



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Тања Шобот

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

Докторска дисертација

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

Крагујевац, 2019. године

САДРЖАЈ

1. УВОД	5
1.1. Метионин	5
1.2. Метаболизам метионина	8
1.3. Хомоцистеин	10
1.3.1. Хемијске карактеристике хомоцистеина	10
1.3.2. Метаболизам хомоцистеина	12
1.4. Поремећај метаболизма метионина и хомоцистеина	15
1.4.1. Ензимски поремећаји метаболизма метионина и хомоцистеина	15
1.4.2. Неензимски поремећаји метаболизма метионина и хомоцистеина	17
1.5. Улога хомоцистеина у патофизиологији настанка и развоја кардиоваскуларних болести	22
1.6. Улога хомоцистеина у (дис)функцији ендотела	26
1.7. Улога оксидационог стреса у патофизиологији кардиоваскуларног система	28
1.8. Сумпоровите аминокиселине и неогрански NaHS-значај и примена	31
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	35
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	38
3.1. Материјал	38
3.1.1. Аминокиселине употребљене у студији	38
3.1.2. Супстанце за прављење сложеног Кребсовог раствора	38
3.1.3. Супстанце и реагенси за одређивање параметара оксидационог стреса	38
3.2. Етички аспекти	39
3.3. Протокол студије	39
3.4. Изоловање срца пацова	41
3.5. Лангендорф апарат	42
3.6. Протокол перфузије изолованог органа по Лангендорф техници	44
3.7. Биохемијске анализе	45
3.7.1. Одређивање хомоцистеина (Hcy)	45
3.7.2. Одређивање супероксид ањон радикала (O_2^-)	46
3.7.3. Одређивање водоник пероксида (H_2O_2)	46
3.7.4. Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS)	48
3.7.5. Одређивање азот монооксида у форми нитрита (NO_2^-)	49
3.7.6. Одређивање редукованог глутатиона (GSH)	51
3.7.7. Одређивање супероксид дисмутазе (SOD)	51
3.7.8. Одређивање каталазе (CAT)	51
3.8. Статистичка анализа података	52

4. РЕЗУЛТАТИ	53
4.1. Концентрација хомоцистеина у односу на третман DL-Нсу	53
4.2. Динамика кардиодинамских параметара унутар контролних група пацова	54
4.3. Динамика кардиодинамских параметара унутар експерименталних група пацова	76
4.4. Динамика прооксидационих маркера у коронарном венском ефлуенту унутар контролних група пацова	98
4.5. Динамика прооксидационих маркера у коронарном венском ефлуенту унутар експерименталних група пацова	113
4.6. Прооксидациони маркери у крвној плазми у односу на третман DL-Нсу	129
4.7. Маркери антиоксидационог система заштите	130
5. ДИСКУСИЈА	133
5.1. Ефекти сумповоритих једињења на биорасположивост укупног хомоцистеина	135
5.2. Ефекти сумповоритих једињења на функцију миокарда и коронарни проток	136
5.3. Ефекти сумповоритих аминокиселина на биомаркере оксидационог стреса	140
6. ЗАКЉУЧЦИ	146
7. ЛИТЕРАТУРА	149

УВОД

1. УВОД

1.1. Метионин као аминокиселина

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

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

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

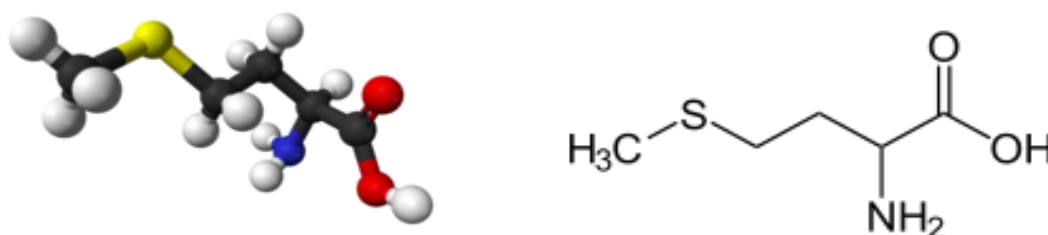
Табела 1. Хемијске особине метионина и других аминокиселина

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

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

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

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



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

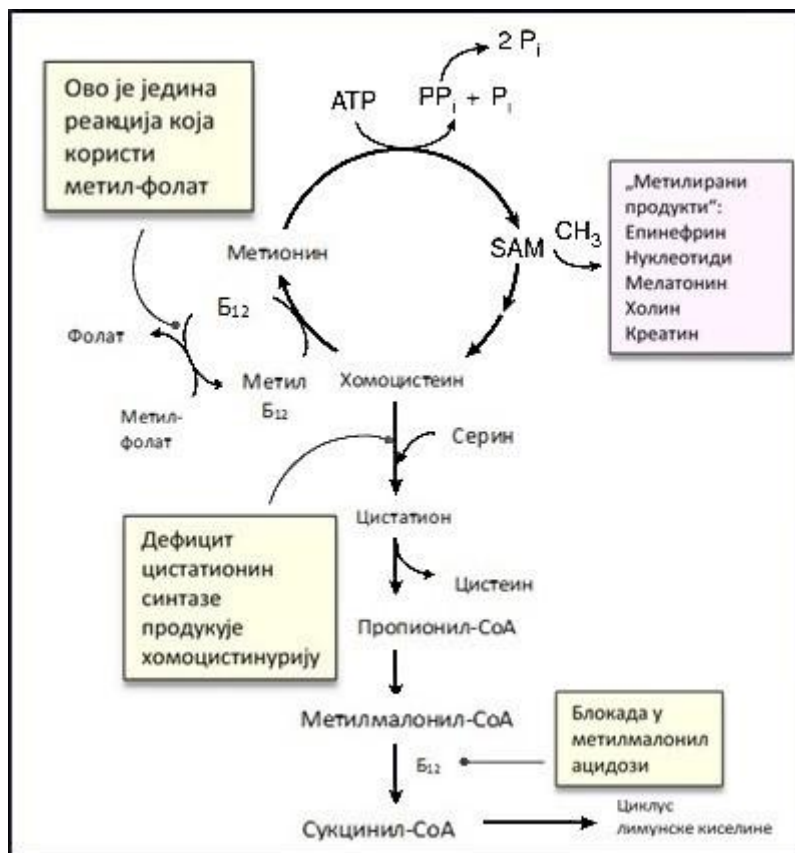
Након уношења метионина оралним путем, апсорпција метионина почиње у горњем делу гастроинтестиналног система, односно у почетном делу танког црева. Укупна количина метионина која се метаболише у гастроинтестиналном тракту након уношења оралним путем је око 20% од укупне унете количине. Метаболисана количина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

1.2. *Метаболизам метионина*

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

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

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



1.3. Хомоцистеин

1.3.1. Хемијске карактеристике хомоцистеина

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

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

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

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

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

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

1.3.2. Метаболизам хомоцистеина

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

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

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

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

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

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

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

1.4. Поремећај метаболизма метионина и хомоцистеина

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

1.4.1. Ензимски поремећаји метаболизма метионина и хомоцистеина

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

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

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

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

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

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

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

1.4.2. Неензимски поремећаји метаболизма метионина и хомоцистеина

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

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

Наследни узроци:

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

Стечени узроци:

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

- лекови

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

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

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

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

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

Генетска мутација која се чешће јавља у односу на остале (учесталост око 40%) је мутација ензима С677 на нуклеотидној позицији 677 гена за МТНFR (68,72). Хомозиготи за термолабилну форму МТНFR имају специфичну активност овог ензима 50% од нормалне активности, док хетерозиготи имају специфичну ензимску активност до 75%. Скорашње студије су показале да се хомозиготна форма ове мутације јавља код 4-10% особа у општој популацији. Овај полиморфизам изазива снижену ензимску активност и термолабилност и представља предуслов појаве благе и умерене хиперхомоцистеинемије, под условом сниженог статуса фолата (74).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5. Улога хомоцистеина у патофизиологији настанка и развоја кардиоваскуларних болести

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.6. Улога хомоцистеина у (дис)функцији ендотела

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

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

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

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

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

Табела 2. Могући механизми настанка атеротромбозе услед хиперхомоцистеинемије

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

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

1.7. Улога оксидационог стреса у патофизиологији кардиоваскуларног система

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

2.1. Општи циљеви

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

2.2. Специфични циљеви:

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

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

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Материјал

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

3.1.1. Аминокиселине и неоргански Na-хидрогенсулфид употребљени у студији

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

3.1.2. Супстанце за прављење сложеног Кребс-Хенселејтовог раствора

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

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

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

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

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

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

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

3.2. *Етички аспекти студије*

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

3.3. *Протокол студије*

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

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

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

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

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

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

3.4. *Изоловање срца пацова*

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

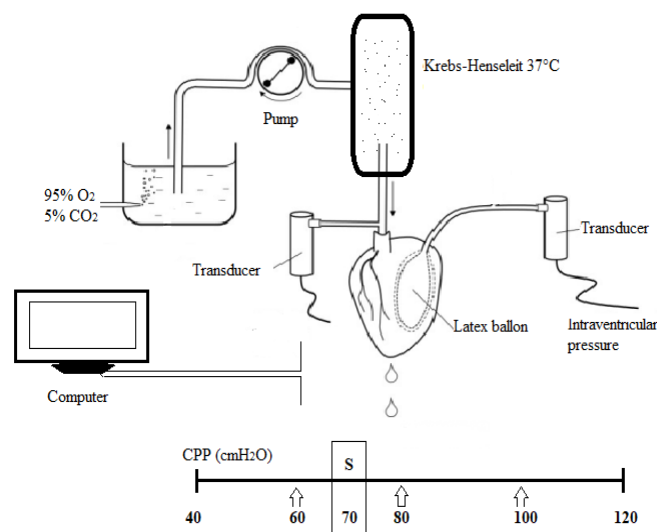
Први корак у низу активности изоловања органа је припрема животиње за општу анестезију и процес увођења у анестезију. Имајући у виду кардиодепресивне ефекте већине општих анестетика, нарочито након дуже експозиције и веће дозе, у нашој студији одлучили смо се за краткотрајну анестезију мешом ксилазин/кетамин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

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

3.5. Лангендорф апарат

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

Слика 3. Лангендорф систем за перфузију изолованог срца пацова



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

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

Основне компоненте овог апарата су:

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

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

3.6. *Протокол перфузије изолованог органа по Лангендорф техници*

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

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

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

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

3.7. Биохемијске анализе

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

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

3.7.1. Одређивање хомоцистеина (Hcy)

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

3.7.2. Одређивање супероксид анјон радикала (O_2^-)

Одређивање количине супероксид анјон радикала (O_2^-) у коронарном венском ефлуенту заснива се на реакцији O_2^- са нитро тетразолијум плавим (Nitro Blue Tetrazolium - NBT) до нитроформазама плавог (155, 156, 157). Спектрофотометријско мерење се врши на таласној дужини максималне апсорпције $\lambda_{\max}=550\text{nm}$. Есејна смеша (“assay mixture”) садржи: 50 mM TRIS-HCl пуфера (pH=8.6), 0.1 mM EDTA, 0.1 mg/ml желатина и 0.1 mM NBT. Пре употребе смеша 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 Кребс-Хенселејтовог раствора. На самом почетку реакције измери се екстинкција смеше и нотира се као екстинкција E_1 . Сваких 60 секунди се врши мешање пластичним штапићем и нотира екстинкција након мешања до своје стабилизације, што подразумева две узастопне приближно исте екстинкције. Последња екстинксија се означава као E_2 . Исти поступак се примењује и за слепу пробу.

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

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

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

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

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

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

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

3.7.3. Одређивање водоник пероксида (H_2O_2)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.7.4. Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS)

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

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

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

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

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

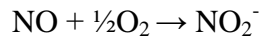
2. Након тога, количина ослобођених TBARS по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин:

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

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

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

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



Биохемијски се ова метода заснива на употреби Griess-реагенса, који са нитритима гради диазо-комплекс, који даје љубичасту боју. Griess-ов реагенс се припрема *ex tempore*, непосредно пре аналитичког одређивања, мешањем једнаких запремина (v/v) 1 % сулфанилне киселине растворене у 5 % орто-фосфорној киселини и 0.1 % воденог раствора: N-(1-нафтил)-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 (NH₄Cl) и натријум тетраборат (Na₂B₄O₇). Амонијачни пуфер, који се у току припеме мора загревати, због изузетно слабе растворљивост натријум тетрабората, има за сврху стабилизацију диазо-комплекса. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћено је 1 ml Кребс-Хенселејтовог раствора.

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

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

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

Екстинкција стандарда-екстинкција слепе пробе

Концентрација NaNO_2 у стандарду

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

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

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

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

3.7.6. Одређивање редукованог глутатиона (GSH)

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

3.7.7. Одређивање супероксид дисмутазе (SOD)

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

3.7.8. Одређивање каталазе (CAT)

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

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

3.8. Статистичка анализа података

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

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

РЕЗУЛТАТИ

4. РЕЗУЛТАТИ

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

4.1. Концентрација хомоцистеина у односу на третман DL-Нсу

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

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

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

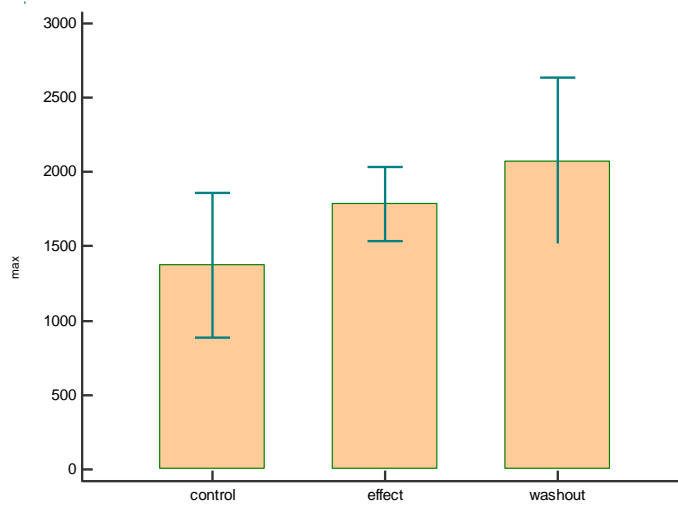
Вредности у табели су приказане као средња вредност измереног параметра \pm стандардна грешка

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

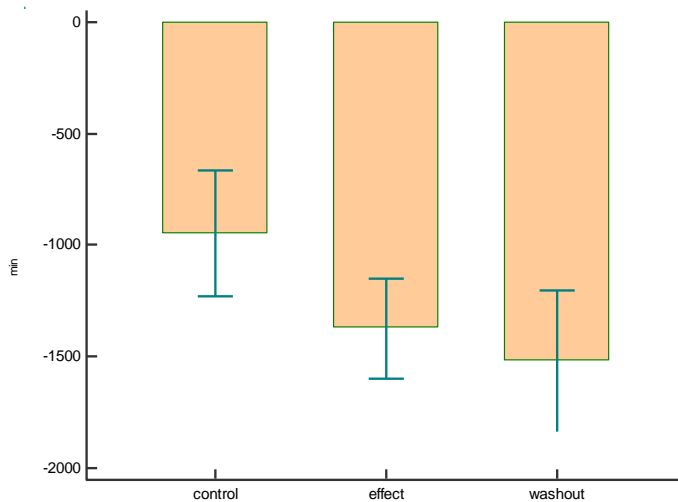
4.2. Динамика кардиодинамских параметара унутар контролних група пацова

4.2.1. Контролна група (CTRL)

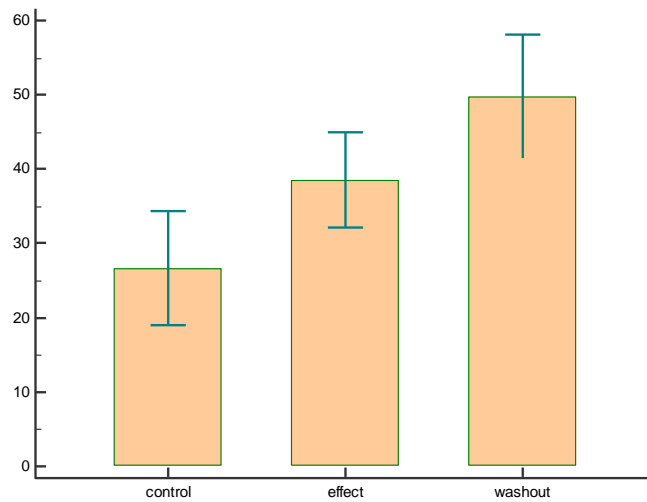
Графикон 1. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{\max}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у контролној групи пацова који нису третирани DL-Нсу



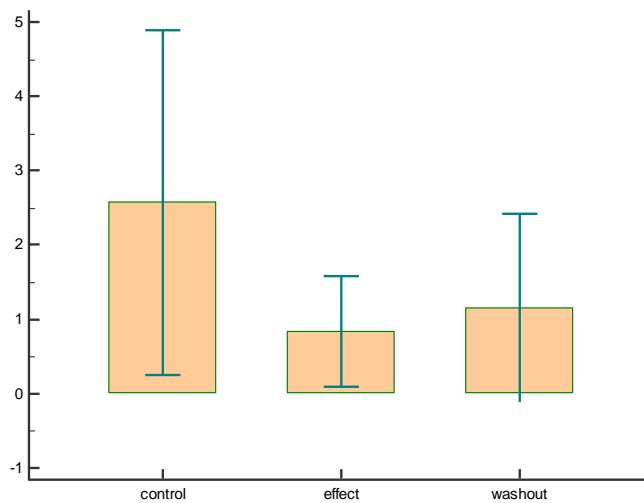
Графикон 2. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{\min}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у контролној групи пацова који нису третирани DL-Нсу



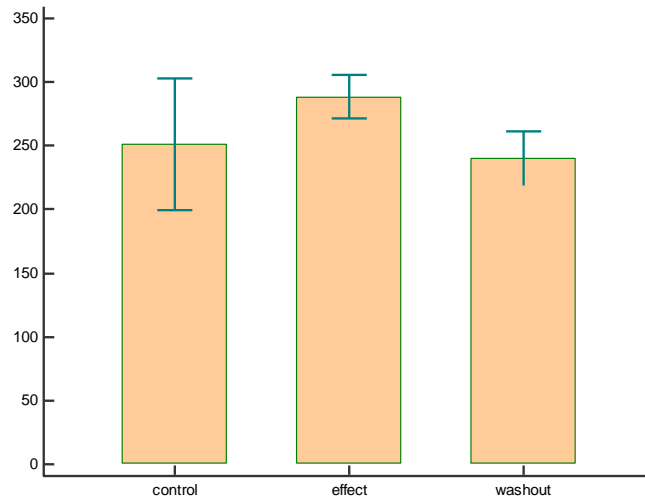
Графикон 3. Систолни притисак у левој комори (SLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у контролној групи пацова који нису третирани DL-Нсу



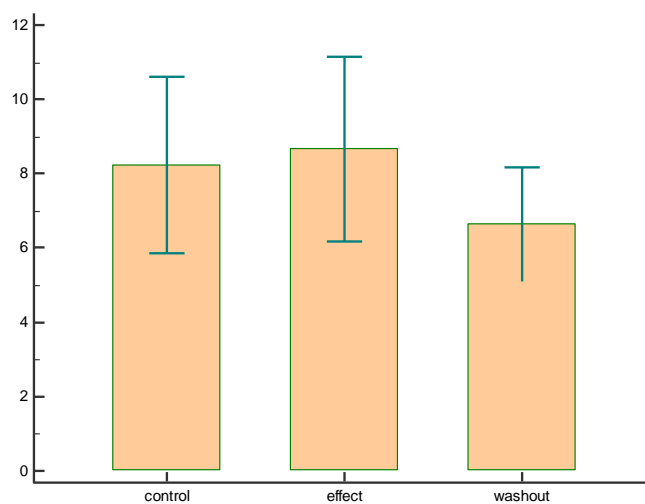
Графикон 4. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у контролној групи пацова који нису третирани DL-Нсу



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

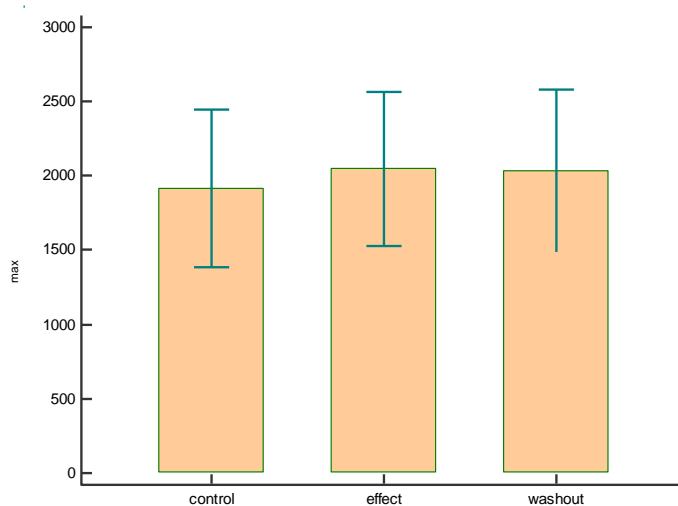


Графикон 6. Коронарни проток (CF) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у контролној групи пацова који нису третирани DL-Нсу

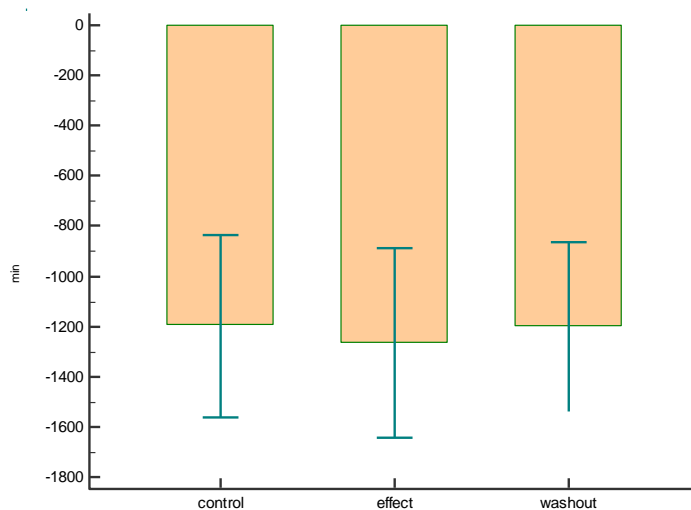


4.2.2. L-метионин група (L-Meth)

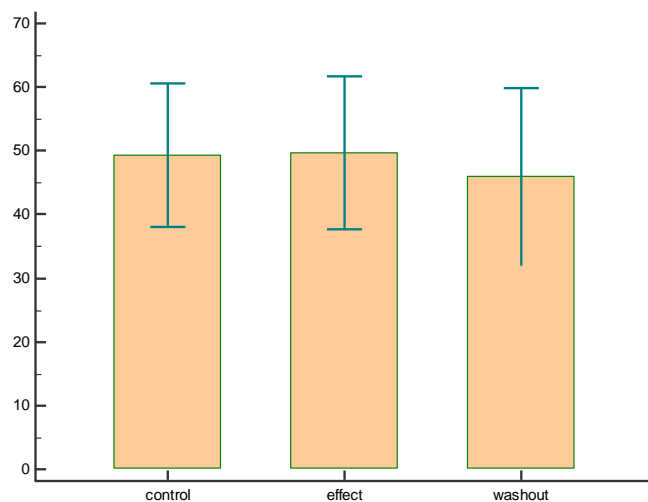
Графикон 7. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{max}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Meth групи пацова



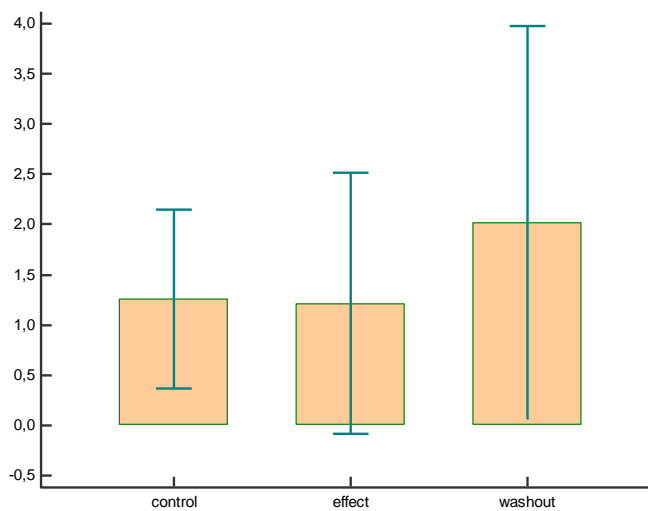
Графикон 8. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{min}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Meth групи пацова



