



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

**Ефекти хиперхомоцистеинемije на функцију миокарда,  
коронарну циркулацију и редокс статус изолованог срца  
пацова: улога инхибитора хидрокси метил-глутарил коензим-  
А (HMG-CoA) редуктазе**

Докторска дисертација

Др Тамара Р. Николић

Ментор: Доц. др Владимир Живковић

Крагујевац, 2017. године

# САДРЖАЈ

1. УВОД .....	6
1.1. АМИНОКИСЕЛИНА ХОМОЦИСТЕИН - ОТКРИЋЕ, ХЕМИЈСКА СТРУКТУРА И КАРАКТЕРИСТИКЕ .....	6
1.1.1. Откриће аминокиселине хомоцистеина .....	6
1.1.2. Хемијска структура и карактеристике аминокиселине хомоцистеина .....	7
1.2. МЕТАБОЛИЗАМ ХОМОЦИСТЕИНА .....	9
1.3. ДЕФЕКТИ У МЕТАБОЛИЗМУ ХОМОЦИСТЕИНА .....	11
1.3.1. Дефиниција хиперхомоцистеинемije .....	11
1.3.2. Генетски дефекти као узрочници хиперхомоцистеинемije .....	12
1.3.2. Нутритивни фактори као узрочници хиперхомоцистеинемije .....	13
1.3.3. Остали фактори као узрочници хиперхомоцистеинемije .....	24
1.4. ХИПЕРХОМОЦИСТЕИНЕМИЈА И КАРДИОВАСКУЛАРНЕ БОЛЕСТИ .....	27
1.4.1. Епидемиологија и етиопатогенеза кардиоваскуларних болести .....	27
1.4.2. Фактори ризика за настанак кардиоваскуларних болести .....	30
1.4.3. Хомоцистеин као потенцијално нови фактор ризика за кардиоваскуларне болести .....	30
1.5. ХИПЕРХОМОЦИСТЕИНЕМИЈА И ЕНДОТЕЛНА (ДИС)ФУНКЦИЈА .....	35
1.6. ХИПЕРХОМОЦИСТЕИНЕМИЈА И ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС .....	36
1.6.1. Оксидациони стрес .....	36
1.6.2. Хомоцистеином посредован оксидациони стрес .....	39
1.7. ХИПЕРХОМОЦИСТЕИНЕМИЈА: ТЕРАПИЈСКЕ МОГУЋНОСТИ .....	45
1.7.1. Инхибитори НМГ-СоА редуктазе .....	46
1.7.2. Механизам дејства и липидни ефекти инхибитора НМГ-СоА редуктазе .....	47
1.7.3. Нелипидни (плеiotропни) ефекти статина .....	48
1.8. СТАТИНИ У ПРЕВЕНЦИЈИ КАРДИОВАСКУЛАРНИХ БОЛЕСТИ .....	50
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА .....	53
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ .....	56
3.1. МАТЕРИЈАЛ .....	56
3.1.1. Специјалне дијете за пацове .....	56
3.1.2. Комплет реагенаса за припремање Krebs-Hensenleit-овог перфузионог раствора: .....	59
3.1.3. Инхибитори хидрксиметил-глутарил коензим А редуктазе .....	59
3.1.4. Супстанце и реагенси за одређивање параметара оксидационог статуса .....	59
3.1.5. Комплет реагенаса за детерминацију индекса липидне пероксидације (TBARS): .....	59
3.1.6. Комплет реагенаса за детерминацију азот монооксида (NO) у облику нитрита: .....	59
3.1.7. Комплет реагенаса за детерминацију супероксид ањонског радикала (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ): .....	59
3.1.8. Комплет реагенаса за детерминацију водоник пероксида (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ): .....	60
3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛИ .....	61
3.2.1. Експериментални модел хиперхомоцистеинемije .....	61
3.2.2. Експериментални модел изолованог органа (срце) .....	62
3.2.3. Langendorff апарат LF-01 F-P .....	63
3.3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ .....	66
3.4. БИОХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ .....	69
3.4.1. ОДРЕЂИВАЊЕ ИНДЕКСА ЛИПИДНЕ ПЕРОКСИДАЦИЈЕ (TBARS) .....	69

3.4.2. ОДРЕЂИВАЊЕ НИТРИТА (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ).....	71
3.4.3. ОДРЕЂИВАЊЕ СУПЕРОКСИД АНИОН РАДИКАЛА (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) .....	72
3.4.4. ОДРЕЂИВАЊЕ ВОДНИК ПЕРОКСИДА (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	73
3.4.5. ОДРЕЂИВАЊЕ ХОМОЦИСТЕИНА.....	75
3.4.6. ОДРЕЂИВАЊЕ ЛИПИДНИХ ПАРАМЕТАРА .....	75
3.4.7. ОДРЕЂИВАЊЕ КАТАЛАЗЕ.....	75
3.4.8. ОДРЕЂИВАЊЕ СУПЕРОКСИД ДИСМУТАЗЕ.....	75
3.4.9. ОДРЕЂИВАЊЕ РЕДУКОВАНОГ ГЛУТАТИОНА.....	76
3.4.10. МОРФОМЕТРИЈСКЕ АНАЛИЗЕ .....	76
3.5. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА .....	76
4. РЕЗУЛТАТИ.....	79
4.1. КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ХОМОЦИСТЕИНА И ЛИПИДА У СЕРУМУ У ОДНОСУ НА ДИЈЕТАЛНИ РЕЖИМ И ФАРМАКОЛОШКИ ТРЕТМАН ПАЦОВА.....	79
4.2. МОРФОМЕТРИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ У ОДНОСУ НА ДИЈЕТАЛНИ И ФАРМАКОЛОШКИ ТРЕТМАН .....	84
4.2.3. УТИЦАЈ РАЗЛИЧИТОГ РЕЖИМА ИСХРАНЕ НА МОРФОМЕТРИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦОВА У ПРИСУСТВУ СИМВАСТАТИНА .....	88
4.2.4. Укупан унос хране и укупна телесна маса животиња у свим групама у односу на дијетални режим и фармаколошки третман .....	90
4.2.5. Морфометријске карактеристике поједних органа (срце и јетра) .....	91
4.3. УТИЦАЈ ДИЈЕТАЛНОГ РЕЖИМА И ИНХИБИТОРА ХИДРОКСИМЕТИЛ-ГЛУТАРИЛ КО-А РЕДУКТАЗЕ (АТОРВАСТАТИН И СИМВАСТАТИН) НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА УНУТАР ГРУПЕ .....	93
4.3.7. Кардиодинамски параметри изолованог срца пацова у контролној групи подвргнутој хроничној администрацији симвастатина у дози од 5мг/кг/дан (СИМ-контрола).....	111
4.4. ПРОМЕНЕ КАРДИДИНАМСКИХ ПАРАМЕТАРА ИЗЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА У ОДНОСУ НА ДИЈЕТАЛНИ РЕЖИМ И ВРЕДНОСТИ ХОМОЦИСТЕИНА У КРВИ .....	120
4.5. ПРОМЕНЕ КАРДИДИНАМСКИХ ПАРАМЕТАРА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА У ОДНОСУ НА ФАРМАКОЛОШКИ ТРЕТМАН У УСЛОВИМА НОРМАЛНИХ, УМЕРЕНО ПОВИШЕНИХ И ЕКСТРЕМНО ПОВИШЕНИХ КОНЦЕНТРАЦИЈА ХОМОЦИСТЕИНА У КРВИ .....	129
4.6. УТИЦАЈ РЕЖИМА ИСХРАНЕ И ИНХИБИТОРА ХИДРОКСИМЕТИЛ-ГЛУТАРИЛ КО-А РЕДУКТАЗЕ (АТОРВАСТАТИН И СИМВАСТАТИН) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА У ЕФЛУЕНТУ .....	138
4.7. УТИЦАЈ РЕЖИМА ИСХРАНЕ И ИНХИБИТОРА ХИДРОКСИМЕТИЛ-ГЛУТАРИЛ КО-А РЕДУКТАЗЕ (АТОРВАСТАТИН И СИМВАСТАТИН) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА (ПЛАЗМА).....	152
4.8. УТИЦАЈ РЕЖИМА ИСХРАНЕ И ИНХИБИТОРА ХИДРОКСИМЕТИЛ-ГЛУТАРИЛ КО-А РЕДУКТАЗЕ (АТОРВАСТАТИН И СИМВАСТАТИН) НА ПАРАМЕТРЕ АНТИОКСИДАЦИОНОГ СИСТЕМА ЗАШТИТЕ (ЕРИТРОЦИТИ).....	161
4.9. ПРОМЕНЕ ПАРАМЕТАРА АНТИОКСИДАЦИОНОГ СИСТЕМА ЗАШТИТЕ У КРВИ У ПОРЕЂЕЊЕМ СВИХ ГРУПА .....	168

4.10. КОРЕЛАЦИОНА АНАЛИЗА СВИХ ИСПИТИВАНИХ ПАРАМЕТАРА СВИХ ГРУПА СА ВРЕДНОСТИМА ХОМОЦИСТЕИНА .....	170
5. ДИСКУСИЈА.....	173
5.1. УТИЦАЈ РАЗЛИЧИТОГ РЕЖИМА ИСХРАНЕ И ФАРМАКОЛОШКОГ ТРЕТМАНА НА МОРФОМЕТРИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ.....	173
5.2. УТИЦАЈ РАЗЛИЧИТОГ РЕЖИМА ИСХРАНЕ И ФАРМАКОЛОШКОГ ТРЕТМАНА СТАТИНИМА НА ПАРАМЕТРЕ КОНТРАКТИЛНОСТИ СРЦА.....	180
5.3. УТИЦАЈ РАЗЛИЧИТОГ РЕЖИМА ИСХРАНЕ И ФАРМАКОЛОШКОГ ТРЕТМАНА НА РЕДОКС РЕДОКС-РАВНОТЕЖУ .....	187
6. ЗАКЉУЧЦИ .....	194
7. ЛИТЕРАТУРА.....	197

# 1. УВОД

## 1.1. АМИНОКИСЕЛИНА ХОМОЦИСТЕИН - ОТКРИЋЕ, ХЕМИЈСКА СТРУКТУРА И КАРАКТЕРИСТИКЕ

### 1.1.1. Откриће аминокиселине хомоцистеина

Хомоцистеин је откривен давне 1932. године и од тада је предмет многих истраживања. Открили су је Butz и du Vigneaud, са престижног Универзитета Illinois, који су у свом истраживању о инсулину, загревањем аминокиселине метионина у сумпорној киселини изоловали аминокиселину која је била сличне хемијске структуре као и цистеин (1-4). Због сличне хемијске структуре цистеину, добио је назив хомоцистеин. Након добијања Нобелове награде 1955. године из области хемије за откриће полипептидних хормона и синтезе аминокиселина од интереса помоћу метионина, пажња се драматично усмерава на размевању, откривању и испитивању свих аминокиселина (5).

Већ неколико година касније, 1960. године McCully извештава о присуству хомоцистинурије код особа са атеросклерозом и тромбозом као удруженим клиничким стањима, са присутном тешком хиперхомоцистеинемом са екстремно високим вредностима хомоцистеина у крви изнад 500  $\mu\text{mol/L}$ . Тачније, први пут се описује хомоцистинурија код деце код којих се примећује повећана смртност од тешке атеросклерозе и тромбоза (6-11). Међутим, повезаност повишених вредности хомоцистеина са било којим стањима није истраживана и није окупирала научну јавност све до 1991. године, када је научник Clarke објавио прелиминарне резултате својих клиничких истраживања у којима први пут се хиперхомоцистеинемиа се помиње као независан фактор ризика за кардиоваскуларне болести. Година 1991. је година рођења хипотезе „хомоцистеин-кардиоваскуларне болести“, како су научници тог доба извештавали. Од тада, актуелна тема и фокус многих екстензивних студија је управо хомоцистеин и његова повезаност са кардиоваскуларним болестима (12, 13).

### 1.1.1. Хемијска структура и карактеристике аминокиселине хомоцистеина

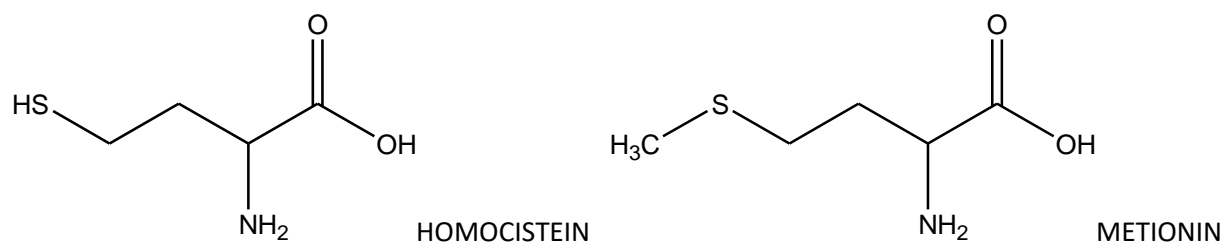
Хомоцистеин, сулфхидрилна аминокиселина, представља интермедијерни продукт нормалне биосинтезе аминокиселине метионина и цистеина (Слика бр. 1) (14). Настаје процесом деметилације метионина који се уноси, а којим обилује храна богата анималним протеинима (15). У плазми се налази у четири различите форме: око 1% циркулише као слободни тиол, 70-80% остаје везано дисулфидним везама за плазма протеине, углавном албумине, и 20-30% је у облику димера хомоцистеина или комбинација са другим тиолима (16).

Хомоцистеин је кључни фактор у метилационом циклусу, у којем прво долази до метилације хомоцистеина до метионина, при чему S-аденолизацијом настаје S-аденозилметионин (SAM) (Слика бр. 2) (17). S-аденозилметионин је основни метил донор за све метилационе процесе у ћелији. Спајањем метионина са АТФ, такође настаје S-аденозилметионин (17). Метил група закачена на терцијерни сумпор SAM-а може се преносити и тако изазвати метилацију и других једињења. Метилација је удружена са губитком енергије па је тако ова реакција неповратна. Процес деметилације представља формирање S-аденозилхомцистеина (SAH), који представља тиоетар (сумпор везан са две алкил или арил групе) аналог метионина (Слика бр. 2). Управо однос SAM-SAH дефинише метилациони потенцијал ћелије. Даље, хидролизом SAH-а настаје хомоцистеин и аденозин, и као такав, хомоцистеин може бити употребљен у два случаја:

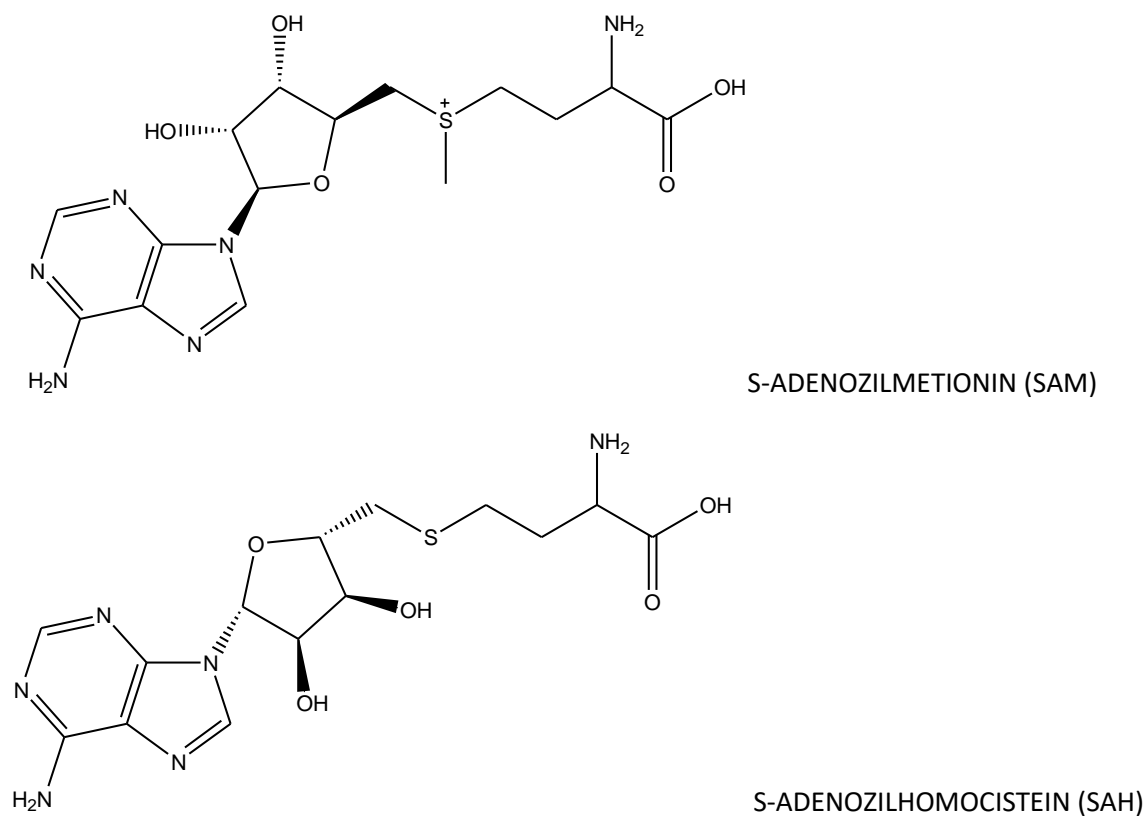
а) у случају дефицита метионина, хомоцистеин може бити реметилисан у метионин, при чему ензим N5, N10-метилентетрахидрофолат редуктаза конвертује хомоцистеин у метионин, и

б) у случају довољне количине метионина, хомоцистеин се уместо за конверзију у метионин користи се за производњу цистеина. Цистатион-β синтетаза је ензим који у присуству есенцијалног кофактора витамина B<sub>6</sub> (пиридоксина) претвара хомоцистеин у цистеин. Дакле, хомоцистеин се синтетише из есенцијалне аминокиселине метионина па с` тога цистеин није есенцијална аминокиселина све док су доступне довољне количине метионина.

Слика бр. 1 Структура хомоцистеина и метионина



Слика бр. 2 Структура S-аденозилметионина (SAM) и S-аденозилхомоцистеина (SAH)



## 1.2. МЕТАБОЛИЗАМ ХОМОЦИСТЕИНА

Хомоцистеин је не-есенцијална, сумпорна аминокиселина. Синтезише се процесом трансметилације из есенцијалне аминокиселине метионина која се уноси исхраном. Трансметилација је процес који се одвија у три корака а који је катализован ензимима S-аденозилметионин синтетаза (SAM), L-метионин аденозилтрансфераза, метилтрансферазе (MT) и S-аденозилхомоцистеин хидролаза (SAH) које постоје у различитим ткивима (18-20). SAM синтетаза активира метионин у реакцији са АТФ-ом при чему настаје S-аденозилметионин, који је универзални метил донор у биосинтези различитих супстанци као на пример креатина, епинефрина, фосфолипида, протеина, нуклеинских киселина и полиамина. Као продукт свих SAM-зависних трансметилационих реакција настаје S-аденозилхомоцистеин (SAH). У процесу продукције хомоцистеина важну улогу играју метилтрансферазе којих постоји неколико типова (21-25). Па тако, фосфатидилетаноламин-N-метилтрансфераза (PEMT) учествује у синтези фосфатидилхолина што представља додатни начин синтезе фосфатидилхолина (уместо директне синтезе из холина), док гуанидин-ацетат-N-метилтрансфераза учествује у синтези креатина, и као такви главни су учесници процеса продукције хомоцистеина углавном у јетри. Заправо, у чак 85% свих SAM-зависних трансметилационих процеса, наведене метилтрансферазе су заступљене. Други важан ензим који суделује у превођењу SAM-метил групу што резултира производњом хомоцистеина је глицин-N-метилтрансфераза (GNMT). GNMT је цитоплазматски протеин који је одговоран за метилацију глицина и производњу саркозина, који има и регулаторну улогу у јетри, јер регулише однос SAM/SAH у циљу оптимизације трансметилационих реакција (26-30).

Хомоцистеин је циљна тачка три важна метаболичка пута, који се углавном одигравају у јетри: ресинтеза SAH кроз реверзну активност SAH хидролазе; реметилација метионина помоћу фолат/B<sub>12</sub>-зависног/независног пута; и трансулфурација до цистатиона (Слика бр. 2). Након SAM-зависне трансметилације, SAH се брзо метаболише помоћу SAH хидролазе до аденозина и хомоцистеина, при чему се може повисити концентрација хомоцистеина. Као последица повишеног хомоцистеина у ћелијама настаје акумулација SAH-а током реакције реверзне катализе помоћу SAH хидролазе. Тако повећана концентрација SAH има јак негативан ефекат на већину метилтрансфераза, нарочито оним које се налазе у ткиву дојке, зато што SAH

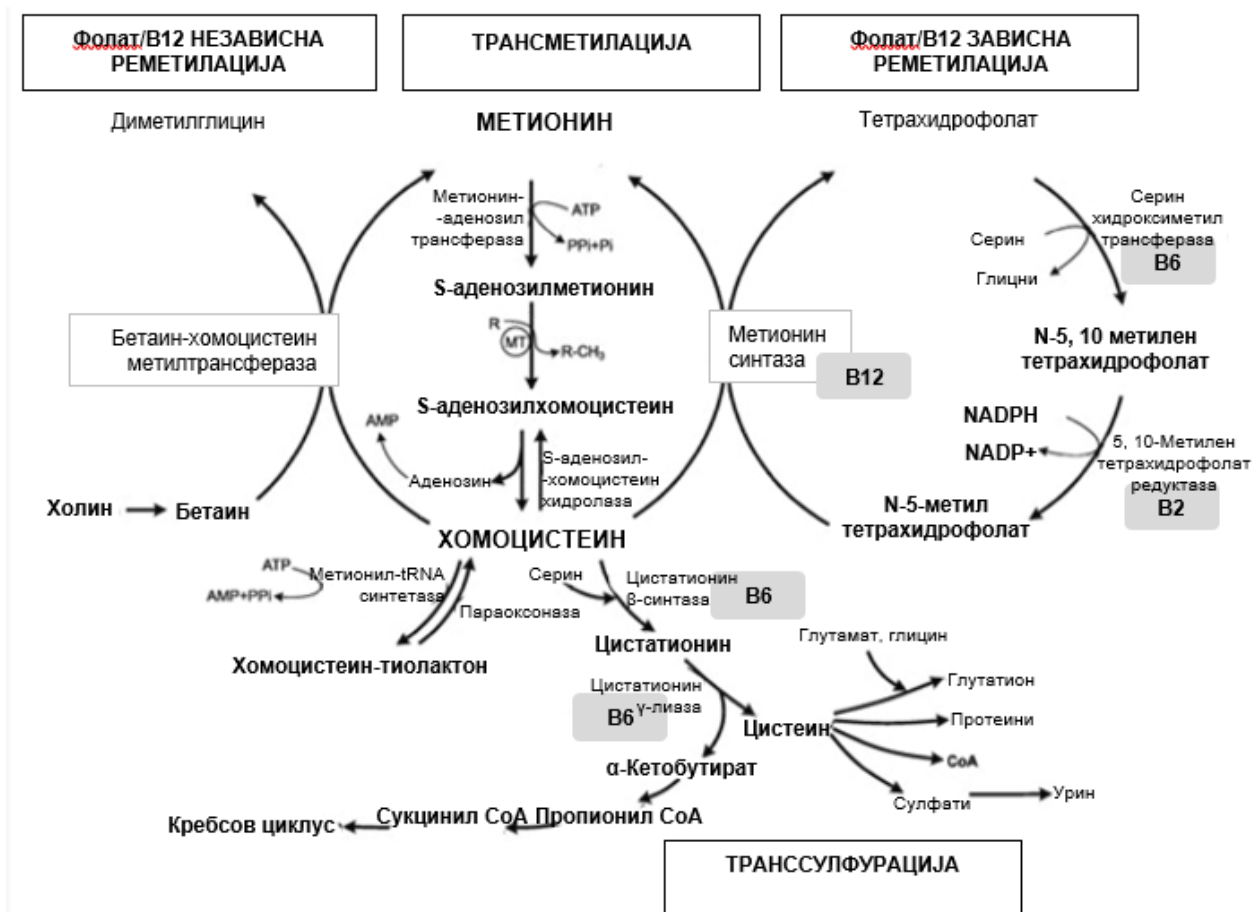


делује као снажан алостерни инхибитор МТ (31, 32). У ћелијама се на основу односа SAM/SAH одређује трансметилациони њен потенцијал (33). Дисрегулација метилације и промена метилационог статуса (на пример хипометилација) током редуковане синтезе SAM представља централни механизам који објашњава негативне ефекте хиперхомоцистеинемике у васкуларним и неуродегенеративним обољењима, у којима је синтеза неуротрансмitera и важних структуралних протеина нарушена.

У физиолошким условима, око 50% хомоцистеина се реметилише до метионина. Два важне реакције су кључне у кругу метилације, процесу реметилације хомоцистеина до метионина. Први пут реметилације хомоцистеина је завистан од присуства витамина В и фолата део је тзв. “one-carbon” метаболизма. Фолати у форми коензима N-5-метилтетрахидрофолат (THF) може донирати метил групу хомоцистеину у реакцији која је катализована метионин синтетазом (MT) зависне од витамина В<sub>12</sub>. Дакле, статус фолата и витамина В<sub>12</sub> игра важну улогу у одржавању равнотеже хомоцистеина у ћелији а самим тим у плазми, као и N-5,10-метилтен тетрахидрофолат редуктаза која катализује синтезу N-5-метилтетрахидрофолат форму из N-5,10-метилентетрахидрофолата која захтева NADPH а који је регулисан од стране SAM и SAH (34-38).

Други пут реметилације хомоцистеина је независтан од “one-carbon” метаболизма. Користи бетаин као донор метил групе, који је синтетисан из холина помоћу бетаин-хомоцистеин S-метилтрансферазе (BHMT). BHMT-зависна реметилација хомоцистеина се примарно дешава у јетри, бубрезима и сочиву, иако је фолат/витамин В<sub>12</sub>-зависни пут универзалан за сва ткива. За фолат-независну метионин реметилацију, регулација и/или експресија BHMT је важна јер утиче на концентрацију хомоцистеина и широк спектар клиничких манифестација (Слика бр. 2) (39).

Последњи пут у метаболизму хомоцистеина је транссулфурација до цистеина, који је прекурсор у синтези протеина, коензима А, сулфата и глутатиона. Прва у низу реакција је кондензација хомоцистеина са серином која води до прозводње цистатиона, након које следи реакција хидролизе до цистеина и α-кетобутарата. Ове две реакције су катализоване В<sub>6</sub>-зависним ензимима цистатион β-синтетазе (CBS) и цистатион γ-лиазе (CSE). Транссулфурација је одговорна и за катаболизам метионина и за трансфер атома сумпора од метионина до серина, и нарушен процес транссулфурације је одговоран за хиперхомоцистеинемичу, хомоцистинурију, али и аутизам, цирозу јетре, дисфункцију имунског система и панкреатитис (40, 41).



Слика бр. 2. Процеси метилације, трансметилације, реметилиције и транссулфурације током метаболизма метионина и хомоцистеина

### 1.3. ДЕФЕКТИ У МЕТАБОЛИЗМУ ХОМОЦИСТЕИНА

#### 1.3.1. Дефиниција хиперхомоцистеинемije

Дефиниција хиперхомоцистеинемije се разликује у различитим студијама. Најчешће, хиперхомоцистеинемija се дефинише као медицинско стање које је карактерише абнормално високим нивоом хомоцистеина у крви, изнад  $15 \mu\text{mol/L}$  (42). Укупна концентрација хомоцистеина у крви здраве одрасле особе је у распону од  $5,0$  до  $15,0 \mu\text{mol/L}$  када се одређује хроматографским методама (HPLC) или у распону од  $5,0$  до  $12,0 \mu\text{mol/l}$  ако се одређује методом имуноесеја (43). На основу измерених вредности хомоцистеина у плазми хиперхомоцистеинемiju делимо на: умерену ( $16\text{-}30\mu\text{mol/l}$ ), средњу ( $31\text{-}100\mu\text{mol/l}$ ) и тешку ( $>100\mu\text{mol/l}$ ). Најређе се развија тешка хиперхомоцистеинемija која настаје услед великих генетских мутација на нивоу ензима укључених у метаболизам хомоцистеина (цистатионин  $\beta$ -синтетазе, 5,10-

метилентетрахидро-фолат редуктазе или метионин синтетазе). Најчешће настаје умерена хиперхомоцистеинемија у чију патогенезу су укључени генетски и фактори средине (исхрана дефицитарна фолатима, витаминима В<sub>12</sub>, В<sub>6</sub>; дисфункција бубрега, тиреоиде, карциноми, дијабетес; употреба кафе, цигарета, алкохола, лекова; старија животна доб и менопауза) (42, 43).

### 1.3.2. Генетски дефекти као узрочници хиперхомоцистеинемије

Хиперхомоцистеинемија се може развити због генетског дефекта ензима који су укључени у метаболизам хомоцистеина, као што су цистатион-β-синтетаза, 5,10-метилентетрахидрофолат редуктаза, и метионин синтетаза (44).

Први генетски модел за изазивање хиперхомоцистеинемије је дефект *Cbs* гена који је специфичан за цистатионин β-синтетазу. Цистатионин β-синтетаза катализује први корак у конверзији хомоцистеина у цистеин: кондензацију хомоцистеина и серина при формирању цистатионина. На анималним моделима, како се и очекује, мишеви са недостатком овог ензима имају повишене плазма концентрације хомоцистеина. *Cbs* хетерозиготи имају благо повишене плазма концентрације метионина и нормалне нивое *AdoMet* у крви, док у ткиву јетре имају повишене вредности *AdoHcy*. Код *Cbs* хомозигота развија се тешка форма хиперхомоцистеинемије, а *AdoMet* нивои у јетри су повишени око 2 пута, док су нивои *AdoHcy* повишени чак 9 пута више од нормалних, што говори у прилог томе да *Cbs* дефект гена је ткивно специфичан, без ефеката на мозгано и ткиво бубрега. Код људи, најчешћи узрок тешких облика хиперхомоцистеинемије и хомоцистинурије, најчешће урођене, је хомозиготна дефицијенција цистатион-β-синтетазе (*CβS*), због које настају 40 пута веће концентрације хомоцистеина у крви од референтних. Сматра се да је 0,5-1,5% сваке популације захваћено хетерозиготном формом *CBS* дефицијенције (45-48).

Широм света је врло чест и заступљен са високом инциденцом у различитим популацијама нуклеотидни полиморфизам 5,10-метилентетрахидрофолат редуктазе, који је удружен са умереном и тешком хиперхомоцистеинемом а први пут употребљен у *Rozen* лабораторији (49). Заправо, познато је да овај најчешћи ензимски дефект повезан са тачкастом мутацијом на нуклеотиду 677 као последица С-Т субституције на кодираном региону гена за *MTHFR*, који као такав онда последично има за половину слабију активност због чега и настају повишене вредности

хомоцистеина у крви. Хомозиготна дефицијенција МТНFR доводи до повећаног нивоа хомоцистеина а смањеног нивоа метионина у плазми.

Међу осталим ретким узроцима тешких хиперхомоцистеинемиија описују се дефицит метионин синтетазе као и метионин синтетазе редуктазе, и нарушена активност метионин синтетазе у склопу генетских поремећаја метаболизма витамина В<sub>12</sub>. Витамин В<sub>12</sub> метионин синтаза је присутна у свим ћелијама и ткивима, али је учесталост јављања генетских грешака у синтези овог ензима мала. Проучавањем фибробласта пацијената са дефицијенцијом метионин синтазе дефинисана су 2 типа дефицијентне болести, познате као cbLE и cbLG тип. CbLE се односи на редукцију самог ензима, cbLG на промену метионин синтазе апоензима (50, 51).

### **1.3.2. Нутритивни фактори као узрочници хиперхомоцистеинемиије**

Хиперхомоцистеинемиија може настати и као последица нутритивних дефицита фолата, витамина В<sub>6</sub> и витамина В<sub>12</sub>. Концентрације фолата, витамина В<sub>6</sub> и витамина В<sub>12</sub> у крви су обрнуто пропорционалне вредностима укупног хомоцистеина, па тако особа са дефицитом наведених витамина је у великом ризику од настанка хиперхомоцистеинемиије. Ова негативна корелација је израженија код старих, посебно за витамин В<sub>12</sub> и фолну киселину, али је присутна и код младих. Утивај витамина В<sub>6</sub> је најслабије изражен. Из тог разлога се, фолна киселина (В<sub>9</sub>), пиридоксин (В<sub>6</sub>) и кобаламин (В<sub>12</sub>) сматрају есенцијалним кофакторима у метаболизму хомоцистеина и метионина (52-55).

#### *1.3.2.1. Фолна киселина*

Фолна киселина, позната и као витамин В<sub>9</sub> или птероилглутаминска киселина, фолацин, витамин М, *Folvite*, *Acifolic*, *Folcidin*, је добила назив од латинске речи *folium*, што значи лист. Први пут откривена је од стране Луси Вилс, која је радила као патолог у Royal Free Hospital у Лондону, а која је у лечењу макроцитне анемије током трудноће код жена која су радиле у тесквилној индустрији у Бомбају користила фолну киселину (55, 56). 1941. године фолна киселина је први пут изолована из спанаћа, а неколико година касније, 1943. године се први пут синтетише кристализована форма фолне киселине. Од тог момента, фолна киселина се користи у третману мегалобластне анемије. Синтетизована фолна киселина се дакле, структурално разликује од фолата, јер поседује глутаматни остатак (полиглутамати), редукцију ди- или тетра- хидроформи

и додатну угљеникову јединицу, на пример метил (-CH<sub>3</sub>), формил-CHO, метилен=CH<sub>2</sub>, метенил=CH<sub>4</sub>, која је закачена на N5 или N10 положај азотовог атома.

Иако се термини фолна киселина и фолати користе наизменично, метаболички ефекти и могу бити у мањој мери различити. Фолна киселина је заправо синтетска форма фолата која се данас може наћи у облику суплемената и храни обогаћеној фолном киселином индустријским путем. Фолна киселина, такође позната као витамин B<sub>9</sub>, је облик полусинтетског витамина растворљивог у води, који се природно налази у зеленом лиснатом поврћу, а налази се и као додатак многим намирницама у исхрани које су у широкој употреби. У организму човека не постоји могућност синтетисања фолне киселине *де ново*, па се из тог разлога овај витамин мора уносити храном или супституисати витаминским препаратима. Са друге стране, фолати се могу наћи у природи, углавном у биљкама, као што су зелено лиснато поврће, броколи, шпаргле, цитруси, пасуљ, авокадо, грашак, сочиво, бамија, прокељ, ораси, карфиол, цвекла, кукуруз, целер, шаргарепа и бундева. Фолна киселина се налази у житарицама, брашну и производима од житарица, а као суплемент се користи у виду таблета са различитим садржајем фолне киселине у њој. Поред тога, фолати се налазе и у намирницама животињског порекла, у пилетини, ћуретини, јагњетини, говедини и цигерици. Дневна препоручена доза фолне киселине је 400 mcg/дан за адолесценте, особе у развоју и одрасле, 500 mcg/дан у дојењу и 600 mcg/дан у трудноћи (57-60).

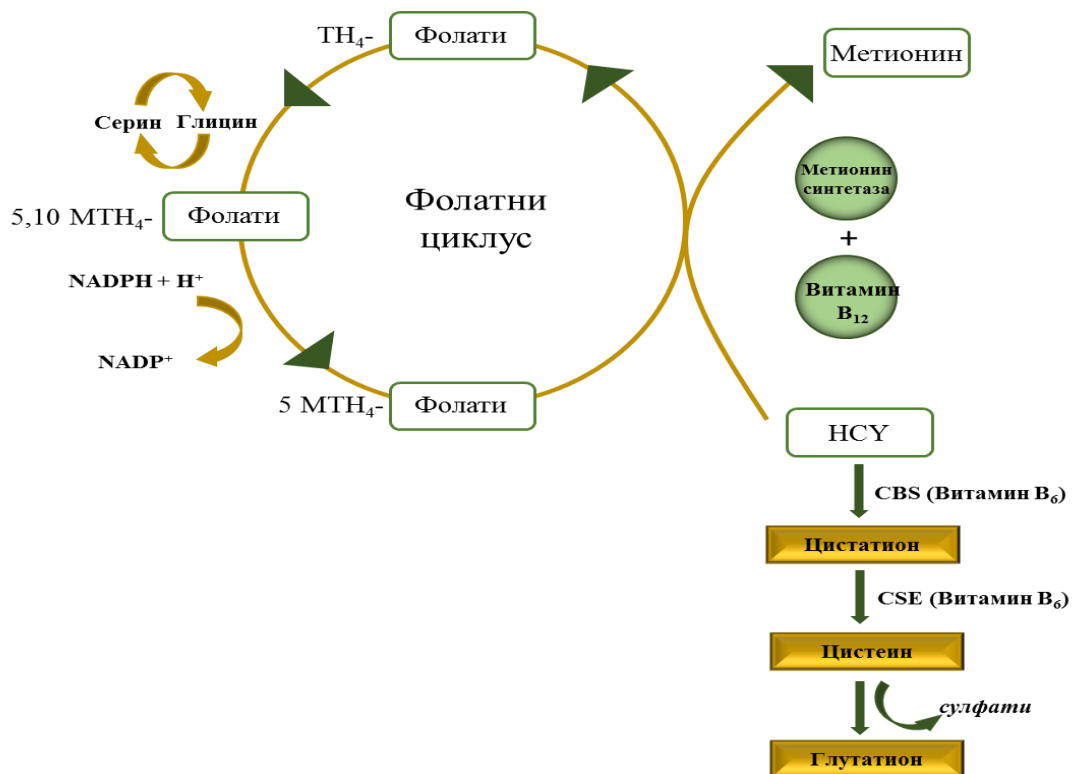
#### 1.3.2.1.1. Метаболизам фолне киселине

Фолати и биолошки активна фолна киселина која се конвертује у дихидрофолну киселину у јетри, од суштинског су значаја за функционисање физиолошких процеса у организму (61). Фолна киселина учествује у процесима синтезе, обнављања и метилацију дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК), па је из тог разлога неопходна у трудноћи и детињству за нормално одвијање процеса деобе ћелије и раста. Деоксиуридин монофосфат (dUMP) кроз додавање метил групе посредством ензима тимидилат-синтетазе резултира у *де ново* синтези деокситимидин монофосфата (dTMP) са наступајућом фосфорилацијом деоксинуклетид трисфосфата (dNTP) и тимидин трисфосфата (dTTP). Тако настаје тимидин трисфосфат (dTTP), која је једна од четири есенцијалне дезоксирибонуклеинске киселине за синтезу и опоравак DNA (62-64). Дефицит фолата може блокирати конверзију dUMP у dTMP што последично доводи до

нагомилавања dUTP. Како DNA полимеразе нису способне да направе разлику између dUTP и dTTP, тако настаје могућност да се деси погрешно уграђивање, односно да се на место тимидина угради урацил. Са повећањем броја погрешних уграђивања у DNA због недостатка фолата настаје и потпуно уништена, погрешна и измењена DNA, чија дестабилизација води до хромозомских аберација и потенцијалних малигнух трансформација (65, 66).

### 1.3.2.1.2. Улога фолата у конверзији хомоцистеина у метионин

Друга важна метаболичка улога фолата је улога у конверзији хомоцистеина у метионин активацијом 5-метилтетрахидрофолат (5-methyl-THF) (Слика бр. 3). Један део регенерисаног метионина се може претворити помоћу ензима метионин аденозил трансферазе у своју активну форму, S-аденозилметионин (SAM). SAM учествује у неколико реакција метилације различитих молекула, као што су липиди и пептиди и представља главног метил учесника у метилацији цитозина у DNA. У стањима фолатне дефицијенције, редукција метилације цитозина у DNA може резултирати про-онкогеном експресијом и потенцијалном малигнуом трансформацијом (67).



Слика бр. 3. Фолатни циклус

Деплеција фолата и следствена редукција DNA синтеза и метилација су токсичне и за нормалне и за малигне ћелије зато што је метаболизам фолата фундаменталан за обе врсте ћелија. Инхибиција метаболизма фолне киселине је кључни механизам који се користи за елиминацију малигнућ ћелија, па се с` тога аналози фолне киселине користи као антитуморски терапеутици, као што је аминоптерин који инхибира дихрофолат редуктазу, спречавајући на тај начин редукцију фолне и дихидрофолне киселине до тетраhydrofolата (THF), и метотрексат, који директно инхибира дихидрофолат редуктазу а самим тим и тимидилат синтетазу. Други познати структурални аналози фолата који се користи као хемотерапеутици су триметрексад, перметрексед и ралтитрексед (68-72).

#### *1.3.2.1.3. Фолна киселина и клиничке импликације*

Метилентетрахидрофолат редуктаза (MTHFR) као ензим има веома важну улогу у метаболизму фолата. Мутација MTHFR гена на позицији 677 СТ, који преводи аланин у валин, резултира у смањењу ензимске активности. Редукција од око 65% ензимске активности код хомозигота MTHFR ТТ генотипова и редукција од око 30% код хетерозигота СТ генотипа су стања повезана са повишеним нивоима хомоцистеина, DNA хипометилацијом и геномском нестабилношћу (73-75).

Хиперхомоцистеинемија представља фактор ризика за настанак атеросклерозе и коронарне артеријске болести. Сматра се да чак 40 % пацијената са коронарном артеријском болешћу, церебралном или периферном артеријском болешћу има повишене нивое хомоцистеина у крви. Хомоцистеин је окривљен да узрокује атерогенезу и тромбогенезу која води ка следственој фибрози и хиперплазији мишићних ћелија иако је још увек тачан механизам нејасан. Опсервационе студије сугерирају да је хиперхомоцистеинемија независан фактор ризика за болести које су у вези кардиоваскуларним болестима. У литератури се помињу препоруке за примену фолне киселине у дози од 0.8 мг/дан у циљу снажне редукције нивоа хомоцистеина у крви. Смањење за четвртину до трећине укуних вредности хомоцистеина у крви се остварује и суплементацијом истовремено 0.5-5мг/дан фолне киселине и 0.5мг/дан витамина В<sub>12</sub> (76-79).

Дефицит фолне киселине може изазвати низ нежељених здравствених поремећаја, и недостатак овог витамина у организму може настати већ након само неколико месеци уношења хране дефицијентне овим витамином, када се исцрпе

резерве фолне киселине у организму. Чести здравствени поремећаји који настају као последица недостатка витамина B<sub>9</sub> су различити, може настати макроцитна анемија, слабост и конфузија, губитак памћења, периферна неуропатија, компликације у трудноћи и депресија. Поред тога, хиперхомоцистеинемија и настанак канцера као последица нарушене синтезе и обнављања ДНК-а могу настати услед хроничног дефицита фолне киселине у организму. У литератури се последњих година, све више помиње значај надокнаде фолне киселине, као потенцијални третман многих поремећаја и болести, као што су кардиоваскуларне болести, васкуларне деменције, периферне неуропатије али и нека депресивна стања у психијатрији (80, 81).

#### *1.3.2.1.4. Фолна киселина у третману многих болести*

Мета анализе описује ефикасност суплементације фолном киселином у снижавању кардиоваскуларног ризика мерењем дебљине интима медије каротидних крвних судова, као и ефикасност у смањењу атеросклеротских промена и артеријског притиска. Свакако, постоје и студије које тврде да суплементација фолном киселином не даје значајне бенефитне ефекте на крвне судове, што говори у прилогу томе да су потребна даља истраживања како би потврдила или одбацила овакве сумње. Литературни подаци наводе и примере 36-месечне суплементације фолном киселином која у значајној мери смањила ризик од настанка možданог удара смањењем за око 20% укупне вредности хомоцистеина. Код пацијената који болују од дијабетеса мелитуса тип 2, суплементација фолном киселином изгледа да може смањивањем вредности хомоцистеина, делујући на тај начин на бољу гликемијску контролу. Како је дијабетесна болест у тесној повезаности са ендотелијалном дисфункцијом, описани су и примери утицаја фолне киселине на азот-моноксид синтетазни ензимни систем. Поред тога, суплементација фолном киселином смањује оштећења настала услед дијабетичне нефропатије, неуропатије и ретинопатије, утичући на ендотелијалну дисфункцију и смањење албуминурије. Комбинована примена уридин монофосфата, фолне киселине и витамина B<sub>12</sub> може смањити и неуропатски бол код дијабетичне неуропатије. Употреба фолне киселине током прекоцепцијског периода трудноће спречава настанак дефеката неуралне цеви код фетуса за 41%. Међутим примена фолне киселине током другог и трећег триместра трудноће у циљу превенције поменутих дефеката је контроверзна, помињући података да хронична суплементација током трудноће може утицати на правиан развој плаценте и постпорођајну тежину



новорођенчета. Поред тога, употреба фолна киселине може смањити инциденцу канцерских обољења након петогодишње суплементације овим витамином, као што је меланом, али ови подаци остају на нивоу литературних претпоставки (82-85).

Дакле, широку примену фолне киселине треба проверити у опсежнијим клиничким истраживањима како би се усагласиле препоруке и утврдили јани протоколи и индикације употребе фолне киселине.

#### *1.3.2.2. Витамин В<sub>6</sub> (пиридоксин; пиридоксал 5'-фосфат)*

Витамин В<sub>6</sub> састоји од три везаних пиримидин-витаминских деривата: пиридоксина, пиридоксала, пиридоксамина и њихових фосфатних естера. Метаболички активни коензим облик витамина В<sub>6</sub> је пиридоксал 5'фосфат (P5P). В<sub>6</sub> витамин се прво оксидује до пиридоксала и брзо фосфорилише до P5P у јетри, који је главни циркулишући агенс из јетре и сматра се најрелевантнијим параметром директне мере статуса витамина В<sub>6</sub> (86-88). Пиридоксин је први пут изолован 1934. године и названа овим именом од стране Albert Szent-Gyorgy (89). Као суплемент у исхрани витамин В<sub>6</sub> се користи у облику пиридоксин хидрохлорида (HCL), међутим, P5P је једини облик који се може користити од стране ензима укључених у биохемијске процесе, а који су повезани са азотом и метаболизам протеина и хем синтезом у организму. Метаболички активни коензим облик витамина В<sub>6</sub>, пиридоксал 5'фосфат (P5P) се налази у сниженим концентрацијама код особа са оштећеном функцијом јетре, што наглашава значај јетре у конверзији овог витамина (90).

Пиридоксин је витамин растворљив у води, стабилан у топлим и киселим медијумима и нестабилан у алкалним растварачима и на светлости. Пиридоксин и његове различите форме се апсорбују у вишим деловима танког црева простом дифузијом, након чега се транспортује до јетре у којој се одиграва биотрансформација у активни коензим P5P, након чега се везује за албумин (92-94). У ткивима, преузимање се врши екстрацелуларном дефосфолирацијом, након које следи метаболички интрацелуларни улазак P5P-а. У метаболизму пиридоксина важну улогу играју P5P-зависни ензими, који су укључени у различим реакцијама, као што су:

- а) реакције декарбоксилације аминокиселина при чему настају амини, од којих су многе важни неуротрансмитери и хормони,
- б) реакције превођења аминокиселина у кетокиселине, које подлежу оксидацији и користе се као метаболичко гориво,

- в) реакције фосфорилационе разградње гликогена из јетре и мишића до монофосфатне глукозе,
- г) реакције формирања алфа аминокиселине, прекурсора хема,
- д) реакције декарбоксилације фосфатидилсерина до фосфатидилетаноламина при фосфолипидној синтези и
- ђ) реакције у којима има улогу кофактора са цистатионин синтетазом и цистатионазом у различитим реакцијама које укључују цепање бочног ланца.

#### *1.3.2.2.1. Витамин В<sub>6</sub> и клиничке импликације*

P5P је неопходан за активацију глицина у иницијалној фази производње хема. Заправо, са терапијске тачке гледишта, P5P се може корисити у терапији симптоматске примарне сидеробластне анемије која није реаговала на пиридоксин. У литератури се описују случајеви анемија које не рагују на примену пиридоксина али дају одговор на примену P5P-а, што говори у прилог дефицита или инхибиције пиридоксал киназе (95, 96). Орална примена пиридоксина 50mg пиридоксина два пута дневно резултира у повећању P5P нивоа у плазми, па тако дакле и пиридоксин и P5P су користе као терапијски избори у лечењу српастих ћелија *ин vivo*. Поред тога, научници су пронашли повезаност између синдрома карпалног тунела и дефицита P5P, па је препорука да се третман пиридоксином у дози од 100-200 mg дневно најмање 12 недеља спроведе са циљем смањења симптома у овом синдрому и то као адјувантна терапија. Сматра се да делује тако што смањује перцепцију бола и повећава праг болне издржљивости (97).

Како В<sub>6</sub> витамински статус у организму има значајан и селективни модулаторни утицај на централну производњу серотонина и габааминобутерне киселине (GABA) као неуротрансмитера у централном нервном систему, тако и јасно да витамин В<sub>6</sub> има улогу у контроли депресије, перцепције бола и анксиозним стањима. Поред тога, P5P је кофактор у синтези наведених неуротрансмитера. У рандомираним клиничким студијама се помиње ефикасност пиридоксина у дози од 100 mg дневно у третману предменструалног синдрома са циљем смањења у ублажавања соматских симптома али и предменструалне депресије (98).

Последњих година, актуелна тема је примена пиридоксина у третману хиперхомоцистеинемije, као независног фактора ризика за настанак атеросклеротске болести и венске тромбозе. У опсежним клиничким студијама показано је да пиридоксин примењен у дози од 100 mg/дан у комбинацији са фолном киселином у дози од 500 mcg/дан значајно (32%) редукује нивое хомоцистеина у крви испитаника (100).

Литературни подаци помињу и податак да дефицит витамина B<sub>6</sub> нарушава конверзију алфа-линолеинске киселине у ЕРА и ДНА, али и да P5P има протективну улогу при примени аминокликозида од настанка нефротоксичности. Пиридоксин у ниским дозама (10 mg/дан) користи се и у третману оксалатних каменаца у бубрезима. Анималне студије наводе и сазнања да дефицит B<sub>6</sub> може довести до развоја хипертензије, која се регулише након примене пиридоксина, међутим тачан механизам још увек није јасан. За сада једина доказана индикација за примену пиридоксина је примена у третману јутарње мучнине у дози од 25 mg/8часова током 3 дана. Суплементација пиридоксином је врло ретко повезана са токсичношћу, а последица је смањењом способношћу јетре да фосфорилише пиридоксин у P5P. Дневна дефинисана доза пиридоксина је 2-4 mg/дан, а најчешћа терапијска доза је 50-200 mg/дан (100-103).

### *1.3.2.3. Витамин B<sub>12</sub> (Кобаламин)*

Витамин B<sub>12</sub> је откривен давне 1926. године од стране Минота и Марфија. Покушавајући да открију начин лечења пацијената оболелих од пернициозне анемије на узорку од 45 пацијената примењивали су исхрану богату месом и цигерицом, након чега су открили да овакав режим исхране након 1-6 месеци значајно побољшава здравствено стање испитаника (104, 105). Касније, 1948. године, Рикес је изоловао супстанцу у облику кристала из јетре, која је била одговорна за позитивне ефекте код оболелих од пернициозне анемије, а исте године Смит и Паркер су исту супстанцу прерадили у кристал високе концентрације и чистоће. Скоро деценију касније, 1956. године Ходџкин је открио структуру супстанце у кристалу и први пут објаснио структуру витамина B<sub>12</sub> применивши X-зраке и кристалографију, а Ленерт и Ходџкин 1961. године се јасно дефинише органометална структура овог кофактора (106, 107).

Витамин B<sub>12</sub> је састављен од четири пиролска прстена (тетрапирол) са централним атомом кобалта (Co), повезаних са азотним лигандима помоћу пиурола

формирајући прстен. Молекул везан за Co атом на горњем делу прстена назива горњи аксијални лиганд ( $\beta$ -аксијални лиганд), а молекул везан за Co атом на доњем делу прстена назива доњи аксијалног лиганд ( $\alpha$ -аксијални лиганд) (108, 109). Витамин B<sub>12</sub> који садржи цијанид групу у горњем аксијалном лиганду (цијанокобаламин) је релативно инертан Co (II) кориноид и не понаша се као ко-фактор. Деривати витамина B<sub>12</sub> од великог физиолошког значаја су коензим B<sub>12</sub> или аденозилкобаламин (AdoCbl) и метилкобаламин, који имају 5'-деокси-5'-аденозин или метил групу као горњи аксијални лиганд. Најчешће, кориноиди имају 5,6-диметилбензимидазола (DBM) у основи нуклеотида, и познати су као кобамиди, док неки деривати, попут псевдовитамина B<sub>12</sub> доњи аксијални лиганд је аденин. У физиолошким условима, кобалт може бити присутан у три могућа оксидациона стања деривата B<sub>12</sub>: Co(III), Co(II), and Co(I). Оксидационо стање одређује аксијални лиганд, да ли ће или не бити присутан у молекулу. Код деривата и са  $\alpha$ - и  $\beta$  аксијалним лигандима везаних за кобалт настаје Co(III); кобалт везан за кофактор који има само један лиганд је Co(II); и када је кобалт без присуства лиганда онда настаје Co(I). Ова карактеристика кобалта одређује функцију сви х деривата B<sub>12</sub> као кофактора (110-117).

Витамин B<sub>12</sub> или кобаламин, постоји у неколико форми, као што су цијано-, метил-, деоксиаденозил- и хидрокси-кобаламин. Цијано- облик, који се и користи као суплемент се налази и траговима у храни. Остале форме кобаламина, могу се конвертовати до метил- или 5-деоксиаденозил форми, које су неопходне као ко-фактори за метионин синтетазу и L-метил-малонил-CoA мутазу. Метионин синтетаза је есенцијална за синтезу пурина и пиримидина, а реакција зависи од метил кобаламина као кофактора и од фолата, при чему се метил група метилтетрахидрофолата транспортује до хомоцистеина како би се формирао метионин и тетрахидрофолат. Дефицит витамина B<sub>12</sub> и прекид ове реакције води у развој мегалобластне анемије, али и дефицит фолата независно од дефицита витамина B<sub>12</sub> такође доводи до настанка мегалобластне анемије. За неуролошке ефекте дефицита кобаламина је одговоран реакција конвертовања метилмалонил- CoA у сукцинил-CoA у присуству аденозил кобаламина као кофактора, која ако је нарушена доводи до акумулације метилмалонила-CoA који је директно одговоран за ефекте на нервном систему (118-126).

Серумски витамин B<sub>12</sub> који је везан за протеине плазме се назива транскобаламини (ТС), део витамина (око 80%) се транспортује као инактивна форма и

назива хаптокорин (ТСI), а део витамина (око 20%) који се активно транспортује кроз циркулацију назива се транскобаламин (ТСII). Холо-транскобаламин (holo-ТС) представља ТСII форму везану за кобаламин, која допрема витамин В<sub>12</sub> ћелијама. Управо ниске концентрације кобаламина у серуму су повезане са дефицитом ТСI, док су вредности ТСII непромењене (127).

#### *1.3.2.3.1. Витамин В<sub>12</sub> и клиничке импликације*

Традиционално, статус витамина В<sub>12</sub> се одређује у серуму као сензитиван показатељ витаминског статуса, међутим интерпретација резултата измерених концентрација и референтни опсег је ипак недовољно јасан. Метилмалонска киселина (ММА) и хомоцистеин су препознати индикатори витамин В<sub>12</sub> статуса, па је мерење ових индиректних индикатора корисно у откривању субклиничких дефицијенција витамина В<sub>12</sub>, у стањима када тај дефицит још увек није очигледан. ММА је специфични индикатор метаболизма кобаламина, док је хомоцистеин индикатор удруженог дефицита В<sub>12</sub>, дефицита фолата и В<sub>6</sub>. Плазма нивои ММА су повишени у реналној инсуфицијенцији и врло често код старијих људи, и мерење концентрација ММА може бити одговарајућа стратегија за процену статуса витамина В<sub>12</sub>. Литературни подаци предлажу референтне вредности за витамин В<sub>12</sub> статус: В<sub>12</sub> < 148 pmol/L или 148–258 pmol/L, ММА > 0.30 μmol/L, или tHcy > 13 nmol/L (жене) and >15 nmol/L (мушкарци). Мерење holo-ТС концентрација се такође користи у одређивању витаминског статуса и показује високу специфичност и сензитивност (128-130).

Апсорпција витамина В<sub>12</sub> се одвија под утицајем хлороводоничне киселине у гастроинтестиналном тракту. Кобаламин везан за R протеин пролази до дуоденума где се одваја од R протеина и веже за унутрашњи фактор (Intrinsic Factor-IF). IF-кобаламин комплекс се даље апсорбује у дисталном делу илеума у присуству калцијума, а у циркулацији се појави 3-4 сата након уношења. Секретује се билијарним путем и реапсорбује у ентерохепатичној циркулацији помоћу илеалних рецептора у присуству IF, па је из тог разлога настанак дефицита овог витамина вероватнији код пацијената са пернициозном анемијом. Неапсорбовани билијарни витамин В<sub>12</sub> елиминише се путем фецеса, а вишак витамина се, након на пример интравенске примене витамина, излучује путем урина јер превазилази везивне капацитете ТС (131).

Класична процедура за процену апсорпције витамина В<sub>12</sub> је Шилингов тест, који се данас врло ретко користи. Тест дијагностикује узроке смањене апсорпције као што је

атрофични гастритис, малапсорпција, а подразумева и гастроскопију и одређивање серумског гастрина и пепсиногена. Међутим, специфични тест за пернициозну анемију подразумева одређивање IF антитела и ниво серумског гастрина. MMA и хомоцистеин су бољи маркери за одређивање статуса витамина B<sub>12</sub> иако нису погодни за процену апсорпције. Витамин B<sub>12</sub> се синтетише под дејством бактерија у гастроинтестиналном тракту животиња, а концентрован се налази у анималним ткивима, односно налази се само у храни животињског порекла. Храна богата витамином B<sub>12</sub> (µg/100g) је: цигерица (26–58), јагњетина (1–3), пилетина (око-1) и јаја (1–2.5). Неке биљке садрже мању количину овог витамина као што су неке врсте печурака, али не садрже биоактивне форме витамина већ аналоге витамина B<sub>12</sub> који су неактивни у људском организму, што је битно знати при веганској исхрани. Поред тога, неке врсте риба (Thai риба) су контаминирани и ферментирани бактеријама па се због тога сматра да су богате кобаламином, иако као такав витамин може бити слабо апсорбован због слабог афинитета за унутрашњи фактор у гастроинтестиналном тракту (133).

Дефицит витамина B<sub>12</sub> је обично узрокован малапсорпцијом услед атрофичног гастритиса, неких других гастроинтестиналних обољења или смањеним уносом путем хране који се често дешава код старијих особа, вегана или вегетеријанаца. Дефицит је чест и при неким интеракцијама лекова са храном и код урођених генетских аномалија. Пример дефицита овог витамина је пернициозна анемија која је последњи стадијум аутоимунског гастритиса и ресекција гастричног антрума који резултирају губитком синтезе унутрашњег фактора. Пацијентима са пернициозном анемијом примењује се суплементација витамином B<sub>12</sub> у дози од 500–1,000 µg/дан. Дефицит се може развити код пацијената са бактеријском или паразитарном инфекцијом због слабог преузимања витамина B<sub>12</sub> у илеуму, али и код свих ресекција и болести илеума као што је Кронова болест и остале хроничне инфламаторне болести црева (134-136).

Литературни подаци помињу али недовољно описују повезаност КВБ са кобаламинским статусом (137). Мета анализе проспективних студија описују повезаност између укупних вредности хомоцистеина, наводећи да примена витамина B<sub>12</sub> у опсегу дозе од 0.02–1 mg/дневно узрокује смањење хомоцистеина за око 7%, док фолати узрокују редукацију од 10-30% (138). Све рандомизирани студије наводе и податак да суплементација кобаламина у дози од 6 µg-1 mg је оправдана у комбинацији са фолатима, па је тешко измерити појединачан ефекат кобаламина у смањењу кардиоваскуларног ризика (139). Поред тога, суплементација витамином B<sub>12</sub> је описана

у литератури као оправдана јер побошљава опоравак и инциденцу позитивних исхода код КВБ (140).

### 1.3.3. Остали фактори као узрочници хиперхомоцистеинемije

Фактори средине као што је исхрана дефицитарна фолатима, витаминима В<sub>12</sub>, В<sub>6</sub>, присуство дисфункције бубрега због повећаних вредности креатинина, тиреоиде, карциноми, дијабетес али и употреба кафе, цигарета, алкохола, лекова; старија животна доб и менопауза су фактори повезани са настанком и развојем хиперхомоцистеинемije (141-144). Главни пут елиминације хомоцистеина из организма је путем бубрега, па тако на пример у хроничној реналној болести постоји и смањења елиминација хомоцистеина што погодује развоју тежих форми хиперхомоцистеинемije. Интолеранција глукозе, дијабетес мелитус тип 1, ренална инсуфицијенција, различити малигнитети, хипотиреоидизам, неки облици псоријазе, акутна лимфобластна леукемија су повезани са хиперхомоцистеинемijом.

Хиперхомоцистеинемija директно корелира са креатинином и гломерулском филтрацијом (145-151). Чак и скроман пад у гломерулској филтрацији је повезан са повећањем хомоцистеина у плазми. Код уремије редуковани хомоцистеин није повећан, али јесте протеински везан. Хронична уремија такође нарушава екстрареналну активност ензима одговорних за метаболизам хомоцистеина. Како је бубрег значајно место метаболисања хомоцистеина, други механизам који намеће је оштећење тубуларних ћелија, које више нису у могућности да ефикасно обављају транссулфурационе процесе у катаболизму хомоцистеина, код различитих степена бубрежне инсуфицијенције. Истраживања су показала да витаминска суплементација код пацијената са овим стањем смањује плазма концентрацију хомоцистеина. Међутим, и поред смањеног нивоа хомоцистеина, оптималне вредности <10 µM/L се тешко постижу код пацијената са бубрежним болестима. Чак и међу пацијентима са трансплатацијом бубрега, суплементација фолатима резултује оптималној концентрацији хомоцистеина код само 21,4% пацијената (152). Разлог због којег се ове вредности тешко нормализују код пацијената са завршном фазом болести бубрега је неизван, али може бити услед комбинованих ефеката субоптималне исхране, губитка бубрежних паренхимских ћелија и евентуално неких других метаболичких

поремећаја. За разлику од односа хомоцистеина у плазми са исходом у општој популацији, код пацијената са завршном фазом болести је овај однос има инверзну везу са морталитетом и морбидитетом (153).

Поред тога, плазма концентрације хомоцистеина могу бити повишене под утицајем многих лекова и болести које интерферирају са метаболизмом фолата, витамина В<sub>12</sub> и В<sub>6</sub>, иако се абнормалне вредности хомоцистеина могу користити као помоћ при дијагностици неких од наведених стања и поремећаја. Низ фармаколошки активних супстанци из неколико фармаколошких група различитим механизмима утичу на ниво хомоцистеинемije. Метотрексат је инхибитор дихидрофолат редуктазе, која води ка успореној регенерацији и каснијој разградњи редукованих фолата, укључујући и 5-метил-тетрахидрофолат. Терапија метотрексатом онемогућава правилну реметилацију хомоцистеина, а хиперхомоцистеинемija достиже максимум већ након 2 дана при дози од 25mg дневно, односно за неколико сати код канцера и давања 1-3,6g дневно (154-156).

Азотни оксиди, попут азот субоксида и азот монооксида, могу да доведу до хиперхомоцистеинемije. Азот субоксид ступа у интеракцију са цијанокобаламином при чему се ослобађају ОН радикали, који инактивирају активност метионин синтазе везивањем за активно место ензима. Истим механизмом се врши инактивација метималонил-СоА, али при дужем деловању субоксида, долази до нагомилавања 5-метилтетрахидрофолата, као и повећан губитак фолата урином. Хиперхомоцистеинемija се јавља услед нагомилавања хомоцистеина у ћелији и изласка у екстрацелуларни простор. Постоје прелиминарни подаци да азот монооксид врши инактивацију метионин синтазе у још јачем облику (157).

L-допа у појединачној дози одмах изазива хиперхомоцистеинемiju, док је хронично узимање одржава. Разлог за то је повећана концентрација S-аденозилхомоцистеина, односно смањена концентрација S-аденозилметионина који се користи као дозор метил групе у реакцији катализованој катехол-О-метилтрансферазом. Азауридин, антиметаболит који делује као антагониста витамина Б6, може да изазове хиперхомоцистеинемiju, као и тешке кризе васкуларног типа чији механизам до краја 1976. године, када је забрањен за употребу, није до краја разјашњен. Антиепилептици, попут фенитоина и карбамазепина повећавају хомоцистеинемiju, највероватније услед ремећења хомеостазе фолата. Хиперхомоцистеинемiju могу да изазову и теофилин, као и деривати жучних киселина. Примена холестилола и сличних



препарата повећава укупан хомоцистеин због дефицита фолата, који је изазван поремећеном апсорпцијом (158).

Физиолошки фактори који утичу на ниво хомоцистеина су пол, старост, исхрана и начин живота. Наиме, референтне вредности, доступне у литератури, за новорођенчад и малу децу износи 3-6  $\mu\text{M/l}$ , за адолесценте 5-8  $\mu\text{M/l}$ , да би код особа изнад 60 година живота обавезно прелазила 10  $\mu\text{M/l}$ . Особе старије од 50 година имају просечно и до 1,9  $\mu\text{M/L}$  виши ниво хомоцистеина у односу на млађу популацију. Код жена је ова концентрација израженија и износи 2,2  $\mu\text{M/L}$ , а код мушкараца 1,6  $\mu\text{M/L}$  (159). Занимљиво, код стогодишњака вредности хомоцистеина се крећу од 25-27  $\mu\text{M/l}$  (160). Концентрација укупног хомоцистеина код мушкараца је за око 25% виша него код пременопаузалних жена. У менопаузи се ова разлика смањује, али никад не нестаје. У трудноћи се јавља карактеристично смањење хомоцистеинемije, због смањења концентрације циркулишућег албумина (160-162).

## 1.4. ХИПЕРХОМОЦИСТЕИНЕМИЈА И КАРДИОВАСКУЛАРНЕ БОЛЕСТИ

### 1.4.1. Епидемиологија и етиопатогенеза кардиоваскуларних болести

Кардиоваскуларне болести (КВБ) представљају велику и хетерогену групу обољења, која према десетој ревизији Међународне класификације болести (МКБ10) обухвата следеће поремећаје здравља (Табела 1.1): акутну реуматску грозницу, хроничне реуматске болести срца, болести проузроковане повишеним крвним притиском, исхемијску болест срца (коронарну болест срца), болести срца плућног порекла и болести крвних судова плућа, болести крвних судова мозга, болести артерија, малих артерија и капилара, вена, лимфних судова и лимфних чворова и друге неозначене болести срца и крвотока. Исхемијска болест срца (ИБС) је најчешћа болест из ове велике групе (163, 164).

