 6,8	59,46 $\pm$ 6,28
<b>DLVP (mmHg)</b>	1,24 $\pm$ 0,39	1,41 $\pm$ 0,42	1,27 $\pm$ 0,34
<b>HR (bpm)</b>	286,29 $\pm$ 10,44	258,67 $\pm$ 5,2	283,67 $\pm$ 10,64
<b>CF (ml/min)</b>	10,3 $\pm$ 0,66	9,37 $\pm$ 0,65	10,11 $\pm$ 0,74

Табела 4.3Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control - C*), током примене глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect - E*) и након периода опоравка (*Wash-out - W*).

Параметар	C vs E	E vs W	C vs W
<b>dp/dt max (mmHg/s)</b>	-10,3%; <b>p&lt;0,05</b>	+8,38%; <b>p&lt;0,05</b>	-2,78%; p>0,05
<b>dp/dt min (mmHg/s)</b>	-11,35%; <b>p&lt;0,05</b>	+14,59%; <b>p&lt;0,05</b>	+1,58%; p>0,05
<b>SLVP (mmHg)</b>	-8,08%; p>0,05	+8,5%; p>0,05	-0,26%; p>0,05
<b>DLVP (mmHg)</b>	+13,79%; p>0,05	-10,1%; p>0,05	+2,3%; p>0,05
<b>HR (bpm)</b>	-9,65%; <b>p&lt;0,01</b>	+9,66%; <b>p&lt;0,05</b>	-0,91%; p>0,05
<b>CF (ml/min)</b>	-6,55%; <b>p&lt;0,05</b>	+7,93%; <b>p&lt;0,05</b>	+0,85%; p>0,05

**График 4.3.** Ефекти комбиноване примене глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на кардиодинамске параметре и коронарни проток ( $X \pm \text{SE}$ ) у контролном периоду (*Control*), током примене супстанци (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).



#### 4.1.4. ДЕЈСТВО МК-801 (50 $\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти примене МК-801 у концентрацији од 50  $\mu\text{mol/l}$  на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су на Табелама 4.4А и 4.4Б и Графику 4.4.

Примена МК-801 је изазвала статистички значајно смањење свих посматраних кардиодинамских параметара и коронарног протока. Након периода опоравка (*Wash-out*) сви наведени параметри су се статистички значајно повећали, при чему није било статистички значајне разлике између почетних вредности и вредности након периода опоравка.

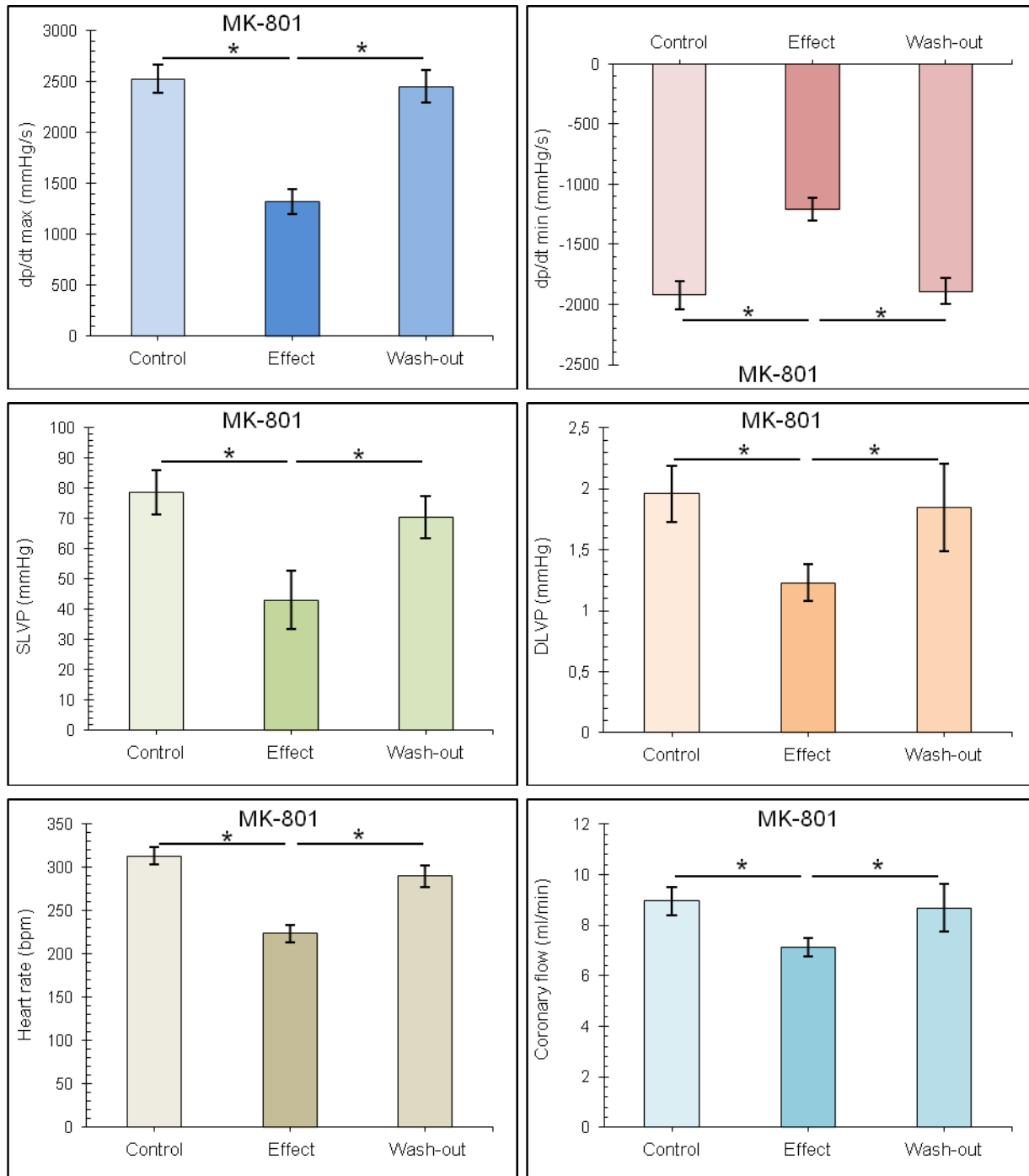
Табела 4.4А. Вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control* - **C**), током примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - **E**) и након периода опоравка (*Wash-out* - **W**).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SE)	МК-801 (X $\pm$ SE)	Опоравак (X $\pm$ SE)
<b>dp/dt max (mmHg/s)</b>	2526,49 $\pm$ 138,62	1324,23 $\pm$ 122,12	2455,89 $\pm$ 163,65
<b>dp/dt min (mmHg/s)</b>	-1923,13 $\pm$ 112,86	-1206,56 $\pm$ 96,23	-1889,63 $\pm$ 106,56
<b>SLVP (mmHg)</b>	78,66 $\pm$ 7,32	43,12 $\pm$ 9,78	70,39 $\pm$ 6,91
<b>DLVP (mmHg)</b>	1,96 $\pm$ 0,23	1,23 $\pm$ 0,15	1,85 $\pm$ 0,36
<b>HR (bpm)</b>	313,56 $\pm$ 9,65	223,79 $\pm$ 10,26	289,96 $\pm$ 12,69
<b>CF (ml/min)</b>	8,96 $\pm$ 0,55	7,12 $\pm$ 0,36	8,69 $\pm$ 0,96

Табела 4.4Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control* - **C**), током примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - **E**) и након периода опоравка (*Wash-out* - **W**).

Параметар	<b>C vs E</b>	<b>E vs W</b>	<b>C vs W</b>
<b>dp/dt max (mmHg/s)</b>	-47,59%; <b>p&lt;0,05</b>	+85,46%; <b>p&lt;0,05</b>	-2,79%; <b>p&gt;0,05</b>
<b>dp/dt min (mmHg/s)</b>	-37,26%; <b>p&lt;0,05</b>	+56,61%; <b>p&lt;0,05</b>	-1,74%; <b>p&gt;0,05</b>
<b>SLVP (mmHg)</b>	-45,18%; <b>p&lt;0,05</b>	+63,24%; <b>p&lt;0,05</b>	-10,51%; <b>p&gt;0,05</b>
<b>DLVP (mmHg)</b>	-37,24%; <b>p&lt;0,05</b>	+50,41%; <b>p&lt;0,05</b>	-5,61%; <b>p&gt;0,05</b>
<b>HR (bpm)</b>	-28,63%; <b>p&lt;0,05</b>	+29,57%; <b>p&lt;0,05</b>	-7,53%; <b>p&gt;0,05</b>
<b>CF (ml/min)</b>	-20,54%; <b>p&lt;0,05</b>	+22,05%; <b>p&lt;0,05</b>	-3,01%; <b>p&gt;0,05</b>

**График 4.4.** Ефекти МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ) на кардиодинамске параметре и коронарни проток ( $X \pm \text{SE}$ ) у контролном периоду (*Control*), током примене супстанце (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).





#### 4.1.5. ДЕЈСТВО КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ МК-801 (50 $\mu\text{mol/l}$ ) И ГЛУТАМАТА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти комбиноване примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ) и глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су на Табелама 4.5А и 4.5Б и Графику 4.5.

Истовремена примена МК-801 и глутамата је узроковала статистички значајно смањење свих посматраних кардиодинамских параметара и коронарног протока. Након периода опорвака (*Wash-out*) сви наведени параметри, изузев дијстолног притиска у левој комори (DLVP), су се статистички значајно повећали, при чему није било статистички значајне разлике између почетних вредности и вредности након периода опоравка.

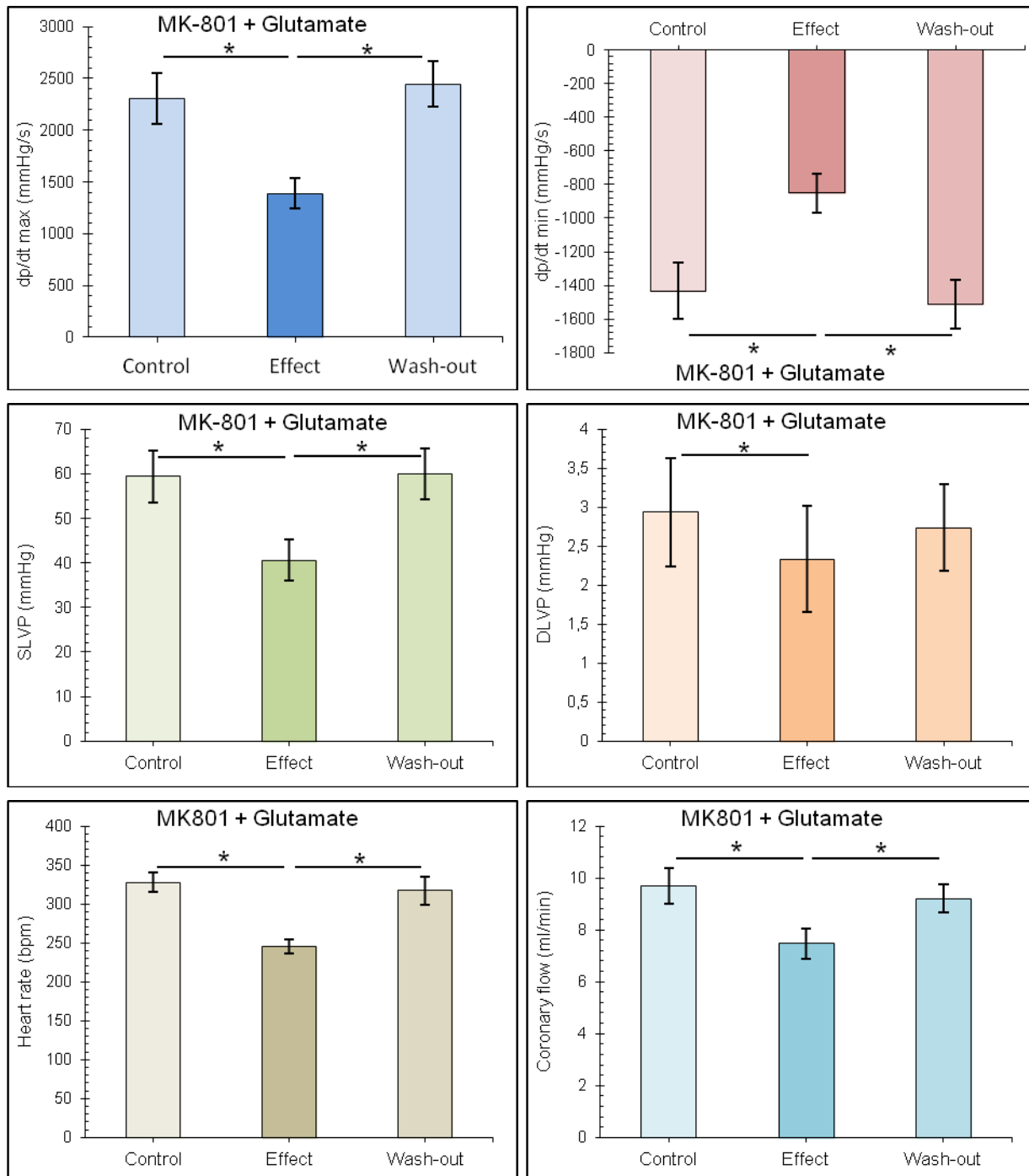
Табела 4.5А. Вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control* - C), током примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ) и глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - E) и након периода опоравка (*Wash-out* - W).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SE)	МК-801 и глутамат (X $\pm$ SE)	Опоравак (X $\pm$ SE)
dp/dt max (mmHg/s)	2304,6 $\pm$ 249,04	1385,52 $\pm$ 146,66	2445,3 $\pm$ 216,85
dp/dt min (mmHg/s)	-1432,92 $\pm$ 165,63	-851,57 $\pm$ 117,37	-1512,8 $\pm$ 145,57
SLVP (mmHg)	59,43 $\pm$ 5,84	40,57 $\pm$ 4,57	59,87 $\pm$ 5,71
DLVP (mmHg)	2,93 $\pm$ 0,69	2,33 $\pm$ 0,68	2,73 $\pm$ 0,56
HR (bpm)	327,87 $\pm$ 12,48	244,95 $\pm$ 9,18	316,85 $\pm$ 17,72
CF (ml/min)	9,7 $\pm$ 0,69	7,47 $\pm$ 0,59	9,2 $\pm$ 0,54

Табела 4.5Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control* - C), током примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ) и глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - E) и након периода опоравка (*Wash-out* - W).

Параметар	C vs E	E vs W	C vs W
dp/dt max (mmHg/s)	-39,88%; p<0,05	+76,49%; p<0,05	+6,11%; p>0,05
dp/dt min (mmHg/s)	-40,57%; p<0,05	+77,65%; p<0,05	+5,57%; p>0,05
SLVP (mmHg)	-31,74%; p<0,05	+47,58%; p<0,05	+0,73%; p>0,05
DLVP (mmHg)	-20,45%; p<0,05	+17,14%; p>0,05	-6,82%; p>0,05
HR (bpm)	-25,29%; p<0,05	+29,35%; p<0,05	-3,36%; p>0,05
CF (ml/min)	-23,02%; p<0,05	+23,21%; p<0,05	-5,15%; p>0,05

**График 4.5.** Ефекти комбиноване примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ) и глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на кардиодинамске параметре и коронарни проток ( $X \pm SE$ ) у контролном периоду (*Control*), током примене супстанци (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).



#### 4.1.6. ДЕЈСТВО КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ МК-801 (50 $\mu\text{mol/l}$ ) И ГЛИЦИНА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти комбиноване примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су на Табелама 4.6А и 4.6Б и Графику 4.6

Истовремена примена МК-801 и глицина је узроковала статистички значајно смањење свих посматраних кардиодинамских параметара и коронарног протока. Након периода опоравка (*Wash-out*) сви наведени параметри, су се статистички значајно повећали, при чему је само фреквенција срца (HR) била статистички значајно нижа након периода опоравка у односу на почетне вредности, док код осталих параметара није било статистички значајне разлике између почетних вредности и вредности након периода опоравка.

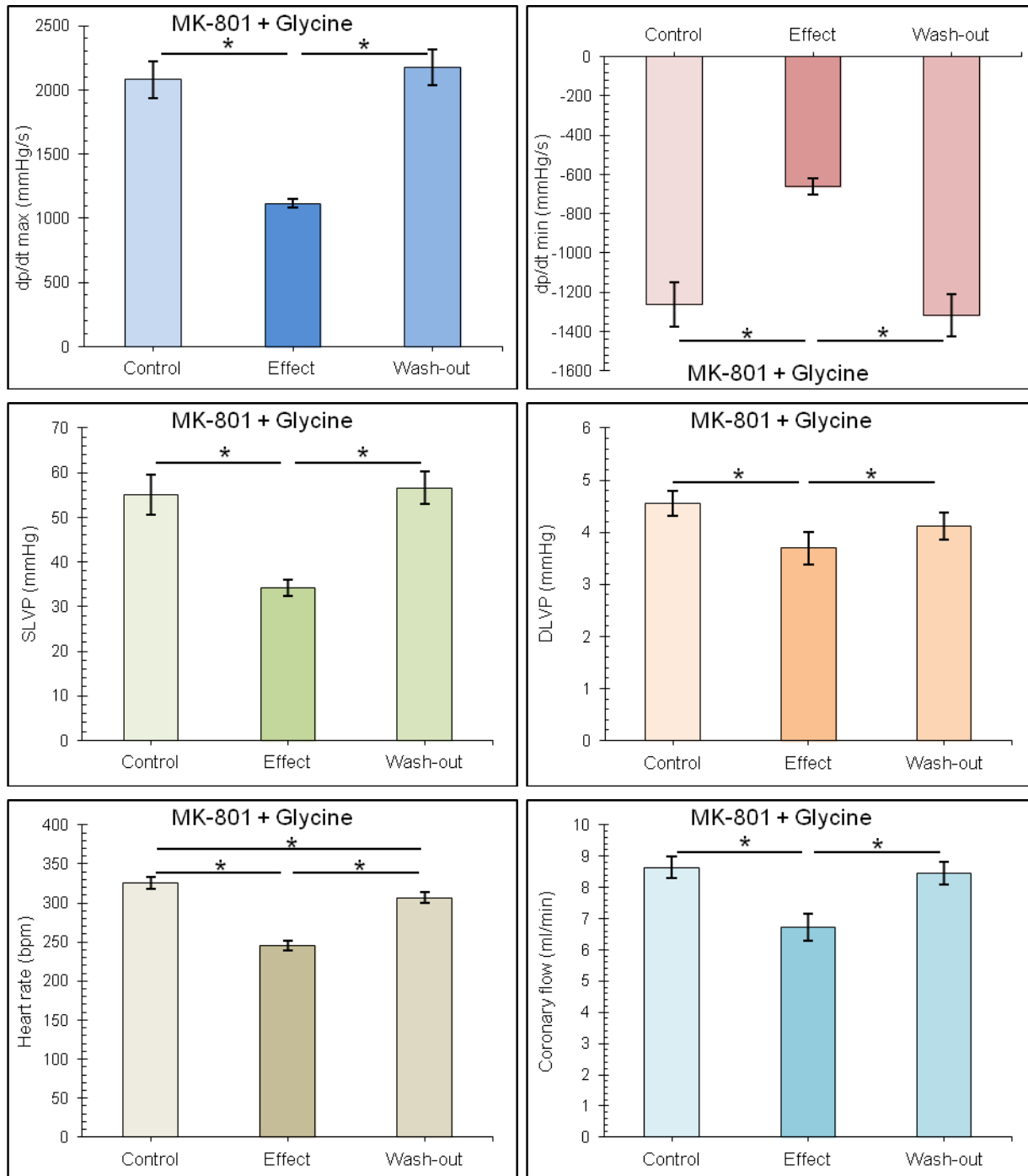
Табела 4.6А. Вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control - C*), током примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect - E*) и након периода опоравка (*Wash-out - W*).

Параметар	Контрола ( $X \pm SE$ )	МК-801 и глицин ( $X \pm SE$ )	Опоравак ( $X \pm SE$ )
<b>dp/dt max (mmHg/s)</b>	2078,81 $\pm$ 143,09	1116,83 $\pm$ 36,47	2176,27 $\pm$ 138,05
<b>dp/dt min (mmHg/s)</b>	-1259,64 $\pm$ 112,8	-662,24 $\pm$ 42,32	-1316,24 $\pm$ 106,65
<b>SLVP (mmHg)</b>	55,14 $\pm$ 4,5	34,13 $\pm$ 1,78	56,63 $\pm$ 3,56
<b>DLVP (mmHg)</b>	4,56 $\pm$ 0,24	3,7 $\pm$ 0,31	4,11 $\pm$ 0,26
<b>HR (bpm)</b>	326,04 $\pm$ 7,77	245,31 $\pm$ 6,66	306,69 $\pm$ 6,82
<b>CF (ml/min)</b>	8,63 $\pm$ 0,34	6,71 $\pm$ 0,44	8,46 $\pm$ 0,37

Табела 4.6Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control - C*), током примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect - E*) и након периода опоравка (*Wash-out - W*).

Параметар	C vs E	E vs W	C vs W
<b>dp/dt max (mmHg/s)</b>	-46,28%; <b>p&lt;0,05</b>	+94,86%; <b>p&lt;0,05</b>	+4,69%; p>0,05
<b>dp/dt min (mmHg/s)</b>	-47,43%; <b>p&lt;0,05</b>	+98,76%; <b>p&lt;0,05</b>	+4,49%; p>0,05
<b>SLVP (mmHg)</b>	-38,1%; <b>p&lt;0,05</b>	+65,92%; <b>p&lt;0,05</b>	+2,7%; p>0,05
<b>DLVP (mmHg)</b>	-18,86%; <b>p&lt;0,05</b>	+11,08%; <b>p&lt;0,05</b>	-9,87%; p>0,05
<b>HR (bpm)</b>	-24,76%; <b>p&lt;0,05</b>	+25,02%; <b>p&lt;0,05</b>	-5,93%; <b>p&lt;0,05</b>
<b>CF (ml/min)</b>	-22,25%; <b>p&lt;0,05</b>	+26,08%; <b>p&lt;0,05</b>	-1,97%; p>0,05

**График 4.6.** Ефекти комбиноване примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на кардиодинамске параметре и коронарни проток ( $X \pm \text{SE}$ ) у контролном периоду (*Control*), током примене супстанци (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).



#### 4.1.7. ДЕЈСТВО КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ МК-801 (50 $\mu\text{mol/l}$ ), ГЛУТАМАТА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) И ГЛИЦИНА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти комбиноване примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ), глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су на **Табелама 4.7А** и **4.7Б** и **Графику 4.7**.

Истовремена примена МК-801, глутамата и глицина је узроковала статистички значајно смањење свих посматраних кардиодинамских параметара и коронарног протока, изузев дијастолног притиска у левој комори (DLVP). Након периода опоравка (*Wash-out*) сви наведени параметри, су се статистички значајно повећали, при чему су вредности максималне стопе промене притиска ( $dp/dt \max$ ) и минималне стопе промене притиска у левој комори ( $dp/dt \min$ ) биле статистички значајно веће у односу на контролне вредности.

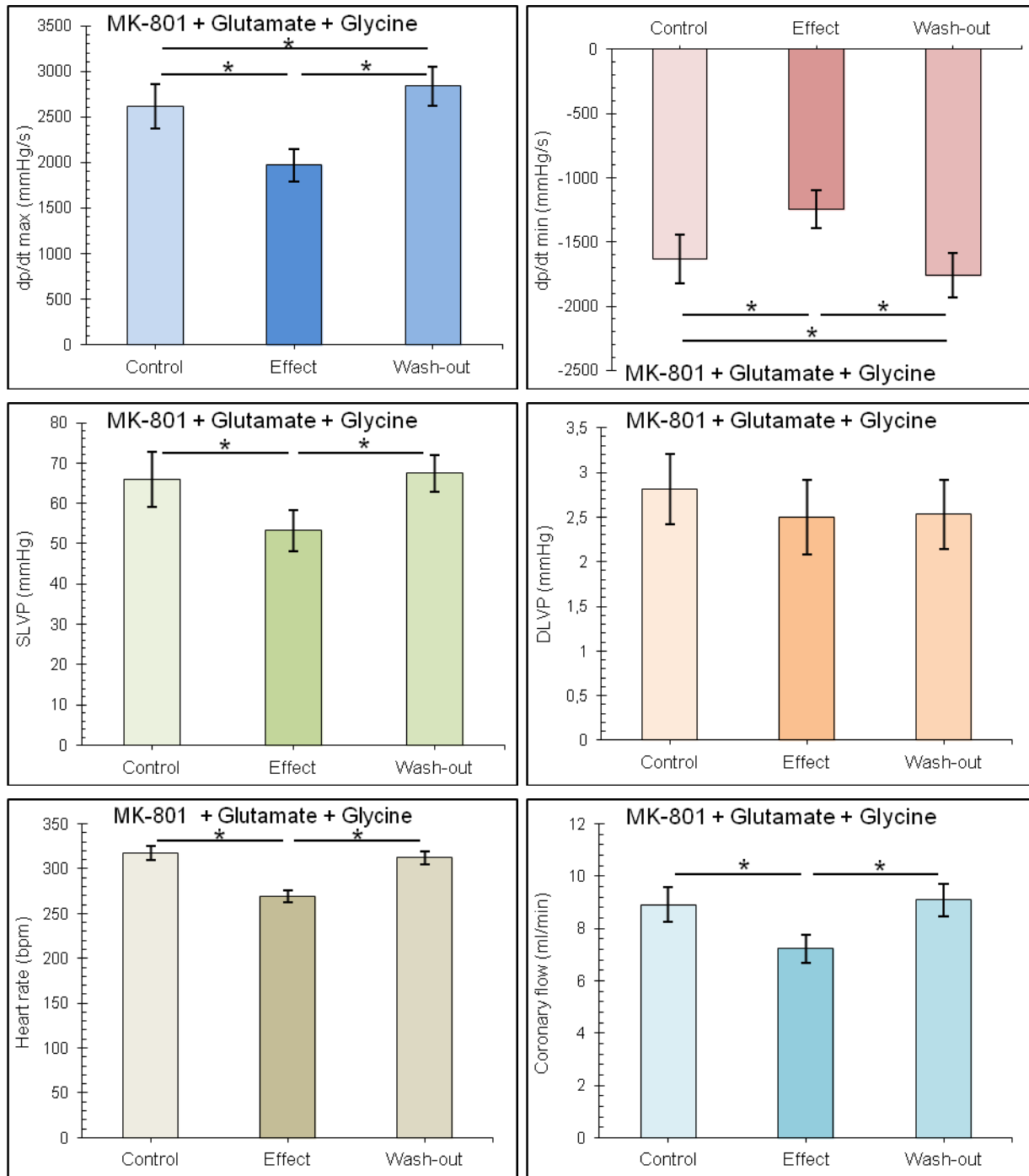
**Табела 4.7А.** Вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control - C*), током примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ), глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect - E*) и након периода опоравка (*Wash-out - W*).

Параметар	Контрола ( $X \pm SE$ )	МК-801, глутамат и глицин ( $X \pm SE$ )	Опоравак ( $X \pm SE$ )
$dp/dt \max$ (mmHg/s)	2611,01 $\pm$ 245,25	1967,53 $\pm$ 181,3	2836,57 $\pm$ 210,05
$dp/dt \min$ (mmHg/s)	-1632,29 $\pm$ 190,07	-1243,69 $\pm$ 150,14	-1759,94 $\pm$ 169,46
SLVP (mmHg)	65,96 $\pm$ 6,79	53,21 $\pm$ 4,97	67,46 $\pm$ 4,49
DLVP (mmHg)	2,81 $\pm$ 0,4	2,5 $\pm$ 0,42	2,53 $\pm$ 0,38
HR (bpm)	317,79 $\pm$ 7,86	269,06 $\pm$ 6,77	312,19 $\pm$ 7,04
CF (ml/min)	8,91 $\pm$ 0,68	7,23 $\pm$ 0,53	9,09 $\pm$ 0,61

**Табела 4.7Б.** Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control - C*), током примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ), глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect - E*) и након периода опоравка (*Wash-out - W*).

Параметар	C vs E	E vs W	C vs W
$dp/dt \max$ (mmHg/s)	-24,65%; $p < 0,05$	+44,17%; $p < 0,05$	+8,64%; $p < 0,05$
$dp/dt \min$ (mmHg/s)	-23,81%; $p < 0,05$	+41,51%; $p < 0,05$	+7,82%; $p < 0,05$
SLVP (mmHg)	-19,32%; $p < 0,05$	+26,77%; $p < 0,05$	+2,27%; $p > 0,05$
DLVP (mmHg)	-11,17%; $p > 0,05$	+1,14%; $p > 0,05$	-10,15%; $p > 0,05$
HR (bpm)	-15,33%; $p < 0,05$	+16,03%; $p < 0,05$	-1,76%; $p > 0,05$
CF (ml/min)	-18,91%; $p < 0,05$	+25,69%; $p < 0,05$	+1,95%; $p > 0,05$

**График 4.7.** Ефекти комбиноване примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ), глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на кардиодинамске параметре и коронарни проток ( $X \pm SE$ ) у контролном периоду (*Control*), током примене супстанци (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).



#### 4.1.8. ДЕЈСТВО ВЕРАПАМИЛА (3 $\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ) на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су на Табелама 4.8А и 4.8Б и Графику 4.8.

Примена верапамила је узроковала статистички значајно смањење свих посматраних кардиодинамских параметара, изузев дијастолног притиска у левој комори (DLVP), док се коронарни проток статистички значајно повећао. Након периода опоравка (*Wash-out*) вредности максималне стопе промене притиска ( $dp/dt \text{ max}$ ) и минималне стопе промене притиска у левој комори ( $dp/dt \text{ min}$ ) и систолног притиска у левој комори (SLVP) су се статистички значајно повећали, при чему су вредности наведених параметара биле статистички значајно ниже у односу на почетне вредности. Вредност фреквенције срца (HR) се није статистички значајно мењала током периода опоравка, док се коронарни проток (CF) статистички значајно смањио до вредности сличних почетним.

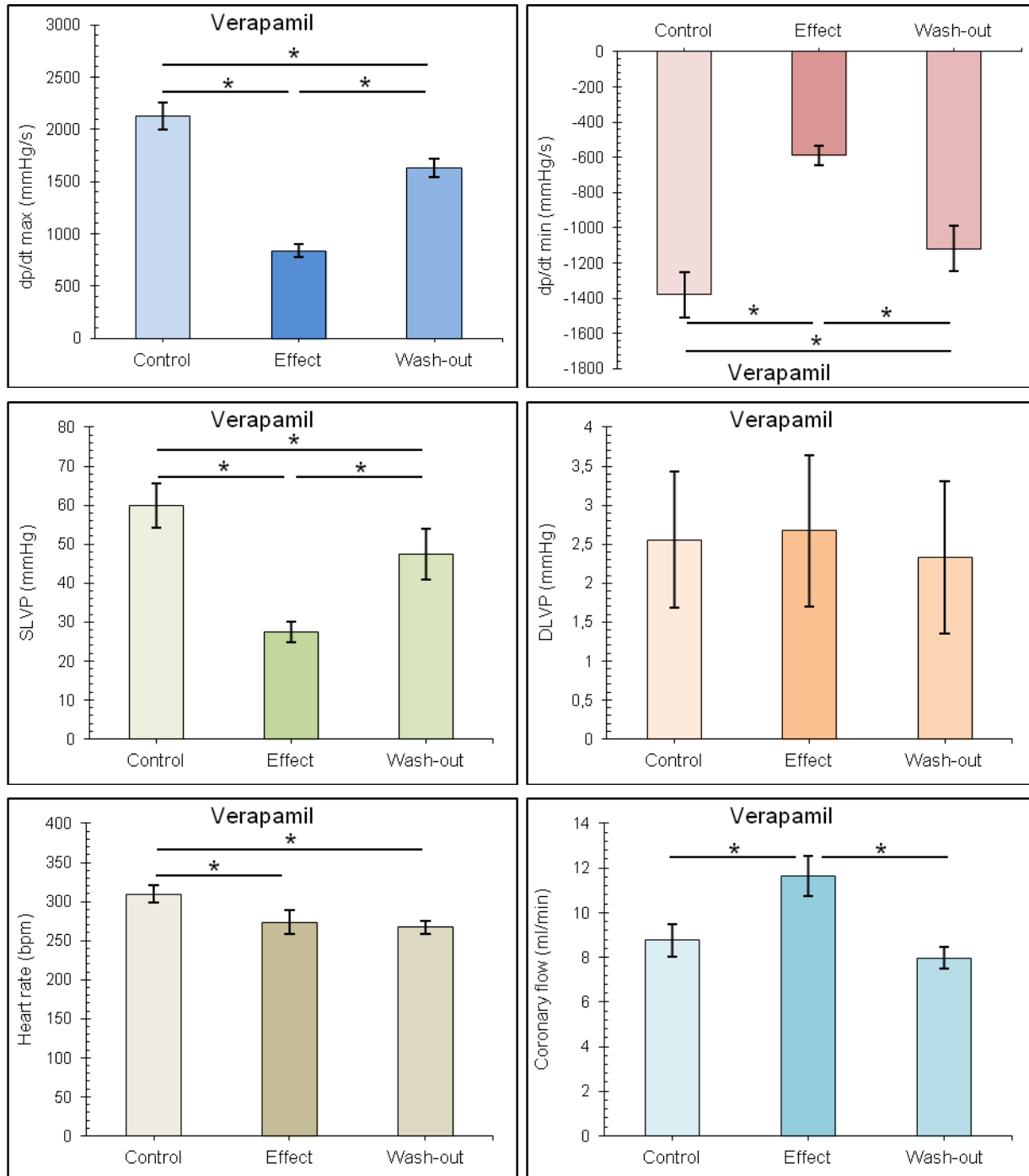
Табела 4.8А. Вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control* - C), током примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - E) и након периода опоравка (*Wash-out* - W).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SE)	Верапамил (X $\pm$ SE)	Опоравак (X $\pm$ SE)
<b>dp/dt max (mmHg/s)</b>	2129,87 $\pm$ 127,97	836,57 $\pm$ 66,2	1630,23 $\pm$ 90,79
<b>dp/dt min (mmHg/s)</b>	-1378,47 $\pm$ 128,77	-589,9 $\pm$ 57,04	-1117,64 $\pm$ 128,92
<b>SLVP (mmHg)</b>	59,8 $\pm$ 5,69	27,4 $\pm$ 2,65	47,51 $\pm$ 6,51
<b>DLVP (mmHg)</b>	2,56 $\pm$ 0,87	2,67 $\pm$ 0,97	2,33 $\pm$ 0,98
<b>HR (bpm)</b>	309,67 $\pm$ 10,85	273,69 $\pm$ 15,15	266,9 $\pm$ 8,34
<b>CF (ml/min)</b>	8,77 $\pm$ 0,72	11,66 $\pm$ 0,9	7,97 $\pm$ 0,48

Табела 4.8Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control* - C), током примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - E) и након периода опоравка (*Wash-out* - W).

