



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Јована Брадић

**ИСПИТИВАЊЕ АНТИМИКРОБНИХ, АНТИИНФЛАМАЦИЈСКИХ,
АНТИОКСИДАЦИОНИХ И КАРДИОПРОТЕКТИВНИХ ЕФЕКТА
ЕКСТРАКТА ИВАЊСКОГ ЦВЕЋА, *GALIUM VERUM L***

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор: др сци. мед. Марина Томовић, ванредни професор

Крагујевац, 2019. године

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>
Име и презиме: Јована Брадић
Датум и место рођења: 19.12.1991, Крагујевац, Србија
Садашње запослење: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: Испитивање антимикуробних, антиинфламацијских, антиоксидационих и кардиопротективних ефеката екстракта ивањског цвећа, <i>Galium verum L</i>
Број страница: 190
Број слика: 16
Број библиографских података: 254
Установа и место где је рад израђен: Лабораторија за кардиоваскуларну физиологију, Институт Факултета медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац
Научна област (УДК): медицина
Ментор: др сци. мед. Марина Томовић, ванредни професор
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 02.11.2017. године
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-03-97/16 од 07.02.2018. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: 1. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области <i>Микробиологија и имунологија</i> и <i>Онкологија</i> , председник; 2. Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Физиологија</i> , члан; 3. Проф. др Слободан Новокмет, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Фармацеутска биотехнологија</i> , члан; 4. Проф. др Биљана Божин, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду за ужу научну област <i>Фармакогнозија и фитотерапија</i> , члан; 5. Доц. др Мирослав Соврлић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Фармацеутска анализа</i> , члан.
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: 1. Доц. др Ана Барјактаревевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Фармацеутска технологија</i> , председник; 2. Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Физиологија</i> , члан; 3. Проф. др Биљана Божин, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду за ужу научну област <i>Фармакогнозија и фитотерапија</i> , члан.
Датум одбране дисертације:

САЖЕТАК

Циљ овог истраживања био је да испита антимикробна, антиоксидациона, антиинфламацијска и кардиопротективна својства екстраката добијених из надземних делова биљке ивањско цвеће (*Galium verum L.*). Антимикробна активност екстраката тестирана је помоћу бујон микродилуционог метода, док је антибиофилм активност тестирана помоћу *Tissue culture plate* теста. Антиинфламацијски ефекат екстраката одређиван је на моделу инфламације изазване карагенином код пацова. Овај део студије обухватио је 50 пацова (5 група по 10 пацова): пацови на третману екстрактом у дози од 50 mg/kg, 100 mg/kg и 200 mg/kg интраперитонеално (i.p.), индометацином (10 mg/kg i.p.) и пацови на третману 0,9% NaCl. Ефекти екстраката ивањског цвећа на функцију миокарда испитивани су помоћу модела исхемијско-реперфузионе (И-Р) повреде изолованог срца пацова, методом ретроградне перфузије по *Langendorff*-у. Овај део експеримента обухватио је 80 пацова (8 група по 10 пацова): здрави и спонтано хипертензивни пацови који су током 4 недеље, пре изазивања срчане И-Р, били на третману метанолним екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg, 250 mg/kg и 500 mg/kg per os и здрави и спонтано хипертензивни нетретирани пацови. У узорцима коронарног венског ефлуента одређивани су нивои прооксиданаса, док је из узорака венске крви одређиван системски редок статус. Наши резултати су открили умерену антибактеријску и слабу антигљивичну активност екстраката, чији је интензитет варирао у зависности од тестираног микроорганизама и типа екстракта. Метанолни екстракт ивањског цвећа у свим дозама показао је значајан потенцијал ка ублажавању инфламације изазване карагенином, при чему је најизраженији ефекат постигнут највишом дозом. Четворонедељни третман екстрактом ивањског цвећа у свим дозама значајно је побољшао опоравак функције миокарда и допринео очувању контракције и релаксације срца. Такође екстракт ове биљне врсте умањио је срчану и системску продукцију прооксиданаса. Наведене протективне ефекте екстракт ивањског цвећа је остварио у условима нормотензије и повишеног крвног притиска, при чему је интензивнији утицај након администрације више дозе. Обећавајући ефекти ивањског цвећа у овој докторској дисертацији пружају основу за будућа истраживања која би додатно сагледала терапијске могућности ове биљне врсте и расветлила механизме путем којих остварује фармаколошку активност.

Кључне речи: *Galium verum*, исхемијско-реперфузиона повреда миокарда, инфламација, оксидациони стрес

ABSTRACT

The aim of this study was to estimate the antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory and cardioprotective properties of the extracts obtained from the aerial part of lady's bedstraw (*Galium verum* L, *G. verum* L). The antimicrobial activity of the extract was tested by microdilution method, while the antibiofilm activity was assessed by Tissue Culture Plate test. The anti-inflammatory effects of extracts were determined by using model of carrageenan- induced inflammation in rats. This part of the study included 50 rats (5 groups, 10 rats per group): rats on the treatment with extracts at doses of 50 mg/kg, 100 mg/kg and 200 mg/kg intraperitoneally (i.p.), indomethacin (10 mg/kg i.p.) and rats treated with 0.9% NaCl solution. The effects of extracts of *G. verum* on myocardial function were investigated by using a model of ischemia-reperfusion (I-R) injury of the isolated rat hearts, by Langendorff retrograde perfusion method. This part of the study included 80 rats divided into 8 groups: healthy and spontaneously hypertensive rats that were treated with methanolic extract of *G. verum* at a dose of 125 mg/kg, 250 mg/kg and 500 mg/kg for 4 weeks prior to the induction of cardiac I-R, and healthy and spontaneously hypertensive untreated rats. Levels of pro-oxidants were determined in the samples of coronary venous effluent, while systemic redox state was estimated in venous blood samples. Our results revealed a moderate antibacterial and weak antifungal activity of extracts, the intensity of which varied depending on the tested microorganism and the type of extract. Methanolic extract of *G. verum* in all doses showed significant potential to alleviate carrageenan-induced inflammation, with the most pronounced effect achieved with the highest dose. Four-week treatment with *G. verum* extract in all doses significantly improved the myocardial functional recovery and contributed to preservation of contraction and relaxation of the heart. The extract of this plant species diminished cardiac and systemic production of pro-oxidants as well. The above-mentioned protective effects of the *G. verum* extract were achieved both in conditions of normal and elevated blood pressure, with more intensive influence after administration of higher doses. The promising effects of *G. verum* in this PhD thesis provides a basis for future research which would further explore the therapeutic possibilities of this plant species and illuminate mechanisms underlying pharmacological activity.

Key words: *Galium verum*, myocardial ischemia reperfusion injury, inflammation, oxidative stress

Неизмерну захвалност дугујем проф. др Владимиру Јаковљевићу који ми је отворио врата своје лабораторије, указао на све лепоте научно-истраживачког рада и омогућио да сарађујем са извршним стручњацима и још бољим људима. Желим да му се захвалим на указаном поверењу, пренесеном знању, бројним драгоценим професионалним и пријатељским саветима, сталној помоћи, разумевању и подрици током основних и докторских студија, што је утицало не само на квалитет ове докторске дисертације, већ и на мој целокупни професионални развој и напредак.

Велику захвалност дугујем менторки проф. др Марини Томовић на свом уложеном труду приликом осмишљавања и израде докторске дисертације, корисним саветима, оптимизму и подрици који никад нису изостајали.

Желим да се захвалим драгим колегама из лабораторије за кардиоваскуларну физиологију: Владимиру Живковићу, Невени Јеремић и Ивану Срејовићу за пренесено знање у вези експерименталног рада, бројне стручне и пријатељске савете током дугогодишње заједничке сарадње. Такође велику захвалност дугујем драгим колегама и пријатељима: Јовани Јеремић, Александри Вранић, Аници Петковић, Исидори Стојић, Тамари Николић Турнић, Марку Равићу, Маријани Анђић, Марини Ранковић, Невени Драгинић, Катарини Радоњић, Маји Савић и Јасмини Сретеновић на помоћи у извођењу експеримената, колегијалности и сталној пријатној атмосфери која сваки радни задатак претвара у задовољство.

Захваљујем се Предрагу Равићу и Љиљани Ђоковић на свим корисним саветима и позитивној енергији коју уносе и лабораторију и сваки радни дан учине посебним.

Желим да се захвалим и колеги Мирославу Соврлићу на помоћи око екстракције биљке, корисним саветима и дружењу. Такође топло се захваљујем проф. др Слободанки Митровић на изузетној помоћи приликом хистолошке анализе. Колеги и другу Душану Томашевићу се захваљујем за сву помоћ приликом техничке обраде докторске дисертације, која је омогућила да она поприми свој коначни облик.

Захваљујем се и пријатељима на пруженој подрици и мотивацији да истрајем током израде докторске дисертације.

Све оно што није преточиво у речи дугујем својим родитељима, Јелени и Верољубу, и баба Вери. Они заузимају посебно место у изради ове докторске дисертације јер без њихове безусловне љубави и подрике ништа од овога не би било могуће.

Ваша Јована

1. УВОД	1
1.1. Опис врсте <i>Galium verum</i> (ивањско цвеће)	2
1.2. Етимологија	3
1.3. Таксономија и распрострањеност ивањског цвећа	3
1.4. Хемијски састав ивањског цвећа	3
1.4.1. Полифенолна једињења	4
1.4.2. Иридоиди	7
1.4.3. Остала биоактивна једињења присутна у ивањском цвећу	8
1.4.4. Етарско уље ивањског цвећа	9
1.5. Традиционална употреба ивањског цвећа	10
1.6. Фармаколошка активност ивањског цвећа	11
1.6.1. Антиканцерогени ефекти ивањског цвећа	12
1.6.2. Ефекти ивањског цвећа на ендокрини систем	12
1.6.3. Антихемолитичка активност ивањског цвећа	12
1.6.4. Холинестеразна активност	13
1.6.5. Антимикробна активност ивањског цвећа	13
1.6.6. Антиоксидациона активност ивањског цвећа	13
1.7. Исхемијска болест срца	15
1.7.1. Механизми исхемијско/реперфузионе повреде миокарда	17
1.7.2. Феномен прекондиционирања миокарда: улога лековитих биљака	18
1.8. Инфламација: улога лековитих биљака	18
1.9. Инфективне болести: улога лековитих биљака	19
1.10. Оксидациони стрес	21
1.10.1. Слободни радикали и редокс равнотежа	21
1.10.2. Оксидациони стрес и кардиоваскуларне болести: улога лековитих биљака	22
2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	24
2.1. Општи циљеви	25
2.2. Специфични циљеви	25
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД	26
3.1. Прикупљање и припрема биљног материјала	27
3.2. Припрема екстракта	27
3.3. Хемијска карактеризација екстракта	28

3.3.1. Скрининг одабраних једињења HPLC-MS/MS техником.....	28
3.3.2. Одређивање укупног фенолног садржаја.....	29
3.3.3. Одређивање укупног флавоноидног садржаја.....	30
3.4. Одређивање способности неутрализације DPPH· радикала.....	32
3.4.1. Реагенси.....	32
3.4.2. Поступак.....	32
3.5. Испитивање антимикробне активности екстраката.....	33
3.5.1. Коришћени антимикробни лекови.....	33
3.5.2. Припрема екстраката и хранљиве подлоге.....	33
3.5.3. Испитивани микроорганизми.....	34
3.5.4. Припрема суспензија.....	34
3.5.5. Поступак.....	35
3.6. Испитивање антибиофилм активности екстраката.....	36
3.6.1. Припрема екстраката и хранљиве подлоге.....	36
3.6.2. Испитивани микроорганизми.....	36
3.6.3. Припрема суспензије.....	36
3.6.4. Tissue culture plate (TCP) тест.....	36
3.7. Испитивање антиинфламацијске активности екстраката ивањског цвећа.....	37
3.7.1. Експерименталне животиње.....	37
3.7.2. Индукција локалне инфламације и третман екстрактима.....	38
3.8. Испитивање кардиопротективних ефеката екстраката ивањског цвећа.....	39
3.8.1. Експерименталне животиње.....	39
3.8.2. Испитивање ex vivo функције срца.....	42
3.8.3. Експериментални протокол.....	44
3.9. Испитивање ефеката ивањског цвећа на системски и срчани редокс статус.....	44
3.9.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS).....	45
3.9.2. Одређивање нитрита (NO ₂ ⁻).....	46
3.9.3. Одређивање супероксид анјон радикала (O ₂ ⁻).....	48
3.9.4. Одређивање водоник пероксида (H ₂ O ₂).....	49
3.9.5. Одређивање каталазе (CAT).....	50
3.9.6. Одређивање супероксид дисмутазае (SOD).....	51
3.9.7. Одређивање редукованог глутатиона (GSH).....	52
3.10. Хистопатолошка анализа срца пацова.....	53
3.10.1. Поступак.....	53
3.11. Снага студије и величина узорка.....	54

3.12. Статистичка обрада података	54
4. РЕЗУЛТАТИ	55
4.1. Утицај растварача различите поларности на принос екстраката ивањског цвећа	56
4.2. Хемијска карактеризација екстраката ивањског цвећа	56
4.2.1. Одабрана једињења у екстрактима ивањског цвећа.....	56
4.2.2. Садржај укупних фенола и флавоноида у екстрактима	61
4.3. Капацитет неутралисања DPPH' радикала	61
4.4. Антимикробна активност екстраката ивањског цвећа.....	62
4.5. Антибиофилм активност екстраката ивањског цвећа	65
4.6. Антиинфламацијска активност екстраката ивањског цвећа	65
4.7. Ефекти екстраката ивањског цвећа на морфометријске карактеристике пацова..	66
4.7.1. Ефекти екстраката ивањског цвећа на телесну масу животиња	66
4.7.2. Ефекти екстраката ивањског цвећа на масу срца, јетре и бубрега животиња	67
4.8. Ефекти екстраката ивањског цвећа на маркере оксидационог стреса у крви пацова ..	68
4.8.1. Ефекти екстраката ивањског цвећа на системски редокс статус здравих пацова ..	68
4.8.2. Ефекти екстраката ивањског цвећа на системски редокс статус спонтано хипертензивних пацова.....	71
4.8.3. Разлике у утицају екстраката ивањског цвећа на системски редокс статус здравих и спонтано хипертензивних животиња	74
4.9. Ефекти екстраката ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова.....	77
4.9.1. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока изолованог срца нетретираних пацова	77
4.9.2. Ефекти екстраката ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток здравих пацова	81
4.9.3. Ефекти екстраката ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток спонтано хипертензивних пацова	92
4.9.4. Разлике у ефектима екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток код здравих и спонтано хипертензивних пацова.....	103
4.10. Ефекти екстраката ивањског цвећа на маркере оксидационог стреса у перфузату изолованог срца пацова	107
4.10.1. Вредности маркера оксидационог стреса у перфузату изолованог срца нетретираних пацова	107
4.10.2. Ефекти екстраката ивањског цвећа на маркере оксидационог стреса у перфузату изолованог срца здравих пацова	109
4.10.3. Ефекти екстраката ивањског цвећа на маркере оксидационог стреса у перфузату изолованог срца спонтано хипертензивних пацова	116
4.10.4. Разлике у ефектима екстракта ивањског цвећа на срчане прооксидантне маркере код здравих и спонтано хипертензивних пацова.....	123

4.11. Ефекти екстраката ивањског цвећа на очуваност грађе органа пацова	127
4.11.1. Ефекти екстраката ивањског цвећа на очуваност грађе јетре здравих и спонтано хипертензивних пацова	127
4.11.2. Ефекти екстраката ивањског цвећа на очуваност грађе бубрега здравих и спонтано хипертензивних пацова	129
4.11.3. Ефекти екстраката ивањског цвећа на очуваност грађе срца здравих и спонтано хипертензивних пацова након исхемије-реперфузије.....	132
5. ДИСКУСИЈА	136
5.1. Хемијски састав екстраката ивањског цвећа.....	137
5.2. Способност неутрализације DPPH радикала	137
5.3. Антимикробна активност екстраката ивањског цвећа.....	139
5.4. Антиинфламацијска активност екстраката ивањског цвећа	143
5.5. Ефекти екстраката ивањског цвећа на системски редокс статус пацова.....	145
5.5.1. Ефекти екстраката ивањског цвећа на системски редокс статус здравих пацова	145
5.5.2. Ефекти екстраката ивањског цвећа на системски редокс статус спонтано хипертензивних пацова.....	147
5.5.3. Разлике у ефектима екстраката ивањског цвећа на системски редокс статус код здравих и хипертензивних пацова	149
5.6. Ефекти екстраката ивањског цвећа на <i>ex vivo</i> исхемијско-реперфузиону повреду срца	149
5.6.1. Утицај примене екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток пацова.....	150
5.6.2. Утицај примене екстракта ивањског цвећа на срчани редокс статус пацова	158
5.7. Утицај екстраката ивањског цвећа на очуваност структуре органа пацова	162
5.7.1. Утицај екстраката ивањског цвећа на очуваност структуре јетре здравих и спонтано хипертензивних пацова	162
5.7.2. Утицај екстраката ивањског цвећа на очуваност структуре бубрега здравих и спонтано хипертензивних пацова	163
5.7.3. Утицај екстраката ивањског цвећа на очуваност структуре срца здравих и спонтано хипертензивних пацова након исхемије	165
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	166
7. ЛИТЕРАТУРА	166

1. УВОД

1.1. Опис врсте *Galium verum* (ивањско цвеће)

Galium verum L. (жуто ивањско цвеће, броћац, богородичин простирач, Иванова трава) је вишегодишња зељаста биљка која припада породици *Rubiacea*. Стабљика ове биљне врсте је усправна, четвороугласта и достиже висину од 60-120 cm. Листови су 1-3 cm дуги и око 2 mm широки, сјајни, тамно зелени, док су на наличју длакави. Цветови су жути и скупљени у велике цвасти, док је плод ситан, црне боје. Надземни делови *G. verum* се вековима користе у народној медицини у третману разних обољења. Сакупља се горњи део биљке у цвату, по сувом и сунчаном времену, у периоду од јула до септембра (1-3).

Ивањско цвеће сматра се цвећем дуговечности и здравља. Од давних времена постоји обичај међу Србима да се 7. јула када православни верници прослављају Ивандан прави венац од ивањског цвећа. Народ поставља венац на врата својих домова јер постоји веровање да он штити породицу од несрећа и недаћа.



Слика 1. *Galium verum* (ивањско цвеће)

1.2. Етимологија

Назив ове биљке *Galium verum* потиче од грчке речи *gala* што значи млеко и латинске речи *verus* што значи прави. Цветови и листови ивањског цвећа садрже ензиме који доводе до згрушавања млека и зато се од давнина херба ове биљне врсте користи у производњи сира (4, 5). На страним језицима називи ивањског цвећа су: lady's bedstraw, yellow bedstraw (енглески), caille-lait jaune, gaillet vrai, gaillet jaune (француски), cuajaleche, galio, presera, sanjuanera (шпански) (6).

1.3. Таксономија и распрострањеност ивањског цвећа

Ивањско цвеће припада роду *Galium* који обухвата око 400 биљних врсти, од којих је 145 распрострањено у Европи. У флори Србије јавља се 37 врсти ове биљке, међу којима је жуто ивањско цвеће најпознатије по употреби у традиционалној медицини (1, 2, 7). У Табели 1 је приказана таксономија ивањског цвећа (6).

Ивањско цвеће је распрострањено у целој Европи, Азији, Северној Америци и Африци. Пореклом је са територије Европе и Азије, али је касније пренето и на остале континенте. На нашим просторима ова биљна врста успева на планинским ливадама и пашњацима (3, 5).

Табела 1. Таксономија *Galium verum* L.

Таксономске категорије	Таксони
Царство	<i>Plantae</i>
Раздео	<i>Magnoliophyta</i>
Класа	<i>Magnoliopsida</i>
Ред	<i>Gentianales</i>
Фамилија	<i>Rubiaceae</i>
Род	<i>Galium</i>
Врста	<i>Galium verum</i>

1.4. Хемијски састав ивањског цвећа

Током протекле две деценије значајни истраживачки напори били су усмерени ка испитивању биљних секундарних метаболита који би допринели унапређењу здравља људи. Супстанце биљног порекла као и екстракти, декокти, чајеви и старска

уља лековитих биљака налазе се у фокусу интересовања бројних студија због импозантних биолошких карактеристика (8, 9). Анализе фитохемијског састава *G. veget* указују на присуство различитих фармаколошки активних једињења којима се приписују многобројна лековита својства ове биљне врсте. Надземни део предстаља добар извор иридоидних гликозида, полифенола, антрахинона и тритерпена, док су у мањим количинама заступљени танини, сапонини, алкалоиди, етарска уља, пигменти и витамин Ц (2, 3). Доминантна биоактивна једињења која су и највише изучавана у екстрактима ивањског цвећа су полифеноли и иридоиди.

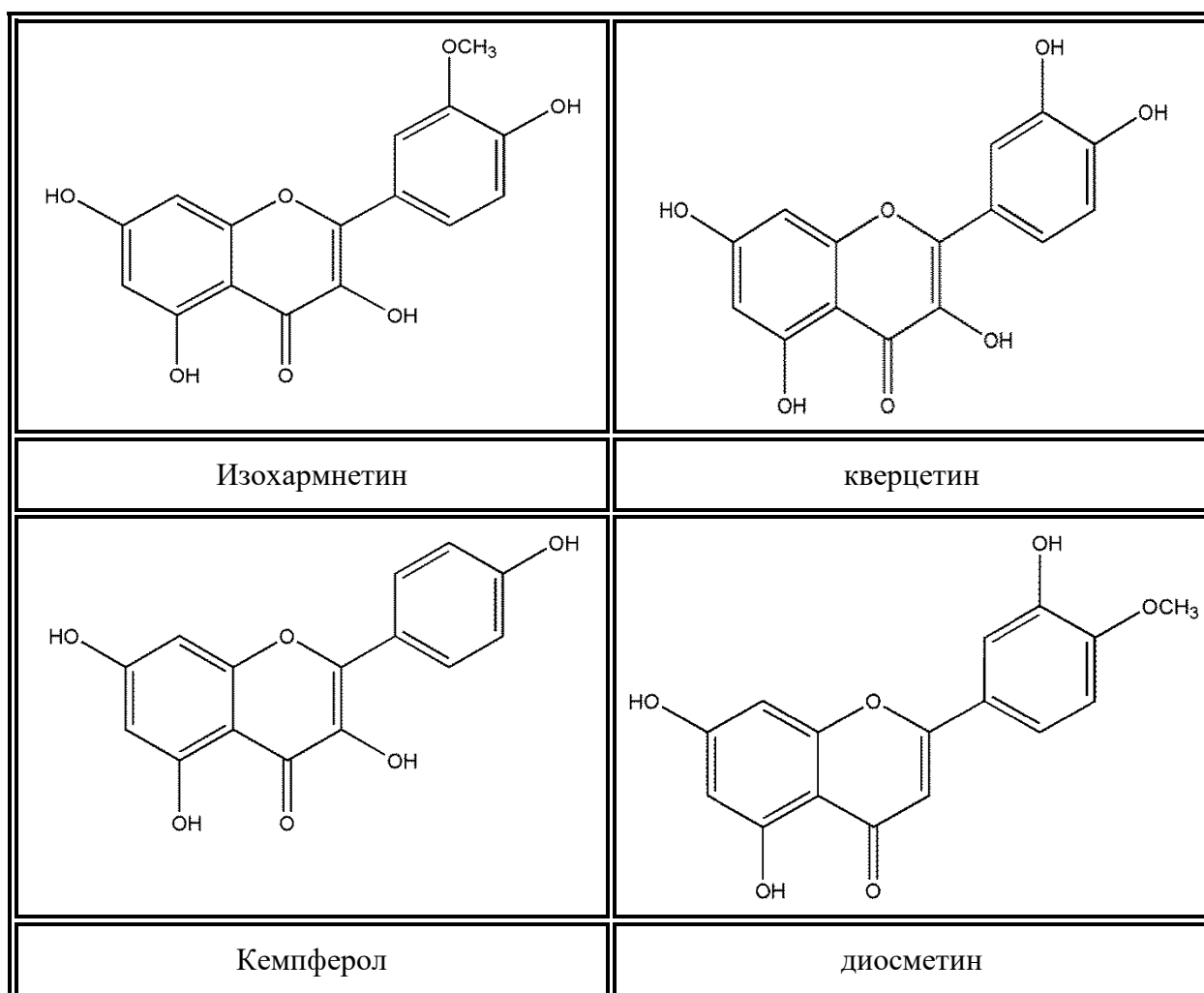
1.4.1. Полифенолна једињења

Полифеноли представљају једну од најбројнијих и најзначајнијих група биљних секундарних метаболита, које карактерише заједничко присуство макар једног ароматичног прстена за који су везане једна или више хидроксилних група (10, 11). Биљни полифеноли заступљени су претежно у воћу, поврћу, житарицама, вину итд (12). Досадашњим истраживањима је потврђено присуство неколико стотина различитих полифенолних једињења у јестивим биљкама, која су заслужна за карактеристике намирница као што су горчина, боја, укус и мирис (13, 14). Секундарни метаболити које биљка ствара неопходни су јој за регуларан раст и заштиту од штетних ефеката ултраљубичастог зрачења, као и развоја микроорганизама (14, 15). На основу хемијске структуре полифенолна једињења се могу класификовати у следеће групе: фенолне киселине, флавоноиди, стилбени и лигнани. У оквиру групе флавоноида на основу броја двоструких веза, броја и положаја супституената са кисеоником разликују се: флавоноли, флаволи, изофлаволи, флаванони, антоцијани и флаваноли (11).

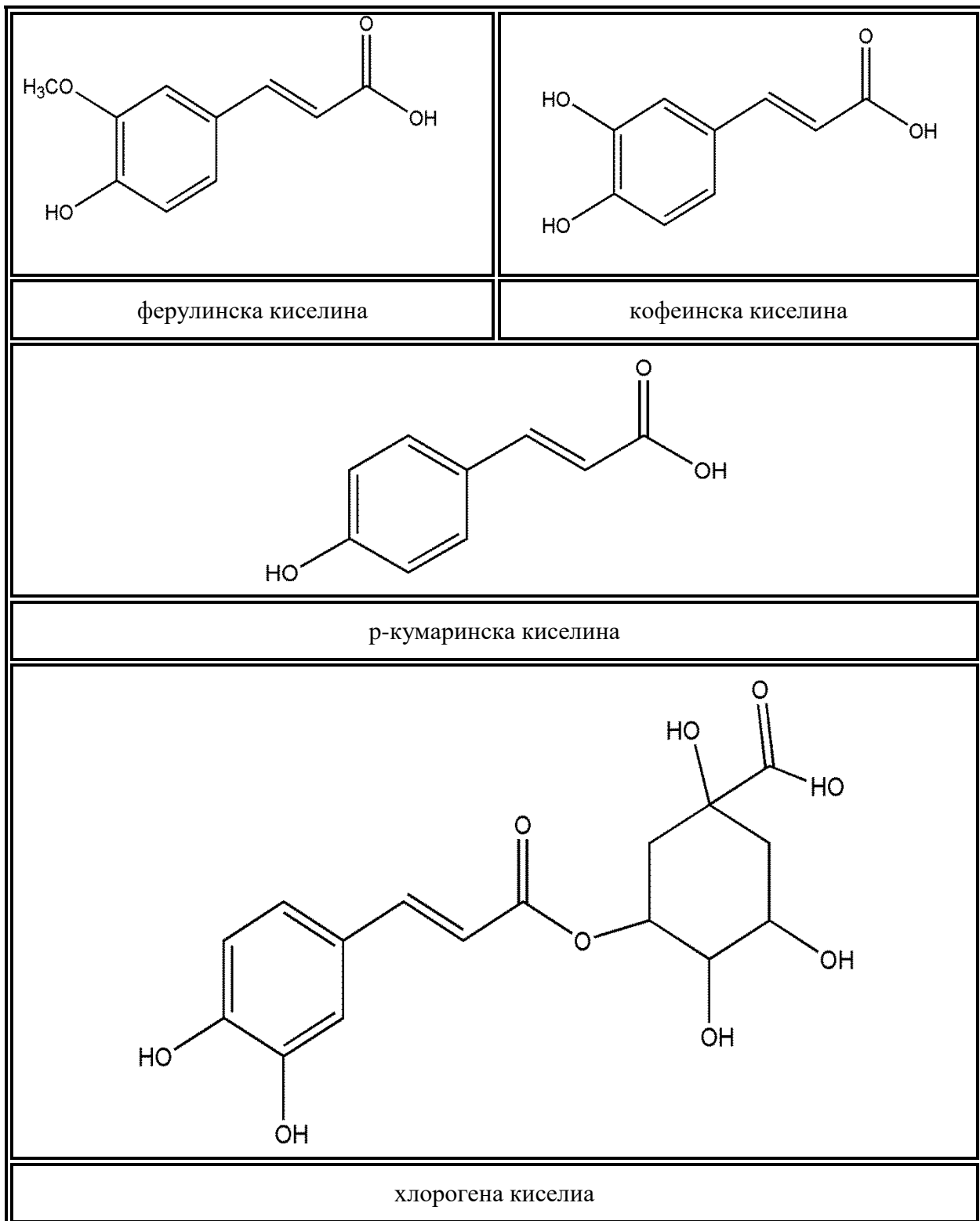
Фитохемијска истраживања екстраката жутог ивањског цвећа указују на присуство бројних флавоноида, који се налазе како у облику агликона, тако и у облику хетерозидно везаних метаболита. Идентификовани су флавоноли попут изохармнетина, кверцетина, кемферола, као и њихови гликозидно везани облици: изорхамнетин 3-О- α -L-рамнопиранозил-(1-6)- β -D-глукопиранозид и кверцетин-3-О- β -D-глукопиранозид, кверцетин-3-О- β -D-рутинозид (рутин) и кемферол-3-О- β -D-глукопиранозид (астрагалин) (16, 17). Такође надземни део ивањског цвећа представља извор диосметина, хризина и хиспидулина и гликозида диосметина као што су: диосметин 7-О- β -D-глукопиранозид, диосметин 7-О- β -D-ксилопиранозил-(1-6)- β -D-глукопиранозид и диосметин 7-О- α -L-рамнопиранозил-(1-2)-[β -D-ксилопиранозил-(1-6)]- β -D-

глукопиранозид (16-19). У овој биљној врсти идентификовани су катехин и епикатехин, као и флаванонски гликозид хесперидин (18). Структуре најзначајнијих флавоноидних једињења приказане су на Слици 2. Примери најзаступљенијих фенолних киселина у ивањском цвећу су кумаринска, ферулинска, кафеинска и хлорогена и њихове структуре приказане су на Слици 3 (18-21)

Последњих деценија полифеноли налазе се у жижи научног интересовања захваљујући својим бројним терапеутским својствима. Наиме највећа пажња усмерена је на изучавање антиоксидационих ефеката ових биомолекула које остварују како модулацијом антиоксидационог система заштите тако и директим ефектом „хватања“ слободних радикала (11, 22). Највећи здравствени потенцијал полифенола огледа се у спречавању настанка кардиоваскуларних и малигних болести, дијабетеса, остеопорозе и неуродегенеративних болести (11, 23, 24).



Слика 2. Структуре најзначајнијих флавоноидних једињења изолованих из *G. verum*.



Слика 3. Структуре најзначајнијих фенолних киселина изолованих из *G. verum*.

1.4.1.1. Фактори који утичу на садржај полифенола у екстракту ивањског цвећа

На садржај полифенола у екстрактима биљака утичу бројни фактора као што су: хемијска структура једињења која се екстрахују, врста екстракције, дужина трајања, температура, поларност растварача, као и подручје са ког је сакупљен биљни материјал (25). Истраживање које је испитивало утицај различитих техника екстракције на садржај полифенола *Galium* врста издваја екстракцију под рефлуксом као погодан метод због повећане растворљивости фенола и флавоноида у екстракционом растварачу при температурама кључања растварача (26). Генерално гледано, у процесима екстракције најчешће су као растварачи у употреби вода, ацетон, метанол, етанол итд. Предност воде као растварача огледа се у безбедности, нетоксичности и могућности екстракције флавоноида који испољавају антиоксидационо деловање. С друге стране, примена етанолних и метанолних раствора пружа могућност за изоловање веће количине полифенола из биљног материјала, док је метанол нарочито погодан за екстракцију катехина, епикатехина, епигалокатехина. Додатно када се користи ацетон као растварач могуће је екстраховати многе хидросолубилне и липосолубилне компоненте (27, 28).

Међутим, недостатак примене воде, метанола и ацетона самостално огледа се у недовољном капацитету за изоловање полифенола који се у биљци налазе везани за друге биомолекуле попут полисахарида, терпена, хлорофила, липида итд. Уколико су полифеноли везани водоничним везама за протеине, органски растварач неће бити довољан за раскидање везе, већ је пожељна комбинована примена са водом (29).

1.4.2. Иридоиди

Доступни подаци указују на богатство биљних врста из рода *Galium* иридоидима (3, 6). Иридоиди представљају неиспарљиве монотерпене који садрже циклопентан-[С]-пирански скелет и присутни су у биљкама и животињама. У биљкама се најчешће јављају везани за глукозу, односно као иридоидни гликозиди (30, 31).

И поред вишевековне примене ивањског цвећа у традиционалној медицини, број истраживања који је испитивао његов хемијски састав је ограничен. Први подаци о заступљености иридоида у надземном делу ивањског цвећа датирају од почетка 80-их година 20. века. Тада су *Böjthe-Horváth K* и сарадници открили присуство следећих једињења у ивањском цвећу: асперулозид, асперулозидинска киселина, деацетил-

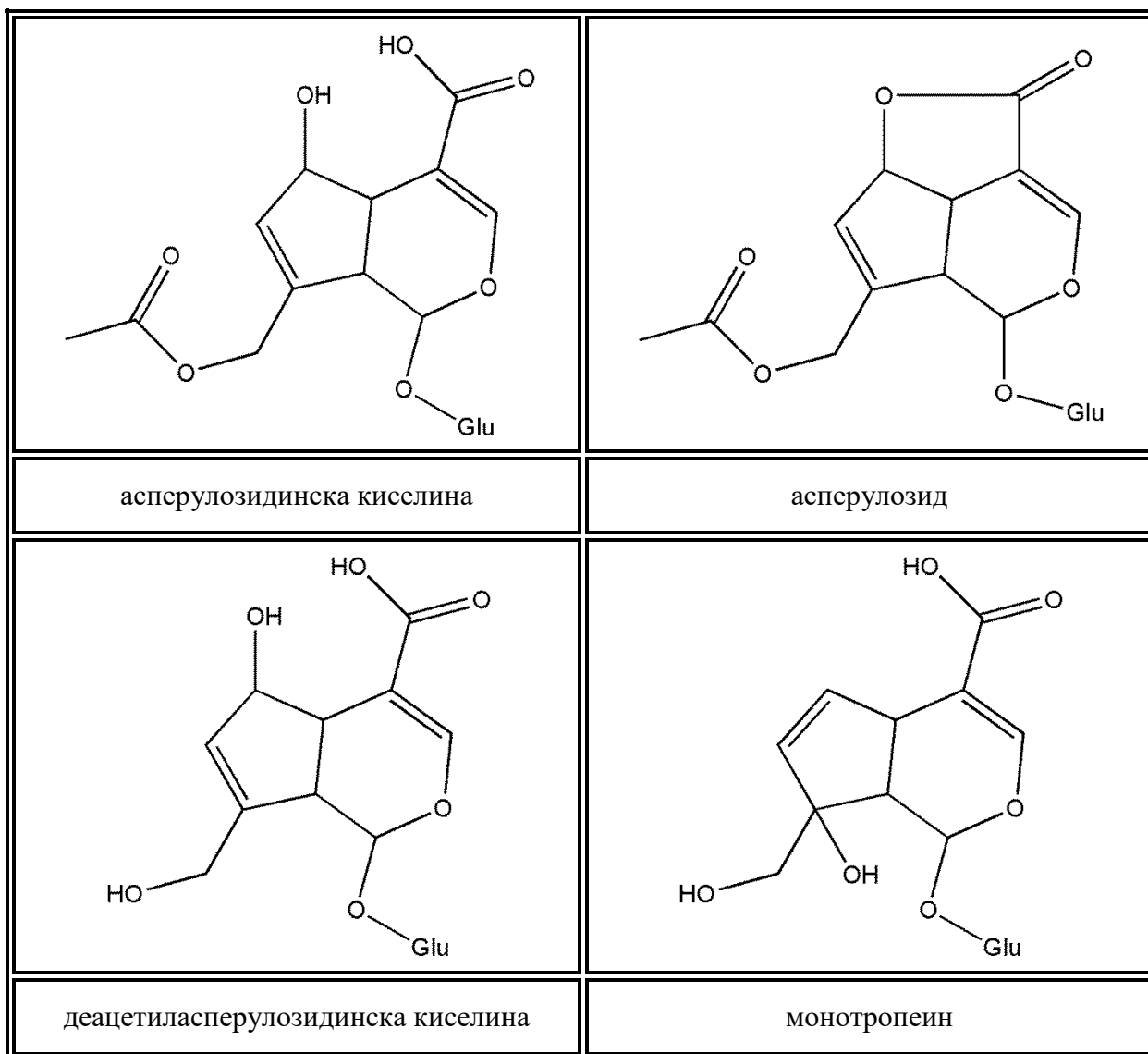
асперулозидинска киселина, монотропеин, скандозид и генипозидинску киселину (32, 33). Почетак 21. века представља наставак фитохемијских испитивања ове биљне врсте. Додатно су идентификовани логанин, 6-ацетилскандозид и секогалиозид, 6-о-епи-ацетилскандозид, дафилозид и деацетил-дафилозид у надземном делу ивањског цвећа (7, 34). Група истраживача из Турске је била прва која је 2006. год изоловала и разјаснила структуру 6-О-епи-ацетилскандозида и ацикличних монотерпенских гликозида из ове биљне врсте (34). Такође *Lee* и сарадници су указали на присуство 10-р-дихидрокумароил-6- α -хидроксигенипозид, 10-р-дихидрокумароил деацетиласперулозида и метилестра асперулозидинске киселине у метанолном екстракту ивањског цвећа (35). Структуре најзначајнијих иридоида изолованих из ивањског цвећа приказане су на Слици 4.

Здравствени бенефити уноса иридоида базирају се на хепатопротекцији, кардиопротекцији, неуропротекцији, као и антиинфламационом, антимицробном и антиоксидационом деловању. Такође иридоиди су ефикасни у снижавању нивоа глукозе и липида у крви што указује на њихову улогу у терапији дијабетеса и кардиоваскуларних болести. Због карактеристичног горког укуса користе се као агенси за побољшање апетита (31, 36).

1.4.3. Остала биоактивна једињења присутна у ивањском цвећу

Поред полифенола и иридоида који због квантитативне заступљености највише доприносе ефектима ивањског цвећа, у мањим концентрацијама идентификовани су и монотерпени, антрахинони и фитостероли (3). Постоје подаци о присуству 2 монотерпенска гликозида као што су бетулалбузид А и (2Е)-2,6-диметил-2,7-октадиен-1,6-диол-6О- β -глукопиранозид у надземном делу ивањског цвећа (34). Из групе антрахинона пронађени су 1,3-дихидрокси-2-метилантрахинон, 2-хидрокси-1,3-диметокси антрахинон и 2,5-дихидрокси-1,3-диметоксиантрахинон (37).

Фитостероли представљају биљна једињења структурно и функционално слична холестеролу (38). Спроведене студије указују на присуство β -ситостерола ($85,46 \pm 1,24 \mu\text{g/g}$ екстракта) и кемпестерола ($9,86 \pm 0,04 \mu\text{g/g}$ екстракта) у надземном делу ивањског цвећа (19).



Слика 4. Структуре најзначајнијих иридоида изолованих из *G. verum*.

1.4.4. Етарско уље ивањског цвећа

Највећи број истраживања који је имао за циљ испитивање хемијског састава ивањског цвећа био је усмерен на екстракте ове биљне врсте, док су подаци о фитохемијским анализама етарског уља ограничени. Доступне информације које се односе на квантитативно-квалитативни састав етарског уља ивањског цвећа приказан је у Табели 2.

Табела 2. Преглед резултата студија које су испитивале хемијски састав етарског уља *G. verum*.

Једињење	% у цветовима	Референца
цис-3-хексен-1-ол	0,82	(39)
диетиленгликол монометил етар	0,28	
бензил алкохол	0,22	
диоктилфталат	0,57	
Једињење	% у надземном делу	Референца
кариофилен	26	(40)
кариофилен оксид	16,2	
гермакрен D	11,2	
фитол	9,27	(6)
тетрадекан	11,76	
хексадекан	12,27	
n-тетрадекан	17,93	
октадекатриеноична киселина- метил естар	8,08	
хексадеканска киселина- метил естар	4,32	

Наиме студија која је истраживала етарско уље добијено из цветова ове биљне врсте указује на присуство 4 масне киселине, 5 ароматичних једињења и 9 терпеноида који припадају различитим класама органских једињења. У липофилној фракцији доминантно су заступљени цис-3-хексен-1-ол (29,77%), сквален (20,82), диетиленгликол монометил етар (10,17) и бензил алкохол (7,85). Укупна количина испарљивих једињења износила је 2,74% рачунато по апсолутној маси сувог материјала (39).

1.5. Традиционална употреба ивањског цвећа

Биљне врсте које припадају роду *Galium* користе се у медицинске сврхе од давних дана, при чему се по највећем терапијском потенцијалу убедљиво издваја жуто ивањско цвеће (2). Надземни делови ивањског цвећа се традиционално користе као седативи, што је и потврдила етноботаничка студија о употреби дивљих лековитих биљака са територије Централне Србије (41, 42). Сматра се да су хемијска једињења из групе иридоида попут асперулозида заслужна за седативне ефекте *Galium* врста (43). Ивањско цвеће је познато и по благотворним ефектима у лечењу епилепсије, хистерије, нервозе и фобија (2, 19, 44, 45). Хиспидулин је доказани лиганд за бензодиазепинске рецепторе са антиконвулзивним деловањем и његово присуство у ивањском цвећу први пут је описано 2016. године. Ово једињење заједно са другим вредним секундарним

метаболитима може бити одговорно за традиционалну употребу ивањског цвећа у третману епилепсије (19, 46).

Постоје подаци о антидиуретском ефекту ивањског цвећа и његовој вишевековној употреби у лечењу пијелитиса и циститиса (19, 41, 44). Такође испољава бенефите и код иритације бешике и бубрега, камена у бубрегу и колика, а може наћи примену и као антидијароик, спазмолитик и у лечењу стомачних тегоба (2, 19, 26, 44, 47). Поред тога, надземни делови ивањског цвећа утичу протективно и на поремећаје јетре, делују и као холеретици и холагози (2, 34). Познато је да се ова биљна врста у Кини користи и за лечење хепатитиса (48).

Када је реч о терапији канцера у традиционалној фитомедицини неизоставна је улога ивањског цвећа. Постоје извештаји о успешном лечењу пацијената са карциномом језика и ларинкса применом чаја ове биљне врсте. *Jonathan Hartwells'* студија наводи да се ивањско цвеће користи у Европи и Северној Америци у третману канцерогених улцера и канцера дојке (5, 49).

Литературни подаци који се односе на спољашњу примену ивањског цвећа указују на његов значај у третману кожних промена, псоријазе и зарастања рана (2, 5, 42). Такође вековима се користи и као дијафоретик и депуратив, а забележени су и позитивни ефекти ове биљне врсте код постојања гихта и реуматских болести (2, 26, 41, 45).

1.6. Фармаколошка активност ивањског цвећа

Жуто ивањско цвеће представља једно од највише проучаваних представника рода *Galium* (2). Студије које су испитивале биолошке ефекте ове биљне врсте доминантно су биле спроведене у земљама Азије. То је донекле и очекивано имајући у виду да је традиционална медицина у много већој мери имплементирана у културу и свакодневни живот народа са наведеног континента у односу на Европу и САД (5, 26). Међутим обим спроведених истраживања је ограничен и још увек недовољан да у потпуности сагледа укупне потенцијале ове биљне врсте у многобројним индикацијама. Досадашња сазнања сведоче о значајним здравственим бенефитима уноса ивањског цвећа у третману различитих болести и стања и несумњиво представљају погодан тло за наставак испитивања у овом смеру у будућности.

1.6.1. Анतिकанцерогени ефекти ивањског цвећа

Подстицај за научна испитивања антиканцерогеног потенцијала ивањског цвећа лежи у његовој дуготрајној традиционалној употреби у третману малигнух обољења. Малобројне спроведене експерименталне студије су указале на улогу ове биљне врсте у лечењу канцера, док података о клиничким студијама из ове области нема. Диосметин је екстрахован из ивањског цвећа сакупљеног са територије Кине и испитиван на цервикалним ћелијским линијама. Показано је да може да инхибира раст тумора и пружи заштиту од тумором индуковане апоптозе тимуса. Такође ова група аутора открила је да етанолни екстракт ивањског цвећа може да инхибира пролиферацију хуманих MCF-7 ћелија канцера дојке и индукује ћелијску смрт апоптозом (50). Додатно, декокт ове биљне врсте испољио је инхибиторни ефекат на хемосензитивне и хеморезистентне туморске ћелијске линије ларингеалног карцинома, чиме је оправдао његову конкомитантну употребу у терапији канцера главе и врата (5).

1.6.2. Ефекти ивањског цвећа на ендокрини систем

Мали је број истраживања која се односе на ендокрине ефекте ове биљне врсте. Спроведено је истраживање које је имало за циљ да испита протективни потенцијал водено-алкохолног екстракта ивањског цвећа на структурне промене тироидеје и оваријума код пацова под условима анакинетичког стреса. Резултати овог експеримента показали су да екстракт у дози од 25 mg/100 g телесне масе (т.м.) стимулише активност тироидеје и оваријума (51). Такође у другој студији је уочено да у условима анакинетичког стреса администрација исте дозе водено-алкохолног екстракта ивањског цвећа појачава неуросекреторну активност хипоталамичких паравентрикуларних једара. То се може довести у везу са стимулацијом ослобађања коритикотропин-*releasing* хормона, активацијом хормона предњег режња хипофизе, као и стимулацијом адреналних стероидних хормона. Секреторна активност ивањског цвећа је додатно потврђена и хистолошким анализама ткива животиња (43).

1.6.3. Антихемолитичка активност ивањског цвећа

Спроведена је студија која је испитивала антихемолитичку активност екстраката биљака с циљем да идентификује могуће кандидате за лечење болести повезаних са

хемолизом. Откривено је да екстракт надземног дела ивањског цвећа добијен методом перколације снажно антагонизује хемолизу изазвану реактивним кисеоничним врстама. IC 50 вредност овог екстракта је износила $1,32 \mu\text{g/mL}$, што указује на већу потентност у односу на референтни витамин С чија IC 50 износи $235 \pm 5,26 \mu\text{g/mL}$ (41).

1.6.4. Холинестеразна активност

Анализом ефеката ивањског цвећа на хуману серумску холинестеразу уочено је да доводи до благе активације ($+16,28 \pm 0,09 \%$) у поређењу са референтним агенсом неостигмин бромидом који је показао инхибицију од $-35,26 \pm 0,12 \%$. Овај податак је од интереса јер активација холинестеразе наведеном биљним екстрактом може бити потенцијално опасна у присуству других болести централног нервног система попут Алцхајмерове болести (41).

1.6.5. Антимикробна активност ивањског цвећа

Иако се врсте из рода *Galium* дуго низ година користе у традиционалној медицини у третману инфективних болести, антимикробна активност ивањског цвећа није у потпуности истражена. Досадашње студије сведоче о антибактеријској активности екстракта ивањског цвећа према различитим сојевима Грам позитивних и Грам негативних бактерија, док је потенцијал у лечењу гљивичних инфекција ограничен (52-54). Потврђено је да растварач који се користи приликом екстракције биљног материјала доприноси укупном антимикробном деловању екстракта. Резултати претходно спроведеног истраживања указују на израженију антибактеријску активност хлороформског у односу на водени и етанолни екстракт (52). Међутим према досадашњим сазнањима разлика у антибактеријском и антигљивичном ефекту воденог, метанолног и ацетонског екстракта није позната.

1.6.6. Антиоксидациона активност ивањског цвећа

Постоје докази да биљне врсте које припадају роду *Gallium* поседују антиоксидациона својства. Екстракти надземног дела ивањског цвећа испољавају веома снажну активност „чистача“ слободних радикала која је дозно-зависна. Претходне студије одређивале су антиоксидациони капацитет екстракта ивањског цвећа на основу

способности да неутралише 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH) радикал, хидроксил радикал (OH[•]), водоник пероксид (H₂O₂) и инхибира липидну пероксидацију (Табела 3).

Обећавајући резултати спроведених истраживања квалификују ивањско цвеће као могући природни извор антиоксидантних супстанци. Међутим студије које су испитивале потенцијал ивањског цвећа да ублажи оксидциони стрес углавном су примењивале *in vitro* тестове на метанолним, водено-етанолним и етанолним екстрактима. Недавно је спроведена прва студија која је имала за циљ да испита ефекат водено-етанолног екстракта ивањског цвећа на концентрацију прооксиданаса и антиоксиданаса у крви пацова. Показано је да је третман екстрактом ивањског цвећа довео до снижења нивоа индекса липидне пероксидације и повећања активности ензима антиоксидационе заштите у односу на контролне животиње (56). Додатно, мали број истраживања имао је за циљ да испита утицај примењеног растварача приликом екстракције на способност екстракта да неутралише слободне радикале. *Mavi A* и сарадници указали су на највећу антиоксидациону активност метанолног екстракта када се упореди са воденим и алкохолним, који су испољили деловање у опсегу концентрација 50-500 mg/L (57). Такође упоређивањем воденог, 30%, 50% и 70% алкохолног екстракта, уочено је да највећи потенцијал може бити очекиван од 50% алкохолног екстракта. Антиоксидациона активност лековитих биљака приписује се присуству флавоноида, међу којима се истичу по својој ефикасности флавони и катехини (58).

Табела 3. Преглед резултата истраживања која су испитивала *in vitro* антиоксидациону активност екстракта надземног дела ивањског цвећа.

Биљни материјал	Метода	Резултат	Реф.
<i>Метанолни екстракт ивањског цвећа са Златара, Србија</i>	одређивање капацитета неутрализације DPPH•	IC50=3,10 µg/mL	(2)
	одређивање капацитета хватања OH•	IC50=0,05 µg/mL	
	одређивање капацитета хватања H ₂ O ₂	IC50=4,98 µg/mL	
	инхибиција липидне пероксидације	IC50 = 11,69 µg/mL	
<i>Метанолни екстракт ивањског цвећа са Ветерника, Србија</i>	одређивање неутрализације DPPH•	IC50=8,04 µg/mL	(2)
	одређивање капацитета хватања OH•	IC50=0,54 µg/mL	
	одређивање капацитета хватања H ₂ O ₂	IC50=3,80 µg/mL	
	инхибиција липидне пероксидације	IC50=19,47 µg/mL	
<i>Етанолни екстракт ивањског цвећа из Трансилваније, Румунија</i>	одређивање неутрализације DPPH•	IC50=105,43±0,15 µg/mL	(20)
<i>Метанолни екстракт ивањског цвећа из Селичевеице и Лалинца, Србија</i>	одређивање неутрализације DPPH•	IC50=26,97±1,21 µg/mL	(41)
	одређивање неутрализације ABTS•	125,14±9,98 trolox/g	
	одређивање редокс потенцијала	70,31 µg/mL	
<i>Метанолни екстракт надземног дела ивањског цвећа из Ирана</i>	одређивање неутрализације DPPH•	IC50=59,6±0,04 µg /mL	(55)
	одређивање редокс потенцијала	50-800 µg/mL	
	одређивање капацитета хватања NO•	IC50=1,7±0,01 µg /mL	
	одређивање капацитета хватања H ₂ O ₂	при конц. од 50 µg/ mL % инхибиција је 92,5	

DPPH- 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикал; OH• - хидроксил радикал; H₂O₂- водоник пероксид; ABTS• - 2,2'-азинобис-(3-етилбензотиазолин-6-сулфонат).

1.7. Ишемијска болест срца

Коронарна болест срца (КБС) односно ишемијска болест срца (ИБС) остаје водећи узрок морталитета и инвалидитета широм света, са растућом стопом инциденце (59). Акутни инфаркт миокарда (АИМ) представља озбиљну клиничку манифестацију КБС и карактерише се оклузијом коронарне артерије која доводи до недовољног дотока крањљивих материја и кисеоника до срчаног ткива. Услед смањеног дотока кисеоника

до срца током исхемије преовладава анаеробни метаболизам, који доводи до пада рН вредности и нивоа АТР-а (60). Како би се ублажило накупљање водоникових јона, Na^+/H^+ измењивачка пумпа покушава да екскретује водоникове јоне, што узрокује инфлукс натријумових јона у ћелију (61). Зауставља се процес оксидативне фосфорилације, смањује стварање АТР-а што доводи до смањене активности АТР-аза. Пад ћелијског АТР-а узрокује смањени ефлукс Ca^{2+} , ограничава се преузимање калцијума од стране ендоплазматског ретикулума, што у крајњем доводи до презасићености цитосола Ca^{2+} . На тај начин се компромитује процес релаксације миокарда. Такође долази до отварања митохондријских транзиционих пора (МТП) што додатно погоршава стварање АТР-а, доводи до хиперконтрактуре и настанка контракционих пруга (енгл. *contraction band necrosis* (60, 62).

Најефикаснији терапеутски приступ у смањењу величине инфаркта подразумева рано успостављање поновног протока крви кроз срце. То се постиже благовременом реперфузионом терапијом која може бити механичка, применом перкутане коронарне ангиопластике или фармаколошка, применом тромболитичке терапије (59). Међутим 1960. године *Jennings* и сарадници су уочили да реперфузија може погоршати некрозу срца након исхемије (63). Овај феномен познат је као исхемијско-реперфузиона (И-Р) повреда и описује да повратак кисеоника у исхемични миокард током реперфузије може узроковати парадоксалну дисфункцију кардиомиоцита и продубити оштећење ткива узроковано хипоксичним стресом. Реперфузија може довести и до животно угрожавајућих вентрикуларних аритмија и у крајњем изазвати изненадну срчану смрт. Сматра се да се ефекти КБС углавном приписују штетним последицама И-Р повреде миокарда (60).

Хипертензија се налази међу највећим јавно-здравственим проблемима модерног света са глобалном инциденцом која надмашује 1 билион станованика. Представља главни фактор ризика за настанак АИМ, срчане инсуфицијенције, можданог удара, периферне артеријске болести и анеуризме аорте (64, 65). Већ дуги низ година познато је да су промене у крвном притиску праћене неурохуморалним адаптацијама које утичу на исход И-Р повреде (66, 67). У том смислу одржавање вредности крвног притиска у физиолошким границама представља још већи изазов за систем здравствене заштите. Повећано срчано оптерећење и механички стрес који се јављају у хипертензији могу да утичу на модулацију ендогених кардиотоксичних и кардиопротективних механизма. Срце може развити адаптивне механизме за борбу

против стреса, али уколико он предуго траје последице се манифестују погоршањем исхода И-Р повреде. Сматра се да је срце преоптерећено притиском склоно штетним последицама И-Р повреде услед смањеног утицаја кардиопротективних путева и повећане активности кардиотоксичних путева (68).

1.7.1. Механизми исхемијско/реперфузионе повреде миокарда

Комплексни механизми укључени у настанак и прогресију И-Р повреде се интензивно испитују више од четири деценије са циљем да се отвори пут ка новим ефикасним стратегијама за спасавање миокарда. Сматра се да су фактори који највише посредују у развоју И-Р повреде: 1) повећана генерација реактивних кисеоничних врста (енгл. *reactive oxygen species*- ROS) услед увођења молекулског кисеоника, 2) накупљање Ca^{2+} 3) отварање митохондријских транзиционих пора (МТП) који доводи до ослобађања цитохрома С 4) ендотелна дисфункција 5) изражен инфламацијски одговор (59-62)

Наиме у првим минутима реперфузије долази до појачане продукције прооксиданаса као што су ROS и реактивне азотне врсте (енгл. *reactive nitrogen species*- RNS) које се сматрају кључним иницијаторима И-Р повреде. Сматра се да метаболичке адаптације повезане са исхемијом и измењена хомеостаза митохондрија утичу на повећану продукцију RNS у реперфузији. Екскесивна концентрација прооксиданаса може надвладати капацитете ендогених антиоксидационих система што резултира оштећењем срца (68-70).

Један од догађаја за који се сматра да доприноси дисфункцији срца услед И-Р повреде је отварање МТП. Наиме током исхемије МТП су затворени, али на почетку реперфузије због присуства веће концентрације ROS и RNS, повећаног нивоа калцијума у митохондријама и повратка рН долази до појачаног отварања МТП. Отварање МТП утиче на ослобађање цитохрома С и у крајњем доводи до ћелијске смрти (71-73). Оксидациона оштећења могу утицати на настанак секундарних процеса, као што је проинфламациони одговор (74). Још увек није у потпуности разјашњена улога инфламације у И-Р повреди, односно да ли је инфламациони одговор који прати ИМ одговоран за функционалне и морфолошке промене срчаног ткива или је пак инфламациони одговор реакција на акутну повреду миокарда (75). Међутим разумевање тачних патофизиолошких механизма укључених у И-Р повреду и даље

остаје изазов за клиничаре, а откривање нових алгоритама који би допринели смањењу реперфузионе повреде је и даље предмет расправе у научној заједници.

1.7.2. Феномен прекондиционарања миокарда: улога лековитих биљака

Murry и сарадници су давне 1986. године уочили да излагање срца краткотрајним епизодама исхемије и реперфузије пре дуготрајне исхемије може значајно смањити величину инфаркта (75). Овај маневар је описан као исхемијско прекондиционарање, међутим његова клиничка примена је ограничена. Из тог разлога истраживачи су усмерени као откривању неисхемичних, нехипоксичних агенаса, попут биљних производа, који би ублажили штетне ефекте И-Р повреде имитирајући сигнализацију изазвану исхемијским предкондиционарањем (76). Кардиоваскуларни бенефити употребе биљака су познати вековима и заснивају се на њиховом антиагрегационом, хиполипидемијском, антиинфламационом, хипогликемијском и хипотензивном деловању. (77). Резултати бројних истраживања пружају увид у нове терапеутске циљеве и стратегије за лечење И-Р повреде применом различитих биљних врста или препарата добијених из биљака. Сматра да се се наведене терапијске могућности биљних екстраката приписују доминантно присуству полифенолних једињења (78, 79). Корист од уноса полифенола у снижавању инциденције коронарне болести је научно потврђена (80, 81). Наведена биоактивна једињења могу ублажити штетне утицаје И-Р испољавањем антиоксидационе и антиинфламационе активности (81). Током последњих деценија концепт лечења изолованим супстанцама из групе фенола или екстрактима богатим фенолима као природним антиоксидансима је подржан великим бројем студија (82-84). Кардиопротективни ефекти акутне и хроничне примене појединих биљних врста на различитим моделима И-Р су научно потврђени (85-87).

1.8. Инфламација: улога лековитих биљака

Инфламација представља протективни одговор организма на инфекцију, иритацију или присуство страних супстанци, који има за циљ да уклони штетне стимулусе као што су патогени, иританси и хемикалије (88). Комплексни механизми који су у основи инфламационог процеса укључују садејство васкуларног ткива, плазма протеина или ћелија и бројних ћелијских медијатора укључених у иницијацију,

пропагацију и прогресију запаљења (88-90). Важну улогу у процесу инфламације заузимају хемијски медијатори које чине протеини плазме или медијатори који потичу из ћелије попут маст ћелија, неутрофила, тромбоцита, моноцита и макрофага. Наведени медијатори специфичним везивањем за рецепторе индукују васкуларну пропустљивост, хемотаксу неутрофила, контракцију глатких мишића и ензимску активацију (91). Велики је значај хемијских медијатора као што су NO, простагландини, хистамин, леукотриени и бројни цитокини (92, 93). Главне манифестације инфламације су настанак едема, гранулома и инфилтрација леукоцита (90).

Здравствени проблем данашњице представља хронична инфламација која лежи у основи реуматоидног артритиса, инфламаторних болести црева, кардиоваскуларних, малигнух, неуродегенеративних болести итд. Систем комплементарне и алтернативне медицине отвара многобројне могућности за ефикасно лечење велике популације са инфламаторним болестима (94-96). Тренутна терапија запаљенског процеса базира се на примени стероидних и нестероидних антиинфламаторних лекова, чији је главни недостатак појава бројних нежељених ефеката. Прилив информација о нежељеним ефектима синтетских антиинфламаторних лекова знатно повећава интересовање за открићем мање токсичне, а потентне терапијске алтернативе (89). Иазов за научну јавност представља потрага за новим агенсима са другачијим механизмом деловања који би држали процес инфламације под контролом. Истраживања спроведена током последња два века указују на то да биљке представљају драгоцен и бескрајан извор различитих биолошки активних молекула са антиинфламацијским карактеристикама (97, 98). Екстракцијом биљног материјала растварачима различите поларности могуће је изоловати једињења из групе танина, алкалоида, терпена, флавоноида. Међутим највише је проучаван антиинфламациони потенцијал флавоноида, који је документован бројним претклиничким и клиничким студијама (99, 100). Додатна испитивања биљних врста које се традиционално користе у третману инфламације представља логичну истраживачку стратегију у циљу проналазка нових антиинфламационих лекова.

1.9. Инфективне болести: улога лековитих биљака

Велики јавно-здравствени проблем представља растућа учесталост у заједници стечених и болничких инфекција услед развоја мултирезистентних патогена отпорних на доступну антибиотску терапију (101). Заједнички напори владе и академских институција неопходни су за борбу против глобалног ширења патогена отпорних на

више антимикробних лекова, а нарочито у земљама у развоју где су заразне болести узрок половине смртних случајева (102, 103). Поред микроорганизама који се у природи јављају као планктонски организми, односно индивидуалне ћелије, велику опасност по људско здравље представља и појава биофилма. Биофилм се дефинише као заједница бактерија уклопљених у матрикс које су саме створиле и карактерише их измењен фенотип у односу на планктонске микроорганизме и висок степен резистенције на антимикробне лекове (104). Према Националном институту здравља, за више од 75% инфекција које настају у организму одговорна је сесилна заједница - биофилм. Такође о значају проблема бактеријске резистенције сведочи извештај да у Еворпи годишње умре 25000 људи због развоја инфекција према којима доступни лекови нису били ефикасни (105).

Растућа инциденција инфективних болести удружена са настанком бактеријске резистенције, као и озбиљни нежељени ефекти доступних антимикробних лекова указују на хитну потребу за развојем нових, мање штетних супстанци активних против различитих сојева микроорганизама. Многе биљне врсте користе се од давних дана као антимикробна терапија, а њихова употреба као зачина може спречити развој микроорганизама и последично кварење намирница (106, 107). Традиционална примена лековитих биљака у третману инфективних болести оправдана је позитивним резултатима бројних истраживања. Ефикасност како екстраката биљака, тако и појединих биљних секундарних метаболита, научно је потврђена и данас се сматра да лековите биљке представљају вредан извор антимикробних агенаса (108). Из тог разлога биљни екстракти и једињења изолована из биљака налазе се у фокусу интензивних истраживања у циљу детаљног проучавања њиховог директног и индиректног антимикробног деловања. Бројне *in vitro* студије су показале да су за антимикробно деловање биљака међу фитохемикалијама најзаслужнији алкалоиди, танини, терпеноиди и полифеноли (109, 110). Будући да нема података о антиинфламационој активности ивањског цвећа, од великог значаја би било испитати потенцијал екстракта наведене биљне врсте да ублажи запаљенски одговор организма.

1.10. Оксидациони стрес

1.10.1. Слободни радикали и редокс равнотежа

Слободни радикали представљају молекуле, атоме или јоне који садрже неспарени електрон у атомској орбитали и због тога су нестабилни и јако реактивни (111). Они могу да донирају електрон или да га прихвате, па се на тај начин могу понашати и као оксидациона и као редукциона средства (111, 112). Стварају се током нормалних ћелијских метаболичких реакција и као резултат излагања спољашњим факторима попут цигарета, загађивача из ваздуха и индустрије, X-зрака (113). Када су присутни у организму у ниским концентрацијама имају улогу у ћелијској и митохондријалној сигнализацији и функционисању. Међутим у високим концентрацијама прооксиданси модификују ћелијске компоненте доводећи до оштећења и нарушавања хомеостазе (114, 115). Због своје изузетне реактивности прооксиданси могу ступити у реакције са свим молекулима у организму, али главни таргети су свакако липиди, протеини и ДНК (112). У биолошким системима прооксиданси/оксиданси припадају највећим делом реактивним врстама кисеоника и азота. У оквиру ROS и RNS издвајају се радикалске и нерадикалске врсте и приказане су у Табели 4. Од значаја су још и реактивне врсте сумпора (енгл. *reactive sulfur species* - RSS) и реактивне врсте угљеника (енгл. *reactive carbon species* - RCS) (115).

Табела 4. Приказ најзначајнијих оксиданаса у биолошким системима

Реактивне врсте кисеоника - ROS			
Радикалске врсте		Нерадикалске врсте	
Оксидант	Формула	Оксидант	Формула
Супероксид анјон радикал	$O_2^{\cdot-}$	Водоник пероксид	H_2O_2
Хидроксил радикал	OH^{\cdot}	Хипохлорна киселина	$HOCl$
Пероксил радикал	ROO^{\cdot}	Озон	O_3
Алкоксил радикал	RO^{\cdot}		
Хидропероксил радикал	HOO^{\cdot}		
Реактивне врсте азота - RNS			
Радикалске врсте		Нерадикалске врсте	
Оксидант	Формула	Оксидант	Формула
Азот-моноксид радикал	NO^{\cdot}	Пероксинитрит анјон	$OOONO^-$
Азот-диоксид радикал	NO_2^{\cdot}	Алкил пероксинитрит	$ROONO$

Аеробни организми су развили систем антиоксидационе заштите који има за циљ да неутралише штетне ефекте прооксиданаса и обухвата ензимске и неензимске компоненте.

Табела 5. Приказ најзначајнијих антиоксиданаса у биолошким системима

Ендогени антиоксиданси	
Ензимски	Неензимски
Супероксид дизмутаза- SOD	β-каротен
Каталаза- CAT	Витамин С
Глутатион пероксидаза- GPx	Глутатион- GSH
Глутатион редуктаза- GR	α-токоферол

Антиоксиданси који учествују у примарној заштити организма су SOD, CAT, GR, GPx, GSH. SOD је ензим задужен за дисмутацију реактивне врсте кисеоника $O_2^{\cdot-}$ која је настала редукцијом молекулског кисеоника једним електроном. Под утицајем SOD из $O_2^{\cdot-}$ настаје H_2O_2 , који може под дејством CAT бити потпуно редукован до воде и кисеоника. С друге стране, H_2O_2 може бити делимично редукован до јако токсичног хидроксил радикала (OH^{\cdot}). У реакцији $O_2^{\cdot-}$ са NO може настати један од најтоксичнијих прооксиданаса пероксинитрит ($OONO^{\cdot}$) (111-114). У редукцији H_2O_2 на два молекула воде и липидних хидропероксида на липидне алкоhole учествује GSH-Px у присуству редукованог глутатиона – GSH. У тој реакцији настаје и оксидовани глутатион који се под утицајем ензима глутатион редуктазе (GR) враћа у редуковано стање (116).

1.10.2. Оксидациони стрес и кардиоваскуларне болести: улога лековитих биљака

Оксидациони стрес се дефинише као поремећај равнотеже између прооксиданата и антиоксиданата, као последица смањене антиоксидационе заштите или повећане продукције слободних радикала (112). Велики број истраживања сведочи о повезаности оксидационог стреса и развоја кардиоваскуларних болести. Повећана генерација ROS дешава се због нарушене редукције молекулског кисеоника на нивоу митохондрија, секреције ROS од стране леукоцита, ендотелне дисфункције, аутооксидације катехоламина, излагања радијацији или загађењу из ваздуха. Такође услед исцрпљености и/или измена у експресији гена може доћи до смањења капацитета антиоксидационог система заштите који је кључни фактор у одбрани срчаног и васкуларних мишића (112, 117).

Иако узрочно-последична веза између оксидационог стреса и развоја КВБ и даље није у потпуности разјашњена, јасни докази иду у прилог томе да је појачано стварање прооксиданаса присутно у широком спектру експерименталних и клиничких

стања (117). Прекомерна концентрација прооксиданаса утиче на оштећење макромолекула и нарушавања сигнализације васкуларног зида који је завистан од редокс равнотеже. Такође накупљање ROS нарушава хомеостазу калцијума, што се манифестује настанком аритмија и започињањем срчаног ремоделовања (118). Недавно је постављена хипотеза да је оксидациони стрес кључни фактор у патогенези хипертензије. Сматра се да је код повишеног крвног притиска смањена искористљивост азот монооксида као потентног вазодилатора и за то је заслужан делимично супероксид анјон радикал. Такође у хипертензивним условима смањена је активност ензима антиоксидационе заштите попут каталазе и супероксид дизмутате и нижи нивои „хватача“ слободних радикала као што су глутатион, витамини Е и С. Бројни извештаји су потврдили да у реперфузији повратак кисеоника у кисеоником дефицитарно ткиво узрокује скок у генерисању ROS. Главни извори прооксиданаса укључују митохондријали респираторни електронски транспортни ланац, активацију ксантин оксидазе што резултира продукцијом високореактивних $O_2^{\cdot -}$ и H_2O_2 (119). Последњих година научна интересовања окренута су ка примени лековитих биљака или једињења изолованих из биљака у заштити миокарда од И-Р повреде превасходно због свог потентног антиоксидационог ефекта. Прилив информација које се односе на антиоксидансе природног порекла указују на њихову протективну улогу у превенцији и терапији хипертензије као главног фактора ризика за АИМ. Такође њихова примена побољшава функционални опоравак срца и смањује величину инфаркта, указујући на потенцијално нови терапијски алгоритам базиран на полифенолима у третману инфаркта миокарда (120).

Обзиром на ограничен број студија које су испитивале фармаколошку активност ивањског цвећа остаје непозаница да ли екстракт ове биљне врсте може испољити антимикуробна и антиинфламацијска својства. Такође поставља се питање да ли терапија екстрактом ивањског цвећа може ублажити функционалне и морфолошке промене срца изазване И-Р.

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

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

2.1. Општи циљеви:

1. Евалуација и компарација антимикуробних ефеката примењених доза екстракта ивањског цвећа.
2. Евалуација и компарација антиинфламацијских ефеката примењених доза екстракта ивањског цвећа.
3. Евалуација и компарација ефеката хроничне администрације примењених доза екстракта ивањског цвећа у моделу прекондиционирања на функцију миокарда и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.

2.2. Специфични циљеви:

1. Хемијска карактеризација екстракта и испитивање способности неутрализације DPPH[•] радикала.
2. Испитивање утицаја различитих биомаркера оксидационог оштећења: супероксид анјон радикала (O_2^-), нитрита (NO_2^-), индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS) и водоник пероксида (H_2O_2) на кардиодинамске параметре срчаног рада и коронарну циркулацију при примени различитих доза екстракта.
3. Евалуација и компарација вредности маркера оксидационог оштећења и антиоксидационе заштите из крви животиња које су претходно биле изложене третману различитим дозама екстракта ивањског цвећа.
4. Стандардним хистолошким методама испитати и упоредити морфолошке промене бубрега и јетре код животиња које су претходно биле изложене третману различитим дозама екстракта ивањског цвећа.
5. Стандардним хистолошким методама испитати и упоредити морфолошке промене миокарда настале након исхемије код животиња које су претходно биле изложене третману различитим дозама екстракта ивањског цвећа.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

Ово је експериментална студија на микроорганизмима *in vitro* и на материјалу анималног порекла *in vivo* и *ex vivo*. При експерименталном раду су поштоване одредбе прописаних аката (*EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes* 86/609/ЕЕС) и принципа етичности. Експериментални протокол је одобрен од стране Етичког одбора за добробит експерименталних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

3.1. Прикупљање и припрема биљног материјала

Биљни материјал је сакупљен у јулу 2017. на подручју села Доброселица, општина Чајетина у Златиборском округу. Идентификација биљног материјала извршена је на Институту за ботанику, Биолошки факултет, Универзитета у Београду. Узорци су депоновани у хербаријуму Института за ботанику и ботаничкој башти „Јевремовац“ под бројем ваучера 17417. Биљни материјал је осушен у хладу на промајном месту и до припреме екстракта чувао се у папирним кесама.

3.2. Припрема екстракта

Надземни део ивањског цвећа уситњен је до степена грубог прашка (2–6 mm) помоћу млина. Коришћена је метода под рефлуксом, која подразумева екстракцију на температури кључања растварача. Метанолни, водени и ацетонски екстракти припремљени су екстраховањем 100 g надземног дела биљке са 500 mL одговарајућег растварача. Смеша је филтрирана кроз филтер папир (Whatman, No.1) и суви екстракт је добијен након уклањања растварача методом упаравања под сниженим притиском помоћу ротационог вакуум упаривача. Након тога суви екстракти су чувани у тамним стакленим бочицама на +4°C до употребе за даља испитивања (121).

3.3. Хемијска карактеризација екстраката

3.3.1. Скрининг одабраних једињења HPLC-MS/MS техником

3.3.1.1. Реагенси

Реагенси који су коришћени за скрининг одабраних фенолних једињења HPLC-MS/MS техником су: метанол, HPLC gradient grade (J. T. Baker, Deventer, The Netherlands), хексан, р.а. (J. T. Baker, Deventer, The Netherlands), мравља киселина, р.а. (Merck, Darmstadt, Germany) и референтни стандарди (Sigma-Aldrich).

3.3.1.2. Поступак

Раздвајање и идентификација одабраних једињења у екстрактима ивањског цвећа извршени су техником течне хроматографије помоћу Agilent Technologies 1200 HPLC-DAD куплованим са Agilent Technologies 6410A ESI-QqQ-MS/MS. Припрема екстраката за анализу спроведена је првобитним растварањем у диметилсулфоксиду и даљим разблаживањем коришћењем 50 % метанола. Добијене су концентрације екстраката од 2%, 0,2 % и 0,02 % које су након филтрирања (филтер од регенерисане целулозе, промера 0,45 μm) анализирани на LC-DAD-MS/MS. Како би се одредио квантитативни и квалитативни састав екстраката, односно утврдили концентрације одабраних фенолних једињења у екстракту, коришћена је претходно утврђена метода (122). Коришћено је по 5 μL узорка сваког од тестираних екстраката. Непокретну фазу представљала је Zorbax Eclipse XDB-C18 колона (50 mm \times 4,6 mm, величина честица 1,8 μm), а температура колоне је одржавана на 50°C током анализе. Мобилну фазу чинио је систем растварача: А- 0,05% водени раствор мравље киселине и В- метанол. Проток мобилне фазе износио је 1,0 mL/min. Примењен је следећи линеарни градијент: 0 min 30 % В, 6 мин 70 %, 9 мин 100 %, 12 мин 100 %, при чему је време ре-еквилибрације износило 3 минута.

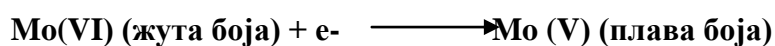
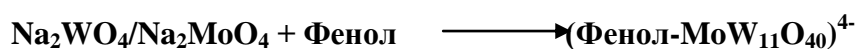
Идентификација одабраних биљних секундарних метаболита извршена је поређењем спектара и ретенционог времена супстанце са спектром и ретенционим временом стандарда. Потврда идентификације одабраних једињења вршена је праћењем UV/VIS сигнала у опсегу 190–700 nm након чега је ефлуенс прослеђен на MS/MS детектор. Коришћени су следећи параметри јонског извора: притисак небулајзера 50 psi, температура и проток гаса за сушење (N_2) 350 °C и 10 l/min, напон

на капилари 4000 V, негативни поларитет. Једињења су праћена у режиму одабране реакције фрагментације (енгл. *selected reactions monitoring*- SRM).

Метода екстерног стандарда коришћена је како би се квантификовала испитивана једињења у екстракту. Почетни раствор масене концентрације 1,0 mg/mL направљен је за сваки коришћени стандард, а након тога је разблажењем у односу 1:1 направљена серија раствора масене концентрације 1,53 ng/mL - 25,0 µg/mL. Конструисањем калибрационе криве за сваки стандард одређена је масена концентрација одабраних биомолекула у тестираним екстрактима. За читавање површине пикова из хроматограма коришћен је MassHunter Workstation Qualitative Analysis софтвер, верзија В.06.00 (Agilent Technologies), док су калибрационе криве конструисане и концентрације читаване у Microsoft Excel софтверу. Резултат је изражен као µg одабраног једињења по 1 g сувог екстракта (µg једињења/g с.е.).

3.3.2. Одређивање укупног фенолног садржаја

За одређивање укупног фенолног садржаја у испитиваним екстрактима примењена је спектрофотометријска метода Singleton-а и сарадника прилагођена за микроплоче (123). Коришћен је *Folin-Ciocalteu* (FC) реагенс који се састоји из смеше фосфоволфрамове и фосфомолибденске киселине. Наведена метода подразумева оксидацију полифенолних једињења у присуству FC реагенса до феноксидних аниона, а редукцију реагенса до волфрам-оксида и молибден-оксида плаве боје. Интензитет плаве боје се детектује спектрофотометријски при апсорбанцији $\lambda=760$ nm и директно је пропорционалан количини полифенола у испитиваним узорцима екстраката.



3.3.2.1. Реагенси

Реагенси који су коришћени за одређивање укупног фенолног садржаја у екстрактима ивањског цвећа су:

- FC реагенс (0,1 M);
- Раствор Na_2CO_3 (75 g/L);
- Основни раствор галне киселине 1 mg/ml који је даље разблаживан водом како би се добиле почетне концентрације у распону: 80, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 и 0,625 $\mu\text{g/mL}$;
- Раствори испитиваних екстраката (250, 65 и 32,5 $\mu\text{g/mL}$).

3.3.2.2. Поступак

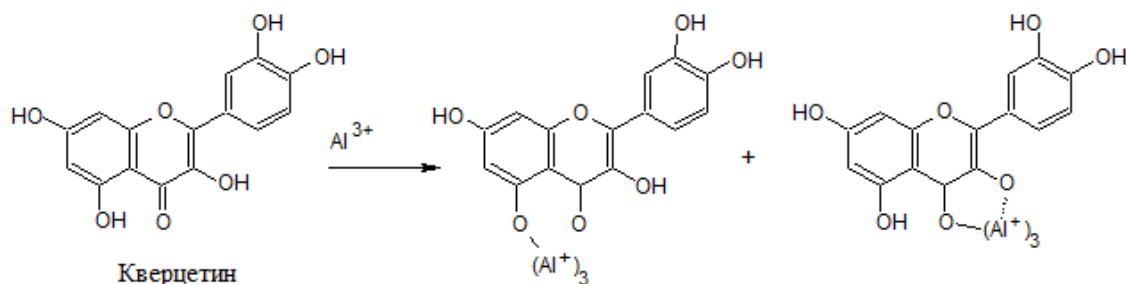
Претходно споменути разблажени раствори галне киселине у распону концентрација 0,625 – 80 $\mu\text{g/mL}$ били су неопходни за конструисање калибрационе криве. Основни раствор екстракта је разблажен како би се добили раствори почетних концентрација од 250, 65 и 32,5 $\mu\text{g/mL}$. Реакциона смеша је обухватала: 30 μL екстракта који је помешан са 150 μL 0,1 M FC реагенса и 120 μL 75 g/L Na_2CO_3 . Слепа проба је припремљена на исти начин осим што је уместо екстракта додат растварач (метанол/50% метанол/дестилована H_2O (dH_2O)). Након 2 сата на собној температури апсорбанција раствора је очитана спектрофотометријски на таласној дужини 760 nm на *Multiskan Spectrum* читачу микроплоча (Thermo Scientific).

Садржај фенолних једињења израчунат је помоћу калибрационе криве стандардног раствора галне киселине (функције апсорбанције у зависности од концентрације). Резултат је приказан помоћу средње вредности три мерења и представља mg еквивалената галне киселине по g сувог екстракта) (123).

3.3.3. Одређивање укупног флавоноидног садржаја

Укупни флавоноидни садржај одређен је према претходно утврђеној методи *Chang*-а и сарадника, прилагођеној за микро плоче (124). Метода се заснива на особини флавоноида да са металима граде одговарајуће металне комплексе. У реакцији флавоноида са AlCl_3 , Al^{3+} се везује за укупне флавоноиде и настаје комплекс флавоноида са алумунијумом. Интензитет обојеног комплекса се одређује

спектрофотометријски мерењем апсорбације на $\lambda=415$ nm и пропорционалан је садржају флавоноида у испитиваном узорку.



Слика 5. Реакција флавоноида са металом и настанак обојеног комплекса

3.3.3.1. Реагенси

Реагенси који су коришћени за одређивање укупног флавоноидног садржаја у екстрактима ивањског цвећа су:

- AlCl_3 (0,75 M);
- CH_3COONa (1 M);
- Основни раствор кверцетина 1 mg/mL који је даље разблаживан са 80% метанолом како би се добиле почетне концентрације кверцетина: 84, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 и 0,625 $\mu\text{g/mL}$;
- Раствори испитиваних екстраката (1000, 250 и 625 $\mu\text{g/mL}$).

3.3.3.2. Поступак

Добијени распон концентрација кверцетина 0,625-84 $\mu\text{g/mL}$ био је неопходан за конструисање калибрационе криве. Раствори испитиваних екстраката били су у концентрацијама 1000, 250 и 625 $\mu\text{g/mL}$, а радне пробе припремљене су у 3 понављања. Реакциона смеша је обухватала: 30 μL екстракта који је помешан са 90 μL метанола, 6 μL 0,75 M AlCl_3 , 6 μL 1 M CH_3COONa и 170 μL H_2O . Слепа проба је припремљена на исти начин осим што је уместо екстракта додат растварач (метанол/50% метанол/ dH_2O). Апсорбација раствора је очитавана спектрофотометријски на $\lambda=415$ nm на Multiskan

Spectrum читачу микроплоча (Thermo Scientific) након 30 минута. Користећи калибрациону криву стандардног раствора кверцетина одређен је укупан садржај фенолних једињења. Резултат је приказан као средња вредност три мерења \pm стандардна девијација и представља mg еквивалената кверцетина по g сувог екстракта.

3.4. Одређивање способности неутрализације *DPPH*[•] радикала

In vitro антиоксидациона активност одабраних екстраката ивањског цвећа процењена је помоћу методе за одређивање способности неутрализације *DPPH*[•] (1,1-дифенил-2-пикрилхидразил) радикала. Коришћена је спектрофотометријска метода аутора Sánchez-Moreno и сарадника, прилагођена за микроплоче (125). Овај радикал се често примењује за одређивање способности једињења да „хватају“ слободне радикале (енгл. *free radical scavengers*), односно да донирају протон и електрон. Наиме тест се заснива на чињеници да када се фенолна једињења нађу у присуству стабилног азот-центрираног *DPPH*[•] (љубичасти раствор) могу донирати водоник или електрон, при чему *DPPH*[•] прелази у редуковани неутрални *DPPH*-H (жуте боје) (125, 126).

3.4.1. Реагенси

Реагенси који су коришћени за одређивање капацитета екстраката ивањског цвећа за неутралисање *DPPH*[•]:

- Основни раствор *DPPH*[•] реагенса: 3 mM (1,18 mg/mL) *DPPH*[•] у етанолу;
- Радни раствор *DPPH*[•] реагенса: 67,2 μ M (26,4 μ g/mL) *DPPH*[•] у метанолу;
- Екстракти:
 - Ацетонски и метанолни екстракти (250, 500, 1000, 2000, 4000, 8000 и 16000 μ g/mL)
 - Водени екстракт (125, 250, 500, 1000, 2000 и 4000 μ g/mL);
- Стандард- бутиловани хидрокситолуен (ВНТ) (0,078 - 5 mg/mL).

3.4.2. Поступак

Серија раствора двоструких разблажења припремљена је од екстракта почетних концентрација 300 mg/mL и 200 mg/mL и добијен је распон концентрација од 125–16000 μ g/mL у зависности од типа екстракта. Радне пробе припремљене су у 3 понављања. Раствору узорка (10 μ L екстракта/стандарда) је додато 100 μ L 90 μ mol/L *DPPH*[•] и 190 μ L метанола. Као контрола уместо узорка коришћена је иста запремина

растварача (метанол/50% метанол/dH₂O). Након 60 минута апсорбанција раствора је читавана спектрофотометријски на $\lambda=515$ nm на *Multiskan Spectrum* читачу микроплоча (Thermo Scientific) у тами на собној температури.

Способност екстракта да неутралише DPPH[•] радикал (енгл. *radical scavenging capacity*- RSC) - RSC_{DPPH[•]} израчуната је на основу следеће једначине:

$$\text{RSC}_{\text{DPPH}^{\bullet}} (\%) = (1 - A/(A_{\text{кон}} - A_{\text{сп}})) \times 100$$

при чему је А- апсорбанција екстракта, А_{кон} -апсорбанција контроле, а А_{сп} - апсорбанција слепе пробе.

Концентрација екстракта при којој је 50% радикала неутралисано назива се IC50 вредност. Она се одређује на основу RSC_{DPPH[•]} вредности читавањем са графика који представља функцију RSC_{DPPH[•]} (%) у зависности од радне концентрације, коришћењем софтвера за анализу података *Origine 8.0*. Резултат се приказује као средња вредност три мерења IC50 ± стандардна девијација и изражава се у $\mu\text{g/mL}$.

3.5. Испитивање антимицробне активности екстракта

3.5.1. Коришћени антимицробни лекови

Лекови који су коришћени као стандарди приликом одређивања антимицробне активности екстракта су антибиотик доксициклин (Галеника А.Д., Београд) и антигљивични лек флуконазол (Pfizer Inc., US).

3.5.2. Припрема екстракта и хранљиве подлоге

Испитивани екстракти су растворени у диметилсулфоксиду, а затим разблажени хранљивим течним медијумом у циљу добијања 10% раствора. Доксициклин је растворен у Mueller-Hinton бујону, а флуконазол у Sabouraud dextrose бујону. Наведене хранљиве подлоге добијене су са Торлака, Београд.

Mueller-Hinton бујон представља стандардизовану подлогу прописану од стране Националног комитета за клиничке и лабораторијске стандарде Америке и користи се за испитивање антибактеријског деловања различитих агенаса. Састоји се из 2 g месног екстракта, 17,5 g казеин хидролизата и 1,5 g скроба. Sabouraud dextrose бујон представља подлогу која се користи за узгој и одржавање гљивица (патогених и

непатогених), нарочито оних које припадају групи дерматофита. Састоји се из 5 g панкреатичне дигестије казеина, 5 g пептичне дигестије животињског ткива, 40 g декстрозе и 15 g агара.

3.5.3. Испитивани микроорганизми

Антимикробна активност екстраката била је тестирана на 20 микроорганизма. Сви тестирани микроорганизми су представљени у Табели 6. Клинички изолати патогених бактерија су поклон Института за јавно здравље, Крагујевац, Србија. Остали микроорганизми су обезбеђени из колекције Лабораторије за микробиологију, Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу.

Табела 6. Списак тестираних микроорганизма приликом одређивања антимикробне активности екстраката ивањског цвећа

Бактерије	Гљиве
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Penicillium expansum</i>
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>P. chrysogenum</i>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>P. italicum</i>
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	<i>Trichoderma viridae</i> ATCC 13233
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 9170
<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 29544	<i>A. fumigatus</i> ATCC 204305
<i>Salmonella enteric</i>	<i>A. niger</i> ATCC 16404

3.5.4. Припрема суспензија

Колоније бактерија и гљива су узете са подлоге и суспендоване у 10 ml стерилног физиолошког раствора до настанка предвиђене густине суспензије која је одређена помоћу дензитометра. Упоређивање густине је вршено са 0,5 McFarland стандардом, који је еквивалентан садржају бактеријске суспензије од око 10^8 CFU/mL, а

суспензије квасца око 10^6 CFU/mL (CFU- Јединица за формирање колонија) (127). Суспензија спора гљива је припремљена пажљивим уклањањем спора из мицелија. Разблажење почетних суспензија вршено је коришћењем 0,85% стерилног физиолошког раствора у односу 1:100 за бактерије и кваснице и 1:1000 за филаментозне гљивице.

3.5.5. Поступак

За испитивање *in vitro* антимикробне активности коришћена је микродилуциона метода уз помоћ ресазурина (128). Плочица за микротитар са 96 отвора напуњена је хранљивом подлогом (100 μ L), а 100 μ L сваког тестираног екстракта почетне концентрације 20 mg/mL додато је у први ред микротитарске плоче. Након тога су направљена двострука разблажења тако да је распон концентрација екстракта био од 10 mg/mL у првом реду до 0,078 mg/mL у последњем реду. Након тога је додато 10 μ L суспензије бактерија, гљива и спора у одговарајуће отворе. Испитивана једињења су тестирана применом бактеријске концентрације од 5×10^5 CFU/ml и концентрације спора квасница и гљива од 5×10^3 CFU/ml. Након свега наведеног додат је ресазурин, супстанца плаво-љубичасте боје, која под утицајем оксидоредуктаза живих ћелија прелази у резорурфин који је розе флуоресцентне боје (129). Микротитарске плоче су инкубирани на 37° C око 24 часа за бактерије, на 28° C током 48 сати за квасце и 72 сата за споре гљива.

Антимикробна активност је процењена на основу вредности минималне инхибиторне концентрације (МИК) и минималне микробиоцидне концентрације (ММК). МИК је дефинисана као најмања концентрација испитаног екстракта која неће довести до промене боје ресазурина од плаве до розе, док када је реч о филаментозним гљивама МИК представља најмању концентрацију екстракта која је спречила раст мицелије. МИК се одређује визуелно. Одређивање ММК спроводи се тако што се узорак (10 μ l) узме из отвора плоче у којој није дошло до раста бактерија и постави се на плочаста агар. Концентрација при којој се не детектује раст бактерија након предвиђеног периода инкубације означава се као ММК. Сваки тест је укључио контролу раста и контролу стерилности и изведен је у дупликату.

3.6. Испитивање антибиофилм активности екстраката

3.6.1. Припрема екстраката и хранљиве подлоге

Екстракти ивањског цвећа су растворени у DMSO, па онда разблажени Mueller-Hinton бујоном до настанка раствора концентрације од 10 %. Као стандард коришћен је доксициклин који је растворен у истој хранљивој подлози као и екстракти.

3.6.2. Испитивани микроорганизми

Антибиофилм активност екстраката ивањског цвећа тестирана је на 2 врсте бактерија: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Proteus mirabilis* ATCC 12453

3.6.3. Припрема суспензије

У циљу припремања суспензије бактерија колоније су узимане са подлоге и суспендоване у стерилном физиолошком раствору (5 mL). Густина суспензије је подешавана помоћу дензитометра (DEN-1, BioSan), на основу упоређивања са 1,0 McFarland стандардом.

3.6.4. Tissue culture plate (TCP) тест

TCP тест представља један од најчешће коришћених тестова за испитивање антибиофилм активности различитих агенаса и описали су га *Christensen* и сарадници (130). Сваки тест је подразумевао и контролу формирања биофилма. *O'Toole* и сарадници пружили су увид у процес настанка бактеријског биофилма (131). Прикључивање планктонских ћелија у подлоге за формирање сесилних ћелија представља почетни корак у настанку биофилма. Када се ћелије причврсте настављају да расту у заједници и као резултат награди се биофилм. Помоћу кристал виолет теста могуће је проценити везивање ћелија, а тест се заснива на способности боје да продире у ћелијску мембрану везаних ћелија чиме се пружа слика о густини причвршћених ћелија. (132, 133). Антибиофилм активност изражава се као биофилм инхибиторна концентрација (БИК) односно најнижа концентрација екстракта која инхибира формирање биофилма (у процентима).

Плоче са 96 отвора су припремљене додавањем 100 μL хранљиве подлоге за бактерије у сваки отвор. Из stock раствора испитиваних екстраката (концентрација 20 mg/mL) узето је 100 μL и додато у први ред плоче. Након тога вршено је серијско двоструко разблажење тестираних екстраката у сваком наредном реду, а добијени опсег концентрација раствора износио је од 10 до 0,78 mg/mL. Потом је 10 μL свеже суспензије бактерија, почетне концентрације 10^8 CFU/mL и разблажења у односу 1:100, пипетирано у сваки отвор. Инокулисане плоче су инкубиране на 37°C током 24 или 48 h, у зависности од тога да ли је реч о Грам-негативним или Грам-позитивним бактеријама. Додатних 24 часа плоче су инкубиране у циљу праћења утицаја екстракта на формирани биофилм.

Након инкубације садржај сваког отвора је пажљиво уклоњен, а отвори су испирани помоћу 200 μL раствора пуфера (0,15 M амонијум-сулфат, 0,1 M калијум-дихидрогенфосфат, 0,034 M натријум--дихидрогенцитрат и 0,001 M магнезијум-сулфат) да би се отклониле неадхериране бактерије. Додато је 100 μL метанола да би се фиксирао биофилм. Формирани биофилмови од везаних ћелија у отворима су обојени кристал виолетом (0,1% w/v) и инкубирани на собној температури током 20 минута. Вишак боје је уклоњен темељним испирањем са дејонизованом водом, а затим са 100 μL етанола. Оптичке густине обојених везаних ћелија бактерија су процењене помоћу микро ELISA читача плоча (RT-2100C, Rayto, Shenzhen, China) на таласној дужини од 630 nm. Само бујон или бујон са различитим концентрацијама тестираних екстраката служили су као контрола провере стерилности и неспецифичног везивања медијума. Тетрациклин је коришћен као позитивна контрола. Сви тестови су изведени у дупликату.

3.7. Испитивање антиинфламацијске активности екстраката ивањског цвећа

3.7.1. Експерименталне животиње

У оквиру испитивања антиинфламацијског деловања екстраката коришћени су одрасли пацови *Wistar* соја, мушког пола, старости 8 недеља, телесне масе 200-250g. Животиње су биле чуване у строго контролисаним условима (температура $22\pm 2^\circ\text{C}$, циклус светлост:тама 12:12 часова). Вода и храна су били доступни у довољној количини да би пацови могли да их узимају према потреби (*ad libitum*).

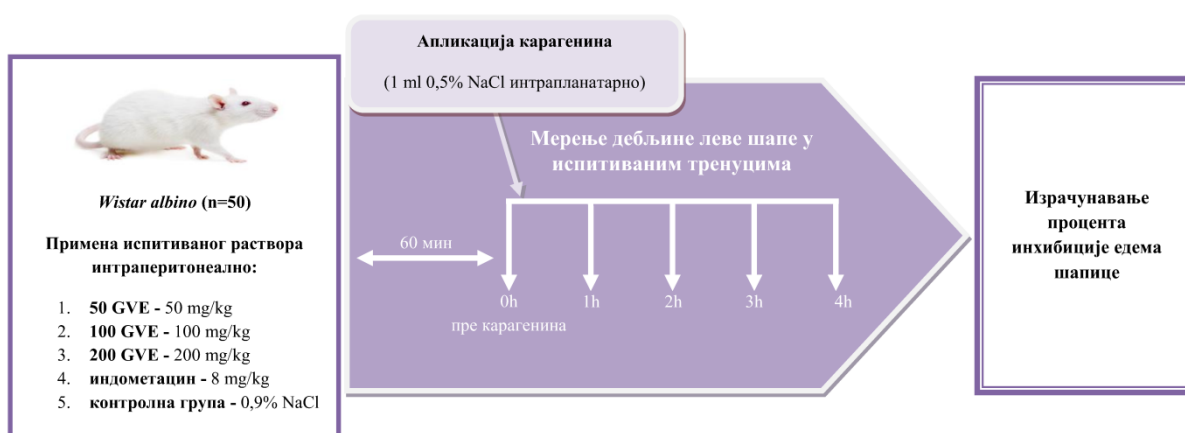
3.7.2. Индукција локалне инфламације и третман екстрактима

Испитивање антиедематозне активности спроведено је на моделу карагенином изазване инфламације шапе пацова. Карагенин је проинфламациона супстанца која примењена интраплантарно у шапу пацова изазива акутну инфламацију, која се карактерише брзом појавом еритема, едема и хипералгезије. Овај модел је високо репродукцибилан и често коришћен у научним истраживањима у циљу испитивања антиинфламационе активности различитих супстанци (134, 135).

Део истраживања који испитује антиинфламационе ефекте ивањског цвећа обухватио је 50 животиња подељених у две групе експерименталну и контролну. Експериментални протокол приказан је на Слици 6. Свим пацовима изазвана је инфламација применом 1 mL 0,5% физиолошког раствора карагенина интраплантарно у задњу леву шапу пацова.

Пацови укључени у овај део истраживања били су подељени у 5 група (10 животиња по групи):

- 1) **50 GVE** - животиње се третирају акутном интраперитонеалном (i.p.) инјекцијом екстракта у дози од 50 mg/kg, 60 минута пре изазивања инфламације.
- 2) **100 GVE** - животиње се третирају акутном i.p. инјекцијом екстракта у дози од 100 mg/kg, 60 минута пре изазивања инфламације.
- 3) **200 GVE** – животиње се третирају акутном i.p. инјекцијом екстракта у дози од 200 mg/kg, 60 минута пре изазивања инфламације.
- 4) **индометацин** - животиње се третирају акутном i.p. инјекцијом у индометацина суспендованог у физиолошком раствору у дози од 8 mg/kg, 60 минута пре изазивања инфламације.
- 5) **контрола** - животиње се третирају i.p. инјекцијом физиолошког раствора, 60 минута пре изазивања инфламације.



Слика 6. Схематски приказ експерименталног протокола за испитивање антиинфламацијске активности ивањског цвећа

3.7.3. Одређивање антиинфламационе активности екстраката

У циљу квантификације антиинфламацијског ефекта примењених екстраката мерена је дебљина ткива леве шапце сваког пацова у следећим тренуцима: непосредно пре изазивања инфламације и 1,2,3,4 часа након инфламације. Дебљина ткива се мери на средини шапце пацова коришћењем дигиталног калипера. Процент инхибиције едема шапце рачуна се према формули:

$$\% \text{ инхибиције} = 100 \times [1 - (Y_t / Y_c)]$$

Где је Y_t = просечно повећање дебљине шапе у третираној групи пацова између два тренутка мерења, а Y_c = просечно повећање дебљине шапе у нетретираној групи пацова између два тренутка мерења.

3.8. Испитивање кардиопротективних ефеката екстраката ивањског цвећа

3.8.1. Експерименталне животиње

У оквиру испитивања ефеката екстраката ивањског цвећа на исхемијско-реперфузионо оштећење срца користили су се здрави и спонтано-хипертензивни пацови мушког пола, старости 8 недеља, телесне масе 200-250g. Овај део истраживања

обухватио је 80 животиња (по 10 у свакој групи) које су биле подељене у две групе, експерименталну и контролну.

Експериментална група је на основу присуства или одсуства спонтано развијене хипертензије и примењене дозе екстракта била подељена у 6 подгрупа (10 по свакој подгрупи):

1) **125 GVE** - здраве животиње које су третиране екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg *per os* у трајању од 4 недеље.

2) **250 GVE** - здраве животиње које су третиране екстрактом ивањског цвећа у дози од 250 mg/kg *per os* у трајању од 4 недеље.

3) **500 GVE** - здраве животиње које су третиране екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg *per os* у трајању од 4 недеље.

4) **SHR + 125 GVE** – спонтано хипертензивне животиње које су третиране екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg *per os* у трајању од 4 недеље.

5) **SHR + 250 GVE** – спонтано хипертензивне животиње које су третиране екстрактом ивањског цвећа у дози од 250 mg/kg *per os* у трајању од 4 недеље.