*Табела 1.* Класификација кардиоваскуларних болести према Међународној класификацији болести (МКБ-10)

Кардиоваскуларна болест	МКБ-шифра
Болести система крвотока	I00-I99
Акутна реуматска грозница	I00-I02
Хроничне реуматске грознице срца	I05-I09
Болести узроковане повишеним крвним притиском	I10-I15
Исхемијске болести срца	I20-I25
Болести срца плућног порекла и болести крвних судова плућа	I26-I28
Друге болести срца	I30-I52
Болести крвних судова мозга	I60-I69
Болести артерија, малих артерија и капилара	I70-I79
Болести вена, лимфних судова и лимфних чворова	I80-I89
Друге и неозначене болести крвотока	I95-I99

Болести срца и крвних судова су већ деценијама уназад водећи узрок обољевања, радне неспособности, изостајања са посла и превремене смртности (пре 65. године) у развијеним земљама и у земљама у развоју. На почетку 20. века од КВБ умирао је тек сваки 10 становник, да би се на почетку 21. века, услед нове фазе тзв. епидемиолошке транзиције, тај број повећао на 30%. Сваке године од кардиоваскуларних болести умре преко 17 милиона становника, док само од АИМ оболи преко 6 милиона становника, од чега се смртни исход јавља код приближно 25% случајева (163, 164). Иако се различите земље налазе у различитим фазама транзиције, предвиђа се да ће до 2020. године болести срца и крвних судова постане водећи узрок умирања у свим земљама, нарочито у неразвијеним. Већ сада је процењено да преко 80% смртности од свих КВБ и 60% оптерећења од ИБС потиче из земаља у развоју и неразвијених земаља (165). Сам процес "епидемиолошке транзиције" не подразумева само промене у структури обољевања и умирања, већ се огледа и у променама у оквиру исте групе обољења (нпр. пад учесталости обољевања од реуматске грознице код младих, а честа појава ИБС код радно-активног становништва). Због тога данас у свету у структури умирања од кардиоваскуларних болести доминира морталитет од ИБС, након чега следи умирање од цереброваскуларних и других болести срца и крвних судова (166). Због тога данас у свету, у структури умирања од кардиоваскуларних болести доминира морталитет од ИБС, након чега следи умирање од цереброваскуларних и других болести срца и крвних судова.

У Србији је ситуација наизглед другачија, вероватно и због неадекватног шифрирања основног узрока смрти. Врло велики број умрлих од ИБС се "крије" у подгрупи умрлих од осталих КВБ (у Србији је у поређењу са светом дупло већи проценат умрлих сврстан у групу остале КВБ, а скоро дупло мањи у групу ИБС). Међутим, детаљнијом анализом појединачних узрока смрти, у структури свих узрока смртог исхода, смртност од појединих клиничких форми ИБС је међу првих десет. Услед померања узрасне границе обољевања и умирања од ИБС, код особа узраста од 20 до 64 године, смртност од акутног инфаркта миокарда је већ на другом месту, иза морталитета од рака плућа (167).

Коронарна болест срца или исхемијска болест срца настаје у 95% случајева услед атеросклерозе крвних судова који снабдевају крвљу срчани мишић тј. исхрањују срце. Иако се десио огроман напредак у области лечења кардиоваскуларних болести, атеросклероза као болест коронарних артерија и даље остаје водећи узрок смрти.

Атеросклероза се карактерише раним почетком у животу, дугим временским интервалом пре клиничких симптома и хетерогеношћу у свом фенотипском изражају (168).

У основи исхемијске болести срца, као за нас најважнијег ентитета када говоримо о кардиваскуларним болестима, се налази атеросклероза крвних судова срца. Заправо, нагомилавањем масти у зидовима срчаних артерија, временом, долази до њиховог сужења и смањења протока крви кроз њих. Срчани мишић не добија довољно кисеоника, те настају симптоми тзв. исхемијске болести срца. У почетку се симптоми јављају у напору јер су тада потребе срчног мишића (миокарда) за кисеоником веће, а понуда мала. Нагомилавањем масти, артерија, се све више сужава сам симптоми се јављају и у мировању. Поред масти, плак садржи и фиброзно (ожиљно) ткиво које је по конзистенцији чвршће од масног ткива. Према количини масног ткива и фиброзног атеросклеротски плак може бити стабилан и нестабилан. Стабилан плак има више фиброзног ткива, па такав плак ређе пуца. често се у плак уграђују сам соли калцијума. Нестабилан плак има више масног ткива, па је опаснији, често пуца и на том месту се ствара тромб који затвара коронарну артерију, па тако настаје инфаркт срца (169-172).

У 5% случајева узроци коронарне болести су неатеросклеротског порекла. Релативно чест узрок су коронарне аномалије или "мишићно мост" (главне срчане артерије су нормално смештене на површини срца, док код ове аномалије дио срчане артерије улази дубље у срчани мишић и у току контракције (грчења) срца се сужава (173). Лице са овом аномалијом може да имати различите симптоме, од ангине пекторис, инфаркта, опасних аритмија, па до напрасне. Други ређи узроци настанка коронарне болести су: коронарна дирекција: цепање срчане артерије спонтано или услед трауме или дисекције аорте тј. цепање аорте на месту где из ње излазе срчане артерије), васкулитис коронарних артерија - запаљење зида коронарне артерије; друге болести хомоцистинурија, мукополисахаридозе; хиперплазија интима: задебљање унутрашњег слоја зида коронарне артерије: после зрачења, трансплантације срца или ПТЦА; метастазе у миокарду: компресија коронарних артерија или инфилтрација малигним ткивом; спонтане коронарне тромбозе: леукемија, полицитемија, тромбоцитоза, српаста анемија (услед повећања броја крвних ћелија долази до зачепљења срчаних артерија), злоупотреба никотина, хормонална контрацепција (174-177).

#### **1.4.2. Фактори ризика за настанак кардиоваскуларних болести**

Међу многобројним факторима ризика за настанак и развој кардиоваскуларних болести, кратко ћемо се осврнути на традиционалне и добро познате факторе ризика а који се деле на променљиве и непроменљиве. Непроменљиви су пол, старост и породична анамнеза, док су променљиви фактори ризика дијабетес, хипертензија, пушење, физичка неактивност и дислипидемија. Препоставка је да чак 15-20% оболелих од кадиоваскуларних болести нису имали ниједан од наведених добро познатих фактора ризика, односно да ниједан фактор ризика за настанак кардиоваскуларне болести није био препознат, чиме су пропустили своју прилику за примарну превенцију болести (162, 163, 169). Међутим, тачно је да упркос агресивној контроли свих фактора ризика у општој популацији, није могуће превенирати све болести код свих пацијената (178, 179).

#### **1.4.3. Хомоцистеин као потенцијално нови фактор ризика за кардиоваскуларне болести**

Не тако давне, 1990.-е године, хомоцистеин бива препознат као фактор ризика за атеросклеротску васкуларну болест и стања хиперкоагубилности. Данас, међу новијим факторима ризика данас се све чешће помиње хиперхомоцистеинемија као променљиви фактор који има важну улогу у развоју многих болести, а пре свега кардиоваскуларних (178, 179).

Хомоцистеин је означен као значајан маркер васкуларне болести нарочито код пацијената азијског порекла. Старост, мушки пол, пушење, конзумирање кафе, висок крвни притисак, нерегулисан липидни статус, висок креатинин су фактори врло често удружени са повећаним вредностима хомоцистеина у крви. Са друге стране, физичка активност, умерена употреба алкохола, задовољавајући фолатни и витамин В<sub>12</sub> статус су фактори удружени са сниженим нивоима хомоцистеина (180).

Годинама уназад, присутна је дебата међу научницима о томе да ли хомоцистеин треба сматрати фактором ризика за КВБ, обзиром да око 50% насталих КВБ се може објаснити „класичним“ факторима ризика, а да хомоцистеин као „нови“ фактор ризика треба имати већу снагу. Овакав став међу научном јавношћу је негативно искритикован и одбачен, са образложењем да су сви фактори ризика међусобно повезани и да

хомоцистеин значајно контрибуира у настанку и развоју КВБ (178-180). Фрамингамски скор, као важан инструмент у предвиђању коронарне артеријске болести код пацијената са традиционалним факторима ризика, као што су дислипидемија, хипертензија, дијабетес мелитус и пушење, изгледа да је занемарио значај и постојање ризика код пацијената са високим плазматским вредностима хомоцистеина (181). Истраживања су показала повезаност између умерене хиперхомоцистеинемije и ризика за настанак КВБ (коронарне, срчане, цереброваскуларне и периферне артеријске болести), јер када се не лечи, умерена и тешка хиперхомоцистеинемija повећава могућност настанка нежељеног васкуларног догађаја за 50% код пацијената са врло високим вредностима хомоцистеина у крви, и то пре 30 године живота. Овако високе вредности хомоцистеина настају услед хомозиготне мутације C,S, када настају 40 пута веће вредности хомоцистеина од референтних, а оваква појава се јавља у 1 од 100,000 живорођених (182, 183). Овако тежак поремећај у метаболизму хомоцистеина јавља се и услед хомозиготне мутације MTHFR која је честа у општој полуацији у свету, а која је узрок настанка превременог нежељеног кардиоваскуларног догађаја. Корелација између хиперхомоцистеинемije и атеросклеротске болести се први пут помиње пре тачно 48 година, а од тада неколико студија пресека и студија серије случајева указале су на јасну повезаност између укупне серумске концентрације и инциденце јављања кардиоваскуларне болести. Дакле, показано је да на сваких 5 $\mu$ M повећања хомоцистеина у крви, хомоцистеин повећава ризик за настанак коронарне артеријске болести за 60% код одраслих особа мушког пола и за 80% код особа женског пола (182, 183).

Са друге стране, систематски прегледни чланак који је обухватио 12 рандомизираних клиничких студија на узорку од 47,429 испитаника је испитивао и утицај снижавања хомоцистеина на инциденцу и превенцију инфаркта миокарда, можданог удара и показао да нема значајне повезаности. Међутим, оваква сазнања захтевају опсежнију проверу у потврду у другим валидним студијама (182, 183).

Дакле, и даље постоји дилема да ли је хомоцистеин биомаркер или фактор ризика? Важеће смернице како у Републици Србији, тако и у свету, нису хомоцистен уврстиле у листу фактора ризика. Међутим, проспективне студије наглашавају неопisivу важност хомоцистеина у предвиђању кардиоваскуларних болести, што свакако јесте разлог да се научна јавност запита да ли заправо хомоцистеин испуњава критеријуме за званично проглашавање хомоцистеина као ``новог`` фактора ризика за

настанак али и погоршање већ настале КВБ, јер и пацијенти са смањеном реналном функцијом могу имати повишене вредности хомоцистеина, па је подједнако важан и у примарној и у секундарној превенцији односно ризику за настанак КВБ.

Верује се да хиперхомоцистеинемиа доводи до оштећења ендотела ћелија, смањење флексибилности крвних судова и измене процеса хемостазе. Утицај хомоцистеина на развој кардиоваскуларних болести остварује посредством различитих механизма, испољавањем негативних ефеката на васкуларни ендотел и глатке мишићне ћелије са последичним променама у субклиничкој структури и функцији. Неки од претпостављених механизма ових ефеката укључују пролиферацију васкуларних глатких мишићних ћелија, ендотелну дисфункцију, оксидативна оштећења, повећање и синтеза колагена али и погоршање артеријског зида еластичног материјала (184-186).

Истраживањем повезаности хомоцистеина са експресијом Ц-реактивног протеина и поменутог механизма деловања хомоцистеина, познато је да хомоцистеин значајно индукује експресију mRNA и Ц-реактивног протеина у глатким мишићним ћелијама васкуларног порекла *in vitro* и *in vivo*. Хомоцистеин повећава експресију NR1 подјединице (N-метил-D-аспартат рецептор (NMDAr)) док МК-801 смањује хомоцистеином индуковану експресију Ц-реактивног протеина у васкуларном ендотелу. Поред тога, клинички валидне студије описују да је хомоцистеин способан да иницира инфламаторни одговор код васкуларних глатких мишићних ћелија стимулишући производњу Ц-реактивног протеина, који је посредован преко NMDAr-ROS-ERK1/2/p38-NF-κB сигналног пута, што говори у прилог значајне улоге хомоцистеина у патогенези атеросклерозе (186-188).

Претходно поменути метилациони потенцијал ћелије, који се дефинише односом SAM/SAH је однос који хомоцистеин тежи да смањи. Таква тежња некада води и до глобалне DNA хипометилације. Хомоцистеин такође може супримирати транскрипцију цикллина А у ендотелним ћелијама што представља ген-специфични ефекат хомоцистеина. Заправо, дешава се деметилација CpG-а и то спречава стварање метил CpG-градивног протеина 2, односно спречава стварање хистон деацетилазе (HDAC). Ово даље узрокује ацетилизоване хистоне (H3, H4) да супримирају експресију гена, а DNA хипометилација и ацетилација хистона су у вези са транскрипционим хроматимом. Конформација хроматина може узроковати транскрипциону супресију протеина. Са друге стране, хомоцистеином индукована DNA хипометилација њених

промотера узрокује *up regulated* генску експресију, као на пример индукција *p66shc* експресије у ендотелним ћелијама што корелира са промотерима хпометилације а што контрибуира оксидационом стресу (189-191).

У различитим студијама је описано да хиперхомоцистеинија промовише пролиферацију васкуларних ендотелних ћелија, да повећава активност хидроксиметилглутарил коензим А (HMG-Co-A) редуктазе и тако утиче на повећање синтезе холестерола, који онда промовира настанак и развој атеросклерозе. Улога хомоцистеина у ендотелној дисфункцији је повезана са механизмима индукције оксидационог стреса, активације нуклеарног фактора капа-бе (NF- $\kappa$ B), инфламације и инхибиције ендотелијалне азот моноксид синтетазе (eNOS) (192).

Даље, хомоцистеин је снажно повезан са параметрима различитог степена артеријске крутости као што је крутост и притисак у самом крвном суду, која се детерминише каротидно-феморалним индексом флексибилности (*carotid-femoral Pulse Wave Velocity (PWV)*) у општој популацији. Примећено је да је овај индекс промене карактеристике крвног суда је значајно повишен код особа са хиперхомоцистеинијом. Механизам којим хомоцистеин остварује овакав ефекат још увек није довољно истражен, али се претпоставља да хомоцистеин игра важну улогу у ремоделовању артеријског зида која води до оштећења крвног суда, вероватно посредством оксидативног стреса и инфламације, односно посредством металопротеиназама-индукованом еластолизом (189, 190).

Када говоримо о кардиоваскуларним болестима, хиперхомоцистеинија је у високом проценту повезана и са патогенезом венске тромбозе. Дакле, хомоцистеин у високим концентрацијама повећава агрегацију тромбоцита за ендотелне ћелије, а повезује се и за високим нивоима протромботичним факторима, као што су  $\beta$ -тромбоглобулин, активатор ткивног плазминогена и фактора VIIc. Оваква активација води до подстицања формирања тромба. На то се надовезују и промене на самом зиду крвног суда као и промене LDL атерогенезе узроковане хомоцистеином. Дакле, хиперхомоцистеинија подстиче штетне ефекте на ендотелним ћелијама, коагулацију и пролиферацију глатких мишићних ћелија (185, 191).

Када је питању хипертензија која један од најзначајних индуктора озбиљних кардиоваскуларних компликација, познато је да хомоцистеин значајно контрибуира у регулацији крвног притиска. Заправо, хомоцистеин своје кардиотоксичне ефекте остварује у високим концентрацијама директно, делујући штетно на ендотелне ћелије и



индиректно, редукцијом азот монооксида као вазодилататора синтетисаног од стране ендотела. Клиничке студије наводе повезаност дијастолног и систолног крвног притиска са вредностима хомоцистеина, наводећи интересантан податак да повећање хомоцистеина од 5  $\mu\text{mol/L}$  повећава дијастолни и систолни притисак за око 0.5 - 0.7 mmHg код мушкараца и за 0.7-1.2 mmHg код жена. Као што је поменуто раније, хиперхомоцистеинемиа различитог степена у различитој мери индукује процесе модификације LDL-а, HDL-а, инфламације, поремећаја коагулације и фибринолизе. Путем ових механизма, хиперхомоцистеинемиа узрокује ремоделовање зида крвног суда, дијастолну дисфункцију крвних судова, редуковану флексибилност зида крвних судова, повећање крвног притиска, прогресију хипертензије и последично оштећење органа и органских система (185-187).

Хомоцистеин штетно делује и на васкуларне глатке мишићне ћелије, доводи до пролиферације мишићних ћелија у култури што може допринети хиперплазији интима (193). Такође, хомоцистеин може индуковати васкуларна оштећења повећањем адхезије тромбоцита и ослобађање тромбоцитних фактора раста, активирањем фактора V, X и XII, инхибицијом активације протеина C, инхибицијом ћелијске површинске експресије тромбомодулина и смањењем активности ткивног активатора плазминогена, док повећањем стварање тромбоксана и везивање липопротеина за фибрин смањује фибринолизу. Због своје цитотоксичности хомоцистеин узрокује десквамацију ендотелних ћелија. Хомоцистеин потенцира производњу тромбина у ендотелним ћелијама. Тромбин је потентни активатор протеазом-активираних рецептора (PAR), који припадају Г протеин-куплованој фамилији рецептора. Идентификовано је 4 PAR: PAR-1, PAR-2, PAR-3, PAR-4. PAR-1, PAR-2, PAR-3 се активирају тромбином, а PAR-2 и PAR-4 трипсином. Сви PAR су изражени у ендотелним ћелијама. PAR-1, PAR-2, и PAR-4 су укључени у васкуларни развоја и низ биолошких процеса, укључујући ремоделирање. Дакле, познато је и да је један од могућих механизма протромбогеног ефекта хомоцистеина нарушена биоискористиљивост азот монооксида која последично до повећане активације тромбоцита (187, 189, 192).

## 1.5. ХИПЕРХОМОЦИСТЕИНЕМИЈА И ЕНДОТЕЛНА (ДИС)ФУНКЦИЈА

Ендотелна дисфункција се дефинише као неравнотежа између вазодилатора и вазоконстриктора које лучи ендотел, и представља језгро системског патолошког одговора у процесу атерогенезе и кардиоваскуларних болести. У свим крвним судовима и целом циркулаторном систему, ендотел је састављен од једног слоја ендотелних ћелија и представља слој између васкуларних глатких мишићних ћелија (VSMC) и крви (194).

Ендотел има неколико виталних функција, као што је регулација васкуларног тонуса и инфламаторне равнотеже. Васкуларна дилатација у одговору на *shear stress* протока крви зависи управо од ендотелног-фактора релаксације крвног суда, азот монооксида (NO) (195). Азот монооксид се већим делом синтетише помоћу ендотелне изоформе NO синтетазе (e-NOS) у одговору на вазодилаторни стимулус. Ендотелни азот монооксид дифузно пролази кроз васкуларне глатке мишићне ћелије где активира цитоплазматску гуанилилциклазу, повећавајући производњу цикличног гуанозин-монофосфата (GMP), што доводи до релаксације глатких мишићних ћелија крвног суда. Из тог разлога, губитак ендотелом-посредоване вазодилаторне способности која се карактерише променом васкуларне равнотеже на рачун абнормалног инфламаторног и протромботичног одговора, је најранија манифестација кардиоваскуларног оштећења и претходи формирању атеросклеротских плакова (196, 197).

Екстензивне експерименталне *in vitro* и *in vivo* студије, указују на чињенице да високи нивои хомоцистеина значајно нарушавају ендотел-зависну вазодилатацију што последично доводи до смањења доступности азот монооксида у одговору на дилаторни стимулус као што је ацетилхолин, а говори у прилог томе да хомоцистеином-индукована ендотелна дисфункција у најмањој мери зависи од ендотел-зависних фактора релаксације (196-198). Поред тога, атеросклеротске промене код пацијената са хиперхомоцистеинемојом се доводе у везу са активацијом процеса коагулације и агрегације крвних плочица, нарушеном фибринолизом и хроничном инфламацијом. Међутим, сазнања о тачним механизмима и путевима којима хомоцистеин редукује синтезу азот монооксида и редукује ендотел-зависну релаксацију су још увек непоптпуна и недовољна. Претпоставка је да хомоцистеин не супримира директно e-NOS, већ да делује индиректним механизмима на продукцију NO (199).

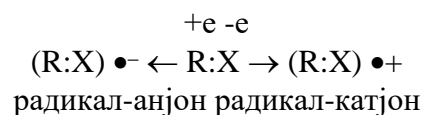
На основу података заснованих на доказима из литературе и претпоставке да хомоцистеин учествује у механизмима ауторегулације, разликујемо три потенцијална механизма којима хиперхомоцистеинија води до нарушавања ендотел-зависне дилатације: 1) оксидациони стрес, 2) ендоплазматски ретикулум-стрес са могућом апоптозом ендотелних ћелија и 3) хронична инфламација/протромбогено стање (194-199).

## 1.6. ХИПЕРХОМОЦИСТЕИНЕМИЈА И ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС

### 1.6.1. Оксидациони стрес

Оксидациони стрес се дефинише као дисбаланс између продукције слободних радикала (реактивних врста кисеоника (ROS) и азота RNS) и антиоксидационог система (AOS) заштите организма (200). Оксидациони стрес, дакле, настаје због повећаног стварања слободних радикала и оксиданаса или смањене количине и/или активности фактора AOS. Иако је оксидациони стрес укључен у патогенезу многих акутних и хроничних болести, са аспекта кардиоваскуларних истраживања, има још доста неусаглашених података и пуно потенцијалних (пато)физиолошких механизма за које се сумња да укључују оксидациони стрес (200, 201).

Слободни радикали (CP) настају у низу биолошких реакција, те су у организму присутни у ниским концентрацијама ( $10^{-5} - 10^{-9}$  mol). Настају у: оксидативној фосфорилацији у митохондријама, фагоцитози, биотрансформацијама егзогених и ендогених супстанци на мембранама ендоплазминог ретикулума – у процесима аутооксидације и у редокс циклусима, метаболизму етанола, ензимским реакцијама у којима учествују оксигеназе, синтези еикозаноида – биосинтези простагландина, леукотриена, оксидо – редукцијама метала са променљивом валенцом, липидној пероксидацији (202-210). Слободни радикали могу бити неутрални, али и позитивно (радикал-катјон) или негативно наелектрисани (радикал-анјон):



У физиолошким процесима, CP учествују у производњи енергије, важни су за антимикробну активност фагоцитних ћелија, учествују у процесима преношења

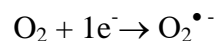
сигнала и регулацији ћелијског циклуса, неопходни су за механизам деловања неких ензима (202, 209). Поред тога, CP су и мутагени, убрзавају старење и стимулишу раст ћелија. Кисеонични слободни радикали настају у процесу фагоцитне активности неутрофила, моноцита, макрофага и еозинофила и део су каскадних догађаја у антимикуробној активности фагоцитних ћелија. Фагоцитоване честице у овим ћелијама изложене су великој количини створеног супероксид анјон радикала у процесу тзв. респираторне експлозије која настаје након активације мембранске NADPH оксидазе (210).

За бактерицидну активност су највероватније одговорни хидропероксил радикал (211) ( $\text{HO}_2^\bullet$ ), и водоник пероксид који настаје дисмутацијом супероксид анјон радикала у присуству SOD. Према теорији слободних радикала о развоју организма, метаболички оксиданси (ROS и CP) утичу на развој тако што мењају антиоксидациони капацитет ћелије мењањем продукције глутатиона (GSH) (209-211). Наиме, GSH и кисеоник утичу на активност ензима одговорних за иницирање и одржавање епигенетске контроле у експресији гена.

Реактивне кисеоничне врсте не представљају само реактивне кисеоничне врсте и деле у 2 групе: слободни радикали кисеоника и нерадикалски облици кисеоника. Слободни радикали кисеоника су супероксид анјон радикал ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), хидроксил радикал ( $\bullet\text{OH}$ ), хидропероксил радикал ( $\text{HO}_2^\bullet$ ), алкоксил радикал ( $\text{RO}^\bullet$ ) и пероксил радикал ( $\text{RO}_2^\bullet$ ) а нерадикалски облици кисеоника су Водоник пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), хипохлорна киселина ( $\text{HOCl}$ ), озон ( $\text{O}_3$ ), синглет кисеоник ( $^1\text{O}_2$ ) органски хидропероксид ( $\text{ROOH}$ ) (212).

#### 1.6.1.1. Супероксид анјон радикал ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ )

Супероксид анјон радикал ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), настаје једноелектронском редукцијом молекулског кисеоника у електронском транспортном ланцу (213):

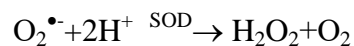


Као слободни радикал,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  лако ступа у интеракцију са другим слободним радикалима, на пример, азот моноксид радикалом ( $\text{NO}^\bullet$ ), а настали пероксинитрит ( $\text{OONO}^\bullet$ ) је такође реактивна кисеонична честица. Супероксид анјон радикал настаје током различитих биохемисјких процеса у организму, као на пример при респирацији, фотосинтези и фотореспирацији, непотпуном редукцијом молекулског кисеоника на мембранама митохондрија, хлоропласта и ендоплазматског ретикулума, аутооксидацијом

високореактивних хемијских једињења, оксидацијом миоглобина (Mb) и хемоглобина (Hb) али и при различитим оксидоредукционим процесима, у којима учествују ензими са никотин-аденинским нуклеотидима као кофакторима-NADH, NADPH, алдехид оксидазе, ксантин оксидазе, триптофан оксидазе (201, 212-215).

#### *1.6.1.2. Водоник пероксид ( $H_2O_2$ )*

Најстабилнији је облик ROS-а и велики део продукованог водоник пероксида настаје путем дисмутације супероксид анјон радикала, створеног од стране митохондрија или NADPH оксидаза (201, 213).



$H_2O_2$  делује као редокс сигнал или реагујући директно са тиолима цистеинских остатака протеина чиме доводи до промене самог протеина или индиректно преко тиоредоксина или глутатиона. У ниским концентрацијама оштећује протеине ћелијских мембрана и ремети њихову функцију, у већим концентрацијама оштећује ДНК у многим типовима ћелија док високе концентрације су леталне за скоро све живе организме (201, 212-215).

#### *1.6.1.3. Липидна пероксидација*

Липидна пероксидација је процес који може настати на два начина, ензимским путем и то дејством липоксигеназе и циклооксигеназе који катализују оксидацију арахидоната, до простагландина и леукотриена, док оксидацију холестерола до хидроксихолестерола катализује цитохром P-450 и неензимским путем односно осредовањем ROS-а на полинезасићене масне киселине из липидног двослоја мембране доводи до појаве изопростана (216). Радикали који учествују у одузимању водониковог атома полинезасићеним масним киселинама су алкоксил радикали ( $RO^{\bullet}$ ), пероксил радикали ( $RO_2^{\bullet}$ ), хидропероксил радикали ( $HO_2^{\bullet}$ ), неколико гвожђе-кисеоник комплекса и хидроксил радикал ( $^{\bullet}HO$ ). Као финални продукт липидне пероксидације полинезасићених масних киселина (PUFA) настаје малонилдиалдехид (MDA). У киселој средини он кондензује са 2 молекула ТБА (тиобарбитурна киселина), дајући производ који апсорбује у видљивом делу спектра, са апсорпционим максимумом на 532 nm. Ово представља и доказну реакцију за липидну пероксидацију у неком биолошком систему и квантитативна мера присуства липидних пероксида у систему (201, 213-217).

#### 1.6.1.4. Азот моноксид ( $\bullet\text{NO}$ )

Главни представник реактивних азотних врста (RNS) је азот моноксид ( $\bullet\text{NO}$ ). Метаболизам  $\bullet\text{NO}$  и његова реактивност, доводе до постанка много других RNS, пре свега пероксинитрита ( $\text{ONOO}^-$ ), а онда и азот диоксида ( $\text{NO}_2$ ), диазот триоксида ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) и диазот тетоксида ( $\text{N}_2\text{O}_4$ ) (218, 219). Азот моноксид има многобројне улоге у редокс сигнализацији као слободни радикал. Његов настанак је везан за ћелије под дејством ензима који се називају азот моноксид синтазе-NOS (Nitric Oxide Synthases – NOSs). Азот моноксид реагује са многим биомолекулима.  $\bullet\text{NO}$  може да изазове инхибицију активности многих ензима, да изазове липидну пероксидацију, може и да измени структуру ДНК, али може да делује и као антиоксиданс у смислу заштите ћелије од оксидационог стреса (399), што је директно пропорционално продукцији  $\bullet\text{NO}$ . Азот моноксид на овај начин утиче на регулацију многих биолошких одговора, као што су индукција и активација гена, инхибицију агрегације тромбоцита, цитостаза, апоптоза, неуротрансмисија, стимулација имуног одговора, релаксација васкуларне глатке мускулатуре (201, 220).

#### 1.6.2. Хомоцистеинном посредован оксидациони стрес

Оксидациони стрес представља један од битних фактора са утицајем на ендотелну функцију. Акумулација оксидованих биомолекула мења биолошку функцију многих ћелијских путева. Постоје неколико механизма којима хомоцистеин индукује оксидативни стрес (201-220):

1. хомоцистеин аутооксидација (182, 201),
2. NADPH-оксидаза up-regulation (182, 206),
3. Хомоцистеинном-индукована редукција у L-аргинин систему (198, 199),
4. Хомоцистеинном-индукована акумулација асиметричног диметиларгинина (ADMA) (198, 206, 218) и
5. инхибиција ензимске активности антиоксиданата у ћелијама (182).

### 1.6.2.1. Аутооксидација хомоцистеина

Тиол група хомоцистеина одговорна је за токсичност самог хомоцистеина. Прва хипотеза сугерира да водоник пероксид ( $H_2O_2$ ) формиран у редокс реакцијама је последица реакције тиол групе хомоцистеина. Токсичност хомоцистеина се може објаснити кроз биотоксичност хомоцистеина, кроз три механизма која се описују у литератури (220-223):

- i. модификација протеинских структура под називом хомоцистеинилација,
- ii. индукција оксидационог стреса и
- iii. ексцитотоксичност.

Токсичност хомоцистеина је последица ковалентног везивања хомоцистеина за протеине које је праћено модификацијом њихове функције. Тај процес се зове хомоцистеинилација и представља посттранслациону модификацију протеина. Степен протеинске хомоцистеинилације је пропорционалан повећаном нивоу хомоцистеина у плазми. S-хомоцистеинилација је процес везивања хомоцистеина помоћу слободне тиол групе за другу слободну тиол групу која је заправо Cys остаток у протеинском молекулу при чему се формира дисулфидна веза, што значајно утиче на тиол-зависни редокс статус протеина. Са друге стране, N- хомоцистеинилација је резултат високе реактивности хомоцистеин-тиолактона (Hcy-TL) чија је синтеза катализована метионил- tRNA синтетазе у присуству АТФ. N- хомоцистеинилација постоји када хомоцистеин интерагује са својим аминокиселинама са  $\epsilon$ -амино групом лизинског протеинског остатка која мења и оштећује структуру и функцију модификованог протеина (224, 225).

Експерименталне студије наводе да Hcy-TL учествује у патобиологији хомоцистеина, која узрокује N- хомоцистеинилацију. Ин виво, Hcy-TL погађа и мења албумин у крви, хемоглобин, имуноглобулине, LDL, HDL, трансферин, антитрипсин и фибриноген. Додатно, Hcy-TL делује као инхибитор  $Na^+/K^+$ -АТФ-азе у хипокампусу, кортексу и ћелијама мозга код пацова, мењајући потенцијал мембране при чему настају штетни ефекти на нервним ћелијама (225). Повећана плазма концентрација Hcy-TL и протеина измењена N- хомоцистеинилацијом су директне последице или генетских дефеката у метаболизму хомоцистеина или након метионином-богате исхране. Углавном, N- хомоцистеинилација утиче на функцију протеина кроз интеракцију нове слободне тиол групе и инактивације слободне аминокиселине што резултира у промени

редокс потенцијала протеина праћеној повећаним оксидационим стресом. Тако онда патолошке последице N- хомоцистеинилације су цитотоскично посредована углавном ендоплазматским оксидационим стресом, неадекватним одговором протеина, повећаном протеинском деградацијом, ензимском инактивацијом и чак амилоидном формацијом (226). Поред тога, доказано је и да модификовани протеини N- хомоцистеинилацијом могу имати улогу неоантигена, подстичући активацију инфламаторног одговора који је кључни механизам у патогенези атерогенезе, атеротромбозе и možданог удара. Неоантигени индукују и аутоимунски одговор па је и концентрација антитела виша у неким патолошким стањима, као што су цереброваскуларне и реналне болести. N-хомоцистеинилизовани протеини на луминалној страни васкуларних ендотелних ћелија су заправо препознати као специфична антитела и ова неоантиген-антитело интеракција води ка активацији циркулишућих макрофага, који су одговорни за поновљено оштећење васкуларног ендотела. Даље, Hcy-TL смањује способност васкуларног ендотела да се обнови и регенерише директном инхибицијом лизил-оксидазом (Lox), која је одговорна за структуру колагена и еластина у артеријском зиду. Молекуларни механизми који узроковани Hcy-TL су организација хроматина, процеси у вези са мастима и "one-carbon" метаболизам (224-226). Укупно гледавши, сви поменути процеси имају важну улогу у регулацији васкуларне функције. N- хомоцистеинилација је заправо процес који учествује у коагулацији крви, метаболизму сумпоровитих аминокиселина и липида, који су заправо индуктори атеросклерозе и коронарне болести срца.

Хомоцистеин као слободна аминокиселина може бити у редукованом и оксидованом облику. У плазми доминира редуковани облик хомоцистеина који лако подлеже оксидацији, при чему два редукована облика дају дисулфид, два  $H^+$  и  $2e^-$  (227). У присуству јона метала и кисеоника хомоцистеин се лако аутооксидује и даје: супероксид радикал, хидроксилни радикал, водоник пероксид ( $H_2O_2$ ) и тиолне слободне радикале. Дакле, аутооксидацијом хомоцистеина настаје акумулација снажног оксидативног агенса, водоник пероксида. Тиоли у присуству јона гвожђа имитирају липидну пероксидацију, продукцију хидроксилног радикала и оксидативно модификованих протеина (228). Директно токсично дејство супероксид радикала, се огледа у његовој склоности ка оксидацији липопротеина мале густине (ЛДЛ), односно утицају на повећано преузимање ЛДЛ честица од стране "скавенгер" ћелија. Хидроксилни радикали и супероксидни анјон, под дејством супероксид дисмутазе или



спонтано, конвертује се у H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Водоник пероксид и супероксидни радикали могу инактивирани азот моноксид и створити још јаче оксиданте, насцентни кисеоник и пероксинитрит, који води ка нитритацији тирозина који потом изазива промене у функцији протеина и индукује ћелијску дисфункцију (227).

#### 1.6.2.2. NADPH-оксидаза *up-regulation*

Од када је инкубацијом аортних ендотелних ћелија физиолошком концентрацијом хомоцистеина (1 mM) показано постојање повећане производње супероксид анјон радикала, и од када је доказано да антиоксиданси имају улогу у снижавању оксидационог стреса и регулацији хомоцистеином-индуковане ендотелне дисфункције, од тада је сугерисано да оксидациони стрес има важну улогу у нарушавању ендотелне функције хомоцистеином. Ову претпоставку подржава и чињеница да супероксид редукује биорасположивост азот монооксида у реакцији са њим формирајући пероксинитрит (228-230).

Хомоцистеин садржи високо реактивну сулфхрилну групу (-SH), која врло лако подлеже самооксидацији и формира дисулфидне везе са другим слободним тиолима, што је праћено стварањем слободних кисеоничних радикала као нуспродуката. Заправо, више од 98% хомоцистеина у плазми постоји у оксидованом стању, или у облику дисулфидног димера или у комбинацији са протеинима. Иако претходне студије наводе да је производња супероксид анјон радикала последица потенцијалне самооксидације хомоцистеина, још увек се поставља питање зашто цистеин, као још један тиол али у знатно већем изобиљу, не изазива значајан оксидациони стрес и не оштећује васкуларни ендотел (198-205).

Оксидациони стрес који се генерише током оксидације хомоцистеина, може бити парцијално генерисан кроз *upregulation* ензима никотинамид аденин динуклеотид фосфат-оксидаза (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase-NADPH oxidase*) која генерише супероксид анјон радикал кроз следећу реакцију (200, 201):



Постоји неколико изоформи NADPH-оксидазе (NOX), при чему су ендотелне ћелије најчешће изложене NOX2 изоформи. Хомоцистеин значајно повећава експресију гена за NOX2, акумулацију *phox47-a* у једру (протеинска субјединица NOX2) и перинуклеусну локализацију изоформе NOX4, а повећање експресије остварује у

временски и дозно-зависном маниру. Са друге стране, количина створених генерација реактивних кисоничних врста не може се објанити истим повећањем активности NADPH-оксидазе. Овакву појаву можемо објаснити сазнањем да *upregulation* NADPH-оксидазе представља иницијални извор оксидационог стреса у ендотелним ћелијама икоји предствала окидач за настанак нових генерација слободних радикала у хиперхомоцистеинемiji. Неке клиничке студије наводе и урођени недостатак изоформе NOX2 као разлог настанка претходно поменутог оштећења (204, 208).

#### *1.6.2.3. Хомоцистеином-индукована редукција у L-аргинин систему и настанак пероксинитрита*

Азот моноксид настаје услед дејства ендотелијалне азот моноксид синтетазе (*e-NOS*) која захтева присуство атома азота. L-аргинин реагује са кисеоничним радикалима након чега настаје редукција посредована NADPH, услед чега се формирају азот моноксид радикали и нуспродукт L-цитрулин. Због тога, константно снабдевање L-аргинина је важно у одржавању довољне продукције азот монооксида. Поред тога, претпоставка је да смањења синтеза азот монооксида услед реаговања са L-аргинином је посредована хомоцистеином, односно преузимањем L-аргинина у ендотелним ћелијама и учествовањем у<sup>+</sup> катјонског аминокиселинског транспортера (у<sup>+</sup> *cationic amino acid transporter* –*CAT*) (198-203).

Поред тога, деплеција L-аргинина не резултира само у деплецији синтезе азот монооксида већ и у феномену познат под називом *e-NOS* распаривање (*енг. e-NOS uncoupling*). Заправо, *e-NOS* постоји као хетеродимер који се састоји од 2 редуктазе спојене са другим паром кисеоника. У пару редуктаза, електрони из NADPH редукују кисеоник хемом као кофактором и резултујућим гвожђе-диоксидом последично оксидује L-аргинин, при чему на тај начин настаје азот моноксид у оксигеназном домену. У одсуству довољне количине L-аргинина, смањен је прилив кисеоника потребног за продукцију азот монооксида али редуктаза и даље наставља редукцију кисеоника, што резултира продукцијом супероксид анјон радикала (198-210). Стога, *e-NOS* сада учествује у процесу распаривања и преусмерена је са производње азот монооксида на производњу реактивних кисеоничних врста (POC). Овај феномен који настаје под утицајем хомоцистеина описан је у *ex vitro* студијама где је показано да продукција POC-а је директно пропорционална *e-NOS* активности (198). Дакле, хомоцистеином индуковано оштећење транспорта L-аргинина, последично доводи до распаривања *e-NOS*-а што значајно контрибуира у повећању оксидативног стреса а

смањењу ендотелијалне продукције азот монооксида. Поред тога, хомоцистеин узрокује *downregulation* глутатион пероксидазе, кључног генератора интрацелуларне резерве антиоксидантних ензима, сугерирајући заправо да хомоцистеин не контрибуира у настанку оксидативног стреса само повећањем реактивних кисеоничних врста, већ и супресијом антиоксидативне способности ендотелних ћелија (201, 202).

#### *1.6.2.4. Хомоцистеином-индукована акумулација асиметричног диметиларгинина (ADMA)*

У литератури је описан још један механизам хомоцистеином-индуковане нарушене ендотел-зависне дилатацијем, а који је укључен асиметрични диметиларгинин (ADMA), који може имати улогу ендогеног компетитивног инхибитора за e-NOS (198). Хиперхомоцистеинемија је уско повезана са акумулацијом асиметричног диметиларгинина и инхибитора ендотелне азот-оксид синтетазе (NOS), који инхибира ендотелну и индуцибилну NOS. Висока концентрација асиметричног диметиларгинина ослабљује ацетилхолином индуковану коронарну вазодилатацију и указује на оштећену сигнализацију ендотелног азот-оксида. Инхибиција NOS помоћу асиметричног диметиларгинина и повећан нитротирозин могу значајно смањити NO биорасположивост (202-209)

## 1.7. ХИПЕРХОМОЦИСТЕИНЕМИЈА: ТЕРАПИЈСКЕ МОГУЋНОСТИ

Имајући у виду све претходно наведено, последњих година пажњу научне јавности заокупљује не само плазма концентрацијом-зависна повезаност хомоцистеина и кардиоваскуларног ризика, већ и могуће мере смањења нивоа хомоцистеина са тежњом ка смањењу морбидитета и морталитета од васкуларних болести. Повишени нивои хомоцистеина повећавају ризик за развој атеротромботичне кардиоваскуларне болести, периферне васкуларне болести, инфаркта миокарда и мозданог удара, а сви ови подаци добијени су из опсервационих и студија пресека. У сваком случају, ова сазнања, заједно са познавањем механизма на ћелијском нивоу којима хомоцистеин промовише оксидативним-стресом индуковану васкуларну дисфункцију, су обезбедила доказе да се подрже претклиничка и клиничка истраживања у вези са снижавањем нивоа хомоцистеина, односно нови терапијски аспекти третмана хиперхомоцистеинемije.

Као један од могућих потенцијалних третмана хиперхомоцистеинемije наводи се орална комбинована примена фолне киселине, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub>. Агенција за храну и лекове издала је дозволу за примену фолне киселине 1996. године, у превенцији дефеката неуралне цеви у току трудноће, а изнели су податак да примена фолне киселине може смањити концентрације хомоцистеина у крви за ~53% (RR=0.28, 95% CI 0.12-0.71) (231-233).

У последњој деценији, рандомизирани клиничке студије су тестирале ефикасност примене витаминске суплементације као третмана у смањењу хомоцистеина на различите исходе болести, али и у секундарној превенцији кардиоваскуларних болести (148-151, 234). Резултат у овим студијама је био негативан што је значило да оваква терапија није имала ефекта. Но, тада се онда почело размишљати заправо о томе да ли је и у којој мери хиперхомоцистеинемija удружена са осталим факторима ризика за настанак и развој кардиоваскуларних болести, као што је липидемija. Због тога, и сам третман пацијената са хиперхомоцистеинемijом и дислипидемijом би се сада разликовао, а мали је број студија који се бавио овом проблематиком (148-152). Циљ је да хиперхомоцистеинемija заправо постане модификујући фактор ризика за кардиоваскуларне болести. Ефикасност и оправданост фармаколошког третмана хиперхомоцистеинемije и дислипидемije у примарној и секундарној превенцији кардиоваскуларних болести је у великој мери још увек

непозната (235-237). Из тог разлога, поставља се питање, да ли примена статина у примарној или секундарној превенцији кардиоваскуларних болести, има утицаја на смањење концентрација хомоцистеина у крви, и каква је њихова улога у превенцији кардиоваскуларне болести у хиперхомоцистеинемiji, обзиром да је оваква стања и третмане тешко посматрати као одвојене ентитете.

### 1.7.1. Инхибитори *HMG-CoA* редуктазе

Давне 1970. године др Акира Ендо је открио супстанцу изоловану из гљивице која инхибира активност *HMG-CoA* редуктазе, кључног ензима у синтези холестерола. Нешто касније, 1987. године изолован је и ловастатин, први инхибитор *HMG-CoA* редуктазе, који се тада користио у третману хиперхолестеролемије. Због своје доступности и тога што су постали генерички лекови, лекови су првог избора у третману липидних поремећаја и једни од најшире употребљиванијих лекова данас. У кардиологији, статини се сматрају револуционарним лековима, како у примарној тако и у секундарној превенцији (238-240).

Данас, постоји седам инхибитора *HMG-CoA* редуктазе, од којих су три изолована из гљивица (ловастатин, симвастатин и правастатин), и четири синтетисана хемијским путем (аторвастатин, росувастатин, флаувастатин и питавастатин). Статини имају различите фармакокинетичке особине које могу да објасне клинички значајне разлике у погледу безбедности и њихових интеракција. Већина статина су липофилни изузев правастатина и росувастатина који су хидрофилни. Липофилни статини могу лакше ући у ћелију, али клинички значај ове разлике није довољно истражен. Већим делом клиренс статина је преко јетре и гастроинтестиналног тракта, док је бубрежни клиренс статина у целини низак, посебно аторвастатина, који има веома низак проценат излучивања преко бубрега и због тога је лек избора код пацијената са значајним бубрежним болестима. Полу-живот статина варира, па тако ловастатин, правастатин, симвастатин и флаувастатин који имају кратак полуживот (1-3 часа) док аторвастатин, росувастатин и питавастатин имају дуг полуживот. Сви статини су најефикаснији када се дају у вечерњим сатима када је активност ХМГ-ЦоА редуктазе максимална. Кључна разлика између статина је њихов пут метаболизма. Симвастатин, ловастатин и аторвастатин се метаболишу преко изоформе *CYP3A4* ензима и лекови који утичу на *CYP3A4* изоформе, могу мењати метаболизам ових статина. Флувастатин

се метаболише углавном преко *CYP2C9* са малим доприносом од *CYP2C8*, питавастатин и росувастатин се минимално метаболишу преко *CYP2C9* путева. Правастатин се не метаболише уопште путем система *CYP* ензима (238-240).

### **1.7.2. Механизам дејства и липидни ефекти инхибитора HMG-CoA редуктазе**

Статини су компетитивни инхибитори HMG-CoA редуктазе, који узрокују смањену синтезу холестерола у јетри. Статини имитирају природни супстрат, HMG-CoA који се компетитивно везује за HMG-CoA редуктазу која катализује конверзију HMG-CoA до мевалоната (Слика 4), и управо на том кораку конверзије делују статини, спречавањем биосинтезе холестерола (241-243).

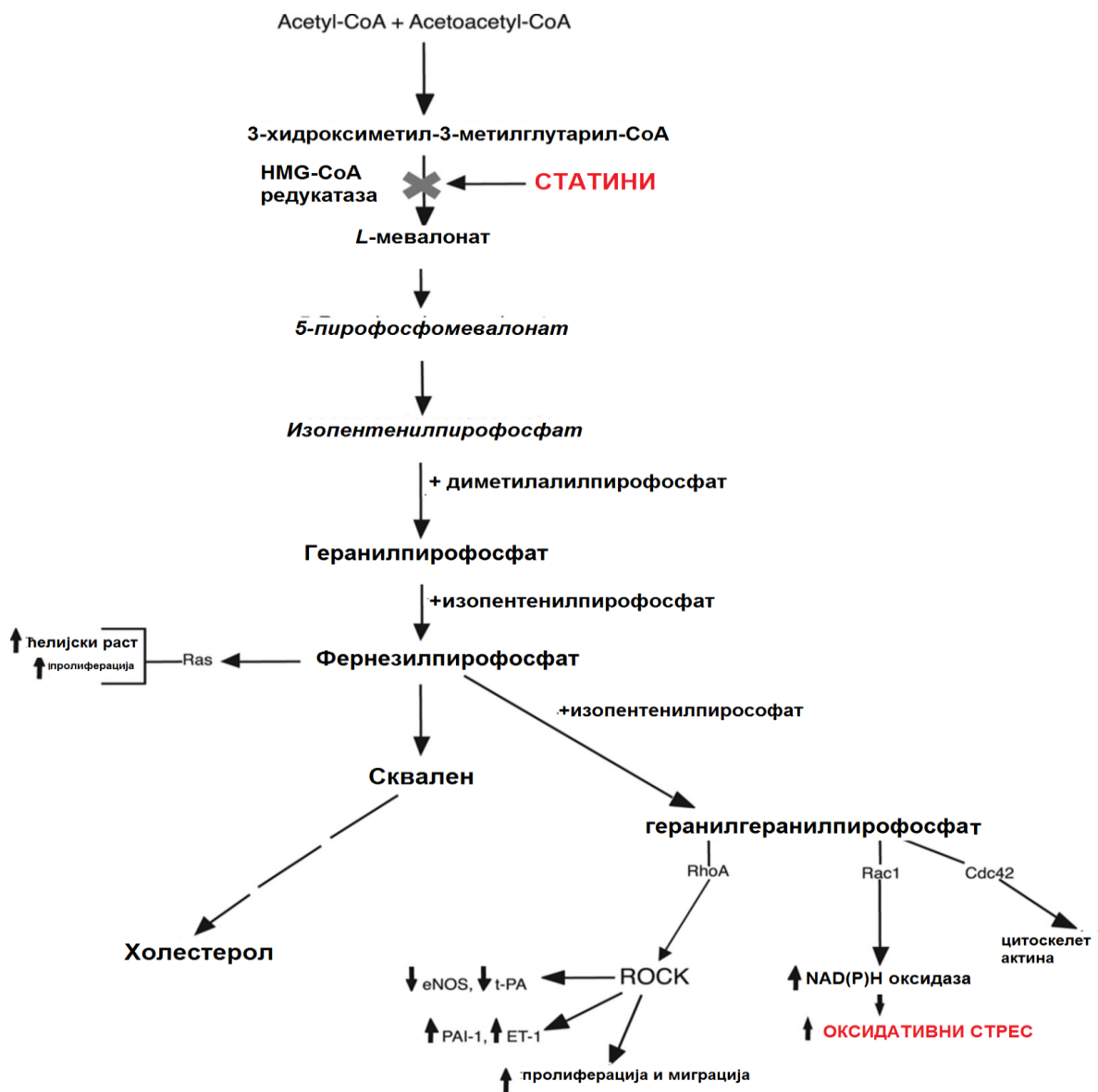
Инхибиција хепатичне синтезе холестерола резултира смањењем холестерола у ендоплазматском ретикулуму, а што има за последицу смањен прелазак регулаторног стерол-елемента за везивање протеина (SREBPs) из ендоплазматског ретикулума у голџијев апарат, где се разлаже под утицајем протеаза до активних транскрипционих фактора. SREBPs се онда премешта до једра, где сада настаје повећана експресија гена, укључујући и HMG-CoA редуктазе и најважније, експресију LDL рецептора. Повећана експресија HMG-CoA редуктазе поништава синтезу холестерола до нормалне, док повећана експресија LDL рецептора доводи до повећања броја рецептора на плазма мембрани хепатоцита, узрокујући убрзану разградњу аполипоропротеина Б и Е који садрже липопротеине (LDL и VLDL). Повећана разградња LDL и VLDL-а доводи до редукције плазма LDL нивоа и триглицерида (244, 245) (Слика 4).

Главни ефекти статина огледају се у снижавању нивоа LDL-холестерола. Различити статини испољавају различите ефекте и способност снижавања LDL-холестерола, при чему максималну редукцију овог холестерола може остварити росувастатин, и то до 60%. Дуплирање дозе статина доприноси додатном смањењу за 6% LDL-нивоа, и монотерапија статином је најчешће довољна за снижавање холестерола испод циљаних вредности. После ацетилсалицилне киселине, у превенцији кардиоваскуларних болести, препоручује се рана и интензивна примена статина независно од вредности холестерола, са циљем да се LDL смањи испод 2,6 mmol/l, односно на основу PROVE IT студије, да буде мањи од 1,81 mmol/l. Позитиван утицај на ризик од смртног исхода може се запазити тек након 4 месеца, а постаје значајан након годину дана континуиране примене и вероватно је последица њихових

“липидских” дејстава. Из тог разлога, актуелни водичи препоручују дугорочни наставак континуиране примене статина ради стабилизације атеросклеротског плака (246, 247).

### **1.7.3. Нелипидни (плеиотропни) ефекти статина**

Поред хиполипидних ефеката, статини поседују различите плеиотропне ефекте, односно ефекте који нису у директној повезаности са променама у метаболизму липида, односно у вези са *LDL*-холестеролом (247, 248). Плеиотропни ефекти статина су побољшање ендотелне функције, смањење васкуларне инфламације, смањење агрегабилности тромбоцита, повећање неоваскуларизације исхемијског ткива, повећање пролиферације ендотелних прогениторних ћелија, стабилизација атеромског плака, антироботичко деловање, појачање фибринолизе, остеокласна апоптоза и повећање синтетичке активности остеобласта, инхибиција миграције герминативних ћелија током развоја и имуносупресија (240-248). Статини своје потенцијално плеиотропно (нелипидско) корисно дејство остварују стимулацијом синтезе NO, чиме долази до побољшања функције ендотела, инхибицијом пролиферације ћелија зида артерије и индукцијом апоптозе. Помиње се у литератури да имају удела у инхибицији агрегације тромбоцита и нивоа фибриногена, а своје антиинфламаторно дејство остварују и снижавањем Ц-реактивног протеина, (*CRP*) а имуномодулаторно снижавањем нивоа интерферона гама (*IF- $\gamma$* ). Последњих година, све више се помиње и антиоксидантно дејство статина, и претпоставка је да такво дејство остварују кроз смањење оксидације липопротеина ниске густине ( $\downarrow$ окс. ЛДЛ). Заправо, претпоставка је да ови ефекти имају клинички значај, али тачан механизам и значај ових ефеката још увек није довољно познат (Слика 4) (248).



Слика 4. - Пут синтезе холестерола, начин деловања и ефекти статина који указују на инхибицију 3-хидрокси-3-метил-глутарил-коензиме-А (*HMG-CoA*) редуктазе. Смањена изопренализација сигналних молекула као што су *Ras*, *Rho*, и *Rac*, води ка модулацији различитих сигналних путева. *eNOS*- представља ендотелијалну азот моноксид синтетазу; *ET-1*- ендотелин-1; *NAD(P)H*- никотинамид аденин динуклетид фосфат; *PAI-1*- активатор плазминогена-1; *ROCK*- rho-повезана протеин киназа; и *tPA*-ткивно специфични активатор плазминогена (248)



## 1.8. СТАТИНИ У ПРЕВЕНЦИЈИ КАРДИОВАСКУЛАРНИХ БОЛЕСТИ

Ендотелијална дисфункција изазвана хиперхомоцистеинемијом и/или хиперхолестеролемијом се карактерише нарушеном биорасположивошћу ендотел-синтетишућег азот монооксида (249). Овај вазодилататор је важан осим у вазодилатацији и у агрегацији тромбоцита, пролиферацији васкуларних глатких мишићних ћелија и ендотел-леукоцити интеракцији. Претпоставка је да статини могу повећати продукцију азот монооксида, делом помоћу *up*-регулације ендотелијалне азот монооксид синтетазе (eNOS), што посматрамо као нелипидни (плеиотропни) ефекат статина (250-253). Иако је повећање eNOS и других ћелијских маркера веома важно, још увек не постоје проспективне анималне нити клиничке студије које би детаљније објасниле клиничке ефекте употребе статина чиме би статини добили и друге индикације у клиничкој пракси. Претпоставка је да статини, активирају eNOS кроз неколико механизма. Један од сигналних путева подразумева Rho/ROCK сигнални пут, где се повећањем активности ROCK-а инхибира eNOS, и обрнуто (254). Статини такође повећавају активност eNOS помоћу пост-транслационе активације фосфатидилинозитол 3-киназа/протеин киназе активације, односно Akt-сигналног пута, где је eNOS фосфорилисана путем Akt. Управо ова инхибиција Rho/ROCK сигналног пута активира PI3k/Akt сигнални пут и последичну кардиопротекцију, при чему је ROCK негативни регулатор Akt-а, вероватно кроз активацију фосфатазе и хомолога тензина. У литератури се и помиње утицај статина на кавеолин-1, који је интегрисани мембрански протеин који штити eNOS у кавеолама и директно инхибира продукцију азот монооксида. Дакле, статини смањују експресију кавеолина-1 промовишући активност eNOS (254-258).

Посредством свих претходно наведених механизма, статини остварују ефекте на ћелије вансрчаног порекла, међутим описани су и механизми деловања статина на сам миокард. GTP-везујући протеини, Ras, Rho, и Rac имају важну улогу у хипертрофији срчаног мишића (242, 255, 256). У експерименталним студијама, мишеви без Rac1 имају смањену активност NADPH оксидазе и повећан оксидативни стрес у муокарду, уз потврду да је Rac1 есенцијални фактор у хипертрофији миокарда. Уз то, овај протеин повећава и активност минералкортикоидних рецептора. У литератури се помиње да, статини у *in vitro* условима повећавају активност Rac1 како у липид-зависним тако и независним стањима, што значи да могу спречити настанак

хипертрофије, фиброзе миокарда, а као статин који то врло често изазива помиње се аторватстатин. Вероватно, статини инхибицијом NADPH-а остварују протективно дејство на преткоморски миокард (254). Поред тога, статини вероватно повећавају биоасположивост азот монооксида, који повећава проток крви миокарда и под хипоксичним условима и инхибирају IL-6, IL-8 и адхезивни молекул васкуларних ћелија-1, али и редуковањем митохондријалне дисфункције и смрти кардиомиоцита. Даље, претпоставка је да статини редукују и Rac1-посредовану продукцију реактивних кисеоничних врста и оксидо-сензитивне инфламаторне путеве (249, 251, 257, 258).

Обзиром да је стање хиперхомоцистеинемије стање повишене производње реактивних кисеоничних и азотних врста, остаје непознаница како примена статина утиче на редокс статус у нормолипемичким условима и да ли је у таквим стањима оправдана примена статина у терапијским дозама. Поред тога, поставља се и питање ефикасности статина у третману срчаних болести, као и питање бенефита терапије статинима у најранијим фазама кардиоваскуларне болести.

**2.**

## **ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА**

## 2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

На основу свега претходно изложеног циљеви наше студије су били следећи:

### 2.1. Општи циљеви:

1. Евалуација ефеката хроничне администрације метионина на функцију миокарда изолованог срца пацова.
2. Евалуација ефеката хроничне администрације аторвастатина и симвастатина на функцију миокарда изолованог срца пацова.
3. Компарација ефеката хроничне администрације аторвастатина и симвастатина на функцију миокарда изолованог срца пацова у условима нормалног и повишеног хомоцистеина у крви
4. Испитивање утицаја хроничне администрације различитих инхибитора хидроксиметил глутарил СоА-редуктазе на коронарну циркулацију изолованог срца пацова у условима нормалног и повишеног хомоцистеина у крви

### 2.2. Специфични циљеви:

5. Испитивање ефеката различитих параметара оксидационог стреса (липидних пероксида (TBARS), азот монооксида (NO), супероксид анјон радикала ( $O_2^-$ ), и водоник пероксида ( $H_2O_2$ ) на кардиодинамске параметре срчаног рада и коронарну циркулацију у условима нормалног и повишеног хомоцистеина у крви
6. Испитивање улоге различитих параметара антиоксидативног система заштите (редуковани глутатион (GSH), супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT)) на кардиодинамске параметре срчаног рада и коронарну циркулацију у условима нормалног и повишеног хомоцистеина у крви
7. Испитивање утицаја хроничне администрације различитих инхибитора хидроксиметил глутарил СоА-редуктазе на морфометријске карактеристике и липидни профил пацова у условима нормалног и повишеног хомоцистеина у крви

8. Процена међусобне интеракције хомоцистеина и оксидационог стреса, као и ефеката исте на функцију миокарда и коронарне циркулације, морфометријске карактеристике, липидне и не-липидне биохемијске параметре.
9. Испитивање механизмама путем којих потенцијални међусобни утицај егзогеног метионина, ендогеног хомоцистеина, различитих инхибитора хидроксиметил глутарил СоА-редуктазе и слободних радикала учествује у одржавању хомеостазе срчаног рада.

### **3.**

## **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

#### 3.1. МАТЕРИЈАЛ

У овој експерименталној студији употребљене су специјалне дијете за пацове различитог састава произвођача *Mucedola*, Милано, Италија и аналитички стандарди и супстанце високе чистоће произвођача *Sigma–Aldrich Chemie GmbH*, Немачка.

##### 3.1.1. Специјалне дијете за пацове

У циљу изазивања клинички најближег облика хиперхомоцистеинемije животиње су биле подвргнуте исхрани богатој метионином или исхрани богатој метионином без фолата, витамина B<sub>12</sub> и B<sub>6</sub> према раније утврђеном протоколу (259, 260). Контролна група храњена је стандардном храном за пацове. Пацовима је храна била доступна без ограничења, *ad libitum*.

Специјална дијета и стандарда храна за пацове је храна обогаћена или дефицијентна одређеним компонентама, стерилизована и припремљена индустријским путем и намењена искључиво за исхрану лабораторијских пацова у пелетираном облику. Пре употребе чувана је по упутству произвођача, на сувом, тамном и хладном месту, на температури од +4 до +1°C.

Стандардна исхрана подразумева примену хране са следећим саставом: метионин 3,8 g/kg, витамин B<sub>6</sub> 70,0 mg/kg, витамин B<sub>9</sub> 2,0 mg/kg, витамин B<sub>12</sub> 0,03 mg/kg и осталих компоненти: казеин, 18,5 %, масти 7,5%, угљени хидрати 2%, витамин А 4000 IU/kg, витамин D<sub>3</sub> 1000 IU/kg, витамин Е 25 mg/kg, Na (натријум) 0,15-0,25 %/kg, Fe (у виду гвожђе цитрата) 40,2 mg/kg, P (фосфор) мин. 0,5 %/kg, Mn (у виду манган карбоната) 10,5 mg/kg, Zn (у виду цинк карбоната) 33,5 mg/kg, Cu (у виду бакар карбоната) 6,2 mg/kg, I (у виду калијум јодида) 0,21 mg/kg, Se (у виду натријум селенита) 0,15 mg/kg, Mo (у виду амонијум молибдата) 0,15 mg/kg, t-butylhydroquinone 14 mg/kg и остатак 10%.

Специјална дијета обогаћена метионином са високим садржајем витамина, подразумева примену хране са следећим саставом: метионин 7,7 g/kg, витамин B<sub>6</sub> 70,0 mg/kg, витамин B<sub>9</sub> 2,0 mg/kg, витамин B<sub>12</sub> 0,03 mg/kg и осталих компоненти: казеин, 18,5 %, масти 7,5%, угљени хидрати 2%, витамин А 4000 IU/kg, витамин D<sub>3</sub> 1000 IU/kg, витамин Е 25 mg/kg, Na (натријум) 0,15-0,25 %/kg, Fe (у виду гвожђе цитрата) 40,2

mg/kg, P (фосфор) мин. 0,5 %/kg, Mn (у виду манган карбоната) 10,5 mg/kg, Zn (у виду цинк карбоната) 33,5 mg/kg, Cu (у виду бакар карбоната) 6,2 mg/kg, I (у виду калијум јодида) 0,21 mg/kg, Se (у виду натријум селенита) 0,15 mg/kg, Mo (у виду амонијум молибдата) 0,15 mg/kg, t-butylhydroquinone 14 mg/kg и остатак 4%.

Специјална дијета обogaћена метионином са ниским садржајем витамина, подразумева примену хране са следећим саставом: метионин 7,7 g/kg, витамин B<sub>6</sub> 0,01 mg/kg, витамин B<sub>9</sub> 0,08 mg/kg, витамин B<sub>12</sub> 0,01 mg/kg и осталих компоненти: казеин, 18,5 %, масти 7,5%, угљени хидрати 2%, витамин А 4000 IU/kg, витамин D<sub>3</sub> 1000 IU/kg, витамин Е 25 mg/kg, Na (натријум) 0,15-0,25 %/kg, Fe (у виду гвожђе цитрата) 40,2 mg/kg, P (фосфор) мин. 0,5 %/kg, Mn (у виду манган карбоната) 10,5 mg/kg, Zn (у виду цинк карбоната) 33,5 mg/kg, Cu (у виду бакар карбоната) 6,2 mg/kg, I (у виду калијум јодида) 0,21 mg/kg, Se (у виду натријум селенита) 0,15 mg/kg, Mo (у виду амонијум молибдата) 0,15 mg/kg, t-butylhydroquinone 14 mg/kg и остатак 4%.

Упоредни приказ састава контролне и специјалне исхране којој су били подвргнути пацови у трајању од четири недеље је приказан табеларно (*Табела 2*).



Табела 2. Упоредни приказ састава стандардне хране и специјалних дијета за пацове

САСТАВ	СТАНДАРДНА ХРАНА	ХРАНА БОГАТА МЕТИОНИНОМ	ХРАНА БОГАТА МЕТИОНИНОМ БЕЗ ВИТАМИНА
Метионин (g/kg)	3,8	7,7	7,7
Витамин В <sub>6</sub> (mg/kg)	70,0	70,0	0,01
Витамин В <sub>9</sub> (mg/kg)	2,0	2,0	0,08
Витамин В <sub>12</sub> (mg/kg)	0,03	0,03	0,01
<b>АДИТИВИ</b>			
Протеини (Казеин, %)	20	18,5	18,5
Масти (%)	7,5	7,5	7,5
Угљени хидрати (%)	2	2	2
Витамин А (IU/kg)	4000	4000	4000
Витамин D <sub>3</sub> (IU/kg)	1000	1000	1000
Витамин Е (mg/kg)	25	25	25
Na (натријум, %/kg)	0,15-0,25	0,15-0,25	0,15-0,25
Fe (Гвожђе цитрат, mg/kg)	40,2	40,2	40,2
P (фосфор, %/kg)	мин. 0,5	мин. 0,5	мин. 0,5
Mn (Манган карбонат, mg/kg)	10,5	10,5	10,5
Zn (Цинк карбонат, mg/kg)	33,5	33,5	33,5
Cu (Бакар карбонат, mg/kg)	6,2	6,2	6,2
I (Калијум јодид, mg/kg)	0,21	0,21	0,21
Se (Натријум селенит, mg/kg)	0,15	0,15	0,15
Mo (Амонијум молибдат, mg/kg)	0,15	0,15	0,15
t-butylhydroquinone (mg/kg)	14	14	14
Остатак (%)	10	4	4

### 3.1.2. Комплет реагенаса за припремање *Krebs-Hensenleit*-овог перфузионог раствора:

Натријум хлорид (NaCl, 27.216 g/4L), калијум хлорид (KCl, 1.4 g/4L), магнезијум сулфат (MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, 1.636 g/4L), калијум дихидроген фосфат (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O, 0.0644 g/4L), натријум бикарбонат (NaHCO<sub>3</sub>, 8.36g/4L), глукоза (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>×H<sub>2</sub>O, 8.8g/4L) и калцијум хлорид (CaCl<sub>2(anh.)</sub>, 1.117 g/4L).

### 3.1.3. Инхибитори хидрксиметил-глутарил коензим А редуктазе

За испитивање хроничних утицаја инхибитора хидрксиметил-глутарил коензим А редуктазе на изоловано срце пацова употребљени су аналитички стандарди и супстанце високог квалитета поменутог произвођача (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Немачка): аторвастатин, *Atorvastatin calcium salt trihydrate* ≥98% (C<sub>33</sub>H<sub>34</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>×0.5 Сах1.5 H<sub>2</sub>O) MW: 604,69, (број: PZ0001-25MG) и симвастатин, *Simvastatin* ≥97% (C<sub>25</sub>H<sub>38</sub>O<sub>5</sub>), MW: 418,35, (број: S6196-25MG).