Параметар	C vs E	E vs W	C vs W
<b>dp/dt max (mmHg/s)</b>	-60,68%; <b>p&lt;0,05</b>	+94,64%; <b>p&lt;0,05</b>	-23,46%; <b>p&lt;0,05</b>
<b>dp/dt min (mmHg/s)</b>	-57,21%; <b>p&lt;0,05</b>	+89,46%; <b>p&lt;0,05</b>	-18,92%; <b>p&lt;0,05</b>
<b>SLVP (mmHg)</b>	-54,18%; <b>p&lt;0,05</b>	+73,41%; <b>p&lt;0,05</b>	-20,54%; <b>p&lt;0,05</b>
<b>DLVP (mmHg)</b>	+4,47%; <b>p&gt;0,05</b>	-12,83%; <b>p&gt;0,05</b>	-8,93%; <b>p&gt;0,05</b>
<b>HR (bpm)</b>	-11,62%; <b>p&lt;0,05</b>	-2,48%; <b>p&gt;0,05</b>	-13,81%; <b>p&lt;0,05</b>
<b>CF (ml/min)</b>	+32,9%; <b>p&lt;0,05</b>	-31,62%; <b>p&lt;0,05</b>	-9,12%; <b>p&gt;0,05</b>

**График 4.8.** Ефекти примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ) на кардиодинамске параметре и коронарни проток ( $X \pm \text{SE}$ ) у контролном периоду (*Control*), током примене супстанце (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).





#### 4.1.9. ДЕЈСТВО КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ ВЕРАПАМИЛА (3 $\mu\text{mol/l}$ ) И ГЛУТАМАТА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти комбиноване примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ) и глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су на Табелама 4.9А и 4.9Б и Графику 4.9.

Комбинована примена верапамила и глутамата је узроковала статистички значајно смањење свих посматраних кардиодинамских параметара, изузев дијастолног притиска у левој комори (DLVP), док се коронарни проток статистички значајно повећао. Након периода опоравка (*Wash-out*) вредности максималне стопе промене притиска у левој комори ( $dp/dt \text{ max}$ ) и систолног притиска у левој комори (SLVP) су се статистички значајно повећали, при чему су вредности наведених параметара биле статистички значајно ниже у односу на почетне вредности. Вредности минималне стопе промене притиска у левој комори ( $dp/dt \text{ min}$ ) и фреквенције срца (HR) се нису статистички значајно мењале током периода опоравка, док се коронарни проток (CF) статистички значајно смањило до вредности које су статистички значајно ниже од почетних.

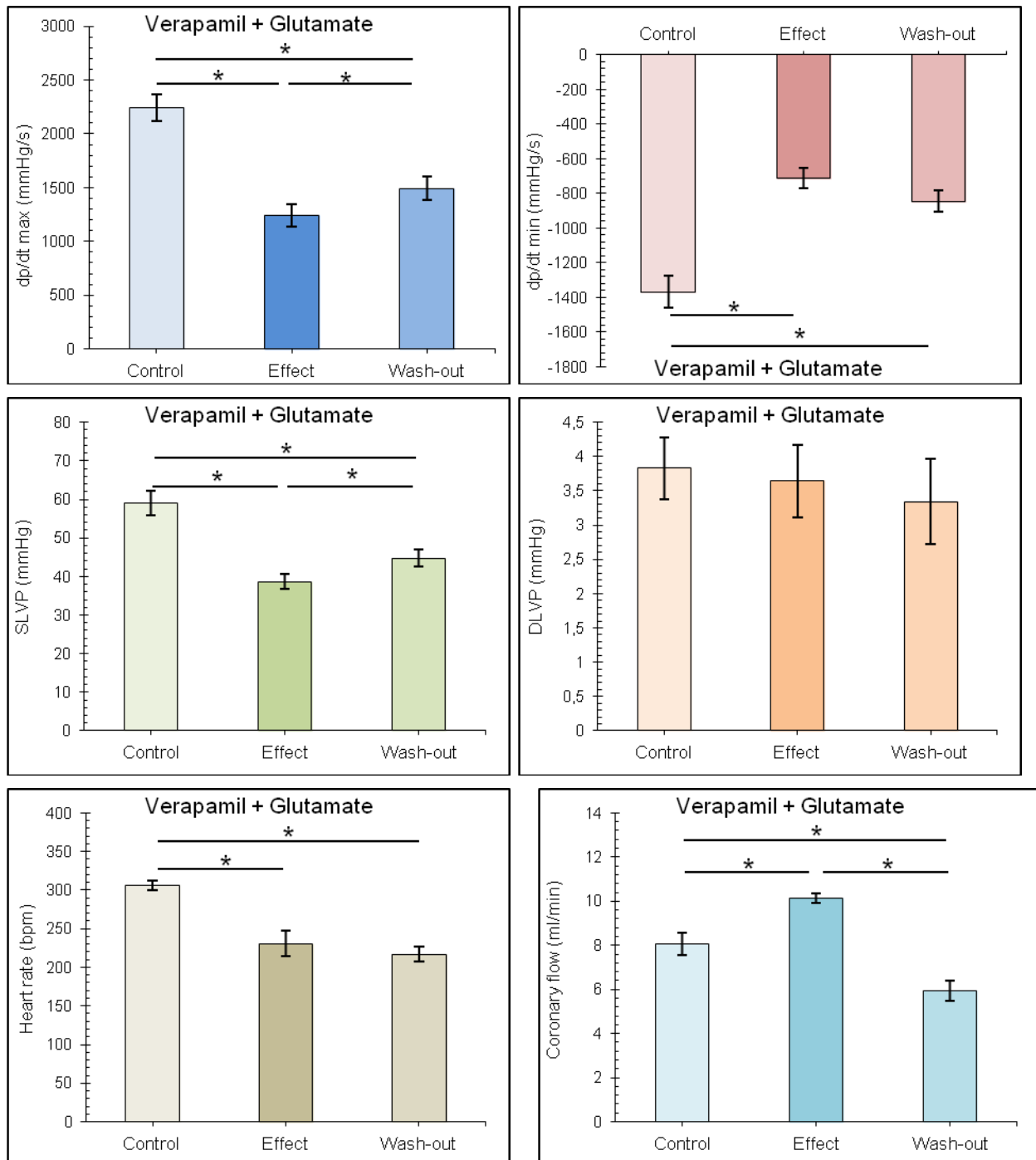
Табела 4.9А. Вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control - C*), током примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ) и глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect - E*) и након периода опоравка (*Wash-out - W*).

Параметар	Контрола ( $X \pm SE$ )	Верапамил и глутамат ( $X \pm SE$ )	Опоравак ( $X \pm SE$ )
$dp/dt \text{ max}$ (mmHg/s)	2243,07 $\pm$ 127,16	1241,24 $\pm$ 101,89	1491,36 $\pm$ 106,75
$dp/dt \text{ min}$ (mmHg/s)	-1367,84 $\pm$ 92,6	-711,89 $\pm$ 56,79	-845,23 $\pm$ 60,38
SLVP (mmHg)	59,04 $\pm$ 3,22	38,7 $\pm$ 2,02	44,69 $\pm$ 2,19
DLVP (mmHg)	3,83 $\pm$ 0,45	3,64 $\pm$ 0,53	3,34 $\pm$ 0,62
HR (bpm)	306,33 $\pm$ 6,34	230,64 $\pm$ 16,51	216,73 $\pm$ 9,87
CF (ml/min)	8,06 $\pm$ 0,5	10,14 $\pm$ 0,23	5,94 $\pm$ 0,46

Табела 4.9Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control* - **C**), током примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ) и глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - **E**) и након периода опоравка (*Wash-out* - **W**).

Параметар	<b>C vs E</b>	<b>E vs W</b>	<b>C vs W</b>
<b>dp/dt max</b> (mmHg/s)	-44,66%; <b>p&lt;0,05</b>	+20,15%; <b>p&lt;0,05</b>	-33,51%; <b>p&lt;0,05</b>
<b>dp/dt min</b> (mmHg/s)	-47,96%; <b>p&lt;0,05</b>	+18,73%; p>0,05	-38,21%; <b>p&lt;0,05</b>
<b>SLVP</b> (mmHg)	-34,45%; <b>p&lt;0,05</b>	+15,47%; <b>p&lt;0,05</b>	-34,32%; <b>p&lt;0,05</b>
<b>DLVP</b> (mmHg)	-4,85%; p>0,05	-8,26%; p>0,05	-12,69%; p>0,05
<b>HR</b> (bpm)	-24,71%; <b>p&lt;0,05</b>	-6,03%; p>0,05	-29,25%; <b>p&lt;0,05</b>
<b>CF</b> (ml/min)	+25,89%; <b>p&lt;0,05</b>	-41,41%; <b>p&lt;0,05</b>	-26,24%; <b>p&lt;0,05</b>

**График 4.9.** Ефекти комбиноване примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ) и глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на кардиодинамске параметре и коронарни проток ( $X \pm SE$ ) у контролном периоду (*Control*), током примене супстанци (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).



#### 4.1.10. ДЕЈСТВО КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ ВЕРАПАМИЛА (3 $\mu\text{mol/l}$ ) И ГЛИЦИНА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти комбиноване примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су на Табелама 4.10А и 4.10Б и Графику 4.10.

Комбинована примена верапамила и глицина је узроковала статистички значајно смањење вредности максималне стопе промене притиска ( $dp/dt \max$ ) и минималне стопе промене притиска у левој комори и систолног притиска у левој комори (SLVP), док се коронарни проток (CF) статистички значајно повећао. Након периода опоравка (*Wash-out*) вредности наведених параметара су се статистички значајно повећали, при чему су вредности биле статистички значајно ниже у односу на почетне вредности. Вредност фреквенције срца (HR) се додатно смањила током периода опоравка, тако да постоји статистички значајна разлика између почетних вредности и вредности након периода опоравка. Коронарни проток (CF) се током периода опоравка статистички значајно смањило до вредности које су статистички значајно ниже од почетних.

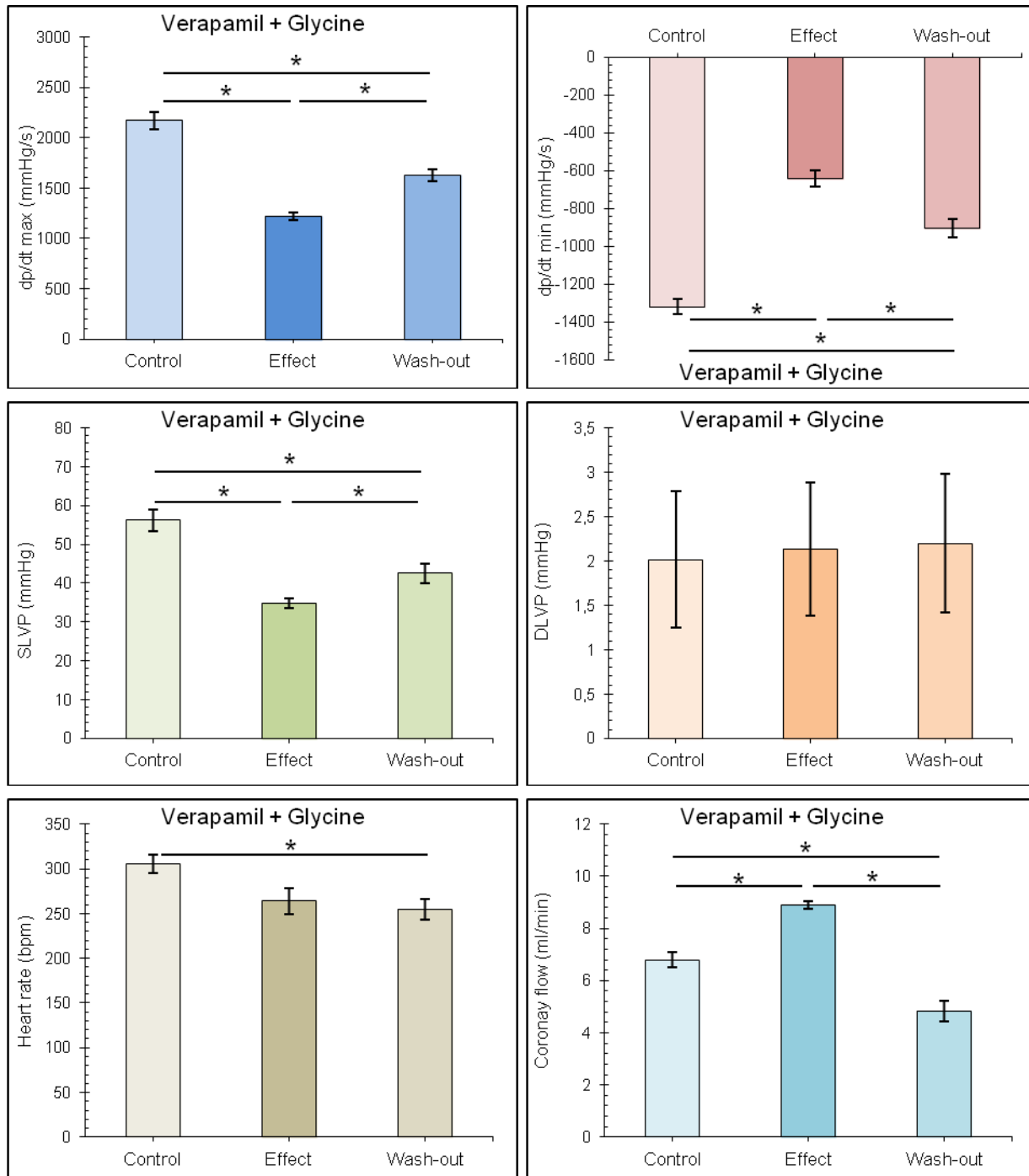
Табела 4.10А. Вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control* - C), током примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - E) и након периода опоравка (*Wash-out* - W).

Параметар	Контрола ( $X \pm SE$ )	Верапамил и глицин ( $X \pm SE$ )	Опоравак ( $X \pm SE$ )
<b><math>dp/dt \max</math> (mmHg/s)</b>	2170,97 $\pm$ 84,07	1220,45 $\pm$ 39,54	1623,72 $\pm$ 60,83
<b><math>dp/dt \min</math> (mmHg/s)</b>	-1320,77 $\pm$ 39,75	-640,77 $\pm$ 41,66	-905,68 $\pm$ 50,05
<b>SLVP (mmHg)</b>	56,23 $\pm$ 2,81	34,9 $\pm$ 1,29	42,5 $\pm$ 2,63
<b>DLVP (mmHg)</b>	2,02 $\pm$ 0,77	2,13 $\pm$ 0,75	2,2 $\pm$ 0,78
<b>HR (bpm)</b>	305,77 $\pm$ 10,4	264,28 $\pm$ 14,5	254,72 $\pm$ 11,19
<b>CF (ml/min)</b>	6,8 $\pm$ 0,29	8,9 $\pm$ 0,14	4,83 $\pm$ 0,41

**Табела 4.10Б.** Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control* - **C**), током примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - **E**) и након периода опоравка (*Wash-out* - **W**).

Параметар	<b>C vs E</b>	<b>E vs W</b>	<b>C vs W</b>
<b>dp/dt max</b> (mmHg/s)	-43,78%; <b>p&lt;0,05</b>	+33,04%; <b>p&lt;0,05</b>	-25,21%; <b>p&lt;0,05</b>
<b>dp/dt min</b> (mmHg/s)	-51,79%; <b>p&lt;0,05</b>	+41,34%; <b>p&lt;0,05</b>	-31,43%; <b>p&lt;0,05</b>
<b>SLVP</b> (mmHg)	-37,94%; <b>p&lt;0,05</b>	+21,78%; <b>p&lt;0,05</b>	-24,42%; <b>p&lt;0,05</b>
<b>DLVP</b> (mmHg)	+5,79%; <b>p&gt;0,05</b>	+3,13%; <b>p&gt;0,05</b>	+9,09%; <b>p&gt;0,05</b>
<b>HR</b> (bpm)	-13,57%; <b>p&lt;0,05</b>	-3,62%; <b>p&gt;0,05</b>	-16,7%; <b>p&lt;0,05</b>
<b>CF</b> (ml/min)	+30,88%; <b>p&lt;0,05</b>	-45,69%; <b>p&lt;0,05</b>	-28,92%; <b>p&lt;0,05</b>

**График 4.10.** Ефекти комбиноване примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на кардиодинамске параметре и коронарни проток ( $X \pm \text{SE}$ ) у контролном периоду (*Control*), током примене супстанци (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).



#### 4.1.11. ДЕЈСТВО КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ ВЕРАПАМИЛА (3 $\mu\text{mol/l}$ ), ГЛУТАМАТА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) И ГЛИЦИНА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти комбиноване примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ), глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су на **Табелама 4.11А и 4.11Б** и **Графику 4.11**.

Истовремена примена верапамила, глутамата и глицина је узроковала статистички значајно смањење вредности максималне стопе промене притиска ( $dp/dt \max$ ) и минималне стопе промене притиска у левој комори и систолног притиска у левој комори (SLVP), док се коронарни проток (CF) статистички значајно повећао. Након периода опоравка (*Wash-out*) вредности наведених параметара су се статистички значајно повећали, при чему су вредности биле статистички значајно ниже у односу на почетне вредности. Вредност фреквенције срца (HR) се смањила током периода опоравка, тако да постоји статистички значајна разлика између вредности након примене супстанци и вредности након опоравка, као и између почетних вредности и вредности након периода опоравка. Коронарни проток (CF) се током периода опоравка статистички значајно смањило до вредности које су статистички значајно ниже од почетних.

**Табела 4.11А.** Вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control - C*), током примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ), глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect - E*) и након периода опоравка (*Wash-out - W*).

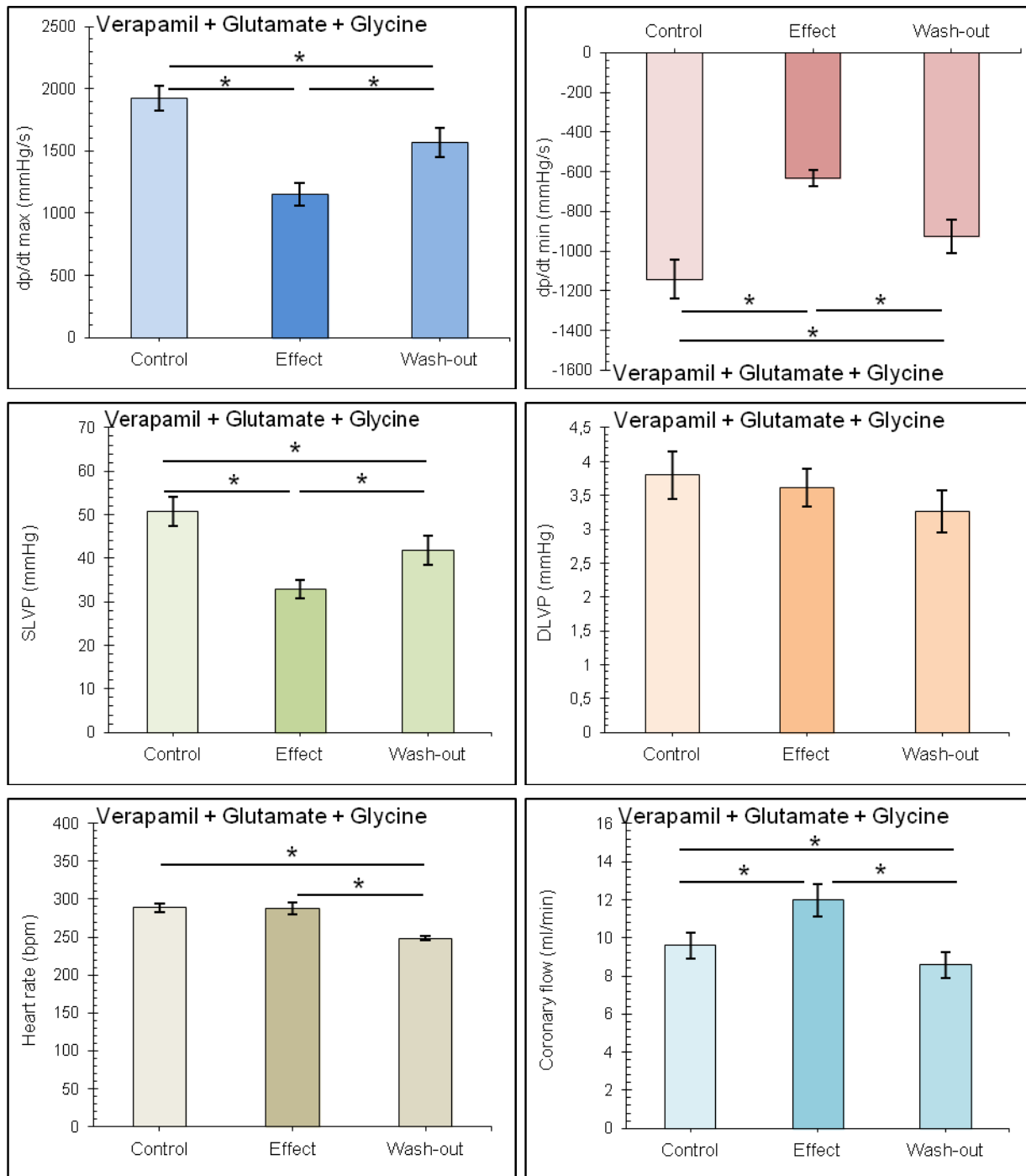
Параметар	Контрола ( $X \pm SE$ )	Верапамил, глутамат и глицин ( $X \pm SE$ )	Опоравак ( $X \pm SE$ )
<b>dp/dt max (mmHg/s)</b>	1919,73 $\pm$ 99,67	1149,9 $\pm$ 88,24	1569,16 $\pm$ 117,06
<b>dp/dt min (mmHg/s)</b>	-1142,99 $\pm$ 97,55	-630,41 $\pm$ 41,08	-925,93 $\pm$ 82,45
<b>SLVP (mmHg)</b>	50,73 $\pm$ 3,35	32,89 $\pm$ 2,08	41,87 $\pm$ 3,35
<b>DLVP (mmHg)</b>	3,8 $\pm$ 0,35	3,61 $\pm$ 0,28	3,26 $\pm$ 0,31
<b>HR (bpm)</b>	288,86 $\pm$ 5,62	287,4 $\pm$ 7,59	248,49 $\pm$ 2,82
<b>CF (ml/min)</b>	9,6 $\pm$ 0,69	11,97 $\pm$ 0,83	8,57 $\pm$ 0,68

Табела 4.11Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control* - **C**), током примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ), глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - **E**) и након периода опоравка (*Wash-out* - **W**).

Параметар	<b>C vs E</b>	<b>E vs W</b>	<b>C vs W</b>
<b>dp/dt max</b> (mmHg/s)	-40,1%; <b>p&lt;0,05</b>	+36,46%; <b>p&lt;0,05</b>	-18,26%; <b>p&lt;0,05</b>
<b>dp/dt min</b> (mmHg/s)	-44,85%; <b>p&lt;0,05</b>	+46,88%; <b>p&lt;0,05</b>	-18,99%; <b>p&lt;0,05</b>
<b>SLVP</b> (mmHg)	-35,17%; <b>p&lt;0,05</b>	+27,32%; <b>p&lt;0,05</b>	-17,46%; <b>p&lt;0,05</b>
<b>DLVP</b> (mmHg)	-4,88%; <b>p&gt;0,05</b>	-9,88%; <b>p&gt;0,05</b>	-14,29%; <b>p&gt;0,05</b>
<b>HR</b> (bpm)	-0,5%; <b>p&gt;0,05</b>	-13,54%; <b>p&lt;0,05</b>	-13,98%; <b>p&lt;0,05</b>
<b>CF</b> (ml/min)	+24,7%; <b>p&lt;0,05</b>	-28,4%; <b>p&lt;0,05</b>	-10,71%; <b>p&lt;0,05</b>



**График 4.11.** Ефекти комбиноване примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ), глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на кардиодинамске параметре и коронарни проток ( $X \pm \text{SE}$ ) у контролном периоду (*Control*), током примене супстанци (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).



#### 4.1.12. ДЕЈСТВО *N*-МЕТИЛ-*D*-АСПАРТАТА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти примене *N*-метил-*D*-аспартата у концентрацији од 100  $\mu\text{mol/l}$  на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су на Табелама 4.12А и 4.12Б и Графику 4.12.

Примена *N*-метил-*D*-аспартата није изазвала статистички значајне промене посматраних кардиодинамских параметра, као ни коронарног протока.

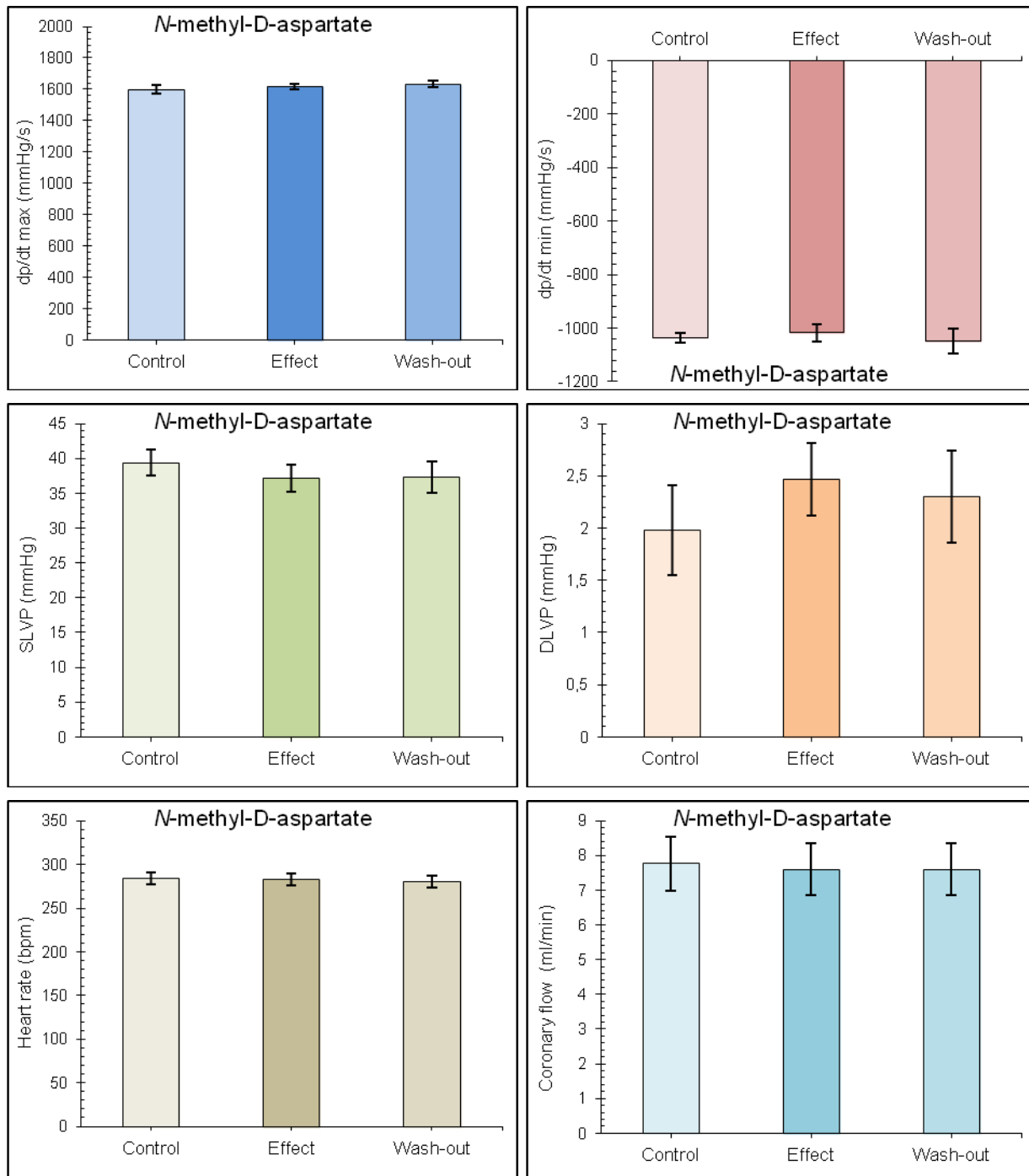
Табела 4.12А. Вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control* - *C*), током примене *N*-метил-*D*-аспартата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - *E*) и након периода опоравка (*Wash-out* - *W*).

Параметар	Контрола ( $X \pm SE$ )	<i>N</i> -метил- <i>D</i> -аспартат ( $X \pm SE$ )	Опоравак ( $X \pm SE$ )
<b>dp/dt max</b> (mmHg/s)	1598,73 $\pm$ 25,35	1617,75 $\pm$ 18,36	1631,28 $\pm$ 21,4
<b>dp/dt min</b> (mmHg/s)	-1035,77 $\pm$ 18,91	-1017,92 $\pm$ 33,79	-1048,18 $\pm$ 47,4
<b>SLVP</b> (mmHg)	39,37 $\pm$ 1,88	37,22 $\pm$ 1,95	37,28 $\pm$ 2,29
<b>DLVP</b> (mmHg)	1,98 $\pm$ 0,43	2,47 $\pm$ 0,35	2,3 $\pm$ 0,44
<b>HR</b> (bpm)	284,33 $\pm$ 7,04	282,78 $\pm$ 7,31	280,53 $\pm$ 7,09
<b>CF</b> (ml/min)	7,77 $\pm$ 0,78	7,6 $\pm$ 0,75	7,6 $\pm$ 0,75

Табела 4.12Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control* - *C*), током примене *N*-метил-*D*-аспартата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - *E*) и након периода опоравка (*Wash-out* - *W*).

Параметар	<i>C</i> vs <i>E</i>	<i>E</i> vs <i>W</i>	<i>C</i> vs <i>W</i>
<b>dp/dt max</b> (mmHg/s)	+1,19%; $p > 0,05$	+0,84%; $p > 0,05$	+2,04%; $p > 0,05$
<b>dp/dt min</b> (mmHg/s)	-1,72%; $p > 0,05$	+2,97%; $p > 0,05$	+1,2%; $p > 0,05$
<b>SLVP</b> (mmHg)	-5,46%; $p > 0,05$	+0,18%; $p > 0,05$	-5,29%; $p > 0,05$
<b>DLVP</b> (mmHg)	+24,37%; $p > 0,05$	+6,76%; $p > 0,05$	+15,97%; $p > 0,05$
<b>HR</b> (bpm)	-0,55%; $p > 0,05$	-0,8%; $p > 0,05$	-1,34%; $p > 0,05$
<b>CF</b> (ml/min)	-2,15%; $p > 0,05$	0%; $p > 0,05$	-2,15%; $p > 0,05$

**График 4.12.** Ефекти *N*-метил-*D*-аспартата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на кардиодинамске параметре и коронарни проток ( $X \pm \text{SE}$ ) у контролном периоду (*Control*), током примене супстанце (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).



#### 4.1.13. ДЕЈСТВО DL-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти примене DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (DL Нсу TLHC) у концентрацији од 10  $\mu\text{mol/l}$  на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су на Табелама 4.13А и 4.13Б и Графику 4.13.

Примена DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (DL Нсу TLHC) је изазвала статистички значајно смањење максималне стопе промене притиска у левој комори ( $dp/dt \max$ ), систолног притиска у левој комори (SLVP), фреквенције срца (HR) и коронарног протока (CF). Након периода опоравка (*Wash-out*) максимална стопа промене притиска у левој комори ( $dp/dt \max$ ) и коронарни проток (CF) су се повећали, тако да није било статистички значајне разлике између почетних вредности и вредности након периода опоравка. Вредности систолног притиска у левој комори (SLVP) и фреквенције срца (HR) се ницу статистички значајно мењале током периода опоравка, тако да постоји статистички значајна разлика између почетних вредности и вредности након периода опоравка. Вредности дијастолног притиска у левој комори (DLVP) су се додатно смањиле током периода опоравка тако да постоји статистички значајна разлика између почетних вредности и вредности након периода опоравка.