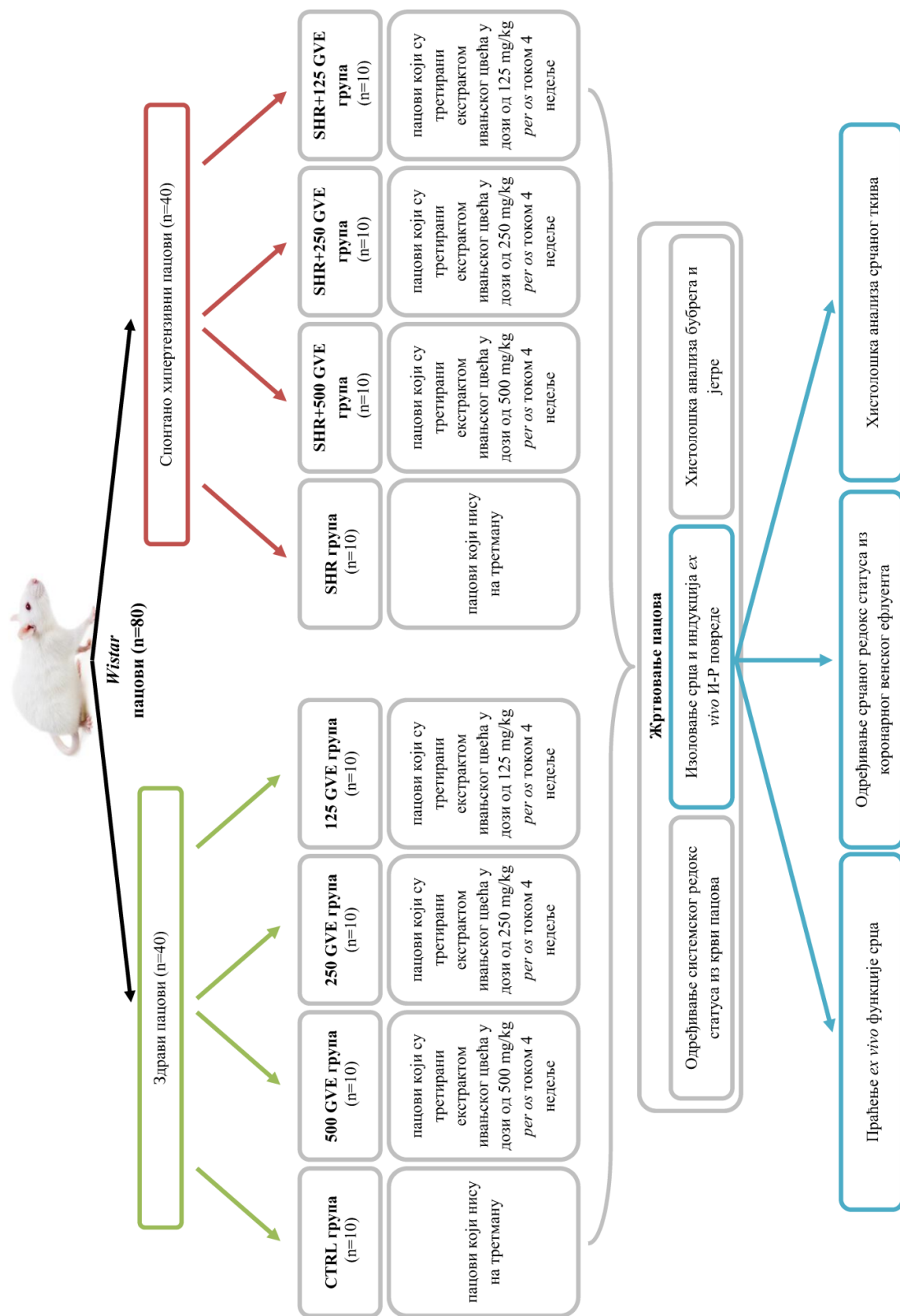
6) **SHR + 500 GVE** – спонтано хипертензивне животиње које су третиране екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg *per os* у трајању од 4 недеље.

Контролна група је била подељена у 2 подгрупе:

1) **CTRL** - здрави *Wistar* пацови који нису конзумирали екстракте ивањског цвећа током периода од 4 недеље, већ су користили стандардну храну и воду за пиће.

2) **SHR** - спонтано хипертензивни *Wistar* пацови који нису конзумирали екстракте ивањског цвећа током периода од 4 недеље, већ су користили стандардну храну и воду за пиће.

Како би се обезбедила прецизна количина лека за сваку животињу, пацови су чувани у одвојеним кавезима (једна животиња по кавезу). Будући да пацови пију у просеку 60 – 80 ml воде дневно, у тој запремини је растворена појединачна доза екстракта прилагођена телесној маси пацова. Иста процедура је понављана сваког дана експерименталног протокола током 28 дана. Након конзумације екстракта у периоду од 4 недеље, све животиње су жртвоване, након чега се други део истраживања обавио на *ex vivo* моделу изолованог срца пацова. Експериментални протокол је приказан на Слици 7.



Слика 7. Схематски приказ експерименталног протокола за испитивање кардиопротективних ефеката ивањског цвећа

3.8.2. Испитивање *ex vivo* функције срца

Испитивање *ex vivo* функције срца обављено је помоћу модела ретроградне перфузије изолованог срца по *Langendorff*-у (*Langendorff apparatus, Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary*).

3.8.2.1. Модел изоловане ретроградне перфузије по *Langendorff*-у

Модел изоловане ретроградне перфузије по *Langendorff*-у сматра се погодним за је проучавање функције срца и коронарне циркулације изолованог срца сисара (пас, заморчић, пацов, зец, мачка). Постоје две технике рада на *Langendorff* апарату од којих се једна базира на перфузији срца при константном протоку, док се друга односи на перфузију срца при константном притиску кроз коронарно васкуларно корито. У овом истраживању применили смо методу перфузије срца при константном коронарном перфузионом притиску од 70 cmH₂O.

Апарат се састоји из две вертикалне стаклене цеви (мања се налази у већој) између којих протиче вода загрејана до физиолошке температуре од 37 °C. Подешавање температуре омогућено је захваљујући воденом купатилу које омогућава на тај начин и загревање читавог система. *Krebs-Henseleit*-ов раствор је раствор који протиче кроз апарат и исхрањује срце. По хемијском саставу садржи све компоненте сличне екстрацелуларној течности и помоћу негативног притиска убацује се у цев мањег калибра. Цев мањег калибра се завршава канилом на коју се поставља изоловано срце пацова. Резервоар који садржи *Krebs-Henseleit*-ов раствор је повезан са цеви мањег калибра и боцом са смешом гасова O₂ : CO₂ у односу 95% : 5%. Улога боце са смешом гасова је да омогући постизање физиолошког парцијалног притиска O₂ и CO₂ који је присутан у артеријској крви као и да допрема раствор до унутрашње цеви система помоћу негативног притиска који настаје у резервоару. Изоловано срце се помоћу асцедентне аорте прикачи за канилу која се налази на завршном делу цеви мањег калибра и омогућава се несметан проток *Krebs-Henseleit* раствора кроз срце. Сензор односно трансдјусер има улогу континуираног праћења срчане функције и физички је повезан са лучно савијеном, танком металном цеви на чијем се крају налази балон испуњен дестилованом водом. Прокидањем митралне валвуле између леве преткоморе и леве коморе уводи се балон сензора у леву комору. Рачунар са одговарајућим софтвером (*Spel Advanced HaemoSys v3.24*) добија информације о раду срца помоћу

сензора и преводи их у излазне податке помоћу математичких формула. На тај начин читавањем вредности са рачунара омогућено је континуирано праћење рада леве коморе и то бележењем следећих параметара:

- $dp/dt \max$ – максимална стопа промене притиска у левој комори која се изражава у mmHg/s;
- $dp/dt \min$ – минимална стопа промене притиска у левој комори која се изражава у mmHg/s;
- SLVP – систолни притисак у левој комори који се изражава у mmHg;
- DLVP – дијастолни притисак у левој комори који се изражава у mmHg;
- HR – фреквенца рада срца која се изражава као број откуцаја по минути (енгл. *beats per minute, bpm*).

Коронарни проток (CF) је мерен флоуметријски (flowmetrically) и изражава се у mL коронарног венског ефлуента у минути. Будући да је лева комора морфолошки и функционално доминантија, праћење њене функције може осликати рад срца у целости.

3.8.2.2. Krebs-Hensenleit раствор за перфундовање срца

Krebs-Hensenleit-ов перфузиони раствор доводи хранљиве материје до срца и омогућава његову исхрану и несметан рад на апарату. Компоненте које улазе у његов састав су: натријум хлорид (NaCl – 118 mmol/L), калијум хлорид (KCl – 4,7 mmol/L), магнезијум сулфата ($MgSO_4 \times 7H_2O$ – 1,66 mmol/L), калијум дихидроген фосфат ($KH_2PO_4 \times 2H_2O$ – 1,18 mmol/L), натријум бикарбонат ($NaHCO_3$ – 24,88 mmol/L), глюкоза ($C_6H_{12}O_6 \times H_2O$ – 5,5 mmol/L) и калцијум хлорид ($CaCl_2$ – 2,52 mmol/L). рН вредност раствора износи 7,4.

3.8.2.3. Изоловање и припрема срца

Након краткотрајне наркозе интраперитонеалном применом комбинације кетамина и ксилазина сви пацови се жртвују цервикалном дислокацијом (*Schedule 1 of the Animals/Scientific Procedures, Act 1986, UK*). Отвара се абдомен, лучно сече дијафрагма, након тога се врши отварање грудног коша лучно, дуж мамиларне линије, да би се у крајњем пресецањем перикарда изоловало срце. Током процеса изолације срце се прелива хладним физиолошким раствором температуре од (+4°C) како би се у

трајању манипулације одржао његов рад у оквирима хомеостазе. По уклањању из организма одмах се ставља у ледени физиолошки раствор како би се импровизовала тзв. „физиолошка клешта“ која метаболичке процесе у срцу своде на минимум. Тупом препарацијом срца се уклањају непотребни делови и издваја асцендентна аорта која ће се причврстити за канилу. У делу аурикуле приступа се левој преткомори, пинцетом се прокидају митрални записци и омогућава улазак сензора.

3.8.3. Експериментални протокол

Након постављања срца на апарат чека се успостављање стабилног рада које се верификује непромењеним вредностима коронарног протока и параметара функције срца након неколико узастопних мерења. Након стабилизације срца су подвргнута глобалној исхемији у трајању од 20 мин затварањем протока кроз срце, након чега је успостављена реперфузија (поновно успостављање протока) у трајању од 30 минута. Коронарни венски ефлуент прикупљан је у следећим тачкама експеримента: у тачки стабилизације (С), у првој тачки реперфузије након двадесетоминутне исхемије (P1), као и на сваких 5 минута током периода реперфузије (P2-P7). У наведеним интервалима софтверски су бележени и сви претходно наведени кардиодинамски параметри.

3.9. Испитивање ефеката ивањског цвећа на системски и срчани редокс статус

Током жртвовања животиња узорци крви за биохемијске анализе су сакупљени из југуларне вене у циљу испитивања ефеката ивањског цвећа на системски редокс статус. Након центрифугирања крви издвојени су плазма и лизат еритроцита. У узорцима плазме одређивани су прооксиданси као што су: индекс липидне пероксидације - мерен као TBARS, азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-), супероксид анјон радикал (O_2^-) и водоник пероксид (H_2O_2). Следећи параметри антиоксидационе заштите су одређивани из узорака еритроцита: активност супероксиддизмутазе (SOD) и каталазе (CAT), као и ниво редукованог глутатиона (GSH). Како би се испитали ефекти екстракта ивањског цвећа на срчану продукцију прооксиданаса у узорцима коронарног венског ефлуента одређивани су нивои: TBARS, NO_2^- , O_2^- и H_2O_2 . Све биохемијске анализе одрађене су спектрофотометријски (Specord S-600 Analytik Jena, Велика Британија).

3.9.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS)

Индекс липидне пероксидације одређиван је индиректно мерењем продуката реакције липидне пероксидације са тиобарбитурном киселином, односно нивоа TBARS (енгл. *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*). Спектрофотометријска метода се базира на одређивању нивоа липидних пероксида на основу реакције малонилдиалдехида (MDA) са тиобарбитурном киселином (ТВА) (136).

3.9.1.1. Реагенси

Реагенси који су коришћени за одређивање нивоа TBARS су: 2-тиобарбитурна киселина (ТВА), 28% трихлорсирћетне киселине (ТСА) и натријум хидроксид (NaOH).

3.9.1.2. Поступак

У епрувету је стављено 800 μL узорка односно коронарног венског ефлуента и 200 μL 1% ТВА у 0,05 М натријум хидроксиду. Узорци су инкубирани у воденом купатилу у трајању од 15 минута, при температури од 100°C, након чега су 15 минута инкубирани на собној температури пре одређивања апсорбанције. Апсорбанција је мерена спектрофотометријски на $\lambda=530\text{nm}$. *Krebs-Hensenleit* раствор је коришћен као слепа проба, у количини еквивалентној запремини коронарног венског ефлуента.

Протокол за одређивање нивоа TBARS у плазми се незнатно разликује. Наиме помеша се 400 μL 28% ТСА и 800 μL плазме и остави 15 минута на леду. Након тога следи процес центрифугирања у трајању од 15 мин при 6000 rpm. У 800 μL супернатанта додаје се 200 μL 1% ТВА, а потом се добијени узорци инкубирају у воденом купатилу 15 минута на 100°C. Наставак протокола је исти као и за коронарни венски ефлуент. Дестилована вода је коришћен као слепа проба, у количини еквивалентној запремини плазме.

Концентрација ослобођених TBARS израчуната је на основу следеће једначине:

$$\text{nmol TBARS/mL ефлуента или плазме} = \Delta A (A_y - A_{\text{сп}}) / 1,56 \times 1,25$$

при чему је A_y апсорбанца узорка, док је $A_{\text{сп}}$ апсорбанца следеће пробе, док су 1,56 и 1,25 корекциони фактор за овај есеј.

Количина ослобођених TBARS по граму срчаног ткива израчуната је на следећи начин:

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

Ниво TBARS се изражава у μM , за разлику од осталих мерених прооксиданаса чија је концентрација изражавана у nM јер је количина TBARS за један ранг величина већа од свих осталих параметара.

3.9.2. Одређивање нитрита (NO_2^-)

Мерење нивоа ослобођених нитрита у коронарном венском ефлуенту представља погодну методу за индиректну процену функционалности ендотелног L-аргинин:NO система у коронарној циркулацији. Азот моноксид (NO) у реакцији са молекуларним кисеоником доводи до настанка нитрита (NO_2^-) на следећи начин:



Како у овој реакцији настаје еквимоларна количина нитрита, сматра се да је ниво нитрита у коронарном венском ефлуенту заправо ниво ослобођеног азот монооксида. Метода се заснива на коришћењу *Griess*-ов реагенса који у присуству нитрита доводи до настанка диазо-комплекса љубичасте боје (137).

3.9.2.1. Реагенси

Реагенси који су коришћени за одређивање нивоа NO_2^- су: сулфанилна киселина (4-амино бензенсулфонска киселина), N-(1-нафтил)-етилendiамин дихидрохидрат (NEDA), амонијум хлорид (NH_4Cl), боракс ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$), 85% орто-фосфорна киселина (H_3PO_4), $\rho = 1,685 \text{ g cm}^{-3}$; натријум нитрит (NaNO_2).

3.9.2.2. Поступак

Griess-ов реагенс се припрема *ex tempore* тако што се помешају једнаке запремине (v/v) 1 % сулфанилне киселине растворене у 5 % орто-фосфорној киселини и 0,1 % воденог раствора N-(1-нафтил)-етилендиамин дихидрохлорида (NEDA).

У епрувет (12 x 100) се пипетира 1 mL коронарног венског ефлуента, 250 μ L свеже направљеног *Griess*-ов реагенса и 125 μ L амонијачног пуфера (pH=9.0). Амонијачни пуфер садржи амонијум хлорид (NH₄Cl) и натријум тетраборат (Na₂B₄O₇) и има улогу у стабилизацији диазо-комплекса. *Krebs-Hensenleitov* раствор користи се као слепа проба.

Концентрација ослобођених нитрита одређује се на основу калибрационе криве. Конструисање калибрационе криве врши се на основу екстинкција узорка који у себи садрже познату концентрацију нитрита, након реакције са *Griess*-овим реагенсом у присуству пуфера. Добија се пипетирањем 3, 6, 12 и 24 μ L воденог раствора 1 mM NaNO₂ у 1 mL *Krebs-Hensenleitov*-ог раствора чиме се добија концентрација нитрита од 2,18; 4,37; 8,73 и 17,34 nmol NO₂⁻/mL. Након 5-10 минута долази до стабилизације боје на собној температури и приступа се одређивању концентрације ослобођених нитрита спектрофотометријски на таласној дужини од λ =550 nm. Концентрација, а затим количина ослобођених нитрита добијана је на основу:

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

$$\frac{\text{Екстинкција стандарда-екстинкција слепе пробе}}{\text{Концентрација NaNO}_2 \text{ у стандарду}}$$

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

Дељењем разлике екстинкција узорка и слепе пробе са стандардом F:

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

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

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

3.9.3. Одређивање супероксид анјон радикала (O_2^-)

Одређивање количине супероксид анјон радикала (O_2^-) у коронарном венском ефлуенту и плазми заснива се на реакцији O_2^- са нитро тетразолијум плавим (енгл. *Nitro Blue Tetrazolium*, NBT) при чему настаје нитроформаза плави (138). Мерење се спроводи на таласној дужини $\lambda_{max}=550nm$.

3.9.3.1. Реагенси

Реагенси који су коришћени за одређивање нивоа O_2^- су: TRIS (Трис (хидроксиметил) аминометан, $C_4H_{11}NO_3$), 37% хлороводонична киселина (HCl), $\rho=1,19\text{ gcm}^{-3}$, Na_2EDTA , Нитро-тетразолијум плаво хлорид (NBT, $C_{40}H_{30}ClN_{10}O_6$), Желатин ($C_{15}H_{11}N_2 NaO_2$).

3.9.3.2. Поступак

У епрувете (12x100) се пипетира 50 μL узорка и 950 μL есејне смеше. Есејна смеша (“*assay mixture*”) представља смешу 50 mM TRIS-HCl пуфера (pH=8,6), 0,1 mM EDTA, 0,1 mg/mL желатина и 0,1 mM NBT. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћен је *Krebs-Hensenleitov* раствор. На почетку реакције измери се екстинкција смеше и то се означава као екстинкција E_1 . Затим се на сваких 60 секунди врши мешање пластичним штапићем и нотира екстинкција након мешања и тај поступак се понавља до достизања приближно исте вредности две узастопне екстинкције. Последња екстинкција се означава као E_2 . Исти поступак се спроводи и за слепу пробу. Концентрација ослобођеног O_2^- добијена је на основу следећих једначина:

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

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

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

$$\text{nmol } O_2^-/\text{mL ефлуента} = \Delta E / 0,015 \times 1/0,05$$

Након тога количина ослобођеног O_2^- по граму срчаног ткива се одређивала према следећој једначини:

$$\text{nmol } O_2^-/\text{минут/g} = \Delta E / 0,015 \times 1/0,05 \times CF/m_{\text{срца}}$$

3.9.4. Одређивање водоник пероксида (H_2O_2)

Одређивање H_2O_2 заснива се на оксидацији фенол црвеног помоћу водоник пероксид реакције која је катализована ензимом пероксидазом из коњске ротквице (енгл. *Horseshoe Radish Peroxidase* - HRPO). Ова реакција доводи до формирања једињења чији је максимум апсорпције $\lambda_{max}=610$ nm (139). Линеарна зависност апсорбанце 610 nm од концентрациј H_2O_2 је постојана за 1-60 μ M опсег концентрација (1-60 nmol/mL). Овом методом могуће је одредити настанак и ослобађање H_2O_2 у току временског интервала од 5-60 минута.

3.9.4.1. Реагенси

Реагенси који су коришћени за одређивање нивоа H_2O_2 су: калијум хидрогенфосфат дихидрат ($K_2HPO_4 \times 2H_2O$), калијум дихидрогенфосфат дихидрат ($KH_2PO_4 \times 2H_2O$), натријум хлорид (NaCl), водоник пероксид (H_2O_2), D(+)-глукоза монохидрат (декстроza), фенол црвено (енгл. *phenol red*, $C_{19}H_{14}O_5S$), пероксидаза из коњске ротквице (енгл. *peroxidase from horse radish*, HRPO EC 1.11.1.7).

3.9.4.2. Поступак

У епрувете (12x100) се пипетира 200 μ L коронарног венског ефлуента и 800 μ L свеже направљеног раствора фенол црвеног (енгл. *Phenol Red Solution-PRS*). PRS настаје мешањем 140 mM NaCl, 10 mM калијум фосфатног пуфера (pH =7), 5,5 mM D(+)-глукозе и 0,28 mM фенол црвеног. Након тога се у узорке дода 10 μ L (1:20) HRPO који је припремљен *ex tempore*. Узорци се остављају на собној температури 10 минута, након чега се помоћу 1 M NaOH подеси pH \approx 12. Као слепа проба се користи *Krebs-Hensenleitov* раствор уместо коронарног венског ефлуента. Концентрација ослобођеног H_2O_2 у коронарном венском ефлуенту израчунава се на основу стандардне криве, одређиване за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве, користи се стандардни (Stock) раствор H_2O_2 , уз претходну проверу концентрације (A_{230} за 10 mM H_2O_2 износи 0,810). У 3 епрувете се пипетира: 5, 10 и 20 μ L 1 mM раствора H_2O_2 (уместо коронарног венског ефлуента), 200 μ L дестиловане, 800 μ L раствора фенол црвеног и 10 μ L (1:20) HRPO. Након инкубације у трајању од 10 минута на собној температури, подешава се

pH вредност око 12 помоћу 10 μL 1 M NaOH. Финална концентрација H_2O_2 у 3 узорка стандарда износила је: 2,75; 5,49; и 10,99 nmol/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{mL}$. Мерење апсорбанце (A) спровођене су спектрофотометријски на таласној дужини максималне апсорпције $\lambda_{\text{max}}=610$ nm, у стакленим киветама запремине 1 mL. Од добијених апсорбанци одузима се вредност апсорбанце слепе пробе (B), чиме се добија коначна апсорбанца (ΔA). Концентрација, а затим и количина ослобођеног H_2O_2 у коронарном венском ефлуенту израчунавана је на основу:

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

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

2) на основу апсорбанце узорка на $\lambda_{\text{max}}=610$ nm (A_u) и њеног упоређивања са слепом пробом (A_{sp}) израчунава се финална апсорбанца (ΔA) ($A = A_u - A_{sp}$). Помоћу овако добијене апсорбанце, фактора F и количине коронарног венског ефлуента употребљеног опотребљеног у есеју (200 mL) израчунавана 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) количина ослобођеног H_2O_2 по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин:

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

3.9.5. Одређивање каталазе (CAT)

Активност каталазе у сонификату одређује се применом методе по *Beutler*-у (140). Метода се састоји у спектрофотометријском праћењу брзине разградње водоник-пероксида у присуству каталазе на таласној дужини од 230 nm при којој H_2O_2 апсорбује светлост. Прецизна концентрација водоник-пероксида се одређује у односу на апсорпцију разблаженог раствора пуфера (1:10). Као нула, читава се апсорпција раствора састављеног од 0,9 mL разблаженог пуфера и 0,1 mL разблаженог 30% раствора H_2O_2 (1:100).

Концентрација водоник пероксида израчунава се на основу екстинкционог коефицијента, који је за H_2O_2 на 230 nm, 0,071, по формули:

$$C = \Delta A / 0,071$$

Након тога, добијена концентрација се разблажује до 10 mM.

3.9.5.1. Поступак

У кварцну кивету у којој се налази 50 μL пуфера додаје се између 5 и 50 μL узорка (зависно од активности каталазе). Додатком 1 mL 10 mM раствора водоник-пероксида иницира се реакција разградње водоник-пероксида под утицајем каталазе. Пад апсорбанције прати се на таласној дужини 230 nm у току 3 минута. Активност се изражава у јед/mg протеина, а јединица је дефинисана као количина редукованог H_2O_2 , изражена у μM у минути. Израчунавање се врши према следећој једначини:

$$\Delta A * R / 0,071 * Low * V$$

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

3.9.6. Одређивање супероксид дисмутазае (SOD)

Одређивање активности SOD спроводи се помоћу епинефринске методе која се заснива на праћењу смањења брзине аутооксидације у алкалној средини, која зависи од O_2^- (141). SOD уклања O_2^- и на тај начин спречава аутооксидацију епинефрина. Брзина аутооксидације се детектује спектрофотометријски на апсорбанци од 480 nm. Контролу представља брзина аутооксидације епинефрина у одсуству SOD, док брзина аутооксидације епинефрина у присуству SOD представља део референтних вредности.

3.9.6.1. Поступак

У епрувету се дода 100 μL лизата и 1 mL карбонатног пуфера чиме се започиње процес. Након тога се додаје 100 μL епинефрина. Мерење се врши спектрофотометријски на таласној дужини од 470 nm. Активност SOD се изражава у

јединицама њене активности по граму Hb (unit/gHb) (142). Израчунавање се врши према наведеној реакцији:

$$\text{SOD} - 1 = 2(\Delta K - \Delta A) * R / V * Hb * \Delta K$$

ΔK је промена апсорпције контролне реакције у минути; ΔA је промена апсорпције реакције са узорком у минути; V је запремина узорка која се сипа у реакциону смешу (mL); Hb количина хемоглобина (g/100mL лизата); R је разблажење.

3.9.7. Одређивање редукованог глутатиона (GSH)

Ниво GSH у еритроцитима се одређује спектрофотометријски по методи *Beutler*-а која се заснива на оксидацији глутатиона GSH помоћу 5,5-дитио-бис-6,2-нитробензојеве киселином (DTNB) (143).

3.9.7.1. Поступак

GSH се екстрахује тако што се у 0,1 mL 0,1% EDTA дода 0,4 mL узорка и 0,75 mL раствора за преципитацију. Овај раствор се прави према тако што се помеша 1,67 g метафосфорне киселине, 0,2 g EDTA, 30 g NaCl, а потом допуни до 100 mL дестилованом водом. После мешања на *Vortex* мешалици наведена смеша се екстрахује 15 минута на леду и центрифугира 10 минута на 4000 rpm. У епрувете (12 x 100) се пипетира 300 μ L узорка, 750 μ L Na₂HPO₄ и 100 μ L DTNB (1 mg DTNB/ml 1% натријум цитрата). Као слепа проба се користи дестилована вода. Мерење нивоа GSH се одвија спектрофотометријски у кварцним киветама запремине 1 mL.

Концентрација, а затим и количина редукованог глутатиона у еритроцитима одређује се на основу стандардне криве за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве користи се стандардни *Stock*-раствор редукованог глутатиона концентрације 1,5 mmol/L тако што се у 4 епрувете пипетира 10, 20, 30 и 40 μ L 1 mM раствора GSH, 300 μ L хладног перфузионог *Krebs-Hensenleit*-овог раствора. На овај начин се одређује концентрација нитрита у узорцима стандарда (nmol/GSH/mL). Мерење апсорбанце (A) врши се на таласној дужини максималне апсорпције од 420 nm. Од добијених апсорбанци одузима се вредност апсорбанце слепе пробе (B), чиме се добија коначна апсорбанца (ΔA).

Помоћу овако добијене апсорбанце, стандардног фактора (F), и количине венског ефлуента употребљеног у есеју израчунава се концентрација глутатиона у венском ефлументу према следећој формули:

$$\text{nmol GSH / mL еритроцита} = \Delta A / F$$

3.10. Хистопатолошка анализа срца пацова

У моменту жртвовања изоловани су бубрег и јетра сваке животиње, док су срца узета по завршетку протокола И-Р на *Langendorff*-овом апарату. Наведени органи су фиксирани у 10% раствору формалдехида на собној температури. Запремина раствора коришћеног за фиксацију била је 10 пута већа у односу на запремину органа. Након тога су органи укалупљени у парафинске блокове и исечени на резове дебљине 5 μm помоћу микротоме. Пресеци су нанешени на предметна стакла, а затим бојени хематоксилином и еозином (H&E).

3.10.1. Поступак

Парафински исечци су претходно загрејани у термостату на +56 °C у трајању од 45 минута. Затим су депарафинисани у ксилолу и испирани у опадајућим концентрацијама етил алкохола у циљу дехидратације ткива на следећи начин: два пута по 5 минута у апсолутном алкохолу, 5 минута у 96% алкохолу, 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 70% алкохолу и на крају 5 минута у дестилованој води. Препарати су бојени *Mayer*-овим хематоксилином (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) 10 минута, а потом су испирани дестилованом водом, а након тога текућом водом у трајању од 5 минута. Препарати су затим бојени алкохолним еозином (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) 2 минута. Након бојења ткиво је дехидратисано и просветљено у ксилолу. У циљу дехидратације коришћене су растуће концентрације алкохола и то: 5 минута у 70% алкохолу, затим 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 96% алкохолу и на крају два пута по 5 минута у апсолутном алкохолу. Након бојења и поступка дехидратације, добијени препарати су просветљени потапањем током једног минута у мешавини ксилола и апсолутног алкохола у односу 1:1, а потом два пута по 1 минут само у ксилолу. Ткивни исечци су прекривени канада балзамом (*Canada balsam, Centrohem, Србија*) и покровним стаклима. Након сушења у трајању од 24 сата препарати су анализирани под

светлосним микроскопом (*Olympus, Japan*). Резултати хистопатолошке анализе, односно Н&Е бојења ћелија, представљени су сликама. Степен промена на бубрезима и срцу одређен је на основу претходно описаних скала које класификују оштећења наведених органа на градусе O-IV (144, 145).

3.11. Снага студије и величина узорка

Прорачун укупног узорка је заснован на резултатима претходно публикованих студија (146). За прорачун је коришћен *t*-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 (147).

Узимајући у обзир резултате ових студија, укупан број експерименталних животиња је прорачунат на 104 (по 8 у свакој групи). Имајући у виду могућност искључења неких експерименталних животиња из завршне анализе, укупни студијски узорак је утврђен на најмање 130 експерименталних животиња.

3.12. Статистичка обрада података

За статистичку обраду података коришћен је статистички пакет *IMB SPSS 20.0 for Windows*. За испитивање нормалности расподеле користили су се тестови *Kolmogorov Smirnov* и *Shapiro Wilk* и хистограм и *normal QQ plot*. За тестирање разлика између параметара, у зависности од њихове природе, користили су се Студентов *t*-тест, *Mann-Whitney* тест, Фишеров тест апсолутне вероватноће, једнофакторска или двофакторска анализа варијансе. Уколико је утврђено да постоји статистички значајна разлика између група користио се *Bonfferoni* тест како би се испитало између којих група се појавила статистички значајна разлика. Вредност $p < 0,05$ указује на статистички значајну, а вредност $p < 0,01$ на статистички високо значајну разлику. Вредности испитиваних параметара приказане су као средња вредност (\bar{X}) \pm стандардна девијација (SD). За креирање графикана и табела коришћен је *Microsoft Excel*.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Утицај растварача различите поларности на принос екстракта ивањског цвећа

Приликом екстракције надземног дела ивањског цвећа коришћени су вода, метанол и ацетон као растварачи. У зависности од поларности коришћених растварача садржај сувог екстракта у испитиваним узорцима налазио се у опсегу од 8,9 до 12,3 (Табела 7).

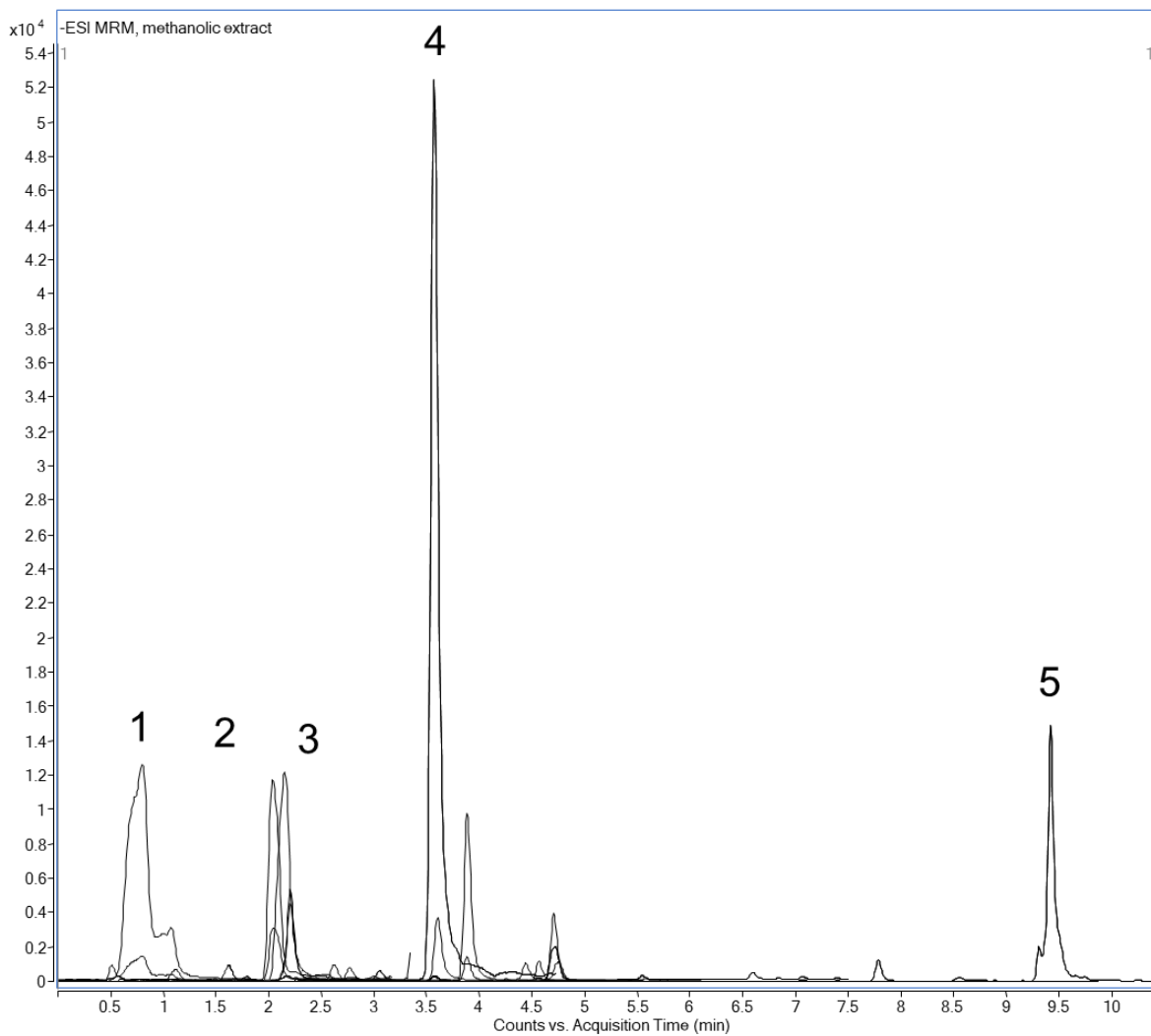
Табела 7. Приноси екстракције ивањског цвећа употребом растварача различите поларности.

<i>Растварач</i>	<i>Принос екстракта (g/100g дроге) %</i>
Вода	10,2
Метанол	12,3
Ацетон	8,9

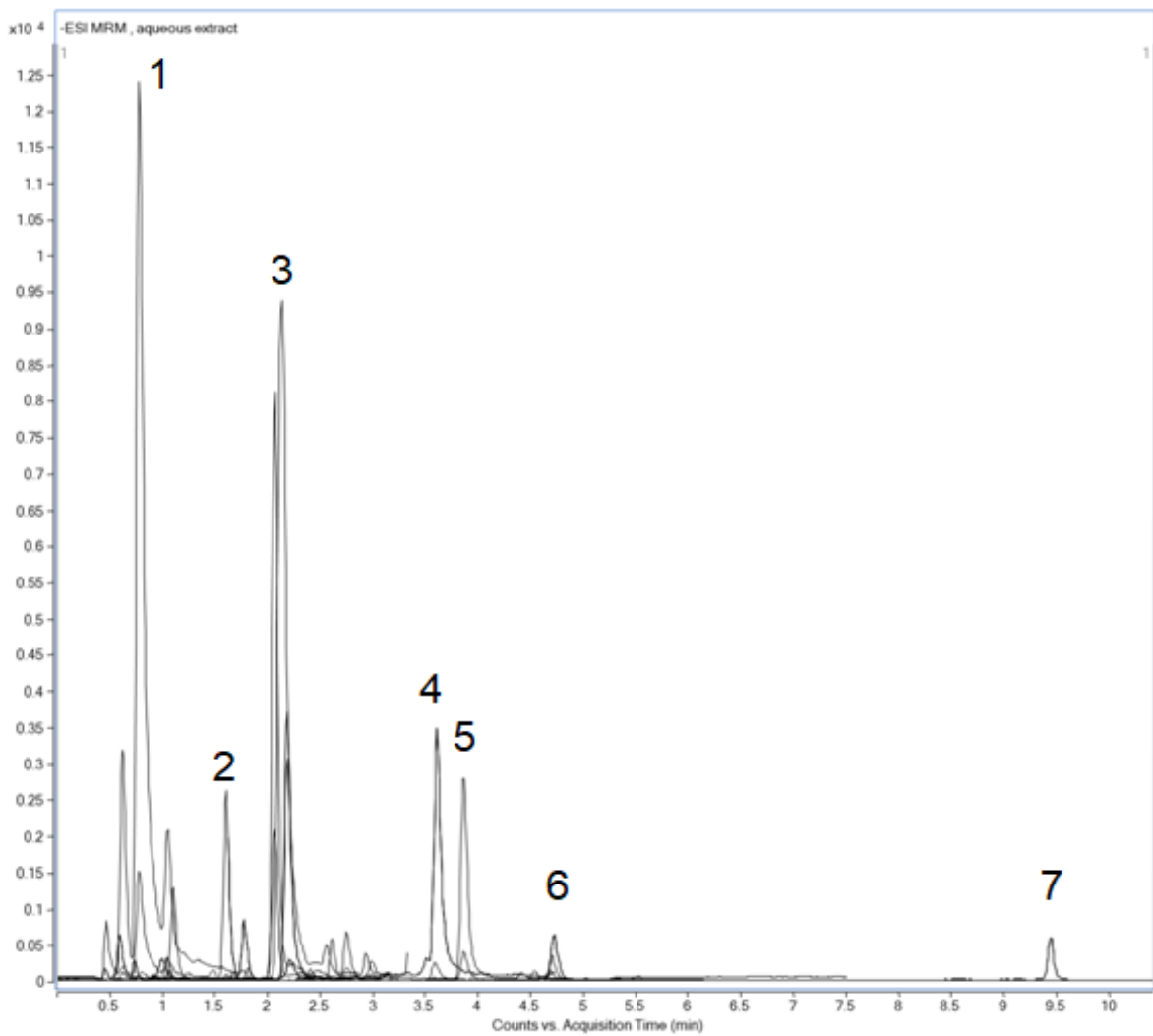
4.2. Хемијска карактеризација екстракта ивањског цвећа

4.2.1. Одабрана једињења у екстрактима ивањског цвећа

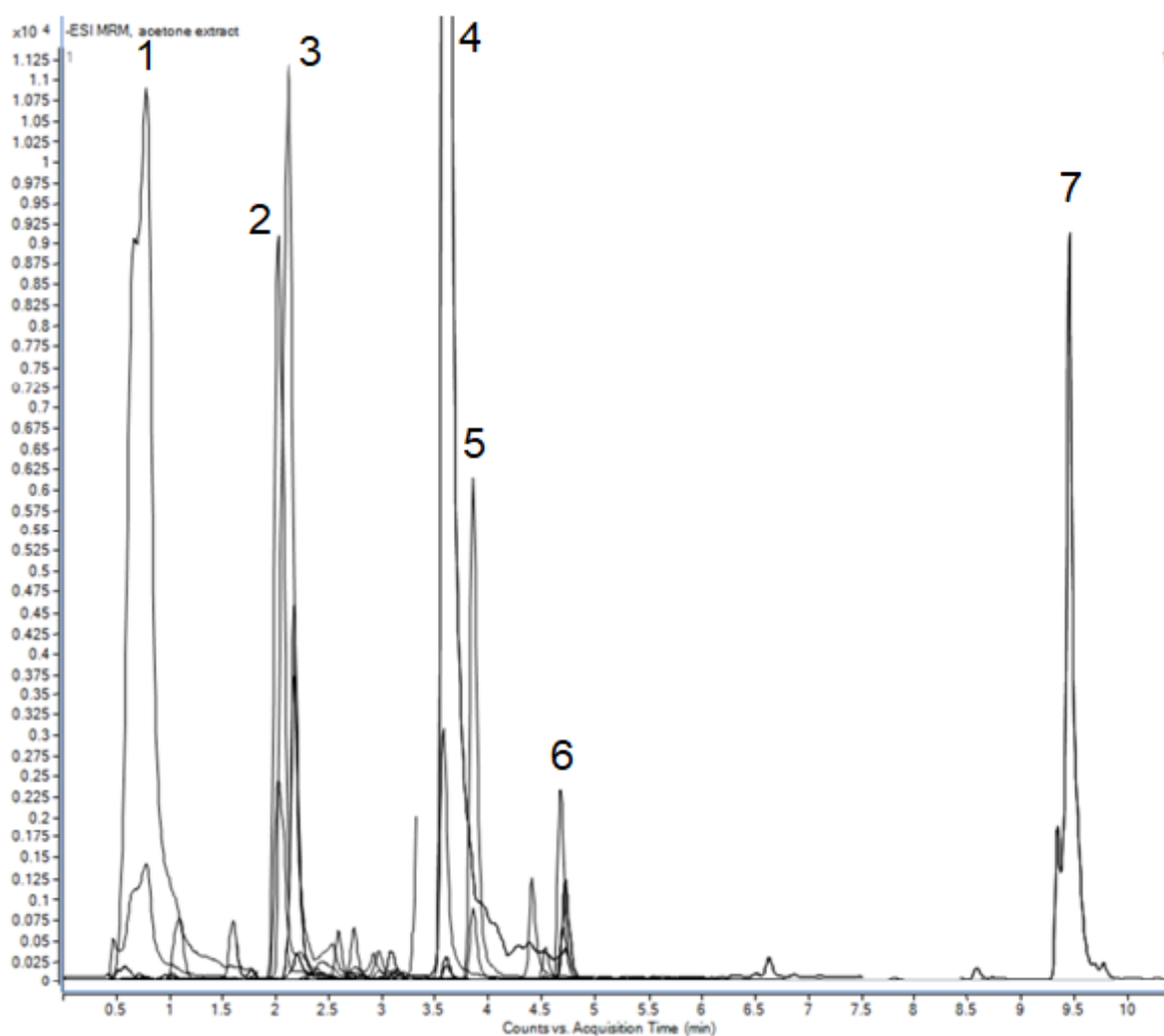
НРРС хроматограми метанолног, воденог и ацетонског екстракта надземног дела *G. verum* приказани су на Слици 8, 9 и 10. НРРС анализа открила је да су најзаступљенија једињења у метанолном екстракту: хлорогенска киселина, цинарозид (лутеолин-7-О-глукозид), кверцетин-3-О-глукозид, кверцетин, лутеолин, изорамнетин и урсолна киселина. У воденом екстракту једињења која су била у највишем проценту заступљена су: хлорогенска киселина, р-кумаринска киселина, цинарозид (лутеолин-7-О-глукозид), кверцетин, лутеолин, изорамнетин и урсолна киселина. Додатно, доминантно место у ацетонском екстракту заузимају следећи биомолекули: хлорогенска киселина, цинарозид (лутеолин-7-О-глукозид), кверцетин-3-О-глукозид, кверцетин, лутеолин, изорамнетин и урсолна киселина. Хлорогенска киселина се истиче по највећој концентрацији у свим испитиваним екстрактима.



Слика 8. HPLC хроматограм метанолског екстракта *G. verum*: једињење 1- хлорогенска киселина; једињење 2- цинарозид; једињење 3- кверцетин-3-О-глукозид; једињење 4- кверцетин; једињење 5- лутеолин; једињење 6- изорамнетин; једињење 7- урсолна киселина.



Слика 9. HPLC хроматограм воденог екстракта *G. vegeta*: једињење **1**- хлорогенска киселина; једињење **2**- р-кумаринска киселина; једињење **3**- цинарозид; једињење **4**- кверцетин; једињење **5**- лутеолин; једињење **6**- изорамнетин; једињење **7**- урсолна киселина.



Слика 10. HPLC хроматограм ацетонског екстракта *G. verum*: једињење **1**- хлорогенска киселина; једињење **2**- цинарозид; једињење **3**- кверцетин-3-О-глукозид; једињење **4**- кверцетин; једињење **5**- лутеолин; једињење **6**- изорамнетин; једињење **7**- урсолна киселина.

Табела 8. Концентрација одабраних биомолекула у екстрактима *G. veget* изражена као $\mu\text{g/g}$ сувог екстракта.

	Име једињења	Ацетонски екстракт	Метанолни екстракт	Водени екстракт	Ретенционо време [t_R]
1.	Урсолна киселина	5376 \pm 35	8900 \pm 58	30,3 \pm 0,2	9,5
2.	Хлорогена киселина	20368 \pm 1018	15561 \pm 778	27420 \pm 1371	0,8
3.	Изокверцетин	6900 \pm 207	6873 \pm 206	290 \pm 8,7	2,25
4.	Цинарозид	6918 \pm 207	9612 \pm 288	5032 \pm 151	2,13
5.	Кверцетин	145,6 \pm 43,7	179,1 \pm 53,7	12,2 \pm 3,7	3,74
6.	<i>p</i> -кумаринска киселина	44,9 \pm 4,0	54,3 \pm 4,9	137,6 \pm 12,4	1,69
7.	Астрагалин	72,4 \pm 2,9	93,8 \pm 3,8	63,7 \pm 2,5	2,8
8.	Кафеинска киселина	24,2 \pm 1,7	19,6 \pm 1,4	22,6 \pm 1,6	1,18
9.	Ферулинска киселина	15,8 \pm 1,6	17,3 \pm 1,7	38,8 \pm 3,9	1,9
10.	Лутеолин	19,7 \pm 1,0	33,9 \pm 1,7	10,0 \pm 0,5	4,03
11.	Изорамнетин	38,5 \pm 2,3	60,2 \pm 3,6	2,2 \pm 0,1	4,79
12.	Апигетрин	22,5 \pm 1,1	45,8 \pm 2,3	15,5 \pm 0,8	2,81
13.	Ванилинска киселина	15,9 \pm 4,8	14,7 \pm 4,4	14,5 \pm 4,4	1,24
14.	<i>p</i> -хидроксибензоева киселина	10,6 \pm 0,6	8,0 \pm 0,5	26,7 \pm 1,6	1,08
15.	Кемпферол	9,4 \pm 0,6	7,3 \pm 0,5	0,5 \pm 0,04	4,55
16.	Хесперетин	12,9 \pm 0,2	14,4 \pm 0,4	1,0 \pm 0,05	444
17.	Протокатехинска киселина	1,9 \pm 0,2	1,8 \pm 0,1	3,1 \pm 0,2	0,79
18.	Рамнетин	< 5,28	< 4,89	< 4,89	5,84
19.	Диосметин	6,1	12,4	2,9	5,02
20.	Рузмаринска киселина	1,9	0,3	1,4	2,43
21.	Ализарин	< 2,6	< 2,44	< 2,44	5,95
22.	Апиин	< 0,16	< 0,16	< 0,16	2,6
23.	Бајкалин	< 0,16	< 0,16	< 0,16	3,4
24.	Епигалокатехин галат	< 0,65	< 0,61	< 0,61	0,81
25.	Епикатехин	< 0,65	< 0,61	< 0,61	0,95
26.	Глициризин	< 0,16	< 0,16	< 0,16	7,41
27.	Хиперозид	< 0,32	< 0,31	< 0,31	2,16
28.	Катехин	< 0,65	< 0,61	< 0,61	0,74
29.	Мирицетин	< 20,85	< 19,55	< 19,55	2,67

	Име једињења	Ацетонски екстракт	Метанолни екстракт	Водени екстракт	Ретенционо време [t _R]
30.	o- кумаринска киселина	< 0,16	< 0,16	< 0,16	2,62
31.	Рутин	< 0,16	< 0,16	< 0,16	2,33
32.	Глициретинска киселина	< 0,32	< 0,31	< 0,31	8,93
33.	Елагна киселина	< 0,32	< 0,31	0,6 ± 0,01	2,61
34.	Кверцитрин	< 0,16	< 0,16	< 0,16	2,75
35.	Витексин	< 0,16	< 0,16	0,3 ± 0,02	1,9

4.2.2. Садржај укупних фенола и флавоноида у екстрактима

Укупни садржај фенола био је највећи у воденом, а најмањи у метанолном екстракту ивањског цвећа. Додатно највећи садржај флавоноида откривен је у метанолном, а најмањи у ацетонском екстракту. Резултати су приказани у Табели 9.

Табела 9. Укупни садржај фенола и флавоноида у екстрактима ивањског цвећа.

	Метанолни екстракт	Водени екстракт	Ацетонски екстракт
Укупни садржај фенола ^а	27,34 ± 2,12	127,57 ± 11,25 ^{§§}	101,58 ± 7,96 ^{**#}
Укупни садржај флавоноида ^б	67,11 ± 4,13	61,24 ± 6,11 [§]	30,51 ± 3,37 ^{**##}

^аmg еквивалента галне киселине (EGA)/g с.е.; ^бmg еквивалента кверцетина (EQU)/g с.е.; с.е. - суви екстракт; приказана је средња вредности три мерења ± стандардна девијација (X ± SD). **статистички значајна разлика на нивоу p<0,01 приликом поређења ацетонског и метанолног екстракта; # статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 приликом поређења ацетонског и воденог екстракта; ## статистички значајна разлика на нивоу p<0,01 приликом поређења ацетонског и воденог екстракта; § статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 приликом поређења метанолног и воденог екстракта; §§ статистички значајна разлика на нивоу p<0,01 приликом поређења метанолног и воденог екстракта.

4.3. Капацитет неутралисања DPPH• радикала

Резултати испитивања антиоксидационе активности екстракта ивањског цвећа указују на то да највећи потенцијал неутрализације DPPH• поседује метанолни, након

чега се истиче водени екстракт. С друге стране, активност ацетонског екстракта била је статистички значајно нижа у поређењу са метанолним и воденим ($p < 0,05$). Капацитет неутралисања DPPH изражен је преко IC50 вредности које су приказане у Табели 10.

Табела 10. Капацитет испитиваних екстраката да неутралишу DPPH радикал.

Узорак	IC50 ^a (µg/mL)
Водени екстракт	8,78 ± 0,10
Метанолни екстракт	9,63 ± 0,32
Ацетонски екстракт	11,65 ± 1,16** #
ВНТ	11,64 ± 1,144 ^{§§} ¶

Вредности су приказане као средња вредности три мерења ± стандардна девијација ($X \pm SD$); ВНТ - бутиловани хидрокситолуен. **статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ приликом поређења ацетонског и метанолског екстракта; #статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ приликом поређења ацетонског и воденог екстракта; §§статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ приликом поређења метанолског екстракта и ВНТ; ¶статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ приликом поређења воденог екстракта и ВНТ.

4.4. Антимикробна активност екстраката ивањског цвећа

In vitro испитивање антимикробне активности екстраката ивањског цвећа спроведено је на 10 врсти патогених бактерија и 10 врсти гљива. Вредности МИК и ММК одговарајућих екстраката, као и доксицилина и флуконазола као позитивних контрола приказани су у Табели 11.

Интензитет антимикробне активности варирао је у зависности од тестираног микроорганизма и типа екстракта. МИК вредности за испитиване екстракте налазиле су се у опсегу од $< 0,078$ до 5 mg/mL. Највећу осетљивост показала је бактерија *Bacillus subtilis* ATCC 6633 са вредности МИК $< 0,078$ mg/mL за метанолни и ацетонски и 0,313 mg/mL за водени екстракт. Изражена антибактеријска активност свих испитиваних екстраката уочена је према бактеријама *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и *Salmonella enterica* са вредностима МИК 1,25 mg/mL.

Антигљивична активност испитиваних екстраката била је генерално слаба, а добијени резултати су приказани у Табели 12. Сви испитивани екстракти испољили су умерену и нижу активност према већини квасница и филаментозних гљива у односу на позитивну контролу. Изузетак је уочен код ацетонског екстракта према врсти *Aspergillus niger* ATCC 16404 са вредности МИК 0,625 mg/mL, чија је антигљивична активност била виша у односу на флуконазол.

Табела 11. Антибактеријска активност екстракта ивањског цвећа.

Врста	Тип екстракта		Водени		Метанолни		Ацетонски		Доксициклин	
	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК	МИЦ	ММК
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	10	5	5	2,5	2,5	2,5	2,5	0,448	7,81
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1,25	1,25	jan.25	2,5	1,25	2,5	2,5	2,5	0,22	3,75
<i>Bacillus cereus</i>	5	10	5	5	2,5	2,5	2,5	2,5	0,977	7,81
<i>Bacillus subtilis</i>	5	10	2,5	5	5	5	5	5	0,112	1,95
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0,31	1,25	<0,078	0,313	<0,078	<0,078	<0,078	<0,078	1,953	31,3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2,5	5	2,5	2,5	5	2,5	5	10	15,63	31,3
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	2,5	2,5	2,5	2,5	5	2,5	5	5	15,63	62,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	5	10	5	5	5	5	5	5	62,5	125
<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 29544	5	5	5	5	5	5	5	5	/	/
<i>Salmonella enterica</i>	1,25	5	1,25	2,5	1,25	2,5	1,25	5	15,63	31,3

МИК-минимална инхибиторна концентрација (µg/mL); ММК-минимална микробицидна концентрација (µg/mL); нг-није тестирано. Позитивна контроле је доксициклин.

Табела 12. Антигљивична активност екстракта ивањског цвећа.

Врста	Тип екстракта		Водени		Метанолни		Ацетонски		Флуконазол	
	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	5	10	5	>10	2,5	10	2,5	10	31,25	500
<i>Saccharomyces boulardii</i>	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	7,81	31,3
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	2,5	5	2,5	>10	5	>10	5	>10	31,25	62,5
<i>Penicillium expansum</i>	10	>10	5	10	10	10	10	10	/	/
<i>P. chrysogenum</i>	10	>10	5	10	10	10	10	10	1000	1000
<i>P. italicum</i>	10	>10	10	10	10	10	10	10	250	500
<i>Trichoderma viridae</i> ATCC 13233	10	10	5	10	5	10	5	10	500	1000
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 9170	>10	>10	10	>10	10	>10	5	10	500	500
<i>A. fumigatus</i> ATCC 204305	>10	>10	10	>10	10	>10	5	>10	1000	1000
<i>A. niger</i> ATCC 16404	10	>10	5	10	0,625	5	0,625	5	1000	1000

МИК-минимална инхибиторна концентрација ($\mu\text{g/mL}$); ММК-минимална микробицидна концентрација ($\mu\text{g/mL}$), нг-није тестирано. Позитивна контроле је флуконазол.

4.5. Антибиофилм активност екстракта ивањског цвећа

Испитивање *in vitro* антибиофилм активности спроведно је на 2 врсте бактерија и резултати су приказани у Табели 13. Водени екстракт је испољио снажнији ефекат од метанолног и ацетонског екстракта на инхибицију формирања биофилма *B. subtilis* ATCC 6633 и *P. mirabilis* ATCC 12453. Наиме није уочена значајна активност метанолног и ацетонског екстракта у тестираним концентрацијама. Ефикасност воденог екстракта у формирању биофилма *B. subtilis* ATCC 6633 и *P. mirabilis* ATCC 12453 уочена је при концентрацији од 5 mg/mL. Додатно водени екстракт је испољио активност према формираном биофилму *P. mirabilis* ATCC 12453 при концентрацији од 5,47 mg/mL.

Табела 13. Антибиофилм активност екстракта ивањског цвећа.

Тип екстракта	Формирање биофилма			Формирани биофилм			
	Водени	Метанолни	Ацетонски	Водени	Метанолни	Ацетонски	Тетрациклин
Врста микроорганизма	БИК₅₀						
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	5	> 10	> 10	> 10	>10	> 10	<15,6
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	5	> 10	> 10	5,47	> 10	> 10	156

*БИК–минимална биофилм инхибиторна концентрација при којој је дошло до 50% инхибиције- за биљне екстракте изражена је у mg/mL, док је за антибиотик у µg/mL.

4.6. Антиинфламацијска активност екстракта ивањског цвећа

Метанолни екстракт ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg и 250 mg/kg испољио је значајну ($p < 0,05-0,01$) инхибицију едема шапе пацова након 1., 2., 3. и 4. сата од апликације карагенина у односу на контролну групу. Додатно, најнижа доза довела је до значајне инхибиције едема шапе након 2., 3. и 4. сата од примене карагенина. Међутим индометацин је изазвао процентуално веће снижење едема шапе у односу на све третиране и контролну групу у 2., 3. и 4. сату.

Табела 14. Утицај екстраката ивањског цвећа на смањење дебљине шапе пацова.

Групе	Повећање дебљине шапе пацова (mm) (% инхибиције)			
	1h	2h	3h	4h
50 GVE	0,84 ± 0,01 (6,7)	1,56 ± 0,13* (17,02)	2,18 ± 0,23* (11,38)	1,56 ± 1,13** (25,71)
100 GVE	0,75 ± 0,04* (16,6)	1,22 ± 0,3** (35,1)	1,78 ± 0,12** (27,64)	1,56 ± 0,2** (26,62)
200 GVE	0,4 ± 0,03* (33,3)	1,1** ± 0,4 (41,49)	1,67 ± 0,2** (32,25)	1,4 ± 0,3** (33,3)
Индометацин	0,79 ± 0,01 (12,2)	1,01 ± 0,12** (46,81)	1,16 ± 0,04** (52,77)	0,9 ± 1,3** (57,14)
Контрола	0,9 ± 0,02	1,88 ± 0,11	2,46 ± 0,23	2,1 ± 0,17

Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација (X ± SD); *статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на контролну групу; **статистички значајна разлика на нивоу p<0,01 у односу на контролну групу.

4.7. Ефекти екстраката ивањског цвећа на морфометријске карактеристике пацова

4.7.1. Ефекти екстраката ивањског цвећа на телесну масу животиња

На почетку експерименталног протокола све здраве животиње укључене у студију биле су телесне масе 210 ± 40 g, док су спонтано-хипертензивне животиње тежиле 150 ± 30 g. Након четворонедељног третмана екстрактима ивањског цвећа уочен је пораст телесне масе у односу на први дан експерименталног периода код свих животиња. Поредили смо телесну масу здравих нетретираних животиња са спонтано хипертензивним нетретираним, као и здраве и спонтано хипертензивне пацове који су примали исту дозу екстракта (CTRL vs SHR, 500 GVE vs SHR + 500 GVE, 250 GVE vs SHR + 250 GVE и 125 vs SHR + 125 GVE). Уочили смо да је телесна маса здравих животиња била значајно виша у односу на спонтано хипертензивне животиње у свим групама. Међутим након 28 дана терапијског протокола нису забележене статистички значајне разлике у вредностима телесне масе између здравих нетретираних и здравих пацова на третману екстрактима ивањског цвећа. Такође конзумација екстраката ивањског цвећа није значајно утицала на промену телесне масе, ни у смислу њеног прираста нити губитка код SHR пацова.

4.7.2. Ефекти екстракта ивањског цвећа на масу срца, јетре и бубрега животиња

Непосредно након жртвовања животиња изоловани су бубрег, јетра и срце. Апсолутна маса бубрега и јетре измерена је након жртвовања, док је маса срца измерена након завршетка протокола исхемије и реперфузије на *Langendorff* апарату. Израчуната је и релативна маса органа која представља однос апсолутне масе органа (mg) и телесне масе животиње (g). За статистичку анализу ефеката екстракта ивањског цвећа на морфометријске карактеристике користили смо вредности релативне масе. Поредили смо релативну масу срца, бубрега и јетре здравих нетретираних животиња са спонтано хипертензивним нетретираним, као и релативну масу здравих и спонтано хипертензивних пацова који су примали исту дозу екстракта. Резултати указују да је релативна маса срца већа код свих група SHR у односу на здраве пацове, а значајни скок је уочен у SHR + 250 GVE групи у односу на SHR + 125 GVE групу.

Када је реч о релативној маси бубрега она је била виша код SHR и SHR + 500 GVE у односу на CTRL и 500 GVE. Релативна маса јетре је била нижа у SHR у односу на CTRL и виша у SHR + 250 GVE у односу на 250 GVE. У групи 250 GVE уочено је снижење у односу на CTRL, док у групи хипертензивних није било статистички значајних разлика између група.

Табела 15. Ефекти екстракта ивањског цвећа на телесну масу пацова и апсолутне масе срца, бубрега и јетре.

	TM (g)	MC (g)	MB(g)	MJ (g)
CTRL	319,83 ± 21,23	1,13 ± 0,04	0,9 ± 0,09	13,2 ± 0,15
125 GVE	340,23 ± 15,6	1,22 ± 0,07	1,02 ± 0,23	12,9 ± 2,1
250 GVE	356 ± 19,6	1,21 ± 0,5	1,01 ± 0,76	11,64 ± 0,87
500 GVE	336,75 ± 37,78	1,25 ± 0,1	0,91 ± 0,1	13,05 ± 0,2
SHR	210 ± 15*	0,94 ± 0,08	0,65 ± 0,09	6,890 ± 0,9
SHR+125 GVE	215,2 ± 10 ^α	1,02 ± 0,04	0,63 ± 0,02	7,78 ± 0,012
SHR+250 GVE	203,2 ± 15,3 ^β	1,05 ± 0,07	0,62 ± 0,04	8,08 ± 0,02
SHR+500 GVE	205,6 ± 14,9 ^γ	1,01 ± 0,01	0,61 ± 0,03	7,36 ± 0,87

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X±SD). *Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на CTRL групу; ^αзначајност на нивоу p<0,05 у односу на 125 GVE групу; ^βзначајност на нивоу p<0,05 у односу на 250 GVE групу; ^γразлика на нивоу p<0,05 у односу на 500 GVE групу; TM- телесна маса; MC- маса срца; MB- маса бубрега; MJ- маса јетре.

Табела 16. Ефекти екстракта ивањског цвећа на релативну масу срца, бубрега и јетре.

	МС/ТМ	МБ/ТМ	МЈ/ТМ
CTRL	353,31	281,4	4127,19
125 GVE	358,58	299,80	3791,55
250 GVE	339,89	283,71	3269,66*
500 GVE	371,20	270,23	3875,28
SHR	447,62*	309,52*	3280,95*
SHR+125 GVE	473,98 ^α	292,75	3534,76
SHR+250 GVE	516,73 ^{βγ}	305,13	3976,38 ^β
SHR+500 GVE	491,25 ^γ	296,69 ^α	3579,77

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X±SD). *Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на CTRL групу; ^αСтатистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на 125 GVE групу; ^βСтатистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на 250 GVE групу; ^γСтатистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на 500 GVE групу; ^δСтатистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на SHR+125 GVE групу; МС/ТМ – однос масе срца и телесне масе; МБ/ТМ – однос масе срца бубрега и телесне масе; МЈ/ТМ – однос масе јетре и телесне масе.

4.8. Ефекти екстракта ивањског цвећа на маркере оксидационог стреса у крви пацова

4.8.1. Ефекти екстракта ивањског цвећа на системски редокс статус здравих пацова

4.8.1.1. Ефекти екстракта ивањског цвећа на прооксидационе параметре мерене у крви здравих пацова

Вредности прооксидационих параметара TBARS, NO₂⁻, O₂⁻ и H₂O₂ мерених у плазми пацова на третману екстрактима у дози од 500 mg/kg, 250 mg/kg и 125 mg/kg као и нетретираних пацова приказане су табеларно и графички (Табела 17, График 1). Вредности параметара су изражене као средња вредност ± стандардна девијација (X±SD) са статистички значајном разликом за вредност p<0,05.

Сви испитивани прооксидациони маркери били су статистички значајно нижи у групи која је била на третману највишом дозом, док је примена екстракта у дози од 250 mg/kg смањила концентрације O₂, H₂O₂ и TBARS у односу на контролне услове.

Најнижа доза екстракта довела је до смањења концентрације O_2^- и H_2O_2 у поређењу са вредностима у групи нетретираних пацова. Такође ниже вредности O_2^- , H_2O_2 и TBARS биле су забележене након третмана екстрактом у дози од 500 mg/kg у односу на 125 mg/kg, док је концентрација H_2O_2 била нижа у групи на третману највишом у односу на средњу дозу екстракта. Није било разлика у вредностима наведених параметара у групи која је користила средње и најниже дозе.

Табела 17. Ефекти примене екстракта ивањског цвећа на прооксидационе параметре (TBARS, NO_2^- , O_2^- и H_2O_2) у плазми здравих пацова.

	TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO_2^- (nmol/ml)	O_2^- (nmol/ml)	H_2O_2 (nmol/ml)
CTRL	0,98 \pm 0,09	2,8 \pm 0,1	1,36 \pm 0,22	3,2 \pm 0,32
125 GVE	0,68 \pm 0,05	2,56 \pm 0,31	1,17 \pm 0,1	2,59 \pm 0,13
250 GVE	0,51 \pm 0,08	2,42 \pm 0,11	1,16 \pm 0,16	2,54 \pm 0,25
500 GVE	0,38 \pm 0,03	2,39 \pm 0,12	1,1 \pm 0,15	2,36 \pm 0,23

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

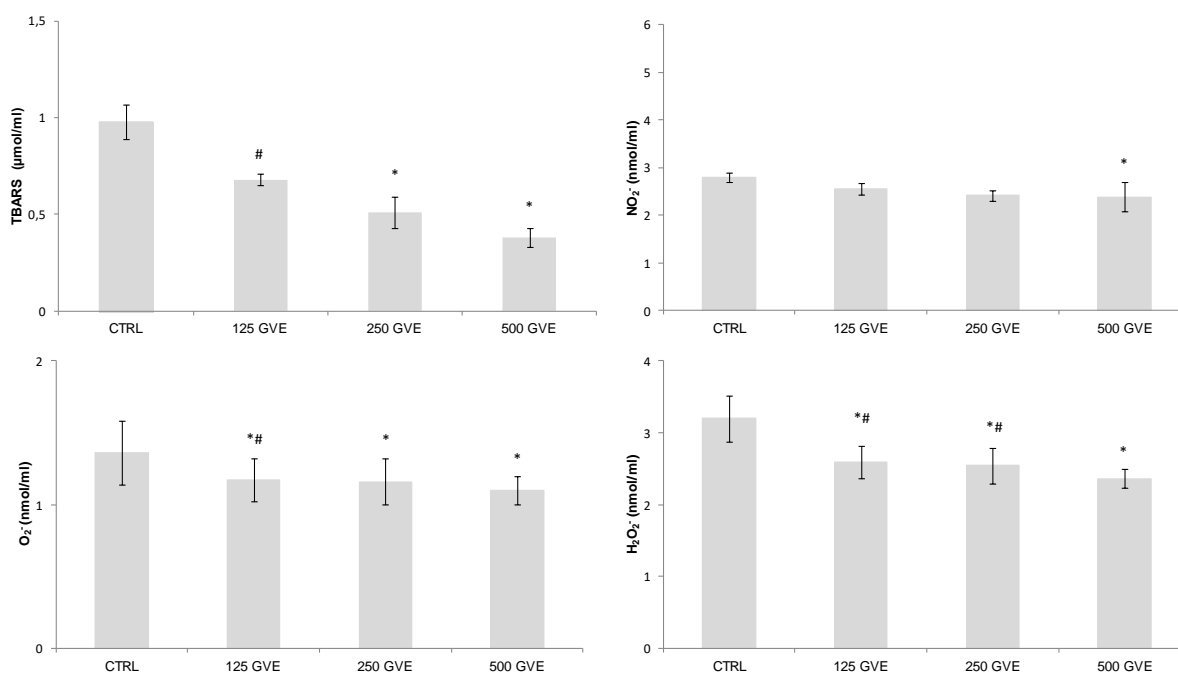


График 1. Прооксидациони параметри (TBARS, NO_2^- , O_2^- и H_2O_2) мерени у плазми здравих пацова на третману екстрактима у дози од 500 mg/kg, 250 mg/kg и 125 mg/kg као и нетретираних здравих пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). *Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на CTRL групу; #Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на 500 GVE.

4.8.1.2. Ефекти екстраката ивањског цвећа на антиоксидационе параметре мерене у крви здравих пацова

Вредности антиоксидационих параметара SOD, CAT и GSH мерених у лизату еритроцита здравих пацова на третману екстрактима у дози од 500 mg/kg, 250 mg/kg и 125 mg/kg, као и нетретираних пацова приказане су табеларно и графички (Табела 18, График 2). Вредности параметара су изражене као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$) са статистички значајном разликом за вредност $p < 0,05$.

Активност SOD је била значајно повишена у групи која је била на третману екстрактом у дози од 500 mg/kg и 250 mg/kg у односу на нетретиране животиње. Значајно нижа активност овог ензима забележена је у групи која је користила најнижу дозу (125 GVE) у односу на средњу дозу (250 GVE). Сличне вредности CAT и GSH биле су присутне у свим групама здравих животиња.

Табела 18. Ефекти примене екстраката ивањског цвећа на антиоксидационе параметре (SOD, CAT и GSH) мерене у лизату еритроцита здравих пацова.

	SOD (U/g Hb x 10 ³)	CAT (U/g Hb x 10 ³)	GSH (nmol/ml RBC)
CTRL	16,5 ± 2,8	7,6 ± 0,5	89560 ± 4500
125 GVE	19,8 ± 3,1	8,9 ± 0,6	92748 ± 2110
250 GVE	22,3 ± 2,5	8,7 ± 0,5	93045 ± 2500
500 GVE	25,8 ± 1,6	8,4 ± 0,9	92005 ± 5200

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$).

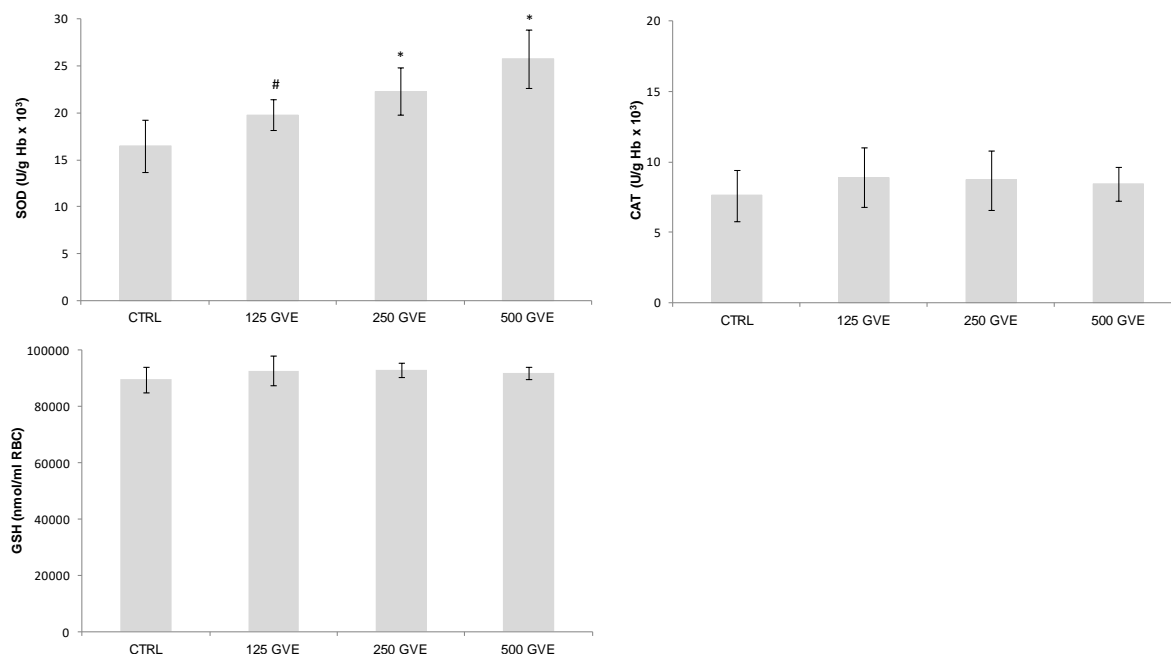


График 2. Антиоксидациони параметри (SOD, CAT и GSH) мерени у лизату еритроцита здравих пацова на третману екстрактима у дози од 500 mg/kg, 250 mg/kg и 125 mg/kg, као и нетретираних здравих пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). *Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на CTRL групу; [#]Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку 500 GVE групу.

4.8.2. Ефекти екстракта ивањског цвећа на системски редокс статус спонтано хипертензивних пацова

4.8.2.1. Ефекти екстракта ивањског цвећа на прооксидационе параметре мерене у крви спонтано хипертензивних пацова

Вредности прооксидационих параметара TBARS, NO_2^- , O_2^- и H_2O_2 мерених у плазми спонтано хипертензивних пацова на третману екстрактима у дози од 500 mg/kg, 250 mg/kg и 125 mg/kg као и нетретираних спонтано хипертензивних пацова приказане су табеларно и графички (Табела 19, График 3). Вредности параметара су изражене као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$) са статистички значајном разликом за вредност $p < 0,05$.

Примена екстракта у дози од 500 и 250 mg/kg довела је до снижења свих биомаркера оксидационог стреса, док је доза од 125 mg/kg довела до пада у концентрацијама H_2O_2 и TBARS у односу на нетретиране спонтано хипертензивне

животиње. Вредности O_2^- и H_2O_2 су биле значајно ниже у групи на третману највишом у односу на најнижу дозу.

Табела 19. Ефекти примене екстраката ивањског цвећа на прооксидационе параметре (TBARS, NO_2^- , O_2^- и H_2O_2 , и) у плазми спонтано хипертензивних пацова.

	TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO_2^- (nmol/ml)	O_2^- (nmol/ml)	H_2O_2 (nmol/ml)
SHR	1,69 ± 0,05	4,15 ± 0,01	3,8 ± 0,42	4,56 ± 0,15
SHR + 125 GVE	1,25 ± 0,08	4,09 ± 0,1	3,31 ± 0,54	4,1 ± 0,31
SHR + 250 GVE	1,22 ± 0,07	3,75 ± 0,12	3,23 ± 0,62	3,97 ± 0,19
SHR + 500 GVE	1,13 ± 0,06	3,77 ± 0,3	3,12 ± 0,31	3,68 ± 0,17

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$).

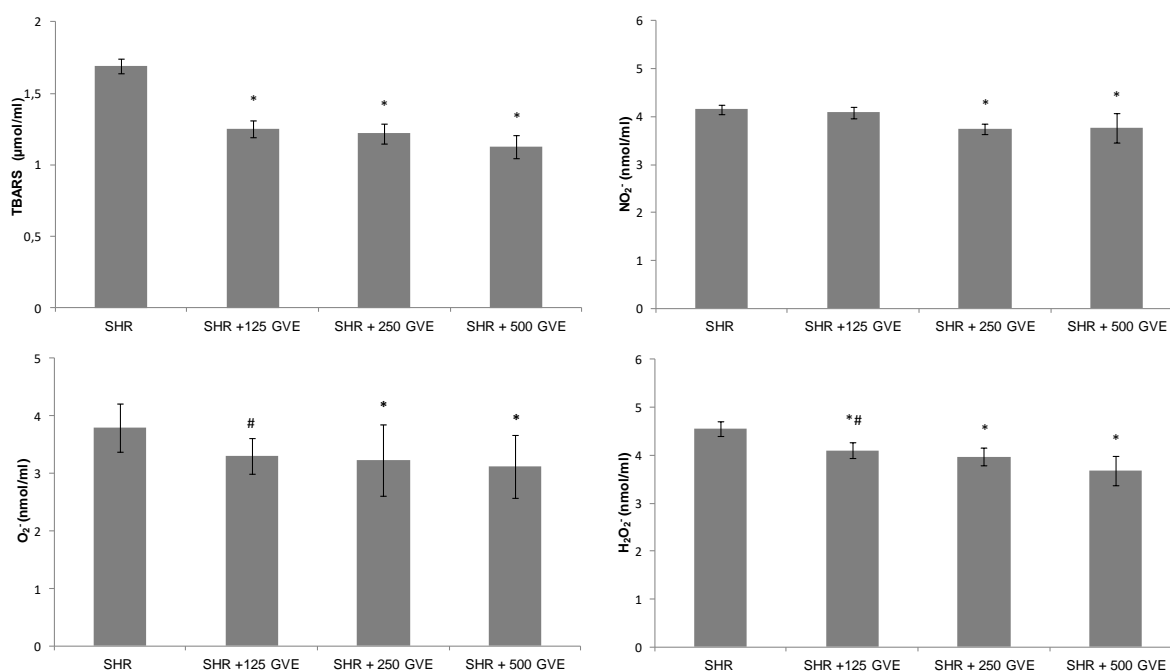


График 3. Прооксидациони параметри (TBARS, NO_2^- , O_2^- и H_2O_2 ,) мерени у плазми спонтано хипертензивних пацова на третману екстрактима у дози од 500 mg/kg, 250 mg/kg и 125 mg/kg, као и нетретираних спонтано-хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). *Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на SHR групу; #Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на SHR+500 GVE.

4.8.2.2. Ефекти екстракта ивањског цвећа на антиоксидационе параметре мерене у крви спонтано хипертензивних пацова

Вредности антиоксидационих параметара SOD, CAT и GSH мерених у лизату еритроцита спонтано хипертензивних пацова на третману екстрактима у дози од 500 mg/kg, 250 mg/kg и 125 mg/kg, као и нетретираних хипертензивних пацова приказане су табеларно и графички (Табела 20, График 4). Вредности параметара су изражене као средња вредност + стандардна девијација ($X \pm SD$) са статистички значајном разликом за вредност $p < 0,05$.

Активност SOD је била значајно повишена у групи која је била на третману екстрактом у дози од 500 mg/kg и 250 mg/kg у односу на нетретиране животиње. Значајно нижа активност овог ензима забележена је у групи која је користила најнижу дозу (125 GVE) у односу на средњу дозу (250 GVE). Сличне вредности CAT и GSH биле су присутне у свим групама здравих животиња.

Табела 20. Ефекти примене екстракта ивањског цвећа на антиоксидационе параметре (SOD, CAT и GSH) мерене у лизату еритроцита спонтано хипертензивних пацова.

	SOD (U/g Hb x 10 ³)	CAT (U/g Hb x 10 ³)	GSH (nmol/ml RBC)
SHR	9,8 ± 1,8	4,3 ± 0,4	78954 ± 1592
SHR + 500 GVE	12,3 ± 2,1	5,1 ± 0,7	76523 ± 2132
SHR + 250 GVE	11,2 ± 2,6	4,9 ± 0,6	79800 ± 2593
SHR + 125 GVE	10,6 ± 1,2	4,87 ± 0,8	82002 ± 5645

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$).

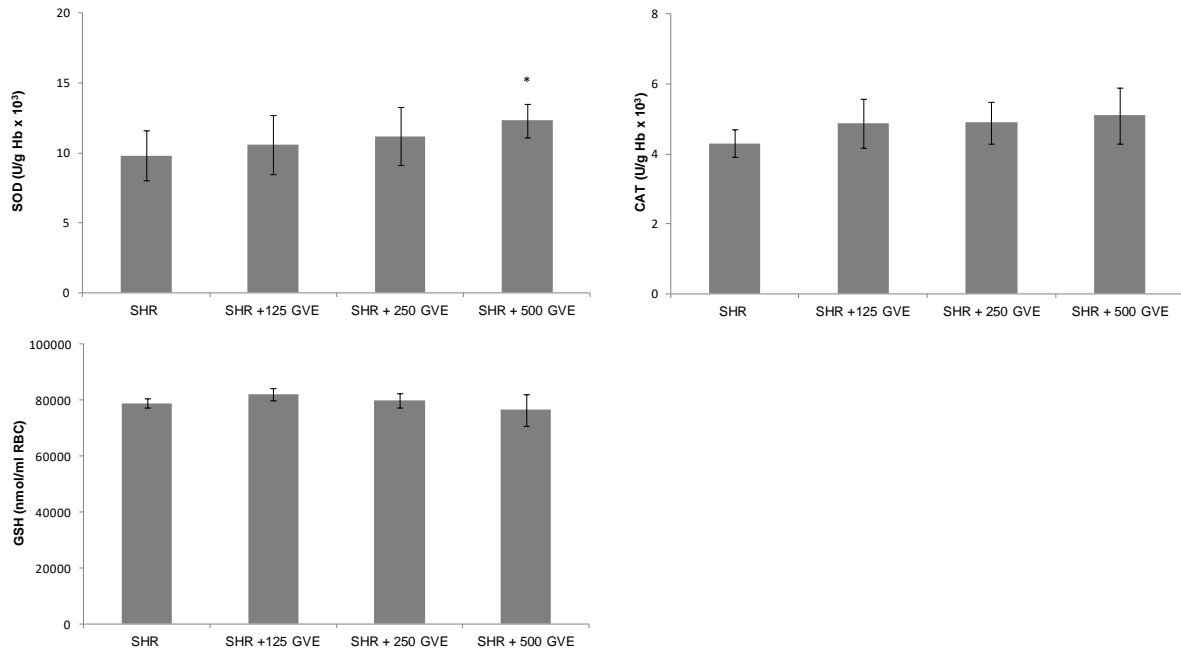


График 4. Антиоксидациони параметри (SOD, CAT и GSH) мерени у лизату еритроцита спонтано хипертензивних пацова на третману екстрактима у дози од 500 mg/kg, 250 mg/kg и 125 mg/kg као и нетретираних здравих пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X±SD). *Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на SHR групу; #Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку SHR+500 GVE групу.

4.8.3. Разлике у утицају екстракта ивањског цвећа на системски редокс статус здравих и спонтано хипертензивних животиња

Разлике у прооксидационим параметрима између нетретираних здравих и спонтано хипертензивних пацова приказане су на Графику 5. Сви мерени параметри били су значајно виши у групи SHR у односу на CTRL.

Разлике у антиоксидационим параметрима између нетретираних здравих и спонтано хипертензивних пацова приказане су на Графику 6. Сви мерени параметри били су значајно нижи у групи SHR у односу на CTRL.

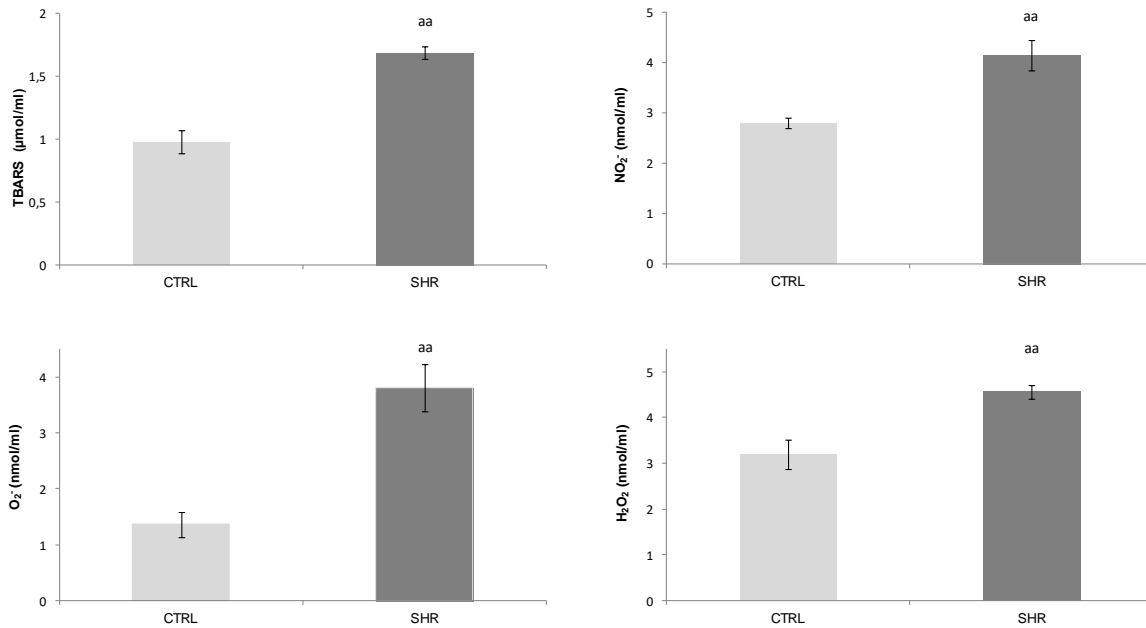


График 5. Ефекти екстракта ивањског цвећа на прооксидационе маркере у плазми здравих и спонтано хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). ^aСтатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на CTRL групу; ^{aa}Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ у односу на CTRL групу.

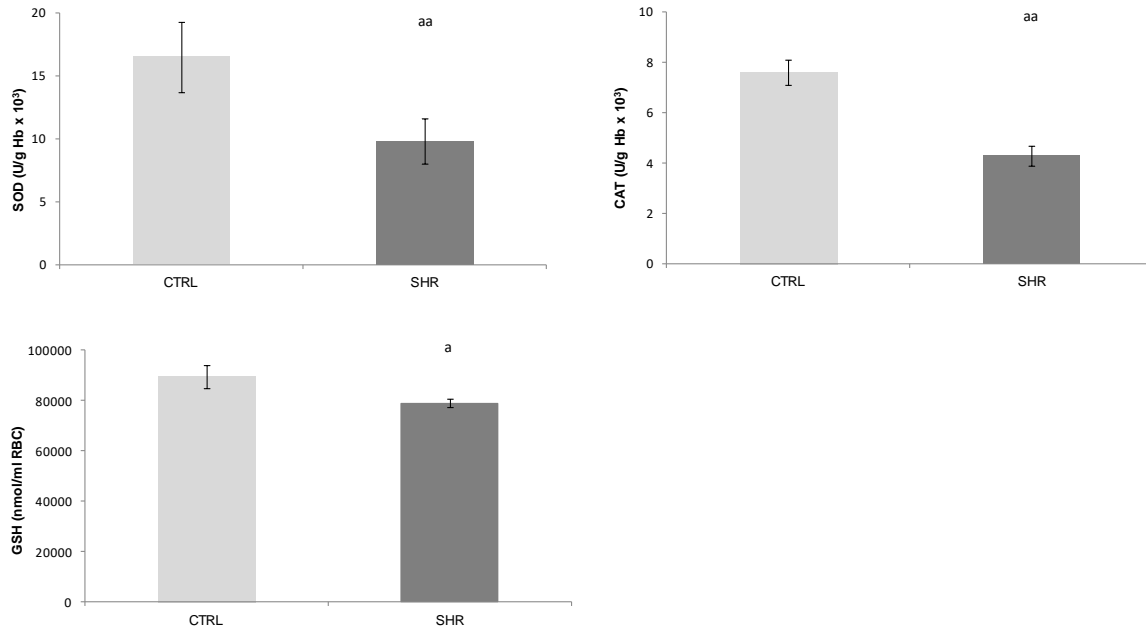


График 6. Ефекти екстракта ивањског цвећа на антиоксидационе маркере мерене у лизату еритроцита здравих и спонтано хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). ^aСтатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на CTRL групу; ^{aa}Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ у односу на CTRL групу.

Разлике у ефектима екстракта ивањског цвећа на прооксидационе и антиоксидационе параметре код здравих и спонтано хипертензивних пацова приказане су на Графицима 7 и 8. Вредности параметара су изражене као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$) са статистички значајном разликом за вредност $p < 0,05$.

Поређење је извршено између здравих и хипертензивних нетретираних пацова, као и између здравих и хипертензивних пацова који су користили исту дозу екстракта. Уочено је да су вредности свих маркера оксидационог стреса значајно више код спонтано хипертензивних пацова након примене свих доза екстракта (График 7). С друге стране, вредности антиоксидационих параметара биле значајно више код здравих пацова у свим групама у односу на одговарајуће хипертензивне групе. Једино није било разлике у нивоу GSH између здравих и хипертензивних пацова на третману екстрактом у дози од 250 mg/kg (График 8).

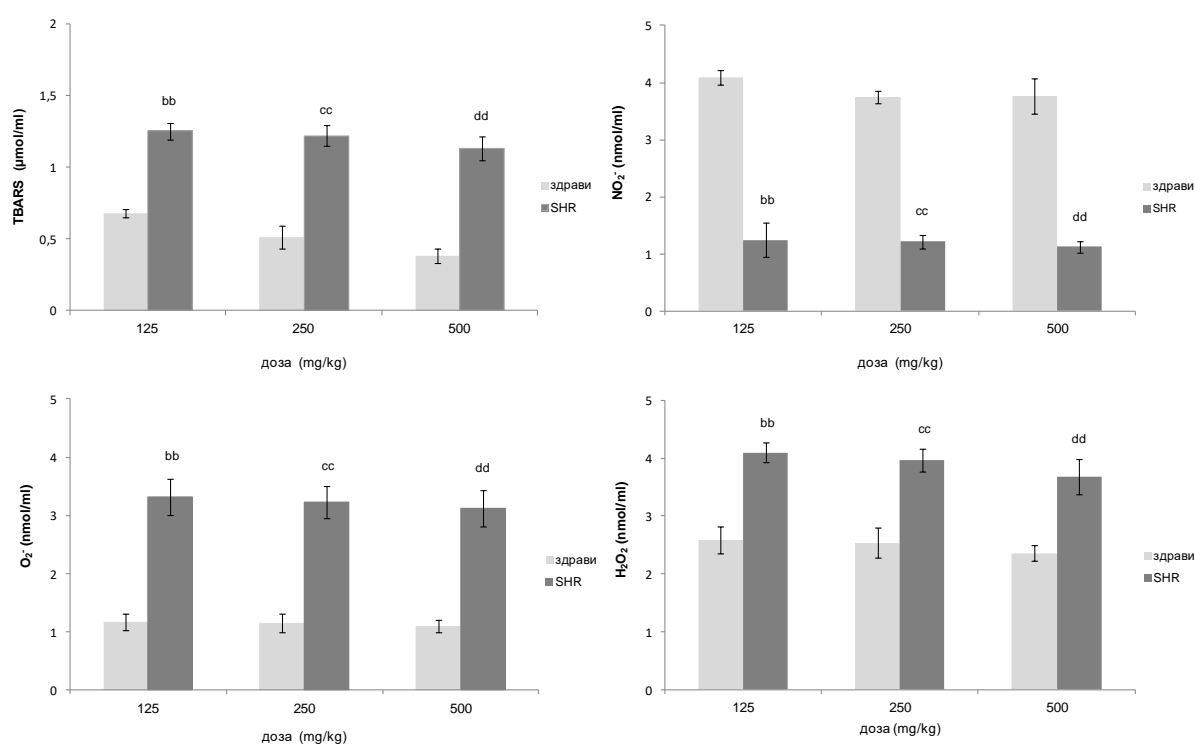


График 7. Поређење ефеката различитих доза екстракта ивањског цвећа на прооксидационе параметре здравих и спонтано хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). ^{bb}Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ у односу на 125 GVE групу; ^{cc}Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ у односу на 250 GVE групу; ^{dd}Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ у односу на 500 GVE групу.

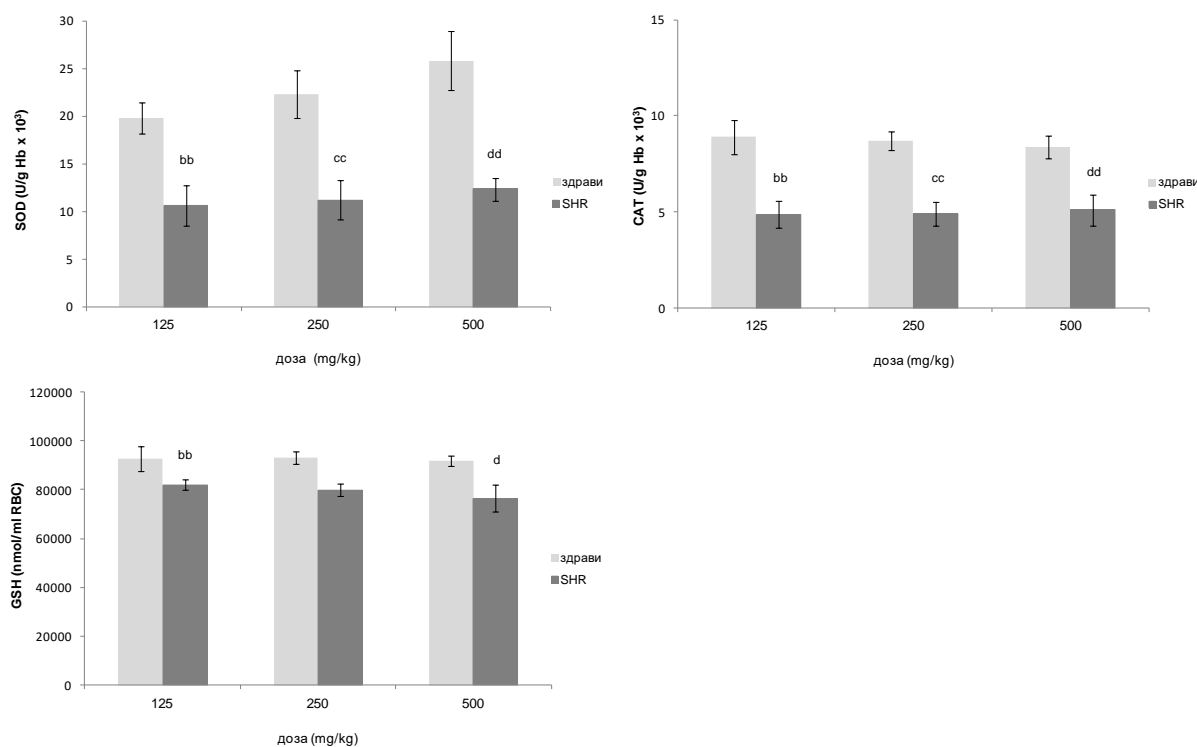


График 8. Поређење ефеката различитих доза екстракта ивањског цвећа на антиоксидационе параметре здравих и спонтано хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). ^{bb}Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ у односу на 125 GVE групу; ^{cc}Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ у односу на 250 GVE групу; ^{dd}Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ у односу на 500 GVE групу.

4.9. Ефекти екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Вредности $dp/dt \max$, $dp/dt \min$, SLVP, DLVP, HR и CF бележене су у: тренутку стабилизације (C), у првом минуту реперфузије након исхемије (P1) и на сваких пет минута током тридесетоминутне реперфузије (P2-P7). Међутим за статистичку анализу података узимане су у обзир три тачке од интереса: вредности у моменту стабилизације (C), након првог (P1) и последњег минута реперфузије (P7).

4.9.1. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока изолованог срца нетретираних пацова

Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока нетретираних здравих и спонтано хипертензивних животиња након двадесетоминутне исхемије која је

праћена тридесетоминутном реперфузијом приказане су табеларно и графички (Табела 21, График 9).

У групи здравих пацова (CTRL) дошло је до значајног повећања $dp/dt \max$ у првој тачки реперфузије у односу на период стабилизације и последњи минут реперфузије. Значајан пад у $dp/dt \max$ као и апсолутној вредности $dp/dt \min$ забележен је у тачки P7 у односу на вредност пре исхемије. Додатно, након тридесетоминутне реперфузије вредност SLVP била је нижа у односу на тачку C, док се DLVP није значајно мењао унутар групе у посматраним тачкама од интереса. Изражено смањење срчане фреквенце као и вредности коронарног протока уочено је на крају реперфузионог периода у односу на вредности пре исхемије.

Код спонтано хипертензивних нетретираних пацова уочен је статистички значајан скок у вредности $dp/dt \max$ у првом минуту реперфузије у односу на период стабилизације и крајњи минут реперфузије. Такође забележено је смањење вредности овог параметра на крају реперфузије у односу на стабилизацију. Дошло је до статистички значајног пада у апсолутној вредности $dp/dt \min$ на крају реперфузије у односу на први минут реперфузије и стабилизациони период. Додатно откривено је значајно смањење систолног притиска на крају реперфузије у односу на први минут повратка протока и период стабилизације. Такође ниже вредности срчане фреквенце и коронарног протока забележене су после тридесетоминутне реперфузије у односу на вредности пре исхемије.

Значајно ниже вредности $dp/dt \max$ у тренутку C и P1 и више апсолутне вредности $dp/dt \min$ у P1 уочене су код спонтано хипертензивних у односу на здраве пацове. Систолни притисак у тренутку P1 и дијастолни у P1 и P7 били су нижи у SHR у односу на CTRL групу. Срчана фреквенца је бележила ниже вредности код SHR животиња у свим тачкама од интереса, док се коронарни проток није значајно разликовао.

Табела 21. Кардиодинамски параметри код нетретираних здравих и спонтано хипертензивних пацова.

		<i>dp/dt max(mmHg)</i>	<i>dp/dt min(mmHg)</i>	<i>SLVP(mmHg)</i>
<i>CTRL</i>	<i>C</i>	1603,8 ± 240,16	-1101,85 ± 100,32	53,42 ± 8,77
	<i>P1</i>	1815,8 ± 307,23*	-1045,23 ± 73,4	58,9 ± 7,65
	<i>P7</i>	1300,7 ± 120,47*#	-904,07 ± 35,2*	45,6 ± 7,22*
<i>SHR</i>	<i>C</i>	1303,8 ± 235,2	-1145,85 ± 90,32	49,6 ± 4,6
	<i>P1</i>	1415,8 ± 123,5*	-1245,25 ± 73,26	53,6 ± 7,9
	<i>P7</i>	1223,2 ± 118,54*#	-970,1 ± 84,4*#	39,3 ± 6,2*#
		<i>DLVP(mmHg)</i>	<i>HR(bpm)</i>	<i>CF(mL/min)</i>
<i>CTRL</i>	<i>C</i>	1,1 ± 0,19	275,4 ± 26,68	7,3 ± 0,52
	<i>P1</i>	1,2 ± 0,13	305,07 ± 43,39	7,65 ± 0,31
	<i>P7</i>	1,1 ± 0,17	217,1 ± 21,2*	5,3 ± 0,66
<i>SHR</i>	<i>C</i>	1,01 ± 0,16	230,5 ± 25,2	7,5 ± 0,5
	<i>P1</i>	1,1 ± 0,13	220,5 ± 31,2	7,2 ± 0,31
	<i>P7</i>	0,93 ± 0,06	180,2 ± 19,2*#	6,41 ± 0,66*

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X±SD).
 С - стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - последњи минут реперфузије;
 *Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку С у групи;
 #Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку P1 у групи.

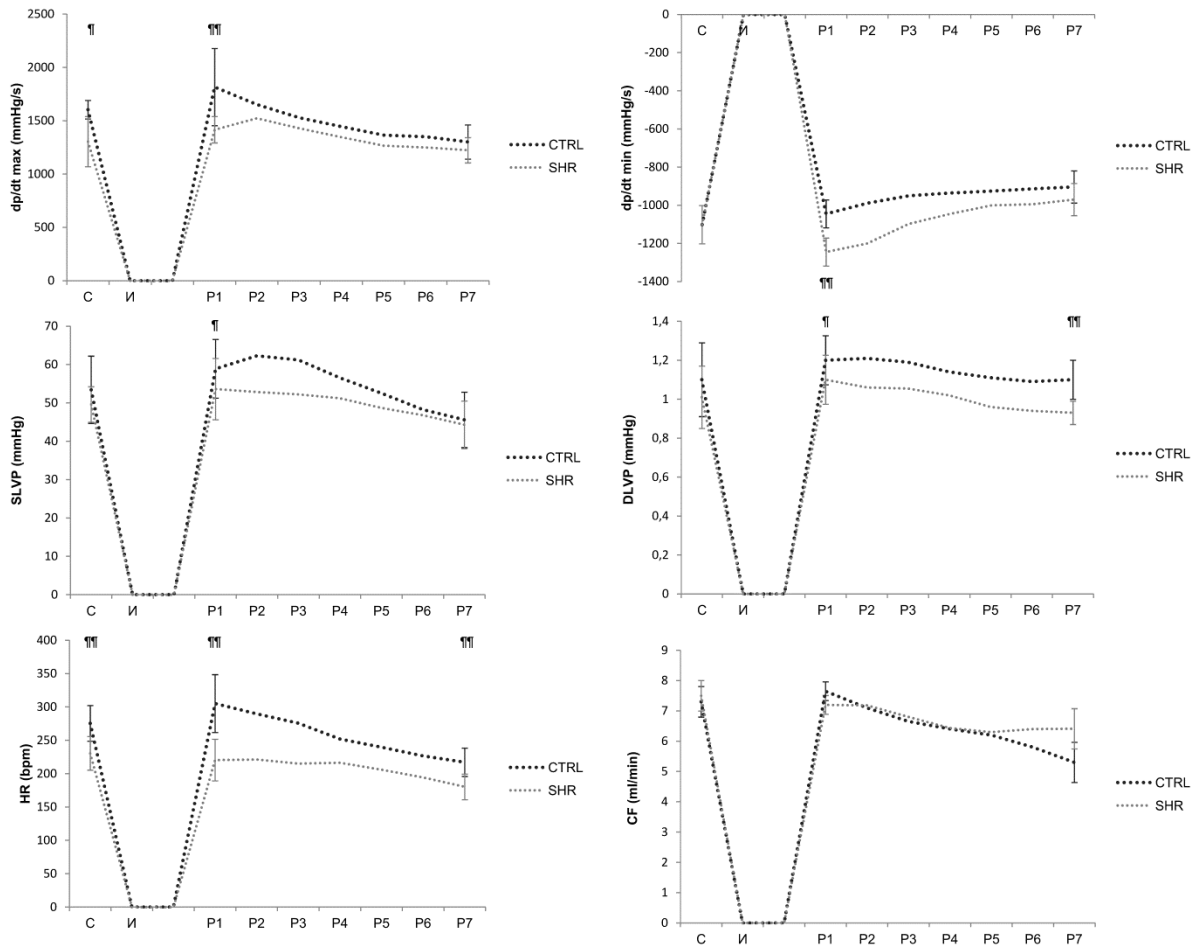


График 9. Кардиодинамски параметри и коронари проток нетретираних здравих (CTRL) и спонтано хипертензивних (SHR) пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). C - стабилизација; И - исхемија; P1-P7 - вредности бележене на сваких пет минута током тридесетоминутне реперфузије. ¶ статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у тренутку од интереса између група; ¶¶ статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ у тренутку од интереса између група.