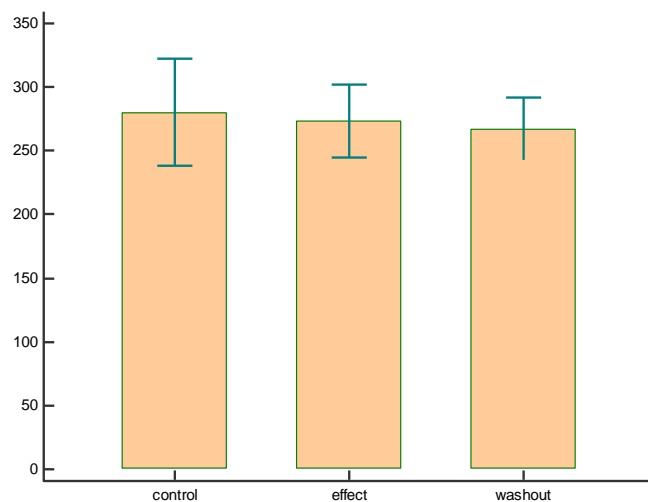
Графикон 9. Систолни притисак у левој комори (SLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Meth групи пацова



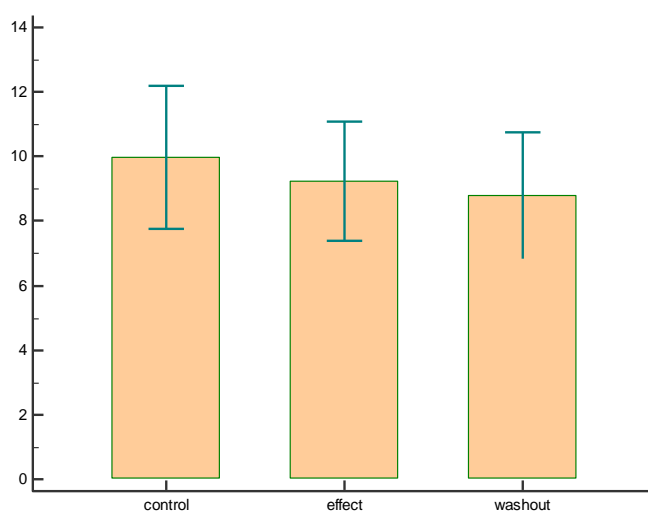
Графикон 10. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Meth групи пацова



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

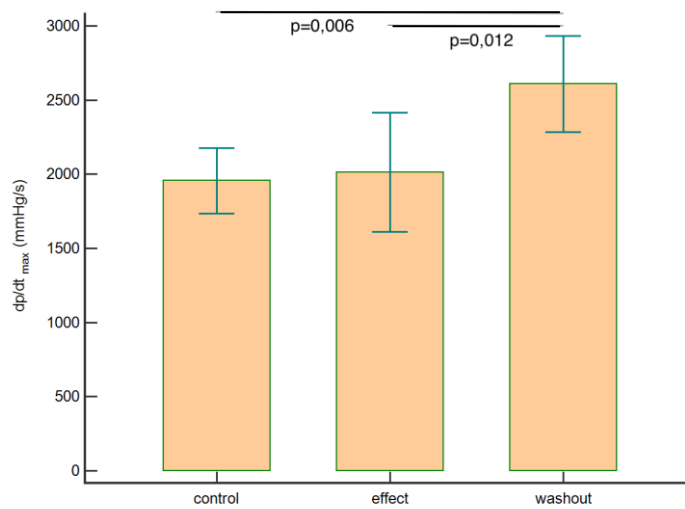


Графикон 12. Коронарни проток (CF) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Meth групи пацова

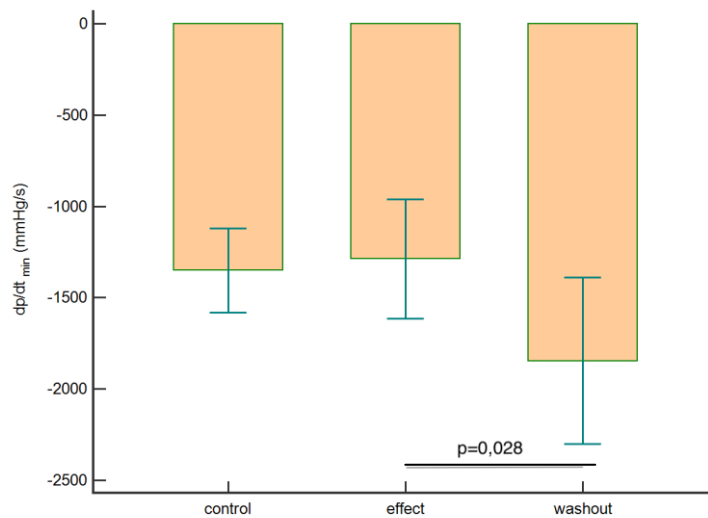


4.2.3. L-цистеин група (L-Cys)

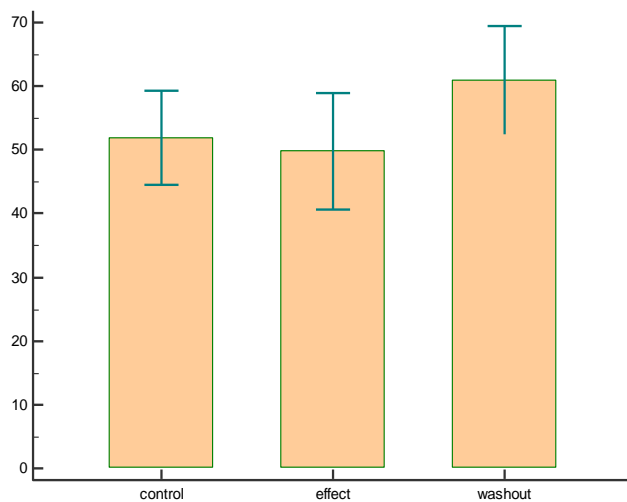
Графикон 13. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{\max}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Cys групи пацова



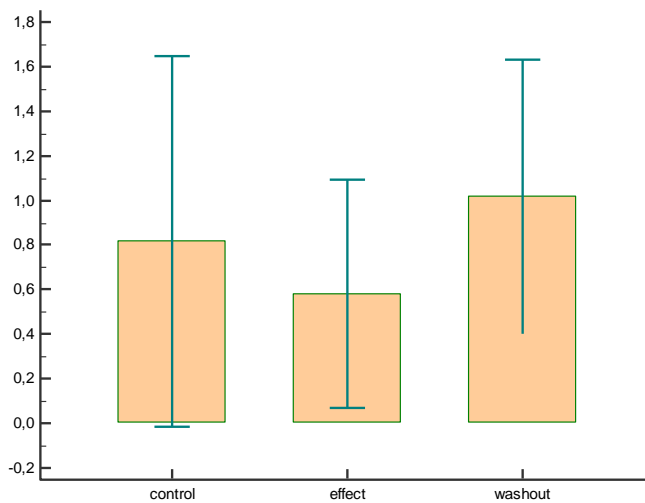
Графикон 14. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{\min}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Cys групи пацова



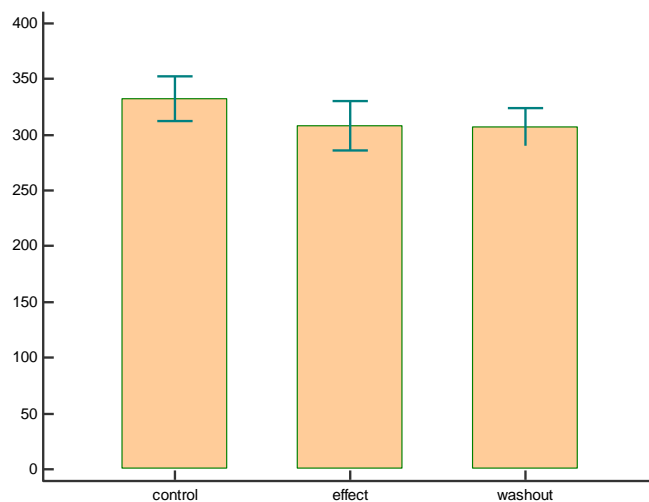
Графикон 15. Систолни притисак у левој комори (SLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Cys групи пацова



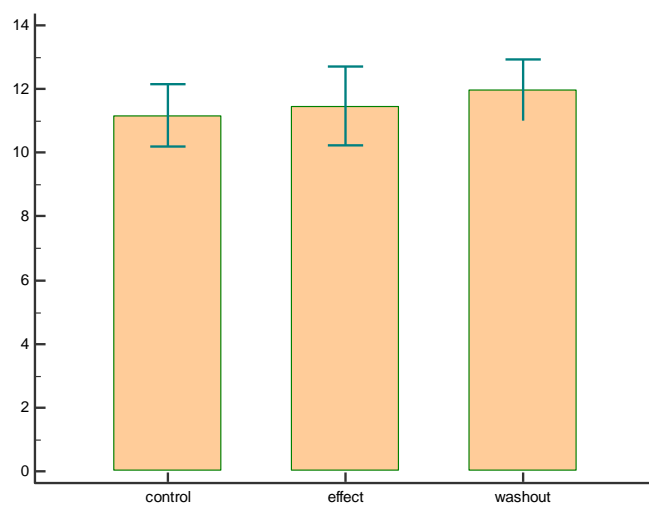
Графикон 16. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Cys групи пацова



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

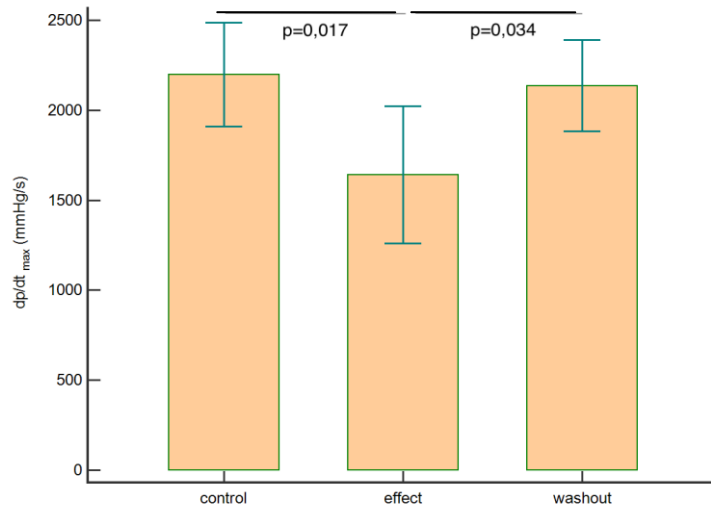


Графикон 18. Коронарни проток (CF) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Cys групи пацова

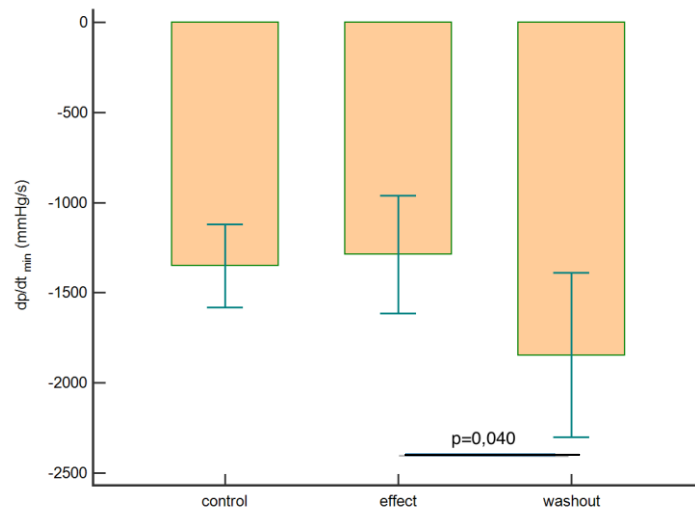


4.2.4. N-ацетилцистеин група (NAC)

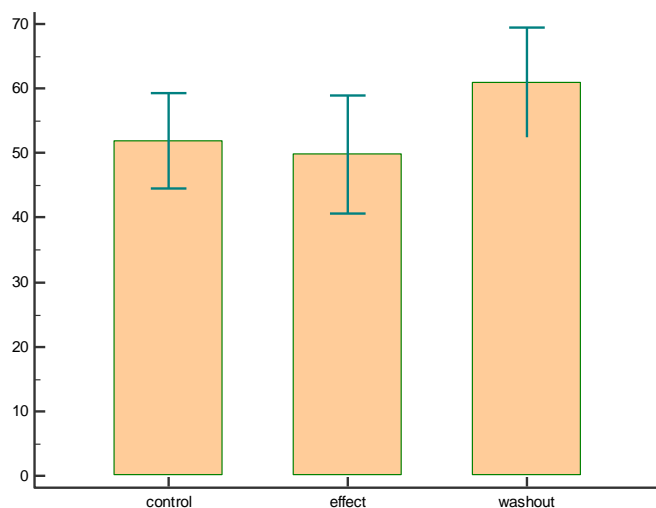
Графикон 19. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{max}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NAC групи пацова



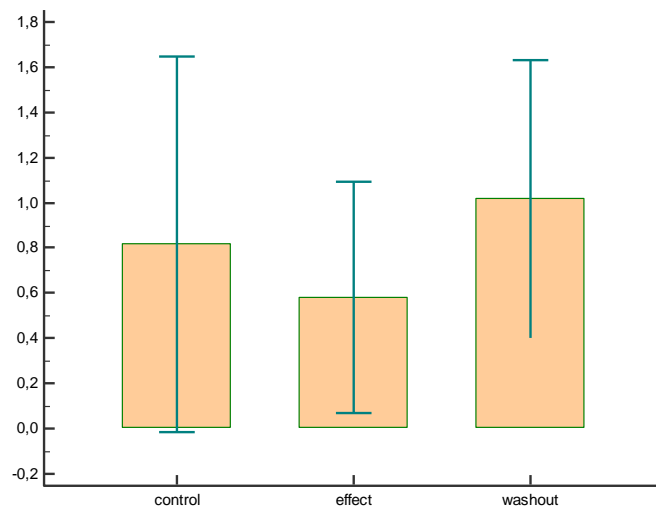
Графикон 20. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{min}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NAC групи пацова



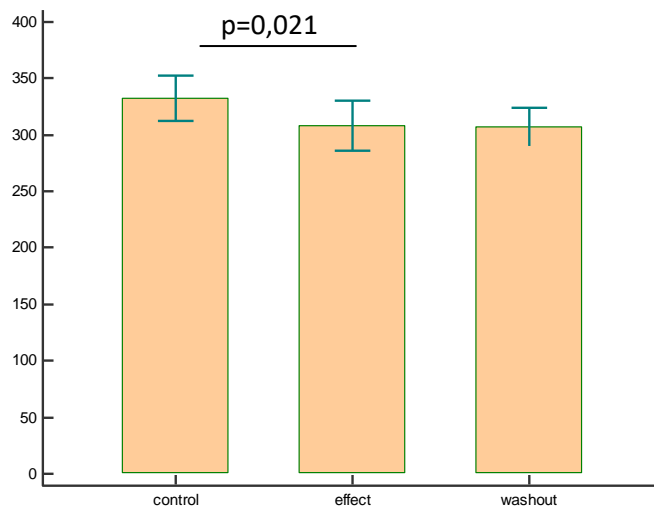
Графикон 21. Систолни притисак у левој комори (SLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NAC групи пацова



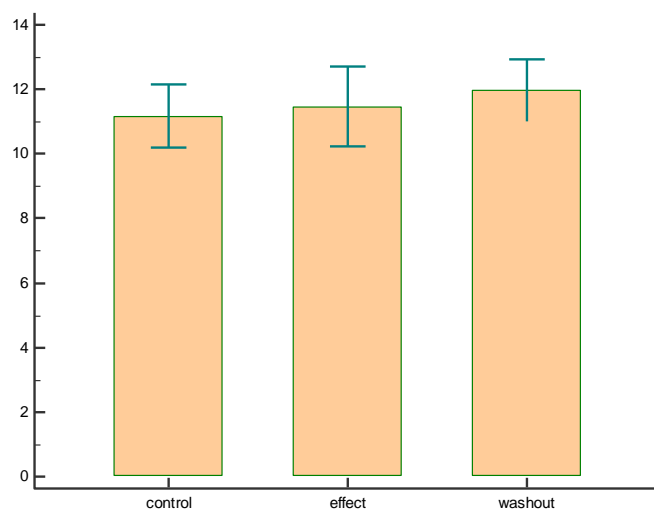
Графикон 22. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NAC групи пацова



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

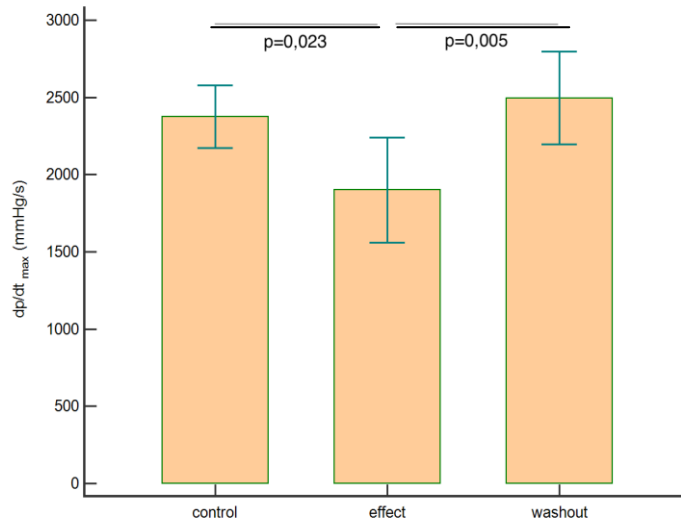


Графикон 24. Коронарни проток (CF) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања НАС (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у НАС групи пацова

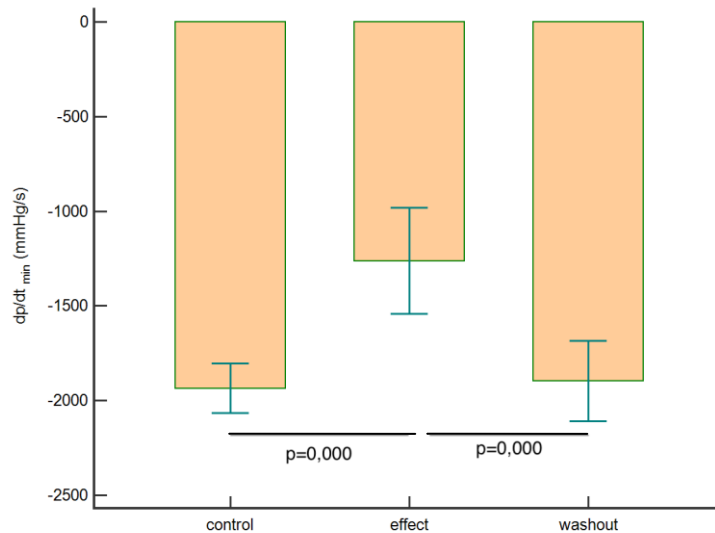


4.2.5. Na-хидрогенсулфид група (NaHS)

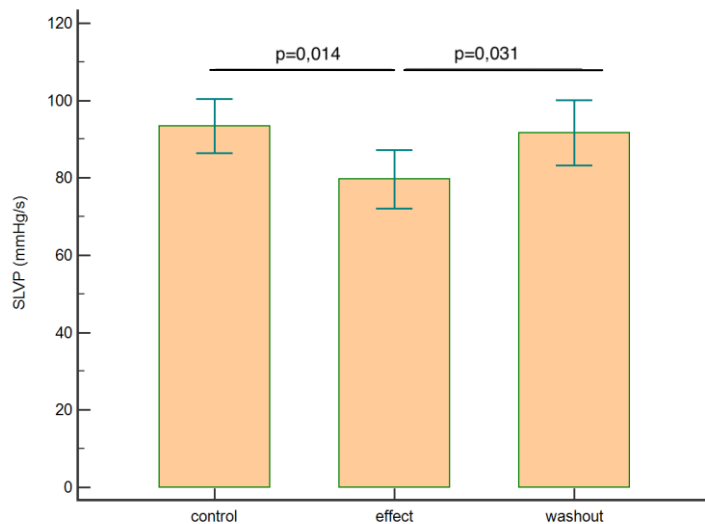
Графикон 25. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{max}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NaHS групи пацова



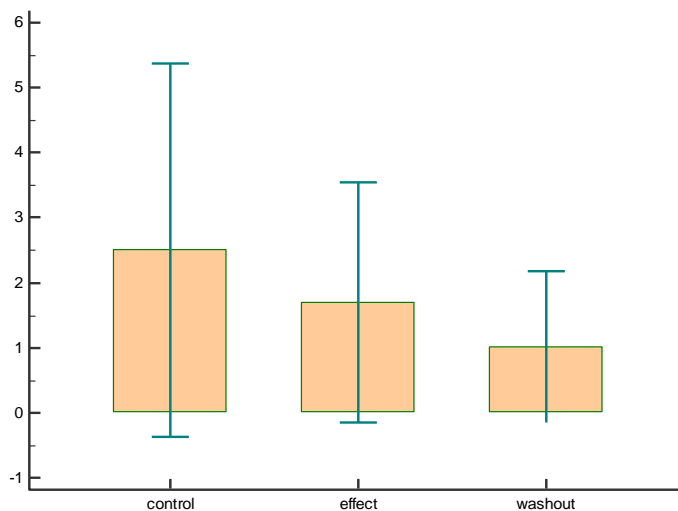
Графикон 26. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{min}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NaHS групи пацова



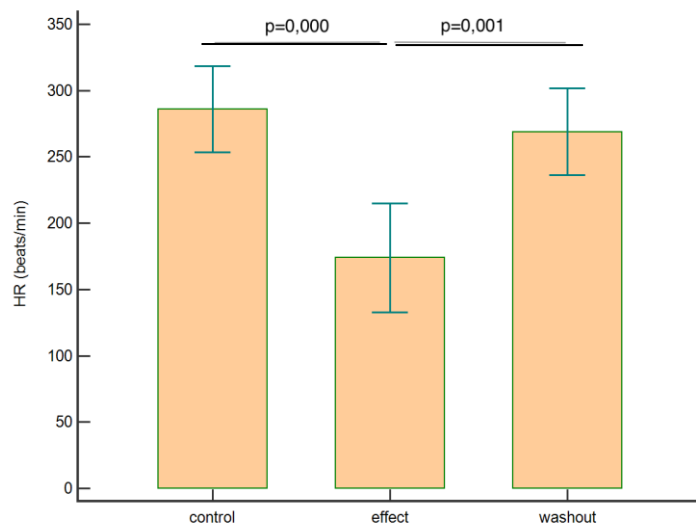
Графикон 27. Систолни притисак у левој комори (SLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NaHS групи пацова



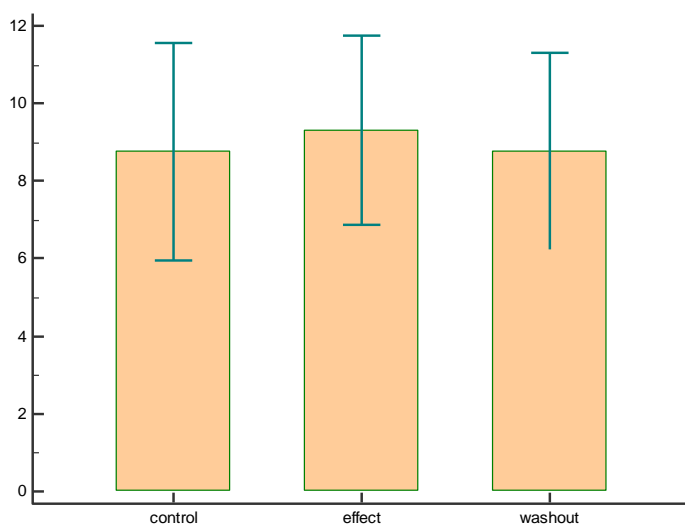
Графикон 28. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NaHS групи пацова