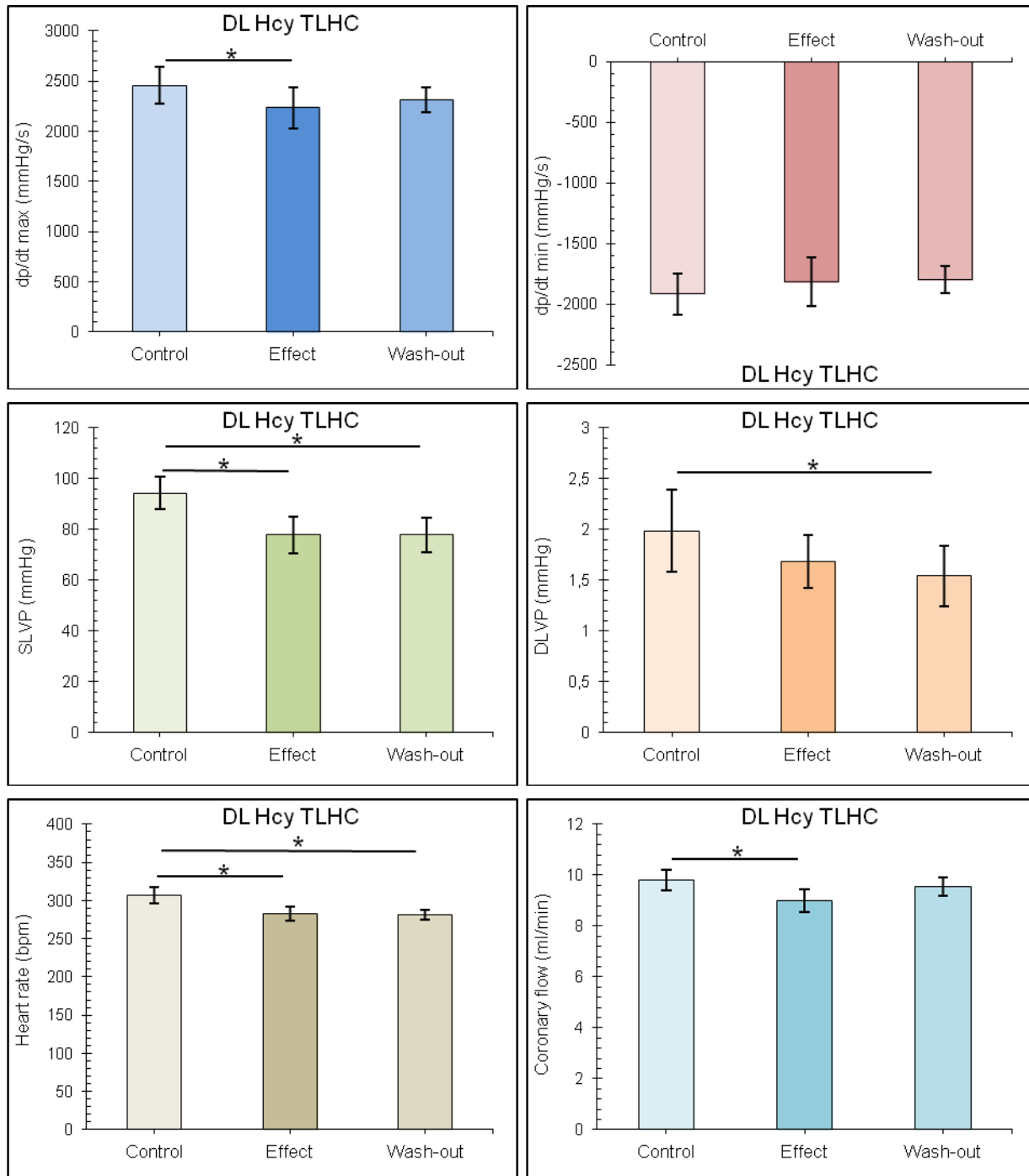
Табела 4.13А. Вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control - C*), током примене DL Нсу TLHC (10  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect - E*) и након периода опоравка (*Wash-out - W*).

Параметар	Контрола ( $X \pm SE$ )	DL Нсу TLHC ( $X \pm SE$ )	Опоравак ( $X \pm SE$ )
<b><math>dp/dt \max</math> (mmHg/s)</b>	2457,4 $\pm$ 182,48	2232,89 $\pm$ 204,1	2314,9 $\pm$ 123,35
<b><math>dp/dt \min</math> (mmHg/s)</b>	-1915,6 $\pm$ 171,21	-1817,61 $\pm$ 203,63	-1793,93 $\pm$ 111,42
<b>SLVP (mmHg)</b>	94,4 $\pm$ 6,5	77,87 $\pm$ 7,15	77,9 $\pm$ 6,68
<b>DLVP (mmHg)</b>	1,99 $\pm$ 0,4	1,69 $\pm$ 0,26	1,54 $\pm$ 0,3
<b>HR (bpm)</b>	307,2 $\pm$ 10,36	282,7 $\pm$ 9,18	281,49 $\pm$ 6,01
<b>CF (ml/min)</b>	9,8 $\pm$ 0,4	9 $\pm$ 0,44	9,54 $\pm$ 0,37

Табела 4.13Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control* - **C**), током примене DL Нсу TLHC (10  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - **E**) и након периода опоравка (*Wash-out* - **W**).

Параметар	<b>C vs E</b>	<b>E vs W</b>	<b>C vs W</b>
<b>dp/dt max</b> (mmHg/s)	-9,14%; <b>p&lt;0,05</b>	+3,67%; p>0,05	-5,8%; p>0,05
<b>dp/dt min</b> (mmHg/s)	-5,12%; p>0,05	-1,3%; p>0,05	-6,35%; p>0,05
<b>SLVP</b> (mmHg)	-17,51%; <b>p&lt;0,05</b>	+0,04%; p>0,05	-17,48%; <b>p&lt;0,05</b>
<b>DLVP</b> (mmHg)	-15,11%; p>0,05	-8,47%; p>0,05	-22,3%; <b>p&lt;0,05</b>
<b>HR</b> (bpm)	-7,98%; <b>p&lt;0,05</b>	-0,43%; p>0,05	-8,37%; <b>p&lt;0,05</b>
<b>CF</b> (ml/min)	-8,16%; <b>p&lt;0,05</b>	+6,03%; p>0,05	-2,62%; p>0,05

**График 4.13.** Ефекти DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (DL Hcy TLHC) (10  $\mu\text{mol/l}$ ) на кардиодинамске параметре и коронарни проток ( $X \pm SE$ ) у контролном периоду (*Control*), током примене супстанце (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).



#### 4.1.14. ДЕЈСТВО МЕМАНТИН ХИДРОХЛОРИДА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти примене мемантин хидрохлорида у концентрацији од 100  $\mu\text{mol/l}$  на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су на Табелама 4.14А и 4.14Б и Графику 4.14.

Примена мемантин хидрохлорида изазвала је статистички значајно смањење вредности свих кардиодинамских параметара и коронарног протока, изузев дијастолног притиска у левој комори (DLVP). Након периода опоравка (*Wash-out*) сви кардиодинамски параметри и коронарни проток су се статистички значајно повећали, и сви су достигли вредности приближне почетним вредностима, изузев фреквенције срца (HR).

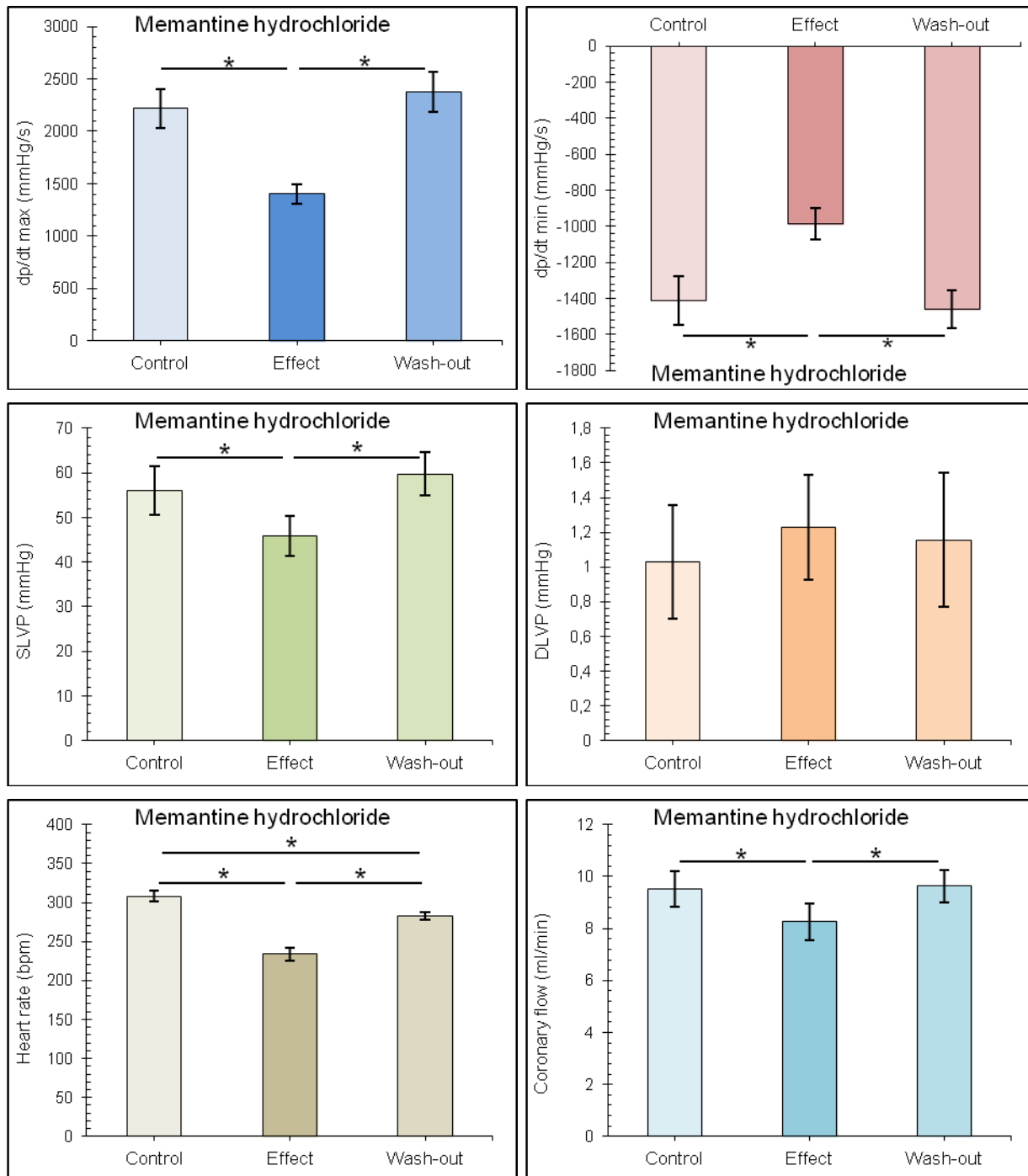
Табела 4.14А. Вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control - C*), током примене мемантин хидрохлорида (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect - E*) и након периода опоравка (*Wash-out - W*).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SE)	Мемантин хидрохлорид (X $\pm$ SE)	Опоравак (X $\pm$ SE)
<b>dp/dt max (mmHg/s)</b>	2216,74 $\pm$ 189,73	1401,36 $\pm$ 92,28	2377,56 $\pm$ 189,21
<b>dp/dt min (mmHg/s)</b>	-1411,19 $\pm$ 133,2	-988,73 $\pm$ 87,01	-1460,59 $\pm$ 104,15
<b>SLVP (mmHg)</b>	56,01 $\pm$ 5,38	45,86 $\pm$ 4,44	59,79 $\pm$ 4,78
<b>DLVP (mmHg)</b>	1,03 $\pm$ 0,33	1,23 $\pm$ 0,3	1,16 $\pm$ 0,39
<b>HR (bpm)</b>	308,24 $\pm$ 6,82	234,21 $\pm$ 8,32	282,91 $\pm$ 4,67
<b>CF (ml/min)</b>	9,51 $\pm$ 0,67	8,26 $\pm$ 0,69	9,63 $\pm$ 0,61

Табела 4.14Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control - C*), током примене мемантин хидрохлорида (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect - E*) и након периода опоравка (*Wash-out - W*).

Параметар	C vs E	E vs W	C vs W
<b>dp/dt max (mmHg/s)</b>	-36,78%; <b>p&lt;0,05</b>	+69,67%; <b>p&lt;0,05</b>	+7,26%; p>0,05
<b>dp/dt min (mmHg/s)</b>	-29,94%; <b>p&lt;0,05</b>	+47,72%; <b>p&lt;0,05</b>	+3,5%; p>0,05
<b>SLVP (mmHg)</b>	-18,13%; <b>p&lt;0,05</b>	+30,37%; <b>p&lt;0,05</b>	+6,73%; p>0,05
<b>DLVP (mmHg)</b>	+19,44%; p>0,05	-5,81%; p>0,05	+12,5%; p>0,05
<b>HR (bpm)</b>	-24,02%; <b>p&lt;0,05</b>	+20,79%; <b>p&lt;0,05</b>	-8,22%; <b>p&lt;0,05</b>
<b>CF (ml/min)</b>	-13,21%; <b>p&lt;0,05</b>	+16,61%; <b>p&lt;0,05</b>	+1,2%; p>0,05

**График 4.14.** Ефекти мемантин хидрохлорида (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на кардиодинамске параметре и коронарни проток ( $X \pm \text{SE}$ ) у контролном периоду (*Control*), током примене супстанце (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).





#### 4.1.15. ДЕЈСТВО ИФЕНПРОДИЛ ТАРТАРАТА (1 $\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти примене ифенпродил тартарата у концентрацији од 1  $\mu\text{mol/l}$  на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су на Табелама 4.15А и 4.15Б и Графику 4.15.

Примена ифенпродил тартарата изазвала је статистички значајно смањење вредности фреквенције срца (HR) и коронарног протока (CF). Након периода опоравка (*Wash-out*) наведени параметри су се статистички значајно повећали, и достигли су вредности приближне почетним вредностима. Током периода опоравка вредност максималне стопе промене притиска у левој комори ( $dp/dt \text{ max}$ ) се статистички значајно повећала, тако да је вредност била статистички значајно већа у односу на контролне вредности и вредности током апликације супстанце. Остали параметри се нису статистички значајно мењали.

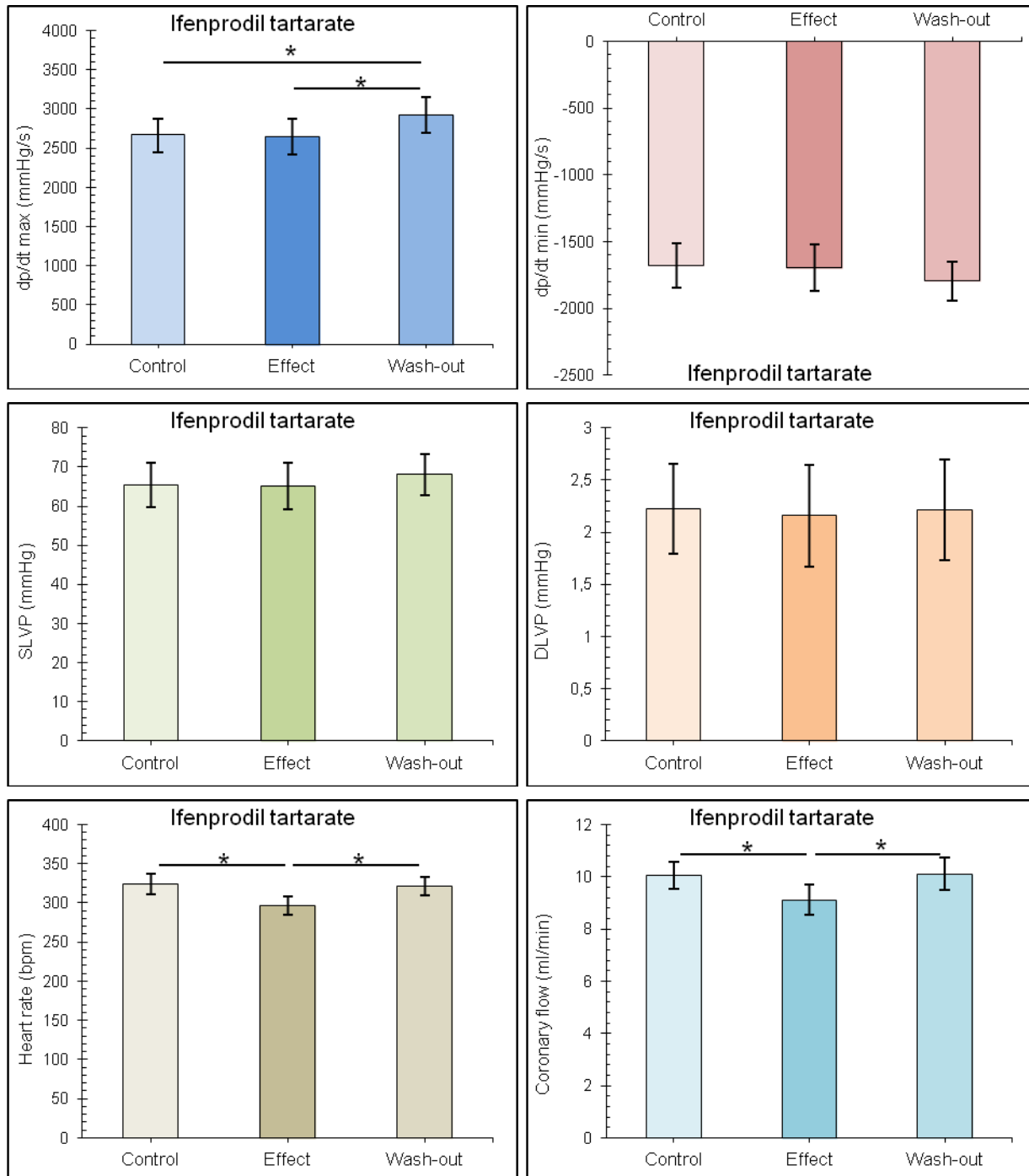
Табела 4.15А. Вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control* - C), током примене ифенпродил тартарата (1  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - E) и након периода опоравка (*Wash-out* - W).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SE)	Ифенпродил тартарат (X $\pm$ SE)	Опоравак (X $\pm$ SE)
<b>dp/dt max (mmHg/s)</b>	2678,81 $\pm$ 198,68	2653,24 $\pm$ 219,66	2926,76 $\pm$ 227,4
<b>dp/dt min (mmHg/s)</b>	-1680,96 $\pm$ 166,36	-1693,83 $\pm$ 173,59	-1794,44 $\pm$ 147,39
<b>SLVP (mmHg)</b>	65,37 $\pm$ 5,67	65,16 $\pm$ 5,91	68,07 $\pm$ 5,35
<b>DLVP (mmHg)</b>	2,23 $\pm$ 0,43	2,16 $\pm$ 0,48	2,21 $\pm$ 0,48
<b>HR (bpm)</b>	323,51 $\pm$ 13,04	296,79 $\pm$ 11,97	321,01 $\pm$ 11,85
<b>CF (ml/min)</b>	10,06 $\pm$ 0,52	9,11 $\pm$ 0,59	10,11 $\pm$ 0,52

Табела 4.15Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (*Control* - C), током примене ифенпродил тартарата (1  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - E) и након периода опоравка (*Wash-out* - W).

Параметар	C vs E	E vs W	C vs W
<b>dp/dt max (mmHg/s)</b>	-0,96%; p>0,05	+10,31%; p<0,05	+9,26%; p<0,05
<b>dp/dt min (mmHg/s)</b>	+0,77%; p>0,05	+5,94%; p>0,05	+6,75%; p>0,05
<b>SLVP (mmHg)</b>	-0,33%; p>0,05	+4,47%; p>0,05	+4,13%; p>0,05
<b>DLVP (mmHg)</b>	-3,21%; p>0,05	+2,65%; p>0,05	-0,64%; p>0,05
<b>HR (bpm)</b>	-8,26%; p<0,05	+8,16%; p<0,05	-0,77%; p>0,05
<b>CF (ml/min)</b>	-9,38%; p<0,05	+10,97%; p<0,05	+0,57%; p>0,05

**График 4.15.** Ефекти ифенпродил тартарата (1  $\mu\text{mol/l}$ ) на кардиодинамске параметре и коронарни проток ( $X \pm \text{SE}$ ) у контролном периоду (*Control*), током примене супстанце (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).



## 4.2. ЕФЕКТИ МОДУЛАЦИЈЕ NMDA РЕЦЕПТОРА НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

### 4.2.1. ДЕЈСТВО ГЛУТАМАТА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти примене глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на параметре оксидационог стреса су приказани на Табелама 4.16А и 4.16Б и Графику 4.16.

Примена глутамата није изазвала статистички значајне промене вредности испитиваних параметара оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту.

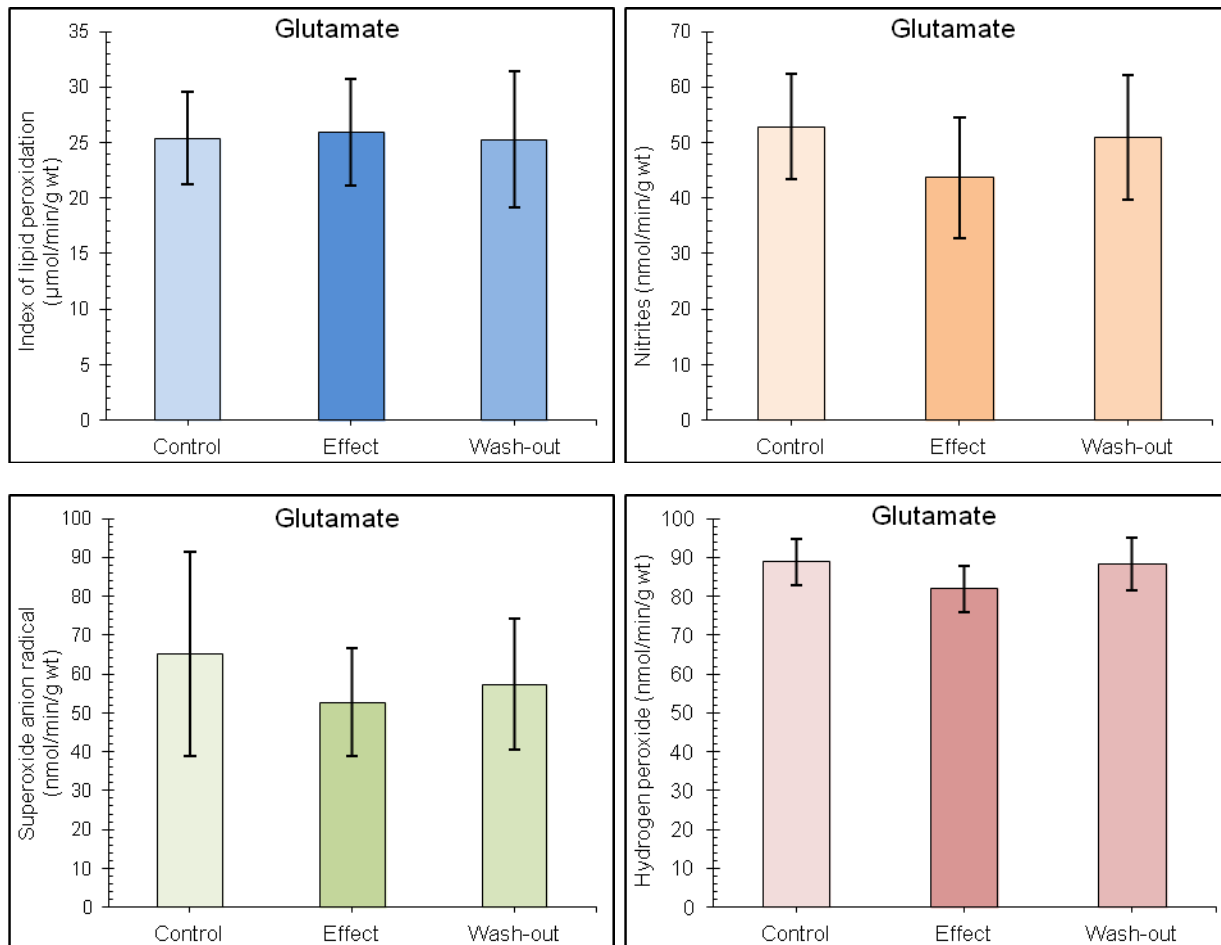
Табела 4.16А. Вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - **C**), током примене глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - **E**) и након периода опоравка (*Wash-out* - **W**).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SE)	Глутамат (X $\pm$ SE)	Опоравак (X $\pm$ SE)
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	25,39 $\pm$ 4,2	25,95 $\pm$ 4,8	25,27 $\pm$ 6,1
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	52,82 $\pm$ 9,48	43,68 $\pm$ 10,83	50,99 $\pm$ 11,2
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	65,15 $\pm$ 26,32	52,62 $\pm$ 13,86	57,35 $\pm$ 16,96
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	88,81 $\pm$ 6,08	81,87 $\pm$ 6	88,28 $\pm$ 6,85

Табела 4.16Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - **C**), током примене глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - **E**) и након периода опоравка (*Wash-out* - **W**).

Параметар	<b>C vs E</b>	<b>E vs W</b>	<b>C vs W</b>
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	+2,2%; p>0,05	-2,62%; p>0,05	-0,47%; p>0,05
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	-17,3%; p>0,05	+16,73%; p>0,05	-3,46%; p>0,05
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	-19,24%; p>0,05	+9%; p>0,05	-11,97%; p>0,05
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	-7,82%; p>0,05	+7,84%; p>0,05	-0,59%; p>0,05

**График 4.16.** Ефекти глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на вредности параметара оксидационог стреса ( $X \pm SE$ ) у коронарном венском ефлуенту у контролном периоду (*Control*), током примене супстанце (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).



#### 4.2.2. ДЕЈСТВО ГЛИЦИНА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти примене глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на параметре оксидационог стреса су приказани на Табелама 4.17А и 4.17Б и Графику 4.17.

Примена глицина није изазвала статистички значајне промене вредности испитиваних параметара оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту.

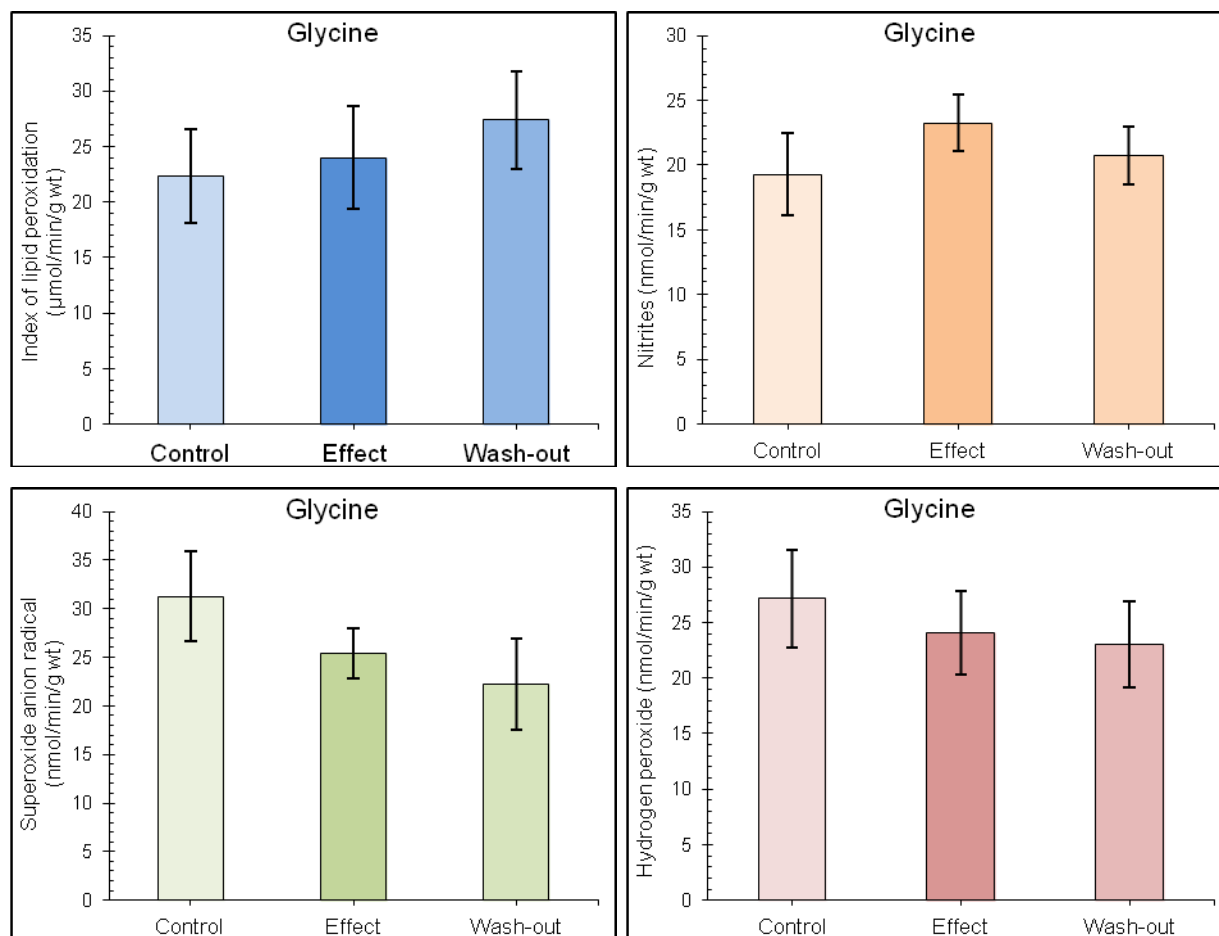
Табела 4.17А. Вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - **C**), током примене глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - **E**) и након периода опоравка (*Wash-out* - **W**).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SE)	Глицин (X $\pm$ SE)	Опоравак (X $\pm$ SE)
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	22,38 $\pm$ 4,23	23,97 $\pm$ 4,64	27,38 $\pm$ 4,38
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	19,29 $\pm$ 3,14	23,22 $\pm$ 2,17	20,77 $\pm$ 2,25
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	31,27 $\pm$ 4,61	25,38 $\pm$ 2,53	22,21 $\pm$ 4,64
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	27,18 $\pm$ 4,4	24,08 $\pm$ 3,81	23,02 $\pm$ 3,92

Табела 4.17Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - **C**), током примене глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - **E**) и након периода опоравка (*Wash-out* - **W**).

Параметар	<b>C vs E</b>	<b>E vs W</b>	<b>C vs W</b>
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	+7,12%; p>0,05	+14,22%; p>0,05	+22,36%; p>0,05
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	+20,42%; p>0,05	-10,59%; p>0,05	+7,67%; p>0,05
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	-18,83%; p>0,05	-12,47%; p>0,05	-28,95%; p>0,05
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	-11,4%; p>0,05	-4,4%; p>0,05	-15,29%; p>0,05

**График 4.17.** Ефекти глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на вредности параметара оксидационог стреса ( $X \pm SE$ ) у коронарном венском ефлуенту у контролном периоду (*Control*), током примене супстанце (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).



### 4.2.3. ДЕЈСТВО КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ ГЛУТАМАТА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) И ГЛИЦИНА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти примене глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на параметре оксидационог стреса су приказани на Табелама 4.18А и 4.18Б и Графику 4.18.

Истовремена примена глутамата и глицина је изазвала статистички значајно повећање вредности нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ), супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ ) и водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Након периода опоравка (*Wash-out*) наведени параметри су се статистички значајно смањили на вредности које се нису статистички значајно разликовале од почетних. Вредности индекса липидне пероксидације (TBARS) се нису статистички значајно мењале.

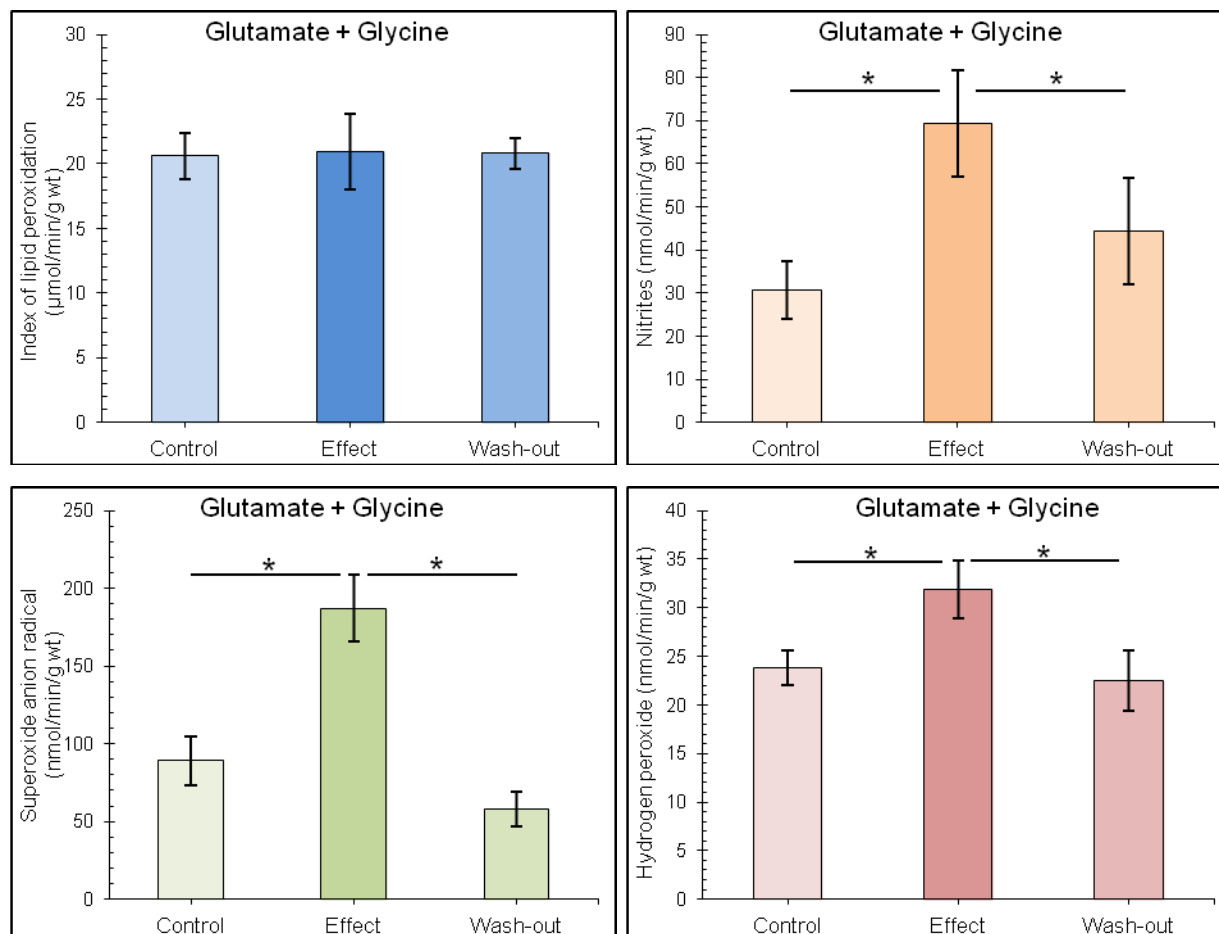
Табела 4.18А. Вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control - C*), током примене глутамата и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect - E*) и након периода опоравка (*Wash-out - W*).