4.9.2. Ефекти екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток здравих пацова

4.9.2.1. Ефекти 125 mg/kg екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток здравих пацова

Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока приказане су табеларно и графички (Табела 22, График 10). Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене параметара функције срца у групи животиња које су претходно биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg (125 GVE). Такође приказане су статистички значајне разлике у наведеним параметрима под утицајем 125 mg/kg екстракта у односу на контролне услове (CTRL група).

У групи изложеној четворонедељној примени екстракта ивањског цвећа у првом минуту реперфузије евидентиран је статистички значајан пораст у вредности $dp/dt \max$ у односу на контролу и последњи минут реперфузије. Додатно, на крају реперфузије уочава се значајан пад $dp/dt \max$ у односу на период стабилизације. Веће вредности коронарног протока забележене су у првом минуту реперфузије у односу на период пре исхемије и крај реперфузије. Међутим није било значајних промена у вредностима остаих испитиваних параметара, већ су оне биле константне током посматраног периода.

Статистички значајне разлике у вредностима $dp/dt \max$, $dp/dt \min$, HR и CF уочене су између нетретираних пацова и пацова који су били изложени третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg. Наиме након тридесетоминутне реперфузије вредности $dp/dt \max$ у групи која је користила екстракт биле су значајно више. Веће апсолутне вредности $dp/dt \min$ у првом и последњем минуту реперфузије биле су уочене у третираној групи у односу на нетретиране. На почетку реперфузије повећање срчане фреквенце евидентирано је у нетретираној групи, да би на крају реперфузије виша вредност овог параметра била уочена у третираној групи. Такође по завршетку реперфузије откривене су веће вредности коронарног протока у групи изложеној екстракту.

Табела 22. Ефекти третмана екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца здравих пацова.

		<i>dp/dt max(mmHg)</i>	<i>dp/dt min(mmHg)</i>	<i>SLVP(mmHg)</i>
CTRL	C	1603,8 ± 240,16	-1101,85 ± 100,32	53,42 ± 8,77
	P1	1815,8 ± 307,23*	-1045,23 ± 73,4	58,9 ± 7,65
	P7	1300,7 ± 120,47 [#]	-904,07 ± 35,2*	45,6 ± 7,22*
125 GVE	C	1650,3 ± 402,14	-1098,73 ± 352,19	49,28 ± 11,8
	P1	1852,3 ± 495,6*	- 1123,5 ± 162,7 [¶]	52,8 ± 5,5
	P7	1506,17 ± 235,09* ^{#¶}	-1043,2 ± 329,7 [¶]	47,2 ± 8,1
		<i>DLVP(mmHg)</i>	<i>HR(bpm)</i>	<i>CF(mL/min)</i>
CTRL	C	1,1 ± 0,19	275,4 ± 26,68	7,3 ± 0,52
	P1	1,2 ± 0,13	305,07 ± 43,39	7,65 ± 0,31
	P7	1,1 ± 0,17	217,1 ± 21,2*	5,3 ± 0,66
125 GVE	C	1,1 ± 0,002	271,3 ± 32,8	7,2 ± 0,06
	P1	1,15 ± 0,004	274,2 ± 45,5 [¶]	8,2 ± 0,012*
	P7	0,96 ± 0,006	261,2 ± 31,2 [¶]	7,1 ± 0,66 ^{#¶}

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X ± SD). C – стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - последњи минут реперфузије; *Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку C у групи; #Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку P1 у групи; ¶Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на нетретирани животиње у истом тренутку од интереса.

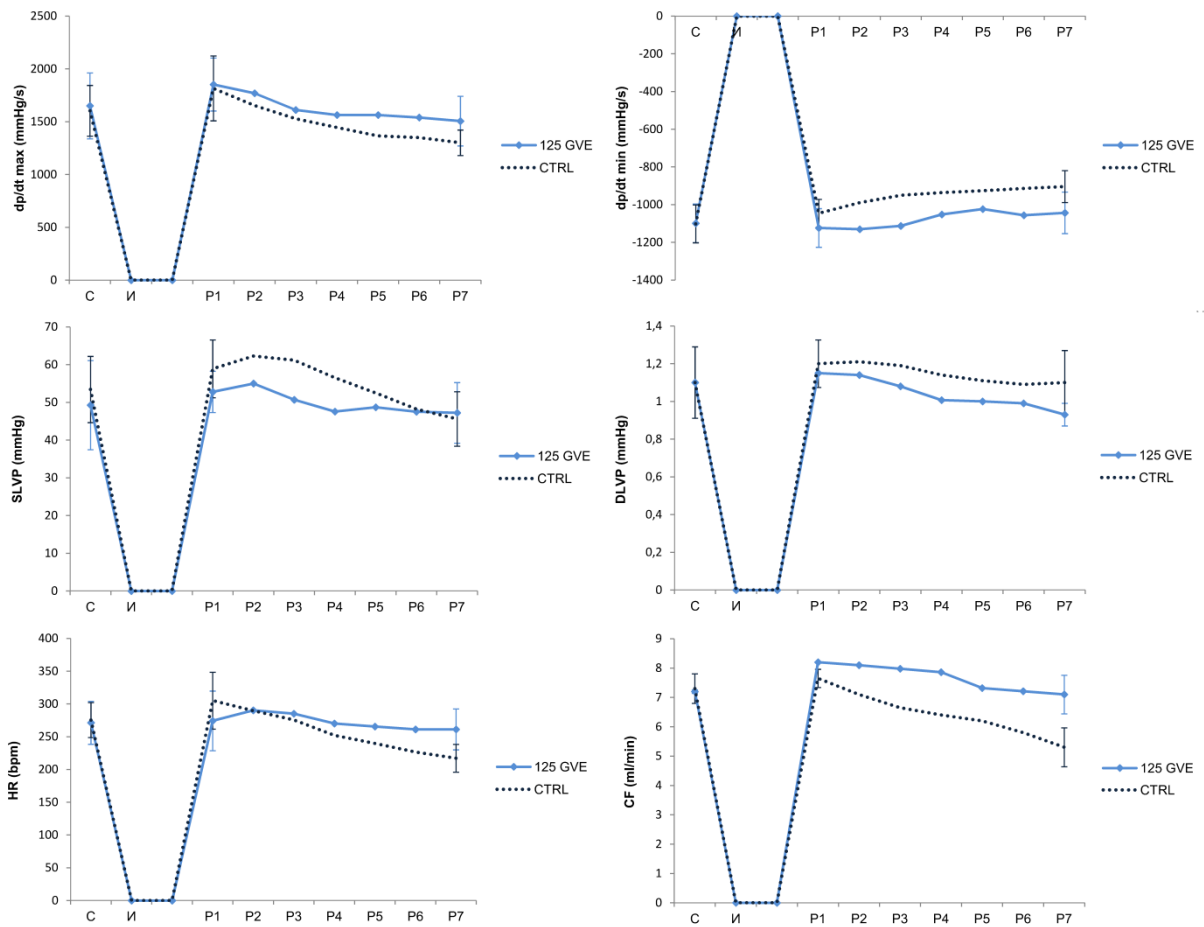


График 10. Кардиодинамски параметри и коронарни проток здравих пацова који су били на третману екстрактом у дози од 125 mg/kg и нетретираних здравих пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). С - стабилизација; И - исхемија; P1-P7 - вредности бележене на сваких пет минута током тридесет минута реперфузије.

4.9.2.2. Ефекти 250 mg/kg екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток здравих пацова

Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока приказане су табеларно и графички (Табела 23, График 11). Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене параметара функције срца у групи животиња које су претходно биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 250 mg/kg (250 GVE). Такође приказане су статистички значајне разлике у наведеним параметрима под утицајем 250 mg/kg екстракта у односу на контролне услове (CTRL група).

У групи која је била подвргнута третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 250 mg/kg уочен је пораст вредности $dp/dt \max$ у првом минуту реперфузије у односу на вредност пре исхемије. Након тридесетоминутне реперфузије вредности $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ биле су сличне вредностима забележеним у периоду стабилизације. Такође вредности систолног, дијастолног притиска, као и срчане фреквенце и коронарног протока се нису значајно мењале током испитиваног периода.

Разлике између групе која је конзумирала екстракт ивањског цвећа у дози од 250 mg/kg и нетретираних пацова уочене су у вредностима свих испитиваних параметара изузев дијастолног притиска. Наиме на самом почетку реперфузије су откривене ниже вредности $dp/dt \max$, да би на крају реперфузије те вредности биле значајно више у односу на нетретиране пацове. Такође у овој групи дошло је до значајног повећања апсолутних вредности $dp/dt \min$ у свим посматраним тачкама од интереса. На крају тридесетоминутне реперфузије SLVP је бележио више вредности у групи која је користила екстракт ивањског цвећа. Додатно, у групи подвргнутој третману наведеним екстрактом запажене су ниже вредности срчане фреквенце у првом минуту реперфузије. Насупрот томе на самом крају реперфузије вредности овог параметра су биле значајно више у односу на нетретиране животиње. Такође конзумација екстракта ивањског цвећа довела је до повећања протока у првом и последњем минуту реперфузије у односу на групу која није била подвргнута наведеном третману.

Табела 23. Ефекти третмана екстрактом ивањског цвећа у дози од 250 mg/kg на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца здравих пацова.

		<i>dp/dt max(mmHg)</i>	<i>dp/dt min(mmHg)</i>	<i>SLVP(mmHg)</i>
CTRL	C	1603,8 ± 240,16	-1101,85 ± 100,32	53,42 ± 8,77
	P1	1815,8 ± 307,23*	-1045,23 ± 73,4	58,9 ± 7,65
	P7	1300,7 ± 120,47*#	-904,07 ± 35,2*	45,6 ± 7,22*
250 GVE	C	1677,83 ± 86,76	-1289,13 ± 146,16 [¶]	53,72 ± 3,75
	P1	1782,2 ± 361,83* [¶]	-1138 ± 130,33 [¶]	59,5 ± 11,93
	P7	1729,85 ± 160,18 [¶]	-1123 ± 228,2 [¶]	56,8 ± 4,12 [¶]
		<i>DLVP(mmHg)</i>	<i>HR(bpm)</i>	<i>CF(mL/min)</i>
CTRL	C	1,1 ± 0,19	275,4 ± 26,68	7,3 ± 0,52
	P1	1,2 ± 0,13	305,07 ± 43,39	7,65 ± 0,31
	P7	1,1 ± 0,17	217,1 ± 21,2*	5,3 ± 0,66
250 GVE	C	1,2 ± 0,1	265,2 ± 23,2	7,6 ± 1,4
	P1	1,12 ± 0,006	278,2 ± 32,3 [¶]	8,4 ± 1,01 [¶]
	P7	1,03 ± 0,04	255,2 ± 36,3 [¶]	7,62 ± 1,55 [¶]

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X ± SD). C - стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - последњи минут реперфузије; *Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку C у групи; #Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку P1 у групи; [¶]Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на нетретирание животиње у истом тренутку од интереса.

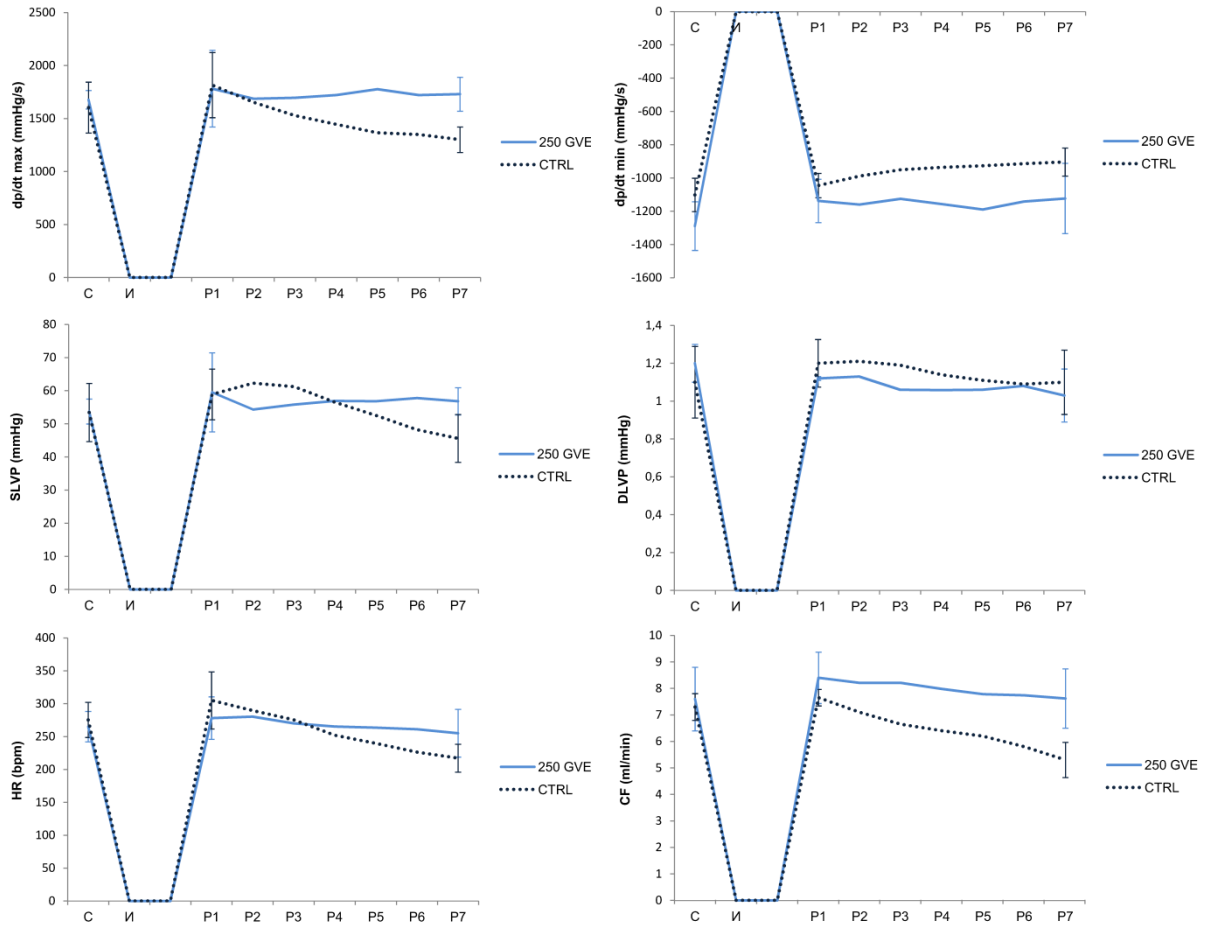


График 11. Кардиодинамски параметри и коронарни проток здравих пацова који су били на третману екстрактом у дози од 250 mg/kg и нетретираних здравих пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). С - стабилизација; И - исхемија; P1-P7 - вредности бележене на сваких пет минута током тридесет минута реперфузије.

4.9.2.3. Ефекти 500 mg/kg екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток здравих пацова

Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока приказане су табеларно и графички (Табела 24, График 12). Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене параметара функције срца у групи животиња које су претходно биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg (500 GVE). Такође приказане су статистички значајне разлике у наведеним параметрима под утицајем 500 mg/kg екстракта у односу на контролне услове (CTRL група).

У групи која је била третирана екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg дошло је до скока у вредности $dp/dt \max$ у P1 у односу на тренутке C и P7, али у последњем моменту реперфузије вредности су биле сличне вредностима забележеним пре исхемије. Апсолутна вредност $dp/dt \min$ била је већа на крају реперфузије у односу на моменат стабилизације. Вредности систолног и дијастолног притиска у левој комори су остале константе током посматраног периода. Међутим када је реч о срчаној фреквенци забележено је повећање у P1 у односу на C, док није било значајних разлика у вредностима забележеним у P7 у односу на C.

Када се упореде здрави пацови и пацови на третману екстрактом, вредност $dp/dt \max$ је била значајно повишена у третираној групи у свим тачкама од интереса. Додатно апсолутне вредности $dp/dt \min$ биле су веће у групи која је користила екстракт у првом и последњем моменту реперфузије. Након употребе екстракта ивањског цвећа у највишој дози уочен је скок у вредностима систолног притиска пре исхемије и након завршетка реперфузије у односу на контролу, док није дошло до значајних промена на нивоу дијастолног притиска. Срчана фреквенца након тридесетоминутне реперфузије је била значајно виша у третираној групи, док је вредност коронарног протока у овој групи била већа у свим тачкама од интереса у односу на нетретиране пацове.

Табела 24. Ефекти третмана екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца здравих пацова.

		<i>dp/dt max(mmHg)</i>	<i>dp/dt min(mmHg)</i>	<i>SLVP(mmHg)</i>
CTRL	C	1603,8 ± 240,16	-1101,85 ± 100,32	53,42 ± 8,77
	P1	1815,8 ± 307,23*	-1045,23 ± 73,4	58,9 ± 7,65
	P7	1300,7 ± 120,47 [#]	-904,07 ± 35,2*	45,6 ± 7,22*
500 GVE	C	1700,2 ± 228,2 [¶]	-1168,82 ± 91,87	72,7 ± 4,62 [¶]
	P1	2037,65 ± 165,98* [¶]	-1323,93 ± 94,34 [¶]	63,4 ± 4,95
	P7	1690,2 ± 136,9 ^{#¶}	-1182,95 ± 69,04* [¶]	62,4 ± 6,12* [¶]
		<i>DLVP(mmHg)</i>	<i>HR(bpm)</i>	<i>CF(mL/min)</i>
CTRL	C	1,1 ± 0,19	275,4 ± 26,68	7,3 ± 0,52
	P1	1,2 ± 0,13	305,07 ± 43,39	7,65 ± 0,31
	P7	1,1 ± 0,17	217,1 ± 21,2*	5,3 ± 0,66
500 GVE	C	1 ± 0,1	278,65 ± 33,46	8,95 ± 1,25 [¶]
	P1	1,2 ± 0,16	323,3 ± 29*	9,8 ± 1,03 [¶]
	P7	1,01 ± 0,08	262,55 ± 21,3 [¶]	8,2 ± 1,01 [¶]

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X ± SD). C – стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - последњи минут реперфузије; *Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку C у групи; [#]Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку P1 у групи; [¶]Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на нетретираних животиње у истом тренутку од интереса.

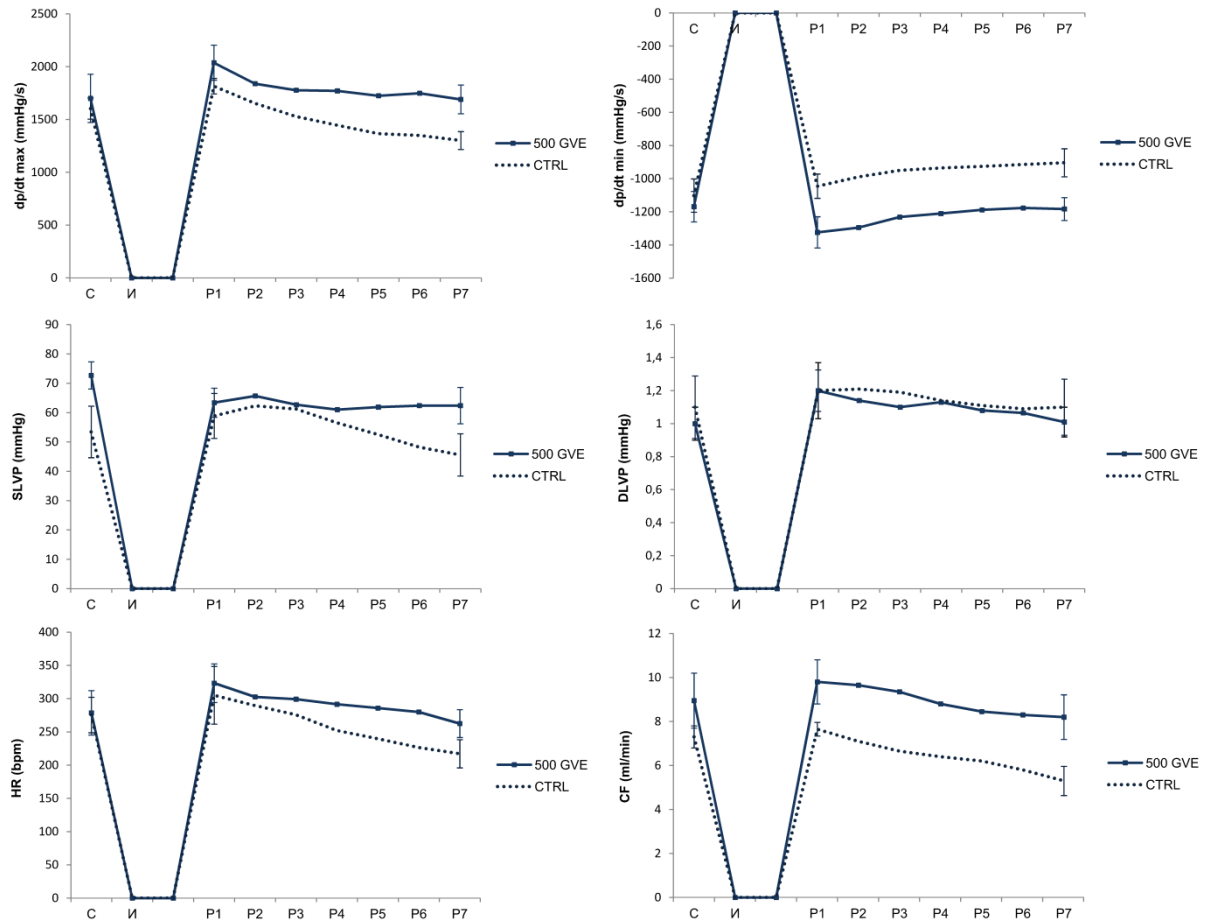


График 12. Кардиодинамски параметри и коронарни проток здравих пацова који су били на третману екстрактот у дози од 500 mg/kg и нетретираних здравих пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). С - стабилизација; И - исхемија; P1-P7 - вредности бележене на сваких пет минута током тридесет минута реперфузије.

4.9.2.4. Промене кардиодинамских параметара и коронарног протока изолованог срца здравих пацова у односу на примењену дозу екстракта ивањског цвећа

Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока приказане су на Графику 13. Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене параметара функције срца у групи здравих животиња у односу на примењену дозу екстракта ивањског цвећа.

У тренутку стабилизације није било разлика у вредности $dp/dt \max$ између група, међутим апсолутна вредност $dp/dt \min$ је била значајно нижа у групи која је користила најмању дозу у односу на остале групе. С друге стране, статистички значајан пораст апсолутних вредности ових параметара уочен је у првом минуту реперфузије у групи која је подвргнута највећој дози екстракта у односу на друге две примењене дозе. Након тридесетоминутне реперфузије вредност $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ се нису разликовале између група на третману екстрактом у дози од 500 mg/kg и 250 mg/kg, али су те вредности значајно више у односу на вредности ова два параметра код пацова који су користили 125 mg/kg екстракта. У периоду стабилизације вредност систолног притиска у левој комори била је значајно виша у групи која је конзумирала 500 mg/kg екстракта у односу на друге две групе. У првом и последњем минуту реперфузије уочава се статистички значајан скок у вредности систолног притиска у групи која је примала највишу дозу екстракта у односу на најнижу. Исти тренд је присутан на крају тридесетоминутне реперфузије када је реч о дијастолном притиску. На почетку реперфузије вредност срчане фреквенце је била статистички значајно виша у групи која је била изложена дози од 500 mg/kg у односу на остале две дозе, док су на крају реперфузионог периода сличне вредности овог параметра забележене у све три групе. Коронарни проток је био највиши у групи која је била на третману највећом дозом у односу на остале две дозе у свим испитиваним тренуцима.

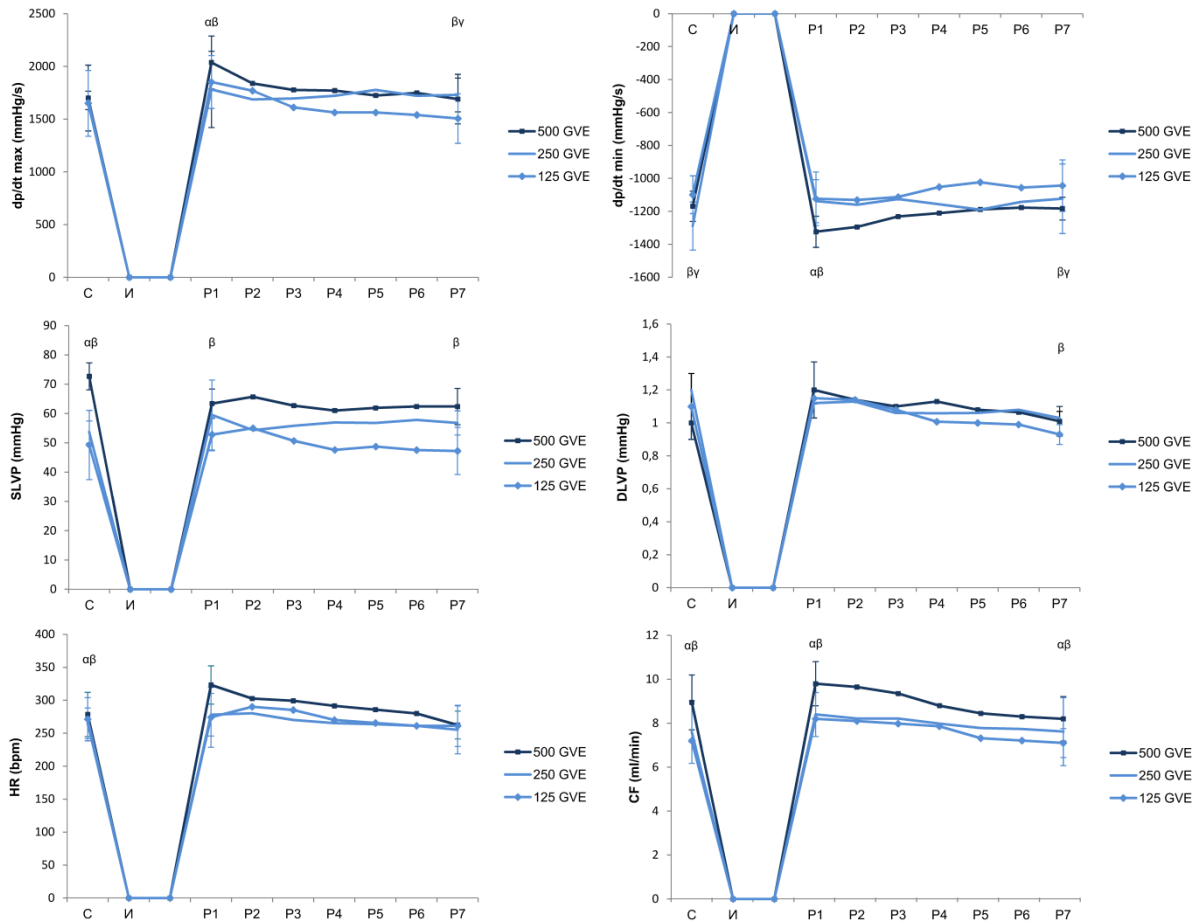


График 13. Поређење ефеката различитих доза екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца здравих пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). С - стабилизација; И - исхемија; P1-P7 - вредности бележене на сваких пет минута током тридесет минута реперфузије. ^αСтатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе 500 GVE и 250 GVE у тренутку од интереса; ^βСтатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе 500 GVE и 125 GVE; ^γСтатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе 250 GVE и 125 GVE.

4.9.3. Ефекти екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток спонтано хипертензивних пацова

4.9.3.1. Ефекти 125 mg/kg екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток спонтано хипертензивних пацова

Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока приказане су табеларно и графилки (Табела 25, График 14). Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене параметара функције срца у групи хипертензивних животиња које су претходно биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg (SHR + 125 GVE). Такође приказане су статистички значајне разлике у наведеним параметрима под утицајем 125 mg/kg екстракта у односу на контролне услове (SHR група).

Откривено је статистички значајно повећање вредности dp/dt max у групи изложеној третману ивањским цвећем у првом минуту реперфузије у односу на период стабилизације и крај реперфузије. Остали испитивани параметри у наведеној групи су бележили сличне вредности у испитиваним тачкама од интереса. Екстракт ивањског цвећа довео до повећања вредности dp/dt min у првом и последњем моменту реперфузије и DLVP на крају реперфузије у односу на нетретиране животиње. Такође забележене су више вредности срчане фреквенце у првом и последњем минуту реперфузије и коронарног протока у првом минуту реперфузије у третираној групи пацова.

Табела 25. Ефекти третмана екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца спонтано хипертензивних пацова.

		<i>dp/dt max(mmHg)</i>	<i>dp/dt min(mmHg)</i>	<i>SLVP(mmHg)</i>
SHR	<i>C</i>	1303,8 ± 235,2	-1145,85 ± 90,32	49,6 ± 4,6
	<i>P1</i>	1415,8 ± 123,5*	-1245,25 ± 73,26	53,6 ± 7,9
	<i>P7</i>	1223,2 ± 118,54* [#]	-970,1 ± 84,4* [#]	39,3 ± 6,2 ^{#*}
SHR + 125 GVE	<i>C</i>	1315,2 ± 54,95	-1056,2 ± 56,3	45,6 ± 4,51
	<i>P1</i>	1446,3 ± 235,2*	-1098,9 ± 84,5 [¶]	45,56 ± 5,54
	<i>P7</i>	1310,2 ± 220 [#]	-1016,2 ± 140,2 [¶]	41,3 ± 13,5
		<i>DLVP(mmHg)</i>	<i>HR(bpm)</i>	<i>CF(mL/min)</i>
SHR	<i>C</i>	1,01 ± 0,16	230,5 ± 25,2	7,5 ± 0,5
	<i>P1</i>	1,1 ± 0,13	220,5 ± 31,2	7,2 ± 0,31
	<i>P7</i>	0,93 ± 0,06	180,2 ± 19,2* [#]	6,41 ± 0,66*
SHR + 125 GVE	<i>C</i>	1,15 ± 0,3	245,2 ± 17,3	7,56 ± 0,23
	<i>P1</i>	1,12 ± 0,13	256,2 ± 21,9 [¶]	8,17 ± 0,15 [¶]
	<i>P7</i>	1,12 ± 0,06 [¶]	234,2 ± 12,3 [¶]	6,97 ± 0,159

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X ± SD). С - стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - последњи минут реперфузије, *Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку С у групи; [#]Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку P1 у групи; [¶]Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на нетретиране животиње у истом тренутку од интереса.

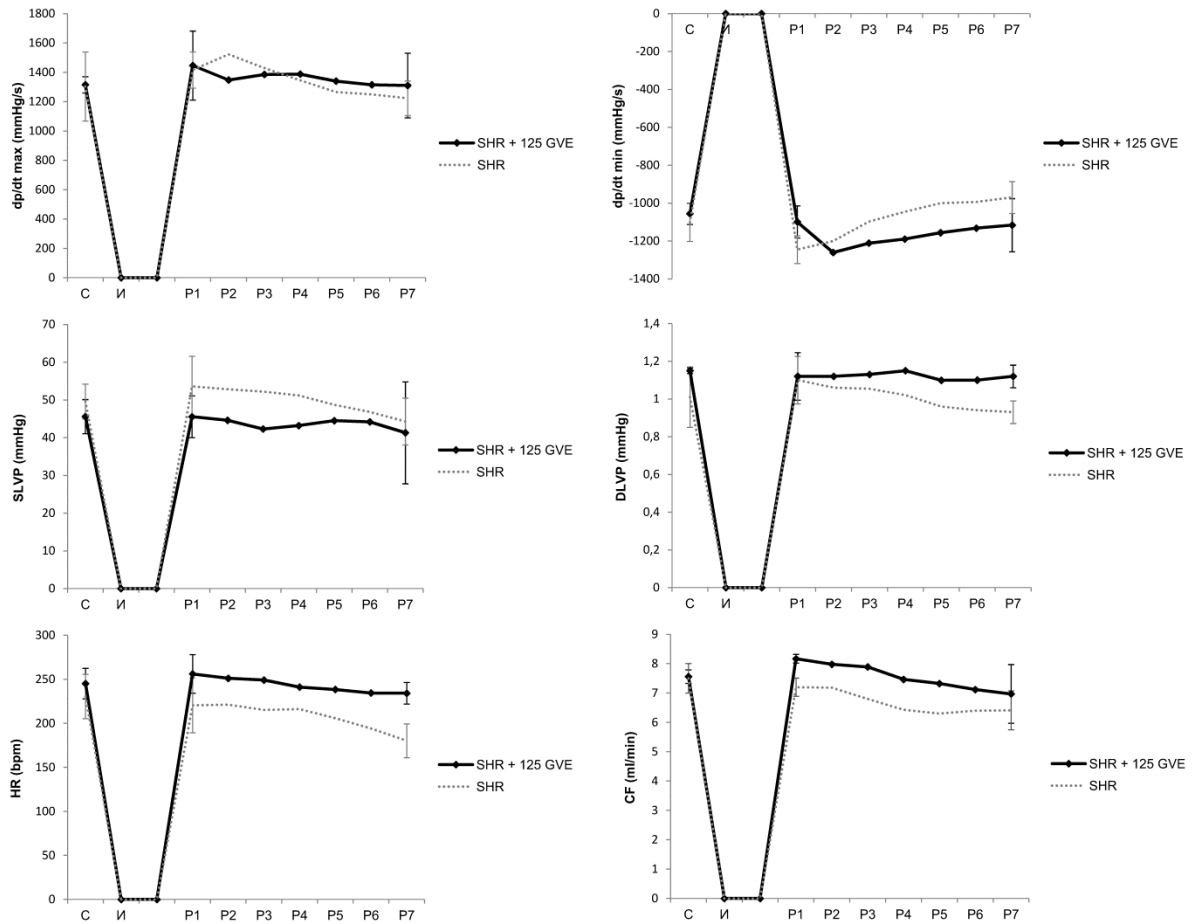


График 14. Кардиодинамски параметри и коронарни проток спонтано хипертензивних пацова који су били на третману екстрактот у дози од 125 mg/kg и нетретираних хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). C - стабилизација; И - исхемија; P1-P7 - вредности бележене на сваких пет минута током тридесет минута реперфузије.

4.9.3.2. Ефекти 250 mg/kg екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток спонтано хипертензивних пацова

Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока приказане су табеларно и графички (Табела 26, График 15). Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене параметара функције срца у групи хипертензивних животиња које су претходно биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 250 mg/kg (SHR + 250 GVE). Такође приказане су статистички значајне разлике у наведеним параметрима под утицајем 250 mg/kg екстракта у односу на контролне услове (SHR група).

Статистички значајно повећање вредности $dp/dt \max$ и смањење $dp/dt \min$ уочено је у групи изложеној третману ивањским цвећем у првом минуту реперфузије у односу на период стабилизације и крај реперфузије. Такође забележен је скок срчане фреквенце у првом у односу на последњи минут реперфузије.

Када се упореде вредности кардиодинамских параметара у групи нетретираних и третираних пацова уочавају се следеће промене: у третираној групи дошло је до повећања вредности $dp/dt \max$ у свим тачкама од интереса, $dp/dt \min$ у крајњем минуту реперфузије, систолног притиска у првом минуту реперфузије и срчане фреквенце у првом и последњем минуту реперфузије. Такође вредности коронарног протока су биле више у групи која је конзумирала екстракт ивањског цвећа на почетку и крају реперфузије.

Табела 26. Ефекти третмана екстрактом ивањског цвећа у дози од 250 mg/kg на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца спонтано хипертензивних пацова.

		<i>dp/dt max(mmHg)</i>	<i>dp/dt min(mmHg)</i>	<i>SLVP(mmHg)</i>
SHR	<i>C</i>	1303,8 ± 235,2	-1145,85 ± 90,32	49,6 ± 4,6
	<i>P1</i>	1415,8 ± 123,5*	-1245,25 ± 73,26	53,6 ± 7,9
	<i>P7</i>	1223,2 ± 118,54* [#]	-970,1 ± 84,4* [#]	39,3 ± 6,2* [#]
SHR + 250 GVE	<i>C</i>	1418,15 ± 121,3 [¶]	-1172 ± 102,3	45,5 ± 5,5
	<i>P1</i>	1595,13 ± 150,6* [¶]	-1120,2 ± 102,3*	37,4 ± 6,2 [¶]
	<i>P7</i>	1444,17 ± 200,5 ^{#¶}	-1156,8 ± 110,2 ^{#¶}	40,7 ± 3,1
		<i>DLVP(mmHg)</i>	<i>HR(bpm)</i>	<i>CF(mL/min)</i>
SHR	<i>C</i>	1,01 ± 0,16	230,5 ± 25,2	7,5 ± 0,5
	<i>P1</i>	1,1 ± 0,13	220,5 ± 31,2	7,2 ± 0,31
	<i>P7</i>	0,93 ± 0,06	180,2 ± 19,2* [#]	6,41 ± 0,66*
SHR + 250 GVE	<i>C</i>	1,21 ± 0,009	251,2 ± 18,2	7,91 ± 0,45
	<i>P1</i>	1,16 ± 0,01	260,2 ± 31,1 [¶]	8,12 ± 0,39 [¶]
	<i>P7</i>	1,08 ± 0,14	239,2 ± 19,2 ^{#¶}	7,39 ± 0,96 [¶]

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X ± SD).
 C – стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - последњи минут реперфузије;
 *Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку C у групи;
 #Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку P1 у групи;
 ¶Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на нетретирание животиње у истом тренутку од интереса.

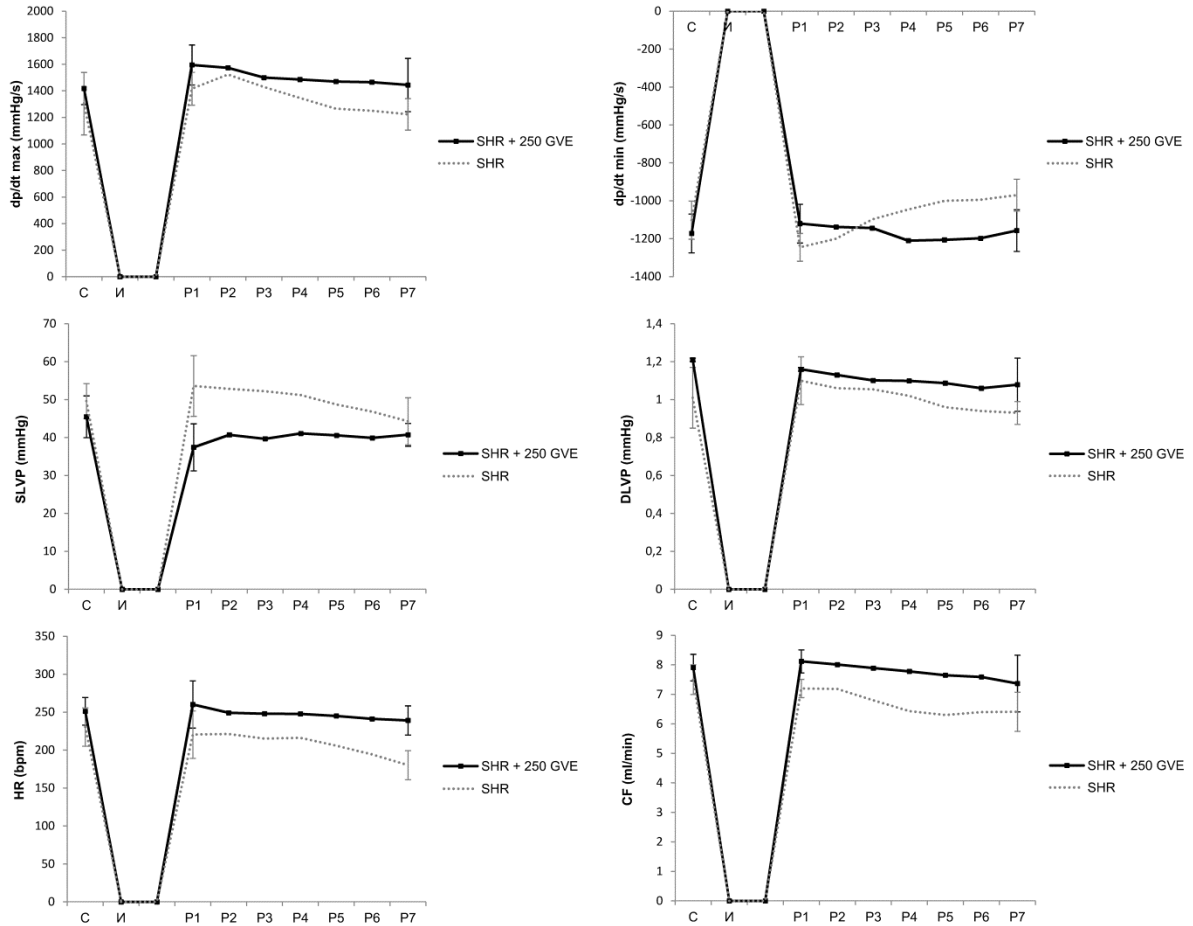


График 15. Кардиодинамски параметри и коронарни проток спонтано хипертензивних пацова који су били на третману екстрактот у дози од 250 mg/kg и нетретираних хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). C - стабилизација; И - исхемија; P1-P7 - вредности бележене на сваких пет минута током тридесет минута реперфузије.

4.9.3.3. Ефекти 500 mg/kg екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток спонтано хипертензивних пацова

Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока приказани су табеларно и графички (Табела 27, График 16). Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене параметара функције срца у групи хипертензивних животиња које су претходно биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg (SHR + 500 GVE). Такође приказане су статистички значајне разлике у наведеним параметрима под утицајем 500 mg/kg екстракта у односу на контролне услове (SHR група).

У групи изложеној третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg вредности испитиваних параметара функције срца нису се значајно мењале током посматраног периода. Више вредности $dp/dt \max$ у тачкама C и P7 биле су уочене у третираној групи у односу на спонтано хипертензивну контролу. Додатно у групи која је конзумирала екстракт ивањског цвећа у последњем минуту реперфузије биле су присутне изражено више апсолутне вредности $dp/dt \min$. Такође претретман ивањским цвећем довео је до значајног повећања систолног притиска на крају реперфузије у односу на нетретиране пацове. Срчана фреквенца је била значајно виша у периоду стабилизације и по завршетку реперфузије у групи која је била изложена третману екстрактом. Такође код ових пацова коронарни проток је био значајно виши у свим испитиваним тренуцима.

Табела 27. Ефекти третмана екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца спонтано хипертензивних пацова.

		<i>dp/dt max(mmHg)</i>	<i>dp/dt min(mmHg)</i>	<i>SLVP(mmHg)</i>
SHR	C	1303,8 ± 235,2	-1145,85 ± 90,32	49,6 ± 4,6
	P1	1415,8 ± 123,5*	-1245,25 ± 73,26	53,6 ± 7,9
	P7	1223,2 ± 118,54* [#]	-970,1 ± 84,4* [#]	39,3 ± 6,2 ^{#*}
SHR + 500 GVE	C	1450 ± 75,9 [¶]	-1188,83 ± 90,8	53,42 ± 8,77
	P1	1435,1 ± 146,8	-1212,93 ± 40,2	58,1 ± 7,66
	P7	1420,8 ± 59,5 [¶]	-1121,95 ± 150,2 [¶]	42,1 ± 7,2 [¶]
		<i>DLVP(mmHg)</i>	<i>HR(bpm)</i>	<i>CF(mL/min)</i>
SHR	C	1,01 ± 0,16	230,5 ± 25,2	7,5 ± 0,5
	P1	1,1 ± 0,13	220,5 ± 31,2	7,2 ± 0,31
	P7	0,93 ± 0,06	180,2 ± 19,2* [#]	6,41 ± 0,66*
SHR + 500 GVE	C	1,3 ± 0,1	250,3 ± 20,2 [¶]	8,6 ± 1,2 [¶]
	P1	1,28 ± 0,01	248,9 ± 28,5	9,2 ± 0,97 [¶]
	P7	1,29 ± 0,14	230,8 ± 19,8 [¶]	8,1 ± 1,12 [¶]

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X ± SD). C – стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - последњи минут реперфузије; *Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку C у групи; [#]Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку P1 у групи; [¶]Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на нетретиране животиње у истом тренутку од интереса.

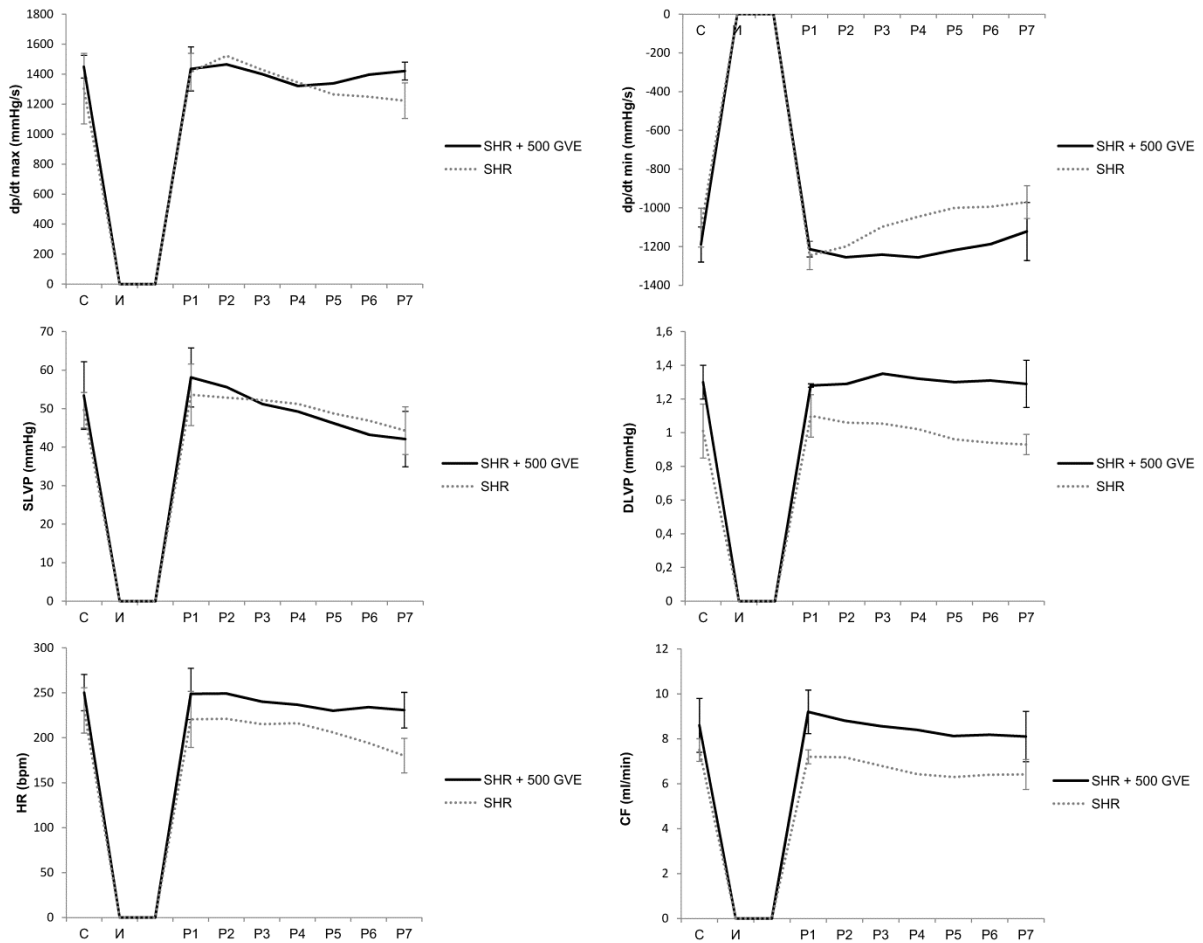


График 16. Кардиодинамски параметри и коронарни проток спонтано хипертензивних пацова који су били на третману екстрактом у дози од 500 mg/kg и нетретираних хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). C - стабилизација; И - исхемија; P1-P7 - вредности бележене на сваких пет минута током тридесет минута реперфузије.

4.9.3.4. Промене кардиодинамских параметара и коронарног протока изолованог срца спонтано хипертензивних пацова у односу на примењену дозу екстракта ивањског цвећа

Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока приказани су на Графику 17. Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене параметара функције срца у групи спонтано хипертензивних животиња у односу на примењену дозу екстракта ивањског цвећа.

Апсолутне вредности $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ су биле значајно више у групама третираним са 500 mg/kg и 250 mg/kg екстракта у односу на групу третирану са 125 mg/kg екстракта у периоду стабилизације и на крају реперфузије. Додатно у првом минуту реперфузије запажена је значајно виша вредност $dp/dt \max$ у 250 GVE групи у односу на остале групе, док када је реч о $dp/dt \min$ више вредности су биле присутне у групи изложеној највећој дози у односу на остале примењене дозе. Повећање вредности систолног притиска уочено је у групи која је била на третману са 500 mg/kg екстракта у односу на 250 mg/kg и 125 mg/kg у периоду стабилизације и првом минуту реперфузије. Исти тренд је уочен код дијастолног притиска, али на крају реперфузије. Промена дозе примењеног екстракта није имала утицаја на вредност срчане фреквенце, док је коронарни проток био значајно виши у групи третираној са 500 mg/kg екстракта у односу на 125 mg/kg екстракта у свим испитиваним тренуцима.

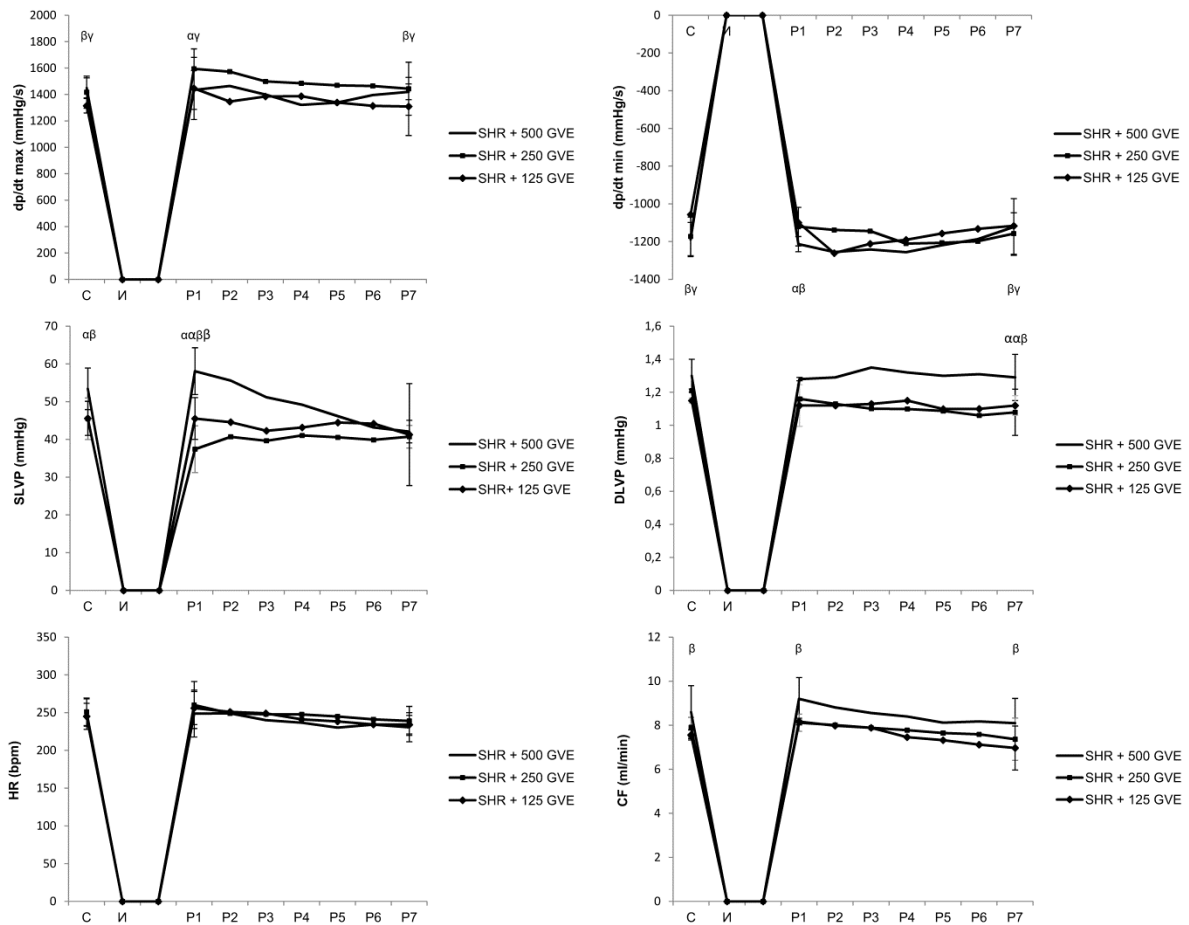


График 17. Поређење ефеката различитих доза екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца спонтано хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). С - стабилизација; И - исхемија; P1-P7 - вредности бележене на сваких пет минута током тридесет минута реперфузије. α Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе SHR + 500 GVE и SHR + 250 GVE у тренутку од интереса; $\alpha\alpha$ Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ између групе SHR + 500 GVE и SHR + 250 GVE у тренутку од интереса; β Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе SHR + 500 GVE и SHR + 125 GVE; $\beta\beta$ Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ између групе SHR + 500 GVE и SHR + 125 GVE; γ Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе SHR + 250 GVE и SHR + 125 GVE.

4.9.4. Разлике у ефектима екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток код здравих и спонтано хипертензивних пацова

Промене параметара функције срца у групи нормотензивних и спонтано хипертензивних животиња под утицајем различитих доза екстракта приказане су графички (Графици 18, 19 и 20).

Вредност $dp/dt \max$ и HR у групи здравих пацова који су користили 125 mg/kg екстракта била је значајно виша у односу на хипертензивне пацове током испитиваног периода, док се вредност $dp/dt \min$ и коронарног протока није значајно разликовала. Код хипертензивних пацова систолни притисак је био нижи на почетку реперфузије, а дијастолни виши на крају реперфузије у односу на здраве (График 18). У групи здравих пацова на третману екстрактом у дози од 250 mg/kg забележене су више вредности $dp/dt \max$ и SLVP током свих испитиваних тачака од интереса, $dp/dt \min$ у периоду стабилизације и HR у првом минуту реперфузије. Ни дијастолни притисак ни коронарни проток се нису значајно разликовали између нормотензивних и хипертензивних пацова током посматраног периода (График 19).

Виша вредност $dp/dt \max$ била је уочена код здравих животиња на третману екстрактом у дози од 500 mg/kg током целог посматраног периода у односу на хипертензивне животиње, док није било разлика у вредности $dp/dt \min$. Такође вредности систолног притиска су биле више, а дијастолног ниже у групи здравих у периоду стабилизације и на крају реперфузије. Примена екстракта код здравих пацова била је повезана са статистички значајним повећањем срчане фреквенце у свим тренуцима, док се коронарни проток није значајно разликовао између испитиваних група (График 20).

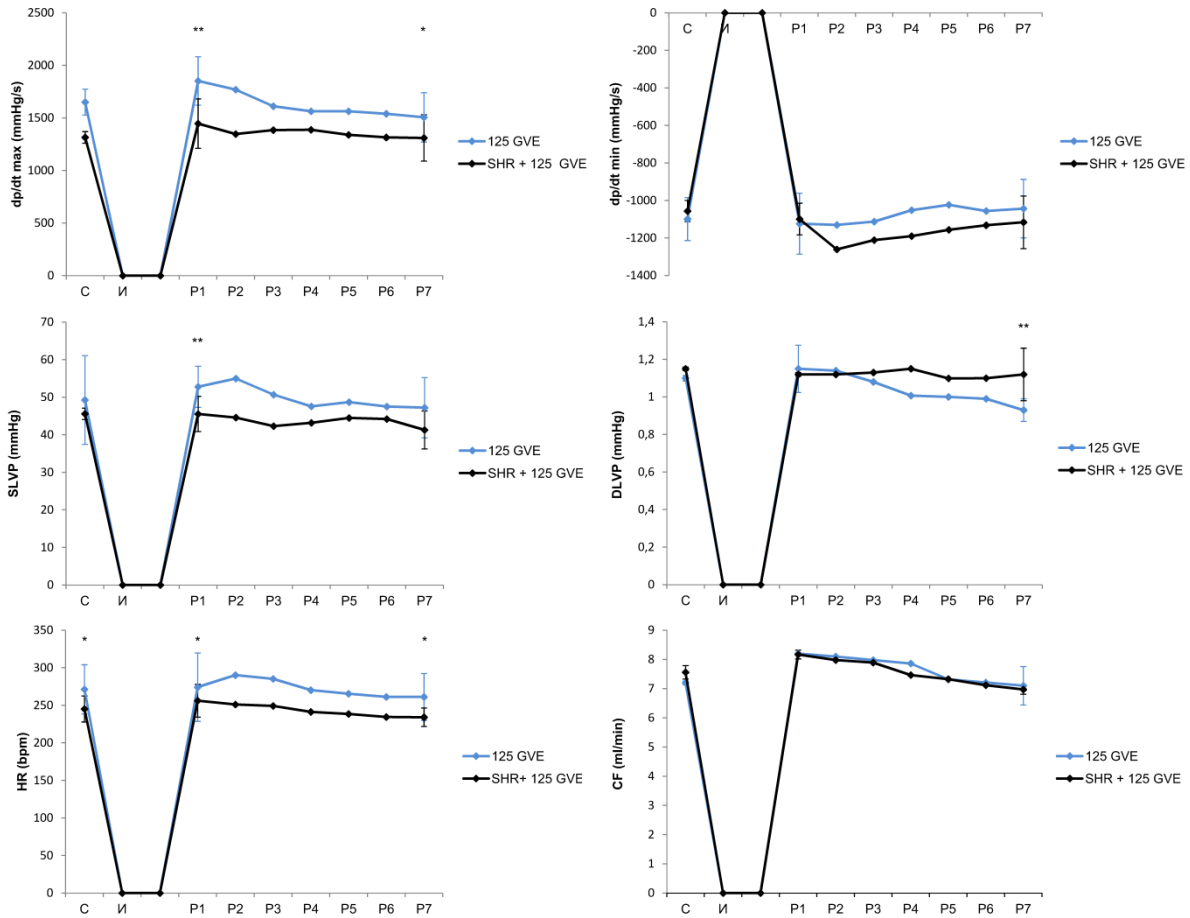


График 18. Поређење ефеката 125 mg/kg екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре нормотензивних и спонтано хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). С - стабилизација; И - исхемија; P1-P7 - вредности бележене на сваких пет минута током тридесет минута реперфузије. * Статистички значајна разлика између група 125 GVE и SHR + 125 GVE; **Статистички високо значајна разлика између група 125 GVE и SHR + 125 GVE.

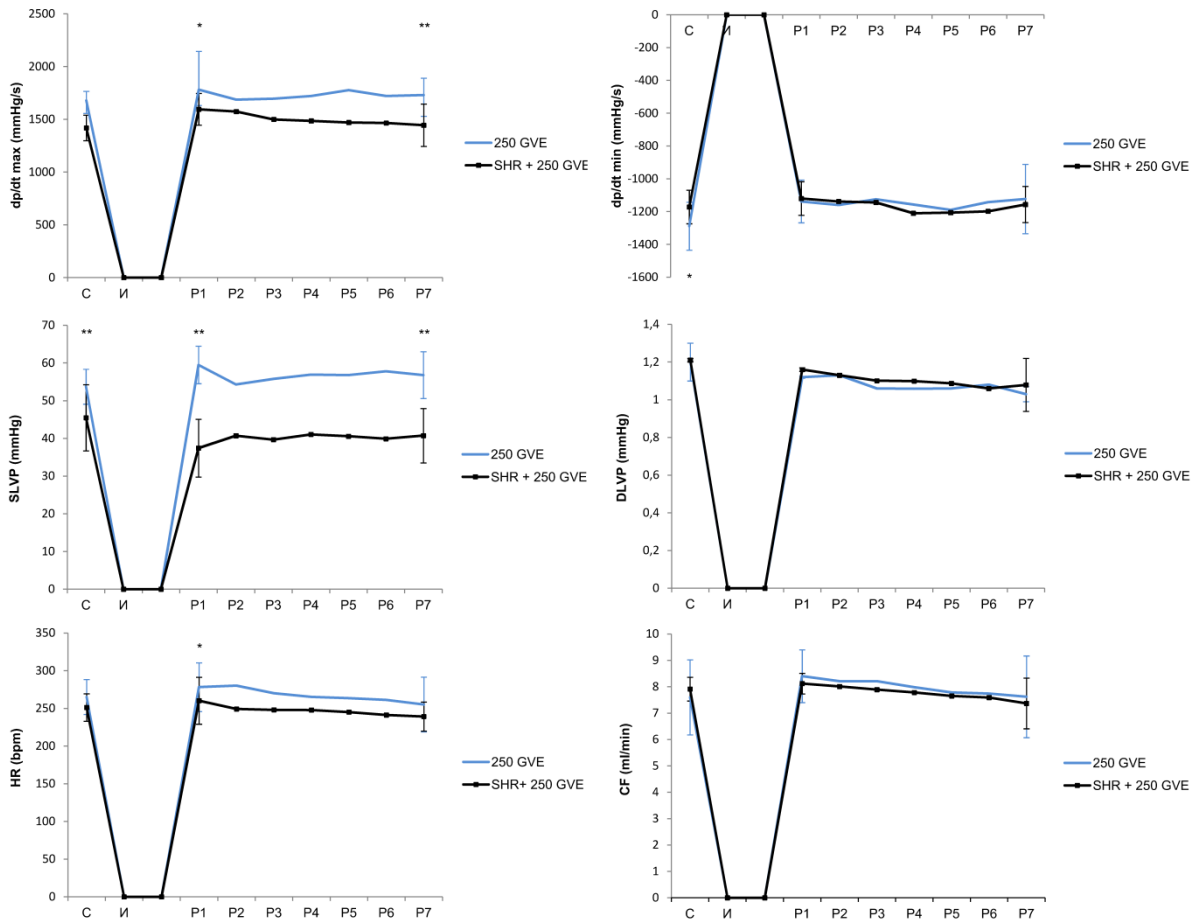


График 19. Поређење ефеката 250 mg/kg екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре нормотензивних и спонтано хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). С - стабилизација; И - исхемија; P1-P7 - вредности бележене на сваких пет минута током тридесет минута реперфузије. * Статистички значајна разлика између група 250 GVE и SHR + 250 GVE; **Статистички високо значајна разлика између група 250 GVE и SHR + 250 GVE.

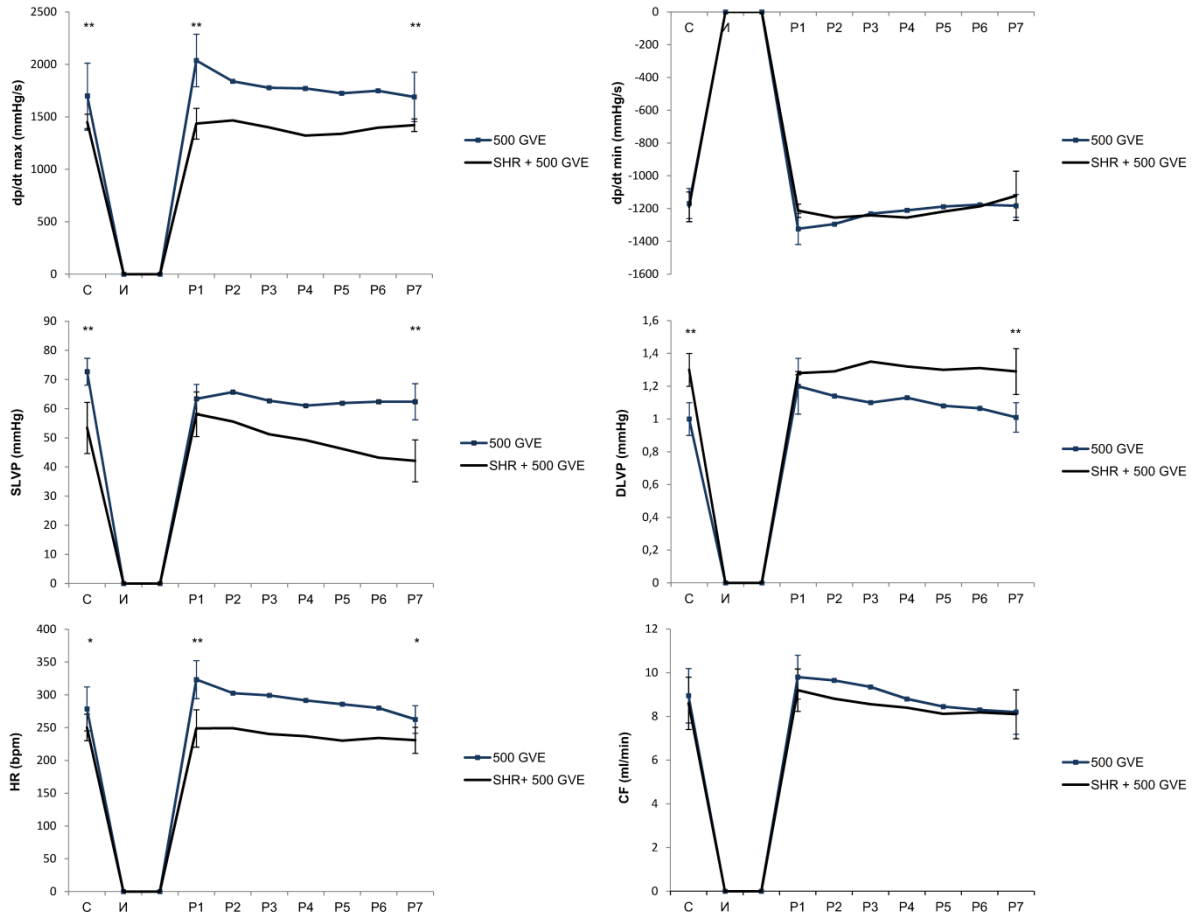


График 20. Поређење ефеката 500 mg/kg екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре нормотензивних и спонтано хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). С - стабилизација; И - исхемија; P1-P7 - вредности бележене на сваких пет минута током тридесет минута реперфузије. * Статистички значајна разлика између група 500 GVE и SHR + 500 GVE; ** Статистички високо значајна разлика између група 500 GVE и SHR + 500 GVE.

4.10. Ефекти екстракта ивањског цвећа на маркере оксидационог стреса у перфузату изолованог срца пацова

Концентрације прооксиданаса као што су O_2^- , NO_2^- , H_2O_2 и TBARS одређиване су из коронарног венског ефлуента који је сакупљан у тренутку стабилизације (С), првом минути реперфузије након исхемије (P1) и на сваких пет минута током тридесетоминутне реперфузије (P2-P7). Међутим за статистичку анализу података узимане су у обзир три тачке од интереса: вредности у моменту стабилизације (С), након првог (P1) и последњег минута реперфузије (P7).

4.10.1. Вредности маркера оксидационог стреса у перфузату изолованог срца нетретираних пацова

Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене маркера оксидационог оштећења у групи здравих и хипертензивних животиња, а вредности испитиваних параметара су приказане су табеларно и графички (Табела 28, График 21).

И-Р је довела до значајног скока у концентрацији свих испитиваних маркера оксидационог стреса на крају реперфузије у односу на вредности пре исхемије како у условима нормотензије тако и код хипертензивних пацова. Ниво TBARS-а је био значајно повишен у првом минути реперфузије у обе групе у односу на стабилизациони период, док је ниво NO_2^- био повишен на почетку реперфузије у односу на стабилизацију само код хипертензивних пацова.

Код хипертензивних пацова уочена је виша концентрација O_2^- и TBARS на крају реперфузије, H_2O_2 у првом и последњем минути реперфузије, као и нижа концентрација NO_2^- у стабилизацији.

Табела 28. Прооксидациони маркери у коронарном венском ефлуенту нетретираних здравих и спонтано хипертензивних пацова.

		TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO_2^- (nmol/ml)	O_2^- (nmol/ml)	H_2O_2 (nmol/ml)
CTRL	C	22,3 ± 2,4	97,7 ± 14,9	58,3 ± 1,3	56,5 ± 4,2
	P1	27,4 ± 1,8*	104,5 ± 13,9	62 ± 1	59,2 ± 6,2
	P7	27,8 ± 3*	105,8 ± 21,2*	69,5 ± 5,3*	61,5 ± 3,4*
SHR	C	21 ± 1,8	87,7 ± 13,2 [¶]	62,1 ± 2,5	58,3 ± 2,1
	P1	25,5 ± 2,1*	103,6 ± 12,1*	65 ± 4,7	64,2 ± 3,6
	P7	30,2 ± 2,3*	106,3 ± 12,7*	76,2 ± 3,8*	67,8 ± 1,7*

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). C – стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - последњи минут реперфузије; *Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку C у групи; [¶]Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку P1 у групи.

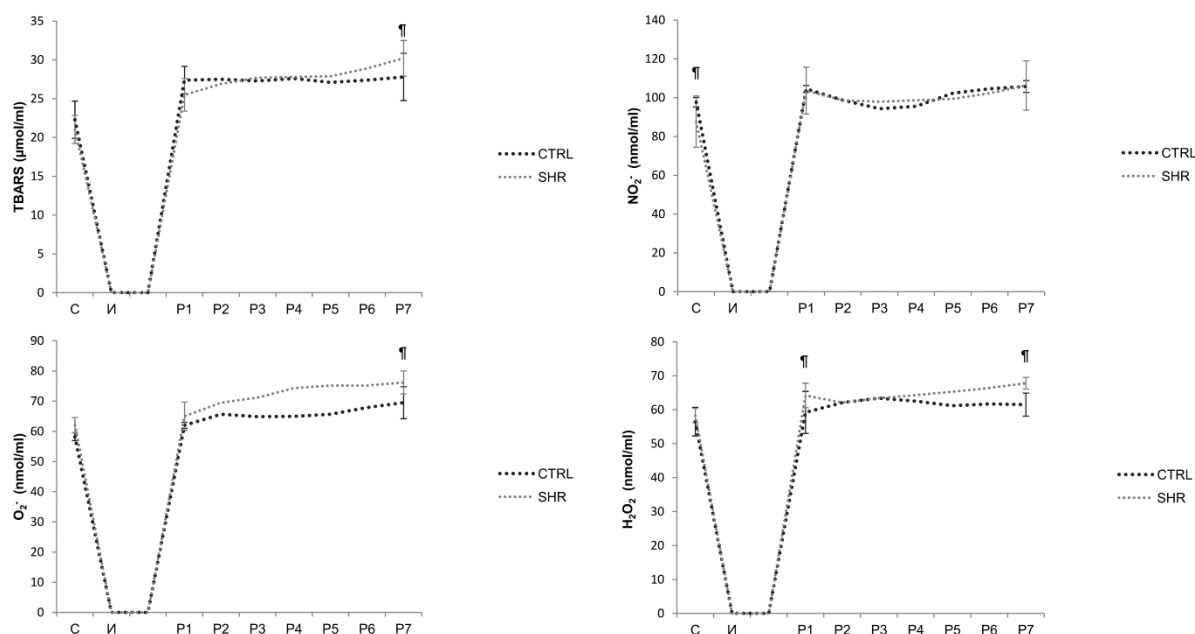


График 21. Прооксидациони маркери у коронарном венском ефлуенту нетретираних здравих (CTRL) и спонтано хипертензивних (SHR) пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). C - стабилизација; И - исхемија; P1- P7 - вредности бележене на сваких пет минута током тридесет минута реперфузије. [¶]статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у тренутку од интереса између група; ^{¶¶}статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ у тренутку од интереса између група.

4.10.2. Ефекти екстракта ивањског цвећа на маркере оксидационог стреса у перфузату изолованог срца здравих пацова

4.10.2.1. Ефекти 125 mg/kg екстракта ивањског цвећа на срчане прооксидационе маркере здравих пацова

Вредности маркера оксидационог стреса приказане су табеларно и графички (Табела 29, График 22). Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене параметара оксидационог стреса у групи животиња које су претходно биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg (125 GVE). Такође приказане су статистички значајне разлике у наведеним параметрима под утицајем 125 mg/kg екстракта у односу на контролне услове (CTRL група).

Након третмана екстрактом у дози од 125 mg/kg уочене су промене концентрација NO_2^- и O_2^- између посматраних тренутака. Дошло је до статистички значајног пораста концентрације NO_2^- у првом минуту реперфузије у односу на период стабилизације. Додатно ниво O_2^- је био значајно повишен на крају реперфузије у односу на период пре исхемије и први минут реперфузије.

Ниже концентрације TBARS у првом минуту реперфузије и NO_2^- у свим тачкама од интереса биле су забележене у групи која је конзумирала екстракт у односу на контролне услове.

Табела 29. Ефекти третмана екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg на прооксидационе маркере у коронарном венском ефлуенту здравих пацова.

		TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO_2^- (nmol/ml)	O_2^- (nmol/ml)	H_2O_2 (nmol/ml)
	C	22,3 ± 2,4	97,7 ± 14,9	58,3 ± 1,3	56,5 ± 4,2
CTRL	P1	27,4 ± 1,8*	104,5 ± 13,9	62 ± 1	59,2 ± 6,2
	P7	27,8 ± 3*	105,8 ± 21,2*	69,5 ± 5,3*	61,5 ± 3,4*
125 GVE	C	22,9 ± 1,1	92,5 ± 5,2 [¶]	60,2 ± 5,6	57,2 ± 1,6
	P1	23,4 ± 1,2 [¶]	98,8 ± 3,9* [¶]	60,1 ± 4,8	58,6 ± 5,6
	P7	25,46 ± 3,6	96,4 ± 3,1 [¶]	65,3 ± 2,8* [#]	59,1 ± 7,2

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X ± SD). C – стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - последњи минут реперфузије; Статистички значајна разлика на нивоу: * p<0,05 у односу на тачку C у групи; # p<0,05 у односу на тачку P1 у групи; [¶] p<0,05 у односу на нетретирани животиње у истом тренутку од интереса.

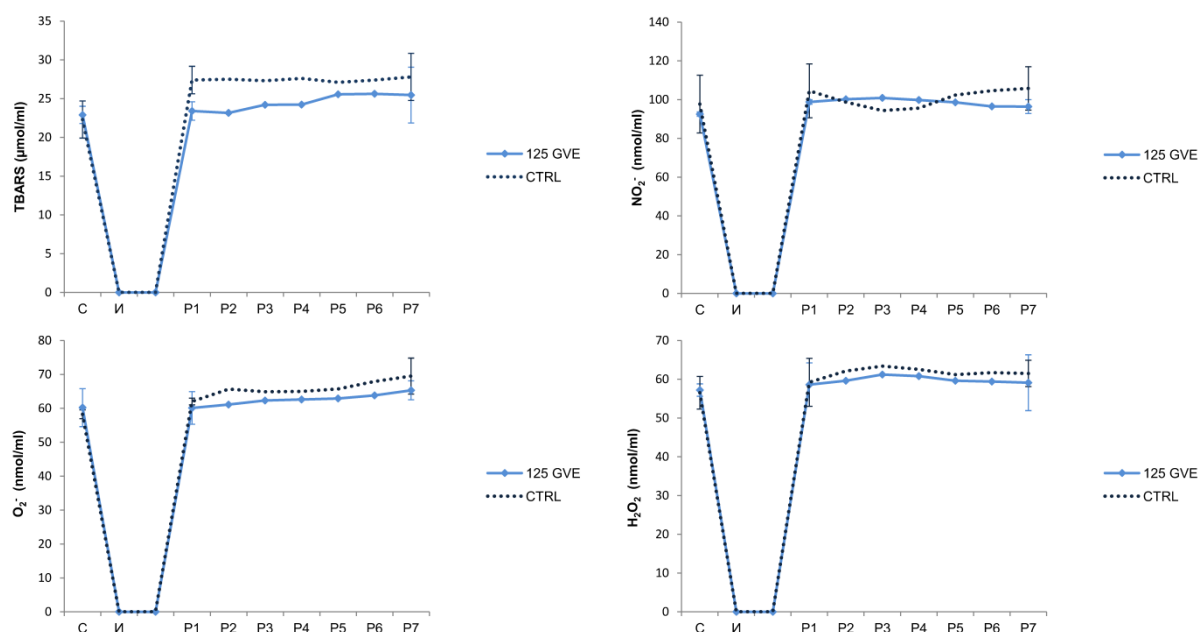


График 22. Прооксидациони маркери у коронарном венском ефлуенту здравих пацова који су били на третману екстрактом у дози од 125 mg/kg и нетретираних здравих пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). С - стабилизација; И - исхемија; P1-P7 - вредности бележене на сваких пет минута током тридесет минута реперфузије.

4.10.2.2. Ефекти 250 mg/kg екстракта ивањског цвећа на срчане прооксидационе маркере здравих пацова

Вредности маркера оксидационог стреса приказане су табеларно и графички (Табела 30, График 23). Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене параметара оксидационог стреса у групи животиња које су претходно биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 250 mg/kg (250 GVE). Такође приказане су статистички значајне разлике у наведеним параметрима под утицајем 250 mg/kg екстракта у односу на контролне услове (CTRL група).

У групи животиња која је била изложена третману екстрактом у дози од 250 mg/kg уочене су промене вредности TBARS и NO₂⁻ током посматраног периода. Наиме дошло је до значајног скока у концентрацији TBARS у првом и последњем минути реперфузије у односу на период стабилизације. Такође у првом минути реперфузије концентрација NO₂⁻ је била значајно виша у односу на остала два посматрана тренутка од интереса.

Примена екстракта довела је до значајног пада у концентрацији свих испитиваних прооксиданаса сем H_2O_2 након тридесетоминутне реперфузије у односу на здраве нетретиране животиње. Такође ниже вредности TBARS и O_2^- биле су забележене у овој групи и у првом минуту реперфузије.

Табела 30. Ефекти третмана екстрактом ивањског цвећа у дози од 250 mg/kg на прооксидационе маркере у коронарном венском ефлуенту здравих пацова.

		TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO_2^- (nmol/ml)	O_2^- (nmol/ml)	H_2O_2 (nmol/ml)
CTRL	C	22,3 \pm 2,4	97,7 \pm 14,9	58,3 \pm 1,3	56,5 \pm 4,2
	P1	27,4 \pm 1,8*	104,5 \pm 13,9	62 \pm 1	59,2 \pm 6,2
	P7	27,8 \pm 3*	105,8 \pm 21,2*	69,5 \pm 5,3*	61,5 \pm 3,4*
250 GVE	C	20,2 \pm 1,13	93,6 \pm 1,9	56,8 \pm 4,2	54,2 \pm 4,8
	P1	22,3 \pm 2,1* [¶]	102,3 \pm 1,2*	57,6 \pm 3,6 [¶]	57,5 \pm 2,1
	P7	22,6 \pm 1,21* [¶]	94,2 \pm 5,6 ^{#¶}	60,2 \pm 3,9 [¶]	58,4 \pm 4,9

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). C – стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - последњи минут реперфузије; *Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку C у групи; #Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку P1 у групи; [¶]Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на нетретиране животиње у истом тренутку од интереса.

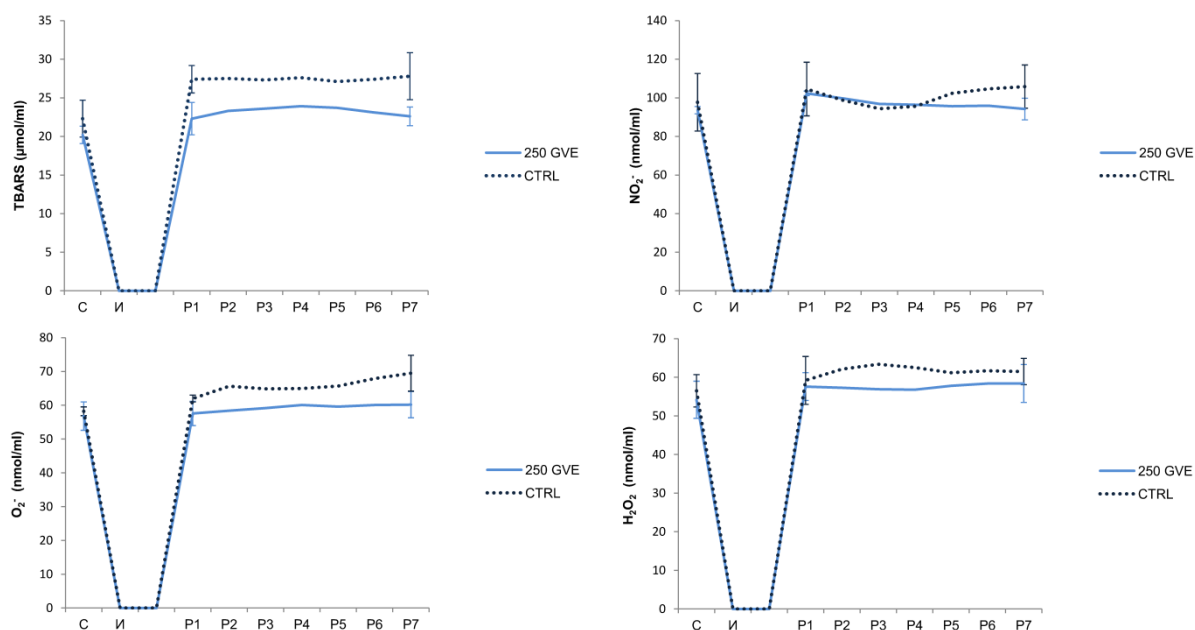


График 23. Прооксидациони маркери у коронарном венском ефлуенту здравих пацова који су били на третману екстрактом у дози од 250 mg/kg и нетретираних здравих пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). С - стабилизација; И - исхемија; P1-P7 - вредности бележене на сваких пет минута током тридесет минута реперфузије.

4.10.2.3. Ефекти 500 mg/kg екстракта ивањског цвећа на срчане прооксидационе маркере здравих пацова

Вредности маркера оксидационог стреса приказане су табеларно и графички (Табела 31, График 24). Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене параметара оксидационог стреса у групи животиња које су претходно биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg (500 GVE). Такође приказане су статистички значајне разлике у наведеним параметрима под утицајем 500 mg/kg екстракта у односу на контролне услове (CTRL група).

У групи која је била третирана екстрактом дошло је до смањења концентрације H_2O_2 на крају реперфузије у односу на период стабилизације, док су вредности осталих параметара биле непромењене. Такође концентрација $TBARS$ и NO_2^- била је значајно виша у првом минуту реперфузије у односу на стабилизацију и крај реперфузије, док је концентрација O_2^- у тридесетом минуту била нижа у односу на први минут реперфузије.

Третман екстрактом довео је до значајног снижења концентрације свих мерених прооксиданаса на крају реперфузије у односу на контролне услове. Такође сви маркери сем NO_2^- били су значајно нижи у првом минуту реперфузије у групи изложеној екстракту, док су TBARS и O_2^- бележили ниже концентрације и у моменту стабилизације.

Табела 31. Ефекти третмана екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg на прооксидационе маркере у коронарном венском ефлуенту здравих пацова.

		TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO_2^- (nmol/ml)	O_2^- (nmol/ml)	H_2O_2 (nmol/ml)
CTRL	C	22,3 ± 2,4	97,7 ± 14,9	58,3 ± 1,3	56,5 ± 4,2
	P1	27,4 ± 1,8*	104,5 ± 13,9	62 ± 1	59,2 ± 6,2
	P7	27,8 ± 3*	105,8 ± 21,2*	69,5 ± 5,3*	61,5 ± 3,4*
500 GVE	C	18,2 ± 1,8 ^{¶¶}	96,7 ± 6,1	50,9 ± 5,4 ^{¶¶}	54,5 ± 5,7
	P1	24,3 ± 1,5* [¶]	107,9 ± 5,2*	54,1 ± 3,2 ^{¶¶}	52,4 ± 5,1 ^{¶¶}
	P7	19,2 ± 2,3 ^{#¶¶}	91,9 ± 5,8 ^{¶¶}	50,1 ± 2,9 ^{#¶¶}	49,5 ± 4* ^{¶¶}

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$).
 C – стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - последњи минут реперфузије;
 *Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку C у групи;
 #Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку P1 у групи;
 ¶Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на нетретиране животиње у истом тренутку од интереса.

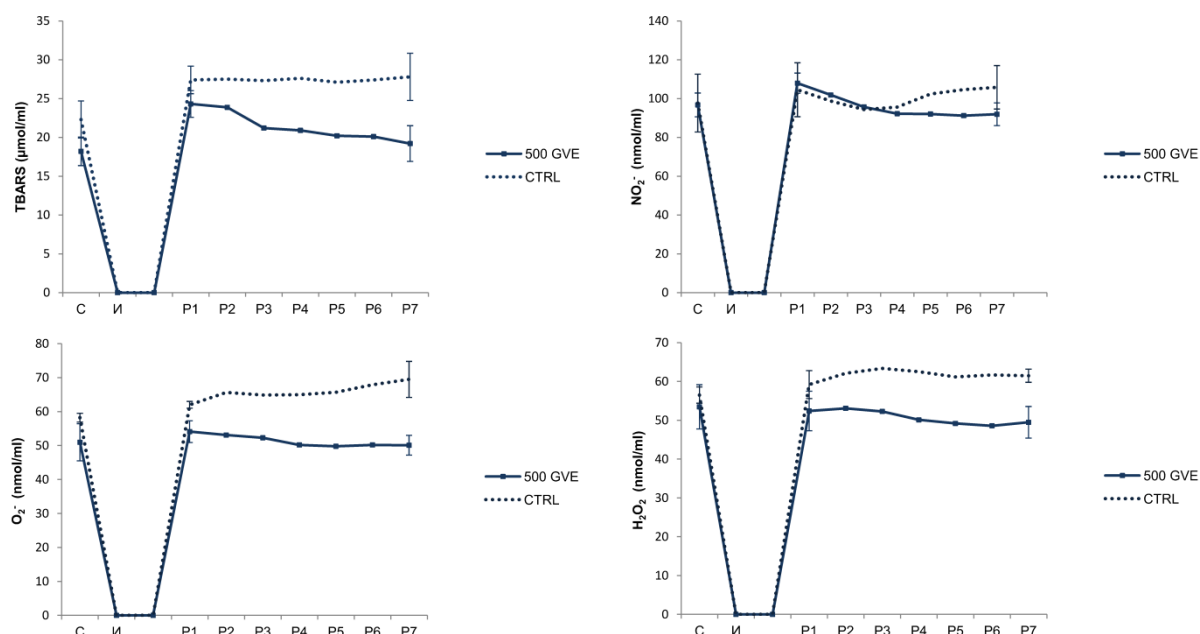


График 24. Прооксидациони маркери у коронарном венском ефлуенту здравих пацова који су били на третману екстрактом у дози од 500 mg/kg и нетретираних здравих пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). С - стабилизација; И - исхемија; P1-P7 - вредности бележене на сваких пет минута током тридесет минута реперфузије.

4.10.2.4. Промене срчаних прооксидационих маркера здравих пацова у односу на примењену дозу екстракта ивањског цвећа

Разлике у вредностима прооксидационих маркера у коронарном венском ефлуенту под утицајем 500, 250 и 125 mg/kg екстракта приказане су на Графику 25. Резултати су представљени у виду средњих вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$) са статистички значајном разликом за вредност $p < 0,05$ и статистички високо значајном разликом за вредност $p < 0,01$.

Концентрација TBARS је била значајно нижа у стабилизацији и на крају реперфузије у групи подвргнутој највишој у односу на најнижу дозу. Такође нижа вредност TBARS откривена је на крају реперфузије у групи на третману 500 mg/kg у односу на 250 mg/kg и 250 mg/kg у односу на 125 mg/kg екстракта. У групи која је користила највишу дозу концентрација NO_2^- је била значајно виша у првом минуту реперфузије и нижа на крају реперфузије у односу на најнижу дозу. Код пацова третираних са 500 mg/kg екстракта откривен је значајно нижи ниво O_2^- у односу на

остале две дозе у свим испитиваним тренуцима и H_2O_2 у првом и последњем минути реперфузије.

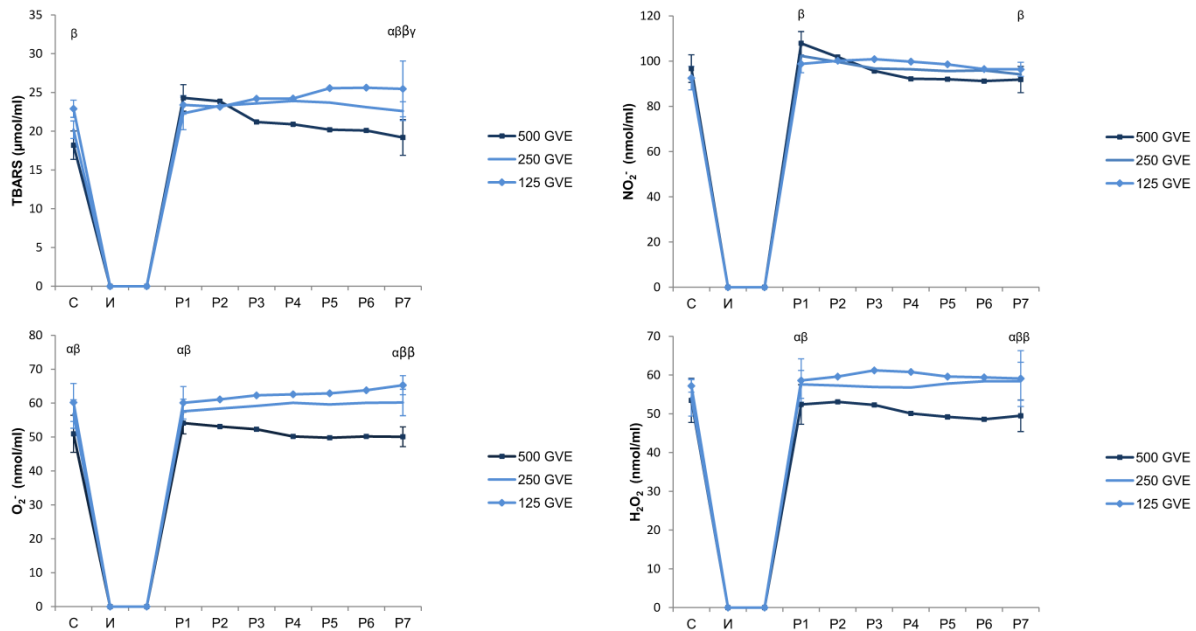


График 25. Поређење ефеката различитих доза екстракта ивањског цвећа на концентрацију срчаних прооксиданаса код здравих пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). С - стабилизација; И - исхемија; P1-P7 - вредности бележене на сваких пет минута током тридесет минута реперфузије. ^{α} Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе SHR + 500 GVE и SHR + 250 GVE у тренутку од интереса; ^{β} Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе SHR + 500 GVE и SHR + 125 GVE; ^{$\beta\beta$} Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ између групе SHR + 500 GVE и SHR + 125 GVE; ^{γ} Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе SHR + 250 GVE и SHR + 125 GVE.

4.10.3. Ефекти екстракта ивањског цвећа на маркере оксидационог стреса у перфузату изолованог срца спонтано хипертензивних пацова

4.10.3.1. Ефекти 125 mg/kg екстракта ивањског цвећа на срчане прооксидационе маркере спонтано хипертензивних пацова

Протоколом исхемије (20 мин) и реперфузије (30 мин) праћене су промене параметара оксидационог стреса у групи хипертензивних животиња на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg (SHR+ 125 GVE). Вредности маркера оксидационог стреса приказане су табеларно и графички (Табела 32, График 26).

У групи која је конзумирала 125 mg/kg екстракта дошло је до значајног скока у концентрацији свих испитиваних параметара на крају реперфузије у односу на стабилизациони период. Додатно откривена је виша концентрација TBARS у P1 у односу на C, као и NO₂⁻ и H₂O₂ у P7 у односу на P1.

Након примене екстракта уочавају се смањене концентрације TBARS на крају реперфузије и повишене NO₂⁻ у периоду стабилизације у односу на хипертензивну контролну групу. Такође код третираних пацова забележена је нижа концентрација O₂⁻ у свим тренуцима од интереса.

Табела 32. Ефекти третмана екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg на прооксидационе маркере у коронарном венском ефлуенту спонтано хипертензивних пацова.

		TBARS (μmol/ml)	NO ₂ ⁻ (nmol/ml)	O ₂ ⁻ (nmol/ml)	H ₂ O ₂ (nmol/ml)
	C	21 ± 1,8	87,7 ± 3,2	62,1 ± 2,5	58,3 ± 2,1
SHR	P1	25,5 ± 2,1	103,6 ± 2,1	65 ± 4,7	64,2 ± 3,6
	P7	30,2 ± 2,3	106,3 ± 3,2	70,2 ± 3,8	67,8 ± 1,7
SHR + 125 GVE	C	22,2 ± 1,5	93,5 ± 2,5 [¶]	56,9 ± 2,3 [¶]	59,5 ± 4,5
	P1	27,8 ± 3,6*	98,5 ± 4,9	59,6 ± 6,5 [¶]	60,2 ± 6,8
	P7	26,1 ± 2,8* [¶]	107,1 ± 8,9* [#]	61,2 ± 7,2* [¶]	66,6 ± 9,2* [#]

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X ± SD). C – стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - последњи минут реперфузије; *Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку C у групи; [#]Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку P1 у групи; [¶]Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на нетретиране животиње у истом тренутку од интереса.

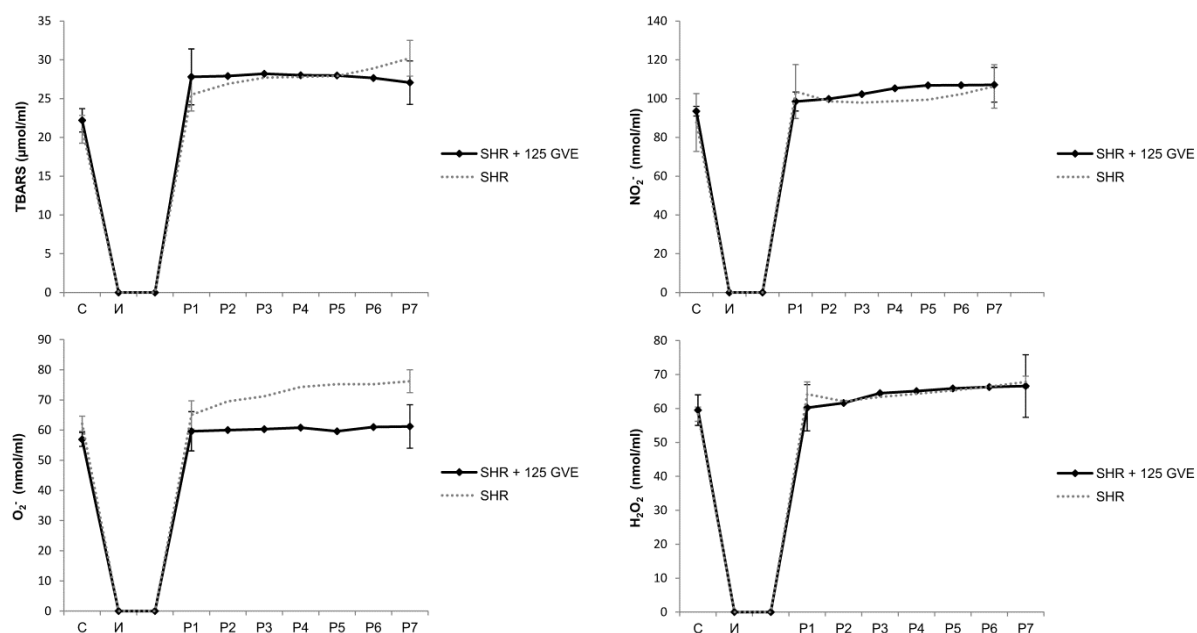


График 26. Прооксидациони маркери у коронарном венском ефлуенту спонтано хипертензивних пацова који су били на третману екстрактом од 125 mg/kg и нетретираних хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). С - стабилизација; И - исхемија; P1-P7 - вредности бележене на сваких пет минута током тридесет минута реперфузије.

4.10.3.2. Ефекти 250 mg/kg екстракта ивањског цвећа на срчане прооксидационе маркере спонтано хипертензивних пацова

Вредности маркера оксидационог стреса приказане су табеларно и графички (Табела 33, График 27). Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене параметара оксидационог стреса у групи спонтано-хипертензивних животиња које су претходно биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 250 mg/kg (SHR + 250 GVE). Такође приказане су статистички значајне разлике у наведеним параметрима под утицајем 250 mg/kg екстракта у односу на контролне услове (SHR група).

Третман екстрактом у дози од 250 mg/kg довео је до повећања концентрације NO_2^- и O_2^- на крају реперфузије у односу на период пре исхемије, док су концентрације ТВАРS и H_2O_2 биле непромењене током испитиваног периода.

Примена екстракта довела је до пада у концентрацији свих испитиваних параметара на крају реперфузије у односу на нетретиране контролне животиње.

Додатно уочене су и ниже концентрације NO_2^- , O_2^- и H_2O_2 у првом минуту реперфузије, а O_2^- и у стабилизацији.

Табела 33. Ефекти третмана екстрактом ивањског цвећа у дози од 250 mg/kg на прооксидационе маркере у коронарном венском ефлуенту спонтано-хипертензивних пацова.

		TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO_2^- (nmol/ml)	O_2^- (nmol/ml)	H_2O_2 (nmol/ml)
	C	21 \pm 1,8	87,7 \pm 3,2	62,1 \pm 2,5	58,3 \pm 2,1
SHR	P1	25,5 \pm 2,1	103,6 \pm 2,1	65 \pm 4,7	64,2 \pm 3,6
	P7	30,2 \pm 2,3	106,3 \pm 3,2	70,2 \pm 3,8	67,8 \pm 1,7
SHR + 250 GVE	C	23,2 \pm 1,2	90,2 \pm 1,69	57,8 \pm 1,2 [¶]	56,6 \pm 2,3
	P1	25,6 \pm 2,3	95,6 \pm 5,6 [¶]	60,2 \pm 5,9 [¶]	58,4 \pm 7,1 [¶]
	P7	25,2 \pm 1,9 [¶]	100,2 \pm 4,9*	63,4 \pm 4,4* [¶]	56,8 \pm 4,9 [¶]

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).
 C – стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - последњи минут реперфузије;
 *Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку C у групи;
 #Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку P1 у групи;
 ¶Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на нетретираних животиње у истом тренутку од интереса.

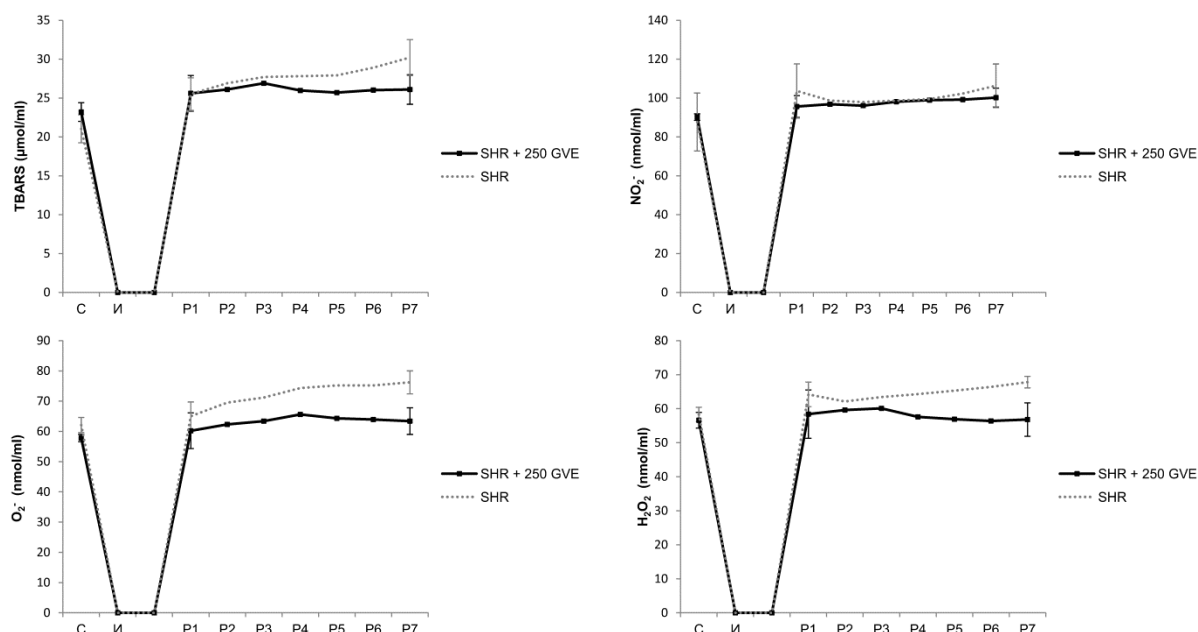


График 27. Прооксидациони маркери у коронарном венском ефлуенту спонтано хипертензивних пацова који су били на третману екстрактом од 250 mg/kg и нетретираних хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). С - стабилизација; И - исхемија; P1-P7 – вредности бележене на сваких пет минута током тридесет минута реперфузије.