### 3.1.4. Супстанце и реагенси за одређивање параметара оксидационог статуса

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

### 3.1.5. Комплет реагенаса за детерминацију индекса липидне пероксидације (TBARS):

2-тиобарбитурна киселина (ТВА, C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S), Mr 144.15; натријум хидроксид (NaOH) Mr 40.00.

### 3.1.6. Комплет реагенаса за детерминацију азот монооксида (NO) у облику нитрита:

Сулфанилна киселина (4-амино бензенсулфонска киселина, C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>S), Mr 173.19; N-(1-нафтил)-етилениамина дихидрохидрат (NEDA, C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>C<sub>12</sub>N), Mr 259.18; амонијум хлорид (NH<sub>4</sub>Cl), Mr 53.49; Боракс (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>×10H<sub>2</sub>O), Mr 381.4; 85% орто-фосфорна киселина (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), ρ=1,685 gcm<sup>-3</sup>; натријум нитрит (NaNO<sub>2</sub>), Mr 69.00.

### 3.1.7. Комплет реагенаса за детерминацију супероксид ањонског радикала (O<sub>2</sub><sup>-</sup>):

TRIS (Трис (хидроксиметил) аминоетан, C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>), Mr 121.14; 37% хлороводонична киселина (HCl), ρ=1,19 gcm<sup>-3</sup>, Mr 36.5; Na<sub>2</sub>EDTA, Mr 372.24; Нитро-тетразолијум плаво хлорид (NBT, C<sub>40</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>10</sub>O<sub>6</sub>), Mr 817.6; Желатин (C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub> NaO<sub>2</sub>), Mr 61.5 kDa.

### **3.1.8. Комплет реагенаса за детерминацију 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) Mr 214.23; калијум дихидрогенфосфат дихидрат (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O) Mr 164.09; натријум хлорид (NaCl) Mr 58.44; водоник пероксид (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Mr 34.01; D(+)-глукоза монохидрат (декстроза), Mr 198.17; фенол црвено (phenol red, C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>S), Mr 354.4; пероксидаза из коњске ротквице (peroxidase from horse radish – HRPO EC 1.11.1.7), Mr 44 kDa.

## 3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛИ

### 3.2.1. Експериментални модел хиперхомоцистеинемije

У литератури се описују различити модели хиперхомоцистеинемije, како код људи тако и на животињама. Анимални модели који увек теже да имитирају клиничке процесе промењеног метаболизма хомоцистеина су врло често неадекватни у погледу објашњавања биохемијских процеса који се дешавају код људи у условима хиперхомоцистеинемije. Анимални модели хиперхомоцистеинемije се заснивају на индукцији повишених нивоа хомоцистеина ( $>15\mu\text{M/L}$ ) код дивљих животиња различитим методама: генетским, фармаколошким и хигијенско-дијететским методама. Модели индуковани генетским поступком подразумевају циљану делецију MTHFR и CBS гена и примену тзв. “*knockout*” пацова или мишева, међутим оваква конгенитална делеција код људи изазива тешке поремећаје, не само у метаболизму хомоцистеина већ и тешке неуролошке поремећаје и скелетне малформације које засигурно нису последица хиперхомоцистеинемije (259-262).

Фармаколошки модели хиперхомоцистеинемije се заснивају на егзогеној апликацији хомоцистеина или метионина и лекова који ометају метаболизам фолне киселине (метотрексат), парентералним или оралним путем, али недостатак ових модела хиперхомоцистеинемije су фармакокинетске интериндивидуалне разлике примењених фармаколошких агенаса. У свим моделима је заједничко то да се различитим методама манипулише хомоцистеином. Најприкладнији и клинички најближи модел је модел дијетом индукована хиперхомоцистеинемija, односно уношењем хране обогаћене метионином са или без суплементације витамина В комплекса, што је пандан свакодневној хиперпротеинској исхрани код људи (259-262).

При одабиру најадекватнијег анималног модела хиперхомоцистеинемije водили смо се следећим критеријумима: а) да ли анимални модел може да звучи као хумани модел у погледу стања и исхода који ће настати; б) да ли је модел довољно прецизан ако се жели истражити исто стање на људима и в) да ли модел добро предвиђа исходе на људима. Узимајући у обзир све претходно наведено, дијетом-индукована хиперхомоцистеинемija је најадекватнији и клинички најближи модел хиперхомоцистеинемije на животињама.

### 3.2.2. Експериментални модел изолованог органа (срце)

Од када је чувени немачки физиолог Оскар Лангендорф 1895. (*Oskar Langendorff* 1853-1908) поставио хипотезу да срце сисара не захтева *a priori* присуство крви у својим шупљинама, како би обављало своју функцију и од када је заправо невероватно једноставним моделом доказао праву функцију коронарних артерија, као нутритивних крвних судова срца, од тада експериментални модел ретроградно перфундованог изолованог срца је модел који се у многим истраживањима користи за процену кардиоваскуларне функције сисара. Након овог његовог пионирског подухвата, Лангендорфови сарадници су под његовим стручним руководством наставили усавршавање овог модела, који се принципски (уз логична техничка усавршавања) задржао до данас (263, 264). Оправданост овог модела показује чињеница да се сваке године повећава број научних радова, који користе неку од модификација Лангендорфовог модела у својим истраживањима.

За изучавање функције миокарда и коронарне циркулације определили смо се за модификовани *Langendorff*-ов модел изолованог срца, применљив на изолованом срцу сисара (пас, мачка, зец, заморчић).

Две класичне варијанте *Langendorff*-ове технике које се примењују у експерименталним истраживањима су:

- Перфузија изолованог срца при константном протоку кроз коронарно васкуларно корито;
- Перфузија изолованог срца при константном притиску кроз коронарно васкуларно корито;

при чему је други параметар променљива варијабла. У првој варијанти експерименталног модела променљива варијабла је притисак, који се региструје на писачу посебним системом преносника (трансдјусера), док је у другој варијанти експерименталног модела то проток, који се региструје „*flowmetrijски*“, тј. скупљањем венског ефлуента у одређеном временском интервалу или помоћу „*flow-metra*“, који се апликује директно у коронарно артеријско корито.

У оба експериментална модела ради се о средњој вредности променљивог параметра, с обзиром да се апсолутне вредности не могу третирати као поуздане. Узрок томе су специфичности самог срчаног рада: понављање срчаних циклуса, чије радне компоненте (систола и дијастола) не трају исто, фреквенца срца која се сваког

тренутка мења, минималне разлике у температури комплексног физиолошког раствора којим се срце перфундује итд. У циљу поузданости се, због тога, одређивање променљивог параметра у функцији задатог параметра регистује у трајању од 5 минута.

Ми смо се определили за прву варијанту модификованог *Langendorff*-овог модела, који као константну величину има проток, док је притисак променљива компонента. Однос ових величина постављен је следећом формулом:

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

Избор овог модела је оправдан, јер коронарна циркулација, као испитивани феномен у нашем истраживању, управо подразумева променљивост притиска. Сагледавајући физиолошки аспект, перфузија изолованог срца при променљивом притиску има предност у односу на другу варијанту експерименталног модела (262).

### 3.2.3. Langendorff апарат LF-01 F-P

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

Основне компоненте овог апарата су следеће:

1. Две вертикалне стаклене цеви, исте висине, од којих се цев мањег калибра налази у цеви већег калибра. Између површине ове две цеви циркулише вода, која се убацује у цев већег калибра путем бочних цеви и система црева, а претходно се у воденом купатилу загрева до одређене температуре. У цев мањег калибра се, методом негативног притиска убацује комплексан физиолошки раствор (у нашем случају Krebs-Henseleit-ов раствор), који има сличне перформансе као екстрацелуларна течност. Циркулишућа вода у цеви већег калибра се загрева тако да раствор у цеви мањег калибра на излазу из система има температуру 37 °C тј. оптималну телесну температуру. Цев мањег калибра се завршава излазом, на који се поставља препарат изолованог срца;

2. Резервоара у коме се налази комплексни Krebs-Henseleit-ов раствор, чија је запремина 4 литра, који је спојен са једне стране са унутрашњом цеви мањег калибра, а са друге стране са боцом у којој се налази смеша гасова  $O_2/CO_2$ ;
3. Боце са мешом гасова у односу  $O_2:CO_2=95\%:5\%$ , а која је спојена са резервоаром у коме се налази Krebs-Henseleit-ов раствор. Боца са мешом гасова има двоструки задатак: 1) да постигне физиолошки парцијални притисак кисеоника и угљен диоксида какав егзистира у артеријској крви и 2) да негативним притиском који ствара у резервоару убацује раствор у унутрашњу цев система цеви;
4. Каниле, која спаја изводну цев система цеви и асцедентну аорту изолованог срца пацова;
5. Воденог купатила које загрева воду у спољашњој цеви и на тај начин индиректно постиже температуру физиолошког раствора од  $37\text{ }^\circ\text{C}$  (изотермичност);
6. Инфузионе пумпе, којом се жељени агенс адекватном брзином (у зависности од базалног коронарног протока) администрира непосредно на споју каниле и асцедентне аорте,
7. Рачунара са одговарајућим софтвером (*Spel Advanced HaemoSys v3.24*) преко кога се континуирано прате кардиодинамски параметри срчаног рада (Слика 15). Рачунар је повезан са сензорима преко којих добија податке о раду срца.
8. Сензора - трансдјусера који су са једне стране повезани са различитим структурама изолованог срца, а са друге стране са рачунаром. Улога сензора је у континуираном регистровању функције миокарда - леве коморе (промена притисака, систолног и дијастолног притиска, срчане фреквенце, притисака у аорти). На нашем моделу *Langendorff* апарата постоје три врсте сензора: 1) Први сензор (transducer BS4 73-0184) је повезан са лучно савијеном, танком металном цеви на чијем крају се налази балончић (пречника 5mm, latex/ најлон фолија) испуњен дестилованом водом. Овај балончић се након пресецања митралне валвуле 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).

Обзиром на морфолошку и функционалну доминантност леве коморе, праћењем ових параметара се може објективно и прецизно испитати функција читавог срца. Чињеница да се сви наведени подаци добијају директно из саме срчане шупљине, доноси овом инвазивном поступку неопходну оригиналност и веродостојност.

2) Други сензор (perfusion pressure transducer) је фиксне позиције и смештен је непосредно уз канилу, односно аорту, чиме омогућава регистровање притисака у аорти. У садашњем истраживању смо преко овог сензора били у могућности да пратимо средњи (артеријски) притисак раствора (крви) у аорти – MBP, (mmHg).

3) Трећи сензор (temperature transducer) је такође фиксне локализације, уз стаклену комору која окружује изоловано срце, и региструје температуру срца.

Комплексни *Krebs Hensenleit*-ов раствор је по свом саставу врло сличан екстрацелуларној течности. Он се састоји из: NaCl – 118mmol/L, KCl - 4,7 mmol/L, MgSO<sub>4</sub> - 1,66 mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> - 24,88 mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 1,18 mmol/l, глукоза (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) - 5,55 mmol/L, и CaCl<sub>2</sub> - 2,52 mmol/L. pH раствора износи 7,4. Улога овог раствора је да, захваљујући свом саставу, обезбеди одговарајућу исхрану срца и тиме му омогући несметан рад.

Овакав експериментални модел омогућава регистровање и анализу следећих кардиодиманских параметара:

- $dp/dt \max$  – максимална стопа промене притиска у левој комори, изражава се у mmHg/s,
- $dp/dt \min$  – минимална стопа промене притиска у левој комори, изражава се у mmHg/s,
- SLVP – систолни притисак у левој комори, изражава се у mmHg,
- DLVP – дијастолни притисак у левој комори, изражава се у mmHg, и
- HR – фреквенца рада срца, изражава се као број откуцаја срца у минути (bpm)

$dp/dt \max$  је параметар помоћу кога смо индиректно процењивали контрактилну, а  $dp/dt \min$ , релаксантну способност миокарда, као што је поменуто у ранијим радовима (263).

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



### 3.3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ

Све експерименталне процедуре су се спроводиле у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу (Одобрење Етичке комисије за заштиту добробити експерименталних животиња број 01-11794).

У нашем истраживању смо користили модел дијетом индуковану хиперхомоцистеинемију и модел изолованог срца пацова *Wistar albino* соја, као најоптималније моделе за испитивану проблематику. Старосна доб жртвованих пацова је била 4 недеља, пол мушки, а телесна маса  $100\pm 15$  г грама. Животиње су чуване у стандардним лабораторијским условима (температура ваздуха  $23\pm 1^\circ\text{C}$ , 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 девет (9) експерименталних група (10 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 број 01-11794.

У циљу изазивања клинички најближег облика хиперхомоцистеинемије животиње бити подвргнуте исхрани богатој метионином или исхрани богатој метионином без фолата, витамина  $\text{B}_{12}$  и  $\text{B}_6$  према раније утврђеном протоколу (259, 260). 31. дана, након жртвовања, животињи се узима крв како би се измериле вредности хомоцистеина и утврдило постојање хиперхомоцистеинемије.

Животиње би осим контролисаног режима исхране имале и одговарајући фармаколошки третман. У зависности од фармаколошког третмана свака група је подељена на подгрупе: подгрупа свакодневно интраперитонеално прима аторвастатин у дози 3 mg/kg и подгрупа свакодневно интраперитонеално прима симвастатин у дози од 5 mg/kg. Након завршеног контролисаног режима исхране и фармаколошког третмана (31. дана) животиње би биле жртвоване да би се спровела испитивања на изолованом срцу (испитала функција миокарда и коронарна ауторегулација).

Жртвовање животиња ће се спровести на начин којим се избегава патња експерименталних животиња, а у сагласности са релевантном директивом. Жртвованим животињама би се изоловало срце и перфундовало према модификованој техници изолованог ретроградно перфундованог срца по Langendorff-у. Животиње се жртвују након краткотрајне кетамин/ксилазин наркозе 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.

Да би се одржало у релативној хомеостази, током ових процедура, срце је преливано физиолошким раствором (+4°C). По отварању грудног коша, пресечен је перикард на врху срца и на тај начин срце је било спремно за изоловање. Након пресецања перикарда, крвни судови на бази срца се ресецирају, орган се вади из грудног коша и одмах се ставља у леден физиолошки раствор ((-4) – (-10) °C), чиме се импровизује тзв. „физиолошка клешта“ и метаболички процеси у миокарду се свде на минимум.

По стављању органа на лед, спроводи се тупа препарација базе срца, са отклањањем свих елемената, изузев асцендентне аорте, јер се кроз њу одвија ретроградна перфузија. Препарисана аорта се, потом, концем причвршћује (везује) за канилу за ретроградну перфузију чиме експеримент почиње. У циљу што поузданијих резултата, односно одржања виталности препарата, потребно је да ова хируршка процедура траје свега 2-3 минута.

Након постављања изолованог срца на апарат по Langendorff-у, у пределу леве аурикуле, се пресеца лева преткомора, чиме се приступа митралној валвули. Потом се, пинцетом разарају митрални залистци, што у нашем експерименталном моделу има двоструки значај: 1) на овај начин притисак у левој преткомори је сведен на нулу, чиме се искључује сваки утицај на коронарну циркулацију, који не зависи од функције леве коморе. То омогућава постизање оптималних услова за ретроградну перфузију изолованог срца, јер ток раствора за перфузију има следећи смер: аорта - лева преткомора - лева комора - коронарни синус - коронарне артерије - коронарне вене, што фокусира и простор нашег истраживања на срце и коронарну циркулацију. 2) Прокидањем митралне валвуле се обезбеђује улазак и постављање претходно поменутог сензора у леву комору преко кога се прати функција срчаног мишића (региструју се притисци у левој комори срца:  $dp/dt \max$  – максимална стопа развоја

притиска у левој комори, изражава се у mmHg/s, dp/dt min – минимална стопа развоја притиска у левој комори, изражава се у mmHg/s, SLVP – систолни притисак у левој комори, изражава се у mmHg, DLVP – дијастолни притисак у левој комори, изражава се у mmHg, и HR – фреквенца рада срца, изражава се као број откуцаја срца у минути).

Као што је већ поменуто, сви параметри функције леве коморе су повезани са софтверском јединицом и све време трајања експеримената се прате и снимају на монитору рачунара. Проток крви кроз коронарне крвне судове (CF) се изражава у ml/min и мери се скупљањем капи перфузионог раствора који излазе из коронарних крвних судова и срца, флуорометријском методом.

После успостављања стабилног (правилног) срчаног рада (коронарни проток након неколико серија мерења као и сви параметри срчане функције се не мењају значајно), за шта је потребно око пола сата, створени су услови за испитивање функције изолованог срца. Након контролног протокола испитиване су варијабле од значаја за нашу студију, односно променом перфузионог притиска пратили би се сви претходно наведени кардиодинамски параметри.

Истраживање је било подељено у девет (9) експерименталних група (10 животиња у групи):

- 1) контролна група пацова храњена стандардном храном,
- 2) експериментална група пацова храњена храном богатом метионином (7,7g/kg метионина),
- 3) експериментална група пацова храњена храном богатом метионином без фолата (7,7g/kg метионина и 0g/kg фолата, витамина B<sub>6</sub> и B<sub>12</sub>).
- 4) контролна група пацова храњена стандардном храном + примена аторвастатина у дози од 3 mg/kg интраперитонеално;
- 5) експериментална група пацова храњена храном богатом метионином (7,7g/kg метионина) + примена аторвастатина у дози од 3 mg/kg интраперитонеално;
- 6) експериментална група пацова храњена храном богатом метионином без фолата (7,7g/kg метионина и 0g/kg фолата, витамина B<sub>6</sub> и B<sub>12</sub>) + примена аторвастатина у дози од 3 mg/kg интраперитонеално;
- 7) контролна група пацова храњена стандардном храном + примена симвастатина у дози од 5 mg/kg интраперитонеално;

- 8) експериментална група пацова храњена храном богатом метионином (7,7g/kg метионина) + примена симвастатина у дози од 5 mg/kg интраперитонеално;
- 9) експериментална група пацова храњена храном богатом метионином без фолата (7,7g/kg метионина и 0g/kg фолата, витамина B<sub>6</sub> и B<sub>12</sub>) + примена симвастатина у дози од 5 mg/kg интраперитонеално.

### 3.4. БИОХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ

У тренутку жртвовања животиње, употребом гилотине, животињи се узима крв искрвављењем. Из узете крви се издвајају плазма и еритроцити. У плазми би се одређивао ниво хомоцистеина (метода за одређивање *HPLC*) како би се потврдила хиперхомоцистеинија (>15 $\mu$ mol/l). Из узорка плазме одређују се и следећи параметри: укупни холестерол, HDL холестерол, триглицериди. Поред тога, приликом жртвовања животиња прикупили би се узорци крви за процену системског редокс статуса, путем мерења нивоа про-оксидационих параметара (TBARS-а, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), и параметара антиоксидационог система заштите: каталаза (CAT), супероксид дисмутаза (SOD) и редуковани глутатион (GSH) (267). Све поменуте методе урађене су спектрофотометријском методом на апарату марке Specord S-600 Analytik Jena, Велика Британија.

Након жртвовања животиње узимали би се срце, аорта, јетра, бубрег и мозак како би се утврдиле морфолошке промене.

У прикупљеним узорцима коронарног венског ефлуента, за сваку вредност перфузионог притиска, спектрофотометријским методама ће се одређивати следећи биомаркери оксидационог стреса: индекс липидне пероксидације - мерен као TBARS, азот моноксид у форми нитрита (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), супероксид ањон радикал (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), водоник пероксид (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

#### 3.4.1. 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 (Thiobarbituric Acid Reactive Substances). У нашим истраживањима ниво TBARS-а у коронарном венском

ефлуенту смо одређивали спектрофотометријски (273). Метода се заснива на одређивању нивоа липидних пероксида на основу реакције једног од њих, малонилдиалдехида (MDA) са тиобарбитурном киселином (ТВА).

У епрувете (12x100) пипетирано је 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 Krebs-Hensenleitov-ог раствора. Након пипетирања, узорци су инкубирани у воденом купатилу 15 минута на 100 °C. Након инкубације, узорци су прилагођени собној температури, па се приступа детерминисању концентрације ослобођених TBARS у коронарни венски ефлуент спектрофотометријски на таласној дужини од  $\lambda=530\text{nm}$ .

1. 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.

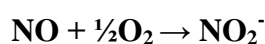
2. Након тога, *количина* ослобођених TBARS по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин:

$$\text{nmol TBARS/минути/g wt} = \Delta A / 1.56 \times 1.25 \times CF / m_{\text{срца}}$$

Важно је напоменути да се, за разлику од свих осталих биохемијских параметара, ниво TBARS изражава у  $\mu\text{M}$ , док је количина осталих молекула изражавана у  $\text{nM}$ . Разлог је у количини TBARS, која је за један ранг величина већа од свих осталих параметара. Овакав наш резултат је последица неспецифичности TBARS, као теста, јер он представља сумацију целог једног начина деловања реактивних кисеоничних и азотних врста, док сви остали параметри везани за појединачне молекуле, имају различите механизме дејства, као појединачне кисеоничне врсте.

### 3.4.2. ОДРЕЂИВАЊЕ НИТРИТА (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)

Одређивање количине ослобођених нитрита у коронарном венском ефлуенту представљало је за нас најдоступнију индиректну методу за одређивање функционалности ендотелног L-аргинин:NO система у коронарној циркулацији. С обзиром да су методе за директно одређивање азотног монооксида (NO) нама за сада недоступне, спектрофотометријска метода одређивања количине ослобођених нитрита (272) представља доступну и довољно поуздану методу за ову процену. С обзиром да се у реакцији са молекуларним кисеоником:



ствара еквимоларна количина нитрита, можемо са веома великом сигурношћу тврдити да количина ослобођених нитрита у коронарном венском ефлуенту представља количину ослобођеног NO-а. Биохемијски се ова метода заснива на употреби Griess-реагенса, који са нитритима гради диазо-комплекс, који даје љубичасту боју. Griess-ов реагенс се припрема *ex tempore*, непосредно пре аналитичког одређивања, мешањем једнаких запремина (v/v) 1 % сулфанилне киселине, растворене у 5 % орто-фосфорној киселини (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-ов 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 растворљивост натријум тетрабората, има за сврху стабилизацију диазо-комплекса. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћено је 1 ml Krebs-Hensenleitov-ог 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 Krebs-Hensenleitov-ог раствора и то: 3, 6, 12, 24 µl, чиме је добијена концентрација нитрита од: 2.18, 4.37, 8.73

i 17.34 nmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/ml. Након стабилизације боје на собној температури 5-10 минута приступа се детерминисању концентрације ослобођених нитрита спектрофотометријски на таласној дужини од λ=550 nm. Концентрација, а затим количина ослобођених нитрита добијана је на основу:

Одређивања стандардног фактора (F), који се добијао из следеће 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.

Дељењем разлике екстинкција узорка и слепе пробе са стандардом F:

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

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

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

### 3.4.3. ОДРЕЂИВАЊЕ СУПЕРОКСИД АНИОН РАДИКАЛА (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)

Одређивање количине супероксид анион радикала (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) у коронарном венском ефлуенту заснива се на реакцији O<sub>2</sub><sup>-</sup> са нитро тетразолијум плавим (**Nitro Blue Tetrazolium** - **NBT**) до нитроформаза плавог (270). Мерење се врши на таласној дужини максималне апсорпције λ<sub>max</sub>=550nm. Есејна смеша (“assay mixture”) садржи: 50 mM TRIS-HCl пуфера (pH=8.6), 0.1 mM EDTA, 0.1 mg/ml желатина и 0.1 mM NBT. Пре употребе раствор се претходно гасира азотом под притиском у трајању од једног часа.

У епрувете (12x100) је пипетирано 50 μl коронарног венског ефлуента и 950 μl есејне смеше, чиме реакција отпочиње. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћена је адекватна количина Krebs-Hensenleitov-ог раствора. На самом почетку реакције измери се екстинкција смеше и нотира се као екстинкција E<sub>1</sub>. Сваких

60 секунди се врши мешање пластичним штапићем и нотира екстинкција након мешања до своје стабилизације, што подразумева две узастопне приближн о исте екстинкције. Последња екстинксија се означава као  $E_2$ . Исти поступак се примењује и за слепу пробу.

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

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

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

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

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

2. Након тога, **количина** ослобођеног  $O_2^-$  по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин

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

#### 3.4.4. ОДРЕЂИВАЊЕ ВОДНИК ПЕРОКСИДА ( $H_2O_2$ )

Детерминација количине водоник пероксида ( $H_2O_2$ ) заснива се на оксидацији фенол црвеног помоћу водоник пероксид реакције која је катализована ензимом пероксидазом из коњске ротквице (*Horseradish Peroxidase* - HRPO). Ова реакција резултује формирањем једињења чији је максимум апсорпције  $\lambda_{\text{max}} = 610 \text{ nm}$  (268). Линеарна зависност апсорбанце 610nm од концентрациј  $H_2O_2$  је постојана за 1-60  $\mu\text{M}$  опсег концентрација (1-60 nmol/ml). Ова метода омогућује детерминацију настајања и ослобађања  $H_2O_2$  за временски интервал од 5-60 минута. У епрувете (12x100) пипетирано је 200  $\mu\text{l}$  коронарног венског ефлуента и 800  $\mu\text{l}$  свеже направљеног раствора фенол црвеног (*Phenol Red Solution-PRS*) који садржи 140 mM NaCl, 10 mM калијум фосфатног пуфера ( $pH = 7$ ), 5,5 mM D(+)-глукозе и 0,28 mM фенол црвеног. Узорцима се затим дода 10  $\mu\text{l}$  (1:20) HRPO, припремљен *ex tempore*. Узорци су отављани на собној температури 10 минута, а затим се подеси  $pH \approx 12$ , помоћу 1 M NaOH. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћена је адекватна количина Krebs-Hensenleitov-ог раствора. Концентрација ослобођеног  $H_2O_2$  у



коронарном венском ефлуенту израчунавана је на основу калибрационог дијаграма (стандардне криве), одређиваног за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве, користи се стандардни (Stock) раствор  $H_2O_2$ , уз претходну проверу концентрације ( $A_{230}$  за 10 mM  $H_2O_2$  износи 0,810). У 3 епрувете је пипетирано: (уместо коронарног венског ефлуента) 5, 10 и 20  $\mu$ l, 1 mM раствора  $H_2O_2$ , 200  $\mu$ l дестиловане, 800  $\mu$ l раствора фенол црвеног и 10  $\mu$ l (1:20) HRPO. Након инкубације од 10 минута на собној температури, подешена је  $pH \approx 12$  помоћу 1 M NaOH (10  $\mu$ l). Тако је финална концентрација  $H_2O_2$  у 3 узорка стандарда износила: 2,75; 5,49; и 10,99 nmol/  $H_2O_2$ /ml. Мерење апсорбанце (A) спровођене су на таласној дужини максималне апсорпције  $\lambda_{max}=610nm$ , у стакленим киветама, запремина 1 ml на спектрофотометру LKB Biochrom. модел: Ulltросрес 4050. Од добијених апсорбанци одузима се вредност апсорбанце слепе пробе (B), чиме се добија коначна апсорбанца ( $\Delta A$ ). Концентрација, а затим и количина ослобођеног  $H_2O_2$  у коронарном венском ефлуенту израчунавана је на основу:

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

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

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

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

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

$$\text{nmol } H_2O_2 / \text{ml /минут/g wt} = \Delta A / F \times CF / m_{\text{срца}}$$

### **3.4.5. ОДРЕЂИВАЊЕ ХОМОЦИСТЕИНА**

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

### **3.4.6. ОДРЕЂИВАЊЕ ЛИПИДНИХ ПАРАМЕТАРА**

Дванаест сати пре узимања крви животињама је ускраћена храна, јер би узимање хране непосредно пре узимања крви значајно променила резултате, јер се након оброка значајно повећава концентрација триглицерида. Након центрифугирања крви на 3000 – 4000 обртаја/минути током 10 минута, издваја се серум. У серуму смо мерили концентрацију укупног холестерола, триглицерида, липопротеине високе густине (HDL -High Density Lipoproteins) који су подељени према саставу тј, густини после ултрацентрифугирања.

Холестерол се одређује фотометријском стандардном методом, у којој је реагенс за холестерол холестерол-оксидаза која реагује са хромогеном и даје промену боје у интензитету који је пропорционалан концентрацији холестерола. Триглицериди и остали липопротеини се такође одређује класичном фотометријском методом.

### **3.4.7. ОДРЕЂИВАЊЕ КАТАЛАЗЕ**

У лизату крви је одређивана концентрација каталазе. Након дилуције лизата дестилованом водом у односу 1:7 и додавања етанола у односу 0,6:1 приступило се даљој процедури. 50  $\mu\text{l}$  САТ буфера, 100  $\mu\text{l}$  узорка и 1 ml 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  су стављени у епрувету и приступило се мерењу узорака на таласној дужини од 360 nm (265).

### **3.4.8. ОДРЕЂИВАЊЕ СУПЕРОКСИД ДИСМУТАЗЕ**

Супероксид дисмутаза је одређивана по епинефрин-методом по *Beutler-a*. Мешањем 100  $\mu\text{l}$  лизата и 1 ml карбонатног буфера се започиње процес, након чега се

додаје 100  $\mu$ l епинефрина. Мерење се врши спектрофотометријски на таласној дужини од 470nm (266).

### 3.4.9. ОДРЕЂИВАЊЕ РЕДУКОВАНОГ ГЛУТАТИОНА

Активност антиоксидативног молекула редукованог глутатиона је одређиван у лизату а мерен спектрофотометријском методом. Ова метода се базира на реакцији оксидације глутатиона са 5,5-dithio-bis-6,2-nitrobenzoic киселином, методом по *Beutler*-у (267).

### 3.4.10. МОРФОМЕТРИЈСКЕ АНАЛИЗЕ

Све морфометријске процедуре су се спроводиле у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију Факултета Медицинских Наука у Крагујевцу а све патохистолошке у Одсеку за патологију Факултета Медицинских Наука, Универзитета у Крагујевцу.

Пре почетка, у току и након експерименталног периода пратили смо морфолошке карактеристике пацова у свим групама. Варијабле које смо мерили и пратили су: укупна телесна тежина, унос хране, добијање у тежини, калоријски унос хране, односи тежине појединих органа у односу на укупну телесну тежину (јетра и срце). Животиње су чуване у кавезима у пару, при чему су тачном методом обележавања сваког пацова, праћене промене у телесној маси, уносу хране појединачно и свакодневно. У току жртвовања контролних и експерименталних група, мерене су и морфолошке промене појединачних органа (јетра и срце).

## 3.5. 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 користио се *Mann-Whitney* тест, Фишеров тест апсолутне вероватноће, једнофакторска или двофакторска анализа варијансе (*ANOVA*). Приликом тестирања разлика између параметара, употребљавао се непараметријски аналог једнофакторске анализе варијансе, *Kruskal-Wallis H* тест, са нивоом значајности од 0,05.
- 4) За тестирање повезаности између континуалних варијабли са другим испитиваним параметрима, употребљен је непараметријски статистички тест корелације и *Spearman*-ов коефицијент корелације, на основу којег је дефинисан смер и јачина повезаности.
- 5) Статистичка обрада података је рађена у статистичком пакету *SPSS 22.0 for Windows*.

**4.**

# **РЕЗУЛТАТИ**

## 4. РЕЗУЛТАТИ

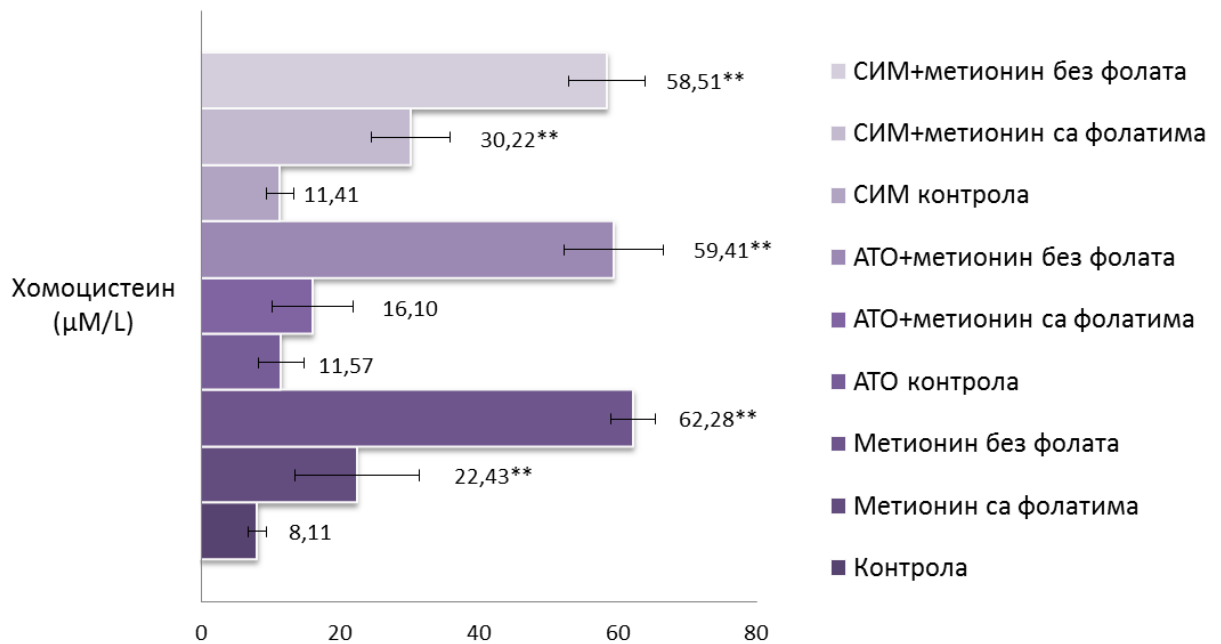
### 4.1. КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ХОМОЦИСТЕИНА И ЛИПИДА У СЕРУМУ У ОДНОСУ НА ДИЈЕТАЛНИ РЕЖИМ И ФАРМАКОЛОШКИ ТРЕТМАН ПАЦОВА

#### 4.1.1. Укупни хомоцистеин у серуму

У нашем истраживању, експериментални модел индуковања хиперхомоцистеиније заснива се на примени исхране обогаћене високим садржајем метионина са или без дефицита фолне киселине, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub>. У истом временском периоду од 30 дана, примењени су различити инхибитори HMG-CoA редуктазе (аторвастатин и симвастатин) у еквивалентним дозама, при чему је између осталог праћен и утицај статина на концентрације хомоцистеина у серуму пацова (Графикон бр. 1). Поред тога, испитан је и хиполипемички ефекат аторвастатина и симвастатина у условима исхране обогаћене метионином и условима умерене и тешке хиперхомоцистеиније (Графикони 2-4).

Концентрације хомоцистеина у контролним групама животиња која су биле на третману стандардном храном за пацове су биле у оквиру референтних вредности, са просечном вредношћу 8,11  $\mu\text{M/L}$ , док у групама изложених аторвастатину и симвастатину просечна концентрација хомоцистеина је била већа, без статистички значајне разлике (11,57  $\mu\text{M/L}$ ; 11,41  $\mu\text{M/L}$ ). Са друге стране, у групи животиња које биле подвргнуте исхрани богатој метионином са високим садржајем витамина В комплекса, просечна вредност концентрације хомоцистеина је 22, 43  $\mu\text{M/L}$ , док у присуству аторвастатина просечна вредност хомоцистеина је била снижена и износила је 16, 10  $\mu\text{M/L}$ , док под утицајем симвастатина је чак била повишена 30, 22  $\mu\text{M/L}$ , са статистички значајним разликама у односу на контролну групу. Затим, у групама животиња које су биле подвргнуте третману хиперметиониске исхране са садржајем витамина В комплекса, концентрације хомоцистеина у серуму су биле значајно увећане у односу на све остале групе, при чему под утицајем симвастатина и аторвастатина концентрације хомоцистеина су нису значајно разликовале у односу на групу без фармаколошког третмана (61, 28  $\mu\text{M/L}$ ; 59,41  $\mu\text{M/L}$ ; 58, 51  $\mu\text{M/L}$ ). У односу на вредности хомоцистеина и добијене резултате, све групе су подељене на групе са нормалним вредностима хомоцистеина у серуму у опсегу од 0-15  $\mu\text{M/L}$  (контрола, АТО-контрола и СИМ-контрола), групе са повишеним вредностима хомоцистеина

односно умерена хиперхомоцистеинемија 15-31  $\mu\text{M/L}$  (метионин са фолатима, АТО+метионин са фолатима и СИМ-метионин са фолатима) и групе са врло високим вредностима хомоцистеина изнад 32  $\mu\text{M/L}$ , односно тешка хиперхомоцистеинемија (метионин без фолата, АТО-метионин без фолата, СИМ-метионин без фолата) (Графикон бр. 1).



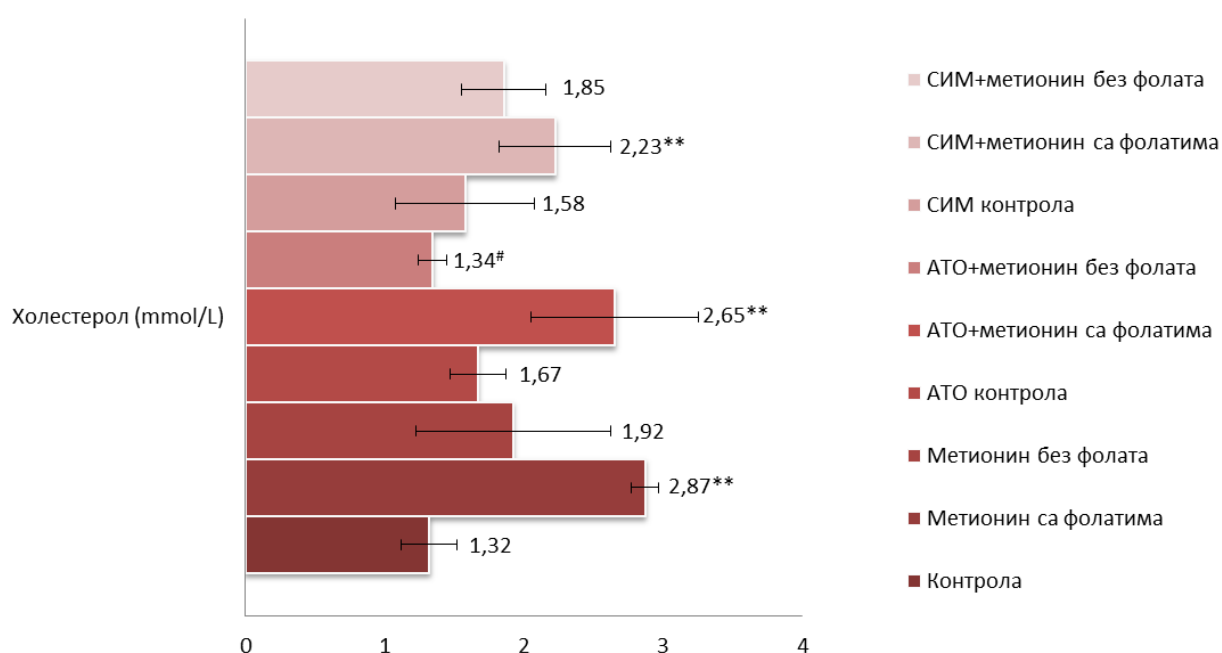
Графикон бр. 1- Концентрација хомоцистеина ( $\mu\text{M/L}$ ) у зависности од групе након 30 дана специјалног режима исхране и/или фармаколошког третмана (аторвастатин или симвастатин). Статистички значајна разлика утврђена је непараметријским аналогом ANOVA анализе, *Kruskal–Wallis* тестом, са нивоом значајности од 0,05 (\*\* $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2. Укупни холестерол у серуму

У групама животиња које су биле на стандардном режиму исхране са или без фармаколошког третмана, концентрације укупног холестерола се нису значајно разликовале (1,32 mmol/L, 1,67 mmol/L и 1,58 mmol/L). У групама животиња на хиперметионинској исхрани са високим садржајем В витамина, вредности укупног холестерола су се значајно разликовале и поређењем ових група међусобно и у односу на све остале групе, са преобладајућим повишеним вредностима укупног холестерола у метионин са фолатима групи, АТО+метионин са фолатима и СИМ+метионин са

фолатима (2,87 mmol/L, 2,65 mmol/L и 2,23 mmol/L). На крају, ниво укупног холестерола се значајно разликовао само у групи АТО+метионин без фолата (1,34 mmol/L) у односу на остале групе које су биле подвргнуте хиперметионинској дијети без садржаја фолата (СИМ+метонин без фолата и метионин без фолата контролна група) (Графикон бр. 2).

Вредности укупног холестерола у серуму у свим групама приказане су на Графикону бр. 2.

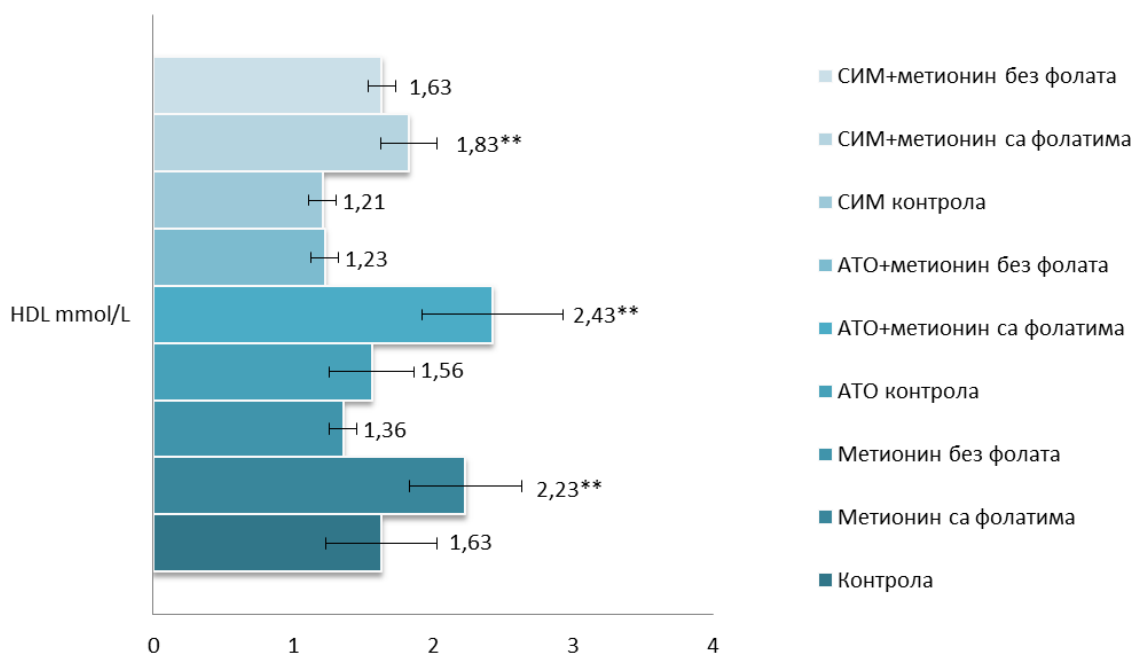


Графикон бр. 2- Концентрација укупног холестерола у серуму (mmol/L) у зависности од групе након 30 дана специјалног режима исхране и/или фармаколошког третмана (аторвастатин или симвастатин). Статистички значајна разлика утврђена је непараметријским аналогом ANOVA анализе, *Kruskal–Wallis* тестом, са нивоом значајности од 0,05 (\*\*p<0,05).



### 4.1.3. HDL-холестерол у серуму

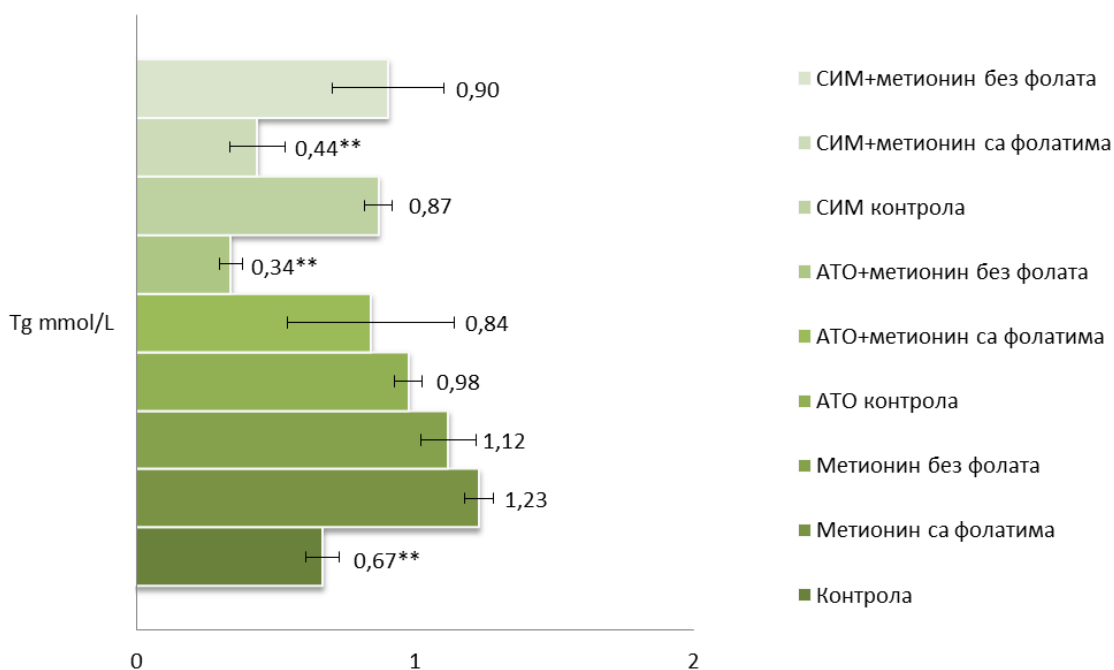
Вредности HDL холестерола у серуму пацова свих група приказане су на Графикону бр. 3. У групама животиња које су биле на стандардном режиму исхране, нивои HDL холестерола нису значајно различити, док у групама животиња које су биле подргнуте хиперметионинској дијети са високим садржајем фолне киселине, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub>, ниво HDL холестерола се значајно разликовало, са доминантно вишим вредностима групи метионин са фолатима и АТО+метионин са фолатима (2,23 mmol/L и 2,43 mmol/L), у поређењу са свим осталим групама. Поред тога, нивои HDL холестерола су били значајно виши и групи која била подвргнута третману симвастатином и хиперметионинској дијети са ниским садржајем фолата (1,63 mmol/L) у односу на АТО+метионин без фолата и метионин без фолата групе (1,23 mmol/L и 1,36 mmol/L) (Графикон бр. 3).



Графикон бр. 3- Концентрација липопротеина високе густине (*HDL*) у серуму (mmol/L) у зависности од групе након 30 дана специјалног режима исхране и/или фармаколошког третмана (аторвастатин или симвастатин). Статистички значајна разлика утврђена је непараметријским аналогом ANOVA анализе, *Kruskal–Wallis* тестом, са нивоом значајности од 0,05 (\*\* $p < 0,05$ ).

#### 4.1.4. Укупни триглицериди у серуму

У групи животиња на третману стандардном храном (контрола), просечне вредности укупних триглицерида су биле статистички значајно ниже (0,67 mmol/L) у односу на групе које биле на стандардном режиму исхране али на фармаколошком третману статином (0,98 mmol/L и 0,87 mmol/L). Са друге стране, у групама које су биле на хиперметионинској дијети са високим садржајем фолне киселине, статистички значајно ниже вредности укупних триглицерида биле су у групи под третманом симвастатина (0,44 mmol/L) у односу на групу која била на третману аторвастатином (0,84 mmol/L) и без фармаколошког третмана (1,23 mmol/L). Поред тога, у односу на контролну групу без фармаколошког третмана на хиперметионинској исхрани са ниским садржајем фолата, аторвастатин група има значајно ниже нивое укупних триглицерида (0,34 mmol/L) у односу на симвастатин групу и контролну хиперметионинску групу са ниским садржајем фолне киселине (0,90 mmol/L и 1,12 mmol/L) (Графикон бр. 4).



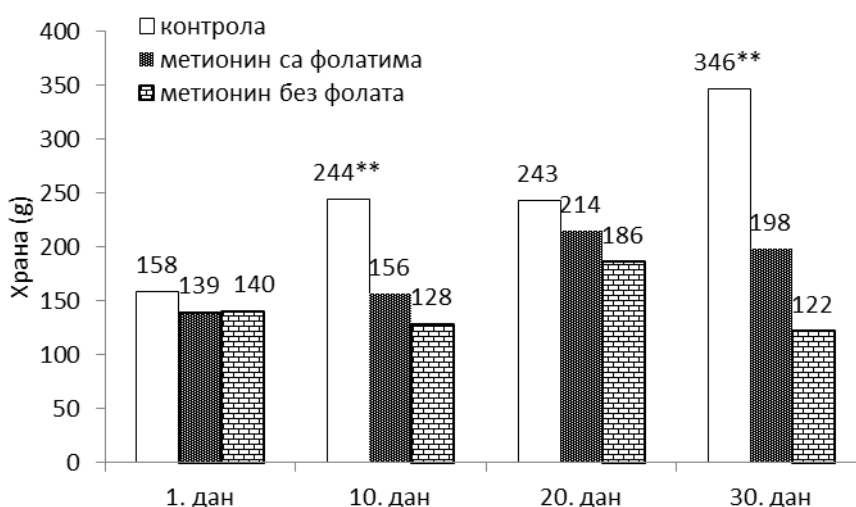
Графикон бр. 4- Концентрација триглицерида (Tg) у серуму (mmol/L) у зависности од групе након 30 дана специјалног режима исхране и/или фармаколошког третмана (аторвастатин или симвастатин). Статистички значајна разлика утврђена је непараметријским аналогом ANOVA анализе, *Kruskal–Wallis* тестом, са нивоом значајности од 0,05 (\*\* $p < 0,05$ ).

## 4.2. МОРФОМЕТРИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ У ОДНОСУ НА ДИЈЕТАЛНИ И ФАРМАКОЛОШКИ ТРЕТМАН

### 4.2.1. УТИЦАЈ РАЗЛИЧИТОГ РЕЖИМА ИСХРАНЕ НА МОРФОМЕТРИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦОВА

#### 4.2.1.1. Унос хране контролне групе, групе пацова на исхрани обогаћеној метионином са и без дефицита фолне киселине, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> током 30-дневног режима исхране

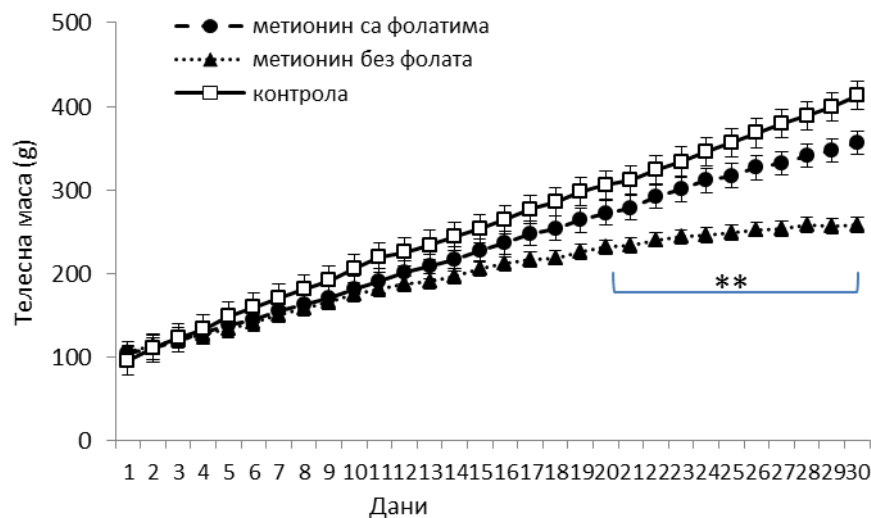
Током тридесетодневног режима исхране, примећен је линеаран пораст уноса хране у свим групама. Најзначајнији унос хране примећен је у контролној групи храњеној стандардном храном, са статистички значајним повећањем у 10. и 30. дану. У односу на први дан експерименталног периода, линеаран пораст уноса хране запажен је у контролној и групи на специјалном режиму хиперметионинске исхране обогаћеној фолатима, В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> док у групи пацова на хиперметионинској дијети са дефицитом фолата, В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> приметан је негативан пад почев од 20-ог дана дијеталног режима, у поређењу са количином унете хране првог дана (Графикон бр. 5).



Графикон бр. 5- Укупан унос стандардне, хиперметионинске хране са или без дефицита фолне киселине, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> у грамама (g) у зависности од групе у првом, десетом, двадесетом и тридесетом дану специјалног режима исхране. Статистички значајна разлика утврђена је непараметријским аналогом ANOVA анализе, *Kruskal–Wallis* тестом, са нивоом значајности од 0,05 (\*\* $p < 0,05$ ).

#### 4.2.1.2. Телесна маса животиња контролне групе, групе пацова на исхрани обogaћеној метионином са и без дефицита фолне киселине, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> током 30-дневног режима исхране

У исто време, са праћењем уноса хране, свакодневно смо пратили и раст и добијање у тежини пацова свих група. Пацови који су били на третману стандардном храном за пацове и хиперметионинској дијети са високим садржајем фолне киселине, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> пратио је и линеарни пораст телесне масе, док у групи животиња на специјалном третману хиперметионинске исхране са ниским садржајем фолне киселине, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> након 20 дана примећен је мањи пораст телесне масе, сразмерно и мањем уносу хране у овој групи (Графикон бр. 6).



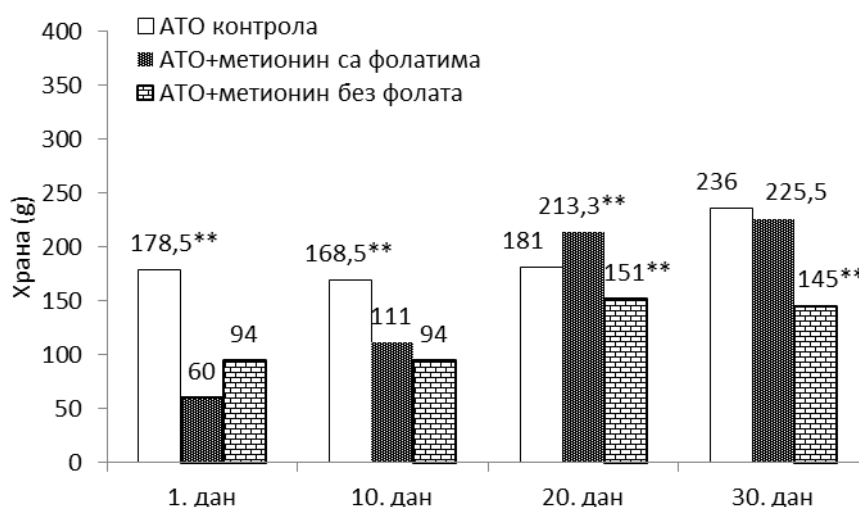
Графикон бр. 6- Просечна телесна маса животиња током тридесетодневног дијеталног режима исхране (стандардне, хиперметионинске хране са или без дефицита фолне киселине, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub>) у грамима (g) у зависности од групе. Статистички значајна разлика утврђена је непараметријским аналогом ANOVA анализе, *Kruskal–Wallis* тестом, са нивоом значајности од 0,05 (\*\* $p < 0,05$ ).

### 4.3. МОРФОМЕТРИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦОВА ПОДВГНУТИХ РАЗЛИЧИТОМ ДИЈЕТАЛНОМ РЕЖИМУ ИСХРАНЕ И ФАРМАКОЛОШКОМ ТРЕТМАНУ АТОРВАСТАТИНОМ

#### 4.2.2. УТИЦАЈ РАЗЛИЧИТОГ РЕЖИМА ИСХРАНЕ НА МОРФОМЕТРИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦОВА У ПРИСУСТВУ АТОРВАСТАТИНА

##### 4.2.2.1. Унос хране контролне групе, групе пацова на исхрани обогаћеној метионином са и без дефицита фолне киселине, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> током 30-дневног дијеталног режима и фармаколошког третмана аторвастатином

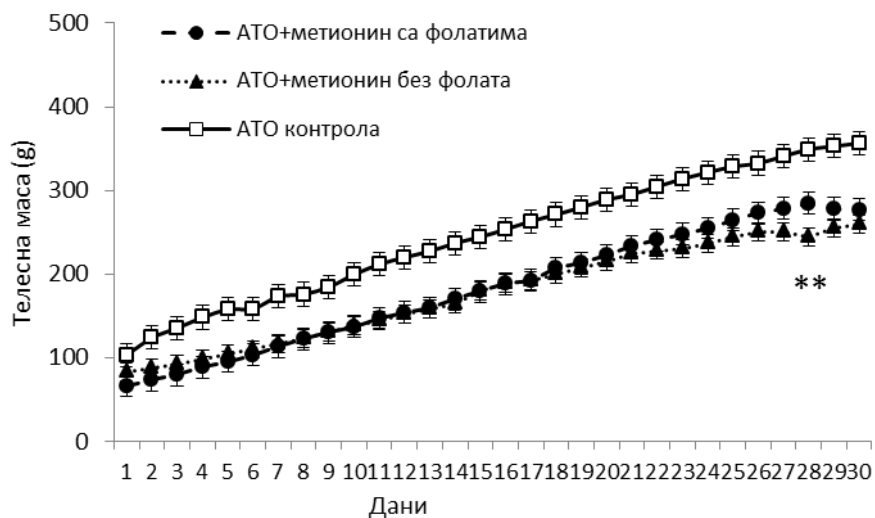
У АТО-контрола групи статистички значајно је већи унос хране у првом и десетом дану у односу на групе животиња које су биле на хиперметиониским дијетама, док се та разлика током даљем експерименталног периода постепено смањивала. Интересантно, у двадесетом дану разлика је мања али статистичка значајна, да би се у тридесетом дану потпуно изгубила под утицајем аторвастатина. Поређењем уноса хране током хиперметиониских дијета са и без фолата, примећено је да у двадесетом и тридесетом дану постоје статистички значајне разлике у уносу хране, у корист хиперметионске дијете са високим садржајем фолне киселине, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> (Графикон бр. 7).



Графикон бр. 7- Укупан унос стандардне, хиперметионинске хране са или без дефицита фолне киселине, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> у грамима (g) у току третмана аторвастатином у првом, десетом, двадесетом и тридесетом дану специјалног режима исхране. Статистички значајна разлика утврђена је непараметријским аналогом ANOVA анализе, *Kruskal–Wallis* тестом, са нивоом значајности од 0,05 (\*\*p<0,05).

#### 4.2.2.2. Телесна маса животиња контролне групе, групе пацова на исхрани обогаћеној метионином са и без дефицита фолне киселине, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> током 30-дневног дијеталног режима и фармаколошког третмана аторвастатином

У току фармаколошког третмана аторвастатином у дози од 3 мг/кг/дан пратили смо и укупну телесну масу животиња током целог експерименталног периода. Примећен је континуиран линеаран раст телесне масе животиња у свим групама, са статистички значајном разликом током целог експерименталног периода, односно, животиње које су биле изложене хиперметионским дијетама су имале мањи прираст телесне масе током последње три недеље дијеталног и фармаколошког режима у односу на животиње које су биле изложене стандардном начину исхране и истом фармаколошком третману. Статистички значајна разлика између телесне масе животиња поређењем хиперметионинских дијета примећена је само у 27. и 28. дану експерименталног периода. (Графикон бр. 8).

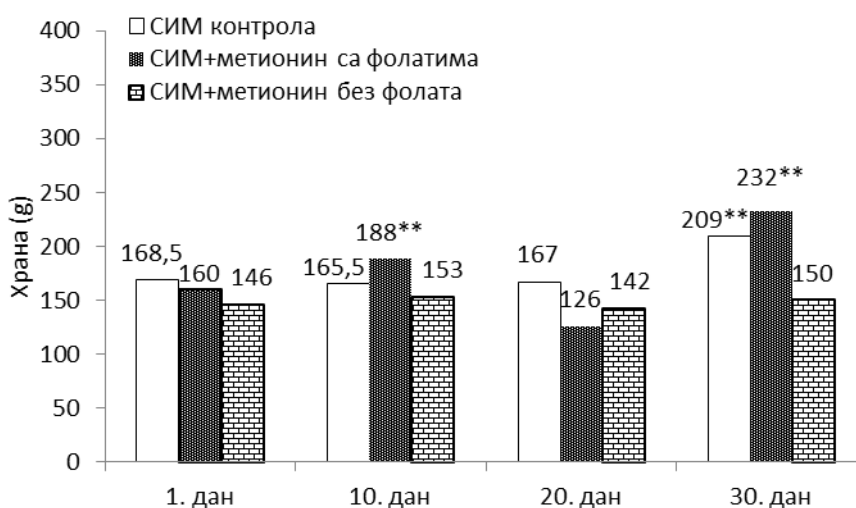


Графикон бр. 8- Просечна телесна маса животиња током тридесетодневног дијеталног режима исхране (стандардне, хиперметионинске хране са или без дефицита фолне киселине, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub>) у грамима (g) у току третмана аторвастатином. Статистички значајна разлика утврђена је непараметријским аналогом ANOVA анализе, *Kruskal–Wallis* тестом, са нивоом значајности од 0,05 (\*\*p<0,05).

#### 4.2.3. УТИЦАЈ РАЗЛИЧИТОГ РЕЖИМА ИСХРАНЕ НА МОРФОМЕТРИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦОВА У ПРИСУСТВУ СИМВАСТАТИНА

##### 4.2.3.1. Унос хране контролне групе, групе пацова на исхрани обогаћеној метионином са и без дефицита фолне киселине, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> током 30-дневног режима исхране и фармаколошког третмана симвастатином

Под утицајем симвастатина у дози од 5 мг/кг, статистички значајан пораст уноса хране примећен је у десетом и тридесетом дану у групи која била изложена исхрани обогаћеној метионином, фолном киселином, витаминима В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> у односу на све остале групе и све остале дане. Са друге стране, приметан је статистички значајно већи унос стандардне хране у тридесетом дану у односу претходни експериментални период (Графикон бр. 9).

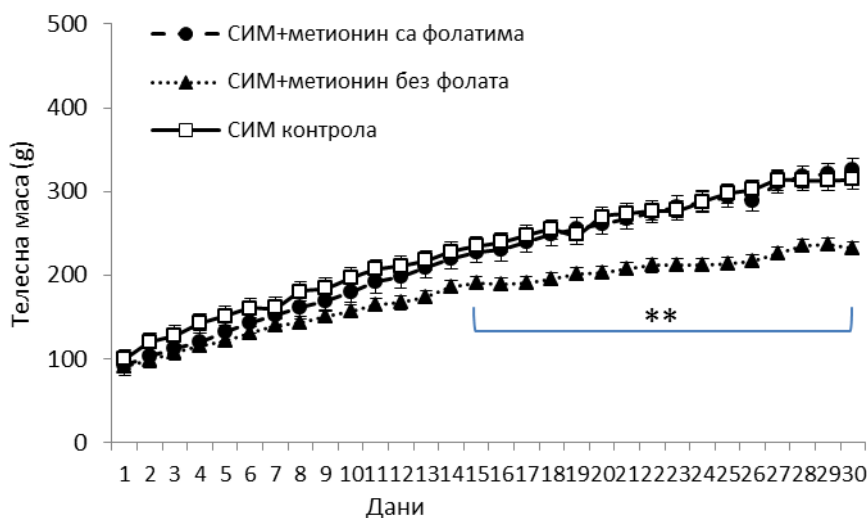


Графикон бр. 9- Укупан унос стандардне, хиперметионинске хране са или без дефицита фолне киселине, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> у грамима (g) у току третмана симвастатином у првом, десетом, двадесетом и тридесетом дану специјалног режима исхране.

Статистички значајна разлика утврђена је непараметријским аналогом ANOVA анализе, *Kruskal–Wallis* тестом, са нивоом значајности од 0,05 (\*\* $p < 0,05$ ).

#### 4.2.3.2. Телесна маса животиња контролне групе, групе пацова на исхрани обогаћеној метионином са и без дефицита фолне киселине, витамина B<sub>6</sub> и B<sub>12</sub> током 30-дневног режима исхране и фармаколошког третмана симвастатином

Током тридесетодневног дијеталног режима и фармаколошког третмана симвастатином у дози од 5 мг/кг/дан, забележен је линеаран сразмеран раст и прираст телесне масе животиња на стандардном и хиперметионинском третману са нормалним садржајем витамина B комплекса. Међутим, 15.ог дана од почетка третмана, под утицајем симвастатина у групи животиња подвргнутих хиперметионинској дијети са ниским садржајем витамина B комплекса, почиње статистички значајно мањи пораст телесне масе у односу на претходно поменуте две групе, који се одржава до краја експериментално периода (Графикон бр. 10).

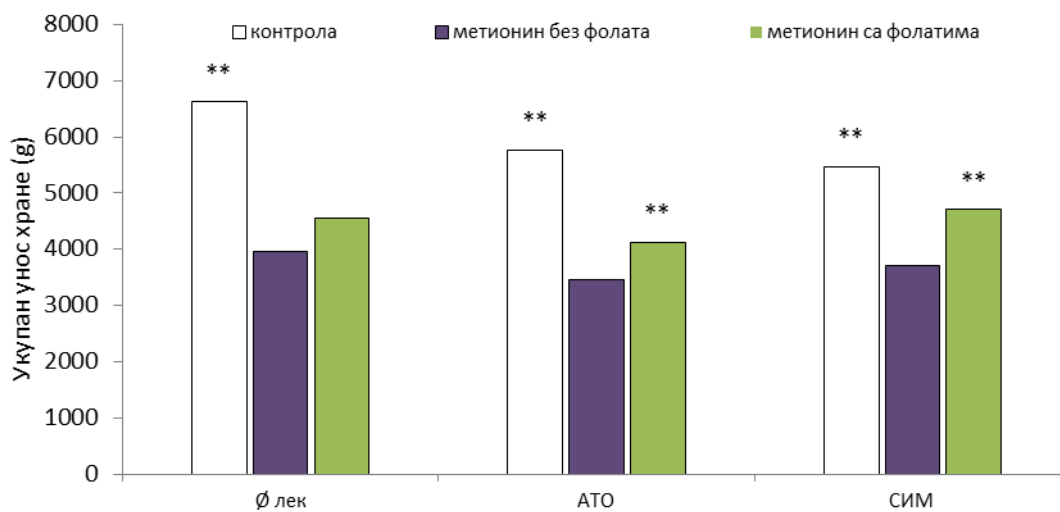


Графикон бр. 10- Просечна телесна маса животиња током тридесетодневног дијеталног режима исхране (стандардне, хиперметионинске хране са или без дефицита фолне киселине, витамина B<sub>6</sub> и B<sub>12</sub>) у грамама (g) у току третмана симвастатином. Статистички значајна разлика утврђена је непараметријским аналогом ANOVA анализе, *Kruskal–Wallis* тестом, са нивоом значајности од 0,05 (\*\* $p < 0,05$ ).