Параметар	Контрола ( $X \pm SE$ )	Глутамат и глицин ( $X \pm SE$ )	Опоравак ( $X \pm SE$ )
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	20,62 $\pm$ 1,8	20,92 $\pm$ 2,9	20,82 $\pm$ 1,2
<b><math>\text{NO}_2^-</math></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	30,69 $\pm$ 6,64	69,42 $\pm$ 12,31	44,32 $\pm$ 12,35
<b><math>\text{O}_2^-</math></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	89,17 $\pm$ 15,65	187,22 $\pm$ 21,74	57,77 $\pm$ 11,12
<b><math>\text{H}_2\text{O}_2</math></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	23,86 $\pm$ 1,77	31,87 $\pm$ 2,97	22,5 $\pm$ 3,13

Табела 4.18Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control - C*), током примене глутамата и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect - E*) и након периода опоравка (*Wash-out - W*).

Параметар	C vs E	E vs W	C vs W
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	+1,45%; $p > 0,05$	-0,48%; $p > 0,05$	0,97%; $p > 0,05$
<b><math>\text{NO}_2^-</math></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	+126,24%; $p < 0,05$	-36,16%; $p < 0,05$	+44,44%; $p > 0,05$
<b><math>\text{O}_2^-</math></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	+109,96%; $p < 0,05$	-69,14%; $p < 0,05$	-35,21%; $p > 0,05$
<b><math>\text{H}_2\text{O}_2</math></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	+33,58%; $p < 0,05$	-29,41%; $p < 0,05$	-5,7%; $p > 0,05$

**График 4.18.** Ефекти комбиноване примене глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на вредности параметара оксидационог стреса ( $X \pm \text{SE}$ ) у коронарном венском ефлуенту у контролном периоду (*Control*), током примене супстанци (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).





#### 4.2.4. ДЕЈСТВО МК-801 (50 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ) на параметре оксидационог стреса су приказани на Табелама 4.19А и 4.19Б и Графику 4.19.

Примена МК-801 је изазвала статистички значајно смањење индекса липидне пероксидације (TBARS). Након периода опоравка (*Wash-out*) вредности индекса липидне пероксидације (TBARS) су се статистички значајно смањиле, тако да постоји статистички значајна разлика између почетних вредности и вредности након периода опоравка. Вредности осталих параметара оксидационог стреса се нису статистички значајно мењали.

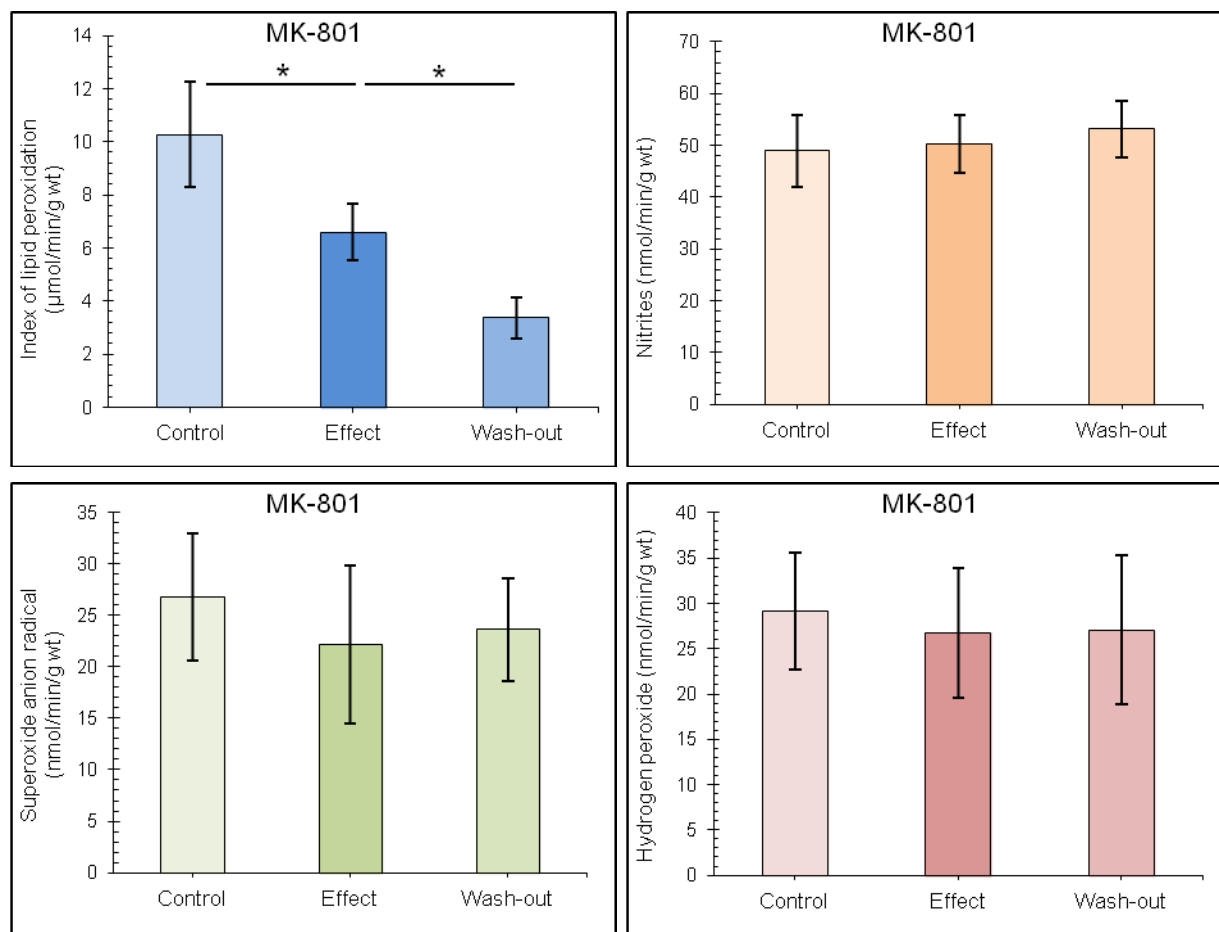
Табела 4.19А. Вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - **C**), током примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - **E**) и након периода опоравка (*Wash-out* - **W**).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SE)	МК-801 (X $\pm$ SE)	Опоравак (X $\pm$ SE)
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	10,26 $\pm$ 1,98	6,59 $\pm$ 1,05	3,36 $\pm$ 0,78
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	48,96 $\pm$ 6,98	50,26 $\pm$ 5,59	53,13 $\pm$ 5,37
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	26,85 $\pm$ 6,18	22,14 $\pm$ 7,69	23,64 $\pm$ 5,02
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	29,13 $\pm$ 6,46	26,71 $\pm$ 7,18	27,09 $\pm$ 8,25

Табела 4.19Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - **C**), током примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - **E**) и након периода опоравка (*Wash-out* - **W**).

Параметар	<b>C vs E</b>	<b>E vs W</b>	<b>C vs W</b>
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	-35,77%; <b>p&lt;0,05</b>	-49,01%; <b>p&lt;0,05</b>	-67,25%; <b>p&lt;0,05</b>
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	+2,66%; <b>p&gt;0,05</b>	+5,71%; <b>p&gt;0,05</b>	+8,52%; <b>p&gt;0,05</b>
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	-17,54%; <b>p&gt;0,05</b>	+6,78%; <b>p&gt;0,05</b>	-11,96%; <b>p&gt;0,05</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	-8,31%; <b>p&gt;0,05</b>	+1,42%; <b>p&gt;0,05</b>	-7%; <b>p&gt;0,05</b>

**График 4.19.** Ефекти МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ) на вредности параметара оксидационог стреса ( $X \pm \text{SE}$ ) у коронарном венском ефлуенту у контролном периоду (*Control*), током примене супстанце (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).



#### 4.2.5. ДЕЈСТВО КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ МК-801 (50 $\mu\text{mol/l}$ ) И ГЛУТАМАТА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти примене МК-801 (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на параметре оксидационог стреса су приказани на Табелама 4.20А и 4.20Б и Графику 4.20.

Истовремена примена МК-801 и глутамата је изазвала статистички значајно смањење вредности индекса липидне пероксидације (TBARS) и нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ). Након периода опоравка (*Wash-out*) наведени параметри су се статистички значајно повећали до вредности које се нису статистички значајно разликовале од почетних. Вредности супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ ) и водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) се нису статистички значајно мењале.

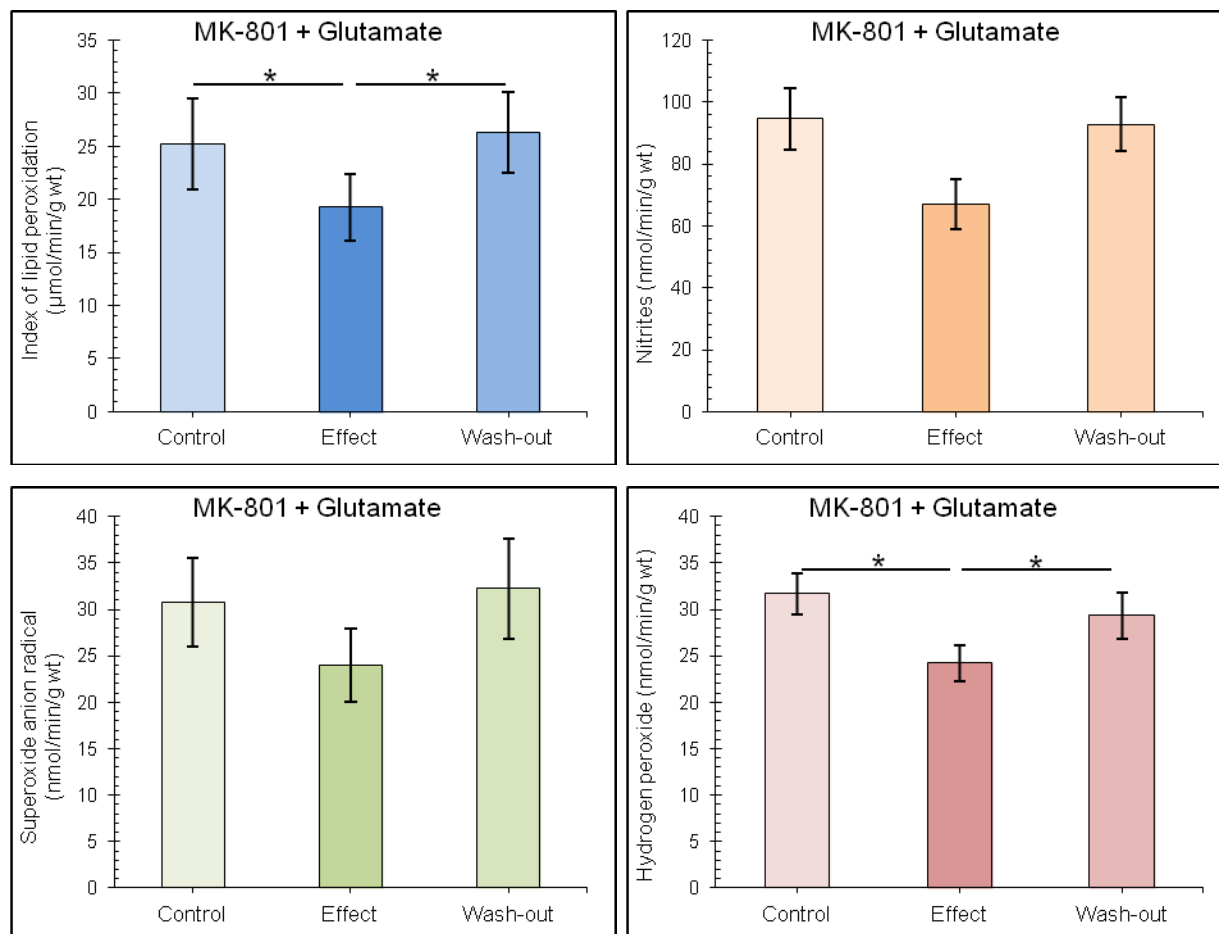
Табела 4.20А. Вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - **C**), током примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ) и глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - **E**) и након периода опоравка (*Wash-out* - **W**).

Параметар	Контрола ( $\text{X} \pm \text{SE}$ )	МК-801 и глутамат ( $\text{X} \pm \text{SE}$ )	Опоравак ( $\text{X} \pm \text{SE}$ )
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	25,21 $\pm$ 4,33	19,25 $\pm$ 3,19	26,3 $\pm$ 3,75
<b><math>\text{NO}_2^-</math></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	94,66 $\pm$ 9,95	66,98 $\pm$ 8,09	92,8 $\pm$ 8,73
<b><math>\text{O}_2^-</math></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	30,77 $\pm$ 4,77	24,01 $\pm$ 3,95	32,22 $\pm$ 5,37
<b><math>\text{H}_2\text{O}_2</math></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	31,68 $\pm$ 2,23	24,26 $\pm$ 1,93	29,34 $\pm$ 2,45

Табела 4.20Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - **C**), током примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ) и глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - **E**) и након периода опоравка (*Wash-out* - **W**).

Параметар	<b>C vs E</b>	<b>E vs W</b>	<b>C vs W</b>
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	-23,65%; <b>p&lt;0,05</b>	+36,66%; <b>p&lt;0,05</b>	+4,34%; p>0,05
<b><math>\text{NO}_2^-</math></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	-29,24%; p>0,05	+38,55%; p>0,05	-1,97%; p>0,05
<b><math>\text{O}_2^-</math></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	-21,95%; p>0,05	+34,18%; p>0,05	+4,72%; p>0,05
<b><math>\text{H}_2\text{O}_2</math></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	-23,43%; <b>p&lt;0,05</b>	+20,96%; <b>p&lt;0,05</b>	-7,38%; p>0,05

**График 4.20.** Ефекти комбиноване примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ) и глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на вредности параметара оксидационог стреса ( $X \pm \text{SE}$ ) у коронарном венском ефлуенту у контролном периоду (*Control*), током примене супстанци (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).



#### 4.2.6. ДЕЈСТВО КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ МК-801 (50 $\mu\text{mol/l}$ ) И ГЛИЦИНА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на параметре оксидационог стреса су приказани на Табелама 4.21А и 4.21Б и Графику 4.21.

Истовремена примена МК-801 и глицина је изазвала статистички значајно смањење вредности нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ). Након периода опоравка (*Wash-out*) вредности наведеног параметра су се статистички значајно повећале до вредности које се нису статистички значајно разликовале од почетних. Вредности индекса липидне пероксидације (TBARS), супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ ) и водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) се нису статистички значајно мењале.

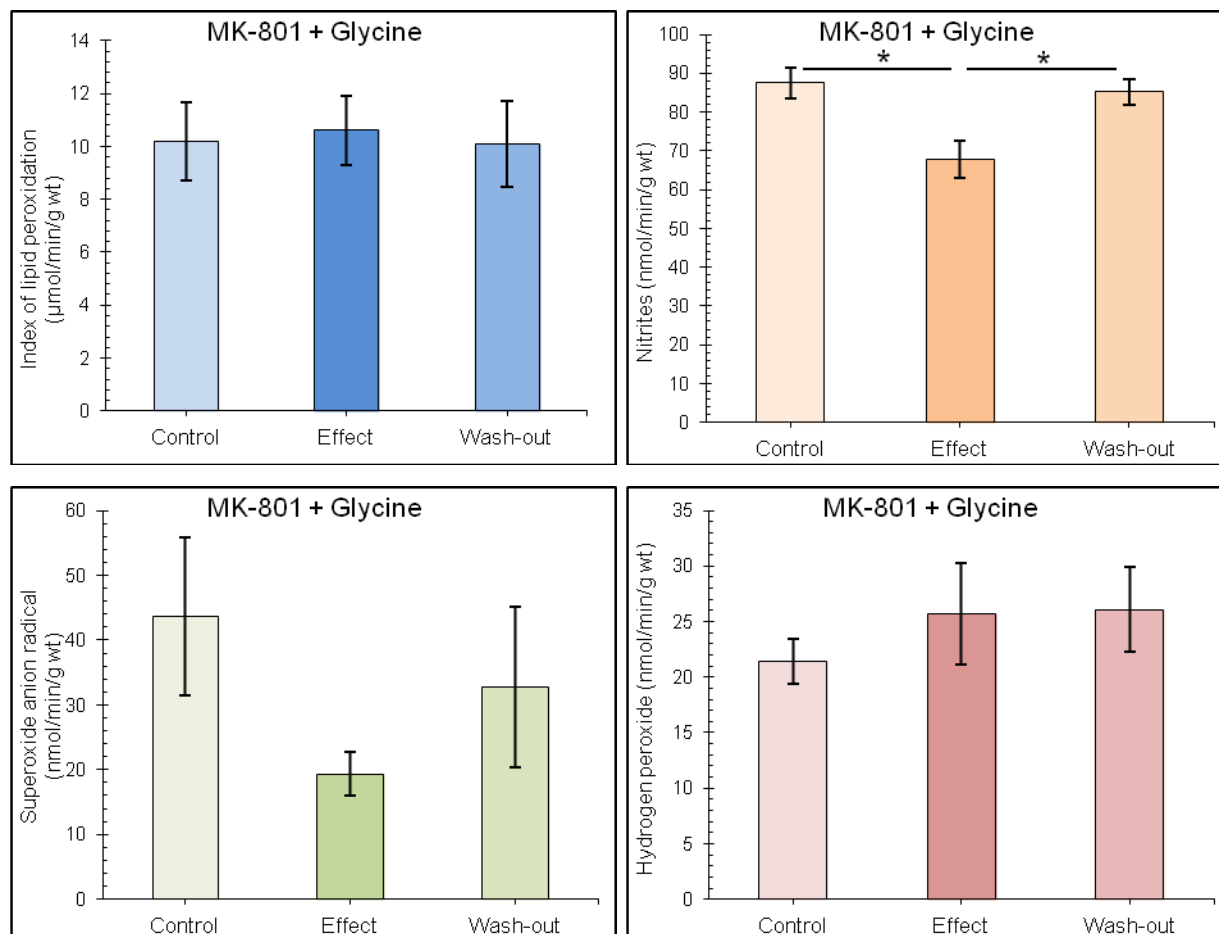
Табела 4.21А. Вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - **C**), током примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - **E**) и након периода опоравка (*Wash-out* - **W**).

Параметар	Контрола ( $X \pm SE$ )	МК-801 и глицин ( $X \pm SE$ )	Опоравак ( $X \pm SE$ )
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	10,18 $\pm$ 1,46	10,6 $\pm$ 1,3	10,1 $\pm$ 1,64
<b><math>\text{NO}_2^-</math></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	87,51 $\pm$ 4,03	67,75 $\pm$ 4,9	85,15 $\pm$ 3,44
<b><math>\text{O}_2^-</math></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	43,69 $\pm$ 12,17	19,35 $\pm$ 3,37	32,79 $\pm$ 12,43
<b><math>\text{H}_2\text{O}_2</math></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	21,42 $\pm$ 2	25,69 $\pm$ 4,6	26,07 $\pm$ 3,81

Табела 4.21Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - **C**), током примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - **E**) и након периода опоравка (*Wash-out* - **W**).

Параметар	<b>C vs E</b>	<b>E vs W</b>	<b>C vs W</b>
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	+4,1%; $p > 0,05$	-4,76%; $p > 0,05$	-0,86%; $p > 0,05$
<b><math>\text{NO}_2^-</math></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	-22,58%; <b><math>p &lt; 0,05</math></b>	+26,68%; <b><math>p &lt; 0,05</math></b>	-2,7%; $p > 0,05$
<b><math>\text{O}_2^-</math></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	-55,72%; $p > 0,05$	+69,49%; $p > 0,05$	-24,96%; $p > 0,05$
<b><math>\text{H}_2\text{O}_2</math></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	+19,93%; $p > 0,05$	+1,47%; $p > 0,05$	+21,69%; $p > 0,05$

**График 4.21.** Ефекти комбиноване примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на вредности параметара оксидационог стреса ( $X \pm SE$ ) у коронарном венском ефлуенту у контролном периоду (*Control*), током примене супстанци (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).



#### 4.2.7. ДЕЈСТВО КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ МК-801 (50 $\mu\text{mol/l}$ ), ГЛУТАМАТА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) И ГЛИЦИНА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ), глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на параметре оксидационог стреса су приказани на Табелама 4.22А и 4.22Б и Графику 4.22.

Истовремена примена МК-801, глутамата и глицина је изазвала статистички значајно смањење вредности нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) и статистички значајно повећање супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ ). Након периода опоравка (*Wash-out*) наведени параметри су се статистички значајно променили и вратили до вредности које се нису статистички значајно разликовале од почетних, а вредности индекса липидне пероксидације (TBARS) су се статистички значајно повећале. Вредности водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) се нису статистички значајно мењале.

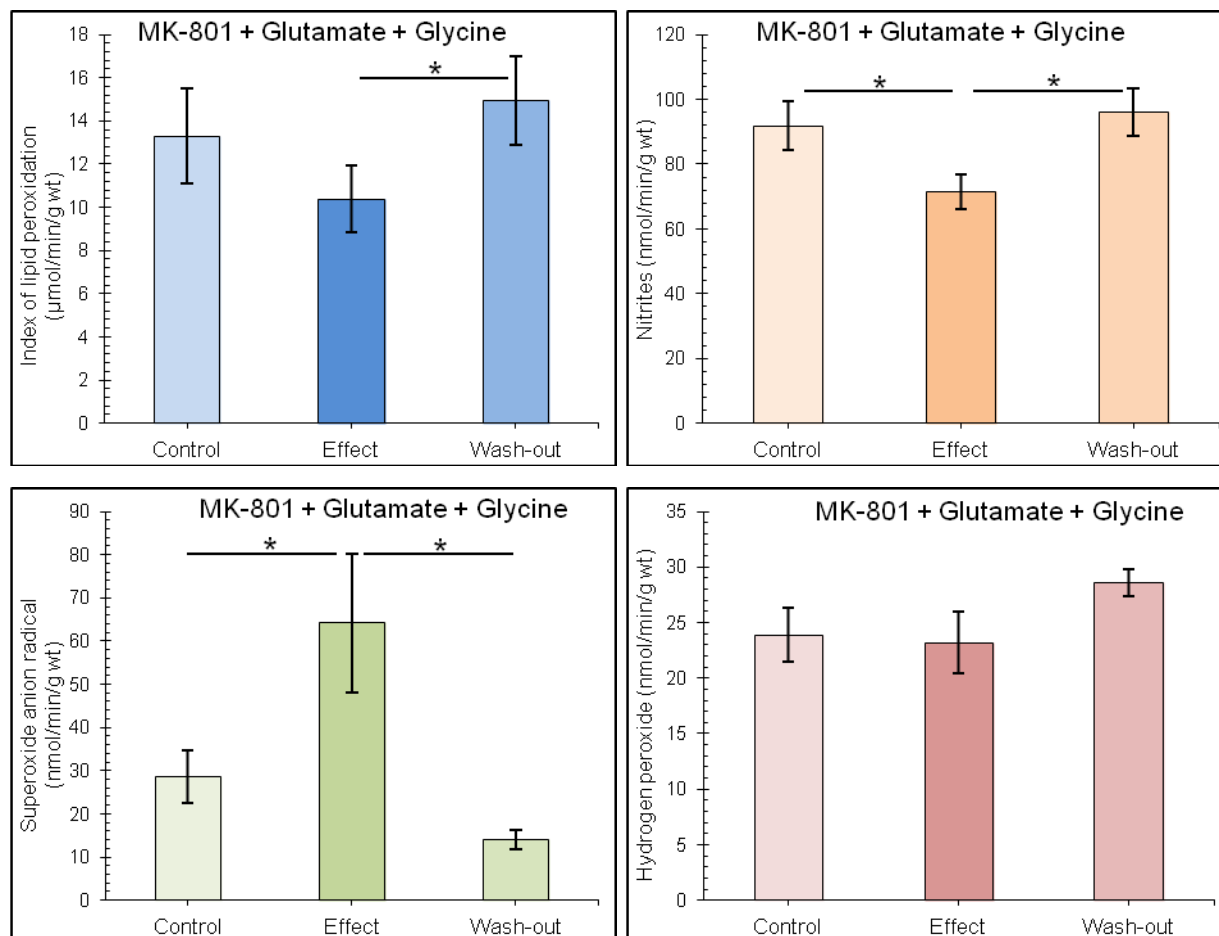
Табела 4.22А. Вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - C), током примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ), глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - E) и након периода опоравка (*Wash-out* - W).

Параметар	Контрола ( $X \pm SE$ )	МК-801, глутамат и глицин ( $X \pm SE$ )	Опоравак ( $X \pm SE$ )
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	13,3 $\pm$ 2,21	10,38 $\pm$ 1,56	14,94 $\pm$ 2,05
<b><math>\text{NO}_2^-</math></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	91,82 $\pm$ 7,61	71,5 $\pm$ 5,45	95,85 $\pm$ 7,34
<b><math>\text{O}_2^-</math></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	28,63 $\pm$ 6,17	64,16 $\pm$ 16,14	13,99 $\pm$ 2,15
<b><math>\text{H}_2\text{O}_2</math></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	23,87 $\pm$ 2,4	23,21 $\pm$ 2,78	28,87 $\pm$ 2,4

Табела 4.22Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - C), током примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ), глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - E) и након периода опоравка (*Wash-out* - W).

Параметар	C vs E	E vs W	C vs W
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	-21,92%; $p > 0,05$	+43,91%; $p < 0,05$	+12,37%; $p > 0,05$
<b><math>\text{NO}_2^-</math></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	-22,13%; $p < 0,05$	+34,07%; $p < 0,05$	+4,4%; $p > 0,05$
<b><math>\text{O}_2^-</math></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	+124,11%; $p < 0,05$	-78,19%; $p < 0,05$	-51,13%; $p > 0,05$
<b><math>\text{H}_2\text{O}_2</math></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	-2,78%; $p > 0,05$	+23,13%; $p > 0,05$	+19,71%; $p > 0,05$

**График 4.22.** Ефекти комбиноване примене МК-801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ), глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на вредности параметара оксидационог стреса ( $X \pm SE$ ) у коронарном венском ефлуенту у контролном периоду (*Control*), током примене супстанци (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).





#### 4.2.8. ДЕЈСТВО ВЕРАПАМИЛА (3 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ) на параметре оксидационог стреса су приказани на Табелама 4.23А и 4.23Б и Графику 4.23.

Примена верапамила није изазвала статистички значајне промене вредности испитиваних параметара оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту.

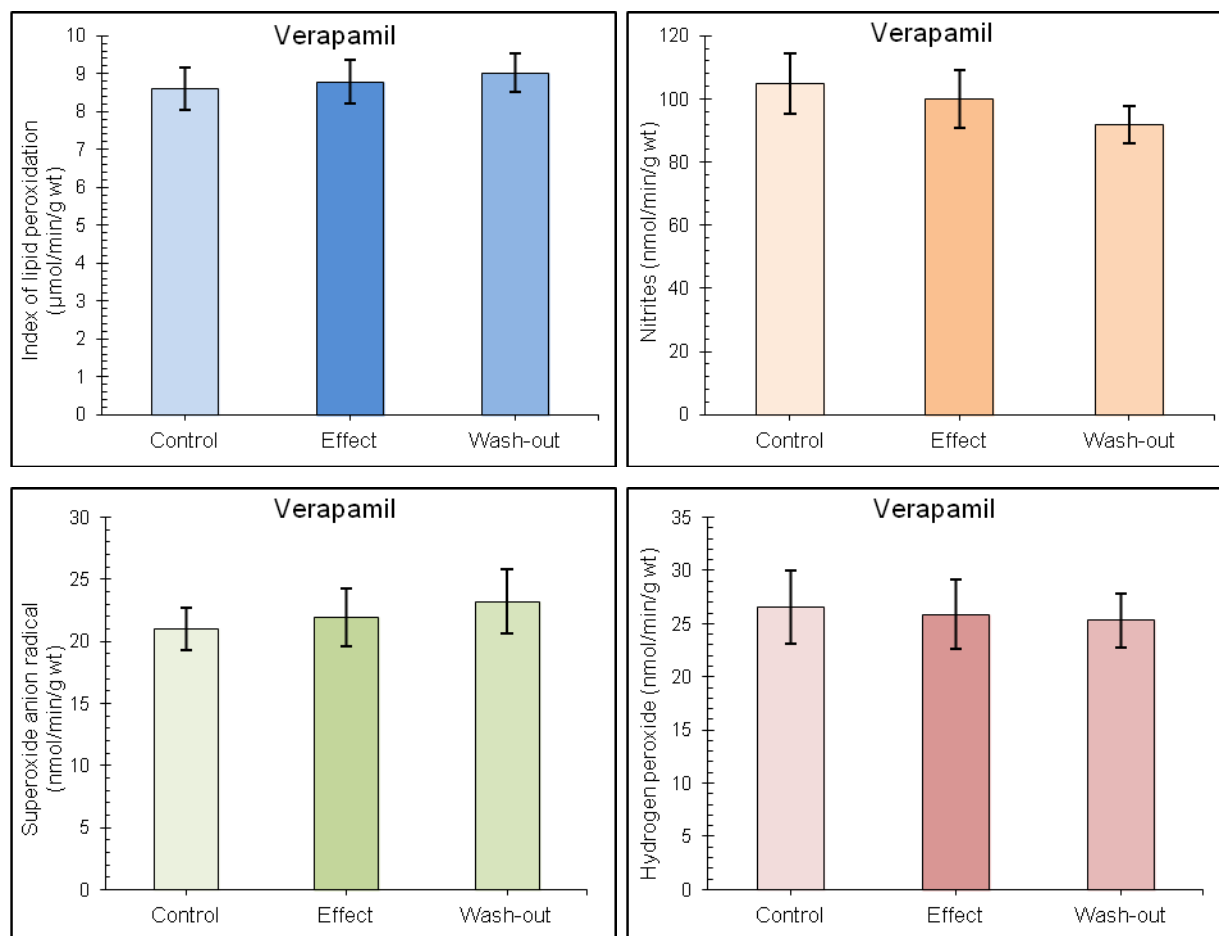
Табела 4.23А. Вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - **C**), током примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - **E**) и након периода опоравка (*Wash-out* - **W**).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SE)	Верапамил (X $\pm$ SE)	Опоравак (X $\pm$ SE)
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	8,6 $\pm$ 0,57	8,78 $\pm$ 0,58	9,02 $\pm$ 0,5
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	104,69 $\pm$ 9,51	99,83 $\pm$ 9,14	91,8 $\pm$ 6,08
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	21,01 $\pm$ 1,72	21,91 $\pm$ 2,32	23,18 $\pm$ 2,58
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	26,52 $\pm$ 3,45	25,88 $\pm$ 3,25	25,28 $\pm$ 2,56

Табела 4.23Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - **C**), током примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - **E**) и након периода опоравка (*Wash-out* - **W**).

Параметар	<b>C vs E</b>	<b>E vs W</b>	<b>C vs W</b>
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	+2,12%; p>0,05	+2,73%; p>0,05	+4,91%; p>0,05
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	-4,64%; p>0,05	-8,04%; p>0,05	-12,31%; p>0,05
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	+4,26%; p>0,05	+5,78%; p>0,05	+10,29%; p>0,05
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	-2,39%; p>0,05	-2,32%; p>0,05	-4,65%; p>0,05

**График 4.23.** Ефекти примене верапамила ( $3 \mu\text{mol/l}$ ) на вредности параметара оксидационог стреса ( $X \pm \text{SE}$ ) у коронарном венском ефлуенту у контролном периоду (*Control*), током примене супстанце (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).



#### 4.2.9. ДЕЈСТВО КОМБИНОВАНЕ ВЕРАПАМИЛА (3 $\mu\text{mol/l}$ ) И ГЛУТАМАТА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ) и глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на параметре оксидационог стреса су приказани на Табелама 4.24А и 4.24Б и Графику 4.24.

Истовремена примена верапамила и глутамата није изазвала статистички значајне промене испитиваних параметара оксидационог стреса. Након периода опоравка (*Wash-out*) вредности индекса липидне пероксидације (TBARS), нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) и водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) су се статистички значајно смањиле. Вредности супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ ) се нису статистички значајно мењале.