4.10.3.3. Ефекти 500 mg/kg екстракта ивањског цвећа на срчане прооксидационе маркере спонтано хипертензивних пацова

Вредности маркера оксидационог стреса приказане су табеларно и графички (Табела 34, График 28). Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене параметара оксидационог стреса у групи спонтано-хипертензивних животиња које су претходно биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg (SHR + 500 GVE). Такође приказане су статистички значајне разлике у наведеним параметрима под утицајем 500 mg/kg екстракта у односу на контролне услове (SHR група).

Примена екстракта у највишој дози довела је скока у концентрацији NO_2^- у првом минуту реперфузије и пада у концентрацијама O_2^- и H_2O_2 на крају реперфузије у односу на период стабилизације. Такође ниво O_2^- је био нижи на крају тридесетоминутне реперфузије и у односу на први мунут повратка протока.

Третман екстрактом у дози од 500 mg/kg довео је до значајног снижења концентрације TBARS, O₂⁻ и H₂O₂ на крају реперфузије у односу на нетретиране хипертензивне животиње.

Табела 34. Ефекти третмана екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg на прооксидационе маркере у коронарном венском ефлуенту спонтано хипертензивних пацова.

		TBARS (μmol/ml)	NO ₂ ⁻ (nmol/ml)	O ₂ ⁻ (nmol/ml)	H ₂ O ₂ (nmol/ml)
	C	21 ± 1,8	87,7 ± 3,2	62,1 ± 2,5	58,3 ± 2,1
SHR	P1	25,5 ± 2,1	103,6 ± 2,1	65 ± 4,7	64,2 ± 3,6
	P7	30,2 ± 2,3	106,3 ± 3,2	70,2 ± 3,8	67,8 ± 1,7
SHR + 500 GVE	C	22,9 ± 1,4	94,5 ± 6,1	56,9 ± 5,5	57,7 ± 5,7
	P1	23,3 ± 1,9	100,9 ± 4,1*	59,2 ± 5,4	53,41 ± 5,1 [†]
	P7	22,3 ± 0,4 ^{††}	97,2 ± 5,8	50,1 ± 2,9* ^{#††}	50,5 ± 4,1* ^{††}

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X ± SD). C – стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - последњи минут реперфузије; *Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку C у групи; #Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку P1 у групи; [†]Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на нетретиране животиње у истом тренутку од интереса.

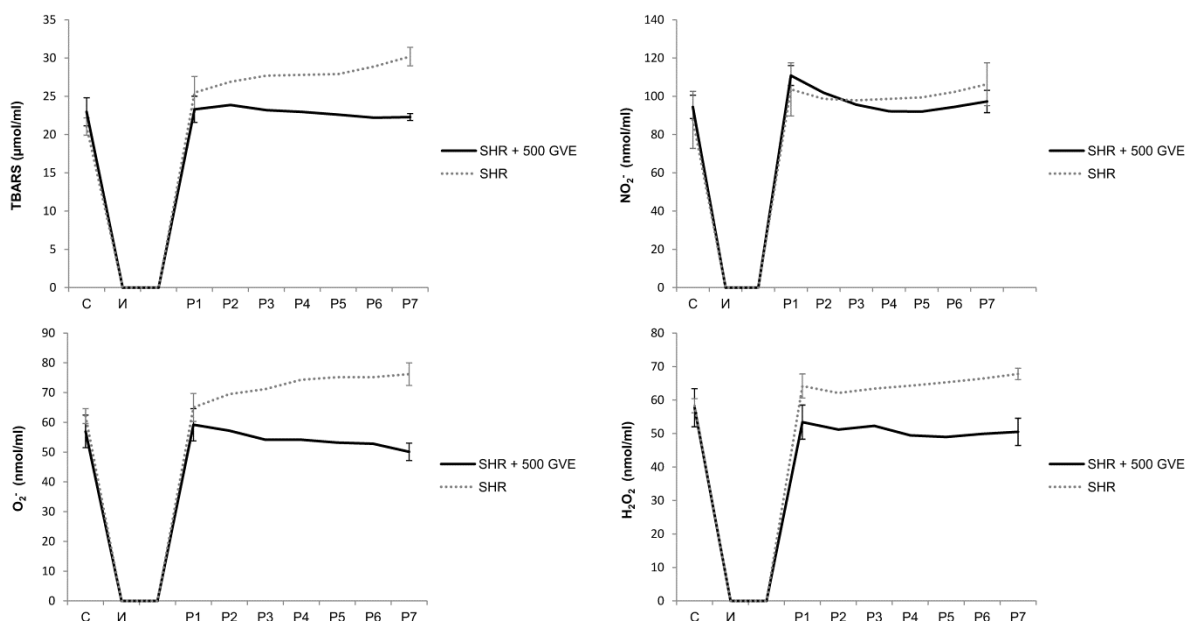


График 28. Прооксидациони маркери у коронарном венском ефлуенту спонтано хипертензивних пацова који су били на третману екстрактом од 500 mg/kg и нетретираних хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). С - стабилизација; И - исхемија; P1-P7 - вредности бележене на сваких пет минута током тридесет минута реперфузије.

4.10.3.4. Промене срчаних прооксидационих маркера спонтано хипертензивних пацова у односу на примењену дозу екстракта ивањског цвећа

Разлике у вредностима прооксидационих маркера у коронарном венском ефлуенту хипертензивних пацова под утицајем 500, 250 и 125 mg/kg екстракта приказане су на Графику 29. Резултати су представљени у виду средњих вредности+стандардна девијација ($X \pm SD$) са статистички значајном разликом за вредност $p < 0,05$ и $p < 0,01$ између група хипертензивних пацова на третману различитим дозама екстракта.

Статистички значајна разлика између пацова који су користили највишу дозу у односу на остале две дозе уочава се у концентрацијама свих испитиваних прооксиданаса. Наиме третман дозом од 500 mg/kg био је повезан са значајно нижим концентрацијама свих параметара на крају реперфузије у односу на дозу од 125 mg/kg и нижим концентрацијама TBARS, O₂⁻ и H₂O₂ у односу на дозу од 250 mg/kg. Такође TBARS и H₂O₂ су били нижи у групи изложеној највишој дози у првом минуту

реперфузије у односу на најнижу дозу, док је H_2O_2 били нижи у односу на дозу од 250 mg/kg. У групи на третману 500 mg/kg екстракта откривен је скок у нивоу NO_2^- у првом минути реперфузије у односу на друге две групе. Разлика између пацова који су користили 250 mg/kg и 125 mg/kg екстракта уочава се у вредностима параметара H_2O_2 и NO_2^- по завршетку реперфузије који су били значајно нижи у групи која је користила 250 mg/kg екстракта.

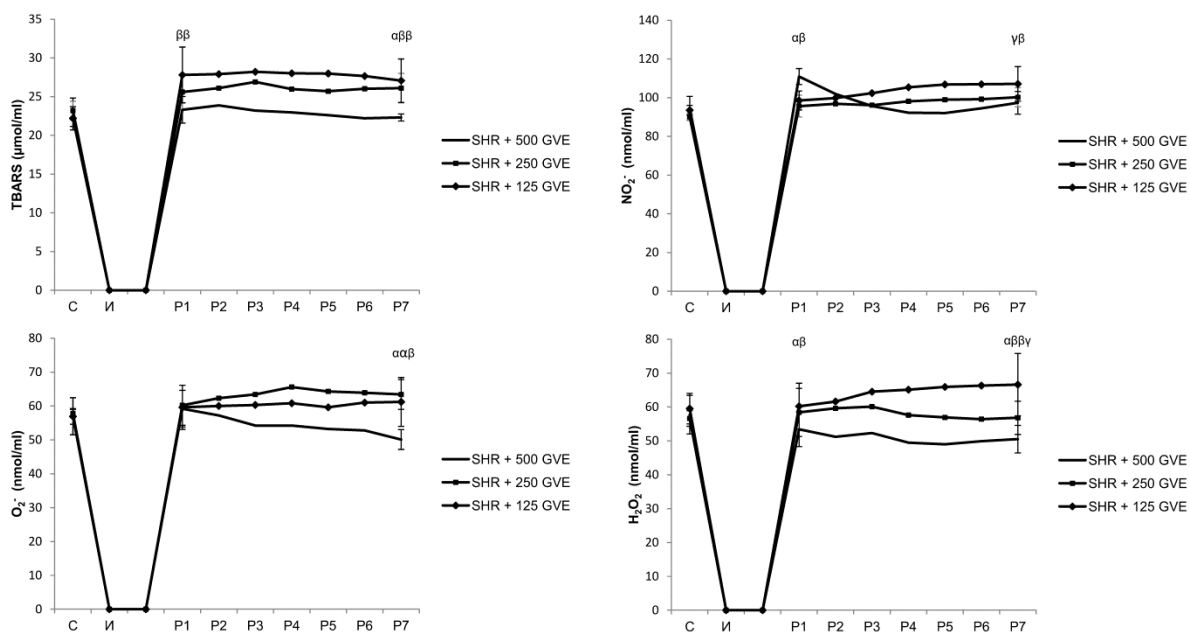


График 29. Поређење ефеката различитих доза екстракта ивањског цвећа на концентрацију прооксидационих маркера у коронарном венском ефлуенту спонтано хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). C - стабилизација; И - исхемија; P1-P7 - вредности бележене на сваких пет минута током тридесет минута реперфузије. α Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе SHR + 500 GVE и SHR + 250 GVE у тренутку од интереса; β Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе SHR + 500 GVE и SHR + 125 GVE; $\beta\beta$ Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ између групе SHR + 500 GVE и SHR + 125 GVE; γ Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе SHR + 250 GVE и SHR + 125 GVE.

4.10.4. Разлике у ефектима екстракта ивањског цвећа на срчане прооксидантне маркере код здравих и спонтано хипертензивних пацова

Промене вредности срчаних прооксиданаса у групи нормотензивних и спонтано хипертензивних животиња под утицајем различитих доза екстракта приказане су графички (Графици 30, 31 и 32). Резултати су представљени у виду средњих вредности+стандардна девијација ($X\pm SD$) са статистички значајном, односно статистички високо значајно разликом за вредност $p<0,05$, односно $p<0,01$ између нормотензивних и хипертензивних животиња на третману истом дозом екстракта у тачакама од интереса.

У групи хипертензивних животиња које су биле изложене екстракту у дози од 125 mg/kg забележене су: виша концентрација TBARS у првом минуту реперфузије и виша концентрација NO_2^- и H_2O_2 на крају реперфузије (График 30).

Једина разлика која је забележена између групе хипертензивних и нормотензивних пацова који су били изложене екстракту у дози од 250 mg/kg била је виша концентрација TBARS код хипертензивних пацова у свим тачкама од интереса и O_2^- на крају реперфузије (График 31).

У групи хипертензивних животиња које су биле изложене екстракту у дози од 500 mg/kg забележене су: више концентрације TBARS у тренутку стабилизације и на крају реперфузије и O_2^- у тренутку стабилизације и првом минуту реперфузије (График 32).

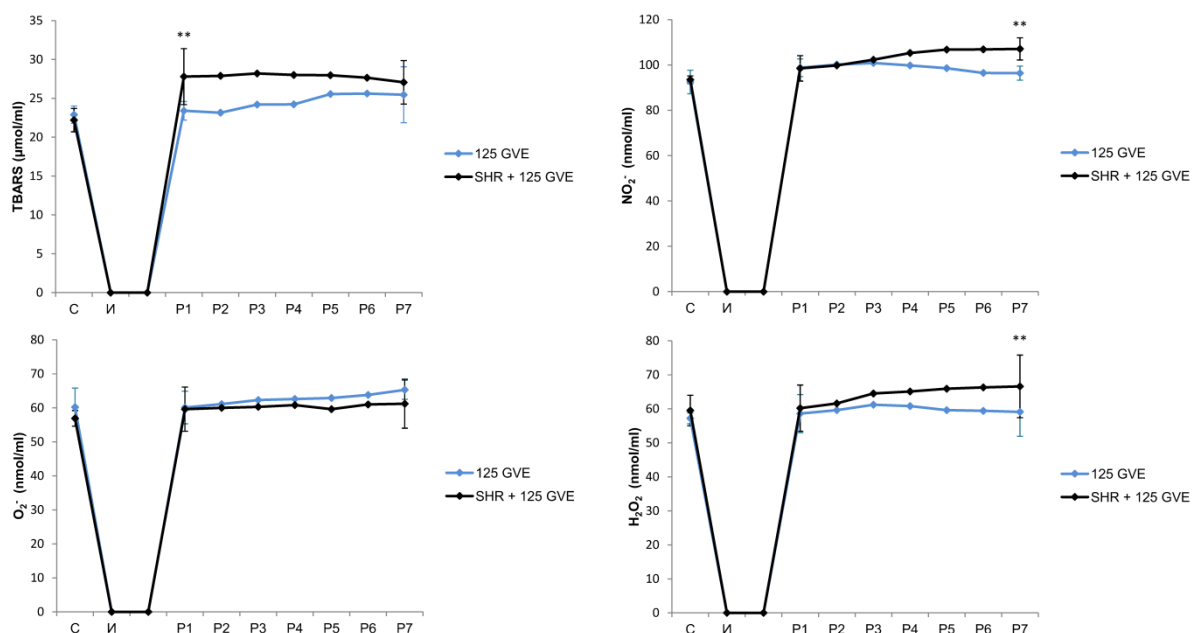


График 30. Поређење ефеката 125 mg/kg екстракта ивањског цвећа на срчане прооксидантне маркере нормотензивних и спонтано хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). C - стабилизација; И - исхемија; P1-P7 - вредности бележене на сваких пет минута током тридесет минута реперфузије. * Статистички значајна разлика између група 125 GVE и SHR + 125 GVE; ** статистички високо значајна разлика између група 125 GVE и SHR + 125 GVE.

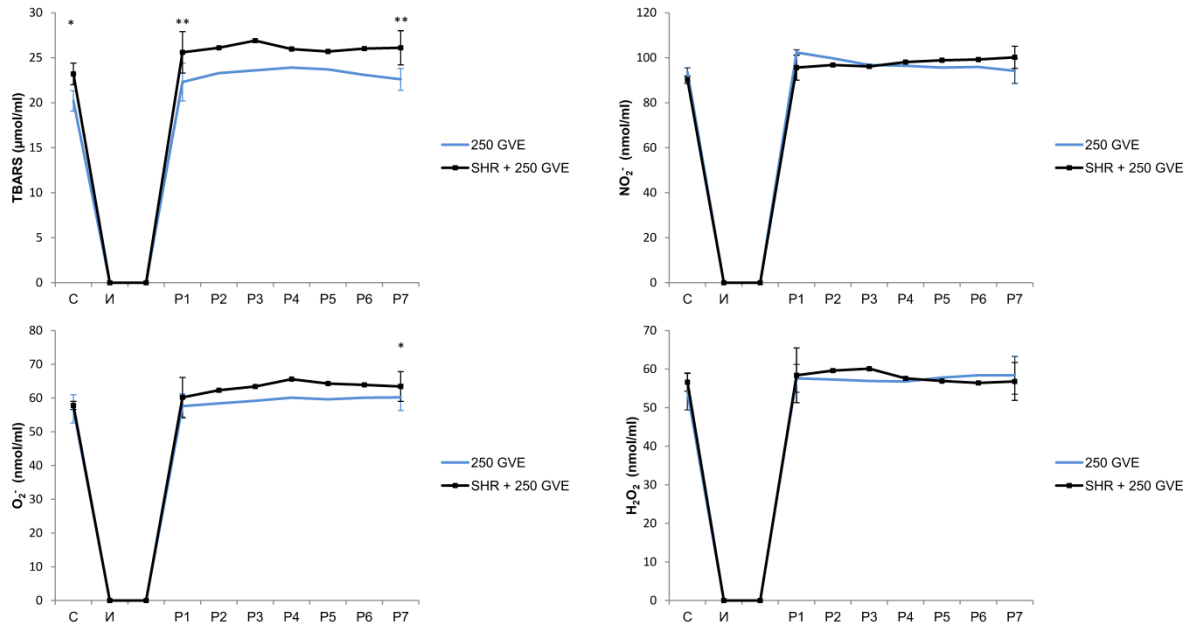


График 31. Поређење ефеката 250 mg/kg екстракта ивањског цвећа на срчане прооксидантне маркере нормотензивних и спонтано-хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). С - стабилизација; И - исхемија; P1-P7 - вредности бележене на сваких пет минута током тридесет минута реперфузије. * Статистички значајна разлика између група 250 GVE и SHR + 250 GVE; ** статистички високо значајна разлика између група 250 GVE и SHR + 250 GVE.

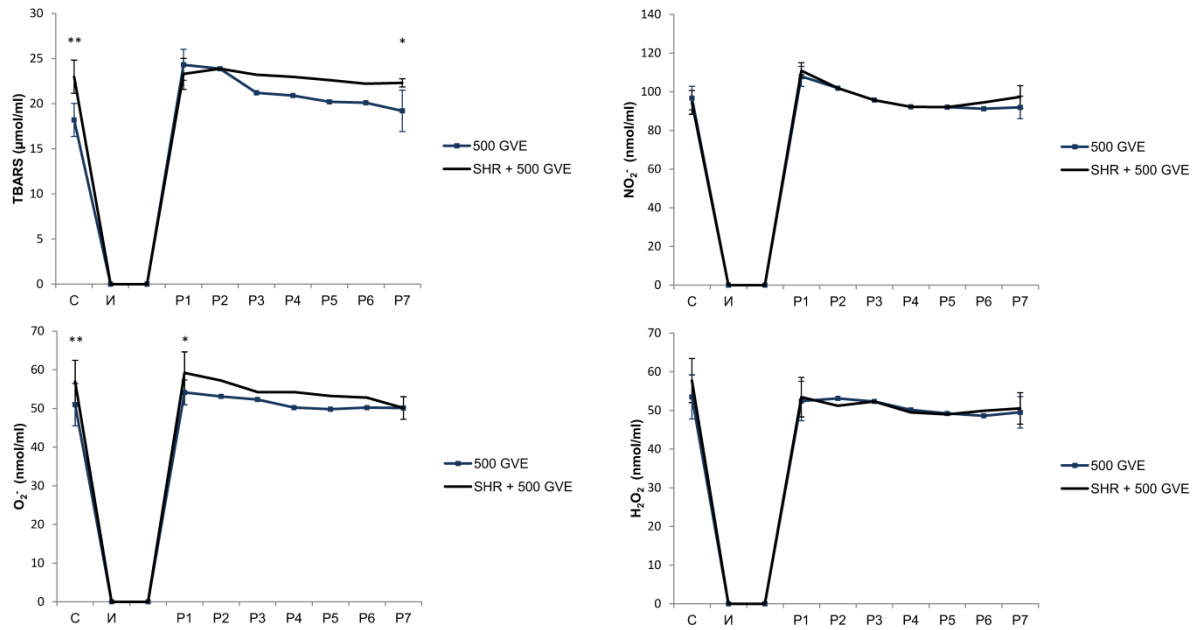
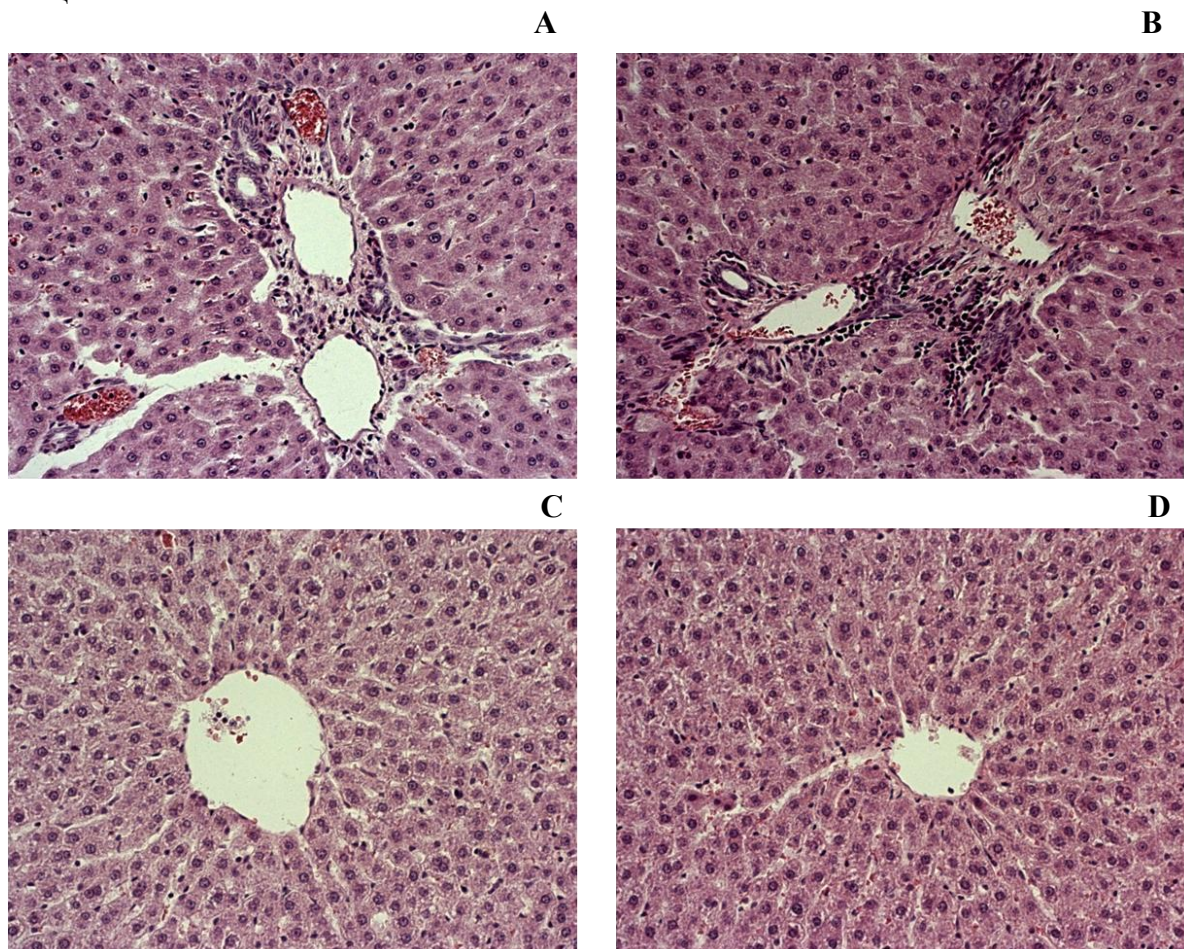


График 32. Поређење ефеката 500 mg/kg екстракта ивањског цвећа на срчане прооксидантне маркере нормотензивних и спонтано хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). С - стабилизација; И - исхемија; P1-P7 – вредности бележене на сваких пет минута током тридесет минута реперфузије. * Статистички значајна разлика између група 500 GVE и SHR+500 GVE; ** статистички високо значајна разлика између група 500 GVE и SHR+500 GVE.

4.11. Ефекти екстраката ивањског цвећа на очуваност грађе органа пацова

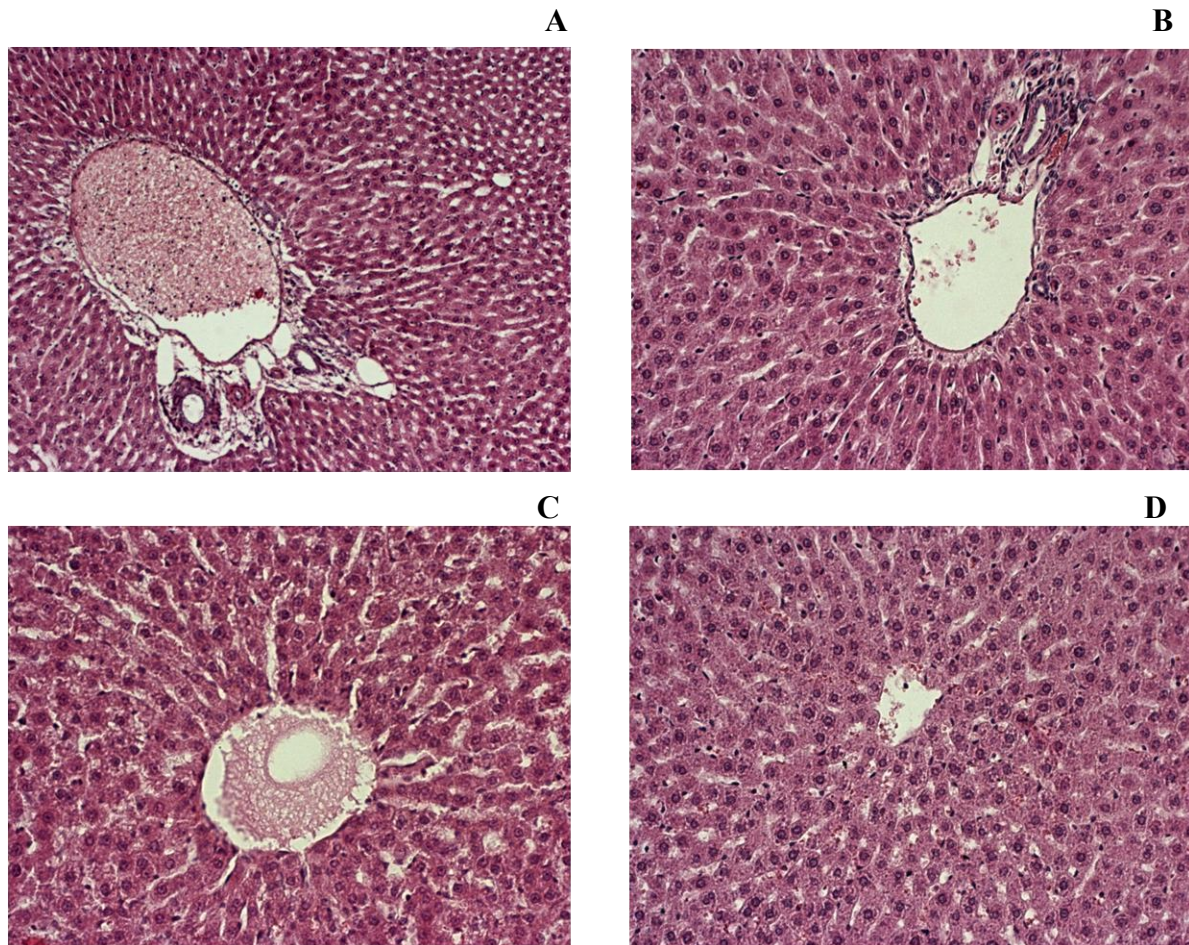
4.11.1. Ефекти екстраката ивањског цвећа на очуваност грађе јетре здравих и спонтано хипертензивних пацова

Грађа јетре здравих нетретираних као и животиња које су биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg, 250 mg/kg и 500 mg/kg приказана је на слици 11.



Слика 11. Хистопатолошке промене у јетри здравих пацова (увећање, x 200): А, С- CTRL група; В, D- 500 GVE група.

Грађа јетре спонтано хипертензивних нетретираних као и животиња које су биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg, 250 mg/kg и 500 mg/kg приказана је на слици 12.



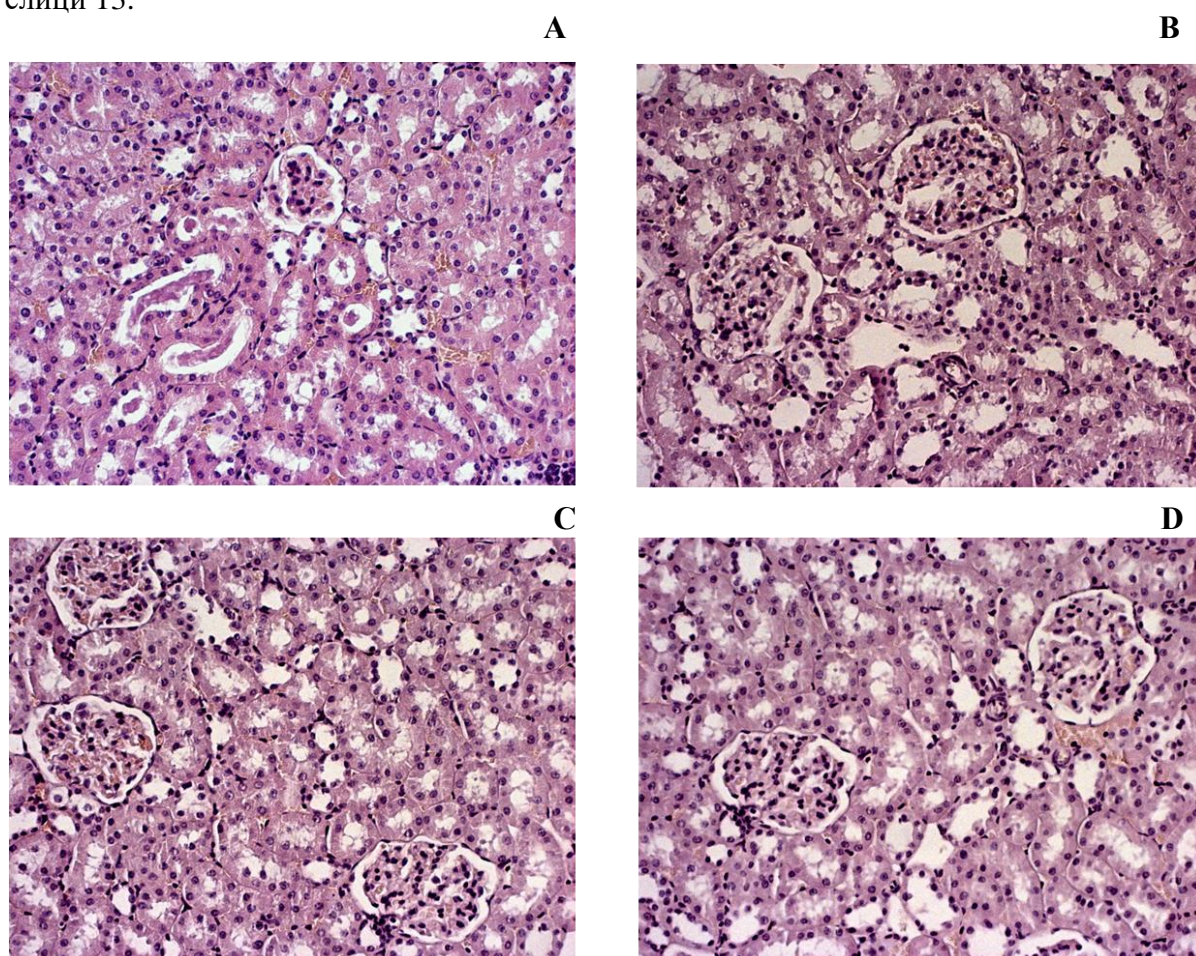
Слика 12. Хистопатолошке промене у јетри спонтано хипертензивних пацова (увећање, x200): А, С- SHR група; В, D- SHR + 500 GVE група.

Микроскопска анализа јетриног паренхима свих жртвованих животиња је подразумевала највећу површину са по 3 пресека на прескок од 20 микрона. Нема разлика у хистолошким променама између група и здравих и хипертензивних пацова чак ни након третмана екстрактом ивањског цвећа у растућим дозама. У свим групама животиња уочено је следеће: јетрин паренхим је углавном очуване лобуларне грађе са централно постављеном венном од које су у неправилно радијалном аранжману постављене гредице хепатоцита између којих се налазе синусоидални простори лако, а перивенуларно израженије дилатирани, углавном нормалне целуларности са уочљивим, појединачним, неправилно размештеним моноклеарним ћелијама и Купферовим макрофагима. Додатно, портни простори су нормоцелуларни, фокално садрже више од једног билијарног каналића. Без регуларности у односу на лобуларну архитектуру јетре уочавају се дегенеративне промене хидропсног типа и микрофокуси, углавном

уницелуларних некроза. Присутна је хиперемија, најизраженије перивенуларно, фокално хидропсна дегенерација хепатоцита и некроза.

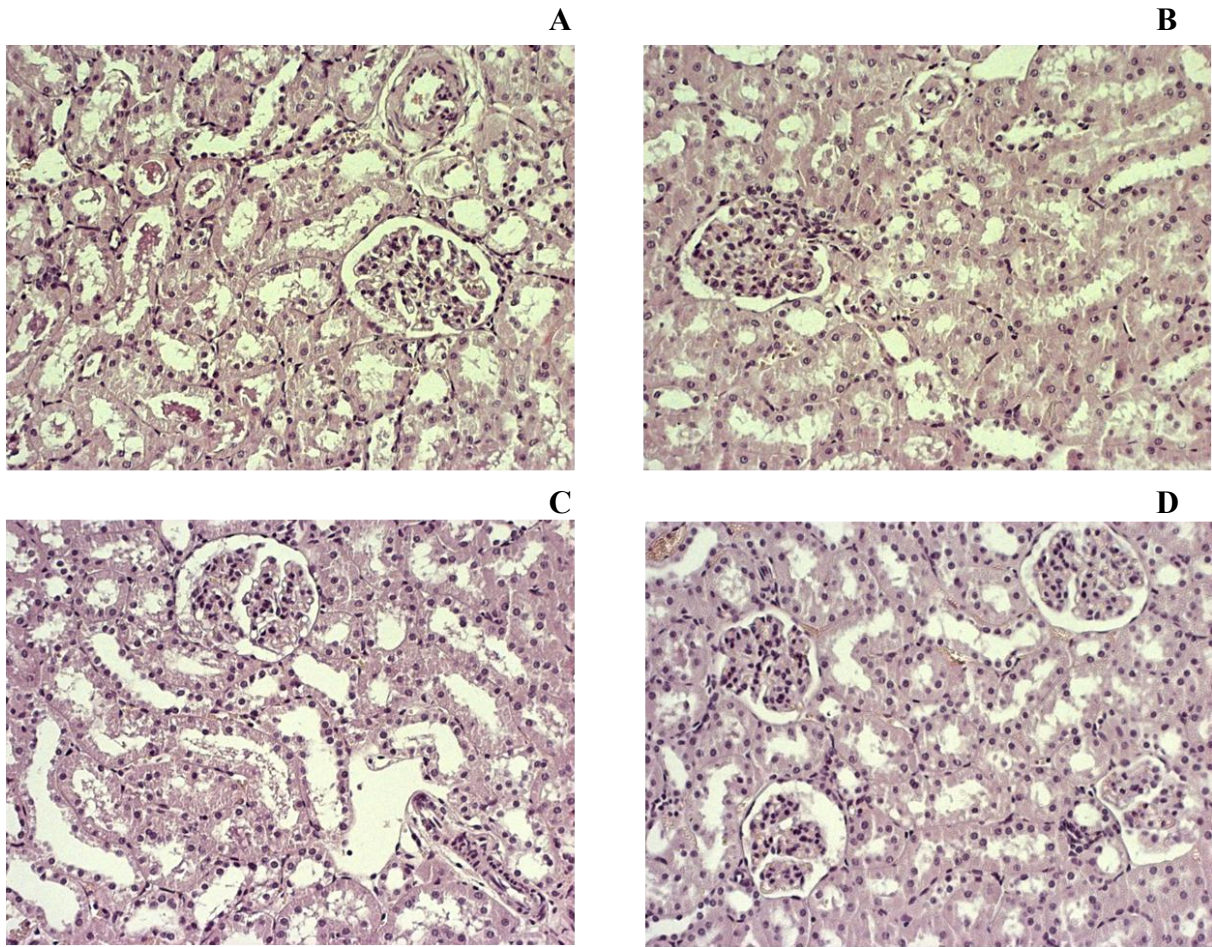
4.11.2. Ефекти екстракта ивањског цвећа на очуваност грађе бубрега здравих и спонтано хипертензивних пацова

Грађа бубрега здравих нетретираних као и животиња које су биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg, 250 mg/kg и 500 mg/kg приказана је на слици 13.



Слика 13. Хистопатолошке промене у бубрезима здравих пацова (увећање, x200): А- CTRL група; В- 125 GVE група; С- 250 GVE група; D- 500 GVE група.

Грађа бубрега спонтано хипертензивних нетретираних као и животиња које су биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg, 250 mg/kg и 500 mg/kg приказана је на слици 14.



Слика 14. Хистопатолошке промене у бубрезима спонтано хипертензивних пацова (увећање, x200): А- SHR група; В- SHR + 125 GVE група; С- SHR + 250 GVE група; D- SHR + 500 GVE група.

Процена оштећења бубрега извршена је на основу присуства следећих карактеристика, а према дефинисаној скали (144):

1. Губитак четкастог покрива (симплификација епитела тубула)
2. Губитак епителних ћелија
3. Некроза
4. Интралуминални ћелијски дебрис
5. Интралуминални хомогени цилиндри

Табела 35. Скала за процену степена промена структуре бубрега.

Степен промена	Процентуална заступљеност оштећења тубула
Градус 0	<10%
Градус I	10-25%
Градус II	26-50%
Градус III	51-75%
Градус IV	>76%

Резултати процене промена структуре бубрега здравих пацова приказани су у Табели 36.

Табела 36. Утицај екстраката ивањског цвећа на промену структуре бубрега здравих и спонтано хипертензивних пацова.

Група	Градус
CTRL	2
125 GVE	1
250 GVE	1
500 GVE	0
SHR	3
SHR + 125 GVE	2
SHR + 250 GVE	2
SHR + 500 GVE	1

Анализирани су уздужни пресеци оба бубрега пацова из свих група. Праћене су хистолошке промене на свим функционално -морфолошким сегментима коре и медуле бубрега, при чему су се издвојиле промене на крвним судовима, гломерулима и проксималним тубулима нефрона.

Крвни судови бубрега здравих пацова су регуларне морфологије, док се код бубрега спонтано хипертензивних пацова, посебно на артериолама и малим мишићним артеријама, уочава знатно задебљање зида уз последично сужење лумена. Гломерули како здравих тако и спонтано хипертензивних пацова су углавном регуларне морфологије, са фокалним променама у групи хипертензивних животиња. Фокалне промене су биле највише изражене у групи нетретираних хипертензивних пацова, у виду хипоцелуларности, проширења субкапсуларног простора и местимичне

еозинофилне хомогенизације налик фибрози. Најупадљивије промене су присутне на проксималним тубулима. Према раније дефинисаном скору оцењиване су хистолошке промене у бубрезима и уочено је да су оне најизраженије код нетретираних пацова, и то више код нетретираних хипертензивних пацова, са оштећењем које захвата од 50 до 75% површине. Најмање промене које подразумевају мање од 10% оштећења биле су присутне код здравих пацова који су били на третману највишом дозом екстракта. Нема упадљиве разлике у градусу оштећења између пацова који су користили средњу и најнижу дозу екстракта ни у групи здравих ни спонтано хипертензивних животиња.

4.11.3. Ефекти екстракта ивањског цвећа на очуваност грађе срца здравих и спонтано хипертензивних пацова након исхемије-реперфузије

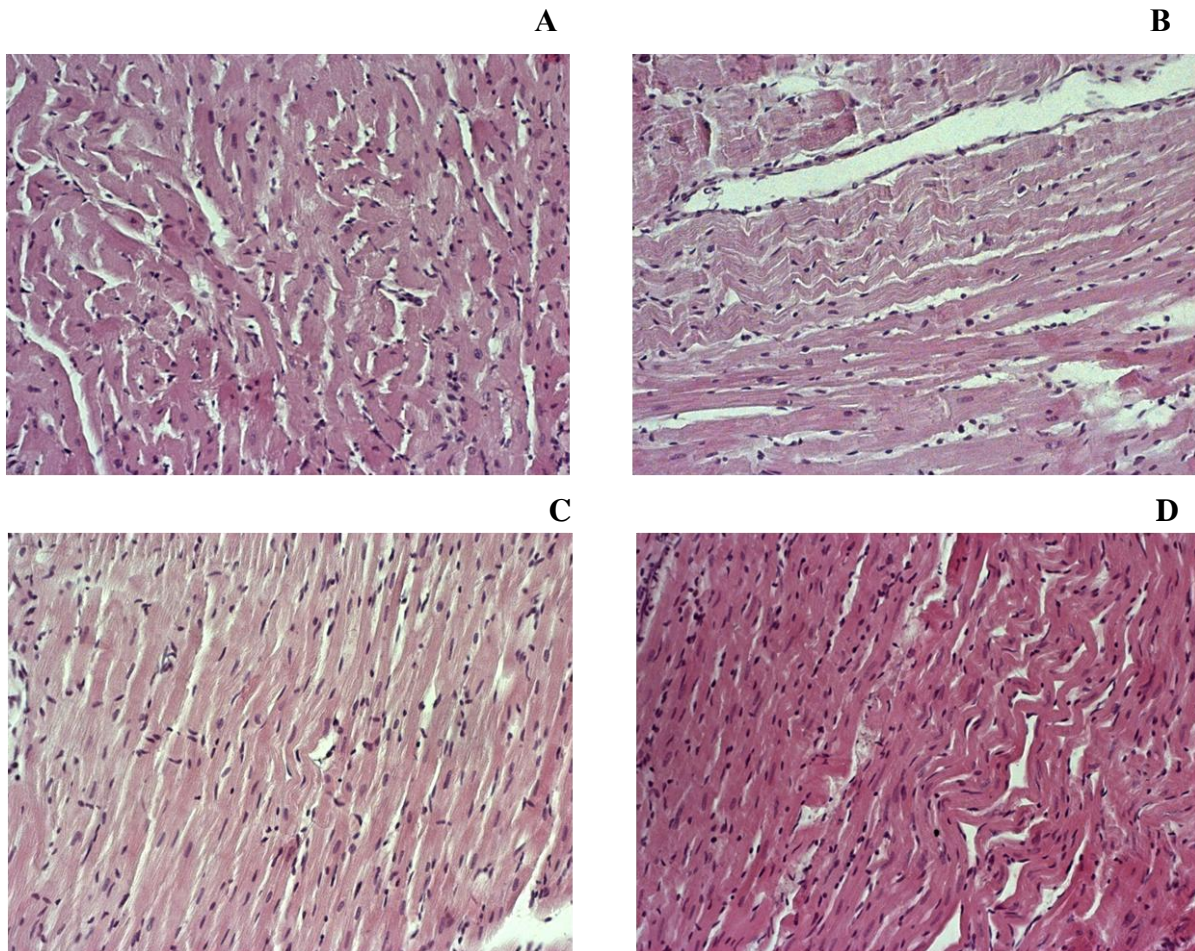
Микроскопски су анализирани уздужни пресеци срца свих пацова, прављени на 3-4 mm од епикардне површине. Праћене су хистолошке промене на миокарду свих срчаних шупљина, са акцентом на миокард леве коморе, и то латерални зид, септум и апекс. Бележене су промене на мишићним влакнима, интерстицијуму и крвним судовима, посебно су градирани едем, запаљенска инфилтрација, степен некрозе и дегенеративних промена, према раније дефинисаном скору (Табела 37) (145).

Табела 37. Скала за процену степена промена структуре срца.

Степен промена	Оштећење срчаног ткива
Градус 0	Регуларна хистоморфологија, дискретне дегенеративне промене
Градус I	Фокалне и уницелуларне некрозе ограничене на субендокардни појас, дискретне дегенеративне промене
Градус II	Фокалне, мрљасте некрозе
Градус III	Већа поља некрозе
Градус IV	Опсежна поља конфлуентне некрозе

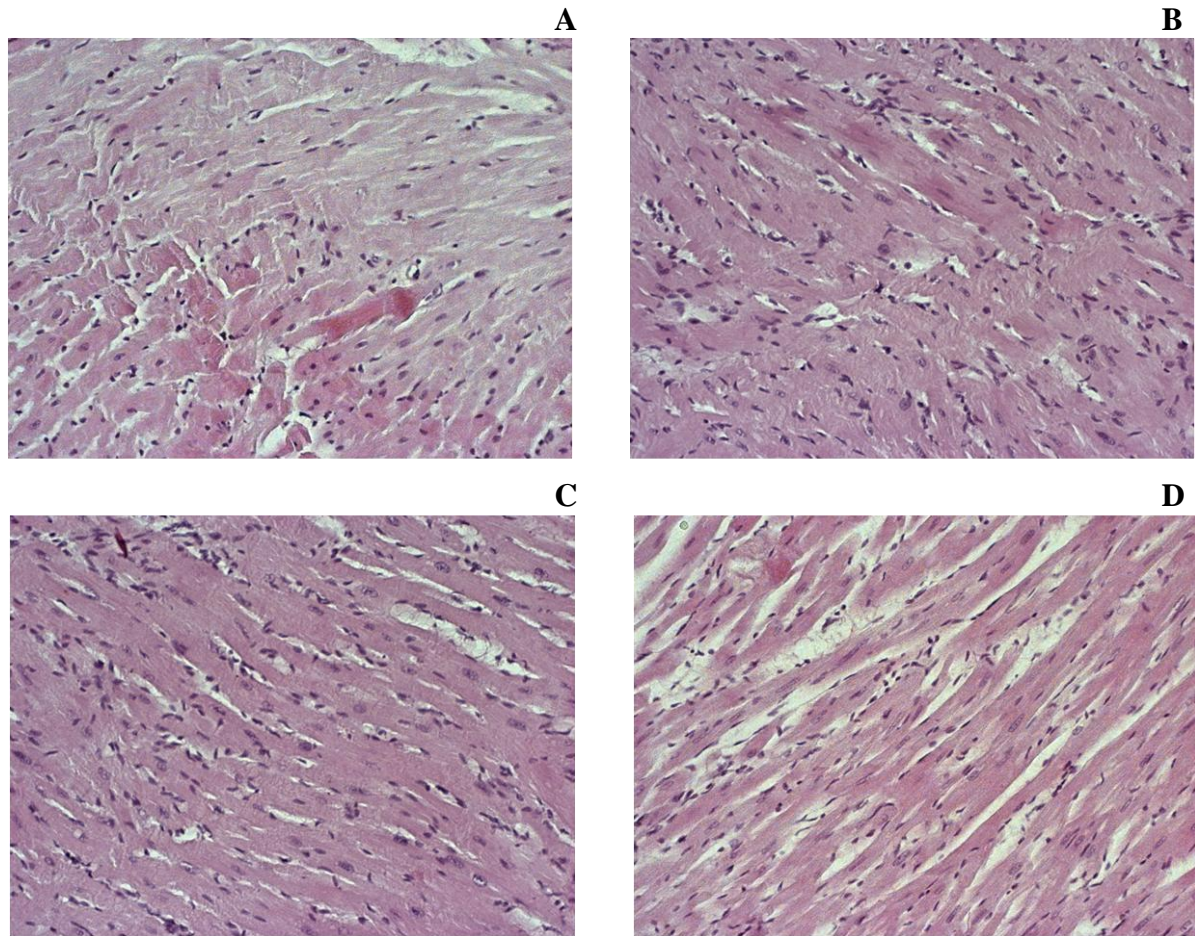
Микроморфолошке промене које су дефинисале некрозу и дегенерацију су укључивале: фрагментацију влакана, појаву контракционих трака, таласање и атенуацију влакана, хипереозинофилију, интрацитоплазматску вакуоларну дегенерацију и губитак попречне стријације, уз губитак, полиморфизам, едем, пикнозу и кариорексу једара.

Грађа срца нетретираних здравих животиња као и животиња које су биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 125, 250 и 500 mg/kg након излагања протоколу И-Р приказана је на слици 15.



Слика 15. Хистопатолошке промене у срцу здравих пацова након исхемије (увећање, x200): А- CTRL група; В- 125 GVE група; С- 250 GVE група; D- 500 GVE група.

Грађа срца нетретираних спонтано хипертензивних животиња као и животиња које су биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 125, 250 и 500 mg/kg након излагања протоколу И-Р приказана је на слици 16.



Слика 16. Хистопатолошке промене у срцу спонтано хипертензивних пацова након исхемије (увeћање, x200): A- SHR група; B- SHR + 125 GVE група; C- SHR + 250 GVE група; D- SHR + 500 GVE група.

Табела 38. Утицај екстракта ивањског цвећа на промену структуре срчаног ткива здравих и спонтано хипертензивних пацова након исхемије.

Група	Градус
CTRL	3
125 GVE	2
250 GVE	2
500 GVE	1
SHR	4
SHR + 125 GVE	3
SHR + 250 GVE	3
SHR + 500 GVE	1

Хистопатолошка анализа је показала да су крвни судови здравих пацова регуларне морфологије, док се у групи спонтано хипертензивних, посебно на артериолама и малим мишићним артеријама, уочава задебљање зида и сужење лумена.

Хистопатолошке промене на миокарду су најизраженије код срца нетретираних здравих и спонтано хипертензивних животиња. На срцу нетретираних животиња (Слика 15А и 16А) присутна су већа поља некрозе са фрагментацијом и хипереозинофилијом мишићних влакана, губитком једара или њиховом дегенерацијом, праћена едемом, појавом контракционих пруга и интрацитоплазматских вакуола, при чему је некроза израженија у виду већих, конфлуентних зона у SHR групи.

У групи здравих пацова најмање оштећење миокарда је присутно код животиња третираних са 500 mg/kg екстракта (Слика 15D). На миокарду доминирају дискретне дегенеративне промене влакана, лакостепени едем са благим полиморфизмом једара, уз уницелуларне и микроскопске некрозе ограничене на субендокардни појас (Слика 15D). Нема упадљиве разлике у степену некрозе и дегенерације мишићних влакана између група здравих пацова третираних средњом и најнижом дозом екстракта (Слика 15B и 15C), али су те промене мањег опсега и интензитета у односу на миокард нетретираних здравих пацова (15A).

На серијским пресецима исечака миокарда спонтано хипертензивних пацова који су били на третману екстрактом у највишој дози као и нетретираних пацова, хистолошки доминира хипертрофија мишићних влакана, дискретан едем, ретки фокуси хиперцелуларног интерстицијума моноклеарног и фиброцитно-фибробластног типа, некроза и дегенеративне промене. Некроза и дегенеративне промене су израженије у групи нетретираних пацова и укључују зоналне, конфлуентне некрозе, са хипереозинофилијом, фрагментацијом влакана и губитком једара. У групи пацова који су били на третману уочене су фокалне некрозе и захватају мањи број кардиомиоцита или су уницелуларне и ограничене само на субендокардни појас. Генерално гледано, у групи хипертензивних пацова хистолошке промене су најизраженије на миокарду нетретираних животиња, а најмање оштећење је присутно код животиња третираних са 500 mg/kg екстракта (Слика 16А и 16D) Нема разлике у степену некрозе и дегенерације мишићних влакана између миокарда пацова који су били изложени дози од 250 и 125 mg/kg екстракта (Слика 16B и 16C).

5. ДИСКУСИЈА

Избор ивањског цвећа као биљног материјала у овој докторској дисертацији заснован је на његовој широко распрострањеној традиционалној употреби кроз историју, па самим тим и могућој имплементацији као терапеутског средства у савременој медицини. Коришћена је екстракција под рефлуксом као метод добијања екстракта због раније утврђене предности над осталим техникама екстракције, која се огледа у повећаној растворљивости фенола и флавоноида у екстракционом растварачу на вишим температурама (26).

5.1. Хемијски састав екстракта ивањског цвећа

Будући да се фармаколошко деловање екстракта заснива на адитивној или синергистичкој активности једињења која улазе у његов састав, први циљ ове докторске дисертације био је да се изврши хемијска карактеризација воденог, метанолног и ацетонског екстракта ивањског цвећа. LC-DAD-MS/MS анализа коришћена је за одређивање квантитативне и квалитативне заступљености биомолекула у испитиваним екстрактима. Потврђено је присуство различитих биоактивних молекула, док су најзаступљенија једињења у свим екстрактима била: хлорогенска киселина, цинарозид, изокверцетин и р-кумаринска киселина. Ова анализа је пружила информација да су вода, метанол и ацетон екстраховали сличне биомолекуле, али у различитим количинама, у зависности од њихове растворљивости. Најважнији фактори који утичу на растворљивост полифенола су присуство и положај хидроксилних група, величина молекула и дужина угљоводоничних ланаца (148). Испитивањем укупног фенолног и флавоноидног садржаја откривен је највећи садржај фенола у воденом, а флавоноида у метанолном екстракту. Екстракт са највишим садржајем флавоноида, односно у овом случају метанолни, коришћен је за испитивање кардиопротективне и антиинфламацијске активности ивањског цвећа.

5.2. Способност неутрализације DPPH радикала

Конверзија стабилног слободног DPPH радикала у 1,1-дифенил-2-пикрилхидразин у присуству антиоксиданаса представља погодан, тачан и широко коришћен метод за испитивање способности природних једињења да неутралишу слободне радикале (149). Резултати ове студије јасно указују на то да испитивани екстракти показују антиоксидациони потенцијал, што се може приписати

синергистичким ефектима идентификованих биолошки активних једињења као што су феноли, флавоноиди (150). Антиоксидациона активност метанолног и воденог екстракта ивањског цвећа била је виша у односу на коришћени стандард ВНТ. Наши налази су у корелацији са резултатима других аутора који су открили да метанолни екстракт *G. verum* такође може да неутралише DPPH радикал уз IC 50 вредност од 8,04 $\mu\text{g/ml}$ (2). Међутим у истраживању спроведеном од стране других аутора метанолни екстракт ивањског цвећа, добијен ултразвучном екстракцијом, показао је значајно нижу способност неутралисања DPPH радикала (IC 50 = 26,97 \pm 1,21 $\mu\text{g/ml}$) у односу на наш метанолни екстракт. Једно од објашњења за нижи антиоксидациони потенцијал је могућа оксидација и деградација неких антиоксидативних супстанци током сонификације (148, 41). Додатно, метанолни екстракт *G. verum* сакупљен у Ирану испољио је мањи потенцијал за ублажавање оксидационог стреса (IC 50 вредност била је 59,6 \pm 0,04 $\mu\text{g/ml}$) у поређењу са метанолним екстрактом тестираним у нашој студији. Поред чињенице да су биљне врсте сакупљене са различитих локалитета, ова дискрепанца у резултатима је логична имајући у виду да су аутори студије екстраховали биљни материјал процесом мацерације на собној температури. Насупрот томе, екстракција под рефлуксом која је коришћена у нашој студији се сматра једном од најефикаснијих техника за изолацију антиоксидантних компоненти из биљних врста (55, 151). Поређењем различитих врсти из рода *Galium* запажено је да се *G. verum* издваја по изузетној антиоксидационој активности и већем садржају флавоноида као природних антиоксиданаса у односу на *G. molugo*, *G. odoratum* и *G. aparine* (20).

Имајући у виду да биолошка активност екстраката највише зависи од поларитета екстракционог растварача, циљ ове докторске дисертације је био и да се упореди антиоксидациону активност метанолног, воденог и ацетонског екстракта ивањског цвећа. Наши резултати су показали да највећу активност неутралисања DPPH поседује метанолни, док је најнижа активност ацетонског екстракта. Овај резултат је делимично очекиван пошто је већ познато да метанол има већу способност да екстрактује антиоксидантне супстанце, као што су феноли, у поређењу са водом и ацетоном. Неколико студија потврђује чињеницу да се највећа антиоксидативна активност може остварити ако се метанол користи као растварач (152). До сада није било истраживања која би указала на разлику у активности метанолног, воденог и ацетонског екстракта надземних делова ивањског цвећа ка „чишћењу“ DPPH радикала. Доступни подаци сугеришу на предност воде у односу на метанол када је реч о *in vitro* неутрализацији

DRPH екстракта, док се већа способност инхибиције пероксидације постиже метанолом (57).

5.3. Антимикробна активност екстракта ивањског цвећа

Обзиром на растућу инциденцу инфективних болести и резистенцију на доступне лекове, бројна истраживања су усмерена ка открићу нових агенаса са антимикробним својствима. Главни изазов у глобалној здравственој заштити је откриће нових, ефикасних и приступачних антиинфективних агенаса, а лековито биље се истиче као драгоцен извор бројних компонената са траженим карактеристикама (153). Лековите биљке и биљни екстракти као антимикробни агенси налазе се у жижи научног интересовања због своје безбедности, доступности и ниске цене. Такође применом једињења природног порекла могуће је превазићи јавно здравствени проблем резистенције микроорганизама на најчешће коришћене синтетске лекове (154).

На антимикробну активност једињења из биљака утичу бројни фактори као што су: генотип, услови средине, време прикупљања биљне врсте, услови чувања, географска локација и услови екстракције (155). И поред широке традиционалне примене ивањског цвећа, његов антимикробни потенцијал је недовољно истражен. Ефикасност ивањског цвећа у третману инфективних болести је научно потврђена, али утицај раствара различите поларности на антимикробна својства екстракта није довољно познат.

Како би се утврдило на који начин растварачи различите поларности утичу на карактеристике екстракта, испитиван је антибактеријски и антигљивични потенцијал воденог, ацетонског и метанолног екстракта ивањског цвећа. Наши резултати указују на умерену антибактеријску активност екстракта према већини испитиваних сојева, при чему није било разлике у активности према Грам позитивним и Грам негативним бактеријама. Интензитет антимикробне активности зависио је од врсте микроорганизама, при чему је запажена највећа сензитивност *Bacillus subtilis* ATCC 6633 према сва три типа екстракта, са израженијом активношћу метанолног и ацетонског. Такође по осетљивости на сва три екстракта се издвајају и *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и *Salmonella enterica*. Додатно, антигљивична активност је била генерално слаба према већини квасница и филаментозних гљива са изузетком *Aspergillus niger* ATCC која је осетљивија на ацетонски екстракт у односу на стандардни антифунгални лек флуконазол. Интензивнија антимикробна активност

уочена код ацетонског екстракта може се објаснити способношћу ацетона да екстрахује широк спектар једињења различите поларности која испољавају ефекат на патогене сојеве (153).

За разлику од планктонских микроорганизама који функционишу као индивидуалне ћелије, велики проблем на пољу инфективних болести представља формирање биофилма. Већина бактерија, гљива итд је способна да адхерира на биотичку и абиотичку површину и награди биофилм који показује другачије фенотипске карактеристике у односу на планктонске микроорганизме. Опасност формирања биофилма проистиче из чињенице да су бактерије унутар биофилма 10-1000 пута отпорније на антибиотике у односу на планктонске микроорганизме (156, 157). Будући да контрола сесилне заједнице представља изазов у терапији инфективних болести, наш циљ је био да испита и потенцијал екстракта да утиче на настајање биофилма, као и на већ формиран биофилм *B. subtilis* ATCC 6633 и *P. mirabilis* ATCC 12453. Уочили смо највећу ефикасност воденог екстракта према формирању биофилма наведених бактерија при концентрацији од 5 mg/ml и на формиран биофилм *P. mirabilis* ATCC 12453 при концентрацији од 5.47 mg/ml.

Испитивањем ефеката метанолног и хлороформског екстракта ивањског цвећа са територије Турске према хуманим патогеним клиничким изолатима *Candida albicans* уочено је да они не показују антигљивичну активност, што је у сагласности са резултатима нашег истраживања (54). Такође проучавани су ефекти воденог, алкохолног (70%) и хлороформског екстракта ивањског цвећа против следећих сојева бактерија: *Staphylococcus aureus* 15923, *Escherichia coli* 25922, *Pseudomonas aeruginosa* 2789, *Bacillus subtilis* 6633 и *Proteus vulgaris* 4636. Користећи диск дифузиону методу аутори су потврдили значајан антибактеријски потенцијал хлороформског екстракта у концентрацијама од 20 и 50 g/l према свим испитиваним врстама, а дијаметар инхибиције зоне раста је износио: 30, 3 ± 0,4 и 32,4 ± 0.3 mm против соја *S. aureus*, 12,0 ± 0,1 и 13,2 ± 0.2 mm против соја *E. coli*, 21,2 ± 0,2 и 20,2 ± 0,3 mm против соја *P. aeruginosa*, 20,2±0,3 и 30,3±0,4 против соја *B. subtilis* и 16,1 ± 0,3 и 15,1 ± 0,2 против соја *Proteus vulgaris*, редом. С друге стране, водени и алкохолни (70%) екстракт нису показали активност према испитиваним бактеријама. Такође у оквиру исте студије откривено је да су сојеви *B. subtilis* 6633 и *S. 15923* изузетно осетљиви на липофилни комплекс ивањског цвећа, што је у корелацији са нашим резултатима. Дијаметар зоне инхибиције раста за *S. aureus* 15923 износио је 32,4 ± 0,3, а за *B. subtilis* 6633 30,3 ± 0,4

(52). Ова група аутора предлаже генерално слабу активност према према соју *C. albicans*.

Додатно, проучавањем антибактеријских ефеката етанолног екстракта ивањског цвећа откривено је да је инхибиторна активност углавном усмерена према Грам-позитивним бактеријама (*S. aureus* и *Listeria. monocytogenes*) и у мањем степену према Грам-негативним бактеријама (*Salmonella typhimurium*, *E. coli*). Екстракт ове биљне врсте показао је умерену антибактеријску активност против *L. monocytogenes* (дијаметар инхибиције 16 mm) и ограничену активност према осталим тестираним патогенима. Дијаметри зоне инхибиције износили су: за *S. aureus* $11 \pm 0,05$, *E. coli* $10 \pm 0,05$ и *S. typhimurium* $12 \pm 0,05$. Такође у овом експерименту је откривено да етанолни екстракт ивањског цвећа испоњава слабу антифунгалну активност против *C. albicans*, са дијаметром зоне инхибиције раста $15 \pm 0,05$ (20).

Резултати истраживања спроведеног од стране *Quave* и сарадника 2008. године указује на то да етанолни екстракт ивањског цвећа са подручја Италије није имао ефекта на раст и настанак биофилма метицилин резистентног *S. aureus*-а (158). Према нашим досадашњим сазнањима, не постоје подаци о антибиофилм активности воденог, метанолног и ацетонског екстракта ивањског цвећа, као ни о њихових могућим разликама. Резултати ове докторске дисертације су први који пружају увид у предност воденог екстракта са аспекта инхибиторне активност према настанку биофилма.

Многобројне студије сведоче о употреби биљака како у циљу спречавања раста микроба, тако и због побољшања квалитета и безбедности хране. Биоактивна једињења из групе флавоноида, алкалоида, лектина, терпеноида се сматрају заслужнима за директни и индиректни антимикуробни ефекат биљних врста (103, 159, 160). И поред великог броја истраживања која потврђују антимикуробни потенцијал флавоноида, тачан механизам којим остварују ефекат на микроорганизме и даље остаје непознаница (161). Сматра се да механизми одговорни за директни антибактеријски ефекат флавоноида: инхибиција синтезе нуклеинских киселина, инхибиција функционисања цитоплазматске мембране, инхибиција енергетског метаболизма (161-163). Извештаји сугеришу да се инхибиторни ефекат једињења из групе флавоноида према *E.coli* заснива се на интеркалацији флавоноида у ДНК што резултира инхибицијом ДНК гиразе, као и могућности ових једињења да се компетитивно вежу за ДНК и ометају функцију гиразе. (164). Поред инхибиције синтезе нуклеинских киселина, флавоноиди попут хлорогенске киселине као једне од квантитативно најзаступљенијих компонената

наших екстраката, могу нарушити спољашњу и цитоплазматску мембрану бактерија (165). Спољашња мембрана Грам-негативних бактерија се састоји од липополисахарида (ЛПС) и протеина који су стабилисани помоћу електростатичких интеракција са двовалентним катјонима. Ањонске супстанце попут хлорогенске киселине могу да хелирају јоне Mg^{2+} и на тај начин да наруше интегритет спољне мембране бактерија, која губи своју баријерну функцију. На тај начин се побољшава ефикасност антибиотика који не би успели да испоље своје деловање у случају ненарушене спољне мембране (165, 166). Такође таргет за бројне флавоноиде представља и плазма мембрана, тако што ова једињења повећавају њену пропустљивост. Нарушавањем спољашње и плазма мембране омета се размена нутријената и метаболита и инхибира енергетско снабдевање бактерија (165, 167). Генерално посматрано, интегритет бактеријске плазма мембрана је неопходан за регуларно одвијање осморегулације, респирације, биосинтезе липида итд, а нарушавање њене структуре води у смрт бактерије. Док неполярна једињења из групе флавоноида пролазе хидрофобни слој мембране, поларна формирају водоничне везе са поларним главама липида. Додатно, неспецифичне интеракције флавоноида са фосфолипидима могу изазвати структурне промене мембране и утицати на функцију мембранских протеина (168).

Још један од претпостављених механизма антибактеријске активности флавоноида је и инхибиција синтезе ћелијске мембране и агрегаторни ефекат на ћелијски зид бактерија. Такође предложено је да одређена фенолна једињења могу спречити настајање биофилма, тако што обложе површину ћелија, измене њену површину и последично ометају интеракцију између бактеријске ћелије и површине супстрата (169, 170). Велики значај полифенола огледа се и у синергистичком ефекту са бројним антибиотцима, који се базира на инхибицији ефлуксне пумпе која је задужена за избацивање антибиотика (171, 172). Такође поједина флавоноида једињења могу инхибирати синтезу пептидогликана који је доминантно присутан у ћелијском зиду Грам позитивних бактерија, инхибирати ензим β лактамазу и дихидрофолат редуктазу (173, 174).

Сматра се да екстракти са добром активношћу према одређеним Грам-негативним бактеријама не морају нужно испољити високу ефикасност према осталим сојевима из групе Грам-негативних бактерија. Такође постоје различити ланци истих бактеријских врста и то треба имати у виду приликом тумачења добијених резултата антимицробне активности екстраката (160).

5.4. Антиинфламацијска активност екстракта ивањског цвећа

Будући да је примена синтетских антиинфламационих лекова повезана са појавом озбиљних нежељених ефеката, у фокусу истраживања последњих година налазе се природна једињења попут полифенола која могу изменити инфламациони одговор организма (175). Према нашим сазнањима нема података о улози ивањског цвећа у процесу инфламације, али имајући у виду њен хемијски састав, претпоставља се да би биоактивна једињења заједничким деловањем могла допринети смањењу запаљења. У циљу свеобухватног сагледавања терапијског потенцијала ивањског цвећа, један од наших циљева био је да испита утицај екстракта ове биљне врсте на развој едема шапе пацове на моделу карагенином изазване инфламације.

Наши резултати јасно указују на то све примењене дозе значајно смањују едем шапе пацова у односу на контролне услове, при чему су најбољи ефекти уочени након примене највеће дозе. Међутим ни највиша доза екстракта није успела да изазове степен инхибиције едема шапе који постиже референтни лек индометацин. Такође уочени ефекти екстракта су временски-зависни, указујући на то да је најмања инхибиција едема шапе у првим сатима, да би се након истека 4. сата испољила најизраженија редукција едема која је износили 25,71 %, 26,62% и 33,3% за дозе од 50, 100 и 200 mg/kg. Бројне студије сведоче о бифазном инфламационом одговору након примене карагенина. Наиме у иницијалној фази, односно у првом сату након инјекције карагенина, долази до ослобађања хистамина, серотонина и леукотриена и повећања васкуларне пропустљивости (176, 177). Још један значајан медијатор инфламације је NO који се на месту запаљења формира од стране бројних ћелија попут леукоцита, ендотелних ћелија и сензорних нервних ћелија. Сматра се да експресија COX-2 достиже максималну експресију 1 h након локалне апликације карагенина (178). Додатно, у наредној фази долази до инфилтрације неутрофила, продукције простагландина, брадикинина и развоја едема (176, 177). Ослобођени простагландини у садејству са хистамином и брадикинином доприносе развоју црвенила шапе и узрокују појачани проток на месту запаљења. Такође долази до ослобађања протеаза, лизозомалних ензима, миграције ћелија, активације и дегранулације (177, 179). Индометацин у нашем истраживању је испољио ефекте током друге фазе карагенином изазваног едема што је и очекивано обзиром да НСАИЛ инхибирају синтезу простагландина преко инхибиције COX (177). Примена нашег екстракта у средњој и највишој дози смањила је едем након 1. сата од апликације карагенина, док најнижа

доза није имала ефекта у тој иницијалној фази запаљенског одговора. У сагласности са литературним подацима, пик едема постигнут је након 3 сата од инјекције карагенина у свим групама, што потврђује развој локалне и акутне инфламацијске реакције (180).

Обзиром на то да нема информација о антиинфламационој активности ивањског цвећа, уочени ефекти екстракта на нашем моделу се могу објаснити са аспекта хемијског састава и присуства једињења из групе полифенола. Бројне студије указују на антиинфламацијске ефекте полифенола које остварују посредством неколико механизма: инхибицијом ензима који су одговорни за настанак еикосаноида, инхибицијом ослобађања хисамина, фосфодиестеразе, протеин киназе и активацијом транскриптазе (181, 182).

У развоју инфламације велики је значај ензима попут циклооксигеназе (COX), липооксигеназе (5-LOX) и фосфолипазе А2 и они представљају потенцијалне таргете за деловање полифенола. Почетну основу у инфламационом одговору представља ослобађање арахидонске киселине од стране фосфолипазе А2, која се даље оксидује до бројних медијатора запаљења (простагландина, тромбоксана) под утицајем COX и 5-LOX. *In vitro* и *in vivo* тестовима показано је да полифеноли поседују способност да измене, односно инхибирају активност фосфолипазе А2 и COX и намећу се као могући кандидати у лечењу инфламаторних болести (182, 183).

Кверцетин и хлорогена киселина су квантитативно доминантни у нашем екстракту па се може претпоставити да значајно доприносе уоченим ефектима на испитиваном моделу. Ова једињења могу да измене метаболизам арахидонске киселине на различитим нивоима и последично умање продукцију еикосаноида. Док је за хлорогену киселину потврђено да је потентни инхибитор COX, за кверцетин се сматра да инхибира и COX и 5-LOX ензиме (184, 185). Документовано је да су флавоноиди који испољавају антиагрегациону активност и потентни инхибитори COX и 5-LOX (182).

Поред набројаних механизма, флавоноиди могу и умањити ослобађање хистамина и на тај начин додатно допринети смањењу инфламационог одговора. Извештаји потврђују да хидроксиловани флавоноиди присутни у екстракту ивањског цвећа, као што су кемпферол и кверцетин итд, могу спречити продукцију TNF- α , деловањем на нивоу транскрипције или посредством фосфодиестеразе (182). Претходно спроведена студија испитивала је ефекте хлорогене киселине на продукцију интерлеукина 8 (IL-8) изазвану TNF- α и H₂O₂ у епителним Сасо-2 ћелијама. Откривено

је да ово једињење доводи до нискодне регулације продукције IL-8 (186). У сагласности са наведеном студијом, друга група истраживача потврдила је да хлорогена киселина умањује секрецију проинфламационих цитокина као што су IL-8 и IL-6 у Сасо-2 ћелијама стимулираним са тумор некрозис фактором α (TNF- α), липополисахаридом (ЛПС), IL-1 β и интерфероном γ (IFN- γ) (187). Наведени механизми могу донекле објаснити редукцију едема шапе пацова под утицајем ивањског цвећа у нашој студији.

Још један од потенцијалних начина којим флавоноиди остварују антиинфламациони ефекат подразумева утицај на протеинску тирозин киназу, протеин киназу Ц које су укључене у активацију ћелија током инфламације (182). Такође флавоноиди могу изменити инфламациони одговор инхибицијом активности I κ B киназе (188). Додатно, откривено је да су кемферол и кемферол 3-*O*-*d*- глукопиранозид, који су такође заступљени у екстракту ивањског цвећа, дозно-зависно инхибирани ЛПС и IFN- γ изазвану продукцију NO, TNF- α и IL-12 (189). Наведени механизми могу објаснити потенцијал екстракта ивањског цвећа да умањи едем шапе пацова на примењеном моделу инфламације изазване карагенином. Будући да флавоноиди имају способност да утичу на активност различитих медијатора запаљења, екстракти богати овом класом једињења попут ивањског цвећа истичу се као погодни агенси у третману инфламаторних стања. Обзиром на широку доступност ивањског цвећа, могуће је користити га или самостално или у комбинацији са осталим лековима у терапији различитих акутних и хроничних запаљенских стања.

Главни недостатак наведених података који се тичу молекулских механизма одговорних за ефекте флавоноида је што се морају испитати и потврдити на хуманој популацији. Такође иако је дозно-зависни ефекат флавоноида познат раније, и потврђен и у нашем истраживању, велики опрез треба постојати приликом повећања примењене дозе јер у високим дозама флавоноиди могу деловати као прооксиданси.

5.5. Ефекти екстраката ивањског цвећа на системски редокс статус пацова

5.5.1. Ефекти екстраката ивањског цвећа на системски редокс статус здравих пацова

Велика пажња научне јавности усмерена је на измену редокс хомеостазе под утицајем лековитих биљака и биљних екстраката који су богати природним

антиоксидансима (190). Стога један од наших циљева био је да испита да ли четворонедељни унос метанолног екстракта ивањског цвећа утиче на системски редокс статус, односно да ли може да повећа антиоксидациони капацитет здравих пацова.

Резултати овог истраживања указују на то да је примена екстракта ивањског цвећа довела до смањења концентрације мерених прооксиданаса, при чему је најизраженији ефекат уочен након примене дозе од 500 mg/kg. Када је реч о параметрима антиоксидационе заштите, третман екстрактом у највишој и средњој дози успео је да повећа активност SOD, док ни једна од примењених доза није утицала на CAT и GSH. Најзначајније дозно-зависне разлике у активности екстракта огледају се у знатно бољим антиоксидационим ефектима након конзумације 500 mg/kg у односу на 125 mg/kg.

Уочени ефекти екстракта ивањског цвећа на системски редокс статус се приписују присуству бројних једињења из групе полифенола. Наши резултати су показали да третман екстрактима доводи до пада у концентрацијама O_2^- и H_2O_2 , међутим динамика O_2^-/H_2O_2 не може се тумачити независно од активности ензима антиоксидационе одбране, као што су SOD и CAT. Повећана активност SOD под утицајем екстракта може бити одговорна за снижење нивоа O_2^- , обзиром да овај ензим катализује коверзију O_2^- у H_2O_2 (191). Стога се може претпоставити да је иницијална модулација SOD један од механизма којим ивањско цвеће испољава своје ефекте. Додатно, полифеноли могу инхибирати систем ксантин дехидрогеназа/ксантин оксидаза (ХО) што такође може допринети снижењу концентрације O_2^- и H_2O_2 и делимично објаснити добијене резултате (192). Поред свега наведеног, антиоксидациони потенцијал полифенола подразумева и њихову способност да делују као директни „хватачи“ слободних радикала (193, 194). Имајући у виду непромењене вредности CAT и GSH у свим групама пацова, може се претпоставити да је директна неутрализација слободних радикала, пре него активација антиоксидационог ензима заштите, доминантни механизам који је одговоран за снижење нивоа слободних радикала под утицајем ивањског цвећа. Полифеноли делују као директни „хватачи“ слободних радикала донирањем водониковог атома или трансфером електрона (195). Додатно, литературни подаци сугеришу да флавоноиди могу спречити оксидацију јона метала, а захваљујући потенцијалу да хелирају јоне метала у траговима, попут Fe^{2+} and Cu^+ , могу значајно утицати на метаболизам кисеоника и настанак ROS (196). Истраживања која су испитивала антиоксидациони потенцијал ивањског цвећа

користила су *in vitro* тестове, док података о утицају ове биљне врсте на системски редокс статус готово да нема (20, 41, 55). Према нашим сазнањима, једина студија у којој су одређивани параметри оксидационог стреса у крви пацова који су користили ивањско цвеће показала је способност екстракта да умањи липидну пероксидацију и повећа капацитет антиоксидационих ензима (56): Генерално гледано, обзиром на оскудан број података који се односе на антиоксидациону активност ивањског цвећа протективни ефекти наведеног ивањског цвећа се могу објаснити заједничким утицајем свих биоактивних једињења у екстракту. Кверцетин и његов гликозидно везани обик кверцетин-3-О-*Gl* се истичу по квантитативној заступљености у екстракту, а кверцетин је уједно и један од највише проучаваних полифенола. Његов антиоксидациони потенцијал је научно потврђен и везује се за присуство и положај –ОН субституената и катехолне групе у типу Б прстена у својој структури (196). Познато је да биоискористљивост и метаболизам полифенола ограничавају његову биолошку активност и зато је од великог значаја познавати понашање примењених полифенола у организму. Метаболизам кверцетина је највише испитиван и доказано је да његови метаболити поседују значајне антиоксидационе карактеристике (197, 198). Додатно, високе концентрације хлорогене и урсолне киселине у екстракту такође доприносе антиоксидационом деловању екстракта и могу обајаснити наше резултате. Бројне студије су потврдиле потенцијал ових једињења да спрече пероксидацију липидне мембране, што је у корелацији са нашим сазнањима. (184, 199). Иако су најблаготворнији ефекти ивањског цвећа уочени након примене највише дозе, приликом уноса полифенола треба бити обазрив јер јако велике дозе могу испољити и прооксидациону активност (200).

5.5.2. Ефекти екстракта ивањског цвећа на системски редокс статус спонтано хипертензивних пацова

Све већи број научних доказа иде у прилог томе да оксидациони стрес има кључну улогу у патогенези хипертензије и погоршању хипертензивних срчаних поремећаја. Повећана продукција РОС, а нарочито O_2^- у стању хипертензије може разградити NO који је један од главних ендогених вазодилататора. На тај начин се смањује биоискористљивост NO, компромитује процес релаксације артерија и модификује ендотелна функција (64). Из тог разлога једна од посебних актуелности

наше студије је испитивање утицаја примене екстракта ивањског цвећа на системски редокс статус хипертензивних пацова.

Наши резултати су показали да је четворонедељни унос екстракта у највишој и средњој дози довео је до снижења свих биомаркера системског оксидационог стреса, док је најнижа доза умањила системски ниво појединих прооксиданаса. Само највиша доза довела је до скока у активности SOD у односу на нетретирани животиње, док су активност CAT и ниво GSH остали непромењени под утицајем све три дозе екстракта. Генерално гледано екстракти ивањског цвећа су протективно утицали на редокс равнотежу пацова_што потврђују ниже концентрације системских прооксидационих маркера. Непромењене вредности антиоксидационих параметара указују на то да су уочене ниже концентрације прооксиданаса највероватније у највећој мери последица директне неутрализације слободних радикала под утицајем полифенола. С друге стране, повећање активности SOD након уноса екстракта у дози од 500 mg/kg иде у прилог томе да више концентрације полифенола могу побољшати антиоксидациони систем заштите хипертензивних пацова, док је овај утицај при нижим дозама занемарљив.

Природна биоактивна једињења из групе полифенола могу објаснити добијене резултате. Наиме полифеноли имају способност да инхибирају ензиме који производе РОС, као што су NADPH и XO, активирају и побољшавају експресију eNOS и повећају ниво GSH. На тај начин доприносе побољшању ендотелне функције, потпомажу нормализацију васкуларног тонуса и остварују антихипертензивни ефекат (201). Као што је и претходно наведено, велики допринос смањењу оксидационог стреса полифеноли остварују директним „хватањем“ слободних радикала.

Бројна истраживања сведоче о значају полифенола као антиоксиданаса у превенцији и терапији хипертензије. Мале измене у начину исхране које се односе на повећан унос природних антиоксиданаса могу остварити значајне бенефите код хипертензивних пацијената (202). Предност употребе лековитих биљака попут ивањског цвећа као извора антиоксиданаса над синтетским лековима огледа се у: добром безбедоносном профилу, ограниченим нежељеним ефектима, доброј биорасположивости и ограниченом потенцијалу да изазову прооксидационе ефекте (64).

5.5.3. Разлике у ефектима екстраката ивањског цвећа на системски редокс статус код здравих и хипертензивних пацова

У циљу бољег разумевања терапијског потенцијала ивањског цвећа поредили смо и ефекте екстракта на редокс статус здравих и хипертензивних пацова. Наши резултати јасно указују да је и након третмана свим дозама екстракта ивањског цвећа, оксидациони стрес у условима хипертензије остао повишен. Раније је утврђено да је хипертензија повезана са израженијом пероксидацијом липида и повећаном продукцијом РОС као што су O_2^- и H_2O_2 , што је у сагласности са нашим резултатима (203). Примена екстракта ивањског цвећа је значајно умањила повишен оксидациони стрес који се јавља у хипертензији и тиме потенцијално ублажила оштећење артерија, али није успела да достигне вредности које су присутне код здравих пацова.

5.6. Ефекти екстраката ивањског цвећа на *ex vivo* исхемијско-реперфузиону повреду срца

Међу водећим узроцима смртности и инвалидитета налазе се исхемијски поремећаји који укључују инфаркт миокарда, мождани удар и периферну васкуларну болест. Стога још од када је пре скоро 6 деценија први пут описана И-Р повреда, пажња научне јавности је усмерена ка открићу новог третмана који може ублажити дисфункцију миокарда. Како би се приступило развоју нове терапијске стратегије од круцијалног значаја је разумевање свих патолошких догађаја током реперфузије. Оксидациони стрес и изражени инфламациони одговор, који се карактерише инфилтрацијом проинфламаторних неутрофила у исхемијско ткиво, остају један од критичних фактора који доприносе оштећењу миокарда (62). Стога могући таргети за фармаколошко предкондиционирање могу бити ћелијски и ензимски извори стварања РОС, као и неколико инфламаторних медијатора. Примена полифенола или екстраката богатих полифенолима је у фази интензивног проучавања због антиоксидационих, антиромбогенних, антиинфламацијских и антиапоптоличких својстава (204). Бројна истраживања су потврдила протективну улогу биљних екстраката у И-Р изазваном оштећењу срца управо захваљујући антиоксидационом и антиинфламацијском потенцијалу полифенола и флавоноида (велика група полифенола) (78). До сада нема података о ефектима ивањског цвећа на функцију срца и потенцијал ове биљне врсте да ублажи оштећење срца и умањи оксидациони стрес је отворен за дискусију.

Претпоставили смо да четворонедељни третман екстрактом ивањског цвећа може да побољша функционалне и морфолошке карактеристике срца након исхемије. У циљу испитивања ефеката екстракта ивањског цвећа на И-Р повреду миокарда пратили смо параметре функције срца као и маркере оксидационог стреса у перфузату изолованог срца здравих и спонтано-хипертензивних пацова.

5.6.1. Утицај примене екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток пацова

5.6.1.1. Утицај примене екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток здравих пацова

Кардиодинамски параметри који су праћени у нашем истраживању односе се на функционалне карактеристике срца, посебно на леву комору и њену систолну и дијастолну функцију. На тај начин ефекти екстракта ивањског цвећа на измерене кардиодинамске варијабле одражавају његову потенцијалну терапијску улогу у моделу фармаколошког прекондиционирања.

Наши резултати јасно указују на то да су кардиодинамски параметри у контролним условима (CTRL група) значајно снижени током реперфузије у поређењу са вредностима пре исхемије. Уочена је депресија срчаног рада, као и ослабљене инотропне и лузитропне особине срца, које су евидентирани падом у апсолутним вредностима $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ на крају тридесетоминутне реперфузије у односу на вредности у стабилизацији. Такође забележен је и пад у систолној функцији срца (снижење SLVP вредности), фреквенци и коронарном протоку, потврђујући на тај начин да И-Р нарушава функцију миокарда.

Примена екстракта ивањског цвећа у свим дозама довела је до скока у вредности $dp/dt \max$ у првом минути реперфузије. Тај пораст код животиња које су користиле дозу екстракта од 500 mg/kg и 250 mg/kg је био реверзибилан и праћен је спорим континуираним падом током даље реперфузије, да би се по завршетку тридесетог минута вратио на вредности забележене пре исхемије. Једино у групи која је била на третману најнижом дозом екстракта вредности на крају реперфузије нису успеле да се приближе вредности у стабилизацији, већ су биле благо, али статистички значајно снижене. С друге стране уочени су протективни ефекти ивањског цвећа на стопу релаксације срца код примене све три дозе екстракта. Наиме средња и најнижа доза

екстракта спречиле су флукуације у вредностима $dp/dt \min$ чиме су омогућиле срцу да се релаксира без промена у снази. Највиша доза ивањског цвећа није само очувала релаксациону моћ срца, већ је и побољшала, што се одразило скоком у апсолутној вредности $dp/dt \min$ по завршетку посматраног периода у односу на стабилизациони период. Све примењене дозе екстракта довеле су до повећања наведених параметара контрактилности на крају реперфузије у односу на нетретиране пацове.

Примена све три дозе екстракта је спречила пад у вредностима SLVP и DLVP услед И-Р, што указује на потенцијал екстракта да очува систолну и дијастолну функцију леве коморе. Значајно побољшан систолни капацитет уочен је код пацова третираних екстрактима у највишој и средњој дози по завршетку реперфузије у односу на животиње без третмана. Међутим иако се вредност SLVP на крају триседетоминутног периода у групи која је користила 125 mg/kg није значајно разликовала од контроле, протективни ефекти чак и ове најниже дозе се огледају у одржавању систоле релативно константом, без флукуација у условима И-Р. Наши резултати сугеришу да четворонедељна употреба екстракта у све три дозе значајно доприноси побољшању систолне функције миокарда након глобалне исхемије.

Обзиром на то да нема доступних података о ефектима ивањског цвећа на параметре контрактилности и релаксације, наши резултати се могу објаснити деловањем једињења која улазе у састав екстракта. У метанолном екстракту ивањског цвећа најзаступљенија једињења су хлорогена киселина, кверцетин, урсолна киселина, лутеолин-7-О- *Glc* и кверцетин-3-О- *Glc*. У литератури се као један од кључних патофизиолошких догађаја који учествују у прогресији И-Р повреде наводи преоптерећење Ca^{2+} као резултат преузимања Ca^{2+} из цитосола у сакроплазматски ретикулум посредством Ca^{2+} -АТФ-азе (SERCA2a). Смањена експресија и активност SERCA2a, који су потврђени током И-Р изолованог срца пацова, додатно погоршавају Ca^{2+} overload и могу објаснити компромитовану систолну и дијастолну функцију срца нетретираних животиња. Повишен ниво Ca^{2+} у цитосолу доприноси отварању митохондријских транзиционих пора што води ка ћелијској смрти (205-207). С друге стране, сматра се да одређена флавоноидна једињења могу побољшати контрактилну снагу срца повећањем експресије SERCA2a, што утиче на повратак интрацелуларних Ca^{2+} резерви што обезбеђује довољно Ca^{2+} за наредну контракцију (207, 208). Наведени механизам модулације SERCA2a пумпе под утицајем полифенола може бити одговоран за побољшану контрактилност миокарда након уноса екстракта ивањског цвећа.

Група истраживача која је годинама проучавала ефекте лутеолина на кардиваскуларни систем указује да се његовом интрагастричном администрацијом спречава И-Р изазвано смањење активности SERCA2a. Овај ефекат лутеолин делимично остварује и преко активације PI3K/Akt сигналног пута, који је један од најзначајнијих сигналних механизма одговорних за регулисање ћелијског преживљавања. Показано је да лутеолин побољшава контрактилну снагу срца и превенирајући срчану фиброзу блокадом Ang II-TGFβ1 сигналног пута. Додатно на *in vitro* моделу је откривено да лутеолин доводи до бољег контрактилног одговора срца захваљујући активацији активацији SERCA2a преко p38 MAPK сигналног пута (207, 209). Такође постоје подаци који сведоче о стимулацији SERCA под утицајем ниских концентрација кверцетина у дужем временском периоду (< 25 μM). Насупрот томе акутна примена овог флавоноида не утиче на оптерећење калцијумом (210). Генерално гледано улога флавоноида у хомеостази калцијума је од изузетног значаја имајући у виду да флукуације у концентрацији овог јона услед губитка способности срца да одржи физиолошки интрацелуларни ниво може узроковати аритмије и контрактилну дисфункцију (208).

Додатно, хлорогена киселина је присутна у највећој концентрацији у нашем метанолном екстракту ивањског цвећа (15561±778 μg/g сувог екстракта). Претходно спроведена студија указује на то инфаркт миокарда доводи до тешке фиброзе са наглашеном инфилтрацијом макрофага. Међутим, орална примена хлорогене киселине у дози од 30 mg/kg током две недеље је ублажила фиброзне промене и супримира инфилтрацију макрофага, чиме је ефикасно спречила хронично васкуларно ремоделовање након инфаркта (211).

У циљу откривања дозно-зависног утицаја екстракта ивањског цвећа на *ex vivo* функцију срца извршено је поређење кардиодинамских параметара између група на третману 500 mg/kg, 250 mg/kg и 125 mg/kg екстракта. Највећи скок у параметрима dp/dt max и dp/dt min детектован је у групи која је била изложена највишој дози у односу на остале дозе у првом минуту повратка протока у срце. Међутим током реперфузије вредности оба параметра су полако опадале, да би се на крају тридесетог минута приближиле вредностима забележеним у групи која је користила 250 mg/kg екстракта. На крају реперфузије вредности у групи која је била третирана најнижом дозом екстракта су биле значајно ниже у односу на друге две дозе, указујући на израженији протективни ефекат на контрактилна и релаксациона својства срца при

вишим дозама екстракта. Бројни извештаји указују на то да је одговор срца на деловање флавоноида дозно-зависан. Показано је да кверцетин испољава позитивне инотропне и лузитропне ефекте при нижим концентрацијама (10^{-10} - 10^{-8} М), док при вишим (10^{-7} и 10^{-6} М) делује негативно инотропно и лузитропно (212). Такође протективни ефекти рутина на SERCA пумпу и последично на контрактилну моћ срца присутни су при нижим концентрацијама од 5–50 $\mu\text{mol/l}$, док је инхибиторни ефекат забележен при високим концентрацијама од 100–250 $\mu\text{mol/l}$ (213). Разлике у вредностима SLVP и DLVP између група на третману највишом и средњом дозом уочавају се у првим минутима реперфузије где је повећање вредности SLVP било резултат примене веће дозе екстракта. Међутим оно што је далеко важније су вредности на крају реперфузије, које одражавају касније последице И-Р повреде. У последњем минуту реперфузије, већи систолни и дијастолни капацитет срца постигнут је након примене највише у односу на најнижу дозу.

Када је реч о срчаној фреквенци, четворонедељни третман метанолним екстрактом ивањског цвећа у највишој дози узроковао је скок у вредности овог параметра у првом минуту реперфузије, али су се те вредности до краја реперфузије приближиле вредностима које су забележене у стабилизацији. Међутим, примена средње и најниже дозе није довела до варијација у вредностима срчане фреквенце током испитиваног периода, већ су се вредности одржале у константном опсегу. Непромењена срчана фреквенца омогућава срцу несметану контракцију и релаксацију, што још једном потврђује кардиопротективни потенцијал екстраката ове биљне врсте. Срчана фреквенца је била значајно виша у свим третираним у односу на нетретиране пацове након завршетка реперфузије. Претходно спроведено истраживање предлаже да кверцетин остварује ефекте на срцу преко β -адренергичког пута, а повећање срчане фреквенце је вероватно ефекат на срчани пејсмејкер (210).

Примена екстракта у дози од 500 и 250 mg/kg одржала је вредности коронарног протока константним током читавог експеримента, што је показатељ очуваног одговора коронарне циркулације након излагања исхемији и реперфузији. С друге стране, примена најниже дозе довела је до пораста коронарног протока у првом минуту реперфузије, који је праћен даљим падом, да би до краја тридесетог минута поново достигао вредности које су биле присутне у стабилизационом периоду. Све три дозе екстракта утицале су на то да коронарни проток буде виши на крају реперфузије у односу на контролне услове.

Добијени резултати који се односе на коронарни протоок се могу објаснити утицајем флавоноида на L-аргинин/ NO систем. Бројни подаци указују на то да је очување биоактивности NO пореклом из ендотела један од главних механизма заслужних за кардиопротективне ефекте флавоноида (214). NO је један од најпотентнијих ендогених вазодилататора који се синтетише из L-аргинина каталитичким деловањем три изоформе NO синтазе: неуронске NOS (nNOS), индуцибилне NOS (iNOS и NOS II) и ендотелне NOS (eNOS и NOS III). Док су конститутивне NOS (nNOS и eNOS) задужене су за стварање и ослобађање малих кочичина NO које регулишу микроваскуларни тонус, индуцибилна iNOS се активира под утицајем имуностимулаторних цитокина, инфекција и бактеријских продуката и продукује велику количину NO (215, 216).

Активација iNOS у ендотелу доводи до продукције велике количине NO и везује се за патолошка стања попут исхемијско-реперфузионе повреде срца. Улога iNOS/ NO сигнализације у срчаној И-Р повреди је веома сложена и збуњујућа, а описани су и штетни и корисни ефекти iNOS. Сматра се да повећана експресија iNOS у стању сниженог оксидационог стреса преусмерава ефекте iNOS са негативних на протективне (216). Експериментално је потврђено да је током првих минута исхемије ниво eNOS повишен, да би се у условима дуготрајне исхемије смањивао (217). Вишеструки докази потврђују кардиопротективну улогу eNOS током И-Р повреде срца, а наглашавају да се у условима њене дефицијенције систолна и дијастолна функција срца погоршавају и може доћи и до смртог исхода (218). Повећање експресије eNOS током И-Р повреде може заштити срце преко повећања NO/ циклични гуанозин монофосфат (cGMP) (219). Очувани коронарни вазодилататорни одговор код пацова који су користили екстракт ивањског цвећа се може објаснити доказаним потенцијалом полифенола да активирају eNOS и узрокују повећану синтезу и ослобађања NO, у условима смањене концентрације РОС. Насупрот томе, у присуству високе концентрације РОС, повећано стварање NO ће довести до настанка токсичног NOO- који погоршава срчану дисфункцију (214).

Једна од бројних предности полифенола који који су главне компоненте примењеног екстракта огледа се у њиховој задовољавајућој биоискористљивости и документованој корелацији између дневног уноса и плазма концентрације. Квантитативна заступљеност једињења у екстракту као и хемијска структура у многеме доприносе постигнутим ефектима. Наиме доступни подаци сугеришу да флавоноиди са

5-хидрокси и 5-метокси супституентом могу побољшати постисхемијски функционални опоравак срца. Насупрот томе, запажено је да деривати флавоноида који немају хидроксилну групу на позицији 5 немају тенденцију ка испољавању кардиопротективног деловања на моделу И-Р срца. Примењени екстракт у нашем истраживању садржи високу концентрацију кверцетина и кверцетин-3-О-Glc који поседују 5-хидрокси супституент, па се може претпоставити да они у многоме доприносе уоченим протективним ефектима ивањског цвећа (220).

5.6.1.2. Утицај примене метанолног екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток спонтано хипертензивних пацова

Будући да присуство хроничне хипертензије погоршава исход И-Р повреде, актуелност овог истраживања базира се и на испитивању утицаја екстракта ивањског цвећа на моделу спонтано хипертензивних пацова (221). Бројне експерименталне студије су показале нижу ефикасност одређених маневара прекондиционирања срца у условима хипертензије (222, 223). Имајући у виду претходно наведено, као и да је осетљивост хипертензивног срца на И-Р и даље недовољно истражена, један од наших циљева је био да испита ефикасност екстракта ивањског цвећа код кардиодинамске параметре и коронарни проток хипертензивних пацова.

Наши резултати су показали да двадесетоминутна исхемија праћена тридесетоминутном реперфузијом на срцу спонтано хипертензивних животиња нарушава контрактилну снагу срца, систолну функцију, као и одговор коронарне циркулације. Ове промене манифестоване су падом у вредностима свих испитиваних параметара сем DLVP на крају реперфузије у односу стабилизациони период. Добијени резултати у складу су са претходно потврђеним штетним последицама И-Р повреде. Наиме системска хипертензија је повезана са активацијом неурохуморалних механизма који продубљују оштећења миокарда након исхемије (224).

Примена екстракта ивањског цвећа у највишој дози није довела до осцилација у вредностима испитиваних параметера, указујући на потпуно очувани рад срца изложеног исхемији и реперфузији. С друге стране, након третмана екстрактом у средњој и нижој дози дошло је до реверзибилних промена поједених кардиодинамских параметара детектованих у првом минути реперфузије. Међутим по завршетку тридесетоминутне реперфузије сви параметри су се вратили на вредности пре исхемије,

што је индикатор ненарушеног срчаног рада. Бенефити третмана екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg огледају се и у повећању вредности свих испитиваних параметара, изузев дијастолног притиска, на крају реперфузије у односу на нетретирани хипертензивне пацове. Такође излагање дози од 250 mg/kg праћено је вишим вредностима $dp/dt \max$, $dp/dt \min$, HR и CF на крају реперфузије, а најнижој дози скоком у $dp/dt \min$, DLVP и HR у односу на животиње које нису користиле екстракт..

Наведени резултати указују на то да су све три дозе екстракта допринеле опоравку функције срца спонтано-хипертензивних животиња. Међутим највиша и средња доза имале су бољи утицај на контрактилну и релаксациону моћ срца у односу на најнижу дозу. Скок у систолном и дијастолном капацитету као и коронарном протоку се истиче у групи која је била на третману највишом дозом у односу на остале две дозе. Ови резултати још једном потврђују бољи ефекат екстракта ивањског цвећа на функционални опоравак срца у вишој дози.

Познато је да хипертрофија леве коморе може настати као одговор срца на повећано оптерећење притиском, а праћена је повећањем дебљине зида и мањим повећањем дијаметра леве коморе. Када се то оптерећење притиском одржава, хипертрофија може да напредује до вентрикуларне дилатације и контрактилне дисфункције (225). Сматра се да су механизми флавоноида који се заснивају на повећаној активности SERCA пумпе описани претходно одговорни за побољшану контрактилну функцију срца како код нормотензивних тако и код хипертензивних животиња. Додатно, очуваност коронарног протока се може приписати ендотел-зависним релаксирајућим ефектима полифенола који су посредовани NO. У стању хипертензије смањена доступност NO утиче на настанак ендотелне дисфункције и доводи до измена у вредностима крвног притиска, а ендотелна дисфункција води у атеросклеротску коронарну и церебралну артеријску болест. Стога је разумевање молекуласких механизма који регулишу сигнализацију NO у патофизиолошким условима од пресудног значаја на путу ка открићу нових терапијских стратегија. Неколико механизма може објаснити смањење NO у присуству хипертензије, али се издваја деструкција овог гасног трансмитера под деловањем O_2^- (226). Будући да флавоноиди повећавају експресију eNOS и последично повећавају ниво NO, јасно се уочава недвосмислен значај ових природних једињења у хипертензивним условима, а нарочито након исхемије. Још један од механизма одговорних за вазорелаксацију је и ефекат флавоноида на стимулацију продукције простацikliна (227). Наши резултати

су у корелацији са претходно спроведеним истраживањима који предлажу протективну улогу флавоноида у превенцији погоршања васкуларне ендотелне функције у хипертензивним условима (228). Утицај хемијске структуре, односно предност 5-хидрокси и 5-метокси супституисаних флавоноида над осталим флавоноидима истиче се и када је реч о ефектима екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре хипертензивних пацова. Највероватнији су благотворни ефекти екстракта последица синергистичког и адитивног деловања компоненти присутних у највећим концентрацијама, а нарочито 5-хидрокси супституисаних једињења (220).

5.6.1.3. Разлике у ефектима екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток код здравих и спонтано хипертензивних пацова

Значајно ниже вредности dp/dt max, SLVP и DLVP код SHR животиња у одсуству третмана указују на лошији контрактилни одговор и систолну и дијастолну функцију хипертензивног срца. Такође срчана фреквенца је била значајно нижа, потврђујући да је присуство хипертензије повезано са већим оштећењем срца након И-Р. Више вредности односа масе срца и телесне масе код хипертензивних пацова указују на то да је системска хипертензија повезана са развојем вентрикуларне хипертрофије. И након третмана екстрактом ивањског цвећа у свим дозама контрактилна снага срца, систолни капацитет и срчана фреквенца хипертензивних пацова били су нижи. С друге стране примена највише дозе екстракта била је повезана са значајно вишим коронарним протоком код здравих животиња, док су остале две дозе узроковале сличан одговор коронарне циркулације код здравих и хипертензивних животиња. Средња доза екстракта је у обе испитиване групе резултирала сличним дијастолним капацитетом срца, док је након примене највише и средње дозе уочена већа вредност DLVP код хипертензивних пацова. Међутим повећање овог параметра није компромитовало систолну функцију. Однос масе срца и телесне масе у свим групама хипертензивних пацова је остао виши у односу на здраве. Генерално гледано, средња доза екстракта је највише успела да функцију хипертензивних срца приближи здравим, али је несумњиво бољи ефекат на укупни опоравак здравих и хипертензивних срца под утицајем највише дозе. Ови резултати су сагласности са преходним извештајима да патофизиолошке промене које прате стање повишеног крвног притиска доводе до веће осетљивости срца на И-Р повреду и последично већег степена оштећења (229).