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



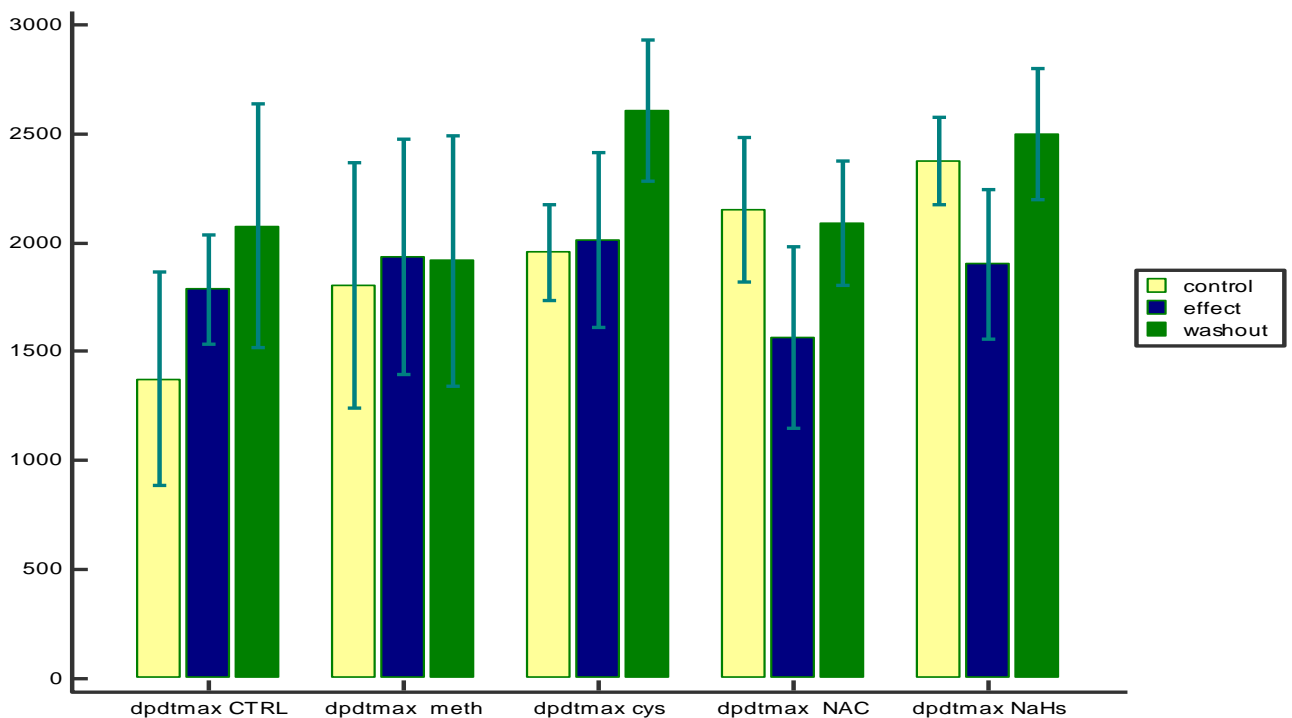
Графикон 30. Коронарни проток (CF) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NaHS групи пацова



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

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

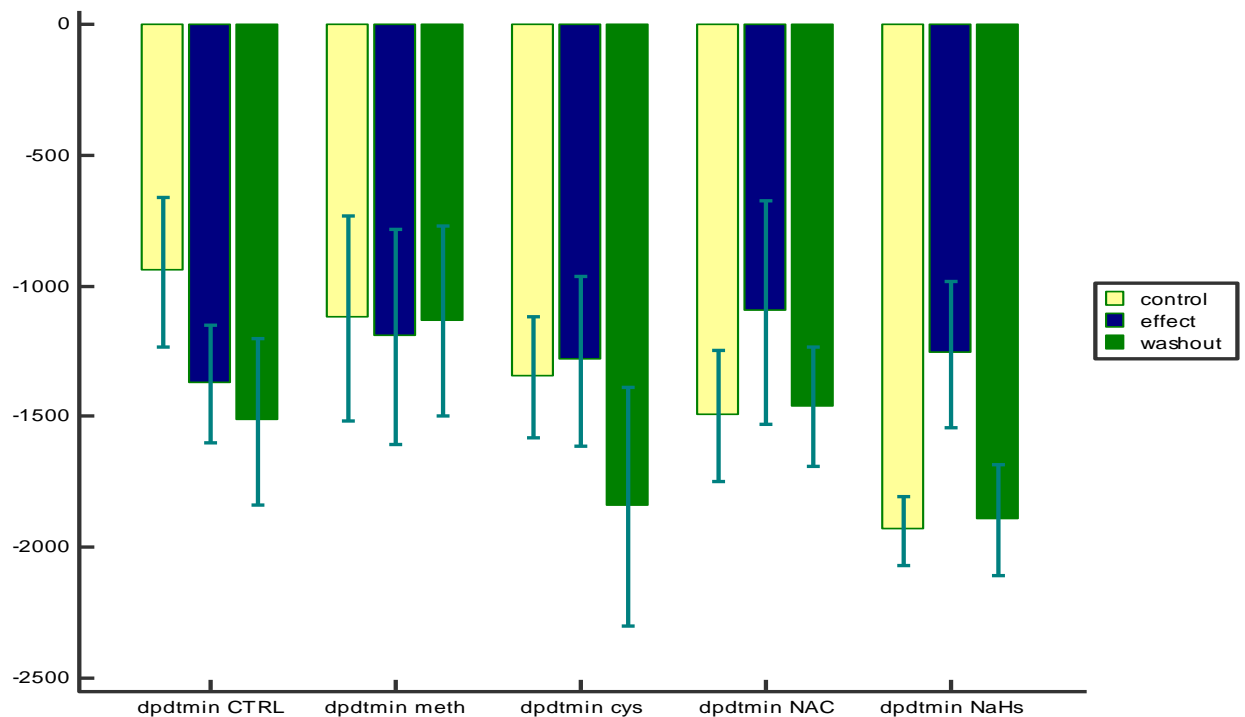
Графикон 31. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{max}) у CTRL, L-Meth, L-Cys, NAC и NaHS групи (*control, effect, washout*)



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

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

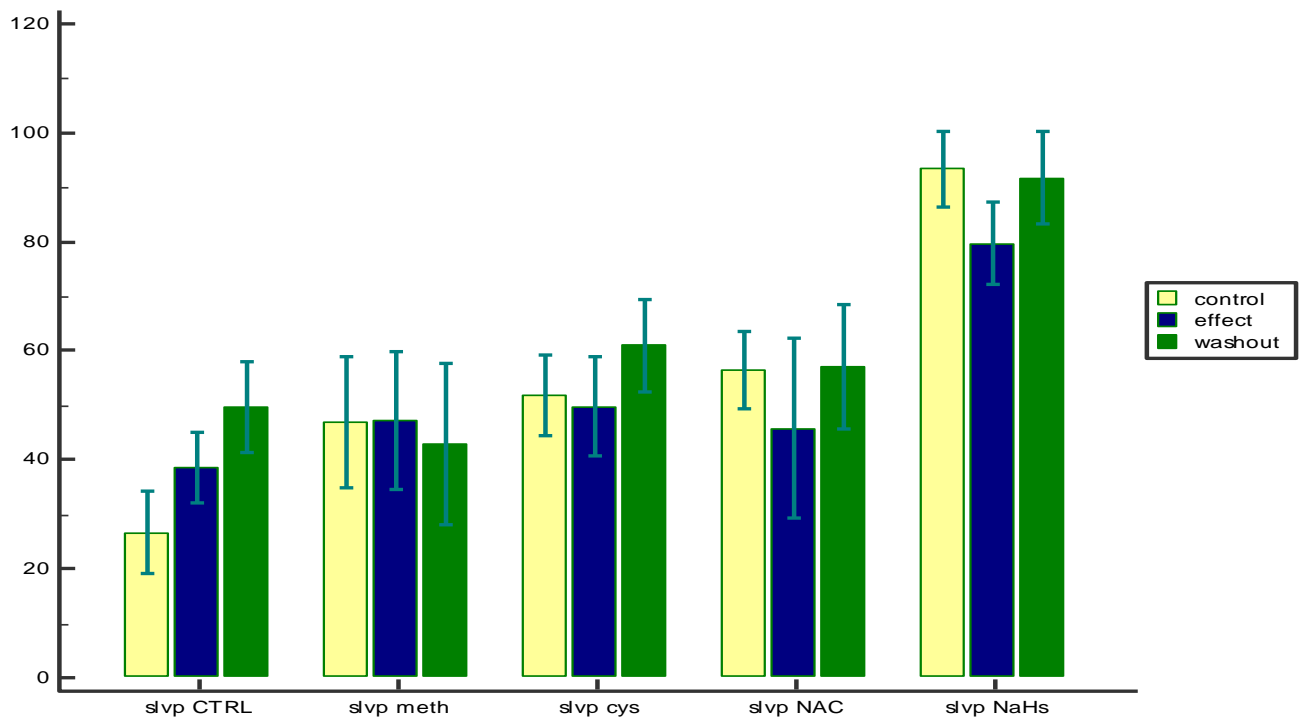
Графикон 32. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{min}) у CTRL, L-Meth, L-Cys, NAC и NaHS групи (*control, effect, washout*)



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

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

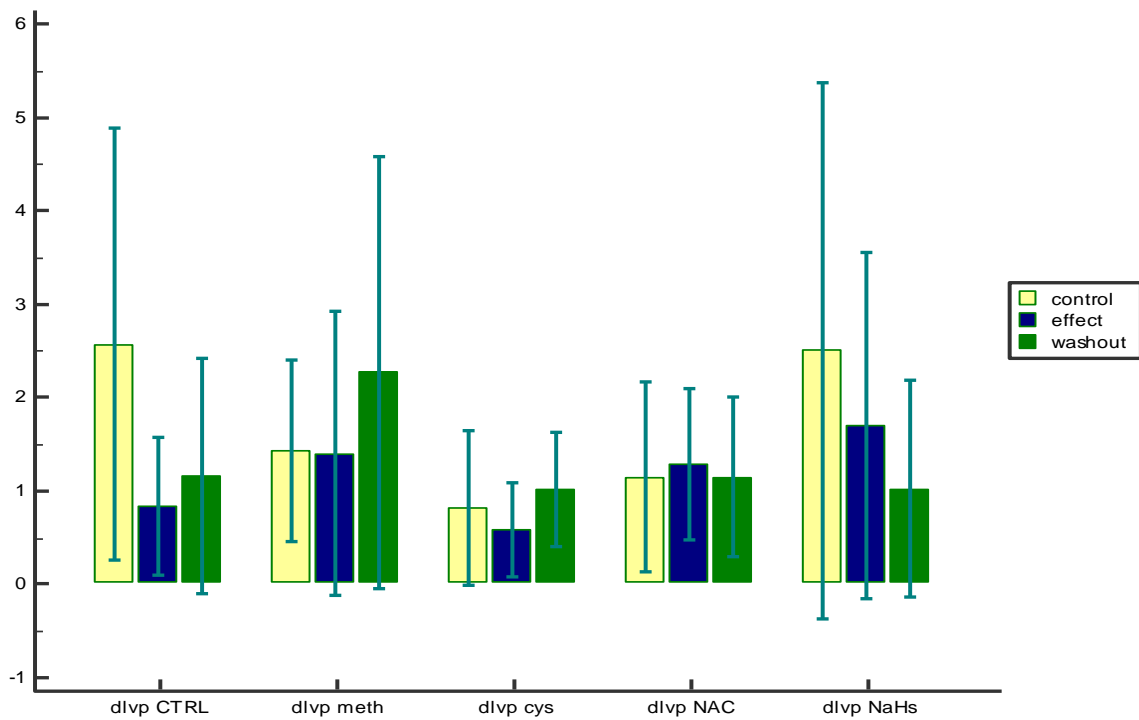
Графикон 33. Систолни притисак у левој комори (SLVP) у CTRL, L-Meth, L-Cys, NAC и NaHS групи (*control, effect, washout*)



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

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

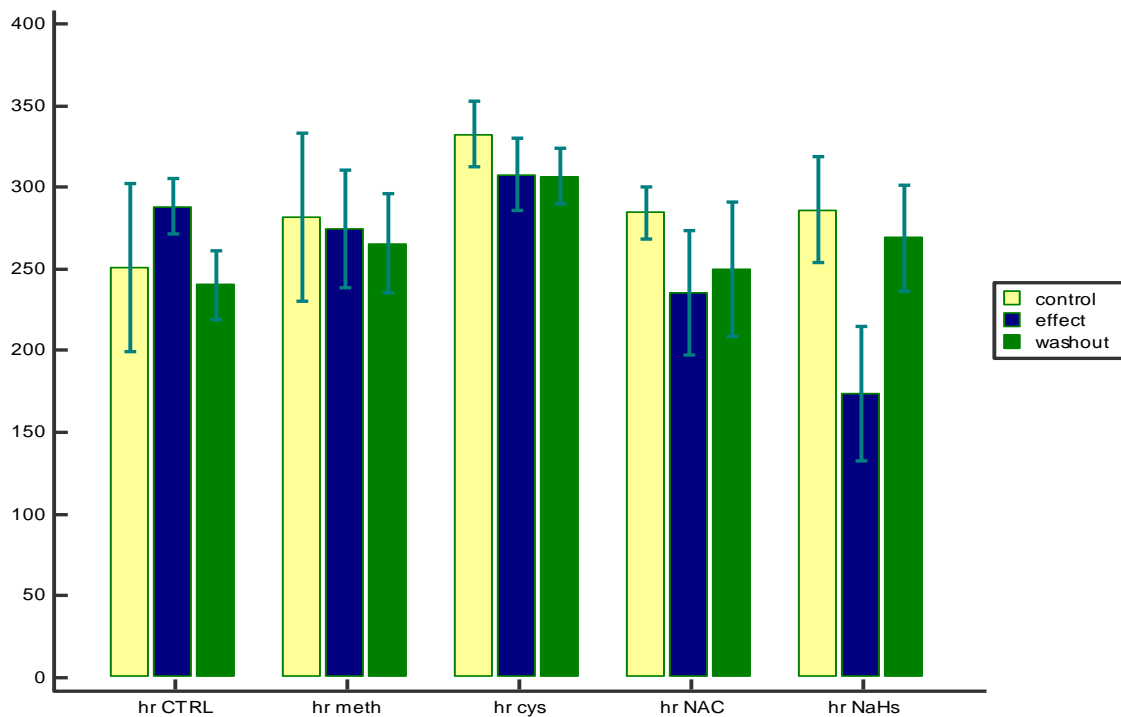
Графикон 34. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) у CTRL, L-Meth, L-Cys, NAC и NaHS групи (*control, effect, washout*)



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

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

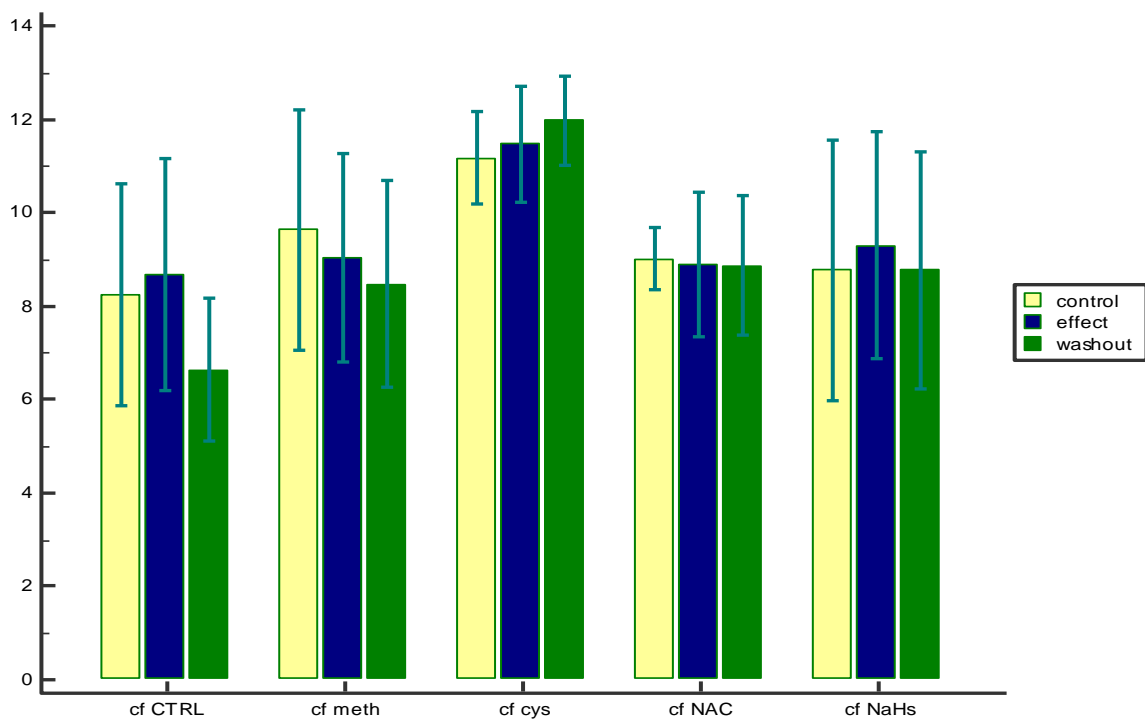
Графикон 35. Срчана фреквенца (HR) у CTRL, L-Meth, L-Cys, NAC и NaHS групи (*control, effect, washout*)



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

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

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



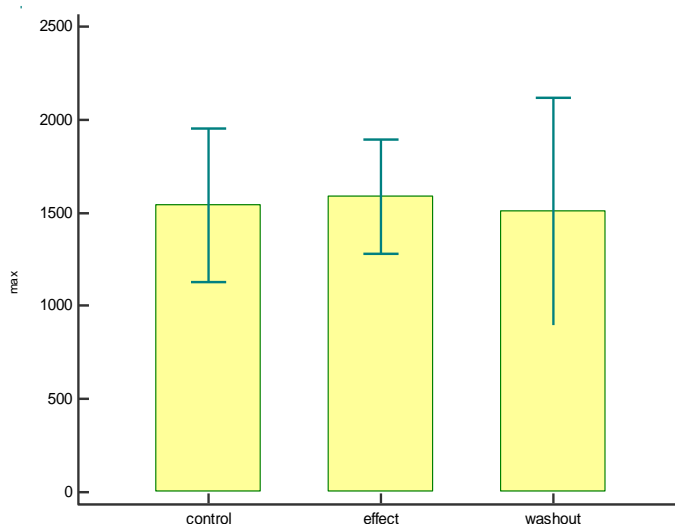
Табела 4. Статистичко поређење различитих мерења (на крају контролног периода – *control*, на крају периода администрације тест супстанце – *effect*, на крају периода опоравка – *washout*) унутар контролних група пацова за кардиодинамске параметре (dp/dt_{max} , dp/dt_{min} , *SLVP*, *DLVP*, *HR* и *CF*).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

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

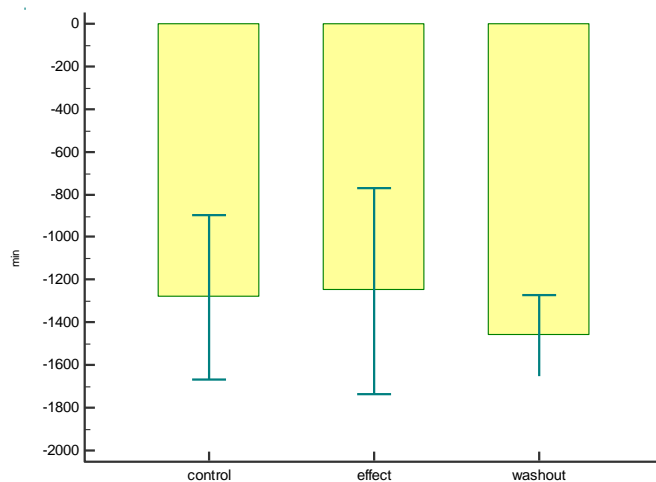
4.3. Динамика кардиодинамских параметара унутар експерименталних група пацова

4.3.1. DL-хомоцистеин група (DL-Hcy)

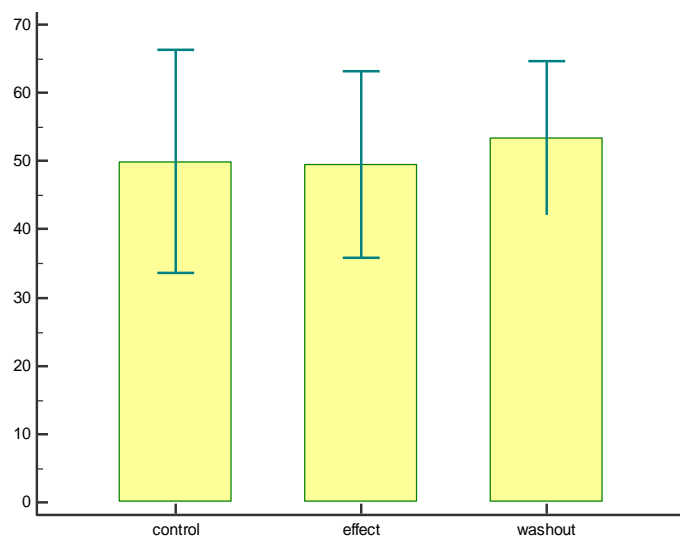
Графикон 37. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{max}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy групи пацова



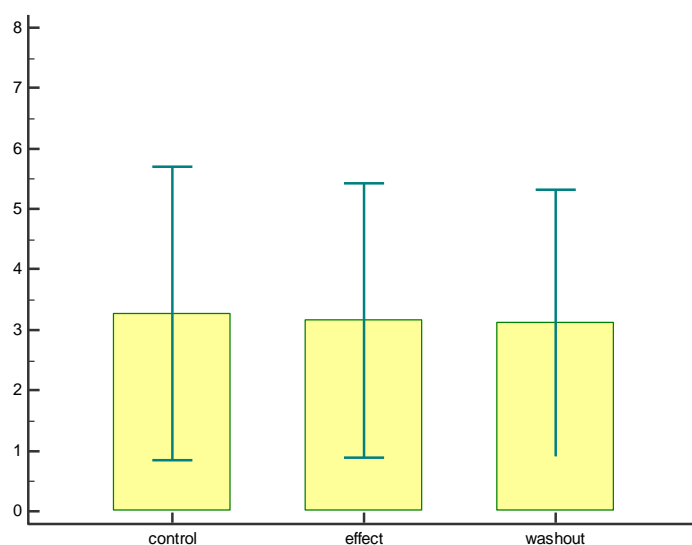
Графикон 38. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{min}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy групи пацова



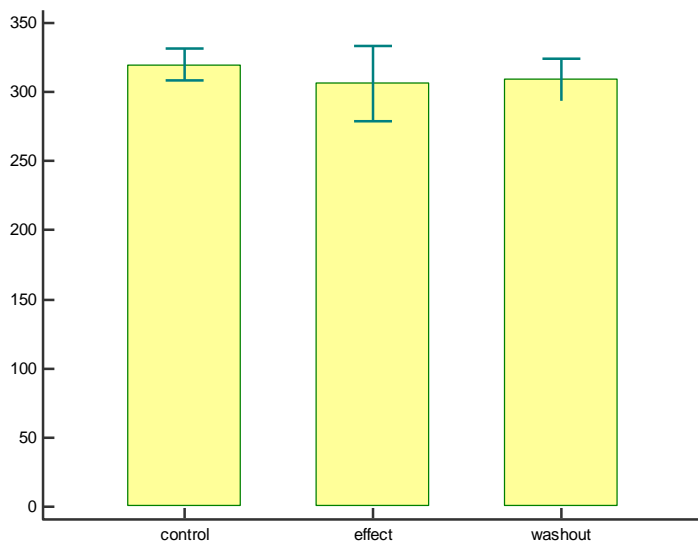
Графикон 39. Систолни притисак у левој комори (SLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу групи пацова



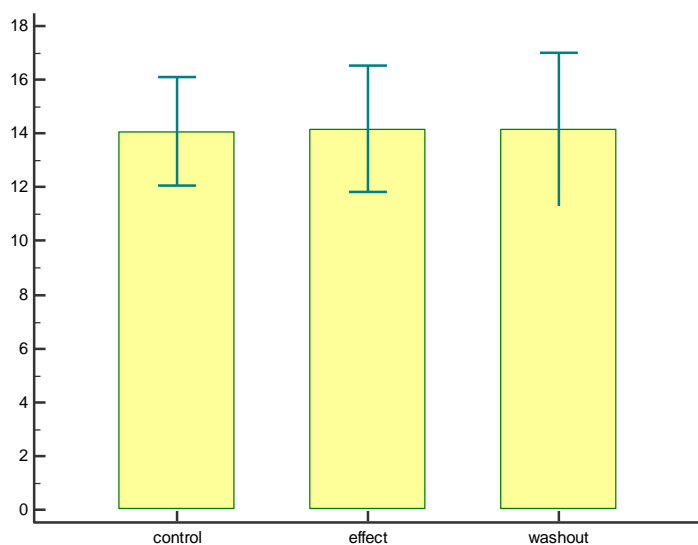
Графикон 40. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу групи пацова



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

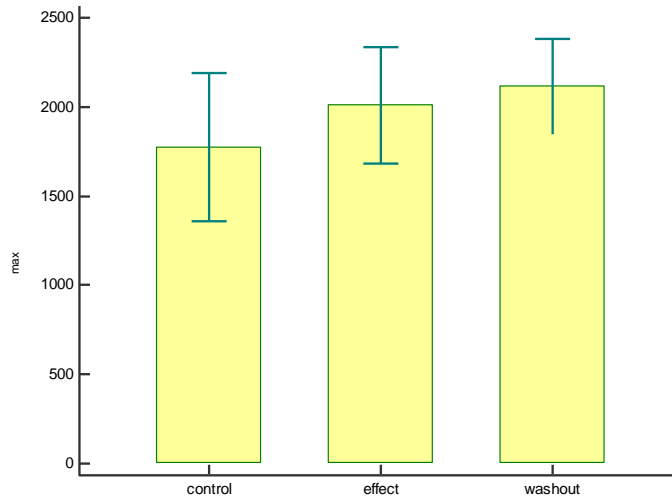


Графикон 42. Коронарни проток (CF) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу групи пацова