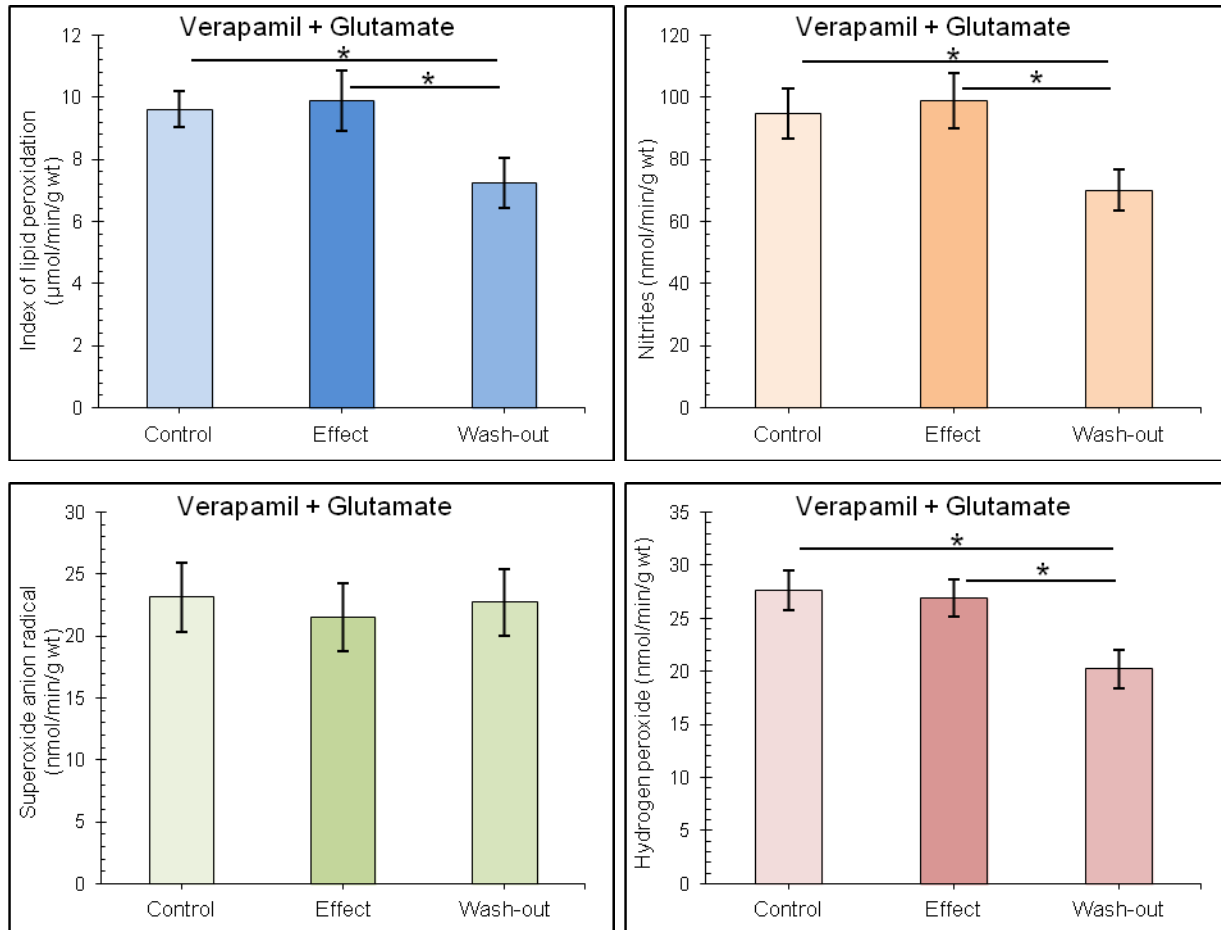
Табела 4.24А. Вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - C), током примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ) и глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - E) и након периода опоравка (*Wash-out* - W).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SE)	Верапамил и глутамат (X $\pm$ SE)	Опоравак (X $\pm$ SE)
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	9,6 $\pm$ 0,58	9,89 $\pm$ 0,95	7,24 $\pm$ 0,81
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	94,69 $\pm$ 7,96	99,04 $\pm$ 8,9	69,94 $\pm$ 6,64
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	23,13 $\pm$ 2,82	21,49 $\pm$ 2,74	22,71 $\pm$ 2,66
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	27,64 $\pm$ 1,91	26,94 $\pm$ 1,78	20,23 $\pm$ 1,78

Табела 4.24Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - C), током примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ) и глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - E) и након периода опоравка (*Wash-out* - W).

Параметар	C vs E	E vs W	C vs W
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	+3,02%; p>0,05	-26,75%; p<0,05	-24,54%; p<0,05
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	+4,6%; p>0,05	-29,39%; p<0,05	-26,14%; p<0,05
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	-7,11%; p>0,05	+5,7%; p>0,05	-1,82%; p>0,05
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	-2,54%; p>0,05	-24,89%; p<0,05	-26,8%; p<0,05

**График 4.24.** Ефекти комбиноване примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ) и глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на вредности параметара оксидационог стреса ( $X \pm \text{SE}$ ) у коронарном венском ефлуенту у контролном периоду (*Control*), током примене супстанце (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).



#### 4.2.10. ДЕЈСТВО КОМБИНОВАНЕ ВЕРАПАМИЛА (3 $\mu\text{mol/l}$ ) И ГЛИЦИНА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на параметре оксидационог стреса су приказани на Табелама 4.25А и 4.25Б и Графику 4.25.

Истовремена примена верапамила и глицина није изазвала статистички значајне промене испитиваних параметара оксидационог стреса. Након периода опоравка (*Wash-out*) вредности индекса липидне пероксидације (TBARS), нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) и водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) су се статистички значајно смањиле. Вредности супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ ) се нису статистички значајно мењале.

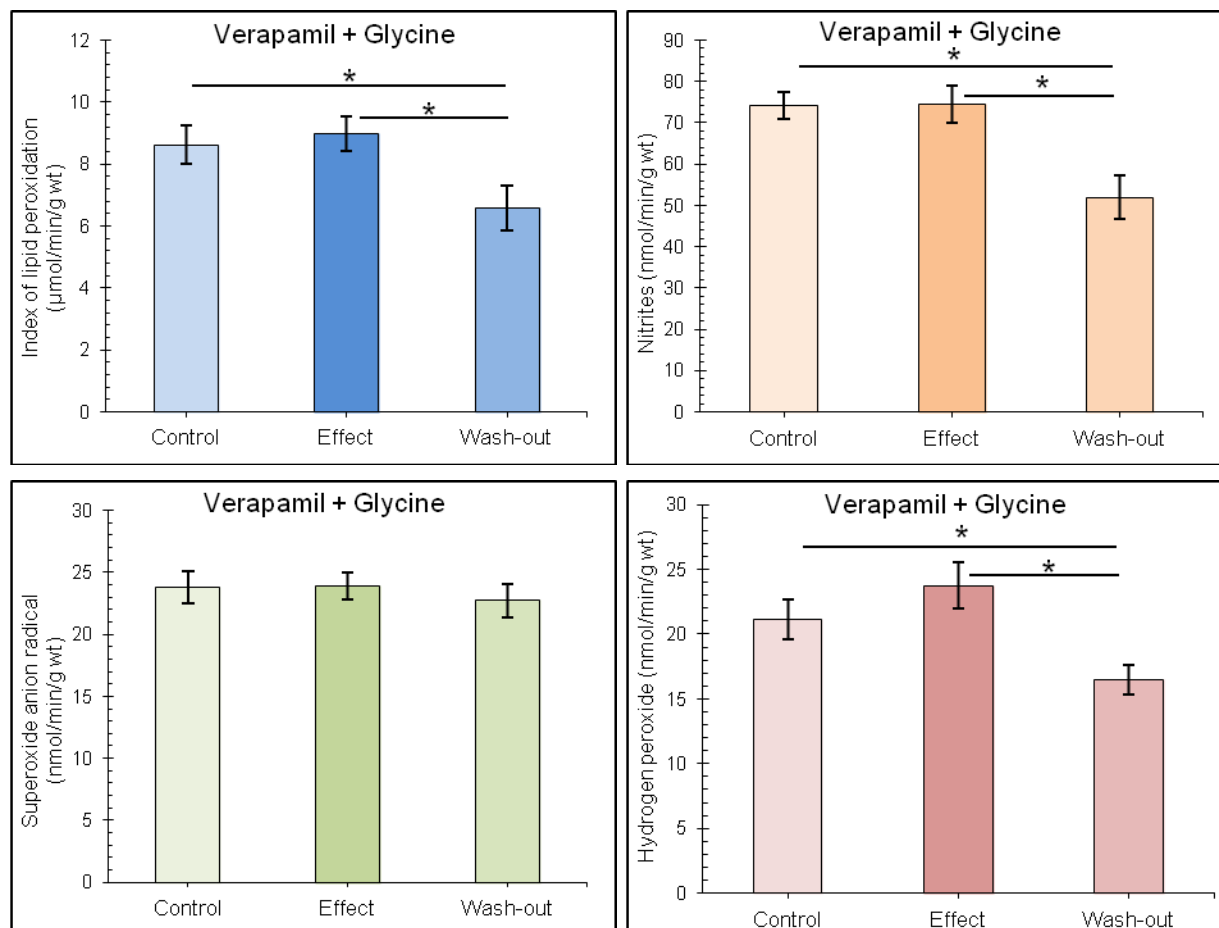
Табела 4.25А. Вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - C), током примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - E) и након периода опоравка (*Wash-out* - W).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SE)	Верапамил и глицин (X $\pm$ SE)	Опоравак (X $\pm$ SE)
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	8,62 $\pm$ 0,61	8,98 $\pm$ 0,54	6,58 $\pm$ 0,74
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	74,05 $\pm$ 3,21	74,6 $\pm$ 4,5	51,86 $\pm$ 5,25
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	23,77 $\pm$ 1,29	23,89 $\pm$ 1,05	22,72 $\pm$ 1,33
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	21,1 $\pm$ 1,53	23,73 $\pm$ 1,8	16,47 $\pm$ 1,18

Табела 4.25Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - C), током примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - E) и након периода опоравка (*Wash-out* - W).

Параметар	C vs E	E vs W	C vs W
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	+4,14%; p>0,05	-26,69%; p<0,05	-23,66%; p<0,05
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	+0,75%; p>0,05	-30,49%; p<0,05	-29,97%; p<0,05
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	+0,52%; p>0,05	-4,89%; p>0,05	-4,4%; p>0,05
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	+12,46%; p>0,05	-30,58%; p<0,05	-21,93%; p<0,05

**График 4.25.** Ефекти комбиноване примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на вредности параметара оксидационог стреса ( $X \pm \text{SE}$ ) у коронарном венском ефлуенту у контролном периоду (*Control*), током примене супстанце (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).



#### 4.2.11. ДЕЈСТВО КОМБИНОВАНЕ ВЕРАПАМИЛА (3 $\mu\text{mol/l}$ ), ГЛУТАМАТА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) И ГЛИЦИНА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ), глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на параметре оксидационог стреса приказани су на Табелама 4.26А и 4.26Б и Графику 4.26.

Истовремена примена верапамила, глутамата и глицина је изазвала статистички значајно повећање индекса липидне пероксидације (TBARS), нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) и водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Након периода опоравка (*Wash-out*) вредности наведених параметара су се статистички значајно смањиле, при чему су вредности индекса липидне пероксидације (TBARS) и нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) биле статистички значајно ниже од контролних. Вредности супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ ) се нису статистички значајно мењале.

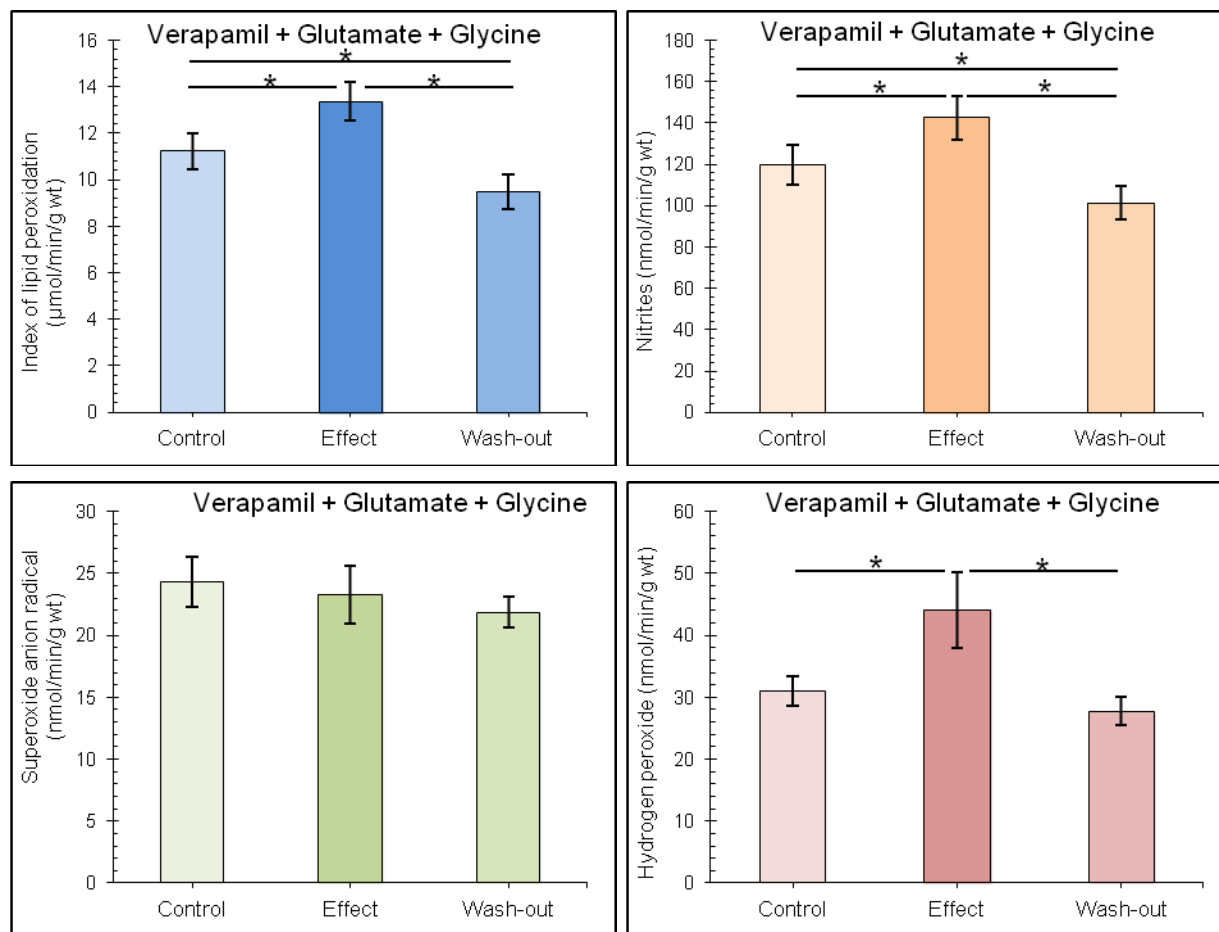
Табела 4.26А. Вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - C), током примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ), глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - E) и након периода опоравка (*Wash-out* - W).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SE)	Верапамил, глутамат и глицин (X $\pm$ SE)	Опоравак (X $\pm$ SE)
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	8,62 $\pm$ 0,61	8,98 $\pm$ 0,54	6,58 $\pm$ 0,74
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	119,85 $\pm$ 9,47	142,73 $\pm$ 10,57	101,32 $\pm$ 8,08
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	24,31 $\pm$ 2,06	23,25 $\pm$ 2,35	21,87 $\pm$ 1,23
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	31,09 $\pm$ 2,37	44,05 $\pm$ 6,08	27,76 $\pm$ 2,22

Табела 4.26Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - C), током примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ), глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - E) и након периода опоравка (*Wash-out* - W).

Параметар	C vs E	E vs W	C vs W
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	+19,07%; <b>p&lt;0,05</b>	-29,1%; <b>p&lt;0,05</b>	-15,58%; <b>p&lt;0,05</b>
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	+19,09%; <b>p&lt;0,05</b>	-29,01%; <b>p&lt;0,05</b>	-15,46%; <b>p&lt;0,05</b>
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	-4,35%; <b>p&gt;0,05</b>	-5,94%; <b>p&gt;0,05</b>	-10,03%; <b>p&gt;0,05</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	+41,68%; <b>p&lt;0,05</b>	-36,97%; <b>p&lt;0,05</b>	-10,7%; <b>p&gt;0,05</b>

**График 4.26.** Ефекти комбиноване примене верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ), глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на вредности параметара оксидационог стреса ( $X \pm \text{SE}$ ) у коронарном венском ефлуенту у контролном периоду (*Control*), током примене супстанце (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).





#### 4.2.12. ДЕЈСТВО *N*-МЕТИЛ-*D*-АСПАРТАТА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти *N*-метил-*D*-аспартата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на параметре оксидационог стреса су приказани на Табелама 4.27А и 4.27Б и Графику 4.27.

Примена *N*-метил-*D*-аспартата није изазвала статистички значајне промене вредности испитиваних параметара оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту.

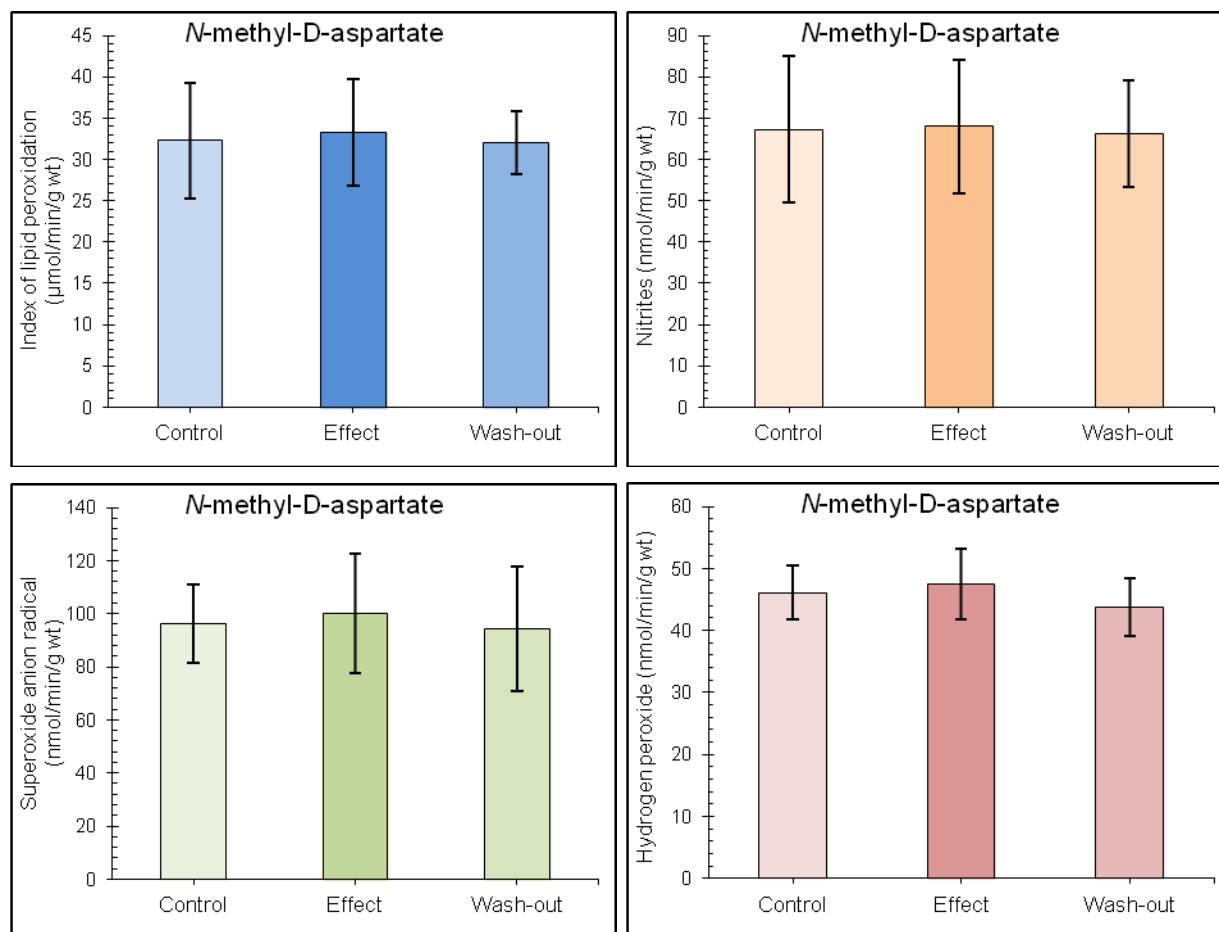
Табела 4.27А. Вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - *C*), током примене *N*-метил-*D*-аспартата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - *E*) и након периода опоравка (*Wash-out* - *W*).

Параметар	Контрола ( $X \pm SE$ )	<i>N</i> -метил- <i>D</i> -аспартат ( $X \pm SE$ )	Опоравак ( $X \pm SE$ )
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	32,29 $\pm$ 6,99	22,06 $\pm$ 6,5	12,19 $\pm$ 3,82
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	84,04 $\pm$ 17,74	68,01 $\pm$ 16,14	58 $\pm$ 12,93
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	110,98 $\pm$ 24,72	180,35 $\pm$ 32,66	161,61 $\pm$ 33,41
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	46,09 $\pm$ 4,3	47,53 $\pm$ 5,74	43,82 $\pm$ 4,69

Табела 4.27Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - *C*), током примене *N*-метил-*D*-аспартата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - *E*) и након периода опоравка (*Wash-out* - *W*).

Параметар	<i>C</i> vs <i>E</i>	<i>E</i> vs <i>W</i>	<i>C</i> vs <i>W</i>
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	+2,97%; $p > 0,05$	-3,82%; $p > 0,05$	-0,96%; $p > 0,05$
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	+1,18%; $p > 0,05$	-2,57%; $p > 0,05$	-1,43%; $p > 0,05$
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	+3,87%; $p > 0,05$	-5,96%; $p > 0,05$	-2,32%; $p > 0,05$
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	+3,12%; $p > 0,05$	-7,81%; $p > 0,05$	-4,93%; $p > 0,05$

**График 4.27.** Ефекти примене *N*-метил-*D*-аспартата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на вредности параметара оксидационог стреса ( $X \pm \text{SE}$ ) у коронарном венском ефлуенту у контролном периоду (*Control*), током примене супстанце (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).



#### 4.2.13. ДЕЈСТВО DL-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (DL Нсу TLHC) (10  $\mu\text{mol/l}$ ) на параметре оксидационог стреса су приказани на Табелама 4.28А и 4.28Б и Графику 4.28.

Примена DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (DL Нсу TLHC) није изазвала статистички значајне промене вредности мерених параметара оксидационог стреса.

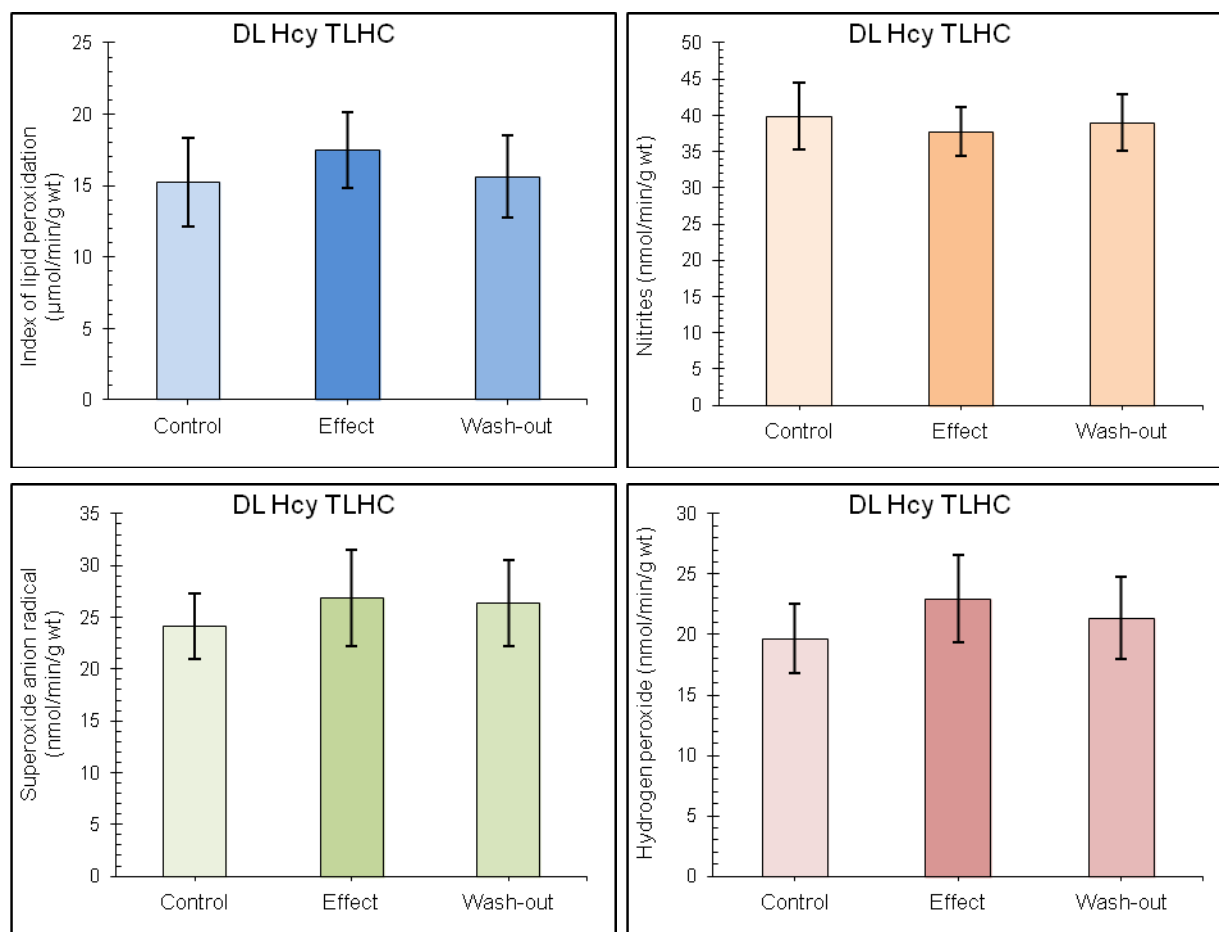
Табела 4.28А. Вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - C), током примене DL Нсу TLHC (10  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - E) и након периода опоравка (*Wash-out* - W).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SE)	DL Нсу TLHC (X $\pm$ SE)	Опоравак (X $\pm$ SE)
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	15,26 $\pm$ 3,12	17,48 $\pm$ 2,65	15,64 $\pm$ 2,89
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	39,86 $\pm$ 4,65	37,72 $\pm$ 3,36	38,96 $\pm$ 3,92
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	24,14 $\pm$ 3,15	26,91 $\pm$ 4,66	26,34 $\pm$ 4,17
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	19,66 $\pm$ 2,84	22,97 $\pm$ 3,64	21,38 $\pm$ 3,37

Табела 4.28Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - C), током примене DL Нсу TLHC (10  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - E) и након периода опоравка (*Wash-out* - W).

Параметар	C vs E	E vs W	C vs W
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	+14,55%; p>0,05	-10,53%; p>0,05	+2,49%; p>0,05
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	-5,37%; p>0,05	+3,29%; p>0,05	-2,26%; p>0,05
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	+11,47%; p>0,05	-2,12%; p>0,05	+9,11%; p>0,05
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	+16,84%; p>0,05	-6,92%; p>0,05	+8,75%; p>0,05

**График 4.28.** Ефекти примене DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (DL Hcy TLHC) ( $10 \mu\text{mol/l}$ ) на вредности параметара оксидационог стреса ( $X \pm SE$ ) у коронарном венском ефлуенту у контролном периоду (*Control*), током примене супстанце (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).



#### 4.2.14. ДЕЈСТВО МЕМАНТИН ХИДРОХЛОРИДА (100 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти мемантин хидрохлорида (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на параметре оксидационог стреса су приказани на Табелама 4.29А и 4.29Б и Графику 4.29.

Примена мемантин хидрохлорида је изазвала смањење вредности свих мерених параметара оксидационог стреса које није статистички значајно. Након периода опоравка (*Wash-out*) вредности индекса липидне пероксидације (TBARS) и водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) су се статистички значајно повећале, до вредности које су приближне почетним, док су вредности супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ ) додатно опале, тако да постоји статистички значајна разлика између почетних вредности и вредности након периода опоравка.

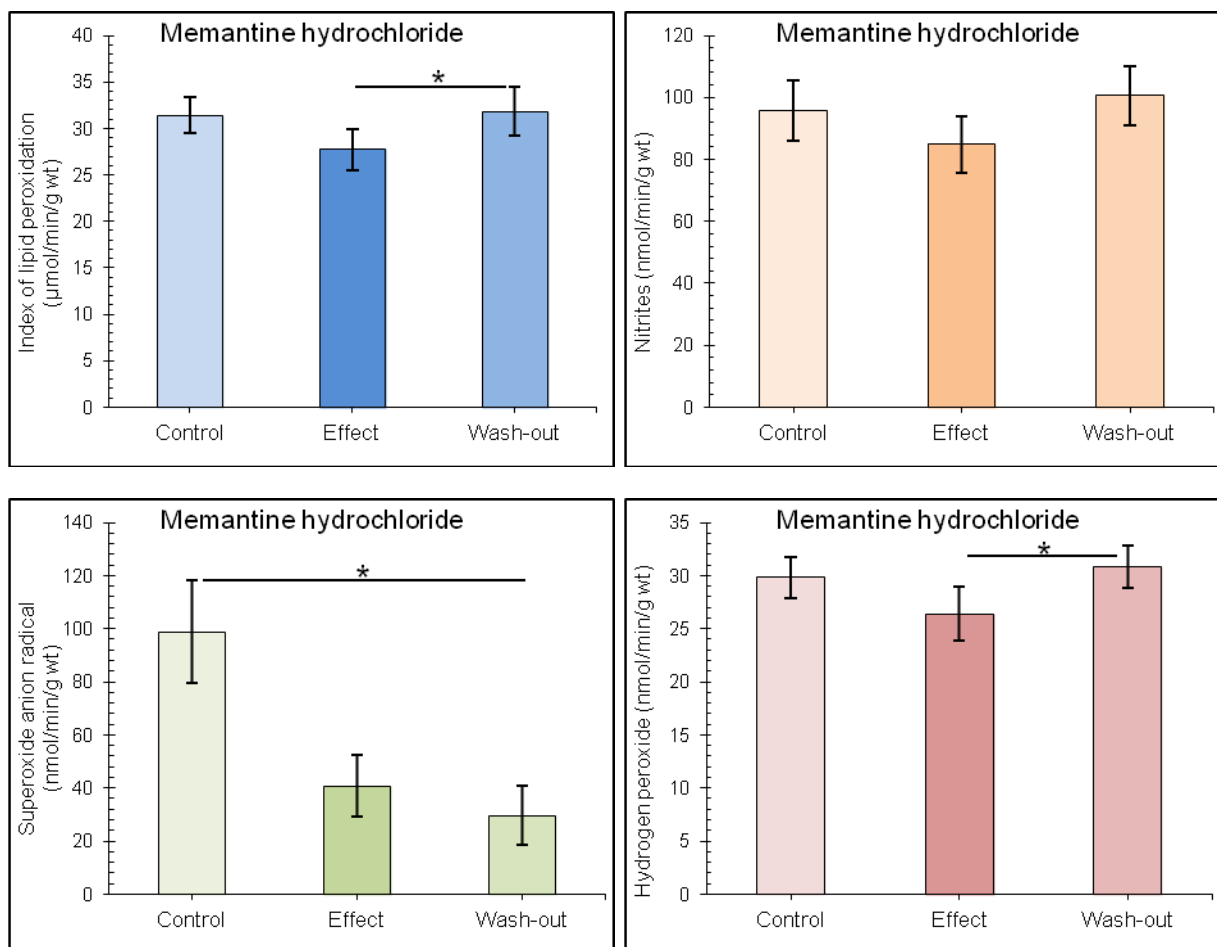
Табела 4.29А. Вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - **C**), током примене мемантин хидрохлорида (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - **E**) и након периода опоравка (*Wash-out* - **W**).

Параметар	Контрола ( $X \pm SE$ )	Мемантин хидрохлорид ( $X \pm SE$ )	Опоравак ( $X \pm SE$ )
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	31,42 $\pm$ 1,91	27,73 $\pm$ 2,24	31,84 $\pm$ 2,65
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	95,79 $\pm$ 9,71	84,85 $\pm$ 9,24	100,54 $\pm$ 9,57
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	98,89 $\pm$ 19,59	40,66 $\pm$ 11,65	29,67 $\pm$ 11,12
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	29,84 $\pm$ 1,96	26,39 $\pm$ 2,51	30,84 $\pm$ 2,02

Табела 4.29Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - **C**), током примене мемантин хидрохлорида (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - **E**) и након периода опоравка (*Wash-out* - **W**).

Параметар	<b>C vs E</b>	<b>E vs W</b>	<b>C vs W</b>
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	-11,74%; $p > 0,05$	+14,83%; $p < 0,05$	+1,36%; $p > 0,05$
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	-11,42%; $p > 0,05$	+18,5%; $p > 0,05$	+4,96%; $p > 0,05$
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	-58,88%; $p > 0,05$	-27,04%; $p > 0,05$	-70%; $p < 0,05$
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	-11,56%; $p > 0,05$	+16,86%; $p < 0,05$	+3,35%; $p > 0,05$

**График 4.29.** Ефекти примене мемантин хидрохлорида (100  $\mu\text{mol/l}$ ) на вредности параметара оксидационог стреса ( $X \pm \text{SE}$ ) у коронарном венском ефлуенту у контролном периоду (*Control*), током примене супстанце (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).



#### 4.2.15. ДЕЈСТВО ИФЕНПРОДИЛ ТАРТАРАТА (1 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти ифенпродил тартарата (1  $\mu\text{mol/l}$ ) на параметре оксидационог стреса су приказани на Табелама 4.30А и 4.30Б и Графику 4.30.

Примена ифенпродил тартарата је изазвала статистички значајно смањење вредности водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Након периода опоравка (*Wash-out*) вредности нитрита су се статистички значајно повећале ( $\text{NO}_2^-$ ), међутим почетне вредности и вредности након периода опоравка се нису статистички значајно разликовале у било ком посматраном параметру.