#### 4.2.4. Укупан унос хране и укупна телесна маса животиња у свим групама у односу на дијетални режим и фармаколошки третман

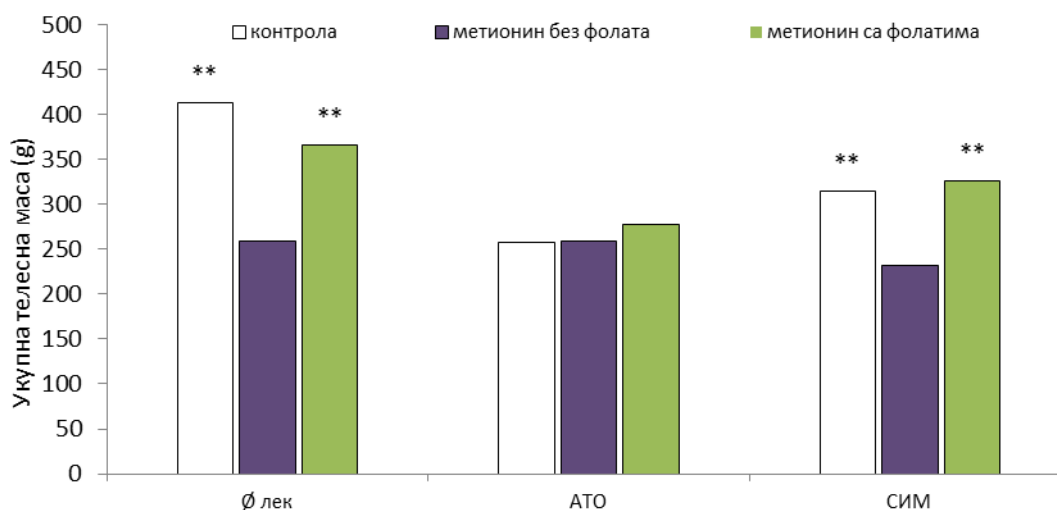
Сумарно посматрано, укупан унос стандардне хране био је статистички значајно већи од уноса хиперметионских дијета, са значајним опадањем под утицајем статина, а нарочито симвастатина. Поред тога, статистички значајно већи унос је био код хиперметионинске дијете са витаминима В комплекса у односу на другу хиперметионинску дијету дефицитарну у В витаминима, при чему се је ова разлика статистички значајна само под утицајем фармаколошког третмана, а нарочито под утицајем статина (Графикон бр. 11)



Графикон бр. 11- Укупан унос хране током тридесетодневног дијеталног режима исхране (стандардне, хиперметионинске хране са или без дефицита фолне киселине, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub>) у грамама (g) у току третмана аторвастатином/симвастатином. Статистички значајна разлика утврђена је непараметријским аналогом ANOVA анализе, *Kruskal–Wallis* тестом, са нивоом значајности од 0,05 (\*\* $p < 0,05$ ).

У складу са уносом хране, промене у укупној телесној маси на крају експерименталног периода су делимично и очекиване. Дакле, статистички значајно већу укупну телесну масу имале су групе подвргнуте стандардној храни, затим и хиперметионинској дијети са високим садржајем витамина В групе у поређењу са осталим групама. Међутим, промене у телесној маси под утицајем симвастатина су изражене само у поређењу са хиперметионинском дијетом дефицитарној у витаминима В комплекса и у поређењу са групама које нису имале фармаколошки третман

(контролне групе), док под утицајем аторвастатина укупне телесне масе животиња се међусобно значајно не разликују (Графикон бр. 12).

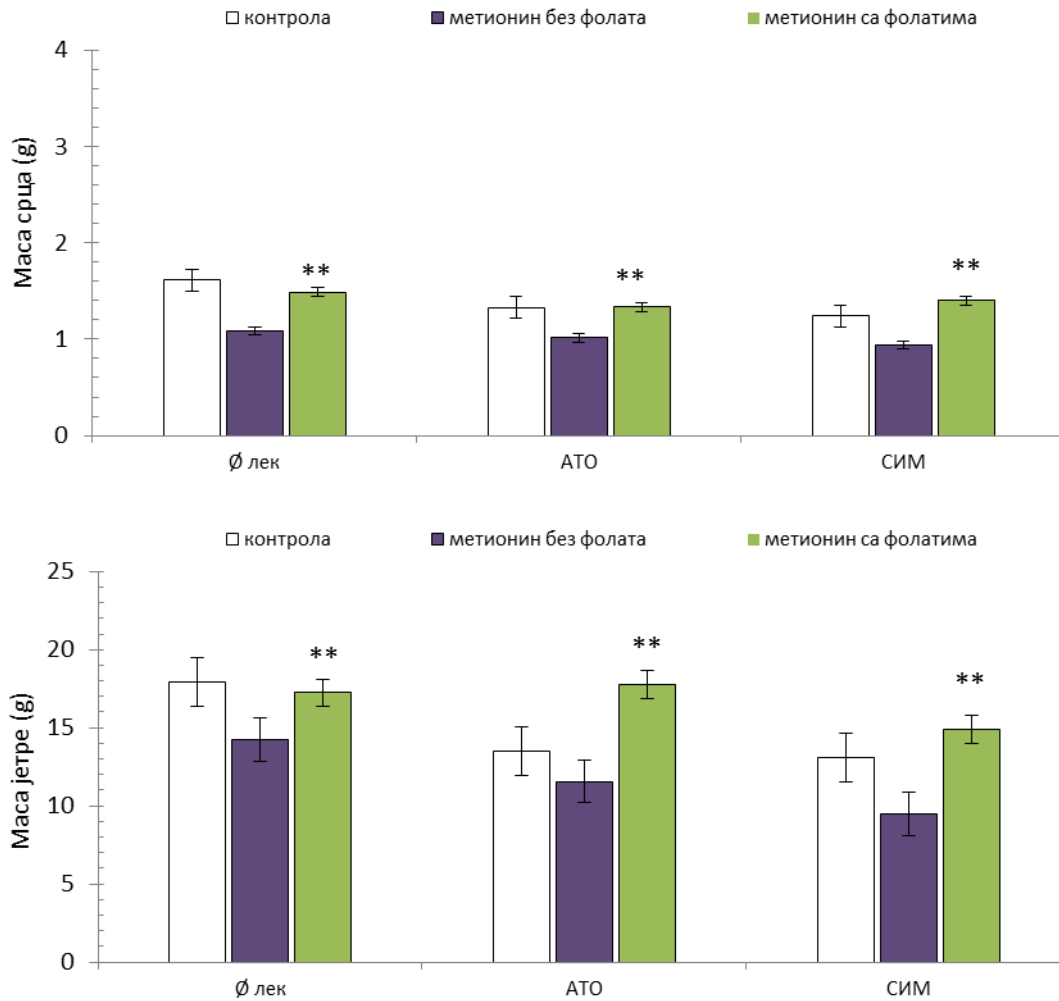


Графикон бр. 12- Укупна телесна маса животиња током тридесетодневног дијеталног режима исхране (стандардне, хиперметионинске хране са или без дефицита фолне киселине, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub>) у грамама (g) у току третмана аторвастатином/симвастатином. Статистички значајна разлика утврђена је непараметријским аналогом ANOVA анализе, *Kruskal–Wallis* тестом, са нивоом значајности од 0,05 (\*\*p<0,05).

#### 4.2.5. Морфометријске карактеристике појединих органа (срце и јетра)

Након хроничног третмана пацова хиперметионинским дијетама са и без фолата и фармаколошког третмана статинима мерили смо тежину појединих органа у односу на укупну телесну тежину животиња у свим групама. Статистички је доказано значајно повећање укупне масе срца у групама које су биле на хиперметионинској исхрани са нормалним садржајем фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> у односу на масу срца у групи са тешком формом хиперхомоцистеиније (Мет без фолата) (p<0,05), а снижење у односу на контролну групу пацова са нормалним вредностима хомоцистеина у крви. У погледу ефеката хиперметионинске дијете са или без фолата на масу органа, слична динамика је забележена и при посматрању утицаја на масу јетре. Међутим, под утицајем статина, а нарочито под утицајем симвастатина, приметно је увећање масе

јетре у односу аторвастатин, а такође и у односу на контролне групе ( $p < 0,05$ ).



Графикон бр. 13

Графикон бр. 13- Просечна маса срца и маса јетре у грамима животиња током тридесетодневног дијеталног режима исхране (стандардне, хиперметионинске хране са или без дефицита фолне киселине, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub>) у грамима (g) у току третмана аторвастатином/симвастатином. Статистички значајна разлика утврђена је непараметријским аналогом ANOVA анализе, *Kruskal–Wallis* тестом, са нивоом значајности од 0,05 (\*\* $p < 0,05$ ).

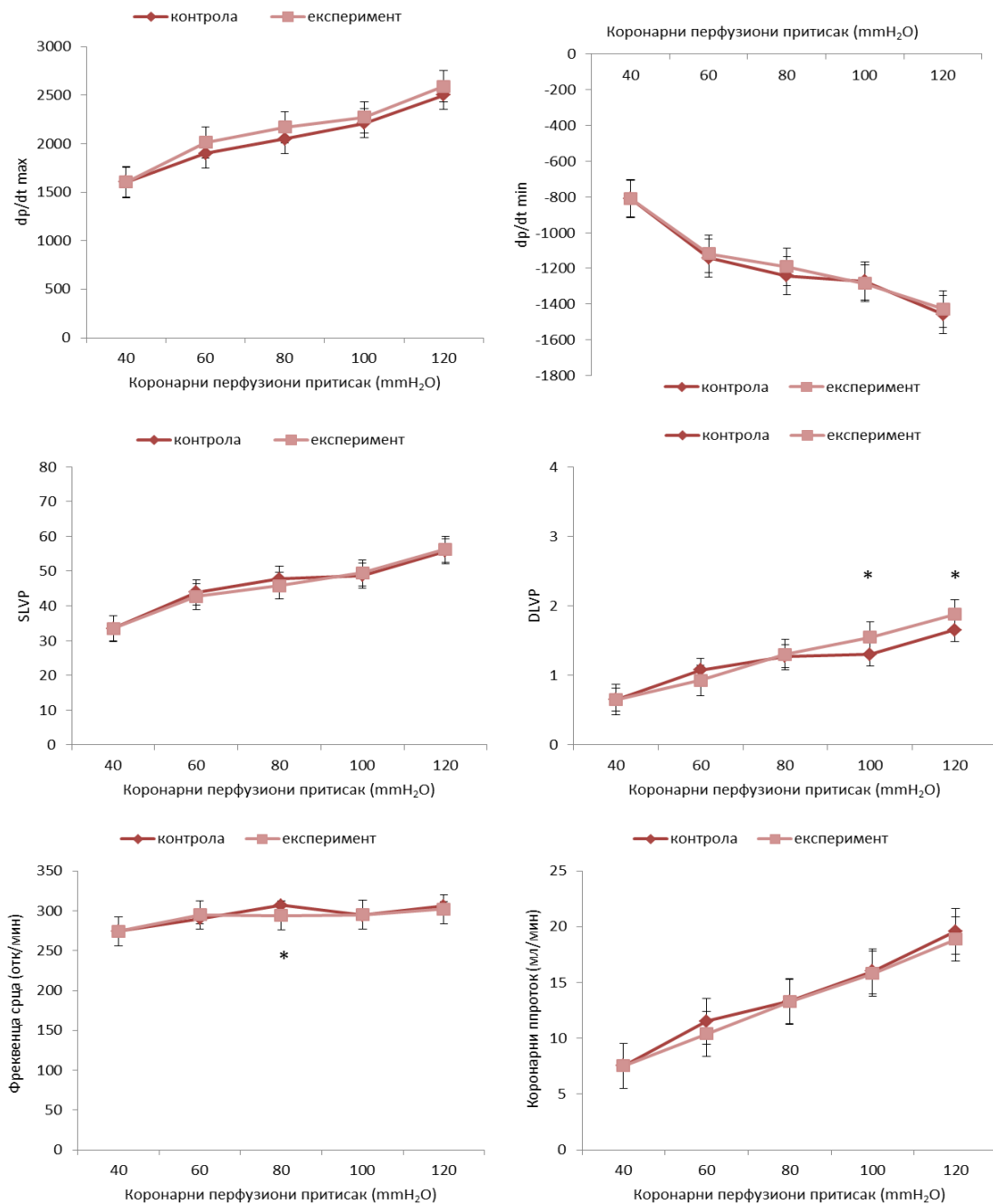
### **4.3. УТИЦАЈ ДИЈЕТАЛНОГ РЕЖИМА И ИНХИБИТОРА ХИДРОКСИМЕТИЛ-ГЛУТАРИЛ КО-А РЕДУКТАЗЕ (АТОРВАСТАТИН И СИМВАСТАТИН) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА УНУТАР ГРУПЕ**

#### **4.3.1. Кардиодинамски параметри изолованог срца пацова у контролној групи (контрола)**

Кардиодинамски параметри и коронарни проток су у виду средњих вредности са обележеним статистички значајним разликама приказани графички и табеларно (Графикон бр. 14, Табела бр. 1). Резултати су приказани у виду средњих вредности+стандардна девијација ( $X \pm SD$ ) са статистички значајном разликом уколико је  $p$  вредност мања од 0,05 (\*\* $p < 0,05$ ).

Протоколом ауторегулације на различитим коронарним перфузионим притисцима ( $CPP$ ) у опсегу од 40 до 120  $cmH_2O$  праћене су промене кардиодинамских параметара у контролним и експерименталним условима у контролној групи, односно групи која била на стандардном режиму исхране. Статистички значајно је промењен  $DLVP$  при притиску од 100 и 120  $cmH_2O$ , као и  $HR$  при притиску од 80  $cmH_2O$  ( $p < 0,05$ ). Остали кардиодинамски параметри нису били статистички значајно различити при промени перфузионог притиска, у контролном и експерименталном периоду унутар групе.

Графикон бр. 14 - Кардиодинамски параметри ( $dp/dt$  max (mmHg/s),  $dp/dt$  min (mmHg/s), SLVP (mmHg), DLVP (mmHg), HR (bpm) и CF (ml/min)) изолованог срца пацова у контролном (К) и експерименталном (Е) периоду ретроградне перфузије по *Langendorff* техници у групи животиња на стандардном режиму исхране (контролна група).



Табела 1. Средње вредности и статистичке значајности разлике између вредности кардиодинамских параметара у контролном (К) и експерименталном (Е) периоду у групи животиња на стандардној исхрани (контрола). Резултати су приказани у виду средњих вредности+стандардна девијација ( $X\pm SD$ ). Статистички значајна разлика утврђена је непараметријским тестом за везане узорке *Wilcoxon-овим тестом*, са нивоом значајности од 0,05 (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ).

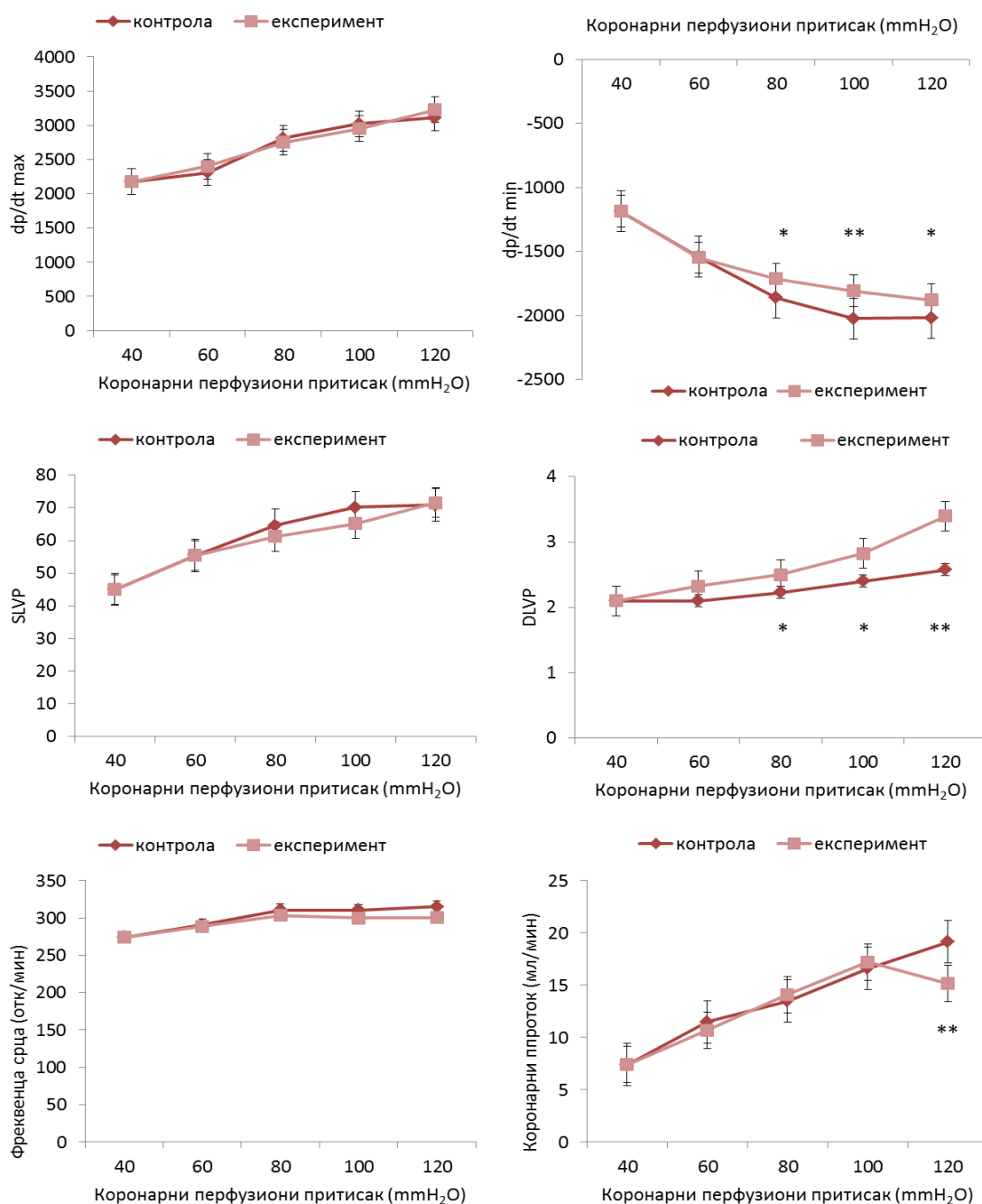
CPP	dp/dt max (mmHg/s)		dp/dt min (mmHg/s)		SLVP (mmHg)	
	K	E	K	E	K	E
<b>40</b>	1604,88±22,52	1604,88±22,52	-809,63±27,25	-809,63±27,25	33,48±1,25	33,48±1,25
<b>60</b>	1899,45±21,21	2014,13±15,73	-1142,88±25,17	-1119,00±32,45	43,93±1,78	42,70±1,45
<b>80</b>	2050,90±17,50	2172,00±13,84	-1242,38±23,14	-1191,78±19,12	47,75±2,85	45,83±2,78
<b>100</b>	2211,63±14,57	2272,83±12,21	-1271,38±15,12	-1284,13±18,17	48,73±2,65	49,45±3,24
<b>120</b>	2501,38±15,53	2591,18±14,28	-1457,82±14,17	-1428,03±22,14	55,73±3,21	56,28±3,25
CPP	DLVP (mmHg)		HR (bpm)		CF (ml/min)	
	K	E	K	E	K	E
<b>40</b>	0,65±0,02	0,65±0,02	274,53±1,98	274,53±1,98	7,53±0,47	7,53±0,47
<b>60</b>	1,08±0,01	0,93±0,04	290,18±2,28	294,98±2,57	11,53±0,54	10,40±0,31
<b>80</b>	1,28±0,02	1,30±0,01	306,95±3,72	<b>294,05±3,54*</b>	13,33±0,54	13,27±0,35
<b>100</b>	1,30±0,01	<b>1,55±0,02*</b>	294,75±4,52	295,08±4,24	16,00±0,43	15,80±0,49
<b>120</b>	1,65±0,02	<b>1,88±0,03*</b>	306,05±4,35	302,15±2,25	19,60±0,28	18,90±0,45

#### 4.3.2. Кардиодинамски параметри изолованог срца пацова у групи подвргнутој хиперметионинској исхрани са присуством фолата, витаминима В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> (Мет са фолатима)

Кардиодинамски параметри и коронарни проток су у виду средњих вредности са обележеним статистички значајним разликама приказани графички и табеларно (Графикон бр. 15, Табела 2). Резултати су приказани у виду средњих вредности+стандардна девијација ( $X \pm SD$ ) са статистички значајном разликом уколико је  $p$  вредност мања од 0,05 (\*\* $p < 0,05$ ).

Протоколом ауторегулације на различитим коронарним перфузионим притисцима ( $CPP$ ) у опсегу од 40 до 120  $cmH_2O$  праћене су промене кардиодинамских параметара у контролним и експерименталним условима у групи животиња на хиперметионинској дијети са нормалним садржајем фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> (Мет са фолатима). Статистички значајно је промењен  $dp/dt \min$  при притиску од 80 ( $p < 0,05$ ), 100 ( $p < 0,01$ ) и 120  $cmH_2O$  ( $p < 0,05$ ), као и  $DLVP$  при притиску од 80 ( $p < 0,05$ ), 100 ( $p < 0,05$ ) и нарочито при притиску од 120  $cmH_2O$  ( $p < 0,01$ ), и  $CF$  при притиску од 120  $cmH_2O$  ( $p < 0,01$ ). Остали кардиодинамски параметри нису били статистички значајно различити при промени перфузионог притиска, у контролном и експерименталном периоду унутар групе.

Графикон бр. 15 - Кардиодинамски параметри ( $dp/dt$  max (mmHg/s),  $dp/dt$  min (mmHg/s), SLVP (mmHg), DLVP (mmHg), HR (bpm) и CF (ml/min)) изолованог срца пацова у контролном (К) и експерименталном (Е) периоду ретроградне перфузије по *Langendorff* техници у групи животиња на хиперметионинској дијети са нормалним садржајем фолата, витамина B<sub>6</sub> и B<sub>12</sub> (Мет са фолатима).





Табела 2. Средње вредности и статистичке значајности разлике између вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (К) и експерименталном (Е) периоду у групи животиња на хиперметионинској дијети са нормалним садржајем фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> (Мет са фолатима). Резултати су приказани у виду средњих вредности+стандардна девијација (X±SD). Статистички значајна разлика утврђена је непараметријским тестом за везане узорке *Wilcoxon-овим тестом*, са нивоом значајности од 0,05 (\*p<0,05; \*\*p<0,01).

CPP	dp/dt max (mmHg/s)		dp/dt min (mmHg/s)		SLVP (mmHg)	
	K	E	K	E	K	E
<b>40</b>	2173,03±22,25	2173,03±22,25	-1186,93±6,54	-1186,93±6,54	45,03±0,01	45,03±0,01
<b>60</b>	2306,33±17,22	2399,93±25,03	-1542,98±7,23	-1549,55±8,23	55,40±0,08	55,48±0,03
<b>80</b>	2810,43±14,11	2752,55±24,98	-1862,08±6,98	<b>-1715,45±7,25*</b>	64,65±0,11	61,20±0,04
<b>100</b>	3022,98±13,14	2947,68±14,11	-2025,03±7,56	<b>-1807,55±6,54**</b>	70,15±0,55	65,18±0,08
<b>120</b>	3110,43±17,14	3224,30±17,24	-2017,78±7,66	<b>-1879,73±7,28*</b>	70,90±0,04	71,58±0,14
CPP	DLVP (mmHg)		HR (bpm)		CF (ml/min)	
	K	E	K	E	K	E
<b>40</b>	2,10±0,01	2,10±0,01	274,08±3,23	274,08±3,23	7,40±0,02	7,40±0,02
<b>60</b>	2,10±0,01	2,33±0,02	290,73±2,87	288,58±3,56	11,50±0,03	10,70±0,05
<b>80</b>	2,23±0,03	<b>2,50±0,03*</b>	310,65±2,54	303,60±1,98	13,50±0,07	14,10±0,05
<b>100</b>	2,40±0,04	<b>2,83±0,01*</b>	310,53±2,12	299,70±2,22	16,60±0,06	17,20±0,07
<b>120</b>	2,58±0,01	<b>3,40±0,01**</b>	315,10±2,04	300,65±3,85	<b>19,15±0,08**</b>	15,15±0,09

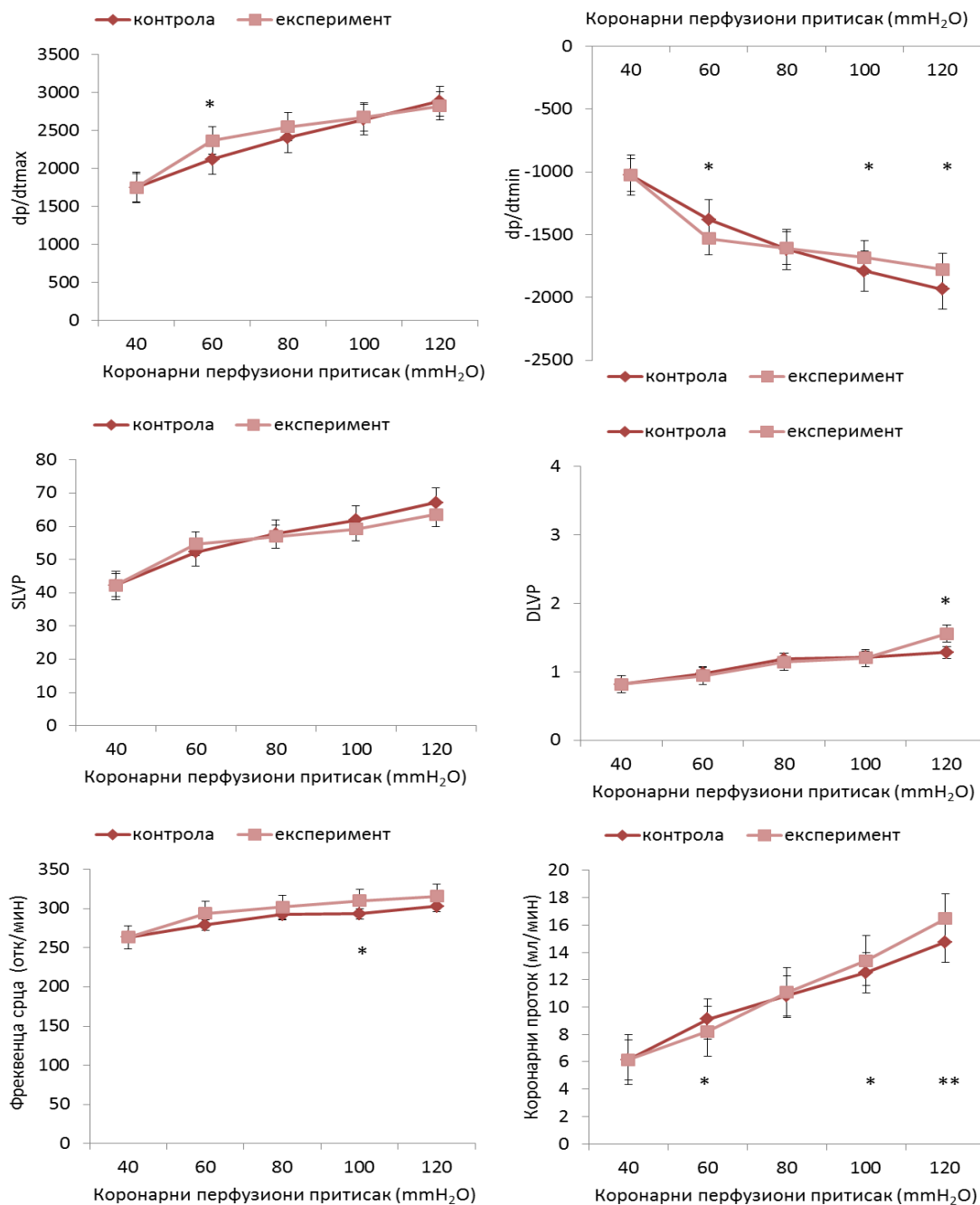
### 4.3.3. Кардиодинамски параметри изолованог срца пацова у групи подвргнутој хиперметионинској исхрани без фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> (Мет без фолата)

Кардиодинамски параметри и коронарни проток су у виду средњих вредности са обележеним статистички значајним разликама приказани графички и табеларно (Графикон бр. 16, Табела бр. 3). Резултати су приказани у виду средњих вредности+стандардна девијација ( $X \pm SD$ ) са статистички значајном разликом уколико је  $p$  вредност мања од 0,05 (\*\* $p < 0,05$ ).

Протоколом ауторегулације на различитим коронарним перфузионим притисцима (*CPP*) у опсегу од 40 до 120 cmH<sub>2</sub>O праћене су промене кардиодинамских параметара у контролним и експерименталним условима у групи животиња на хиперметионинској дијети са дефицитом фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> (Мет без фолата).

Статистички значајно су промењени параметри контрактилности леве коморе срца  $dp/dt \max$  при притиску од 60 cmH<sub>2</sub>O ( $p < 0,05$ ),  $dp/dt \min$  при притиску од 60, 100 и 120 cmH<sub>2</sub>O ( $p < 0,05$ ), као и *DLVP* при притиску од 120 cmH<sub>2</sub>O ( $p < 0,05$ ). Фреквенца срца (HR) је била значајно повишена на притиску од 100 cmH<sub>2</sub>O ( $p < 0,05$ ) у експерименталном периоду, као коронарни проток на притиску од 60, 100 ( $p < 0,05$ ) и 120 cmH<sub>2</sub>O ( $p < 0,01$ ). Остали кардиодинамски параметри нису били статистички значајно различити при промени перфузионог притиска, у контролном и експерименталном периоду унутар групе.

Графикон бр. 16 - Кардиодинамски параметри ( $dp/dt$  max (mmHg/s),  $dp/dt$  min (mmHg/s), SLVP (mmHg), DLVP (mmHg), HR (bpm) и CF (ml/min)) изолованог срца пацова у контролном (К) и експерименталном (Е) периоду ретроградне перфузије по *Langendorff* техници у групи животиња на хиперметионинској дијети са дефицитом фолата, витамина  $B_6$  и  $B_{12}$  (Мет без фолата).



Табела 3. Средње вредности и статистичке значајности разлике између вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (К) и експерименталном (Е) периоду у групи животиња на хиперметионинској дијети са дефицитом фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> (Мет без фолата). Резултати су приказани у виду средњих вредности+стандардна девијација (X±SD). Статистички значајна разлика утврђена је непараметријским тестом за везане узорке *Wilcoxon-овим тестом*, са нивоом значајности од 0,05 (\*p<0,05; \*\*p<0,01).

CPP	dp/dt max (mmHg/s)		dp/dt min (mmHg/s)		SLVP (mmHg)	
	K	E	K	E	K	E
<b>40</b>	1752,27±25,02	1752,27±25,02	-1027,61±14,15	-1027,61±14,15	42,29±2,21	42,29±2,21
<b>60</b>	2120,79±32,28	<b>2370,76±24,06*</b>	-1379,87±15,16	<b>-1530,19±17,96*</b>	52,20±2,39	54,67±1,48
<b>80</b>	2409,71±27,24	2549,56±27,22	-1617,26±11,08	-1607,03±15,63	57,69±3,39	56,90±1,99
<b>100</b>	2646,70±25,23	2678,19±21,03	-1788,17±13,17	<b>-1680,76±17,10*</b>	61,87±4,41	59,13±3,24
<b>120</b>	2887,16±14,25	2824,36±19,82	-1933,53±10,07	<b>-1776,33±17,04*</b>	67,19±5,59	63,51±2,87
CPP	DLVP (mmHg)		HR (bpm)		CF (ml/min)	
	K	E	K	E	K	E
<b>40</b>	0,81±0,01	0,81±0,01	263,40±6,55	263,40±6,55	6,14±0,04	6,14±0,04
<b>60</b>	0,97±0,02	0,94±0,08	279,04±8,65	294,13±7,57	9,11±0,03	<b>8,23±0,02*</b>
<b>80</b>	1,19±0,03	1,14±0,18	292,69±6,55	302,00±6,21	10,83±0,02	11,09±0,04
<b>100</b>	1,21±0,05	1,20±0,01	293,46±3,58	<b>310,00±6,04*</b>	12,51±0,03	<b>13,40±0,03*</b>
<b>120</b>	1,29±0,07	<b>1,56±0,02*</b>	303,14±6,55	316,00±5,09	14,74±0,01	<b>16,46±0,01**</b>

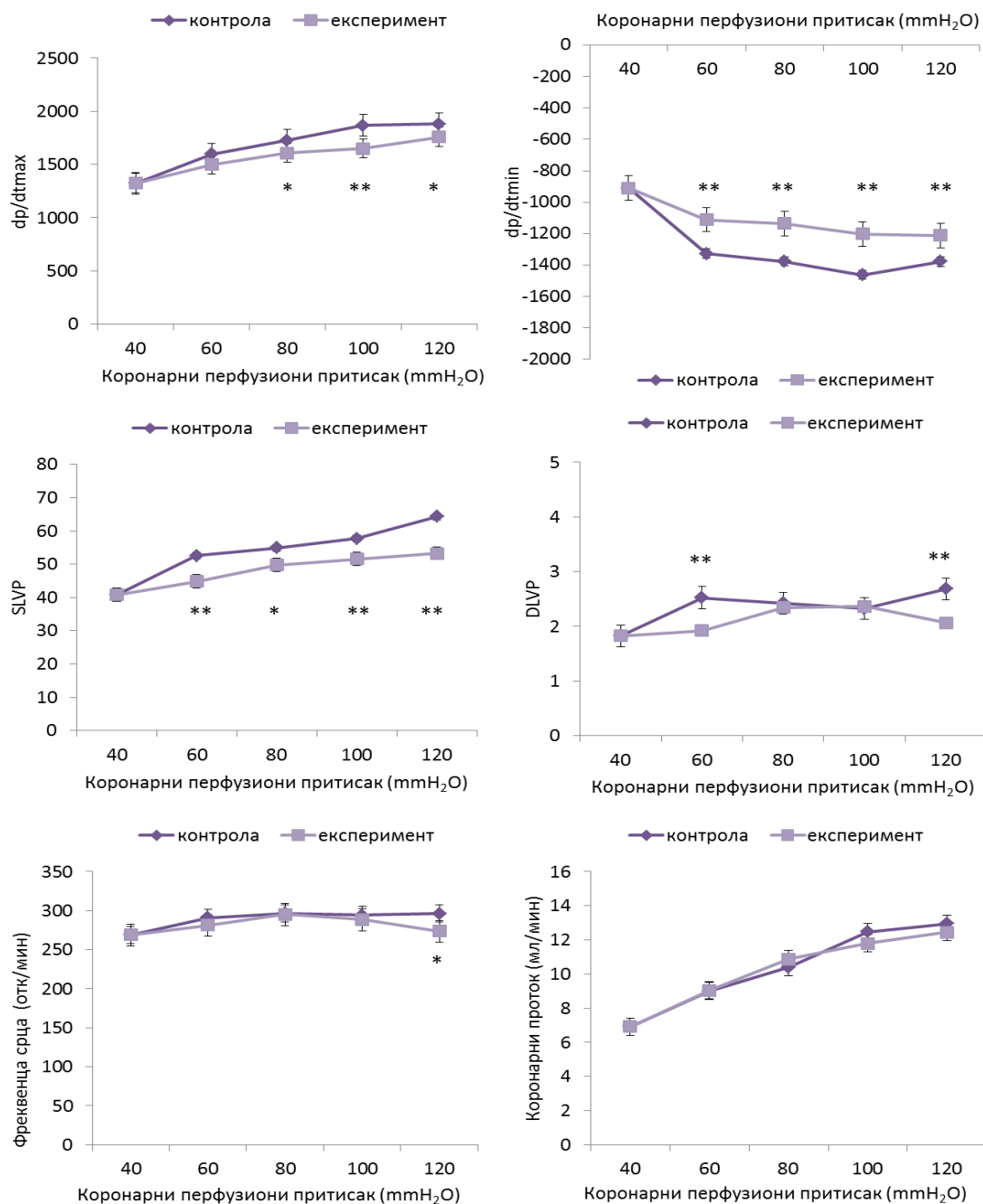
#### 4.3.4. Кардиодинамски параметри изолованог срца пацова у контролној групи подвргнутој хроничној администрацији аторвастатина у дози од 3 мг/кг/дан (АТО-контрола)

Кардиодинамски параметри и коронарни проток су у виду средњих вредности са обележеним статистички значајним разликама приказани графички и табеларно (Графикон бр. 17, Табела бр. 4). Резултати су приказани у виду средњих вредности+стандардна девијација ( $X \pm SD$ ) са статистички значајном разликом уколико је  $p$  вредност мања од 0,05 (\*\* $p < 0,05$ ).

Протоколом ауторегулације на различитим коронарним перфузионим притисцима ( $CPP$ ) у опсегу од 40 до 120  $cmH_2O$  праћене су промене кардиодинамских параметара у контролним и експерименталним условима у групи животиња на стандардној исхрани и хроничној администрацији аторвастатина у дози од 3 мг/кг/дан (АТО-контрола).

Статистички значајно су промењени параметри контрактилности леве коморе срца  $dp/dt \max$  при притиску од 80-120  $cmH_2O$ , са високо статистички значајним разликама на притиску од 100  $cmH_2O$  ( $p < 0,01$ ), док је  $dp/dt \min$  промењен значајно скоро на свим притисцима, од 60 до 120  $cmH_2O$  ( $p < 0,01$ ), као и  $SLVP$ . Са друге стране,  $DLVP$  је значајно смањен у експерименталном периоду на при притиску од 60 и 120  $cmH_2O$  ( $p < 0,01$ ), док је фреквенца срца ( $HR$ ) је била значајно смањена на притиску од 120  $cmH_2O$  ( $p < 0,05$ ) у експерименталном периоду. Коронарни проток није био статистички значајно различит при промени перфузионог притиска, у контролном и експерименталном периоду унутар групе.

Графикон бр. 17 - Кардиодинамски параметри ( $dp/dt$  max (mmHg/s),  $dp/dt$  min (mmHg/s), SLVP (mmHg), DLVP (mmHg), HR (bpm) и CF (ml/min)) изолованог срца пацова у контролном (К) и експерименталном (Е) периоду ретроградне перфузије по *Langendorff* техници у групи животиња на стандардној исхрани и хроничној администрацији аторвастатина у дози од 5мг/кг/дан (АТО-контрола).



Табела 4. Средње вредности и статистичке значајности разлике између вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (К) и експерименталном (Е) периоду у групи животиња на стандардној исхрани и хроничној администрацији аторвастатина у дози од 3мг/кг/дан (АТО-контрола). Резултати су приказани у виду средњих вредности+стандардна девијација ( $X\pm SD$ ). Статистички значајна разлика утврђена је непараметријским тестом за везане узорке *Wilcoxon-овим тестом*, са нивоом значајности од 0,05 (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ).

CPP	dp/dt max (mmHg/s)		dp/dt min (mmHg/s)		SLVP (mmHg)	
	K	E	K	E	K	E
<b>40</b>	1323,66±17,25	1323,66±17,25	-909,58±11,12	-909,58±11,12	40,80±2,58	40,80±2,58
<b>60</b>	1598,32±15,34	1497,42±15,27	-1327,04±15,12	<b>-1110,62±14,78**</b>	52,60±3,21	<b>44,88±4,55**</b>
<b>80</b>	1726,82±14,32	<b>1608,42±26,36*</b>	-1376,26±17,19	<b>-1135,76±15,65**</b>	54,90±4,25	<b>49,76±4,21*</b>
<b>100</b>	1867,96±14,32	<b>1651,16±35,48**</b>	-1462,08±21,21	<b>-1200,91±14,25**</b>	57,76±4,89	<b>51,56±2,58**</b>
<b>120</b>	1880,78±14,17	<b>1759,54±2598*</b>	-1377,68±36,21	<b>-1211,78±36,87**</b>	64,36±5,69	<b>53,28±6,58**</b>
CPP	DLVP (mmHg)		HR (bpm)		CF (ml/min)	
	K	E	K	E	K	E
<b>40</b>	1,82±0,01	1,82±0,01	268,88±7,65	268,88±7,65	6,92±0,01	6,92±0,01
<b>60</b>	2,52±0,03	<b>1,92±0,05**</b>	290,86±6,75	281,40±1,25	9,00±0,01	9,04±0,07
<b>80</b>	2,42±0,07	2,34±0,01	296,80±4,25	294,98±4,25	10,40±0,03	10,88±0,05
<b>100</b>	2,32±0,01	2,36±0,08	294,12±5,36	288,30±3,25	12,48±0,04	11,80±0,07
<b>120</b>	2,68±0,02	<b>2,06±0,04**</b>	296,34±6,96	<b>273,52±5,25*</b>	12,96±0,05	12,44±0,03

#### **4.3.5. Кардиодинамски параметри изолованог срца пацова у групи подвргнутој хиперметионинској исхрани са присуством фолата, витамина В<sub>6</sub> и витамина В<sub>12</sub> и хроничној администрацији аторвастатина у дози од 3 мг/кг/дан (АТО+Мет са фолатима)**

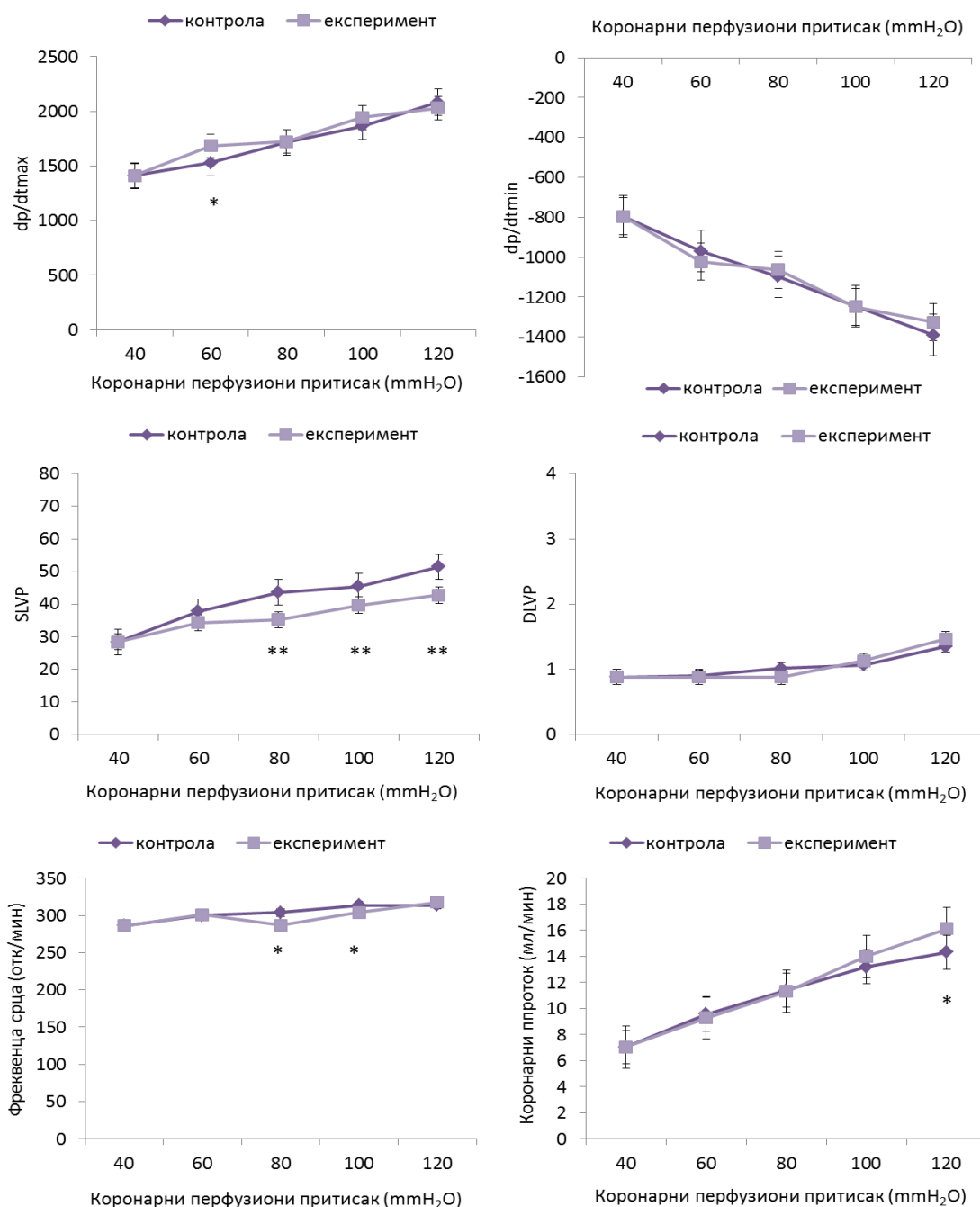
Кардиодинамски параметри и коронарни проток су у виду средњих вредности са обележеним статистички значајним разликама приказани графички и табеларно (Графикон бр. 18, Табела бр. 5). Резултати су приказани у виду средњих вредности+стандардна девијација ( $X \pm SD$ ) са статистички значајном разликом уколико је  $p$  вредност мања од 0,05 (\*\* $p < 0,05$ ).

Протоколом ауторегулације на различитим коронарним перфузионим притисцима (*CPP*) у опсегу од 40 до 120 cmH<sub>2</sub>O праћене су промене кардиодинамских параметара у контролним и експерименталним условима у групи животиња на хиперметионинској дијети са нормалним садржајем фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> и хроничној администрацији аторвастатина у дози од 3мг/кг/дан (АТО+Мет са фолатима).

Статистички значајно су промењени параметри контрактилности леве коморе срца  $dp/dt \max$  при притиску од 60 cmH<sub>2</sub>O ( $p < 0,05$ ), као и *SLVP* при притиску од 80-120 cmH<sub>2</sub>O ( $p < 0,01$ ). Фреквенца срца (HR) је била значајно повишена на притиску од 80 и 100 cmH<sub>2</sub>O ( $p < 0,05$ ) у експерименталном периоду, као коронарни проток на притиску од 120 cmH<sub>2</sub>O ( $p < 0,05$ ). Остали кардиодинамски параметри нису били статистички значајно различити при промени перфузионог притиска у контролном и експерименталном периоду унутар групе.



Графикон бр. 18 - Кардиодинамски параметри ( $dp/dt \max$  (mmHg/s),  $dp/dt \min$  (mmHg/s), SLVP (mmHg), DLVP (mmHg), HR (bpm) и CF (ml/min)) изолованог срца пацова у контролном (К) и експерименталном (Е) периоду ретроградне перфузије по *Langendorff* техници у групи животиња на хиперметионинској дијети са нормалним садржајем фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> и хроничној администрацији аторвастатина у дози од 3мг/кг/дан (АТО-Мет са фолатима).



Табела 5. Средње вредности и статистичке значајности разлике између вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (К) и експерименталном (Е) периоду у групи животиња на хиперметионинској дијети са нормалним садржајем фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> и хроничној администрацији аторвастатина у дози од 3мг/кг/дан (АТО-Мет са фолатима). Резултати су приказани у виду средњих вредности+стандардна девијација (X±SD). Статистички значајна разлика утврђена је непараметријским тестом за везане узорке *Wilcoxon-овим тестом*, са нивоом значајности од 0,05 (\*p<0,05; \*\*p<0,01).

CPP	dp/dt max (mmHg/s)		dp/dt min (mmHg/s)		SLVP (mmHg)	
	K	E	K	E	K	E
<b>40</b>	1409,60±98,12	1409,60±98,12	-795,37±25,78	-795,37±25,78	28,38±2,78	28,38±2,78
<b>60</b>	1527,38±69,32	<b>1684,40±45,89*</b>	-970,63±74,52	-1022,42±98,12	37,77±3,58	34,33±8,97
<b>80</b>	1715,10±45,48	1723,53±85,36	-1096,72±65,65	-1062,73±47,52	43,65±4,87	<b>35,28±9,98**</b>
<b>100</b>	1864,00±78,25	1943,12±78,95	-1245,87±58,26	-1248,33±98,85	45,47±3,25	<b>39,72±5,53**</b>
<b>120</b>	2082,25±58,65	2030,38±89,87	-1390,63±78,12	-1326,83±86,85	51,45±7,85	<b>42,75±2,45**</b>
CPP	DLVP (mmHg)		HR (bpm)		CF (ml/min)	
	K	E	K	E	K	E
<b>40</b>	0,88±0,12	0,88±0,12	286,32±0,13	286,32±0,13	7,03±0,01	7,03±0,01
<b>60</b>	0,90±0,15	0,88±0,17	300,10±0,15	301,17±0,17	9,57±0,02	9,27±0,03
<b>80</b>	1,02±0,18	0,88±0,16	304,07±0,17	<b>286,65±0,23*</b>	11,40±0,03	11,30±0,06
<b>100</b>	1,07±0,04	1,13±0,17	313,72±0,01	<b>304,08±0,22*</b>	13,20±0,04	14,00±0,08
<b>120</b>	1,35±0,56	1,47±0,18	313,85±0,04	317,57±0,56	14,33±0,01	<b>16,13±0,02*</b>

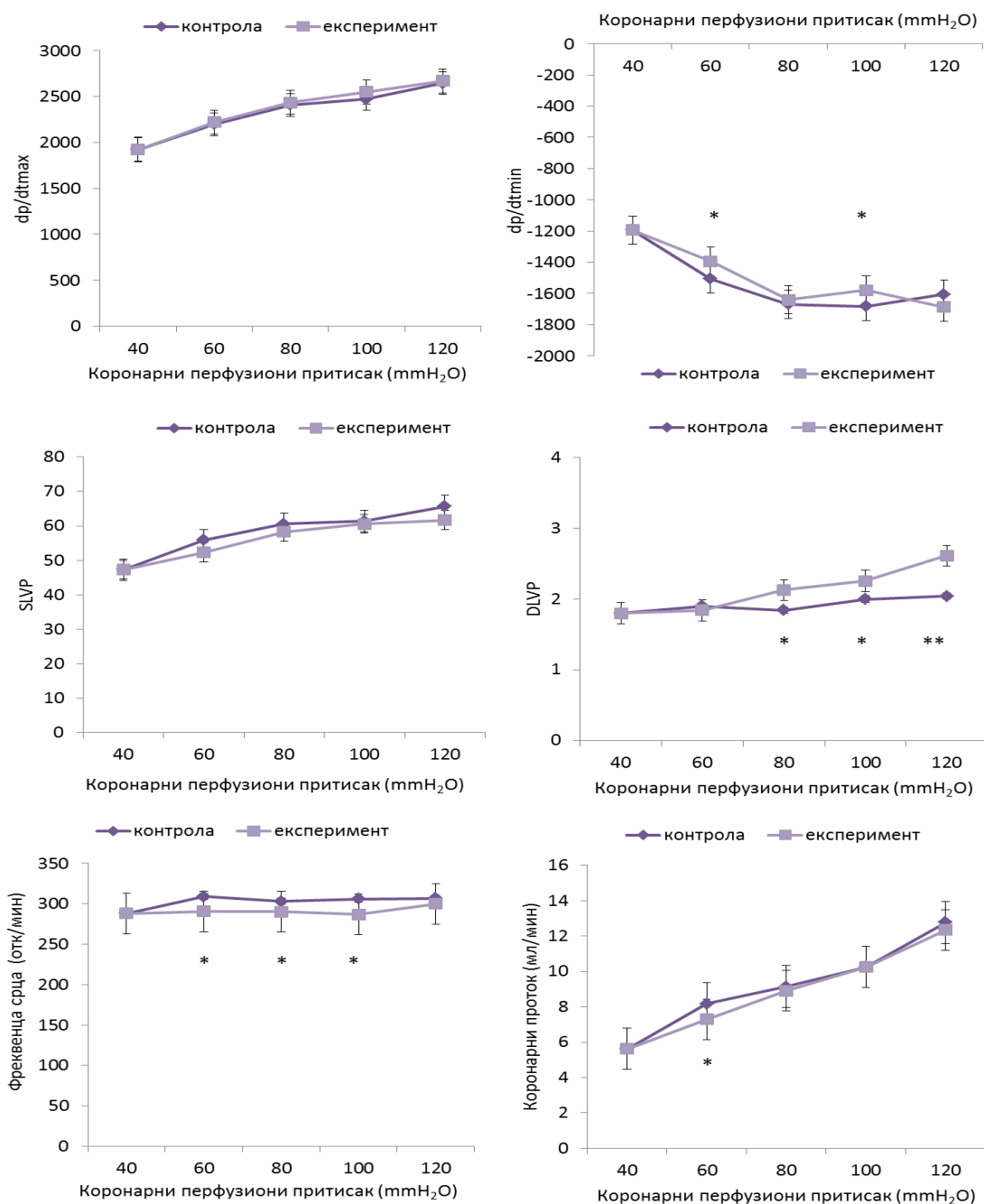
#### 4.3.6. Кардиодинамски параметри изолованог срца пацова у групи подвргнутој хиперметионинској исхрани без фолата, витамина В<sub>6</sub> и витамина В<sub>12</sub> и хроничној администрацији аторвастатина у дози од 3 мг/кг/дан (АТО+Мет без фолата)

Кардиодинамски параметри и коронарни проток су у виду средњих вредности са обележеним статистички значајним разликама приказани графички и табеларно (Графикон бр. 19, Табела бр. 6). Резултати су приказани у виду средњих вредности+стандардна девијација ( $X \pm SD$ ) са статистички значајном разликом уколико је  $p$  вредност мања од 0,05 (\*\* $p < 0,05$ ).

Протоколом ауторегулације на различитим коронарним перфузионим притисцима ( $CPP$ ) у опсегу од 40 до 120  $cmH_2O$  праћене су промене кардиодинамских параметара у контролним и експерименталним условима у групи животиња подвргнутој хиперметионинској исхрани без фолата, витамина В<sub>6</sub> и витамина В<sub>12</sub> и хроничној администрацији аторвастатина у дози од 3мг/кг/дан (АТО+Мет без фолата).

Статистички значајно су промењени параметри контрактилности леве коморе срца  $dp/dt \min$  при притиску од 60 и 100  $cmH_2O$  ( $p < 0,05$ ), као и  $DLVP$  при притиску од 80, 100 ( $p < 0,01$ ) и 120  $cmH_2O$  ( $p < 0,05$ ). Фреквенца срца (HR) је била значајно повишена на притиску од 60-100  $cmH_2O$  ( $p < 0,05$ ) у експерименталном периоду, као коронарни проток на притиску од 60  $cmH_2O$  ( $p < 0,05$ ). Остали кардиодинамски параметри нису били статистички значајно различити при промени перфузионог притиска у контролном и експерименталном периоду унутар групе.

Графикон бр. 19 - Кардиодинамски параметри ( $dp/dt \max$  (mmHg/s),  $dp/dt \min$  (mmHg/s), SLVP (mmHg), DLVP (mmHg), HR (bpm) и CF (ml/min)) изолованог срца пацова у контролном (К) и експерименталном (Е) периоду ретроградне перфузије по *Langendorff* техници у групи животиња подвргнутој хиперметионинској исхрани без фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> и хроничној администрацији аторвастатина у дози од 3мг/кг/дан (АТО-мет без фолата).



Табела 6. Средње вредности и статистичке значајности разлике између вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (К) и експерименталном (Е) периоду у групи животиња на стандардној исхрани и хроничној администрацији аторвастатина у дози од 3мг/кг/дан (АТО-мет без фолата). Резултати су приказани у виду средњих вредности+стандардна девијација ( $X \pm SD$ ). Статистички значајна разлика утврђена је непараметријским тестом за везане узорке *Wilcoxon-овим тестом*, са нивоом значајности од 0,05 (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

CPP	dp/dt max (mmHg/s)		dp/dt min (mmHg/s)		SLVP (mmHg)	
	K	E	K	E	K	E
<b>40</b>	1924,21±25,25	1924,21±25,25	-1193,37±25,85	-1193,37±25,85	47,23±2,25	47,23±2,25
<b>60</b>	2200,20±32,36	2221,60±74,54	-1507,33±12,75	<b>-1395,11±47,89*</b>	55,81±3,21	52,31±5,68
<b>80</b>	2409,79±27,28	2436,50±24,36	-1669,67±65,25	-1639,93±25,63	60,53±4,25	58,24±2,45
<b>100</b>	2473,54±45,56	2551,61±54,56	-1683,13±45,21	<b>-1578,44±58,69*</b>	61,39±6,78	60,57±4,63
<b>120</b>	2644,07±55,62	2670,40±85,65	-1604,90±15,78	-1686,76±74,63	65,67±3,21	61,70±7,21
CPP	DLVP (mmHg)		HR (bpm)		CF (ml/min)	
	K	E	K	E	K	E
<b>40</b>	1,80±0,01	1,80±0,01	287,99±12,12	287,99±12,12	5,63±0,07	5,63±0,07
<b>60</b>	1,90±0,02	1,84±0,04	309,07±13,14	290,59±17,11	8,17±0,01	<b>7,29±0,02*</b>
<b>80</b>	1,84±0,09	<b>2,13±0,04*</b>	302,94±15,11	290,21±13,65	9,14±0,04	8,91±0,07
<b>100</b>	2,00±0,04	<b>2,26±0,05*</b>	305,80±18,98	286,71±15,58	10,26±0,05	10,26±0,02
<b>120</b>	2,04±0,01	<b>2,61±0,07**</b>	306,81±14,75	299,81±17,89	12,77±0,09	12,34±0,04

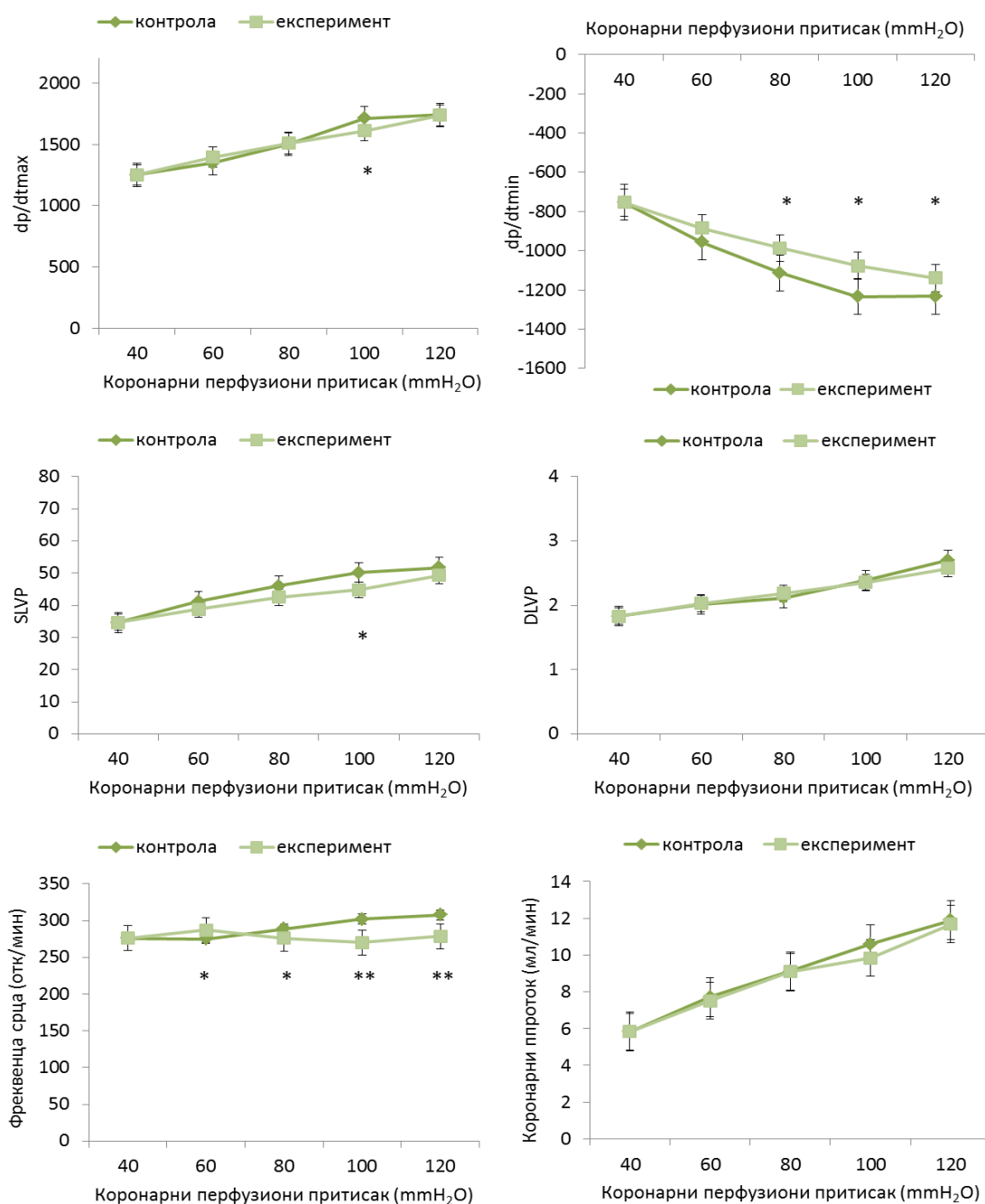
#### 4.3.7. Кардиодинамски параметри изолованог срца пацова у контролној групи подвргнутој хроничној администрацији симвастатина у дози од 5мг/кг/дан (СИМ-контрола)

Кардиодинамски параметри и коронарни проток су у виду средњих вредности са обележеним статистички значајним разликама приказани графички и табеларно (Графикон бр. 20, Табела бр. 7). Резултати су приказани у виду средњих вредности+стандардна девијација ( $X \pm SD$ ) са статистички значајном разликом уколико је  $p$  вредност мања од 0,05 (\*\* $p < 0,05$ ).

Протоколом ауторегулације на различитим коронарним перфузионим притисцима ( $CPP$ ) у опсегу од 40 до 120  $cmH_2O$  праћене су промене кардиодинамских параметара у контролним и експерименталним условима у групи животиња подвргнутој стандардној храни и хроничној администрацији симвастатина у дози од 5мг/кг/дан (СИМ-контрола).

Статистички значајно су промењени параметри контрактилности леве коморе срца  $dp/dt \max$  при притиску од 100  $cmH_2O$  ( $p < 0,05$ ) и  $dp/dt \min$  при притиску од 80-120  $cmH_2O$  ( $p < 0,05$ ), као и  $SLVP$  при притиску од 100  $cmH_2O$  ( $p < 0,05$ ). Фреквенца срца ( $HR$ ) је била значајно снижена на притиску од 60-120  $cmH_2O$  ( $p < 0,05$ ) у експерименталном периоду, са високо значајном разликом при притиску од 100 и 120  $cmH_2O$ . Остали кардиодинамски параметри нису били статистички значајно различити при промени перфузионог притиска у контролном и експерименталном периоду унутар групе.

Графикон бр. 20 - Кардиодинамски параметри ( $dp/dt$  max (mmHg/s),  $dp/dt$  min (mmHg/s), SLVP (mmHg), DLVP (mmHg), HR (bpm) и CF (ml/min)) изолованог срца пацова у контролном (К) и експерименталном (Е) периоду ретроградне перфузије по *Langendorff* техници у групи животиња на стандардној исхрани и хроничној администрацији симвастатина у дози од 5мг/кг/дан (СИМ-контрола).



Табела 7. Средње вредности и статистичке значајности разлике између вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (К) и експерименталном (Е) периоду у групи животиња на стандардној исхрани и хроничној администрацији симвастина у дози од 5мг/кг/дан (СИМ-контрола). Резултати су приказани у виду средњих вредности+стандардна девијација ( $X\pm SD$ ). Статистички значајна разлика утврђена је непараметријским тестом за везане узорке *Wilcoxon-овим тестом*, са нивоом значајности од 0,05 (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ).