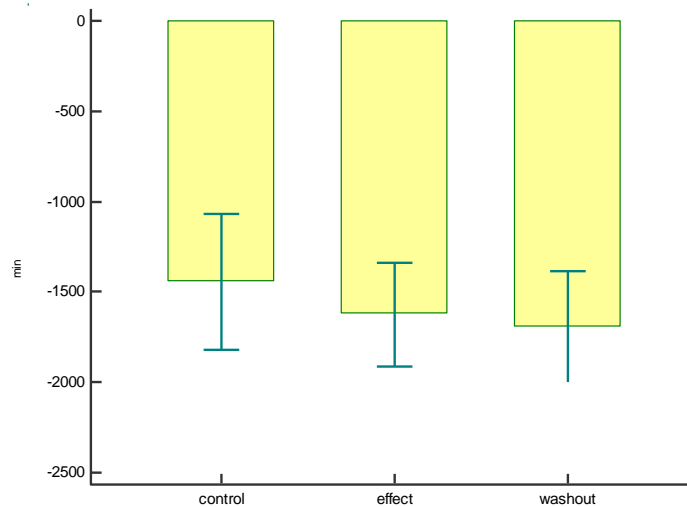


4.3.2. DL-хомоцистеин + L-метионин група (DL-Hcy+L-Meth)

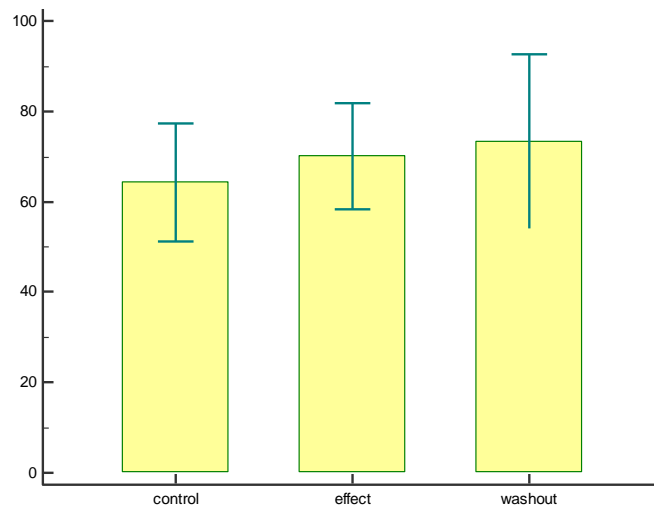
Графикон 43. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{max}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Meth групи пацова



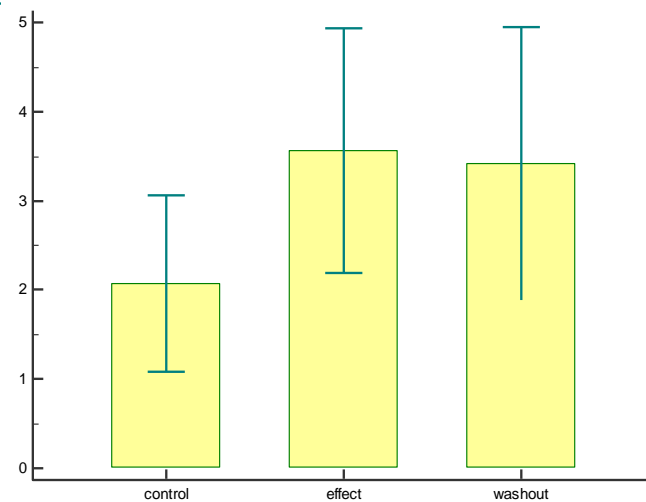
Графикон 44. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{min}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Meth групи пацова



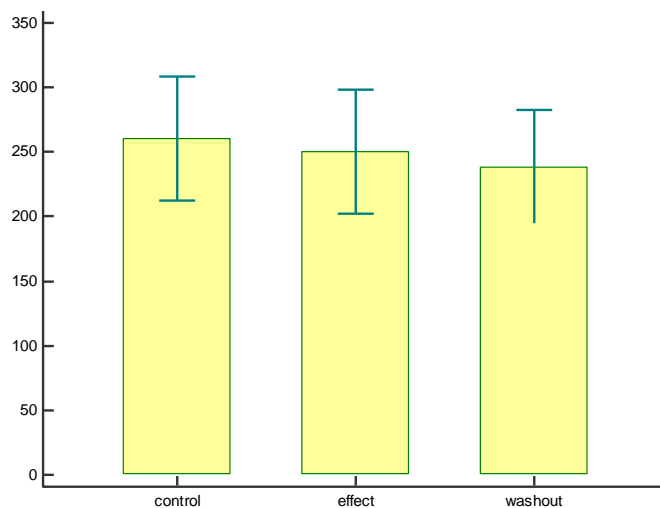
Графикон 45. Систолни притисак у левој комори (SLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Meth групи пацова



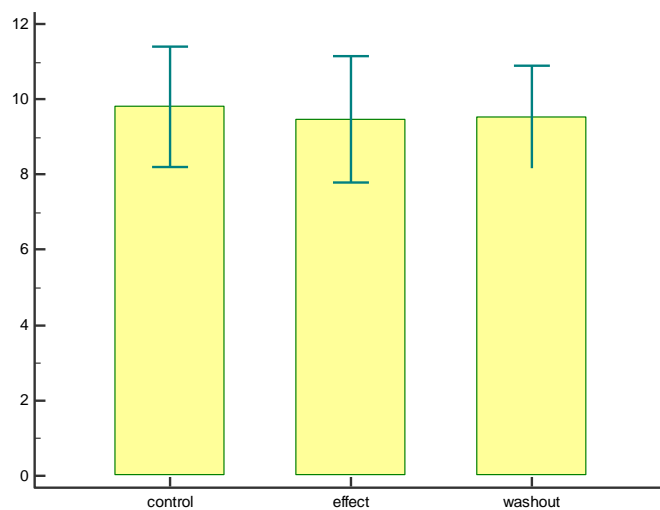
Графикон 46. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Meth групи пацова



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

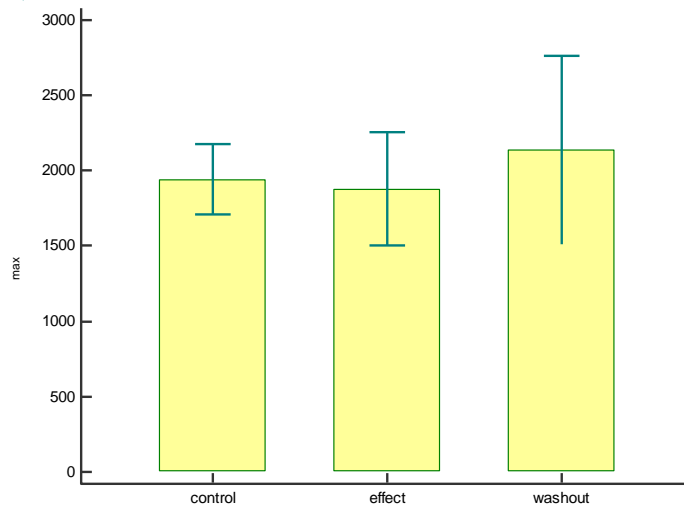


Графикон 48. Коронарни проток (CF) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Meth групи пацова

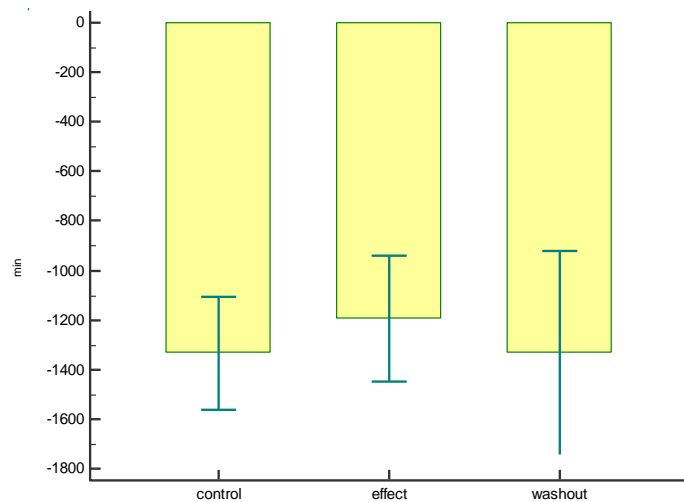


4.3.3. DL-хомоцистеин + L-цистеин група (DL-Hcy+L-Cys)

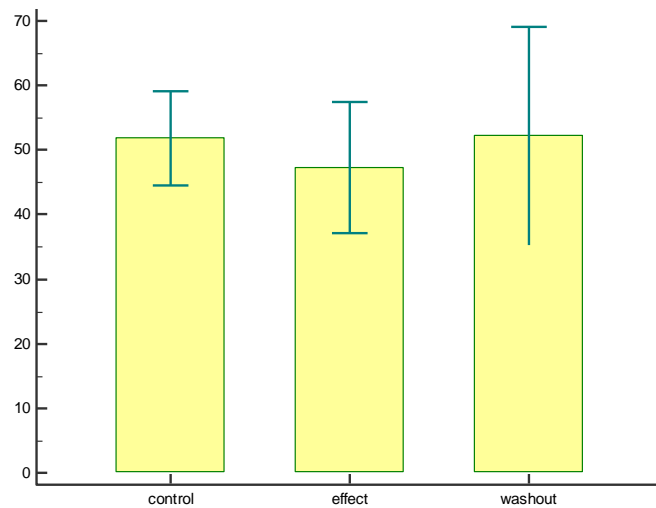
Графикон 49. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{max}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Cys групи пацова



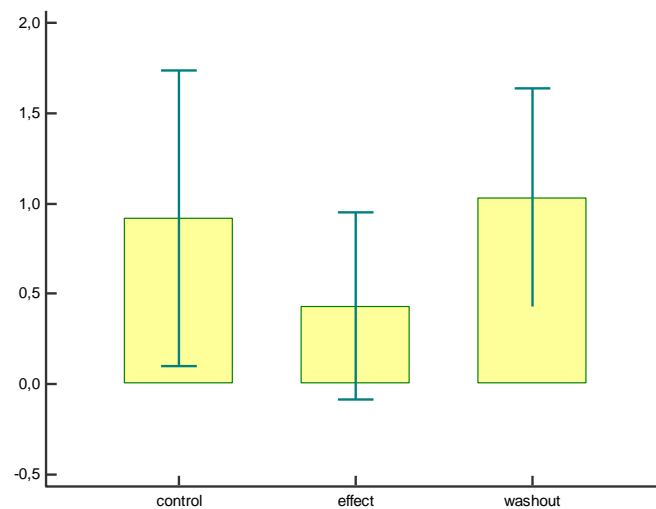
Графикон 50. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{min}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Cys групи пацова



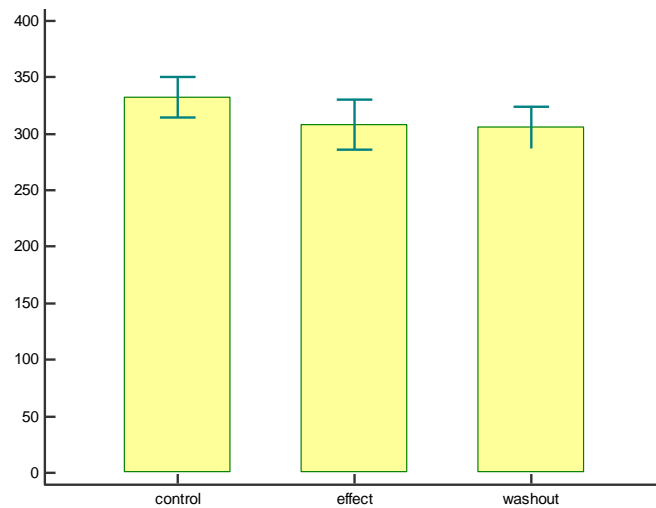
Графикон 51. Систолни притисак у левој комори (SLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Cys групи пацова



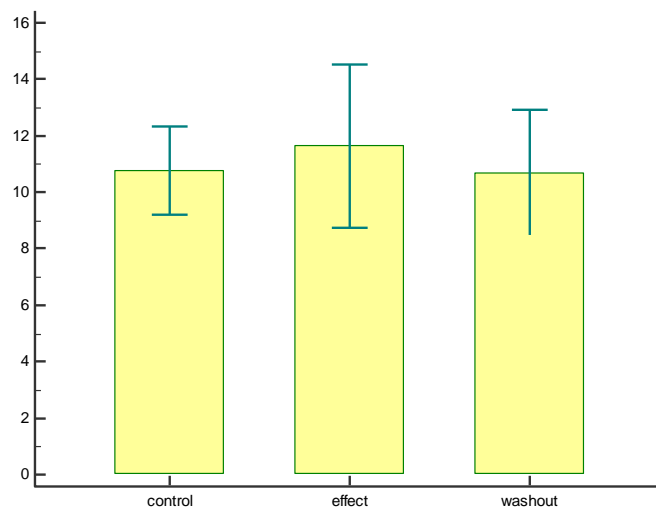
Графикон 52. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Cys групи пацова



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

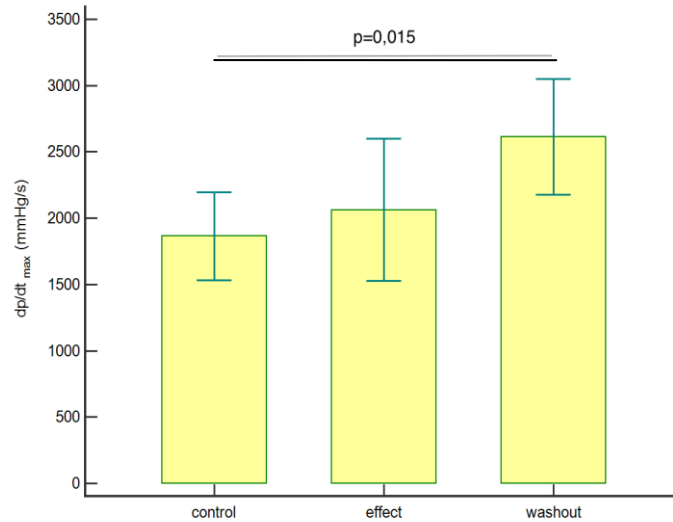


Графикон 54. Коронарни проток (CF) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+L-Cys групи пацова

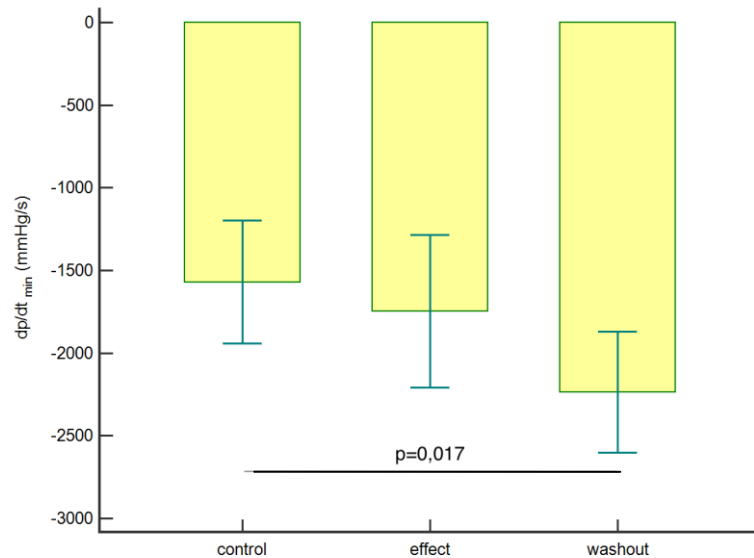


4.3.4. DL-хомоцистеин + N-ацетилцистеин група (DL-Нсу+NAC)

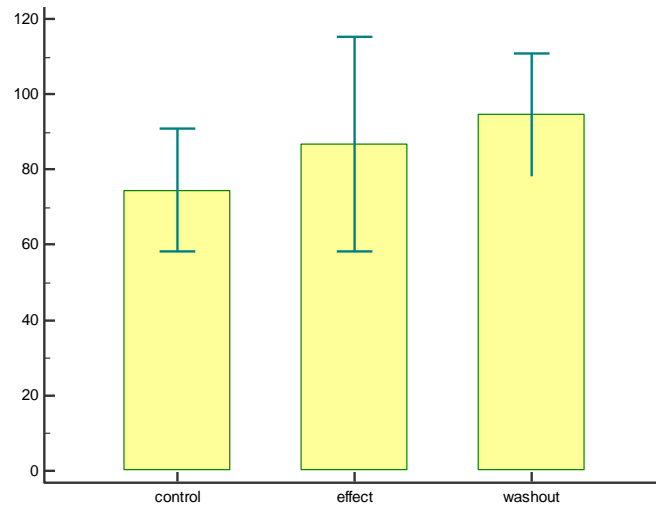
Графикон 55. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{max}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+NAC групи пацова



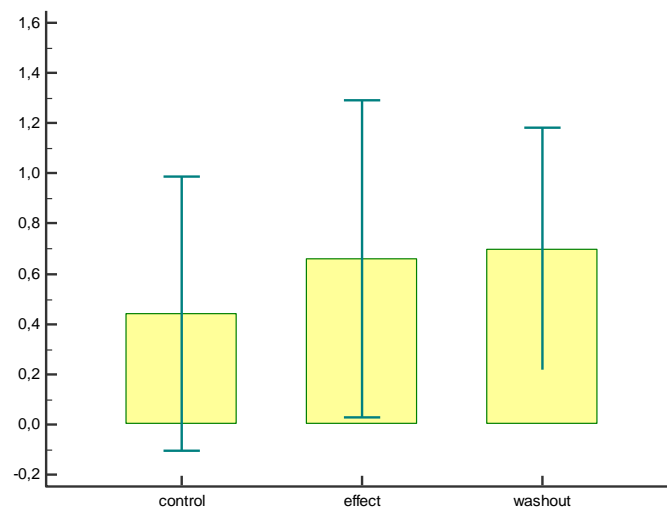
Графикон 56. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{min}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+NAC групи пацова



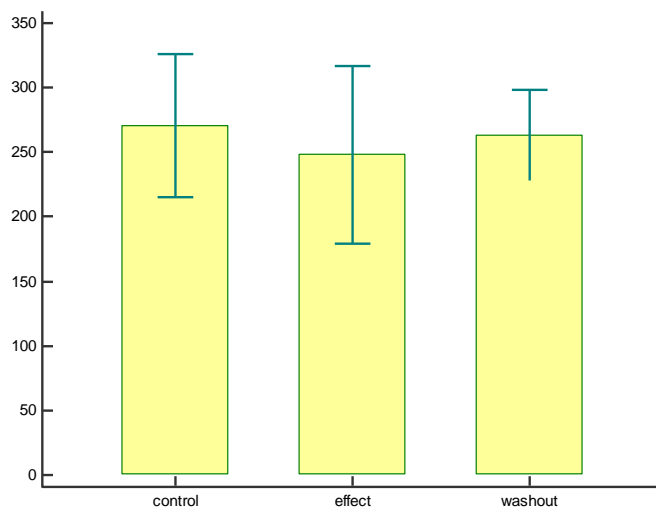
Графикон 57. Систолни притисак у левој комори (SLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+NAC групи пацова



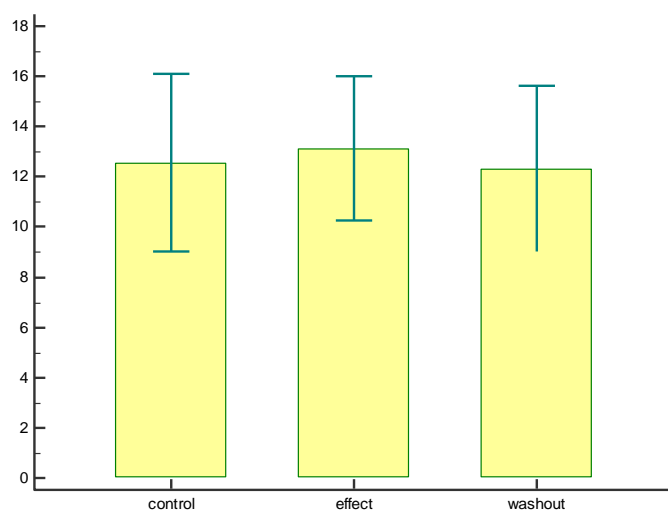
Графикон 58. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+NAC групи пацова



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

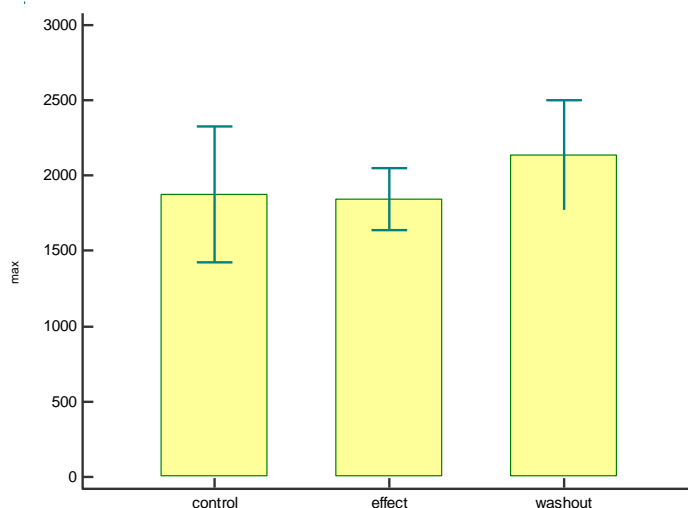


Графикон 60. Коронарни проток (CF) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+NAC групи пацова

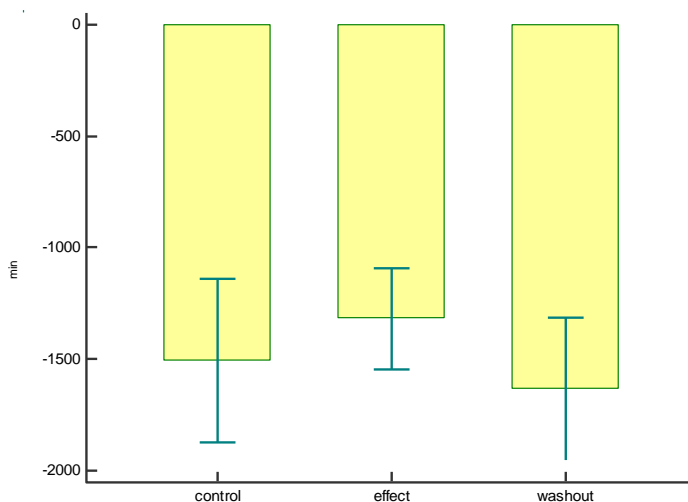


4.3.5. DL-хомоцистеин + Na-хидрогенсулфид (DL-Нсу+NaHS)

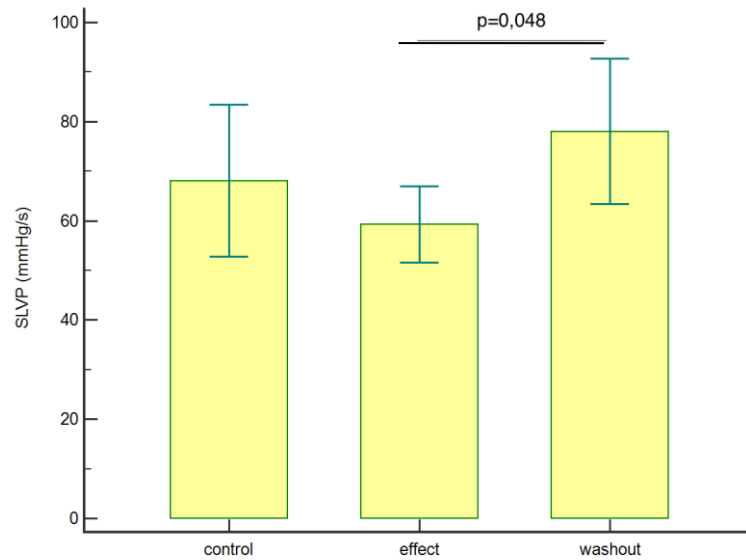
Графикон 61. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{max}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+NaHS групи пацова



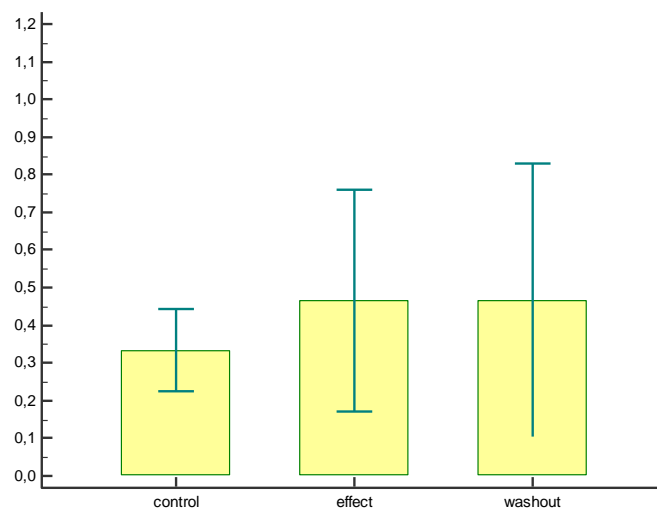
Графикон 62. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{min}) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+NaHS групи пацова