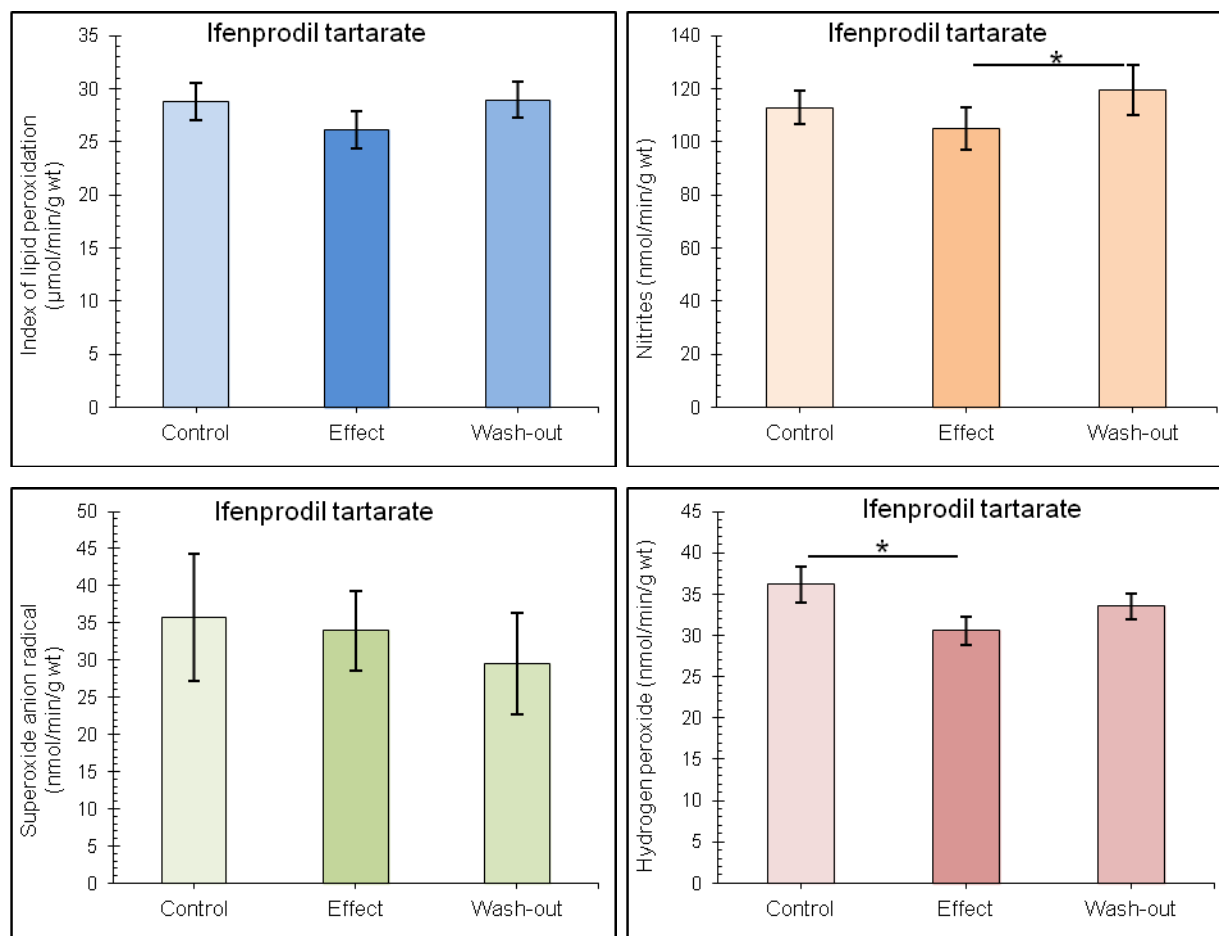
Табела 4.30А. Вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - **C**), током примене ифенпродил тартарата (1  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - **E**) и након периода опоравка (*Wash-out* - **W**).

Параметар	Контрола ( $X \pm SE$ )	Ифенпродил тартарат ( $X \pm SE$ )	Опоравак ( $X \pm SE$ )
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	28,79 $\pm$ 1,76	26,08 $\pm$ 1,76	28,94 $\pm$ 1,66
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	112,92 $\pm$ 6,29	104,93 $\pm$ 8,12	119,37 $\pm$ 9,56
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	35,73 $\pm$ 8,54	33,95 $\pm$ 5,36	29,61 $\pm$ 6,83
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	36,15 $\pm$ 2,13	30,58 $\pm$ 1,7	33,54 $\pm$ 1,53

Табела 4.30Б. Процентулане разлике и статистичке значајности разлике између вредности параметара оксидационог стреса у контролном периоду (*Control* - **C**), током примене ифенпродил тартарата (1  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Effect* - **E**) и након периода опоравка (*Wash-out* - **W**).

Параметар	<b>C vs E</b>	<b>E vs W</b>	<b>C vs W</b>
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol/min/g wt}$ )	-9,42%; $p > 0,05$	+10,95%; $p > 0,05$	+0,5%; $p > 0,05$
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	-7,08%; $p > 0,05$	+13,76%; <b><math>p &lt; 0,05</math></b>	+5,71%; $p > 0,05$
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	-4,98%; $p > 0,05$	-12,78%; $p > 0,05$	-17,13%; $p > 0,05$
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> ( $\text{nmol/min/g wt}$ )	-15,42%; <b><math>p &lt; 0,05</math></b>	+9,68%; $p > 0,05$	-7,24%; $p > 0,05$

**График 4.30.** Ефекти примене ифенпродил тартарата (1  $\mu\text{mol/l}$ ) на вредности параметара оксидационог стреса ( $X \pm \text{SE}$ ) у коронарном венском ефлуенту у контролном периоду (*Control*), током примене супстанце (*Effect*) и након периода опоравка (*Wash-out*).





## **5. ДИСКУСИЈА**

Постоји доста радова који се баве улогом NMDA рецептора у централном нервном систему (ЦНС) (273-275). Јонотропни глутаматни рецептори, на првом месту NMDA и AMPA рецептори, постоје у великом броју синапси у ЦНС, а накнадна истраживања су показала да се састав субјединица које изграђују ове рецепторе разликује у зависности од типа неурона или регије мозга у којој се налазе. На значај јонотропних глутаматних рецептора указује чињеница да поремећај у саставу ових рецептора има драматичне последице како на функционисање појединачне ћелије тако и на функцију нервног система у целини. Наведене промене у функцији јонотропних глутаматних рецептора изазивају поремећаје у равнотежи између ексцитације и инхибиције, што често за последицу има летални исход (273). Поремећај функције NMDA рецептора се налази у основи више тешких неуролошких поремећаја, попут Алцхајмерове болести (2). Наиме, амилоид  $\beta$ , који је главни патогенетски чинилац неуродегенеративних поремећаја у Алцхајмеровој болести, изазива поремећај функције и смањење броја NMDA и AMPA рецептора у синапсама, што даље изазива губитак синптичке пластичности и поремећаје мишљења и памћења. На значај NMDA рецептора у патогенези депресије је указало откриће да кетамин, као инхибитор NMDA рецептора, испољава позитивне ефекте у случајевима депресије отпорне на друге лекове (275). Извесни радови указују на чињеницу да хиперактивност екстрасинаптичких NMDA рецептора имају главну улогу у неуродегенеративним поремећајима за које се сматра да чине основу у настанку депресије (276). Поред ЦНС, све више података се бави улогом NMDA рецептора у екстранеуралним ткивима, између осталих и у кардиоваскуларном систему (140).

Примена глутамата и глицина у концентрацијама од 100  $\mu\text{mol/l}$  није изазвала статистички значајне промене ни једног од праћених кардиодинамских параметара, као ни коронарног протока, док је истовремена примена глицина и глутамата, у наведеним концентрацијама, узроковала значајно смањење максималне и минималне стопе промене притиска у левој комори ( $dp/dt \text{ max}$  и  $dp/dt \text{ min}$ ), фреквенције срчаног рада (HR) и коронарног протока (CF). Након периода опоравка наведени параметри су се статистички значајно повећали и достигли вредности које се нису значајно разликовале од почетних.

*Sun* и сарадници су на основу података о улози NMDA рецептора у патогенези исхемијског možданог удара, за циљ свог истраживања имали утврђивање повезаности између активације ових рецептора глутаматом током исхемије и реперфузије и ефекте

њихове активности на настајање коморских аритмија (144). Током свог истраживања индуковали су исхемију подвезивањем леве десцендентне коронарне артерије у трајању од 30 минута, а након тога су индуковали реперфузију истог трајања. Пошто су експерименти извођени *in vivo*, мерили су вредности глутамата у серуму, активност  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азе, експресију SERCA2а протеина и садржај  $\text{Ca}^{2+}$  у митохондријама. Резултати наведеног истраживања су показали да се вредности глутамата током исхемије и реперфузије знатно повећавају, уз претеће повећање инциденције коморских аритмија. Апликовање МК-801 (инхибитор NMDA рецептора) и габапентина (инхибитор ослобађања глутамата) пре изазивања исхемије је значајно смањило вредности глутамата у серуму, као и настајање аритмија, повећало експресију SERCA2а протеина и активност  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азе у саркоплазматском ретикулуму, и смањило садржај  $\text{Ca}^{2+}$  у митохондријама. Примена дихидрокаината, који блокира преузимање ослобођеног глутамата, је имало супротан ефекат. Резултати наведене студије указују на значај NMDA рецептора у регулацији функционисања миокарда, као и у настајању аритмија током реперфузије. Изостајање оваквих ефеката током примене глутамата у експериментима овог истраживања може да буде последица експерименталног протокола који је извођен *in vitro*, и евентуалног недостатка глицина за активацију NMDA рецептора, који постоји у довољној концентрацији у ткиву ако се експерименти изводе *in vivo*.

Аутори појединих студија су указали на протективно дејство глицина на кардиоваскуларни систем (277-280). Wang и коаутори су испитивали ефекте глицина на промене у концентрацији  $\text{Ca}^{2+}$  у цитоплазми и продукцију фактора туморске некрозе  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) изазване липополисахаридом (LPS), као и да ли су глицин-зависни хлоридни канали (GlyR) укључени у те промене (277). Резултати аутора наведеног истраживања су показали имунохистохемијским методама да кардиомиоцити садрже  $\alpha_1$  и  $\beta$  субјединице GlyR, као и да активација GlyR спречава улазак  $\text{Ca}^{2+}$  које изазива LPS, као и продукцију TNF $\alpha$ . Изостанак ефекта глицина на срце у експериментима овог истраживања може да буде последица различите дозе. Наиме, Wang и сарадници су користили вишеструко веће дозе глицина од 2 mmol/l насупрот 100  $\mu\text{mol/l}$  у овом истраживању. Zhang и сарадници су, такође, испитивали постојање GlyR у неонаталним кардиомиоцитима пацова, као и у адултном срцу пацова (281). Употребом RT-PCR (*real-time polymerase chain reaction*) и *western blot* методе ови аутори су идентификовали експресију иРНК и протеинских

субјединица које изграђују GlyR, што наводи на закључак да GlyR постоје у мембрани кардиомиоцита. И резултати истраживања других аутора указују на протективно дејство глицина током исхемије и реперфузије (282, 283). *Zhong* и коаутори су испитивали кардиопротективно дејство глицина на величину инфаркта код пацова код *in vivo* изазване исхемије и реперфузије (283). Примена глицина интраперитонеално у дози од 0,5 mg/g телесне масе, један сат пре изазивања инфаркта, смањило је величину инфаркта за 21%. Није утврђено да ли глицин спречава апоптозу, мада је примена глицина код пацијената шест сати након настајања исхемијског možданог удара имало за последицу смањење пропадања неурона и повољнији клинички исход (284). Протективно дејство глицина се заснива на спречавању фосфорилације митогеном-активираних протеин-киназа p38 (p38 MAPK) (285). Активираних p38 MAPK и *c-Jun* аминок-терминална киназа/стресом активираних протеин-киназа (JNK/SAPK) врше даљу фосфорилацију транскрипционих фактора и протеина цитоплазме, чиме се изазива повећање експресије адхезивних молекула и цитокина, повећана активација неутрофила и експресија *Fas* лиганда и других проапоптотских протеина (286-288).

Велики број студија се бави ефектима активације NMDA рецептора хомоцистеином (Нсу). *Tyagi* и сарадници су испитивали значај кардиоспецифичне делеције NMDA рецептора на промене у кардиомиоцитима током хиперхомоцистеинемије (ННсу) (146). Аутори наведне студије су индуковали ННсу додавањем 1,8 g DL-Нсу/l у воду за пиће, и након 6 недеља вредности Нсу су биле  $20 \pm 0,5 \mu\text{mol/l}$ , у поређењу са  $1,5 \pm 0,55 \mu\text{mol/l}$  код контролних животиња. ННсу је изазвала значајно повећање продукције ROS и RNS, за разлику од животиња са кардиоспецифичном делецијом NMDA рецептора. Кардиоспецифична делеција NMDA рецептора је, такође, изазвала смањење активације матриксне металопроотеиназе 9 (MMP-9), што наводи на закључак да Нсу изазива активацију MMP-9 посредством NMDA рецептора. Активација NMDA рецептора током ННсу и последична активација MMP-9 је узроковала и транслокацију конексина-43 (Cx43) у митохондрије и његову разградњу, за разлику од животиња са делецијом NMDA рецептора. Резултати претходног истраживања, које је спровела практично иста истраживачка група, су показали да ННсу и последична активација MMP-9 изазива дисфункцију кардиомиоцита и смањење контрактилности (289). И у овом истраживању аутори су користили животиње са кардиоспецифичном делецијом NMDA рецептора, која

је потврђена *western blot* методом и конфокалном микроскопијом. ННсу је узроковала значајно смањење контрактилне функције миокарда, која је била знатно мање изражена код животиња са кардиоспецифичном делецијом NMDA рецептора. ННсу је изазвала и продужење задржавања  $\text{Ca}^{2+}$  у цитоплазми кардиомиоцита, управо активацијом NMDA рецептора. Резултати истраживања које су спровели *Lindsey* и сарадници су указали на последице активације матриксних металопроотеиназа (MMP) на ремоделовање комора, као и на преживљавање, након инфаркта миокарда (290). Индуковање инфаркта миокарда, подвезивањем коронарне артерије, код мишева којима недостаје MMP-7 је изазвало знатно мање промене у EKG запису, провођење импулса је било боље, праћено већим садржајем Cxн-43, у односу на мишове који су имали MMP-7. И ова студија потврђује повезаност између активације NMDA рецептора, активације MMP, промена у садржају Cxн-43 и контрактилности миокарда, што је у корелацији са резултатима експеримената овог истраживања где је истовремена примена глутамата и глицина изазвала смањење контрактилности миокарда, што се рефлектовало кроз смањење параметара  $dp/dt \max$  и  $dp/dt \min$ .

Резултати овог истраживања су показали да није било значајних промена вредности систолног (SLVP) и дијастолног притиска у левој комори (DLVP), како током примене глутамата и глицина појединачно, тако ни током њихове заједничке апликације. Већи број истраживача се бавио утицајем активације NMDA рецептора у појединим регионима ЦНС на промене у вредностима крвног притиска, пре него директним ефектима агониста NMDA рецептора на срце (291, 292).

Истовремена апликација глутамата и глицина је изазвала значајно смањење срчане фреквенције, за разлику од појединачне примене ових једињења. У истраживању које су спровели *Liu* и сарадници, примена мононатријум глутамата у дози од 0,5 g/kg телесне масе је изазвала смањење срчане фреквенције, док је доза од 1,5 g/kg телесне масе изазвала тешку брадикардију (134). Примена мононатријум глутамата након изазваног инфаркта миокарда је изазвала коморске тахиаритмије, чију појаву је спречавала примена блокатора NMDA и AMPA рецептора. Резултати наведене студије су у сагласју са резултатима експеримената овог истраживања, а изостајање ефекта примене само глутамата на фреквенцију срца може да буде последица недостатка глицина. Наиме, експерименти у овом истраживању су изведени *in vitro*, за разлику од експеримената

претходно поменуте студије, који су извођени под *in vivo* условима. Услед тога, у ткиву миокарда током *in vivo* експеримената је вероватно било довољно глицина за активацију NMDA рецептора.

Истовремена апликација глутамата и глицина је изазвала значајно смањење коронарног протока. *Girouard* и сарадници су се бавили ефектима активације NMDA рецептора на продукцију NO у мозгу и последичне промене протока крви (293). Примена NMDA у концентрацији од 40  $\mu\text{mol/l}$  је изазвала повећање протока крви у možданом ткиву, као последица активације nNOS и повећања продукције NO. Наведене промене је инхибирала примена МК-801, као инхибитора NMDA рецептора. Са друге стране, *Qureshi* и сарадници су испитивали ефекте активације NMDA рецептора у васкуларним глатким мишићним ћелијама (294). Употребом RT-PCR детектовали су субјединице које улазе у састав NMDA рецептора у васкуларним глатким мишићним ћелијама, а активација NMDA рецептора хомоцистеином (Hcy) је изазвала повећање експресије протеина и гена за GluN1 субјединицу. Резултати наведеног истраживања су још показали да активација NMDA рецептора хомоцистеином смањује продукцију NO, а овај ефекат је спречен применом МК-801. Наведена улога активације NMDA рецептора на продукцију NO у глатким мишићним ћелијама, као и на садржај  $\text{Ca}^{2+}$  у овим ћелијама, може за последицу да има смањење коронарног протока.

Верапамил је блокатор  $\text{Ca}^{2+}$  канала L-типа, који спречавањем уласка  $\text{Ca}^{2+}$  продужава ефективни рефрактарни период и продужава задржавање импулса у AV чвору, што представља основу његовог негативног инотропног и хронотропног дејства на рад срца (295, 296). Акутна апликација верапамила у концентрацији од 3  $\mu\text{mol/l}$  је значајно смањила вредности параметара  $dp/dt \text{ max}$  и  $dp/dt \text{ min}$ , који осликавају инотропну и луситропну могућност миокарда. Након периода опоравка вредности ових параметара су се значајно повећале, али су достигнуте вредности нису биле приближне почетним вредностима. *Henderson* и сарадници су испитивали ефекте верапамила, уз друге супстанце, на контрактилност миокарда, као и на вредности биомаркера кардиотоксичности: мождани натриуретски пептид (*brain natriuretic peptide* - BNP), фактор туморске некрозе  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), интерлеукин 6 (IL6), тропонин I (TnI) и тропонин T (TnT) (297). Ови аутори су, такође, користили Лангендорфов модел изолованог срца пацова, и при томе су регистровали параметре као што су систолни притисак у левој

комори, развијени притисак (*developed pressure*), енд дијастолни притисак,  $dp/dt$  max и  $dp/dt$  min. Верапамил је у концентацијама од 0,001 до 0,1  $\mu\text{mol/l}$  изазвао дозно зависно смањење параметара  $dp/dt$  max и  $dp/dt$  min, односно контрактилности миокарда, док се остали параметри, укључујући биомаркере оштећења миокарда, нису значајно мењали. Резултати наведене студије су у корелацији са резултатима овог истраживања у погледу ефеката верапамила на контрактилност миокарда. У истраживању које су спровели *Nayakawa* и коаутори праћена је зависност покретљивости кардиомиоцита од кретања  $\text{Ca}^{2+}$  јона (298). Ови аутори су користили кардиомиоците пореклом из хумане плурипотентне ћелије, које су пратили методом видеомикроскопије. Резултати ове студије су показали да верапамил примењеној концентрацији од 100  $\text{nmol/l}$ , смањује све параметре који рефлектују улазак  $\text{Ca}^{2+}$  у ћелије, као и контрактилност кардиомиоцита.

Приликом примене глутамата или глицина у концентрацијама од 100  $\mu\text{mol/l}$  истовремено са верапамилом контрактилност миокарда се такође значајно смњила, али процентат смањења је био знатно мањи у поређењу са групом где је примењен само верапамил. *Xie* и сарадници су испитивали значај активације метаботропних глутаматних рецептора 1 и 5 (mGluR1/5) на регулацију конексина-43 (Cxn-43) у кардиомиобластима (299). Наиме, потврђено је присуство mGluR1/5 у интеркалатним дисковима, где Cxn-43 има доминантну улогу у формирању порозних веза између кардиомиоцита. Резултати наведеног истраживања указују на чињеницу да активација mGluR1 изазива фосфорилацију Cxn-43 и инхибицију међућелијске комуникације преко порозних веза, посредством протеин-киназе регулисане екстрацелуларним сигналом 1/2 (ERK1/2). Наведене промене можда делимично посредују у мањем смањењу контрактилности током истовремене примене верапамила и глутамата. У претходно поменутом истраживању које су спровели *Liu* и сарадници, примена АМПА у концентрацији од  $10^{-5}$  и  $10^{-6}$  је изазвала мањи улазак јона  $\text{Ca}^{2+}$  у кардиомиоците, указујући и на могући значај АМПА рецептора у регулацији срчаног рада (134). Можда је управо активација ових рецептора глутаматом у експериментима овог истраживања, и последични улазак мање количине  $\text{Ca}^{2+}$  јона, разлог процентуланог мањег смањења контрактилности услед комбиноване примене верапамила и глутамата. *Qi* и коаутори су испитивали могућности активације глицинских рецептора (GlyR) у кардиомиоцитима, као и ефекте њихове активације у заштити миокарда од оштећења изазваног липополисахаридом (LPS) и хипоксијом и реоксигенацијом (278).

Примена глицина у експериментима ових аутора је деловала протективно и спречавала како оштећење изазвано LPS, тако и оштећење изазвано хипоксијом и реоксигенацијом, премда се ови резултати делимично разликују од резултата истраживања које су спровели Wang и група аутора (277). Наиме, употребом *western blot* методе Wang и сарадници су регистровани и  $\alpha_1$  и  $\beta$  субјединице GlyR у кардиомиоцитима, док су Qi и сарадници утврдили постојање само  $\beta$  субјединице. GlyR представљају лиганд-зависне хлоридне канале који имају битну улогу у регулацију функција нервног и имунског система (300, 301). Активација GlyR изазива хиперполаризацију мембране и смањење уласка јона  $\text{Ca}^{2+}$ . Резултати већег броја истраживања указују на значај глицина као протективног фактора од оксидационог оштећења у васкуларним ткивима (302-304). Упркос делимично различитим резултатима појединих истраживачких група дефинитивно постоји улога GlyR у регулацији рада миокарда, и можда је управо њихова активација разлог процентуално мањег смањења контрактилности током истовремене примене верапамила и глицина, у поређењу са самосталном применом верапамила.

Истовремена апликација верапамила, глутамата и глицина је, такође, изазвала статистички значајно смањење вредности параметара  $dp/dt \max$  и  $dp/dt \min$ , али је ово смањење процентуално било најмање у поређењу са применом само верапамила, или верапамила у комбинацији са глутаматом или глицином. Након периода опоравка  $dp/dt \max$  и  $dp/dt \min$  су се значајно повећали, тако да су достигнуте вредности биле најприближније почетним вредностима у односу на наведене групе. Имајући у виду значај NMDA рецептора и њихову распрострањеност у могим ткивима, несумњиво су значајни за одржавање хомеостазе  $\text{Ca}^{2+}$  у ткивима срца, а самим тим и за адекватно функционисање срца (140). Vacek и сарадници су описали повезаност активације NMDA рецептора и повећања концентрације  $\text{Ca}^{2+}$  у цитоплазми и митохондријама (305). Повећање концентрације  $\text{Ca}^{2+}$  у кардиомиоцитима услед активације NMDA рецептора изазваном ННсу, праћено је повећањем продукције ROS и NO, као и повећањем пропустљивости мембрана митохондрија, што заједно изазива смањење контрактилности миокарда. Сличне закључке су извели и Gao и сарадници из резултата свог истраживања (145). Активација NMDA рецептора у културама неонаталних кардиомиоцита применом различитих концентрација NMDA изазвала је улазак  $\text{Ca}^{2+}$  у ћелије, док је примена МК-801 тај улазак спречавала. Повећање концентрације  $\text{Ca}^{2+}$  је узрок активације сигналних путева чији је



исход апоптоза. Међутим, у условима блокаде других  $\text{Ca}^{2+}$  канала, активација NMDA рецептора може да обезбеди улазак извесне количине  $\text{Ca}^{2+}$ , која омогућава релативно повећање контрактилности миокарда.

Током примене верапамила систолни притисак у левој комори (SLVP) се значајно смањено, а током периода опоравка се значајно повећао, али није достигао вредности које су блиске почетним вредностима. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) се незнатно смањено током примене верапамила, и тај тренд се наставио током периода опоравка, али није било статистички значајне разлике између контролних вредности и вредности након опоравка. Верапамил, као блокатор  $\text{Ca}^{2+}$  канала L-типа, је битан лек у терапији хипертензије (295). Хи и сарадници су, између осталог, испитивали ефекте верапамила на крвни притисак, при чему је верапамил у дози од 15  $\mu\text{g}/100 \text{ g}$  телесне масе пацова изазвао значајно смањење систолног и дијастолног притиска пацова. Механизам деловања верапамила на нивоу ћелије се заснива на везивању верапамила за  $\alpha_{1c}$  субјединицу калцијумских канала L-типа, при чему се спречава улазак  $\text{Ca}^{2+}$  у ћелије, што за последицу има смањење контрактилности, систолног и дијастолног притиска, као и релаксацију васкуларних глатких мишића (295, 306, 307). Резултати истраживања које су спровели Zhou и сарадници су показали да верапамил изазива смањење систолног притиска и средњег крвног притиска (308). У свом истраживању су користили *in vivo* и *in vitro* експерименте, при чему је верапамил испољио антиармијско дејство, смањено је вредности крвног притиска и деловао је протективно тако што је смањено разградњу Sxn-43.

Верапамил у комбинацији са глутаматом и/или глицином је, такође, изазвао смањење вредности SLVP, али ово смањење је процентуално било најмање изражено у случају истовремене примене верапамила, глутамата и глицина. Током периода опоравка вредности SLVP су се значајно повећале, при чему су се вредности ових параметара у групи где су примењени верапамил, глутамат и глицин најмање разликовале од контролних вредности. Већ је поменута улога AMPA рецептора при уласку мање количине  $\text{Ca}^{2+}$  јона у кардиомиоците, при чему је, слично ефекту на контрактилност, ова количина  $\text{Ca}^{2+}$  можда узрок релативног повећања SLVP у односу на изоловану примену верапамила (134). Такође поменута улога метаботропних рецептора може да буде повезана са мањим смањењем SLVP у случају истовремене примене верапамила и

глутамата (299, 309). *Zhu* и коаутори су испитивали значај метаботропних глутаматних рецептора (mGluR) у диференцијацији кардиомиоцита, а резултати њиховог истраживања указују на улогу mGluR5 у уласку  $\text{Ca}^{2+}$  и сигналној каскади која посредује у кардиогенези (309). Већ је поменуто дејство активације глицинских рецептора (GlyR) на улазак  $\text{Ca}^{2+}$  јона у миокарду (277, 278). У истраживању које су спровели *Mishra* и коаутори, глицин је изазвао смањење средњег артеријског притиска код нормотензивних пацова, док је имао потпуно супротан ефекат на спонтано хипертензивне пацове или пацове којима је хипертензија индукована применом  $\text{N}^G$  нитро L-аргинин метил естра (L-NAME) (310). Овакви ефекти глицина се доводе у везу са различитим ефектима на активацију NOS и продукцију NO. Такође, постоје контрадикторни подаци о ефектима повећано уноса глицина исхраном на вредности крвног притиска. Са једне стране истиче се његово позитивно дејство на периферни крвни притисак, па тако резултати студије коју су спровели *Jennings* и сарадници указују на снижавање периферног крвног притиска код здравих жена са повећаним уносом више аминокиселина, између осталих и глицина (311). За разлику од наведене студије, резултати других истраживања указују на повезаност између повишеног крвног притиска и уноса глицина исхраном, као и негативних последица те повезаности попут исхемијског možданог удара (312, 313). Резултати експеримената овог истраживања су показали да глицин у примењеној дози од 100  $\mu\text{mol/l}$  самостално не утиче на вредности SLVP, али у се уочава мање снижење вредности SLVP када се верапамил примени у комбинацији са глицином, у поређењу са самосталном применом верапамила.

Постоји велики број података који указују на чињеницу да промена активности NMDA рецептора у појединим деловима мозга утиче на вредности крвног притиска (314, 315). Резултати претходних истраживања, спроведених у истој лабораторији где су изведени експерименти ове студије, су показали да примена инхибитора NMDA рецептора, МК-801, изазива смањење вредности систолног крвног притиска (316). Могуће објашњење овог ефекта, као и резултата овог истраживања где примена верапамила у комбинацији са глутаматом и глицином изазива мање смањење SLVP у односу на комбинације глутамата или глицина са верапамилом, или самосталну примену верапамила, је да активација NMDA рецептора омогућава улазак извесне количине  $\text{Ca}^{2+}$  која се супротставља ефектима блокаде уласка  $\text{Ca}^{2+}$  изазвану верапамилом.

Верапамил самостално, као и током истовремене примене са глутаматом или глицином је изазвао значајно смањење фреквенције срчаног рада (HR), при чему се вредности HR нису повећале током периода опоравка. Верапамил испољава супресивно дејство на SA чвор, а такође продужава време задржавања импулса у AV чвору, што за последицу има смањење срчане фреквенције (295, 307, 317). У истраживању које су спровели *Bragança* и сарадници примена верапамила у концентрацији од 1  $\mu\text{mol/l}$  је изазвала смањење фреквенције преткомора за 25% (318). Такође, резултати истог истраживања су показали да примена верапамила у концентрацијама од 0,03  $\mu\text{mol/l}$  до 10  $\mu\text{mol/l}$  изазива дозно зависно смањење фреквенције контракција преткомора. Са друге стране, истовремена примена верапамила, глутамата и глицина није изазвала промене у вредности HR током апликовања супстанци, већ се вредност HR смањила током периода опоравка. Као и у случају крвног притиска, постоји доста података о последицама активације NMDA рецептора у појединим деловима мозга на срчану фреквенцију. *Santini* и коаутори су изазвали тахикардију апликацијом L-глутамата у вентрални хипоталамус (319). Наведене ефекте L-глутамата је спречавала истовремена примена блокатора NMDA рецептора, као и инхибитора nNOS, гуанилил циклазе или једињења које везује NO, па предложени механизам деловања L-глутамата аутора наведеног истраживања подразумева активацију NMDA рецептора L-глутаматом, што за последицу има активацију nNOS и повећање продукције NO и активацију гуанилил циклазе и повећање продукције цикличног гуанозин-монофосфата (cGMP). Сличне резултате су добили и *Busnardo* и сарадници у свом истраживању, при чему локално повећање концентрације АТФ-а у паравентрикуларним једрима хипоталамуса свесних пацова, изазива повећање продукције NO, који изазива ослобађање глутамата и активацију NMDA рецептора (320). У претходно поменутом истраживању наше истраживачке групе, примена МК-801 је изазвала брадикардију (316). Могуће објашњење добијених резултата овог истраживања је да активација NMDA рецептора током апликације верапамила спречава смањење срчане фреквенције, али током периода опоравка дејство верапамила долази до изражаја због евентуалног дужег трајања времена дисоцијације верапамила, у поређењу са глутаматом, премда време дисоцијације глутамата зависи од субјединица које улазе у састав NMDA рецептора (321, 322).

Коронарни проток се значајно повећао како током апликације верапамила, тако и током апликације верапамила у комбинацији са глутаматом и/или глицином. Верапамил се у клиничкој пракси користи и током интервенција на срцу у циљу спречавања феномена недовољне перфузије (323). У истраживању које су спровели *Ok* и сарадници на аорти пацова којој је одстрањен ендотел, верапамил је спречавао улазак  $\text{Ca}^{2+}$  у васкуларне глатке мишићне ћелије, као и вазоконстрикторни ефекат других агенаса који је био посредован уласком  $\text{Ca}^{2+}$  у васкуларне глатке мишиће (324). Повећање коронарног протока у експерименталног групи где су истовремено примењени верапамил, глутамат и глицин може да буде последица евентуално недовољне количине  $\text{Ca}^{2+}$  која улази у васкуларне глатке мишиће коронарних артерија посредством активираних NMDA рецептора, како би се умањио вазодилаторни ефекат верапамила. Међутим, резултати истраживања појединих аутора указују на вазодилаторне ефекте активације NMDA рецептора. *Nama-Tomioka* и сарадници су показали да примена NMDA и последична активација NMDA рецептора изазива вазодилатацију можданих паренхимских артериола зеца (325). Вазодилатацију је спречавала претходна примена МК-801, инхибитора NMDA рецептора, као и инхибитора nNOS, док је инхибиција продукције супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ ) повећавала вазодилатацију. Добијени резултати указују на чињеницу да активација NMDA рецептора узрокује активацију nNOS и повећање продукције NO, што за последицу има вазодилатацију. У истраживању које су спровели *LeMaistre* и сарадници, активација NMDA рецептора је, такође, изазвала дилатацију можданих артериола, при чему аутори овог истраживања истичу значај активације ендотелне азот-моноксид синтазе (eNOS) и продукције NO као посредника у овом ефекту (326).

## **6. ЗАКЉУЧЦИ**

На основу резултата овог истраживања и њиховог поређења са резултатима других аутора могу се закључити следеће:

1. Имајући у виду да апликација глутамата и глицина појединачно није изазвала промене у вредностима кардиодинамских параметара, као ни промене у динамици ослобађања биомаркера оксидационог стреса, за разлику од њихове комбиноване апликације, при чему су се вредности кардиодинамских параметара смањиле, а оксидационог стреса повећале, може да се закључи да прекомерна активација NMDA рецептора изазива поремећај у функционисању миокарда и индукцију оксидационог стреса.
2. Узимајући у обзир значај калцијума за функцију срца, као и његов утицај на продукцију реактивних врста кисеоника и азота, претпостављени механизам настајања наведених промена вероватно подразумева поремећај хомеостазе калцијума, пошто су NMDA рецептори знатно пропустљивији за калцијумове јоне у односу на друге јоне.
3. Анализирајући резултате примене МК-801, као блокатора NMDA рецептора, и верапамила, као блокатора калцијумских канала L-типа, самостално и у комбинацији са глутаматом и/или глицином, уочава се да се најмање промене налазе у групама где се МК-801 или верапамил примењују у комбинацији са глутаматом и глицином. Услед тога, намеће се закључак да активација NMDA рецептора, и последични улазак извесне количине калцијума у ћелије срца модификује утицај МК-801 и верапамила на срце.
4. Примена *N*-метил-*D*-аспартата није узроковала значајне промене вредности кардиодинамских параметара, као ни динамике ослобађања биомаркера оксидационог стреса, а имајући у виду чињеницу да ни самостална примена глутамата није изазвала никакве промене, закључује се да је за активацију NMDA рецептора у срцу на овом експерименталном моделу, неопходно истовремено применити агонисте обе субјединице NMDA рецептора.
5. Примена DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида има негативне инотропне и хронотропне ефекте, а такође смањује и коронарни проток, услед чега се закључује

да је овај, могуће најтоксичнији метаболит хомоцистеина, потентнији активатор NMDA рецептора, чијом активацијом испољава своја нежељена дејства у кардиоваскуларном систему.