5.6.2. Утицај примене екстракта ивањског цвећа на срчани редокс статус пацова

Почетком 1980-их година РОС су предложене као потенцијални медијатори реперфузионе повреде и наведена претпоставка је врло брзо прихваћена и постала предмет интересовања научника. Наиме реперфузија исхемијског ткива узрокује екцесивну продукцију слободних радикала који учествују у нарушавању функционалних и морфолошких карактеристика миокарда (119). Претпоставили смо да примена ивањског цвећа може умањити оксидациони стрес у И-Р и побољшати опоравак срца.

5.6.2.1. Ефекти екстракта ивањског цвећа на срчане маркере оксидационог стреса здравих пацова

У складу са преходним извештајима, И / Р у нашој студији је довела до пораста концентрација свих срчаних прооксиданаса на крају реперфузије у односу на вредности пре исхемије. Наиме повратак протока у исхемијско ткиво доводи до настанка дисбаланса између брзине стварања прооксиданата и способности миокарда да их детоксикује. Сматра се да су главни извори прооксиданаса у реперфузији: митохондријални респираторни транспортни ланац електрона, активација ксантин оксидазе (ХО) у ендотелним и NADPH оксидазе (NOX) у инфламацијским ћелијама. Патолошка улога NOX ензима верификована је на бројним моделима И-Р повреде. Сматра се да повећана активност NOX резултира повећаном продукцијом реактивних врста попут O_2^- и H_2O_2 што може делимично да објасни високе концентрације ове РОС уочене у нашем истраживању. Додатно, ослобађање O_2^- доводи до регрутовања и активације неутрофила и њиховог адхерирања за ендотелне ћелије што стимулише настанак ХО и додатну продукцију O_2^- (230). Такође важну улогу у настанку И-Р оштећења се приписују и нитрозативном стресу и RNS. Док NO самостално не узрокује штетне ефекте, у реакцији са прекомерно продукованим O_2^- доводи до настанка пероксинитрита што објашњава нитросативно оштећење срца (231).

Третман екстрактом ивањског цвећа у највишој дози није само спречио повећање маркера оксидационог оштећења, већ је довео и до смањења концентрације O_2^- и H_2O_2 на крају реперфузије у односу на период пре исхемије. С друге стране, средња и најнижа доза екстракта биле су довољне да спрече пораст концентрације

већине прооксиданаса, изузев TBARS-а у групи 250 GVE и O_2^- у 125 GVE који су остали повишен на крају реперфузије. Док је први минут реперфузије праћен скоком у концентрацији NO_2^- у свим групама, у даљем току реперфузије вредности су полако опадале да би се након 30 минута вратиле на вредности пре исхемије. Након примене највише и средње дозе екстракта концентрација већине прооксидантних маркера је била значајно нижа у односу на контролне услове, док је у случају најниже дозе та разлика минимално изражена.

Вредности срчаних маркера оксидационог стреса су у сагласности са системским параметрима, наглашавајући способност ивањског цвећа да измени редокс сигнализацију и умањи оксидациона оштећења. Одсуство скока у вредности TBARS одражава способност екстракта ивањског цвећа да очува интегритет липидне мембране. Наша открића су у корелацији са резултатима бројних студија који потврђују бенефите екстракта богатих полифенолима у умањењу И-Р-изазваног оксидационог стреса (120). Обзиром да улога ове биљне врсте у И-Р повреди остаје непознаница, наши резултати се могу објаснити са аспекта хемијског састава екстракта. Сматра се да су полифеноли из екстракта помогли срчаном ткиву да одржи баланс у нивоу већине прооксиданаса што је у многоме допринело кардиопротекцији. Механизам који лежи у основи антиоксидационе активности полифенола, а самим тим највероватније и нашег екстракта, је претежно директна неутрализација слободних радикала (150). Екстракт ивањског цвећа је смањењем концентрације H_2O_2 или превенцијом скока овог прооксиданса у срчаном ткиву омогућио очување васкуларног тонуса (232). Додатно патолошке промене у срчаној редокс сигнализацији могу довести до контрактилне и енергетске дисфункције, појаве аритмија, промена у процесу транскрипције, ослобађању митохондријских слободних радикала и у крајњем до поремећаја у хомеостази калцијума (233). У стању оксидационог стреса срце покушава да развије адаптивни одговор како би очувало контрактилност, али уколико компензаторни механизми нису довољни може доћи до смрти ћелија (234). Из тих разлога умањење и/или превенција оксидационог оштећења под утицајем ивањског цвећа је од изузетног значаја за одржавање срчаног рада и очување контрактилне функције, што је и потврђено резултатима кардиодинамике у нашој студији.

5.6.2.2. Ефекти екстракта ивањског цвећа на маркере оксидационог стреса спонтано хипертензивних пацова

Повећан оксидациони стрес је детектован на различитим моделима спонтане и експерименталне хипертензије (235). Додатно, изражена осетљивост хипертензивног срца на И-Р повреду намеће потребу за испитивањем потенцијала природних антиоксиданаса да модулирају редокс сигнализацију чиме би се постигла кардиопротекција (235, 236). Наши резултати указују на то да је И-Р довела до скока у концентрацији свих испитиваних проксидационих маркера спонтано-хипертензивних животиња, што додатно потврђује да је оксидациони стрес укључен у настанак И-Р повреде. Међутим четворонедељна примена екстракта у дози од 500 mg/kg не само да је спречила И-Р изазвано повећање концентрације прооксиданаса, већ је умањила концентрацију O_2^- и H_2O_2 на крају реперфузије. Додатно третман дозом од 250 mg/kg одржао је вредности TBARS и H_2O_2 током реперфузије, док се само код пацова који су примали најнижу дозу екстракта бележе више вредности свих маркера оксидационог стреса на крају реперфузије у односу на стабилизациони период. Непромењене вредности TBARS указују на очуван интегритет липидне мембране (237). Генерално гледано, снижење маркера оксидационог стреса доприноси очувању контрактилности срца и спречава појаву аритмија и дисфункције срца (238, 239). Такође смањењем нивоа O_2^- изостаје његова интеракција са NO и настајање токсичног $ONOO^-$. Повећање биоискористљивости NO под утицајем примене флавоноида је од великог значаја у третману И-Р повреде срца хипертензивних животиња (238, 214). Додатно, умањењем нивоа РОС након третмана екстрактом ивањског цвећа вероватно се смањује инвазија моноцита, инфламација и хипертензивно васкуларно оштећење (239). Такође можемо претпоставити и да супримирање активности XO и NOX услед примене полифенола значајно снижава продукцију РОСа у ендотелним ћелијама и кардиомиоцитима, што доприноси опоравку срца након И-Р (240, 241).

Поређењем концентрација прооксиданаса по завршетку реперфузије у третираним групама у односу на нетретирану, јасно се уочава ефикасност све три дозе екстракта у смањењу оксидационих оштећења. Међутим примена екстракта у дози од 500 mg/kg довела је до значајног пада концентрација већине прооксидантних маркера у односу на преостале две дозе на крају тридесетоминутне реперфузије. Такође највиша доза била је праћена најизраженијим скоком у NO_2^- на самом почетку реперфузије, који

је праћен смањењем током реперфузионог периода. Док је скок у ослобађању слободних радикала на почетку реперфузије срца већ потврђен, подаци о променама које се одвијају у даљем току реперфузије остају контроверзни (242). Додатно, средња доза ивањског цвећа је значајно снизила поједине маркере у односу на најнижу дозу, потврђујући још једном да је ефекат ивањског цвећа дозно-завистан. Највиши потенцијал највеће дозе да ублажи И-Р изазван оксидациони стрес иде у прилог томе да веће концентрације полифенола могу остварити израженији ефекат, али не сме се заборавити да прекомерно повећање дозе може у одређеним условима деловати прооксидантно.

5.6.2.3. Разлике у ефектима екстракта ивањског цвећа на маркере оксидационог стреса код здравих и спонтано хипертензивних пацова

У циљу добијања комплетних информација о ефектима ивањског цвећа у присуству и одсуству повишеног крвног притиска, поредили смо здраве и хипертензивне пацове који су били на третману истом дозом екстракта. У групи нетретираних хипертензивних пацова уочена је израженија иницијална продукција прооксиданаса која је евидентирана вишим вредностима H_2O_2 и O_2^- у првом минути реперфузије у односу на здраве. Такође на крају реперфузије у условима хипертензије детектован је виши ниво липидне пероксидације, као и виша концентрација H_2O_2 што указује на већи степен оштећења у односу на пацове са нормотензијом. С друге стране, додатак највише и најниже дозе екстракта код хипертензивних пацова није успео да приближи срчани редокс статус условима који постоје код здравих пацова, већ су се одржале више вредности већине прооксидационих параметара на крају реперфузионог периода. Такође сличне концентрације већине прооксиданаса су уочене између група које су третиране средњом дозом екстракта, изузев повишеног индекса липидне пероксидације који је био присутан код хипертензивних пацова. Ови резултати су у сагласности са резултатима који се односе на системски оксидациони стрес, потврђујући још једном виши степен оксидационог оштећења у условима хипертензије, било да је нетретирани или третиран екстрактом ивањског цвећа.

5.7. Утицај екстракта ивањског цвећа на очуваност структуре органа пацова

5.7.1. Утицај екстракта ивањског цвећа на очуваност структуре јетре здравих и спонтано хипертензивних пацова

Болести јетре попут стеатозе, хепатитиса, цирозе и хепатоцелуларног карцинома представљају водећи узрок морталитета и морбидитета широм света. Главни патолошки процеси који доводе до оштећења јетре укључују оксидациони стрес, липидну пероксидацију, инфламацију и поремећај у имунском одговору организма. Будући да развој инфламације иницира низ промена који продубљују оштећење јетре, главни изазов у хепатологији представља контрола инфламационих процеса (243). Тренутно ниједна доступна терапија није довољна успешна у лечењу болести јетре и спречавању њене прогресије, а хронична примена чак и новооткривених лекова доводи се у везу са настанком бројних нежељених ефеката (244). Лековите биљке се истичу као могући кандидати у ублажавању поремећаја јетре због доказаних протективних ефеката на оксидациони стрес, метаболизам липида, инсулинску резистенцију и процес инфламације (243). Међутим последњих година поставља се питање безбедности употребе појединих биљака јер постоје извештаји о појави хепатотоксичности након коришћења одређених биљних суплемената (245). Наиме показано је да хепатотоксичност може бити резултат бројних фактора: употребе биљака са непознатим безбедносним профилем, погрешне идентификације биљке и њене замене токсичном биљком, случајне или намерне контаминације препарата пестицидима, тешким металима као и хепатотоксичним лековима попут НСАИЛ. Такође алкохол из биљних лекова може ступити у интеракцију са конвенционалним леком и потенцирати његову токсичност (245-247).

Имајући у виду претходно наведено, желели смо да испитамо да ли четворонедељна примена метанолног екстракта ивањског цвећа може и на који начин да утиче на структуру јетре пацова. Хистолошка анализа је показала да није било промена у морфолошким карактеристикама јетре након третмана екстрактом ивањског цвећа у растућим дозама. Јетрин паренхим је био очуване грађе, портни простори су били нормоцелуларни како код нормотензивних, тако и код хипертензивних животиња. Наши резултати сугеришу да третман екстрактом ове биљне врсте у трајању од 28 дана не доводи до хепатотоксичности, нити било каквих штетних промена у структури јетре.

Протективни ефекти екстраката богатих фенолним једињењима у претходно објављеним студијама су углавном испитивани на различитим моделима оштећења јетре, што може бити план за будућа истраживања која би детаљније истраживала терапијску активност екстракта ивањског цвећа. Предложени механизми одговорни за бенефите које остварују флавоноди код болести јетре су: побољшање капацитета антиоксидационог система заштите, ублажавање инфламације и смањење апоптозе (243).

5.7.2. Утицај екстраката ивањског цвећа на очуваност структуре бубрега здравих и спонтано хипертензивних пацова

Артеријска хипертензија се сматра једним од главних етиолошких фактора који доводе до настанка болести бубрега. Познато је да хронично повећање крвног притиска може узроковати протеинурију и развој гломерулосклерозе. Бројни извештаји указују на то да су инфламација и оксидациони стрес укључени у патогенезу хроничне бубрежне инсуфицијенције (ХБИ). Инфилтрација и активација моноцита, макрофага и миофибробласта повећава експресију проинфламацијских цитокина током ХБИ. Ови цитокини доводе до повећане продукције ROS, што значајно нарушава структуру и функцију бубрега (248, 249). Повећани оксидациони стрес и инфламација доводе и до настанка кардиоваскуларних компликација. Недостатак ефикасне терапије намеће потребу за открићем новог приступа у лечењу поремећаја реналне функције. Природна једињења из групе флавоноида се издвајају као могући агенси у лечењу болести бубрега због добро документованог ренопротективног потенцијала (248-250).

Наши резултати указују на то да су крвни судови бубрега спонтано хипертензивних пацова измењене морфологије, односно присутно је задебљање зида уз последично сужење лумена артериола и малих мишићних артерија. Такође у гломерулима хипертензивних пацова запажене су фокалне промене, које су биле ублажене након третмана екстрактом ивањског цвећа у свим дозама. Знатан ренопротективан ефекат ивањског цвећа квантификован је помоћу претходно дефинисаног скорa за процену хистолошких промена у бубрезима. Код свих третираних пацова биле су присутне патолошке промене мањег обима и интензитета у односу на нетретиране здраве и хипертензивне пацове. Међутим најмање оштећење бубрега ипак је било присутно у групи здравих пацова који су конзумирали екстракт у

највишој дози. Хистопатолошка анализа указује на то да су све примењене дозе екстракта довољно ефикасне да ублаже штетне структурне промене у бубрезима узроковане хипертензијом. Најизраженији позитиван ефекат на морфолошке карактеристике бубрега био је уочен након примене највише дозе екстракта, док није уочена значајна предност средње у односу на најнижу дозу.

Наши резултати се могу објаснити са аспекта хемијског састава метанолног екстракта ивањског цвећа и присуства бројних фенолних једињења. Раније је показано да флавоноиди могу превенирати или ублажити оштећење бубрега повезано са артеријском хипертензијом. Потенцијални механизам дејства заснива се на снижењу крвног притиска и заштитним ефектима на васкуларни систем. Додатно, ова група биомолекула може испољити директно дејство на бубрежни паренхим и ометати сигналне путеве који су укључени у развој оштећења бубрега. То подразумева утицај флавоноида на оксидациони стрес, проинфламацијске молекуле, протеинске киназе и матрикс металопротеиназе (250). Претходне студије указују на потенцијал биљних екстраката богатих флавоноидима да ублаже штетне промене на бубрезима пацова са спонтано развијеном хипертензијом и хипертензијом која је изазвана применом N(ω)-нитро-L-аргинин метил естра (L-name). Документовано је да кверцетин, један од заступљених једињења у метанолном екстракту ивањског цвећа, може спречити хипертрофију, васкуларне лезије и протеинурију код пацова са хипертензијом изазваном L-name-ом (251). Такође показано је да фенолна једињења могу да умање запаљенску инфилтрацију реналног интерстицијума, албуминурију, реналну хипертрофију, реналну фиброзу и маркере оксидационог стреса код спонтано хипертензивних пацова и пацова са индукованом хипертензијом (252, 253). Утицај ових природних једињења на активацију eNOS и синтезу NO у ћелијама бубрега такође доприноси смањењу патолошких промена на бубрезима (254). Обзиром на то да нема података о ефектима ивањског цвећа на морфолошке карактеристике бубрега, може се претпоставити да су претходно наведени механизми фенолних једињења барем делимично заслужни за благотворне ефекте уочене у нашем истраживању.

5.7.3. Утицај екстракта ивањског цвећа на очуваност структуре срца здравих и спонтано хипертензивних пацова након исхемије

Познато је да И-Р може изменити како функционалне тако и структурне карактеристике срчаног ткива. Резултати хистолошке анализе потврдили су да је исхемија у трајању од 20 минута, која је праћена реперфузијом у трајању од 30 минута, довела до настанка поља некрозе, која су најизраженија у групи нетретираних животиња. Уочени су фрагментација и хипереозинофилија мишићних влакана, губитак или дегенерација једара, едем, контракционе пруге и интрацитоплазматске вакуоле. Четворонедељни третман екстрактом ивањског цвећа у највишој дози је спречио губитак једара и појаву контракционих пруга за које се сматра да се јављају у првим минутима повратка протока у исхемијско ткива (62). Такође код пацова који су конзумирали екстракт откривене су фокалне некрозе које захватају мањи број кардиомиоцита или су уницелуларне и ограничене само на субендокардни појас. Присуство лакостепеног едема у групи третираних пацова је у сагласности са очуваном снагом контракције, што је и очекивано имајући у виду да изражено присуство едема погоршава контрактилну моћ срца. Додатно скок у концентрацији слободних радикала може објаснити вакуолизацију у ћелијама нетретираних здравих пацова.

Резултати хистолошке анализе још једном потврђују да присуство хипертензије погоршава исход И-Р повреде. Наиме у групи хипертензивних пацова уочене су промене на крвним судовима манифестоване задебљањем зида и сужењем лумена, као и већи степен конфлуентних зона некрозе. Такође присутни су хипереозинофилија, фрагментација влакана и губитак једара у већем степену него у групи нетретираних здравих пацова. Међутим третман екстрактом ивањског цвећа је ублажио наведене промене и очувао структуру срчаног мишића. Резултати који се односе на морфолошке промене срца су у сагласности са одређиваним кардиодинамским параметрима и указују на потенцијал екстракта ивањског цвећа да очува и функцију и структуру срца у условима исхемије. Дозно-зависни ефекти примене екстракта ивањског цвећа огледају се у највећем потенцијалу највише дозе да спречи промене срчаног ткива изазване исхемијом. Средња и најнижа доза биле су подједнако ефикасне у ублажавању измена структурних карактеристика срца.

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата овог истраживања могу се извести следећи закључци:

- HPLC-DAD анализа указује на присуство бројних биоактивних једињења у метанолном, ацетонском и воденом екстракту *G. verum*, међу којима се по највећој заступљености издвајају хлорогена киселина, цинарозид, изокверцетин и урсолна киселина. Иако је квалитативни састав сва три типа екстракта сличан, концентрација биомолекула варира је у зависности од поларности примењеног растварача.
- Примена воде као растварача за екстракцију *G. verum* била је повезана са највећим садржајем фенолних једињења у екстракту, док је најнижи садржај откривен код метанолног екстракта.
- Највећи садржај флавоноидних једињења и највећи капацитет неутрализације DPPH радикала био је карактеристичан за метанолни екстракт, док је најнижи био присутан код ацетонског.
- Метанолни, ацетонски и водени екстракти *G. verum* испољили су умерену антибактеријску и антибиофилм, као и генерално слабу антигљивичну активност, чији је интензитет зависио од врсте микроорганизма и типа екстракта.
- Све три дозе метанолног екстракта *G. verum* показале су потенцијал да ублаже инфламациону реакцију изазване карагенином, при чему је израженији ефекат уочен након администрације више дозе.
- Екстракти ове биљне врсте у свим дозама утицали су на системску редокс хомеостазу у смислу умањења нивоа прооксидационих молекула, док је само највиша доза довела до повећања капацитета антиоксидационог система заштите.
- Четворнедељни унос екстракта *G. verum* допринео је очувању контрактилне и релаксационе снаге срца и спречио коронарну васкуларну дисфункцију изазвану исхемијом и код здравих и код спонтано хипертензивних пацова.
- Третман екстрактом *G. verum* у свим дозама довео је до смањења срчане продукције прооксиданаса и у условима нормотензије и хипертензије, чиме је значајно ублажио оксидациона оштећења подстакнута исхемијом и реперфузијом.
- Морфолошке промене срца ублажене су након примене екстракта *G. verum*, што иде у прилог томе да екстракт ове биљне врсте може очувати структуру срца у условима исхемије.

- Снижење нивоа прооксидационих молекула под утицајем екстракта *G. verum* указује на то да су остварени кардипротективни ефекти барем делимично посредовани антиоксидационим својствима ове биљне врсте.
- Уочени протективни ефекти метанолног екстракта *G. verum* на исхемијско-реперфузиону повреду миокарда истичу могућност примене ове биљне врсте у маневру прекондиционарања срца.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. M. Gajić. Flora of Serbia. Belgrade: Serbian Academy of Sciences and Arts; 1973.
2. Lakić N, Mimica-Dukić N, Isak J, et al. Antioxidant properties of Galium verum L. (Rubiaceae) extracts. Cent Eur J Biol. 2010; 5:331-7.
3. Bradic J, Petkovic A, Tomovic M. Phytochemical and Pharmacological Properties of Some Species of the Genus Galium L. Galium Verum and Mollugo. Serbian Journal of Experimental and Clinical Research. 2018, doi: 10.1515/sjecr-2017-0057
4. Feijoo-Siota L, Rama JLR, Sánchez-Pérez A, Villa TG. Expression, activation and processing of a novel plant milk-clotting aspartic protease in Pichia pastoris. J Biotechnol. 2018; 268:28-39.
5. Schmidt M, Scholz CJ, Gavril GL, et al. Effect of Galium verum aqueous extract on growth, motility and gene expression in drug-sensitive and-resistant laryngeal carcinoma cell lines. International journal of oncology. 2014; 44(3):745-60.
6. Al-Snafi AE. Galium verum-A review. Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences. 2018; 5(4):2142-9.
7. Mitova MI, Anchev ME, Handjieva NV, et al. Iridoid patterns in Galium L. and some phylogenetic considerations. Zeitschrift für Naturforschung C. 2002; 57(3-4):226-34.
8. Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. Biotechnology advances. 2015; 33(8):1582-614.
9. Sofowora A, Ogunbodede E, Onayade A. The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines. 2013; 10(5):210-29.
10. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. Nutrients. 2010; 2(12):1231-46.
11. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxidative medicine and cellular longevity. 2009; 2(5):270-8.
12. Scalbert A, Manach C, Morand C, et al. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Critical reviews in food science and nutrition. 2005; 45(4):287-306.
13. Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. Annual review of nutrition. 2002; 22(1):19-34.
14. Oliveira LD, Carvalho MV, Melo L. Health promoting and sensory properties of phenolic compounds in food. Revista Ceres. 2014; 61:764-79.

15. Beckman CH. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2000; 57:101–10.
16. Zhao CC, Shao JH, Li X et al. Flavonoids from *Galium verum* L. *J Asian Nat Prod Res.* 2008; 10(7-8):613-7.
17. Zhao C, Shao J, Cao D, et al. [Chemical constituents of *Galium verum*]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2009; 34(21):2761-4.
18. Matei AO, Gatea F, Radu GL. Analysis of Phenolic Compounds in Some Medicinal Herbs by LC-MS. *J Chromatogr Sci.* 2015; 53(7):1147-54.
19. Mocan A, Crisan G, Vlase L, et al. Phytochemical investigations on four *Galium* species (Rubiaceae) from Romania. *Farmacia.* 2016; 64(1):95-9.
20. Vlase L, Mocan A, Hanganu D, et al. Comparative study of polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of four *Galium* species (Rubiaceae). *Digest journal of nanomaterials and biostructures.* 2014;9(3):1085-94.
21. Tămaş M., Stana D., Timiş S., Comparative phytochemical research of *Galium verum* L. and *G. mollugo* L. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj.* 2006; 34:18-20.
22. Hu ML. Dietary polyphenols as antioxidants and anticancer agents: more questions than answers. *Chang Gung Med J.* 2011; 34(5):449-60.
23. Graf BA, Milbury PE, Blumberg JB. Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. *Journal of medicinal food.* 2005; 8(3):281-90.
24. Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American journal of clinical nutrition.* 2005; 81(1):317S-25S.
25. Dent M, Dragovic-Uzelac V, Penic M, et al. The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food technology and biotechnology.* 2013; 51(1):84.
26. Milić PS, Stanojević LP, Rajković KM, et al. Antioxidant activity of *Galium mollugo* L. extracts obtained by different recovery techniques. *Hemijska industrija.* 2013; 67(1):89-94.
27. Ngo TV, Scarlett CJ, Bowyer MC, et al. Impact of different extraction solvents on bioactive compounds and antioxidant capacity from the root of *Salacia chinensis* L. *Journal of Food Quality.* 2017;2017.

28. Turkmen N, Velioglu Y, Sari F, et al. Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*. 2007; 12(3):484-96.
29. Rajbhar KA, Dawda HI, Mukundan US. Polyphenols: methods of extraction. *Scientific reviews and chemical communications*. 2015; 5(1):1-6.
30. Tundis R, Loizzo MR, Menichini F, et al F. Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2008; 8(4):399-420.
31. Viljoen A, Mncwangi N, Vermaak I. Anti-inflammatory iridoids of botanical origin. *Current medicinal chemistry*. 2012; 19(14):2104-27.
32. Bőjthe-Horváth K., Hetényi F., Kocsis Á et al. Iridoid glycosides from *Galium verum*. *Phytochemistry*, 1980; 21:2917-19.
33. Bőjthe-Horváth K, Kocsis Á, Párkány L, et al. A new iridoid glycoside from *Galium verum* L. First X-ray analysis of a tricyclic iridoid glycoside. *Tetrahedron Letters*. 1982; 23(9):965-6.
34. Demirezer LO, Gurbuz F, Guvenalp Z et al. Iridoids, flavonoids and monoterpene glycosides from *Galium verum* subsp. *verum*. *Turk J Chem*. 2006; 30:525-34.
35. Lee TG, Kim DK. Iridoid Compounds from the Whole Plant of *Galium verum* var. *asiaticum*. *Natural Product Sciences*. 2013; 19(3):227-30.
36. Wink M. Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. *Medicines*. 2015; 2(3):251-86.
37. Zhao CC, Shao JH, Li X et al. A new anthraquinone from *Galium verum* L. *Nat Prod Res*. 2006; 20:981-4.
38. Ogbe RJ, Ochalefu DO, Mafulul SG, et al. A review on dietary phytosterols: Their occurrence, metabolism and health benefits. *Asian J. Plant Sci. Res*. 2015; 5(4):10-21.
39. Il'ina TV, Kovaleva AM, Goryachaya OV, et al. Essential oil from *Galium verum* flowers. *Chemistry of natural compounds*. 2009; 45(4):587-8.
40. Mirzam M, Navaei MN, Dini M. Essential oil of *Galium verum* L. from Iran. *Iran J Pharm Res*. 2004; 3:88.
41. Mitic VD, Stankov-Jovanovic VP, Ilic MD et al. The antioxidant, hemolytic and cholinesterase inhibition properties of *Galium verum* L. and *Tragopogon pratensis* subsp. *pratensis*. *Bulg Chem Commun*. 2014; 46:269-76.

42. Jaric S, Popović Z, Macukanović-Jocic M et al. An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia). *J Ethnopharmacol.* 2007; 20:160-75.
43. Roman I, Toma VA, Farcas AD. Protective effects of *Galium verum* L. extract on the hypothalamic--pituitary--adrenal axis under anakinetic stress conditions, in rats. histological aspects. *Studia Universitatis Vasile Goldis Seria Stiintele Vietii (Life Sciences Series).* 2015; 25:207-14
44. Menkovic N, Savikin K, Tasic S, et al. Ethnobotanical study on traditional uses of wild medicinal plants in Prokletije Mountains (Montenegro). *J Ethnopharmacol.* 2011; 133:97–107.
45. Popovic Z, Smiljanic M, Kostic M et al. Wild flora and its usage in traditional phytotherapy (Deliblato Sands, Serbia, South East Europe). *Indian J Tradit Know.* 2014; 13:9-35.
46. Kavvadias D, Sand P, Youdim KA, et al. The flavone hispidulin, a benzodiazepine receptor ligand with positive allosteric properties, traverses the blood–brain barrier and exhibits anticonvulsive effects. *British journal of pharmacology.* 2004; 142(5):811-20.
47. Al-Douri NA. A survey of medicinal plants and their traditional uses in Iraq. *Pharm Biol.* 2000; 38:74-9.
48. Bolivar P, Cruz-Paredes C, Hernandez LR et al. Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic activities of *Galium mexicanum*. *J Ethnopharmacol.* 2011; 137: 141-47.
49. Hartwell JL. Plants used against cancer. A survey. *Lloydia.* 1971; 34:204-55.
50. Zhao R, Chen Z, Jia G et al. Protective effects of diosmetin extracted from *Galium verum* L. on the thymus of U14-bearing mice. *Can J Physiol Pharmacol.* 2011; 89:665-73.
51. Roman I, Puica C. Effects of Anakinetic Stress and *Galium verum* Extract on the Thyroid and Ovary Morphology in Wistar Rats. *Bulletin UASVM.* 2013; 70:167-9.
52. Vasilevna IT, Volodymyrivna GO, Leonidivna TE et al. Antimicrobial Activity of the Genus *Galium* L. *Pharmacogn. Commn.* 2016; 6:42-7.
53. Ergun F, Deliorman D, Veliog IA et al. Antimicrobial activities of *Galium* species. *J Fac Pharm Gazi.* 1999; 16:7–11.
54. Yigit D, Yigit N, Ozgen U. An investigation on the anticandidal activity of some traditional medicinal plants in Turkey. *Mycoses.* 2009; 52:135-40.

55. Layali I, Ebrahimzadeh MA, Joulaei M. Antioxidant properties of *Galium verum*. *Int. J. Life Sci. Pharma Rres.* 2016; 6:31-7.
56. Farcas AD, Mot AC, Zagrean-Tuza C, et al. Chemo-mapping and biochemical-modulatory and antioxidant/prooxidant effect of *Galium verum* extract during acute restraint and dark stress in female rats. *PloS one.* 2018; 13(7):e0200022.
57. Mavi A, Terzi Z, Özgen U, et al. Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum* subsp. *verum* (Rubiaceae), *urtica dioica* (urticaceae). *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 2004;27(5):702-5.
58. Danila AO, Gatea F, Radu GL. Polyphenol composition and antioxidant activity of selected medicinal herbs. *Chem Nat Compd.* 2011; 47(1): 22-6.
59. Xia Z, Li H, Irwin MG. Myocardial ischaemia reperfusion injury: the challenge of translating ischaemic and anaesthetic protection from animal models to humans. *Br J Anaesth.* 2016; 117:ii44-ii62.
60. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, et al. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012; 298:229-317.
61. Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 2011; 301(5):H1723-41.
62. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, et al. Ischemia/Reperfusion. *Compr Physiol.* 2016; 7:113-170.
63. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, et al. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol.* 1960; 70:68-78.
64. Baradaran A, Nasri H, Rafieian-Kopaei M. Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences.* 2014; 19(4):358.
65. Tulman DB, Stawicki SP, Papadimos TJ, et al. Advances in management of acute hypertension: a concise review. *Discovery medicine.* 2012; 13(72):375.
66. Broadley KJ, Penson PE. The roles of alpha- and beta-adrenoceptor stimulation in myocardial ischaemia. *Autonomic and Autacoid Pharmacology.* 2004; 24(4):87-93.

67. Jones SP, Bolli R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2006; 40(1):16-23.
68. Mozaffari MS, Liu JY, Abebe W, et al. Mechanisms of load dependency of myocardial ischemia reperfusion injury. *American journal of cardiovascular disease*. 2013; 3(4):180.
69. de Vries DK, Kortekaas KA, Tsikas D, et al. Oxidative damage in clinical ischemia/reperfusion injury: a reappraisal. *Antioxidants & redox signaling*. 2013; 19(6):535-45.
70. Zweier JL, Talukder MH. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovascular research*. 2006; 70(2):181-90.
71. Slegtenhorst BR, Dor FJ, Rodriguez H, et al. Ischemia/reperfusion injury and its consequences on immunity and inflammation. *Current transplantation reports*. 2014; 1(3):147-54.
72. Morin D, Musman J, Pons S, et al. Mitochondrial translocator protein (TSPO): From physiology to cardioprotection. *Biochem Pharmacol*. 2016; 105:1-13.
73. Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochemical Journal*. 1995; 307(1):93-8.
74. Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovascular research*. 2004; 61(3):481-97.
75. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986; 74(5):1124-36.
76. Li W, Wu N, Shu W, et al. Pharmacological preconditioning and postconditioning with nicorandil attenuates ischemia/reperfusion-induced myocardial necrosis and apoptosis in hypercholesterolemic rats. *Experimental and therapeutic medicine*. 2015; 10(6):2197-205.
77. Mohanty IR, Gupta SK, Arya DS, et al. Medicinal herbs can play significant role in attenuation of ischemia and reperfusion injury. *Journal of Homeopathy and Ayurvedic Medicine*. 2013; 3:2-5.
78. Akhlaghi M, Bandy B. Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia–reperfusion injury. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2009; 46(3):309-17.
79. Barteková M, Čarnická S, Pancza D, et al. Acute treatment with polyphenol quercetin improves postischemic recovery of isolated perfused rat hearts after global ischemia. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2010; 88(4):465-71.

80. Testai L, Martelli A, Cristofaro M, et al. Cardioprotective effects of different flavonoids against myocardial ischaemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2013; 65(5):750-6.
81. Debnath J, Nath LK. A review on pathophysiology of ischemic-reperfusion injury of heart and ameliorating role of flavonoids and polyphenols. *Journal of medicinal plants research*. 2014; 8(16):607-14.
82. Wang Y, Zhang ZZ, Wu Y, et al. Quercetin postconditioning attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through the PI3K/Akt pathway. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2013; 46(10):861-7.
83. Agrawal YO, Sharma PK, Shrivastava B, et al. Hesperidin produces cardioprotective activity via PPAR- γ pathway in ischemic heart disease model in diabetic rats. *PLoS One*. 2014; 9(11):e111212.
84. Li W, Li Y, Sun R, et al. Dual character of flavonoids in attenuating and aggravating ischemia-reperfusion-induced myocardial injury. *Experimental and therapeutic medicine*. 2017; 14(2):1307-14.
85. Mahmoudabady M, Lashkari M, Niazmand S, et al. Cardioprotective effects of *Achillea wilhelmsii* on the isolated rat heart in ischemia–reperfusion. *Journal of traditional and complementary medicine*. 2017; 7(4):501-7.
86. Garjani A, Vaez H, Delazar A, Rameshrad M, Heshmati Afshar F, Asgharian P. Cardioprotective Effects of Methanolic Extract of *Scrophularia frigida* on Ischemia-Reperfusion-Induced Injuries in Isolated Rat Heart. *Iran J Pharm Res*. 2017; 16(Suppl):35-45.
87. Bacui Y, Ting W, Bo Z, et al. Protective Effects of Total Flavonoids from *Dracocephalum moldavica* L. on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in the Isolate Rats Heart. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2013; 7:53-7.
88. Gautam R, Jachak SM. Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Medicinal research reviews*. 2009; 29(5):767-820.
89. Pushpa K, Mahesh K. An overview on plants with anti-inflammatory potential. *Int J Curr Pharm Res*. 2017; 9(5):1-4.
90. Kumar V, Bhat ZA, Kumar D, et al. Evaluation of anti-inflammatory potential of leaf extracts of *Skimmia anquetilia*. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 2012; 2(8):627-30.

91. Vishal V, Sharma GN, Mukesh G, et al. A review on some plants having anti-inflammatory activity. *Journal of Phytopharmacology*. 2014; 2:214-21.
92. Coleman JW. Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. *Clinical Experimental Immunology* 2002; 129:4-10.
93. Iwalewa E, McGaw L, Naidoo V, et al. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *African Journal of Biotechnology* 2007; 6:2868-288.
94. Kumar V, Bhat ZA, Kumar D, et al. In-vitro anti-inflammatory activity of leaf extracts of *Basella alba* linn. Var. *alba*. *Int J Drug Dev & Res*. 2011; 3(2):124-27.
95. Akiyama H, Barger S, Barnum S, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. 2000; 21:383-421.
96. Azeem AK, Dilip C, Prasanth SS, et al. Anti-inflammatory activity of the glandular extracts of *Thunmus alalunga*. *Asia Pac J Med*. 2010; 3(10):412-20.
97. Arivazhagan S, Balasenthi S, Nagini S. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Mallotusoppositifolium*. *J Phytother Res*. 2000; 14:291-93.
98. Kumarappan CT, Chandra R, Mandal SC. Anti-inflammatory activity of *Ichnocarpusfrutescens*. *Pharmacologyonline*. 2006; 3:201-6
99. Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci*. 2004; 96(3):229-45.
100. SouzaEPBSS, FariaRX, RochaLM. Clinical trials studies of plant extracts with anti-inflammatory activity. *J App Pharm Sci*, 2016; 6(12):224-232.
101. Walker B, Barrett S, Polasky S, et al. Environment. Looming global-scale failures and missing institutions. *Science*. 2009; 325(5946):1345-346.
102. Awouafack MD, McGaw LJ, Gottfried S, Mbouangouere R, Tane P, Spiteller M, Eloff JN. Antimicrobial activity and cytotoxicity of the ethanol extract, fractions and eight compounds isolated from *Eriosema robustum* (Fabaceae). *BMC Complement Altern Med*. 2013; 13: 289.
103. Srivastava J, Chandra H, Nautiyal AR, Kalra SJ. Antimicrobial resistance (AMR) and plant-derived antimicrobials (PDA(m)s) as an alternative drug line to control infections. *3 Biotech*. 2014; 4(5):451-60.
104. Sánchez E, Rivas Morales C, Castillo S, Leos-Rivas C, García-Becerra L, Ortiz Martínez DM. Antibacterial and Antibiofilm Activity of Methanolic Plant Extracts against

- Nosocomial Microorganisms. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2016; 2016: 1572697.
105. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2015; 13(1):42-51.
106. Silva NC, Fernandes Júnior A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 2010; 16(3): 402-13.
107. Taguri T, Tanaka T, Kouno I. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biol Pharm Bull.* 2004; 27(12):1965-69.
108. Karuppiyah P, Mustaffa M. Antibacterial and antioxidant activities of *Musa* sp. leaf extracts against multidrug resistant clinical pathogens causing nosocomial infection. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2013; 3(9):737-42.
109. Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol.* 2000; 88(2):308-16.
110. Talib WH, Mahasneh AM. Antimicrobial, cytotoxicity and phytochemical screening of Jordanian plants used in traditional medicine. *Molecules.* 2010; 15(3):1811-24.
111. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003; 552(2):335-44.
112. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010; 4(8):118-26.
113. Bagchi K, Puri S. Free radicals and antioxidants in health and disease. *East Mediterr Health J.* 1998; 4: 350–60.
114. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(1):44-84.
115. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2015; 30(1): 11-26.
116. Iskusnykh IY, Popova TN, Agarkov AA, Pinheiro de Carvalho MÂ, Rjevskiy SG. Expression of Glutathione Peroxidase and Glutathione Reductase and Level of Free Radical Processes under Toxic Hepatitis in Rats. *J Toxicol.* 2013; 2013:870628.
117. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens.* 2000; 18(6):655-73.

118. Münzel T, Camici GG, Maack C, Bonetti NR, Fuster V, Kovacic JC. Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature: Part 2 of a 3-Part Series. *J Am Coll Cardiol.* 2017; 70(2):212-29.
119. Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol.* 2015; 6:524-51.
120. Mattera R, Benvenuto M, Giganti MG, et al. Effects of Polyphenols on Oxidative Stress-Mediated Injury in Cardiomyocytes. *Nutrients.* 2017; 9(5):523.
121. Hijazi A, Al Masri DS, Farhan H, Nasser M, Rammal H, Annan H. Effect of different ethanol concentrations, using different extraction techniques, on the antioxidant capacity of Lebanese *Eryngium creticum*. *IJPCBS.* 2015; 3(2):262-71.
122. Orčić D, Francišković M, Bekvalac K, et al. Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chem.* 2014; 143:48-53.
123. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol.* 1999; 299:152-78
124. Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal.* 2002; 10(3): 178-82.
125. Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* 1998; 76(2):270-76.
126. Orčić DZ, Mimica-Dukić NM, Francišković MM, Petrović SS, Jovin ED. Antioxidant activity relationship of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. *Chem Cent J.* 2011; 5:34.
127. Andrews JM. BSAC Working Party on Susceptibility Testing. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 4). *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(1):60-76.
128. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods.* 2007; 42(4):321-24.
129. Banfi E, Scialino G, Monti-Bragadin C. Development of a microdilution method to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 52(5):796-800.

130. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* 1985; 22(6):996-1006.
131. O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol.* 1998; 30(2):295-304.
132. Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68(6): 2950-958.
133. Mendez C, Garza E, Gulati P, Morris PA, Allen CC. Isolation and identification of microorganisms in JSC Mars-1 simulant soil. *Lunar Planet Sci.* 2005; 36:1-2.
134. Ganga RB, Madhu KP, Vijaya RA. Investigation of antioxidant and anti-inflammatory activity of leaves of *Dalbergia paniculata* (Roxb). *Asian Pac J Trop Med.* 2012; 5(6):455-58.
135. Aouey B, Samet AM, Fetoui H, Simmonds MSJ, Bouaziz M. Anti-oxidant, anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of grapevine leaf extract (*Vitis vinifera*) in mice and identification of its active constituents by LC-MS/MS analyses. *Biomed Pharmacother.* 2016;84: 1088-1098.
136. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95(2):351-58.
137. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982; 126(1):131-8.
138. Auclair C, Voisin E (1985). Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research.* CRC Press Une, Boca Raton, pp 123-132.
139. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods.* 1980; 38(1-2): 161-70.
140. Beutler E (1982). Catalase. In: Beutler E (ed) *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods.* New York, Grune and Stratton, pp 105-106.
141. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972; 247(10): 3170-175.

142. Beutler E (1984). Superoxide dismutase. In: Beutler E (ed) Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods. Philadelphia: Grune and Stratton; 1984: 83-85.
143. Beutler E. Reduced glutathione (GSH). In: Beutler E, ed. Red cell metabolism, a manual of biochemical methods. New York: Grune and Stratton, pp 112-114.
144. Molitoris BA, Ashush H, Dagher PC, et al. siRNA Targeted to p53 Attenuates Ischemic and Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20: 1754–64.
145. Xiong GZ, Ye KH, Huang JL, Ye CL. Effects of extracts of ginkgo biloba leaves on apelin concentration and expressions in plasma and myocardium of rats with myocardial ischemia injury. *J. Chin. Med. Mat.* 2009; 32:1238–241.
146. Sadeghi N, Dianat M, Badavi M, et al. Cardioprotective effect of aqueous extract of *Chichorium intybus* on ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart. *Avicenna journal of phytomedicine.* 2015; 5(6):568.
147. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods.* 2007; 39(2):175-91.
148. Iloki-Assanga SB, Lewis-Luján LM, Lara-Espinoza CL, Gil-Salido AA, Fernandez-Angulo D, Rubio-Pino JL, Haines DD. Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceras* L. and *Phoradendron californicum*. *BMC Res Notes.* 2015; 8(1):396.
149. Loganayaki N, Siddhuraju P, Manian S. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of phenolic extracts from *Helicteres isora* L. and *Ceiba pentandra* L. *J Food Sci Technol.* 2013; 50(4):687-95.
150. Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol.* 2011; 48(4):412-22.
151. Ndhlala AR, Moyo M, Van Staden J. Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules? *Molecules.* 2010; 15(10):6905-930.
152. Dutra RC, Leite MN, Barbosa NR. Quantification of phenolic constituents and antioxidant activity of *Pterodon emarginatus* Vogel seeds. *Int J Mol Sci.* 2008; 9(4): 606-614.
153. Alkhalidly AS, Hossain MA. Study on total phenolics and antioxidant activity of leaves crude extracts of *Annona squamosa* traditionally used for the treatment of cancerous tumours. *Asian Pac J Trop Dis.* 2015; 5:142-44.

154. Elisha IL, Botha FS, McGaw LJ, Eloff JN. The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. *BMC Complement Altern Med.* 2017; 17(1):133.
155. Al-Mariri A, Safi M. In Vitro Antibacterial Activity of Several Plant Extracts and Oils against Some Gram-Negative Bacteria. *Iran J Med Sci.* 2014; 39(1):36-43.
156. Inácio MC, Paz TA, Bertoni BW, Pereira AM. Effect of environmental and phenological factors on the antimicrobial activity of *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. roots. *Acta Scientiarum. Agronomy.* 2016; 38(4):467-73.
157. Miquel S, Lagrèfeuille R, Souweine B, Forestier C. Anti-biofilm Activity as a Health Issue. *Front Microbiol.* 2016; 7:592.
158. Nair S, Desai S, Poonacha N, Vipra A, Sharma U. Antibiofilm Activity and Synergistic Inhibition of *Staphylococcus aureus* Biofilms by Bactericidal Protein P128 in Combination with Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60(12):7280-289.
159. Quave CL, Plano LR, Pantuso T, Bennett BC. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol.* 2008; 118(3):418-28.
160. Das K, Tiwari RKS, Shrivastava DK. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends. *J Med Plants Res.* 2010; 4(2):104-11.
161. Elisha IL, Botha FS, McGaw LJ, Eloff JN. The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. *BMC Complement Altern Med.* 2017; 17(1):133.
162. Babii C, Mihalache G, Bahrin LG, et al. A novel synthetic flavonoid with potent antibacterial properties: In vitro activity and proposed mode of action. *PLoS One.* 2018; 13(4):e0194898.
163. Ulanowska K, Tkaczyk A, Konopa G, Wegrzyn G. Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch Microbiol.* 2006; 184(5):271-78.
164. Farhadi F, Khameneh B, Iranshahi M, Iranshahi M. Antibacterial activity of flavonoids and their structure-activity relationship: An update review. *Phytother Res.* 2019; 33(1):13-40.

165. Verghese J, Nguyen T, Oppedard LM, Seivert LM, Hiasa H, Ellis KC. Flavone-based analogues inspired by the natural product simocyclinone D8 as DNA gyrase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013; 23(21):5874-877.
166. Lou Z, Wang H, Zhu S, Ma C, Wang Z. Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. *J Food Sci.* 2011; 76(6):M398-403.
167. Chen CZ, Cooper SL. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes. *Biomaterials.* 2002; 23(16):3359-368.
168. Yi SM, Zhu JL, Fu LL, Li JR. Tea polyphenols inhibit *Pseudomonas aeruginosa* through damage to the cell membrane. *Int J Food Microbiol.* 2010; 144(1):111-117.
169. Górnjak I, Bartoszewski R, Króliczewski J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochem Rev.* 2019; 18(1): 241-72.
170. Wang Y, Lee SM, Dykes GA. Potential mechanisms for the effects of tea extracts on the attachment, biofilm formation and cell size of *Streptococcus mutans*. *Biofouling.* 2013; 29(3):307-18.
171. Gupta A, Dwivedi M, Mahdi AA, Nagana Gowda GA, Khetrpal CL, Bhandari M. Inhibition of adherence of multi-drug resistant *E. coli* by proanthocyanidin. *Urol Res.* 2012; 40(2):143-50.
172. Dey D, Debnath S, Hazra S, Ghosh S, Ray R, Hazra B. Pomegranate pericarp extract enhances the antibacterial activity of ciprofloxacin against extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and metallo- β -lactamase (MBL) producing Gram-negative bacilli. *Food Chem Toxicol.* 2012; 50(12):4302-309.
173. Gröblacher B, Kunert O, Bucar F. Compounds of *Alpinia katsumadai* as potential efflux inhibitors in *Mycobacterium smegmatis*. *Bioorg Med Chem.* 2012; 20(8): 2701-706.
174. Eumkeb G, Chukrathok S. Synergistic activity and mechanism of action of ceftazidime and apigenin combination against ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae*. *Phytomedicine.* 2013; 20(3-4):262-69.
175. Navarro-Martínez MD, Navarro-Perán E, Cabezas-Herrera J, Ruiz-Gómez J, García-Cánovas F, Rodríguez-López JN. Antifolate activity of epigallocatechin gallate against *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(7):2914-920.
176. Ding S, Jiang H, Fang J. Regulation of Immune Function by Polyphenols. *J Immunol Res.* 2018; 2018:1264074.

177. Carey MW, Rao NV, Kumar BR, Mohan GK. Anti-inflammatory and analgesic activities of methanolic extract of *Kigelia pinnata* DC flower. *J Ethnopharmacol.* 2010; 130(1):179-82.
178. Singh S, Kaur M, Singh A, Kumar B. Pharmacological evaluation of Anti-inflammatory and Anti-ulcer potential of heartwood of *Santalum album* in rats. *AJBPR.* 2014; 4(1):140-53.
179. Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, et al. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br J Pharmacol.* 2004; 142(2):331-38.
180. Saini AK, Goyal R, Gauttam VK, Kalia AN. Evaluation of anti-inflammatory potential of *Ricinus communis* Linn leaves extracts and its flavonoids content in Wistar rats. *J Chem Pharm Res.* 2010; 2(5):690-95.
181. El Jemli M, Kamal R, Marmouzi I, et al. Chemical composition, acute toxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of Moroccan *Tetraclinis articulate* L. *J Tradit Complement Med.* 2016; 7(3):281-87.
182. Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci.* 2004; 96(3):229-45.
183. Rathee P, Chaudhary H, Rathee S, Rathee D, Kumar V, Kohli K. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2009; 8(3):229-35.
184. Yui K, Imataka G, Nakamura H, Ohara N, Naito Y. Eicosanoids Derived From Arachidonic Acid and Their Family Prostaglandins and Cyclooxygenase in Psychiatric Disorders. *Curr Neuropharmacol.* 2015; 13(6):776-85.
185. Liang N, Kitts DD. Role of Chlorogenic Acids in Controlling Oxidative and Inflammatory Stress Conditions. *Nutrients.* 2015; 8(1):16.
186. Kimata M, Shichijo M, Miura T, Serizawa I, Inagaki N, Nagai H. Effects of luteolin, quercetin and baicalein on immunoglobulin E-mediated mediator release from human cultured mast cells. *Clin Exp Allergy.* 2000; 30(4):501-58.
187. Shin HS, Satsu H, Bae MJ, et al. Anti-inflammatory effect of chlorogenic acid on the IL-8 production in Caco-2 cells and the dextran sulphate sodium-induced colitis symptoms in C57BL/6 mice. *Food Chem.* 2015; 168:167-75.

188. Melillo de Magalhães P, Dupont I, Hendrickx A, et al. Anti-inflammatory effect and modulation of cytochrome P450 activities by *Artemisia annua* tea infusions in human intestinal Caco-2 cells. *Food Chem.* 2012; 134(2):864-71.
189. Kim JS, Jobin C. The flavonoid luteolin prevents lipopolysaccharide-induced NF-kappaB signalling and gene expression by blocking IkappaB kinase activity in intestinal epithelial cells and bone-marrow derived dendritic cells. *Immunology.* 2005; 115(3):375-87.
190. Rao YK, Fang SH, Tzeng YM. Antiinflammatory activities of flavonoids and a triterpene caffeate isolated from *Bauhinia variegata*. *Phytother Res.* 2008; 22(7):957-62.
191. Xu DP, Li Y, Meng X, et al. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(1):96.
192. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2011; 15(6): 1583-606.
193. Chen YW, Chou HC, Lin ST, et al. Cardioprotective Effects of Quercetin in Cardiomyocyte under Ischemia/Reperfusion Injury. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 2013:364519.
194. Mattera R, Benvenuto M, Giganti MG, Tresoldi I, Pluchinotta FR, Bergante S, Tettamanti G, Masuelli L, Manzari V, Modesti A, Bei R. Effects of Polyphenols on Oxidative Stress-Mediated Injury in Cardiomyocytes. *Nutrients.* 2017; 9(5): 523.
195. Louis XL, Thandapilly SJ, Kalt W, et al. Blueberry polyphenols prevent cardiomyocyte death by preventing calpain activation and oxidative stress. *Food Funct.* 2014; 5(8):1785-94.
196. Di Meo F, Lemaur V, Cornil J, et al. Free radical scavenging by natural polyphenols: atom versus electron transfer. *J Phys Chem A.* 2013; 117(10):2082-92.
197. Ozgen S, Kivilcim Kilinc O, Selamoğlu Z. Antioxidant Activity of Quercetin: A Mechanistic Review. *Turkish Journal of Agriculture- Food Science and Technology.* 2016; 4(12): 1134-138.
198. Akhlaghi M, Foshati S. Bioavailability and metabolism of flavonoids: A review. *Int J Nutr Sci.* 2017; 2:180-84.
199. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal.* 2013; 2013:162750.

200. Wang H, Sim MK, Loke WK, et al. Potential Protective Effects of Ursolic Acid against Gamma Irradiation-Induced Damage Are Mediated through the Modulation of Diverse Inflammatory Mediators. *Front Pharmacol.* 2017; 8:352.
201. Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia.* 2011; 82(4):513-23.
202. Ward NC, Hodgson JM, Croft KD, Burke V, Beilin LJ, Puddey IB. The combination of vitamin C and grape-seed polyphenols increases blood pressure: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Hypertens.* 2005; 23(2):427-34.
203. Kizhakekuttu TJ, Widlansky ME. Natural antioxidants and hypertension: promise and challenges. *Cardiovasc Ther.* 2010; 28(4):e20-32.
204. Ahmad A, Hossain MM, Singhal U, Islam N. Comparative study of marker of oxidative stress among normotensive, pre-hypertensive and hypertensive patients. *Biomed Res.* 2013; 24:491-95.
205. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci.* 2016; 5: e47.
206. Talukder MA, Kalyanasundaram A, Zuo L, et al. Is reduced SERCA2a expression detrimental or beneficial to postischemic cardiac function and injury? Evidence from heterozygous SERCA2a knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 294(3):H1426-34.
207. Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Inserte J, Rodriguez-Sinovas A, Piper HM. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2012; 94(2):168-80.
208. Misquitta CM, Mwanjewe J, Nie L, Grover AK. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump mRNA stability in cardiac and smooth muscle: role of the 3'-untranslated region. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002; 283(2):560-68.
209. Lipskaia L, Chemaly ER, Hadri L, Lompre AM, Hajjar RJ. Sarcoplasmic reticulum Ca(2+) ATPase as a therapeutic target for heart failure. *Expert Opin Biol Ther.* 2010; 10(1):29-41.
210. Zhu S, Xu T, Luo Y, et al. Luteolin Enhances Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase Activity through p38 MAPK Signaling thus Improving Rat Cardiac Function after Ischemia/Reperfusion. *Cell Physiol Biochem.* 2017; 41(3):999-1010.
211. Santos MS, Oliveira ED, Santos-Miranda A, et al. Dissection of the Effects of Quercetin on Mouse Myocardium. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2017; 120(6):550-59.

212. Kanno Y, Watanabe R, Zempo H, Ogawa M, Suzuki J, Isobe M. Chlorogenic acid attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Int Heart J.* 2013; 54(3):176-80.
213. Angelone T, Pasqua T, Di Majo D, et al. Distinct signalling mechanisms are involved in the dissimilar myocardial and coronary effects elicited by quercetin and myricetin, two red wine flavonols. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2011; 21(5):362-71.
214. Viskupicova J, Strosova M, Sturdik E, Horakova L. Modulating effect of flavonoids and their derivatives on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase oxidized by hypochloric acid and peroxynitrite. *Neuro Endocrinol Lett.* 2009; 30:148-51.
215. Duarte J, Francisco V, Perez-Vizcaino F. Modulation of nitric oxide by flavonoids. *Food Funct.* 2014; 5(8):1653-68.
216. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012;33(7):829-37, 837a-837d.
217. Yu X, Ge L, Niu L, Lian X, Ma H, Pang L. The Dual Role of Inducible Nitric Oxide Synthase in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: Friend or Foe? *Oxid Med Cell Longev.* 2018; 2018:8364848.
218. Liu VW, Huang PL. Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovasc Res.* 2008; 77(1):19-29.
219. Scherrer-Crosbie M, Ullrich R, Bloch KD, et al. Endothelial nitric oxide synthase limits left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation.* 2001; 104(11):1286-291.
220. Brunner F, Maier R, Andrew P, Wölkart G, Zechner R, Mayer B. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res.* 2003; 57(1):55-62.
221. Testai L, Martelli A, Cristofaro M, Breschi MC, Calderone V. Cardioprotective effects of different flavonoids against myocardial ischaemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts. *J Pharm Pharmacol.* 2013; 65(5): 750-56.
222. Lu X, Bi YW, Chen KB. Olmesartan restores the protective effect of remote ischemic preconditioning against myocardial ischemia/reperfusion injury in spontaneously hypertensive rats. *Clinics (Sao Paulo).* 2015; 70(7):500-507.
223. Balakumar P, Singh H, Singh M, Anand-Srivastava MB. The impairment of preconditioning-mediated cardioprotection in pathological conditions. *Pharmacol Res.* 2009; 60(1):18-23.

224. Vinten-Johansen J, Granfeldt A, Mykytenko J, Undyala VV, Dong Y, Przyklenk K. The multidimensional physiological responses to postconditioning. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 14(5):791-810.
225. Mozaffari MS, Schaffer SW. Effect of hypertension and hypertension-glucose intolerance on myocardial ischemic injury. *Hypertension*. 2003; 42(5):1042-49.
226. Elnakish MT, Hassanain HH, Janssen PM. Vascular remodeling-associated hypertension leads to left ventricular hypertrophy and contractile dysfunction in profilin-1 transgenic mice. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2012; 60(6):544-52.
227. Li Q, Youn JY, Cai H. Mechanisms and consequences of endothelial nitric oxide synthase dysfunction in hypertension. *J Hypertens*. 2015; 33(6):1128-36.
228. Debnath J, Nath LK. A review on pathophysiology of ischemic-reperfusion injury of heart and ameliorating role of flavonoids and polyphenols. *J Med Plant Res*. 2014; 8(16):607-14.
229. Monsalve B, Concha-Meyer A, Palomo I, Fuentes E. Mechanisms of Endothelial Protection by Natural Bioactive Compounds from Fruit and Vegetables. *An Acad Bras Cienc*. 2017; 89(1 Suppl 0):615-33.
230. Carrick D, Haig C, Maznyczka AM, et al. Hypertension, Microvascular Pathology, and Prognosis After an Acute Myocardial Infarction. *Hypertension*. 2018; 72(3):720-30.
231. Wang X, Han M, Bao J, Tu W, Dai Z. A superoxide anion biosensor based on direct electron transfer of superoxide dismutase on sodium alginate sol-gel film and its application to monitoring of living cells. *Anal Chim Acta*. 2012; 717:61-66.
232. Darra E, Rungatscher A, Carcereri de Prati A, et al. Dual modulation of nitric oxide production in the heart during ischaemia/reperfusion injury and inflammation. *Thromb Haemost*. 2010; 104(2):200-6.
233. Breton-Romero R, Lamas S. Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. *Redox biology*. 2014; 2:529-34.
234. Madamanchi NR, Runge MS. Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free Radic Biol Med*. 2013; 61:473-501.
235. Kurian GA, Rajagopal R, Vedantham S, Rajesh M. The Role of Oxidative Stress in Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury and Remodeling: Revisited. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016:1656450.
236. González J, Valls N, Brito R, Rodrigo R. Essential hypertension and oxidative stress: New insights. *World J Cardiol*. 2014; 6(6):353-66.

237. Besík J, Szárszoi O, Kunes J, et al. Tolerance to acute ischemia in adult male and female spontaneously hypertensive rats. *Physiol Res.* 2007; 56(3):267-74.
238. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014; 2014:360438.
239. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest.* 2013; 123(1):92-100.
240. Rodrigo R, Libuy M, Feliú F, Hasson D. Oxidative stress-related biomarkers in essential hypertension and ischemia-reperfusion myocardial damage. *Dis Markers.* 2013; 35(6):773-90.
241. Rodiño-Janeiro BK, Paradelo-Dobarro B, Castiñeiras-Landeira MI, Raposeiras-Roubín S, González-Juanatey JR, Alvarez E. Current status of NADPH oxidase research in cardiovascular pharmacology. *Vasc Health Risk Manag.* 2013; 9:401-28.
242. Neri M, Riezzo I, Pascale N, Pomara C, Turillazzi E. Ischemia/Reperfusion Injury following Acute Myocardial Infarction: A Critical Issue for Clinicians and Forensic Pathologists. *Mediators Inflamm.* 2017; 2017:7018393.
243. Li S, Tan HY, Wang N, Cheung F, Hong M, Feng Y. The Potential and Action Mechanism of Polyphenols in the Treatment of Liver Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2018; 2018:8394818.
244. Shehab NG, Abu-Gharbieh E, Bayoumi FA. Impact of phenolic composition on hepatoprotective and antioxidant effects of four desert medicinal plants. *BMC Complement Altern Med.* 2015; 15:401.
245. Amadi CN, Orisakwe OE. Herb-Induced Liver Injuries in Developing Nations: An Update. *Toxics.* 2018; 6(2). pii: E24.
246. Teschke R, Frenzel C, Glass X, Schulz J, Eickhoff A. Herbal hepatotoxicity: A critical review. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2013; 75:630–36.
247. Teschke R, Wolff A, Frenzel C, Schulze J, Eickhoff A. Herbal hepatotoxicity: A tabular compilation of reported cases. *Liver Int.* 2012; 32:1543–56.
248. Diwan V, Brown L, C Gobe G. The flavonoid rutin improves kidney and heart structure and function in an adenine-induced rat model of chronic kidney disease. *J Funct Foods.* 2017; 33:85-93.

-
-
249. Paredes MD, Romecín P, Atucha NM, et al. Moderate Effect of Flavonoids on Vascular and Renal Function in Spontaneously Hypertensive Rats. *Nutrients*. 2018; 10(8). pii: E1107.
250. Vargas F, Romecín P, García-Guillén AI, et al. Flavonoids in Kidney Health and Disease. *Front Physiol*. 2018; 9:394.
251. Duarte J, Jiménez R, O'Valle F, et al. Protective effects of the flavonoid quercetin in chronic nitric oxide deficient rats. *J Hypertens*. 2002; 20(9):1843-854.
252. Lan CZ, Ding L, Su YL, et al. Grape seed proanthocyanidins prevent DOCA-salt hypertension-induced renal injury and its mechanisms in rats. *Food Funct*. 2015; 6(7):2179-186.
253. Wang QZ, Gao HQ, Liang Y, Zhang J, Wang J, Qiu J. Cofilin1 is involved in hypertension-induced renal damage via the regulation of NF- κ B in renal tubular epithelial cells. *J Transl Med*. 2015; 13:323.
254. Palanisamy N, Venkataraman AC. Beneficial effect of genistein on lowering blood pressure and kidney toxicity in fructose-fed hypertensive rats. *Br J Nutr*. 2013; 109(10):1806-12.

БИОГРАФИЈА

1. ЛИЧНИ ПОДАЦИ

Име и презиме: Јована Брадић

Датум и место рођења: 19.12.1991. године, Крагујевац, Република Србија

Адреса: Јосифа Шнерсона 6/3-26

Телефон: 064/3629506

2. ОБРАЗОВАЊЕ

Прва крагујевачка гимназија,

Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, дипломирала 2015. године

Специјализација из области Фармацеутска технологија, 2018 - данас

3. ПОЗНАВАЊЕ СТРАНИХ ЈЕЗИКА

Енглески језик (положени међународни испити, ниво Б1- *Preliminary English Test* и ниво Б2- *First Certificate in English*, Универзитета у Кембриџу)

4. РАДНО ИСКУСТВО

Асистент на катедри за фармацеутску технологију, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу

5. РАЗНО

Учесник бројних домаћих и међународних конгреса;

Аутор је поглавља књиге „Основи биофармације“, главног уредника Снежане М. Цупаре, Факултет Медицинских наука, Крагујевац 2018. год.

БИБЛИОГРАФИЈА

РАДОВИ ШТАМПАНИ У ЧАСОПИСИМА НА СС/SCI ЛИСТИ:

1. Milic P, Jeremic J, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic N, **Bradic J**, Nikolic Turnic T, Milosavljevic I, Bolevich S, Bolevich S, Labudovic Borovic M, Arsic A, Mitrovic M, Jakovljevic V, Vucic V. Effects of different dietary regimes alone or in combination with standardized Aronia melanocarpa extract supplementation on lipid and fatty acids profiles in rats. *Mol Cell Biochem*. 2019. doi: 10.1007/s11010-019-03597-6.
2. Jeremic JN, Jakovljevic VL, Zivkovic VI, Srejovic IM, **Bradic JV**, Bolevich S, Nikolic Turnic TR, Mitrovic SL, Jovicic NU, Tyagi SC, Jeremic NS. The cardioprotective effects of diallyl trisulfide on diabetic rats with ex vivo induced ischemia/reperfusion injury. *Mol Cell Biochem*. 2019. doi:10.1007/s11010-019-03577-w.
3. Pusica I, Djordjevic D, **Bradic J**, Jeremic J, Srejovic I, Zivkovic V, Jakovljevic V. The effects of acute and chronic Red Bull® consumption on cardiodynamics and oxidative stress in coronary effluent of trained rats. *Vojnosanit Pregl*. 2019 doi: 10.2298/VSP190119040P.
4. **Bradic J**, Jeremic N, Petkovic A, Jeremic J, Zivkovic V, Srejovic I, Sretenovic J, Matic S, Jakovljevic V, Tomovic M. Cardioprotective effects of *Galium verum* L. extract against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Arch Physiol Biochem*. 2019. doi: 10.1080/13813455.2018.1551904.
5. **Bradic J**, Zivkovic V, Srejovic I, Jakovljevic V, Petkovic A, Turnic TN, Jeremic J, Jeremic N, Mitrovic S, Sobot T, Ponorac N, Ravic M, Tomovic M. Protective Effects of Galium verum L. Extract against Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury in Spontaneously Hypertensive Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2019; 2019:4235405.
6. Prokic V, Plecevic S, **Bradic J**, Petkovic A, Srejovic I, Bolevich S, Jeremic J, Bolevich S, Jakovljevic V, Zivkovic V. The impact of 9 weeks swimming exercise on heart function in hypertensive and normotensive rats: role of cardiac oxidative stress. *J Sports Med Phys Fitness*. 2019. doi:10.23736/S0022-4707.19.09798-6.
7. Djuric M, Nikolic T, Kostic S, Radonjic K, Jeremic J, Petkovic A, **Bradic J**, Milosavljevic I, Srejovic IM, Zivkovic VI, Djuric D, Jakovljevic V, Stevanovic P. Inhibition of gasotransmitters production and calcium influx affect cardiodynamic variables and cardiac oxidative stress in propofol-anaesthetized wistar male rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2019. doi: 10.1139/cjpp-2018-0719.
8. Rabrenovic M, Nikolic T, Rabrenovic V, **Bradic J**, Tresnjic S, Petkovic A, Jakovljevic B, Masic S, Bokonjic D. Impact of the hyperbaric oxygen therapy on the redox status in patients with systemic lupus erythematosus. *Vojnosanit Pregl*. 2019; 76(4): 412–421.
9. Jakovljevic V, Milic P, **Bradic J**, Jeremic J, Zivkovic V, Srejovic I, Nikolic Turnic T, Milosavljevic I, Jeremic N, Bolevich S, Labudovic Borovic M, Mitrovic M, Vucic V. Standardized Aronia melanocarpa Extract as Novel Supplement against Metabolic Syndrome: A Rat Model. *Int J Mol Sci*. 2018;20(1).
10. Jakovljevic B, Nikolic Turnic T, Jeremic N, Jeremic J, **Bradic J**, Ravic M, Jakovljevic VL, Jelic D, Radovanovic D, Pechanova O, Zivkovic V. The impact of aerobic and anaerobic training regimes on blood pressure in normotensive and hypertensive rats: focus on redox changes. *Mol Cell Biochem*. 2018. doi:10.1007/s11010-018-3457-y.
11. Petkovic AM, Jakovljevic VL, **Bradic JV**, Jeremic JN, Jeremic NS, Nikolic Turnic TR, Jovicic NU, Rosic VZ, Srejovic IM, Zivkovic VI. The Effects of Potassium Cyanide on the Functional Recovery of Isolated Rat Hearts after Ischemia and Reperfusion: The Role

of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2018; 2018:5979721. doi: 10.1155/2018/5979721.

12. **Bradic J**, Dragojlovic Ruzicic R, Jeremic J, Petkovic A, Stojic I, Nikolic T, Zivkovic V, Srejovic I, Radovanovic D, Jakovljevic VL. Comparison of training and detraining on redox state of rats: gender specific differences. *Gen Physiol Biophys.* 2018;37(3):285-297.
13. Tepic S, Petkovic A, Srejovic I, Jeremić N, Zivkovic V, Loncarevic S, **Bradic J**, Jakovljevic V, Zivkovic M. Impact of hyperbaric oxygenation on oxidative stress in diabetic patients. *Undersea Hyperb Med* 2018; 45 (1): 9-17.
14. Pesic G, Jeremic J, Nikolic T, Zivkovic V, Srejovic I, Vranic A, **Bradic J**, Ristic B, Matic A, Prodanovic N, Jakovljevic V. Interleukin-6 as possible early marker of stress response after femoral fracture. *Mol Cell Biochem.* 2017; 430(1-2): 191-199.
15. Radojevic-Popovic R, Zivkovic V, Jeremic N, Sretenovic J, Velicanin N, **Bradic J**, Jakovljevic V. An evaluation of the redox state in professional scuba divers. *Undersea Hyperb Med* 2015; 42(5):409-416.

РАДОВИ ШТАМПАНИ У ЧАСОПИСИМА ЦИТИРАНИМ У EMBASE-У

1. Pusica I, Srejovic I, **Bradic J**, Smigic J, Bolevich S, Bolevich S, Jakovljevic V, Djordjevic D. The Effects of Direct Red Bull Administration to Isolated Hearts of Trained and Untrained Rats Who Regularly Consumed or Did Not Consume Energy Drink: Focus on Cardiodynamics and Oxidative Stress. *Ser J Exp Clin Res.* 2019; doi 10.2478/sjecr-2019-0022 .
2. Antonijevic A, **Bradic J**, Zivkovic V. Exercise Treadmill Test in Patients with Diabetes Mellitus Type 2. *Ser J Exp Clin Res.* 2018; doi 10.2478/sjecr-2018-0051.
3. Krivokapic M, **Bradic J**, Petkovic A, Tomovic M. Phytochemical and pharmacological properties *Allium Ursinum*. *Ser J Exp Clin Res.* 2018; doi: 10.2478/sjecr-2018-0003.
4. **Bradic J**, Petkovic A, Tomovic M. Phytochemical and pharmacological properties of some species of the genus *Galium L.* (*Galium verum* and *mollugo*). *Ser J Exp Clin Res.* 2018; doi: 10.1515/sjecr-2017-0057.
5. Jeremic N, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic J, Petkovic A, **Bradic J**, Jakovljevic V. Effect of ischemic and proton pump inhibitors preconditioning on oxidative stress of isolated rat heart. *Ser J Exp Clin Res.* 2018; 19:131-139.
6. Jevdjevic M, Srejovic I, Zivkovic V, Barudzic N, Petkovic A, **Bradic J**, Djuric D, Jakovljevic V. The effects of diclofenac and ibuprofen on heart function and oxidative stress markers in the isolated rat heart. *Ser J Exp Clin Res.* 2014; 15(1): 11-19.

AUTHORS CURRICULUM VITAE

1. PERSONAL DATA

Name and surname: Jovana Bradic

Date and place of birth: December 12, 1991, Kragujevac, Republic of Serbia

Address: Josifa Snersona 6/3-26

Phone: 064/3629506

2. EDUCATION

The First Grammar School of Kragujevac,

Faculty of medical sciences, University of Kragujevac, graduated - 2015

Specialization in Pharmaceutical technology- 2018 - present

3. FOREIGN LANGUAGE

English (passed international exams, level B1- *Preliminary English Test* and level B2- *First Certificate in English*, University of Cambridge)

4. WORK EXPERIENCE

Assistant trainee at Department of Pharmaceutical technology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac Kragujevac

5. MISCELLANEOUS

Participant in large number of national and international congresses;

Author of the chapter in a book "Osnovi biofarmacije", editor Snezana M. Cupara, Faculty of medical sciences, Kragujevac, 2018.

LIST OF PUBLICATIONS

ARTICLES PUBLISHED IN CC/SCI JOURNALS

1. Milic P, Jeremic J, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic N, **Bradic J**, Nikolic Turnic T, Milosavljevic I, Bolevich S, Bolevich S, Labudovic Borovic M, Arsic A, Mitrovic M, Jakovljevic V, Vucic V. Effects of different dietary regimes alone or in combination with standardized Aronia melanocarpa extract supplementation on lipid and fatty acids profiles in rats. *Mol Cell Biochem.* 2019. doi: 10.1007/s11010-019-03597-6.
2. Jeremic JN, Jakovljevic VL, Zivkovic VI, Srejovic IM, **Bradic JV**, Bolevich S, Nikolic Turnic TR, Mitrovic SL, Jovicic NU, Tyagi SC, Jeremic NS. The cardioprotective effects of diallyl trisulfide on diabetic rats with ex vivo induced ischemia/reperfusion injury. *Mol Cell Biochem.* 2019. doi:10.1007/s11010-019-03577-w.
3. Pusica I, Djordjevic D, **Bradic J**, Jeremic J, Srejovic I, Zivkovic V, Jakovljevic V. The effects of acute and chronic Red Bull® consumption on cardiodynamics and oxidative stress in coronary effluent of trained rats. *Vojnosanit Pregl.* 2019 doi: 10.2298/VSP190119040P.
4. **Bradic J**, Jeremic N, Petkovic A, Jeremic J, Zivkovic V, Srejovic I, Sretenovic J, Matic S, Jakovljevic V, Tomovic M. Cardioprotective effects of *Galium verum* L. extract against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Arch Physiol Biochem.* 2019:1-8.
5. **Bradic J**, Zivkovic V, Srejovic I, Jakovljevic V, Petkovic A, Turnic TN, Jeremic J, Jeremic N, Mitrovic S, Sobot T, Ponorac N, Ravic M, Tomovic M. Protective Effects of Galium verum L. Extract against Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury in Spontaneously Hypertensive Rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2019; 2019:4235405.
6. Prokic V, Plecevic S, **Bradic J**, Petkovic A, Srejovic I, Bolevich S, Jeremic J, Bolevich S, Jakovljevic V, Zivkovic V. The impact of 9 weeks swimming exercise on heart function in hypertensive and normotensive rats: role of cardiac oxidative stress. *J Sports Med Phys Fitness.* 2019. doi:10.23736/S0022-4707.19.09798-6.
7. Djuric M, Nikolic T, Kostic S, Radonjic K, Jeremic J, Petkovic A, **Bradic J**, Milosavljevic I, Srejovic IM, Zivkovic VI, Djuric D, Jakovljevic V, Stevanovic P. Inhibition of gasotransmitters production and calcium influx affect cardiodynamic variables and cardiac oxidative stress in propofol-anaesthetized wistar male rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2019. doi: 10.1139/cjpp-2018-0719.
8. Rabrenovic M, Nikolic T, Rabrenovic V, **Bradic J**, Tresnjic S, Petkovic A, Jakovljevic B, Masic S, Bokonjic D. Impact of the hyperbaric oxygen therapy on the redox status in patients with systemic lupus erythematosus. *Vojnosanit Pregl.* 2019; 76(4): 412–421.
9. Jakovljevic V, Milic P, **Bradic J**, Jeremic J, Zivkovic V, Srejovic I, Nikolic Turnic T, Milosavljevic I, Jeremic N, Bolevich S, Labudovic Borovic M, Mitrovic M, Vucic V. Standardized Aronia melanocarpa Extract as Novel Supplement against Metabolic Syndrome: A Rat Model. *Int J Mol Sci.* 2018;20(1).
10. Jakovljevic B, Nikolic Turnic T, Jeremic N, Jeremic J, **Bradic J**, Ravic M, Jakovljevic VL, Jelic D, Radovanovic D, Pechanova O, Zivkovic V. The impact of aerobic and anaerobic training regimes on blood pressure in normotensive and hypertensive rats: focus on redox changes. *Mol Cell Biochem.* 2018. doi:10.1007/s11010-018-3457-y.
11. Petkovic AM, Jakovljevic VL, **Bradic JV**, Jeremic JN, Jeremic NS, Nikolic Turnic TR, Jovicic NU, Rosic VZ, Srejovic IM, Zivkovic VI. The Effects of Potassium Cyanide on the Functional Recovery of Isolated Rat Hearts after Ischemia and Reperfusion: The Role

of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2018; 2018:5979721. doi: 10.1155/2018/5979721.

12. **Bradic J**, Dragojlovic Ruzicic R, Jeremic J, Petkovic A, Stojic I, Nikolic T, Zivkovic V, Srejovic I, Radovanovic D, Jakovljevic VL. Comparison of training and detraining on redox state of rats: gender specific differences. *Gen Physiol Biophys.* 2018;37(3):285-297.
13. Tepic S, Petkovic A, Srejovic I, Jeremić N, Zivkovic V, Loncarevic S, **Bradic J**, Jakovljevic V, Zivkovic M. Impact of hyperbaric oxygenation on oxidative stress in diabetic patients. *Undersea Hyperb Med* 2018; 45 (1): 9-17.
14. Pesic G, Jeremic J, Nikolic T, Zivkovic V, Srejovic I, Vranic A, **Bradic J**, Ristic B, Matic A, Prodanovic N, Jakovljevic V. Interleukin-6 as possible early marker of stress response after femoral fracture. *Mol Cell Biochem.* 2017; 430(1-2): 191-199.
15. Radojevic-Popovic R, Zivkovic V, Jeremic N, Sretenovic J, Velicanin N, **Bradic J**, Jakovljevic V. An evaluation of the redox state in professional scuba divers. *Undersea Hyperb Med* 2015; 42(5):409-416.

ARTICLES PUBLISHED IN JOURNALS CITED IN EMBASE

1. Pusica I, Srejovic I, **Bradic J**, Smigic J, Bolevich S, Bolevich S, Jakovljevic V, Djordjevic D. The Effects of Direct Red Bull Administration to Isolated Hearts of Trained and Untrained Rats Who Regularly Consumed or Did Not Consume Energy Drink: Focus on Cardiodynamics and Oxidative Stress. *Ser J Exp Clin Res.* 2019; doi 10.2478/sjecr-2019-0022.
2. Antonijevic A, **Bradic J**, Zivkovic V. Exercise Treadmill Test in Patients with Diabetes Mellitus Type 2. *Ser J Exp Clin Res.* 2018; doi 10.2478/sjecr-2018-0051.
3. Krivokapic M, **Bradic J**, Petkovic A, Tomovic M. Phytochemical and pharmacological properties *Allium Ursinum*. *Ser J Exp Clin Res.* 2018; doi: 10.2478/sjecr-2018-0003
4. **Bradic J**, Petkovic A, Tomovic M. Phytochemical and pharmacological properties of some species of the genus *Galium L.* (*Galium verum* and *mollugo*). *Ser J Exp Clin Res.* 2018; doi: 10.1515/sjecr-2017-0057.
5. Jeremic N, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic J, Petkovic A, **Bradic J**, Jakovljevic V. Effect of ischemic and proton pump inhibitors preconditioning on oxidative stress of isolated rat heart. *Ser J Exp Clin Res.* 2018; 19:131-139.
6. Jevdjevic M, Srejovic I, Zivkovic V, Barudzic N, Petkovic A, **Bradic J**, Djuric D, Jakovljevic V. The effects of diclofenac and ibuprofen on heart function and oxidative stress markers in the isolated rat heart. *Ser J Exp Clin Res.* 2014; 15(1): 11-19.

ПРИЛОГ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ**

Редни број - РБ:

Идентификациони број - ИБР:

Тип документације - ТД: Монографска документација

Тип записа - ТЗ: Текстуални штампани материјал

Врста рада - ВР: Докторска дисертација

Аутор - АУ: Јована Брадић

Ментор/коментор - МН: Марина Томовић, ванредни професор

Наслов рада - НР: Испитивање антимикуробних, антиинфламацијских, антиоксидационих и кардиопротективних ефеката екстракта ивањског цвећа, *Galium verum L*

Језик публикације - ЈП: Српски (ћирилица)

Језик извода - ЈИ: Српски/Енглески

Земља публикавања - ЗП: Република Србија

Уже географско подручје - УГП: Шумадијски округ

Година - ГО: 2019.

Издавач - ИЗ: Ауторски репринт

Место и адреса - МС: 34000 Крагујевац, Србија, Улица Светозара Марковића 69

Физичи опис рада - ФО: 190 страна, 16 слика, 38 табела, 32 графика

Научна област - УДК: Медицина

Научна дисциплина - ДИ: Експериментална физиологија

Предметна одредница/ кључне речи - ПО: *Galium verum*, исхемијско-реперфузиона повреда миокарда, инфламација, оксидациони стрес

Чува се - ЧУ: У библиотеци Факултета медицинских наука у Крагујевцу, Светозара Марковића 69, Република Србија

Важна напомена- МН:

Извод - ИД:

Циљ: Циљ овог истраживања био је да испита антимикробна, антиоксидациона, антиинфламацијска и кардиопротективна својства екстраката добијених из надземних делова биљке ивањско цвеће (*Galium verum L.*).

Метод: Антимикробна активност екстраката тестирана је помоћу бујон микродилуционог метода, док је антибиофилм активност тестирана помоћу *Tissue culture plate* теста. Антиинфламацијски ефекат екстраката одређиван је на моделу инфламације изазване карагенином код пацова. Овај део студије обухватио је 50 пацова (5 група по 10 пацова): пацови на третману екстрактом у дози од 50 mg/kg, 100 mg/kg и 200 mg/kg интраперитонеално (i.p.), индометацином (10 mg/kg i.p.) и пацови на третману 0,9% NaCl. Ефекти екстраката ивањског цвећа на функцију миокарда испитивани су помоћу модела исхемијско-реперфузионе (И-Р) повреде изолованог срца пацова, методом ретроградне перфузије по *Langendorff*-у. Овај део експеримента обухватио је 80 пацова (8 група по 10 пацова): здрави и спонтано хипертензивни пацови који су током 4 недеље, пре изазивања срчане И-Р, били на третману метанолним екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg, 250 mg/kg и 500 mg/kg per os и здрави и спонтано хипертензивни нетретирани пацови. У узорцима коронарног венског ефлуента одређивани су нивои прооксиданаса, док је из узорака венске крви одређиван системски редок статус.

Резултати: Наши резултати су открили умерену антибактеријску и слабу антигљивичну активност екстраката, чији је интензитет варирао у зависности од тестираног микроорганизма и типа екстракта. Метанолни екстракт ивањског цвећа у свим дозама показао је значајан потенцијал ка ублажавању инфламације изазване карагенином. Четворонедељни третман екстрактом ивањског цвећа у свим дозама значајно је побољшао опоравак функције миокарда и допринео очувању контракције и релаксације срца. Такође екстракт ове биљне врсте умањио је срчану и системску продукцију прооксиданаса. Наведене протективне ефекте екстракт ивањског цвећа је остварио у условима нормотензије и повишеног крвног притиска, при чему је интензивнији утицај након администрације више дозе.

Закључак: Обећавајући ефекти ивањског цвећа у овој докторској дисертацији пружају основу за будућа истраживања која би додатно сагледала терапијске могућности ове биљне врсте и расветлила механизме путем којих остварује фармаколошку активност.

Датум прихватања теме од стране ННВ - ДП: 31.01.2018.

Датум одбране - ДО:

Чланови комисије - КО:

Доц. др Ана Барјактаревић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска технологија, председник;

Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан;

Проф. др Биљана Божин, варедни професор Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду за ужу научну област Фармакогнозија и фитотерапија, члан;

KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC

FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

Accession number - ANO:

Identification number - INO:

Documentation type - DT: Monographic publication

Type of record - TR: Textual material, printed

Contents code - CC: PhD thesis

Author - AU: Jovana Bradic

Menthor/co-mentor - MN: Marina Tomovic, associate professor

Title - TI: Evaluation of antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant and cardioprotective effects of *Galium verum L* extract

Language of text - LT: Serbian (cyrillic)

Language of abstract: Serbian/English

Country of publication - CP: Republic of Serbia

Locality of publication - LP: Sumadija municipality

Publication year - PY: 2019

Publisher - PU: Author`s reprint

Publication place - PP: 34000 Kragujevac, Serbia, Svetozara Markovica Street, 69

Physical description - PD: 190 pages, 16 pictures, 38 tables, 32 graphs

Scientific field - SF: Medicine

Scientific discipline - SD: Experimental physiology

Subject/key words - SKW: *Galium verum*, myocardial ischemia-reperfusion injury, inflammation, oxidative stress

UDC: medicine

Holding data: Library of Faculty of medical sciences, University of Kragujevac, Svetoyara Markovica Street 69, Republic of Serbia

Note - N:

Abstract -AB:

Objective: The aim of this study was to estimate the antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory and cardioprotective properties of the extracts obtained from the aerial part of lady's bedstraw (*Galium verum* L, *G. verum* L).

Methods: The antimicrobial activity of the extract was tested by microdilution method, while the antibiofilm activity was assessed by Tissue Culture Plate test. The anti-inflammatory effects of extracts were determined by using model of carrageenan- induced inflammation in rats. This part of the study included 50 rats (5 groups, 10 rats per group): rats on the treatment with extracts at doses of 50 mg/kg, 100 mg/kg and 200 mg/kg intraperitoneally (i.p.), indomethacin (10 mg/kg i.p.) and rats treated with 0.9% NaCl solution. The effects of extracts of *G. verum* on myocardial function were investigated by using a model of ischemia-reperfusion (I-R) injury of the isolated rat hearts, by Langendorff retrograde perfusion method. This part of the study included 80 rats divided into 8 groups: healthy and spontaneously hypertensive rats that were treated with methanolic extract of *G. verum* at a dose of 125 mg/kg, 250 mg/kg and 500 mg/kg for 4 weeks prior to the induction of cardiac I-R, and healthy and spontaneously hypertensive untreated rats. Levels of pro-oxidants were determined in the samples of coronary venous effluent, while systemic redox state was estimated in venous blood samples.

Results: Our results revealed a moderate antibacterial and weak antifungal activity of extracts, the intensity of which varied depending on the tested microorganism and the type of extract. Methanolic extract of *G. verum* in all doses showed significant potential to alleviate carrageenan-induced inflammation, with the most pronounced effect achieved with the highest dose. Four-week treatment with *G. verum* extract in all doses significantly improved the myocardial functional recovery and contributed to preservation of contraction and relaxation of the heart, as well as the response of coronary circulation to ischemia. The extract of this plant species diminished cardiac and systemic production of pro-oxidants as well. The above-mentioned protective effects of the *G. verum* extract were achieved both in conditions of normal and elevated blood pressure, with more intensive influence after administration of higher doses.

Conclusion: The promising effects of *G. verum* in this PhD thesis provides a basis for future research which would further explore the therapeutic possibilities of this plant species and illuminate mechanisms underlying pharmacological activity.

Accepted by the Scientific Board on - ASB: January 31, 2018

Defended on - DE:

Thesis defended board (Degree/name/surname/title/faculty) - DB:

Assistant professor Ana Barjaktarevic, PhD, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific domain Pharmaceutical technology, chairman;

Full professor Vladimir Jakovljevic, MD, PhD, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific domain Physiology, member;

Associate professor Biljana Bozin, PhD, Medical faculty, University of Novi Sad, scientific domain Pharmacognosy and phytotherapy, member.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Јована Брадић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

ИСПИТИВАЊЕ АНТИМИКРОБНИХ, АНТИИНФЛАМАЦИЈСКИХ, АНТИОКСИДАЦИОНИХ И КАРДИОПРОТЕКТИВНИХ ЕФЕКТА ЕКСТРАКТА ИВАЊСКОГ ЦВЕЋА, GALIUM VERUM L

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу _____, 02.09.2019. године,

Јована Брадић
потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Јована Брадић

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

ИСПИТИВАЊЕ АНТИМИКРОБНИХ, АНТИИНФЛАМАЦИЈСКИХ,
АНТИОКСИДАЦИОНИХ И КАРДИОПРОТЕКТИВНИХ ЕФЕКТА
ЕКСТРАКТА ИВАЊСКОГ ЦВЕЋА, GALIUM VERUM L

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу _____, 02.09.2019. године,


Јелена Трјуџић
Јотине аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>














Списак објављених радова (прописани минимални услов за одбрану докторске дисертације)

1. **Bradic J**, Zivkovic V, Srejovic I, Jakovljevic V, Petkovic A, Turnic TN, Jeremic J, Jeremic N, Mitrovic S, Sobot T, Ponorac N, Ravic M, Tomovic M. Protective Effects of *Galium verum* L. Extract against Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury in Spontaneously Hypertensive Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2019; 2019:4235405. **M21**
2. **Bradic J**, Jeremic N, Petkovic A, Jeremic J, Zivkovic V, Srejovic I, Sretenovic J, Matic S, Jakovljevic V, Tomovic M. Cardioprotective effects of *Galium verum* L. extract against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Arch Physiol Biochem*. 2019; 11:1-8. **M23**
3. Jakovljevic V, Milic P, **Bradic J**, Jeremic J, Zivkovic V, Srejovic I, Nikolic Turnic T, Milosavljevic I, Jeremic N, Bolevich S, Labudovic Borovic M, Mitrovic M, Vucic V. Standardized Aronia melanocarpa Extract as Novel Supplement against Metabolic Syndrome: A Rat Model. *Int J Mol Sci*. 2018; 20(1). pii: E6 **M22**
4. Jakovljevic B, Nikolic Turnic T, Jeremic N, Jeremic J, **Bradic J**, RavicM, Jakovljevic VL, Jelic D, Radovanovic D, Pechanova O, Zivkovic V. The impact of aerobic and anaerobic training regimes on blood pressure in normotensive and hypertensive rats: focus on redox changes. *Mol Cell Biochem*. 2019; 454(1-2):111-21. **M23**
5. Petkovic AM, Jakovljevic VL, **Bradic JV**, Jeremic JN, Jeremic NS, Nikolic Turnic TR, Jovicic NU, Rosic VZ, Srejovic IM, Zivkovic VI. The Effects of Potassium Cyanide on the Functional Recovery of Isolated Rat Hearts after Ischemia and Reperfusion: The Role of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 2018:5979721. **M21**
6. Rabrenovic M, Nikolic T, Rabrenovic V, **Bradic J**, Tresnjic S, Petkovic A, Jakovljevic B, Masic S, Bokonjic D. Impact of the hyperbaric oxygen therapy on the redox status in patients with systemic lupus erythematosus. *Vojnosanit Pregl*. 2019; 76(4):412-21. **M23**
7. **Bradic J**, Dragojlovic Ruzicic R, Jeremic J, Petkovic A, Stojic I, Nikolic T, Zivkovic V, Srejovic I, Radovanovic D, Jakovljevic VL. Comparison of training and detraining on redox state of rats: gender specific differences. *Gen Physiol Biophys*. 2018; 37(3):285-97. **M23**
8. Tepic S, Petkovic A, Srejovic I, Jeremić N, Zivkovic V, Loncarevic S, **Bradic J**, Jakovljevic V, Zivkovic M. Impact of hyperbaric oxygenation on oxidative stress in diabetic patients. *Undersea Hyperb Med*. 2018; 45 (1):9-17. **M23**
9. Pesic G, Jeremic J, Nikolic T, Zivkovic V, Srejovic I, Vranic A, **Bradic J**, Ristic B, Matic A, Prodanovic N, Jakovljevic V. Interleukin-6 as possible early marker of stress response after femoral fracture. *Mol Cell Biochem*. 2017; 430(1-2):191-99. **M23**
10. Radojevic-Popovic R, Zivkovic V, Jeremic N, Sretenovic J, Velicanin N, **Bradic J**, Jakovljevic V. An evaluation of the redox state in professional scuba divers. *Undersea Hyperb Med* 2015; 42(5):409-16. **M23**
11. Antonijevic A, **Bradic J**, Zivkovic V. Exercise treadmill test in patients with diabetes mellitus type 2. *Ser J Exp Clin Res*. 2018; doi: 10.2478/sjecr-2018-0051 **M51**

12. **Bradic J**, Petkovic A, Tomovic M. Phytochemical and pharmacological properties of some species of the genus *Galium L.* (*Galium verum* and *mollugo*). Ser J Exp Clin Res. 2018; doi: 10.1515/sjecr-2017-0057 **M51**
13. Krivokapic M, **Bradic J**, Petkovic A, Tomovic M. Phytochemical and pharmacological properties *Allium Ursinum*. Ser J Exp Clin Res. 2018; doi: 10.2478/sjecr-2018-0003 **M51**
14. Jeremic N, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic J, Petkovic A, **Bradic J**, Jakovljevic V. Effects of ischemic and proton pump inhibitors preconditioning on oxidative stress of isolated rat heart. Ser J Exp Clin Res. 2018; 19:131-39. **M51**
15. Jevdjevic M, Srejovic I, Zivkovic V, Barudzic N, Petkovic A, **Bradic J**, Djuric D, Jakovljevic V. The effects of diclofenac and ibuprofen on heart function and oxidative stress markers in the isolated rat heart. Ser J Exp Clin Res. 2014; 15(1):11-9. **M52**

Research Article

Protective Effects of *Galium verum* L. Extract against Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury in Spontaneously Hypertensive Rats

Jovana Bradic ¹, Vladimir Zivkovic ², Ivan Srejovic ², Vladimir Jakovljevic ^{2,3},
Anica Petkovic ¹, Tamara Nikolic Turnic ¹, Jovana Jeremic ¹, Nevena Jeremic ¹,
Slobodanka Mitrovic ⁴, Tanja Sobot ⁵, Nenad Ponorac ⁵, Marko Ravic ¹,
and Marina Tomovic ¹

¹University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacy, Svetozara Markovica 69, 34 000 Kragujevac, Serbia

²University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Physiology, Svetozara Markovica 69, 34 000 Kragujevac, Serbia

³University IM Sechenov, 1st Moscow State Medical, Department of Human Pathology, Trubetskaya Street 8, 119991 Moscow, Russia

⁴University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Pathology, Svetozara Markovica 69, 34 000 Kragujevac, Serbia

⁵University of Banja Luka, Faculty of Medicine, Department of Physiology, Save Mrkalja 14, 78000 Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

Correspondence should be addressed to Vladimir Jakovljevic; drvladakgbg@yahoo.com

Received 27 September 2018; Revised 27 November 2018; Accepted 27 December 2018; Published 4 February 2019

Academic Editor: Claudia Penna

Copyright © 2019 Jovana Bradic et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Galium verum L. (*G. verum*, lady's bedstraw) is a perennial herbaceous plant, belonging to the Rubiaceae family. It has been widely used throughout history due to multiple therapeutic properties. However, the effects of this plant species on functional recovery of the heart after ischemia have still not been fully clarified. Therefore, the aim of our study was to examine the effects of methanol extract of *G. verum* on myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury in spontaneously hypertensive rats (SHR), with a special emphasis on the role of oxidative stress. Rats involved in the research were divided randomly into two groups: control (spontaneously hypertensive rats (SHR)) and *G. verum* group, including SHR rats treated with the *G. verum* extract (500 mg/kg body weight per os) for 4 weeks. At the end of the treatment, *in vivo* cardiac function was assessed by echocardiography. Rats were sacrificed and blood samples were taken for spectrophotometric determination of systemic redox state. Hearts from all rats were isolated and retrogradely perfused according to the Langendorff technique. After a stabilization period, hearts were subjected to 20-minute ischemia, followed by 30-minute reperfusion. Levels of prooxidants were spectrophotometrically measured in coronary venous effluent, while antioxidant enzymes activity was assessed in heart tissue. Cell morphology was evaluated by hematoxylin and eosin (HE) staining. 4-week treatment with *G. verum* extract alleviated left ventricular hypertrophy and considerably improved *in vivo* cardiac function. Furthermore, *G. verum* extract preserved cardiac contractility, systolic function, and coronary vasodilatory response after ischemia. Moreover, it alleviated I/R-induced structural damage of the heart. Additionally, *G. verum* extract led to a drop in the generation of most of the measured prooxidants, thus mitigating cardiac oxidative damage. Promising potential of *G. verum* in the present study may be a basis for further researches which would fully clarify the mechanisms through which this plant species triggers cardioprotection.

1. Introduction

Acute myocardial infarction (AMI) is one of the most common causes of disability and mortality worldwide [1]. Although timely restoration of blood flow to an ischemic heart is essential for limiting the infarct size, it can

paradoxically exacerbate tissue damage. This phenomenon is known as ischemia/reperfusion (I/R) injury and occurs in several forms such as reperfusion-induced arrhythmias, myocardial stunning, microvascular obstruction, and reperfusion-induced cardiomyocyte death [2]. The exact mechanisms underlying progression of I/R injury have been

under intense investigation for more than four decades with the aim to open the way to novel effective strategies for myocardial salvage [3]. Factors that have been proven to mostly contribute to myocardial dysfunction are increased generation of prooxidants, pronounced inflammatory response, and intracellular and mitochondrial Ca^{2+} overload [3, 4]. Presence of hypertension, as one of the most common risk factors for cardiovascular diseases, may worsen I/R outcome due to high myocardial load/mechanical stress [5].

Ischemic preconditioning is a successful maneuver for reaching cardioprotection by exposing the heart to brief episodes of ischemia and reperfusion prior to prolonged ischemia. Due to its limited clinical application, recent researches have focused its attention on agents that might be pharmacological mimetics of ischemic preconditioning [4]. Growing evidence suggest benefits of dietary intake of medicinal plants rich in polyphenols in lowering the incidence of coronary diseases [6, 7]. Polyphenols are biologically active constituents found in vegetables, fruits, wines, etc., with great potential to attenuate the deleterious impact of I/R via antioxidant and anti-inflammatory activities and preservation of nitric oxide [7].

Galium verum (*G. verum*, lady's bedstraw) is a perennial herbaceous plant, belonging to the Rubiaceae family and has been widely recognized throughout history due to its multiple therapeutic properties [8]. It has been used as a sedative, an anticancer agent, in the treatment of gout and epilepsy; nevertheless, effects of this plant species on cardiac function have not been clarified yet [9]. Phytochemical investigations revealed the presence of iridoid glycosides, phenolic compounds (such as chlorogenic and caffeic acids, hyperoside), anthraquinones, and triterpenes in *G. verum* extracts [8, 9]. Therefore, we hypothesized that *G. verum* extract might be involved in the alleviation of harmful effects of I/R injury on functional and morphological properties of the heart.

Regarding above-mentioned data the aim of our study was to assess the effects of methanol extract of *G. verum* on myocardial I/R injury in spontaneously hypertensive rats (SHR), with a special emphasis on the role of oxidative stress.

2. Materials and Methods

2.1. Ethical Approval. This investigation was carried out in the laboratory for cardiovascular physiology of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. The study protocol was approved by the Ethical Committee for the welfare of experimental animals of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. All experiments were performed according to the EU Directive for the welfare of laboratory animals (86/609/EEC) and the principles of Good Laboratory Practice (GLP).

2.2. Plant Material and Extract Preparation. The whole plant *G. verum* was collected on July 5th, 2017 in the village *Dobroselica* on the southern cliff of *Mt. Zlatibor* (GPS coordinates: 43°42'59.99"N and 19°41'59.99"E). Identification and classification of the plant material were performed at the Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Kragujevac and at the Institute of Botany and Botanical

garden "Jevremovac", University of Belgrade. A voucher specimen (number 17417) was kept in a herbarium of the Institute of Botany and Botanical garden "Jevremovac". The collected material was dried under the shade and powdered (sieve 0.75). The methanol extract was prepared to extract 100 g of the aerial part of the plant with 500 ml of methanol by heat reflux extraction [10]. The mixture was filtered through a filter paper (Whatman, No. 1), and the dry extract was obtained after removing the solvent by evaporation under reduced pressure (RV05 basic IKA, Germany). Afterwards, the residue (16.03 g) was stored in a dark glass bottle at +4°C until use. Once daily just before administration to experimental animals, extract was dissolved in the tap water.

2.3. Animals. Twenty spontaneously hypertensive rats (males, eight weeks old, body weight 150 ± 30 g) were included in the study. They consumed commercial rat food (20% protein rat food, Veterinary Institute Subotica, Serbia) *ad libitum* and were housed at a temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$, with 12 hours of automatic illumination daily. The rats were divided into two groups as follows:

(1) *Control Group.* Rats who drank only tap water

(2) *G. verum Group.* Rats who drank tap water containing 500 mg/kg of methanol extract of *G. verum*

In order to provide a precise amount of drug for every animal, rats were kept in separate cages (one animal per cage). Considering that animals drink approximately 50 ml of water per day, we dissolved individual dose of extract adjusted to body weight (500 mg/kg) in this volume of water. The same procedure was repeated every day of the experimental protocol.

2.4. Assessment of In Vivo Cardiac Function. Transthoracic echocardiograms were performed after accomplishing drinking protocol. A mixture of ketamine 50 mg/kg (100 mg/mL; *Ketaset*, Fort Dodge, IA) and xylazine 10 mg/kg (100 mg/mL; *AnaSed*, Lloyd Laboratories, Shenandoah, IA) intraperitoneally was used as anesthesia. Echocardiograms were performed using a Hewlett-Packard Sonos 5500 (Andover, Massachusetts) sector scanner equipped with a 15.0 MHz phased array transducer as previously described [11]. From the parasternal long-axis view in a 2-dimensional mode, M-mode cursor was positioned perpendicularly to the interventricular septum and posterior wall of the left ventricle (LV) at the level of the papillary muscles and M-mode images were obtained. Interventricular septal wall thickness at end diastole (IVSd), LV internal dimension at end diastole (LVIDd), LV posterior wall thickness at end diastole (LVPWd), interventricular septal wall thickness at end systole (IVSs), LV internal diameter at end systole (LVIDs), and LV posterior wall thickness at end systole (LVPWs) were recorded with M-mode. Fractional shortening percentage (FS%) was calculated from the M-mode LV diameters using the equation: $[(\text{LVEDd} - \text{LVESd})/\text{LVEDd}] \times 100\%$.