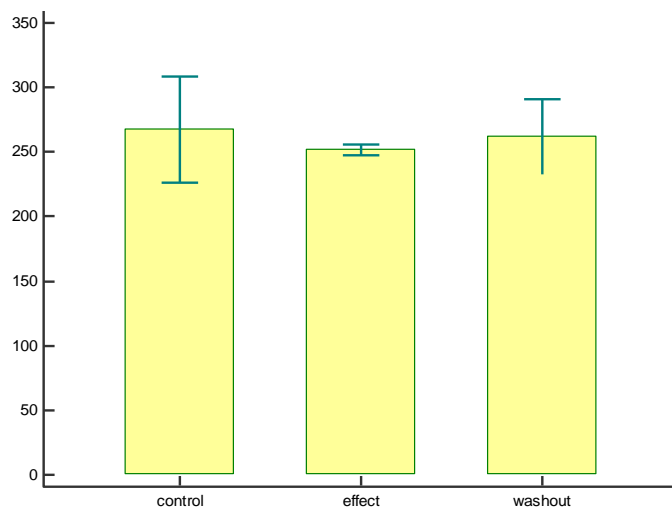
Графикон 63. Систолни притисак у левој комори (SLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+NaHS групи пацова



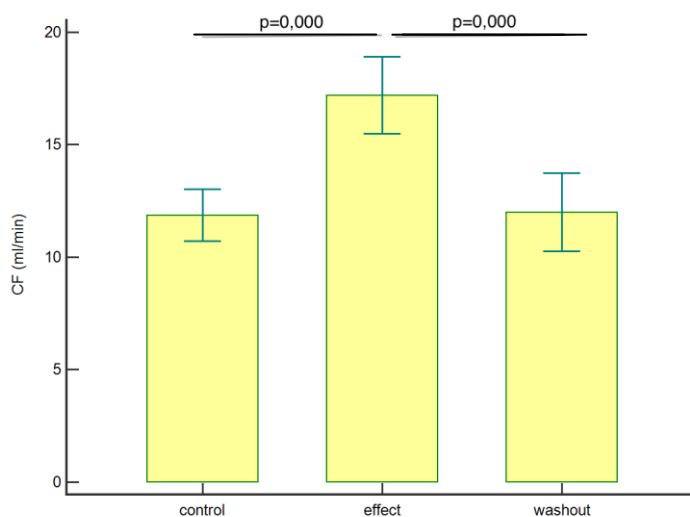
Графикон 64. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+NaHS групи пацова



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



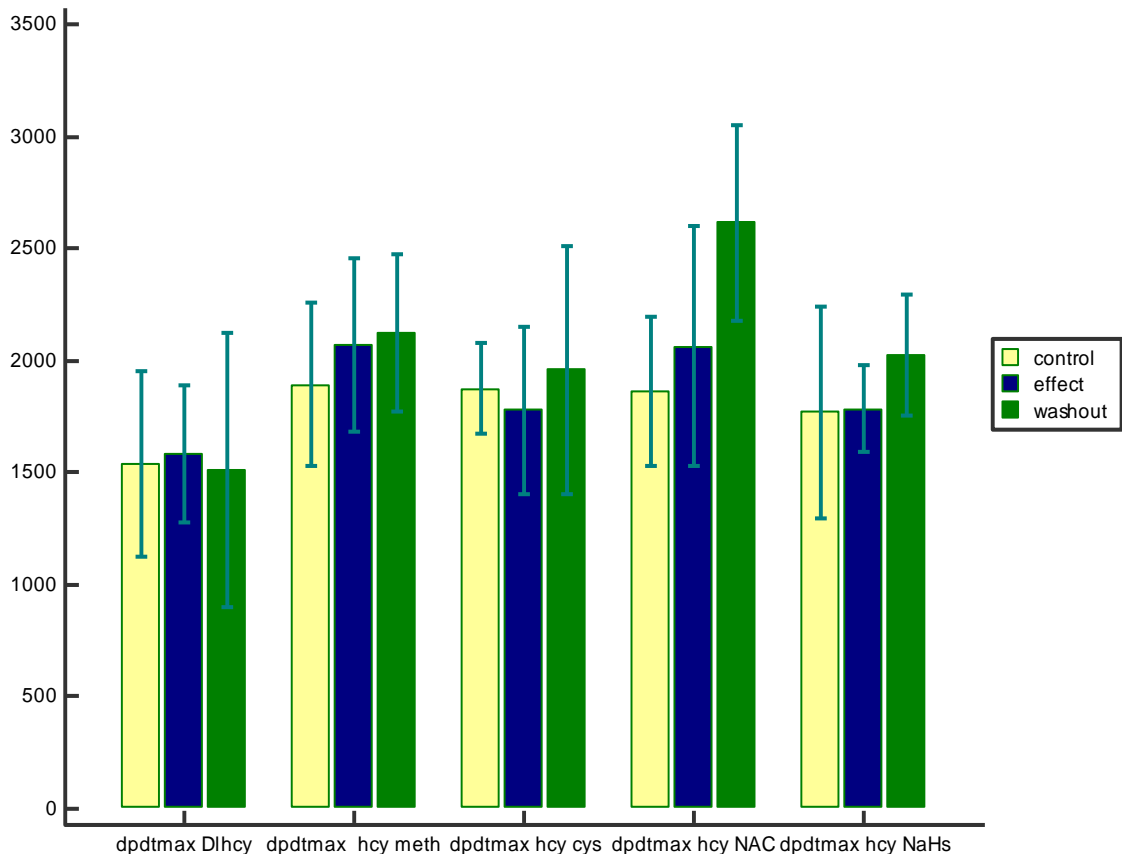
Графикон 66. Коронарни проток (CF) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+NaHS групи пацова



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

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

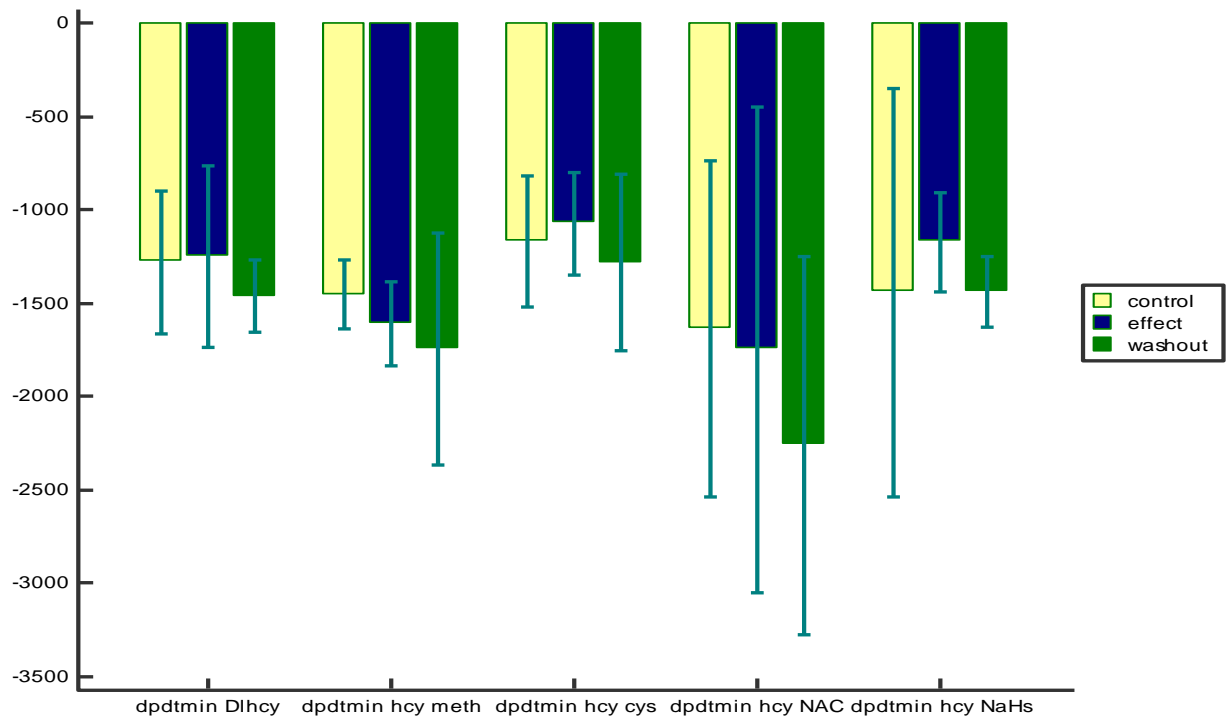
Графикон 67. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{max}) у DL-Нсу, DL-Нсу+L-Meth, DL-Нсу+L-Cys, DL-Нсу+ NAC и DL-Нсу+NaHS групама (*control, effect, washout*)



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

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

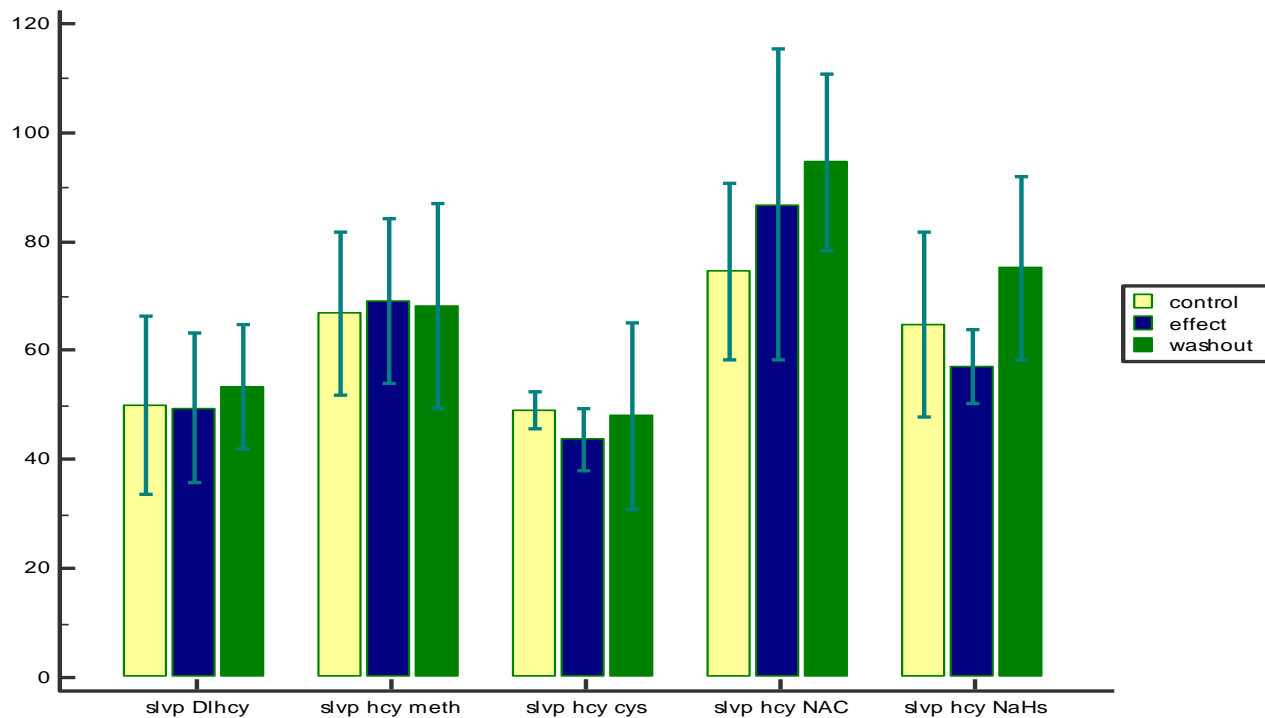
Графикон 68. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt_{\min}) у DL-Hcy, DL-Hcy+L-Meth, DL-Hcy+L-Cys, DL-Hcy+NAC и DL-Hcy+NaHS групама (*control, effect, washout*)



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

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

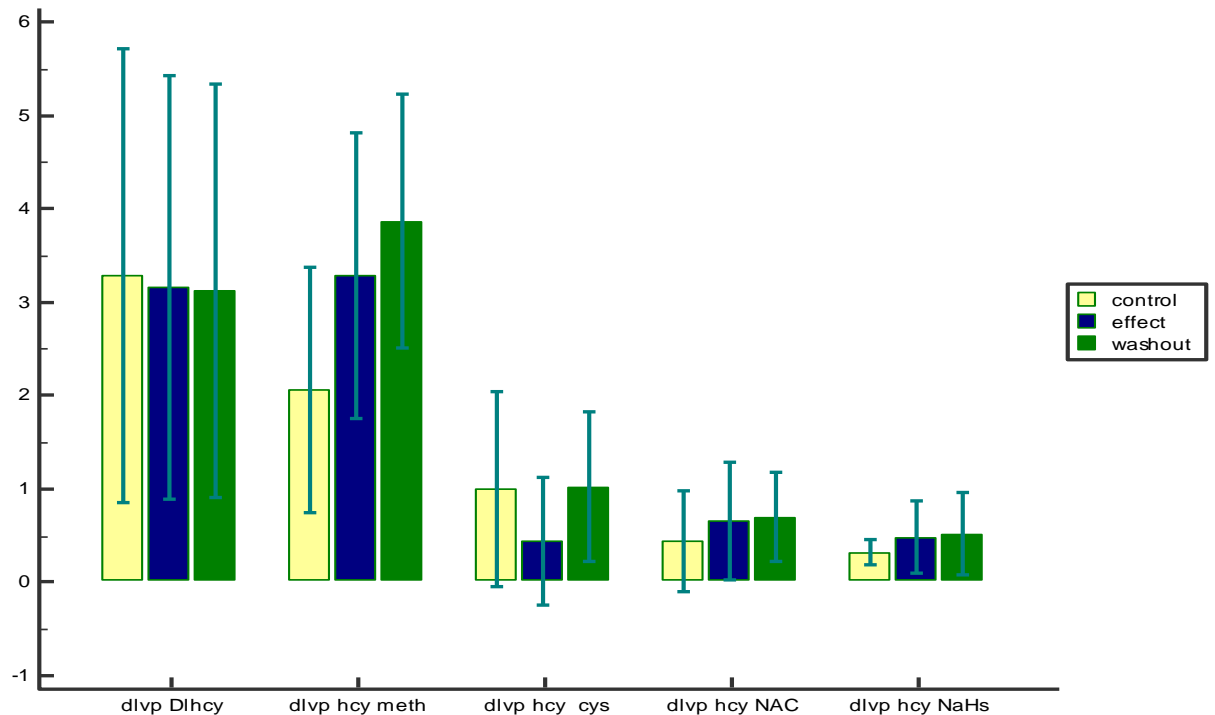
Графикон 69. Систолни притисак у левој комори (SLVP) у DL-Нсу, DL-Нсу+L-Meth, DL-Нсу+L-Cys, DL-Нсу+ NAC и DL-Нсу+NaHS групама (*control, effect, washout*)



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

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

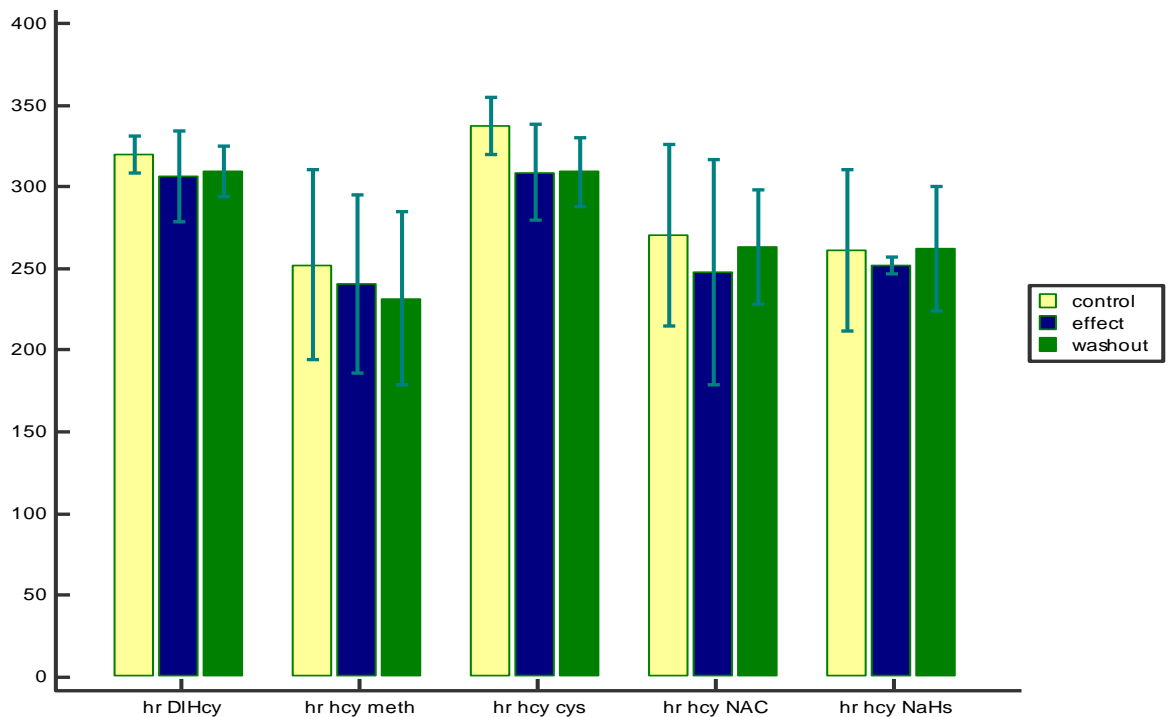
Графикон 70. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP) у DL-Hcy, DL-Hcy+L-Meth, DL-Hcy+L-Cys, DL-Hcy+ NAC и DL-Hcy+NaHS групама (*control, effect, washout*)



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

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

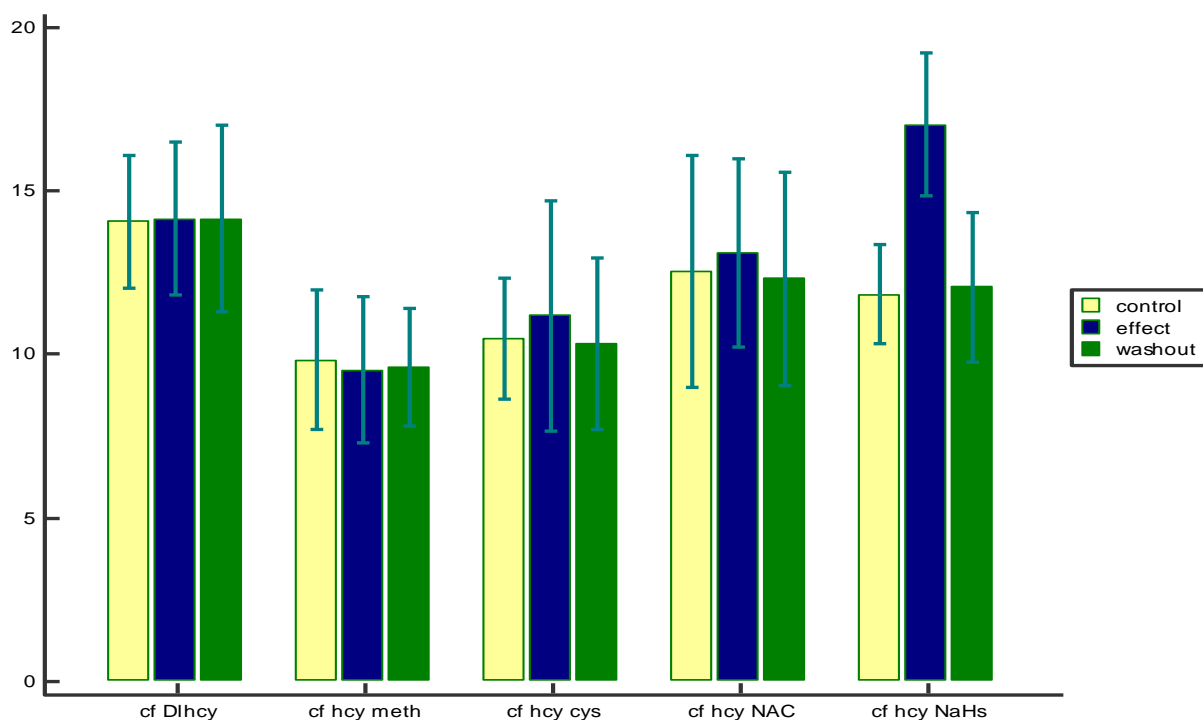
Графикон 71. Срчана фреквенца (HR) у DL-Hcy, DL-Hcy+L-Meth, DL-Hcy+L-Cys, DL-Hcy+ NAC и DL-Hcy+NaHS групама (*control, effect, washout*)



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

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

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



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

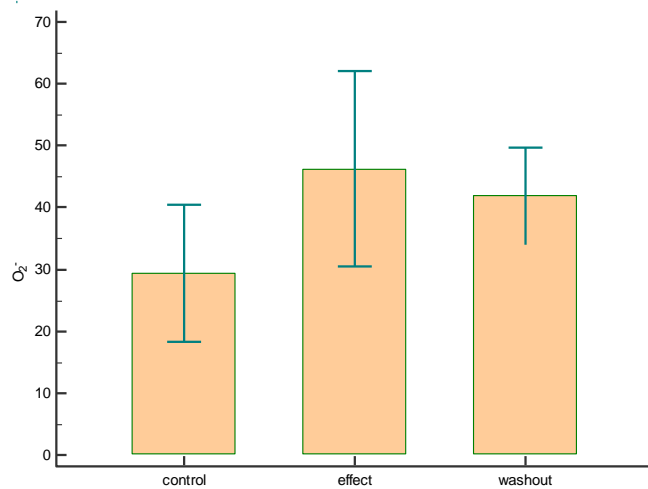
	<i>Cardiodynamic parameters</i>	<i>dp/dt_{max}</i>	<i>dp/dt_{min}</i>	<i>SLVP</i>	<i>DLVP</i>	<i>HR</i>	<i>CF</i>
		<i>sig. p < 0,05</i>					
<i>DL-Hcy</i>	Control vs. effect	0,979	0,970	0,998	0,994	0,380	0,998
	Control vs. washout	0,990	0,369	0,879	0,990	0,546	0,998
	Effect vs. washout	0,942	0,279	0,847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

БИОМАРКЕРИ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА

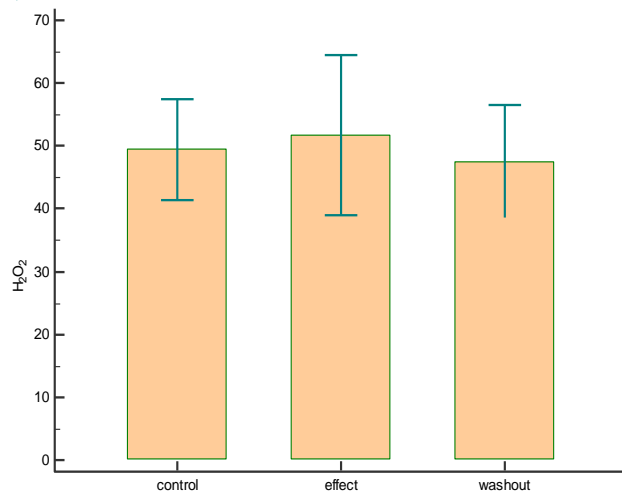
4.4. Динамика прооксидационих маркера у коронарном венском ефлуенту унутар контролних група пацова

4.4.1. Контролна група (CTRL)

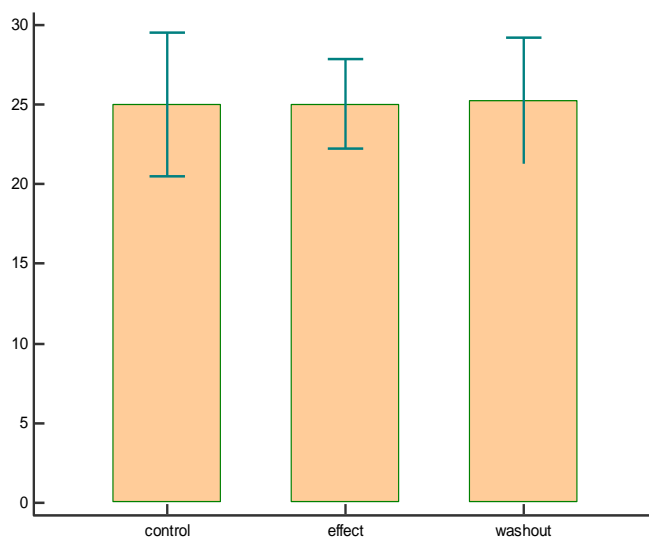
Графикон 73. Супероксид анјон радикал (O_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у контролној групи пацова који нису третирани DL-Нсу