6. Примена мемантин хидрохлорида, као некомпетитвног антагонисте NMDA рецептора, и ифенпродил тартарата, као негативног алостерног модулятора NMDA рецептора, изазива смањење вредности кардиодинамских параметара и смањење вредности појединих биомаркера оксидационог стреса, што опет наводи на закључак да поремећај хомеостазе калцијума, у овом случају смањење концентрације калцијума, вероватно представља механизам који посредује, како у активацији, тако и у инхибицији NMDA рецептора.

# **7. РЕФЕРЕНЦЕ**



1. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev.* 2010 Sep;62(3):405-96.
2. Sobolevsky AI. Structure and gating of tetrameric glutamate receptors. *J Physiol.* 2015 Jan 1;593(1):29-38.
3. Yao Y, Harrison CB, Freddolino PL, Schulten K, Mayer ML. Molecular mechanism of ligand recognition by NR3 subtype glutamate receptors. *EMBO J.* 2008 Aug 6;27(15):2158-70.
4. Collingridge GL, Olsen RW, Peters J, Spedding M. A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology.* 2009 Jan;56(1):2-5.
5. Vyklicky V, Korinek M, Smejkalova T, Balik A, Krausova B, Kaniakova M, Lichnerova K, Cerny J, Krusek J, Dittert I, Horak M, Vyklicky L. Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiol Res.* 2014;63 Suppl 1:S191-203.
6. Lin JW, Wyszynski M, Madhavan R, Sealock R, Kim JU, Sheng M. Yotiao, a novel protein of neuromuscular junction and brain that interacts with specific splice variants of NMDA receptor subunit NR1. *J Neurosci.* 1998 Mar 15;18(6):2017-27.
7. Perez-Otano I, Schulteis CT, Contractor A, Lipton SA, Trimmer JS, Sucher NJ, Heinemann SF. Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. *J Neurosci.* 2001 Feb 15;21(4):1228-37.
8. Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron.* 1994 Mar;12(3):529-40.
9. Sattler R, Xiong Z, Lu WY, Hafner M, MacDonald JF, Tymianski M. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science.* 1999 Jun 11;284(5421):1845-8.
10. Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA, Zhang D. Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature.* 2002 Feb 14;415(6873):793-8.
11. Matsuda K, Fletcher M, Kamiya Y, Yuzaki M. Specific assembly with the NMDA receptor 3B subunit controls surface expression and calcium permeability of NMDA receptors. *J Neurosci.* 2003 Nov 5;23(31):10064-73.
12. Qiu S, Hua YL, Yang F, Chen YZ, Luo JH. Subunit assembly of N-methyl-d-aspartate receptors analyzed by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem.* 2005 Jul 1;280(26):24923-30.
13. Atlason PT, Garside ML, Meddows E, Whiting P, McIlhinney RA. N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit NR1 forms the substrate for oligomeric assembly of the NMDA receptor. *J Biol Chem.* 2007 Aug 31;282(35):25299-307.

14. Schüler T, Mesic I, Madry C, Bartholomäus I, Laube B. Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in N-methyl-D-aspartate receptor assembly. *J Biol Chem.* 2008 Jan 4;283(1):37-46.
15. Stern-Bach Y, Bettler B, Hartley M, Sheppard PO, O'Hara PJ, Heinemann SF. Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains structurally related to bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron.* 1994 Dec;13(6):1345-57.
16. Yuan H, Hansen KB, Vance KM, Ogden KK, Traynelis SF. Control of NMDA receptor function by the NR2 subunit amino-terminal domain. *J Neurosci.* 2009 Sep 30;29(39):12045-58.
17. Dalva MB, Takasu MA, Lin MZ, Shamah SM, Hu L, Gale NW, Greenberg ME. EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell.* 2000 Dec 8;103(6):945-56.
18. Karakas E, Simorowski N, Furukawa H. Structure of the zinc-bound amino-terminal domain of the NMDA receptor NR2B subunit. *EMBO J.* 2009 Dec 16;28(24):3910-20.
19. Vissel B, Krupp JJ, Heinemann SF, Westbrook GL. Intracellular domains of NR2 alter calcium-dependent inactivation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol.* 2002 Mar;61(3):595-605.
20. Aow J, Dore K, Malinow R. Conformational signaling required for synaptic plasticity by the NMDA receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Nov 24;112(47):14711-6.
21. Mayer ML. Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature.* 2006 Mar 23;440(7083):456-62.
22. Mayer ML, Armstrong N. Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annu Rev Physiol.* 2004;66:161-81.
23. Zhang W, Cho Y, Lolis E, Howe JR. Structural and single-channel results indicate that the rates of ligand binding domain closing and opening directly impact AMPA receptor gating. *J Neurosci.* 2008 Jan 23;28(4):932-43.
24. Furukawa H, Singh SK, Mancusso R, Gouaux E. Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature.* 2005 Nov 10;438(7065):185-92.
25. Sobolevsky AI, Prodromou ML, Yelshansky MV, Wollmuth LP. Subunit-specific contribution of pore-forming domains to NMDA receptor channel structure and gating. *J Gen Physiol.* 2007 Jun;129(6):509-25.
26. Lomeli H, Mosbacher J, Melcher T, Höger T, Geiger JR, Kuner T, Monyer H, Higuchi M, Bach A, Seeburg PH. Control of kinetic properties of AMPA receptor channels by nuclear RNA editing. *Science.* 1994 Dec 9;266(5191):1709-13.
27. Burnashev N, Schoepfer R, Monyer H, Ruppersberg JP, Günther W, Seeburg PH, Sakmann B. Control by asparagine residues of calcium permeability and magnesium blockade in the NMDA receptor. *Science.* 1992 Sep 4;257(5075):1415-9.
28. Mony L, Kew JN, Gunthorpe MJ, Paoletti P. Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Br J Pharmacol.* 2009 Aug;157(8):1301-17.

29. Westbrook GL, Mayer ML. Micromolar concentrations of Zn<sup>2+</sup> antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons. *Nature*. 1987 Aug 13-19;328(6131):640-3.
30. Traynelis SF, Burgess MF, Zheng F, Lyuboslavsky P, Powers JL. Control of voltage-independent zinc inhibition of NMDA receptors by the NR1 subunit. *J Neurosci*. 1998 Aug 15;18(16):6163-75.
31. Paoletti P, Vergnano AM, Barbour B, Casado M. Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience*. 2009 Jan 12;158(1):126-36.
32. Low CM, Zheng F, Lyuboslavsky P, Traynelis SF. Molecular determinants of coordinated proton and zinc inhibition of N-methyl-D-aspartate NR1/NR2A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Sep 26;97(20):11062-7.
33. Gielen M, Sieglér Retchless B, Mony L, Johnson JW, Paoletti P. Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. *Nature*. 2009 Jun 4;459(7247):703-7.
34. Paoletti P, Perin-Dureau F, Fayyazuddin A, Le Goff A, Callebaut I, Neyton J. Molecular organization of a zinc binding n-terminal modulatory domain in a NMDA receptor subunit. *Neuron*. 2000 Dec;28(3):911-25.
35. Gallagher MJ, Huang H, Pritchett DB, Lynch DR. Interactions between ifenprodil and the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem*. 1996 Apr 19;271(16):9603-11.
36. Low CM, Zheng F, Lyuboslavsky P, Traynelis SF. Molecular determinants of coordinated proton and zinc inhibition of N-methyl-D-aspartate NR1/NR2A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Sep 26;97(20):11062-7.
37. Sun Y, Olson R, Horning M, Armstrong N, Mayer M, Gouaux E. Mechanism of glutamate receptor desensitization. *Nature*. 2002 May 16;417(6886):245-53.
38. Traynelis SF, Cull-Candy SG. Proton inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurons. *Nature*. 1990 May 24;345(6273):347-50.
39. Low CM, Lyuboslavsky P, French A, Le P, Wyatte K, Thiel WH, Marchan EM, Igarashi K, Kashiwagi K, Gernert K, Williams K, Traynelis SF, Zheng F. Molecular determinants of proton-sensitive N-methyl-D-aspartate receptor gating. *Mol Pharmacol*. 2003 Jun;63(6):1212-22.
40. Traynelis SF, Hartley M, Heinemann SF. Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science*. 1995 May 12;268(5212):873-6.
41. Chang HR, Kuo CC. The activation gate and gating mechanism of the NMDA receptor. *J Neurosci*. 2008 Feb 13;28(7):1546-56.
42. Banke TG, Dravid SM, Traynelis SF. Protons trap NR1/NR2B NMDA receptors in a nonconducting state. *J Neurosci*. 2005 Jan 5;25(1):42-51.
43. Carron C, Jullien A, Bucher B. Synthesis and pharmacological properties of a series of 2-piperidino alkanol derivatives. *Arzneimittelforschung*. 1971 Dec;21(12):1992-8.

44. Carter C, Benavides J, Legendre P, Vincent JD, Noel F, Thuret F, Lloyd KG, Arbilla S, Zivkovic B, MacKenzie ET, et al. Ifenprodil and SL 82.0715 as cerebral anti-ischemic agents. II. Evidence for N-methyl-D-aspartate receptor antagonist properties. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988 Dec;247(3):1222-32.
45. Hess SD, Daggett LP, Deal C, Lu CC, Johnson EC, Veliçelebi G. Functional characterization of human N-methyl-D-aspartate subtype 1A/2D receptors. *J Neurochem.* 1998 Mar;70(3):1269-79.
46. Hatton CJ, Paoletti P. Modulation of triheteromeric NMDA receptors by N-terminal domain ligands. *Neuron.* 2005 Apr 21;46(2):261-74.
47. Ng FM, Geballe MT, Snyder JP, Traynelis SF, Low CM. Structural insights into phenylethanolamines high-affinity binding site in NR2B from binding and molecular modeling studies. *Mol Brain.* 2008 Nov 18;1:16.
48. Han X, Tomitori H, Mizuno S, Higashi K, Füll C, Fukiwake T, Terui Y, Leewanich P, Nishimura K, Toida T, Williams K, Kashiwagi K, Igarashi K. Binding of spermine and ifenprodil to a purified, soluble regulatory domain of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Neurochem.* 2008 Dec;107(6):1566-77.
49. Rachline J, Perin-Dureau F, Le Goff A, Neyton J, Paoletti P. The micromolar zinc-binding domain on the NMDA receptor subunit NR2B. *J Neurosci.* 2005 Jan 12;25(2):308-17.
50. Mott DD, Doherty JJ, Zhang S, Washburn MS, Fendley MJ, Lyuboslavsky P, Traynelis SF, Dingledine R. Phenylethanolamines inhibit NMDA receptors by enhancing proton inhibition. *Nat Neurosci.* 1998 Dec;1(8):659-67.
51. Mony L, Krzaczkowski L, Leonetti M, Le Goff A, Alarcon K, Neyton J, Bertrand HO, Acher F, Paoletti P. Structural basis of NR2B-selective antagonist recognition by N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol.* 2009 Jan;75(1):60-74.
52. Rock DM, Macdonald RL. Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1995;35:463-82.
53. Benveniste M, Mayer ML. Multiple effects of spermine on N-methyl-D-aspartic acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurones. *J Physiol.* 1993 May;464:131-63.
54. Paoletti P, Neyton J, Ascher P. Glycine-independent and subunit-specific potentiation of NMDA responses by extracellular Mg<sup>2+</sup>. *Neuron.* 1995 Nov;15(5):1109-20.
55. Lu WY, Xiong ZG, Orser BA, MacDonald JF. Multiple sites of action of neomycin, Mg<sup>2+</sup> and spermine on the NMDA receptors of rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. *J Physiol.* 1998 Oct 1;512 ( Pt 1):29-46.
56. Williams K. Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem J.* 1997 Jul 15;325 ( Pt 2):289-97.
57. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev.* 1999 Mar;51(1):7-61.

58. Robel P, Baulieu EE. Neurosteroids Biosynthesis and function. *Trends Endocrinol Metab.* 1994 Jan-Feb;5(1):1-8.
59. Weaver CE, Land MB, Purdy RH, Richards KG, Gibbs TT, Farb DH. Geometry and charge determine pharmacological effects of steroids on N-methyl-D-aspartate receptor-induced  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation and cell death. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 Jun;293(3):747-54.
60. Horak M, Vlcek K, Chodounska H, Vyklicky L Jr. Subtype-dependence of N-methyl-D-aspartate receptor modulation by pregnenolone sulfate. *Neuroscience.* 2006;137(1):93-102.
61. Jang MK, Mierke DF, Russek SJ, Farb DH. A steroid modulatory domain on NR2B controls N-methyl-D-aspartate receptor proton sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 May 25;101(21):8198-203.
62. Petrovic M, Sedlacek M, Horak M, Chodounska H, Vyklický L Jr. 20-oxo-5beta-pregnan-3alpha-yl sulfate is a use-dependent NMDA receptor inhibitor. *J Neurosci.* 2005 Sep 14;25(37):8439-50.
63. Kleckner NW, Dingledine R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science.* 1988 Aug 12;241(4867):835-7.
64. Blanke ML, VanDongen AMJ. Activation Mechanisms of the NMDA Receptor. In: Van Dongen AM, editor. *Biology of the NMDA Receptor.* Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009. Chapter 13.
65. Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, Oliet SH. Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell.* 2006 May 19;125(4):775-84.
66. Furukawa H, Gouaux E. Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *EMBO J.* 2003 Jun 16;22(12):2873-85.
67. Kolodney G, Dumin E, Safory H, Rosenberg D, Mori H, Radzishevsky I, Wolosker H. Nuclear compartmentalization of serine racemase regulates d-serine production. IMPLICATIONS FOR N-METHYL-d-ASPARTATE (NMDA) RECEPTOR ACTIVATION. *J Biol Chem.* 2016 Feb 5;291(6):2630.
68. Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, Oliet SH. Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell.* 2006 May 19;125(4):775-84.
69. Zhang X, Nadler JV. Postsynaptic response to stimulation of the Schaffer collaterals with properties similar to those of synaptosomal aspartate release. *Brain Res.* 2009 Oct 27;1295:13-20.
70. Abushik PA, Niittykoski M, Giniatullina R, Shakirzyanova A, Bart G, Fayuk D, Sibarov DA, Antonov SM, Giniatullin R. The role of NMDA and mGluR5 receptors in calcium mobilization and neurotoxicity of homocysteine in trigeminal and cortical neurons and glial cells. *J Neurochem.* 2014 Apr;129(2):264-74.

71. Nahum-Levy R, Lipinski D, Shavit S, Benveniste M. Desensitization of NMDA receptor channels is modulated by glutamate agonists. *Biophys J*. 2001 May;80(5):2152-66.
72. Yao Y, Harrison CB, Freddolino PL, Schulten K, Mayer ML. Molecular mechanism of ligand recognition by NR3 subtype glutamate receptors. *EMBO J*. 2008 Aug 6;27(15):2158-70.
73. de Sousa SL, Dickinson R, Lieb WR, Franks NP. Contrasting synaptic actions of the inhalational general anesthetics isoflurane and xenon. *Anesthesiology*. 2000 Apr;92(4):1055-66.
74. Dickinson R, Peterson BK, Banks P, Simillis C, Martin JC, Valenzuela CA, Maze M, Franks NP. Competitive inhibition at the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor by the anesthetics xenon and isoflurane: evidence from molecular modeling and electrophysiology. *Anesthesiology*. 2007 Nov;107(5):756-67.
75. Lester RA, Clements JD, Westbrook GL, Jahr CE. Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. *Nature*. 1990 Aug 9;346(6284):565-7.
76. Kash TL, Matthews RT, Winder DG. Alcohol inhibits NR2B-containing NMDA receptors in the ventral bed nucleus of the stria terminalis. *Neuropsychopharmacology*. 2008 May;33(6):1379-90.
77. Brauneis U, Oz M, Peoples RW, Weight FF, Zhang L. Differential sensitivity of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor subunits to inhibition by dynorphin. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996 Dec;279(3):1063-8.
78. Blanpied TA, Boeckman FA, Aizenman E, Johnson JW. Trapping channel block of NMDA-activated responses by amantadine and memantine. *J Neurophysiol*. 1997 Jan;77(1):309-23.
79. Dzubay JA, Jahr CE. Kinetics of NMDA channel opening. *J Neurosci*. 1996 Jul 1;16(13):4129-34.
80. Mealing GA, Lanthorn TH, Murray CL, Small DL, Morley P. Differences in degree of trapping of low-affinity uncompetitive N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonists with similar kinetics of block. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999 Jan;288(1):204-10.
81. Bolshakov KV, Gmiro VE, Tikhonov DB, Magazanik LG. Determinants of trapping block of N-methyl-d-aspartate receptor channels. *J Neurochem*. 2003 Oct;87(1):56-65.
82. Johnson JW, Glasgow NG, Povysheva NV. Recent insights into the mode of action of memantine and ketamine. *Curr Opin Pharmacol*. 2015 Feb;20:54-63.
83. Texidó L, Martín-Satué M, Alberdi E, Solsona C, Matute C. Amyloid  $\beta$  peptide oligomers directly activate NMDA receptors. *Cell Calcium*. 2011 Mar;49(3):184-90.
84. Prentice H, Modi JP, Wu JY. Mechanisms of Neuronal Protection against Excitotoxicity, Endoplasmic Reticulum Stress, and Mitochondrial Dysfunction in Stroke and Neurodegenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:964518.

85. Dravid SM, Erreger K, Yuan H, Nicholson K, Le P, Lyuboslavsky P, Almonte A, Murray E, Mosely C, Barber J, French A, Balster R, Murray TF, Traynelis SF. Subunit-specific mechanisms and proton sensitivity of NMDA receptor channel block. *J Physiol.* 2007 May 15;581(Pt 1):107-28.
86. Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science.* 1992 May 22;256(5060):1217-21.
87. Wollmuth LP, Kuner T, Sakmann B. Adjacent asparagines in the NR2-subunit of the NMDA receptor channel control the voltage-dependent block by extracellular  $Mg^{2+}$ . *J Physiol.* 1998 Jan 1;506 ( Pt 1):13-32.
88. Qian A, Antonov SM, Johnson JW. Modulation by permeant ions of  $Mg(2+)$  inhibition of NMDA-activated whole-cell currents in rat cortical neurons. *J Physiol.* 2002 Jan 1;538(Pt 1):65-77.
89. Qian A, Johnson JW. Permeant ion effects on external  $Mg^{2+}$  block of NR1/2D NMDA receptors. *J Neurosci.* 2006 Oct 18;26(42):10899-910.
90. Clarke RJ, Johnson JW. NMDA receptor NR2 subunit dependence of the slow component of magnesium unblock. *J Neurosci.* 2006 May 24;26(21):5825-34.
91. Williams K, Pahk AJ, Kashiwagi K, Masuko T, Nguyen ND, Igarashi K. The selectivity filter of the N-methyl-D-aspartate receptor: a tryptophan residue controls block and permeation of  $Mg^{2+}$ . *Mol Pharmacol.* 1998 May;53(5):933-41.
92. Johnson JW, Ascher P. Voltage-dependent block by intracellular  $Mg^{2+}$  of N-methyl-D-aspartate-activated channels. *Biophys J.* 1990 May;57(5):1085-90.
93. Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature.* 1986 Feb 27-Mar 5;319(6056):774-6.
94. Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci.* 2000;23:649-711.
95. Bórquez DA, Urrutia PJ, Wilson C, van Zundert B, Núñez MT, González-Billault C. Dissecting the role of redox signaling in neuronal development. *J Neurochem.* 2016 Feb 14. doi: 10.1111/jnc.13581. [Epub ahead of print]
96. Greer PL, Greenberg ME. From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. *Neuron.* 2008 Sep 25;59(6):846-60.
97. Liu XB, Murray KD, Jones EG. Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development. *J Neurosci.* 2004 Oct 6;24(40):8885-95.
98. Kumar A. NMDA Receptor Function During Senescence: Implication on Cognitive Performance. *Front Neurosci.* 2015 Dec 16;9:473.

99. Gore AC, Oung T, Woller MJ. Age-related changes in hypothalamic gonadotropin-releasing hormone and N-methyl-D-aspartate receptor gene expression, and their regulation by oestrogen, in the female rat. *J Neuroendocrinol.* 2002 Apr;14(4):300-9.
100. Magnusson KR, Bai L, Zhao X. The effects of aging on different C-terminal splice forms of the zeta1(NR1) subunit of the N-methyl-d-aspartate receptor in mice. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005 Apr 27;135(1-2):141-9.
101. Das SR, Magnusson KR. Relationship between mRNA expression of splice forms of the zeta1 subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor and spatial memory in aged mice. *Brain Res.* 2008 May 1;1207:142-54.
102. Sonntag WE, Bennett SA, Khan AS, Thornton PL, Xu X, Ingram RL, Brunso-Bechtold JK. Age and insulin-like growth factor-1 modulate N-methyl-D-aspartate receptor subtype expression in rats. *Brain Res Bull.* 2000 Mar 1;51(4):331-8.
103. Zhao X, Rosenke R, Kronemann D, Brim B, Das SR, Dunah AW, Magnusson KR. The effects of aging on N-methyl-D-aspartate receptor subunits in the synaptic membrane and relationships to long-term spatial memory. *Neuroscience.* 2009 Sep 15;162(4):933-45.
104. Kumar A, Foster TC. Linking redox regulation of NMDAR synaptic function to cognitive decline during aging. *J Neurosci.* 2013 Oct 2;33(40):15710-5.
105. Foster TC. Dissecting the age-related decline on spatial learning and memory tasks in rodent models: N-methyl-D-aspartate receptors and voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels in senescent synaptic plasticity. *Prog Neurobiol.* 2012 Mar;96(3):283-303.
106. Philpot BD, Weisberg MP, Ramos MS, Sawtell NB, Tang YP, Tsien JZ, Bear MF. Effect of transgenic overexpression of NR2B on NMDA receptor function and synaptic plasticity in visual cortex. *Neuropharmacology.* 2001 Nov;41(6):762-70.
107. Wang M, Arnsten AF. Contribution of NMDA receptors to dorsolateral prefrontal cortical networks in primates. *Neurosci Bull.* 2015 Apr;31(2):191-7.
108. Funahashi S, Bruce CJ, Goldman-Rakic PS. Mnemonic coding of visual space in the monkey's dorsolateral prefrontal cortex. *J Neurophysiol.* 1989 Feb;61(2):331-49.
109. Goldman-Rakic PS. Cellular basis of working memory. *Neuron.* 1995 Mar;14(3):477-85.
110. Wang XJ. Synaptic reverberation underlying mnemonic persistent activity. *Trends Neurosci.* 2001 Aug;24(8):455-63.
111. Yang Y, Paspalas CD, Jin LE, Picciotto MR, Arnsten AF, Wang M. Nicotinic  $\alpha 7$  receptors enhance NMDA cognitive circuits in dorsolateral prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Jul 16;110(29):12078-83.
112. Wang ZC, Zhao J, Li S. Dysregulation of synaptic and extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptors induced by amyloid- $\beta$ . *Neurosci Bull.* 2013 Dec;29(6):752-60.
113. Tu S, Okamoto S, Lipton SA, Xu H. Oligomeric A $\beta$ -induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 2014 Nov 14;9:48.



114. Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci.* 2005 Aug;8(8):1051-8.
115. Ota H, Ogawa S, Ouchi Y, Akishita M. Protective effects of NMDA receptor antagonist, memantine, against senescence of PC12 cells: A possible role of nNOS and combined effects with donepezil. *Exp Gerontol.* 2015 Dec;72:109-16.
116. Stone JM. Imaging the glutamate system in humans: relevance to drug discovery for schizophrenia. *Curr Pharm Des.* 2009;15(22):2594-602.
117. Sharp FR, Tomitaka M, Bernaudin M, Tomitaka S. Psychosis: pathological activation of limbic thalamocortical circuits by psychomimetics and schizophrenia? *Trends Neurosci.* 2001 Jun;24(6):330-4.
118. Sodhi MS, Simmons M, McCullumsmith R, Haroutunian V, Meador-Woodruff JH. Glutamatergic gene expression is specifically reduced in thalamocortical projecting relay neurons in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2011 Oct 1;70(7):646-54.
119. Tomitaka S, Tomitaka M, Tolliver BK, Sharp FR. Bilateral blockade of NMDA receptors in anterior thalamus by dizocilpine (MK-801) injures pyramidal neurons in rat retrosplenial cortex. *Eur J Neurosci.* 2000 Apr;12(4):1420-30.
120. Egerton A, Stone JM, Chaddock CA, Barker GJ, Bonoldi I, Howard RM, Merritt K, Allen P, Howes OD, Murray RM, McLean MA, Lythgoe DJ, O'Gorman RL, McGuire PK. Relationship between brain glutamate levels and clinical outcome in individuals at ultra high risk of psychosis. *Neuropsychopharmacology.* 2014 Nov;39(12):2891-9.
121. Nishikawa T, Morita K, Kinjo K, Tsujimoto A. Stimulation of catecholamine release from isolated adrenal glands by some amino acids. *Jpn J Pharmacol.* 1982 Apr;32(2):291-7.
122. Moroni F, Luzzi S, Franchi-Micheli S, Zilletti L. The presence of N-methyl-D-aspartate-type receptors for glutamic acid in the guinea pig myenteric plexus. *Neurosci Lett.* 1986 Jul 11;68(1):57-62.
123. Morhenn VB, Waleh NS, Mansbridge JN, Unson D, Zolotarev A, Cline P, Toll L. Evidence for an NMDA receptor subunit in human keratinocytes and rat cardiocytes. *Eur J Pharmacol.* 1994 Aug 16;268(3):409-14.
124. Lin YJ, Bovetto S, Carver JM, Giordano T. Cloning of the cDNA for the human NMDA receptor NR2C subunit and its expression in the central nervous system and periphery. *Brain Res Mol Brain Res.* 1996 Dec 31;43(1-2):57-64.
125. Näsström J, Böö E, Ståhlberg M, Berge OG. Tissue distribution of two NMDA receptor antagonists, [3H]CGS 19755 and [3H]MK-801, after intrathecal injection in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 1993 Jan;44(1):9-15.
126. Leung JC, Travis BR, Verlander JW, Sandhu SK, Yang SG, Zea AH, Weiner ID, Silverstein DM. Expression and developmental regulation of the NMDA receptor subunits in the kidney and cardiovascular system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002 Oct;283(4):R964-71.

127. Seeber S, Becker K, Rau T, Eschenhagen T, Becker CM, Herkert M. Transient expression of NMDA receptor subunit NR2B in the developing rat heart. *J Neurochem.* 2000 Dec;75(6):2472-7.
128. LeMaistre JL, Sanders SA, Stobart MJ, Lu L, Knox JD, Anderson HD, Anderson CM. Coactivation of NMDA receptors by glutamate and D-serine induces dilation of isolated middle cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012 Mar;32(3):537-47.
129. Mothet JP, Pollegioni L, Ouanounou G, Martineau M, Fossier P, Baux G. Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Apr 12;102(15):5606-11.
130. Chen H, Fitzgerald R, Brown AT, Qureshi I, Breckenridge J, Kazi R, Wang Y, Wu Y, Zhang X, Mukunyadzi P, Eidt J, Moursi MM. Identification of a homocysteine receptor in the peripheral endothelium and its role in proliferation. *J Vasc Surg.* 2005 May;41(5):853-60.
131. Akanuma S, Sakurai T, Tachikawa M, Kubo Y, Hosoya K. Transporter-mediated L-glutamate elimination from cerebrospinal fluid: possible involvement of excitatory amino acid transporters expressed in ependymal cells and choroid plexus epithelial cells. *Fluids Barriers CNS.* 2015 Apr 29;12:11.
132. Lerma J, Herranz AS, Herreras O, Abaira V, Martín del Río R. In vivo determination of extracellular concentration of amino acids in the rat hippocampus. A method based on brain dialysis and computerized analysis. *Brain Res.* 1986 Oct 1;384(1):145-55.
133. McGee MA, Abdel-Rahman AA. Enhanced vascular neuronal nitric-oxide synthase-derived nitric-oxide production underlies the pressor response caused by peripheral N-methyl-D-aspartate receptor activation in conscious rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012 Aug;342(2):461-71.
134. Liu Y, Zhou L, Xu HF, Yan L, Ding F, Hao W, Cao JM, Gao X. A preliminary experimental study on the cardiac toxicity of glutamate and the role of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor in rats. *Chin Med J (Engl).* 2013 Apr;126(7):1323-32.
135. Bozic M, de Rooij J, Parisi E, Ortega MR, Fernandez E, Valdivielso JM. Glutamatergic signaling maintains the epithelial phenotype of proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol.* 2011 Jun;22(6):1099-111.
136. Fahlke C, Kortzak D, Machtens JP. Molecular physiology of EAAT anion channels. *Pflugers Arch.* 2016 Mar;468(3):491-502.
137. Magi S, Arcangeli S, Castaldo P, Nasti AA, Berrino L, Piegari E, Bernardini R, Amoroso S, Lariccia V. Glutamate-induced ATP synthesis: relationship between plasma membrane Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger and excitatory amino acid transporters in brain and heart cell models. *Mol Pharmacol.* 2013 Oct;84(4):603-14.

138. Ralphe JC, Segar JL, Schutte BC, Scholz TD. Localization and function of the brain excitatory amino acid transporter type 1 in cardiac mitochondria. *J Mol Cell Cardiol.* 2004 Jul;37(1):33-41.
139. Laketić-Ljubojević I, Suva LJ, Maathuis FJ, Sanders D, Skerry TM. Functional characterization of N-methyl-D-aspartic acid-gated channels in bone cells. *Bone.* 1999 Dec;25(6):631-7.
140. Bozic M, Valdivielso JM. The potential of targeting NMDA receptors outside the CNS. *Expert Opin Ther Targets.* 2015 Mar;19(3):399-413.
141. Shi S, Liu T, Li Y, Qin M, Tang Y, Shen JY, Liang J, Yang B, Huang C. Chronic N-methyl-D-aspartate receptor activation induces cardiac electrical remodeling and increases susceptibility to ventricular arrhythmias. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2014 Oct;37(10):1367-77.
142. Maldonado C, Soni CV, Todnem ND, Pushpakumar S, Rosenberger D, Givvimani S, Villafane J, Tyagi SC. Hyperhomocysteinemia and sudden cardiac death: potential arrhythmogenic mechanisms. *Curr Vasc Pharmacol.* 2010 Jan;8(1):64-74.
143. D'Amico M, Di Filippo C, Rossi F, Rossi F. Arrhythmias induced by myocardial ischaemia-reperfusion are sensitive to ionotropic excitatory amino acid receptor antagonists. *Eur J Pharmacol.* 1999 Feb 5;366(2-3):167-74.
144. Sun X, Zhong J, Wang D, Xu J, Su H, An C, Zhu H, Yan J. Increasing glutamate promotes ischemia-reperfusion-induced ventricular arrhythmias in rats in vivo. *Pharmacology.* 2014;93(1-2):4-9.
145. Gao X, Xu X, Pang J, Zhang C, Ding JM, Peng X, Liu Y, Cao JM. NMDA receptor activation induces mitochondrial dysfunction, oxidative stress and apoptosis in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Physiol Res.* 2007;56(5):559-69.
146. Tyagi N, Vacek JC, Givvimani S, Sen U, Tyagi SC. Cardiac specific deletion of N-methyl-d-aspartate receptor 1 ameliorates mtMMP-9 mediated autophagy/mitophagy in hyperhomocysteinemia. *J Recept Signal Transduct Res.* 2010 Apr;30(2):78-87.
147. Moshal KS, Tipparaju SM, Vacek TP, Kumar M, Singh M, Frank IE, Patibandla PK, Tyagi N, Rai J, Metreveli N, Rodriguez WE, Tseng MT, Tyagi SC. Mitochondrial matrix metalloproteinase activation decreases myocyte contractility in hyperhomocysteinemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 Aug;295(2):H890-7.
148. Meneghini A, Ferreira C, Abreu LC, Valenti VE, Ferreira M, F Filho C, Murad N. Memantine prevents cardiomyocytes nuclear size reduction in the left ventricle of rats exposed to cold stress. *Clinics (Sao Paulo).* 2009;64(9):921-6.
149. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol.* 1969 Jul;56(1):111-28.

150. McCully KS, Ragsdale BD. Production of arteriosclerosis by homocysteinemia. *Am J Pathol.* 1970 Oct;61(1):1-11.
151. McCully, K.S., Homocysteine theory of arteriosclerosis. Development and current status. In: Gotto, Jr. A.M., and Paoletti, R. (Eds.), *Atherosclerosis Reviews*, vol. 11, Raven Press, New York, 1983, pp. 157.
152. Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med.* 1991 Apr 25;324(17):1149-55.
153. Faraci FM, Lentz SR. Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction. *Stroke.* 2004 Feb;35(2):345-7.
154. Levonen AL, Lapatto R, Saksela M, Raivio KO. Human cystathionine gamma-lyase: developmental and in vitro expression of two isoforms. *Biochem J.* 2000 Apr 1;347 Pt 1:291-5.
155. Obeid R, Herrmann W. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Lett.* 2006 May 29;580(13):2994-3005.
156. Herrmann W, Herrmann M, Joseph J, Tyagi SC. Homocysteine, brain natriuretic peptide and chronic heart failure: a critical review. *Clin Chem Lab Med.* 2007;45(12):1633-44.
157. Folbergrová J. NMDA and not non-NMDA receptor antagonists are protective against seizures induced by homocysteine in neonatal rats. *Exp Neurol.* 1994 Dec;130(2):344-50.
158. Tyagi N, Mishra PK, Tyagi SC. Homocysteine, hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) and NMDA-receptor in heart failure. *Indian J Biochem Biophys.* 2009 Dec;46(6):441-6.
159. Chang PY, Lu SC, Lee CM, Chen YJ, Dugan TA, Huang WH, Chang SF, Liao WS, Chen CH, Lee YT. Homocysteine inhibits arterial endothelial cell growth through transcriptional downregulation of fibroblast growth factor-2 involving G protein and DNA methylation. *Circ Res.* 2008 Apr 25;102(8):933-41.
160. Austin RC, Lentz SR, Werstuck GH. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. *Cell Death Differ.* 2004 Jul;11 Suppl 1:S56-64.
161. Tyagi N, Sedoris KC, Steed M, Ovechkin AV, Moshal KS, Tyagi SC. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 89:H2649–56.
162. Kamat PK, Kalani A, Tyagi SC, Tyagi N. Hydrogen Sulfide Epigenetically Attenuates Homocysteine-Induced Mitochondrial Toxicity Mediated Through NMDA Receptor in Mouse Brain Endothelial (bEnd3) Cells. *J Cell Physiol.* 2015 Feb;230(2):378-94.
163. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002 Jan;82(1):47-95.