2.5. Preparation of Isolated Rat Hearts. Following 4 weeks of *G. verum* extract treatment, after short-term narcosis induced

by intraperitoneal application of ketamine (10 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg) and premedication with heparin as an anticoagulant, animals were sacrificed by decapitation. Then the chest was opened via midline thoracotomy, the hearts were immediately removed and immersed in cold saline, and the aortas were cannulated and retrogradely perfused under a constant perfusion pressure (CPP) of 70 cmH₂O according to the *Langendorff* technique. The composition of Krebs–Henseleit buffer used for retrograde perfusion was as follows (mmol/L): NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ × 2H₂O 2.5, MgSO₄ × 7H₂O 1.7, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, glucose 11, pyruvate 2, equilibrated with 95% O₂ plus 5% CO₂, and warmed to 37°C (pH 7.4).

2.6. Assessment of Ex Vivo Cardiac Function. After placing the sensor (transducer BS473-0184, Experimetria Ltd., Budapest, Hungary) in the left ventricle, the following parameters of myocardial function have been measured during stabilization and during reperfusion: maximum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt max), minimum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt min), systolic left ventricular pressure (SLVP), diastolic left ventricular pressure (DLVP), and heart rate (HR). Coronary flow (CF) was measured flowmetrically.

At first, the hearts underwent a 30-minute perfusion at CPP of 70 cmH₂O in order to achieve a stable rhythm. After a stabilization period, the hearts were exposed to global ischemia (perfusion was totally stopped) for 20 minutes, followed by 30 minutes of reperfusion. All cardiodynamic parameters and coronary flow were measured in intervals of 5 minutes during the period of reperfusion (30 minutes) (RP1–RP7).

2.7. Biochemical Analysis. After sacrificing, blood samples for biochemical analysis were collected from a jugular vein in order to test the systemic redox state. After centrifugation of heparinized venous blood, plasma and erythrocytes were separated. In plasma, the following prooxidants were determined: the levels of superoxide anion radical (O₂^{•-}), nitrites (NO₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂), and index of lipid peroxidation (measured as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)). Parameters of the antioxidative defense system such as activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) and level of reduced glutathione (GSH) were determined in erythrocyte samples. Cardiac oxidative stress markers were determined in coronary venous effluent and heart tissue. After heart stabilization and in the intervals of 5 minutes during the period of reperfusion, coronary venous effluent was collected and used for spectrophotometric determination of levels of TBARS, O₂^{•-}, H₂O₂, and NO₂⁻. Analyses of the prooxidants were performed using the same methods as when analyzing plasma samples and coronary venous effluent except for NO₂⁻ where the protocol differs. The activity of antioxidant enzymes such as CAT and SOD was determined in heart tissue.

2.7.1. Superoxide Anion Radical Determination (O₂^{•-}). The level of superoxide anion radical (O₂^{•-}) was determined using nitro blue tetrazolium (NBT) reaction in TRIS-buffer combined with plasma sample or coronary venous effluent. The

measurement was performed at a wavelength of 530 nm. Krebs–Henseleit solvent was used as the blank control for O₂^{•-} determination in coronary venous effluent, while distilled water for plasma samples [12].

2.7.2. Hydrogen Peroxide Determination (H₂O₂). The protocol for measurement of hydrogen peroxide (H₂O₂) is based on oxidation of phenol red in the presence of horseradish peroxidase. 200 μl sample with 800 μl PRS (phenol red solution) and 10 μl POD (horseradish peroxidase) were combined (1:20). The level of H₂O₂ was measured at 610 nm. Krebs–Henseleit solvent was used as the blank control for the determination of this parameter in coronary venous effluent, while distilled water was used for plasma samples [13].

2.7.3. Nitrite Determination (NO₂⁻). Nitric oxide (NO) decomposes rapidly to form stable metabolite nitrite/nitrate products. Nitrite (NO₂⁻) was determined as an index of nitric oxide production with Griess reagent. For NO₂⁻ determination in plasma 0.1 ml 3 N PCA (perchloric acid), 0.4 ml 20 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 0.2 ml plasma were put on ice for 15 min, then centrifuged for 15 min at 6000 rpm. After pouring off the supernatant, 220 μl K₂CO₃ was added. Nitrites were measured at 550 nm. Distilled water was used as a blank probe.

In order to determine NO₂⁻ level in coronary venous effluent, 0.5 ml of the perfusate was precipitated with 200 μl of 30% sulfosalicylic acid, mixed for 30 min, and centrifuged at 3000 × g. Equal volumes of the supernatant and Griess reagent were mixed and stabilized for 10 min in the dark, and then the sample was measured spectrophotometrically at a wavelength of 543 nm. The nitrite concentrations were determined using sodium nitrite as the standard [14].

2.7.4. Determination of the Index of Lipid Peroxidation Measured as TBARS. The degree of lipid peroxidation in the sample (plasma and coronary venous effluent) was estimated by measuring of TBARS using 1% TBA (thiobarbituric acid) in 0.05 NaOH, incubated with sample at 100°C for 15 min, and read at 530 nm. TBA extract was obtained by combining 0.8 ml sample and 0.4 ml trichloro acetic acid (TCA); afterwards, the samples were put on ice for 10 min and centrifuged for 15 min at 6000 rpm. For TBARS determination in coronary venous effluent, the Krebs–Henseleit solvent was used as a blank control, while in the case of plasma sample distilled water was used [15].

2.7.5. Determination of Antioxidant Enzymes (CAT, SOD). Isolated RBCs were washed three times with three volumes of ice-cold 0.9 mmol/l NaCl, and hemolysates containing about 50 g Hb/l [16] were used for the determination of CAT activity [17]. Moreover, hearts from all animals were frozen at -80°C. Additionally, 0.5 section of each tissue was homogenized in 5 ml phosphate buffer (pH 7.4) on ice, and homogenates were centrifuged at 1200 × g for 20 min at 4°C. The resulting supernatants were used for the determination of cardiac activity of CAT and SOD. CAT buffer, prepared sample (hemolysates or heart tissue), and 10 mM H₂O₂ were used for CAT determination. Detection was performed at 360 nm. The amount of CAT was expressed as U/g

tissue and in hemolysate as $U/g \text{ Hb} \times 10^3$ [17, 18]. SOD activity was determined by the epinephrine method. Heart tissue or hemolysate was mixed with carbonate buffer, and then epinephrine was added. Detection was performed at 470 nm. The amount of SOD in heart tissue was expressed as U/g tissue and in hemolysate as $U/g \text{ Hb} \times 10^3$ [19, 20].

2.7.6. Determination of Reduced Glutathione (GSH). The level of reduced glutathione (GSH) was determined based on GSH oxidation via 5,5-dithiobis-6,2-nitrobenzoic acid. GSH extract was obtained by combining 0.1 ml 0.1% EDTA, 400 μl hemolysate, and 750 μl precipitation solution (containing 1.67 g metaphosphoric acid, 0.2 g EDTA, 30 g NaCl, and filled with distilled water until 100 ml; the solution is stable for 3 weeks at $+4\text{C}^\circ$). After mixing in the vortex machine and extraction on cold ice (15 min), it was centrifuged at 4000 rpm (10 min). Distilled water was used as a blank probe. The level of GSH was measured at 420 nm. The concentration is expressed as nanomoles per milliliter of red blood cells (RBCs) [21].

2.8. Histological Analysis. In order to evaluate the effects of *G. verum* on cell morphology after I/R, hematoxylin-eosin staining (HE) was performed for hearts according to the previously reported method [22].

2.9. Statistical Analysis. For statistical analysis of data within and between the control and *G. verum* group, IBM SPSS Statistics 20.0 for Windows was used. Three measured points were statistically analyzed: the first point was stabilization (S), the second was the first, and the last point of 30-minute reperfusion period (R1 and R7). Values were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Shapiro–Wilk test was used to check the distribution of data. Additionally, data was analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) and the post hoc Bonferroni test for multiple comparisons. Values of $p < 0.05$ were considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Effects of *G. verum* Extract on Morphological Variables. Values of body weight (BW), heart weight (HW), and HW/BW ratio in both groups of rats are shown in Table 1. The HW/BW ratio was significantly lower in the *G. verum* group.

3.2. Effects of *G. verum* Extract on In Vivo Cardiac Function. LVIDd, LVIDs, and LVPWd were significantly decreased after *G. verum* treatment, while IVSd remained unchanged. Furthermore, midwall fractional shortening was significantly increased in the *G. verum* group in comparison to control (Table 2).

3.3. Effects of *G. verum* Extract on Ex Vivo Cardiac Function. There was a statistically significant increase in the value of the maximum rate of left ventricular pressure development (dp/dt max) at RP1 in comparison to S and RP7 in the control group and a decrease in RP7 in comparison to S point. In the *G. verum* group, the value of this parameter remained constant during the observed period. Furthermore, the values

TABLE 1: Effects of *G. verum* extract on body and heart weight measurements.

	BW (g)	HW (mg)	HW/BW ratio
Control	266.65 \pm 14.75	1.08 \pm 0.07	4.95 \pm 0.25
<i>G. verum</i>	235.75 \pm 17.78	1.02 \pm 0.1	4.32 \pm 0.83*

Values are shown as means \pm SD. *Statistical significance at the level of $p < 0.05$ between the control and *G. verum* group; BW = body weight; HW = heart weight; HW/BW = heart weight to body weight.

TABLE 2: Effects of *G. verum* extract on *in vivo* cardiac function.

	Control	<i>G. verum</i>
IVSd (cm)	0.203 \pm 0.011	0.208 \pm 0.016
LVIDd (cm)	0.709 \pm 0.003	0.458 \pm 0.013*
LVPWd (cm)	0.251 \pm 0.013	0.176 \pm 0.046*
LVIDs (cm)	0.432 \pm 0.01	0.186 \pm 0.034*
LVPWs (cm)	0.302 \pm 0.002	0.297 \pm 0.03
FS (%)	39.0 \pm 2.34	59.3 \pm 3.54*

Values are shown as means \pm SD. *Statistical significance at the level of $p < 0.05$ between the control and *G. verum* group; IVSd = end-diastolic interventricular septal thickness; LVIDd = left ventricular internal diameter end diastole; LVPWd = left ventricular end-diastolic posterior wall thickness; LVIDs = left ventricular internal diameter end systole; LVPWs = left ventricular posterior wall thickness; FS = fractional shortening.

noticed in S and RP7 points were higher in *G. verum* than in the control group (Figure 1(a)). There was a drop in the value of the minimum rate of left ventricular pressure development (dp/dt min) at RP7 in comparison to RP1 and S points in the control group. Markedly, higher value of this parameter was noticed in the *G. verum* group both at RP1 and at RP7 compared to control conditions (Figure 1(b)).

A significant drop in systolic blood pressure in the left ventricle (SLVP) was found in the control group at RP7 when compared to RP1, while in the *G. verum* group SLVP value did not vary significantly. In the *G. verum* extract pretreated group, higher SLVP was observed at RP7 (Figure 1(c)). There was no statistically significant change in the value of diastolic blood pressure in the left ventricle (DLVP) both within and between groups (Figure 1(d)).

In the control group, a drop in heart rate (HR) was noticed at RP7 in comparison to S point. When compared to *G. verum* and control group, higher HR was noticed at RP7 and S points (Figure 1(e)). Coronary flow (CF) decreased at RP7 compared to S in the control group, and the value of the observed parameter was lower in this group in all points in comparison to the *G. verum* group (Figure 1(f)).

3.4. Effects of *G. verum* Extract on Systemic Redox State. The levels of oxidative stress markers, such as O_2^- , NO_2^- , and TBARS, were decreased in the *G. verum* group in comparison to the control group, while there was no difference in the level of H_2O_2 (Figure 2). Regarding the parameters of antioxidant defense system, there was an increase in SOD activity in the *G. verum* group, while the activity of CAT and level of GSH were not changed compared to the control group (Figure 3).

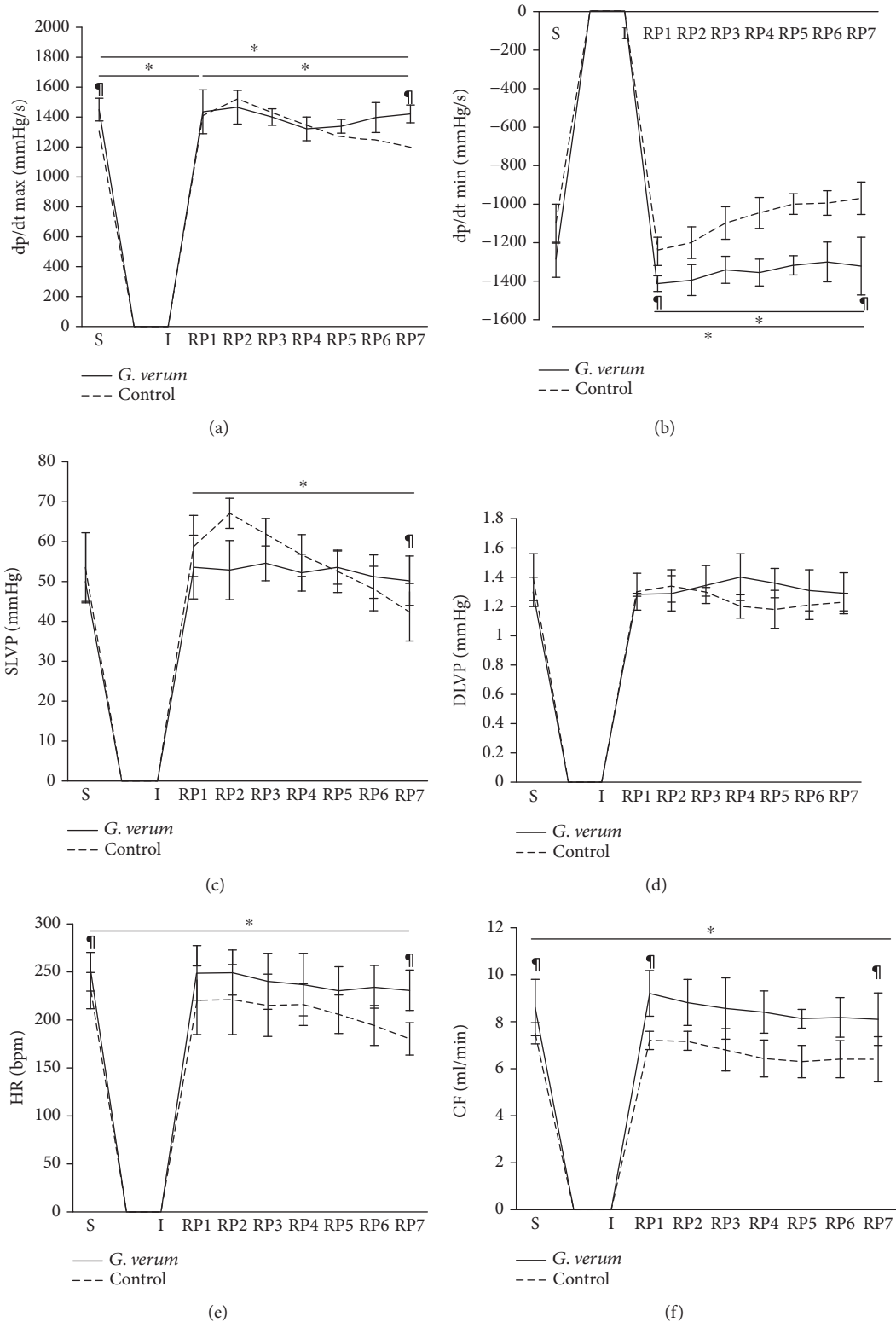


FIGURE 1: Effects of *G. verum* pretreatment on ex vivo cardiac function. (a) Comparison within and between groups in the value of dp/dt max, (b) comparison within and between groups in the value of dp/dt min, (c) comparison within and between groups in the value of SLVP, (d) comparison within and between groups in the value of DLVP, (e) comparison within and between groups in the value of heart rate, and (f) comparison within and between groups in the value of coronary flow. *Statistical significance at the level of $p < 0.05$ within the control group; # statistical significance at the level of $p < 0.05$ within the *G. verum* group; § statistical significance at the level of $p < 0.05$ between the control and *G. verum* group. Data are presented as means \pm SD. R1, first minute of reperfusion. R7, last minute of reperfusion.

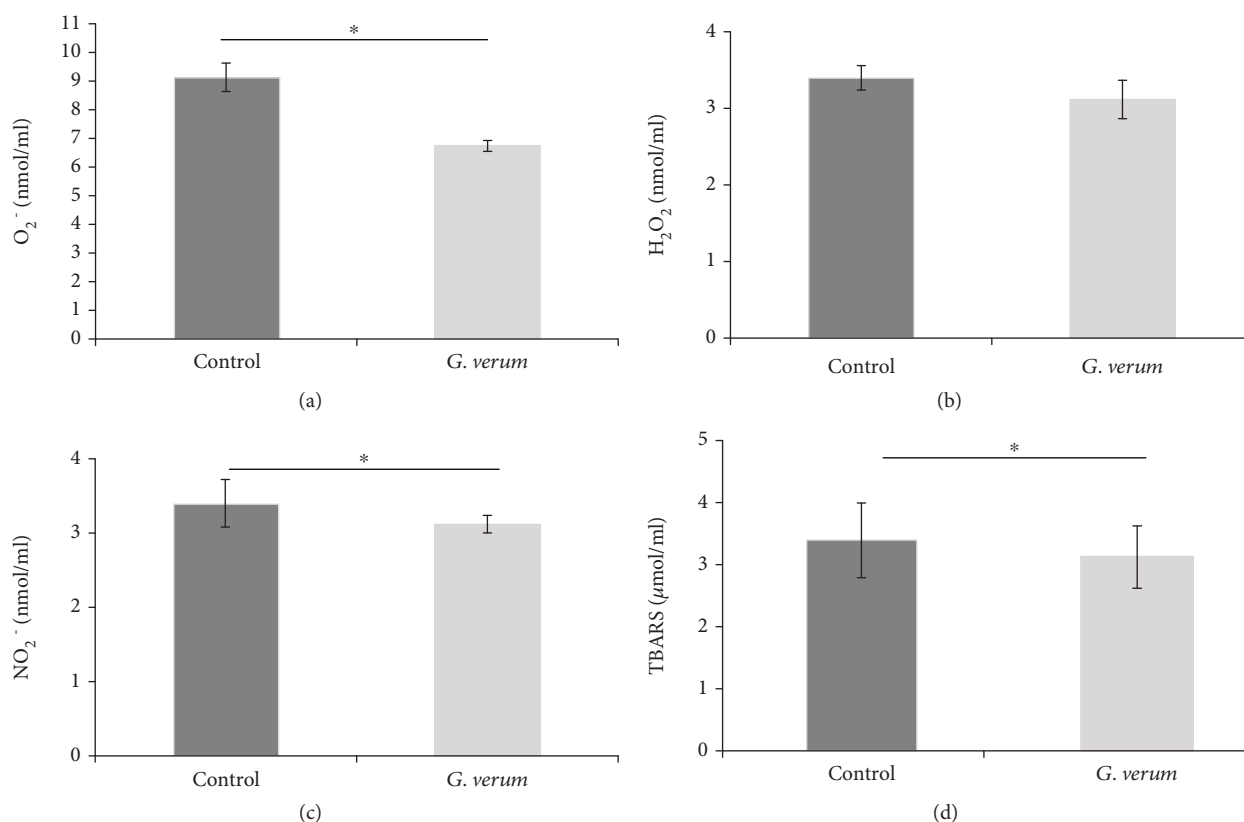


FIGURE 2: Effects of *G. verum* pretreatment on the level of prooxidants determined in plasma samples. (a) Comparison between groups in the value of O_2^- , (b) comparison between groups in the value of H_2O_2 , (c) comparison between groups in the value of NO_2^- , and (d) comparison between groups in the value of TBARS. *Statistical significance at the level of $p < 0.05$ between the control and *G. verum* group. Data are presented as means \pm SE.

3.5. Effects of *G. verum* Extract on Cardiac Redox State

3.5.1. Superoxide Anion Radical (O_2^-). There was a rise in O_2^- at RP7 in comparison to S point in the control group. Furthermore, *G. verum* extract led to an increase in the level of this parameter in RP1 compared to S; however, it significantly decreased at RP7 and reached the values similar from the S point. The levels of O_2^- both at S and RP7 moments were significantly higher in the control group (Figure 4(a)).

3.5.2. Hydrogen Peroxide (H_2O_2). A significantly elevated level of H_2O_2 was noticed in RP7 compared to S and RP1 in the control group, while in the *G. verum* group this parameter did not change during the time. A pronounced rise in the level of this oxidative stress marker was detected in the control group in comparison to *G. verum* at RP7 (Figure 4(b)).

3.5.3. Nitrites (NO_2^-). In the control group, there was an increase in the level of NO_2^- in RP7 in comparison to S point. On the other hand, in the *G. verum* group an increase in the level of this parameter was noticed in RP1 compared to S and RP7 and in RP7 compared to the S point. In S and RP1 moments, the level of NO_2^- was higher in the group pretreated with *G. verum* extract (Figure 4(c)).

3.5.4. Index of Lipid Peroxidation Measured as TBARS. The level of TBARS was elevated in RP7 compared to S in the

control group. Additionally, the level of this marker in the *G. verum* group in RP7 was significantly lower than in the control group (Figure 4(d)).

3.5.5. Catalase (CAT) and Superoxide Dismutase (SOD). The cardiac activity of CAT and SOD was significantly increased in the *G. verum* group (Figure 5).

3.6. Effects of *G. verum* Extract on Heart Morphology. Hypertrophy of the cardiac muscle fibers, edema, necrosis, and degenerative changes were observed in both groups. However, in the control group, degenerative changes were more prominent involving zonal necrosis of higher number of cardiomyocytes, with hyper eosinophilia, fragmentation of the fibers, and loss of nucleus. Moreover, focal necrosis of lower number of cardiomyocytes or unicellular was found in the *G. verum* group (Figure 6).

4. Discussion

It is well established that hypertension may lead to left ventricular hypertrophy development, thus increasing mortality from AMI and vulnerability of myocardium to I/R injury [23, 24]. Advances in understanding the complexity of mechanisms involved in the pathogenesis of myocardial I/R injury points to a central role of oxidative stress. Therefore, growing scientific attention was focused on the

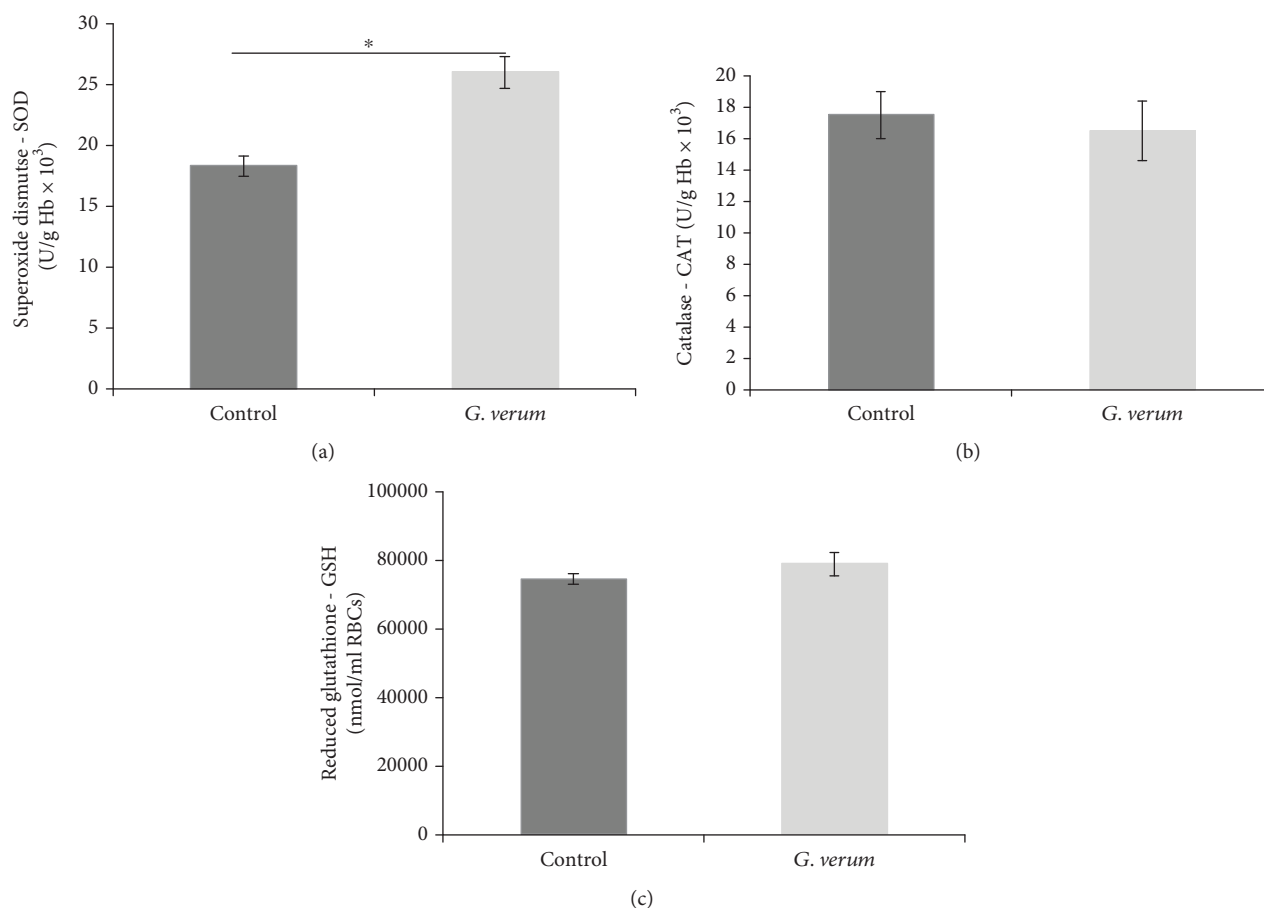


FIGURE 3: Effects of *G. verum* pretreatment on parameters of antioxidant defense system determined in erythrocytes samples. (a) Comparison between groups in the activity of SOD, (b) comparison between groups in the activity of CAT, and (c) comparison between groups in the level of GSH. *Statistical significance at the level of $p < 0.05$ between the control and *G. verum* group. Data are presented as means \pm SE.

modulation of redox homeostasis with plants and plant-derived products rich in natural antioxidants, thus reducing postischemic myocardial dysfunction [6]. Previous investigations have proven the antioxidant activity of *G. verum* extract *in vitro* [8, 25]. However, to our best knowledge, there is no data regarding its effects on heart function and potential of *G. verum* extract to attenuate myocardial damage, and diminish oxidative stress is open to discussion. We hypothesized that *G. verum* extract treatment might help salvage the ischemic-reperfused heart.

An echocardiographic examination of heart function demonstrated that 4-week *G. verum* treatment decreased LVIDD, LVIDs, and LVPWd and increased FS compared to the untreated SHR group, thus mitigating left ventricular hypertrophy and considerably improving cardiac function. This is in line with previous findings showing that natural substances belonging to a group of flavonoids might ameliorate endothelial dysfunction and cardiac hypertrophy in the spontaneously hypertensive rats [26, 27]. Additionally, the beneficial effect of isoflavones on overall cardiovascular markers in models of LV dysfunction, involving enhancement of percent FS, has been proven so far [28].

Our results clearly show that 20-minute *ex vivo* ischemia on *Langendorff* apparatus impaired myocardial function

manifested as a marked reduction in dp/dt max, dp/dt min, SLVP, HR, and CF in the control group. However, in the *G. verum* group, values of dp/dt max and dp/dt min were unchanged during the reperfusion period, enabling the cardiac muscle to contract and relax without variations in force. In support of this finding, it was found that protective effects on ventricular contractility may be reached by either application of flavonoids alone or plant extracts containing polyphenolics, flavonoids, iridoids, and terpenoids [29, 30]. Moreover, in animals receiving *G. verum*, systolic function was not only preserved but even improved, as evidenced by an increase in SLVP. *G. verum* extract consumption prevented I/R-induced decline in HR, so unaltered HR provided enough time for the heart to contract strongly. Additionally, prolonged ischemia led to a coronary vascular dysfunction reflected in reduced CF in the control group. In the *G. verum* extract pretreated group, coronary flow was slightly but not significantly changing over 30 min recovery period, so at the end of reperfusion it returned to baseline values. This fact suggested that preconditioning with *G. verum* preserved the coronary vasodilatory response to I/R.

The presence of flavonoids in *G. verum* extracts was confirmed in previous studies [8, 9]. Striking evidence indicate that flavonoids have the potential to improve

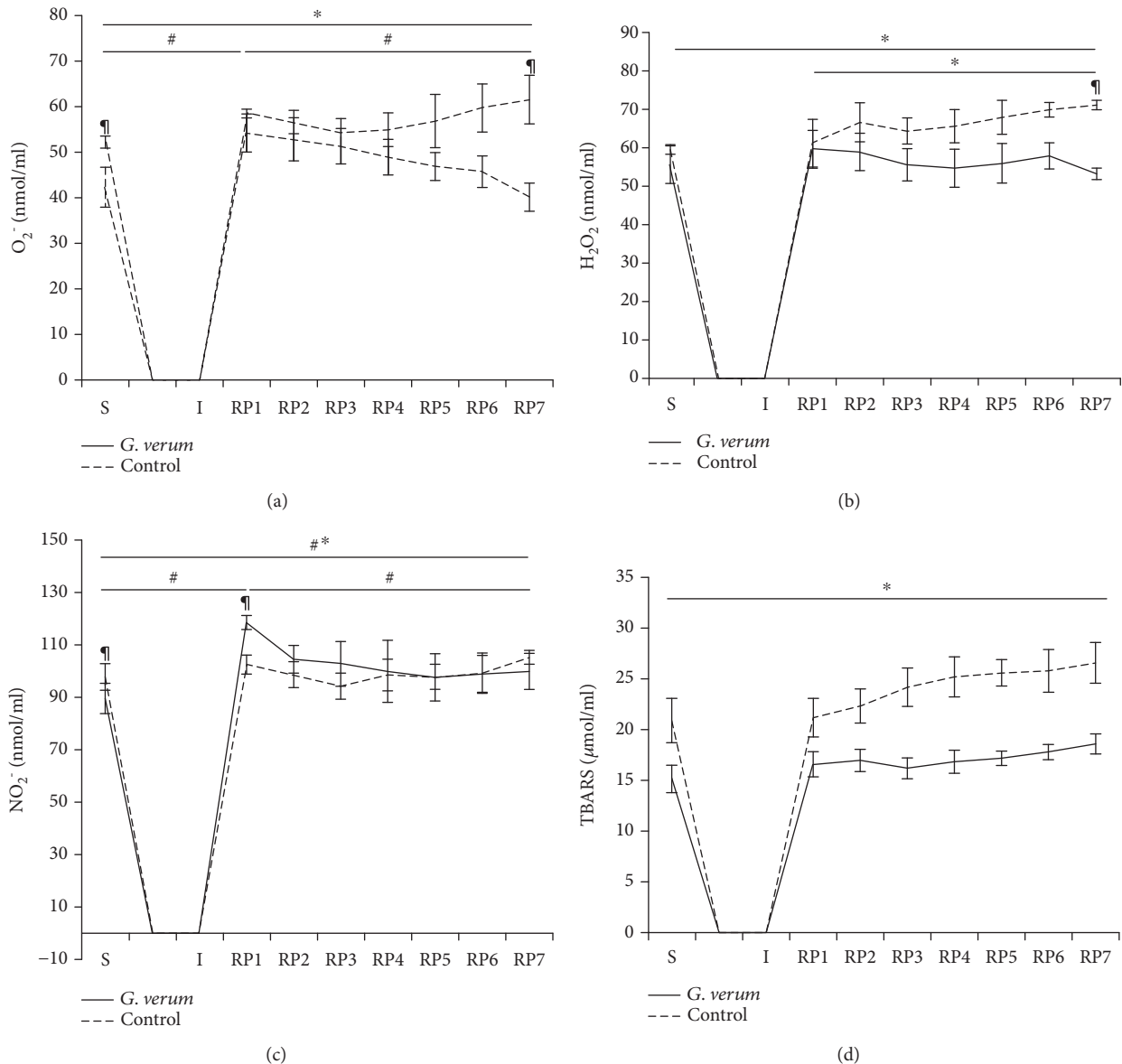


FIGURE 4: Effects of *G. verum* pretreatment on the level of cardiac prooxidants. (a) Comparison within and between groups in the value of O_2^- , (b) comparison within and between groups in the value of H_2O_2 , (c) comparison within and between groups in the value of NO_2^- , and (d) comparison within and between groups in the value of TBARS. *Statistical significance at the level of $p < 0.05$ within the control group; #statistical significance at the level of $p < 0.05$ within the *G. verum* group; #*statistical significance at the level of $p < 0.05$ between the control and *G. verum* group. Data are presented as means \pm SE. R1, first minute of reperfusion. R7, last minute of reperfusion.

postischemic heart functionality [29, 30]. Polyphenols might inhibit endothelial NADPH oxidase (NOX), leading to a decrease in O_2^- release and formation of peroxynitrite, thus preventing endothelial dysfunction [31]. Moreover, these compounds may activate endothelial nitric oxide synthase (eNOS), resulting in increase bioavailability of nitrogen monoxide (NO), the most potent endogenous vasodilator [32]. Therefore, we may speculate that the protective effects of *G. verum* extract on the maintenance of coronary vasodilator tone and coronary circulation may be attributed to the presence of total phenols.

Furthermore, we evaluated whether 4-week treatment with *G. verum* affects systemic redox homeostasis and alters

systemic production of prooxidants, as well as the capacity of the antioxidant defense system. Our results showed that *G. verum* extract consumption exerted benefits referring to systemic redox state, leading to a drop in the plasma levels of O_2^- , NO_2^- , and TBARS. Moreover, we observed an increase in the activity of SOD, as the first line of cellular defense against oxidative injury, which is in line with a decrease in O_2^- level. In fact, we may hypothesize that probably O_2^- formed in mitochondria was converted to H_2O_2 in a reaction catalyzed by SOD. Our observation that there was no difference in the level of plasma H_2O_2 between groups is in accordance with unchanged CAT activity since the rise in H_2O_2 level would have led to a higher activity of CAT [33].

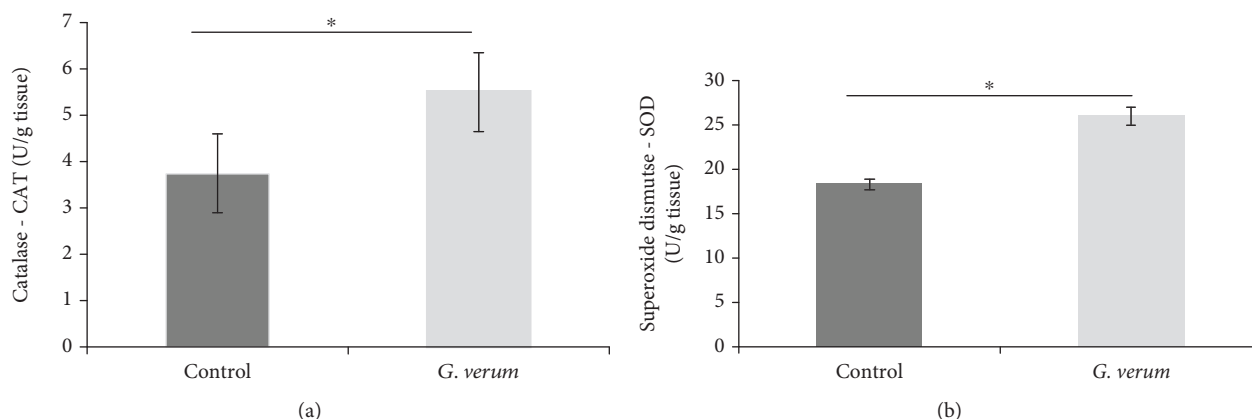


FIGURE 5: Effects of *G. verum* pretreatment on cardiac antioxidant enzymes activity. (a) Comparison between groups in the activity of CAT and (b) comparison between groups in the activity of SOD. *Statistical significance at the level of $p < 0.05$ between the control and *G. verum* group. Data are presented as means \pm SE.

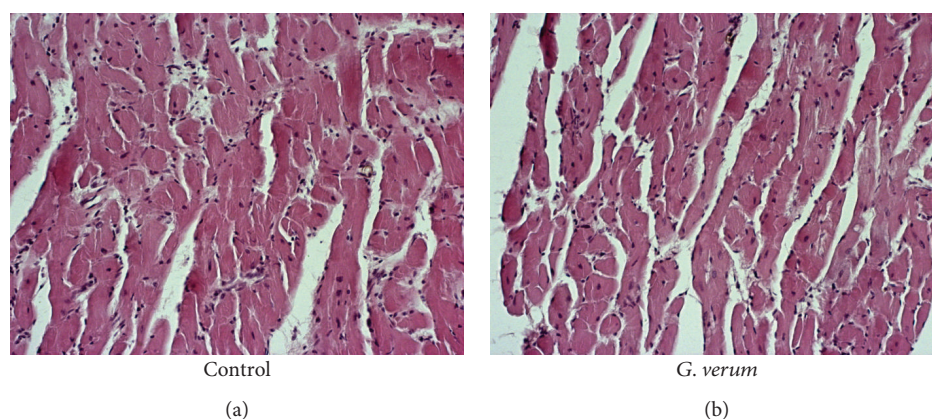


FIGURE 6: Histopathological changes in the myocardium following reperfusion (*magnification*, $\times 200$). Control group: hypertrophy of the cardiac muscle fibers, edema, necrosis, and zonal necrosis of higher number of cardiomyocytes, with hyper eosinophilia, fragmentation of the fibers, and loss of nucleus. *G. verum* group: hypertrophy of the cardiac muscle fibers, edema, necrosis, focal necrosis of lower number of cardiomyocytes or unicellular, and less prominent degenerative changes.

It has been proposed that polyphenols may preserve mitochondrial function and modulate redox signalling via inhibition of enzymes involved in ROS production such as xanthine oxidase (XO) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (NOX). Another way to exert antioxidant effect is via chelation of iron ions which catalyze several free radical-generating reactions [7].

In our research, I/R led to a rise in the generation of all cardiac prooxidants, which is consistent with the previous reports that during reperfusion of ischemic tissue the reversal of oxygen to oxygen-starved myocardium is associated with a burst of ROS generation. The main sources of prooxidants involve mitochondrial respiratory electron transport chain and activation of XO, resulting in enhanced production of very reactive species such as O_2^- and H_2O_2 [34]. Nevertheless, pretreatment with *G. verum* extract was capable of preventing an increase in the levels of most of the markers of myocardial oxidative damage. Markedly, higher levels of TBARS, O_2^- , and H_2O_2 in coronary venous effluent in the control group compared to the *G. verum* group were noticed

after 30 min restoration of blood flow, thus suggesting that *G. verum* extract attenuated oxidative stress derived from the endocardium of the left ventricle and endothelium of the coronary circulation. Increased activity of myocardial antioxidant enzymes supports a decline in cardiac production of prooxidants. In fact, enhanced SOD activity might be responsible for a decrease in O_2^- levels, while lower level of H_2O_2 may be explained by its decomposition to water and oxygen catalyzed by CAT. In our study, *G. verum* treatment was associated with enhanced both systemic and myocardial SOD activity and diminished systemic and cardiac production of O_2^- , thus indicating that initial modulation of this antioxidant enzyme is involved in the action of *G. verum*. Consistent with these results, striking evidence indicate that polyphenols are able to activate endogenous antioxidant defense system, particularly SOD and CAT, thus alleviating oxidative stress-induced myocardial damage. In that sense, we may assume that this is one of the mechanisms through which polyphenol-containing extracts such as *Galium verum* extract may exert its antioxidant effects. Additionally,

antioxidant potential of these natural compounds involves their ability to act as direct free radical scavengers as well [35, 36]. In addition to the aforementioned mechanisms, it has been known that flavonoids might alleviate I/R-induced oxidative stress by inhibiting the xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase system [37]. Promising potential of *G. verum* extract in a decrease of oxidative damage may be mostly attributed to the additive and synergistic effects of bioactive molecules belonging to polyphenols.

Histological assessment suggested that ischemia altered the myocardial structure in both groups manifested as hypertrophy of cardiac muscle fibers, edema, necrosis, and degenerative changes. However, *G. verum* consumption alleviated I/R-induced deleterious effects on heart morphology and confirmed its potential to preserve both myocardial function and structure under ischemic conditions.

Our research highlighted for the first time that methanol extract of *G. verum* improved *in vivo* cardiac function and exerted benefits on systemic redox homeostasis. Additionally, it preserved the functional and morphological properties of the heart and prevented coronary vascular dysfunction after ischemia. Moreover, *G. verum* modulated the cardiac generation of prooxidants, thus alleviating oxidative stress-induced heart damage. Obvious protective effects of this plant species on myocardial I/R injury in our study provide a scientific basis for its use in triggering cardioprotection. However, further studies are certainly necessary for better understanding the underlying mechanisms.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Disclosure

The results of this manuscript were presented at the 8th International Congress of Pathophysiology – Satellite Symposium, held on September 03, 2018 in Kragujevac, Serbia.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors would like to express gratitude to the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for Grant No. JP 06/17.

References

- [1] M. Neri, I. Riezzo, N. Pascale, C. Pomara, and E. Turillazzi, "Ischemia/reperfusion injury following acute myocardial infarction: a critical issue for clinicians and forensic pathologists," *Mediators of Inflammation*, vol. 2017, Article ID 7018393, 14 pages, 2017.
- [2] D. J. Hausenloy and D. M. Yellon, "Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 123, no. 1, pp. 92–100, 2013.
- [3] T. Kalogeris, C. P. Baines, M. Krenz, and R. J. Korthuis, "Ischemia/reperfusion," *Comprehensive Physiology*, vol. 7, no. 1, pp. 113–170, 2016.
- [4] W. Li, N. Wu, W. Shu, D. Jia, and P. Jia, "Pharmacological preconditioning and postconditioning with nicorandil attenuates ischemia/reperfusion-induced myocardial necrosis and apoptosis in hypercholesterolemic rats," *Experimental and Therapeutic Medicine*, vol. 10, no. 6, pp. 2197–2205, 2015.
- [5] M. S. Mozaffari, J. Y. Liu, W. Abebe, and B. Baban, "Mechanisms of load dependency of myocardial ischemia reperfusion injury," *American Journal of Cardiovascular Disease*, vol. 3, no. 4, pp. 180–196, 2013.
- [6] L. Testai, A. Martelli, M. Cristofaro, M. C. Breschi, and V. Calderone, "Cardioprotective effects of different flavonoids against myocardial ischaemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 65, no. 5, pp. 750–756, 2013.
- [7] J. Debnath and L. K. Nath, "A review on pathophysiology of ischemic-reperfusion injury of heart and ameliorating role of flavonoids and polyphenols," *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 8, no. 16, pp. 607–614, 2014.
- [8] N. S. Lakić, N. M. Mimica-Dukić, J. M. Isak, and B. N. Božin, "Antioxidant properties of *Galium verum* L. (Rubiaceae) extracts," *Central European Journal of Biology*, vol. 5, no. 3, pp. 331–337, 2010.
- [9] L. Ö. Demirezer, F. Gürbüz, Z. Güvenalp, K. Ströch, and A. Zeeck, "Iridoids, flavonoids and monoterpene glycosides from *Galium verum* subsp. *verum*," *Turkish Journal of Chemistry*, vol. 30, pp. 525–534, 2006.
- [10] A. Hijazi, D. S. Al Masri, H. Farhan, M. Nasser, H. Rammal, and H. Annan, "Effect of different ethanol concentrations, using different extraction techniques, on the antioxidant capacity of Lebanese *Eryngium creticum*," *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, vol. 3, pp. 262–271, 2015.
- [11] I. I. Joffe, K. E. Travers, C. L. Perreault-Micale et al., "Abnormal cardiac function in the streptozotocin-induced non-insulin-dependent diabetic rat: noninvasive assessment with Doppler echocardiography and contribution of the nitric oxide pathway," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 34, no. 7, pp. 2111–2119, 1999.
- [12] C. Auclair and E. Voisin, "Nitroblue tetrazolium reduction," in *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, R. A. Greenwald, Ed., pp. 123–132, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1985.
- [13] E. Pick and Y. Keisari, "A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture," *Journal of Immunological Methods*, vol. 38, no. 1-2, pp. 161–170, 1980.
- [14] L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum, "Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids," *Analytical Biochemistry*, vol. 126, no. 1, pp. 131–138, 1982.
- [15] H. Ohkawa, N. Ohishi, and K. Yagi, "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction," *Analytical Biochemistry*, vol. 95, no. 2, pp. 351–358, 1979.
- [16] J. M. McCord and I. Fridovich, "The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and

- oxygen,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 244, no. 22, pp. 6056–6063, 1969.
- [17] E. Beutler, “Catalase,” in *Red Cell Metabolism, a Manual of Biochemical Methods*, E. Beutler, Ed., pp. 105–106, Grune and Stratton, New York, NY, USA, 1982.
- [18] H. Aebi, “Catalase in vitro,” *Methods in Enzymology*, vol. 105, no. 25, pp. 121–126, 1984.
- [19] H. P. Misra and I. Fridovich, “The role of superoxide-anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 247, no. 10, pp. 3170–3175, 1972.
- [20] E. Beutler, “Superoxide dismutase,” in *Red Cell Metabolism, a Manual of Biochemical Methods*, E. Beutler, Ed., pp. 83–85, Grune and Stratton, Philadelphia, PA, USA, 1984.
- [21] E. Beutler, “Reduced glutathione (GSH),” in *Red Cell Metabolism, a Manual of Biochemical Methods*, E. Beutler, Ed., pp. 112–114, Grune and Stratton, New York, NY, USA, 1975.
- [22] Y. Zhang, C. Yuan, H. Fang, J. Li, S. Su, and W. Chen, “Total flavonoid extract from *Coreopsis tinctoria* Nutt. protects rats against myocardial ischemia/reperfusion injury,” *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, vol. 19, no. 9, pp. 1016–1023, 2016.
- [23] S. Mølgaard, B. Faricelli, M. Salomonsson, T. Engstrøm, and M. Treiman, “Increased myocardial vulnerability to ischemia-reperfusion injury in the presence of left ventricular hypertrophy,” *Journal of Hypertension*, vol. 34, no. 3, pp. 513–523, 2016.
- [24] P. Pagliaro and C. Penna, “Hypertension, hypertrophy, and reperfusion injury,” *Journal of Cardiovascular Medicine*, vol. 18, no. 3, pp. 131–135, 2017.
- [25] L. Vlase, A. Mocan, D. Hanganu, D. Benedec, A. Gheldiu, and G. Crișan, “Comparative study of polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of four *Galium* species (*Rubiaceae*),” *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, vol. 9, no. 3, pp. 1085–1094, 2014.
- [26] J. I. Randriamboavonjy, G. Loirand, N. Vaillant et al., “Cardiac protective effects of *Moringa oleifera* seeds in spontaneous hypertensive rats,” *American Journal of Hypertension*, vol. 29, no. 7, pp. 873–881, 2016.
- [27] L. Yan, J. D. Zhang, B. Wang et al., “Quercetin inhibits left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats and inhibits angiotensin II-induced H9C2 cells hypertrophy by enhancing PPAR- γ expression and suppressing AP-1 activity,” *PLoS One*, vol. 8, no. 9, article e72548, 2013.
- [28] L. Leung, J. B. Martin, T. Lawmaster, K. Arthur, T. L. Broderick, and L. Al-Nakkash, “Sex-dependent effects of dietary genistein on echocardiographic profile and cardiac GLUT4 signaling in mice,” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2016, Article ID 1796357, 10 pages, 2016.
- [29] Y. Kanno, R. Watanabe, H. Zempo, M. Ogawa, J. Suzuki, and M. Isobe, “Chlorogenic acid attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction in mice,” *International Heart Journal*, vol. 54, no. 3, pp. 176–180, 2013.
- [30] S. Srimachai, S. Devaux, C. Demougeot et al., “*Bacopa monnieri* extract increases rat coronary flow and protects against myocardial ischemia/reperfusion injury,” *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 17, no. 1, p. 117, 2017.
- [31] M. Akhlaghi and B. Bandy, “Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia-reperfusion injury,” *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 46, no. 3, pp. 309–317, 2009.
- [32] J. Duarte, V. Francisco, and F. Perez-Vizcaino, “Modulation of nitric oxide by flavonoids,” *Food & Function*, vol. 5, no. 8, pp. 1653–1668, 2014.
- [33] A. M. Petkovic, V. L. Jakovljevic, J. V. Bradic et al., “The effects of potassium cyanide on the functional recovery of isolated rat hearts after ischemia and reperfusion: the role of oxidative stress,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2018, Article ID 5979721, 10 pages, 2018.
- [34] D. N. Granger and P. R. Kvietys, “Reperfusion injury and reactive oxygen species: the evolution of a concept,” *Redox Biology*, vol. 6, pp. 524–551, 2015.
- [35] R. Mattera, M. Benvenuto, M. Giganti et al., “Effects of polyphenols on oxidative stress-mediated injury in cardiomyocytes,” *Nutrients*, vol. 9, no. 5, p. 523, 2017.
- [36] X. L. Louis, S. J. Thandapilly, W. Kalt et al., “Blueberry polyphenols prevent cardiomyocyte death by preventing calpain activation and oxidative stress,” *Food & Function*, vol. 5, no. 8, pp. 1785–1794, 2014.
- [37] Y. W. Chen, H. C. Chou, S. T. Lin et al., “Cardioprotective effects of quercetin in cardiomyocyte under ischemia/reperfusion injury,” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, Article ID 364519, 16 pages, 2013.



Cardioprotective effects of *Galium verum* L. extract against myocardial ischemia-reperfusion injury

Jovana Bradic, Nevena Jeremic, Anica Petkovic, Jovana Jeremic, Vladimir Zivkovic, Ivan Srejovic, Jasmina Sretenovic, Stevan Matic, Vladimir Jakovljevic & Marina Tomovic

To cite this article: Jovana Bradic, Nevena Jeremic, Anica Petkovic, Jovana Jeremic, Vladimir Zivkovic, Ivan Srejovic, Jasmina Sretenovic, Stevan Matic, Vladimir Jakovljevic & Marina Tomovic (2019): Cardioprotective effects of *Galium verum* L. extract against myocardial ischemia-reperfusion injury, Archives of Physiology and Biochemistry, DOI: [10.1080/13813455.2018.1551904](https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1551904)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1551904>



Published online: 11 Jan 2019.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 1



View Crossmark data [↗](#)

Cardioprotective effects of *Galium verum* L. extract against myocardial ischemia-reperfusion injury

Jovana Bradic^a , Nevena Jeremic^a , Anica Petkovic^a, Jovana Jeremic^a, Vladimir Zivkovic^b, Ivan Srejavic^b , Jasmina Sretenovic^b, Stevan Matic^c, Vladimir Jakovljevic^{b,d} and Marina Tomovic^a

^aFaculty of Medical Sciences, Department of Pharmacy, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia; ^bFaculty of Medical Sciences, Department of Physiology, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia; ^cDepartment of Pathology, Clinical Centre of Kragujevac, Kragujevac, Serbia; ^dDepartment of Human Pathology, 1st Moscow State Medical University IM Sechenov, Moscow, Russia

ABSTRACT

The aim of our study was to determine a chemical composition of methanol extract of *Galium verum* as well as to assess its effects on functional recovery and redox status of isolated rat heart after ischemia. Rats were divided into control and *G. verum* group, which included animals treated with 500 mg/kg of methanol extract of *G. verum* for 28 days. Parameters of heart function and oxidative stress markers were estimated. Cell morphology was evaluated by hematoxylin and eosin (HE) staining. Our results demonstrated for the first time that *G. verum* extract preserved cardiac contractility, systolic, and diastolic function as well as structural damage of the heart after ischemia. Furthermore, *G. verum* extract modulated the activity of antioxidant enzymes and alleviated the production of pro-oxidants.

ARTICLE HISTORY

Received 25 July 2018
Accepted 19 November 2018
Published online 14 December 2018

KEYWORDS

Galium verum; ischemia-reperfusion injury; rat heart; oxidative stress

1. Introduction

Nowadays acute myocardial infarction remains a leading cause of hospital admissions and mortality worldwide. Early restoration of blood flow by thrombolytic therapy or primary percutaneous coronary artery angioplasty presents the current therapeutic strategy of a great importance for reducing the size of myocardial infarct (Xia *et al.* 2016). Nevertheless, the reversal of oxygen to oxygen-starved myocardium during reperfusion paradoxically exacerbates tissue injury caused by hypoxic stress. This phenomenon, known as ischemia/reperfusion (I/R) injury, is a frequent clinical problem and it has been a focus of considerable research efforts for more than four decades (Kalogeris *et al.* 2016). Among myriad of mechanisms underlying I/R injury, overwhelming oxidative/nitrosative stress, calcium overload, and pronounced inflammatory response has been considered to mostly contribute to myocardial damage (Kalogeris *et al.* 2012). Early studies were mostly oriented on ischemic preconditioning as a manoeuvre for myocardial protection in which heart is exposed to brief episodes of I/R prior myocardial infarct induced by prolonged ischemia. On the other hand, certain non-ischemic, non-hypoxic stimulus, such as pharmacological agents applied before ischemia may mimic the signaling induced by ischemic preconditioning, thus leading to alleviation of the deleterious effects of I/R injury (Li *et al.* 2015).

Numerous data support the fact that medicinal plants enriched with polyphenols possess the potential to attenuate harmful effects of acute myocardial infarction, thus justifying its traditional use in the prevention of cardiovascular diseases.

Inhibition of reactive oxygen species (ROS) overproduction with antioxidants present in plant extracts may be prominent endpoint target of cardioprotection (Akhlaghi and Bandy 2009, Barteková *et al.* 2010). *Galium verum* L. is a perennial herbaceous plant belonging to the *Rubiaceae* family, widely used throughout history for treatment and prophylaxis of various diseases and conditions (Lakić *et al.* 2010). Several classes of bioactive compounds have been isolated from this plant species so far: phenols, iridoid glycosides, anthraquinones, and triterpenes, as well as small amounts of tannins, saponins, essential oils, etc (Demirezer *et al.* 2006, Lakić *et al.* 2010). *G. verum* has been renowned in traditional medicine since ancient time for its effectiveness as sedative, spasmolytic, anticancer, cardioprotective agent, etc (Demirezer *et al.* 2006, Lakić *et al.* 2010, Milic *et al.* 2013). Phytochemical investigations have revealed a chemical composition of this plant and confirmed antioxidant activity *in vitro*, however its biological effects, especially on cardiac function and oxidative stress are not fully clarified (Lakić *et al.* 2010, Vlase *et al.* 2014).

Regarding all above-presented data, the aim of our study was to determine the content of total phenols and flavonoids of methanol extract of *G. verum* as well as to assess its effects on functional recovery and redox status of isolated rat heart after ischemia.

2. Materials and methods

This investigation was performed at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. The study protocol

was approved (17 March 2017) and performed in accordance with the regulatives of the Faculty's Ethical committee for the welfare of laboratory animals and principles of the Good laboratory practice and European Council Directive (86/609/EEC).

2.1. Plant material and extract preparation

The whole plant *G. verum* was collected on 5 July 2017 in the village Dobroselica, on the southern cliff of the Mt Zlatibor (GPS coordinates: 43°42'59.99"N and 19°41'59.99"E). Identification and classification of the plant material were performed by professor Snezana Vukojicic at the Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Kragujevac and at the Institute of Botany and Botanical garden "Jevremovac," University of Belgrade. Voucher specimens are deposited in Herbarium of the Institute of Botany and Botanical garden "Jevremovac" with number 17417. The collected material was dried under the shade and powdered (sieve 0.75). Methanol extract was prepared extracting 100 g of aerial part of plant with 500 ml of methanol by heat reflux extraction, at temperature of 90°C, in a duration of 2 h (Hijazi *et al.* 2015). The mixture was filtered through filter paper (Whatman, No.1). Dry extract was obtained by evaporation under reduced pressure (RV05 basic IKA, Germany). The residue (17.07 g) was stored in a dark glass bottle at +4°C for further processing. In order to feed the animals, *G. verum* extract was daily dissolved in the water just before administered to experimental animals.

2.2. Determination of the total phenolic and flavonoid contents

Folin-Ciocalteu's method was used in determining the concentrations of total phenolic content of methanol extract (Singleton *et al.* 1999). Total phenolic content was expressed as mg gallic acid equivalents per gram of crude extract (mg GA/g extract). Total flavonoid content of the tested extract was determined following a previously reported method (Brighente *et al.* 2007). Total flavonoid content was expressed as milligram of quercetin equivalent per gram of extract (mg of quercetin equivalent/g of extract).

2.3. Animals and experimental design

Twenty *Wistar albino* rats (males, 8 weeks old, body weight 200±50 g) were included in the study. The animals consumed commercial rat food (20% protein rat food, Veterinary institute Subotica, Serbia) *ad libitum* and were housed at temperature of 22±2°C, with 12 h of automatic illumination daily. The rats were divided into two groups:

- **Control group** – rats that drank only tap water.
- ***G. verum* group** – rats that drank tap water containing 500 mg/kg of methanol extract of *G. verum* for 28 days.

A day after accomplishing 28-day drinking protocol after a short-term ketamine/xylozine-induced narcosis, rats were

sacrificed by decapitation. The chest was then opened via midline thoracotomy. The hearts were immediately removed and immersed in cold saline and were then attached on a cannula of the *Langendorff* perfusion apparatus to provide retrograde perfusion under constant coronary perfusion pressure CPP=70 cmH₂O. Krebs–Henseleit buffer was used for retrograde perfusion (in mmol/l: NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂·2H₂O 2.5, MgSO₄·7H₂O 1.7, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, glucose 11, and pyruvate 2). The buffer was balanced with 95% O₂ and 5% CO₂, with a pH of 7.4 and a temperature of 37°C. After placing the sensor in the left ventricle, the following parameters of myocardial function have been continuously measured: maximum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt max), minimum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt min), systolic left ventricular pressure (SLVP), diastolic left ventricular pressure (DLVP), and heart rate (HR). Coronary flow (CF) was measured flowmetrically.

Following the establishment of heart perfusion, the hearts were stabilised within 30 min. In both groups, after stabilisation period, hearts were subjected to global ischemia (perfusion was totally stopped) for 20 min, followed by 30 min of reperfusion. In the period of reperfusion (30 min), all cardiodynamic parameters and CF were measured in intervals of 5 min (RP1–RP7).

2.4. Biochemical analysis in heart tissue and coronary venous effluent

2.4.1. Coronary venous effluent

Coronary venous effluent was collected in point of stabilisation (S), in first point of reperfusion (R1) and on every 5 min in period of reperfusion (R1–R7). The following oxidative stress parameters were determined spectrophotometrically (Shimadzu UV 1800, Japan) using collected samples of the coronary venous effluent: the index of lipid peroxidation, measured as thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), nitrite (NO₂⁻), levels of superoxide anion radical (O₂⁻) and hydrogen peroxide (H₂O₂).

2.4.2. Heart tissue preparation

After accomplishing experiments, hearts from all animals were frozen at -80°C, and then a 0.5 section of each tissue was homogenised in 5 ml phosphate buffer pH 7.4 using an electrical homogeniser, on ice. Then tissue homogenates were centrifuged at 1200 × g for 20 min at 4°C. The resulting supernatants were isolated and stored at -80°C until determination of biochemical parameters. Index of lipid peroxidation as well as parameters of antioxidant defence system such as reduced glutathione (GSH), catalase (CAT), and superoxide dismutase (SOD) were determined in heart tissue.

2.4.3. Determination of the index of lipid peroxidation measured as TBARS

The degree of lipid peroxidation in the coronary venous effluent and heart tissue was estimated by measuring TBARS, using 1% thiobarbituric acid in 0.05 NaOH, which was

incubated with the coronary effluent or heart tissue at 100 °C for 15 min and measured at 530 nm. Krebs–Henseleit solution was used as a blank probe (Ohkawa *et al.* 1979).

2.4.4. Nitrite determination (NO_2^-)

Nitric oxide (NO) decomposes rapidly to form stable nitrite/nitrate products. The NO_2^- level was measured and used as an index of NO production, using Griess's reagent. A total of 0.5 ml of perfusate was precipitated with 200 μL of 30% sulphosalicylic acid, vortexed for 30 min, and centrifuged at $3000 \times g$. Equal volumes of the supernatant and Griess's reagent (containing 1% sulphanilamide in 5% phosphoric acid/0.1% naphthalene ethylenediamine-dihydrochloride) were added, incubated for 10 min in the dark and measured at 543 nm. NO_2^- levels were calculated using sodium nitrite as the standard (Green *et al.* 1982).

2.4.5. Superoxide anion radical determination (O_2^-)

Superoxide anion radical concentrations were measured using the nitro blue tetrazolium reagent in TRIS buffer (assay mixture) with coronary venous effluent. The measurement was performed at a wavelength of 530 nm. The Krebs–Henseleit solvent was used as the blank control (Auclair and Voisin 1985).

2.4.6. Hydrogen peroxide determination (H_2O_2)

The measurement of H_2O_2 was based on the oxidation of phenol red by H_2O_2 in a reaction catalysed by horseradish peroxidase (Pick and Keisari 1980). Two hundred microlitres of perfusate was precipitated using 800 ml of freshly prepared phenol red solution; 10 μL of (1:20) horseradish peroxidase (made immediately before use) was subsequently added. For the blank probe, an adequate volume of Krebs–Henseleit solution was used instead of coronary venous effluent. The level of H_2O_2 was measured at 610 nm.

2.4.7. Determination of reduced glutathione (GSH)

The level of reduced glutathione was determined based on GSH oxidation with 5,5-dithio-bis-6,2-nitrobenzoic acid using the method reported by Beutler *et al.* (1963). Detection was performed at 420 nm. The amount of GSH was expressed as nmol/g tissue.

2.4.8. Determination of antioxidant enzymes (SOD, CAT)

SOD activity was determined by the epinephrine method of Beutler. Homogenate of heart tissue was mixed with carbonate buffer, and then epinephrine was added. Detection was performed at 470 nm. The amount of SOD was expressed as U/g tissue (Beutler 1984). CAT activity was determined according to Aebi. Diluted homogenate of heart tissue (1:7 v/v) was treated with chloroform–ethanol (0.6:1 v/v). CAT buffer, prepared sample, and 10 mM H_2O_2 was used for determination. Detection was performed at 360 nm. The amount of CAT was expressed as U/g tissue (Aebi 1984).

2.5. Histological analysis

In order to evaluate the effects of *G. verum* on cell morphology after ischemia hematoxylin-eosin staining (HE) was performed for hearts according to the previously reported method (Zhang 2016).

2.6. Statistical analysis

IBM SPSS Statistics 20.0 for Windows was used for statistical analysis of data within control and *G. verum* group. Three measured points were statistically analysed: first point was stabilisation (S), second was the first and the last point of 30 min reperfusion period (R1 and R7). Values were expressed as mean \pm standard error. Distribution of data was checked by Shapiro–Wilk test. Data were analysed using a one-way analysis of variance and the *post hoc* Bonferroni test for multiple comparisons. Values of $p < .05$ were considered to be statistically significant, while values of $p < .01$ were considered to be high statistically significant.

3. Results

3.1. Total phenolic and total flavonoid contents

Total phenolic and flavonoid content of methanol extract of *G. verum* is shown in Table 1.

3.2. Body weight (BW) and heart weight (HW) measurement

Values of BW, HW, and BW to HW ratio in both groups of rats are shown in Table 2. Statistically significant difference in the values of these parameters was not observed between groups.

3.3. Cardiodynamic parameters

3.3.1. Maximum rate of left ventricular pressure development (dp/dt max)

In the control group, there was a significant increase in dp/dt max in the first point of reperfusion (RP1) in comparison to the stabilisation period and last moment of reperfusion (RP7). Markedly lower value of this parameter was observed in RP7 compared to the values before ischemia. In a group who received *G. verum* an increase in dp/dt max was noticed

Table 1. Total phenol and flavonoid content of aerial part of methanol extract of *G. verum*.

Total phenol content ^a	27.26 \pm 1.90
Total flavonoid content ^b	65.10 \pm 5.81

Values are means of three biological replicates \pm SD. DE: dry extract.

^amg gallic acid equivalent (GAE)/g DE.

^bmg quercetin equivalent/g DE.

Table 2. Body and heart weight measurements presented as mean \pm SD.

	BW (g)	Heart weight (g)	BW to HW ratio
Control	319.83 \pm 21.23	1.13 \pm 0.04	354.65 \pm 16.05
<i>G. verum</i>	336.75 \pm 37.78	1.25 \pm 0.1	376.63 \pm 41.83

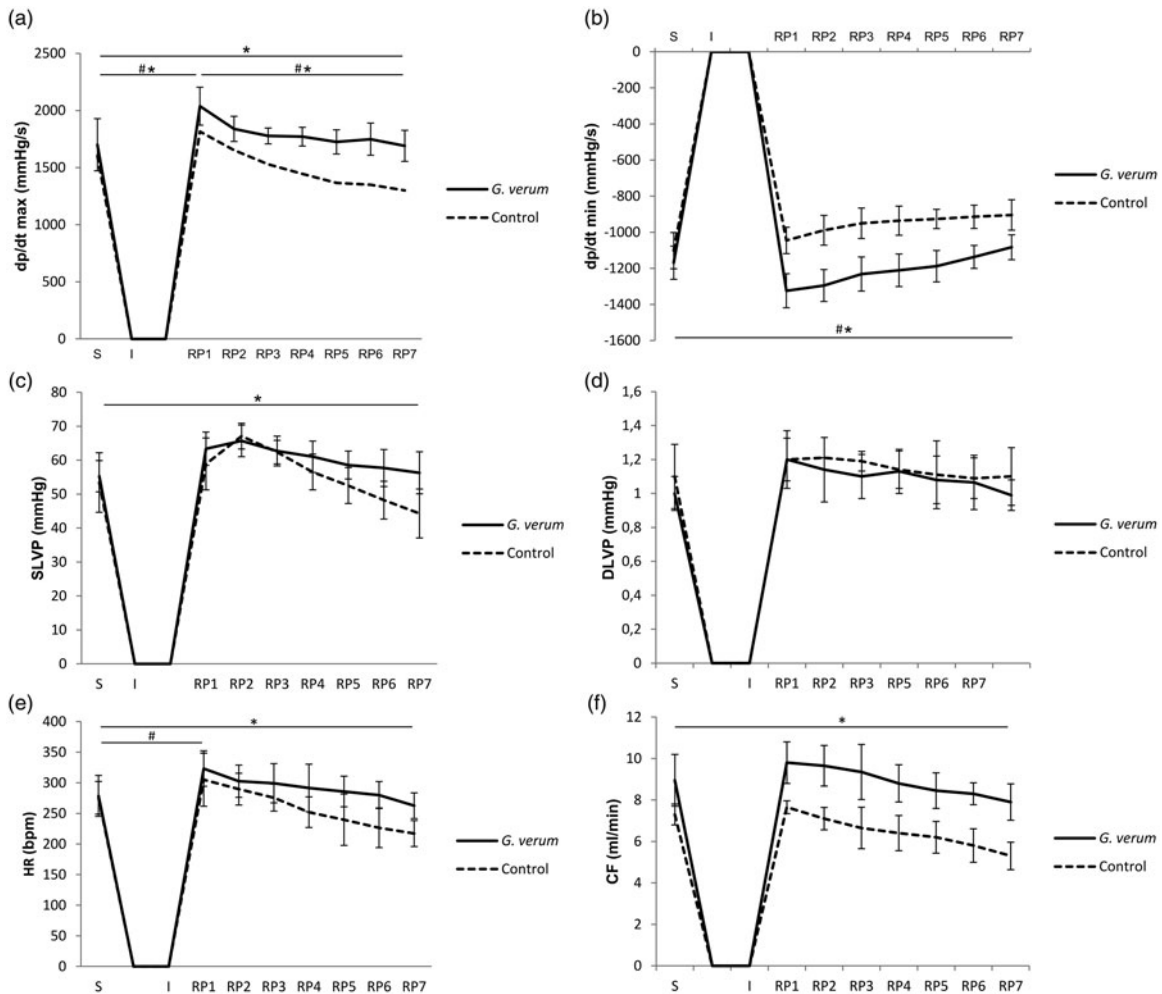


Figure 1. Cardiodynamic parameters in healthy and *G. verum* treated rats. (a) comparison between groups in the value of dp/dt max, (b) comparison between groups in the value of dp/dt min, (c) comparison between groups in the value of SLVP, (d) comparison between groups in the value of DLVP, (e) comparison between groups in the value of HR, (f) comparison between groups in the value of CF. *Statistical significance at the level of $p < 0.05$ within control group; #statistical significance at the level of $p < 0.05$ within *G. verum* group; data are presented as means \pm SD. S: stabilisation; I: ischemia; R1–R7: every 5 min of reperfusion.

in the first minute of reperfusion compared to stabilisation value and value in RP7, while values of this parameter at the end of reperfusion were similar to those before ischemia (Figure 1(a)).

3.3.2. Minimum rate of left ventricular pressure development (dp/dt min)

More negative values of dp/dt min were reached at the end of reperfusion in comparison to stabilisation in group treated with *G. verum*, while in control group at the last point of recovery period dp/dt min value was more positive when compared to the values before ischemia (Figure 1(b)).

3.3.3. Systolic blood pressure in the left ventricle (SLVP)

A significant drop in SLVP was observed in control group at the last point of reperfusion when compared to stabilisation period, while in experimental group SLVP value remained constant during the observed period (Figure 1(c)).

3.3.4. Diastolic left ventricular pressure

Value of DLVP did not vary within both groups during the observed points of interest (Figure 1(d)).

3.3.5. Heart rate

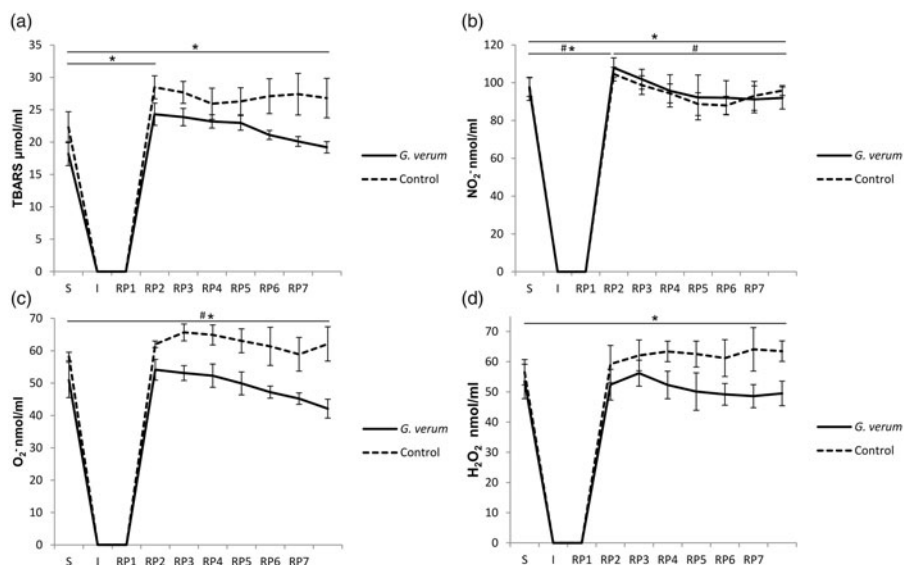
At the end of recovery period in control group, HR was a significantly decreased in comparison to the values in stabilisation. Furthermore, a rise in the value of HR was noticed at first point of reperfusion (R1) compared to stabilisation point in group who received *G. verum*, while at the end of 30 min reperfusion value of HR returned to the value detected before ischemia (Figure 1(e)).

3.3.6. Coronary flow

CF remained constant in experimental group during the observed period, while in control there was a prominent decrease at the last point of reperfusion when compared to stabilisation period (Figure 1(f)).

Table 3. Percent difference in absolute values of cardiodynamic parameters between control and *G. verum* group.

<i>G. verum</i> vs control	(%) increase in stabilisation	(%) increase in RP1	(%) increase in RP7
dp/dt max	+6.01%	+12.22%	+29.95%
dp/dt min	+6.07%	+26.66%	+19.6%
SLVP	+3.48%	+7.65%	+27.09%
DLVP	-0.06%	+0.04%	-0.01%
HR	+1.18%	+5.98%	+20.93%
CF	+22.6%	+28.11%	+49.05%

**Figure 2.** Oxidative stress markers in coronary venous effluent in healthy and *G. verum* treated rats. (a) comparison between groups in the value of TBARS, (b) comparison between groups in the value of NO_2^- , (c) comparison between groups in the value of O_2^- , (d) comparison between groups in the value of H_2O_2 . *Statistical significance at the level of $p < 0.05$ within control group; #statistical significance at the level of $p < 0.05$ within *G. verum* group; data are presented as means \pm SD. S: stabilisation; I: ischemia; R1–R7: every 5 min of reperfusion.

Percentage changes in the values of cardiodynamic parameters induced by *G. verum* extract treatment in comparison to control group are shown in Table 3.

3.4. Biochemical analysis

3.4.1. Index of lipid peroxidation (measured as TBARS)

The index of lipid peroxidation in coronary venous effluent did not differ significantly in the experimental group, while in control group there was a rise in the first minute of reperfusion and at the end of recovery period compared to the values in stabilisation (Figure 2(a)). There was no change in lipid peroxidation in both control and experimental hearts (Figure 3(a)).

3.4.2. Level of nitrites (NO_2^-)

In the control group, there was an increase in NO_2^- production at the first and at the last point of recovery period in comparison to stabilisation. In the group treated with *G. verum*, higher generation of NO_2^- was noticed in the first minute of reperfusion when compared to stabilisation and the end of reperfusion (Figure 2(b)).

3.4.3. Level of superoxide anion radical (O_2^-)

At the end of reperfusion a significantly increased level of O_2^- was observed in the control group in comparison to the

level before ischemia. On the contrary in *G. verum* group significantly diminished production of this pro-oxidant was noticed at the end of recovery period compared to stabilisation (Figure 2(c)).

3.4.4. Level of hydrogen peroxide (H_2O_2)

The level of H_2O_2 did not vary significantly within the experimental group, while in the control group, enhance in production of H_2O_2 was found at the last point reperfusion in comparison to values before ischemia (Figure 2(d)).

Percentage changes in the levels of measured pro-oxidants induced by *G. verum* extract treatment in comparison to control group are shown in Table 4.

3.4.5. Parameters of antioxidant defence system

The activities of SOD and CAT were significantly higher in the group treated with *G. verum* in comparison to the control group, while the level of GSH was similar in both observed groups (Figure 3(b–d)).

3.5. Histopathological results

In the control group, most of the cardiac muscle fibers were hyper eosinophilic with loss of nucleus and transverse striation, followed by contraction bands. Additionally, edema and vacuolation of muscle fibers were observed. On the

Table 4. Percent difference in values of oxidative stress parameters between control and *G. verum* group.

<i>G. verum</i> vs control	(%) increase in Stabilisation	(%) increase in RP1	(%) increase in RP7
TBARS	-18.39%	-14.63%	-28.36%
NO ₂ ⁻	-5.07%	+ 3.24%	-4.12%
O ₂ ⁻	-12.49%	-12.78%	-32.06%
H ₂ O ₂	-5.39%	-11.46%	-22.05%

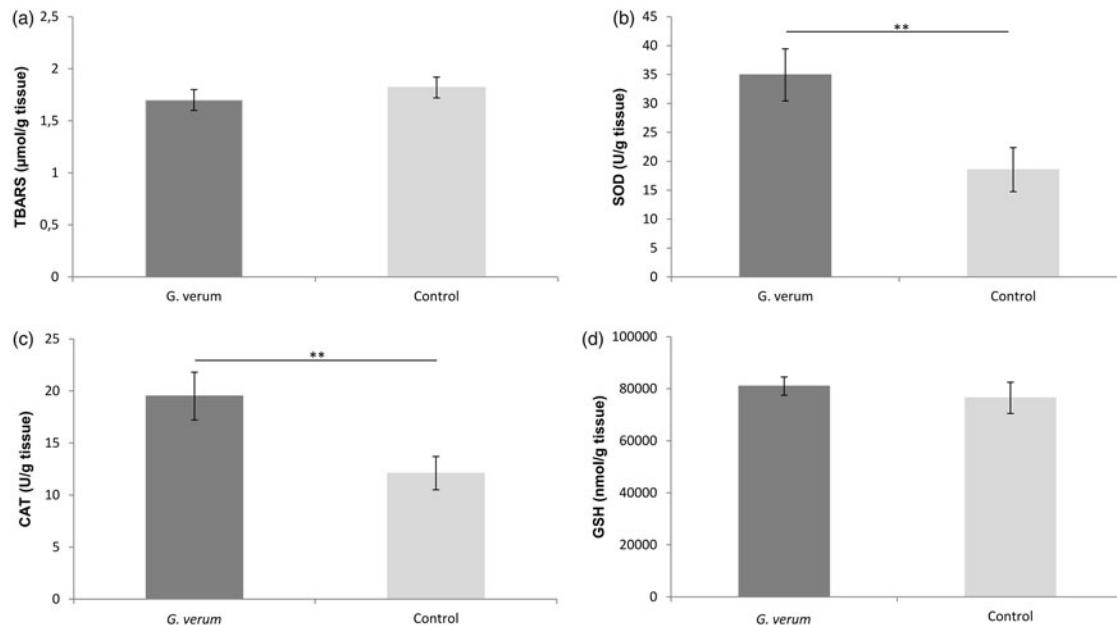


Figure 3. Parameters of oxidative stress and antioxidant defence system in heart tissue in healthy and *G. verum* treated rats. (a) Comparison between groups in the value of TBARS, (b) comparison between groups in the value of CAT, (c) comparison between groups in the value of SOD, (d) comparison between groups in the value of GSH. *Statistical significance at the level of $p < 0.05$ within control group; #statistical significance at the level of $p < 0.05$ within *G. verum* group; data are presented as means \pm SD. S: stabilisation; I: ischemia; R1–R7: every 5 min of reperfusion.

other hand, muscle fibers in the group treated with *G. verum* were hyper eosinophilic and moderately edematous and there were no loss of nucleus and transverse striation (Figure 4).

4. Discussion

Oxidative stress and prominent inflammatory response, characterised by infiltration of proinflammatory neutrophils to ischemic tissue, remain one of a critical factors contributing to myocardial damage (Kalogeris *et al.* 2012). Therefore possible targets for pharmacological preconditioning may be cellular and enzymatic sources of ROS overproduction, as well as several inflammatory mediators. Polyphenols, as a class of naturally occurring compounds present in fruits, plants, etc are under intense investigation due to its antioxidant, anti-thrombogenic, anti-inflammatory, and anti-apoptotic properties (Panche *et al.* 2016). Numerous researches have confirmed the protective effects of plant extracts against reperfusion-induced heart damage, mainly attributed to antioxidant and anti-inflammatory potential of polyphenols and flavonoids (a vast group of polyphenols) (Akhlaghi and Bandy 2009). In that sense, the purpose of our study was to perform chemical analysis of *G. verum* extract and reveal its effects on functional recovery and redox status of heart after ischemia.

Cardiodynamic parameters detected in our research refer to the functional characteristics of the heart, specifically the

left ventricle and its systolic and diastolic function. Therefore the effects of *G. verum* extract on measured cardiodynamic variables, as well as cardiac redox state, reflects its potential therapeutic role in a model of pharmacological preconditioning.

Our results clearly show that cardiodynamic parameters in control conditions were substantially reduced during reperfusion compared to values before ischemia. We obtained depression of cardiac function and impaired inotropic and lusitropic properties of the heart, as well as disturbed coronary circulation and HR, thus confirming that I/R injury is related to myocardial tissue dysfunction. On the other hand, 4 weeks treatment with *G. verum* extract did not only preserve contractile power of the heart, but even improved it, as evidenced by increase in dp/dt max values at the end of reperfusion compared to the values before ischemia. Additionally, administration of *G. verum* significantly restored lusitropic property of myocardium and led to the recovery of systolic and diastolic function in comparison to hearts in control conditions. Restoration of flow was noticed in first minutes of reperfusion and it was followed by a slow continuous drop over 30 min reperfusion period, so at the end of recovery period it returned to the values observed before ischemia. The similar dynamic during reperfusion was noticed in terms of contractility force, thus suggesting that vasculature dilated in accordance with the demands of myocardial contraction. Insignificantly altered HR in rats who

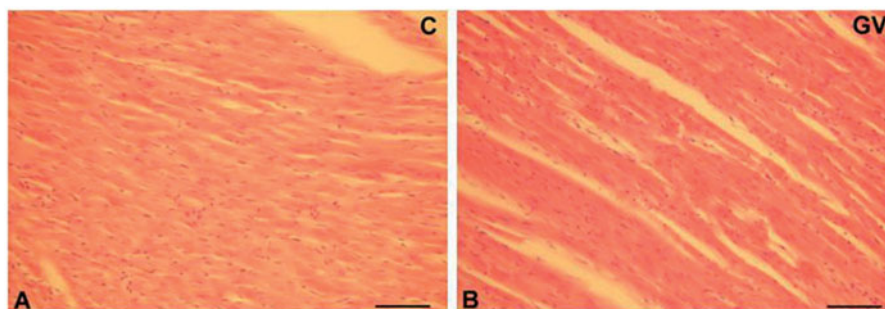


Figure 4. Histopathological changes in the rat heart (magnification, $\times 400$): (A) control group; (B) *G. verum* group.

received *G. verum* provided sufficient time for myocardium to contract strongly.

To our best knowledge, there are no evidence regarding the effects of *G. verum* on myocardial function so far and mechanisms included in its cardioprotective potential are open to discussion. Besides the traditional use of medicinal plants rich in polyphenols as preventive agents for cardiovascular diseases, a lot of epidemiological, *in vitro* and *in vivo* studies have confirmed their capacity to improve recovery of heart after infarction (Akhlaghi and Bandy 2009). It has been reported that chlorogenic acid, which was previously identified in high concentration in *G. verum* extract, led to a better myocardial contractility response in a model of ischemic hearts (Kanno *et al.* 2013, Mocan *et al.* 2016). These biomolecule, as well as other polyphenols found in smaller quantity in *G. verum* extract, may activate endothelial nitric oxide synthase and consequently enhance NO synthesis and release. Increased NO simultaneously with diminished ROS levels may be one of possible explanation for preserved coronary vasodilatory response in a group treated with *G. verum* extract. On the contrary, if there is high level of ROS, increased NO production will result in the formation of peroxynitrite, that is, in oxidative/nitrative tissue injury, which would further damage heart (Wang *et al.* 2011, Duarte *et al.* 2014). Taking into consideration results of previously published studies related to the role of different phenols on functional properties of heart, we may speculate that effects of *G. verum* extract are attributed to the additive and synergistic effects of all present phenols.

In the second part of present investigation, we aimed to estimate whether effects of *G. verum* extract are mediated via change in antioxidant capacity and generation of pro-oxidants. Under normal physiological conditions, there is a balance between continuously produced pro-oxidants and antioxidant system that counterbalances the effects of oxidants (Birben *et al.* 2012). Nevertheless, it has been proposed that re-introduction of oxygen during early phase of reperfusion induces oxygen generation, leading to a destruction of proteins, nucleic acids, carbohydrates, lipids, and finally cell death (Kalogeris *et al.* 2012).

Analysis of pro-oxidants in the coronary venous effluent refers to the oxidative stress in the endocardium of the left ventricle and endothelium of the coronary circulation. Our results illustrated that I/R injury was related to increased oxidative stress, as evidenced by markedly higher TBARS, NO_2^- , O_2^- , and H_2O_2 in coronary venous effluent at the end of

reperfusion compared to stabilisation, while *G. verum* pretreatment led to the decrease of O_2^- . Additionally, *G. verum* extract prevented ischemia-induced lipid peroxidation in heart tissue, thus maintaining membrane integrity.

Regarding the components of antioxidant defence system, myocardial SOD and CAT activity were higher in *G. verum* group, while the level of GSH was similar between groups. Enhanced CAT activity may be an explanation for the absence of rise in H_2O_2 production in *G. verum* pretreated group, since this enzyme catalyses the decomposition of hydrogen peroxide to water and oxygen. Furthermore increased activity of SOD, a major component of antioxidant defence systems against O_2^- , is supported by a decline in O_2^- that we detected. It may be hypothesised that unaltered coronary vasodilatory response accompanied with a drop in O_2^- may be a consequence of interaction between increased NO responsible for regulation of CF with the overproduced O_2^- , resulting in the generation of toxic peroxynitrite (ONOO^-). Polyphenols, including flavonoids, are renowned for great antioxidant potential, which enables them to scavenge suddenly generated ROS during restoration of flow. Furthermore, polyphenols activate endogenous antioxidant defence system, particularly SOD and CAT, resulting in attenuation of oxidative stress-induced tissue damage (Mattera *et al.* 2017). As a consequence, the structural and functional integrity of cardiomyocytes is maintained. Moreover, it has been proved that mechanisms through which polyphenols protect myocardium from oxidative damage involve preservation of mitochondrial function, inhibition of xanthine oxidase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (NADPH) oxidase, as well as chelation of iron ions which catalyse several free radical-generating reactions (Debnath *et al.* 2014). Impact on transcription-mediated signaling is responsible for the long-lasting antioxidative effects of these natural molecules (Mattera *et al.* 2017). Generally viewed, observed effects of *G. verum* extract on cardiac redox status are probably consequence of additive and synergistic antioxidant activities of all present bioactive natural compounds.

Histological analyses indicate that ischemia altered structure of the heart, which could be partially alleviated with *G. verum* pretreatment. *G. verum* consumption prevented loss of nucleus and transverse striation of myocardial muscle fibers, which were prominent in the control hearts. Within first minutes of flow restoration "contraction band necrosis" may occur, which was found in hearts underwent I/R, while in the



Article

Standardized *Aronia melanocarpa* Extract as Novel Supplement against Metabolic Syndrome: A Rat Model

Vladimir JAKOVLJEVIC ^{1,2,*} , Petar Milic ³, Jovana Bradic ⁴, Jovana Jeremic ⁴, Vladimir Zivkovic ¹, Ivan Srejsovic ¹, Tamara Nikolic Turnic ⁴ , Isidora Milosavljevic ⁴, Nevena Jeremic ⁴, Sergey Bolevich ², Milica Labudovic Borovic ⁵, Miroslav Mitrovic ⁶ and Vesna Vucic ⁷

¹ Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia; vladimirziv@gmail.com (V.Z.); ivan_srejsovic@hotmail.com (I.S.)

² Department of Human Pathology, 1st Moscow State Medical, University IM Sechenov, Trubetskaya street 8, Moscow 119991, Russia; bolevich2011@yandex.ru

³ Department of Pharmacy, High Medical School of Professional Studies in Cuprija, Lole Ribara 1/2, 35000 Cuprija, Serbia; milic.milic@gmail.com

⁴ Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia; jovanabradickg@gmail.com (J.B.); jovana.jeremic@medf.kg.ac.rs (J.J.); tamara.nikolic@medf.kg.ac.rs (T.N.T.); isidora.stojic@medf.kg.ac.rs (I.M.); nbarudzic@hotmail.com (N.J.)

⁵ Institute of Histology and Embryology "Aleksandar Dj. Kostic", Faculty of Medicine, University of Belgrade, Dr Subotic 8, 11000 Belgrade, Serbia; milica.borovic@supremalab.rs

⁶ Pharmanova, Generala Anrija 6, 11010 Belgrade, Serbia; miroslav.mitrovic@pharmanova.com

⁷ Institute for Medical Research, Centre of Research Excellence in Nutrition and Metabolism, University of Belgrade, Tadeusa Kosuska 1, 11129 Belgrade, Serbia; vesna.vucic.imr@gmail.com

* Correspondence: drvladakgbg@yahoo.com; Tel.: + 381-34-306-800

Received: 30 November 2018; Accepted: 12 December 2018; Published: 20 December 2018



Abstract: The aim of our study was to examine the effects of different dietary strategies, high-fat (HFd) or standard diet (Sd) alone or in combination with standardized oral supplementation (0.45 mL/kg/day) of *Aronia melanocarpa* extract (SAE) in rats with metabolic syndrome (MetS). SAE is an official product of pharmaceutical company Pharmanova (Belgrade, Serbia); however, the procedure for extraction was done by EU-Chem company (Belgrade, Serbia). Rats were divided randomly into six groups: control with Sd, control with Sd and SAE, MetS with HFd, MetS with HFd and SAE, MetS with Sd and MetS with Sd and SAE during 4 weeks. At the end of the 4-week protocol, cardiac function and liver morphology were assessed, while in the blood samples glucose, insulin, iron levels and systemic redox state were determined. Our results demonstrated that SAE had the ability to lower blood pressure and exert benefits on in vivo and ex vivo heart function. Moreover, SAE improved glucose tolerance, attenuated pathological liver alterations and oxidative stress present in MetS. Obtained beneficial effects of SAE were more prominent in combination with changing dietary habits. Promising potential of SAE supplementation alone or in combination with different dietary protocols in triggering cardioprotection should be further examined in future.

Keywords: metabolic syndrome; *Aronia melanocarpa*; standardized extract; dietary strategies; supplementation

1. Introduction

Metabolic syndrome (MetS) represents one of the metabolic disorders characterized by abdominal obesity, dyslipidemia, hypertension, insulin resistance and diabetes mellitus (DM) type 2 [1,2]. There is

a great concern since MetS directly promotes the development of cardiovascular disorders, possibly because it results in increased oxidative stress and low-grade inflammation [3]. Therapeutic approaches involve dietary restriction or a combination of synthetic antidiabetic and hypolipidemic drugs [4]. However, increasing incidence of MetS associated with the undesirable side-effects and high cost of available drugs indicates the need to discover new, less harmful herbal medicines efficient in controlling both blood glucose and lipids [4,5]. Therefore, a lot of plant extracts as well as plant-derived biomolecules such as polyphenols, have been under research for the prevention and therapy of MetS [1]. It has been well documented that polyphenols, especially anthocyanins and quercetin, exert the potential to enhance the glucose uptake by muscle and adipocyte cells, thus exerting antidiabetic effect [6].

Aronia melanocarpa (*A. melanocarpa*) or black chokeberry is a fruit/plant which belongs to the *Rosaceae* family and is native to North America [7]. However, it has been commonly used in Europe as ingredient for juices, wine, jams, teas and cordial liqueurs [8,9]. *A. melanocarpa* represents one of the richest sources of polyphenols among fruits, with anthocyanins and flavonoids identified as major components responsible for its therapeutic potential [10,11]. Recent researches have focused attention on *A. melanocarpa* due to its numerous health benefits in a broad range of pathological conditions [12]. It has been reported that fruit and extracts of *A. melanocarpa* exert gastroprotective, hepatoprotective, antiinflammatory and antiproliferative activity [12,13]. Furthermore, the health-promoting effects of extracts of this plant involve antiatherosclerotic, antiplatelet and hypoglycemic properties [7,14]. Moreover, it was previously confirmed that *A. melanocarpa* extract may reduce systolic and diastolic pressure and be useful in the management of DM [5,13]. However, to our best knowledge, the effectiveness of *A. melanocarpa* extract in combination with different diet regimens in the treatment of MetS has been not investigated so far.

Therefore, the aim of our study was to examine different dietary strategies, high-fat (HFd) or standard diet (Sd) alone or in combination with standardized *A. melanocarpa* extract (SAE) supplementation, and their potential benefits in the prevention and treatment of various complications in rats with MetS.

2. Results

2.1. Body Mass Index (BMI) of Healthy and Rats with MetS after 4-Weeks of Dietary Changes

BMI was statistically higher in groups with MetS (MetS + HFd, MetS + HFd + SAE, MetS + Sd, MetS + Sd + SAE) than in healthy rats (CTRL, SAE). However, 4 weeks after dietary regime, MetS + Sd and MetS + Sd + SAE groups had significantly lower BMI levels than MetS + HFd and MetS + HFd + SAE, while MetS + Sd + SAE had significantly lower BMI level than MetS + Sd (Figure 1).

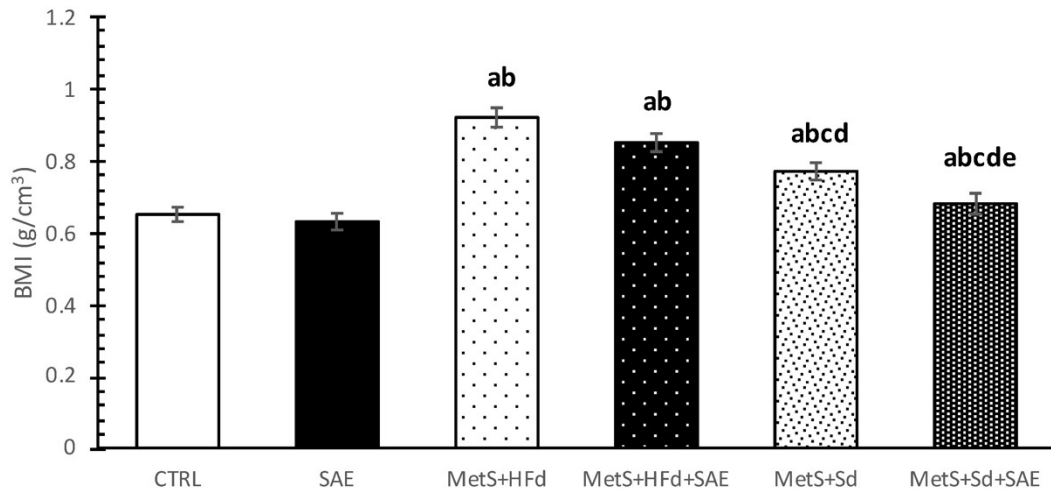


Figure 1. BMI in examined groups 4 weeks after dietary changes. Values are expressed as mean \pm standard deviation for 10 animals, for each group. For statistical significance were considered values $p < 0.05$. ^a Statistical significance in relation to control (CTRL) group; ^b Statistical significance in relation to standardized *A. melanocarpa* extract (SAE) group; ^c Statistical significance in relation to MetS + HFd group; ^d Statistical significance in relation to MetS + HFd + SAE group; ^e Statistical significance in relation to MetS + Sd group.

2.2. Changes in Blood Pressure and Heart Rate in Healthy and Rats with MetS on the Different Diet Regime

Systolic and diastolic blood pressure (SBP and DBP), as well as heart rate (HR) were increased in rats with MetS compared to healthy rats, as expected (Figure 2A–C). More interesting was that with the addition of SAE and Sd in rats with MetS, SBP was statistically decreased compared to MetS + Sd and MetS + HFd + SAE (Figure 2A). DBP was significantly increased in MetS + HFd in comparison with MetS + HFd + SAE, MetS + Sd and MetS + Sd + SAE, while in MetS + Sd + SAE group DBP was significantly lower than in other MetS groups (Figure 2B). SAE treatment in MetS + HFd + SAE group induced significant increase of HR compared to MetS + HFd and MetS + Sd groups (Figure 2C).

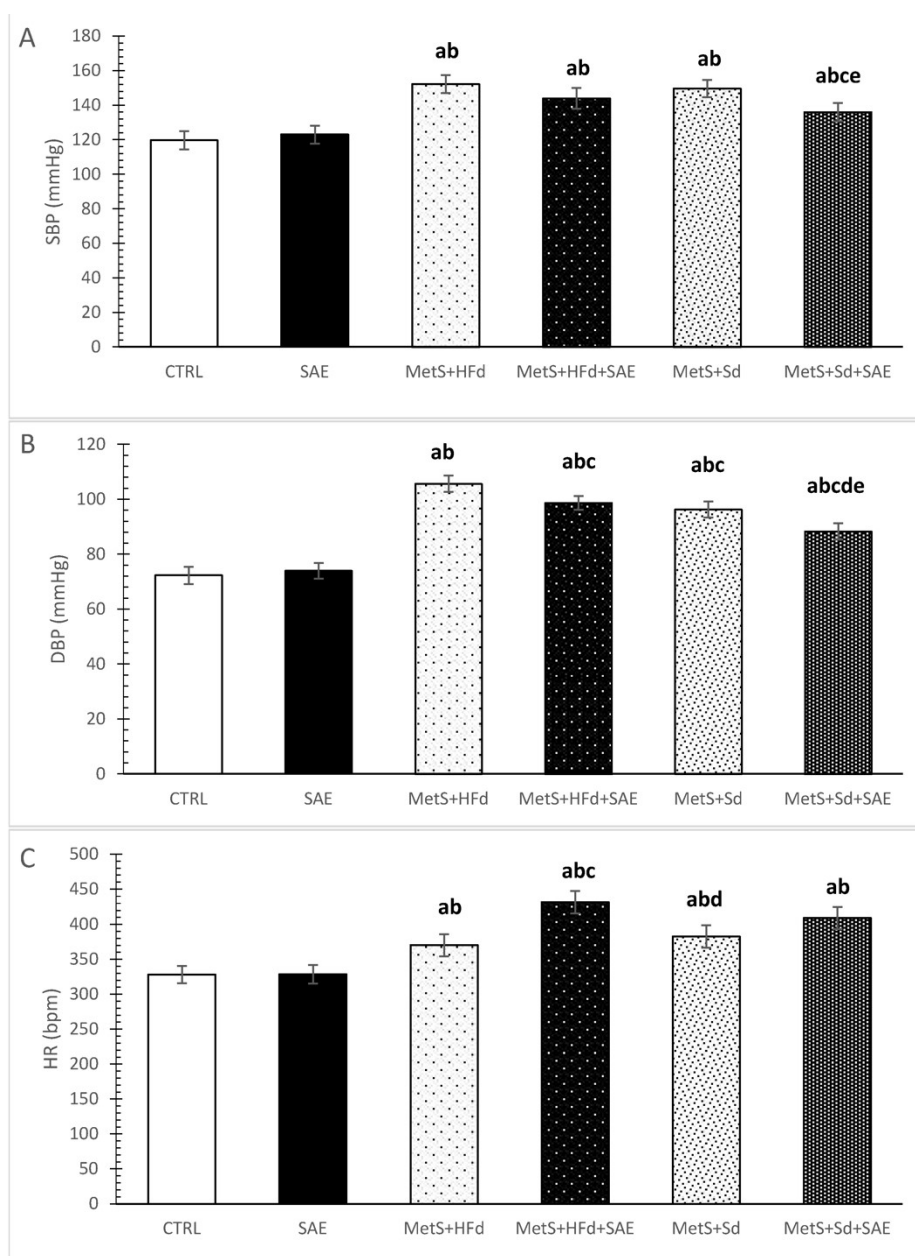


Figure 2. Changes in blood pressure and heart rate in healthy and rats with MetS on the different diet regime: (A) systolic blood pressure (SBP, mmHg); (B) diastolic blood pressure (DBP, mmHg); (C) heart rate (HR, bpm). Values are expressed as mean \pm standard deviation for 10 animals, for each group. For statistical significance were considered values $p < 0.05$. ^a Statistical significance in relation to CTRL group; ^b Statistical significance in relation to SAE group; ^c Statistical significance in relation to MetS + HFd group; ^d Statistical significance in relation to MetS + HFd + SAE group; ^e Statistical significance in relation to MetS + Sd group.

2.3. Effect of Dietary Changes in Healthy and Rats with MetS in In Vivo Cardiac Function

SAE supplementation in healthy rats significantly increased interventricular septal wall thickness at end diastole (IVSd), left ventricle posterior wall thickness at end diastole (LVPWd), interventricular septal wall thickness at end systole (IVSs), left ventricle posterior wall thickness at end systole (LVPWs), fractional shortening (FS) and reduced left ventricle internal dimension at end systole (LVIDs) and left ventricle internal dimension at end diastole (LVIDd) compared to control. On the other hand, IVSd and IVSs were significantly decreased while LVIDd was significantly increased in MetS + HFd compared

to SAE group. More importantly, FS was statistically decreased in MetS + HFd compared to CTRL and SAE, as well as in MetS + HFd + SAE and MetS + Sd compared to SAE. SAE supplementation in rats with MetS fed with Sd significantly increased LVIDd, IVSs and LVIDs compared to MetS + Sd group (Table 1).

Table 1. Effect of dietary changes in healthy and rats with MetS on in vivo cardiac function.