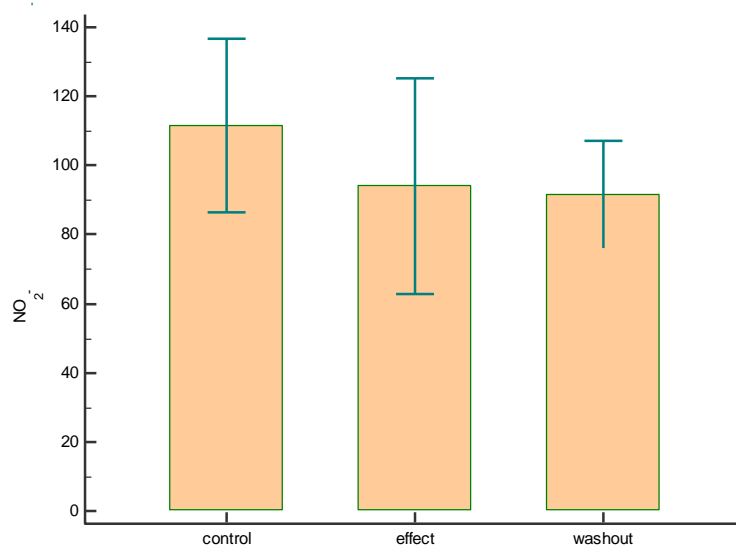
Графикон 74. Водоник пероксид (H_2O_2) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у контролној групи пацова који нису третирани DL-Нсу



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

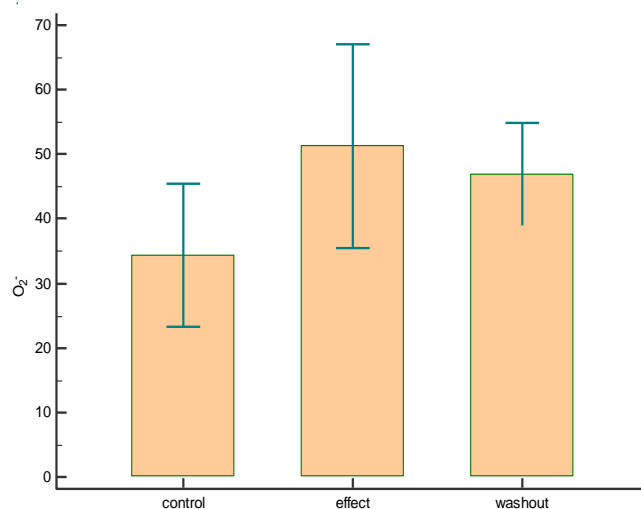


Графикон 76. Азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у контролној групи пацова који нису третирани DL-Нсу

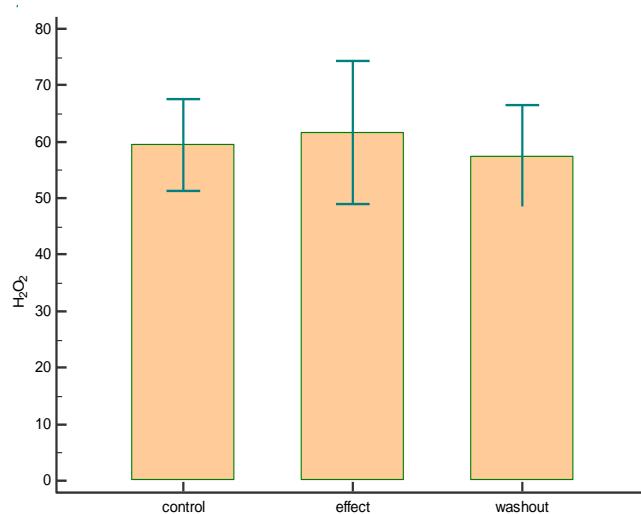


4.4.2. L-метионин група (L-Meth)

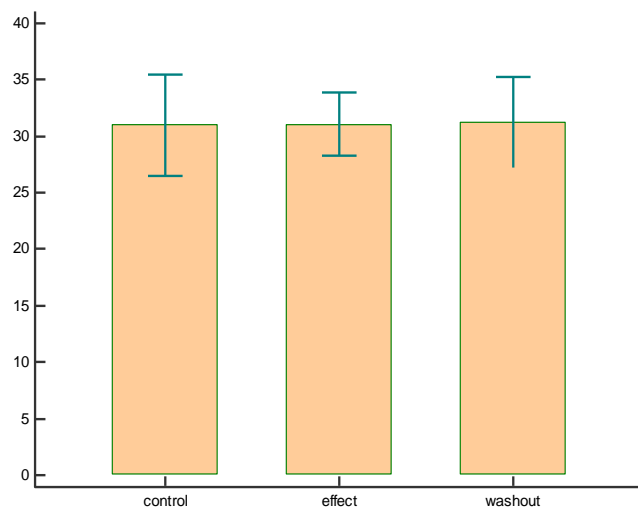
Графикон 77. Супероксид анјон радикал (O_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Meth групи пацова



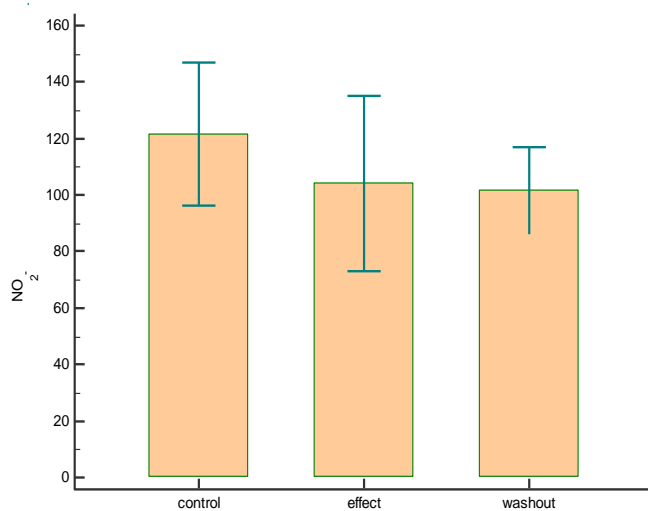
Графикон 78. Водоник пероксид (H_2O_2) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Meth групи пацова



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

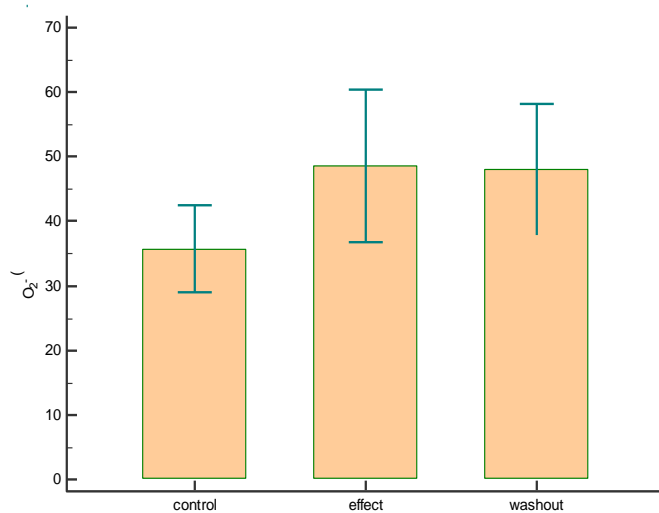


Графикон 80. Азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Meth групи пацова

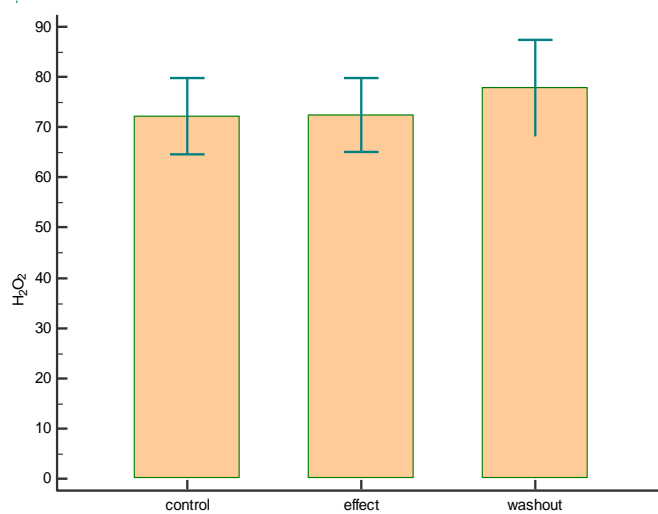


4.4.3. L-цистеин група (L-Cys)

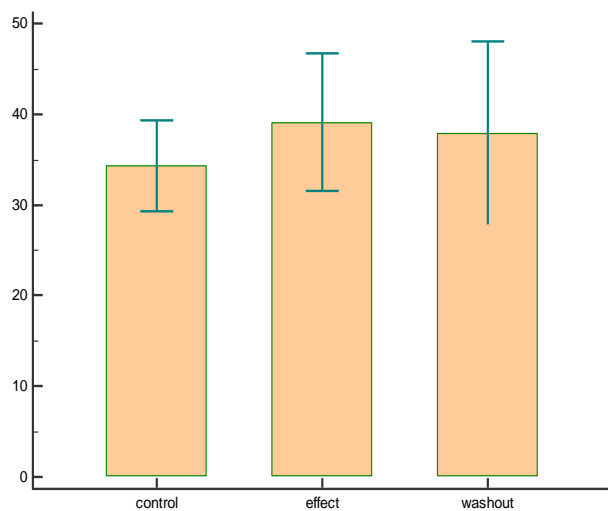
Графикон 81. Супероксид анјон радикал (O_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Cys групи пацова



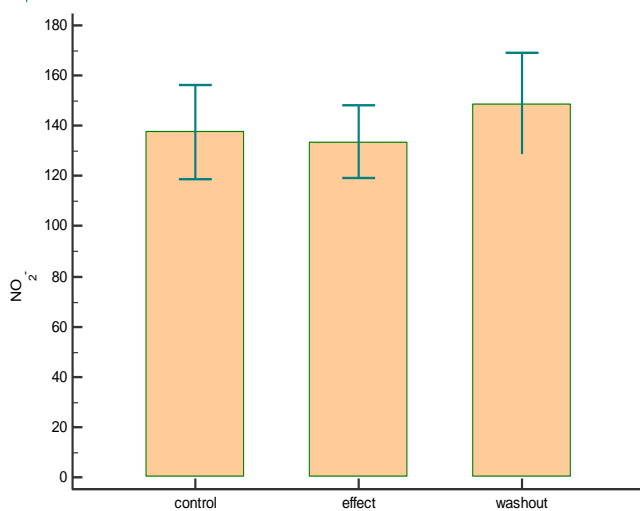
Графикон 82. Водоник пероксид (H_2O_2) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Cys групи пацова



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

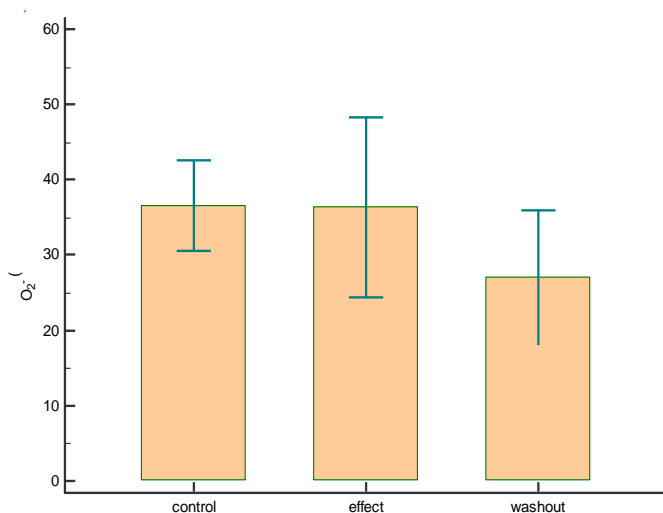


Графикон 84. Азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у L-Cys групи пацова

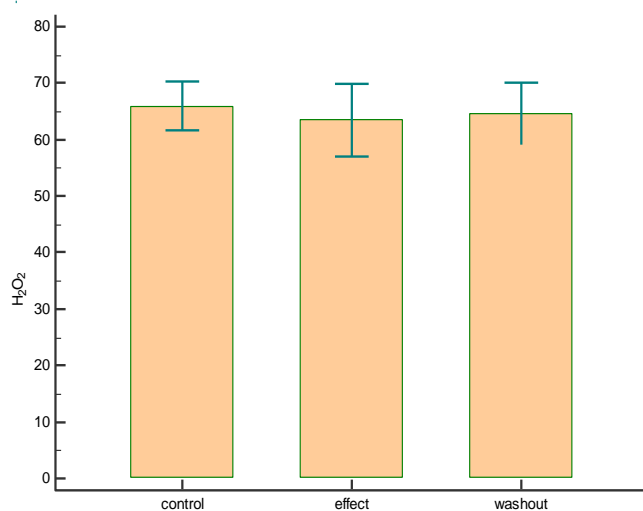


4.4.4. N-ацетилцистеин група (NAC)

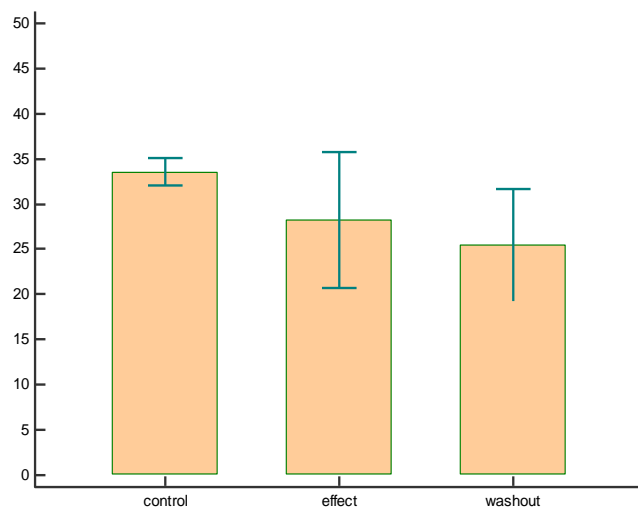
Графикон 85. Супероксид анјон радикал (O_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NAC групи пацова



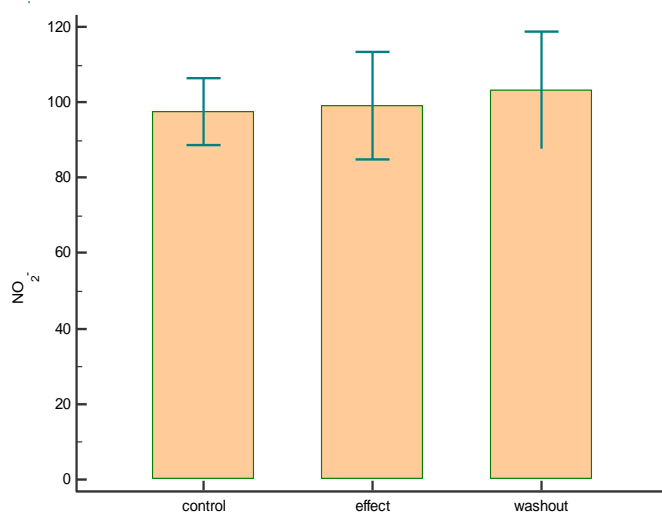
Графикон 86. Водоник пероксид (H_2O_2) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NAC групи пацова



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

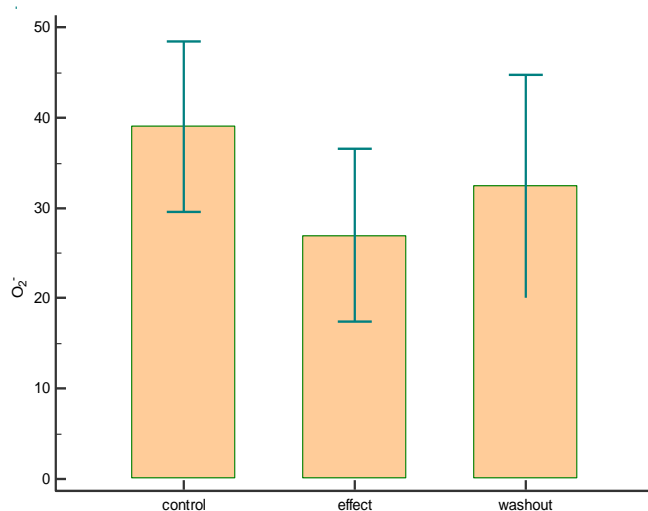


Графикон 88. Азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NAC групи пацова

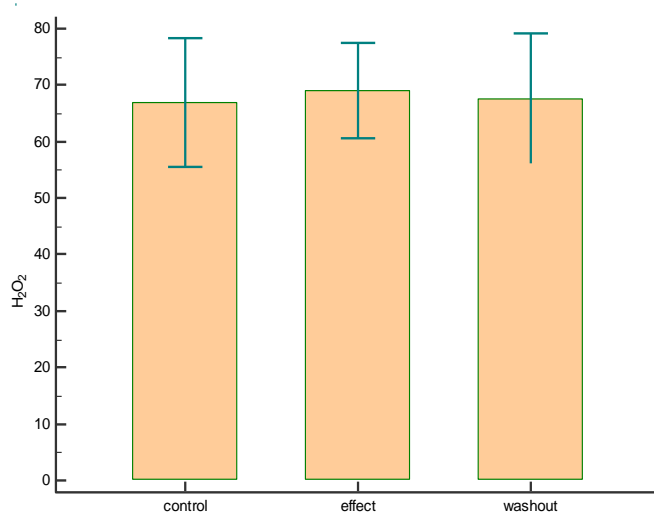


4.4.5. Na-хидрогенсулфид група (NaHS)

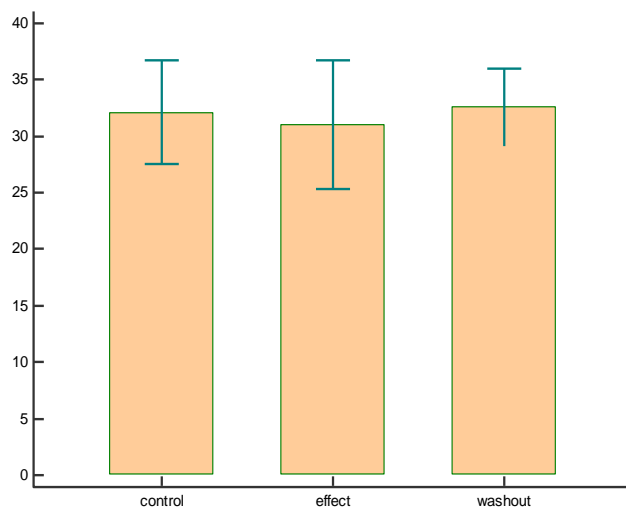
Графикон 89. Супероксид анјон радикал (O_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NaHS групи пацова



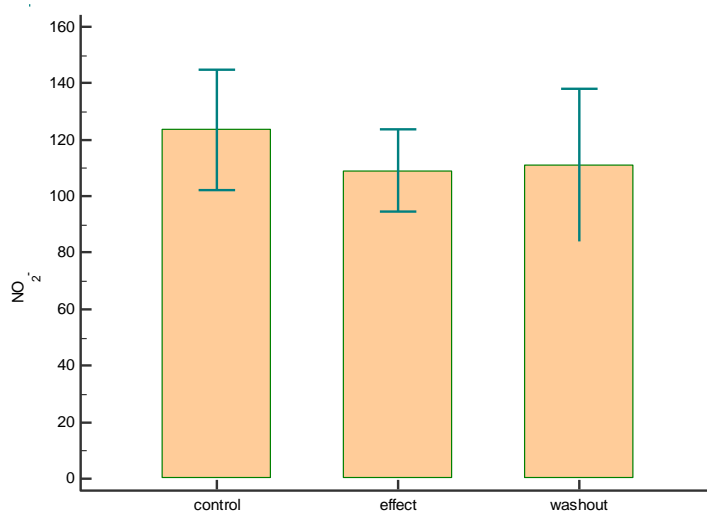
Графикон 90. Водоник пероксид (H_2O_2) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NaHS групи пацова



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



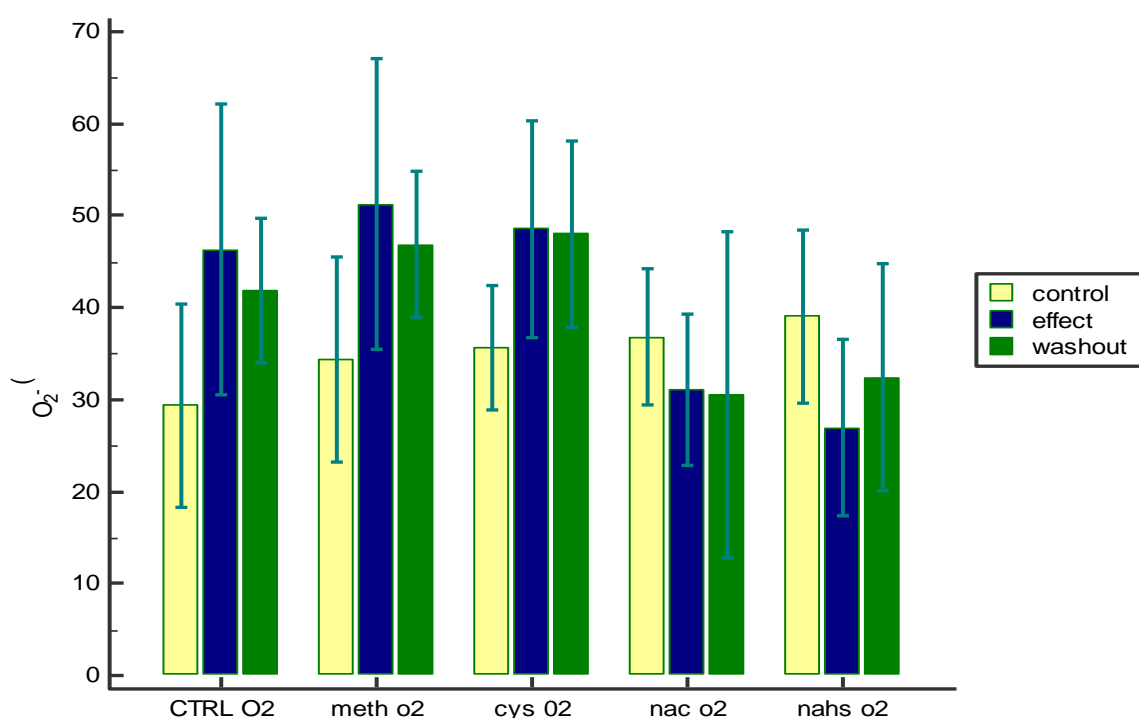
Графикон 92. Азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у NaHS групи пацова



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

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

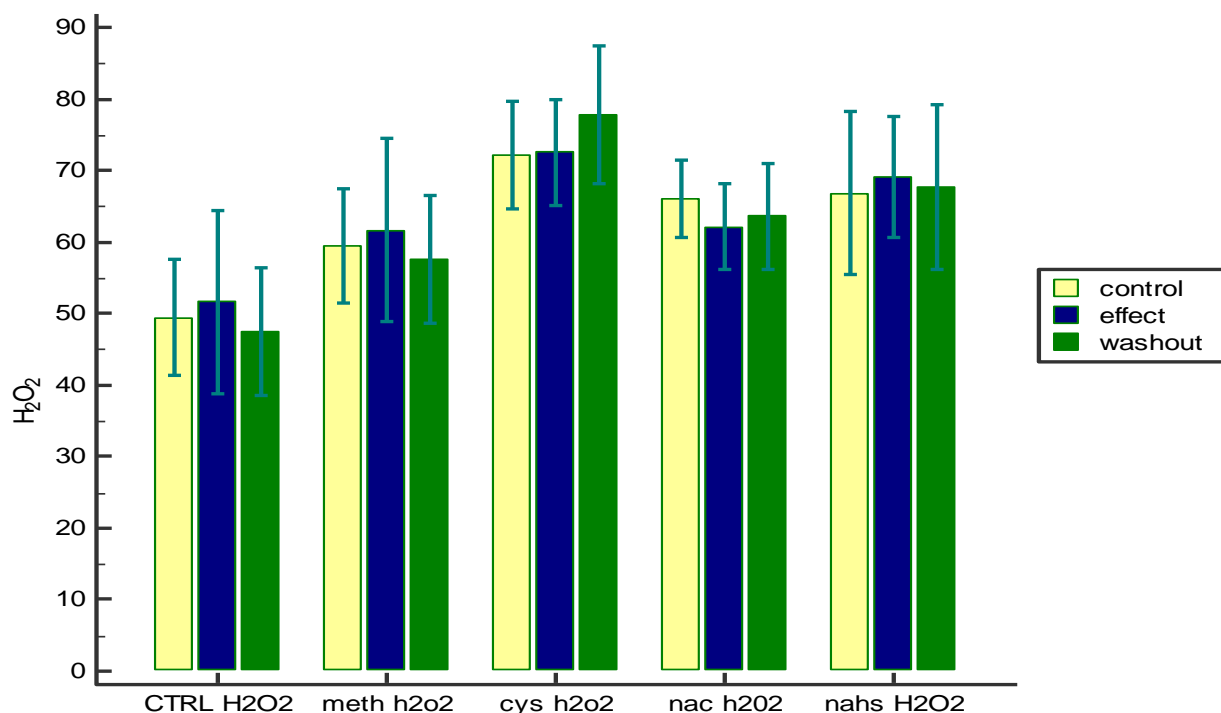
Графикон 93. Вредности супероксид анјон радикала (O_2^-) у CTRL, L-Meth, L-Cys, NAC и NaHS групи (*control, effect, washout*)