164. Halliwell B, Gutteridge JMC (2006) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4. Clarendon Press, Oxford
165. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006 Jun;141(2):312-22.
166. Symons MC. Radicals generated by bone cutting and fracture. *Free Radic Biol Med.* 1996;20(6):831-5.
167. Đukić M, Ninković M, Jovanović M. Oxidative stress: Clinical diagnostic significance. *Journal of Medical Biochemistry* 2008;27(4):409-425.
168. Simon JN, Ziberna K, Casadei B. Compromised redox homeostasis, altered nitroso-redox balance, and therapeutic possibilities in atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 2016 Apr 1;109(4):510-8.
169. Watabe S, Hiroi T, Yamamoto Y, Fujioka Y, Hasegawa H, Yago N, Takahashi SY. SP-22 is a thioredoxin-dependent peroxide reductase in mitochondria. *Eur J Biochem.* 1997 Oct 1;249(1):52-60.
170. Esposito LA, Kokoszka JE, Waymire KG, Cottrell B, MacGregor GR, Wallace DC. Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene. *Free Radic Biol Med.* 2000 Mar 1;28(5):754-66.
171. Khan SA, Lee K, Minhas KM, Gonzalez DR, Raju SV, Tejani AD, Li D, Berkowitz DE, Hare JM. Neuronal nitric oxide synthase negatively regulates xanthine oxidoreductase inhibition of cardiac excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Nov 9;101(45):15944-8.
172. Idigo WO, Reilly S, Zhang MH, Zhang YH, Jayaram R, Carnicer R, Crabtree MJ, Balligand JL, Casadei B. Regulation of endothelial nitric-oxide synthase (NOS) S-glutathionylation by neuronal NOS: evidence of a functional interaction between myocardial constitutive NOS isoforms. *J Biol Chem.* 2012 Dec 21;287(52):43665-73.
173. Kim YM, Guzik TJ, Zhang YH, Zhang MH, Kattach H, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM, Casadei B. A myocardial Nox2 containing NAD(P)H oxidase contributes to oxidative stress in human atrial fibrillation. *Circ Res.* 2005 Sep 30;97(7):629-36.
174. Kim YM, Kattach H, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM, Casadei B. Association of atrial nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity with the development of atrial fibrillation after cardiac surgery. *J Am Coll Cardiol.* 2008 Jan 1;51(1):68-74.
175. Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol.* 2008 May;4(5):278-86.
176. Simon JN, Duglan D, Casadei B, Carnicer R. Nitric oxide synthase regulation of cardiac excitation-contraction coupling in health and disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2014 Aug;73:80-91.

177. Kohr MJ, Sun J, Aponte A, Wang G, Gucek M, Murphy E, Steenbergen C. Simultaneous measurement of protein oxidation and S-nitrosylation during preconditioning and ischemia/reperfusion injury with resin-assisted capture. *Circ Res*. 2011 Feb 18;108(4):418-26.
178. Purohit A, Rokita AG, Guan X, Chen B, Koval OM, Voigt N, Neef S, Sowa T, Gao Z, Luczak ED, Stefansdottir H, Behunin AC, Li N, El-Accaoui RN, Yang B, Swaminathan PD, Weiss RM, Wehrens XH, Song LS, Dobrev D, Maier LS, Anderson ME. Oxidized Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II triggers atrial fibrillation. *Circulation*. 2013 Oct 15;128(16):1748-57.
179. Linton MF, Yancey PG, Davies SS, Jerome WGJ, Linton EF, Vickers KC. The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. 2015 Dec 24. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Koch C, McLachlan R, New M, Rebar R, Singer F, Vinik A, Weickert MO, editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK343489/>
180. Dudley SC Jr, Hoch NE, McCann LA, Honeycutt C, Diamandopoulos L, Fukai T, Harrison DG, Dikalov SI, Langberg J. Atrial fibrillation increases production of superoxide by the left atrium and left atrial appendage: role of the NADPH and xanthine oxidases. *Circulation*. 2005 Aug 30;112(9):1266-73.
181. Gutteridge JM. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact*. 1994 Jun;91(2-3):133-40.
182. Dröse S, Brandt U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv Exp Med Biol*. 2012;748:145-69.
183. Pospíšil P. Molecular mechanisms of production and scavenging of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1817(1):218-31.
184. Schramm A, Matusik P, Osmenda G, Guzik TJ. Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology. *Vascul Pharmacol*. 2012 May-Jun;56(5-6):216-31.
185. Guzik B, Sagan A, Ludew D, Mrowiecki W, Chwała M, Bujak-Gizycka B, Filip G, Grudzien G, Kapelak B, Zmudka K, Mrowiecki T, Sadowski J, Korbut R, Guzik TJ. Mechanisms of oxidative stress in human aortic aneurysms--association with clinical risk factors for atherosclerosis and disease severity. *Int J Cardiol*. 2013 Oct 3;168(3):2389-96.
186. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Bátkai S, Kashiwaya Y, Haskó G, Liaudet L, Szabó C, Pacher P. Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 May;296(5):H1466-83.
187. Chen YR, Zweier JL. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circ Res*. 2014 Jan 31;114(3):524-37.
188. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science*. 1978 Sep 8;201(4359):875-80.

189. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot.* 2003 Jan;91 Spec No:179-94.
190. Foote CS, Valentine JS, Greenberg A, Liebman JF, editors (1985) *Active Oxygen in Chemistry*. Chapman and Hall, New York
191. Gracanin M, Hawkins CL, Pattison DI, Davies MJ. Singlet-oxygen-mediated amino acid and protein oxidation: formation of tryptophan peroxides and decomposition products. *Free Radic Biol Med.* 2009 Jul 1;47(1):92-102.
192. Guo H, Qian H, Idris NM, Zhang Y. Singlet oxygen-induced apoptosis of cancer cells using upconversion fluorescent nanoparticles as a carrier of photosensitizer. *Nanomedicine.* 2010 Jun;6(3):486-95.
193. Nam TW, Ziegelhoffer EC, Lemke RA, Donohue TJ. Proteins needed to activate a transcriptional response to the reactive oxygen species singlet oxygen. *MBio.* 2013 Jan 8;4(1):e00541-12.
194. Gao W, Su Z, Liu Q, Zhou L. State-dependent and site-directed photodynamic transformation of HCN2 channel by singlet oxygen. *J Gen Physiol.* 2014 May;143(5):633-44.
195. DeRosa MC, Crutchley RJ. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord. Chem. Rev.* 233-234 (2002) 351-371
196. Ishihara M, Fujisawa S. Review. Photooxygenation, photodegradation and antioxidative activity of platonin, a cyanine photosensitizing dye. *In Vivo.* 2007 Mar-Apr;21(2):163-73
197. Holt NE, Zigmantas D, Valkunas L, Li XP, Niyogi KK, Fleming GR. Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting. *Science.* 2005 Jan 21;307(5708):433-6
198. Zhou Y, Liang X, Dai Z. Porphyrin-loaded nanoparticles for cancer theranostics. *Nanoscale.* 2016 Jan 5.
199. Bugaj AM. Vascular targeted photochemotherapy using padoporfin and padeliporfin as a method of the focal treatment of localised prostate cancer - clinician's insight. *World J Methodol.* 2016 Mar 26;6(1):65-76.
200. Lamberti MJ, Vittar NB, Rivarola VA. Breast cancer as photodynamic therapy target: Enhanced therapeutic efficiency by overview of tumor complexity. *World J Clin Oncol.* 2014 Dec 10;5(5):901-7
201. Gandhi SA, Kampp J. *Skin Cancer Epidemiology, Detection, and Management.* *Med Clin North Am.* 2015 Nov;99(6):1323-35.
202. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:97-112.
203. Del Río LA, López-Huertas E. ROS Generation in Peroxisomes and its Role in Cell Signaling. *Plant Cell Physiol.* 2016 Apr 14. pii: pcw076.
204. Netto LE, Antunes F. The Roles of Peroxiredoxin and Thioredoxin in Hydrogen Peroxide Sensing and in Signal Transduction. *Mol Cells.* 2016 Jan 31;39(1):65-71.

205. van der Vliet A, Janssen-Heininger YM. Hydrogen peroxide as a damage signal in tissue injury and inflammation: murderer, mediator, or messenger? *J Cell Biochem.* 2014 Mar;115(3):427-35.
206. Haber F, Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc Lond A* 1934; 147: 332–51
207. Koppenol WH. The Haber-Weiss cycle--70 years later. *Redox Rep.* 2001;6(4):229-34.
208. Shlyonsky V, Boom A, Mies F. Hydrogen Peroxide and Sodium Transport in the Lung and Kidney. *Biomed Res Int.* 2016;2016:9512807.
209. Schrader M, Fahimi HD. Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol.* 2004 Oct;122(4):383-93.
210. Brigelius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med.* 1999 Nov;27(9-10):951-65.
211. Rhee SG, Chae HZ, Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med.* 2005 Jun 15;38(12):1543-52.
212. Chen X, Guo C, Kong J. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res.* 2012 Feb 15;7(5):376-85.
213. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996 Nov;271(5 Pt 1):C1424-37.
214. Janzen EG, Wilcox AL, Manoharan V. Reactions of nitric oxide with phenolic antioxidants and phenoxyl radicals. *J Org Chem* 1993; 58:3597-3599.
215. Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation.* 2006 Apr 4;113(13):1708-14.
216. Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, Flores-Santana W, Switzer CH, Donzelli S, Hussain P, Vecoli C, Paolocci N, Ambs S, Colton CA, Harris CC, Roberts DD, Wink DA. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med.* 2008 Jul 1;45(1):18-31.
217. Mangge H, Becker K, Fuchs D, Gostner JM. Antioxidants, inflammation and cardiovascular disease. *World J Cardiol.* 2014 Jun 26;6(6):462-77.
218. Squadrito GL, Cueto R, Splenser AE, Valavanidis A, Zhang H, Uppu RM, Pryor WA. Reaction of uric acid with peroxynitrite and implications for the mechanism of neuroprotection by uric acid. *Arch Biochem Biophys.* 2000 Apr 15;376(2):333-7
219. Denicola A, Freeman BA, Trujillo M, Radi R. Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch Biochem Biophys.* 1996 Sep 1;333(1):49-58
220. Fam SS, Morrow JD. The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation-a review. *Curr Med Chem.* 2003 Sep;10(17):1723-40.
221. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 1984 Apr 1;219(1):1-14.



222. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991;11(1):81-128.
223. Czerska M, Mikołajewska K, Zieliński M, Gromadzińska J, Wąsowicz W. Today's oxidative stress markers. *Med Pr.* 2015;66(3):393-405.
224. Đukić MM. Antioksidativna zaštita i preparati sa antioksidativnim delovanjem. U: Oksidativni stres – slobodni radikali, prooksidansi i antioksidansi. Urednik. Mirjana Đukić. Izdavač: MONO I MANJANA, Beograd 2008; 67–95.
225. Cohen G. Enzymatic/nonenzymatic sources of oxyradicals and regulation of antioxidant defenses. *Ann N Y Acad Sci.* 1994 Nov 17;738:8-14.
226. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.* 1990 Jul;280(1):1-8.
227. Bowler C, Van Montagu M, Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Biology.* 1992;43:83–116.
228. Klug D, Rabani J, Fridovich I. A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. *J Biol Chem* 1972;247:4839–4842.
229. Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem.* 1987;22(2):111-80.
230. Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Dec;79(24):7634-8.
231. Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med.* 2009 Aug 15;47(4):344-56.
232. Banerjee M, Vats P. Reactive metabolites and antioxidant gene polymorphisms in Type 2 diabetes mellitus. *Redox Biol.* 2013 Dec 11;2C:170-177
233. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969 Nov 25;244(22):6049-55.
234. Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem.* 2001 Oct 19;276(42):38388-93.
235. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 1993 Mar 4;362(6415):59-62.
236. Tafuri F, Ronchi D, Magri F, Comi GP, Corti S. SOD1 misplacing and mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis. *Front Cell Neurosci.* 2015 Aug 25;9:336.

237. Elchuri S, Oberley TD, Qi W, Eisenstein RS, Jackson Roberts L, Van Remmen H, Epstein CJ, Huang TT. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene*. 2005 Jan 13;24(3):367-80.
238. Melov S, Schneider JA, Day BJ, Hinerfeld D, Coskun P, Mirra SS, Crapo JD, Wallace DC. A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nat Genet*. 1998 Feb;18(2):159-63.
239. Oberley LW, Buettner GR. Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer Res*. 1979 Apr;39(4):1141-9.
240. Oberley LW, Oberley TD, Buettner GR. Cell differentiation, aging and cancer: the possible roles of superoxide and superoxide dismutases. *Med Hypotheses*. 1980 Mar;6(3):249-68.
241. Oberley LW, Oberley TD, Buettner GR. Cell differentiation, aging and cancer: the possible roles of superoxide and superoxide dismutases. *Med Hypotheses*. 1980 Mar;6(3):249-68.
242. Li JJ, Oberley LW, St Clair DK, Ridnour LA, Oberley TD. Phenotypic changes induced in human breast cancer cells by overexpression of manganese-containing superoxide dismutase. *Oncogene*. 1995 May 18;10(10):1989-2000.
243. Zhong W, Oberley LW, Oberley TD, St Clair DK. Suppression of the malignant phenotype of human glioma cells by overexpression of manganese superoxide dismutase. *Oncogene*. 1997 Jan 30;14(4):481-90.
244. Miriyala S, Spasojevic I, Tovmasyan A, Salvemini D, Vujaskovic Z, St Clair D, Batinic-Haberle I. Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics. *Biochim Biophys Acta*. 2012 May;1822(5):794-814.
245. Gregory EM, Fridovich I. Oxygen toxicity and the superoxide dismutase. *J Bacteriol*. 1973 Jun;114(3):1193-7.
246. Saltzman HA, Fridovich I. Editorial: Oxygen toxicity. Introduction to a protective enzyme: superoxide dismutase. *Circulation*. 1973 Nov;48(5):921-3.
247. Jung O, Marklund SL, Geiger H, Pedrazzini T, Busse R, Brandes RP. Extracellular superoxide dismutase is a major determinant of nitric oxide bioavailability: in vivo and ex vivo evidence from ecSOD-deficient mice. *Circ Res*. 2003 Oct 3;93(7):622-9.
248. Gongora MC, Qin Z, Laude K, Kim HW, McCann L, Folz JR, Dikalov S, Fukui T, Harrison DG. Role of extracellular superoxide dismutase in hypertension. *Hypertension*. 2006 Sep;48(3):473-81.
249. Qin Z, Reszka KJ, Fukui T, Weintraub NL. Extracellular superoxide dismutase (ecSOD) in vascular biology: an update on exogenous gene transfer and endogenous regulators of ecSOD. *Transl Res*. 2008 Feb;151(2):68-78.
250. Oury TD, Day BJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase in vessels and airways of humans and baboons. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(7):957-65.

251. Strålin P, Karlsson K, Johansson BO, Marklund SL. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995 Nov;15(11):2032-6.
252. Bivalacqua TJ, Usta MF, Kendirici M, Pradhan L, Alvarez X, Champion HC, Kadowitz PJ, Hellstrom WJ. Superoxide anion production in the rat penis impairs erectile function in diabetes: influence of in vivo extracellular superoxide dismutase gene therapy. *J Sex Med.* 2005 Mar;2(2):187-97; discussion 197-8.
253. Brown KA, Chu Y, Lund DD, Heistad DD, Faraci FM. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase protects against vascular dysfunction with aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006 Jun;290(6):H2600-5.
254. Chu Y, Iida S, Lund DD, Weiss RM, DiBona GF, Watanabe Y, Faraci FM, Heistad DD. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase reduces arterial pressure in spontaneously hypertensive rats: role of heparin-binding domain. *Circ Res.* 2003 Mar 7;92(4):461-8.
255. Patel MK, Refson JS, Schachter M, Hughes AD. Characterization of [<sup>3</sup>H]-heparin binding in human vascular smooth muscle cells and its relationship to the inhibition of DNA synthesis. *Br J Pharmacol.* 1999 May;127(2):361-8.
256. Karlsson K, Marklund SL. Heparin-induced release of extracellular superoxide dismutase to human blood plasma. *Biochem J.* 1987 Feb 15;242(1):55-9.
257. Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, Adam O, Grohé C, Laufs K, Böhm M, Nickenig G. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res.* 2003 Jul 25;93(2):170-7.
258. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Griendling KK, Harrison DG. Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. *Circ Res.* 1999 Jul 9;85(1):23-8.
259. Welch WJ, Chabrashvili T, Solis G, Chen Y, Gill PS, Aslam S, Wang X, Ji H, Sandberg K, Jose P, Wilcox CS. Role of extracellular superoxide dismutase in the mouse angiotensin slow pressor response. *Hypertension.* 2006 Nov;48(5):934-41.
260. Wilcken DE, Wang XL, Adachi T, Hara H, Duarte N, Green K, Wilcken B. Relationship between homocysteine and superoxide dismutase in homocystinuria: possible relevance to cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 May;20(5):1199-202.
261. Zamocky M, Furtmüller PG, Obinger C. Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxid Redox Signal.* 2008 Sep;10(9):1527-48.
262. Chen H, Yu M, Li M, Zhao R, Zhu Q, Zhou W, Lu M, Lu Y, Zheng T, Jiang J, Zhao W, Xiang K, Jia W, Liu L. Polymorphic variations in manganese superoxide dismutase (MnSOD), glutathione peroxidase-1 (GPX1), and catalase (CAT) contribute to elevated plasma triglyceride levels in Chinese patients with type 2 diabetes or diabetic cardiovascular disease. *Mol Cell Biochem.* 2012 Apr;363(1-2):85-91.

263. Couto N, Wood J, Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med.* 2016 Feb 26;95:27-42.
264. Prabhakar R, Morokuma K, Musaev DG. Peroxynitrite reductase activity of selenoprotein glutathione peroxidase: a computational study. *Biochemistry.* 2006 Jun 6;45(22):6967-77.
265. Ramprasath T, Murugan PS, Kalaiarasan E, Gomathi P, Rathinavel A, Selvam GS. Genetic association of Glutathione peroxidase-1 (GPx-1) and NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1(NQO1) variants and their association of CAD in patients with type-2 diabetes. *Mol Cell Biochem.* 2012 Feb;361(1-2):143-50.
266. Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2011 Jun;50(6):940-50.
267. Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflügers Arch* 1895;61:291-332.
268. Döring HJ. The isolated perfused heart according to Langendorff technique--function--application. *Physiol Bohemoslov.* 1990;39(6):481-504.
269. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95:351-8.
270. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982; 126:131-8.
271. Auclair C, Voisin E (1985). Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research.* CRC Press Une, Boca Raton, pp 123-132.
272. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods.* 1980; 38:161-70.
273. Akgül G, McBain CJ. Diverse roles for ionotropic glutamate receptors on inhibitory interneurons in developing and adult brain. *J Physiol.* 2016 Feb 25. doi: 10.1113/JP271764.
274. Guntupalli S, Widagdo J, Anggono V. Amyloid- $\beta$ -Induced Dysregulation of AMPA Receptor Trafficking. *Neural Plast.* 2016;2016:3204519.
275. Kim YK, Na KS. Role of glutamate receptors and glial cells in the pathophysiology of treatment-resistant depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2016 Apr 1. pii: S0278-5846(16)30036-7.
276. Hardingham GE, Bading H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2010 Oct;11(10):682-96.
277. Wang HD, Lü XX, Lu DX, Qi RB, Wang YP, Fu YM, Wang LW. Glycine inhibits the LPS-induced increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration and TNF $\alpha$  production in cardiomyocytes by activating a glycine receptor. *Acta Pharmacol Sin.* 2009 Aug;30(8):1107-14.

278. Qi RB, Zhang JY, Lu DX, Wang HD, Wang HH, Li CJ. Glycine receptors contribute to cytoprotection of glycine in myocardial cells. *Chin Med J (Engl)*. 2007 May 20;120(10):915-21.
279. Qi RB, Lu DX, Wang HD, Zhou H, Wang HH, Li CJ. Effect of glycine on endotoxin-induced myocardial cell injury of the isolated rat heart. *Chin Pharmacol Bull* 2005; 21: 738–41.
280. McCarty MF, Barroso-Aranda J, Contreras F. The hyperpolarizing impact of glycine on endothelial cells may be anti-atherogenic. *Med Hypotheses*. 2009 Aug;73(2):263-4.
281. Zhang JY, Lu DX, Qi RB, Wang HD, Wang YP, Fu YM, Chen MF, Zhao X, Li CJ. Expression of glycine receptor in rat cardiomyocytes. *Chin J Pathophysiol* 2006; 22: 1070–3.
282. Ruiz-Meana M, Pina P, Garcia-Dorado D, Rodríguez-Sinovas A, Barba I, Miró-Casas E, Mirabet M, Soler-Soler J. Glycine protects cardiomyocytes against lethal reoxygenation injury by inhibiting mitochondrial permeability transition. *J Physiol*. 2004 Aug 1;558(Pt 3):873-82.
283. Zhong X, Li X, Qian L, Xu Y, Lu Y, Zhang J, Li N, Zhu X, Ben J, Yang Q, Chen Q. Glycine attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting myocardial apoptosis in rats. *J Biomed Res*. 2012 Sep;26(5):346-54.
284. Gusev EI, Skvortsova VI, Dambinova SA, Raevskiy KS, Alekseev AA, Bashkatova VG, Kovalenko AV, Kudrin VS, Yakovleva EV. Neuroprotective effects of glycine for therapy of acute ischaemic stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2000 Jan-Feb;10(1):49-60.
285. Jiang L, Qin X, Zhong X, Liu L, Jiang L, Lu Y, Fan L, He Z, Chen Q. Glycine-induced cytoprotection is mediated by ERK1/2 and AKT in renal cells with ATP depletion. *Eur J Cell Biol*. 2011 Apr;90(4):333-41.
286. Juo P, Kuo CJ, Reynolds SE, Konz RF, Raingeaud J, Davis RJ, Biemann HP, Blenis J. Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway requires ICE/CED-3 family proteases. *Mol Cell Biol*. 1997 Jan;17(1):24-35. Erratum in: *Mol Cell Biol* 1997 Mar;17(3):1757.
287. Farley N, Pedraza-Alva G, Serrano-Gomez D, Nagaleekar V, Aronshtam A, Krahl T, Thornton T, Rincón M. p38 mitogen-activated protein kinase mediates the Fas-induced mitochondrial death pathway in CD8+ T cells. *Mol Cell Biol*. 2006 Mar;26(6):2118-29.
288. Hama-Inaba H, Choi KH, Wang B, Haginoya K, Yamada T, Hayata I, Ohyama H. Fas-independent apoptosis induced by UVC in p53-mutated human epithelial tumor A431 cells through activation of caspase-8 and JNK/SAPK. *J Radiat Res*. 2001 Jun;42(2):201-15.
289. Moshal KS, Kumar M, Tyagi N, Mishra PK, Metreveli N, Rodriguez WE, Tyagi SC. Restoration of contractility in hyperhomocysteinemia by cardiac-specific deletion of NMDA-R1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Mar;296(3):H887-92.

290. Lindsey ML, Escobar GP, Mukherjee R, Goshorn DK, Sheats NJ, Bruce JA, Mains IM, Hendrick JK, Hewett KW, Gourdie RG, Matrisian LM, Spinale FG. Matrix metalloproteinase-7 affects connexin-43 levels, electrical conduction, and survival after myocardial infarction. *Circulation*. 2006 Jun 27;113(25):2919-28.
291. Chapp AD, Gui L, Huber MJ, Liu J, Larson RA, Zhu J, Carter JR, Chen QH. Sympathoexcitation and pressor responses induced by ethanol in the central nucleus of amygdala involves activation of NMDA receptors in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014 Sep 1;307(5):H701-9.
292. Camargo LH, Alves FH, Biojone C, Correa FM, Resstel LB, Crestani CC. Involvement of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor and nitric oxide in cardiovascular responses to dynamic exercise in rats. *Eur J Pharmacol*. 2013 Aug 5;713(1-3):16-24.
293. Girouard H, Wang G, Gallo EF, Anrather J, Zhou P, Pickel VM, Iadecola C. NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2. *J Neurosci*. 2009 Feb 25;29(8):2545-52.
294. Qureshi I, Chen H, Brown AT, Fitzgerald R, Zhang X, Breckenridge J, Kazi R, Crocker AJ, Stühlinger MC, Lin K, Cooke JP, Eidt JF, Moursi MM. Homocysteine-induced vascular dysregulation is mediated by the NMDA receptor. *Vasc Med*. 2005 Aug;10(3):215-23.
295. Elliott WJ, Ram CV. Calcium channel blockers. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2011 Sep;13(9):687-9.
296. Lieu PB, Fornari M, Ramos T, Hatcher AS, Clements-Jewery H. Reduced antiarrhythmic efficacy of verapamil in isolated rat hearts in the presence of elevated extracellular calcium. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011 Apr;57(4):455-62.
297. Henderson KA, Borders RB, Ross JB, Huwar TB, Travis CO, Wood BJ, Ma ZJ, Hong SP, Vinci TM, Roche BM (2013) Effects of tyrosine kinase inhibitors on rat isolated heart function and protein biomarkers indicative of toxicity. *J Pharmacol Toxicol Methods* 68:150-159.
298. Hayakawa T, Kunihiro T, Ando T, Kobayashi S, Matsui E, Yada H, Kanda Y, Kurokawa J, Furukawa T (2014) Image-based evaluation of contraction-relaxation kinetics of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: Correlation and complementarity with extracellular electrophysiology. *J Mol Cell Cardiol* 77:178-191.
299. Xie F, Yi SL, Hao L, Zhang Y, Zhong JQ. Role of group I metabotropic glutamate receptors, mGluR1/mGluR5, in connexin43 phosphorylation and inhibition of gap junctional intercellular communication in H9c2 cardiomyoblast cells. *Mol Cell Biochem*. 2015 Feb;400(1-2):213-22.
300. Rajendra S, Lynch JW, Schofield PR. The glycine receptor. *Pharmacol Ther*. 1997;73(2):121-46.

301. Froh M, Thurman RG, Wheeler MD. Molecular evidence for a glycine-gated chloride channel in macrophages and leukocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002 Oct;283(4):G856-63.
302. Díaz-Flores M, Cruz M, Duran-Reyes G, Munguia-Miranda C, Loza-Rodríguez H, Pulido-Casas E, Torres-Ramírez N, Gaja-Rodríguez O, Kumate J, Baiza-Gutman LA, Hernández-Saavedra D. Oral supplementation with glycine reduces oxidative stress in patients with metabolic syndrome, improving their systolic blood pressure. *Can J Physiol Pharmacol.* 2013 Oct;91(10):855-60.
303. Ruiz-Ramírez A, Ortiz-Balderas E, Cardozo-Saldaña G, Diaz-Diaz E, El-Hafidi M. Glycine restores glutathione and protects against oxidative stress in vascular tissue from sucrose-fed rats. *Clin Sci (Lond).* 2014 Jan 1;126(1):19-29.
304. Wang W, Wu Z, Dai Z, Yang Y, Wang J, Wu G. Glycine metabolism in animals and humans: implications for nutrition and health. *Amino Acids.* 2013 Sep;45(3):463-77.
305. Vacek TP, Vacek JC, Tyagi SC. Mitochondrial mitophagic mechanisms of myocardial matrix metabolism and remodelling. *Arch Physiol Biochem.* 2012 Feb;118(1):31-42.
306. Xu YJ, Elimban V, Dhalla NS. Reduction of blood pressure by store-operated calcium channel blockers. *J Cell Mol Med.* 2015 Dec;19(12):2763-70.
307. Abernethy DR, Schwartz JB. Calcium-antagonist drugs. *N Engl J Med.* 1999 Nov 4;341(19):1447-57.
308. Zhou P, Zhang SM, Wang QL, Wu Q, Chen M, Pei JM. Anti-arrhythmic effect of verapamil is accompanied by preservation of cx43 protein in rat heart. *PLoS One.* 2013 Aug 12;8(8):e71567.
309. Zhu DY, Zhou LM, Zhang YY, Huang JQ, Pan X, Lou YJ. Involvement of metabotropic glutamate receptor 5 in cardiomyocyte differentiation from mouse embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 2012 Aug 10;21(12):2130-41.
310. Mishra RC, Tripathy S, Quest D, Desai KM, Akhtar J, Dattani ID, Gopalakrishnan V. L-Serine lowers while glycine increases blood pressure in chronic L-NAME-treated and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2008 Dec;26(12):2339-48.
311. Jennings A, MacGregor A, Welch A, Chowienczyk P, Spector T, Cassidy A. Amino Acid Intakes Are Inversely Associated with Arterial Stiffness and Central Blood Pressure in Women. *J Nutr.* 2015 Sep;145(9):2130-8.
312. Stamler J, Brown IJ, Daviglus ML, Chan Q, Miura K, Okuda N, Ueshima H, Zhao L, Elliott P. Dietary glycine and blood pressure: the International Study on Macro/Micronutrients and Blood Pressure. *Am J Clin Nutr.* 2013 Jul;98(1):136-45.
313. Nagata C, Wada K, Tamura T, Kawachi T, Konishi K, Tsuji M, Nakamura K. Dietary intakes of glutamic acid and glycine are associated with stroke mortality in Japanese adults. *J Nutr.* 2015 Apr;145(4):720-8.

314. Lu HJ, Li MH, Li MZ, Park SE, Kim MS, Jin YZ, Park BR. Functional Connections of the Vestibulo-spino-adrenal Axis in the Control of Blood Pressure Via the Vestibulosympathetic Reflex in Conscious Rats. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2015 Sep;19(5):427-34.
315. Glass MJ, Wang G, Coleman CG, Chan J, Ogorodnik E, Van Kempen TA, Milner TA, Butler SD, Young CN, Davisson RL, Iadecola C, Pickel VM. NMDA Receptor Plasticity in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus Contributes to the Elevated Blood Pressure Produced by Angiotensin II. *J Neurosci*. 2015 Jul 1;35(26):9558-67.
316. Srejavic I, Jakovljevic V, Zivkovic V, Barudzic N, Radovanovic A, Stanojlovic O, Djuric DM. The effects of the modulation of NMDA receptors by homocysteine thiolactone and dizocilpine on cardiodynamics and oxidative stress in isolated rat heart. *Mol Cell Biochem*. 2015 Mar;401(1-2):97-105.
317. Grossman E, Messerli FH. Calcium antagonists. *Prog Cardiovasc Dis*. 2004 Jul-Aug;47(1):34-57.
318. Bragança B, Oliveira-Monteiro N, Ferreirinha F, Lima PA, Faria M, Fontes-Sousa AP, Correia-de-Sá P. Ion Fluxes through KCa<sub>2</sub> (SK) and Cav1 (L-type) Channels Contribute to Chronoselectivity of Adenosine A<sub>1</sub> Receptor-Mediated Actions in Spontaneously Beating Rat Atria. *Front Pharmacol*. 2016 Mar 7;7:45.
319. Santini CO, Fassini A, Scopinho AA, Busnardo C, Corrêa FM, Resstel LB. The ventral hippocampus NMDA receptor/nitric oxide/guanylate cyclase pathway modulates cardiovascular responses in rats. *Auton Neurosci*. 2013 Oct;177(2):244-52.
320. Busnardo C, Ferreira-Junior NC, Cruz JC, Machado BH, Correa FM, Resstel LB. Cardiovascular responses to ATP microinjected into the paraventricular nucleus are mediated by nitric oxide and NMDA glutamate receptors in awake rats. *Exp Physiol*. 2013 Oct;98(10):1411-21.
321. Fusi F, Sgaragli G, Saponara S. Mechanism of myricetin stimulation of vascular L-type Ca<sup>2+</sup> current. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005 May;313(2):790-7.
322. Amico-Ruvio SA, Popescu GK. Stationary gating of GluN1/GluN2B receptors in intact membrane patches. *Biophys J*. 2010 Apr 7;98(7):1160-9.
323. Faruk Akturk I, Arif Yalcin A, Biyik I, Sarikamis C, Turhan Caglar N, Erturk M, Celik O, Uzun F, Murat Caglar I, Oner E. Effects of verapamil and adenosine in an adjunct to tirofiban on resolution and prognosis of noreflow phenomenon in patients with acute myocardial infarction. *Minerva Cardioangiol*. 2014 Oct;62(5):389-97.
324. Ok SH, Kwon SC, Kang S, Choi MJ, Sohn JT. Mepivacaine-induced intracellular calcium increase appears to be mediated primarily by calcium influx in rat aorta without endothelium. *Korean J Anesthesiol*. 2014 Dec;67(6):404-11.
325. Hama-Tomioka K, Kinoshita H, Nakahata K, Kondo T, Azma T, Kawahito S, Hatakeyama N, Matsuda N. Roles of neuronal nitric oxide synthase, oxidative stress, and propofol in N-methyl-D-aspartate-induced dilatation of cerebral arterioles. *Br J Anaesth*. 2012 Jan;108(1):21-9.



326. LeMaistre JL, Sanders SA, Stobart MJ, Lu L, Knox JD, Anderson HD, Anderson CM. Coactivation of NMDA receptors by glutamate and D-serine induces dilation of isolated middle cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012 Mar;32(3):537-47.