CPP	dp/dt max (mmHg/s)		dp/dt min (mmHg/s)		SLVP (mmHg)	
	K	E	K	E	K	E
<b>40</b>	1251,09±25,25	1251,09±25,25	-754,76±24,56	-754,76±24,56	34,64±2,36	34,64±2,36
<b>60</b>	1345,47±35,36	1395,63±74,24	-955,87±25,98	-886,10±23,22	41,14±2,58	38,77±4,56
<b>80</b>	1502,74±45,96	1507,76±24,98	-1114,13±25,87	<b>-987,11±25,89*</b>	46,09±2,14	42,47±7,56
<b>100</b>	1713,06±45,65	<b>1611,26±15,62*</b>	-1234,16±14,79	<b>-1077,83±45,69*</b>	50,20±4,56	<b>44,76±5,69*</b>
<b>120</b>	1739,87±47,56	1736,51±47,85	-1232,89±74,96	<b>-1140,01±74,69*</b>	51,76±7,45	49,30±4,69
CPP	DLVP (mmHg)		HR (bpm)		CF (ml/min)	
	K	E	K	E	K	E
<b>40</b>	1,83±0,12	1,83±0,12	275,89±0,12	275,89±0,12	5,83±0,01	5,83±0,07
<b>60</b>	2,01±0,14	2,03±0,14	275,11±0,14	<b>287,00±0,14*</b>	7,71±0,08	7,51±0,01
<b>80</b>	2,11±0,17	2,19±0,13	288,74±0,15	<b>275,79±0,18*</b>	9,11±0,06	9,09±0,04
<b>100</b>	2,39±0,06	2,36±0,15	302,09±0,17	<b>270,33±0,29**</b>	10,60±0,07	9,83±0,02
<b>120</b>	2,70±0,17	2,57±0,18	307,64±0,14	<b>278,73±0,78**</b>	11,89±0,07	11,69±0,06



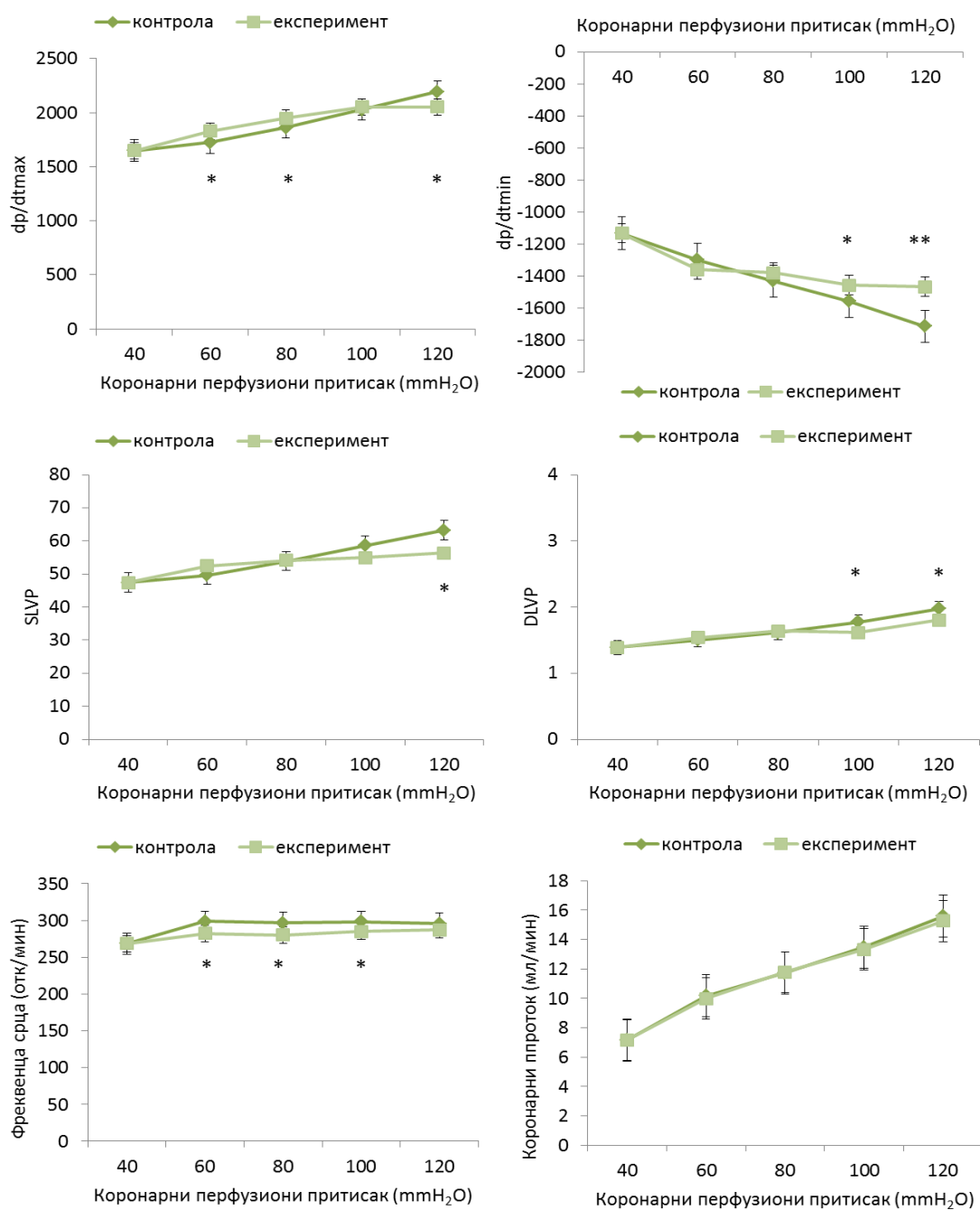
#### 4.3.8. Кардиодинамски параметри изолованог срца пацова у групи подвргнутој хиперметионинској исхрани са присуством фолата, витамина В<sub>6</sub> и витамина В<sub>12</sub> и хроничној администрацији симвастатина у дози од 5мг/кг/дан (СИМ-Мет са фолатима)

Кардиодинамски параметри и коронарни проток су у виду средњих вредности са обележеним статистички значајним разликама приказани графички и табеларно (Графикон бр. 21, Табела бр. 8). Резултати су приказани у виду средњих вредности+стандардна девијација ( $X \pm SD$ ) са статистички значајном разликом уколико је  $p$  вредност мања од 0,05 (\*\* $p < 0,05$ ).

Протоколом ауторегулације на различитим коронарним перфузионим притисцима ( $CPP$ ) у опсегу од 40 до 120  $cmH_2O$  праћене су промене кардиодинамских параметара у контролним и експерименталним условима у групи животиња подвргнутој хиперметионинској исхрани са присуством фолата, витамина В<sub>6</sub> и витамина В<sub>12</sub> и хроничној администрацији симвастатина у дози од 5мг/кг/дан (СИМ-Мет са фолатима).

Статистички значајно су промењени параметри контрактилности леве коморе срца  $dp/dt \max$  при притисцима од 80-120  $cmH_2O$  ( $p < 0,05$ ) и  $dp/dt \min$  при притиску од 100 и 120  $cmH_2O$ , са израженијим променама при највишем притиску перфузије. Затим,  $SLVP$  и  $DLVP$  су се значајно мењали при највишим притисцима, 100 и 120  $cmH_2O$  ( $p < 0,05$ ). Фреквенца срца ( $HR$ ) је била значајно снижена на притиску од 60-100  $cmH_2O$  ( $p < 0,05$ ) у експерименталном периоду, док се коронарни проток није значајно мењао.

Графикон бр. 21 - Кардиодинамски параметри ( $dp/dt$  max (mmHg/s),  $dp/dt$  min (mmHg/s), SLVP (mmHg), DLVP (mmHg), HR (bpm) и CF (ml/min)) изолованог срца пацова у контролном (К) и експерименталном (Е) периоду ретроградне перфузије по *Langendorff* техници у групи животиња подвргнутој хиперметионинској исхрани са присуством фолата, витамина В<sub>6</sub> и витамина В<sub>12</sub> и хроничној администрацији симвастатина у дози од 5мг/кг/дан (СИМ-Мет са фолатима).



Табела 8. Средње вредности и статистичке значајности разлике између вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (К) и експерименталном (Е) периоду у групи животиња подвргнутој хиперметионинској исхрани са присуством фолата, витамина В<sub>6</sub> и витамина В<sub>12</sub> и хроничној администрацији симвастатина у дози од 5мг/кг/дан (СИМ-Мет са фолатима). Резултати су приказани у виду средњих вредности+стандардна девијација (X±SD). Статистички значајна разлика утврђена је непараметријским тестом за везане узорке *Wilcoxon-овим тестом*, са нивоом значајности од 0,05 (\*p<0,05; \*\*p<0,01).

CPP	dp/dt max (mmHg/s)		dp/dt min (mmHg/s)		SLVP (mmHg)	
	K	E	K	E	K	E
<b>40</b>	1650,59±56,89	1650,59±56,89	-1131,78±25,56	-1131,78±25,56	47,43±2,36	47,43±2,36
<b>60</b>	1723,58±87,96	<b>1829,60±25,89*</b>	-1297,35±58,96	-1358,04±24,56	49,65±2,58	52,40±2,56
<b>80</b>	1863,01±74,23	<b>1948,58±89,85*</b>	-1429,26±45,23	-1377,36±45,65	53,91±5,58	54,15±5,69
<b>100</b>	2028,75±45,96	2054,00±45,98	-1555,86±33,21	<b>-1456,49±74,63*</b>	58,56±6,63	54,98±7,69
<b>120</b>	2195,19±85,32	<b>2052,65±45,98*</b>	-1711,28±28,96	<b>-1465,36±25,85**</b>	63,21±7,26	<b>56,30±2,36*</b>
CPP	DLVP (mmHg)		HR (bpm)		CF (ml/min)	
	K	E	K	E	K	E
<b>40</b>	1,39±0,01	1,39±0,01	268,35±23,69	268,35±25,69	7,15±1,2	7,15±1,2
<b>60</b>	1,50±0,02	1,54±0,04	298,73±25,98	<b>282,30±21,25*</b>	10,15±0,9	9,98±0,9
<b>80</b>	1,61±0,05	1,64±0,03	296,70±47,21	<b>280,06±23,36*</b>	11,73±0,8	11,78±0,8
<b>100</b>	1,78±0,04	<b>1,61±0,04*</b>	298,20±15,23	<b>285,18±24,51*</b>	13,48±0,7	13,33±0,7
<b>120</b>	1,98±0,04	<b>1,80±0,05*</b>	295,64±25,65	286,84±23,21	15,58±0,5	15,25±0,5

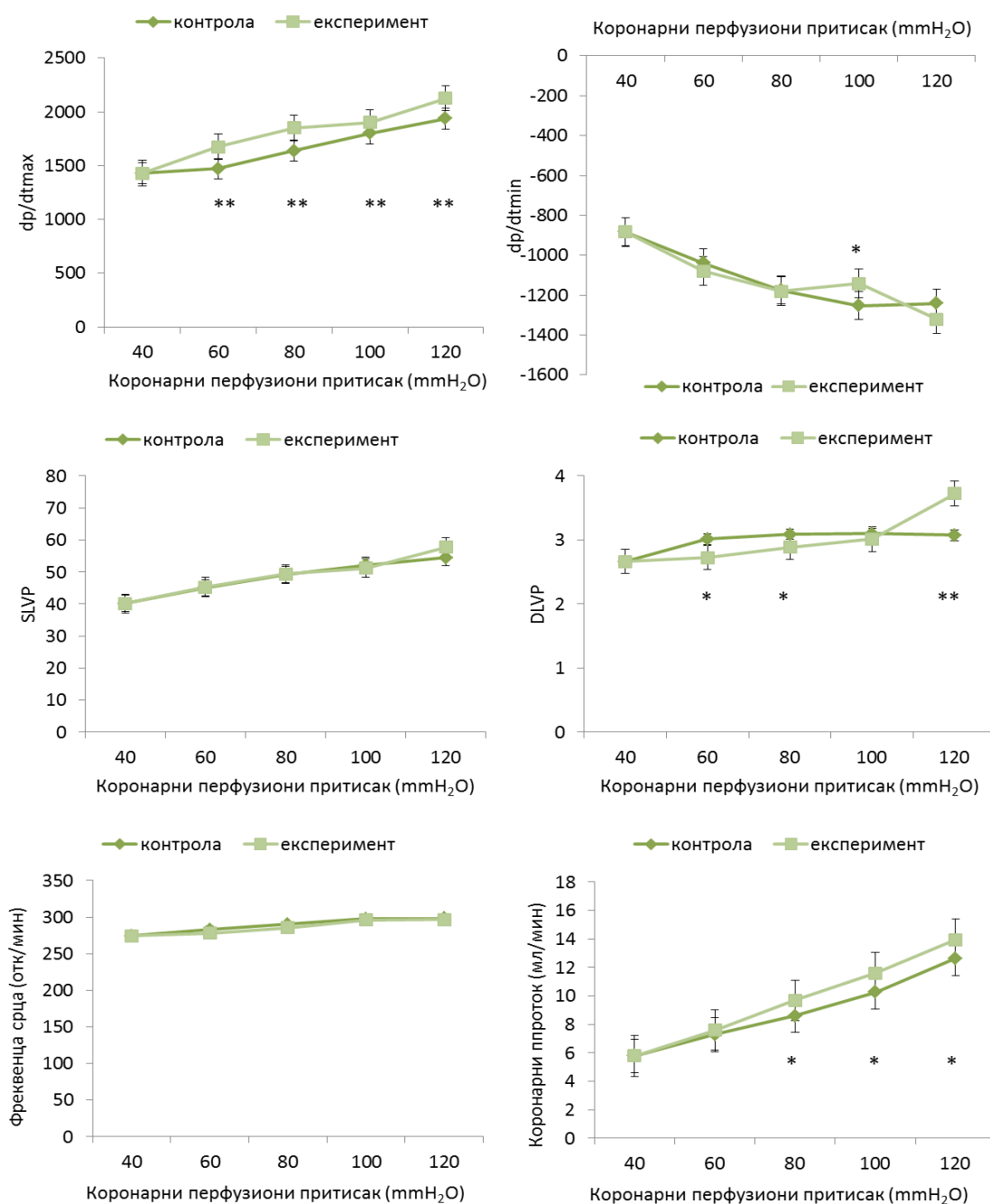
#### **4.3.9. Кардиодинамски параметри изолованог срца пацова у групи подвргнутој хиперметионинској исхрани без фолата, витамина В<sub>6</sub> и витамина В<sub>12</sub> и хроничној администрацији симвастатина у дози од 5мг/кг/дан (СИМ-Мет без фолата)**

Кардиодинамски параметри и коронарни проток су у виду средњих вредности са обележеним статистички значајним разликама приказани графички и табеларно (Графикон бр. 22, Табела бр. 9). Резултати су приказани у виду средњих вредности+стандардна девијација ( $X \pm SD$ ) са статистички значајном разликом уколико је  $p$  вредност мања од 0,05 (\*\* $p < 0,05$ ).

Протоколом ауторегулације на различитим коронарним перфузионим притисцима ( $CPP$ ) у опсегу од 40 до 120  $cmH_2O$  праћене су промене кардиодинамских параметара у контролним и експерименталним условима у групи животиња подвргнутој хиперметионинској исхрани без фолата, витамина В<sub>6</sub> и витамина В<sub>12</sub> и хроничној администрацији симвастатина у дози од 5мг/кг/дан (СИМ-Мет без фолата).

Статистички значајно су промењени параметри контрактилности леве коморе срца  $dp/dt \max$  при скоро свим притисцима (60-120  $cmH_2O$ ) са статистички врло израженим разликама поређењем контролног и експерименталног периода ( $p < 0,01$ ), док је  $dp/dt \min$  био промењен само при притиску од 100  $cmH_2O$  ( $p < 0,05$ ). Затим,  $DLVP$  је значајно промењен при притисцима од 60, 80 ( $p < 0,05$ ) и 120  $cmH_2O$  ( $p < 0,01$ ). Коронарни проток се значајно повишен у експерименталном периоду у поређењу са контролним при притиску од 80, 100 и 120  $cmH_2O$  ( $p < 0,05$ ).  $SLVP$  и Фреквенца срца (HR) се нису статистички значајно мењали у експерименталном периоду ни при једном коронарном перфузионим притиску (40-120  $cmH_2O$ ) ( $p > 0,05$ ).

Графикон бр. 22 - Кардиодинамски параметри ( $dp/dt \max$  (mmHg/s),  $dp/dt \min$  (mmHg/s), SLVP (mmHg), DLVP (mmHg), HR (bpm) и CF (ml/min)) изолованог срца пацова у контролном (К) и експерименталном (Е) периоду ретроградне перфузије по *Langendorff* техници у групи животиња подвргнутој хиперметионинској исхрани без присуства фолата, витамина В<sub>6</sub> и витамина В<sub>12</sub> и хроничној администрацији симвастатина у дози од 5мг/кг/дан (СИМ-Мет без фолата).



Табела 9. Средње вредности и статистичке значајности разлике између вредности кардиодинамских параметара у контролном периоду (К) и експерименталном (Е) периоду у групи животиња подвргнутој хиперметионинској исхрани без присуства фолата, витамина В<sub>6</sub> и витамина В<sub>12</sub> и хроничној администрацији симвастатина у дози од 5мг/кг/дан (СИМ-Мет без фолата). Резултати су приказани у виду средњих вредности+стандардна девијација (X±SD). Статистички значајна разлика утврђена је непараметријским тестом за везане узорке *Wilcoxon-овим тестом*, са нивоом значајности од 0,05 (\*p<0,05; \*\*p<0,01).

CPP	dp/dt max (mmHg/s)		dp/dt min (mmHg/s)		SLVP (mmHg)	
	K	E	K	E	K	E
<b>40</b>	1430,48±87,98	1430,48±87,98	-882,94±19,12	-882,94±19,12	40,18±2,25	40,18±2,25
<b>60</b>	1470,70±45,69	<b>1675,60±65,98*</b>	-1038,41±17,13	-1079,46±14,78	45,08±3,27	45,29±3,25
<b>80</b>	1637,91±78,58	<b>1849,68±56,78*</b>	-1175,56±14,89	-1180,81±25,98	49,18±3,69	49,35±3,78
<b>100</b>	1799,26±96,36	<b>1900,48±25,63*</b>	-1253,46±14,75	<b>-1142,01±23,56*</b>	52,19±3,58	51,21±4,12
<b>120</b>	1937,63±48,58	<b>2126,39±45,12*</b>	-1241,08±13,69	-1321,59±85,35	54,48±4,45	57,70±5,14
CPP	DLVP (mmHg)		HR (bpm)		CF (ml/min)	
	K	E	K	E	K	E
<b>40</b>	2,66±0,01	2,66±0,01	274,50±12,25	274,50±12,25	5,78±0,25	5,78±0,25
<b>60</b>	3,01±0,02	<b>2,73±0,03*</b>	282,89±13,45	277,99±13,26	7,28±0,32	7,60±0,14
<b>80</b>	3,09±0,08	<b>2,89±0,04*</b>	290,06±17,12	285,56±14,25	8,60±0,45	<b>9,68±0,12*</b>
<b>100</b>	3,10±0,01	3,01±0,02	297,83±14,23	296,18±12,23	10,25±0,46	<b>11,60±0,14*</b>
<b>120</b>	3,08±0,04	<b>3,73±0,07**</b>	297,98±12,23	296,41±14,25	12,63±0,47	<b>13,95±0,15*</b>

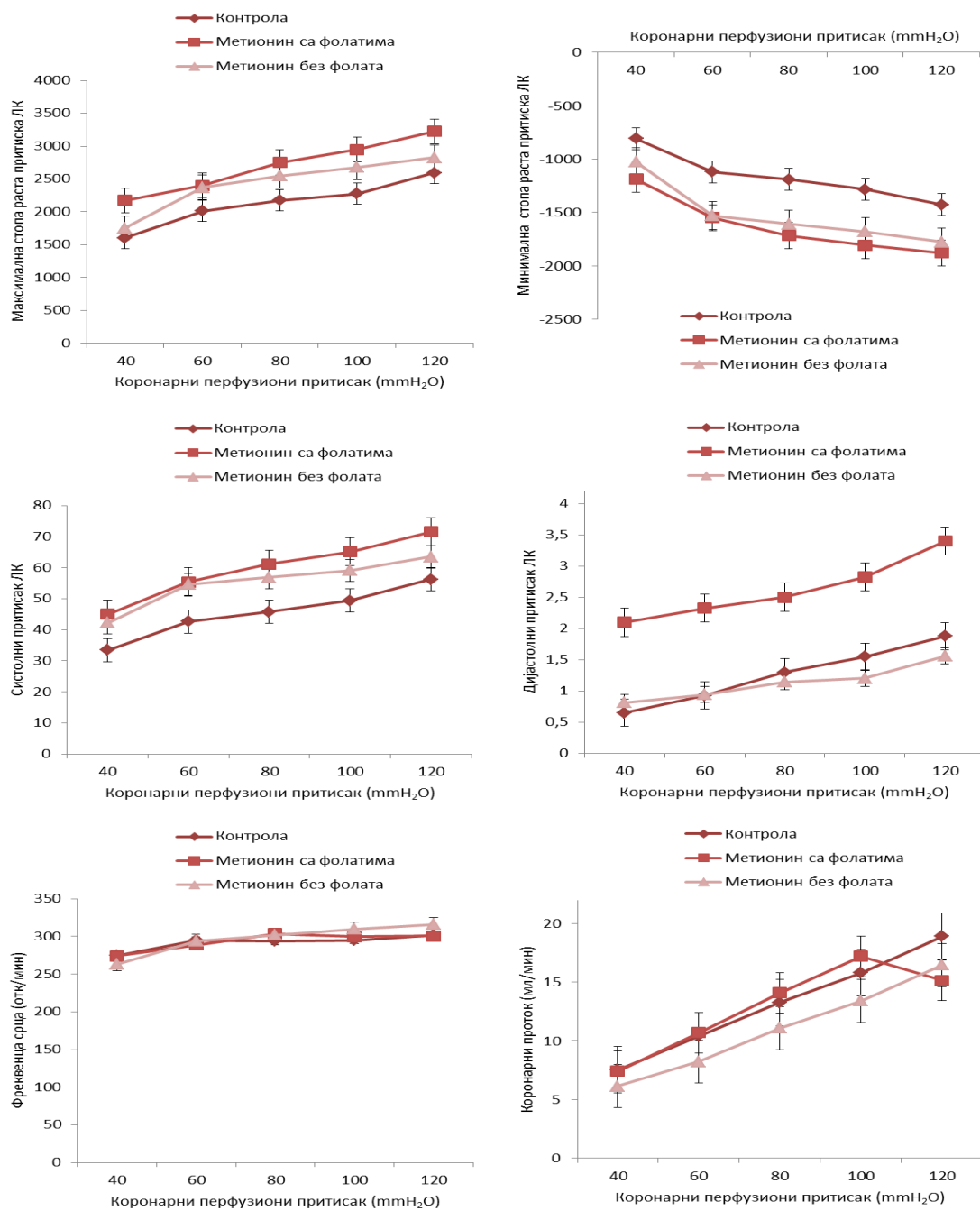
#### 4.4. ПРОМЕНЕ КАРДИДИНАМСКИХ ПАРАМЕТАРА ИЗЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА У ОДНОСУ НА ДИЈЕТАЛНИ РЕЖИМ И ВРЕДНОСТИ ХОМОЦИСТЕИНА У КРВИ

##### 4.4.1. Утицај различитог дијеталног режима на кардиодинамске параметре

Кардиодинамски параметри и коронарни проток су у виду средњих вредности приказани графички а статистички значајне разлике приказане су табеларно (Графикон бр. 23, Табела бр. 10).

Поређењем вредности  $dp/dt \min$  између контролне, Мет са фолатима и Мет без фолата групе, статистички је показано да је овај параметар био повишен у хомоцистеинемичним групама у односу на контролну групу, осим на притиску од 40 и 120  $\text{cmH}_2\text{O}$  у Мет без фолата групи у односу на контролну. Овај параметар је био највиши у групи умерене хиперхомоцистеинемичне у односу на остале групе (контрола, Мет без фолата).  $Dp/dt \min$  је статистички значајно повећан у контролној групи у односу на групе са хиперхомоцистеинемичном скоро при свим притисцима, док су  $SLVP$  и  $DLVP$  значајно нижи у контролној групи у односу на остале две групе, са значајним повишењем систолног и дијастолног притиска у групи умерене хиперхомоцистеинемичне у односу на групу са тешком хиперхомоцистеинемичном.  $HR$  је снижена у групама третиране хиперметионинским дијетама у односу на контролну групу и то при највишим перфузионим притисцима, док је коронарни проток био значајно снижен при тешкој хиперхомоцистеинемичној доминантно у односу на остале групе, са значајним падом протока и у умереној хиперхомоцистеинемичној на највишем притиску 120  $\text{cmH}_2\text{O}$ .

Графикон бр. 23 – Упоредни приказ вредности свих кардиодинамских параметара изолованог срца пацова при примени различитих дијета без фармаколошког третмана





Табела 10 – Поређење вредности свих кардиодинамских параметара изолованог срца пацова између група, односно при примени различитих дијета (контрола (К), хиперметиониска дијета са присуством фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> (МФ) и хиперметиониска дијета без фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> (МБФ)) без фармаколошког третмана на свим перфузионим притисцима (40-120 cmH<sub>2</sub>O). Статистичка значајност између група за сваки параметар утврђена је непараметријским аналогом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), *Kruskal-Wallis H* тестом (p<0,05; HC: p>0,05).

CPP	dp/dt max (mmHg/s)			dp/dt min (mmHg/s)			SLVP (mmHg)		
	K vs. МФ	K vs. МБФ	МФ vs. МБФ	K vs. МФ	K vs. МБФ	МФ vs. МБФ	K vs. МФ	K vs. МБФ	МФ vs. МБФ
<b>40</b>	p<0,05	HC	p<0,05	HC	HC	HC	p<0,05	p<0,05	HC
<b>60</b>	p<0,05	p<0,05	HC	p<0,05	p<0,05	HC	p<0,05	p<0,05	HC
<b>80</b>	p<0,05	p<0,05	HC	p<0,05	p<0,05	HC	p<0,05	p<0,05	p<0,05
<b>100</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	HC	p<0,05	p<0,05	p<0,05
<b>120</b>	p<0,05	HC	p<0,05	p<0,05	p<0,05	HC	p<0,05	p<0,05	p<0,05
CPP	DLVP (mmHg)			HR (bpm)			CF (ml/min)		
	K vs. МФ	K vs. МБФ	МФ vs. МБФ	K vs. МФ	K vs. МБФ	МФ vs. МБФ	K vs. МФ	K vs. МБФ	МФ vs. МБФ
<b>40</b>	p<0,05	HC	p<0,05	HC	HC	HC	HC	p<0,05	p<0,05
<b>60</b>	p<0,05	HC	p<0,05	HC	HC	HC	HC	p<0,05	p<0,05
<b>80</b>	p<0,05	HC	p<0,05	HC	HC	HC	HC	p<0,05	p<0,05
<b>100</b>	p<0,05	HC	p<0,05	HC	HC	HC	HC	p<0,05	p<0,05
<b>120</b>	p<0,05	HC	p<0,05	HC	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05

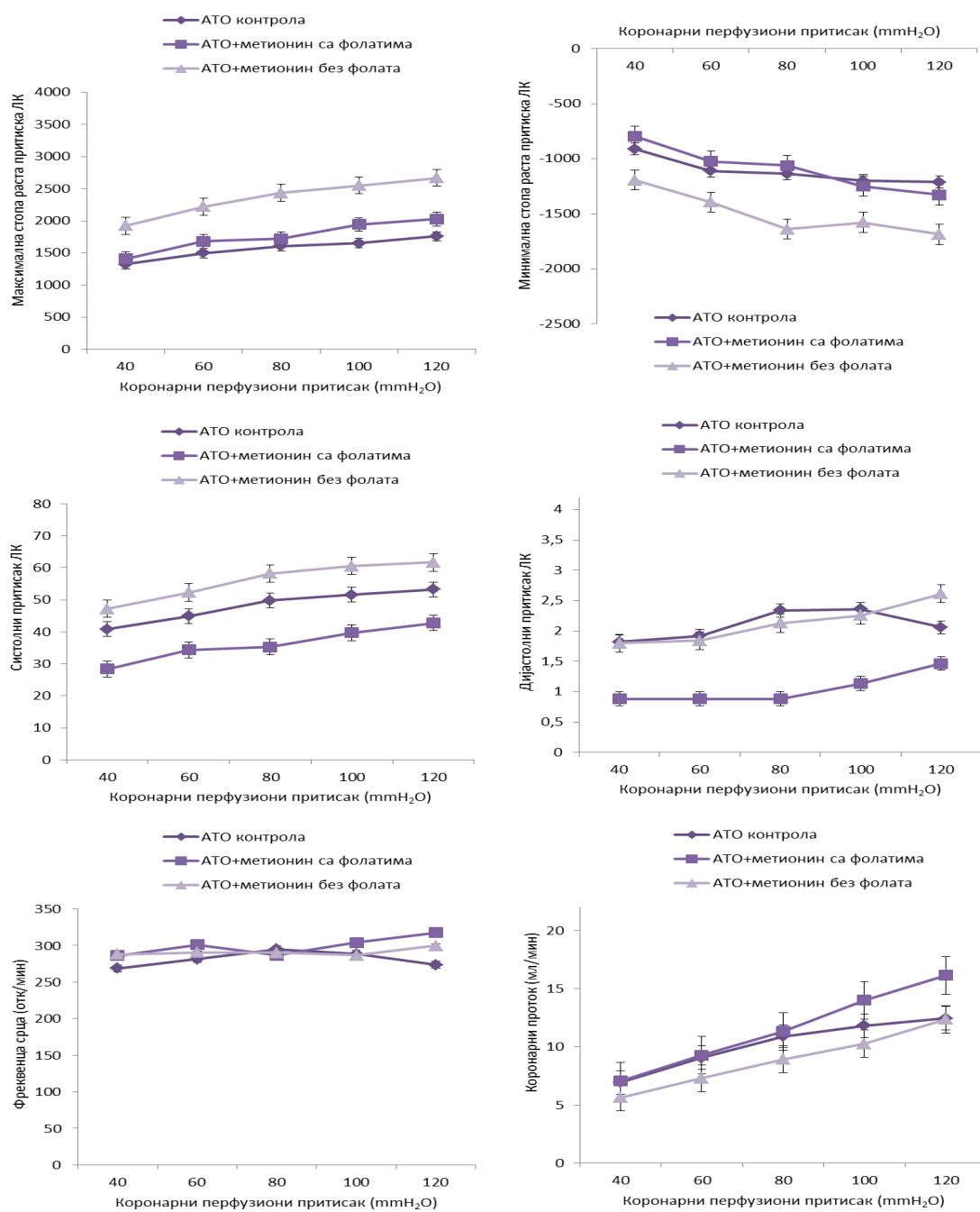
#### 4.4.2. Утицај различитог дијеталног режима на кардиодинамске параметре у присуству аторвастатина

Кардиодинамски параметри и коронарни проток су у виду средњих вредности приказани графички а статистички значајне разлике приказане су табеларно (Графикон бр. 24, Табела бр. 11).

Поређењем вредности  $dp/dt \max$  између контролне, Мет са фолатима и Мет без фолата групе у комбинацији са применом аторвастатина, статистички је показано да је овај параметар био значајно повишен у групи тешке хиперхомоцистеинемije у односу на контролну групу и групу са умереном хиперхомоцистеинемijом. Са друге стране, вредност овог параметра се значајно повећала у групи умерене хиперхомоцистеинемije у односу на контролну групу само на појединим тачкама у присуству аторвастатина (60, 100 и 120  $\text{cmH}_2\text{O}$ ).  $Dp/dt \min$  је статистички значајно мењао сличном динамиком као  $dp/dt \max$ .

Поређењем група,  $SLVP$  је значајно промењен у свим групама, са доминантно највишим вредностима систолног притиска у групи тешке хиперхомоцистеинемije, док је  $DLVP$  статистички значајно нижи у групи умерене хиперхомоцистеинемije (АТО-Мет са фолатима) у односу на остале две групе.  $HR$  је значајно повишен у хиперхомоцистеинемичним групама у односу на контролну групу и то при најнижим и највишим перфузионим притисцима, са доминантно повишеним вредностима у умереној хиперхомоцистеинемijом, док је коронарни проток био значајно снижен при тешкој хиперхомоцистеинемiji доминантно у односу на групу са умереном хиперхомоцистеинемijом, и на притисцима од 40-80  $\text{cmH}_2\text{O}$  у односу на контролну групу након хроничног третмана аторвастатином.

Графикон бр. 24 – Упоредни приказ вредности свих кардиодинамских параметара изолованог срца пацова при примени различитих дијета у присуству аторвастатина



Табела 11 – Поређење вредности свих кардиодинамских параметара изолованог срца пацова између група, односно при примени различитих дијета (АТО-контрола (АК), АТО+хиперметиониска дијета са присуством фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> (АМФ) и АТО+хиперметиониска дијета без фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> (АМБФ)), у току фармаколошког третмана аторвастатином, на свим перфузионим притисцима (40-120 cmH<sub>2</sub>O). Статистичка значајаност између група за сваки параметар утврђена је непараметријским аналогом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), *Kruskal-Wallis H* тестом (p<0,05).

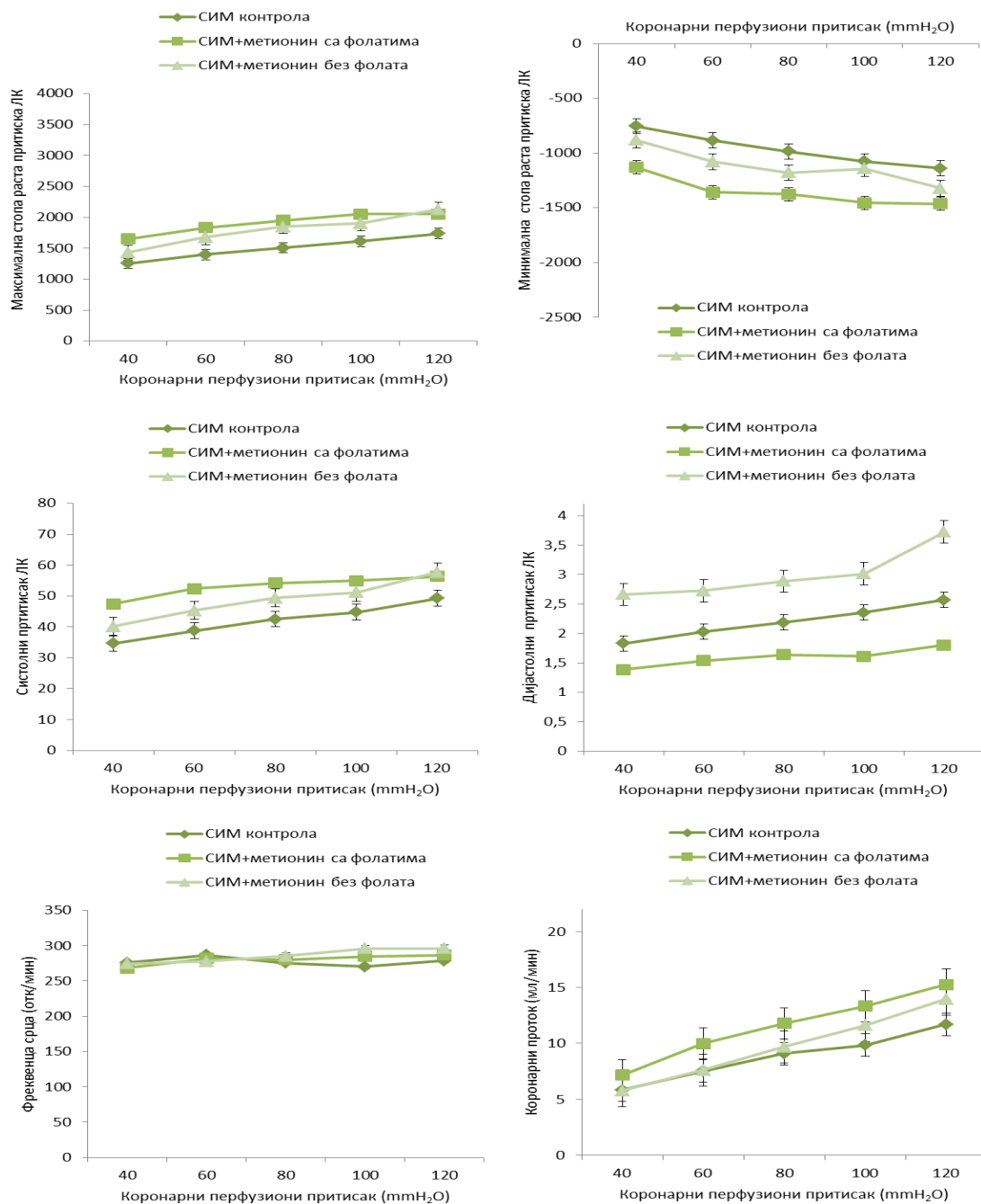
CPP	dp/dt max (mmHg/s)			dp/dt min (mmHg/s)			SLVP (mmHg)		
	AK vs. AMФ	AK vs. АМБФ	АМФ vs. АМБФ	AK vs. АМФ	AK vs. АМБФ	АМФ vs. АМБФ	AK vs. АМФ	AK vs. АМБФ	АМФ vs. АМБФ
<b>40</b>	НС	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
<b>60</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
<b>80</b>	НС	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
<b>100</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
<b>120</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
CPP	DLVP (mmHg)			HR (bpm)			CF (ml/min)		
	AK vs. АМФ	AK vs. АМБФ	АМФ vs. АМБФ	AK vs. АМФ	AK vs. АМБФ	АМФ vs. АМБФ	AK vs. АМФ	AK vs. АМБФ	АМФ vs. АМБФ
<b>40</b>	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05	НС	НС	НС	p<0,05	p<0,05
<b>60</b>	p<0,05	НС	p<0,05	НС	НС	НС	НС	p<0,05	p<0,05
<b>80</b>	p<0,05	НС	p<0,05	НС	НС	НС	НС	p<0,05	p<0,05
<b>100</b>	p<0,05	НС	p<0,05	НС	НС	НС	p<0,05	НС	p<0,05
<b>120</b>	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05

#### 4.4.3. Утицај дијеталног режима на кардиодинамске параметре у присуству симвастатина

Кардиодинамски параметри и коронарни проток су у виду средњих вредности приказани графички а статистички значајне разлике приказане су табеларно (Графикон бр. 25, Табела бр. 12).

Поређењем вредности  $dp/dt \max$  између контролне, Мет са фолатима и Мет без фолата групе у комбинацији са применом симвастатина, статистички је показано да је овај параметар био значајно снижен у контролној групи у односу на групе са умереном и тешком хиперхомоцистеинемијом. Разлика у овом параметру између хиперхомоцистеинемичних група доказана је само на најнижем притиску (СПР-40  $\text{cmH}_2\text{O}$ ).  $Dp/dt \min$  је статистички значајно промењен у свим групама, са доминантно повишеним вредностима у групи умерене хиперхомоцистеинемije. Поређењем група,  $SLVP$  је значајно промењен у свим групама, са доминантно највишим вредностима систолног притиска у групи умерене хиперхомоцистеинемije, и са изузетком на притиску од 120  $\text{cmH}_2\text{O}$ .  $DLVP$  се статистички значајно разликовао у свим групама, са највишим вредностима у у групи тешке хиперхомоцистеинемije (СИМ-Мет без фолата), док је  $HR$  значајно промењен између група само на притиску од 100  $\text{cmH}_2\text{O}$ . Коронарни проток био значајно повишен при умереној хиперхомоцистеинемiji доминантно у односу на групу са тешком хиперхомоцистеинемојом и контролном групом, и у групи тешке хиперхомоцистеинемije у односу на контролну групу на притисцима од 100 и 120  $\text{cmH}_2\text{O}$  након хроничног третмана симвастатином.

Графикон бр. 25 – Упоредни приказ вредности свих кардиодинамских параметара изолованог срца пацова при примени различитих дијета у присуству симвавастатина



Табела 12 – Поређење вредности свих кардиодинамских параметара изолованог срца пацова између група, односно при примени различитих дијета (СИМ-контрола (СК), СИМ+хиперметиониска дијета са присуством фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> (СМФ) и СИМ+хиперметиониска дијета без фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> (СМБФ)), у току фармаколошког третмана симвастатином, на свим перфузионим притисцима (40-120 cmH<sub>2</sub>O). Статистичка значајаност између група за сваки параметар утврђена је непараметријским аналогом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), *Kruskal-Wallis H* тестом (p<0,05).

CPP	dp/dt max (mmHg/s)			dp/dt min (mmHg/s)			SLVP (mmHg)		
	CK vs. CMΦ	CK vs. СМБФ	СМФ vs. СМБФ	CK vs. CMΦ	CK vs. СМБФ	СМФ vs. СМБФ	CK vs. CMΦ	CK vs. СМБФ	СМФ vs. СМБФ
40	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
60	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
80	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
100	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
120	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	НС
CPP	DLVP (mmHg)			HR (bpm)			CF (ml/min)		
	CK vs. CMΦ	CK vs. СМБФ	СМФ vs. СМБФ	CK vs. CMΦ	CK vs. СМБФ	СМФ vs. СМБФ	CK vs. CMΦ	CK vs. СМБФ	СМФ vs. СМБФ
40	p<0,05	p<0,05	p<0,05	НС	НС	НС	p<0,05	НС	p<0,05
60	p<0,05	p<0,05	p<0,05	НС	НС	НС	p<0,05	НС	p<0,05
80	p<0,05	p<0,05	p<0,05	НС	НС	НС	p<0,05	НС	p<0,05
100	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
120	p<0,05	p<0,05	p<0,05	НС	НС	НС	p<0,05	p<0,05	p<0,05

#### 4.5. ПРОМЕНЕ КАРДИДИНАМСКИХ ПАРАМЕТАРА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА У ОДНОСУ НА ФАРМАКОЛОШКИ ТРЕТМАН У УСЛОВИМА НОРМАЛНИХ, УМЕРЕНО ПОВИШЕНИХ И ЕКСТРЕМНО ПОВИШЕНИХ КОНЦЕНТРАЦИЈА ХОМОЦИСТЕИНА У КРВИ

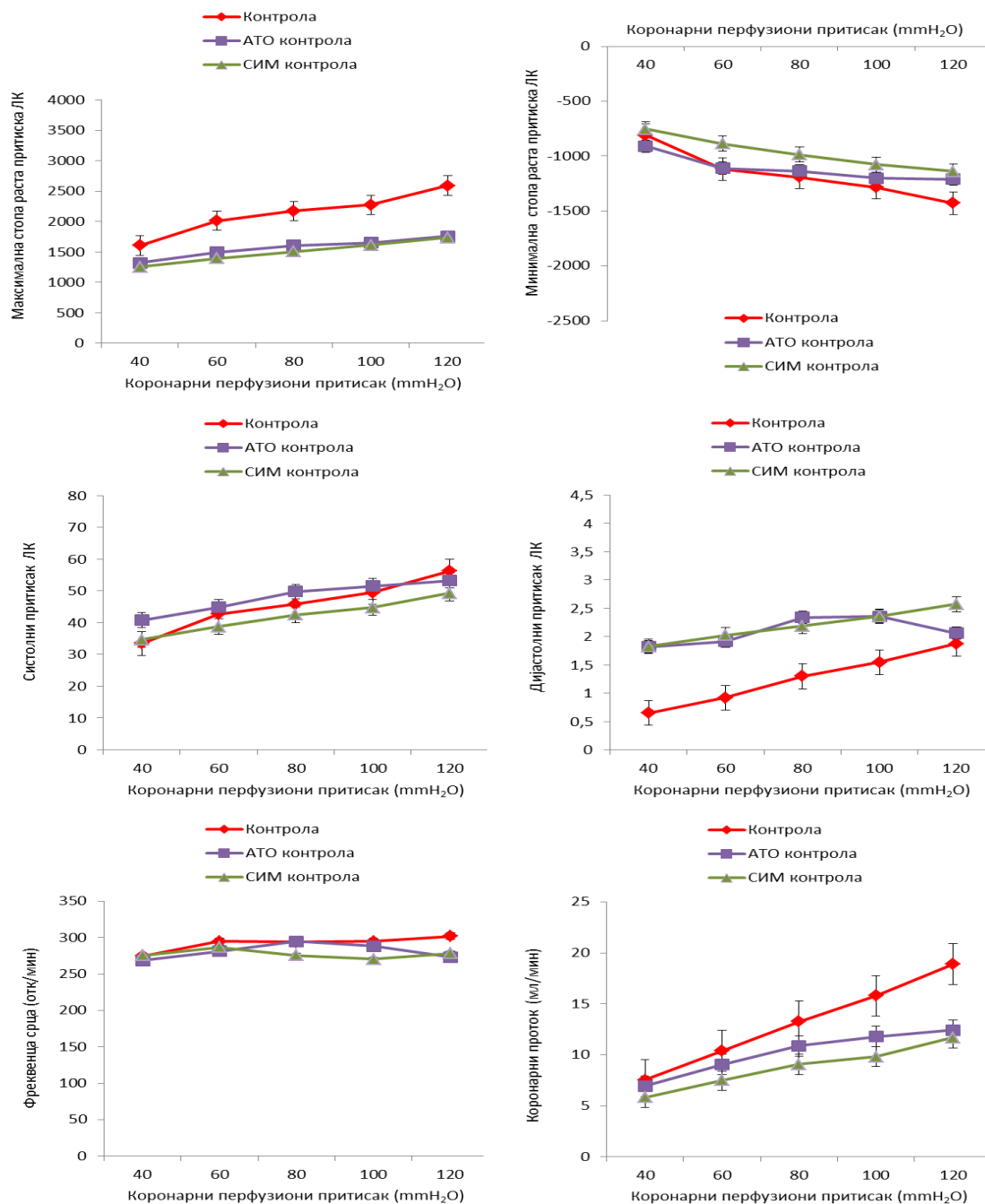
##### 4.5.1. Утицај аторвастатина и симвастатина на кардиодинамске параметре у условима нормалних вредности хомоцистеина у крви ( $tHcy < 15 \mu M/L$ )

Кардиодинамски параметри и коронарни проток су у виду средњих вредности приказани графички а статистички значајне разлике приказане су табеларно (Графикон бр. 26, Табела бр. 13).

У условима нормалних вредности хомоцистеина у крви, пратили смо промене свих кардиодинамских параметара под утицајем аторвастатина и симвастатина.  $Dp/dt_{max}$  је статистичко значајно снижен подједнако подутицајем аторвастатина и симвастатина у односу на групу без фармаколошког третмана, док је  $dp/dt_{min}$  статистички значајно констатно скоро при свим притисцима снижен само под утицајем симвастатина (60-120  $cmH_2O$ ), и под утицајем аторвастатина на највишем притиску (120  $cmH_2O$ ).  $SLVP$  је значајно снижен под утицајем симвастатина у односу на аторвастатин, док је  $DLVP$  значајно повишен под утицајем оба статина у односу на контролну групу, осим при највишем перфузионом притиску.  $HR$  је статистички значајно снижен у СИМ групи на притисцима од 80 и 100  $cmH_2O$ , док је коронарни проток био значајно промењен у свим групама, односно оба статина довела су значајног смањења коронарног протока скоро при свим притисцима, са доминантним смањењем у СИМ групи у односу на АТО групу.



Графикон бр. 26 – Упоредни приказ вредности свих кардиодинамских параметара изолованог срца пацова у контролним групама при хроничној примени различитих статина



Табела 13 – Поређење вредности свих кардиодинамских параметара изолованог срца пацова између група, односно при примени различитих статина (контрола (К), АТО-контрола (АК) и СИМ-контрола (СК)), у току истог дијеталног третмана (стандардна храна), на свим перфузионим притисцима (40-120 cmH<sub>2</sub>O). Статистичка значајност између група за сваки параметар утврђена је непараметријским аналогом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), *Kruskal-Wallis H* тестом ( $p < 0,05$ ).

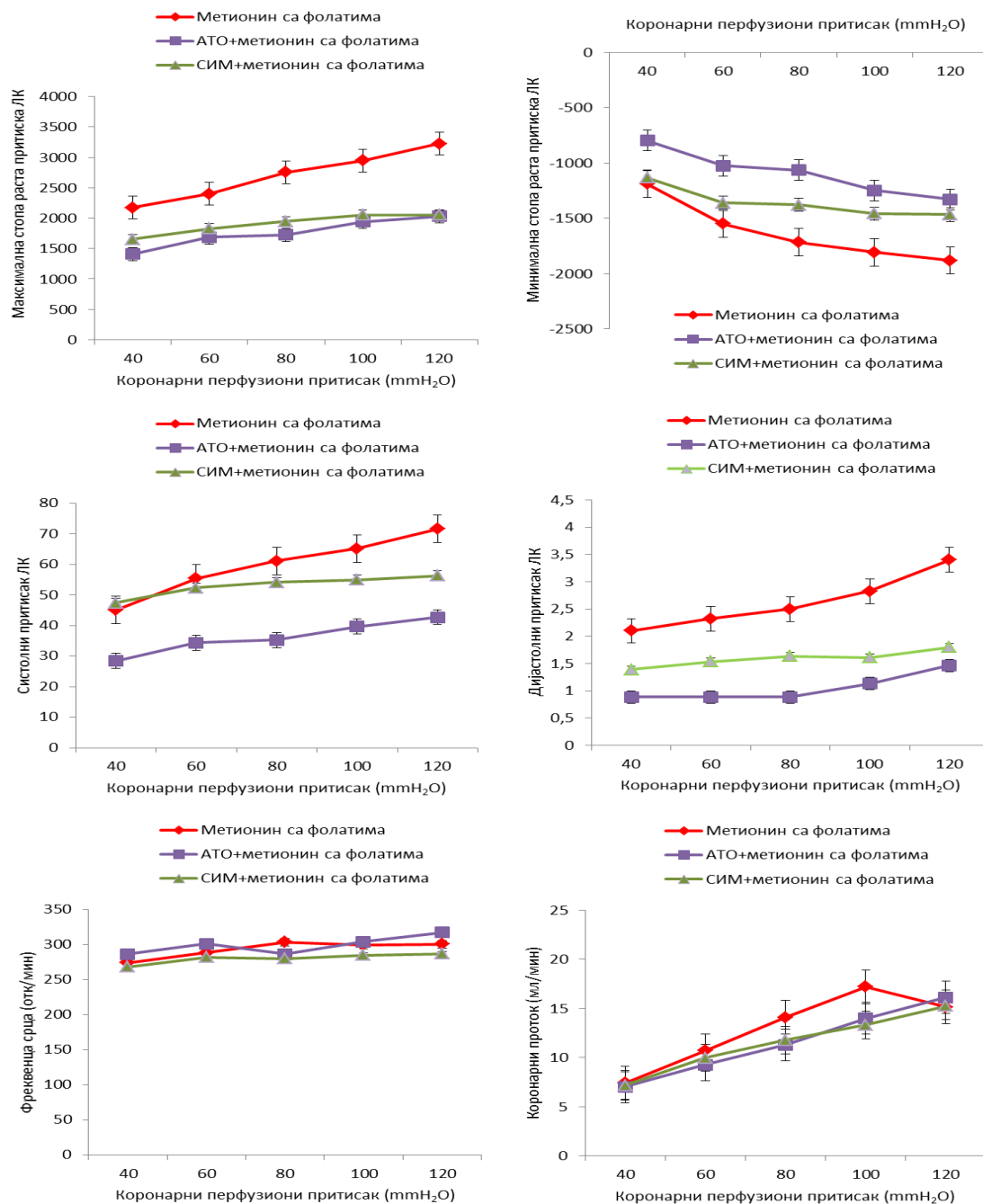
CPP	dp/dt max (mmHg/s)			dp/dt min (mmHg/s)			SLVP (mmHg)		
	<i>K vs. AK</i>	<i>K vs. CK</i>	<i>AK vs. CK</i>	<i>K vs. AK</i>	<i>K vs. CK</i>	<i>AK vs. CK</i>	<i>K vs. AK</i>	<i>K vs. CK</i>	<i>AK vs. CK</i>
<b>40</b>	p<0,05	p<0,05	HC	HC	HC	HC	HC	HC	p<0,05
<b>60</b>	p<0,05	p<0,05	HC	HC	p<0,05	p<0,05	HC	HC	p<0,05
<b>80</b>	p<0,05	p<0,05	HC	HC	p<0,05	p<0,05	HC	HC	p<0,05
<b>100</b>	p<0,05	p<0,05	HC	HC	p<0,05	p<0,05	HC	HC	p<0,05
<b>120</b>	p<0,05	p<0,05	HC	HC	p<0,05	HC	HC	HC	p<0,05
CPP	DLVP (mmHg)			HR (bpm)			CF (ml/min)		
	<i>K vs. AK</i>	<i>K vs. CK</i>	<i>AK vs. CK</i>	<i>K vs. AK</i>	<i>K vs. CK</i>	<i>AK vs. CK</i>	<i>K vs. AK</i>	<i>K vs. CK</i>	<i>AK vs. CK</i>
<b>40</b>	HC	p<0,05	HC	HC	HC	HC	HC	p<0,05	p<0,05
<b>60</b>	p<0,05	p<0,05	HC	HC	HC	HC	p<0,05	p<0,05	p<0,05
<b>80</b>	p<0,05	p<0,05	HC	HC	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
<b>100</b>	p<0,05	p<0,05	HC	HC	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
<b>120</b>	p<0,05	p<0,05	HC	HC	HC	HC	p<0,05	p<0,05	p<0,05

#### 4.5.2. Утицај аторвастатина и симвастатина на кардиодинамске параметре у условима умерене хиперхомоцистеинемije (tHcy 15-30 $\mu\text{M/L}$ )

Кардиодинамски параметри и коронарни проток су у виду средњих вредности приказани графички а статистички значајне разлике приказане су табеларно (Графикон бр. 27, Табела бр. 14).

У условима повишених вредности хомоцистеина у крви у опсегу од 15-30  $\mu\text{M/L}$ , пратили смо промене свих кардиодинамских параметара под утицајем аторвастатина и симвастатина.  $Dp/dt \max$  је статистичко значајно снижен подјенако подутицајем аторвастатина и симвастатина у односу на групу без фармаколошког третмана, са доминантнијим утицајем аторвацтатина.  $Dp/dt \min$ ,  $SLVP$  и  $DLVP$  су статистички значајно константно скоро при свим притисцима снижени (осим на притиску од 40  $\text{cmH}_2\text{O}$ ) под утицајем оба статина, али опет са снажнијим ефектима аторвастатина на ове кардиодинамске параметре у условима умерене хиперхомоцистеинемije.  $HR$  је статистички значајно снижен у СИМ групи на свим притисцима осим на притиску од 80  $\text{cmH}_2\text{O}$  у односу на АТО групу, док је коронарни проток био значајно промењен у групама са фармаколошки третманом у односу на контролну на притисцима од 60-100  $\text{cmH}_2\text{O}$  у односу на контролну групу, са значајанијим смањењем коронарног протока у СИМ групи.

Графикон бр. 27 – Упоредни приказ вредности свих кардиодинамских параметара изолованог срца пацова у групама умерене хиперхомоцистеиније (Мет са фолатима) при хроничној примени различитих статина



Табела 13 – Поређење вредности свих кардиодинамских параметара изолованог срца пацова између група, односно при примени различитих статина (Мет са фолатим (МФ), АТО-Мет са фолатима (АМФ) и СИМ-Мет са фолатима (СМФ)), у току истог дијеталног третмана (хиперметиониска дијета са нормалним садржајем фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub>), на свим перфузионим притисцима (40-120 cmH<sub>2</sub>O). Статистичка значајаност између група за сваки параметар утврђена је непараметријским аналогом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), *Kruskal-Wallis H* тестом (p<0,05).

CPP	dp/dt max (mmHg/s)			dp/dt min (mmHg/s)			SLVP (mmHg)		
	MФ vs. АМФ	MФ vs. СМФ	АМФ vs. СМФ	MФ vs. АМФ	MФ vs. СМФ	АМФ vs. СМФ	MФ vs. АМФ	MФ vs. СМФ	АМФ vs. СМФ
<b>40</b>	p<0,05	p<0,05	HC	p<0,05	HC	p<0,05	p<0,05	HC	p<0,05
<b>60</b>	p<0,05	p<0,05	HC	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
<b>80</b>	p<0,05	p<0,05	HC	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
<b>100</b>	p<0,05	p<0,05	HC	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
<b>120</b>	p<0,05	p<0,05	HC	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
CPP	DLVP (mmHg)			HR (bpm)			CF (ml/min)		
	MФ vs. АМФ	MФ vs. СМФ	АМФ vs. СМФ	MФ vs. АМФ	MФ vs. СМФ	АМФ vs. СМФ	MФ vs. АМФ	MФ vs. СМФ	АМФ vs. СМФ
<b>40</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	HC	HC	p<0,05	HC	HC	HC
<b>60</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	HC	HC	p<0,05	p<0,05	p<0,05	HC
<b>80</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	HC	HC	HC	p<0,05	p<0,05	HC
<b>100</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	HC	HC	p<0,05	p<0,05	p<0,05	HC
<b>120</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	HC	HC	p<0,05	HC	HC	HC

#### 4.5.3. Утицај аторвастатина и симвастатина на кардиодинамске параметре у условима тешке форме хиперхомоцистеинемije (tHcy >31 $\mu\text{M/L}$ )

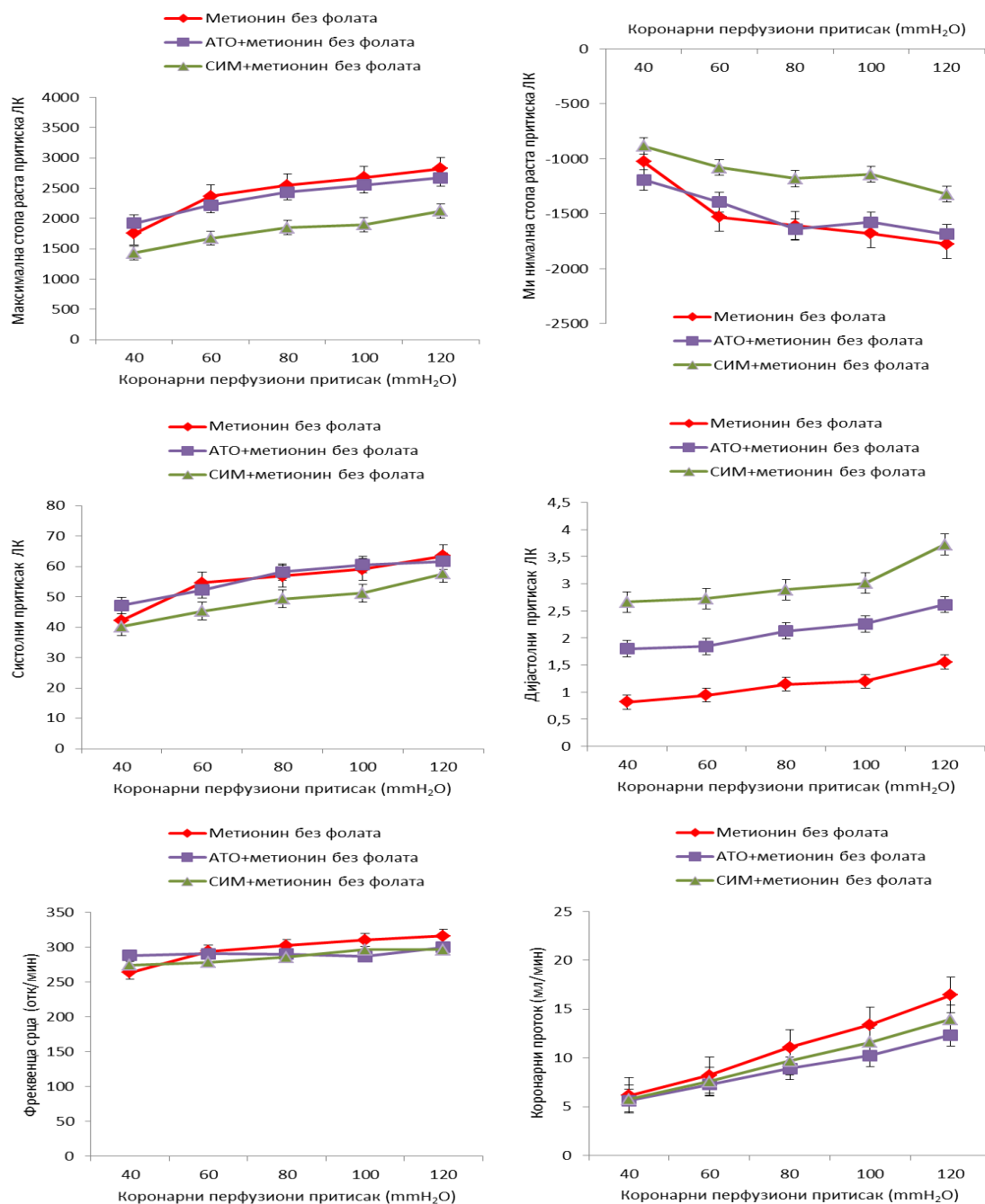
Кардиодинамски параметри и коронарни проток су у виду средњих вредности приказани графички а статистички значајне разлике приказане су табеларно (Графикон бр. 28, Табела бр. 14).

У условима екстремно повишених вредности хомоцистеина у крви већим од 31  $\mu\text{M/L}$ , пратили смо промене свих кардиодинамских параметара под утицајем аторвастатина и симвастатина.

$Dp/dt \max$  и  $dp/dt \min$  су статистичко значајно снижени под утицајем симвастатина у односу на групу без фармаколошког третмана и групу са аторвастатином.  $SLVP$  је статистички значајно је снижен у СИМ групи скоро на свим притисцима осим на притиску од 40  $\text{cmH}_2\text{O}$  у односу на групу без фармаколошког третмана и АТО групу, док је  $DLVP$  статистички значајно повишен под утицајем оба статина, али са снажнијим ефектима симвастатина на овај параметар у условима тешке хиперхомоцистеинемije.

$HR$  је статистички значајно снижен на вишим притисцима под утицајем оба статина (80-120  $\text{cmH}_2\text{O}$ ) у односу на групу без фармаколошког третмана са већим снижењима у АТО групи, а слична динамика промене се примећује и праћењем коронарног протока, са тим што је присутна и статистички значајна међусобна разлика у АТО и СИМ групи на вишим притисцима, од 80-120  $\text{cmH}_2\text{O}$  у условима тешке хиперхомоцистеинемije.

Графикон бр. 28 – Упоредни приказ вредности свих кардиодинамских параметара изолованог срца пацова у групама тешке хиперхомоцистеинемije (Мет без фолата) при хроничној примени различитих статина



Табела 14 – Поређење вредности свих кардиодинамских параметара изолованог срца пацова између група, односно при примени различитих статина (Мет без фолата (МБФ), АТО-Мет без фолата (АМБФ) и СИМ-Мет без фолата (СМБФ)), у току истог дијеталног третмана (хиперметиониска дијета са ниским садржајем фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub>), на свим перфузионим притисцима (40-120 cmH<sub>2</sub>O). Статистичка значајност између група за сваки параметар утврђена је непараметријским аналогом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), *Kruskal-Wallis H* тестом (p<0,05).

CPP	dp/dt max (mmHg/s)			dp/dt min (mmHg/s)			SLVP (mmHg)		
	МБФ vs. АМБФ	МБФ vs. СМБФ	АМБФ vs. СМБФ	МБФ vs. АМБФ	МБФ vs. СМБФ	АМБФ vs. СМБФ	МБФ vs. АМБФ	МБФ vs. СМБФ	АМБФ vs. СМБФ
40	НС	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05	НС	НС	НС
60	НС	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05
80	НС	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05
100	НС	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05
120	НС	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05
CPP	DLVP (mmHg)			HR (bpm)			CF (ml/min)		
	МБФ vs. АМБФ	МБФ vs. СМБФ	АМБФ vs. СМБФ	МБФ vs. АМБФ	МБФ vs. СМБФ	АМБФ vs. СМБФ	МБФ vs. АМБФ	МБФ vs. СМБФ	АМБФ vs. СМБФ
40	p<0,05	p<0,05	p<0,05	НС	НС	НС	НС	НС	НС
60	p<0,05	p<0,05	p<0,05	НС	НС	НС	НС	НС	НС
80	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05	p<0,05
100	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05	p<0,05
120	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05	p<0,05



#### **4.6. УТИЦАЈ РЕЖИМА ИСХРАНЕ И ИНХИБИТОРА ХИДРОКСИМЕТИЛ-ГЛУТАРИЛ КО-А РЕДУКТАЗЕ (АТОРВАСТАТИН И СИМВАСТАТИН) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА У ЕФЛУЕНТУ**

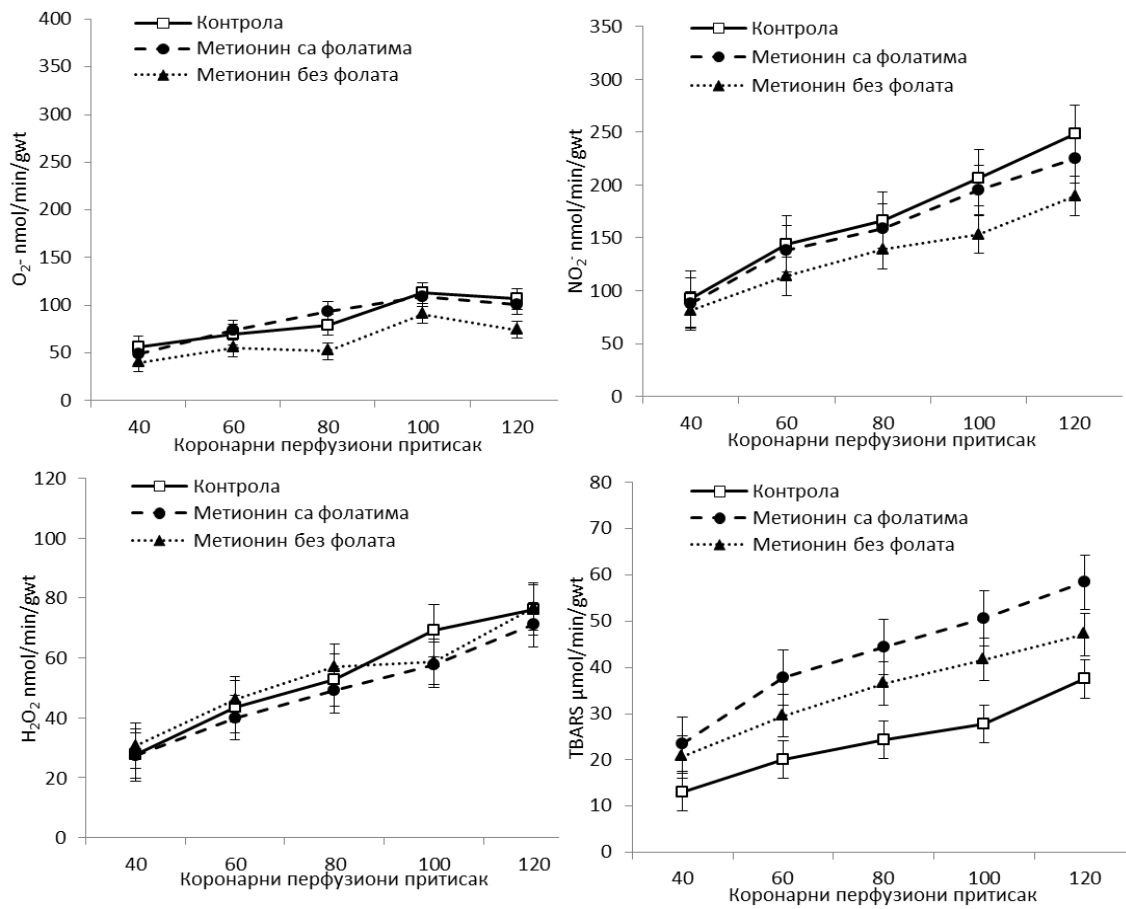
##### **4.6.1. ПРОМЕНЕ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА У ОДНОСУ НА ДИЈЕТАЛНИ РЕЖИМ**

###### **4.6.1.1. Утицај дијеталног режима на параметре оксидационог стреса у ефлуенту**

Промене параметера оксидационог стреса ( $O_2^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $H_2O_2$ , TBARS) поређењем група су приказане графички, а статистички значајне разлике испитиваних параметара табеларно (Графикон бр. 29, Табела 15).

Статистички значајно ниже вредности  $O_2^-$  примећене су у групи са тешком хиперхомоцистеинемојом (Мет без фолата) у поређењу са осталим групама, док су вредности значајно више у групи са умереном хиперхомоцистеинемом (Мет са фолатима) у поређењу са контролном групом на притиску од 60 cmH<sub>2</sub>O, и повишене на сви притисцима у односу на другу хиперхомоцистеинемичну групу. Слична динамика пратила је параметар  $NO_2^-$ , са разликом у највишим притисцима, при којим је примећена разлика поређењем све три групе, са доминантно највишим вредностима овог параметра у контролној групи.  $H_2O_2$  је статистички значајно промењен само при притиску од 100 cmH<sub>2</sub>O, односно снижен у хиперхомоцистеинемичној у односу на контролну групу са нормалним вредностима хомоцистеина. TBARS је статистички значајно промењен поређењем група, са доминантним повећањем овог маркера у групи са умереном хиперхомоцистеинемојом (Мет са фолатима), док су најниже вредности TBARS-а примећене у контролној групи.

Графикон бр. 29. Упоредни приказ параметара оксидационог стреса ( $O_2^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $H_2O_2$ , TBARS) у групама без фармаколошког третмана у ефлуенту на различитим притисцима (40-120  $cmH_2O$ ) током перфузије изолованог срца пацова



Табела 15 - Поређење вредности свих оксидационих параметара мерени у ефлуенту након перфузије изолованог срца пацова између група, односно при примени различитих дијеталних режима (контрола (К), хиперметиониска дијета са присуством фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> (МФ) и хиперметиониска дијета без фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> (МБФ)), без фармаколошког третмана на свим перфузионим притисцима (40-120 cmH<sub>2</sub>O). Статистичка значајаност између група за сваки параметар утврђена је непараметријским аналогом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), *Kruskal-Wallis H* тестом (p<0,05).