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

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

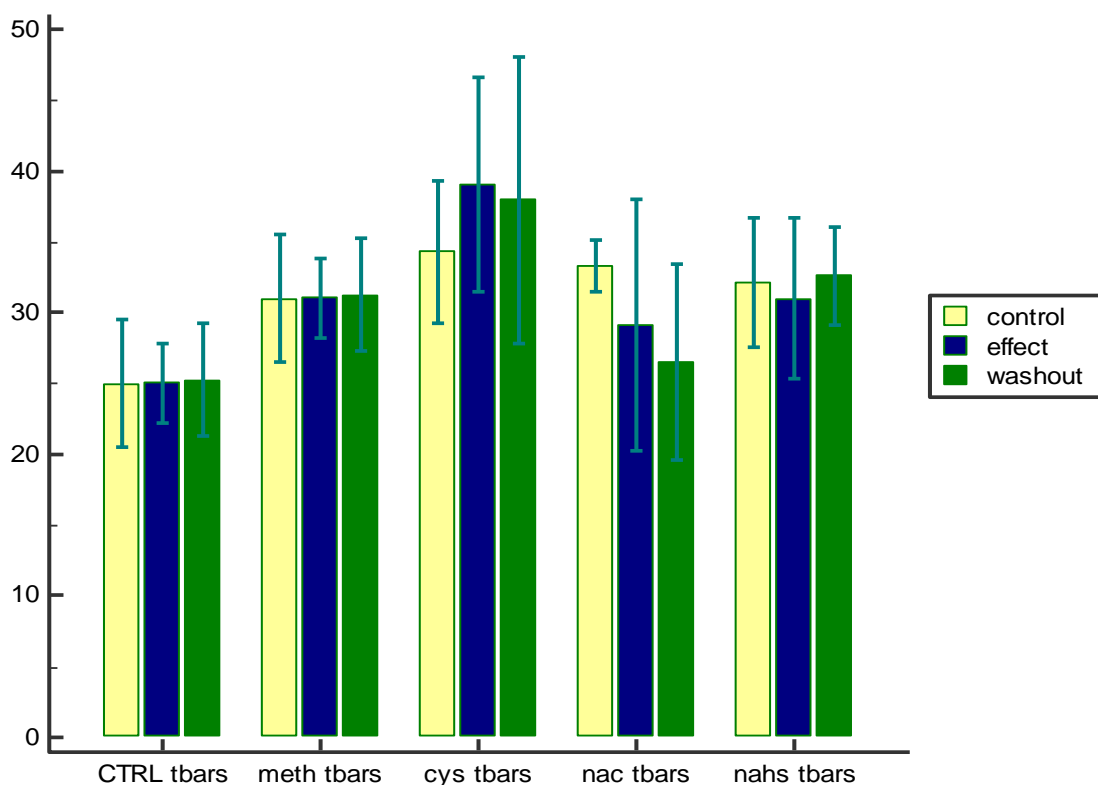
Графикон 94. Вредности водоник пероксида (H_2O_2) у CTRL, L-Meth, L-Cys, NAC и NaHS групи (*control, effect, washout*)



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

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

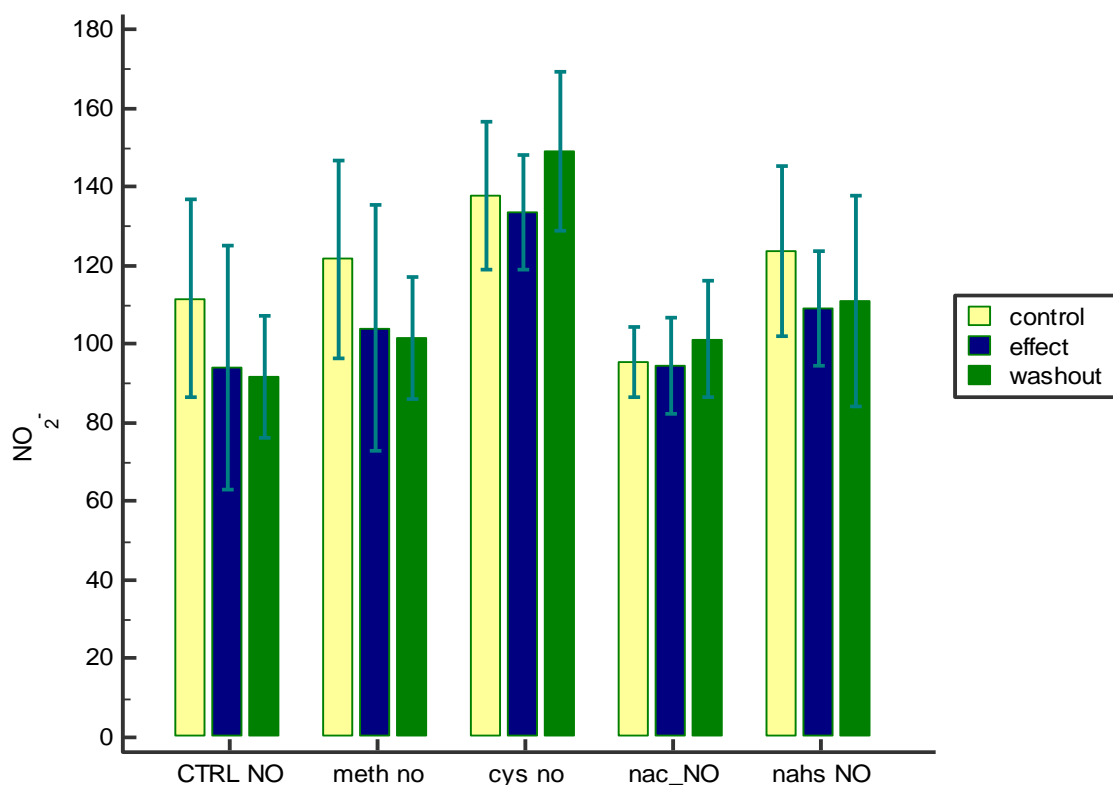
Графикон 95. Вредности индекса липидне пероксидације (TBARS) у CTRL, L-Meth, L-Cys, NAC и NaHS групи (*control, effect, washout*)



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

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

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



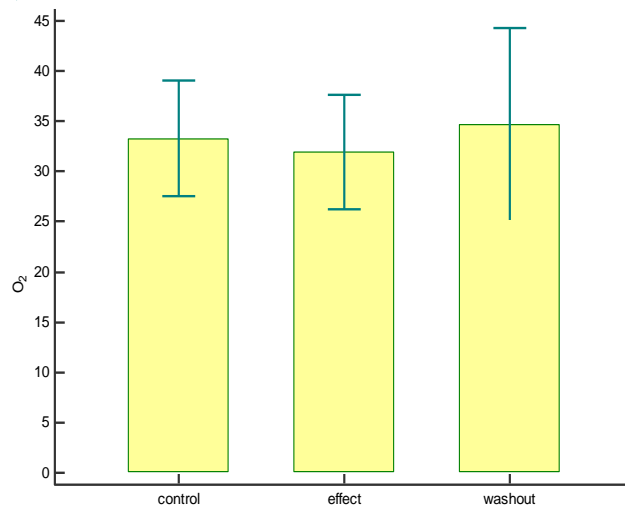
Табела 6. Статистичко поређење различитих мерења (на крају контролног периода – *control*, на крају периода администрације тест супстанце – *effect*, на крају периода опоравка – *washout*) унутар контролних група пацова за прооксидационе маркере (O_2^- , H_2O_2 , TBARS и NO_2^-). Статистички значајна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

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

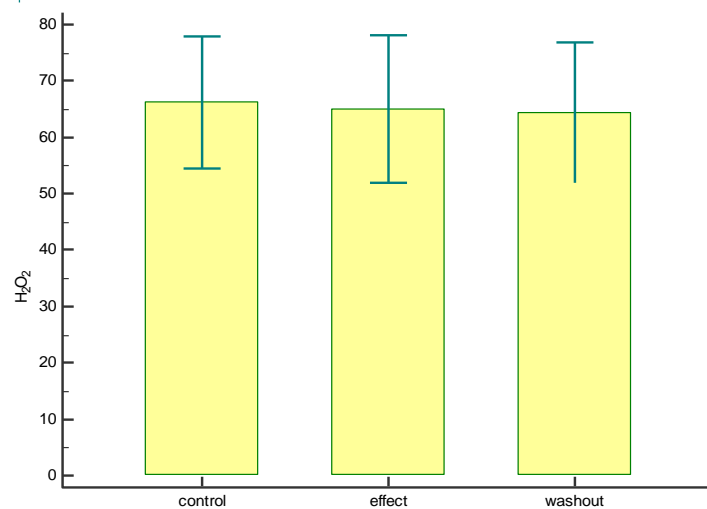
4.5. Динамика прооксидационих маркера у коронарном венском ефлуенту унутар експерименталних група пацова

4.5.1. DL-хомоцистеин група (DL-Hcy)

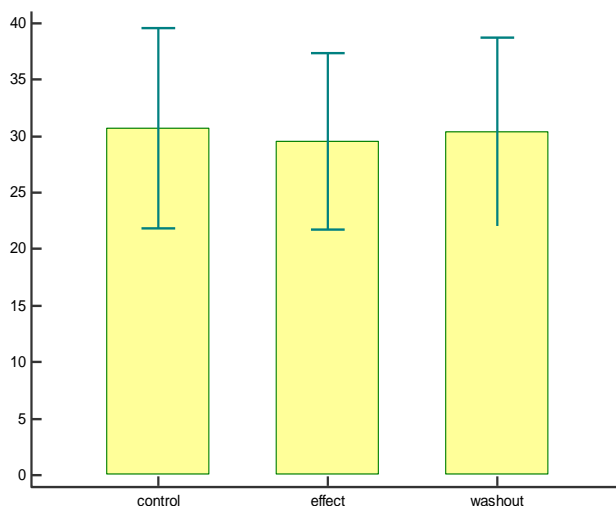
Графикон 97. Супероксид анјон радикал (O_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy групи пацова



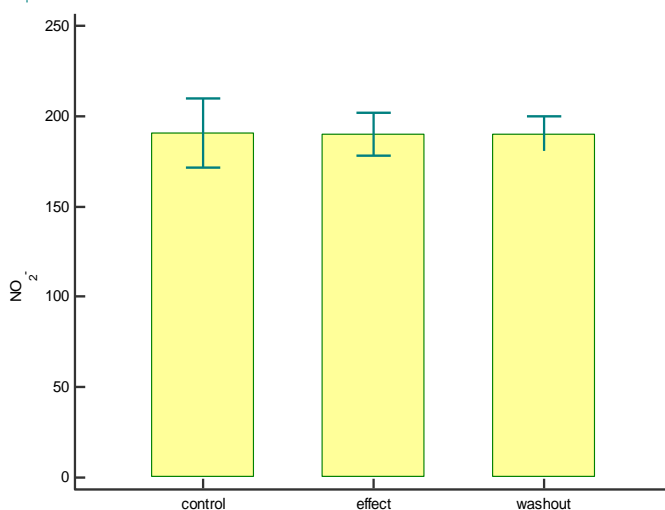
Графикон 98. Водоник пероксид (H_2O_2) на крају контролног периода (*control*), на крају апликовања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy групи пацова



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

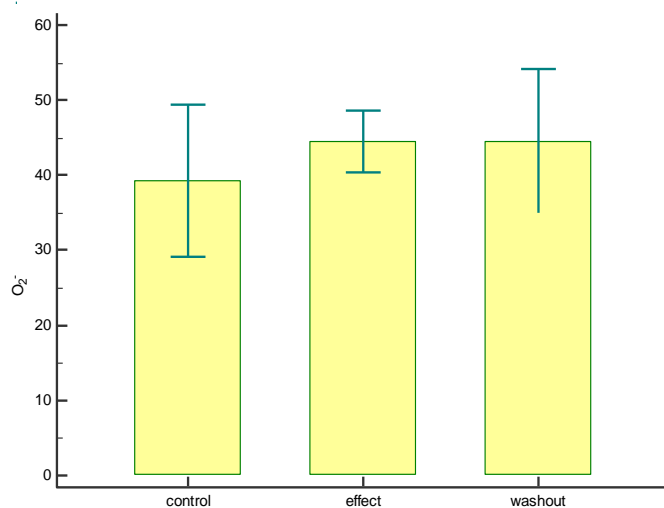


Графикон 100. Азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања физиолошког раствора (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу групи пацова

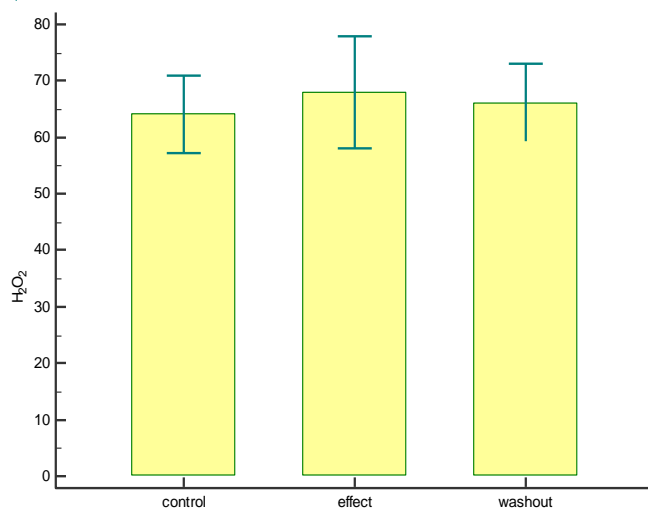


4.5.2. DL-хомоцистеин + L-метионин група (DL-Hcy+L-Meth)

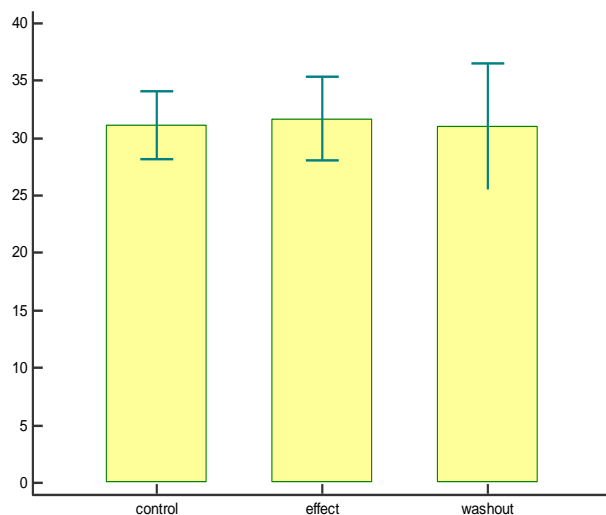
Графикон 101. Супероксид анјон радикал (O_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Meth групи пацова



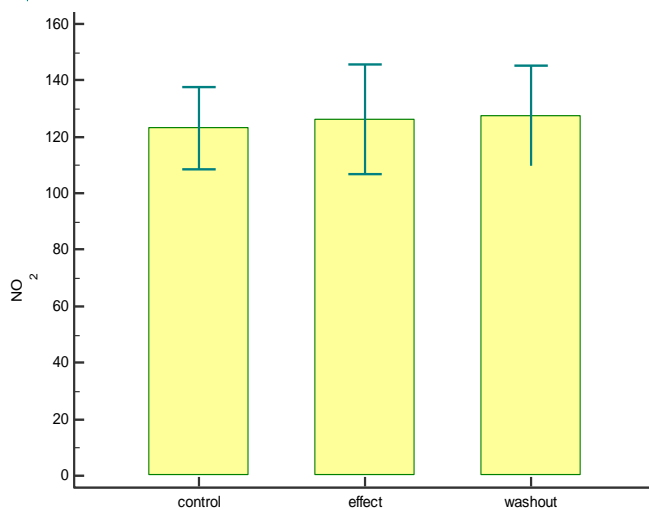
Графикон 102. Водоник пероксид (H_2O_2) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Meth групи пацова



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

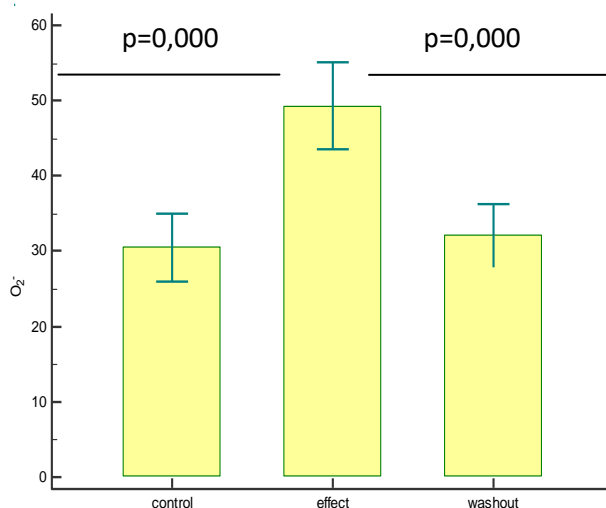


Графикон 104. Азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Meth (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+L-Meth групи пацова

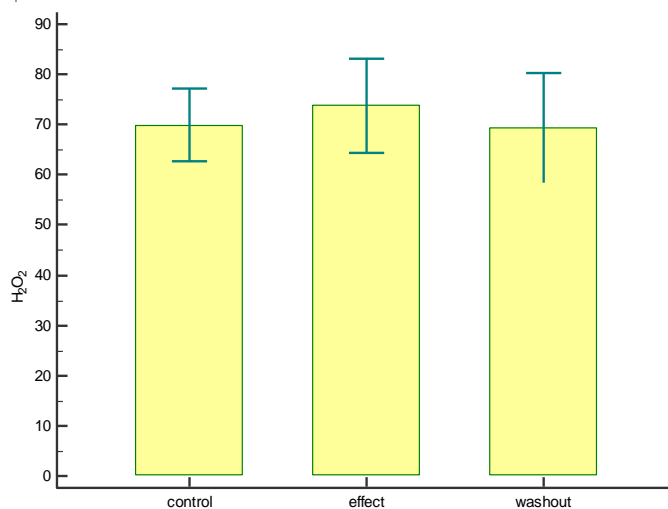


4.5.3. DL- хомоцистеин + L-цистеин група (DL-Hcy+L-cys)

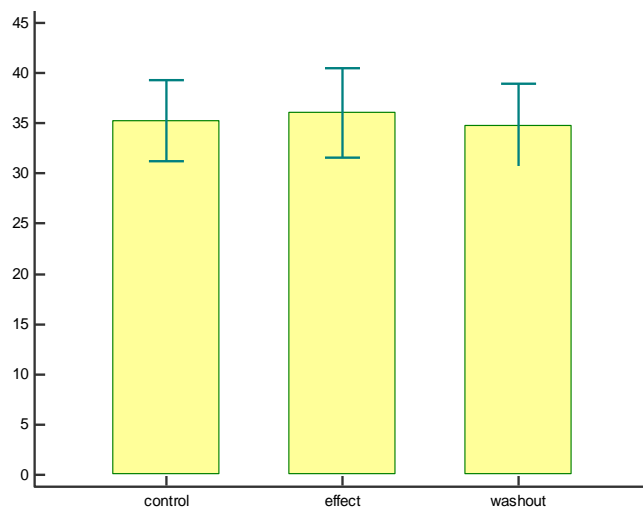
Графикон 105. Супероксид анјон радикал (O_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Cys групи пацова



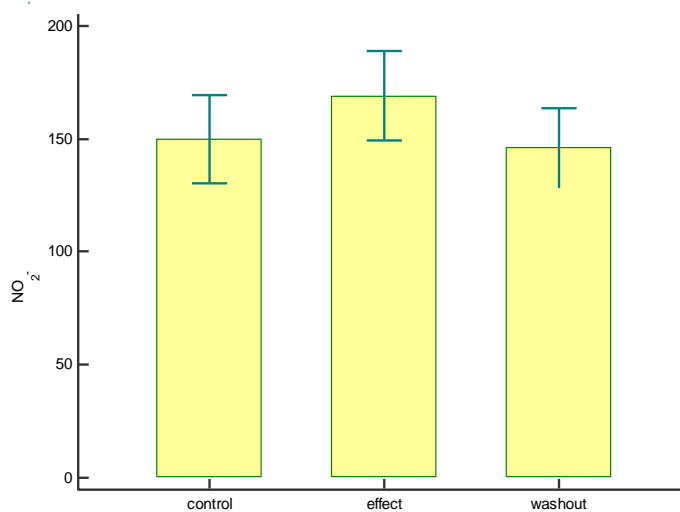
Графикон 106. Водоник пероксид (H_2O_2) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+L-Cys групи пацова



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

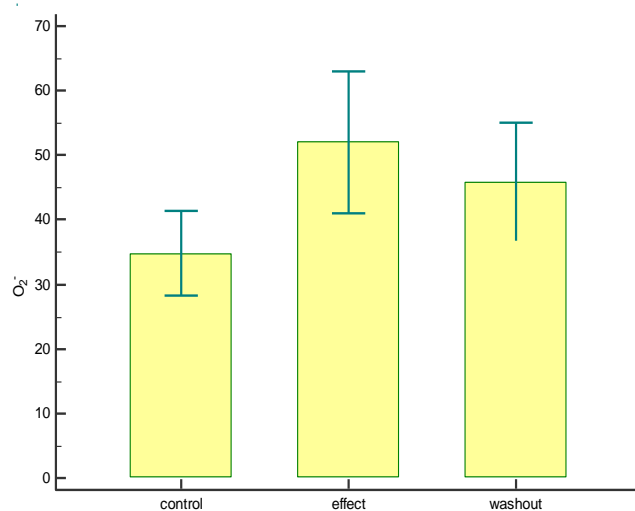


Графикон 108. Азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања L-Cys (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+ L-Cys групи пацова

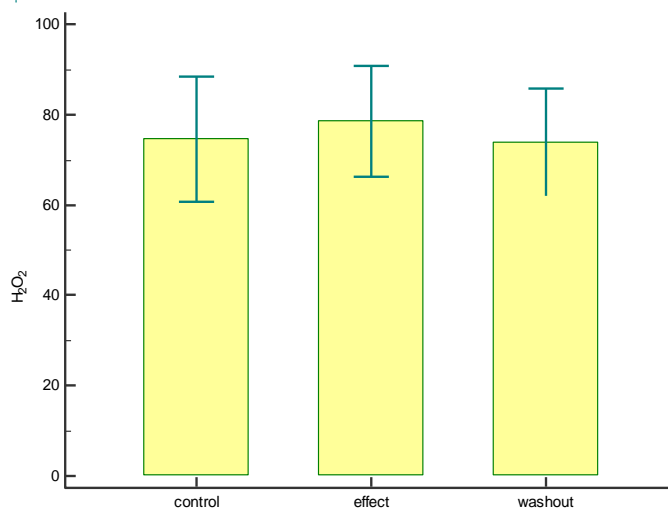


4.5.4. DL-хомоцистен + N-ацетилцистеин група (DL-Нсу+NAC)

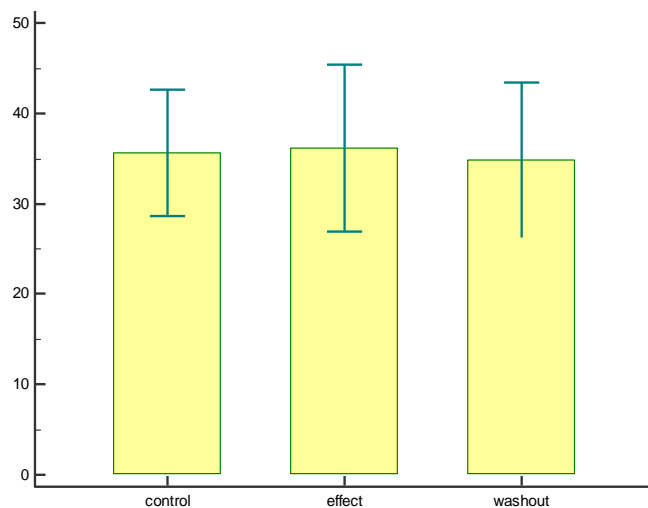
Графикон 109. Супероксид анјон радикал (O_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+ NAC групи пацова