Milimeters (mm)	CTRL	SAE	MetS + HFd	MetS + HFd + SAE	MetS + Sd	MetS + Sd + SAE
IVSd	1.22 ± 0.2	1.89 ± 0.2 ^a	1.28 ± 0.3 ^b	1.34 ± 0.2	1.58 ± 0.2	1.59 ± 0.2
LVIDd	6.80 ± 0.4	5.73 ± 0.2 ^a	6.23 ± 0.4	6.70 ± 0.4	5.53 ± 0.3	7.93 ± 0.4 ^e
LVPWd	1.94 ± 0.4	3.45 ± 0.4 ^a	2.22 ± 0.1	1.72 ± 0.1 ^b	1.88 ± 0.2 ^b	1.93 ± 0.2 ^b
IVSs	2.48 ± 0.3	3.64 ± 0.3 ^a	2.33 ± 0.1 ^b	2.52 ± 0.2	2.45 ± 0.2 ^b	3.24 ± 0.1 ^{ace}
LVIDs	3.20 ± 0.5	2.03 ± 0.2 ^a	3.24 ± 0.2 ^b	3.16 ± 0.1	2.48 ± 0.2 ^{acd}	3.45 ± 0.2 ^{be}
LVPWs	2.98 ± 0.2	4.97 ± 0.1 ^a	3.16 ± 0.2	3.26 ± 0.2	2.76 ± 0.2 ^b	3.45 ± 0.3
FS (%)	53.2 ± 4.18	65.7 ± 5.01 ^a	49.0 ± 3.99 ^{ab}	52.2 ± 4.32 ^b	51.4 ± 4.19 ^b	56.3 ± 4.21

Values are expressed as mean ± standard deviation for 10 animals, for each group. For statistical significance were considered values $p < 0.05$. ^a Statistical significance in relation to CTRL group; ^b Statistical significance in relation to SAE group; ^c Statistical significance in relation to MetS + HFd group; ^d Statistical significance in relation to MetS + HFd + SAE group; ^e Statistical significance in relation to MetS + Sd group.

2.4. Effect of Dietary Changes in Healthy and Rats with MetS on Ex Vivo Cardiac Function

Figure 3 shows the values of ex vivo measured cardiac function parameters and coronary flow, during pressure changing protocols (PCPs) on the Langendorff apparatus. To examine the potential difference due to various dietary habits, we compared the percentage of decrease (−) or increase (+) between PCP 1 and PCP 2 in the group (Table 2).

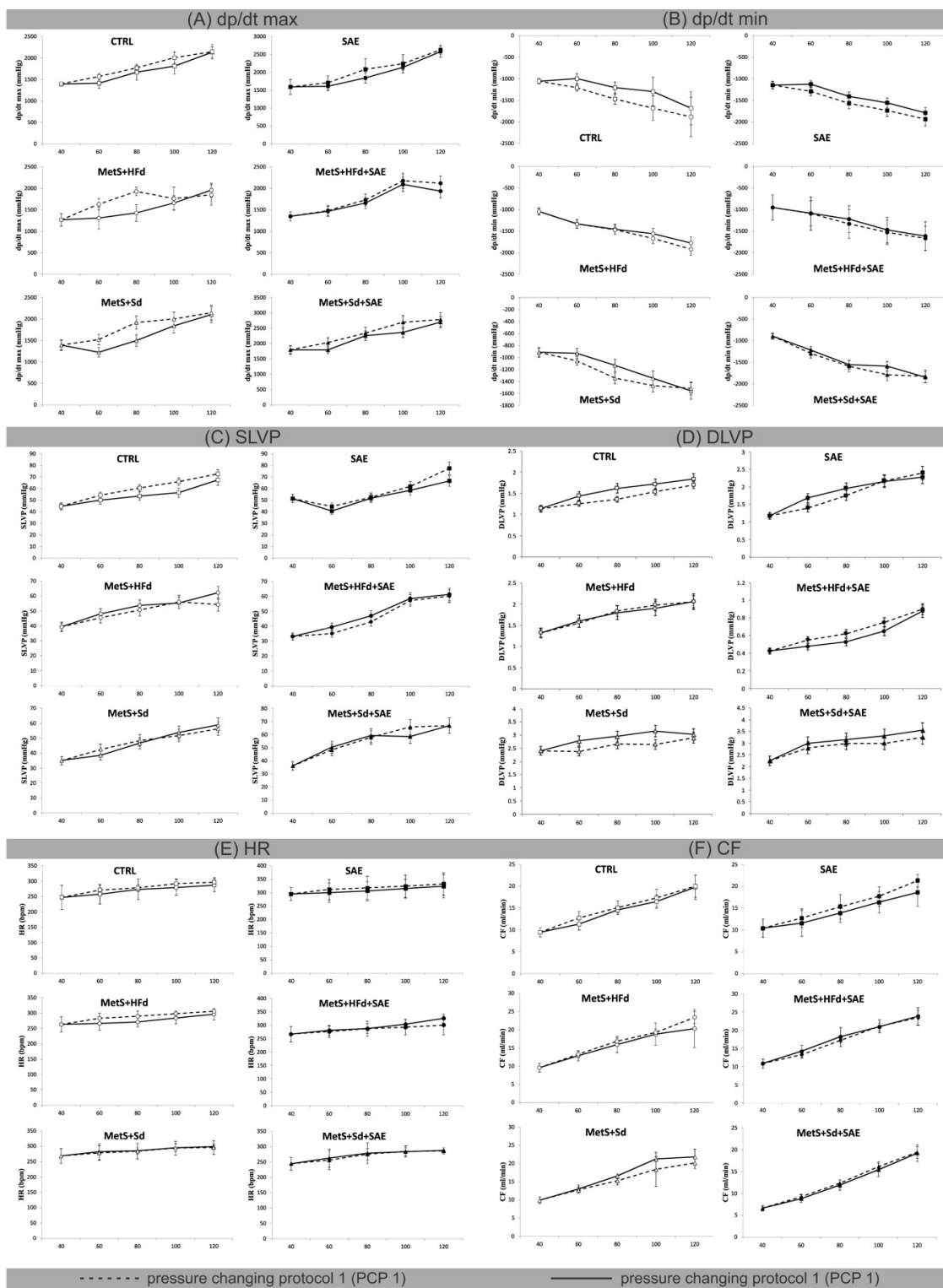


Figure 3. Effect of dietary changes in healthy and rats with MetS on cardiac function parameters, measured ex vivo: (A) values of dp/dt max within each of 6 groups during pressure changing protocol 1 (PCP 1) and pressure changing protocol 2 (PCP 2); (B) values of dp/dt min within each of 6 groups during PCP 1 and PCP 2; (C) values of SLVP within each of 6 groups during PCP 1 and PCP 2; (D) values of diastolic left ventricular pressure (DLVP) within each of 6 groups during PCP 1 and PCP 2; (E) values of HR within each of 6 groups during PCP 1 and PCP 2; (F) values of CF within each of 6 groups during PCP 1 and PCP 2. All values are expressed as mean \pm standard deviation for each group.

Table 2. Percentage differences between PCP 1 and PCP 2 during ex vivo perfusion on Langendorff apparatus.

CPP	CTRL	SAE	MetS + HFd	MetS + HFd + SAE	MetS + Sd	MetS + Sd + SAE
dp/dt max						
60	-11.05	-5.99	-24.77	-1.07	-24.23	-13.13
80	-6.11	-12.90	-35.30	-4.41	-28.11	-3.77
100	-10.88	-4.79	-6.22	-4.08	-8.80	-14.02
120	-0.63	-1.91	5.62	-9.39	-2.06	-3.24
dp/dt min						
60	-21.25	-14.81	-0.46	-0.62	-13.64	-6.36
80	-22.03	-11.53	-0.80	-9.03	-18.90	-2.32
100	-29.70	-11.43	-7.04	-3.81	-9.14	-12.42
120	-12.04	-8.14	-8.08	-3.15	2.63	1.16
SLVP						
60	-8.35	-9.49	5.37	10.80	-10.58	4.06
80	-13.11	-1.66	5.70	8.55	-4.18	2.44
100	-16.81	-5.81	-1.22	2.15	3.72	-12.46
120	-7.79	-16.29	12.60	1.99	4.12	-0.07
DLVP						
60	12.50	16.67	2.50	-15.79	14.41	6.67
80	16.05	10.20	-2.22	-19.05	9.32	4.76
100	10.47	-0.93	-4.21	-15.38	15.87	9.09
120	7.61	-5.26	0.00	-2.86	4.13	8.45
HR						
60	-5.29	-4.01	-6.26	1.59	1.39	2.51
80	-1.96	-3.85	-6.82	0.23	0.41	1.10
100	-4.58	-2.77	-5.04	3.66	0.31	-0.37
120	-3.41	-2.63	-3.21	7.85	1.02	0.61
CF						
60	-12.37	-10.07	-3.11	6.74	1.93	-4.55
80	-3.57	-10.40	-5.78	5.48	7.88	-3.36
100	-5.10	-8.33	-2.55	-0.57	13.44	-4.55
120	-1.21	-14.66	-14.96	1.51	7.59	-1.04

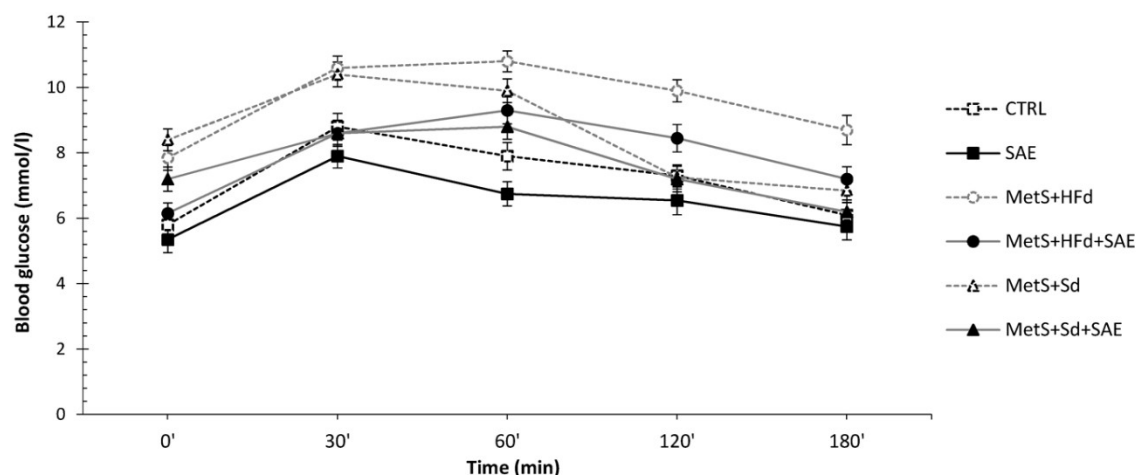
Major changes in maximum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt max) in PCP 1 versus PCP 2 were observed at coronary perfusion pressure (CPP) = 60 cm H₂O and 80 cm H₂O in MetS + HFd (-24.77; -35.3) and MetS + Sd (-24.23; -28.11) groups. In MetS groups that were fed with combination of mentioned diets and SAE, this parameter was not changed during pressure changing protocols. On the other hand, the most significant differences in minimum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt min) were observed in CTRL group at CPP = 60 cm H₂O, 80 cm H₂O and 100 cm H₂O (-21.25; -22.03; -29.7), while during the PCPs there were no significant changes in systolic left ventricular pressure (SLVP), HR, and coronary flow (CF) in any of the examined groups (Figure 3, Table 2).

2.5. Effect of Dietary Changes in Healthy and Rats with MetS on Glucose and Insulin Levels during Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)

2.5.1. Effects on Glucose Levels during OGTT

The average blood glucose values during an OGTT were present in Figure 4. Fasting blood glucose concentrations were significantly increased in all MetS groups compared to healthy groups, except in MetS + HFd + SAE where glucose level was the lowest among the MetS groups. In addition,

glucose level was lower in MetS + Sd + SAE than in MetS + Sd. The similar trend was maintained during 30, 60 and 120 min, while in 180' the highest level was in MetS + HFd.



	0'	30'	60'	120'	180'
CTRL	5.81±0.34	8.82±0.41	7.93±0.42	7.29±0.34	6.08±0.39
SAE	5.35±0.40	7.91±0.36	6.75±0.37 ^a	6.55±0.44	5.75±0.41
MetS+HFd	7.85±0.38 ^{ab}	10.61±0.36 ^{ab}	10.77±0.32 ^{ab}	9.91±0.34 ^{ab}	8.71±0.45 ^{ab}
MetS+HFd+SAE	6.15±0.32 ^c	8.59±0.40 ^c	9.32±0.41 ^{abc}	8.45±0.42 ^{abc}	7.23±0.38 ^c
MetS+Sd	8.42±0.33 ^{abd}	10.43±0.38 ^{abd}	9.90±0.36 ^{ab}	7.25±0.35 ^{cd}	6.85±0.37 ^c
MetS+Sd+SAE	7.19±0.37 ^{abde}	8.60±0.39 ^{ce}	8.78±0.38 ^{bce}	7.18±0.39 ^{cd}	6.22±0.36 ^c

Figure 4. Effect of dietary changes in healthy and rats with MetS on glucose levels during OGTT. Values are expressed as mean ± standard deviation for 10 animals, for each group. For statistical significance were considered values $p < 0.05$. ^a Statistical significance in relation to CTRL group; ^b Statistical significance in relation to SAE group; ^c Statistical significance in relation to MetS + HFd group; ^d Statistical significance in relation to MetS + HFd + SAE group; ^e Statistical significance in relation to MetS + Sd group.

2.5.2. Effects on Insulin Levels during OGTT

Table 3 shows the insulin concentration measured during the OGTT. The SAE group had the lowest, while MetS + Sd group had the highest insulin concentration measured fasting (0'), as well as 3 h after glucose administration (180'). In MetS groups fasting insulin concentration was significantly higher than in CTRL group. Moreover, insulin concentration was significantly lower in MetS + Sd + SAE than in MetS + Sd group, in both measured moments of interest.

Table 3. Effect of dietary changes in healthy and rats with MetS on insulin levels during OGTT.

Groups	0'	180'
CTRL	122.9 ± 6.76	123.7 ± 6.61
SAE	106.9 ± 6.04 ^a	113.8 ± 6.51
MetS + HFd	185.1 ± 7.78 ^{ab}	129.3 ± 6.38
MetS + HFd + SAE	180.3 ± 8.02 ^{ab}	131.1 ± 7.13 ^b
MetS + Sd	205.8 ± 9.87 ^{abcd}	145.2 ± 7.65 ^b
MetS + Sd + SAE	182.1 ± 9.32 ^{abcde}	127.3 ± 6.72 ^e

Values are expressed as mean ± standard deviation for 10 animals, for each group. For statistical significance were considered values $p < 0.05$. ^a Statistical significance in relation to CTRL group; ^b Statistical significance in relation to SAE group; ^c Statistical significance in relation to MetS + HFd group; ^d Statistical significance in relation to MetS + HFd + SAE group; ^e Statistical significance in relation to MetS + Sd group.

2.6. Effect of Dietary Changes in Healthy and Rats with MetS on Serum Iron Levels

SAE supplementation significantly increased iron levels in serum of healthy and rats with MetS fed with HFd or Sd than in non-treated groups. CTRL group had the lowest values of iron in relation to all other examined groups (Figure 5).

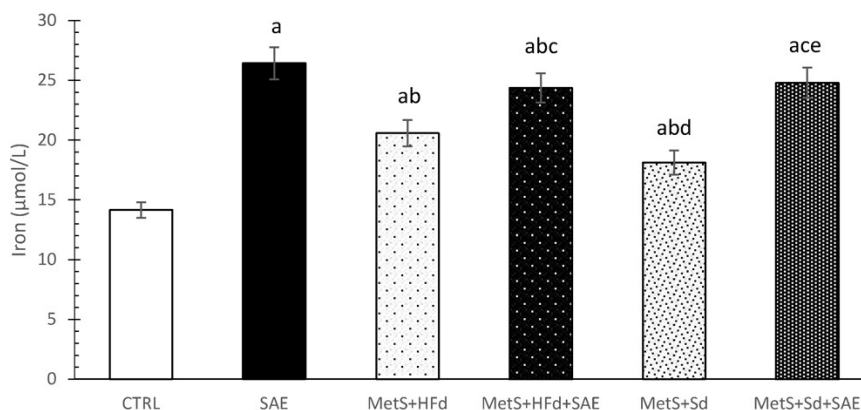


Figure 5. Effect of dietary changes in healthy and rats with MetS on serum iron levels. Values are expressed as mean \pm standard deviation for 10 animals, for each group. For statistical significance were considered values $p < 0.05$. ^a Statistical significance in relation to CTRL group; ^b Statistical significance in relation to SAE group; ^c Statistical significance in relation to MetS + HFd group; ^d Statistical significance in relation to MetS + HFd + SAE group; ^e Statistical significance in relation to MetS + Sd group.

2.7. Evaluation of Systemic Redox State

Level of nitrites (NO_2^-) was significantly decreased in SAE group compared to CTRL group, and significantly increased in MetS groups compare to CTRL and SAE groups. The highest values of NO_2^- were observed in MetS + HFd group, while with the addition of SAE in HFd or Sd these values drop dramatically. Interestingly, MetS + Sd had significantly higher NO_2^- levels compare to MetS + HFd + SAE group (Figure 6A).

The highest level of superoxide anion radical (O_2^-) was noticed in MetS groups untreated with SAE extract. Moreover, SAE supplementation in healthy and rats with MetS significantly reduced O_2^- levels (Figure 6B).

Hydrogen peroxide (H_2O_2) levels were significantly increased in all examined group (except in MetS + HFd + SAE) compared to CTRL (Figure 6C).

Superoxide dismutase (SOD) activity was significantly reduced in rats with MetS, compare to healthy rats. The transition to a standard food with or without SAE supplementation led to a significant increase of SOD activity (Figure 6D).

Catalase (CAT) activity was significantly higher in SAE group compared to other examined groups, except MetS + Sd + SAE. On the other hand, in CTRL group this parameter was significantly increased compared to MetS + HFd and MetS + HFd + SAE and significantly decreased compared to MetS + Sd + SAE. With the addition of SAE in diet of rats with MetS, we observed significant increasement of CAT activity in comparison to MetS rats untreated with SAE (Figure 6E).

Reduced glutathione (GSH) levels were significantly increased in SAE and MetS + HFd + SAE compared to other observed groups (Figure 6F).

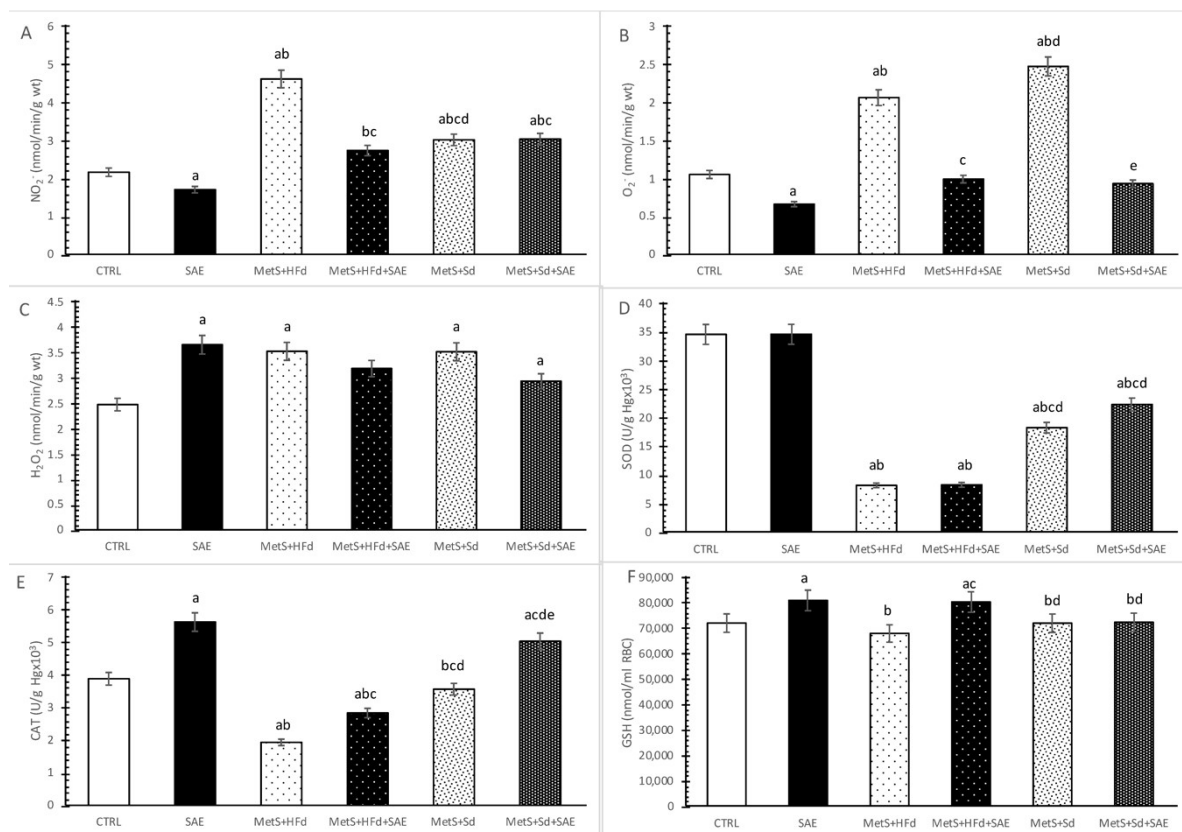


Figure 6. Effect of dietary changes in healthy and rats with MetS on systemic oxidative stress parameters: (A) NO₂⁻; (B) O₂⁻; (C) H₂O₂; (D) SOD; (E) CAT; (F) GSH. Values are expressed as mean ± standard deviation for 10 animals, for each group. For statistical significance were considered values $p < 0.05$. ^a Statistical significance in relation to CTRL group; ^b Statistical significance in relation to SAE group; ^c Statistical significance in relation to MetS + HFd group; ^d Statistical significance in relation to MetS + HFd + SAE group; ^e Statistical significance in relation to MetS + Sd group.

2.8. Histological Analysis of Liver Tissue

As shown in Figure 7, in CTRL, SAE, MetS + HFd + SAE, MetS + Sd and MetS + Sd + SAE liver tissue is a common feature. Liver lobulus is fully preserved. Hepatocytes are correctly arranged in the liver plates, without change. Sinusoidal capillaries are common characteristics, also without change. Fibrosis as well as inflammation have not been detected. On the other hand, in MetS + HFd there was a microvesicular steatosis (fatty change).

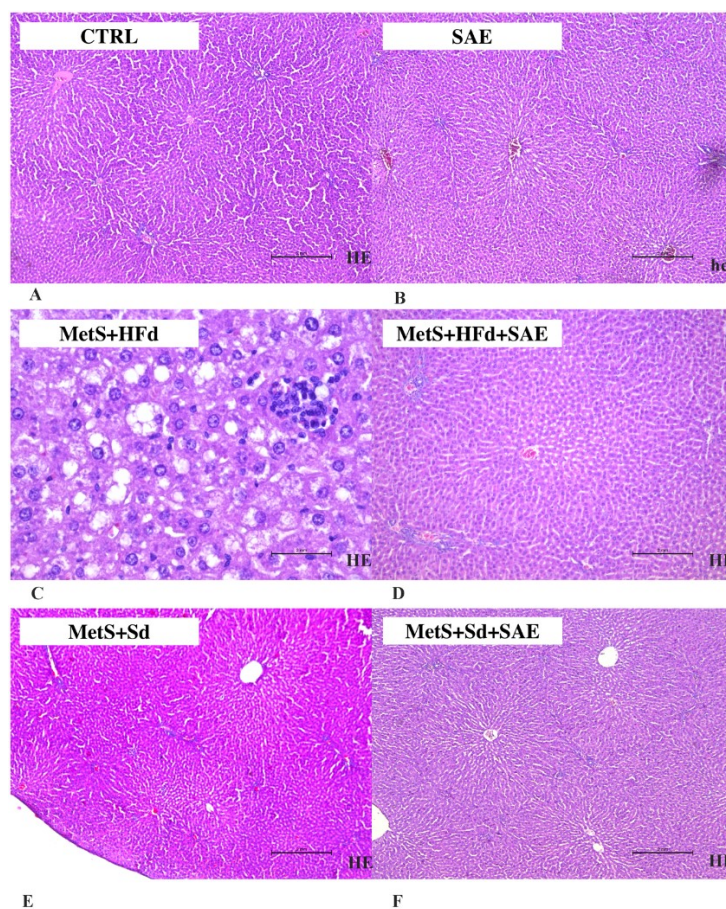


Figure 7. Representative hematoxylin and eosin (H&E) staining photos of liver tissue (for sub-figures A, B, D, E and F original magnification is 100 \times and scale bar is 2 mm, while in sub-figure C magnification is 400 \times and scale bar is 2 mm) in: (A) CTRL, (B) SAE, (C) MetS + HFd, (D) MetS + HFd + SAE, (E) MetS + Sd and (F) MetS + Sd + SAE groups.

3. Discussion

Several epidemiologic studies have implicated visceral fat as a major risk factor for insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease, stroke, metabolic syndrome and death [15]. Taking into consideration increasing incidence of MetS and its related complications we wanted to estimate the effectiveness of HFd cessation and introduction of polyphenol-rich extract (SAE) on weight gain, cardiac function, glucose tolerance, serum insulin and iron levels, as well as systemic redox state and morphological characteristic of the liver.

Our results clearly show that the highest increase in BMI was observed in MetS + HFd, which was expected as many data suggest weight gain in rats exposed to HFd for different periods [16–18]. Introduction of Aronia extract in MetS + HFd group suppressed the body weight gain and decreased BMI; however changing dietary habits from high-fat to standard food had better anti-obesity effect when compared to MetS + HFd group. Moreover, the most prominent reduction in body weight and BMI was achieved by standard diet associated with consumption of SAE extract.

Taking into account, that cardiovascular complications in MetS are very common, we wanted to examine cardiovascular effects such as their ability to affect blood pressure as well as in vivo and ex vivo cardiac function, after dietary changes. Transition from a high caloric to normal fat diet-induced a decline in diastolic blood pressure. Nevertheless, the highest hypotensive effect in rats with MetS, evidenced with a drop in both systolic and diastolic pressure was reached when this regimen was combined with Aronia extract. Extract of Aronia was able to induce a drop in diastolic pressure even in rats who were fed with high-fat food continuously. On the contrary, in healthy rats SAE did not affect

blood pressure. This is in line with the data that both Aronia berries and Aronia polyphenol extracts reduce quite effectively both SBP and DBP in spontaneously hypertensive rats [19]. The proposed mechanism might be through inhibition of the kidney renin-angiotensin system [20]. Others also found that *A. melanocarpa* extract decreases blood pressure in experimental model of hypertension [21,22]. Growing evidence suggests that the flavonoid-rich foods intake is related with decline in SBP and DBP, so we assume that the blood pressure-lowering effect of SAE is attributed to polyphenols [22,23]. Hypotensive effect was confirmed in patients with metabolic syndrome as well [24].

During blood pressure measuring, HR was also registered. Increase in HR in groups with MetS compared to healthy rats may be explained by an increase in sympathetic nervous system activity induced by HFd [25]. In that sense obtained decrease in HR after the transition to standard diet in MetS + Sd group appears to be logical. However, there was no change in HR when SAE was added to a dietary regimen in rats with MetS who were on a Sd, while we noticed an increase in rats on HFd. Moreover, Aronia extract did not alter heart rate in healthy rats, reflecting preserved myocardial function and contractility. Similar results were found in previous investigations regarding the effects of polyphenol-containing extracts on HR [26].

An echocardiographic examination illustrated that the highest impact of Aronia extract on in vivo myocardial functions was found in healthy rats, where we observed significant increase in IVSd, LVPWd, IVSs, LVPWs, FS and decrease in LVIDs compared to CTRL. On the other hand, addition of Aronia extract in rats with MetS during both HFd and Sd did not significantly affect cardiac function compared to MetS + HFd group. The greatest benefit of SAE involves improvement in systolic function, manifested as a significant increase in fractional shortening (FS) in healthy rats relative to almost all other groups. Similar values in healthy and MetS + Sd + SAE and MetS + HFd + SAE group suggest that Aronia extract was capable of improving fractional shortening during both high-calorie and standard dietary conditions in the presence of metabolic syndrome. In accordance with our findings, it has been previously reported that polyphenolics and plants rich in polyphenolics had effect in lessening the pathological alterations in FS promoted by MetS [27–29]. A decrease in systemic blood pressure after Aronia extract treatment may increase fractional shortenings, resulting in increased myocardial contractility [30].

Similar results were obtained during ex vivo, retrograde perfusion on Langendorff. Cardiac contractility, estimated by maximum and minimum rate of left ventricle pressure development, (dp/dt mSAE and dp/dt min), was preserved in MetS groups treated with SAE in combination with HFd or Sd, especially in normoxic conditions (CPP = 60 and 80 cm H₂O). Furthermore, addition of Aronia extract in healthy rats significantly improved heart relaxation (for the CPP values from 60–100 cm H₂O) compared to CTRL group. These results confirm the assumption that Aronia extract triggers cardioprotection, most probably because of its antioxidant, antiinflammatory, vasorelaxant and antithrombotic effects [31].

To estimate if SAE extract might improve glucose tolerance, which is strongly related to insulin resistance and insulin secretion, we performed oral glucose tolerance (OGT) test. Our results highlighted that SAE extract did not affect fasting glucose level in healthy rats, while it exerted hypoglycemic effect in animals with MetS on both HFd and Sd. The similar trend was noticed during 30, 60, 120 and 180 min, except the fact that in 120 and 180 min there was no difference in glucose level between MetS + Sd and MetS + Sd + SAE. Regarding the concentration of insulin, it was the lower in group of healthy rats receiving SAE group compared to healthy untreated group in 0'. Moreover, higher insulin concentration in MetS + HFd group wasn't diminished after adding SAE extract. On the other hand, this extract potentiates effect of standard food on lowering insulin, as evidenced by a decrease in insulin concentration in MetS + Sd + SAE compared to MetS + Sd group in 0' and 180'. In line with our observation, better glucose tolerance achieved by treatment with SAE extract was confirmed by several papers. Other authors showed the beneficial effects of *A. melanocarpa* extract on attenuating insulin resistance and improving insulin sensitivity in HFd-induced obese mice [32]. Furthermore, glucose lowering potential was confirmed in patients with DM as well [33]. Proposed mechanism

though which Aronia exerts hypoglycemic effect involve inhibition of dipeptidyl peptidase IV and α -glucosidase activities [34].

Since iron is an essential trace element that has been involved in maintenance of regular homeostasis, understanding the influence of SAE alone or in combination with different dietary regiments its serum levels would be of a great importance [35]. We found the highest level of iron in group of healthy animals receiving SAE, while increased level of iron was found in all groups with MetS compared to healthy rats. Previous study indicates that increased iron stores have been associated with MetS [36]. Changing dietary habits from high-fat to standard food did not result in change of iron, while addition of SAE in this group induced significant rise when compared to MetS group. This is in agreement with other research which showed that supplementation with Aronia juice increased serum level of iron [34]. In fact, certain flavonoids have potential to chelate iron and decrease iron absorption through mechanism independent of the hepcidin, a hormone included in iron homeostasis [35,37]. On the other hand, other flavonoids may decrease the activity of hepcidin resulting in increased iron uptake and serum iron levels, which may be an explanation for the SAE extract-induced increase in our research [35,38].

Increased oxidative stress has been linked with pathogenesis of MetS, thus indicating the need for consuming natural antioxidants from food sources in treatment of MetS-related diseases [39]. In that sense, in order to test if 4-week SAE supplementation alters systemic redox homeostasis we determined levels of pro-oxidants, as well as capacity of antioxidant defense system in blood samples. Our results demonstrated that SAE consumption led to a drop in NO_2^- and O_2^- and rise in CAT and GSH in healthy rats. Increase in CAT activity which catalyzes the decomposition of hydrogen peroxide to water and oxygen support unchanged values of H_2O_2 . As it was expected increased generation of pro-oxidants and decreased activity of antioxidant enzymes SOD and CAT were noticed in MetS + HFd group compared to control. Introduction of three different dietary strategies such as consumption of SAE or transition to standard diet or its combination induced decline only in NO_2^- compared to MetS + HFd. Regarding the antioxidant status, the highest impact of increase in activities of antioxidant enzymes was noticed when standard diet was combined with SAE treatment. Striking evidence indicate that polyphenols might increase antioxidant capacity via rise in activities of SOD, CAT and GSH-peroxidase and act as direct free radical scavengers as well [40,41]. Chelation of iron ions which catalyze several free radical-generating reactions is one of the mechanisms underlying antioxidant effects of polyphenols. Nevertheless, rise in iron level induced by SAE in our research lead us to a hypothesis that enhanced activity of antioxidant enzymes and direct scavenging rather than iron chelation were responsible for antioxidant potential of applied extract. However, poor bioavailability of polyphenols through food intake suggests necessity for polyphenol-enriched foods or supplements treatment such as our extract [42].

MetS in combination with high-fat altered structure of liver tissue manifested as microvesicular hepatic steatosis. Nevertheless, transition from high-fat to standard food and combined approach which involved SAE extract consumption associated with both dietary protocols significantly normalized liver changes in MetS groups. Obtained positive effects in those groups are evidenced by the absence of fibrosis and inflammation. Ability of anthocyanins in Aronia to diminish liver steatosis induced by MetS was documented before, so we may hypothesize that these bioactive compounds are responsible for the beneficial effects in our study [43,44]. Some results show beneficial effects of *A. melanocarpa* against hepatic lipid accumulation through the inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 (PPAR γ 2) expression along with improvements in body weight, liver functions, lipid profiles and antioxidant capacity suggesting the potential therapeutic efficacy of *A. melanocarpa* on nonalcoholic fatty liver disease [45]. Recently, it was showed clearly an increase in acetylcholinesterase (AChE) and butyryl cholinesterase activity and disruption of lipid metabolism in patients with MetS. After supplementation of MetS patients with *A. melanocarpa* extract, a decrease in AChE activity and oxidative stress was noted [46].

4. Material and Methods

4.1. Ethical Approval

This research was carried out in the laboratory for cardiovascular physiology of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. The study protocol was approved (number: 119-01-5/14/2017-09, date: 30 June 2017) by the Ethical Committee for the welfare of experimental animals of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. All experiments were performed according to EU Directive for welfare of laboratory animals (86/609/EEC) and principles of Good Laboratory Practice.

4.2. Animals

Sixty *Wistar albino* rats (males, six weeks old, body-weight 200 ± 30 g, on beginning of experiments) were included in the study. They were housed at temperature of 22 ± 2 °C, with 12 h of automatic illumination daily. The rats were randomly divided into two groups: healthy animals ($n = 20$), fed with Sd which contains 9% fat, 20% protein, 53% starch, 5% fiber and animals with MetS ($n = 40$), fed with HFd which contains 25% fat, 15% protein, 51% starch and 5% fiber during 4 weeks. After one month on their respective diets, rats from MetS group after 6–8 h of starvation received one dose of streptozotocin intraperitoneally. Streptozotocin was prepared *ex tempore* by dissolving in citrate buffer and, depending on the body weight, it was administered in a dose of 25 mg/kg body weight [47]. Three days (72 h) after streptozotocin treatment and 12 h after starvation fasting glucose and insulin level as well as blood pressure, were measured. Animals with systolic blood pressure greater than 140 mmHg, diastolic blood pressure more than 85 mmHg, fasting glucose level above 7.0 mmol/L and fasting insulin level over 150 μ LU/mL were included in the study and were used in the study as rats with MetS.

Healthy and rats with MetS were divided into 6 groups as follows: CTRL—healthy rats, fed with a Sd for 4 weeks; SAE—healthy rats, fed with a Sd and treated with highly concentrated Aronia extract standardized with polyphenol content—SAE in the dose 0.45 mL/kg/day per os for 4 weeks; MetS + HFd—rats with MetS, fed with HFd for 4 weeks; MetS + HFd + SAE—rats with MetS, fed with HFd and treated with SAE (0.45 mL/kg/day, per os) for 4 weeks; MetS + Sd—rats with MetS, fed with a Sd for 4 weeks; MetS + Sd + SAE—rats with MetS, fed with a Sd for 4 weeks and treated with SAE (0.45 mL/kg/day, per os) for 4 weeks.

Standardized Aronia extract (SAE) is official product of pharmaceutical company Pharmanova (Belgrade, Serbia); however procedure of extraction was done by EU-Chem company (Belgrade, Serbia).

4.3. Measurement of BMI

At the end of the study protocol, body weight and body length were measured. Body length represents nose-anus length. Those parameters were used to calculate the BMI of the rats as follows:

$$\text{Body mass index (BMI)} = \text{body weight (g)} / \text{length}^2 (\text{cm}^2) \quad (1)$$

4.4. Evaluation of Blood Pressure and Heart Rate

A day before sacrificing animals, the blood pressure and heart rate were measured by a tail-cuff noninvasive method BP system (Rat Tail Cuff Method Blood Pressure Systems (MRBP-R), IITC Life Science Inc., Los Angeles, CA, USA) [48].

4.5. Evaluation of *in vivo* Cardiac Function

After accomplishing 4-week treatment, transthoracic echocardiograms were performed. Mixture of ketamine—50 mg/kg and xylazine—10 mg/kg intraperitoneally was used as anesthesia. Echocardiograms were performed using a Hewlett-Packard Sonos 5500 (Andover, MA, USA) sector scanner equipped with a 15.0-MHz phased-array transducer as previously described [49]. From the

parasternal long-axis view in 2-dimensional mode, and M-mode cursor was positioned perpendicularly to the interventricular septum and posterior wall of the left ventricle (LV) at the level of the papillary muscles and M-mode images were obtained. Interventricular septal wall thickness at end diastole (IVSd), LV internal dimension at end diastole (LVIDd), LV posterior wall thickness at end diastole (LVPWd), interventricular septal wall thickness at end systole (IVSs), LV internal diameter at end systole (LVIDs) and LV posterior wall thickness at end systole (LVPWs) were recorded with M-mode. Fractional shortening percentage (FS%) was calculated from the M-mode LV diameters using the equation: $[(LVEDd - LVESd) / LVEDd] \times 100\%$. Where LVEDd is left ventricular end diastolic diameter and LVESd is left ventricular end systolic diameter.

4.6. Evaluation of ex vivo Cardiac Function

Following 4-week protocol, after short-term narcosis induced by intraperitoneal application of ketamine (10 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg) and premedication with heparin as an anticoagulant, animals were sacrificed by decapitation. Then the chest was opened via midline thoracotomy, hearts were immediately removed and immersed in cold saline and aortas were cannulated and retrogradely perfused according to *Langendorff* technique, under gradually increasing coronary perfusion pressure (CPP) from 40 to 120 cm H₂O [50]. The composition of Krebs-Henseleit buffer used for retrograde perfusion was as follows (mmol/L): NaCl 118 mmol/L, KCl 4.7 mmol/L, MgSO₄ × 7H₂O 1.7 mmol/L, NaHCO₃ 25 mmol/L, KH₂PO₄ 1.2 mmol/L, CaCl₂ × 2H₂O 2.5 mmol/L, glucose 11 mmol/L, pyruvate 2 mmol/L, equilibrated with 95% O₂ plus 5% CO₂ and warmed to 37 °C (pH 7.4).

After placing the sensor (transducer BS473-0184, Experimetria Ltd., Budapest, Hungary) in the left ventricle, the following parameters of myocardial function have been measured: maximum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt max), minimum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt min), systolic left ventricular pressure (SLVP), diastolic left ventricular pressure (DLVP), heart rate (HR). Coronary flow (CF) was measured flowmetrically. Following the establishment of heart perfusion, the hearts were stabilized within 30 min with a basal coronary perfusion pressure of 70 cm H₂O. To examine the heart function, after stabilization period, the perfusion pressure was gradually decreased to 60, and then increased to 80, 100 and 120 cm H₂O and reduced to 40 cm H₂O (pressure changing protocol 1, PCP 1) and again gradually increased from 40 to 120 cm H₂O (pressure changing protocol 1, PCP 1).

4.7. Oral Glucose Tolerance Test

Oral glucose tolerance test (OGTT) was performed at the end of 4-week protocol and a day before sacrificing animals. After overnight (12–14h) fasted animals, the blood sample was taken by tail bleeding to determine the fasting blood glucose and insulin level (0 min) and then glucose was administered orally in a dose of 2 g/kg body weight and blood samples were taken at 30, 60, 120 and 180 min after glucose loading. Glucose levels were determined in 0, 30, 60, 120 and 180 min, using glucometer (Accu-Chek, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) with its corresponding strips. At 0 and 180 min, insulin levels were assessed in plasma samples by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method as previously described [51].

4.8. Evaluation of Serum Iron Levels and Systemic Redox State

In the moment of sacrificing animals blood samples were collected from jugular vein in order to estimate serum iron levels and systemic oxidative stress response. The levels of serum iron (SI) was determined on a biochemical analyzer (Dimension, Dade Behring, Milton Keynes, UK, USA) and the results were expressed in µg/L.

In plasma the following pro-oxidants were determined: the levels of nitrites (NO₂⁻), superoxide anion radical (O₂⁻) and hydrogen peroxide (H₂O₂). Parameters of antioxidative defence system, such as activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) and level of reduced glutathione (GSH) were determined in erythrocytes samples.

NO_2^- was determined as an index of NO production with Griess reagent. The method for detection nitrate in plasma is based on the Green and coworkers proposal and measured spectrophotometrically at a wavelength of 543 nm [52]. The concentration of O_2^- in plasma was measured at 530 nm, after the reaction of nitro blue tetrazolium in TRIS buffer [53]. The measurement of H_2O_2 is based on the oxidation of phenol red by hydrogen peroxide, in a reaction catalyzed by horseradish peroxidase (HRPO) as previously described by Pick and colleagues. The level of H_2O_2 was measured at 610 nm [54].

For determination of antioxidant parameters, isolated erythrocytes were prepared according to McCord and Fridovich [54]. CAT activity were determined at 360 nm toward to Beutler [55]. Lysates were diluted with distilled water (1:7 *v/v*) and treated with chloroform-ethanol (0.6:1 *v/v*) to remove hemoglobin [51]. SOD activity was determined by the epinephrine method of Misra and Fridovich. Detection was performed at 470 nm [56]. Level of GSH is based on GSH oxidation via 5,5-dithiobis-6,2-nitrobenzoic acid as previously described by Beutler. Measuring was performed at 420 nm [57].

4.9. Histological Analysis of Liver Tissue

Liver tissue samples were fixed in 4% buffered paraformaldehyde solution and immersed in paraffin. Afterwards 4-micrometre-thick sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) [43].

4.10. Statistical Analysis

IBM SPSS Statistics 20.0 Desktop for Windows was used for statistical analysis. Distribution of data was checked by Shapiro–Wilk test. Where distribution between groups was normal, statistical comparisons were performed using the one-way analysis of variance (ANOVA) tests with a Tukey's post hoc test for multiple comparisons. Kruskal–Wallis was used for comparison between groups where the distribution of data was different than normal. Values of $p < 0.05$ were considered to be statistically significant.

5. Conclusions

Our results highlighted cardioprotective potential of SAE in treatment of MetS, involving lowering blood pressure and favorable effects on heart function. Furthermore, SAE effectively suppressed the body weight gain, improved glucose tolerance and attenuated liver steatosis and oxidative stress present in MetS, thus indicating its promising role in management of MetS-related diseases. Moreover, increase in iron concentration indicates its health benefits in iron deficiency. Obtained beneficial effects would be more prominent in c combination with changing dietary habits. This research may be a starting point for further experimental and clinical investigations which would fully evaluate the effects of SAE alone or in combination with different dietary protocols in various models of chronic diseases.

Author Contributions: Conceptualization, V.J. and M.M.; methodology, I.M.; validation, N.J. and T.N.T.; formal analysis, J.J. and J.B.; investigation, I.S., M.L.B. and J.J.; writing—original draft preparation, J.B. and J.J.; writing—review and editing, V.Z.; visualization, P.M. and S.B.; supervision, V.J. and V.V.; project administration, V.Z. and I.S.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Tabatabaei-Malazy, O.; Larijani, B.; Abdollahi, M. Targeting metabolic disorders by natural products. *J. Diabetes Metab. Disord.* **2015**, *14*, 57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Moore, J.X.; Chaudhary, N.; Akinyemiju, T. Metabolic Syndrome Prevalence by Race/Ethnicity and Sex in the United States, National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–2012. *Prev. Chronic Dis.* **2017**, *14*, E24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Bernabé, J.; Mulero, J.; Marhuenda, J.; Cerdá, B.; Avilés, F.; Abellán, J.; Zafrilla, P. Changes in Antioxidant Enzymes in Metabolic Syndrome Patients after Consumption a Citrus-Based Juice Enriched with Aronia Melanocarpa. *J. Nutr. Disorders Ther.* **2015**, *5*, 4.
4. Nammi, S.; Sreemantula, S.; Roufogalis, B.D. Protective effects of ethanolic extract of Zingiber officinale rhizome on the development of metabolic syndrome in high-fat diet-fed rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2009**, *104*, 366–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Ranasinghe, P.; Mathangasinghe, Y.; Jayawardena, R.; Hills, A.P.; Misra, A. Prevalence and trends of metabolic syndrome among adults in the asia-pacific region: A systematic review. *BMC Public Health* **2017**, *17*, 101. [[CrossRef](#)]
6. De la Iglesia, R.; Loria-Kohen, V.; Zulet, M.A.; Martinez, J.A.; Reglero, G.; Ramirez de Molina, A. Dietary Strategies Implicated in the Prevention and Treatment of Metabolic Syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1877. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Daskalova, E.; Delchev, S.; Peeva, Y.; Vladimirova-Kitova, L.; Kratchanova, M.; Kratchanov, C.; Denev, P. Antiatherogenic and Cardioprotective Effects of Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Juice in Aging Rats. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* **2015**, 2015. [[CrossRef](#)]
8. Kokotkiewicz, A.; Jaremicz, Z.; Luczkiewicz, M. Aronia plants: A review of traditional use, biological activities, and perspectives for modern medicine. *J. Med. Food* **2010**, *13*, 255–269. [[CrossRef](#)]
9. Ochmian, I.; Grajkowski, J.; Smolik, M. Comparison of some morphological features, quality and chemical content of four cultivars of chokeberry fruits (*Aronia melanocarpa*). *Not. Bot. Horti. Agrobot. Cluj Napoca* **2012**, *40*, 253–260. [[CrossRef](#)]
10. Tolić, M.T.; Landeka Jurčević, I.; Panjkota Krbavčić, I.; Marković, K.; Vahčić, N. Phenolic Content, Antioxidant Capacity and Quality of Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Products. *Food Technol. Biotechnol.* **2015**, *53*, 171–179. [[CrossRef](#)]
11. Cebova, M.; Klimentova, J.; Janega, P.; Pechanova, O. Effect of Bioactive Compound of *Aronia melanocarpa* on Cardiovascular System in Experimental Hypertension. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 2017. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Jurikova, T.; Mlcek, J.; Skrovankova, S.; Sumczynski, D.; Sochor, J.; Hlavacova, I.; Snopek, L.; Orsavova, J. Fruits of Black Chokeberry *Aronia melanocarpa* in the Prevention of Chronic Diseases. *Molecules* **2017**, *22*, 944. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Lupascu, N.; Cadar, E.; Cherim, M.; Erimia, C.L.; Sîrbu, R. Research Concerning the Efficiency of Aronia Melanocarpa for Pharmaceutical Purpose. *Eur. J. Interdiscip. Stud.* **2016**, *4*, 115–121. [[CrossRef](#)]
14. Borowska, S.; Brzóska, M.M. Chokeberries (*Aronia melanocarpa*) and Their Products as a Possible Means for the Prevention and Treatment of Noncommunicable Diseases and Unfavorable Health Effects Due to Exposure to Xenobiotics. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2016**, *15*, 982–1017. [[CrossRef](#)]
15. Finelli, C.; Sommella, L.; Gioia, S.; La Sala, N.; Tarantino, G. Should visceral fat be reduced to increase longevity? *Ageing Res. Rev.* **2013**, *12*, 996–1004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Yin, Y.; Yu, Z.; Xia, M.; Luo, X.; Lu, X.; Ling, W. Vitamin D attenuates high fat diet-induced hepatic steatosis in rats by modulating lipid metabolism. *Eur. J. Clin. Investig.* **2012**, *42*, 1189–1196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Wang, Y.; Wang, P.Y.; Qin, L.Q.; Davaasambu, G.; Kaneko, T.; Xu, J.; Murata, S.; Katoh, R.; Sato, A. The development of diabetes mellitus in Wistar rats kept on a high-fat/low-carbohydrate diet for long periods. *Endocrine* **2003**, *22*, 85–92. [[CrossRef](#)]
18. Auberval, N.; Dal, S.; Bietiger, W.; Pinget, M.; Jeandidier, N.; Maillard-Pedracini, E.; Schini-Kerth, V.; Sigrist, S. Metabolic and oxidative stress markers in Wistar rats after 2 months on a high-fat diet. *Diabetol. Metab. Syndr.* **2014**, *6*, 130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Hellström, J.K.; Shikov, A.N.; Makarova, M.N.; Pihlanto, A.M.; Pozharitskaya, O.N.; Ryhänen, E.L.; Kivijärvi, P.; Makarov, V.G.; Mattila, P.H. Blood pressure-lowering properties of chokeberry (*Aronia mitchurinii* var. Viking). *J. Funct. Foods* **2010**, *2*, 163–169. [[CrossRef](#)]
20. Yamane, T.; Kozuka, M.; Imai, M.; Yamamoto, Y.; Ohkubo, I.; Sakamoto, T.; Nakagaki, T.; Nakano, Y. Reduction of blood pressure by aronia berries through inhibition of angiotensin-converting enzyme activity in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Funct. Food Health Dis.* **2017**, *7*, 280–290.
21. Ciocoiu, M.; Badescu, M.; Badulescu, O.; Tutunaru, D.; Badescu, L. Polyphenolic extract association with renin inhibitors in experimental arterial hypertension. *J. Biomed. Sci. Eng.* **2013**, *6*, 493–497. [[CrossRef](#)]

22. Naruszewicz, M.; Laniewska, I.; Millo, B.; Dłuzniewski, M. Combination therapy of statin with flavonoids rich extract from chokeberry fruits enhanced reduction in cardiovascular risk markers in patients after myocardial infarction (MI). *Atherosclerosis* **2007**, *194*, e179–e184. [CrossRef] [PubMed]
23. Tjelle, T.E.; Holtung, L.; Bøhn, S.K.; Aaby, K.; Thoresen, M.; Wiik, S.Å.; Paur, I.; Karlsen, A.S.; Retterstøl, K.; Iversen, P.O.; Blomhoff, R. Polyphenol-rich juices reduce blood pressure measures in a randomised controlled trial in high normal and hypertensive volunteers. *Br. J. Nutr.* **2015**, *114*, 1054–1063. [CrossRef] [PubMed]
24. Broncel, M.; Kozirog, M.; Duchnowicz, P.; Koter-Michalak, M.; Sikora, J.; Chojnowska-Jeziarska, J. *Aronia melanocarpa* extract reduces blood pressure, serum endothelin, lipid, and oxidative stress marker levels in patients with metabolic syndrome. *Med. Sci. Monit.* **2010**, *16*, CR28–CR34. [PubMed]
25. Kanthe, P.S.; Patil, B.S.; Bagali, S.C.; Reddy, R.C.; Aithala, M.R.; Das, K.K. Protective effects of Ethanolic Extract of *Embllica officinalis* (amla) on Cardiovascular Pathophysiology of Rats, Fed with High Fat Diet. *J. Clin. Diagn. Res.* **2017**, *11*, CC05–CC09. [CrossRef] [PubMed]
26. El-Sayyad, S.M.; Makboul, M.A.; Ali, R.M.; Farag, S.F. Hypotensive effect of *Ficus sycomorus* L. on the arterial blood pressure of rabbits. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2016**, *4*. Available online: https://www.researchgate.net/publication/309610756_Hypotensive_effect_of_Ficus_sycomorus_L_on_the_arterial_blood_pressure_of_rabbits (accessed on 28 November 2018).
27. Cherniack, E.P. Polyphenols: Planting the seeds of treatment for the metabolic syndrome. *Nutrition* **2011**, *27*, 617–623. [CrossRef]
28. Leung, L.; Martin, J.B.; Lawmaster, T.; Arthur, K.; Broderick, T.L.; Al-Nakkash, L. Sex-Dependent Effects of Dietary Genistein on Echocardiographic Profile and Cardiac GLUT4 Signaling in Mice. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* **2016**, *2016*, 1796357. [CrossRef]
29. Razmaraii, N.; Babaei, H.; Mohajjel Nayebi, A.; Assadnassab, G.; Ashrafi-Helan, J.; Azarmi, Y. Cardioprotective Effect of Grape Seed Extract on Chronic Doxorubicin-Induced Cardiac Toxicity in Wistar Rats. *Adv. Pharm. Bull.* **2016**, *6*, 423–433. [CrossRef]
30. Yadegari, M.; Khamesipour, F.; Talebiyan, R.; Katsande, S. Echocardiography findings after intravenous injection of *Achillea millefolium* (Yarrow) extract in the dog. *Malays. Appl. Biol.* **2015**, *44*, 85–91.
31. Parzonko, A.; Naruszewicz, M. Cardioprotective effects of *Aronia melanocarpa* anthocyanins. From laboratory experiments to clinical practice. *Curr. Pharm. Des.* **2016**, *22*, 174–179. [CrossRef]
32. Kim, N.H.; Jegal, J.; Kim, Y.N.; Heo, J.D.; Rho, J.R.; Yang, M.H.; Jeong, E.J. Chokeberry Extract and Its Active Polyphenols Suppress Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes and Modulates Fat Accumulation and Insulin Resistance in Diet-Induced Obese Mice. *Nutrients* **2018**, *10*, 1734. [CrossRef]
33. Simeonov, S.B.; Botushanov, N.P.; Karahanian, E.B.; Pavlova, M.B.; Husianitis, H.K.; Troev, D.M. Effects of *Aronia melanocarpa* juice as part of the dietary regimen in patients with diabetes mellitus. *Folia Med.* **2002**, *44*, 20–23.
34. Yamane, T.; Kozuka, M.; Konda, D.; Nakano, Y.; Nakagaki, T.; Ohkubo, I.; Ariga, H. Improvement of blood glucose levels and obesity in mice given aronia juice by inhibition of dipeptidyl peptidase IV and α -glucosidase. *J. Nutr. Biochem.* **2016**, *31*, 106–112. [CrossRef] [PubMed]
35. Imam, M.U.; Zhang, S.; Ma, J.; Wang, H.; Wang, F. Antioxidants Mediate Both Iron Homeostasis and Oxidative Stress. *Nutrients* **2017**, *9*, 671. [CrossRef]
36. Lee, H.J.; Jang, H.B.; Park, J.E.; Park, K.H.; Kang, J.H.; Park, S.I.; Song, J. Relationship between Serum Levels of Body Iron Parameters and Insulin Resistance and Metabolic Syndrome in Korean Children. *Osong Public Health Res. Perspect.* **2014**, *5*, 204–210. [CrossRef] [PubMed]
37. Skarpańska-Stejnborn, A.; Basta, P.; Sadowska, J.; Pilaczyńska-Szcześniak, L. Effect of supplementation with chokeberry juice on the inflammatory status and markers of iron metabolism in rowers. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **2014**, *11*, 48. [CrossRef]
38. Mu, M.; An, P.; Wu, Q.; Shen, X.; Shao, D.; Wang, H.; Zhang, Y.; Zhang, S.; Yao, H.; Min, J.; et al. The dietary flavonoid myricetin regulates iron homeostasis by suppressing hepcidin expression. *J. Nutr. Biochem.* **2016**, *30*, 53–61. [CrossRef] [PubMed]
39. Gregório, B.M.; De Souza, D.B.; de Moraes Nascimento, F.A.; Pereira, L.M.; Fernandes-Santos, C. The potential role of antioxidants in metabolic syndrome. *Curr. Pharm. Des.* **2016**, *22*, 859–869. [CrossRef]
40. Louis, X.L.; Thandapilly, S.J.; Kalt, W.; Vinqvist-Tymchuk, M.; Aloud, B.M.; Raj, P.; Yu, L.; Le, H.; Netticadan, T. Blueberry polyphenols prevent cardiomyocyte death by preventing calpain activation and oxidative stress. *Food Funct.* **2014**, *5*, 1785–1794. [CrossRef]

41. Mattera, R.; Benvenuto, M.; Giganti, M.G.; Tresoldi, I.; Pluchinotta, F.R.; Bergante, S.; Tettamanti, G.; Masuelli, L.; Manzari, V.; Modesti, A.; et al. Effects of Polyphenols on Oxidative Stress-Mediated Injury in Cardiomyocytes. *Nutrients* **2017**, *9*, 523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Brglez Mojzer, E.; Knez Hrnčič, M.; Škerget, M.; Knez, Ž.; Bren, U. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules* **2016**, *21*, 901. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Kotronen, A.; Westerbacka, J.; Bergholm, R.; Pietiläinen, K.H.; Yki-Järvinen, H. Liver fat in the metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2007**, *92*, 3490–3497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Bhaswant, M.; Shafie, S.R.; Mathai, M.L.; Mouatt, P.; Brown, L. Anthocyanins in chokeberry and purple maize attenuate diet-induced metabolic syndrome in rats. *Nutrition* **2017**, *41*, 24–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Park, C.H.; Kim, J.H.; Lee, E.B.; Hur, W.; Kwon, O.J.; Park, H.J.; Yoon, S.K. *Aronia melanocarpa* extract ameliorates hepatic lipid metabolism through PPAR γ 2 downregulation. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0169685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Duchnowicz, P.; Ziobro, A.; Rapacka, E.; Koter-Michalak, M.; Bukowska, B. Changes in Cholinesterase Activity in Blood of Adolescent with Metabolic Syndrome after Supplementation with Extract from *Aronia melanocarpa*. *BioMed Res. Int.* **2018**. [[CrossRef](#)]
47. Pari, L.; Chandramohan, R. Modulatory effects of naringin on hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism in high-fat diet/low-dose streptozotocin-induced diabetes in rats. *Gen Physiol Biophys* **2017**, *36*, 343–352. [[CrossRef](#)]
48. Feng, M.; Whitesall, S.; Zhang, Y.; Beibel, M.; D'Alecy, L.; DiPetrillo, K. Validation of volume-pressure recording tail-cuff blood pressure measurements. *Am. J. Hypertens.* **2008**, *21*, 1288–1291. [[CrossRef](#)]
49. Joffe, I.I.; Travers, K.E.; Perreault-Micale, C.L.; Hampton, T.; Katz, S.E.; Morgan, J.P.; Douglas, P.S. Abnormal cardiac function in the streptozotocin-induced non-insulin-dependent diabetic rat: Noninvasive assessment with Doppler echocardiography and contribution of the nitric oxide pathway. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1999**, *34*, 2111–2119. [[CrossRef](#)]
50. Zivkovic, V.; Jakovljevic, V.; Djordjevic, D.; Vuletic, M.; Barudzic, N.; Djuric, D. The effects of homocysteine-related compounds on cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers in isolated rat heart. *Mol. Cell. Biochem.* **2012**, *370*, 59–67. [[CrossRef](#)]
51. Green, L.C.; Wagner, D.A.; Glogowski, J.; Skipper, P.L.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **1982**, *126*, 131–138. [[CrossRef](#)]
52. Auclair, C.; Voisin, E. Nitroblue tetrazolium reduction. In *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*; Greenvald, R.A., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 1985; pp. 123–132.
53. Pick, E.; Keisari, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods.* **1980**, *38*, 161–170. [[CrossRef](#)]
54. McCord, J.M.; Fridovich, I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 6056–6063. [[PubMed](#)]
55. Beutler, E. Catalase. In *Red Cell Metabolism, a Manual of Biochemical Methods*; Beutler, E., Ed.; Grune and Stratton: New York, NY, USA, 1982; pp. 105–106.
56. Misra, H.P.; Fridovich, I. The role of superoxide-anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 3170–3175.
57. Beutler, E. Reduced glutathione (GSH). In *Red Cell Metabolism, a Manual of Biochemical Methods*; Beutler, E., Ed.; Grune and Stratton: New York, NY, USA, 1975; pp. 112–114.





The impact of aerobic and anaerobic training regimes on blood pressure in normotensive and hypertensive rats: focus on redox changes

Biljana Jakovljevic¹ · Tamara Nikolic Turnic² · Nevena Jeremic² · Jovana Jeremic² · Jovana Bradic² · Marko Ravic² · Vladimir Lj. Jakovljevic^{3,4} · Djordje Jelic⁵ · Dragan Radovanovic⁶ · Olga Pechanova⁷ · Vladimir Zivkovic³

Received: 11 July 2018 / Accepted: 5 October 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

This study was aimed to assess the impact of aerobic and anaerobic type of exercise on blood pressure and redox status in normotensive and hypertensive rats. After 1 week of preconditioning feeding and 1 week of preconditioning running regimen, Wistar albino rats ($n = 72$; bw: 270 ± 50 g) were randomly assigned to three groups according to running protocol (high-intensity interval training (HIIT) or moderate-intensity training (MIT)): sedentary control, MIT, HIIT; spontaneous hypertensive sedentary control (SHR), SHR + MIT and SHR + HIIT. Blood pressure (BP) measurement was performed by a tail-cuff noninvasive method BP system. After 48 h of rest following the final training, the rats were fasted for 24 h and sacrificed under ketamine/xylazine anesthesia and blood samples were collected. The level of the next prooxidants were measured: superoxide anion radical (O_2^-); hydrogen peroxide (H_2O_2); nitrite level (NO_2^-) and index of lipid peroxidation (thiobarbituric acid reactive substances), and the activity of antioxidative enzymes: reduced glutathione (GSH) superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity. After the last week of running, HIIT strongly affected SP, DP, and HR in SHR rats compared to other hypertensive rats, as well as after MIT in normotensive conditions. We have found that HIIT training protocol induced a higher increase of O_2^- and H_2O_2 as compared to MIT. Findings of the present study pointed out that contrary to normotensive conditions, in hypertensive conditions both training regimes reduced the BP levels, which was more prominent in case of HIIT. In addition, MIT seems to be connected with milder disturbance of pro-oxidant production and better antioxidant response.

Keywords Hypertension · HIIT · MIT · Heart · Redox status · Rat

✉ Vladimir Lj. Jakovljevic
drvladakgbg@yahoo.com

¹ Medical College of Applied Sciences in Zemun, Belgrade, Serbia

² Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

³ Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica Str. 69, P.O. Box 124, 34000 Kragujevac, Serbia

⁴ Department of Human Pathology, 1st Moscow State Medical, University IM Sechenov, Trubetskaya Street 8, Str. 2, Moscow 11999, Russian Federation

⁵ Faculty of Stomatology in Pancevo, University Business Academy Novi Sad, Novi Sad, Serbia

⁶ Department of Physiology, Faculty of Sport and Physical Education, University of Nis, Carnojeviceva 10A, Nis 18000, Serbia

⁷ Institute of Normal and Pathological Physiology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia

Introduction

Regular physical exercise is considered to be one of the beneficial factors of a proper lifestyle and is nowadays seen as an indispensable element for good health, able to lower the risk of disorders of the cardiovascular, endocrine and osteomuscular apparatus, immune system diseases, and the onset of potential neoplasms [1]. A moderate and programmed physical exercise has often been reported to be therapeutic both in the adulthood and in aging, being able to promote fitness [2].

High-intensity interval training (HIIT) presents shorter periods of high-intensity (sub- to near maximal) exercise followed by longer periods of low intensity exercise or rest [3, 4]. In recent times, HIIT, referring to alternating short bursts of high-intensity exercise and recovery periods, has become a popular alternative primarily because of its time efficiency, because lack of time is a commonly cited barrier to exercise participation [5]. On the other hand, traditional training methods for cardiovascular health tended to focus on longer-duration sessions involving moderate-intensity exercise performed continuously without rest, often termed moderate-intensity training (MIT) [6, 7].

Physical activity has various effects on different systems and organs. Since 1985, authors suggested benefit of physical exercise, indicating some cardioprotective effects of exercise training [7]. In order to reduce traditional and nontraditional cardiovascular risk factors, scientists explore appropriate dose of physical activity which could be able to decrease hypertension, obesity, insulin resistance, etc [7, 8].

Nowadays, there is one recent the HEPAFIT randomized controlled clinical study which strongly recommended and obligated physical activity from childhood to elderly, and explained the possible effects of physical activity interventions to reduce liver fat content and to improve metabolic profiles and the cardiometabolic health of adolescents and adults [8].

Clinical studies suggested that chronic isometric hand-grip training reduces blood pressure; however, there is still a gap in the knowledge on the effects of this modality of exercise on other cardiovascular variables—such as endothelial function, oxidative stress, and cardiac autonomic modulation—which should be addressed in future studies. People with hypertension are less physically active than those without hypertension and there is strong evidence supporting the blood pressure-lowering ability of regular exercise, especially in hypertensive individuals [9]. Physical activity is commonly recommended as an important lifestyle modification that may aid in the prevention of hypertension. Recent epidemiologic evidence has demonstrated a consistent, temporal, and dose-dependent

relationship between physical activity and the development of hypertension [10]. Experimental evidence from interventional studies has further confirmed a relationship between physical activity and hypertension as the favorable effects of exercise on blood pressure reduction have been well characterized in recent years [11].

Despite clear evidence for the positive adaptations following HIIT compared with MIT with regard to aerobic fitness and vascular function, it is still unclear which form of training is most effective for reducing arterial pressure and oxidative stress and which is the optimal ‘dose–response’ of physical exercise. We hypothesized that both training types can be effective in reducing the BP levels in hypertensive rats and, having in mind their aerobic/anaerobic characteristics, can affect redox processes. Therefore, this study was aimed to assess the impact of aerobic and anaerobic type of exercise on blood pressure in normotensive and hypertensive rats, with emphasis on changes in their redox status.

Materials and methods

Animals and design of the study

Eight-week-old male Wistar albino rats ($n = 72$; bw: 270 ± 50) were kept on an artificial 12-h light–dark cycle (8:00 a.m.–8:00 p.m.) at room temperature ($23 \pm ^\circ\text{C}$) in the Institute of Cardiovascular Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac. Water and food were available ad libitum. The animals were housed in their respective groups in a collective cage and received water and standard laboratory chow. After 1 week of preconditioning feeding and 1 week of preconditioning running regimen, all rats were randomly assigned to three groups: sedentary control (CTRL, $n = 12$), MIT ($n = 12$), HIIT ($n = 12$) Spontaneous hypertensive sedentary control (SHR, $n = 12$), SHR + MIT ($n = 12$), and SHR + HIIT ($n = 12$).

Compliance with ethical standards

The experimental protocol was approved by the Faculty of Medical Sciences Ethics Committee for the welfare of experimental animals, University of Kragujevac, number 01-13340/1 and by Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management, Authority for Veterinary of Serbia number 323-07-04422/2017-05 and followed the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals.

Exercise protocols

Exercise protocols were performed by Treadmill for rats (ELUNIT Medical Equipment) which is a treadmill customized for anatomical and physiological characteristics of

small experimental animals (power supply 220 V, 50 Hz, number of trails for running: 4; Speed control 2–50 m/min with a resolution of 0.1 m/min) which is connected with Treadmil-software to monitoring speed continuously.

Two different modes of continuous exercise training were used on rats: moderate interval continuous training (MIT) and high-intensity interval training (HIIT). The rats on exercise MIT protocol ran on treadmill for 4 weeks-5 days, with 1 week before of adaptation period (8 m/s speed for 1 h/day), and with gradual increase in speed during weeks, from 10 m/min in second week to 15 m/min in fifth week with 3 min rest/100 m and 5 min warmup at 8 m/min prior to each training session (Table 1).

The exercise HIIT group ran on treadmill for 5 weeks-5 days a week with 5 sprints with speed in adaptation period 7 m/min, and then in second week from 45 to 49 ms for 30 s, in third week with 50 m/min speed, in fourth week with speed from 51 to 55 m/s and in the last week with 55 m/min with longer duration. Before each training session 5-min warmup at 8 m/min and after each sprint rest for 2 min was conducted (Table 2).

Blood samples collection

After 48 h of rest following the final training, the rats were fasted for 24 h and sacrificed under ketamine/xylazine anesthesia and blood samples were collected. Blood samples were collected into ice-cold EDTA capillary system tubes by the nick procedure, and approximately 500 μ l of blood plasma sample obtained after centrifugation and was stored at -80°C until use for biochemical analysis.

Blood pressure (BP) measurement

The tail-cuff noninvasive method BP system (Rat Tail Cuff Method Blood Pressure Systems (MRBP-R), IITC Life Science Inc. USA) enables blood pressure (BP) measurements in rats. This method uses a specialized volume pressure recording (VPR) sensor, which detect all blood volume changes and connected by cuff that is placed over the animal's tail. Rats do need to be restrained in specific holders and artificially heated to maintain normal BP. The MRBP-R system provides the measurements of four different blood pressure parameters: systolic and diastolic blood pressure, heart rate, mean blood pressure [12].

Table 1 Protocol for high-intensity interval training for rats (HIITr)

Weeks/ days***	Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday
7 m/min for 15 min					
2	5 sprints \times 45 m/min for 30 s	5 sprints \times 46 m/min for 30 s	5 sprints \times 47 m/min for 30 s	5 sprints \times 48 m/min for 30 s	5 sprints \times 49 m/min for 30 s
3	5 sprints \times 50 m/min for 30 s	5 sprints \times 50 m/min for 40 s	5 sprints \times 50 m/min for 45 s	5 sprints \times 50 m/min for 55 s	5 sprints \times 50 m/min for 60 s
4	5 sprints \times 51 m/min for 60 s	5 sprints \times 52 m/min for 60 s	5 sprints \times 53 m/min for 60 s	5 sprints \times 54 m/min for 60 s	5 sprints \times 55 m/min for 60 s
5	5 sprints \times 55 m/min for 65 s	5 sprints \times 55 m/min for 70 s	5 sprints \times 55 m/min for 75 s	5 sprints \times 55 m/min for 80 s	5 sprints \times 55 m/min for 90 s

*2-min rest after each sprint

**5-min warmup at 8 m/min prior to each training session

Table 2 Protocol for moderate interval continuous training for rats (MIT)

Weeks/ days***	Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday
1	8 m/min for 30 min				
2	10 m/min for 1 h	10 m/min for 1 h	10 m/min for 1 h	10 m/min for 1 h	10 m/min for 1 h
3	12 m/min for 1 h	12 m/min for 1 h	12 m/min for 1 h	12 m/min for 1 h	12 m/min for 1 h
4	13 m/min for 1 h	13 m/min for 1 h	13 m/min for 1 h	13 m/min for 1 h	13 m/min for 1 h
5	15 m/min for 1 h	15 m/min for 1 h	15 m/min for 1 h	15 m/min for 1 h	15 m/min for 1 h

*3-min rest/100 m

**5-min warmup at 8 m/min prior to each training session

Markers of oxidative stress

The level of superoxide anion radical (O_2^-) was measured by NBT (Nitro Blue Tetrazolium) reaction in TRIS-buffer with plasma sample as previously described [13]. Measurement of hydrogen peroxide (H_2O_2) is based on oxidation of Phenol Red by hydrogen peroxide, in a reaction catalyzed by horseradish peroxidase (HRPO) as previously described [13]. Nitric oxide decomposes rapidly to form stable metabolite nitrite/nitrate products. Nitrite level (NO_2^-) was measured and used as an index of nitric oxide (NO) production using the Griess's reagent as previously described [14]. Index of lipid peroxidation (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) was estimated by measuring of TBARS using 1% TBA (Thiobarbituric acid) in 0.05 NaOH incubated with the plasma as previously described [15]. All analysis was determined using the spectrophotometrical method (UV-1800 UV-Vis Spectrophotometer by Shimadzu Scientific Instruments Inc).

Antioxidative enzymes

The level of reduced glutathione (GSH) was determined based on GSH oxidation with 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid), using method described by Beutler [16]. SOD activity was determined by the epinephrine method described by Beutler. A 100 μ l lysate and 1 ml carbonate buffer were mixed, and then 100 μ l of epinephrine was added. Detection was performed at 470 nm [17]. CAT activity was determined according to Aebi. Lysates were diluted with distilled water (1:7 v/v) and treated with chloroform-ethanol (0.6:1 v/v) to remove hemoglobin and then, 50 μ l CAT buffer, 100 μ l sample, and 1 ml 10 mM H_2O_2 were added to the samples. Detection was performed at 360 nm [18].

Statistical analyses

Values were presented as the mean \pm standard error mean. Prior to statistical analysis, all data were checked for normality using the one-sample Kolmogorov-Smirnov test. Biochemical data were evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA). Comparisons of the training protocols of each group were conducted by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test with false discovery rate (FDR) correction. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test was used to analyze other measures. These analyses were carried out using MedCalc statistical software version 17.9 (Acaciaaan 22, 8400 Ostend, Belgium 2018) and SPSS statistical program version 22.0. The level of statistical significance for all analyses was 95% ($p < 0.05$).

Results

Effects of training on systolic (SP), diastolic blood pressure (DP), and heart frequency (HR) during normotensive and hypertensive conditions

Dynamic of systolic, diastolic arterial blood pressure and heart rate were evaluated before (during adaptation period), after first, second, third, and fourth week of running period.

In normotensive rats, significant alterations of SP, DP, and HR were found after second week of training, namely these parameters were significantly decreased in MIT group compared to CTRL group, and significantly increased in HIIT group compared to CTRL group. After third week of training, only in MIT group was significantly reduced SP, DP, and HR compared other groups, while after fourth week no more differences were recorded between the exercised and the sedentary groups, respectively (Table 3).

In the hypertensive rats, no significant differences were seen among the groups prior to the training protocols. After first week, SP was significantly decreased in SHT-MIT group compared to SHR-HIIT group, but after the second week, these parameters in the same group were also significantly decreased, but compared to SHR and SHR-HIIT groups. Interestingly, during the time of running, SP, DP, and HR were significantly decreased in SHR-HIIT and SHR-MIT compared to control conditions (SHR group), with the most prominent changes in hypertensive groups with MIT protocol. At the end of training period, both protocols significantly decreased the hemodynamic parameters as compared to the CTRL (SHR) group. However, blood pressure values were significantly lower in the HIIT versus the MIT group, suggesting that hypertensive animals benefit more from the intensive vs. moderate training—or alternatives. (Table 3).

Effects of training on superoxide anion radical (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2) levels

After training protocol, values of O_2^- were significantly higher in HIIT and MIT group compared to other groups, while in hypertensive rats values of this parameter were also increased but no so prominent as in normotensive (Fig. 1a). Also, the same trend of changes was observed in values of H_2O_2 (Fig. 1b). We have found that HIIT training protocol induced the strong increasing of O_2^- and H_2O_2 compared to MIT and compared to control groups (CTRL and SHR). Furthermore, in almost all hypertensive groups, levels of H_2O_2 were higher compared to normotensive rats.

Table 3 Levels of systolic pressure (SP: mmHg), diastolic pressure (DP: mmHg), and heart rate (HR: beats/min) before, after first, second, third, and fourth weeks

Group	Before			1st week			2nd week			3rd week			4th week		
	SP	DP	HR	SP	DP	HR	SP	DP	HR	SP	DP	HR	SP	DP	HR
CTRL	119±4	76±3	345±16	113±6	71±4	355±15	117±5	75±4	364±17	121±3	77±6	361±12	123±5	78±5	358±13
MIT	125±5	81±6	351±18	119±3	77±5	360±12	123±4	80±3	354±11 ^a	115±6	74±4	349±10 ^a	126±5	81±5	359±13
HIIT	118±6	80±7	359±15	121±5	84±3	371±14	126±7	79±3	376±15 ^b	128±8	71±4	359±13	124±5	67±3	348±16
SHR	188±9	94±5	423±21	182±5	96±5	412±16	191±6	99±4	408±19 ^d	196±10	103±11	411±21 ^{d,e}	199±11	107±9	406±14 ^{d,e}
SHR MIT	180±7	96±7	401±15	179±3	92±4	389±14 ^f	164±7	89±6	369±17 ^{d,f}	158±6	85±6	343±21 ^d	151±8	79±6	329±16 ^{d,f}
SHR HIIT	192±7	97±3	421±16	187±5	94±3	401±11 ^f	189±7	99±7	398±13 ^f	168±5	88±6	389±11 ^e	137±6	77±4	341±1 ^{e,f}

Groups: CTRL sedentary control, MCT moderate-intensity training, HIIT high-intensity interval training, SHR spontaneous hypertensive rats, SHR + MIT spontaneous hypertensive rats on moderate-intensity training, SHR + HIIT spontaneous hypertensive rats on high-intensity interval training.

Means with different superscripts in each row are significantly different from group as follows (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test): *a* MIT versus CTRL, *b* HIIT versus CTRL, *c* MIT versus HIIT, *d* SHR-MIT versus SHR, *e* SHR-HIIT versus SHR, *f* SHR-MIT versus SHR-HIIT (*a-f* $p < 0.05$)

Effects of training on nitrites (NO₂⁻) levels

Levels of nitrites was significantly decreased in HIT-SHR compared to CTRL and SHR groups, and in MIT group compared to CTRL and SHR groups (Fig. 1c). Well, during normotensive conditions after MIT was significantly decreased, and during hypertensive conditions after HIIT this parameter was significantly decreased (Fig. 1c). In almost all hypertensive groups, levels of nitrites were reduced compared to normotensive rats.

Effects of training on index of lipid peroxidation (TBARS) levels

During the normotensive conditions, MIT induced significant increased levels of TBARS, as well as in hypertensive conditions. Actually, in HIIT and MIT groups compared to CTRL group, TBARS was increased significantly, and also in HIIT-SHR and MIT-SHR compared to SHR group. Well, TBARS levels were significantly altered in all study groups compared to controls (Fig. 1d). In almost all hypertensive groups, levels of TBARS were higher compared to normotensive rats.

Effects of training on superoxide dismutase (SOD) levels

In normotensive rats, MIT significantly increased SOD levels compared to HIIT and CTRL groups. In hypertensive rats, also MIT was stronger inducer of SOD compared to HIIT-SHR and SHR groups. It is important to mention that in both of conditions, HIIT running protocol also induced significantly increasing of SOD compared to control conditions (CTRL and SHR groups) (Fig. 2a).

Effects of training on reduced glutathione (GSH) levels

Levels of GSH were significantly increased in MIT group compared to CTRL group, and in HIIT compared to CTRL group also. On the other hand, levels of GSH were significantly decreased in HIIT-SHR group compared to SHR, while the levels of this parameter were not changed in MIT-SHR group compared to SHR group (Fig. 2b). In almost all hypertensive groups, levels of GSH were reduced compared to normotensive rats.

Effects of training on catalase (CAT) activity

In normotensive conditions, HIIT induced significantly increased CAT activity compared to CTRL, while the levels of this parameter were also increased in MIT group but less than in HIIT group. In hypertensive rats, in both

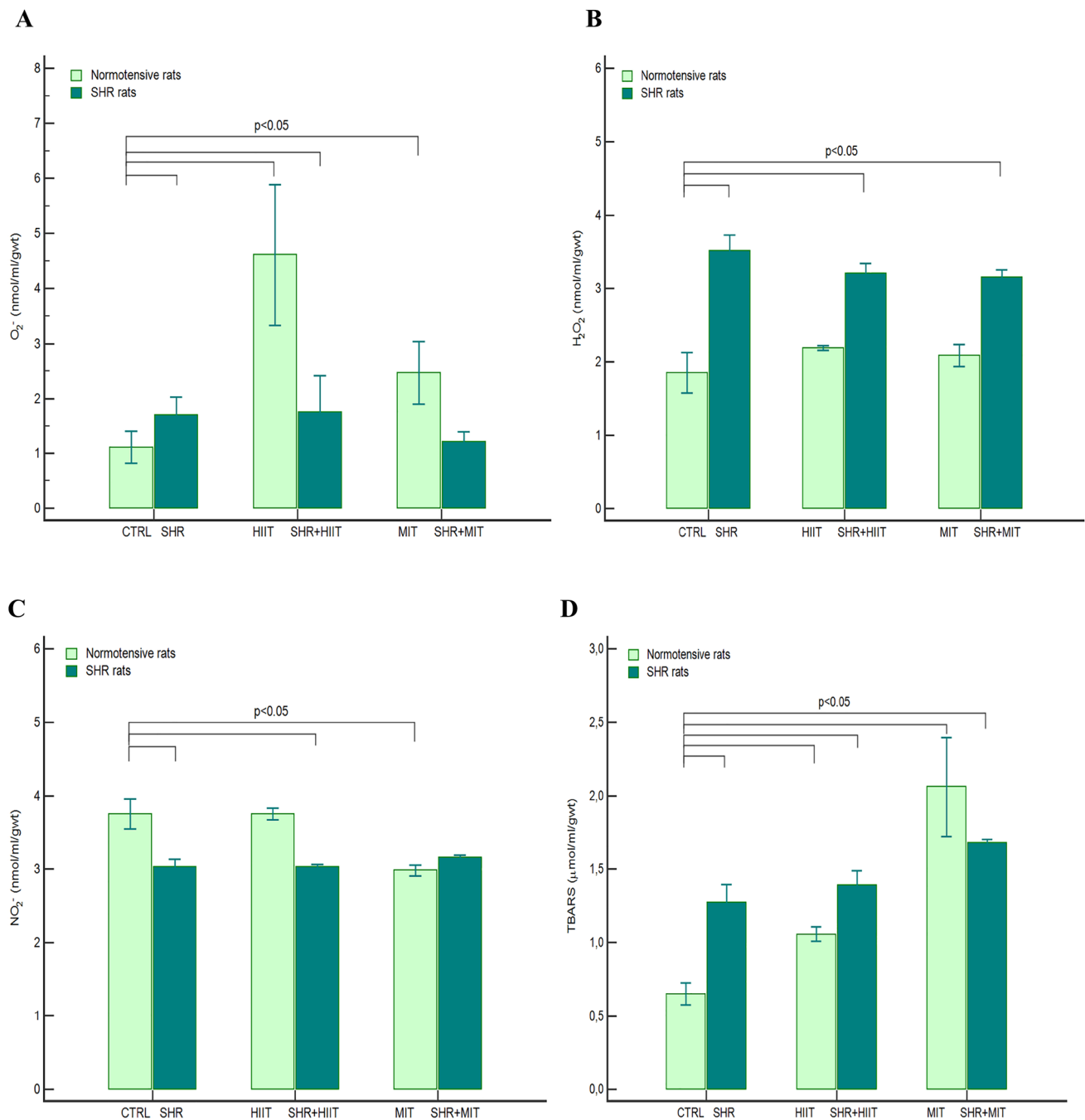


Fig. 1 Levels of pro-oxidant markers: superoxide anion radical (a), hydrogen peroxide (b), nitrites (c) and index of lipid peroxidation measured as TBARS (d) after 4 weeks experimental protocol. Values are reported as the mean \pm standard error mean. Groups: CTRL sedentary control, MIT moderate-intensity training, HIIT high-intensity

interval training, SHR spontaneous hypertensive rats, SHR+MIT spontaneous hypertensive rats on moderate-intensity training, SHR+HIIT spontaneous hypertensive rats on high-intensity interval training. Means are presented as significantly different or not from CTRL (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test)

od groups, HIIT-SHR and MIT-SHR, CAT was decreased compared to SHR group. Generally viewed, in hypertensive rats with or without training, levels of CAT were lower during hypertension (Fig. 2c).

Discussion

Regular physical exercise has many health benefits including a lowered threat of all-cause mortality along with a reduced risk of cardiovascular disease, cancer, and

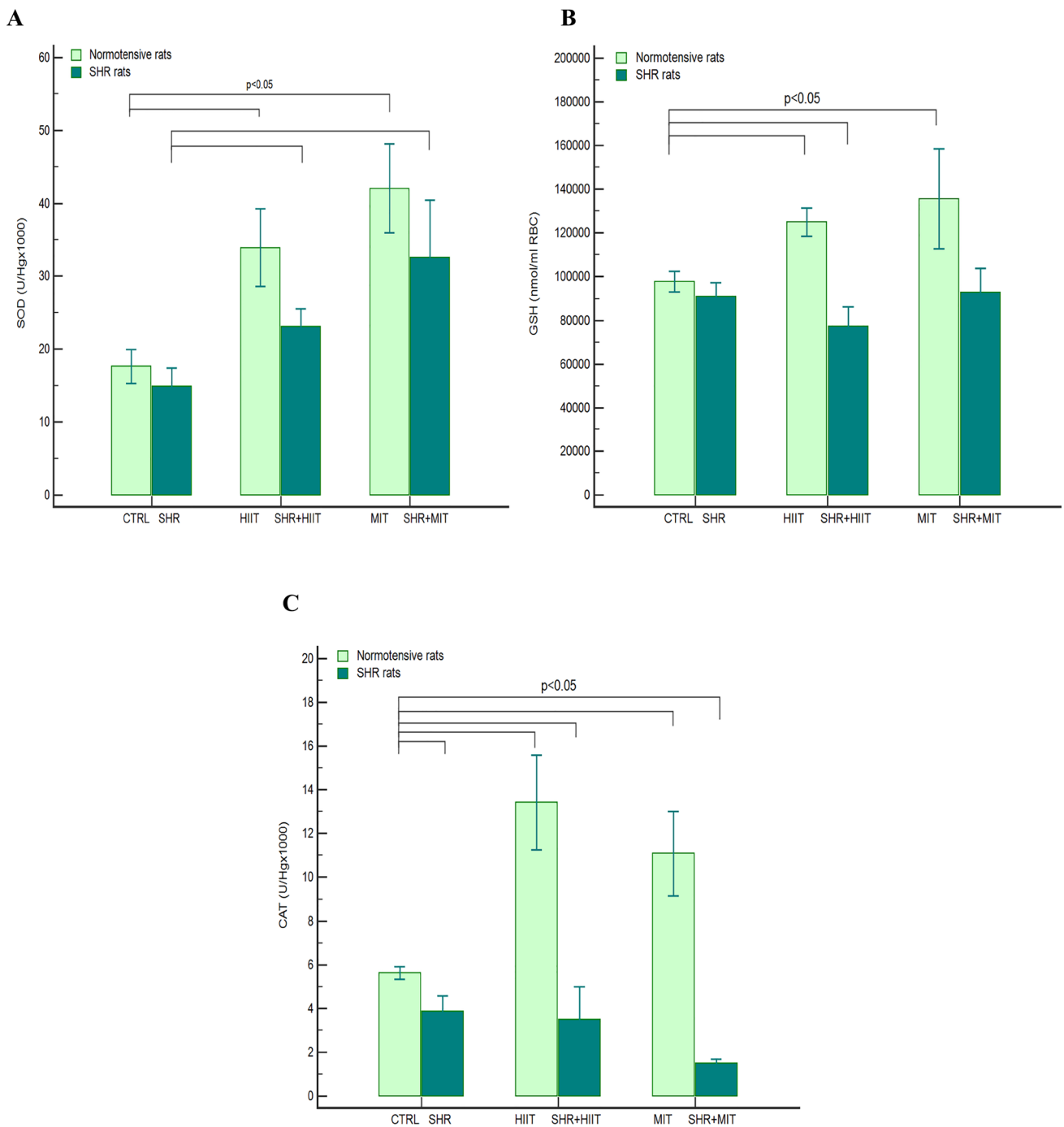


Fig. 2 Levels of antioxidant enzymes: superoxide dismutase (**a**), reduced glutathione (**b**) and catalase (**c**) after 4 weeks experimental protocol. Values are reported as the mean \pm standard error mean. Groups: *CTRL* sedentary control, *MIT* moderate-intensity training, *HIIT* high-intensity interval training, *SHR* spontaneous hypertensive

rats, *SHR + MIT* spontaneous hypertensive rats on moderate-intensity training, *SHR + HIIT* spontaneous hypertensive rats on high-intensity interval training. Means are presented as significantly different or not from *CTRL* (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test)

diabetes [9, 19]. Paradoxically, it is also clear that contracting skeletal muscles generate free radicals and that prolonged and intense exercise can result in oxidative damage to cellular constituents. Despite clear evidence for the positive adaptations following HIIT compared with

MIT with regard to aerobic fitness and vascular function, the aim of this study was examine differences of these running protocols in changing of blood pressure and redox status after chronically and continuous physical training of rats.

In the first part of study, we examined the effects of HIIT and MIT on BP before and during 4 weeks experimental period. It is known that systemic arterial hypertension causes progressive myocardial remodeling. While cardiac function is increased in response to active myocyte hypertrophy in the left ventricle in the compensated phase, left ventricular (LV) remodeling is characterized by the combination of cardiomyocyte hypertrophy and proliferation of other tissues, which leads to arterial stiffness and cardiac dysfunction [20]. In that sense, the benefits of aerobic training to hypertensive subjects are well established in the literature [9, 20, 21]. Animal models of hypertension—SHR in the compensated stage (~6-month old)—have shown the efficacy of physical training in attenuating systolic dysfunction and restoring ventricular elasticity in female SHR [20]. Aerobic training reduced apoptosis in the myocardium of SHR [20, 21] improved contractile function of cardiomyocytes isolated from the left ventricle, and normalized the expression of proteins involved in the regulation of intracellular calcium cycle, such as the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) and phospholamban [22]. However, little is known about precise dose of physical training which can be beneficial and which can be harmful, and where is it that border between good and bad dose of physical activity on arterial pressure.

In normotensive rats, after third week of training, only in MIT group SP, DP, and HR were significantly reduced compared other groups, while after fourth week there were no changes in these parameters (Table 3). On the other hand, in hypertensive groups, interestingly, during the time of running, SP, DP, and HR were decreased in after both training regimes compared to control conditions (SHR group), with the most prominent changes in hypertensive groups with MIT protocol. Finally, after the last week of running, HIIT and MIT strongly affected SP, DP, and HR in SHR rats compared to hypertensive groups (SHR, SHR + MIT, SHR + HIIT) (Table 3). However, MIT running protocol induced stringer drop in blood pressure compared to HIIT protocol. Our data are in agreement with previous studies [22–26].

One of the few similar studies, which compared the effects of HIIT vs. Continuous moderate exercise in animals, was conducted by Wang et al. They compared the possible beneficial effects of two different exercise training regimes in a mouse model of diet-induced obesity, and concluded that HIIT contribute a more favorable regulation of metabolic dysfunctions in mice compared with MICT, but not in arterial blood pressure regulation [23].

The large number of previous studies hypothesized that the HIIT training would be more effective than moderate-intensity continuous training (MICT) in improving endothelial function and maximum oxygen uptake ($\text{VO}_{2\text{max}}$). Based on the presumptions, HIIT more affects endothelial function

and has higher metabolic benefit than other physical training. But, because of diversity of experimental models, there are inconsistent results [27, 24].

If we know that the hypertension is stronger inductor/consequence of oxidative stress and of decreased availability of nitric oxide in the vascular cells, then the SHR model was a good model for assessing the effects of exercise. Besides, physical exercise has many benefits, but it might also have a negative impact on the body, depending on the training level, length of workout, gender, age, and fitness. The negative effects of physical exercise are commonly attributed to an imbalance between the levels of antioxidants (both low molecular weight antioxidants and antioxidant enzymes) and reactive oxygen and nitrogen species due to excessive production of free radicals during physical exercise [27].

In order to investigate potential role of redox status and effects of HIIT and MIT on cardiovascular function, we measured the levels of prooxidants and antioxidants in blood of rats after the running protocol.

We have found that HIIT training protocol induced the strong increasing of O_2^- and H_2O_2 compared to MIT and compared to control groups (CTRL and SHR), with higher levels of H_2O_2 in almost all hypertensive groups compared to normotensive rats (Fig. 1a, b). Superoxide is primarily formed as an intermediate in biochemical reactions and compared with other free radicals (hydrogen peroxide etc.), superoxide has a relatively long half-life that enables diffusion within the cell and, hence, increasing the number of the potential targets. Although superoxide is generally considered relatively unreactive compared with other radical species, it can react rapidly with some radicals such as NO and with some iron-sulfur clusters in proteins. On the other hand, hydrogen peroxide is cytotoxic but is considered a relatively weak oxidizing agent. In our study, measured indirectly, levels of NO^- during normotensive conditions after MIT and during hypertensive conditions after HIIT was significantly decreased (Fig. 1c). In almost all hypertensive groups, levels of nitrites were reduced compared to normotensive rats. The concentrations of nitric oxide are lower, probably because of the possible reaction of O_2^- with NO^- .

Afterwards, the elevated levels of TBARS gave to us clear picture about the effects of HIIT and MIT. TBARS reflects the content of malondialdehyde, the most abundant individual aldehyde that results from the lipid peroxidation processes [28]. During the normotensive conditions, MIT induced significant increased levels of TBARS, as well as in hypertensive conditions. Actually, in HIIT and MIT groups compared to CTRL group, TBARS was increased significantly, and also in HIIT-SHR and MIT-SHR compared to SHR group. Well, TBARS levels were significantly altered in all study groups compared to controls (Fig. 1d). In almost all hypertensive groups, levels of TBARS were higher compared to normotensive rats.

We understand all the inconsistencies between the conclusions of different investigations, commonly based on the concentrations of oxidative biomarkers in body fluids. Previous studies reported similar beneficial outcomes with both protocols or even reported the HIIT protocol as more effective in preventing oxidative stress [24, 25]. In a study Ramos et al. MICT and HIIT protocols prevented an increase in TBARS during obesity [26]. On the other hand, Li et al. suggested that lipid peroxidation (malondialdehyde formation) was increased by an acute bout of HIIT exercise in hepatic mitochondria [29]. Nevertheless, few data are available in literature about effects of these training protocols in state of elevated blood pressure, and regarding to fact that hypertension could be generator of ROS and lipid peroxidation, our results are expected. Actually, during the hypertension as a chronic disorder, HIIT and MIT are probably not recommended beneficial therapy.

Finally, as a major antioxidant enzymes, superoxide dismutase, reduced glutathione, and catalase, we compared the effects of HIIT vs. MIT in normotensive and hypertensive rats. The antioxidant enzymes are important endogenous defenses required to inhibit the formation of ROS or to promote the removal of free radicals and their precursors. CAT is a ferric heme protein that directly catalyzes the decomposition of hydrogen peroxide (H_2O_2). SOD removes the superoxide anion by accelerating the rate of its dismutation to H_2O_2 [29]. GSH catalyzes the decomposition of H_2O_2 as a cofactor in a redox cycle where glutathione reductase reduces oxidized (GSSG) to GSH.

In normotensive and hypertensive rats, MIT significantly increased SOD levels compared to HIIT and controls groups (Fig. 2a). Levels of GSH, were significantly increased in MIT group compared to CTRL group, and in HIIT compared to CTRL group also, but decreased in HIIT-SHR group compared to SHR (Fig. 2b). Only levels of CAT was significantly increased after HIIT compared to CTRL. Generally viewed, in hypertensive rats with or without training, levels of CAT were lower during hypertension (Fig. 2c). Probably because of decreased levels of CAT, we observed higher levels of reactive oxygen species in hypertensive rats. Also, in presence of strong generator of ROS such as hypertension, a diminished antioxidant activity resulted in elevated levels of almost all pro-oxidative markers, except marker of vasodilatation-nitric oxide.

Literature data suggested that the amount and intensity of physical activity were directly related to the antioxidant enzyme activity levels [30]. The findings of this study suggested that an intensity of physical activity could have a modulatory effect on antioxidative balance in the studied female population [31]. Criswell et al. tested the hypothesis that high-intensity (interval) training is superior- to moderate-intensity (continuous) exercise training for 12 weeks in the upregulation of antioxidant enzyme activity in skeletal

muscle [32]. They concluded that when matched for oxygen cost, interval and continuous exercise trainings result in similar increases in SOD activity and that the high-intensity interval exercise is superior- to moderate-intensity continuous exercise in the promotion of GPX activity [32]. Ji et al. explained that HIIT significantly elevated hepatic catalase and cytosolic SOD activity compared to acute physical activity [29]. Steinbacher suggested that the performance of aerobic exercise training increases antioxidant defenses which, in association with morphological and functional adaptations, can provide the organism with protection against oxidative stress [33]. But, Delwing-de Lima concluded that both protocols could prevent the most of alterations in the production of oxidative stress [34].

Based of previous findings, we speculate that an upregulation of the expression of SERCA_{2a} could be induced by the running routine [1–5, 26]. Another possibility is that angiotensin-1–7 through the physical activity can alter the expression of the main RAS enzymes, ACE and ACE₂, favoring the degradation of angiotensin-II and the buildup of angiotensin-1–7 [7, 35, 29, 33].

In summary, although performed on animal model, this study may help in the better understanding of the differences between the effects of aerobic/anaerobic training regimes on BP regulation in both hypertensive and normotensive conditions. Therefore, it provides new evidences which refer to beneficial impact of HIIT in reducing of hypertension. Additionally, our results can be of interest in elucidation of the influence of these exercise protocols on redox homeostasis. Accordingly, regardless the effects on BP, it seems that HIIT can promote oxidative stress and potential damages.

Conclusion

Findings of the present study pointed out that contrary to normotensive conditions, in hypertensive conditions both training regimes reduced the BP levels, which was more prominent in case of HIIT. In addition, MIT seems to be connected with milder disturbance of pro-oxidant production and better antioxidant response.

In this scenario, our results lend support to the idea that high intensity interval training can positively transform pathological into physiological arterial blood pressure. This finding could have clinical relevance in the design of therapeutic strategies for the prevention of progression of hypertension as the major cardiovascular risk factor.