CPP	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/min/gwt)			NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/min/gwt)		
	K vs. МФ	K vs. МБФ	МФ vs. МБФ	K vs. МФ	K vs. МБФ	МФ vs. МБФ
40	НС	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05
60	НС	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05
80	p<0,05	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05
100	НС	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05
120	НС	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
CPP	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol/min/gwt)			TBARS (μmol/min/gwt)		
	K vs. МФ	K vs. МБФ	МФ vs. МБФ	K vs. МФ	K vs. МБФ	МФ vs. МБФ
40	НС	НС	НС	p<0,05	p<0,05	p<0,05
60	НС	НС	НС	p<0,05	p<0,05	p<0,05
80	НС	НС	НС	p<0,05	p<0,05	p<0,05
100	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05	p<0,05
120	НС	НС	НС	p<0,05	p<0,05	p<0,05

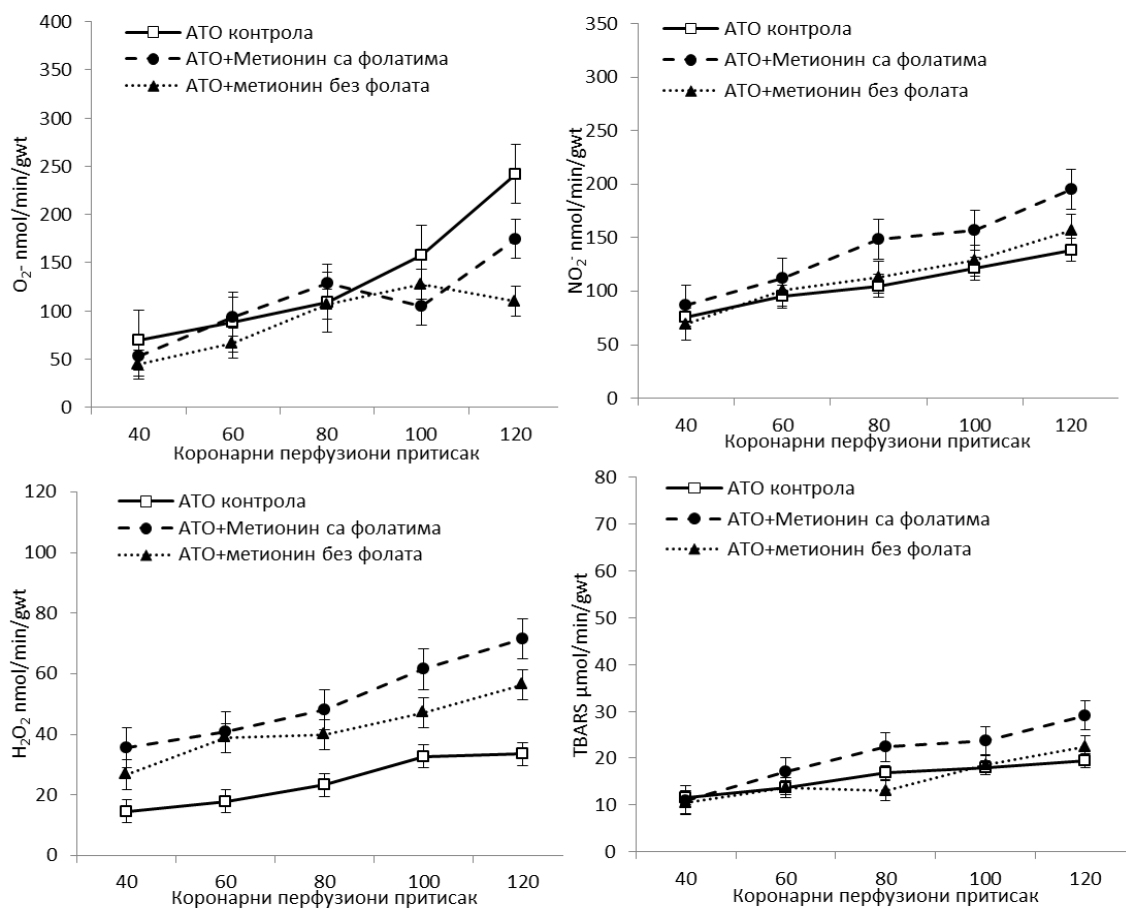
#### 4.6.1.2. Утицај дијеталног режима на параметре оксидационог стреса у ефлуенту у присуству аторвастатина

Промене параметера оксидационог стреса (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TBARS) поређењем група су приказане графички, а статистички значајне разлике испитиваних параметара табеларно (Графикон бр. 30, Табела 16).

Статистички значајно ниже вредности O<sub>2</sub><sup>-</sup> примећене су у групама са умереном и тешком хиперхомоцистеинемојом (Мет са фолатима, Мет без фолата) у поређењу са контролном групом на притиску од 100-120 cmH<sub>2</sub>O. Параметар NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, је статистички значајно повишен у групи са умереном хиперхомоцистеинемом у присуству аторвастатина у односу на остале групе на свим притисцима. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> је статистички значајно промењен скоро при свим притисцима у свим групама, са доминантно

високим вредностима овог параметра у Мет са фолатима и Мет без фолата групама у поређењу са контролном, са такође присутним међусобним разликама и између ове две наведене групе (осим на притиску од 60 cmH<sub>2</sub>O). TBARS је статистички значајно снижен у групи са умереном хиперхомоцистеинемојом (Мет са фолатима), у поређењу са осталим групама у присуству аторвастатина.

Графикон бр. 30. Упоредни приказ параметара оксидационог стреса (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TBARS) у ефлуенту на различитим притисцима (40-120 cmH<sub>2</sub>O) током перфузије изолованог срца пацова у групама са третманом аторвастатином



Табела 16 - Поређење вредности свих оксидационих параметара мерени у ефлуенту након перфузије изолованог срца пацова између група, односно при примени различитих дијеталних режима (АТО-контрола (АК), АТО+хиперметиониска дијета са присуством фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> (АМФ) и АТО+хиперметиониска дијета без фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> (АМБФ)), и фармаколошког третмана аторвастатином на свим перфузионим притисцима (40-120 cmH<sub>2</sub>O). Статистичка значајност између група за сваки параметар утврђена је непараметријским аналогом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), *Kruskal-Wallis H* тестом (p<0,05).

CPP	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/min/gwt)			NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/min/gwt)		
	AK vs. AMФ	AK vs. A АМБФ	АМФ vs. АМБФ	AK vs. AMФ	AK vs. A АМБФ	АМФ vs. АМБФ
40	НС	НС	НС	p<0,05	НС	p<0,05
60	НС	НС	НС	p<0,05	НС	p<0,05
80	НС	НС	НС	p<0,05	НС	p<0,05
100	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05
120	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05
CPP	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol/min/gwt)			TBARS (μmol/min/gwt)		
	AK vs. AMФ	AK vs. A АМБФ	АМФ vs. АМБФ	AK vs. AMФ	AK vs. A АМБФ	АМФ vs. АМБФ
40	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05
60	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	НС	p<0,05
80	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05
100	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05
120	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05

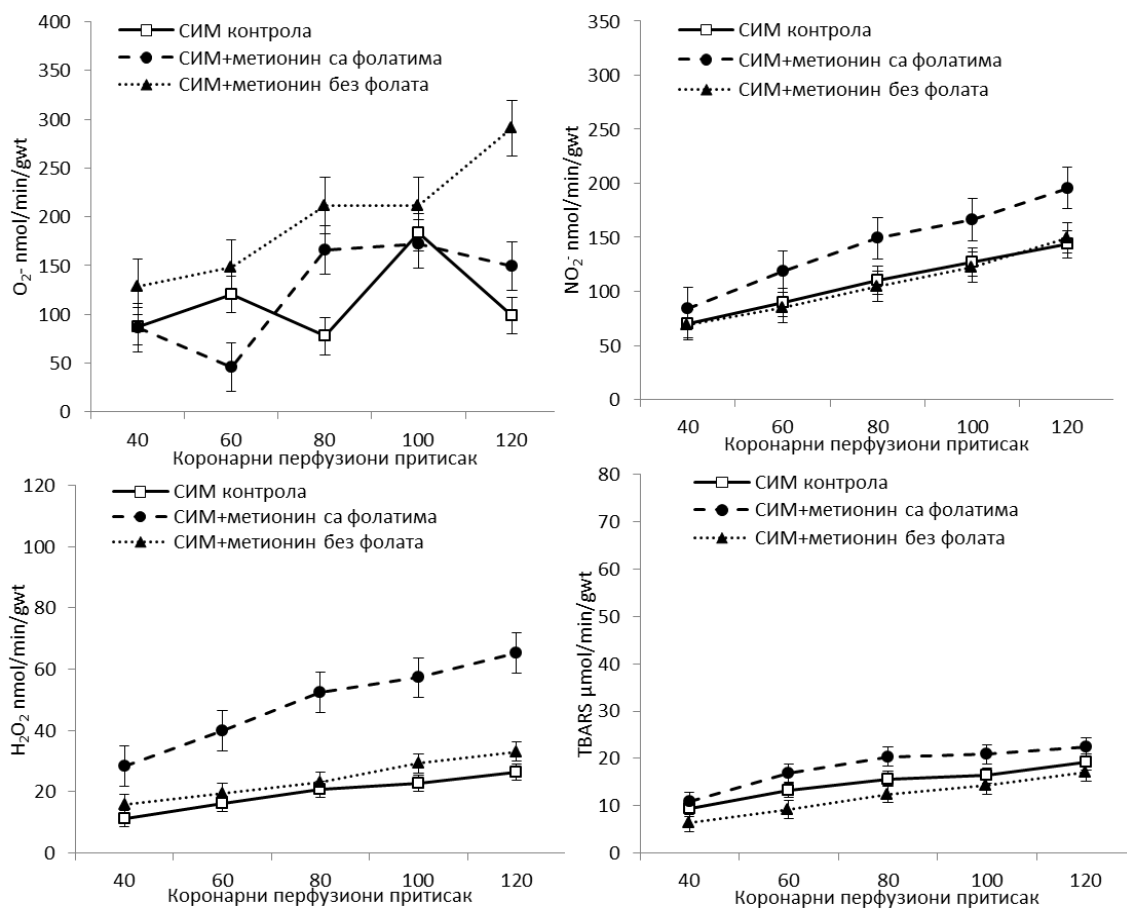
#### 4.6.1.3. Утицај дијеталног режима на параметре оксидационог стреса у ефлуенту у присуству симвастатина

Промене параметера оксидационог стреса (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TBARS) поређењем група су приказане графички, а статистички значајне разлике испитиваних параметара табеларно (Графикон бр. 31, Табела 17).

Статистички значајно веће вредности O<sub>2</sub><sup>-</sup> примећене су у групама са умереном и тешком хиперхомоцистеинемојом (Мет са фолатима, Мет без фолата) у поређењу са контролном групом на вишим притисцима нарочито (100-120 cmH<sub>2</sub>O). Доминантно је повећање овог маркера у групи Мет без фолата. Параметар NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, је статистички значајно повишен у групи са умереном хиперхомоцистеинемом у присуству симвастатина у односу на остале групе на свим притисцима. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> је статистички

значајно промењен скоро при свим притисцима у свим групама, са доминантно високим вредностима овог параметра у Мет са фолатима и Мет без фолата групама у поређењу са контролном, са такође присутним међусобним разликама и између ове две наведене групе (осим на притиску од 80 cmH<sub>2</sub>O). TBARS је статистички значајно промењен су свим групама, а највише вредности су биле присутне у умереној хиперхомоцистеинији у присуству симвастатина.

Графикон бр. 31 Упоредни приказ параметара оксидационог стреса (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TBARS) у ефлуенту на различитим притисцима (40-120 cmH<sub>2</sub>O) током перфузије изолованог срца пацова у групама са третманом симвастатином



Табела 17 - Поређење вредности свих оксидационих параметара мерени у ефлуенту након перфузије изолованог срца пацова између група, односно при примени различитих дијеталних режима (СИМ-контрола (СК), СИМ+хиперметиониска дијета са присуством фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> (СМФ) и СИМ+хиперметиониска дијета без фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> (СМБФ)), и фармаколошког третмана симвастатином на свим перфузионим притисцима (40-120 cmH<sub>2</sub>O). Статистичка значајаност између група за сваки параметар утврђена је непараметријским аналогом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), *Kruskal-Wallis H* тестом (p<0,05).

CPP	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/min/gwt)			NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/min/gwt)		
	CK vs. CMΦ	CK vs.A СМБФ	СМФ vs. СМБФ	CK vs. CMΦ	CK vs.A СМБФ	СМФ vs. СМБФ
<b>40</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	HC	p<0,05
<b>60</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	HC	p<0,05
<b>80</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	HC	p<0,05
<b>100</b>	HC	p<0,05	p<0,05	p<0,05	HC	p<0,05
<b>120</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	HC	p<0,05
CPP	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol/min/gwt)			TBARS (μmol/min/gwt)		
	CK vs. CMΦ	CK vs.A СМБФ	СМФ vs. СМБФ	CK vs. CMΦ	CK vs.A СМБФ	СМФ vs. СМБФ
<b>40</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
<b>60</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
<b>80</b>	p<0,05	HC	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
<b>100</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
<b>120</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05

## **4.6.2. ПРОМЕНЕ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА У ЕФЛУЕНТУ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА У ОДНОСУ НА ФАРМАКОЛОШКИ ТРЕТМАН**

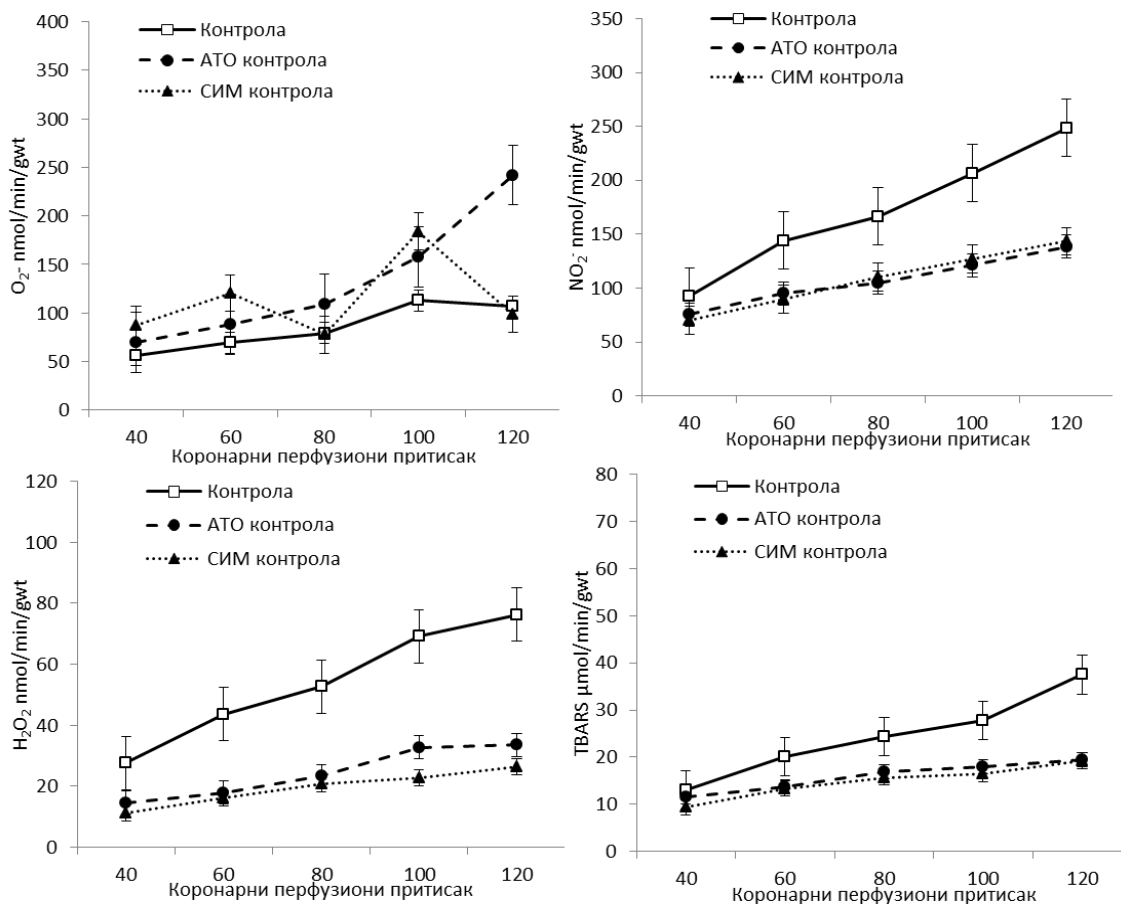
### **4.6.2.1. Утицај аторвастатина и симвастатина на параметре оксидационог стреса у условима нормалних вредности хомоцистеина у крви (<15 $\mu\text{M/L}$ )**

Промене параметера оксидационог стреса ( $\text{O}_2^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , TBARS) поређењем група су приказане графички, а статистички значајне разлике испитиваних параметара табеларно (Графикон бр. 32, Табела 18).

При нижим перфузионим притисцима симвастатин је изазвао повећање вредности  $\text{O}_2^-$  у односу на аторвастатин, док при вишим притисцима настаје обрнута, смањење овог параметра. Параметар  $\text{NO}_2^-$ , је статистички значајно снижен подједнако у АТО и СИМ групама у односу на контролну на свим притисцима. У вези са тим, потпуно иста динамика је у параметрима  $\text{H}_2\text{O}_2$  и TBARS, са значајним повећањем  $\text{H}_2\text{O}_2$  у АТО-контроли у односу на СИМ-контролу на притиску од 100  $\text{cmH}_2\text{O}$ .



Графикон бр. 32 Упоредни приказ параметара оксидационог стреса ( $O_2^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $H_2O_2$ , TBARS) у ефлуенту у контролној групи на различитим притисцима (40-120  $cmH_2O$ ) у односу на фармаколошки третман.



Табела 18. Поређење вредности свих оксидационих параметара мерени у ефлуенту након перфузије изолованог срца пацова између група, односно при истог дијеталног а различитог фармаколошког хроничног третмана (контрола (К), АТО+контрола (АК) и СИМ+контрола (СК)), на свим перфузионим притисцима (40-120 cmH<sub>2</sub>O). Статистичка значајност између група за сваки параметар утврђена је непараметријским аналогом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), *Kruskal-Wallis H* тестом (p<0,05).

CPP	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/min/gwt)			NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/min/gwt)		
	<i>K vs. AT</i>	<i>K vs. CK</i>	<i>AK vs. CK</i>	<i>CK vs. CMΦ</i>	<i>CK vs. A СМБΦ</i>	<i>СМΦ vs. СМБΦ</i>
<b>40</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	НС
<b>60</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	НС
<b>80</b>	НС	НС	НС	p<0,05	p<0,05	НС
<b>100</b>	НС	НС	НС	p<0,05	p<0,05	НС
<b>120</b>	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05	p<0,05	НС
CPP	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol/min/gwt)			TBARS (μmol/min/gwt)		
	<i>CK vs. CMΦ</i>	<i>CK vs. A СМБΦ</i>	<i>СМΦ vs. СМБΦ</i>	<i>CK vs. CMΦ</i>	<i>CK vs. A СМБΦ</i>	<i>СМΦ vs. СМБΦ</i>
<b>40</b>	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05	НС
<b>60</b>	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05	НС
<b>80</b>	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05	НС
<b>100</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	НС
<b>120</b>	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05	НС

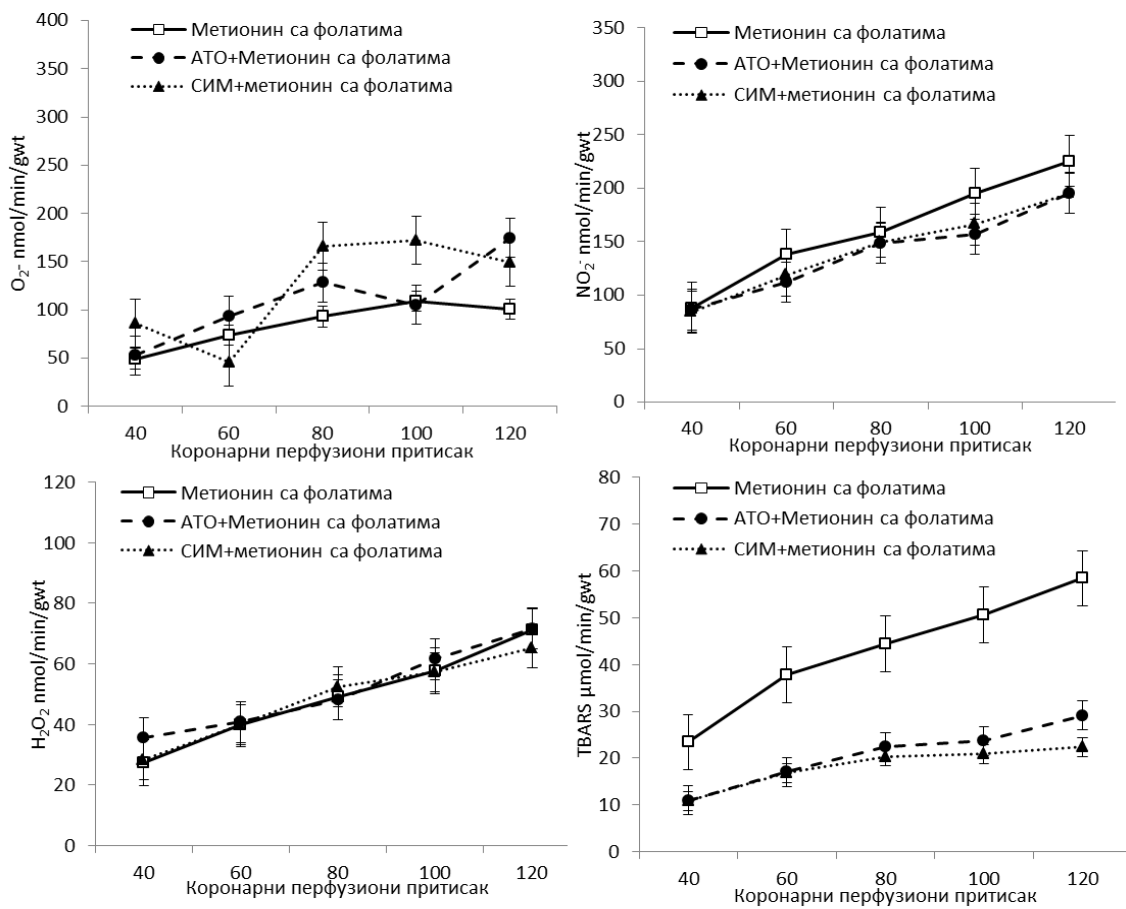
#### 4.6.2.2. Утицај аторвастатина и симвастатина на параметре оксидационог стреса у условима умерено повишених вредности хомоцистеина у крви (15-30 μM/L)

Промене параметера оксидационог стреса (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TBARS) поређењем група су приказане графички, а статистички значајне разлике испитиваних параметара табеларно (Графикон бр. 33, Табела 19).

У односу на контролну групу, значајно су биле повишене вредности O<sub>2</sub><sup>-</sup> при притисцима од 80-120 cmH<sub>2</sub>O у СИМ групи, а при притисцима од 60, 80 и 120 cmH<sub>2</sub>O у АТО групи. Параметар NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, је статистички значајно снижен подједнако у АТО и СИМ групама у односу на контролну на свим притисцима. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> је значајно повишен у АТО групи на најнижем притиску (40 cmH<sub>2</sub>O) и значајно снижен на највишем притиску (120 cmH<sub>2</sub>O) у СИМ групи, у односу на остале групе. TBARS је значајно снижен у групама

са фармаколошким третманом статинима у односу на контролне услове, а значајно је и смањење овог параметра у СИМ-Мет са фолатима групи у односу на АТО групу на притисцима од 100 и 120 cmH<sub>2</sub>O.

Графикон бр. 34. Упоредни приказ параметара оксидационог стреса (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TBARS) у ефлуенту у групама умерене хиперхомоцистеинемije (Мет са фолатима) у односу на фармаколошки третман



Табела 19. Поређење вредности свих оксидационих параметара мерени у ефлуенту након перфузије изолованог срца пацова између група, односно при истом дијеталном а различитом фармаколошком хроничном третману (хиперметиониска дијета са присуством фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> (МФ), АТО+хиперметиониска дијета са присуством фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> (АМФ) и СИМ+хиперметиониска дијета са присуством фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> (СМФ)), на свим перфузионим притисцима (40-120 cmH<sub>2</sub>O). Статистичка значајност између група за сваки параметар утврђена је непараметријским аналогом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), *Kruskal-Wallis H* тестом (p<0,05).

CPP	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/min/gwt)			NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/min/gwt)		
	МФ vs. АМФ	МФ vs. СМФ	АМФ vs. СМФ	МФ vs. АМФ	МФ vs. СМФ	АМФ vs. СМФ
40	НС	НС	НС	p<0,05	p<0,05	НС
60	p<0,05	НС	НС	p<0,05	p<0,05	НС
80	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	НС
100	НС	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	НС
120	p<0,05	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05	НС
CPP	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol/min/gwt)			TBARS (μmol/min/gwt)		
	МФ vs. АМФ	МФ vs. СМФ	АМФ vs. СМФ	МФ vs. АМФ	МФ vs. СМФ	АМФ vs. СМФ
40	p<0,05	НС	p<0,05	p<0,05	p<0,05	НС
60	НС	НС	НС	p<0,05	p<0,05	НС
80	НС	НС	НС	p<0,05	p<0,05	НС
100	НС	НС	НС	p<0,05	p<0,05	p<0,05
120	НС	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05

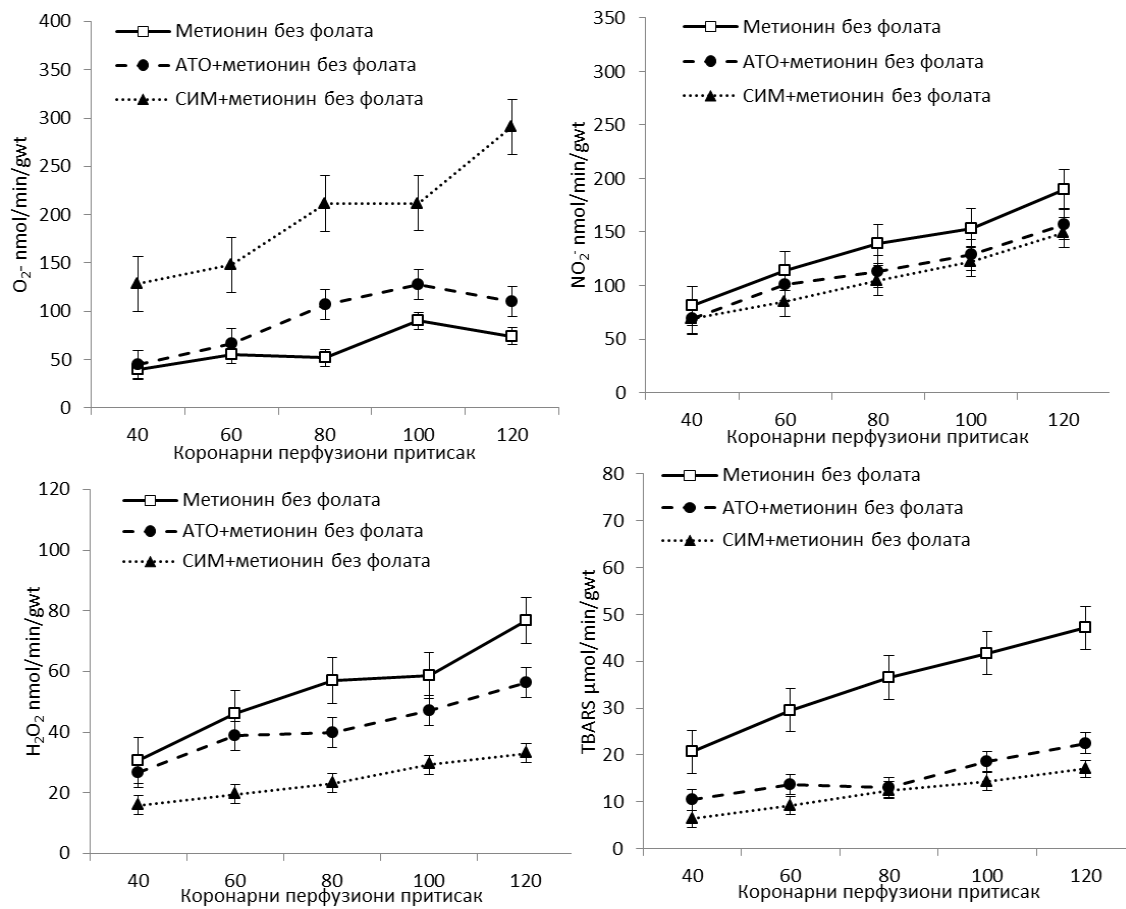
#### 4.6.2.3. Утицај аторвастатина и симвастатина на параметре оксидационог стреса у условима екстремно повишених вредности хомоцистеина у крви (>30 μM/L)

Промене параметера оксидационог стреса (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TBARS) поређењем група су приказане графички, а статистички значајне разлике испитиваних параметара табеларно (Графикон бр. 35, Табела 20).

У односу на контролну групу, значајно су биле повишене вредности O<sub>2</sub><sup>-</sup> при свим притисцима у СИМ групи, а при притисцима од 60- 120 cmH<sub>2</sub>O у АТО групи у односу на контролну групу. Параметри NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и TBARS су статистички значајно

снижени у АТО и СИМ групама у односу на контролну групу, са доминантно сниженим вредностима свих параметара под утицајем симвастатина у условима тешке хиперхомоцистеинемije. Једино, на притиску од 80 cmH<sub>2</sub>O, вредности TBARS –а се нису значајно разликовале међусобно у АТО и СИМ групама.

Графикон бр. 35 Упоредни приказ параметара оксидационог стреса (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TBARS) у ефлуенту у групама тешке хиперхомоцистеинемije (Мет без фолата) у односу на фармаколошки третман



Табела 20. Поређење вредности свих оксидационих параметара мерени у ефлуенту након перфузије изолованог срца пацова између група, односно при истом дијеталном а различитом фармаколошком хроничном третману (хиперметиониска дијета без присуства фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> (МБФ), АТО+хиперметиониска дијета без присуства фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> (АМБФ) и СИМ+хиперметиониска дијета без присуства фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> (СМБФ)), на свим перфузионим притисцима (40-120 cmH<sub>2</sub>O). Статистичка значајност између група за сваки параметар утврђена је непараметријским аналогом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), *Kruskal-Wallis H* тестом (p<0,05).

CPP	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/min/gwt)			NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/min/gwt)		
	МБФ vs. АМБФ	МБФ vs. СМБФ	АМБФ vs. СМБФ	МБФ vs. АМБФ	МБФ vs. СМБФ	АМБФ vs. СМБФ
<b>40</b>	НС	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
<b>60</b>	НС	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
<b>80</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
<b>100</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
<b>120</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
CPP	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol/min/gwt)			TBARS (μmol/min/gwt)		
	МБФ vs. АМБФ	МБФ vs. СМБФ	АМБФ vs. СМБФ	МБФ vs. АМБФ	МБФ vs. СМБФ	АМБФ vs. СМБФ
<b>40</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
<b>60</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
<b>80</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	НС
<b>100</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
<b>120</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05

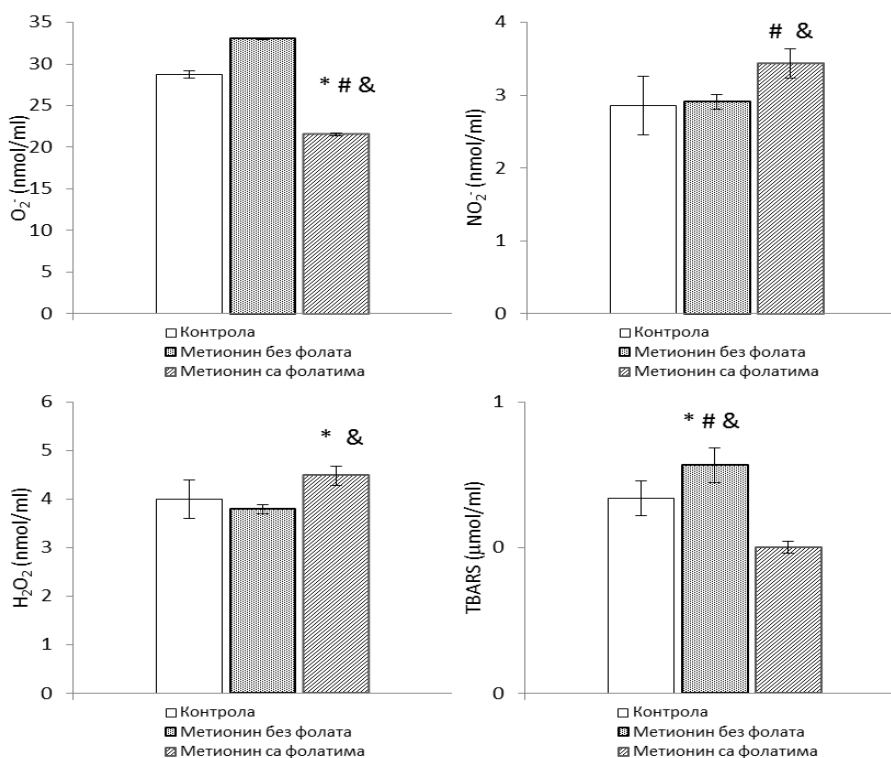
#### 4.7. УТИЦАЈ РЕЖИМА ИСХРАНЕ И ИНХИБИТОРА ХИДРОКСИМЕТИЛ-ГЛУТАРИЛ КО-А РЕДУКТАЗЕ (АТОРВАСТАТИН И СИМВАСТАТИН) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА (ПЛАЗМА)

##### 4.7.1. ПРОМЕНЕ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА У КРВИ У ОДНОСУ НА ДИЈЕТАЛНИ РЕЖИМ

###### 4.7.1.1. Утицај дијеталног режима на параметре оксидационог стреса

На графикону бр. 36 приказане су средње вредности маркера оксидационог стреса у плазми у односу на групу и статистичке значајности. Поређењем група које нису биле на фармаколошком третману, примећено је да се нивои  $O_2^-$  и TBARS-а значајно разликовали у свим групама, са доминантно повишеним вредностима овог маркера у тешкој хиперхомоцистеинемiji. Вредности  $NO_2^-$  и  $H_2O_2$  су биле статистички значајно повишене у умереној хиперхомоцистеинемiji.

Графикон бр. 36 Упоредни приказ параметара оксидационог стреса ( $O_2^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $H_2O_2$ , TBARS) у плазми у контролним групама у односу на дијетални режим. Статистичка значајност између група за сваки параметар утврђена је непараметријским аналогом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), *Kruskal-Wallis H* тестом и сматрана је значајном уколико је  $p < 0,05$  (\* $p < 0,05 = K$  vs. МБФ; # $p < 0,05 = K$  vs. МФ; & $p < 0,05 = МБФ$  vs. МФ).

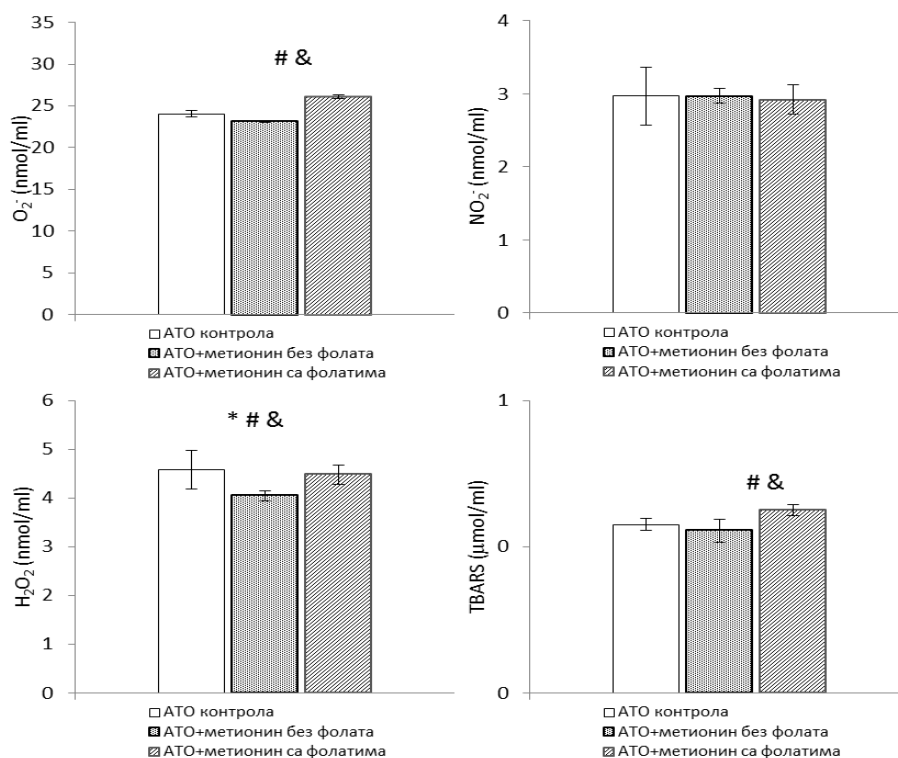


#### 4.7.1.2. Утицај дијеталног режима на параметре оксидационог стреса у присуству аторвастатина

На графикону бр. 37 приказане су средње вредности маркера оксидационог стреса у плазми у односу на групу и статистичке значајности. Поређењем група које су биле на фармаколошком третману аторвастатином, примећено је да су нивои  $O_2^-$  и ТВАРС-а значајно повишени у групи са умереном хиперхомоцистеинемије под утицајем аторвастатина у односу на остале групе.

Вредности  $NO_2^-$  нису биле статистички значајно промењени, док су нивои  $H_2O_2$  статистички значајно снижени у условима умерене и тешке хиперхомоцистеинемије под утицајем аторвастатина.

Графикон бр. 37 Упоредни приказ параметара оксидационог стреса ( $O_2^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $H_2O_2$ , ТВАРС) у плазми у АТО групама у односу на дијетални режим. Статистичка значајност између група за сваки параметар утврђена је непараметријским аналогом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), *Kruskal-Wallis H* тестом и сматрана је значајном уколико је  $p < 0,05$  (\* $p < 0,05 = AK$  vs. АМБФ; # $p < 0,05 = AK$  vs. АМФ; & $p < 0,05 = AMB\Phi$  vs. АМФ).

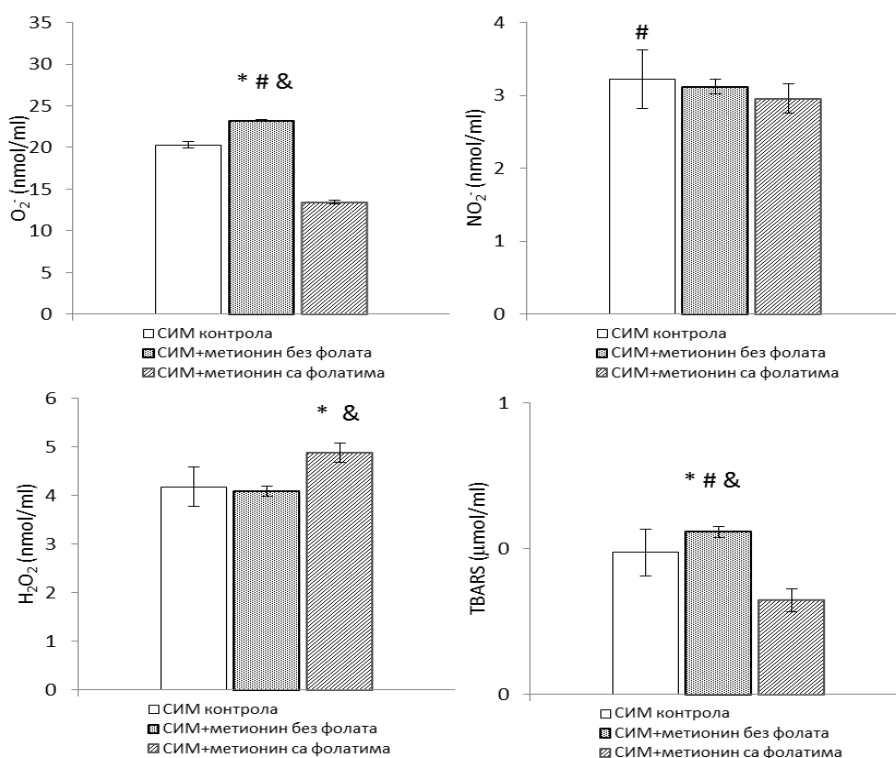




#### 4.7.1.3. Утицај дијеталног режима на параметре оксидационог стреса у присуству симвастатина

На графикону бр. 38 приказане су средње вредности маркера оксидационог стреса у плазми у односу на групу и статистичке значајности. Поређењем група које су биле на фармаколошком третману симвастатином, примећено је да су нивои  $O_2^-$  и ТВАРС-а значајно промењени поређењем свих група, са доминантно сниженим вредностима у у групи са умереном хиперхомоцистемније под утицајем симвастатина у односу на остале групе. Вредности  $NO_2^-$  су биле статистички значајно снижене у групи умерене хиперхомоцистеинемније у односу на контролну групу под утицајем симвастатина, док су нивои  $H_2O_2$  статистички значајно повишени управо у истој групи под утицајем симвастатина.

Графикон бр. 38 Упоредни приказ параметара оксидационог стреса ( $O_2^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $H_2O_2$ , ТВАРС) у плазми у СИМ групама у односу на дијетални режим. Статистичка значајност између група за сваки параметар утврђена је непараметријским аналогом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), *Kruskal-Wallis H* тестом и сматрана је значајном уколико је  $p < 0,05$  (\* $p < 0,05 = CK$  vs. СМБФ; # $p < 0,05 = CK$  vs. СМФ; & $p < 0,05 = СМБФ$  vs. СМФ).

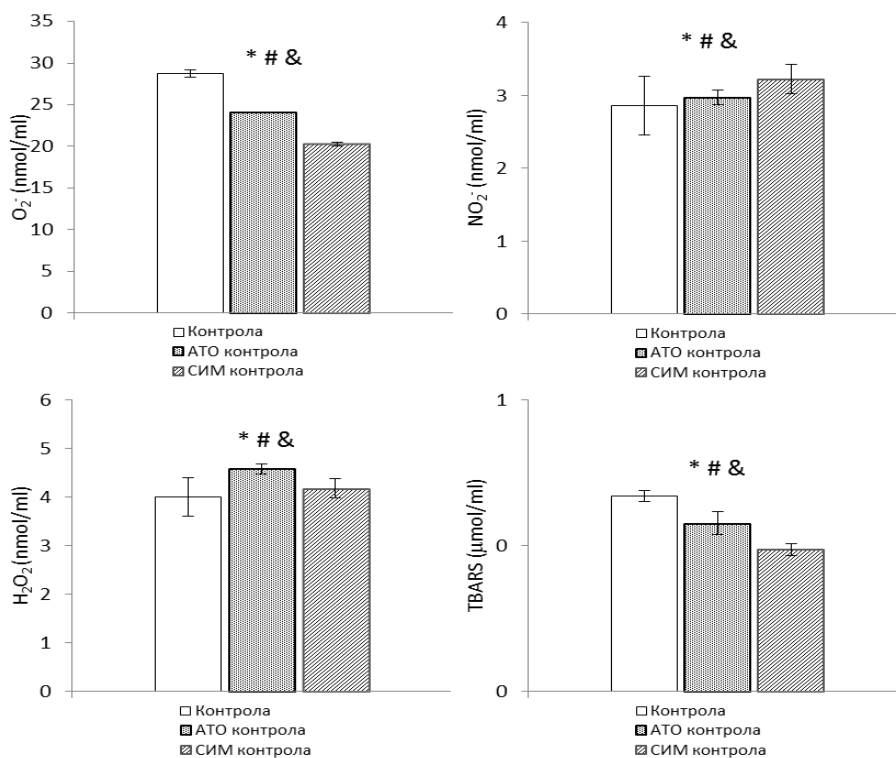


## 4.7.2. ПРОМЕНЕ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА У КРВИ У ОДНОСУ НА ФАРМАКОЛОШКИ ТРЕТМАН

### 4.7.2.1. Утицај аторвастатина и симвастатина на параметре оксидационог стреса у условима нормалних вредности хомоцистеина у крви (<15 $\mu\text{M/L}$ )

На графикону бр. 39 приказане су средње вредности маркера оксидационог стреса у плазми у односу на групу и статистичке значајности. Поређењем група које су биле на фармаколошком третману различитим статинима а на истом третману стандардном храном, односно у условима нормалних вредности хомоцистеина, статистички је доказано смањење нивоа  $\text{O}_2^-$ , ТВАРС-а и  $\text{H}_2\text{O}_2$  под утицајем симвастатина у односу на аторвастатин групе, док су вредности  $\text{NO}_2^-$  значајно снижени поређењем свих група, са доминантно сниженим вредностима у АТО групи.

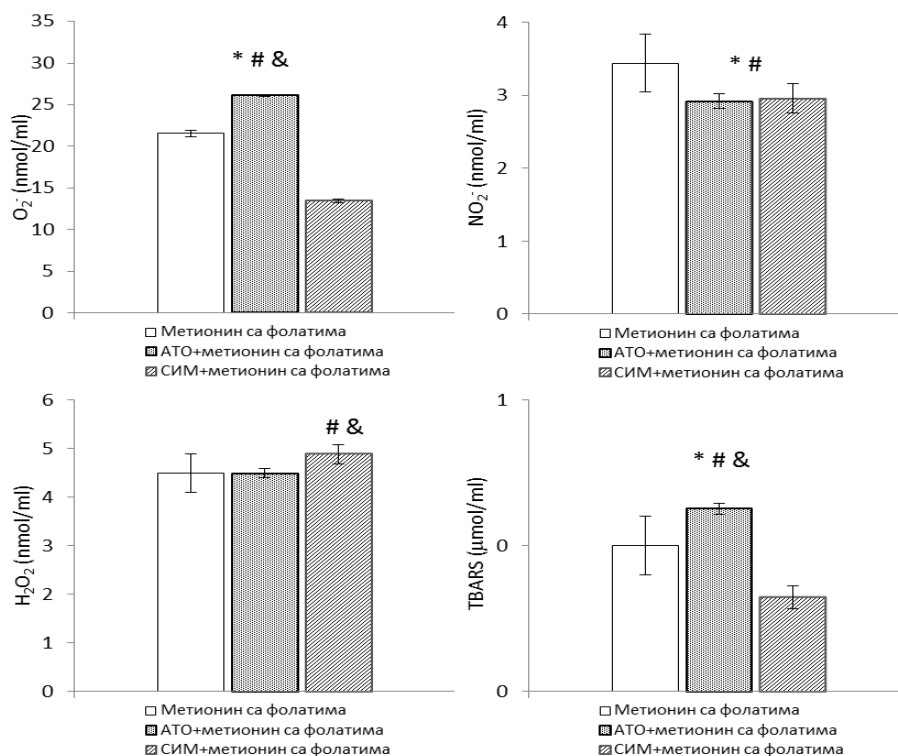
Графикон бр. 39 Упоредни приказ параметара оксидационог стреса ( $\text{O}_2^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ТВАРС) у плазми у групама са истим дијеталним (контролна група) у односу на фармаколошки третман. Статистичка значајаност између група за сваки параметар утврђена је непараметријским аналогом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), *Kruskal-Wallis H* тестом и сматрана је значајном уколико је  $p < 0,05$  (\* $p < 0,05 = \text{K vs. AK}$ ; # $p < 0,05 = \text{K vs. SK}$ ; & $p < 0,05 = \text{AK vs. SK}$ ).



#### **4.7.2.2. Утицај аторвастатина и симвастатина на параметре оксидационог стреса у условима умерено повишених вредности хомоцистеина у крви (15-30 $\mu\text{M/L}$ )**

На графикону бр. 40 приказане су средње вредности маркера оксидационог стреса у плазми у односу на групу и статистичке значајности. Поређењем група које су биле на фармаколошком третману различитим статинима а на истом третману хиперметиониске дијете са фолатима, односно у условима повишених вредности хомоцистеина, статистички је доказано смањење нивоа  $\text{O}_2^-$  и TBARS-а под утицајем симвастатина у односу на аторвастатин групе, док су вредности  $\text{NO}_2^-$  значајно подједнако снижени након третмана оба статина у поређењу са контролном групом без фармаколошког третмана. Поређењем свих група,  $\text{H}_2\text{O}_2$  је био значајно повишен у СИМ групи у односу на АТО групу у контролну у условима умерене хиперхомоцистеиније.

Графикон бр. 40 Упоредни приказ параметара оксидационог стреса ( $O_2^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $H_2O_2$ , TBARS) у плазми у групама са истим дијеталним (хиперметиониска исхрана са нормалним садржајем фолата, витамина  $B_6$  и  $B_{12}$ ) у односу на фармаколошки третман. Статистичка значајност између група за сваки параметар утврђена је непараметријским аналогом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), *Kruskal-Wallis H* тестом и сматрана је значајном уколико је  $p < 0,05$  (\* $p < 0,05 = \text{МФ vs. АМФ}$ ; # $p < 0,05 = \text{МФ vs. СМФ}$ ; & $p < 0,05 = \text{АМФ vs. СМФ}$ ).



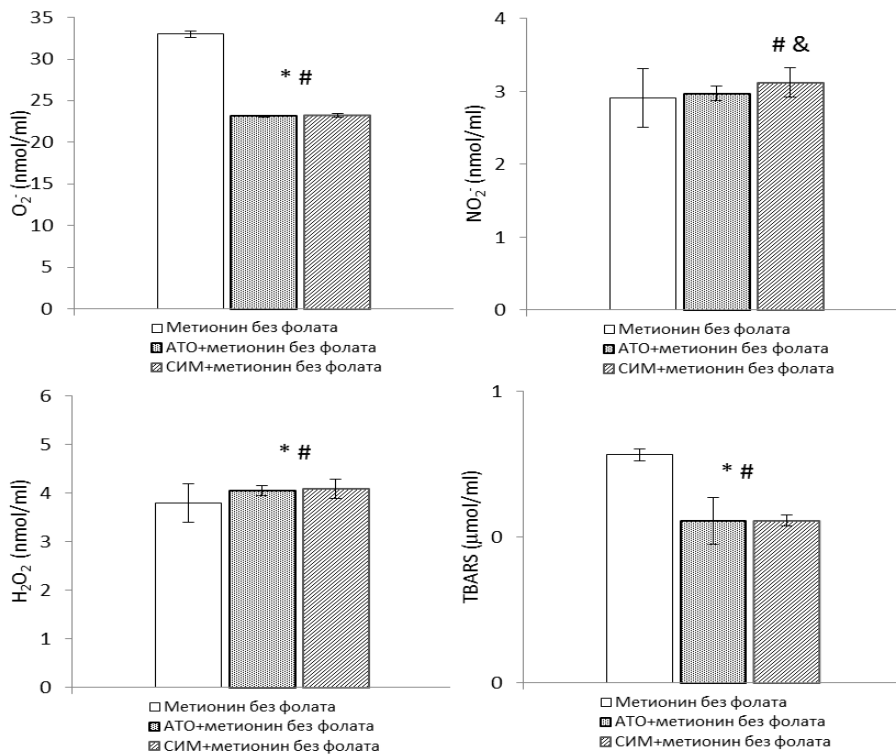
#### 4.7.2.3. Утицај аторвастатина и симвастатина на параметре оксидационог стреса у условима екстремно повишених вредности хомоцистеина у крви (>31 $\mu\text{M/L}$ )

На графикону бр. 41 приказане су средње вредности маркера оксидационог стреса у плазми у односу на групу и статистичке значајности.

Поређењем група које су биле на фармаколошком третману различитим статинима а на истом третману хиперметиониске дијете без фолата, односно у условима екстремно повишених вредности хомоцистеина, статистички је доказано смањење нивоа  $O_2^-$  и TBARS-а под утицајем симвастатина и аторвастатина у односу групу без фармаколошког третмана, док су вредности  $NO_2^-$  значајно промењене

међусобно у АТО и СИМ групама (повишене) и у СИМ групи у поређењу са контролном групом без фармаколошког третмана. Поређењем свих група,  $H_2O_2$  је био значајно повишен у СИМ и АТО групи у односу на контролну у условима тешке хиперхомоцистеинемije.

Графикон бр. 41 Упоредни приказ параметара оксидационог стреса ( $O_2^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $H_2O_2$ , ТВАРС) у плазми у групама са истим дијеталним (хиперметиониска исхрана са ниским садржајем фолата, витамина  $B_6$  и  $B_{12}$ ) у односу на фармаколошки третман. Статистичка значајност између група за сваки параметар утврђена је непараметријским аналогом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), *Kruskal-Wallis H* тестом и сматрана је значајном уколико је  $p < 0,05$  (\* $p < 0,05$ =МБФ vs. АМБФ; # $p < 0,05$ =МБФ vs. СМБФ; & $p < 0,05$ =АМБФ vs. СМБФ).

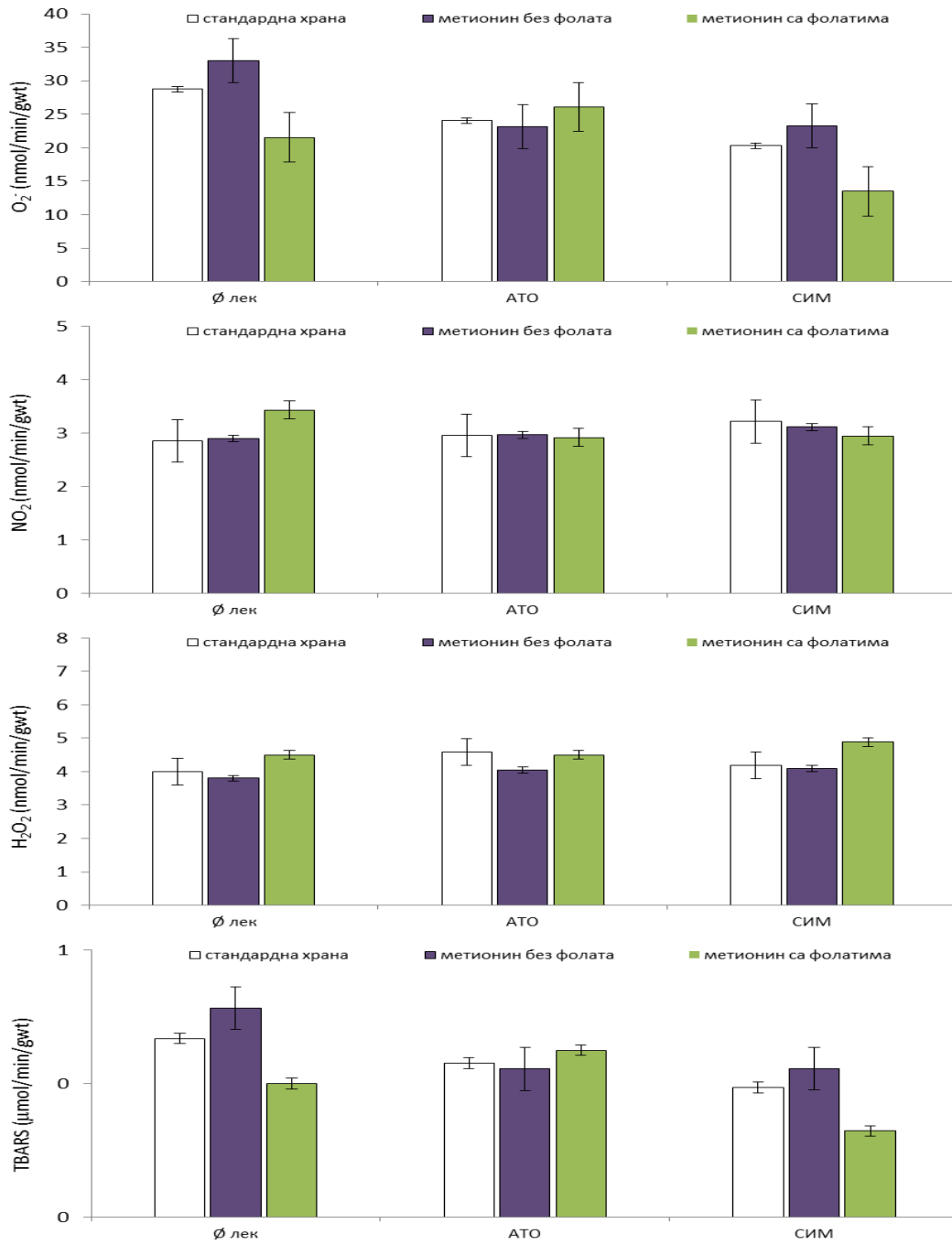


#### **4.7.3. ПРОМЕНЕ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА У КРВИ У ПОРЕЂЕЊЕМ СВИХ ГРУПА**

Посматрајући све групе одједном, ниови супексид ањон радикала су били дефинитивно нижи под утицајем симвастатина у односу на групе са АТО и без фармаколошког третмана, а такође снижени под утицајем аторвастатина у односу на групу без фармаколошког третмана ( $p < 0,05$ ). У групама са екстремно ниским и екстремно ниским вредностима хомоцистеина без примене статина примећене су највише вредности овог маркера, које су се смањиле под утицајем аторвастатина а у већем обиму под утицајем симвастатина (Графикон бр. 42).

Динамика нитрита се није много мењала током различитих третмана ако упоредимо све групе. Значајно је повишење нитрита током умерене хиперхомоцистеиније које смањило у већем обиму под утицајем аторвастатина ( $p < 0,05$ ). Водоник пероксид се задржао на истим нивоима при умереним и екстремно високим вредностима хомоцистеина и под утицајем различитих статина, док при нормалним вредностима хомоцистеина у крви мењао под утицајем статина, односно значајно снизио при примени симвастатина ( $p < 0,05$ ). На крају, индекс липидне пероксидације претрпео је најзначајније промене, односно значајна снижења под утицајем симвастатина у односу на све остале групе, али и снижења под утицајем аторвастатина у односу на групу без фармаколошког третмана. Све промене су статистички биле значајне, са високом значајним променама вредности индекса липидне пероксидације у групама са умереном хиперхомоцистеинијом, у којима је под утицајем симвастатина дошло до екстремног смањења овог маркера ( $p < 0,01$ ).

Графикон бр. 42 Упоредни приказ свих параметара оксидационог стреса ( $O_2^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $H_2O_2$ , TBARS) у плазми у свим групама



#### **4.8. УТИЦАЈ РЕЖИМА ИСХРАНЕ И ИНХИБИТОРА ХИДРОКСИМЕТИЛ-ГЛУТАРИЛ КО-А РЕДУКТАЗЕ (АТОРВАСТАТИН И СИМВАСТАТИН) НА ПАРАМЕТРЕ АНТИОКСИДАЦИОНОГ СИСТЕМА ЗАШТИТЕ (ЕРИТРОЦИТИ)**

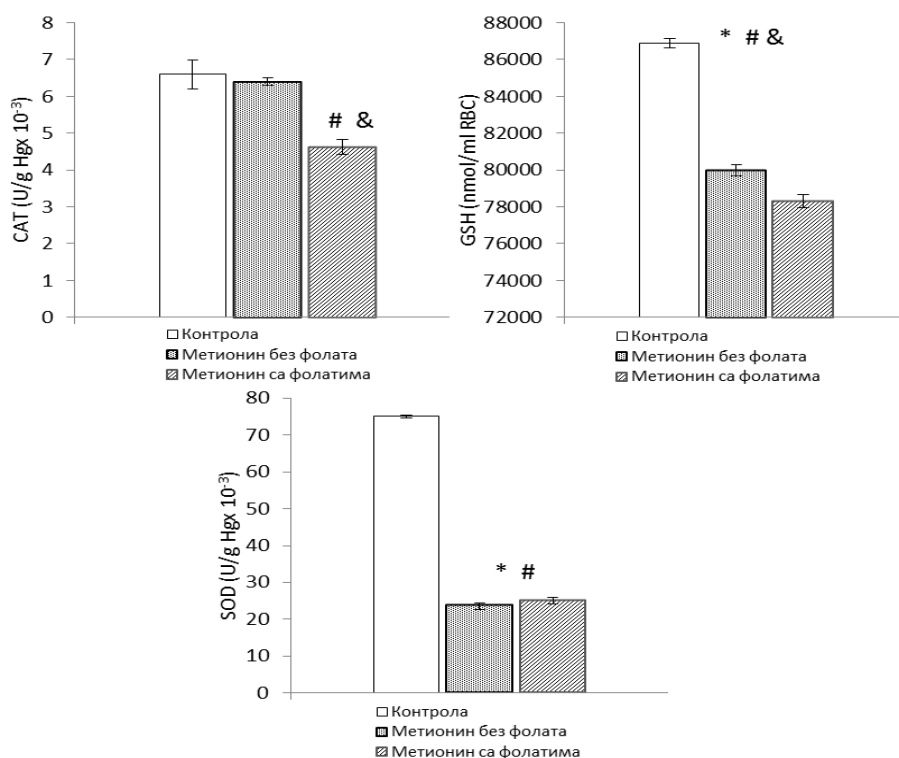
##### **4.8.1. ПРОМЕНЕ АНТИОКСИДАТИВНИХ ПАРАМЕТАРА У КРВИ У ОДНОСУ НА ДИЈЕТАЛНИ РЕЖИМ**

###### **4.8.1.1. Утицај дијеталног режима на параметре антиоксидационог система заштите**

Посматрањем утицаја дијеталног режима на вредности каталазе (CAT) редукованог глутатиона (GSH) и супероксид дисмутазе (SOD) примећене су статистички значајне разлике у свим параметрима и приказане су графички (Графикон бр. 43). У групи умерене хиперхомоцистеинемичке значајно су биле ниже вредности каталазе у односу на остале групе, док су вредности осталих параметара антиоксидативног система заштите, GSH и SOD биле значајно снижене у хиперхомоцистеинемичним групама.



Графикон бр. 43 Упоредни приказ антиоксидативних маркера (CAT, GSH и SOD) у плазми у групама са различитим дијеталним режимом без фармаколошког третмана. Статистичка значајност између група утврђена је непараметријским аналогом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), *Kruskal-Wallis H* тестом (\* $p < 0.05 = K vs. MB\Phi$ ; # $p < 0.05 = K vs. M\Phi$ ; & $p < 0.05 = MB\Phi vs. M\Phi$ ).

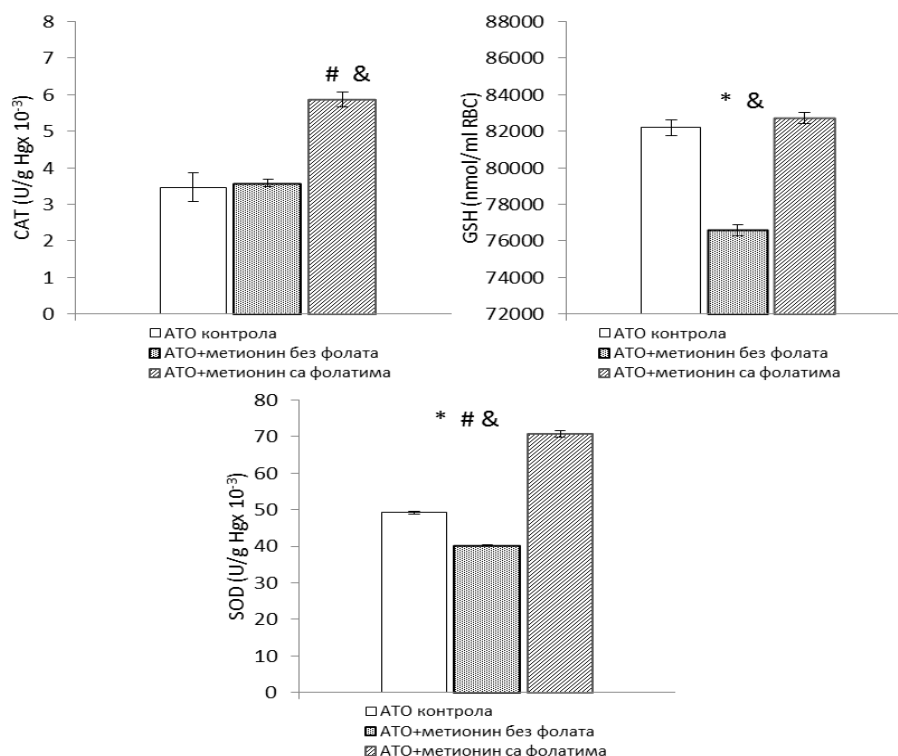


#### 4.8.1.2. Утицај дијеталног режима на параметре антиоксидационог система заштите у присуству аторвастатина

Посматрањем утицаја дијеталног режима на вредности каталазе (CAT) редукованог глутатиона (GSH) и супероксид дисмутазе (SOD) примећене су статистички значајне разлике у свим параметрима и приказане су графички (Графикон бр. 44).

У групи умерене хиперхомоцистеиније значајно су биле више вредности каталазе у односу на остале групе, док су вредности GSH биле значајно ниже у групама тешке хиперхомоцистеиније у односу на остале групе у присуству аторвастатина. Вредности SOD-а су биле значајно промењене под утицајем дијеталног режима у присуству аторвастатина, са доминантно повишеним вредностима у Мет са фолатима групи.

Графикон бр. 44 Упоредни приказ вредности антиоксидативних маркера (CAT, GSH и SOD) у плазми у групама са различитим дијеталним режимом у присуству аторвастатина. Статистичка значајност између група за сваки параметар утврђена је непараметријским аналогом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), *Kruskal-Wallis H* тестом и сматрана је значајном уколико је  $p < 0,05$  (\* $p < 0,05 = \text{AK vs. AMБФ}$ ; # $p < 0,05 = \text{AK vs. AMФ}$ ; & $p < 0,05 = \text{AMБФ vs. AMФ}$ ).