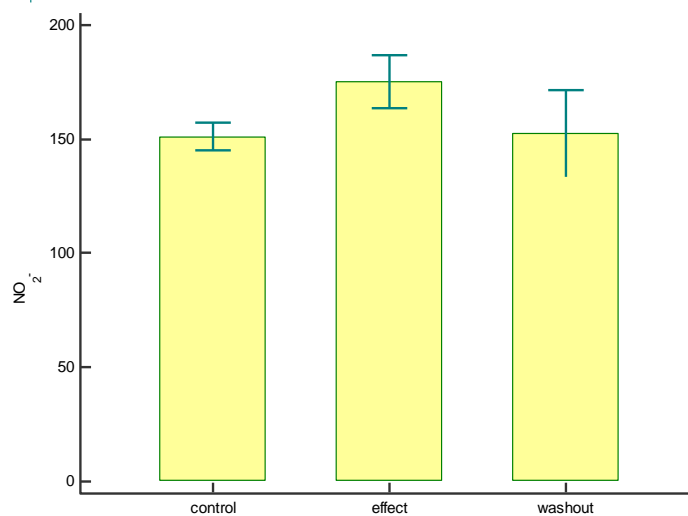
Графикон 110. Водоник пероксид (H_2O_2) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+ NAC групи пацова



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

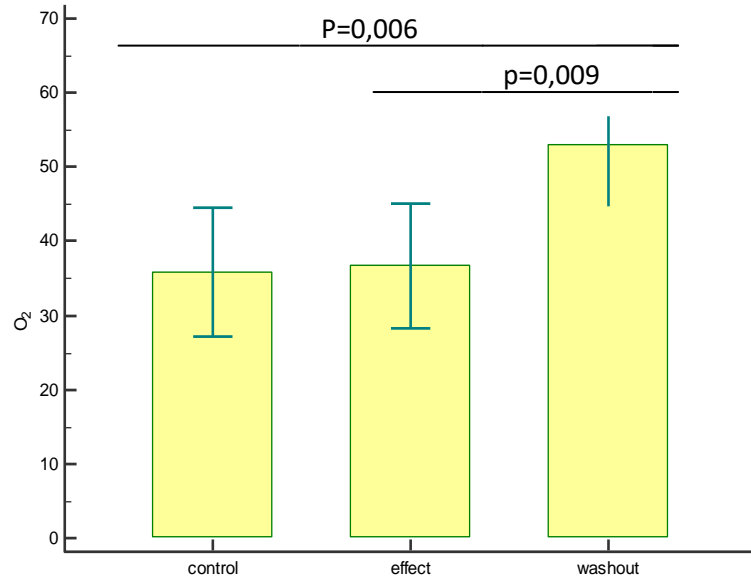


Графикон 112. Азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NAC (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+NAC групи пацова

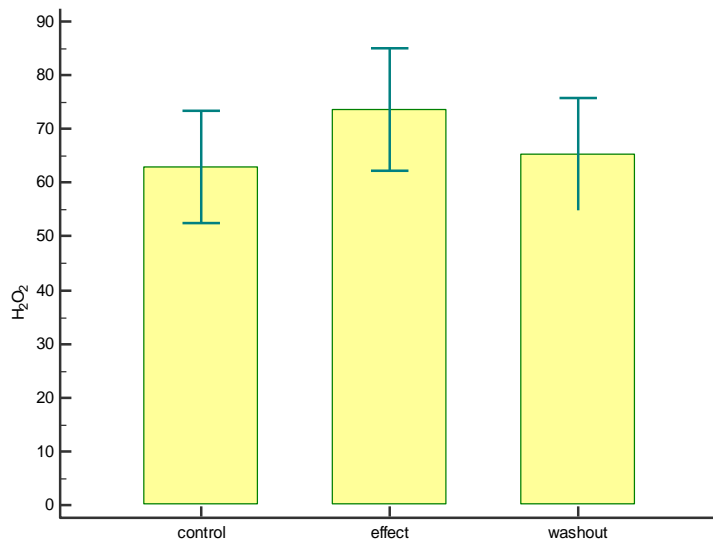


4.5.5. DL-хомоцистеин + Na-хидрогенсулфид (DL-Нсу+NaHS)

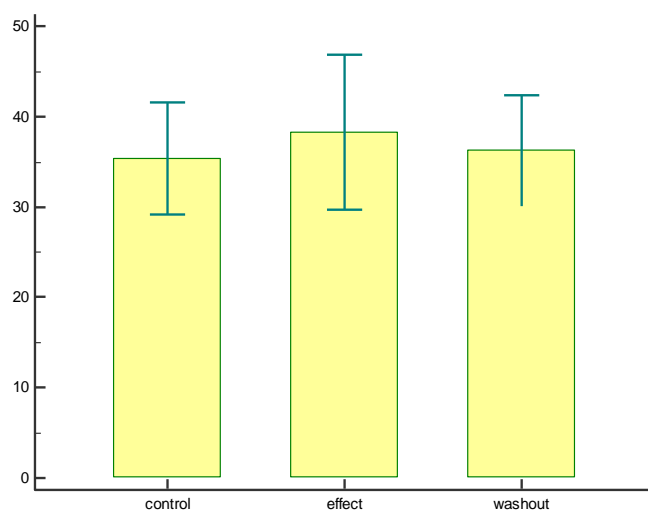
Графикон 113. Супероксид анјон радикал (O_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+NaHS групи пацова



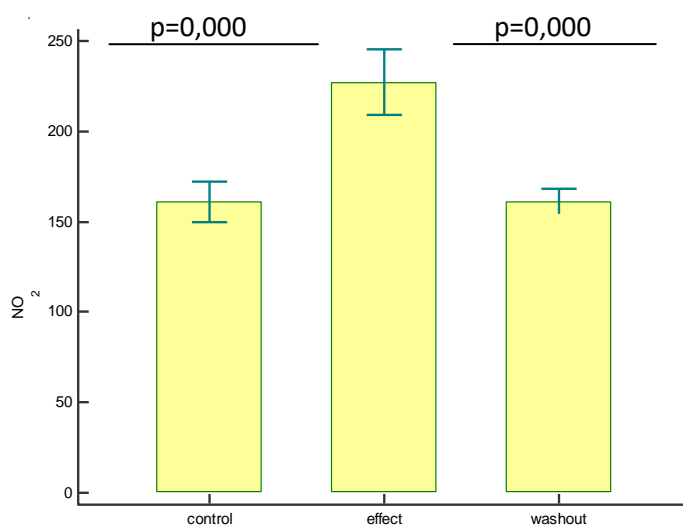
Графикон 114. Водоник пероксид (H_2O_2) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Нсу+NaHS групи пацова



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



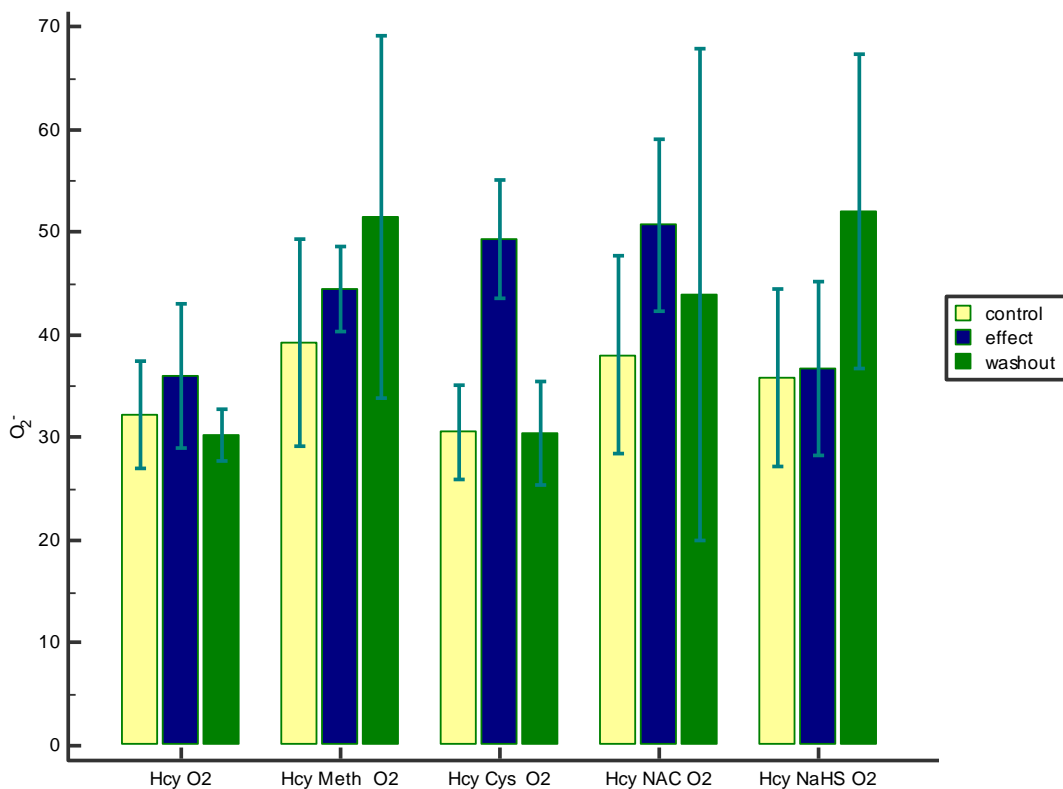
Графикон 116. Азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-) на крају контролног периода (*control*), на крају апликавања NaHS (*effect*) и на крају периода опоравка (*washout*), у DL-Hcy+ NaHS групи пацова



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

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

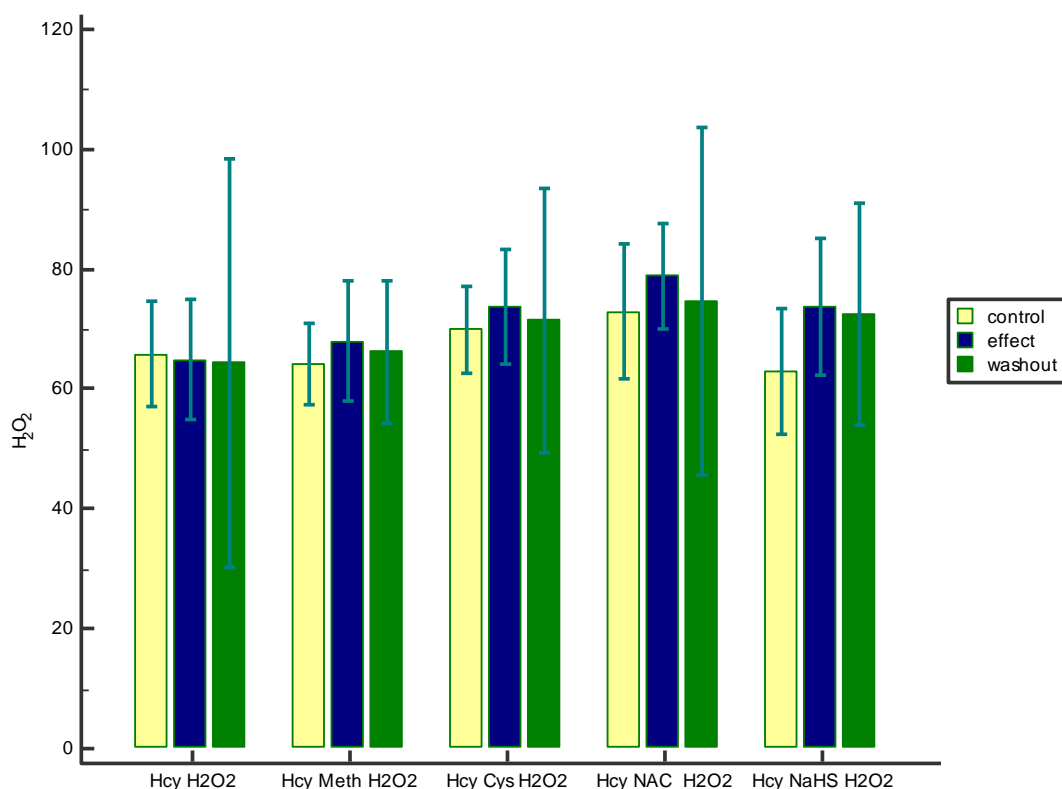
Графикон 117. Вредности супероксид анјон радикала (O_2^-) у DL-Нсу, DL-Нсу+L-Meth, DL-Нсу+L-Cys, DL-Нсу+NAC и DL-Нсу+NaHS групама (*control, effect, washout*)



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

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

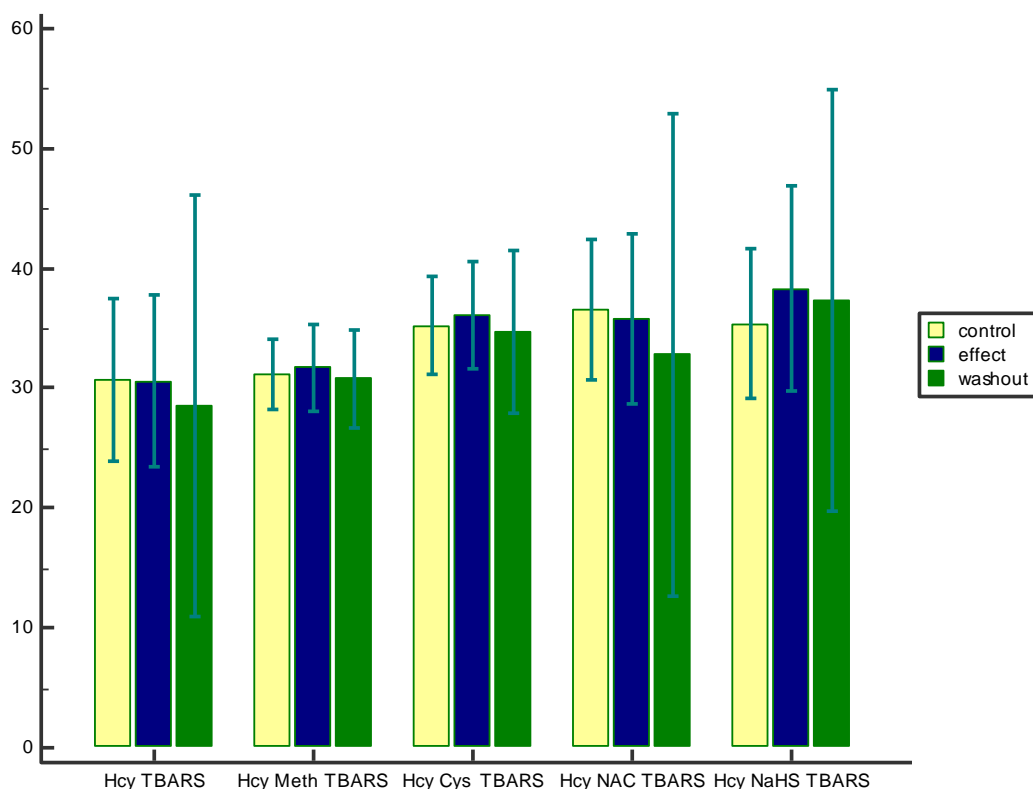
Графикон 118. Вредности водоник пероксида (H_2O_2) у DL-Нсу, DL-Нсу+L-Meth, DL-Нсу+L-Cys, DL-Нсу+NAC и DL-Нсу+NaHS групама (*control, effect, washout*)



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

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

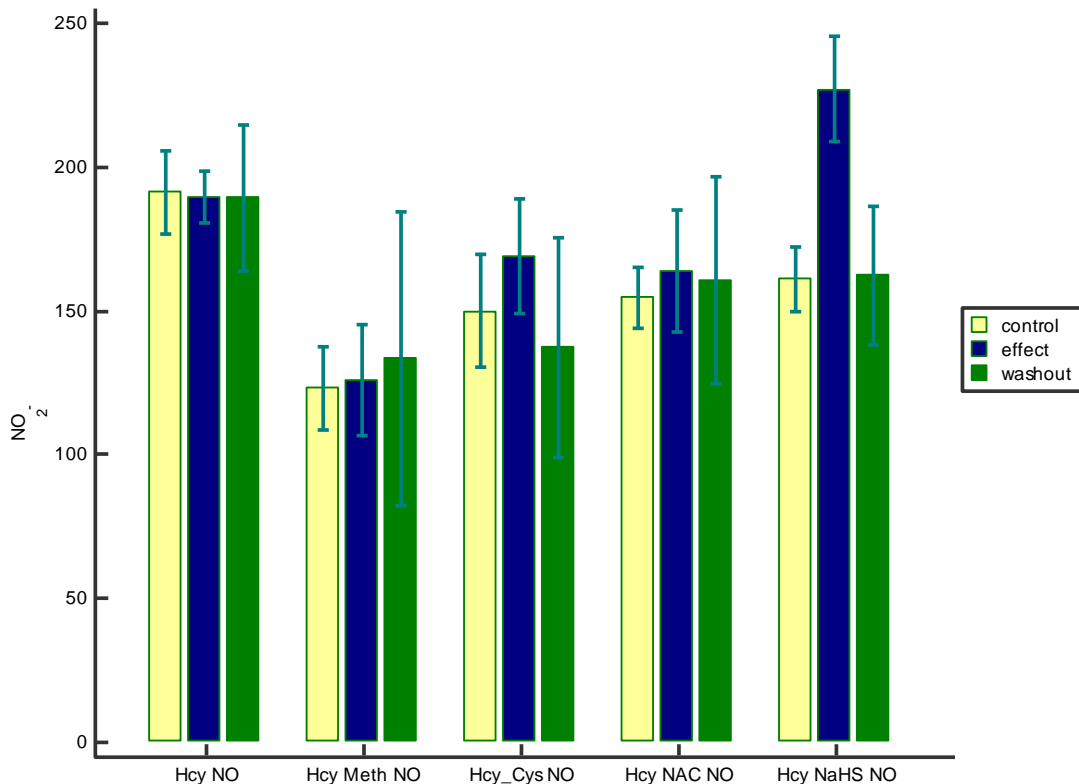
Графикон 119. Вредности индекса липидне пероксидације (TBARS) у DL-Нсу, DL-Нсу+L-Meth, DL-Нсу+L-Cys, DL-Нсу+NAC и DL-Нсу+NaHS групама (*control, effect, washout*)



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

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

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



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

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

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

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

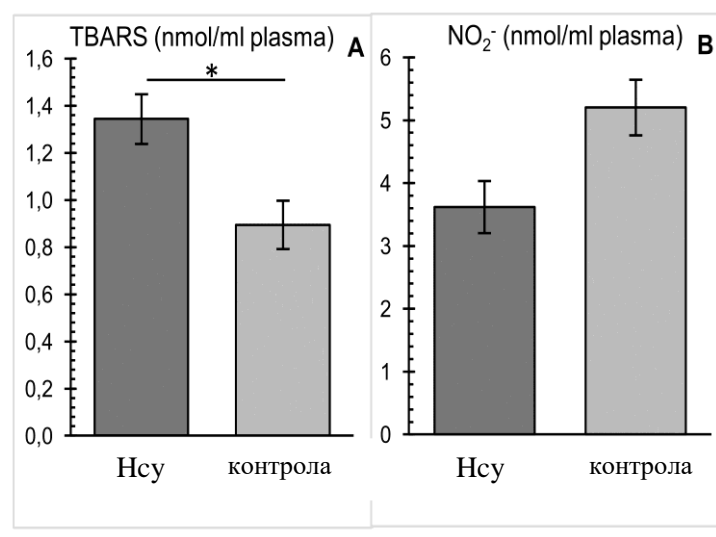
	TBARS		NO_2^-		O_2^-		H_2O_2	
	Sig.	η_p^2	Sig.	η_p^2	Sig.	η_p^2	Sig.	η_p^2
L-methionine DL-Hcy treatment	0,859	0,001	<u>0,017</u>	0,160	0,507	0,013	0,078	0,084
L-cysteine DL-Hcy treatment	0,397	0,024	<u>0,016</u>	0,178	<u>0,010</u>	0,202	0,264	0,041
N-acetylcysteine DL-Hcy treatment	<u>0,005</u>	0,230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

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

4.6.1. Индекс липидне пероксидације и нитрити (крвна плазма)

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

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

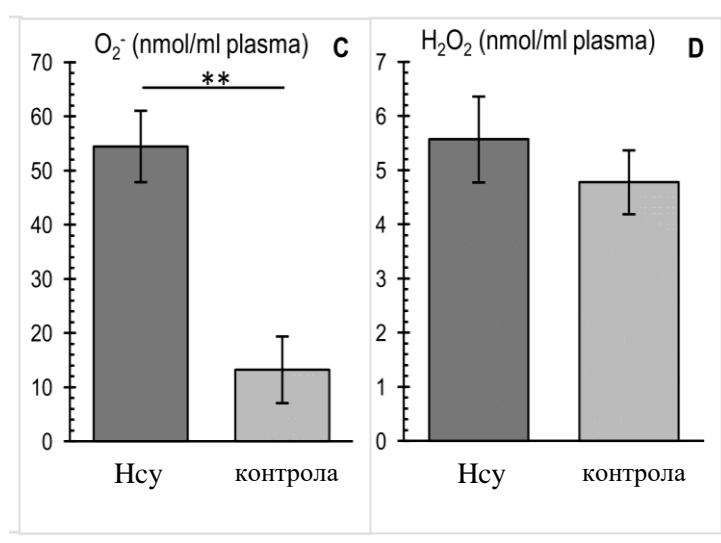


* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

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

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

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



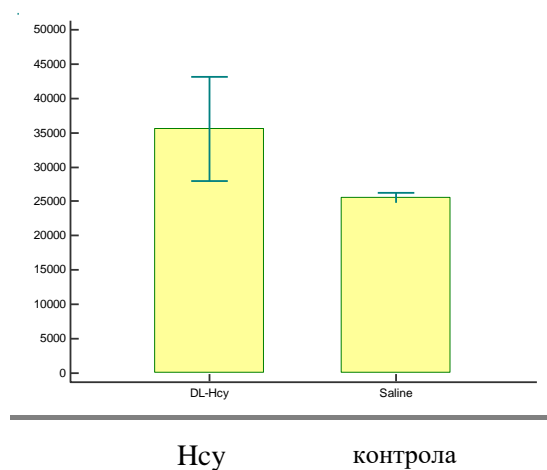
* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

4.7. Маркери антиоксидационог система заштите

4.7.1. Редуковани глутатион (GSH)

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

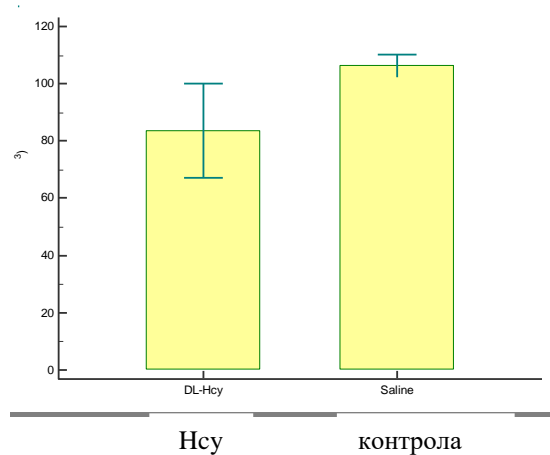
Графикон 123. Вредности редукованог глутатиона (GSH) у хемализату еритроцита у контролној групи (контрола) и групи која је била на субхроничном третману DL-хомоцистеином (Нсу)



4.7.2. Супероксид дисмутаза (SOD)

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

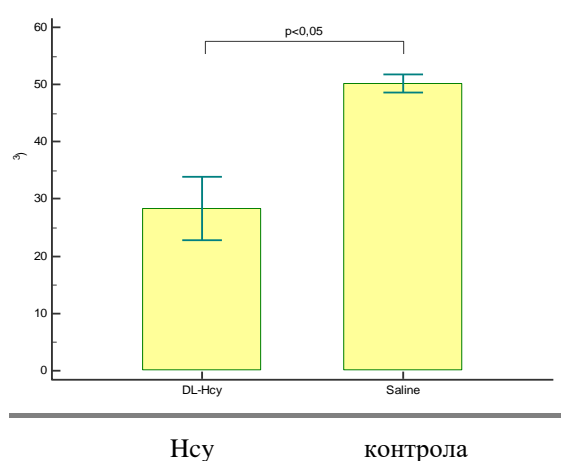
Графикон 124. Вредности супероксид дисмутазе (SOD) у хемолизату еритроцита у контролној групи (контрола) и групи која је била на субхроничном третману DL-хомоцистеином (Hcy)



4.7.3. Каталаза (CAT)

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

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



ДИСКУСИЈА

5. ДИСКУСИЈА

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

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

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

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

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

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

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

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

5.1. *Ефекти сумпоровитих једињења на биорасположивост укупног хомоцистеина*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.3. *Ефекти сумповитих аминокиселина на биомаркере оксидационог стреса*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ЗАКЉУЧЦИ

6. ЗАКЉУЧЦИ

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

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

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

ЛИТЕРАТУРА

7. ЛИТЕРАТУРА

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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