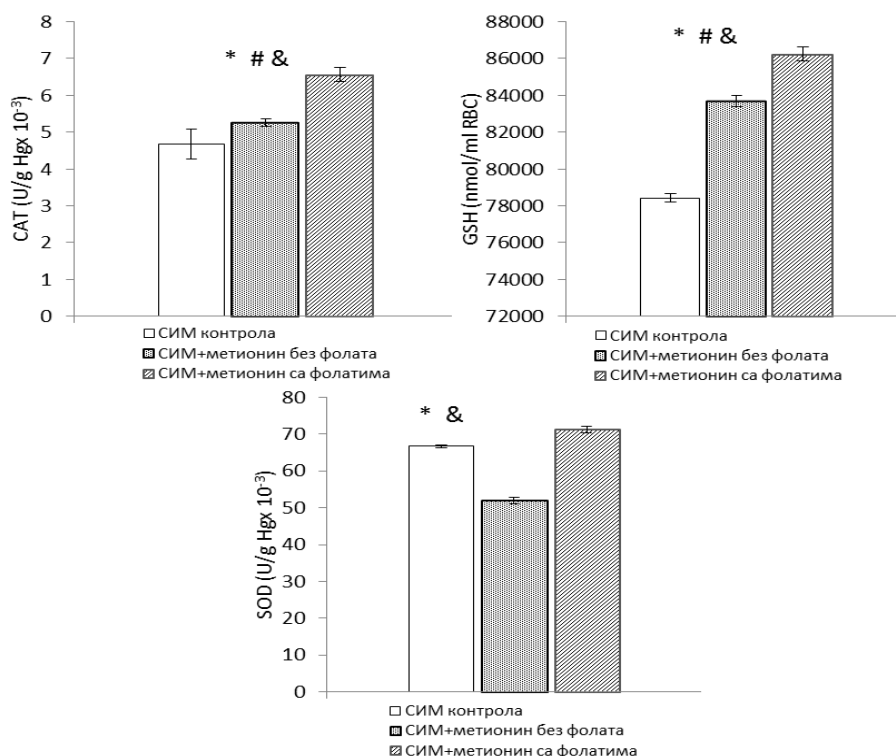


#### 4.8.1.3. Утицај дијеталног режима на параметре антиоксидационог система заштите у присуству симвастатина

Посматрањем утицаја дијеталног режима на вредности каталазе (CAT) редукованог глутатиона (GSH) и супероксид дисмутазе (SOD) примећене су статистички значајне разлике у свим параметрима и приказане су графички (Графикон бр. 45).

Нивои каталазе и редукованог глутатиона су биле значајноповишене под утицајем статина током свих дијеталних режима, са доминантним повећање у условима умерене хиперхомоцистеиније. Тај тренд настављен је и у динамици промене супероксид дисмутазе, међутим значајан пад овог параметра забележен је у условима тешке форме хиперхомоцистеиније у присуству симвастатина.

Графикон бр. 45 Упоредни приказ вредности антиоксидативних маркера (CAT, GSH и SOD) у плазми у групама са различитим дијеталним режимом у присуству симвастатина. Статистичка значајаност између група за сваки параметар утврђена је непараметријским аналогом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), *Kruskal-Wallis H* тестом и сматрана је значајном уколико је  $p < 0,05$  (\* $p < 0,05$ =СК vs. СМБФ; # $p < 0,05$ =СК vs. СМФ; & $p < 0,05$ =СМБФ vs. СМФ).



## 4.8.2. ПРОМЕНЕ АНТИОКСИДАТИВНИХ ПАРАМЕТАРА У КРВИ У ОДНОСУ НА ФАРМАКОЛОШКИ ТРЕТМАН

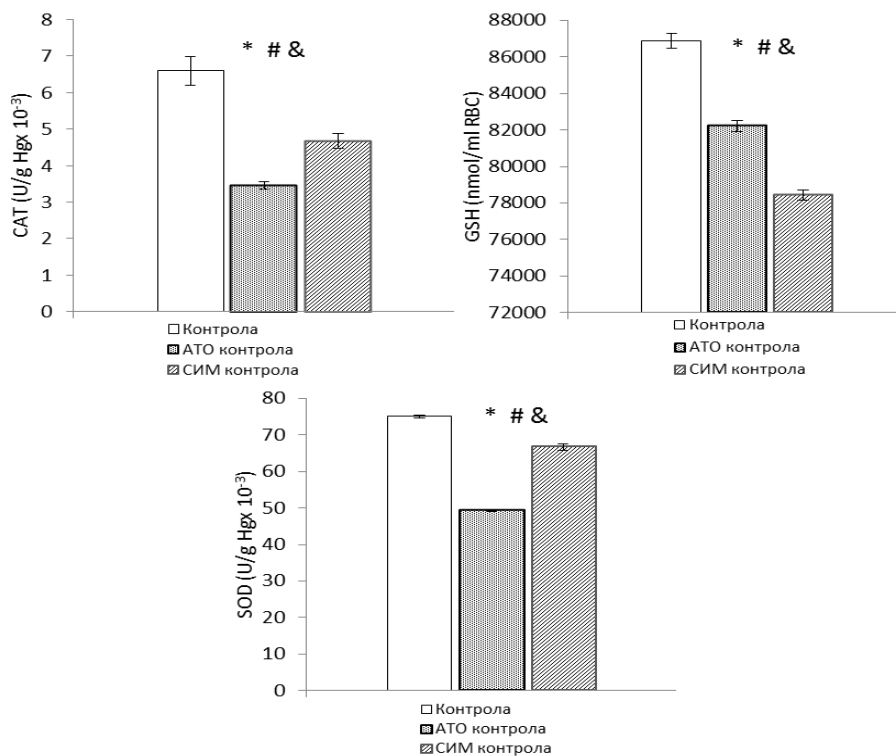
### 4.8.2.1. Утицај аторвастатина и симвастатина на параметре антиоксидационог система заштите у условима нормалних вредности хомоцистеина у крви (<15 $\mu\text{M/L}$ )

Посматрањем утицаја дијеталног режима на вредности каталазе (CAT) редукованог глутатиона (GSH) и супероксид дисмутазе (SOD) примећене су статистички значајне разлике у свим параметрима и приказане су графички (Графикон бр. 46).

Нивои свих маркера антиоксидативног система заштите су значајно промењени под утицајем статина при стандардном режиму исхране, са врло значајаним

снижавањем CAT и SOD под утицајем симвастина, и снижавање GSH под утицајем аторвастатина.

Графикон бр. 46 Упоредни приказ вредности антиоксидативних маркера (CAT, GSH и SOD) у плазми у групама са истим дијеталним режимом (стандардна храна) у присуству различитих статина. Статистичка значајност између група за сваки параметар утврђена је непараметријским аналогом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), *Kruskal-Wallis H* тестом и сматрана је значајном уколико је  $p < 0,05$  (\* $p < 0,05 = K$  vs. AK; # $p < 0,05 = K$  vs. CK; & $p < 0,05 = AK$  vs. CK).



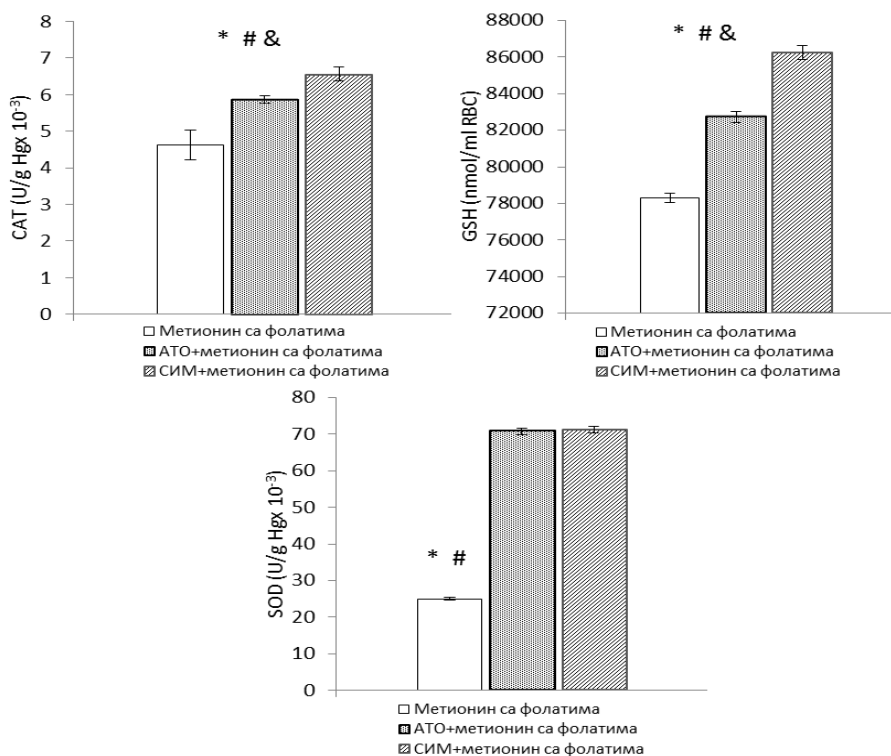
#### 4.8.2.2. Утицај аторвастатина и симвастатина на параметре антиоксидационог система заштите у условима умерено повишених вредности хомоцистеина у крви (15-30 $\mu\text{M/L}$ )

Посматрањем утицаја дијеталног режима на вредности каталазе (CAT) редукованог глутатиона (GSH) и супероксид дисмутазе (SOD) примећене су статистички значајне разлике у свим параметрима и приказане су графички (Графикон бр. 47).

Нивои свих маркера антиоксидативног система заштите су значајно промењени под утицајем статина при умереној хиперхомоцистеинији, са врло значајним

повећањем CAT и GSH под утицајем симвастина, и повећање SOD под утицајем аторвастатина у односу на групу без фармаколошког третмана.

Графикон бр. 47 Упоредни приказ вредности антиоксидативних маркера (CAT, GSH и SOD) у плазми у групама са истим дијеталним режимом (хиперметиониска исхрана са присуством фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub>) у присуству различитих статина. Статистичка значајност између група за сваки параметар утврђена је непараметријским аналогом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), *Kruskal-Wallis H* тестом и сматрана је значајном уколико је  $p < 0,05$  (\* $p < 0,05$ =МФ vs. АМФ; # $p < 0,05$ =МФ vs. СМФ; & $p < 0,05$ =АМФ vs. СМФ).



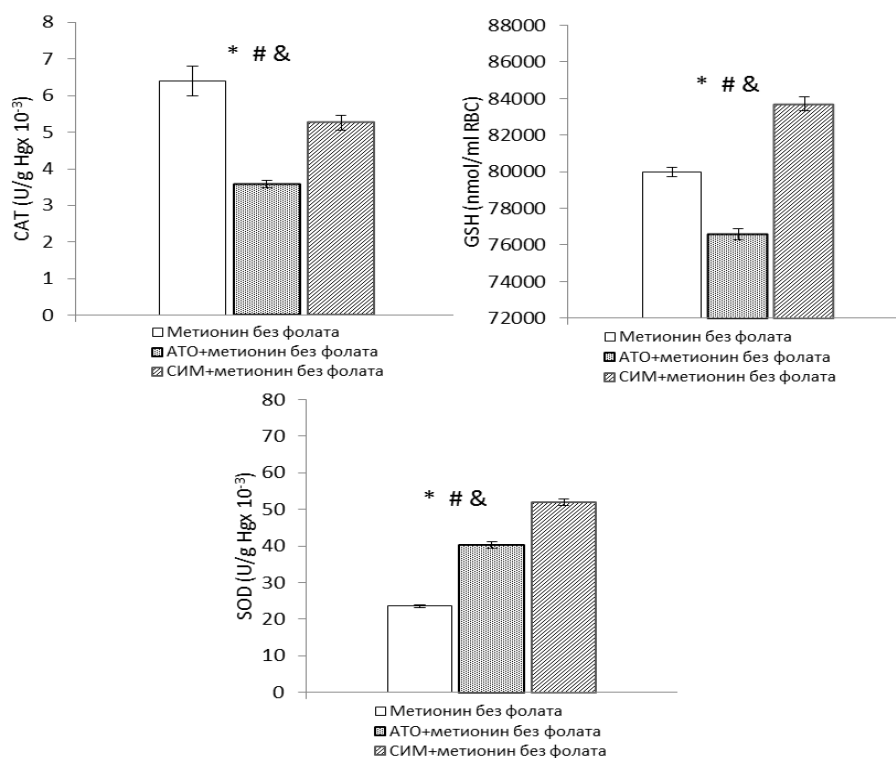
#### 4.8.2.3. Утицај аторвастатина и симвастатина на параметре антиоксидационог система заштите условима екстремно повишених вредности хомоцистеина у крви (>31 $\mu\text{M/L}$ )

Посматрањем утицаја дијеталног режима на вредности каталазе (CAT) редукованог глутатиона (GSH) и супероксид дисмутазе (SOD) примећене су статистички значајне разлике у свим параметрима и приказане су графички (Графикон бр. 48).

Нивои свих маркера антиоксидативног система заштите су значајно промењени под утицајем статина при екстремно повишеним вредностима хомоцистеина у крви (тешка форма хиперхомоцистеинемије), са врло значајним повећањем CAT, GSH и

SOD под утицајем симвастина, у односу на аторвастатин групу и групу без фармаколошког третмана.

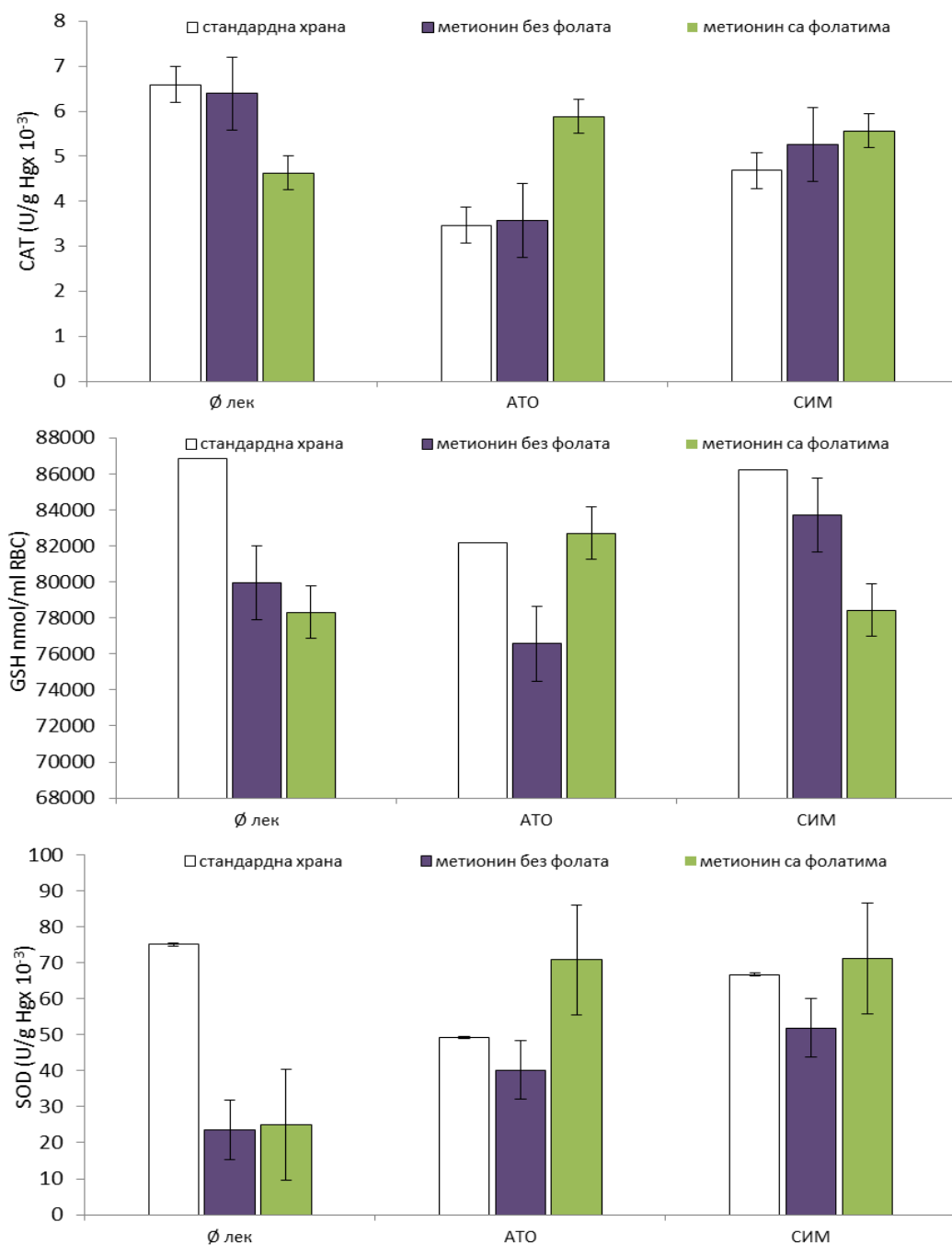
Графикон бр. 48 Упоредни приказ вредности антиоксидативних маркера (CAT, GSH и SOD) у плазми у групама са истим дијеталним режимом (хиперметиониска исхрана без присуства фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub>) у присуству различитих статина. Статистичка значајаност између група за сваки параметар утврђена је непараметријским аналогом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), *Kruskal-Wallis H* тестом (\* $p < 0.05$ =МБФ vs. АМБФ; # $p < 0,05$ =МБФ vs. СМБФ; & $p < 0,05$ =АМБФ vs. СМБФ).



#### **4.9. ПРОМЕНЕ ПАРАМЕТАРА АНТИОКСИДАЦИОНОГ СИСТЕМА ЗАШТИТЕ У КРВИ У ПОРЕЂЕЊЕМ СВИХ ГРУПА**

Посматрајући све групе и све параметре АОС-а заједно, евидентна је промена свих параметара под утицајем дијеталних режима и различитих статина ( $p < 0,05$ ). Под утицајем симвастатина доминантно је повећање каталазе у односу на аторвастатин и при свим вредностима хомоцистеина у крви, као и вредност супероксид дисмутазе ( $p < 0,05$ ). Нивои редукованог глутатиона су значајно повишени под утицајем статина у условима умерено и екстремно повишених вредности хомоцистеина у односу на утицај аторвастатина, али и снижени у односу на групе животиња са нормалним вредностима хомоцистеина у крви без фармаколошког третмана (Графикон бр. 49).

Графикон бр. 49 Упоредни приказ свих параметара антиоксидативног система заштите (CAT, GSH и SOD) у еритроцитима у свим групама





#### **4.10. КОРЕЛАЦИОНА АНАЛИЗА СВИХ ИСПИТИВАНИХ ПАРАМЕТАРА СВИХ ГРУПА СА ВРЕДНОСТИМА ХОМОЦИСТЕИНА**

Корелациона анализа показала је статистички значајну јаку негативну повезаност укупне вредности хомоцистеина у крви са променама морфометријских параметара. У умереној позитивној повезаности су скоро сви кардиодинамски параметри осим срчане фреквенце и коронарног протока, који нису у корелацији са вредностима хомоцистеина у серуму. У ефлуенту, прооксидациони маркери корелирају слабо до умерено са вредностима хомоцистеина, осим нитрита чије промене нису статистички повезане са променама хомоцистеина. У крви, сви испитивани прооксидациони маркери су у умереној позитивној, осим у случају нитрита који су у умереној негативној корелацији са концентрацијама хомоцистеина, док од маркера антиоксидационог система заштите, једино GSH и SOD су у корелацији са хомоцистеином, и то негативној умереној. Вредности липидних параметара CHOL и Tg, статистички значајно позитивно корелирају са концентрацијом хомоцистеина у серуму, и то благом до умереном повезаношћу (Табела 21).

Табела 21. Spearman-ов коефицијент корелације (r) и статистичка значајност (p) корелационе анализе између вредности хомоцистеина и свих испитиваних параметара. Spearman-ов коефицијент корелације: ниска корелација  $0 \leq r \leq 0,3$ ; умерена корелација  $0,3 \leq r < 0,7$ ; јака корелација  $0,7 \leq r < 1$  (- указује на негативну повезаност); p вредност мања од 0,05 указује на постојање корелације (\* $p \leq 0,05$ ).

<b>Хомоцистеин (<math>\mu\text{M/L}</math>)</b>	<b>Морфометријски параметри</b>					
	<b>ТТ (g)</b>		<b>Унос хране (g)</b>		<b>Маса срца (g)</b>	
	-0,840 (0,001)*		-0,870 (0,002)*		-0,711 (0,002)*	
	<b>Кардиодинамски параметри</b>					
	<b>dp/dt max</b>		<b>dp/dt min</b>		<b>SLVP</b>	
	0,533 (0,007)*		-0,502 (0,012)*		0,417 (0,042)*	
	<b>DLVP</b>		<b>HR</b>		<b>CF</b>	
	-0,450 (0,028)*		-0,208 (0,329)		-0,049 (0,819)	
	<b>Прооксидациони маркери (ефлуент)</b>					
	<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>		<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>		<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	
	0,575 (0,003)*		-0,878 (0,001)*		0,238 (0,262)	
	<b>Прооксидациони маркери (плазма)</b>					
	<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>		<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>		<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	
	0,682 (0,001)*		-0,653 (0,001)*		0,381 (0,003)*	
	<b>Антиоксидациони маркери (лизат)</b>					
	<b>CAT (U/g Hg<math>\times 10^3</math>)</b>		<b>GSH (nmol/ml RBC)</b>		<b>SOD (U/g Hg<math>\times 10^3</math>)</b>	
	-0.114 (0.298)		-0.363 (0.041)*		-0.581 (0.001)*	
<b>Липидни параметри (серум)</b>						
<b>CHOL (mmol/L)</b>		<b>HDL (mmol/L)</b>		<b>Tg (mmol/L)</b>		
0,418 (0,02)*		0,325 (0,361)		0,298 (0,03)*		

**5.**

# **ДИСКУСИЈА**

## 5. ДИСКУСИЈА

### 5.1. УТИЦАЈ РАЗЛИЧИТОГ РЕЖИМА ИСХРАНЕ И ФАРМАКОЛОШКОГ ТРЕТМАНА НА МОРФОМЕТРИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ

Већ деценију уназад, хиперхомоцистеинемија као фактор ризика за развој кардиоваскуларних обољења и то најчешће хронична срчана инсуфицијенција, оштећења коронарних и периферних артерија, представља врло актуелна тема научне јавности. Повезаност између хомоцистеина и кардиоваскуларних обољења је прво уочена истраживањем хомоцистинурије, аутозомно-рецесивног обољења узроковано недостатком цистатион  $\beta$ -синтазе, а карактерише се екстремно високом концентрацијом хомоцистеина. 1969. године, када је примећено да деца са хомоцистеинуријом имају висок ризик за прерану смрт због обимних атеросклеротских промена и тромботичких оклузија предложен је појам хиперхомоцистеинемија, као независан фактор ризика за кардиоваскуларне болести (221-247).

Од тада, па до данас, студије типа мета анализе су показале да са сваким порастом хомоцистеина у плазми од  $5\mu\text{M}$  расте ризик од коронарне болести срца за 60% код одраслих мушкараца и 80% код жена. Сличне студије мета анализе су пријавиле 7 пута већу стопу морталитета код особа са хиперхомоцистеинемијом у односу на друге при чему се новим доказима стално потврђује да је повишен ниво хомоцистеина у опсегу  $15\text{-}25\mu\text{M/l}$  у корелацији са коронарним болестима срца, можданим ударом, периферним артеријским стенозама, венском тромбозом и недовољним уносом фолата. Последња запажања показују да хомоцистеин у култури ћелија повећава интрацелуларни и екстрацелуларни холестерол (219-255). Како се хомоцистеин физиолошки повећава са старењем, ова чињеница води концепту примене малих доза статина у превенцији штетних ефеката хомоцистеина, чак и код пацијената код којих су вредности липиди у оквиру нормалних вредности. У том смислу, сматрамо да је од интереса да се испита утицај хроничне примене инхибитора HMG-CoA редуктазе на кардиоваскуларни систем пацова код животиња са повишеним и нормалним вредностима хомоцистеина.

Бројне студије су показале да се умерена хиперхомоцистеинемија може изазвати код експерименталних животиња употребом метионинске дијете или дијете дефицитарне фолатима (259, 260). У нашој студији користили смо анимални модел

дијетом индуковане хиперхомоцистеинемije, односно повећаним уносом ендогеног метионина у виду исхране, са циљем да изазовемо клинички најближи облик хиперхомоцистеинемije. Применом хране обogaћене високим садржајем метионина са дефицитом фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub>, изазвали смо врло високе вредности хомоцистеина у серуму пацова (>65 µM/L) и применом хиперметиониске исхране са присуством фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> изазвали смо умерено повишене вредности хомоцистеина у крви (16-31 µM/L). Дакле, на крају хиперметионинске исхране у трајању од 30 дана дијагностиковали смо два нивоа хиперхомоцистеинемije, умерену и тешку, при чему смо доказали да је примена овог експерименталног модела индуковања хиперхомоцистеинемije сасвим оправдана.

Поред тога, употреба аторвастатина је значајно смањила вредности умерено повишеног хомоцистеина, док је употреба симвастатина значајно смањила вредности екстремно повишених вредности хомоцистеина у серуму. *Bhandari et al* су у свом истраживању показали да примена аторвастатина, код животиња на метионинској дијети, у дози 0,2 mg/kg значајно снижава ниво хомоцистеина у серуму (272). *Li et al* су у свом истраживању показали да примена симвастатина, код животиња на комбинованој метионинској и дијети богатој мастима, у дози 5 mg/kg на дан значајно снижава ниво хомоцистеина у серуму (273). Литературни подаци наводе да аторвастатин супримира хомоцистеинем-индуковани оксидативни стрес у ендоплазматском ретикулуму, узрокује *down-regulation* TNF-α и MMP-9 mRNA у макрофагу (274).

Оваква сазнања говоре у прилог томе да хомоцистеин има значајну улогу у процесу атеросклерозе промовисањем развоја и нестабилности плака, али и да примена статина који инхибирају оксидативни стрес има оправдану улогу у стањима хиперхомоцистеинемije (275-278)

Клиничке опсервационе студије наводе на значајну повезаност хиперхомоцистеинемije са осталим факторима ризика за настанак кардиоваскуларних болести, као што су дислипидемија, хипертензија и гојазност. Први корак у формирању атеросклеротског плака представља адхезија моноцита и диференцијација макрофага у пенасту ћелију (216-223). Овај процес се додатно погоршава у стањима дислипидемије који се карактерише реукцијом садржаја аполипопротеина А (*Apo A*) у липопротеинима као што је *HDL*, и повећаном концентрацијом делимично метаболисаних триглицерида који су богати аполипопротеином Б (*Apo B*), и повећањем концентрација *LDL*-а. Уколико је дислипидемија удружена са хиперхомоцистеинемијом, онда хомоцистеин поспешује

развој атеросклеротских промена али и узрокује низ каскадних 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 (210-252). У нашем истраживању, исхрана обogaћена метионином са садржајем фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> узроковала је значајно повећање холестерола, HDL-а и триглицерида, док су вредности ових липопротеина биле нешто ниже у групи са тешком формом хиперхомоцистеинемije (Графикони 2-4). Дакле примена хиперметиониска исхрана и хиперхомоцистеинемija дозно-зависно утичу и на нивое наведених липопротеина, и у позитивној су корелацији. Обогаћена исхрана метионином и витаминима В групедовели су и до повећане телесне масе животиња што опет потврђује корелацију оптерећења метионином и повећаних концентрација липопротеина у серуму.

Са друге стране, статини инхибирају 3-хидрокси-3-метилглутарил коензим-А (HMG-CoA) редуктазу која има улогу у синтези ендогеног холестерола и сматра се кључним ензимом у циклусу мевалоната (279).

Под утицајем симвастатина, вредности tChol, HDL, и Try су значајно биле снижене при умереним вредностима хомоцистеина, док под утицајем аторвастатина tChol и Try су биле снижене али при екстремно повишеним вредностима хомоцистеина у серуму. Вредности HDL-а под утицајем аторвастатина нису биле промењене. Интересантно је да при нормалним вредностима хомоцистеина у серуму и под утицајем симвастатина и аторвастатина концентрације липопротеина нису биле промењене (Графикони 2-4).

*Couise* и сарадници су својој клиничкој студији испитивали повезаност хиперхомоцистеинемije са дислипидемијом у току хипопротеинске исхране код људи, и доказали да исхрана значајно утиче на промене нивоа липопротеина у крви, а да унос фолата, витамина В<sub>12</sub> и витамина D значајно утиче на промену нивоа хомоцистеина у крви (280).

Ови резултати су у сагласности са нашим резултатима где смо показали да истовремена/одвојена хронична манипулација количином унетог метионина као и фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> последично утичемо на липидни профил и концентрацију хомоцистеина у крви.

*Lupton* и сарадници у су својој опсежној студији која је обухватила 18297 одраслих, испитивали повезаност нивоа триглицерида, LDL-а, non-HDL-а, VLDL-а, HbA1c, инсулина, и азотних материја у крви са вредностима укупног хомоцистеина. Линеарним регресионим моделима и предиктивним прерачунавањем закључили су да постоји значајна повезаност свих наведених биохемијских параметара са хомоцистеином ако се искључе остали фактори који могу бити ометајући, други коморбидитети, старост, и да са повећањем триглицерида за 2-6% очекује се и линеарно повећање хомоцистеина, наводећи на закључак да је хомоцистеин завистан а не независан фактор ризика од липида (281).

*Lu D* и сарадници су, између осталог, испитивали повезаност HDL-а са другим факторима ризика за васкуларне болести, укључујући и инфламаторне маркере код пацијената са исхемијским можданим ударом. Приметили су да пацијенти са акутним исхемијским ударом имају повишене вредности non-HDL-а, и снижене вредности HDL-а и хомоцистеина. Заправо, познато је да су тзв. non-HDL липопротеинске фракције добри предиктори нежељених васкуларних болести и догађаја, али да је хомоцистеин селективни предиктор будућих васкуларних болести. То значи, да у присуству других придружених болести и стања која могу повећати нивое хомоцистеина као што су бубрежна инсуфицијенција, хипертензија, дијабетес али и сама старост као физиолошки фактор хиперхомоцистеинемије, на основу вредности хомоцистеина се не могу предвидети будући исходи, као што и наводе радномизирани клиничке студије (282-285).

У нашем истраживању, на анималном моделу претходно здравих младих (4 недеље старости) животиња пратили смо ефекат хиперметионинске исхране и утицај аторвастатина и симвастатина, те због ове разлике у самом експерименталном протоколу имамо мале разлике у резултатима. Оно у чему је јасно да наша студија потврђује резултате других истраживања, је то да повећање холестерола и триглицерида као важних предиктивних традиционалних фактора кардиоваскуларних болести умногоме зависи од нутритивних фактора, а да ниво хомоцистеина зависи од нивоа липида, и представља зависну варијаблу.

Са друге стране, јако је мали број студија које су испитивале утицај статина на ниво липопротеина у току хиперхомоцистеинемије. *Vladimirova-Kitova et al* су

проучавали утицај симвастатина на метаболизам хомоцистеина током хиперхолестеролемије. Показали су да примена симвастатина у дози од 40mg током 12 недеља не утиче значајно на смањење укупног хомоцистеина, и да је овакав ефекат симвастатина дозно-зависан, односно да са повећањем дозе на 80 mg ефекат на хомоцистеин је био статистички значајан (286). Дакле, наши резултати су индиректно у сагласности са резултатима поменуте студије, јер је јасно да под утицајем тешке хиперхомоцистеиније и нормолипедије ефекат симвастатина је мањи на ниво липида а већи на ниво хомоцистеина, и обрнуто, у условима тешке хиперхолестеролемије нормохомоцистеиније ефекат статина је већи на липопротеине а мањи на ниво хомоцистеина. Дакле, недвосмислено је јасно, да ентитет хиперхомоцистеиније не можемо посматрати одвојено од дислипидемије, као да ни ефекте аторвастатина и симвастатина на липиде током хиперхомоцистеиније, нагласивши изузетну важност хиперхомоцистеиније као зависне варијабле са ове тачке гледишта.

У првом делу истраживања, пратили смо и утицај хиперхомоцистеиније на базичне морфометријске карактеристике животиња, унос хране, укупну телесну масу и масу појединих органа (срце и јетра). У току тешке хиперхомоцистеиније приметан је линеаран пад укупне телесне тежине животиња, као и линеаран смањен унос хране почев од 15.ог дана експерименталног периода, док је у групи умерене хиперхомоцистеиније приметан благи пад телесне масе и уноса хране у односу на групе са нормалним вредностима хомоцистеина у крви. Поред тога, у истим групама запажен и пад масе органа (срце и јетра) у односу на укупну телесну масу (Графикони 5-13). И друге студије потврђују наше резултате. У експерименталној студији, Веск и сарадници пратили су ефекте повећаних нивоа хомоцистеина на телесну масу након хроничног третмана метионином путем исхране код пацова. Потврдили су бенефитне ефекте хиперметионске исхране на телесну тежину, нагласивши важност фолата у ограничавању негативних ефеката хиперметионске исхране у снижавању нивоа хомоцистеина у крви (287). Наши резултати потврђују чињеницу да тешка хиперхомоцистеинија смањује телесну масу, масу срца и јетре, а то у сагласности и са осталим клиничким студијама (288). *Karatela* и *Sainani* су открили повећану учесталост хиперхомоцистеиније код гојазних особа оба пола (289), док *Nabipour et al* у свом истраживању нису пронашли повезаност између нивоа хомоцистеина и индекса телесне масе код пацијената са метаболичким синдромом (290). Ипак, *Vaya et al* су касније у



неколико наврата извештавали о повећаним нивоима хомоцистеина код пацијената са централним типом гојазношћу (291).

Дакле, у свим овим студијама напомиње се и на значај пола, старости и коморбидитета на индекс телесне масе али и на поремећај функције органа и органских система а на мањи значај морфометријских карактеристика, што је и очекивано. Треба нагласити да се на основу промене телесне тежине може предвидети концентрација хомоцистеина у крви, али да се на основу вредности хомоцистеина ипак не може прецизно предвидети индекс телесне масе у будућности. Важно је напоменути да на повећањем уноса метионина можемо очекивати смањење телесне масе, као и да је неопходна суплементација фолном киселином у току хиперметионинске ихране дужем од 15 дана.

Међутим под утицајем симвастатина у току тешке хиперхомоцистеинемije долази до значајног повећања укупне телесне масе као масе јетре, додуше и под утицајем аторвастатина, али статистички незначајно (Графикон бр. 12). Овакав тренд промене укупне телесне масе прати и динамика промене уноса хране (Графикон бр. 11). У односу на групе са нормалним вредностима хомоцистеина, и даље постоји смањење укупне телесне масе и уноса хране у односу на групе са нормалним нивоима хомоцистеина. *Januszek R* је испитивао утицај симвастатина на гојазност код пацијената са кардиоваскуларним обољењем током хроничног третмана овим статином, и доказао је да је примена симвастатина значајно повезана са смањењем телесне тежине и да при оваквим ефектима долази до изражаја плеиотропна активност статина код пацијената са стабилном срчаном болешћу (292).

*Capel F* је доказао да аторвастатин снижава депое масног ткива и превенира настанак нових депоа и обезбеђује адекватну глико-равнотежу, вероватно посредством инхибиције *de novo* липогенезе у јетри (293). Заправо, хронична примена статина је повезана са глико-регулацијом и повећаним ризиком за настанка инсулинске резистенције и дијабетеса типа-2. Стога, и стањима повећаног кардиовакуларног ризика као што је хиперхомоцистеинемija у нашем случају, негативни метаболички ефекти статина постају очигледни, нарочито симвастатина, али се услед њиховог бенефитног дејства на смањење укупног кардиоваскуларног ризика њихова употреба не прекида, односно користе се и у примарној и секундарној превенцији кардиоваскуларних болести (294).

Дакле, у нашој студији посредством вероватно плеiotропних (не-липидних) ефеката, статини утичу на смањење укупне телесне масе и вредности хомоцистеина, а могући потенцијални механизми којима хиперхомоцистеинија и/или статини остварују своје ефекте на претходно поменуте параметре биће посматрани и у склопу других маркера и ентитета, како би смо сагледали проблем са различитих гледишта.

## 5.2. УТИЦАЈ РАЗЛИЧИТОГ РЕЖИМА ИСХРАНЕ И ФАРМАКОЛОШКОГ ТРЕТМАНА СТАТИНИМА НА ПАРАМЕТРЕ КОНТРАКТИЛНОСТИ СРЦА

У другом делу студије испитивали смо ефекте хиперхомоцистеинемije на функцију миокарда, коронарну циркулацију као и улогу инхибитора хидроксиетил-глутарил коензим-А (HMG-CoA) редуктазе у тој интеракцији. Заправо, главни циљ овог истраживања је био да се на експерименталном моделу изолованог срца пацова испитају ефекти умерене и тешке хроничне хиперхомоцистеинемije на миокард и коронарну циркулацију са или без утицаја статина. Хиперхомоцистеинемija представља један од маркера различитих кардиоваскуларних болести, али ипак још увек није познат тачан механизам којим делује на кардиоваскуларни систем, а нарочито како утиче на контрактилност и коронарну циркулацију срца. Ради комплетне слике о утицају хомоцистеина, на терену нормалних, умерено и екстремно повишених вредности хомоцистеина у серуму испитивали смо контрактилност миокарда изолованог срца пацова. Експериментални модел ретроградно перфундованог изолованог срца пацова који смо користили је најадекватнији анимални модел којим је могуће испитати и објаснити механизме деловања хроничних поремећаја и/или третмана на функцију миокарда будући на све морфо-функционалне сличности срца пацова са хуманим срцем. Сматрамо да је ова студија једна од ретких која комбинацијом два експериментална анимална модела хиперхомоцистеинемije и изолованог срца пацова тежи ка проналажењу одговора на то какви су ефекти статина током различитих нивоа хроничне хиперхомоцистеинемije, која има и изузетан клинички значај.

У нашем истраживању функција срца је процењена на основу праћења и анализе кардиодинамике леве коморе као морфолошки и функционално доминантне срчане шупљине, директним мерењем кардиодинамских параметара, показатеља функције миокарда: максималну ( $dp/dt \max$ ) и минималну ( $dp/dt \min$ ) стопу промене притиска у левој комори, систолни (SLVP) и дијатолни притисак (DLVP) леве коморе, и срчану фреквенцу (HR).  $dp/dt \max$  и  $dp/dt \min$  су параметри који означавају величину (стопу) промене притиска (mmHg) у левој комори у функцији времена (током једне секунде). У зависности од фазе срчаног циклуса, ове варијације притисака су на нашем апарату представљене као максималне ( $dp/dt \max$ ), током систоле, и минималне ( $dp/dt \min$ ).

Дакле праћењем наведених кардиодинамских параметара пратили смо индиректно контрактилност миокарда. У кардиодинамском смислу ови параметри су изузетно важни показатељи функционалних процеса у самом срцу (ефикасности фаза срчаног циклуса) –  $dp/dt \max$  показује очуваност фазе систоле, способност контракције леве коморе (инотропно својство), док  $dp/dt \min$  може бити користан у процени дијастоле, очуваности процеса релаксације леве коморе (луситропно својство). На тај начин, поремећај систоле миокарда, региструјемо снижењем вредности  $dp/dt \max$ , док дијастолну дисфункцију уочавамо порастом  $dp/dt \min$  (постаје још негативнији).

Да би смо прецизно утврдили ефекте хиперхомоцистеинемije на контрактилност срца, формирали смо групе животиња које су биле на хиперметионинским дијетама са/или без дефицита фолата, витамина B<sub>6</sub> и B<sub>12</sub> али и на стандардној храни за глодаре. Поред тога, путем модела ретроградно перфундованог изолованог срца, пратили смо изоловани орган и функцију миокарда на различитим перфузионим притисцима, имитирајући на тај начин хипоксичне и хипероксичне услове, којима срце у току неких васкуларних обољења у клиничким условима може бити изложено. Након овог првог дела испитивања кардиодинамских параметра, приступили смо испитивању контрактилности миокарда у условима различитог степена хиперхомоцистеинемije под утицајем аторвастатина/симвастатина, како би смо размотрили потенцијална терапијска решења.

Дакле, први део испитивања функције срца праћењем кардиодинамских параметра односи се на проучавање (пато)физиологије хиперхомоцистеинемije, а други део се односи на могућа терапијска решења и фармакологију кардиоваскуларног система.

Праћењем промене кардиодинамских параметара унутар сваке групе појединачно, примећено је да у групама са умереном хиперхомоцистеинемijом постоји значајно снижење контрактилности миокарда, односно смањење  $dp/dt \min$  повећање DLVP-а, а у групи са тешком хиперхомоцистеинемijом поред поменутих промена постоји и значајно повећање  $dp/dt \max$ , HR-а и коронарног протока (Графикони 14-16).

Претклиничка истраживања наводе на значај хомоцистеина у патофизиологији оштећења срчаног мишића. Liu и сарадници испитивали су утицај опретећења метионином путем исхране на ехокардиографске параметре функције леве коморе уз патофизиолошку потврду. Након оваквог третмана, доказали су да високе вредности

хомоцистеина *in vivo* узрокују смањење ејекционе фракције леве коморе уз фракционо скраћење али без смањења систолног волумена леве коморе срца (295). *Song* и сарадници су у својој студији испитивали утицај хроничне хиперметиониске исхране и умерену хиперхомоцистеинемију на срчану дисфункцију, при чему су показали увећање леве коморе и последичну дисфункцију посредством реактивних кисеоничних врста (296).

*Mendes et al* у својој студији истакли утицај тешке хиперхомоцистеинемије на настанак дисфункције срца. Нагласили да под утицајем егзогеног оптерећења метионином настаје тешка хиперхомоцистеинемија, која узрокује повећање систолног притиска леве коморе, које је последица модулације и дисфункције аутономног система срца (297).

*Joseph* је дуго низ година посветио истраживању хиперхомоцистеинемије како на анималним моделима тако путем клиничких студија. У њиховом првом анималном моделу, су током 10 недеља третирали спонтано хипертензивне пацове хиперметиониском дијетом у циљу изазивања хиперхомоцистеинемије. Након експерименталног периода, на препаратима срца је примећено присуство накупина мастоцита и колагена, сигурних показатеља измењене структуре срца. Ове морфолошке промене су биле поткрепљене логичним оштећењем функције миокарда, у смислу повећања дијастолног притиска срца и дијастолне дисфункције. Пар година касније, у потпуно идентичном експерименталном моделу су користили нормотензивне животиње и потврдили претходне резултате (298, 299). Студија спроведена од стране истраживача *Karni*, известила је о механичким променама коморских миоцита које настају под утицајем хиперхомоцистеинемије код пацова, јер променом хомеостазе калцијума настаје промена контрактности миоцита и самим тим промена срчане фреквенце (300). Смањење коронарног протока током изражене хиперхомоцистеинемије може бити последица оштећења зидова коронарних крвних судова и заправо је последица оштећења коронарне циркулације, за сада још увек непознатим механизмом.

И остале претклиничке студије подржавају теорију да хронична хиперхомоцистеинемија узрокује оштећење контрактилности и функције миокарда, вероватно због последичног ремоделовања самог срчаног мишића (301).

Клиничке студије наводе да хиперхомоцистеинемија је у тесној повезаности са срчаном болешћу, и да најчешће најстаје систолна дисфункција миокарда. Опсежна Фрамингамска студија наводи утицај хомоцистеина на настанак поремећене морфологије и функције леве коморе (302). Затим, проспективна студија спроведена на трудницама, у којој је испитана повезаност хиперхомоцистеинемије током трудноће са учесталошћу конгентиналних малформација на срцу, и показано је да од укупног броја трудница чак 46% је имало хиперхомоцистеинемију, и да је новорођенчад ових мајки имала урођену срчану аномалију (303).

Праћењем нивоа хомоцистеина код пацијената са оштећеном функцијом бубрега, примећено је да хиперхомоцистеинемија код ових пацијената удружена са дијастолном дисфункцијом миокарда (304).

Сви претходно наведени резултати релевантних и валидних студија су у сагласности са нашим резултатима. Дакле при умереној хиперхомоцистеинемији запажамо дијастолну дисфункцију, а при тешкој хиперхомоцистеинемији систолну дисфункцију миокарда изолованог срца пацова. Односно, потпуним укидањем примене фолата, витамина В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> примећен је настанак систолне дисфункције леве преткоморе у *in vitro* условима.

Даље, испитивали смо ефекте аторвастатина и симвастатина на функцију миокарда и коронарну циркулацију у присуству и одсуству хиперхомоцистеинемије. Појединачно посматрано, аторвастатин је узроковао статистички значајне промене кардиодинамских параметара у условима нормалних вредности хомоцистеина, док је симвастатин значајно утицао на кардиодинамске параметре у току умерене хиперхомоцистеинемије, снижавањем кардиодинамских параметара (Графикони 23 и 24).

Генерално посматрано, поређењем ефеката ова два статина у односу на вредности хомоцистеина у серуму, примећено је да у условима нормалних нивоа хомоцистеина ова два статина делују са сличним интезитетом и смером (у смеру побољшања контрактилности срца), у условима умерене хиперхомоцистеинемије под утицајем симвастатина се дешавају већа снижења  $dp/dt$  max,  $dp/dt$  min, SLVP, DLVP, док у условима тешке хиперхомоцистеинемије симвастатин такође остварује корисније дејство на функцију срца, са истом динамиком промењених параметара као што је

претходно поменуто, са разликом у срчаној фреквенци, где је примећен и значајан утицај аторвастатина. Поред тога, не може се ни занемарити ни појединачан користан утицај аторвастатина на кардиодинамске параметре у односу на групе без фармаколошког третмана, иако је несумњиво ефекат симвастатина био снажнији у односу на аторвастатин при истим нивоима хомоцистеина у серуму (Графикони бр. 25-28).

Познато је да поред хиполипидних ефеката, статини поседују различите плеиотропне ефекте, односно ефекте који нису у директној повезаности са променама у метаболизму липида, односно у вези са LDL-холестеролом. Плеиотропни ефекти статина су побољшање ендотелне функције, смањење васкуларне инфламације, смањење агрегабилности тромбоцита, повећање неоваскуларизације исхемијског ткива, повећање пролиферације ендотелних прогениторних ћелија, стабилизација атеромског плака, антитромботичко деловање, појачање фибринолизе, остеокласна апоптоза и повећање синтетичке активности остеобласта, инхибиција миграције герминативних ћелија током развоја и имуносупресија (248-258). Испитивањем кардиодинамских ефеката аторвастатина на изолованом срцу, *Bian* и сарадници су открили да употреба аторвастатина има протективна дејства на моделу исхемије-реперфузије, смањујући реперфузионо оштећење активацијом PI3K/Akt сигналног пута и митохондријалних pathway K(ATP) канала (305). Као кардиопротективно средство, испитан је аторвастатин у погледу смањења настанка аритмија на изолованом срцу, при чему је установљено смањење настанка вентрикуларне фибрилације за 30% у односу на нетретирани срца пацова, што опет говори у прилог корисног дејства аторвастатина на миокард (306).

Са друге стране, претклиничке студије наводе описују и бенефитна дејства сивастатина у погледу кардиопротекције и очувања контрактилности, али и побољшања. *Drapala* и сарадници, на моделу 12-недеља старих *Sprague-Dawley* пацова, ипитивали су утицај симвастатина на контрактилност изоловане феморалне артерије. Навели су да симвастатин утиче на промену средњег артеријског притиска повећањем и да повећава фреквенцу контракција артерије (307). Интересантно је да примена симвастатина у дози од 10 mg/kg у трајању само од 5 дана је довољна да смањи реперузионо оштећење на моделу изолованог срца пацова, и ово су значајна сазнања само потврђују наше сумње. Као један од потенцијалних механизма, у овој студији се

наводи плеiotропна активност симвастатина, односно повећање експресије анти-апоптотског Bcl-2 протеина и смањења експресија про-апоптотских маркера (308). *Abdel-Hamid* такође описује улогу аторвастатина у процесу апоптозе, нагласивши да значајно може побољшати структуру и функцију срчаног мишића у дијабетесу (309).

Fan и сарадници су објаснили разлику у кардиопротекцији између акутне и хроничне примене на моделу изолованог срца пацова. Дакле, хронична али не и акутна примена аторвастатина остварује снажније кардиопротективне ефекте постинфарктно, смањујући поље некрозе и контрактилну дисфункцију која настаје као последица нежељеног крадиоваскуларног догађаја и то вероватно посредством активности Akt и eNOS. Ова студија напомиње значај примене статина у секундарној превенцији кардиоваскуларних болести (310).

Клиничке студије, наводе на неконзистенте и двосмислене резултате у погледу ефеката аторвастатина и симвастатина на миокард. Двоструко слепа рандомизирана клиничка студија испитивала је ефекте аторвастатина на регресију кардиомиопатије 12 месеци након третмана овим статином у терапијским дозама, где је ехокардиографским метода потврђено да након хроничног третмана аторвастатином није дошло до регресије кардиомиопатије нити до промене ејекционе фракције леве коморе (311).

Друге студије наводе да ни примена росувастатина нити симвастатина не остварују кардиопротективно дејство у секундарној превенцији, већ се у први план ставља примена антиагрегационе и антиромботске терапије као главна кардиопротективна средства. Једино у високим дозама (>80mg/дан), аторвастатин и симвастатин показали су оправдану примену у погледу протекције функције срца у клиничким студијама, међутим, тада се испољавају метаболичка нежељена дејства статина као што су инторелација глукозе и повећан ризик за настанак шећерне болести. (312). Студије на људима које су исто време испитивале утицај статина и хиперхомоцистеинемije на контрактилност миокарда готово да не постоје, па је веома тешко упоредити наше резултате.

Ретке су претклиничке студије које су се бавиле овом тематиком. Једна од њих је, компаративна студија *Ankur Rohilla*-е, који је упоредио ефекте аторвастатина и симвастатина у току хиперхомоцистеинемije на моделу изолованог срца пацова. Испитивали су утицај 50  $\mu$ M аторвастатина и 10  $\mu$ M симвастатина на исхемија-



реперфузијом индукованом оштећењу изолованог срца, и доказали да оба статина делују кардиопротективно, делујући инхибиторно у погледу настанка даљег оштећења срчаног мишића, вероватно смањењем оксидативног стреса који настаје у хиперхомоцистеинемiji, са последичним смањење поља инфарктне лезије и концентрација срчане креатин киназе и лактат дехидрогеназе (313).

Дакле, у складу са резултатима свих претходно наведених студија су и наши резултати, наводећи на сазнање да примена и аторвастатина и симвастатина као потентних инхибитора HMG-CoA редуктазе могу испољавати различите бенефитне ефекте у третману кардиоваскуларних болести као што су инфаркт миокарда, нестабилна ангина и у току реваскуларизације након исхемијских догађаја, а нарочито у стањима повишених вредности хомоцистеина у крви.

### 5.3. УТИЦАЈ РАЗЛИЧИТОГ РЕЖИМА ИСХРАНЕ И ФАРМАКОЛОШКОГ ТРЕТМАНА НА РЕДОКС РЕДОКС-РАВНОТЕЖУ

У трећем делу студије испитивали смо ефекте хиперхомоцистеинемије на редокс статус изолованог срца пацова као и улогу инхибитора хидроксиметил-глутарил коензим-А (HMG-CoA) редуктазе.

Обзиром да је стање хиперхомоцистеинемије стање повишене производње реактивних кисеоничних и азотних врста, остаје непознаница како примена статина утиче на редокс статус у нормолипедијским условима и да ли је у таквим стањима оправдана примена статина у терапијским дозама. Поред тога, поставља се и питање ефикасности статина у третману срчаних болести, као и питање бенефита терапије статинима у најранијим фазама кардиоваскуларне болести, као и питање механизма којима статини оставрују своје ефекте.

Као што је објашњено у уводном делу докторске дисертације, оксидативни стрес је дефинисан као неравнотежа између производње реактивних врста и одбране од стране антиоксиданата. Он може бити резултат повећане производње реактивних врста и смањеног нивоа антиоксиданаса. Различите студије показују да редокс реакције могу бити кључни фактор за настанак атеросклерозе, васкуларне хипертрофије и тромбозе код животиња са хиперхомоцистеинемијом (224-262).

Одређивањем нивоа про-оксидантних молекула (азот монооксида у форми нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ), супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ ), и водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )) и маркера оксидационих оштећења (индекса липидне пероксидације мереног као (TBARS)) у коронарном венском ефлуенту и у плазми, смо желели да утврдимо да ли хиперхомоцистеинемија изазива негативна дејства на срце путем повећане продукције слободних радикала или је реч о неким другим механизмима? Поред тога, циљ је испитати да ли примена аторвастатина и симвастатина утичу на смањење оксидативним-стресом индукованог оштећења функције срца и у којој мери, што смо проверили и мерењем маркера АОС (CAT, SOD и GSH).

У нашем истраживању, прво смо проверили утицај хиперхомоцистеинемије на продукцију про-оксидационих маркера. У тешкој и умереној хиперхомоцистеинемији доминантан је пораст  $\text{O}_2^-$  и TBARS-а у односу на контролну групу у ефлуенту са доминантним повећањем наведених маркера у умереној хиперхомоцистеинемији, док

мерењем истих параметара у узорку плазме, приметан је доминантан пораст у тешкој хиперхомоцистеинемiji (Графикони бр. 29 и 36).

Дакле, биохемијска основа индукције оксидационог стреса током хиперхомоцистеинемije се налази у објашњењу да хомоцистеин подлеже аутооксидацији. Токсичност хомоцистеина је последица ковалентног везивања хомоцистеина за протеине које је праћено модификацијом њихове функције. Тај процес се зове хомоцистеинилација и представља посттранслациону модификацију протеина. Степен протеинске хомоцистеинилације је пропорционалан повећаном нивоу хомоцистеина у плазми. S-хомоцистеинилација је процес везивања хомоцистеина помоћу слободне тиол групе за другу слободну тиол групу која је заправо Суs остатак у протеинском молекулу при чему се формира дисулфидна веза, што значајно утиче на тиол-зависни редокс статус протеина. Са друге стране, N- хомоцистеинилација је резултат високе реактивности хомоцистеин-тиолактона (Нсу-TL) чија је синтеза катализована метионил- tRNA синтетазе у присуству АТФ. N- хомоцистеинилација постоји када хомоцистеин интерагује са својим аминокиселинама са  $\epsilon$ -амино групом лизинског протеинског остатка која мења и оштећује структуру и функцију модификованог протеина.

Затим, аутооксидацијом хомоцистеина настају кисеонична једињења: супероксид анион радикал ( $O_2^-$ ), хидроксилни радикал (ОН.) и водоник пероксид ( $H_2O_2$ ). Настали супероксид и тиол радикал су интермедијери у овој оксидоредукцији, са крајњим производом, водоник-пероксидом. Директно токсично дејство супероксид анион радикала, се огледа у његовој склоност ка оксидацији липопротеина мале густине (ЛДЛ), односно утицају на повећано преузимање ЛДЛ честица што преставља први корак у настанку пенастих ћелија.

У ефлуенту, под утицајем хомоцистеина нису приметне промене азот монооксида, док у плазми под утицајем хиперхомоцистеинемije приметан је благи пораст овог маркера, који није значајан. Ендотелна дисфункција представља основни патофизиолошки супстрат ефеката хомоцистеина у коронарној васкулатури. Као што је поменуто у уводном излагању, коронарни ендотел, захваљујући продукцији ендогених контролних молекула (пре свега NO и аденозина), има есенцијалну улогу у контроли коронарног васкуларног тонуса, односно адекватне перфузије срца. Поремећаји функције ендотела у коронарној васкуларној мрежи, на тај начин воде у губитак физиолошке перфузије миокарда и самим тим повећавају ризик од настанка инфаркта.

Основни механизам оштећења коронарног ендотела представља међусобна зависност повећане продукције слободних радикала и/или смањене биорасположивости NO.

У једној од студија на пацовима је показано да хомоцистеин може довести до повећане продукције ROS и последичног смањења NO, што узрокује редукцију коронарног протока и поремећај функције миокарда (258, 262). Наиме, сматра се хомоцистеин индукује повећано стварање бројних оксидаза (нарочито NADPH оксидаза) у коронарном ендотелу, које су богат васкуларни извор  $O_2^-$ . Ова ROS, као изузетно токсична и реактивна, лако ступа у интеракцију са NO, што доводи до стварања још токсичнијег ONOO- (који са своје стране оштећује ендотел) и тако смањене биорасположивости NO (224, 269). Последица свих ових процеса представља оштећење ендотела, поремећај његовог вазодилаторног одговора (смањење протока) и ендотелну дисфункцију. Занимљиво је да и у хуманој популацији хомоцистеин смањује CF описаним механизмима (262). Наши резултати су делимично у сагласности на наведеним студијама, а као потенцијално објашњење за настанак овакве појаве претпоставља се да је дужина трајања хиперхомоцистеиније, за коју претпостављамо да је трајала 15-20 дана, обзиром да је било потребно времена да се храном обогаћеном метионином индукује хиперхомоцистеинија, а која у овом случају није била довољна да доведе до појаве повећања свих про-оксидационих маркера.

Важно је нагласити да током хиперхомоцистеиније настаје липидна пероксидација, процес током којег настају слободни радикали, а која вероватно настаје под утицајем хомоцистеина, који утиче на оксидацију LDL-а. Дакле, аутоксидацијом хомоцистеина настаје акумулација снажног оксидативног агенса, водоник пероксида. Тиоли у присуству јона гвожђа имитирају липидну пероксидацију, продукцију хидроксилног радикала и оксидативно модификованих протеина. Директно токсично дејство супероксид радикала, се огледа у његовој склоности ка оксидацији липопротеина мале густине (ЛДЛ), односно утицају на повећано преузимање ЛДЛ честица од стране "скавенгер" ћелија. Хидроксилни радикали и супероксидни анион, под дејством супероксид дисмутазе или спонтано, конвертује се у  $H_2O_2$ . Водоник пероксид и супероксидни радикали могу инактивирани азот моноксид и створити још јаче оксиданте, насцентни кисеоник и пероксинитрит, који води ка нитритацији тирозина који потом изазива промене у функцији протеина и индукује ћелијску дисфункцију.

Још један од потенцијалних оксидационих механизма путем кога хиперхомоцистеинија нарушава грађу и функцију ендотела, подразумева тзв. оксидационо оштећење ендоплазматског ретикулима (ЕР). Претпоставља се да је оксидациони стрес доминантни молекулски механизам који доводи до настанка фиброзе миокарда. То су потврдиле студије у којима је забележено да хиперхомоцистеинија, оксидативним механизмима, узрокује смрт кардиомиоцита и последичну дисфункцију миокарда, након исхемијско-реперфузионе повреде .

Познавајући механизме којима хиперхомоцистеинија утиче на сигналне путеве који су повезани са последичним оксидативним оштећењем, отвара нам нове потенцијалне терапијске могућности. Познато је да статини утичу на смањење морталитета и да су прва линија лекова који се користе у примарној и секундарној превенцији кардиоваскуларних болести (278, 288).

Даље, под утицајем статина, приметан је пад концентрација скоро свих прооксидационих маркера у ефлуенту, са доминантним утицајем симвастатина и аторвастатина у условима умерене хиперхомоцистеиније (Графикон бр.29-35). Под утицајем статина, концентрације про-оксидационих маркера у плазми  $O_2^-$  и TBARS-а у контролним условима су се значајно смањиле и већем обиму под утицајем симвастатина, док су се вредности  $NO_2^-$  смањиле под утицајем симвастатина и то у умереној хиперхомоцистеинији, док се вредности  $H_2O_2$  нису значајно промениле под утицајем статина (Графикон бр. 42).

*Crespo et al* су упоредили ефекте сторвастатина, симвастатина и правастатина у ниским дозама (10mg) на перформансе срца и оксидативни стрес. Показали су да статини снижавају ниво малонилдиалдехида (MDA) али без утицаја на ниво eNOS и iNOS. Статини своје потенцијално плеиотропно (нелипидско) корисно дејство остварују стимулацијом синтезе NO, чиме долази до побољшања функције ендотела, инхибицијом пролиферације ћелија зида артерије и индукцијом апоптозе, међутим у нашој студији није примећен овакав тренд промене азот монооксида (314). Овакав резултат може бити и позитиван, јер се зна да је биорасположивост азот монооксида у вези са нарушеном ендотелном функцијом. Дакле, ефекти аторвастатина и симвастатина су у условима хиперхомоцистеиније позитивни, али у различитој мери. Про-оскиданти ефекти хиперхомоцистеиније су мање видљиви под утицајем статина, и изгледа да су аторвастатин, а нарочито симвастатин поништили про-оскидантне ефекте хиперхомоцистеиније.

У последњем делу студије, испитивали смо нивое антиоксидативних параметара у условима умерене и тешке хиперхомоцистеинемije, као и улогу статина у побољшању антиоксидативног система заштите. Антиоксидациони заштитни систем (AOS-antioxidant defence system), представља одбрамбену способност организма у борби против оштећења која су настала деловањем реактивних врста кисеоника ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$  и  $^1O_2$ ). Оштећења, која настају деловањем ROS, тумаче се као последица оксидационог стреса. Оксидациони стрес настаје када дође до поремећаја равнотеже између ROS и RNS-а, с једне стране, и заштитног система с друге стране. У том случају вишак произведених ROS регује са липидима, протеинима, нуклеинским киселинама и полисахаридима изазивајући значајна оштећења на ткивима.

У току умерене хиперхомоцистеинемije доминантан је пад свих мерених антиоксидативних маркера (SOD, CAT, GSH), док је у тешкој хиперхомоцистеинемiji тај пад још драматичнији (Графикон бр. 49) у односу на контролну групу. Дакле, устањима хиперхомоцистеинемije дефинитвно долази до слабљења антиоксидативног система заштите, вероватно посредством следећег механизма. Хомоцистеин узрокује *down-regulation* глутатион пероксидазе, кључног генератора интрацелуларне резерве антиоксидантних ензима, сугерирајући заправо да хомоцистеин не контрибуира у настанку оксидативног стреса само повећањем реактивних кисеоничних врста, већ и супресијом антиоксидативне способности ендотелних ћелија.

Пре третмана статинима, нивои GSH-а, CAT и SOD су били значајно редуковани, а након примене статина долази до повећања концентрација ових антиоксидативних маркера. Интересантно је да при већим концентрацијама хомоцистеина у крви симвастатин значајније повећава редуковани глутатион, док при нормалним вредностима хомоцистеина, симвастатин чак смањује вредности овог параметра у односу на деловање аторвастатина. Поново, у условима тешке хиперхомоцистеинемije, симвастатин снажније делује и значајније повећава вредности супероксид дисмутазе у односу на аторвастатин.

Наши резултати су у сагласности са резултатима Wang *et al*, који је потврдио већу антиоксидативну активност симвастатина (315). Са друге стране, Li и сарадници су навели податак да је аторвастатин ефикаснији у редукацији оксидационог стреса у односу на симвастатин (316). Неусаглашеност наших резултат са резултатима наведене

студије вероватно лежи у различитости експерименталних модела, јер су испитивали антиоксидантне ефекте статина у одсуству снажног генератора слободних радикала, хиперхомоцистеинемije.

Један од потенцијалних разлога за већу антиоксидативну способност симвастатина у односу на аторвастатин, може бити разлика у фармаколошким особинама ових статина која резултира различитим антиоксидативним потенцијалом. Заправо, у току свог метаболизма симвастатин се понаша као про-лек и конвертује се до активних метаболита бета хидрокси форми (*simvastatin hydroxy acid (SVA)*), које су веома потентни компетитивни инхибитори HMG-CoA редуктазе. Супротно, метаболизам аторвастатина се примарно одвија преко изоформе цитохрома P4503A4 при чему се формирају активни орто и парахидроксилирани метаболити (*ortho- and parahydroxylated metabolites*) који представљају заправо сву активност аторвастатина, а она чини 70% активности симвастатина. Поред тога, сматра се да снажан антиоксидативни потенцијал симвастатина је последица његове способности да инхибира изопреналин који настаје у циклусу мевалоната као и његове способности да инхибира никотинамид аденин динуклеотид фосфат (317, 318).

Још један разлог ефикасности симвастатина је редукција леукоцита коју остварује симвастатин што директно редукује оксидациони стрес. Други антиоксидативни механизми су инхибиција Nox275, редуковање каталитичке субјединице Nox247, повећање адипонектина који инхибира Nox активацију, повећање супероксид дисмутазе фосфорилацијом Akt41 и S-нитрозилацијом, као и повећањем активности параоксоназе-1, која је одговорна за антиоксидативне особине HDL холестерола. Дакле, различитости у ефектима аторвастатина и симвастатина могу бити и последица фармакокинетских карактеристика, као што је апсорпција, биорасположивост, метаболизам у јетри и полувреме елиминације.

Дакле, наши резултати наводе на сазнање да употреба различитих статина има различите ефекте на оксидативни и антиоксидативни статус током умерене и тешке хиперхомоцистеинемije, и симвастатин показује већи антиоксидациони потенцијал у односу на аторвастатин, независно од нивоа липотеина а зависно од концентрације хомоцистеина у крви.

**6.**

**ЗАКЉУЧЦИ**



## 6. ЗАКЉУЧЦИ

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

- 1) Да хиперхомоцистеинемија узрокује морфометријске карактеристике пацова након 4 недеље трајања, са акцентом на смањење укупне телесне масе при екстремно повишеним вредностима хомоцистеина у крви ( $>65\mu\text{M/L}$ ), односно при тешкој хиперхомоцистеинемији;
- 2) Умерена хиперхомоцистеинемија није узроковала смањење контрактилности миокарда, док је тешка хиперхомоцистеинемија испољила негативно дејство на функцију миокарда и узроковала дијастолну дисфункцију миокарда;
- 3) Негативни ефекти које хиперхомоцистеинемија остварује на срчани мишић посредовани су повећањем реактивних кисеоничних врста и липидне пероксидације (повећање  $\text{O}_2^-$  и TBARS-a) као и смањеном способношћу антиоксидативне заштите (CAT, SOD и GSH) услед хомоцистеином-посредованим оксидационим стресо;
- 4) Испитивани витамини В комплекса (витамин  $\text{B}_9$ ,  $\text{B}_6$ ,  $\text{B}_{12}$ ) имају есенцијалну улогу и метаболизму хомоцистеина и регулацији нивоа хомоцистеина, односно њихова примена има кардипротективну улогу која се остварује снижавањем хомоцистеина у крви;
- 5) У хиперхомоцистеинемији, инхибитори HMG-CoA редуктазе остварују позитивно дејство на кардиоваскуларни систем, снижавањем оксидационог стреса и повећањем антиоксидативне способности;
- 6) Симвастатин је показао снажније антиоксидантно дејство у кардиоваскуларном систему у односу на аторвастатин у терапијски еквивалентним дозама;
- 7) Аторвастатин у току умерене хиперхомоцистеинемије остварује позитивно дејство на контрактилност миокарда и коронарну циркулацију у односу на симвастатин, док у условима тешке хиперхомоцистеинемије, симвастатин остварује већу кардиопротекцију у односу на аторвастатин;

- 8) Аторвастатин и симвастатин имају различите ефекте на контрактилност миокарда, коронарну циркулацију и редокс статус који су зависни од концентрације хомоцистеина а независни од нивоа липида у крви.

# **7.**

# **ЛИТЕРАТУРА**

## 7. ЛІТЕРАТУРА

1. Woese C.R., Olsen G.J., Ibba M., Soll D. Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000;64:202–236.
2. Hunt S. *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids*. Springer; Wien, Austria: 1985. The Non-Protein Amino Acids; pp. 55–138.
3. 33. Rosenthal G.A. *Plant Nonprotein Amino and Imino Acids*. Academic Press; New York, NY, USA: 1982. p. 272.
4. Warnecke P.M., Bestor T.H. Cytosine methylation and human cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 2000;12:68–73.
5. The Nobel Prize in Chemistry. *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2013; 25-98.
6. McCully K.S. Homocystinuria, arteriosclerosis, methylmalonic aciduria, and methyltransferase deficiency: A key case revisited. *Nutr. Rev.* 1992;50:7–12.
7. Stirzaker C., Song J.Z., Ng W., Du Q., Armstrong N.J., Locke W.J., Statham A.L., French H., Pidsley R., Valdes-Mora F., et al. Methyl-CpG-binding protein MBD2 plays a key role in maintenance and spread of DNA methylation at CpG islands and shores in cancer. *Oncogen.* 2016 doi: 10.1038/onc.2016.297.
8. Mudd S.H., Ebert M.H., Scriver C.R. Labile methyl group balances in the human: The role of sarcosine. *Metabolism.* 1980;29:707–720.
9. Stead L.M., Au K.P., Jacobs R.L., Brosnan M.E., Brosnan J.T. Methylation demand and homocysteine metabolism: Effects of dietary provision of creatine and guanidinoacetate. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2001;281:E1095–E1100.
10. Jacobs R.L., Stead L.M., Devlin C., Tabas I., Brosnan M.E., Brosnan J.T., Vance D.E. Physiological regulation of phospholipid methylation alters plasma homocysteine in mice. *J. Biol. Chem.* 2005;280:28299–28305.
11. Wagner C. In: *Folate in Health and Disease*. Bailey L.B., editor. Marcel Dekker; New York, NY, USA: 1995. pp. 23–42.
12. Kerr S.J. Competing methyltransferase systems. *J. Biol. Chem.* 1972;247:4248–4252.
13. Cantoni G.L., Chiang P.K. In: *Natural Sulfur Compounds*. Cavallini D., Gaull G.E., Zappia V., editors. Plenum Press; New York, NY, USA: 1980. pp. 67–80.

14. Faeh D, Chiolero A, Paccaud F. Homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: should we (still) worry about? *Swiss Med Wkly.* 2006 Dec 2; 136(47-48):745-56
15. Venes D, Clarence WT. In: *Taber's Cyclopedic Medical Dictionary.* 21. Venes D, editor. Philadelphia: F.A. Davis; 2005. p. 1089.
16. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet.* 1999 Jul 31; 354(9176):407-13.
17. Harvey RA, Ferrier DR. In: *Lippincott's Illustrated Reviews, Biochemistry.* 5. Rhyner S, editor. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2011. pp. 264–5.
18. Zung M., Pfeifer G.P. Aging and DNA methylation. *BMC Biol.* 2015;13:1733 doi: 10.1186/s12915-015-0118-4.
19. Castro R., Rivera I., Blom H.J., Jakobs C., Tavares de Almeida I. Homocysteine metabolism, hyperhomocysteinaemia and vascular disease: An overview. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2006;29:3–20. doi: 10.1007/s10545-006-0106-5. [PubMed] [Cross Ref]
20. Wang R. Gasotransmitters: Growing pains and joys. *Trends Biochem. Sci.* 2014;39:227–232. doi: 10.1016/j.tibs.2014.03.003.
21. 12. Lee M., Schwab C., Yu S., McGeer E., McGeer P.L. Astrocytes produce the antiinflammatory and neuroprotective agent hydrogen sulfide. *Neurobiol. Aging.* 2009;30:1523–1534.
22. Belalcázar A.D., Ball J.G., Frost L.M., Valentovic M.A., Wilkinson J. Transsulfuration is a significant source of sulfur for glutathione production in human mammary epithelial cells. *ISRN Biochem.* 2013;2013:637897.
23. Brodek P., Olas B. Biochemistry and therapeutic potential of hydrogen sulfide—Reality or fantasy? *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2016;70:820–829.
24. Kožich V., Krijt J., Sokolová J., Melenovská P., Ješina P., Vozdek R., Majtán T., Kraus J.P. Thioethers as markers of hydrogen sulfide production in homocystinurias. *Biochimie.* 2016;126:14–20.
25. Sunden S.L., Renduchintala M.S., Park E.I., Miklasz S.D., Garrow T.A. Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. *Arch. Biochem. Biophys.* 1997;345:171–174.

26. Jakubowski H. The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease. *J. Physiol. Pharmacol.* 2008;59:155–167.
27. Jakubowski H. Homocysteine is a protein amino acid in humans: Implications for homocysteine-linked disease. *J. Biol. Chem.* 2002;277:30425–30428.
28. Manolescu B.N., Oprea E., Farcasanu I.C., Berteanu M., Cercasov C. Homocysteine and vitamin therapy in stroke prevention and treatment: A review. *Acta Biochim. Pol.* 2010;57:467–477.
29. Seshadri S., Beiser A., Selhub J., Jacques P.F., Rosenberg I.H., D'Agostino R.B., Wilson P.W., Wolf P.A. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 2002;346:476–483.
30. Ji C., Kaplowitz N. Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic liver injury. *World J. Gastroenterol.* 2004;10:1699–1708.
31. Chen Z., Karaplis A.C., Ackerman S.L., Pogribny I.P., Melnyk S., Lussier-Cacan S., Chen M.F., Pai A., John S.W., Smith R.S., et al. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum. Mol. Genet.* 2001;10:433–443.
32. Kerr SJ. Competing methyltransferase systems. *J Biol Chem.* 1972 Jul 10; 247(13):4248-52.
33. Cantoni G.L., Chiang P.K. In: *Natural Sulfur Compounds*. Cavallini D., Gaull G.E., Zappia V., editors. Plenum Press; New York, NY, USA: 1980. pp. 67–80.
34. Jakubowski H., Perla-Kaján J., Finnell R.H., Cabrera R.M., Wang H., Gupta S., Kruger W.D., Kraus J.P., Shih D.M. Genetic or nutritional disorders in homocysteine or folate metabolism increase protein N-homocysteinylation in mice. *FASEB J.* 2009;23:1721–1727.
35. Petras M., Tatarkova Z., Kovalska M., Mokra D., Dobrota D., Lehotsky J., Drgova A. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for the neuronal system disorders. *J. Physiol. Pharmacol.* 2014;65:15–23.
36. Sharma G.S., Kumar T., Dar T.A., Singh L.R. Protein N-homocysteinylation: From cellular toxicity to neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta.* 2015;1850:2239–2245.

37. Undas A., Perła J., Lacinski M., Trzeciak W., Kaźmierski R., Jakubowski H. Autoantibodies against N-homocysteinylated proteins in humans: Implications for atherosclerosis. *Stroke*. 2004;35:1299–1304.
38. Raposo B., Rodríguez C., Martínez-González J., Badimon L. High levels of homocysteine inhibit lysyl oxidase (LOX) and downregulate LOX expression in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2004;177:1–8.
39. Gurda D., Handschuh L., Kotkowiak W., Jakubowski H. Homocysteine thiolactone and N-homocysteinylated protein induce pro-atherogenic changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Amino Acids*. 2015;47:1319–1339.
40. Jacobsen D.W. Hyperhomocysteinemia and oxidative stress: Time for a reality check? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2000;20:1182–1184.
41. Dayal S., Arning E., Bottiglieri T., Böger R.H., Sigmund C.D., Faraci F.M., Lentz S.R. Cerebral vascular dysfunction mediated by superoxide in hyperhomocysteinemic mice. *Stroke*. 2004;35:1957–1962.
42. Guo H, Chi J, Xing Y, Wang P. Influence of folic acid on plasma homocysteine levels & arterial endothelial function in patients with unstable angina. *Indian J Med Res*. 2009 Mar; 129(3):279-84.
43. Baszczuk A, Kopczyński. Hyperhomocysteinemia in patients with cardiovascular disease. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2014 Jan 2; 68():579-89.
44. Currò M, Gugliandolo A, Gangemi C, Risitano R, Ientile R, Caccamo D. Toxic effects of mildly elevated homocysteine concentrations in neuronal-like cells. *Neurochem Res*. 2014 Aug; 39(8):1485-95.
45. Tyagi N., Gillespie W., Vacek J.C., Sen U., Tyagi S.C., Lominadze D. Activation of GABA-A receptor ameliorates homocysteine-induced MMP-9 activation by ERK pathway. *J. Cell. Physiol*. 2009;220:257–266.
46. Tyagi N., Moshal K.S., Tyagi S.C., Lominadze D.  $\gamma$ -Aminobutyric acid A receptor mitigates homocysteine-induced endothelial cell permeability. *Endothelium*. 2007;14:315–323.
47. Betzen C., White R., Zehendner C.M., Pietrowski E., Bender B., Luhmann H.J., Kuhlmann C.R. Oxidative stress upregulates the NMDA receptor on cerebrovascular endothelium. *Free Radic. Biol. Med*. 2009;47:1212–1220.

48. Kamat P.K., Vacek J.C., Kalani A., Tyagi N. Homocysteine induced cerebrovascular dysfunction: A link to Alzheimer's disease etiology. *Open Neurol. J.* 2015;9:9–14.
49. Currò M, Gugliandolo A, Gangemi C, Risitano R, Ientile R, Caccamo D. Toxic effects of mildly elevated homocysteine concentrations in neuronal-like cells. *Neurochem Res.* 2014 Aug; 39(8):1485-95.
50. Lacobazzi V., Infantino V., Castegna A., Andria G. Hyperhomocysteinemia: Related genetic diseases and congenital defects, abnormal DNA methylation and newborn screening issues. *Mol. Genet. Metab.* 2014;113:27–33.
51. Antoniadou C., Shirodaria C., Leeson P., Baarholm O.A., Van-Assche T., Cunnington C., Pillai R., Ratnatunga C., Tousoulis D., Stefanadis C. MTHFR 677C > T Polymorphism reveals functional importance for 5-methyltetrahydrofolate, not homocysteine, in regulation of vascular redox state and endothelial function in human atherosclerosis. *Circulation.* 2009;119:2507–2515.
52. Clarke R., Halsey J., Lewington S., Lonn E., Armitage J., Manson J.E., Bønaa K.H., Spence J.D., Nygård O., Jamison R., et al. Effects of lowering homocysteine levels with B vitamins on cardiovascular disease, cancer, and cause-specific mortality: Meta-analysis of 8 randomized trials involving 37,485 individuals. *Arch. Intern. Med.* 2010;170:1622–1631.
53. Huo Y., Li J., Qin X., Huang Y., Wang X., Gottesman R.F., Tang G., Wang B., Chen D., He M., et al. Efficacy of folic acid therapy in primary prevention of stroke among adults with hypertension in China: The CSPPT randomized clinical trial. *JAMA.* 2015;313:1325–1335.
54. Smith D.E., Hornstra J.M., Kok R.M., Blom H.J., Smulders Y.M. Folic acid supplementation does not reduce intracellular homocysteine, and may disturb intracellular one-carbon metabolism. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013;51:1643–1650.
55. Perna A.F., Lanza D., Sepe I., Conzo G., Altucci L., Ingrosso D. Altered folate receptor 2 expression in uraemic patients on haemodialysis: Implications for folate resistance. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2013;28:1214–1224.



56. Kim D.J., Koh J.M., Lee O., Kim N.J., Lee Y.S., Kim Y.S., Park J.Y., Lee K.U., Kim G.S. Homocysteine enhances apoptosis in human bone marrow stromal cells. *Bone*. 2006;39:582–590.
57. Herrmann M., Tami A., Wildemann B., Wolny M., Wagner A., Schorr H., Taban-Shomal O., Umanskaya N., Ross S., Garcia P., et al. Hyperhomocysteinemia induces a tissue specific accumulation of homocysteine in bone by collagen binding and adversely affects bone. *Bone*. 2009;44:467–475.
58. Thaler R., Spitzer S., Rumpler M., Fratzl-Zelman N., Klaushofer K., Paschalis E.P., Varga F. Differential effects of homocysteine and  $\beta$  aminopropionitrile on preosteoblastic MC3T3-E1 cells. *Bone*. 2010;46:703–709.
59. Cao H.X., Gao C.M., Takezaki T., Wu J.Z., Ding J.H., Liu Y.T., Li S.P., Su P., Cao J., Hamajima N., et al. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and susceptibility to colorectal cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev*. 2008;9:203–208.
60. Munjal C., Givvimani S., Qipshidze N., Tyagi N., Falcone J.C., Tyagi S.C. Mesenteric vascular remodeling in hyperhomocysteinemia. *Mol. Cell. Biochem*. 2011;348:99–108.
61. Almadori G., Bussu F., Galli J., Cadoni G., Zappacosta B., Persichilli S., Minucci A., Giardina B., Maurizi M. Serum levels of folate, homocysteine, and vitamin B12 in head and neck squamous cell carcinoma and in laryngeal leukoplakia. *Cancer*. 2005;103:284–292.
62. Kato I., Dnistrian A.M., Schwartz M., Toniolo P., Koenig K., Shore R.E., Akhmedkhanov A., Zeleniuch-Jacquotte A., Riboli E. Serum folate, homocysteine and colorectal cancer risk in women: A nested case-control study. *Br. J. Cancer*. 1999;79:1917–1922.
63. Sun C.F., Haven T.R., Wu T.L., Tsao K.C., Wu J.T. Serum total homocysteine increases with the rapid proliferation rate of tumor cells and decline upon cell death: A potential new tumor marker. *Clin. Chim. Acta*. 2002;321:55–62.
64. Naushad S.M., Reddy C.A., Kumaraswami K., Divyva S., Kotamraju S., Gottumukkala S.R., Digumarti R.R., Kutala V.K. Impact of hyperhomocysteinemia on breast cancer initiation and progression: Epigenetic perspective. *Cell Biochem. Biophys*. 2014;68:397–406.

65. Fryer A.A., Emes R.D., Ismail K.M., Haworth K.E., Mein C., Carroll W.D., Farrell W.E. Quantitative, high-resolution epigenetic profiling of CpG loci identifies associations with cord blood plasma homocysteine and birth weight in humans. *Epigenetics*. 2011;6:86–94.
66. Jayanthi Bai N., Jayakrishnan S. Homocysteine: A Biomarker in neurodegenerative diseases. *Int. J. Biol. Med. Res.* 2015;6:5272–5274.
67. Refsum H., Wesenberg F., Ueland P.M. Plasma homocysteine in children with acute lymphoblastic leukemia: Changes during a chemotherapeutic regimen including methotrexate. *Cancer Res.* 1991;51:828–835.
68. Ozkan Y., Yardim-Akaydin S., Firat H., Caliřkan-Can E., Ardiç S., Simřek B. Usefulness of homocysteine as a cancer marker: Total thiol compounds and folate levels in untreated lung cancer patients. *Anticancer Res.* 2007;27:1185–1189.
69. Iacobazzi V., Castegna A., Infantino V., Andria G. Mitochondrial DNA methylation as a next-generation biomarker and diagnostic tool. *Mol. Genet. Metab.* 2013;110:25–34.
70. Zhang C., Feng Y., Qu S., Wei X., Zhu H., Luo Q., Liu M., Chen G., Xiao X. Resveratrol attenuates doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis in mice through SIRT1-mediated deacetylation of p53. *Cardiovasc. Res.* 2011;90:538–545.
71. Perła-Kaján J., Jakubowski H. Paraoxonase 1 and homocysteine metabolism. *Amino Acids*. 2012;43:1405–1417.
72. Dietary supplement fact sheet. Folate. Health Information. Office of Dietary Supplements, US National Institutes of Health; 2014. Available from:<http://ods.od.nih.gov/factsheets/Folate-HealthProfessional>.
73. Weinstein SJ, Hartman TJ, Stolzenberg-Solomon R, Pietinen P, Barrett MJ, Taylor PR, et al. Null association between prostate cancer and serum folate, vitamin B(6), vitamin B(12), and homocysteine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003; 12(11 Pt 1):1271-2.
74. Botez MI. Folate deficiency and neurological disorders in adults. *Med Hypotheses*. 1976; 2(4):135-40.
75. Weinstein SJ, Hartman TJ, Stolzenberg-Solomon R, Pietinen P, Barrett MJ, Taylor PR, et al. Null association between prostate cancer and serum folate,

- vitamin B(6), vitamin B(12), and homocysteine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003; 12(11 Pt 1):1271-2
76. Hoffbrand AV, Weir DG. The history of folic acid. *Br J Haem.* 2001; 113(3):579-89.
  77. Wills L. Treatment of “pernicious anaemia of pregnancy” and “tropical anaemia” with special reference to yeast extract as curative agent. *Brit Med J.* 1931; 1(3676):1059-64.
  78. Mitchell HK, Snell EE, Williams RJ. The concentration of folic acid. *J Amer Chem Soc.* 1941; 63:2284.
  79. Angier RB, Boothe JH, Hutchings BL, Mowat JH, Semb J, Stokstad EIR, et al. Synthesis of a compound identical with the L. casei factor isolated from liver. *Science.* 1945; 102(2644):227-8.
  80. Hanes EM. Diagnostic criteria and resistance to therapy in the sprue syndrome. *Am J Med Sci.* 1942; 204(3):436-43.
  81. Davidson LSP, Girdwood RH, Innes EM. Folic acid in the treatment of sprue syndrome. *Lancet.* 1947; i:511-15.
  82. Canadian Nutrient File (Dietitian of Canada); 2010. Available from: [www.hc-sc.gc.ca/fn-an/nutrition/fiche-nutri-data/index-eng.php](http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/nutrition/fiche-nutri-data/index-eng.php).
  83. Carmel R. Folic acid. In: Shils M, Shike M, Ross A, Caballero B, Cousins R. *Modern nutrition in health and disease.* Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. p.470-81.
  84. Institute of Medicine Food and Nutrition Board. *Dietary reference intakes: thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline.* Washington, DC: National Academy Press, 1998.
  85. Bailey LB, Gregory JF 3rd. Folate. In: Bowman B, Russell R (eds.). *Present Knowledge in Nutrition.* Washington DC: International Life Sciences Institute, 2006. p.278-301
  86. Oka T. Vitamin B6. *Nippon Rinsho* 1999;57:2199-2204.
  87. Merrill AH Jr, Henderson JM. Vitamin B6 metabolism by human liver. *Ann N Y Acad Sci* 1990;585:110-117.
  88. Leklem JE. Vitamin B6:a status report. *J Nutr* 1990;120:1503-1507.
  89. Haas E. *Staying Healthy with Nutrition. The Complete Guide to Diet and Nutritional Medicine.* Berkeley, CA: Celestial Arts Publishing; 1992:122.

90. Parker TH, Marshall JP 2d, Roberts RK, et al. Effect of acute alcohol ingestion on plasma pyridoxal 5'-phosphate. *Am J Clin Nutr* 1979;32:1246-1252.
91. Labadarios D, Rossouw JE, McConnell JB, et al. Vitamin B6 deficiency in chronic liver disease – evidence for increased degradation of pyridoxal-5-phosphate. *Gut* 1977;18:23-27.
92. Marz R. *Medical Nutrition from Marz. A Textbook in Clinical Nutrition.* Portland, OR: Omni Press; 1997:211.
93. Bender D. Non-nutritional uses of vitamin B6. *Br J Nutr* 1999;81:7-20.
94. Mason DY, Emerson PM. Primary acquired sideroblastic anemia: response to treatment with pyridoxal-5-phosphate. *Br Med J* 1973;1:389-390.
95. Hines JD, Cowan DH. Studies on the pathogenesis of alcohol-induced sideroblastic bone marrow abnormalities. *N Engl J Med* 1970;283:441-446.
96. Natta CL, Reynolds RD. Apparent vitamin B6 deficiency in sickle cell anemia. *Am J Clin Nutr* 1984;40:235-239.
97. Kark JA, Kale MP, Tarassoff PG, et al. Inhibition of erythrocyte sickling in vitro by pyridoxal. *J Clin Invest* 1978;62:888-891.
98. Kark JA, Tarassoff PG, Bongiovanni R. Pyridoxal phosphate as an antisickling agent in vitro. *J Clin Invest* 1983;71:1224-1229.
99. Fuhr JE, Farrow A, Nelson HS Jr. Vitamin B6 levels in patients with carpal tunnel syndrome. *Arch Surg* 1989;124:1329-1330.
100. Ellis JM. Treatment of carpal tunnel syndrome with vitamin B6. *South Med J* 1987;80:882-884.
101. Ellis J, Folkers K, Watanabe T, et al. Clinical results of a cross-over treatment with pyridoxine and placebo of the carpal tunnel syndrome. *Am J Clin Nutr* 1979;32:2040-2046.
102. Spooner GR, Desai HB, Angel JF, et al. Using pyridoxine to treat carpal tunnel syndrome. Randomized control trial. *Can Fam Physician* 1993;39:2122-2127.
103. Stransky M, Rubin A, Lava NS, Lazaro RP. Treatment of carpal tunnel syndrome with vitamin B6: a double blind study. *South Med J* 1989;82:841-842.
104. Banerjee R. *Cobalamin Coenzymes and Vitamin B12.* John Wiley & Sons, Ltd; 2001. eLS.

105. Banerjee R, Vlasie M. Controlling the reactivity of radical intermediates by coenzyme B12 dependent methylmalonyl CoA mutase. *Biochem Soc Transact.* 2002;30(4):621–624. doi: 10.1042/bst0300621.
106. Barker H, Weissbach H, Smyth R. A coenzyme containing pseudovitamin B12 . *PNAS.* 1958;44(11):1093–1097.
107. Berkovitch F, Besad E, Tang K, Enns E, Frey P, Drenan C. A locking mechanism preventing radical damage in the absence of substrate, as revealed by the X-ray structure of lysine 5,6-aminomutase. *PNAS.* 2004;101(45):15870–15875.
108. Bobik TA, Rasche ME. Identification of the human methylmalonyl CoA racemase gene based on the analysis of prokaryotic gene arrangements. Implications for decoding the human genome. *J Biol Chem.* 2001;276(40):37194–37198.
109. Booker S, Licht S, Broderick J, Stubbe J. Coenzyme B12-dependent ribonucleotide reductase: evidence for the participation of five cysteine residues in ribonucleotide reduction. *Biochemistry.* 1994;33(42):12676–12685.
110. Bradbeer C. The clostridial fermentations of choline and ethanolamine. *J Biol Chem.* 1965;240(12):4669–4674.
111. Brooks A, Vlasie M, Banerjee R, Brunold T. Spectroscopic and computational studies on the adenosylcobalamin dependent methylmalonyl-CoA mutase: evaluation of enzymatic contributions to Co-C bond activation in the Co<sup>3+</sup> ground state. *J Am Chem Soc.* 2004;126(26):8167–8180. doi: 10.1021/ja039114b. [PubMed] [Cross Ref]
112. Brooks A, Vlasie M, Banerjee R, Brunold T. Co-C bond activation in methylmalonyl-CoA mutase by stabilization of the post-homolysis product Co<sup>2+</sup>cobalamin. *J Am Chem Soc.* 2005;127(47):16522–16528.
113. Buckel W, Golding B. Glutamate and 2-methyleneglutarate mutase: from microbial curiosities to paradigms for coenzyme B12-dependent enzymes. *Chem Soc Rev.* 1996;5(25):329–337.
114. Cannata JB, Focesi A, Mazumder R, Warner R, Ochoa S. Metabolism of propionic acid in animal tissues: properties of mammalian methylmalonyl coenzyme A mutase. *J Biol Chem.* 1965;240(8):3249–3257.

115. Chowdhury S, Banerjee R. Role of the dimethylbenzimidazole tail in the reaction catalyzed by coenzyme B12 dependent methylmalonyl-CoA mutase. *Biochemistry*. 1999;38(46):15287–15294.
116. Cracan V, Banerjee R. A novel coenzyme B12-dependent interconversion of isovaleryl-CoA and pivalyl-CoA. *J Biol Chem*. 2012;287(6):3723–3732.
117. Cracan V, Padovani D, Banerjee R. IcmF is a fusion between the radical B12 enzyme isobutyryl-CoA mutase and its G-protein chaperone. *J Biol Chem*. 2010;285(1):655–666.
118. Dobson M, Wai T, Leclerc D, Wilson A, Wu X, Doré C, Hudson T, Rosenblatt D, Gravel R. Identification of the gene responsible for the cblA complementation group of vitamin B12 responsive methylmalonic acidemia based on analysis of prokaryotic gene arrangements. *PNAS*. 2002;99(24):15554–15559.
119. Erb T, Rétey J, Fuchs G, Alber B. Ethylmalonyl-CoA mutase from *Rhodobacter sphaeroides* defines a new subclade of coenzyme B12-dependent acyl-CoA mutases. *J Biol Chem*. 2008;283(47):32283–32293.
120. Erfle D, Clark M, Nystrom R, Johnson C. Direct hydrogen transfer by methylmalonyl coenzyme A mutase. *J Biol Chem*. 1964;239(6):1920–1924.
121. Faust L, Babior B. Overexpression, purification and some properties of the AdoCbl-dependent ethanolamine ammonia-lyase from *Salmonella typhimurium*. *Arch Biochem Biophys*. 1992;294(1):50–54.
122. Fenton W, Hack A, Willard H, Gertler A, Rosenberg E. Purification and properties of methylmalonyl coenzyme A mutase from human liver. *Arch Biochem Biophys*. 1982;214(2):815–823.
123. Fenton W, Hack A, Helfgott D, Rosenberg E. Biogenesis of the mitochondrial enzyme methylmalonyl CoA mutase. Synthesis and processing of a precursor in a cell system and in cultures cells. *J Biol Chem*. 1984;259(10):6616–6621.
124. Flavin M, Ortiz PJ, Ochoa S. Metabolism of propionic acid in animal tissues. *Nature*. 1955;176(4487):823–826. doi: 10.1038/176823a0.
125. Forage R, Foster M. Resolution of the coenzyme B12-independent dehydratases of *Klebsiella* sp. and *Citrobacter freundii*. *Biochim Biophys Acta Enzymol*. 1979;569(2):249–258.

126. Froese D, Dobson M, White P, Wu X, Padovani D, Banerjee R, Haller T, Gerlt A, Surette G, Gravel R. Sleeping beauty mutase (sbm) is expressed and interacts with *ygfd* in *Escherichia coli*. *Microbiol Res.* 2009;164(1):1–8.
127. Froese D, Kochan G, Muniz J, Wu X, Gileadi C, Ugochukwu E, Krysztofinska E, Gravel R, Oppermann U, Yue W. Structures of the human GTPase MMAA and vitamin B12-dependent methylmalonyl-CoA mutase and insight into their complex formation. *J Biol Chem.* 2010;285(49):38204–38213.
128. Guest J, Friedman S, Woods D, Smith E. A methyl analogue of cobamide coenzyme in relation to methionine synthesis by bacteria. *Nature.* 1962;195(4839):340–342.
129. Hodgkin D, Kramper J, Mackay M, Pickworth J, Trueblood K, White J. Structure of vitamin B12. *Nature.* 1956;178(4524):64–66.
130. Hubbard PA, Padovani D, Labunska T, Mahlstedt SA, Banerjee R, Drennan CL. Crystal structure and mutagenesis of the metallochaperone MeaB: insight into the causes of methylmalonic aciduria. *J Biol Chem.* 2007;282(43):31308–31316.
131. Janata J, Kogekar N, Fenton W. Expression and kinetic characterization of methylmalonyl CoA mutase from patients with the *mut*– phenotype: evidence for naturally occurring interallelic complementation. *Hum Mol Genet.* 1997;6(9):1457–1464.
132. Jansen R, Kalousek F, Fenton W, Rosenberg E, Ledley F. Cloning of full-length methylmalonyl CoA mutase from cDNA library using the polymerase chain reaction. *Genomics.* 1989;4(2):198–205.
133. Kambo A, Sharma V, Casteel D, Woods V, Pilz R, Boss G. Nitric oxide inhibits mammalian methylmalonyl CoA mutase. *J Biol Chem.* 2005;280(11):10073–10082.
134. Katz J, Chaikoff IL. The metabolism of propionate by rat liver slices and the formation of isosuccinic acid. *J Am Chem Soc.* 1955;77(9):2659–2660.
135. Korotkova N, Lidstrom M. MeaB is a component of the methylmalonyl CoA mutase complex required for protection of the enzyme from inactivation. *J Biol Chem.* 2004;279(14):13652–13658.
136. Korotkova N, Chistoserdova L, Kuksa V, Lidstrom M. Glyoxalate regeneration pathway in the methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1. *J Bacteriol.* 2002;184(6):1750–1758.

137. Kräutler B. Vitamin B12: chemistry and biochemistry. *Biochem Soc Trans.* 2005;33(Pt.4):806–810.
138. Lenhert G, Hodgkin D. Structure of the 5,6-dimethylbenzimidazolylcobamide coenzyme. *Nature.* 1961;192(4806):937–938.
139. Minot M, Murphy W. Treatment of pernicious anemia by a special diet. *JAMA.* 1926;87(7):470–476.
140. Rickes E, Brink N, Koniuszy F, Wood T, Folkers K. Crystalline Vitamin B12 . *Science.* 1948;107(2781):396–397.
141. Li N, Chen L, Muh RW, Li PL. Hyperhomocysteinemia associated with decreased renal transsulfuration activity in Dahl S rats. *Hypertension.* 2006;47:1094–1100.
142. van Guldener C, Stam F, Stehouwer CD. Hyperhomocysteinaemia in chronic kidney disease: focus on transmethylation. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43:1026–1031.
143. Perry IJ, Refsum H, Morris RW, Ebrahim SB, Ueland PM, Shaper AG. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet.* 1995;346:1395–1398.
144. Jager A, Kostense PJ, Nijpels G, Dekker JM, Heine RJ, Bouter LM, Donker AJ, Stehouwer CD. Serum homocysteine levels are associated with the development of (micro)albuminuria: The Hoorn Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:74–81
145. Refsum H, Ueland PM, Nygard O et al. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med,* 1998; 49: 31–62.
146. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol,* 1969; 56: 111–128.
147. Wierzbicki AS. Homocysteine and cardiovascular disease: a review of the evidence. *Diab Vasc Dis Res,* 2007; 4: 143–140.
148. Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K et al. Clinical use and rational management of homocysteine, folic acid, and B vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases. *Z Kardiol,* 2004; 93: 439–453.
149. Ntaios G, Savopoulos C, Grekas P, Hatzitolios A. The controversial role of B-vitamins in cardiovascular risk: an update. *Arch Cardiovasc Dis,* 2009; 102: 847–854. doi: 10.1016/j.acvd.2009.07.002.



150. Selhub J, Jacques PF, Bostom AG et al. Relationship between plasma homocysteine and vitamin status in the Framingham study population. Impact of folic acid fortification. *Public Health Rev*, 2000; 28: 117–145.
151. Debrececi B, Debrececi L. Why do homocysteine lowering B vitamin and antioxidant E vitamin supplementations appear to be ineffective in the prevention of cardiovascular diseases? *Cardiovasc Therap*, 2012; 30: 227–233.
152. Brilakis ES, McConnell JP, Ballman KV et al. Lack of association between plasma homocysteine and angiographic coronary artery disease in the era of fortification of cereal grain flour with folic acid. *Atherosclerosis*, 2002; 165: 375–381.
153. Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *J Am Med Assoc*, 2002; 288: 2015–2022.
154. Peng H, Man C, Xu J. Elevated homocysteine levels and risk of cardiovascular and all-cause mortality: meta-analysis of prospective studies. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2015; 16: 78–86.
155. Waśkiewicz A, Sygnowska E, Broda G. Homocysteine concentration and the risk of death in the adult Polish population. *Kardiol Pol*, 2012; 70: 897–902.
156. He Y, Li Y, Chen Y et al. Homocysteine level and risk of different stroke types: a meta-analysis of prospective observational studies. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2014; 24: 1158–1165.
157. Moller J, Nielsen GM, Tvedegaard KC et al. A meta-analysis of cerebrovascular disease and hyperhomocysteinemia. *Scand J Clin Lab Invest*, 2000; 60: 491–499.
158. Den Heijer M, Rosendaal FR, Blom HJ et al. Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis. *Thromb Haemost*, 1998; 80: 874–877.
159. Yang Q, Botto LD, Erickson JD et al. Improvement in stroke mortality in Canada and United States, 1990 to 2002. *Circulation*, 2006; 113: 1335–1343.
160. Bentley TG, Weinstein MC, Willett WC, Kunz KM. A cost-effectiveness analysis of folic acid fortification policy in United States. *Publ. Health Nutr*, 2009; 12: 455–467.
161. Perk J, De Backer G, Gohlke H et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). *Eur Heart J*, 2013; 33: 1635–1701.

162. Goff DC, Lloyd-Jones DM, Bennett G et al. 2013 ACC/AHA Guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*, 2014; 63: 2935–2959.
163. Braunwald E. Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *N Engl J Med*. 1997;337:1360–1369.
164. Braunwald E. The war against heart failure: the lancet lecture. *Lancet*. 2015;385:812–824.
165. Chiao YA, Rabinovitch PS. The aging heart. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5:a025148.
166. Hamzeh N, Ghadimi F, Farzaneh R, Hosseini SK. Obesity, Heart Failure, and Obesity Paradox. *J Tehran Heart Cent*. 2017;12(1):1-5.
167. Harjola VP, Mebazaa A, Čelutkienė J, Bettex D, Bueno H, Chioncel O Crespo-Leiro MG, Falk V, Filippatos G, Gibbs S, Leite-Moreira A, Lassus J, Masip J, Mueller C, Mullens W, Naeije R, Nordegraaf AV, Parissis J, Riley JP, Ristic A, Rosano G, Rudiger A, Ruschitzka F, Seferovic P, Sztrymf B, Vieillard-Baron A, Yilmaz MB, Konstantinides S. Contemporary management of acute right ventricular failure: a statement from the Heart Failure Association and the Working Group on Pulmonary Circulation and Right Ventricular Function of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail*. 2016 Mar;18(3):226-41.
168. Lakatta EG, Sollott SJ. Perspectives on mammalian cardiovascular aging: humans to molecules. *Comp Biochem Physiol A*. 2002;132:699–721. doi: 10.1016/S1095-6433(02)00124-1. [PubMed] [Cross Ref]
169. Lam CS, Donal E, Kraigher-Krainer E, Vasan RS. Epidemiology and clinical course of heart failure with preserved ejection fraction. *Eur J Heart Fail*. 2011;13:18–28.
170. Lam CS, Rienstra M, Tay WT, Liu LC, Hummel YM, van der Meer P, de Boer RA, van Gelder I, Van Veldhuisen DJ, Voors AA, Hoendermis ES. Atrial fibrillation in heart failure with preserved ejection fraction: association with exercise capacity, left ventricular filling pressures, natriuretic peptides, and left atrial volume. *JACC Heart Fail*. 2017;5:92–98.

171. Ling LH, Kistler PM, Ellims AH, Iles LM, Lee G, Hughes GL, Kalman JM, Kaye DM, Taylor AJ. Diffuse ventricular fibrosis in atrial fibrillation: noninvasive evaluation and relationships with aging and systolic dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60:2402–2408.
172. Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H, Kuwajima G, Mikoshiba K, Just H, Hasenfuss G. Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1995;92:778–784.
173. Najafi A, Sequeira V, Kuster DW, van der Velden J. Beta-adrenergic receptor signalling and its functional consequences in the diseased heart. *Eur J Clin Invest*. 2016;46:362–374.
174. Nakou ES, Parthenakis FI, Kallergis EM, Marketou ME, Nakos KS, Vardas PE. Healthy aging and myocardium: a complicated process with various effects in cardiac structure and physiology. *Int J Cardiol*. 2016;209:167–175.
175. Neuman RB, Bloom HL, Shukrullah I, Darrow LA, Kleinbaum D, Jones DP, Dudley SC., Jr Oxidative stress markers are associated with persistent atrial fibrillation. *Clin Chem*. 2007;53:1652–1657.
176. Ng B, Connors LH, Davidoff R, Skinner M, Falk RH. Senile systemic amyloidosis presenting with heart failure: a comparison with light chain-associated amyloidosis. *Arch Intern Med*. 2005;165:1425–1429.
177. Olivetti G, Melissari M, Capasso JM, Anversa P. Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. *Circ Res*. 1991;68:1560–1568.
178. Forouzanfar MH, Alexander L, Anderson HR, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the global burden of disease study 2013. *Lancet*. 2015;386:2287–2323.
179. Hozawa A, Folsom AR, Sharrett AR, et al. Absolute and attributable risks of cardiovascular disease incidence in relation to optimal and borderline risk factors: comparison of African American with white subjects—atherosclerosis risk in communities study. *Arch Intern Med*. 2007;167:573–579

180. Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69:89–95.
181. Lee B, Lee SW, Kang HR, Kim DI, Sun HY, Kim JH. Relationship between lower urinary tract symptoms and cardiovascular risk scores including Framingham risk score and ACC/AHA risk score. *Neurourol Urodyn.* 2017 Jun 13. doi:10.1002/nau.23320. [Epub ahead of print]
182. Tyagi N, Sedoris KC, Steed M, Ovechkin AV, Moshal KS, Tyagi SC. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:H2649–H2656.
183. Steed MM, Tyagi SC. Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15:1927–194
184. Elhawary NA, Hewedi D, Arab A, Teama S, Shaibah H, Tayeb MT, Bogari N: The MTHFR 677T allele may influence the severity and biochemical risk factors of Alzheimer's disease in an Egyptian population. *Dis Markers* 2013;35:439-446.
185. McCully KS: Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969;56:111-128.
186. Arnesen E, Refsum H, Bonna KH, Ueland PM, Forde OH, Nordrehaug JE: Serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int J Epidemiol* 1995;24:704-709.
187. Homocysteine Studies Collaboration: Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA* 2002;288:2015-2022.
188. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM, Palma-Reis RJ, Boers GH, Sheahan RG, Israelsson B, Uiterwaal CS, Meleady R, McMaster D, Verhoef P, Witteman J, Rubba P, Bellet H, Wautrecht JC, de Valk HW, Sales Luis AC, Parrot-Rouland FM, Tan KS, Higgins I, Garcon D, Medrano MJ, Candito M, Evans AE, Andria G: Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European concerted action project. *JAMA* 1997;277:1775-1781.
189. den Heijer M, Rosendaal FR, Blom HJ, Gerrits WB, Bos GM: Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis. *Thromb Haemost* 1998;80:874-877.

190. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG: A meta-analysis of plasma homocysteine as a risk factor for arteriosclerotic vascular disease and the potential preventive role of folic acid. *Dev Cardiovasc Med* 1997;196:245-249.
191. Ganguly P, Alam SF: Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutr J* 2015;14:6.
192. Hayden MR, Tyagi SC: Homocysteine and reactive oxygen species in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atheroscleropathy: the pleiotropic effects of folate supplementation. *Nutr J* 2004;3:4
193. Gori AM, Corsi AM, Fedi S, Gazzini A, Sofi F, Bartali B, Bandinelli S, Gensini GF, Abbate R, Ferrucci L. A proinflammatory state is associated with hyperhomocysteinemia in the elderly. *Am J Clin Nutr.* 2005;82:335–341.
194. Chen P, Poddar R, Tipa EV, Dibello PM, Moravec CD, Robinson K, Green R, Kruger WD, Garrow TA, Jacobsen DW: Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease. *Adv Enzyme Regul* 1999;39:93-109.
195. Cheng Z, Yang X, Wang H: Hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction. *Curr Hypertens Rev* 2009;5:158-165.
196. Stankevicius E, Kevelaitis E, Vainorius E, Simonsen U: [Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors]. *Medicina (Kaunas)* 2003;39:333-341.
197. Deanfield J, Donald A, Ferri C, Giannattasio C, Halcox J, Halligan S, Lerman A, Mancia G, Oliver JJ, Pessina A, et al; Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension: Endothelial function and dysfunction. Part I: methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the working group on endothelin and endothelial factors of the European society of hypertension. *J*
198. Jin L, Caldwell RB, Li-Masters T, Caldwell RW: Homocysteine induces endothelial dysfunction via inhibition of arginine transport. *J Physiol Pharmacol* 2007;58:191-206.
199. McDowell IF, Lang D: Homocysteine and endothelial dysfunction: a link with cardiovascular disease. *J Nutr* 2000;130(2S suppl):369S-372S.
200. Jacobsen DW: Hyperhomocysteinemia and oxidative stress: time for a reality check? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1182-1184.

201. McCully KS: Chemical pathology of homocysteine. IV. Excitotoxicity, oxidative stress, endothelial dysfunction, and inflammation. *Ann Clin Lab Sci* 2009;39:219-232.
202. Eikelboom JW. Lonn E. Genest J., Jr. Hankey G. Yusuf S. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med.* 1999;131:363–375.
203. Elfering SL. Sarkela TM. Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2002;277:38079–38086.
204. Faraci FM. Hyperhomocysteinemia, a million ways to lose control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:371–373.
205. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem.* 1990;1:228–237.
206. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr.* 1998;157:40–44
207. Friedman AN. Bostom AG. Selhub J. Levey AS. Rosenberg H. The kidney and homocysteine metabolism. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12:2181–2189. [PubMed]
208. Geisel J. Zimbelmann I. Schorr H. Knapp JP. Bodis M. Hubner U. Herrmann W. Genetic defects as important factors for moderate hyperhomocysteinemia. *Clin Chem Lab Med.* 2001;39:698–704.
209. Gerritsen T. Vaughn JG. Weisman HA. The identification of homocysteine in the urine. *Biochem Biophys Res Commun.* 1962;9:493–496.
210. Gibbons GH. Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med.* 1994;330:1431–1438.
211. Green JM. Ballou DP. Matthews RG. Examination of the role of methylenetetrahydrofolate reductase in incorporation of methyltetrahydrofolate into cellular metabolism. *FASEB J.* 1988;2:42–47.
212. Griffiths R. Williams DC. O'Neill C. Dewhurst IC. Ekuwem CE. Sinclair CD. Synergistic inhibition of [3H]muscimol binding to calf-brain synaptic membranes in the presence of L-homocysteine and pyridoxal 5'-phosphate. A possible mechanism for homocysteine-induced seizures. *Eur J Biochem.* 1983;137:467–478.

213. Guttormsen AB. Ueland PM. Svarstad E. Refsum H. Kinetic basis of hyperhomocysteinemia in patients with chronic renal failure. *Kidney Int.* 1997;52:495–502.
214. Hart SR. Mangoni AA. Swift CG. Jackson SH. Effect of methionine loading on pulse wave analysis in elderly volunteers. *Postgrad Med J.* 2006;82:524–527.
215. Hayden MR. Tyagi SC. Intimal redox stress: accelerated atherosclerosis in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis Cardiovasc Diabetol.* 2002;1:3.
216. Hayden MR. Tyagi SC. Homocysteine and reactive oxygen species in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atherosclerosis: the pleiotropic effects of folate supplementation. *Nutr J.* 2004;3:4.
217. Heinecke JS. Superoxide mediated oxidation of low-density lipoproteins by thiols. In: Cerutti PA, editor; Cerutti JM, editor; McCord I, editor; Fridovich I, editor. *Oxy-radicals in Molecular Biology and Pathology.* New York: Liss; 1988. pp. 433–457.
218. Hoffman DR. Cornatzer WE. Duerre JA. Relationship between tissue levels of S-adenosylmethionine, S-adenylhomocysteine, and transmethylation reactions. *Can J Biochem.* 1979;57:56–65.
219. Hofmann MA. Lalla E. Lu Y. Gleason MR. Wolf BM. Tanji N. Ferran LJ. Kohl B. Rao V. Kisiel W. Stern DM. Schmidt AM. Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *J Clin Invest.* 2001;107:675–683.
220. Hultberg B. Andersson A. Sterner G. Plasma homocysteine in renal failure. *Clin Nephrol.* 1993;40:230–234.
221. Jacobsen DW. Catanesu O. DiBello PM. Barbato JC. Molecular targeting by homocysteine: a mechanism for vascular pathogenesis. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43:1076–1083.
222. Jacobsen DW. Gatautis VJ. Green R. Robinson K. Savon SR. Secic M. Ji J. Otto JM. Taylor LM., Jr Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects. *Clin Chem.* 1994;40:873–881.
223. Jencks DA. Matthews RG. Allosteric inhibition of methylenetetrahydrofolate reductase by adenosylmethionine. Effects of adenosylmethionine and NADPH

- on the equilibrium between active and inactive forms of the enzyme and on the kinetics of approach to equilibrium. *J Biol Chem*. 1987;262:2485–2493.
224. Chambers JC, McGregor A, Jean-Marie J, Obeid OA, Kooner JS. Demonstration of rapid onset vascular endothelial dysfunction after hyperhomocysteinemia: an effect reversible with vitamin C therapy. *Circulation*. 1999;99:1156–1160.
225. Kanani PM, Sinkey CA, Browning RL, Allaman M, Knapp HR, Haynes WG. Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans. *Circulation*. 1999;100:1161–1168.
226. Nappo F, De Rosa N, Marfella R, De Lucia D, Ingrosso D, Perna AF, Farzati B, Giugliano D. Impairment of endothelial functions by acute hyperhomocysteinemia and reversal by antioxidant vitamins. *JAMA*. 1999;281:2113–2118.
227. Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest*. 1986;77:1370–1376.
228. Misra HP. Generation of superoxide free radical during the autoxidation of thiols. *J Biol Chem*. 1974;249:2151–2155.
229. Jacobsen DW, Troxell LS, Brown KL. Catalysis of thiol oxidation by cobalamins and cobinamides: reaction products and kinetics. *Biochemistry*. 1984;23:2017–2025.
230. Mansoor MA, Ueland PM, Aarsland A, Svardal AM. Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with homocystinuria. *Metabolism*. 1993;42:1481–1485.
231. Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69:89–95.
232. Redberg RF, Vogel RA, Criqui MH, et al. 34th Bethesda conference: task force #3—what is the spectrum of current and emerging techniques for the noninvasive measurement of atherosclerosis? *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:1886–1898.
233. Hoff J, Wehner W, Nambi V. Troponin in cardiovascular disease prevention: updates and future direction. *Curr Atheroscler Rep*. 2016;18:12



234. Roffi M, Patrono C, Collet JP, et al. 2015 ESC guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: task force for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC) *Eur Heart J*. 2016;37:267–315.
235. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. Bønaa KH, Njølstad I, Ueland PM, Schirmer H, Tverdal A, Steigen T, Wang H, Nordrehaug JE, Arnesen E, Rasmussen K, NORVIT Trial Investigators. *N Engl J Med*. 2006 Apr 13; 354(15):1578-88.
236. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M, McQueen MJ, Probstfield J, Fodor G, Held C, Genest J Jr, Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators. *N Engl J Med*. 2006 Apr 13; 354(15):1567-77.
237. Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial. Toole JF, Malinow MR, Chambless LE, Spence JD, Pettigrew LC, Howard VJ, Sides EG, Wang CH, Stampfer MJ. *JAMA*. 2004 Feb 4; 291(5):565-75.
238. Sattar N, Preiss D, Murray HM, Welsh P, Buckley BM, de Craen AJ, Seshasai SR, McMurray JJ, Freeman DJ, Jukema JW, Macfarlane PW, Packard CJ, Stott DJ, Westendorp RG, Shepherd J, Davis BR, Pressel SL, Marchioli R, Marfisi RM, Maggioni AP, Tavazzi L, Tognoni G, Kjekshus J, Pedersen TR, Cook TJ, Gotto AM, Clearfield MB, Downs JR, Nakamura H, Ohashi Y, Mizuno K, Ray KK, Ford I. Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomised statin trials. *Lancet*. 2010 Feb 27;375(9716):735-42.
239. Barry AR, O'Neill DE, Graham MM. Primary Prevention of Cardiovascular Disease in Older Adults. *Can J Cardiol*. 2016 Sep;32(9):1074-81.
240. Nascimbeni F, Aron-Wisnewsky J, Pais R, Tordjman J, Poitou C, Charlotte F, Bedossa P, Poynard T, Clément K, Ratziu V., LIDO study Group. Statins, antidiabetic medications and liver histology in patients with diabetes with non-alcoholic fatty liver disease. *BMJ Open Gastroenterol*. 2016;3(1):e000075. [PMC free article] [PubMed]

241. Jackevicius CA, Tu JV, Krumholz HM, Austin PC, Ross JS, Stukel TA, Koh M, Chong A, Ko DT. Comparative Effectiveness of Generic Atorvastatin and Lipitor® in Patients Hospitalized with an Acute Coronary Syndrome. *J Am Heart Assoc.* 2016 Apr 19;5(4):e003350.
242. Smith L, Mosley J, Yates J, Caswell L. The New Face of Hyperlipidemia Management: Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Inhibitors (PCSK-9) and Their Emergent Role As An Alternative To Statin Therapy. *J Pharm Pharm Sci.* 2016;19(1):137-46
243. Chopra AS, Miyatani M, Craven BC. Cardiovascular disease risk in individuals with chronic spinal cord injury: Prevalence of untreated risk factors and poor adherence to treatment guidelines. *J Spinal Cord Med.* 2016 Mar 04;:1-8. [PubMed]
244. Bijlsma MJ, Vansteelandt S, Janssen F, Hak E. The effect of adherence to statin therapy on cardiovascular mortality: quantification of unmeasured bias using falsification end-points. *BMC Public Health.* 2016 Apr 11;16:303.
245. Barrett B, Ricco J, Wallace M, Kiefer D, Rakel D. Communicating statin evidence to support shared decision-making. *BMC Fam Pract.* 2016 Apr 06;17:41
246. Qato DM, Lee TA, Durazo-Arvizu R, Wu D, Wilder J, Reina SA, Cai J, Gonzalez F, Talavera GA, Ostfeld RJ, Daviglius ML. Statin and Aspirin Use Among Hispanic and Latino Adults at High Cardiovascular Risk: Findings From the Hispanic Community Health Study/Study of Latinos. *J Am Heart Assoc.* 2016;5(4):e002905.
247. Henderson RM, Lovato L, Miller ME, Fielding RA, Church TS, Newman AB, Buford TW, Pahor M, McDermott MM, Stafford RS, Lee DS, Kritchevsky SB., LIFE Study Investigators. Effect of Statin Use on Mobility Disability and its Prevention in At-risk Older Adults: The LIFE Study. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2016 Nov;71(11):1519-1524
248. Sandhu K, Mamas M, Butler R. Endothelial progenitor cells: Exploring the pleiotropic effects of statins. *World J Cardiol.* 2017 Jan 26;9(1):1-13.
249. Yu M, Tsai SF, Kuo YM. The Therapeutic Potential of Anti-Inflammatory Exerkines in the Treatment of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci.* 2017 Jun 13;18(6). pii: E1260. doi: 10.3390/ijms18061260. Review. PubMed PMID: 28608819.

250. Shaposhnik, Z.; Wang, X.; Trias, J.; Fraser, H.; Lusis, A. The synergistic inhibition of atherogenesis in ApoE<sup>-/-</sup> mice between pravastatin and the sPLA2 inhibitor varespladib (A-002). *J. Lipid Res.* 2009, 50, 623–629.
251. Ridker, P.M.; Rifai, N.; Pfeffer, M.A.; Sacks, F.; Braunwald, E. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The cholesterol and recurrent events (care) investigators. *Circulation* 1999, 100, 230–235.
252. Shepherd, J.; Cobbe, S.M.; Ford, I.; Isles, C.G.; Lorimer, A.R.; MacFarlane, P.W.; McKillop, J.H.; Packard, C.J. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N. Engl. J. Med.* 1995, 333, 1301–1307.
253. The Scandinavian Simvastatin Survival. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994, 344, 1383–1389
254. Nissen, S.E.; Nicholls, S.J.; Sipahi, I.; Libby, P.; Raichlen, J.S.; Ballantyne, C.M.; Davignon, J.; Erbel, R.; Fruchart, J.C.; Tardif, J.C.; et al. Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. *JAMA* 2006, 295, 1556–1565.
255. Nicholls, S.J.; Ballantyne, C.M.; Barter, P.J.; Chapman, M.J.; Erbel, R.M.; Libby, P.; Raichlen, J.S.; Uno, K.; Borgman, M.; Wolski, K.; et al. Effect of two intensive statin regimens on progression of coronary disease. *N. Engl. J. Med.* 2011, 365, 2078–2087.
256. Tsujita, K.; Sugiyama, S.; Sumida, H.; Shimomura, H.; Yamashita, T.; Yamanaga, K.; Komura, N.; Sakamoto, K.; Oka, H.; Nakao, K.; et al. Impact of dual lipid-lowering strategy with ezetimibe and atorvastatin on coronary plaque regression in patients with percutaneous coronary intervention: The multicenter randomized controlled PRECISE-IVUS trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2015, 66, 495–507
257. Cannon, C.P.; Blazing, M.A.; Giugliano, R.P.; McCagg, A.; White, J.A.; Theroux, P.; Darius, H.; Lewis, B.S.; Ophuis, T.O.; Jukema, J.W.; et al. Ezetimibe added to Statin therapy after acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.* 2015, 372, 2387–2397.

258. Catapano, A.L.; Graham, I.; de Backer, G.; Wiklund, O.; Chapman, M.J.; Drexel, H.; Hoes, A.W.; Jennings, C.S.; Landmesser, U.; Pedersen, T.R.; et al. ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias: The Task Force for the Management of Dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS). Developed with the special contribution of the European Association for CVD Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur. Heart J.* 2016, 37, 2999.
259. Zhang R, Ma J, Xia M, Zhu H, Ling WH. Mild hyperhomocysteinemia Induced by feeding Rats Diets Rich in Methionine or Deficient in Folate Promotes Early Atherosclerotic Inflammation Processes. *J Nutr.* 2004: 825-30.
260. Yang R, Huang S, Yan F et al. Danshensu protects vascular endothelia in a rat model of hyperhomocysteinemia. *Acta Pharmacologica Sinica.* 2010: 1395-400.
261. Troen AM. The central nervous system in animal models of hyperhomocysteinemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2005 Sep;29(7):1140-51. Review. PubMed PMID: 16111797.
262. Matthews RG, Elmore CL. Defects in homocysteine metabolism: diversity among hyperhomocyst(e)inemia. *Clin Chem Lab Med.* 2007;45(12):1700-3.
263. Liao R, Podesser BK, Lim CC. The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012 Jul 15;303(2):H156-67.
264. Chen B, Zhang C, Guo A, Song LS. In situ single photon confocal imaging of cardiomyocyte T-tubule system from Langendorff-perfused hearts. *Front Physiol.* 2015 May 6;6:134.
265. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology.* 1984;105:121-126
266. Beutler E. Superoxide dismutase. In: Beutler E, eds. *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods.* Philadelphia, Grune & Stratton:PA; 1984:83-85.
267. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood. *Glutathione. J Lab Clin Med.* 1963;61:882-888.
268. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982;126:131-138.

269. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA, eds. Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton, CRC Press:1985;123-132.
270. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Meth.* 1980;38:161-170.
271. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95:351-358.
272. Bhandari U, Pathan RA, Kumar V, Khanna N. Ameliorative role of atorvastatin on methionine-induced hyperhomocysteinemia and hematological changes in albino rats. *Indian J Exp Biol.* 2011: 132-9.
273. Li L, Jia Z, Xu L, Wu Y, Zheng Q. Expression Profile of Neuro-Endocrine-Immune Network in Rats with Vascular Endothelial Dysfunction. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2014:177-82.
274. Jia F, Wu C, Chen Z, Lu G, Sun J. Atorvastatin attenuates atherosclerotic plaque destabilization by inhibiting endoplasmic reticulum stress in hyperhomocysteinemic mice. *Mol Med Rep.* 2016 Apr;13(4):3574-80.
275. Pang X, Si J, Xu S, Li Y, Liu J. Simvastatin inhibits homocysteine-induced CRP generation via interfering with the ROS-p38/ERK1/2 signal pathway in rat vascular smooth muscle cells. *Vascul Pharmacol.* 2017;88:42-47
276. Sahebkar A, Pirro M, Reiner Ž, Cicero A, Ferretti G, Simental-Mendía M, Simental-Mendía LE. A Systematic Review and Meta-Analysis of Controlled Trials on the Effects of Statin and Fibrate Therapies on Plasma Homocysteine Levels. *Curr Med Chem.* 2016;23(39):4490-4503.
277. Baigent C, Landray MJ, Reith C, Emberson J, Wheeler DC, Tomson C, et al. The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (Study of Heart and Renal Protection): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2011;377:2181–92.
278. Athyros VG, Katsiki N, Mikhailidis DP. Statins, renal function and homocysteine. *Pharmacol Rep.* 2016 Oct;68(5):1093.
279. Pytel E, Jackowska P, Chwatko G, Olszewska-Banaszczyk M, Koter-Michalak M, Kubalczyk P, et al. Intensive statin therapy, used alone or in combination

- with ezetimibe, improves homocysteine level and lipid peroxidation to a similar degree in patients with coronary artery diseases. *Pharmacol Rep* 2016;68: 344–8.
280. Couce ML, Vitoria I, Aldámiz-Echevarría L, Fernández-Marmiesse A, Roca I, Llarena M, Sánchez-Pintos P, Leis R, Hermida A. Lipid profile status and other related factors in patients with Hyperphenylalaninaemia. *Orphanet J Rare Dis.* 2016;11(1):123.
281. Lupton JR, Quispe R, Kulkarni K, Martin SS, Jones SR. Serum homocysteine is not independently associated with an atherogenic lipid profile: The Very Large Database of Lipids (VLDL-21) study. *Atherosclerosis.* 2016;249:59-64.
282. Lu D, Li P, Zhou Y, Xu X, Zhang H, Liu L, Tian Z. Association between serum non-high-density lipoprotein cholesterol and cognitive impairment in patients with acute ischemic stroke. *BMC Neurol.* 2016 Aug 26;16(1):154.
283. Wu J, Zhang Q, Yang H, Gao X, Zhou Y, Wang A, et al. Association between non-high-density-lipoprotein-cholesterol levels and the prevalence of asymptomatic intracranial arterial stenosis. *PLoS One.* 2013;8:e65229.
284. Berger JS, McGinn AP, Howard BV, Kuller L, Manson JE, Otvos J, et al. Lipid and lipoprotein biomarkers and the risk of ischemic stroke in postmenopausal women. *Stroke.* 2012;43:958–66.
285. Canoui-Poitrine F, Luc G, Bard JM, Ferrieres J, Yarnell J, Arveiler D, et al. Relative contribution of lipids and apolipoproteins to incident coronary heart disease and ischemic stroke: the PRIME Study. *Cerebrovasc Dis.* 2010;30:252–9.
286. Vladimirova-Kitova LG, Deneva TI, Marinov B. Effect of moderate and high-dose simvastatin on asymmetric dimethylarginine-homocysteine metabolic pathways in patients with newly detected severe hypercholesterolemia. *Cardiovasc Ther.* 2011 Oct;29(5):340-8.
287. Beck B, Bossenmeyer-Pouricé C, Jeannesson E, Richy S, Guéant JL. Increased homocysteinemia is associated with beneficial effects on body weight after long-term high-protein, low-fat diet in rats. *Nutrition.* 2012;28:932-936
288. Park SB, Georgiades A. Changes in body composition predict homocysteine changes and hyperhomocysteinemia in Korea. *J Korean Med Sci.* 2013;28:1015-1020.

289. Karatela RA, Sainani GS. Plasma homocysteine in obese, overweight and hypertensive subjects in Mumbai. *Indian Heart J.* 2009;61(2):156–159.
290. Nabipour I, Ebrahim A, Jafari SM, Vahdat K, Assadi M, Movahed A. et al. The metabolic syndrome is not associated with homocysteinemia: The Persian Gulf healthy heart study. *J Endocrinol Invest.* 2009;32(5):406–410.
291. Vayá A, Carmona P, Badia N, Pérez R, Hernandez MA, Corella D. Homocysteine levels and the metabolic syndrome in a Mediterranean population. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2011;47(1):59–66.
292. Januszek R. Paraoxonase-1 activity and pleiotropic properties of simvastatin in obese and non-obese patients with stable coronary artery disease (CAD). *Przegl Lek.* 2016;73(2):59-66.
293. Capel F, Chabrier G, Pitois E, Rigaudière JP, Le Plenier S, Durand C, Jouve C, de Bandt JP, Cynober L, Moinard C, Morio B. Combining citrulline with atorvastatin preserves glucose homeostasis in a murine model of diet-induced obesity. *Br J Pharmacol.* 2015 Oct;172(20):4996-5008.
294. Food and Drug Administration (2012). FDA drug safety communication: important safety label changes to cholesterol-lowering statin drugs. Available from: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm293101.htm>
295. Liu B, Ma S, Wang T, Zhao C, Li Y, Yin J, Liu C, Gao C, Sun L, Yue W, Yu H, Jia R. A novel rat model of heart failure induced by high methionine diet showing evidence of association between hyperhomocysteinemia and activation of NF-kappaB. *Am J Transl Res.* 2016;8(1):117-24.
296. Song S, Kertowidjojo E, Ojaimi C, Martin-Fernandez B, Kandhi S, Wolin M, Hintze TH. Long-term methionine-diet induced mild hyperhomocysteinemia associated cardiac metabolic dysfunction in multiparous rats. *Physiol Rep.* 2015 May;3(5). pii: e12292.
297. Mendes RH, Mostarda C, Candido GO, Moraes-Silva IC, D'Almeida V, Belló-Klein A, Irigoyen MC, Rigatto K. Moderate hyperhomocysteinemia provokes dysfunction of cardiovascular autonomic system and liver oxidative stress in rats. *Auto Neurosci.* 2014;180:43-7.
298. Joseph J, Joseph L, Devi S, Kennedy RH. Effect of anti-oxidant treatment on hyperhomocysteinemia-induced myocardial fibrosis and diastolic dysfunction. *J Heart Lung Transplant.* 2008 Nov;27(11):1237-41.

299. Joseph J, Joseph L, Shekhawat NS, Devi S, Wang J, Melchert RB, Hauer-Jensen M, Kennedy RH. Hyperhomocysteinemia leads to pathological ventricular hypertrophy in normotensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Aug;285(2):H679-86.
300. Karni SM, Srinivas MT, Thomas PV, Munish K, Mahavir S, Iluiana EF, Phani KP, Neetu T, Jayesh R, Naira M, Walter ER, Michael TT, Suresh CT. Mitochondrial matrix metalloproteinase activation decreases myocyte contractility in hyperhomocysteinemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:890–897.
301. Nasir K, Tsai M, Rosen BD, Fernandes V, Bluemke DA, Folsom AR, Lima JA. Elevated homocysteine is associated with reduced regional left ventricular function: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Circulation*. 2007;115:180-187.
302. Gariglio L, Riviere S, Morales A, Porcile R, Potenzoni M, Fridman O. Comparison of homocysteinemia and MTHFR 677CT polymorphism with Framingham Coronary Heart Risk Score. *Arch Cardiol Mex*. 2014 Apr-Jun;84(2):71-8. doi: 10.1016/j.acmx.2013.12.006. Epub 2014 May 1. PubMed PMID: 24793554.
303. Malik RA, Lone MR, Ahmed A, Koul KA, Malla RR. Maternal hyperhomocysteinemia and congenital heart defects: A prospective case control study in Indian population. *Indian Heart J*. 2017;69(1):17-19.
304. Rafeq Z, Roh JD, Guarino P, Kaufman J, Joseph J. Adverse myocardial effects of B-vitamin therapy in subjects with chronic kidney disease and hyperhomocysteinaemia. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2013;23(9):836-42.
305. Bian B, Yu X, Wang Q, Teng T, Nie J. Atorvastatin protects myocardium against ischemia-reperfusion arrhythmia by increasing Connexin 43 expression: A rat model. *Eur J Pharmacol*. 2015 Dec 5;768:13-20.
306. Benova T, Knezl V, Vicenzova C, Bacova BS, Radosinska J, Tribulova N. Acute anti-fibrillating and defibrillating potential of atorvastatin, melatonin, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid demonstrated in isolated heart model. *J Physiol Pharmacol*. 2015;66(1):83-9.
307. Drapala A, Aleksandrowicz M, Zera T, Sikora M, Skrzypecki J, Kozniwska E, Ufnal M. The effect of simvastatin and pravastatin on arterial blood pressure,



- baroreflex, vasoconstrictor, and hypertensive effects of angiotensin II in Sprague-Dawley rats. *J Am Soc Hypertens.* 2014;8(12):863-71.
308. Rajtík T, Čarnická S, Szobi A, Mesárošová L, Máťuš M, Švec P, Ravingerová T, Adameová A. Pleiotropic effects of simvastatin are associated with mitigation of apoptotic component of cell death upon lethal myocardial reperfusion-induced injury. *Physiol Res.* 2012;61:S33-41.
309. Abdel-Hamid AA, Firgany Ael-D. Atorvastatin alleviates experimental diabetic cardiomyopathy by suppressing apoptosis and oxidative stress. *J Mol Histol.* 2015 Oct;46(4-5):337-45.
310. Fan Y, Yang S, Cao Y, Huang Y. Effects of acute and chronic atorvastatin on cardioprotection of ischemic postconditioning in isolated rat hearts. *Cardiovasc Ther.* 2013;31(4):187-92.
311. Hersi A, Giannoccaro JP, Howarth A, Exner D, Weeks S, Eitel I, Herman RC, Duff H, Ritchie D, Mcrae M, Sheldon R. Statin Induced Regression of Cardiomyopathy Trial: A Randomized, Placebo-controlled Double-blind Trial. *Heart Views.* 2016 Oct-Dec;17(4):129-135.
312. Leoncini M, Toso A, Maioli M, Tropeano F, Badia T, Villani S, Bellandi F. Early high-dose rosuvastatin and cardioprotection in the protective effect of rosuvastatin and antiplatelet therapy on contrast-induced acute kidney injury and myocardial damage in patients with acute coronary syndrome (PRATO-ACS) study. *Am Heart J.* 2014 Nov;168(5):792-7.
313. Ankur Rohillaa, Ayaz Ahmada, M.U.Khanb, Razia Khanamc. A comparative study on the cardioprotective potential of atorvastatin and simvastatin in hyperhomocysteinemic rat hearts. *European Journal of Pharmacology.* Volume 764, 5 October 2015, Pages 48-54.
314. Crespo MJ, Quidgley J (2015) Simvastatin, atorvastatin, and pravastatin equally improve the hemodynamic status of diabetic rats. *World J Diabetes* 6:1168–1178
315. Wang XL, Zhang T, Hu LH, Sun SQ, Zhang WF, Sun Z, Shen LH, He B (2017) Comparison of effects of different statins on contrast-induced acute kidney injury in rats: histopathological and biochemical findings. *Oxid Med Cell Longev.* doi:10.1155/

316. Li J, Sun YM, Wang LF, Li ZQ, Pan W, Cao HY (2010) Comparison of effects of simvastatin versus atorvastatin on oxidative stress in patients with coronary heart disease. *Clin Cardiol* 33:222–227.
317. Variya BC, Patel SS, Trivedi JI et al (2015) Comparative evaluation of HMG CoA reductase inhibitors in experimentally-induced myocardial necrosis: biochemical, morphological and histological studies. *Eur J Pharmacol* 764:283–291
318. Tunceli K, Sajjan SG, Ramey DR et al (2010) Switching from high-efficacy lipid-lowering therapies to simvastatin and lowdensity lipoprotein cholesterol goal attainment in coronary heart disease/coronary heart disease-equivalent patients *J Clin Lipidol* 4(6):491–500.