Acknowledgements This work was supported by Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia (JP 01/15).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Oxidative stress (2018) role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. *Oncotarget* 9(24):17181–17198. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24729>
- Farah BQ, Germano-Soares AH, Rodrigues SLC, Santos CX, Barbosa SS, Vianna LC, Cornelissen VA, Ritti-Dias RM (2017) Acute and chronic effects of isometric handgrip exercise on cardiovascular variables in hypertensive patients: a systematic review. *Sports (Basel)* 5(3). E55. <https://doi.org/10.3390/sports5030055>
- Hakansson S, Jones MD, Ristov M, Marcos L, Clark T, Ram A, Morey R, Franklin A, McCarthy C, Carli L, Ward R, Keech A (2018) Intensity-dependent effects of aerobic training on pressure pain threshold in overweight males: a randomised trial. *Eur J Pain*. <https://doi.org/10.1002/ejp.1277>
- O'Driscoll JM, Wright SM, Taylor KA, Coleman DA, Sharma R, Wiles JD (1985) Cardiac autonomic and left ventricular mechanics following high intensity interval training: a randomised cross-over controlled study. *J Appl Physiol*. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00056.2018>
- Li FH, Li T, Ai JY, Sun L, Min Z, Duan R, Zhu L, Liu YY, Liu TC (2018) Beneficial autophagic activities, mitochondrial function, and metabolic phenotype adaptations promoted by high-intensity interval training in a rat model. *Front Physiol* 9:571. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00571>
- Costa EC, Hay JL, Kehler DS, Boreskie KF, Arora RC, Umpierre D, Sz wajcer A, Duhamel TA (2018) Effects of high-intensity interval training versus moderate-intensity continuous training on blood pressure in adults with pre- to established hypertension: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Sports Med*. <https://doi.org/10.1007/s40279-018-0944-y>
- Green DJ, Eijssvogels T, Bouts YM, Maiorana AJ, Naylor LH, Scholten RR, Spaanderman ME, Pugh CJ, Sprung VS, Schreuder T, Jones H, Cable T, Hopman MT, Thijssen DH (2014) Exercise training and artery function in humans: nonresponse and its relationship to cardiovascular risk factors. *J Appl Physiol* 117(4):345–352. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00354.2014>
- González-Ruíz K, Correa-Bautista JE, Izquierdo M, García-Hermoso A, Dominguez-Sanchez MA, Bustos-Cruz RH, García-Prieto JC, Martínez-Vizcaíno V, Lobelo F, González-Jiménez E, Prieto-Benavides DH, Tordecilla-Sanders A, Schmidt-RioValle J, Perez G, Ramírez-Vélez R (2018) Effects of an exercise program on hepatic metabolism, hepatic fat, and cardiovascular health in overweight/obese adolescents from Bogotá, Colombia (the HEPAFIT study): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 19(1):330. <https://doi.org/10.1186/s13063-018-2721-5>
- Sharman JE, La Gerche A, Coombes JS (2015) Exercise and cardiovascular risk in patients with hypertension. *Am J Hypertens* 28(2):147–158. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpu191>
- Diaz KM, Shimbo D (2013) Physical activity and the prevention of hypertension. *Curr Hypertens Rep* 15(6):659–668. <https://doi.org/10.1007/s11906-013-0386-8>
- Agnoletti D (2018) The aerobic exercise training in hypertension: a matter of baking ingredients. *J Hypertens* 36(8):1651–1653. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000001776>
- Feng M, Whitesall S, Zhang Y, Beibel M, D'Alecy L, DiPetrillo K (2008) Validation of volume-pressure recording tail-cuff blood pressure measurements. *Am J Hypertens* 21(12):1288–1291. <https://doi.org/10.1038/ajh.2008.301>
- Auclair C, Voisin E (1985) Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton, pp 123–132. <https://doi.org/10.12691/jnh-5-1-2>
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite and [15 N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131–138. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X)
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351–358 doi: 0003-2697(79)90738-3
- Beutler E, Duron O, Kelly BM (1963) Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 61:882–888
- Beutler E (1984) Superoxide dismutase. In: Beutler E (ed) *Red cell metabolism. a manual of biochemical methods*. Grune & Stratton: Philadelphia, pp 83–85
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 105:121–126
- Pescatello LS, Franklin BA, Fagard R, Farquhar WB, Kelley GA, Ray CA (2004) American College of Sports Medicine. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension. *Med Sci Sports Exerc* 36(3):533–553
- Libonati JR, Sabri A, Xiao C, MacDonnell SM, Rennan BF (2011) Exercise training improves systolic function in hypertensive myocardium. *J Appl Physiol* 111(6):1637–1643. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00292.2011>
- Carneiro-Júnior MA, Quintão-Júnior JF, Drummond LR, Lavorato VN, Drummond FR, Amadeu MA (2014) Effect of exercise training on Ca²⁺ release units of left ventricular myocytes of spontaneously hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res* 47(11):960–965
- Carneiro-Júnior MA, Quintão-Júnior JF, Drummond LR, Lavorato VN, Drummond FR, da Cunha DN (2013) The benefits of endurance training in cardiomyocyte function in hypertensive rats are reversed within four weeks of detraining. *J Mol Cell Cardiol* 57:119–128. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.01.013>
- Wang N, Liu Y, Ma Y, Wen D (2017) High-intensity interval versus moderate-intensity continuous training: superior metabolic benefits in diet-induced obesity mice. *Life Sci* 191:122–131. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.08.023>
- Pingitore A, Lima GPP, Mastorci F, Quinones A, Iervasi G, Vassalle C (2015) Exercise and oxidative stress: potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition* 31(7–8):916–922. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2015.02.005>
- Aro CEP, Guzmán JAR, Muñoz MES, González BEV (2015) Effects of high intensity interval training versus moderate intensity continuous training on the reduction of oxidative stress in type 2 diabetic adult patients: CAT. *Medwave* 15(7):1–13. <https://doi.org/10.5867/medwave.2015.07.6212>
- Ramos JS, Dalleck LC, Tjonna AE, Beetham KS, Coombes JS (2015) The impact of high-intensity interval training versus moderate-intensity continuous training on vascular function: a systematic review and meta-analysis. *Sports Med* 45(5):679–692. <https://doi.org/10.1007/s40279-015-0321-z>
- Finkler M, Lichtenberg D, Pinchuk I (2014) The relationship between oxidative stress and exercise. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 25(1):1–11. <https://doi.org/10.1515/jbcp-2013-0082>
- Halliwell B, Whiteman M (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 142:231–255. <https://doi.org/10.1038/sj.bj.0705776>
- Steinbacher P, Eckl P (2015) Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. *Biomolecules* 5(2):356–377. <https://doi.org/10.3390/biom5020356>
- Wewege M, van den Berg R, Ward RE, Keech A (2017) The effects of high-intensity interval training vs. moderate-intensity

- continuous training on body composition in overweight and obese adults: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 18(6):635–646. <https://doi.org/10.1111/obr.12532>
31. Covas MI, Elosua R, Fitó M, Alcántara M, Coca L, Marrugat J (2002) Relationship between physical activity and oxidative stress biomarkers in women. *Med Sci Sports Exerc* 34(5):814–819
 32. Criswell D, Powers S, Dodd S, Lawler J, Edwards W, Renshler K (1993) High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. *Med Sci Sports Exerc* 25:1135–1140. <https://doi.org/10.1249/00005768-199310000-00009>
 33. Garciarena CD, Pinilla OA, Nolly MB, Laguens RP, Escudero EM, Cingolani HE (2009) Endurance training in the spontaneously hypertensive rat: conversion of pathological into physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension* 53(4):708–714. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.126805>
 34. Delwing-de Lima D, Ulbricht ASSF, Werlang-Coelho C, Delwing-Dal Magro D, Joaquim VHA, Salamaia EM, de Quevedo SR, Desordi L (2017) Effects of two aerobic exercise training protocols on parameters of oxidative stress in the blood and liver of obese rats. *J Physiol Sci*. <https://doi.org/10.1007/s12576-017-0584-2>
 35. Safarimosavi S, Mohebbi H, Rohani H (2018) High-intensity Interval vs. continuous endurance training: preventive effects on hormonal changes and physiological adaptations in prediabetes patients. *J Strength Cond Res*. <https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000002709>

Research Article

The Effects of Potassium Cyanide on the Functional Recovery of Isolated Rat Hearts after Ischemia and Reperfusion: The Role of Oxidative Stress

Anica M. Petkovic ¹, Vladimir Lj. Jakovljevic ^{2,3}, Jovana V. Bradic ¹,
Jovana N. Jeremic ¹, Nevena S. Jeremic ¹, Tamara R. Nikolic Turnic,¹
Nemanja U. Jovicic ⁴, Vesna Z. Rosic ⁴, Ivan M. Srejovic ², and Vladimir I. Zivkovic ²

¹Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, 34 000 Kragujevac, Serbia

²Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, 34 000 Kragujevac, Serbia

³Department of Human Pathology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya Street 8, Moscow 119991, Russia

⁴Department of Histology and Embryology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, 34 000 Kragujevac, Serbia

Correspondence should be addressed to Vladimir Lj. Jakovljevic; drvladakbg@yahoo.com

Received 13 March 2018; Revised 16 May 2018; Accepted 6 June 2018; Published 19 July 2018

Academic Editor: Neelam Khaper

Copyright © 2018 Anica M. Petkovic et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

This investigation is aimed at examining the effects of pharmacological PostC with potassium cyanide (KCN) on functional recovery, gene expression, cytochrome c expression, and redox status of isolated rat hearts. Rats were divided into the control and KCN groups. The hearts of male Wistar albino rats were retrogradely perfused according to the *Langendorff* technique at a constant perfusion pressure of 70 cmH₂O. After stabilisation, control hearts were subjected to global ischemia (5 minutes), followed by reperfusion (5 minutes), while experimental hearts underwent global ischemia (5 minutes) followed by 5 minutes of reperfusion with 10 μmol/L KCN. The following parameters of heart function were measured: maximum and minimum rates of pressure development, systolic and diastolic left ventricular pressure, heart rate, and coronary flow. Levels of superoxide anion radical, hydrogen peroxide, nitrites, and index of lipid peroxidation (measured as thiobarbituric acid-reactive substances) were measured in coronary venous effluent, and activity of catalase was determined in heart tissue. Expression of Bax, Bcl-2, SOD-1, SOD-2, and cytochrome c was studied as well. It was shown that expression of Bax, Bcl-2, and SOD-2 genes did not significantly differ between groups, while expression of SOD-1 gene and cytochrome c was lower in the KCN group. Our results demonstrated that KCN improved the recovery of myocardial contractility and systolic and diastolic function, enhanced catalase activity, and diminished generation of prooxidants. However, all possible mechanisms and potential adverse effects of KCN should be further examined in the future.

1. Introduction

The leading causes of morbidity and mortality nowadays are cardiovascular diseases. Acute myocardial infarction probably represents the most often variety within this pathophysiological entity due to reduction of coronary blood flow and myocardial ischemia. Reperfusion strategies can be used for rescuing the myocardium, but immediate reperfusion of

ischemic myocardial tissue can paradoxically induce further damage known as the phenomenon of “reperfusion injury.” A lot of effort has been invested to find effective methods to reduce reperfusion injury [1, 2].

Postconditioning (PostC) is a strategy which provides cardioprotection through exposure to sublethal stimulus initiated at the very onset of reperfusion. Two elementary techniques of myocardial PostC involve ischemic PostC and

pharmacological PostC [3]. Groundbreaking research which gave the first data about the ischemic PostC was conducted by Zhao and coworkers approximately a decade ago. It was reported that brief episodes of I/R applied at early reflow can be applicable in occasions such as artery bypass surgery, transplantation of organs, and peripheral revascularization [4]. The beneficial effect of ischemic PostC involves postponed reversal of acidosis, activation of protein kinase C (PKC), formation of autacoids, such as adenosine and bradykinin, and release of endogenous opioids [5]. Furthermore, activation of mitochondrial K_{ATP} channel and closure of mitochondrial permeability transition pore may also contribute to cardioprotection [6]. Positive effects of ischemic PostC may be mediated via decreased NO-peroxynitrite signaling, as well as endogenous H_2S production which stimulates PKC- α and PKC- ϵ [7]. In addition, ischemic PostC may diminish the harmful effects of reactive oxygen species (ROS), bearing in mind that oxidative burst during reperfusion remains one of the major factors responsible for reperfusion injury [8]. Ischemic PostC is an adaptive response induced by short periods of ischemia alternating with short periods of reperfusion applied at onset of reperfusion after continuous ischemia; however, the similar effects can be caused by pharmacological agents as well [9].

Cyanide is a rapidly acting as deadly poison that can exist in various forms (gas, solid, and liquid). The main mechanism of its toxicity lies in inhibition of mitochondrial cytochrome c oxidase (CcO), an enzyme involved in formation of terminal complex in the respiratory chain that is integral to the production of adenosine triphosphate (ATP). Consequently, cells are unable to use oxygen and ATP which results in cellular dysfunction and death [10, 11]. Interestingly, potassium cyanide (KCN) applied in a small concentration may attenuate myocardial dysfunction and decrease production of reactive oxygen species (ROS) in a model of heart preconditioning [12].

Regarding all above presented statements, the aim of this study was to examine the effects of KCN in a pharmacological model of PostC on the functional recovery and oxidative stress parameters of isolated rat hearts.

2. Materials and Methods

2.1. Ethical Approval. The study was performed in the cardiovascular laboratory of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for the welfare of experimental animals of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac. All experiments were performed according to EU Directive for welfare of laboratory animals (86/609/EEC) and principles of Good Laboratory Practice (GLP).

2.2. Animals. Sixteen male Wistar albino rats (eight weeks old, body weight 200–250 g, obtained from Military Medical Academy, Belgrade, Serbia) were subjected to the study's protocol. Rats were housed with a temperature adjusted to $22 \pm 2^\circ\text{C}$ with 12:12 light/dark cycle. They consumed

commercial rat food (20% protein rat food, Veterinary Institute Subotica, Serbia) and tap water ad libitum.

2.3. Preparation of Isolated Rat Hearts. The hearts of male Wistar albino rats, divided into the control and KCN group (8 in each group), were excised and retrogradely perfused according to *Langendorff* technique (Experimetria Ltd., 1062 Budapest, Hungary). After a short-term narcosis induced by intraperitoneal application of ketamine (10 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg) and premedication with heparin as an anticoagulant, animals were sacrificed by cervical dislocation (schedule 1 of the Animals (Scientific Procedures) Act 1986, UK). After urgent thoracotomy and rapid cardiac arrest by superfusion with ice-cold isotonic saline, the hearts were rapidly excised; the aortas were cannulated and retrogradely perfused under a constant perfusion pressure (CPP) of 70 cm H_2O . The composition of the nonrecirculating Krebs-Henseleit perfusate was as follows (mmol/L): NaCl 118, KCl 4.7, $CaCl_2 \times 2H_2O$ 2.5, $MgSO_4 \times 7H_2O$ 1.7, $NaHCO_3$ 25, KH_2PO_4 1.2, glucose 11, and pyruvate 2, equilibrated with 95% O_2 plus 5% CO_2 and warmed to 37°C (pH 7.4).

2.4. Physiological Assay and Experimental Protocol. All study groups underwent 30 minutes of perfusion at a CPP of 70 cm H_2O (period of stabilisation). In the control group, after the stabilisation period, the hearts were subjected to global ischemia (perfusion was totally stopped) for 5 minutes, followed by 5 minutes of reperfusion. In the KCN group, after the stabilisation period, the hearts underwent global ischemia lasting for 5 minutes and then submitted to 5 minutes of reperfusion with 10 $\mu\text{mol/L}$ KCN [13].

After placing the sensor (transducer BS473-0184, Experimetria Ltd., Budapest, Hungary) in the left ventricle, the following parameters of myocardial function have been measured during stabilisation and during reperfusion: maximum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt max), minimum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt min), systolic left ventricular pressure (SLVP), diastolic left ventricular pressure (DLVP), and heart rate (HR). Coronary flow (CF) was measured flowmetrically in specific points of interest in the control group—at the end of stabilisation, in the first minute of reperfusion (R1), and in the last minute of reperfusion (R2)—and in the KCN group—at the end of stabilisation, in the first minute of reperfusion (R1), and in the last minute of reperfusion (R2). The average heart weight in the control group and the KCN group was very similar (control group— 1.1 ± 0.02 , KCN group— 1.06 ± 0.09).

The following oxidative stress parameters were determined spectrophotometrically (Shimadzu UV-1800, Japan) using collected samples of the coronary venous effluent: the index of lipid peroxidation, measured as thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), nitrite (NO_2^-), levels of superoxide anion radical (O_2^-), and hydrogen peroxide (H_2O_2).

2.5. Determination of the Index of Lipid Peroxidation Measured as TBARS. The degree of lipid peroxidation in the coronary venous effluent was estimated by measuring

TBARS, using 1% thiobarbituric acid in 0.05 NaOH, which was incubated with the coronary effluent at 100°C for 15 min and measured at 530 nm. Krebs–Henseleit solution was used as a blank probe [14].

2.6. Nitrite Determination (NO_2^-). Nitric oxide (NO) decomposes rapidly to form stable nitrite/nitrate products. The NO_2^- level was measured and used as an index of NO production, using Griess’s reagent. A total of 0.5 mL of perfusate was precipitated with 200 μL of 30% sulphosalicylic acid, vortexed for 30 min and centrifuged at 3000 \times g. Equal volumes of the supernatant and Griess’s reagent (containing 1% sulphanilamide in 5% phosphoric acid/0.1% naphthalene ethylenediamine-dihydrochloride) were added, incubated for 10 min in the dark, and measured at 543 nm. NO_2^- levels were calculated using sodium nitrite as the standard [15].

2.7. Superoxide Anion Radical Determination (O_2^-). O_2^- levels were measured at 530 nm via a nitro blue tetrazolium reaction in TRIS buffer with coronary venous effluent. Krebs–Henseleit solution was used as a blank probe [15].

2.8. Hydrogen Peroxide Determination (H_2O_2). The measurement of H_2O_2 was based on the oxidation of phenol red by H_2O_2 in a reaction catalyzed by horseradish peroxidase [16]. Two hundred microlitres of perfusate was precipitated using 800 mL of freshly prepared phenol red solution; 10 μL of (1:20) horseradish peroxidase (made immediately before use) was subsequently added. For the blank probe, an adequate volume of Krebs–Henseleit solution was used instead of coronary venous effluent. The level of H_2O_2 was measured at 610 nm.

2.9. Catalase Activity Determination. After accomplishing the experiments, the hearts from all animals were frozen at -80°C , and then a 0.5 section of each tissue was homogenized in 5 mL phosphate buffer pH 7.4 using an electrical homogenizer, on ice. Afterwards, tissue homogenates were centrifuged at 1200 \times g for 20 min at 4°C . The resulting supernatants were isolated and stored at -80°C until determination of catalase (CAT) activity. CAT activity was determined according to Aebi. Diluted homogenate of heart tissue (1:7 *v/v*) was treated with chloroform ethanol (0.6:1 *v/v*). CAT buffer, prepared samples, and 10 mM H_2O_2 were used for determination. Detection was performed at 360 nm. The amount of CAT was expressed as U/g tissue [17].

2.10. Expression of Genes in the Heart Tissue. TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer’s instructions was used for isolation of total RNA. Total RNA (μg) was reverse transcribed using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Real-time quantitative PCR was performed using Thermo Scientific Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) and mRNA-specific primers for SOD-1, SOD-2, Bax, Bcl-2, and β -actin as a housekeeping genes (Invitrogen, Carlsbad, CA) (Table 1). PCR reactions were done in a Mastercycler ep realplex (Eppendorf, Hamburg, Germany). Data

TABLE 1: Primers used for qRT-PCR analysis.

β -Actin	gatcagcaagcaggagtacgat	gtaacagtccgctagaagcat
Bax	gctacagggtttcaccaggat	atgttggtgccagttcatcgc
Bcl-2	gcaaagcacatccaataaaagcg	gtacttcatcacgatctccgg
SOD-1	tgaagagaggcatgttggagac	cacacgatcttcaatggacaca
SOD-2	aatcaacagaccaagctaggc	cacaatgtcactcctctccgaa

were analyzed and relative gene expression was calculated according to Schmittgen and Livak [18].

2.11. Immunohistochemistry. After sacrificing, the hearts were extracted, fixated in 10% formaldehyde, and immersed in paraffin. Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) sections, 5 μm thick, were deparaffinized, rehydrated, and treated with citrate buffer (pH 6.0) in a microwave for antigen restoration. Endogenous peroxidase activity was blocked using hydrogen peroxide (3%). Immunohistochemical staining was performed by incubating FFPE tissue sections with primary mouse anti-cytochrome C antibody (338500, Invitrogen, Carlsbad, CA) overnight at room temperature. Staining was visualized by using Expose Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC Kit (ab80436, Abcam, Cambridge, UK). Sections were counterstained with Mayer’s hematoxylin and photomicrographed by light microscope (Olympus BX51, Japan) equipped with a digital camera. Results are presented as a mean count of positive stained cells per field at $\times 40$ magnification [19].

2.12. Drugs. All drugs were purchased from Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Germany.

2.13. Statistical Analysis. IBM SPSS Statistics 20.0 for Windows was used for statistical analysis. Three specific points of interest were statistically analyzed in both groups: the first point was stabilisation (S), the second was the first (R1) and the last points of 5-minute reperfusion period (R2). Descriptive statistics were used to calculate arithmetic mean with dispersion measures (standard deviation (SD) and standard error (SE)). Values were expressed as mean \pm standard error (SE). Distribution of data was checked by Shapiro–Wilk test. Data was analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) and the post hoc Bonferroni test for multiple comparisons. Values of $p < 0.05$ were considered to be statistically significant, while values $p < 0.01$ were considered to be highly statistically significant.

3. Results

3.1. Cardiodynamic Parameters

3.1.1. Maximum Rate of Left Ventricular Pressure Development (dp/dt max). In the control group, parameter dp/dt max was significantly higher at R1 (3192.14 ± 192.74) compared to S (2839.08 ± 250.01). On the other hand, in the KCN group, dp/dt max values at S (2657.08 ± 252.2) and R1 (2645.56 ± 220.2) were similar; however, a statistically significant increase was noticed at R2 (3370.32 ± 210.3)

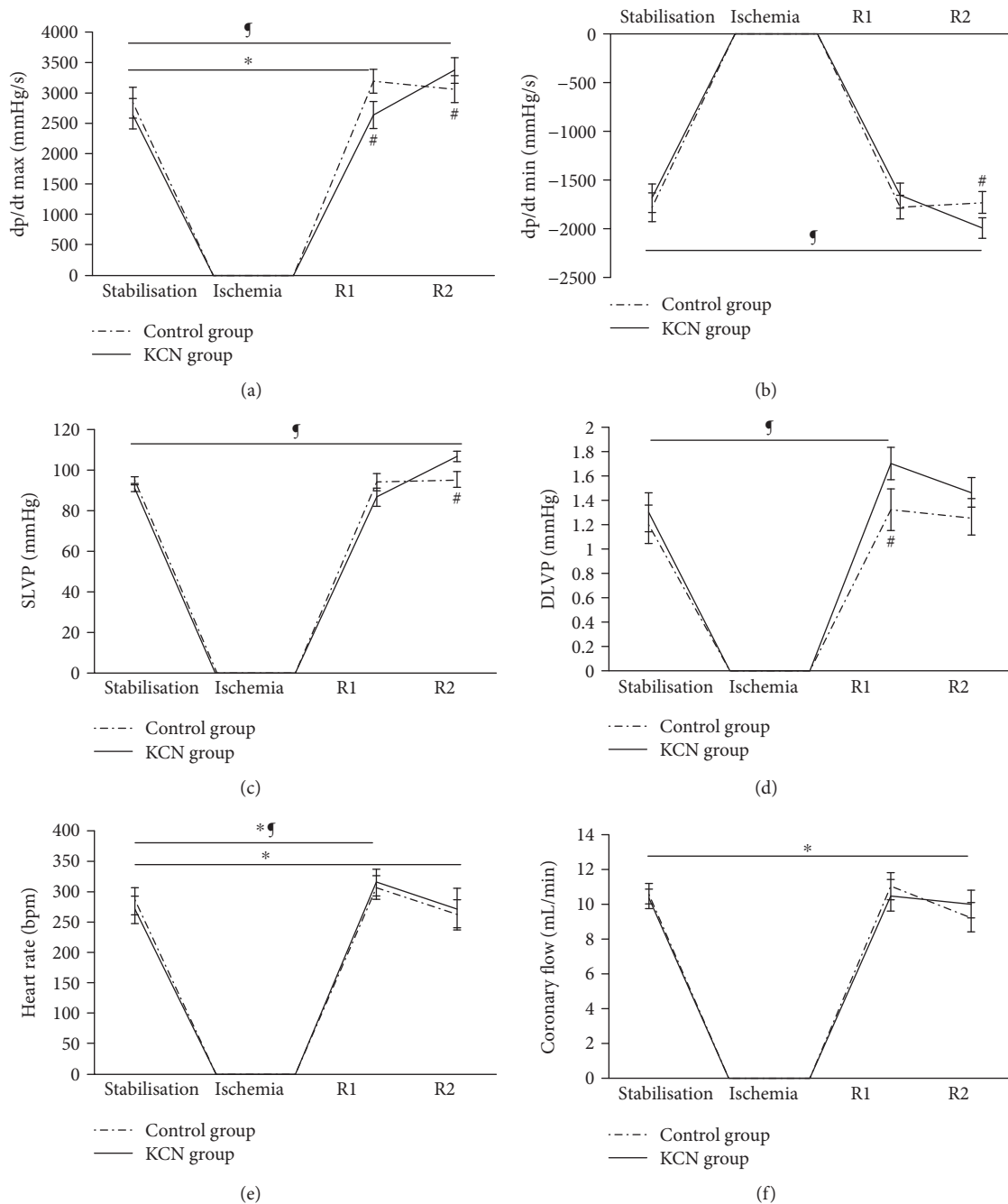


FIGURE 1: Effects of KCN postconditioning on cardiodynamic parameters. (a) Comparison within and between groups in the value of dp/dt max, (b) comparison within and between groups in the value of dp/dt min, (c) comparison within and between groups in the value of SLVP, (d) comparison within and between groups in the value of DLVP, (e) comparison within and between groups in the value of heart rate, and (f) comparison within and between groups in the value of coronary flow. *Statistical significance at the level of $p < 0.05$ within the control group; §statistical significance at the level of $p < 0.05$ within the KCN group; #statistical significance at the level of $p < 0.05$ between the control and KCN groups; data are presented as means \pm SE. R1: first minute of reperfusion; R2: last minute of reperfusion.

compared to S (2657.08 ± 252.2). Additionally, when the control and KCN groups were compared, significantly lower values were noticed in the KCN group at R1 (2645.56 ± 220.2 for KCN versus 3192.14 ± 192.74 for control), while values at R2 were statistically higher in the KCN group (3370.32 ± 210.3 for KCN versus 3063.66 ± 225 for control) (Figure 1(a)).

3.1.2. *Minimum Rate of Left Ventricular Pressure Development (dp/dt min).* Values of dp/dt min parameter did not vary significantly within the control group (-1780.6 ± 145.96 at S versus -1774.88 ± 122 at R1 versus -1730.98 ± 112.70 at R2). On the other hand, within the KCN group, dp/dt min reached more negative values at R2 (-1892.28 ± 103.1) compared to S (-1690.6 ± 145.96). More

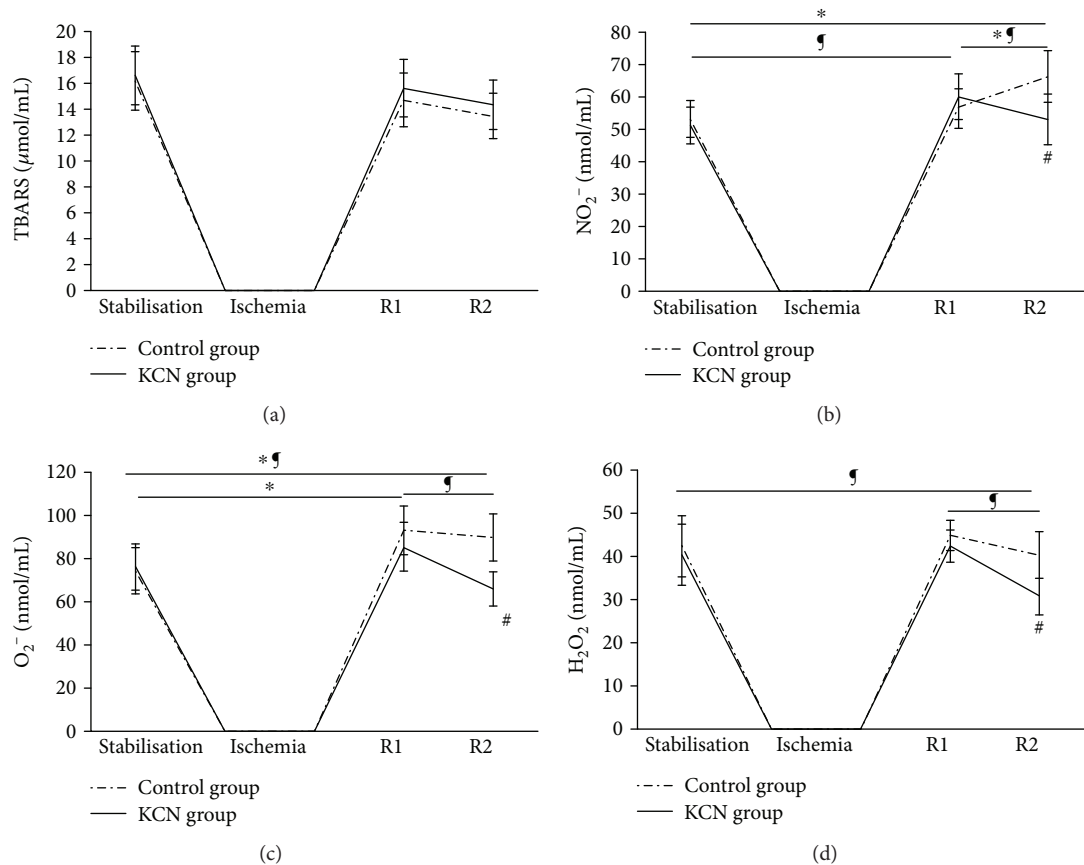


FIGURE 2: Effects of KCN postconditioning on oxidative stress parameters. (a) Comparison within and between groups in the value of TBARS, (b) comparison within and between groups in the value of NO_2^- , (c) comparison within and between groups in the value of O_2^- , and (d) comparison within and between groups in the value of H_2O_2 . *Statistical significance at the level of $p < 0.05$ within the control group; †statistical significance at the level of $p < 0.05$ within the KCN group; #statistical significance at the level of $p < 0.05$ between the control and KCN groups; data are presented as means \pm SE. R1: first minute of reperfusion; R2: last minute of reperfusion.

negative values of the observed parameter were noticed in the KCN group (-1989.28 ± 103.1) in comparison to the control group (-1730.98 ± 112.70) at R2 (Figure 1(b)).

3.1.3. Systolic Left Ventricle Pressure (SLVP). After KCN administration, systolic pressure significantly increased at R2 (106.22 ± 2.24) compared to S (90.79 ± 1.68). Values of SLVP did not change significantly in the control group (94.79 ± 1.68 at S versus 93.92 ± 4.24 at R1 versus 95.1 ± 3.85 at R2), as well as between S (90.79 ± 1.68) and R1 (86.48 ± 4.37) in the KCN group. Comparing R2 between the KCN (106.22 ± 2.24) and control groups (95.1 ± 3.85), significantly higher values of SLVP were noticed in the KCN-treated group (Figure 1(c)).

3.1.4. Diastolic Left Ventricular Pressure (DLVP). DLVP remained unchanged within observed points of interest in the control group (1.2 ± 0.16 at S versus 1.32 ± 0.17 at R1 versus 1.26 ± 0.15 at R2). Values of diastolic pressure significantly increased at R1 (1.7 ± 0.13) in the KCN group compared to S (1.3 ± 0.16). Significant increase of DLVP was noticed in the KCN group at R1 (1.7 ± 0.13) compared to the control group (1.32 ± 0.17) (Figure 1(d)).

3.1.5. Heart Rate (HR). In the control group, HR significantly increased at R1 (307.28 ± 19.46) and then decreased at R2 (264.4 ± 22.91) compared to S (284.7 ± 22.44). In the KCN group, HR was significantly higher at R1 (314.98 ± 21.75) compared to S (270.7 ± 22.4), while there was no difference between R2 (272.24 ± 33.61) and S (Figure 1(e)).

3.1.6. Coronary Flow (CF). A significant drop of CF was observed at R2 (9.2 ± 0.88) compared to S (10.6 ± 0.56) in the control group. On the other hand, in the KCN group, CF remained constant during the experiment (10.3 ± 0.56 at S versus 10.52 ± 0.91 at R1 versus 10 ± 0.79 at R2) (Figure 1(f)).

3.2. Oxidative Stress Parameters

3.2.1. Levels of Index of Lipid Peroxidation (Measured as Thiobarbituric Acid-Reactive Substances (TBARS)). No difference was observed in any point of interest in the level of TBARS, neither in the control group (16.19 ± 2.28 at S versus 14.72 ± 2.06 at R1 versus 13.47 ± 1.76 at R2) nor in the KCN group (16.59 ± 2.28 at S versus 15.6 ± 2.29 at R1 versus 14.32 ± 1.91 at R2) (Figure 2(a)).

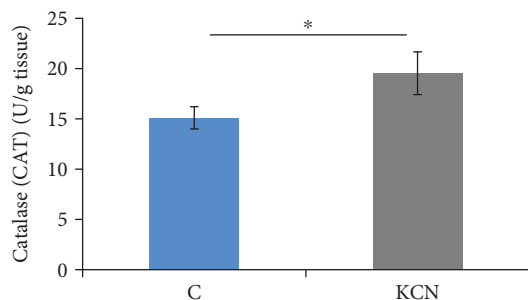


FIGURE 3: Effects of KCN postconditioning on catalase activity in heart tissue. Comparison between the control and KCN groups. *Statistical significance at the level of $p < 0.05$ between the control group and the KCN group; data are presented as means \pm SE.

3.2.2. Levels of Nitrites (NO_2^-). In the control group, there was a significant increase in the level of nitrites at R2 (66.3 ± 7.98) compared to R1 (56.36 ± 6.16) and S (53.14 ± 5.66). While in the group treated with KCN, we observed a significant increase at R1 (60.07 ± 7.03) compared to S (51.14 ± 5.66), while R2 (53.07 ± 1.2) was lower when compared to R1. At R2, a significantly lower level of NO_2^- in the KCN group (53.07 ± 1.2) was noticed compared to that in the control group (66.3 ± 7.98) (Figure 2(b)).

3.2.3. Levels of Superoxide Anion Radical (O_2^-). An increase in O_2^- production at R1 (92.91 ± 11.25) and R2 (89.63 ± 10.83) compared to S (74.17 ± 10.69) was found in the control group. Furthermore, in the KCN group, there was a decrease in the level of O_2^- at R2 (65.84 ± 7.94) compared to S (76 ± 10.69). KCN induced further a significant decline in the level of examined parameter at R2 (65.84 ± 7.94) compared to the control group (89.63 ± 10.83) (Figure 2(c)).

3.2.4. Levels of Hydrogen Peroxide (H_2O_2). Hydrogen peroxide did not vary significantly within points of interest in the control group (42.39 ± 7.06 at S versus 44.88 ± 3.43 at R1 versus 40.3 ± 5.46 at R2). On the other hand, KCN induced a significant drop in H_2O_2 at R2 (30.82 ± 4.29) compared to S (40.39 ± 7.06) and a rise at R1 (42.36 ± 3.72) in comparison to R2. At R2, significantly lower level of H_2O_2 was observed in the KCN group (30.82 ± 4.29) compared to the control group (40.3 ± 5.46) (Figure 2(d)).

3.2.5. Catalase Activity (CAT). Application of KCN induced a significant increase in the activity of catalase (19.5 ± 2.1) when compared to the control group (15.1 ± 1.1) (Figure 3).

3.2.6. Gene Expression in Heart Tissue. Perfusion of the hearts with KCN led to a significant decrease in expression of gene SOD-1 (0.039 ± 0.02) in comparison to the control group (0.074 ± 0.01) (Figure 4(a)). However, KCN did not induce a significant change in gene expression of Bax (0.027 ± 0.01 in the control group versus 0.026 ± 0.003 in the KCN group) (Figure 4(b)), SOD-2 (0.031 ± 0.002 in the control group versus 0.021 ± 0.004 in the KCN group) (Figure 4(c)), and Bcl-2 (0.012 ± 0.006 in the control group versus 0.012 ± 0.005 in the KCN group) (Figure 4(d)), compared to the control group.

3.2.7. Cytochrome c Determination. The mean count of positive stained cells reduced for 73.3% in the KCN group (3.08 ± 2.5) in comparison to the control group (12.42 ± 3.32) (Figure 5).

4. Discussion

Pharmacological PostC is proposed as great and practicable strategy to protect the ischemic heart with the similar protective effect as preconditioning [20]. Due to the unpredictability of clinical acute myocardial infarction, PostC may have greater clinical potential than preconditioning [8]. It has been reported that prolonged ischemia is accompanied by impairment in mitochondrial function, such as a decline in CcO activity [21, 22]. Generation of ROS in ischemic conditions affects the activity of enzymes composing the respiratory chain complexes, thus contributing to cardiac damage [23]. Nevertheless, phosphorylation of CcO and inhibition of its activity, as well as suppression of aerobic respiration and ATP utilization, may be involved in prevention of I/R-induced myocardial dysfunction [12]. In that sense, we hypothesized that KCN, as a selective inhibitor of CcO, may ameliorate the function of the heart which was exposed to I/R, when applied at the very onset of reperfusion. To the best of our knowledge, so far, there are no data regarding the effects of KCN in a pharmacological model of postconditioning and mechanisms responsible for potential benefits in cardioprotection.

Our results clearly show that in the first minute of reperfusion, contractility force and heart rate were increased in control condition, but still, these parameters started to decrease over 5 minutes of reperfusion. A drop in dp/dt max and coronary flow during recovery period indicates that vasculature dilated in accordance with the demands of heart contraction. Impaired coronary flow and heart rate in the control group at the end of reperfusion confirmed that ischemia impairs myocardial function. On the other hand, application of KCN, in the first minute of reperfusion, gradually restored cardiac contractility and systolic function, and as reperfusion continued, they progressively improved, manifested as an increase in dp/dt max and SLVP at the end of the experiment. Additionally, dp/dt min reached more negative values after accomplishing 5 minutes of reperfusion, thus suggesting that KCN also enhanced the lusitropic property of the heart. This agent prevented ischemia-induced decrease in heart rate and coronary flow. In fact, unchanged heart rate enabled sufficient time for the heart to effectively contract.

Most of the studies which examined the effects of KCN on cardiac function were mainly conducted on a model of preconditioning, while literature data referring to its effects in early reperfusion period is lacking. It was previously shown that 0.5 mmol/L KCN in cardioplegic solution enhanced the cardiac function by increasing the pressure and contractility and did not affect coronary flow, which correlates with our results [24]. These authors assumed that increased left ventricular contractility was the consequence of the myocardial norepinephrine release as a stress response and increase of intracellular calcium as well. Other authors

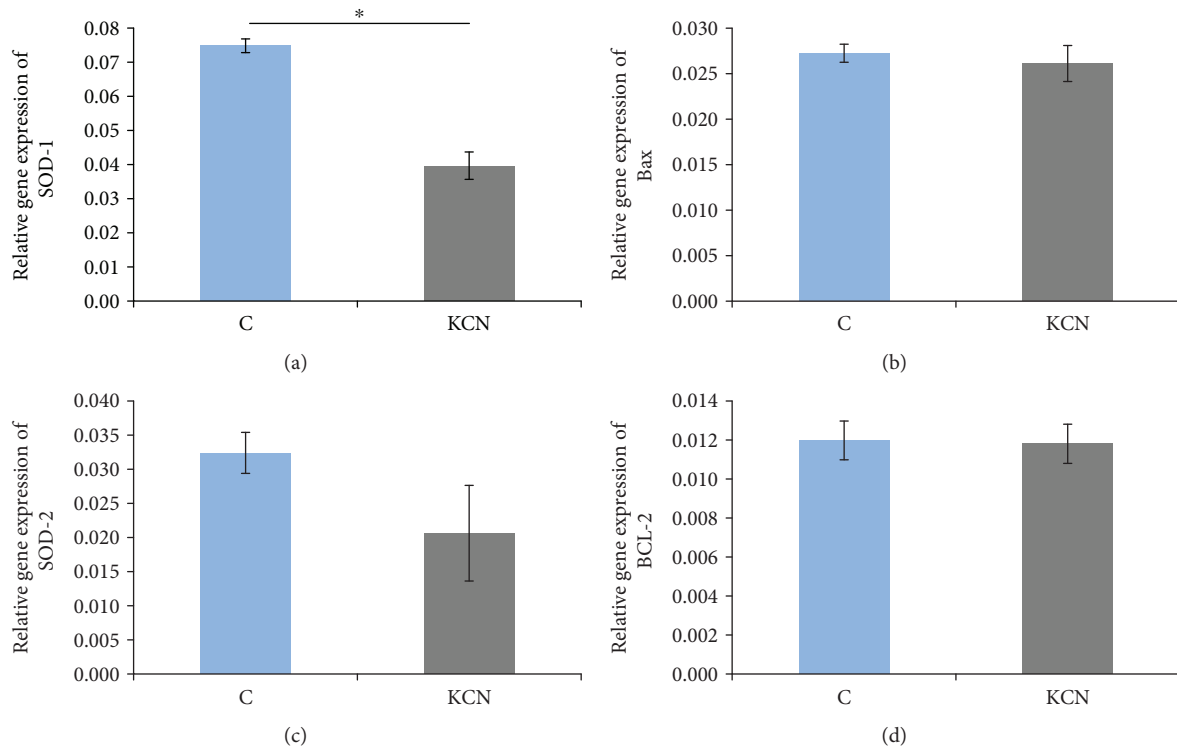


FIGURE 4: Effects of KCN postconditioning on gene expression in heart tissue. (a) Relative expression of SOD-1 gene in the control and KCN groups, (b) relative expression of Bax gene in the control and KCN groups, (c) relative expression of SOD-2 gene in the control and KCN groups, and (d) relative expression of Bcl-2 gene in the control and KCN groups. *Statistical significance at the level of $p < 0.05$ between the control group and the KCN group; data are presented as means \pm SE.

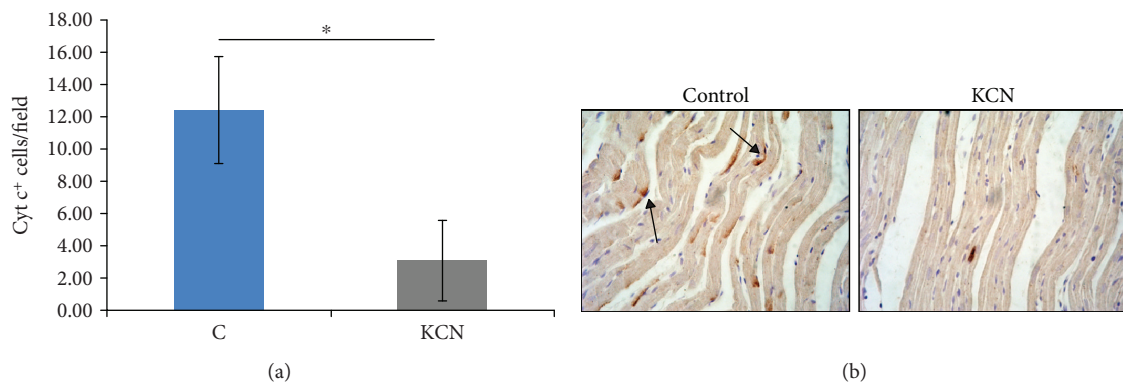


FIGURE 5: Effects of KCN postconditioning on cytochrome c expression in heart tissue. (a) Comparison between the control and KCN groups. *Statistical significance at the level of $p < 0.05$ between the control group and the KCN group; data are presented as means \pm SE. (b) Cytochrome c immunohistochemistry of heart tissues from the control and KCN groups.

also confirmed the cardioprotective effects of KCN, however, in a model of preconditioning [12].

The special focus of our investigation was the role of oxidative stress in the protective effects of KCN in a model of PostC, since overproduction of prooxidants has been reported as a major mechanism underlying I/R injury in the heart [25]. Enhanced production of prooxidants, such as O_2^- and NO_2^- , was noticed in the control group during reperfusion, which was expected since restoration of oxygenated blood flow to the ischemic heart is paradoxically

followed by increased release of ROS and oxidative stress [26]. In addition, I/R with or without KCN perfusion did not affect lipid peroxidation, while generation of H_2O_2 and O_2^- decreased at the end of reperfusion in the KCN-treated group. NO, included in regulation of coronary flow, probably interacted with excessively produced O_2^- , which may explain unchanged values of O_2^- noticed at the beginning of restoration of flow in the KCN group.

O_2^-/H_2O_2 dynamic can not be interpreted independently of the activities of enzymes of antioxidant defense, such as

CAT and SOD. We observed lower expression of SOD-1 gene (CuZnSOD), found to be present in the cytosol, nucleus, and the intermembrane space of mitochondria, in the group treated with KCN [27]. However, acute application of KCN during reperfusion did not significantly affect the expression of SOD-2 (MnSOD) gene located in mitochondria. O_2^- formed in mitochondria may be converted to H_2O_2 either in a spontaneous manner or in a reaction catalyzed by SODs [28, 29]. Another source of O_2^- and H_2O_2 is conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. CAT catalyzes the decomposition of H_2O_2 to water and oxygen, and its higher activity in the KCN group supports a decrease in O_2^- level [28]. Findings of the previously mentioned research suggest that KCN pretreatment induced a dose-dependent decrease in generation of free radicals and improvement in antioxidant capacity [12].

The main source of ROS production is certainly mitochondria, where CcO during ischemic injury contributes 30–35% of total prooxidant formation [20, 29]. This enzyme is responsible for transferring electrons from cytochrome c to O_2^- , and under physiological conditions, activity of CcO reflects an oxidative capacity of the cells [11, 30]. We measured expression of cytochrome c in heart tissue and showed a reduction of 75% in the KCN group (Figure 5). I/R damage, mediated by CcO hyperactivity and increased ROS production, is also followed by release of cytochrome c from mitochondria to cytosol, which initiates apoptosis and cell death [31, 32]. So, decrease of cytochrome c expression reflects decline in CcO activity, which correlates with our results. Since increased production of O_2^- leads to enhanced activity of SOD, a drop in O_2^- may explain the absence of change or a decrease in gene expression for SODs in the KCN group [33]. Additionally, it has been reported that CcO reduces NO_2 to NO under hypoxic conditions, and inhibition of CcO may be a reason for high levels of nitrites detected during the first minute of reperfusion after KCN perfusion [34]. Taking into consideration that modulation of CcO activity may alleviate myocardial injury and increased oxidative stress, we may assume that observed effects of KCN in our investigations are attributed to lowering cytochrome c expression [21].

Five minutes of ischemia is not sufficient to induce myocardial necrosis, and in fact, all observed positive effects of KCN in our investigation are not attributed to a reduction of infarct size [13]. Reperfusion of ischemic heart stimulates opening of the mitochondrial permeability transition pores and leads to a mitochondrial release of cytochrome c, which is considered as one of the imperative events involved in apoptosis in these conditions [35]. Cardiomyocyte apoptosis in I/R leads to a further impairment of myocardial function and agents able to suppress it may significantly contribute to minimization of cardiac injury [36]. We investigated expression of apoptosis suppressor gene Bcl-2 and proapoptotic Bax gene after KCN application; however, this agent did not significantly affect gene expression [37].

Besides the fact that the protective effects of pharmacological PostC on myocardial function have been proven so far, it should not be forgotten that comorbidities and chronic therapy in humans may affect the signaling pathways

included in preserving myocardial function [38]. This study may be a starting point for further researches which would fully clarify the effects of KCN on cardiac function in different models of PostC.

5. Conclusion

Based on our results, we may conclude that KCN led to the improvement of functional recovery of cardiac contractility and systolic and diastolic function when applied during the period of reperfusion. Additionally, KCN application was associated with the less production of prooxidants, which indicates alleviation of oxidative stress as one of the possible mechanisms through which KCN triggers cardioprotection during I/R injury. It is certainly necessary to further examine all possible mechanisms and potential adverse effects, but for now, KCN has shown promising effects on acute myocardial infarction as a pharmacological PostC agent.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Conflicts of Interest

The authors have declared no conflict of interest.

References

- [1] D. J. Hausenloy and D. M. Yellon, "Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 123, no. 1, pp. 92–100, 2013.
- [2] D. J. Hausenloy, A. Tsang, and D. M. Yellon, "The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning," *Trends in Cardiovascular Medicine*, vol. 15, no. 2, pp. 69–75, 2005.
- [3] J. Vinten-Johansen, D. M. Yellon, and L. H. Opie, "Postconditioning: a simple, clinically applicable procedure to improve revascularization in acute myocardial infarction," *Circulation*, vol. 112, no. 14, pp. 2085–2088, 2005.
- [4] Z. Q. Zhao, J. S. Corvera, M. E. Halkos et al., "Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning," *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 285, no. 2, pp. H579–H588, 2003.
- [5] G. Heusch, "Treatment of myocardial ischemia/reperfusion injury by ischemic and pharmacological postconditioning," *Comprehensive Physiology*, vol. 5, no. 3, pp. 1123–1145, 2015.
- [6] J. Vinten-Johansen, Z. Q. Zhao, A. J. Zatta, H. Kin, M. E. Halkos, and F. Kerendi, "Postconditioning—a new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury," *Basic Research in Cardiology*, vol. 100, no. 4, pp. 295–310, 2005.
- [7] W. Shi and J. Vinten-Johansen, "Endogenous cardioprotection by ischaemic postconditioning and remote conditioning," *Cardiovascular Research*, vol. 94, no. 2, pp. 206–216, 2012.
- [8] I. Andreadou, E. Iliodromitis, M. Koufaki, and D. Kremastinos, "Pharmacological pre- and post-

- conditioning agents: reperfusion-injury of the heart revisited," *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, vol. 8, no. 9, pp. 952–959, 2008.
- [9] R. KLONER and S. REZKALLA, "Preconditioning, postconditioning and their application to clinical cardiology," *Cardiovascular Research*, vol. 70, no. 2, pp. 297–307, 2006.
- [10] L. Nelson, "Acute cyanide toxicity: mechanisms and manifestations," *Journal of Emergency Nursing*, vol. 32, no. 4, pp. S8–11, 2006.
- [11] S. Srinivasan and N. G. Avadhani, "Cytochrome *c* oxidase dysfunction in oxidative stress," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 53, no. 6, pp. 1252–1263, 2012.
- [12] Z. Yang, Z. Duan, T. Yu, J. Xu, and L. Liu, "Inhibiting cytochrome *c* oxidase leads to alleviated ischemia reperfusion injury," *Korean Circulation Journal*, vol. 47, no. 2, pp. 193–200, 2017.
- [13] J. Dow, A. Bhandari, and R. A. Kloner, "The mechanism by which ischemic postconditioning reduces reperfusion arrhythmias in rats remains elusive," *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, vol. 14, no. 2, pp. 99–103, 2009.
- [14] H. Ohkawa, N. Ohishi, and K. Yagi, "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction," *Analytical Biochemistry*, vol. 95, no. 2, pp. 351–358, 1979.
- [15] L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum, "Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids," *Analytical Biochemistry*, vol. 126, no. 1, pp. 131–138, 1982.
- [16] C. Auclair and E. Voisin, "Nitroblue tetrazolium reduction," in *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, R. A. Greenvald, Ed., pp. 123–132, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1985.
- [17] H. Aebi, "Catalase in vitro," in *Methods in Enzymology*, L. Packer, Ed., pp. 121–126, Academic Press, San Diego, CA, USA, 1984.
- [18] T. D. Schmittgen and K. J. Livak, "Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method," *Nature Protocols*, vol. 3, no. 6, pp. 1101–1108, 2008.
- [19] N. Jovicic, I. Jeftic, I. Jovanovic et al., "Differential immunometabolic phenotype in Th1 and Th2 dominant mouse strains in response to high-fat feeding," *PLoS One*, vol. 10, no. 7, article e0134089, 2015.
- [20] D. J. Hausenloy and D. M. Yellon, "Preconditioning and postconditioning: underlying mechanisms and clinical application," *Atherosclerosis*, vol. 204, no. 2, pp. 334–341, 2009.
- [21] S. K. Prabu, H. K. Anandatheerthavarada, H. Raza, S. Srinivasan, J. F. Spear, and N. G. Avadhani, "Protein kinase A-mediated phosphorylation modulates cytochrome *c* oxidase function and augments hypoxia and myocardial ischemia-related injury," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 4, pp. 2061–2070, 2006.
- [22] Q. Yu, T. Nguyen, M. Ogbi, R. W. Caldwell, and J. A. Johnson, "Differential loss of cytochrome-*c* oxidase subunits in ischemia-reperfusion injury: exacerbation of COI subunit loss by PKC- ϵ inhibition," *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, vol. 294, no. 6, pp. H2637–H2645, 2008.
- [23] T. Ide, H. Tsutsui, S. Hayashidani et al., "Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction," *Circulation Research*, vol. 88, no. 5, pp. 529–535, 2001.
- [24] D. Shackebe, "Effect of cyanide in cardioplegic solution on isolated rat heart function," *Medical Journal of The Islamic Republic of Iran*, vol. 14, no. 4, pp. 373–378, 2001.
- [25] D. Morin, R. Assaly, S. Paradis, and A. Berdeaux, "Inhibition of mitochondrial membrane permeability as a putative pharmacological target for cardioprotection," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 16, no. 33, pp. 4382–4398, 2009.
- [26] Q. Chen, S. Moghaddas, C. L. Hoppel, and E. J. Lesnfsky, "Ischemic defects in the electron transport chain increase the production of reactive oxygen species from isolated rat heart mitochondria," *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 294, no. 2, pp. C460–C466, 2008.
- [27] I. M. Stojic, V. I. Zivkovic, I. M. Srejavic et al., "Cisplatin and cisplatin analogues perfusion through isolated rat heart: the effects of acute application on oxidative stress biomarkers," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 439, no. 1–2, pp. 19–33, 2018.
- [28] J. F. Turrens, "Mitochondrial formation of reactive oxygen species," *The Journal of Physiology*, vol. 552, no. 2, pp. 335–344, 2003.
- [29] M. P. Murphy, "How mitochondria produce reactive oxygen species," *The Biochemical Journal*, vol. 417, no. 1, pp. 1–13, 2009.
- [30] S. Shimada, K. Shinzawa-Itoh, J. Baba et al., "Complex structure of cytochrome *c*-cytochrome *c* oxidase reveals a novel protein-protein interaction mode," *The EMBO Journal*, vol. 36, no. 3, pp. 291–300, 2017.
- [31] M. Hüttemann, S. Helling, T. H. Sanderson et al., "Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: cytochrome *c* oxidase and cytochrome *c* in ischemia/reperfusion injury and inflammation," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1817, no. 4, pp. 598–609, 2012.
- [32] A. Andreyev, P. Tamrakar, R. E. Rosenthal, and G. Fiskum, "Calcium uptake and cytochrome *c* release from normal and ischemic brain mitochondria," *Neurochemistry International*, vol. 117, pp. 15–22, 2018.
- [33] R. Rokytka, V. Holecek, I. Pekárkova et al., "Free radicals after painful stimulation are influenced by antioxidants and analgesics," *Neuro Endocrinology Letters*, vol. 24, no. 5, pp. 304–309, 2003.
- [34] P. R. Castello, P. S. David, T. McClure, Z. Crook, and R. O. Poyton, "Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes," *Cell Metabolism*, vol. 3, no. 4, pp. 277–287, 2006.
- [35] G. X. Zhang, S. Kimura, K. Murao, K. Obata, H. Matsuyoshi, and M. Takaki, "Inhibition of cytochrome *c* release by 10-*N*-nonyl acridine orange, a cardiolipin-specific dye, during myocardial ischemia-reperfusion in the rat," *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, vol. 298, no. 2, pp. H433–H439, 2010.
- [36] C. M. Li, S. W. Shen, T. Wang, and X. H. Zhang, "Myocardial ischemic post-conditioning attenuates ischemia reperfusion injury via PTEN/Akt signal pathway," *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, vol. 8, no. 9, pp. 15801–15807, 2015.

- [37] L. Zhang, J. Yu, B. H. Park, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein, "Role of *BAX* in the apoptotic response to anticancer agents," *Science*, vol. 290, no. 5493, pp. 989–992, 2000.
- [38] C. Tanaka-Esposito, Q. Chen, and E. J. Lesnefsky, "Blockade of electron transport before ischemia protects mitochondria and decreases myocardial injury during reperfusion in aged rat hearts," *Translational Research*, vol. 160, no. 3, pp. 207–216, 2012.



Impact of the hyperbaric oxygen therapy on the redox status in the patients with systemic lupus erythematosus

Uticaj hiperbarične oksigenoterapije na redoks status bolesnika sa sistemskim eritemskim lupusom

Milorad Rabrenović*, Tamara Nikolić†, Violeta Rabrenović‡§, Jovana Bradić†, Saša Trešnjić*, Anica Petković†, Biljana Jakovljević||, Siniša Mašić||, Dubravko Bokonjić§¶

Military Medical Academy, *Center of Hyperbaric Medicine, †Clinic of Nephrology, ‡Institute of Hygiene, Military Medical Academy, §Poisoning Control Center, Belgrade, Serbia; University of Kragujevac, Faculty of Medical Science, †Department of Pharmacy, Kragujevac, Serbia; University of Defence, §Faculty of Medicine of the Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

Abstract

Background/Aim. Hyperbaric oxygen therapy (HBOT) is a method which increases oxygen solubility in plasma up to 20 times. This effect is very important in the treatment of circulatory disorders, which reduces oxygenation and leads to increased production of inflammatory mediators and free oxygen radicals. The aim of this study was to examine the impact of HBOT on the oxidative stress parameters in the patients with systemic lupus erythematosus (SLE). **Methods.** This prospective study included 18 females with SLE [American College of Rheumatology (ACR) criteria], average age 52.2 ± 8.82 years, treated with HBOT for 60 min/day, with average partial oxygen pressure of 2.2 atmospheres absolute (ATA), during 10 days, in combination with appropriate medication therapy for SLE. The following parameters were determined in the serum: C-reactive protein (CRP), hemoglobin, creatinine, albumin, complement 3 (C3), antinuclear antibodies (ANA), glomerular filtration rate (GFR) using the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) formula. In the urine, parameters of oxidative stress were spectrophotometrically determined: levels of superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), nitrites (NO_2^-) and concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). In hemolysate, the pa-

rameters of antioxidant protection: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and reduced glutathione (GSH), were measured. The samples for the analysis were collected three times: before HBOT (initial values), after 10 days of HBOT and 1 month after beginning the treatment in relation to the initial value. **Results.** We noticed a statistically significant ($p < 0.05$) decrease in a level of $O_2^{\bullet-}$, both after 10 days and after 1 month of HBOT (8.26 ± 13.62 ; 8.39 ± 4.94 ; 11.92 ± 6.86 nmol/mL, respectively). Values of other parameters of oxidative stress such as NO_2^- , TBARS and H_2O_2 showed no significant difference during the monitored period. Regarding the parameters of antioxidant protection, we revealed slightly higher value of GSH after treatment (initial value: 66.34 ± 16.31 ; after 10 days of HBOT 79.43 ± 36.77 ; after 1 month of HBOT 69.72 ± 22.32 μ mol/mL red blood cells) which was held after a month, but it was not statistically significant. Activity of SOD and CAT, before and after HBOT, did not change significantly. **Conclusion.** Our results suggested the potential beneficial effects of HBOT on redox status in the patients with SLE by decreasing the levels of $O_2^{\bullet-}$.

Key words: hyperbaric oxygenation; lupus erythematosus; oxidation-reduction; oxidative stress.

Apstrakt

Uvod/Cilj. Hiperbarična oksigenoterapija (HBOT) je metoda kojom se rastvorljivost kiseonika u plazmi povećava i do 20 puta. Taj efekat je veoma značajan u terapiji poremećaja cirkulacije koji smanjuju oksigenaciju i dovode do povećanja produkcije medijatora zapaljenja i slobodnih kiseo-

ničkih radikala. Cilj ove studije bio je da se ispita uticaj HBOT na parametre oksidativnog stresa kod bolesnika sa sistemskim eritemskim lupusom (SLE). **Metode.** Prospektivnom studijom obuhvaćeno je 18 bolesnika sa SLE (kriterijumi Američkog koledža za reumatologiju) prosečne starosti $52,2 \pm 8,82$ godina, koje su tretirane HBOT u trajanju od 60 min/dan, pri pritisku od 2,2 apsolutne atmosfere (ATA),

ukupno 10 dana, u kombinaciji sa odgovarajućom terapijom za SLE. U serumu su određivani sledeći parametri: C-reaktivni protein (CRP), hemoglobin, kreatinin, albumin, komplement 3 (C3), antinuklearna antitela (ANA), stopa glomerularne filtracije (GFR korišćenjem *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI) formule. U urinu su spektrofotometrijski određivani parametri oksidacionog stresa: nivo superoksid anjon radikala ($O_2^{\bullet-}$), vodonik peroksida (H_2O_2), nitrita (NO_2^-) i koncentracija reaktivnih produkata tiobarbituratne kiseline (TBARS). U hemolizatu, određivani su parametri antioksidativne zaštite: aktivnost superoksid dismutaza (SOD), katalaze (CAT) i redukovani glutation (GSH). Uzorci za analize su sakupljeni tri puta: pre HBOT (inicijalne vrednosti), nakon 10 dana HBOT i nakon mesec dana terapije. **Rezultati.** Uočili smo statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje nivoa $O_2^{\bullet-}$ nakon 10 dana, kao i nakon mesec dana od početka HBOT u odnosu na inicijal-

nu vrednost ($8,26 \pm 13,62$; $8,39 \pm 4,94$ $11,92 \pm 6,86$; nmol/mL, redom). Nisu pokazane značajne razlike u vrednostima ostalih parametara oksidativnog stresa kao što su NO_2^- , TBARS i H_2O_2 tokom posmatranog perioda. Što se tiče parametara antioksidativne zaštite, otkrili smo nešto veću vrednost GSH nakon tretmana (inicijalno $66,34 \pm 16,31$; posle 10 dana $79,43 \pm 36,77$; posle mesec dana tretmana $69,72 \pm 22,32$ $\mu\text{mol/mL}$ eritrocita), koja se održala nakon mesec dana, ali nije bila statistički značajna. Aktivnost SOD i CAT, pre i posle HBOT, nije se statistički značajno menjala. **Zaključak.** Naši rezultati ukazuju na povoljan efekat HBOT na redoks ravnotežu kod bolesnika sa SLE zbog sniženja nivoa $O_2^{\bullet-}$.

Ključne reči:
hiperbarična oksigenacija; lupus, eritematozni, sistemski; oksidoredukcija; stres, oksidativni.

Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a very serious autoimmune inflammatory disease, with an unpredictable course and outcome, whose etiology remains largely unknown and the effects of conservative treatment are limited¹. Human and animal studies indicate that oxidative stress is involved in the pathogenesis of SLE. Excessive production of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), including peroxynitrite- $ONOO^-$, can damage lipids, proteins and DNA and products of oxidative modification can be detected in biological fluids². The abundance of those products correlates with disease activity in the SLE patients, suggesting oxidative modification acts as a biomarker³⁻⁵. While several studies implicate nitric oxide as an important mediator of disease in the SLE^{6,7}, there is a lack of data revealing the association between the level of urine nitrite and citrulline levels, as surrogate markers of nitrogen monoxide (NO) production, and disease activity among the patients with SLE⁸. Also, previous data suggested that lipid peroxidation could be a risk factor for endothelial dysfunction in some autoimmune diseases⁹.

Hyperbaric oxygen therapy (HBOT) is a treatment modality in which a person breathes 100% O_2 intermittently while exposed to increased atmospheric pressure, greater than 1 atmosphere, absolute (ATA) usually 2 to 2.5 ATA¹⁰. The primary mechanisms of action include hyperoxygenation and a decrease in bubble size, or vasoconstriction, angiogenesis, fibroblast proliferation, oxidative leukocyte degradation, toxin inhibition and antibiotic synergy^{11,12}. Hyperbaric oxygen may be used as the primary therapy intervention in some conditions, such as carbon monoxide poisoning, decompression sickness and arterial gas embolism, arterial insufficiencies, cardiovascular diseases, osteomyelitis and as an adjunctive therapy for wound healing¹³⁻¹⁵. The HBOT showed to have the beneficial effects on hypoxic diabetic ulcers that result in severe wound-healing problems and osteoradionecrosis and is frequently used for necrotic soft tissues and bone that fails to heal. The HBOT also induces signifi-

cant angiogenesis, which in one study was measurable after the eight HBOT sessions. Previous clinical studies revealed that vasculitis skin ulcers in the patient suffering from SLE was treated successfully with the HBOT¹⁶⁻¹⁸. There are not many studies that examined effects of HBOT on redox homeostasis and inflammation in the patients with SLE.

Given the fact that the HBOT can modify oxidation-reduction reactions, the aim of our study was to establish an influence of hyperbaric oxygenation on the oxidative stress parameters and antioxidant enzymes activity in the patients with SLE.

Methods

This prospective study included 18 females with SLE, treated with the HBOT once a day for 60 min (total 10 days) with the average partial oxygen pressure of 2.2 ATA, in combination with an appropriate therapy for SLE. The study protocol was approved by the Institutional Ethics Committee (Military Medical Academy Belgrade, Serbia) and the study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All the participants were informed about the research protocol before giving their written consent to participate in the study.

All patients were admitted to the Military Medical Academy, Belgrade, Serbia from October 2011 to December 2014, with a diagnosis of SLE. In order to define a severity of the disease course in this study, the original 1997 American College of Rheumatology (ACR) classification of SLE was used^{18,19}. At the beginning of study, all participants were in the similar stage of the disease, in remission [Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) score 0.30 ± 0.47]. The exclusion criteria were: the pregnant women with SLE, the patients with urinary infection (positive urine culture), with renal insufficiency (creatinine clearance < 60 mL/min), the presence of malignancy, the patients with any other ongoing inflammatory process, or under 18 years of age. The patients who were on immunosuppressive therapy such as mycophenolate mofetil, cyclophosphamide and other cytotoxic agents, were excluded. The only therapy, that the patients took, was the corticosteroids (the maintenance dose of 5 mg).

All patients with any contraindication for the HBOT were also excluded. All participants were non-smokers and did not take any antioxidant dietary supplement for 1 month before the study. Before beginning the HBOT, all participants passed a standard medical and physical revision at the hospital. During the study period no patient was eliminated.

Hyperbaric oxygen therapy

The HBOT was performed at The Center for Hyperbaric Medicine, Military Medical Academy in Belgrade, Serbia. The HBOT consisted of 10 sessions (1 session a day/5 days a week) in a multiplace (10-person) hyperbaric chamber. In total 60 min of 100% medical oxygen was administered to the patients under the increased pressure of 2.2 ATA during a 70-min hyperbaric session. At this pressure, 100% oxygen was delivered via an oronasal mask in two episodes of 30 min, each interrupted by 5 min of air breathing. During the pressure changes, great care was taken to avoid barotraumas, particularly of the middle ear, which is the most common side-effect of a hyperbaric treatment. All patients tolerated the treatment well without any complications.

Biochemical analysis

The samples for biochemical analysis were collected three times: before the HBOT (initial values), after 10 days of the HBOT (2 hours after the last HBOT session) and after 1 month. The following parameters were determined in the blood serum samples: C-reactive protein (CRP), hemoglobin (Hb), creatinine, albumin, complement 3 (C3), antinuclear antibodies (ANA), glomerular filtration rate (GFR using the CKD-EPI formula). In the urine samples, the following parameters of the redox status were spectrophotometrically determined: levels of superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), nitrites (NO_2^-) and concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The parameters of antioxidant protection were measured in the blood samples: activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) and level of reduced glutathione (GSH).

Superoxide anion radical determination

The level of $O_2^{\bullet-}$ was measured using nitro blue tetrazolium (NBT) reaction in TRIS-buffer combined with the urine samples and read at 530 nm²⁰.

Hydrogen peroxide determination

The protocol for measurement of H_2O_2 is based on oxidation of phenol red in the presence of horseradish peroxidase²¹. The 200 μ L sample with 800 μ L of phenol red solution (PRS) and 10 μ L of Horseradish Peroxidase (HRP) were combined (1 : 20). The level of H_2O_2 was measured at 610 nm.

Nitric oxide determination

Nitric oxide (NO) decomposes rapidly to form the stable metabolite nitrite/nitrate products. NO_2^- was determined as an index of nitric oxide production with the Griess re-

agent²². 0.1 mL of 3 N Perchloride acid (PCA), 0.4 mL 20 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and 0.2 mL urine were put on ice for 15 min, then centrifuged 15 min at 6,000 rpm. After pouring off the supernatant, 220 μ L of K_2CO_3 was added. Nitrites were measured at 550 nm. Distilled water was used as a blank probe.

Determination of concentration of thiobarbituric acid reactive substances

The degree of lipid peroxidation in urine was estimated by measuring concentration of TBARS using 1% thiobarbituric acid (TBA) in 0.05 NaOH, incubated with urine at 100 °C for 15 min and read at 530 nm. Distilled water was used as a blank probe. The TBA extract was obtained by combining 0.8 mL of urine and 0.4 mL of trichloro-acetic acid (TCA), then the samples were put on ice for 10 min and centrifuged for 15 min at 6,000 rpm. This method was described previously²³.

Preparation of hemolysate

The blood samples were taken from the antecubital vein into vacutainer test tube containing sodium citrate anticoagulant. Blood was centrifuged to separate plasma and red blood cells (RBCs). Isolated RBCs were washed 3 times with 3 vol. of ice cold 0.9 mmol/L NaCl. The blood samples were stored immediately and kept for further analyses²⁴.

Determination of antioxidant enzymes catalase and superoxide dismutase

Hemolysates containing about 50 g Hb/L prepared according to McCord and Fridovich²⁴ were used to determine the CAT activity which was expressed in U/gHb \times 1,000. The CAT activity was determined according to Beutler²⁵. Lysates were diluted with distilled water (1:7 v/v) and treated with chloroform-ethanol (0.6:1 v/v) to remove hemoglobin. Then 50 μ L of CAT buffer, the 100 μ L of sample, and 1 mL of 10 mM H_2O_2 were added to the samples. Detection was performed at 360 nm. Distilled water was used as a blank probe. The SOD activity was determined by the epinephrine method of Misra and Fridovich²⁶ and it was expressed in U/gHb \times 1,000. A hundred μ L of lysate and 1 mL carbonate buffer were mixed, and then 100 μ L of epinephrine was added. Detection was performed at 470 nm.

Determination of reduced glutathione

A level of GSH was determined spectrophotometrically, and it was based on GSH oxidation via 5,5-dithiobis-6,2-nitrobenzoic acid. The GSH extract was obtained by combining 0.1 mL 0.1 % EDTA, 400 μ L haemolysate, and 750 μ L precipitation solution (containing 1.67 g metaphosphoric acid, 0.2 g EDTA, 30 g NaCl, and filled with distilled water until 100 mL; the solution was stable for 3 weeks at +4 °C). After mixing in the vortex machine and extraction on cold ice (15 min), it was centrifuged on 4,000 rpm (10 min). Distilled water was used as a blank probe. Measuring was performed at 420 nm. The concentration is expressed as micro-moles per mL of RBCs^{25, 27}.

Statistical analysis

In case of continuous data, the variables were presented as the mean value \pm standard deviation (SD). The Kolmogorov-Smirnov test was used for evaluation of distribution of biochemical data. A statistical significance between the groups was tested by the Friedman (repeated measure) test (post hoc Wilcoxon test). All the analyses were estimated at $p < 0.05$ level of statistical significance. A complete statistical analysis of data was done by the statistical software package, SPSS Statistics 18.

Results

A total of 18 women, the average age 52.22 ± 8.82 years, were enrolled in the study. The patients presented SLE

with an average time without symptoms of healing of 20.2 ± 5.0 months when they underwent the HBOT.

The values of the serum parameters such as CRP, Hb, creatinine, albumin, C3, ANA, chronic kidney disease estimated (CKD eGFR), were not statistically significantly different when compared the initial values, with the values after 10 days and after a month of the therapy (Table 1).

Levels of superoxide anion radical

We noticed a statistically significant decreased ($p < 0.05$) levels of $O_2^{\bullet-}$ after 30 days of the HBOT beginning compared to the initial values of this parameter, and significantly decreased values after 10 days of the HBOT compared to the initial values (11.92 ± 6.86 , 8.26 ± 13.6 , 8.39 ± 4.94 nmol/mL, respectively) (Figure 1).

Table 1

Comparison of selected laboratory parameters - the initial value, value after 10 days and after a month of HBOT

Laboratory parameters in serum	Initial (mean \pm SD)	10th day (mean \pm SD)	30th day (mean \pm SD)
CRP (mg/L)	5.16 ± 5.7	4.93 ± 6.06^{ns}	3.26 ± 2.25^{ns}
Hb (g/L)	129.3 ± 10.27	131.00 ± 12.51^{ns}	129.44 ± 14.13^{ns}
Creatinine (mmol/L)	72.00 ± 22.84	78.55 ± 26.09^{ns}	74.55 ± 23.55^{ns}
Albumin (g/L)	42.33 ± 2.95	40.66 ± 2.50^{ns}	42.33 ± 2.95^{ns}
C3 (g/L)	1.05 ± 0.23	1.05 ± 0.29^{ns}	1.03 ± 0.25^{ns}
ANA (IU/mL)	1.11 ± 1.16	1.44 ± 1.33^{ns}	1.00 ± 1.11^{ns}
CKDeGFR (mL/min/1.73 m ²)	89.00 ± 22.46	84.33 ± 19.53^{ns}	87.44 ± 20.91^{ns}

^{ns} non significant differences in comparison to the initial values

HBOT – hyperbaric oxygen therapy; CRP – C-reactive protein; Hb – hemoglobin; C3 – complement 3; ANA – antinuclear antibody; (CKD eGFR) – a chronic kidney disease estimated glomerular filtration rate.

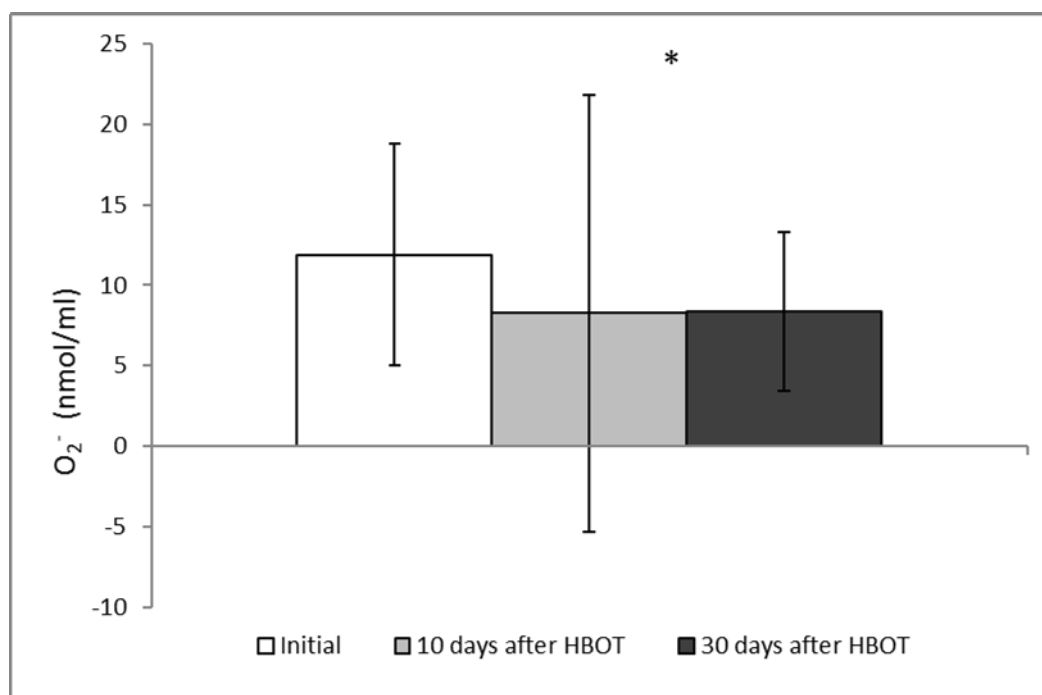


Fig. 1 – Level of superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$) in the urine samples (the values are presented as mean and standard deviation). The statistical significances are presented as a significance between the values after 10 days vs. initial values and after 30 days of hyperbaric oxygen therapy (HBOT) vs. the initial values (* $p < 0.05$).

Levels of nitrites

The levels of NO_2^- before and after the HBOT were similar in all terms observed (2.72 ± 0.16 , 2.77 ± 0.29 , and 2.76 ± 0.20 nmol/mL, respectively). We found that this parameter was not significantly affected by the HBOT when comparing the initial values to the values after 10 days of the HBOT and 1 month after the treatment beginning (Figure 2).

Levels of hydrogen peroxide

During the observed period of HBOT, there were no statistically significant changes of H_2O_2 levels when compared the initial values, the values after 10 days and after 1 month of the HBOT. This parameter was not changed during the study (1.52 ± 0.08 , 1.51 ± 0.07 , 1.54 ± 0.17 nmol/mL, respectively) (Figure 3).

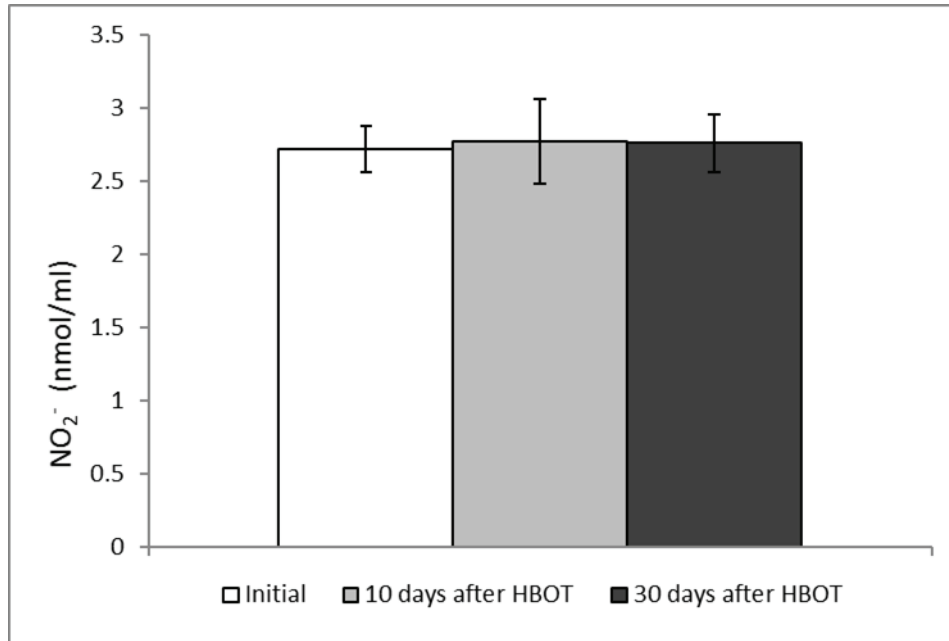


Fig. 2 – Levels of nitrites (NO_2^-) in the urine samples (the values are presented as mean and standard deviation). There was no significant difference before and after the hyperbaric oxygen therapy (HBOT).

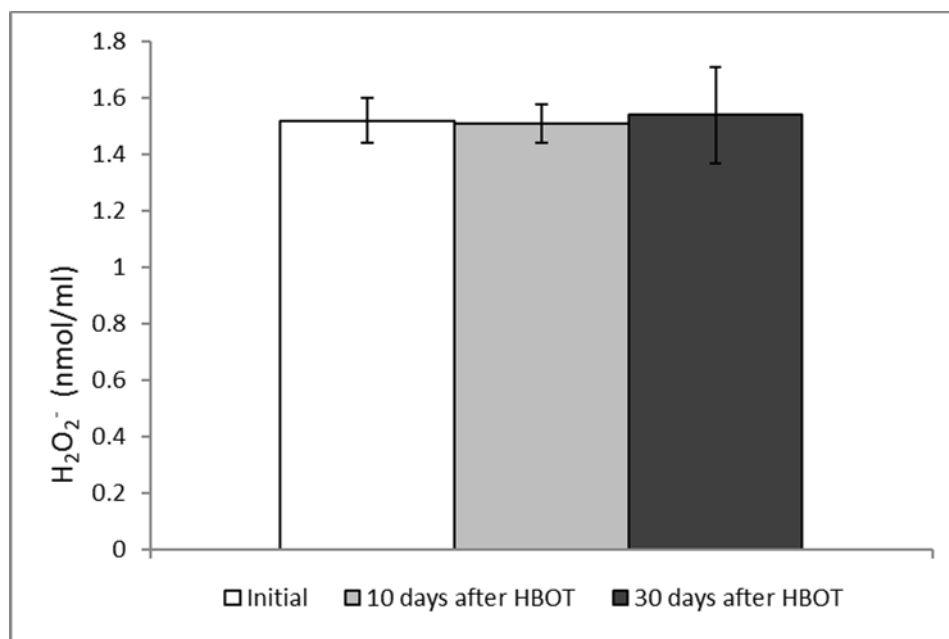


Fig. 3 – Levels of hydrogen peroxide (H_2O_2) in the urine samples (the values are presented as mean and standard deviation). There were no significant differences before and after the hyperbaric oxygen therapy (HBOT).

Concentration of TBARS

Among the examined groups, TBARS concentration was not significantly altered during the study (1.01 ± 0.11 ; 1.09 ± 0.11 ; 1.05 ± 0.96 $\mu\text{mol/mL}$, respectively) (Figure 4).

Activity of superoxide dismutase (SOD)

In the study group, we noticed a decreased activity of SOD after the HBOT when compared the initial value to the value after 10 days of the therapy (27.58 ± 8.86 , and 19.47 ± 10.63 $\text{U/gHb} \times 10^3$, respectively). However, a month after, the values were similar to those from the beginning of the study protocol and the activity was 27.11 ± 28.26 $\text{U/gHb} \times 10^3$. Those changes were without a statistical significance (Figure 5).

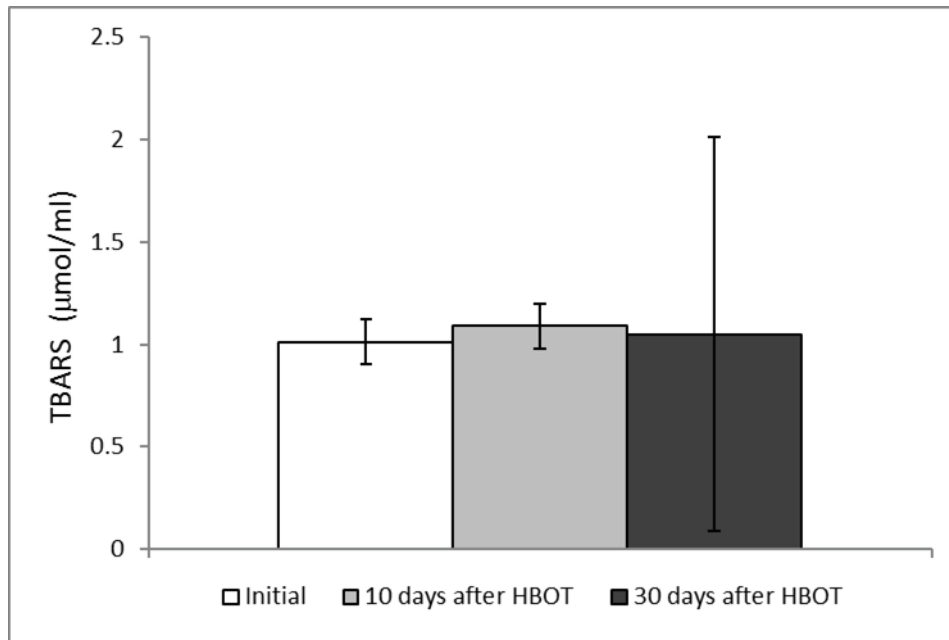


Fig. 4 – Concentration of TBARS in the urine samples (the values are presented as mean and standard deviation). There were no significant differences before and after the hyperbaric oxygen therapy (HBOT). TBRS – thiobarbituric acid reactive substances.

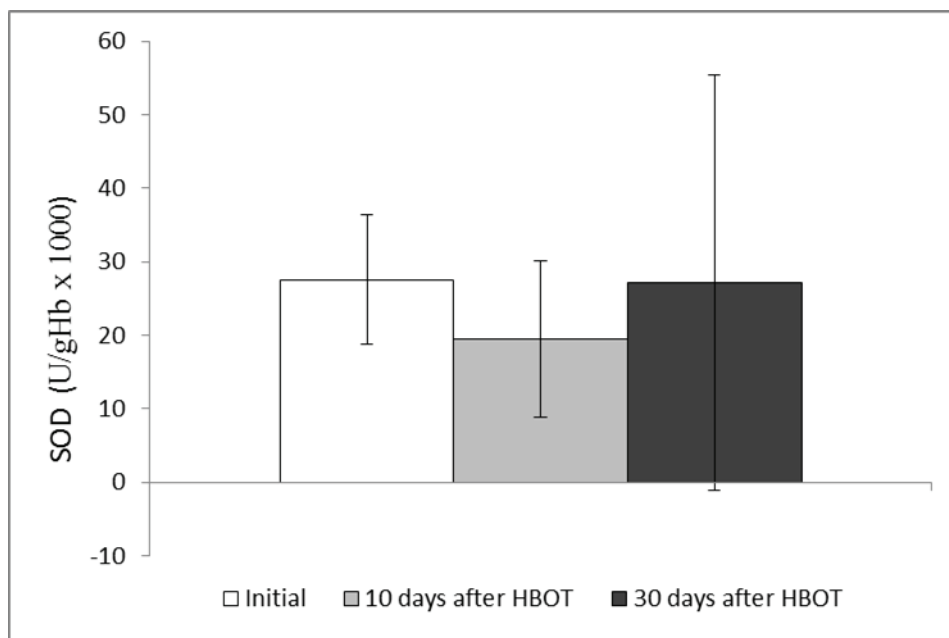


Fig. 5 – Activity of superoxide dismutase (SOD) in the blood samples (the values are presented as mean and standard deviation). Comparing the initial values of SOD and those after the hyperbaric oxygen therapy (HBOT), it was observed decrease in the level, but without a significant difference. After 30 days activity of SOD is similar to the initial values.

Level of reduced glutathione

A level of GSH was not statistically significantly increased in our group (initially 66.34 ± 16.31 , 79.43 ± 36.77 $\mu\text{mol/mL RBC}$ after the HBOT). However, a month after values were similar to those from the beginning of the study protocol and the activity was 69.72 ± 22.32 $\mu\text{mol/mL RBC}$ (Figure 6).

Activity of catalase

We observed a decrease in the activity of CAT after 10 days of the HBOT compared to the initial value (4.77 ± 2.93 and 5.44 ± 3.55 $\text{U/gHb} \times 10^3$, respectively), and it continued to decrease, so after a month it was lower than before the HBOT and after 10 days of the HBOT (3.82 ± 2.49 $\text{U/gHb} \times 10^3$, respectively). However those differences were not statistically significant (Figure 7).

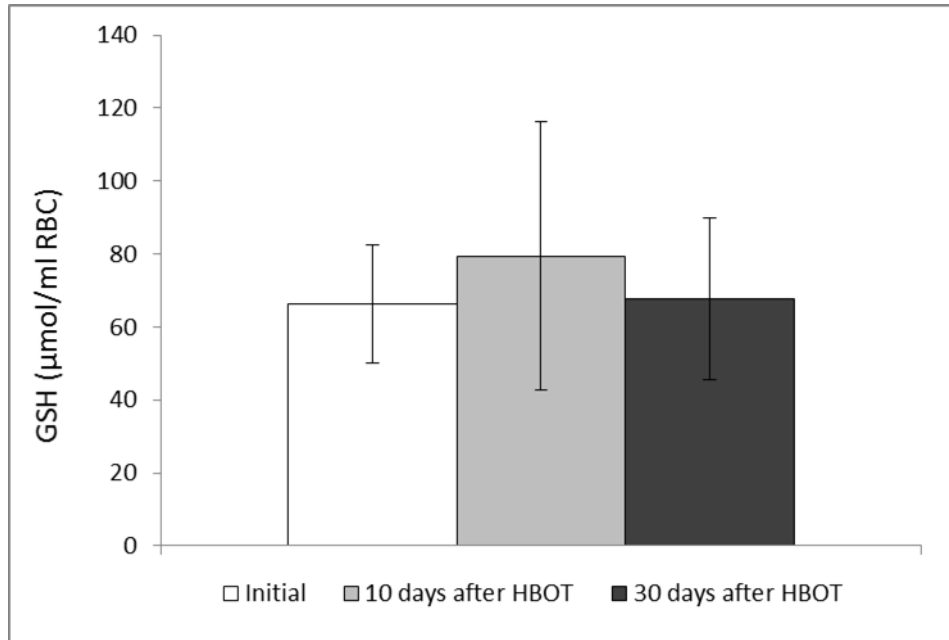


Fig. 6 – Level of reduced glutathione (GSH) in the hemolysate samples (the values are presented as mean and standard deviation). Comparing the values of GSH initially and after the hyperbaric oxygen therapy (HBOT) there were no statistically significant differences.

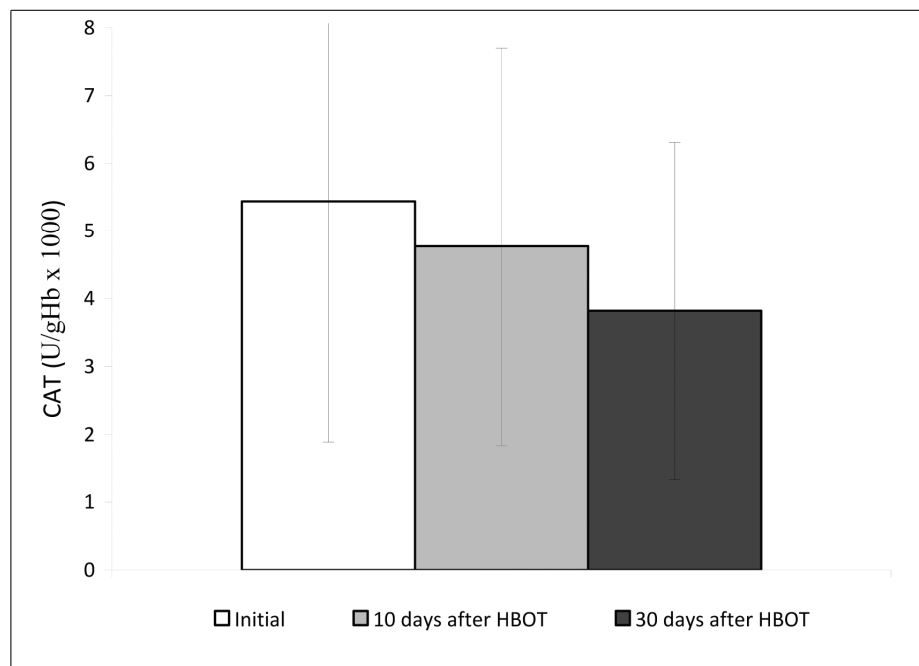


Fig. 7 – Activity of catalase (CAT) in the hemolysate samples (the values are presented as mean and standard deviation). Comparing the initial values and those after 10 days and 30 days, the hyperbaric oxygen therapy (HBOT), there were no statistically significant differences.

Discussion

This study was designed in the field of physiology research of hyperbaric oxygenation with a special emphasis on potential systemic effects of disturbed redox balance, induced by a systemic disease before and after the application of oxygen. Actually, the HBOT leads to an increase in the amount of dissolved oxygen in plasma, creating a diffusion gradient which facilitates the transition of oxygen from the capillaries to the ischemic tissues¹⁷. Studies reported controversial results regarding the effect of the HBOT on the oxidative stress and enzymes of antioxidative defense in the several pathophysiological models. The role of ROS and RNS in therapeutic responses of the HBOT in the patients with SLE has still not been completely revealed and explained²⁸⁻³¹.

Immune dysfunction, genetic, hormonal and environmental factors are included in an etiology of SLE, however molecular mechanisms underlying this systemic autoimmune response remain largely unknown^{31,32}. It is believed that the oxidative stress has an important role in the pathogenesis of SLE. Excessive production of ROS (including ONOO⁻) can damage all biomolecules such as lipid, protein and DNA and cause a formation of different products which can be detected in biological fluids²⁻⁵. In case of the patients with SLE, this fact can be useful since their abundance correlates with the disease activity and organ damage³. Our study included the patients with SLE in whom the disease was in remission, which was maintained before and after the HBOT was applied. Comparing the laboratory parameters (CRP, hemoglobin, creatinine, albumin, complement C3, ANA) before and after the performed therapy as well as after a month, we did not notice the statistically significant differences in their values. We examined the effects of 10 session of the HBOT on the parameters of redox balance in the patients with SLE. We found the statistically significant decreased levels of O₂^{•-} after the HBOT, which were held after 30 days. There is a concern that the HBOT might increase the oxidative stress via the production of reactive oxygen species, however, the oxidative stress appears to be less of a concern at the hyperbaric pressures under 2.0 ATA³³. The patients in our study were exposed to the higher pressure such as 2.2 ATA and we revealed the beneficial effects of hyperbaric oxygen on O₂⁻ levels. On the other hand, other pro-oxidants, such as NO₂⁻, TBARS and H₂O₂ were not affected by the HBOT. In order to validate our results, we excluded all patients with renal disease or urinary infection, because the oxidative stress parameters may have not been removed from plasma because of insufficient excretion and may continue to rediffuse in circulation³⁰⁻³⁴. So, because of this fact, we could not be sure in unchanged levels of the oxidative markers.

Literature data regarding the effects of the HBOT on SLE is limited, and it is hard to compare our results to the others due to the fact that available researches were mostly focused on the effects of the HBOT on ulcers healing. One of a few studies which examined the effects of the HBOT in a SLE patient was a case report conducted by Olivieri et al¹⁷. They described the SLE patient with a case of refractory vas-

culitic ulcer responding to the HBOT, which was used in combination with immunosuppressive therapy. Jou et al.³⁵ reported their experience with the use of the HBOT for the treatment of intractable hemorrhagic cystitis in a SLE patient treated with cyclophosphamide. They concluded that this treatment was very successful, with no recurrent hematuria after the HBOT during 6 months³⁵. Efrati et al.¹⁶ reported that the HBOT may serve as an effective safe treatment for the patients with vasculitis having nonhealing skin ulcers, which is in agreement with the results of previously mentioned authors as well as with ours regarding a safety of the HBOT. The increase in tissue oxygenation appeared to be one of the major components responsible for the high cure rates in the patients with ulcers^{16,17}.

In order to complete our picture about the influence of HBOT on redox status, we examined the activity of the antioxidant enzyme system. GSH is an important endogenous antioxidant and prime scavenger of free radicals in cells. One of the body's most powerful natural antioxidant enzymes are SOD and CAT. SOD, essential to catalyze the dismutation of superoxide, has been shown to protect cells from oxygen free radicals. Exposure to ROS from a variety of sources led to development of a series of defence mechanisms to neutralize these species and so protect cells against their toxic effects and that protection is achieved mainly by enzymatic antioxidants such as catalase. Some research conclude that hyperbaric oxygen treatment below 2.0 ATA can increase the activity of antioxidant enzymes including SOD, GSH and CAT³⁶⁻⁴⁰.

Regarding a component of antioxidant defense including SOD, GSH, CAT we observed that the levels of GSH were higher (but without statistical significance) after 10 days exposed to hyperbaric oxygen treatment and a month later, too.

We believe that these beneficial results in regard to levels of O₂^{•-} and GSH after the HBOT imply the possibility that the study with a larger number of patients or changes of number of treatments could have results which would be statistically significant for these parameters. That refers to results noticed for SOD and CAT.

Activities of SOD and CAT were affected by the HBOT, but not statistically significantly. We noticed that the activity of SOD decreased after 10 days, but returned to the initial level after 30 days, and level of CAT decreased after a month compared to the initial value and value after 10 days of the HBOT. However, these changes were not statistically significant. Considering that differences in the activity of SOD and CAT between the peroxide initial level and the level after the HBOT were insignificant, we did not observe any significant influence on prooxidants such as hydrogen.

We believe that smaller number of patients in our study influenced our results. The assumption is that the future studies of a different design (larger number of patients, more treatments, additional analysis, etc.) could clarify the fact that we did not get a correlation between the decreased level of O₂⁻ (statistically significant in our study) and the increased values of the antioxidant protection parameters (GSH was not statistically significantly changed in our study).

We decided to treat the SLE patients with the HBOT not only because it improves the oxygenation of ischemic

tissues and exerts the beneficial effects on vascular inflammatory response by regulating the chemotaxis of leukocytes, but also because it facilitates the healing process of infected wounds promoting the deposition of collagen, angiogenesis, epithelialization and facilitating the oxygen-dependent killing by leukocytes¹⁶⁻¹⁸. Previous studies suggested that vasculitis skin ulcers in the patient suffering from SLE had been treated successfully with the HBOT¹⁷.

Given the fact that the HBOT can modify oxidation-reduction reactions and because of the mentioned beneficial effects of the HBOT in different tissues in the patients with SLE, this protocol of therapy can be one of the possibility.

Conclusion

Our results highlighted some of the beneficial effects of hyperbaric oxygen treatment on redox balance among the patients suffering from SLE. However, the management of SLE is complex and more research is required to establish the complete mechanism by which the HBOT can modify oxidation-reduction reactions in the patients with SLE, so it can become an additional potential therapeutic strategy in the treatment of SLE.

R E F E R E N C E S

1. Adinolfi A, Valentini E, Calabresi E, Tesi G, Signorini V, Barsotti S et al. One year in review 2016: systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2016; 34(4): 569–74.
2. Shab D, Mahajan N, Sab S, Nath SK, Paudyal B. Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Sci* 2014; 21(1): 23.
3. Mansour RB, Lassoued S, Gargouri B, Gaid EA, Attia H, Fakhfakh F. Increased levels of autoantibodies against catalase and superoxide dismutase associated with oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 2008; 37(2): 103–8.
4. Avalos I, Chung CP, Oeser A, Milne GL, Morrow JD, Gebretsadik T, et al. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus: relationship to disease activity and symptoms. *Lupus* 2007; 16(3): 195–200.
5. Shab D, Kiran R, Wanchu A, Bhatnagar A. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus: relationship to Th1 cytokine and disease activity. *Immunol Lett* 2010; 129(1): 7–12.
6. Gilkeson G, Cannon C, Oates J, Reilly C, Goldman D, Petri M. Correlation of serum measures of nitric oxide production with lupus disease activity. *J Rheumatol* 1999; 26(2): 318–24.
7. Oates JC, Shaftman SR, Self SE, Gilkeson GS. Association of serum nitrate and nitrite levels with longitudinal assessments of disease activity and damage in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 2008; 58(1): 263–72.
8. Wanchu A, Khullar M, Sud K, Sakhuja V, Thennarasu K, Sud A, et al. Serum and urine nitrite and citrulline levels among patients with systemic lupus erythematosus: a possible addition to activity parameters?. *J Clin Rheumatol* 2001; 7(1): 10–5; discussion 15.
9. Stanislavljević N, Stojanović L, Marislavljević D, Djoković A, Dopsaj V, Kotur-Stevuljević J, et al. Lipid peroxidation as risk factor for endothelial dysfunction in antiphospholipid syndrome patients. *Clin Rheumatol* 2016; 35(10): 2485–93.
10. Kumar MA, Radhika B, Gollamudi N, Reddy SP, Yaga US. Hyperbaric Oxygen Therapy: A Novel Treatment Modality in Oral Submucous Fibrosis: A Review. *J Clin Diagn Res* 2015; 9(5): ZE01–4.
11. Bhutani S, Vishwanath G. Hyperbaric oxygen and wound healing. *Indian J Plast Surg* 2012; 45(2): 316–24.
12. Camporesi EM, Bosco G. Mechanisms of action of hyperbaric oxygen therapy. *Undersea Hyperb Med* 2014; 41(3): 247–52.
13. Boykin JV, Baylis C. Hyperbaric oxygen therapy mediates increased nitric oxide production associated with wound healing: a preliminary study. *Adv Skin Wound Care* 2007; 20(7): 382–8.
14. Health Quality Ontario. Hyperbaric oxygen therapy for non-healing ulcers in diabetes mellitus: an evidence-based analysis. *Ont Health Technol Assess Ser* 2005; 5(11): 1–28.
15. Rabrenović M, Matunović R, Rabrenović V, Zoranović U. Hyperbaric medicine: dilemmas regarding its possibilities. *Vojnosanit Pregl* 2008; 65(3): 235–8. (Serbian)
16. Efrati S, Bergan J, Fishlev G, Tishler M, Golik A, Gall N. Hyperbaric oxygen therapy for nonhealing vasculitic ulcers. *Clin Exp Dermatol* 2007; 32(1): 12–7.
17. Olivieri AN, Mellos A, Duilio C, Di Meglio M, Mauro A, Perrone L. Refractory vasculitic ulcer of the toe in an adolescent suffering from systemic lupus erythematosus treated successfully with hyperbaric oxygen therapy. *Ital J Pediatr* 2010; 36: 72.
18. Guidelines for referral and management of systemic lupus erythematosus in adults. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Systemic Lupus Erythematosus Guidelines. *Arthritis Rheum* 1999; 42(9): 1785–96.
19. Tunncliffe DJ, Singh-Grewal D, Kim S, Craig JC, Tong A. Diagnosis, Monitoring, and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus: A Systematic Review of Clinical Practice Guidelines. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2015; 67(10): 1440–52.
20. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA, editor. *Handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton: CRC Press; 1985. p. 123–32.
21. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980; 38(1–2): 161–70.
22. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skippier PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126(1): 131–8.
23. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95(2): 351–8.
24. McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem* 1969; 244(22): 6056–63.
25. Beutler CE. Red cell metabolism, a manual of biochemical methods. In: Beutler E, editor. *New York: Grune and Stratton*; 1982. p. 105–6.
26. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247(10): 3170–5.
27. Beutler E. Reduced glutathione (GSH). In: Beutler E, editor. *Red Cell Metabolism, a Manual of Biochemical Methods*. New York, NY, USA: Grune and Stratton; 1975. p. 112–4.
28. Thom SR. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *J Appl Physiol* 2009; 106(3): 988–95.
29. Gošović S. *Foundations of Military and Underwater Medicine with Respiratory Protection*. Split: Medicinska naklada; 2000. (Croatian)

30. *Allen RG, Balin AK.* Oxidative influence on development and differentiation: an overview of a free radical theory of development. *Free Radic Biol Med* 1989; 6(6): 631–61.
31. *Dennog C, Radermacher P, Barnett YA, Speit G.* Antioxidant status in humans after exposure to hyperbaric oxygen. *Mutat Res* 1999; 428(1–2): 83–9.
32. *Aringer M, Schneider M.* Management of systemic lupus erythematosus. *Internist (Berl)* 2016; 57(11): 1052–9.
33. *Crow MK.* Etiology and pathogenesis of systemic lupus erythematosus. In: Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE, McInnes IB, O'Dell JR, et al, editors. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. 9th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2013: Chap 79.
34. *Yatsuzuka H.* Effects of hyperbaric oxygen therapy on ischemic brain injury in dogs. *Masui* 1991; 40(2): 208–23. (Japanese)
35. *Jou Y, Lien F, Cheng M, Shen C, Lin C, Chen P.* Hyperbaric oxygen therapy for cyclophosphamide-induced intractable refractory hemorrhagic cystitis in a systemic lupus erythematosus patient. *J Chin Med Assoc* 2008; 71(4): 218–20.
36. *Ozden TA, Uzun H, Bobloli M, Toklu AS, Paksoy M, Simsek G, et al.* The effects of hyperbaric oxygen treatment on oxidant and antioxidants levels during liver regeneration in rats. *Tohoku J Exp Med* 2004; 203(4): 253–65.
37. *Yasar M, Yildiz S, Mas R, Dundar K, Yildirim A, Korkmaz A, et al.* The effect of hyperbaric oxygen treatment on oxidative stress in experimental acute necrotizing pancreatitis. *Physiol Res* 2003; 52(1): 111–6.
38. *Kudchodkar BJ, Wilson J, Lacko A, Dory L.* Hyperbaric oxygen reduces the progression and accelerates theregression of atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(6): 1637–43.
39. *Gulec B, Yasar M, Yildiz S, Oter S, Akay C, Deveci S, et al.* Effect of hyperbaric oxygen on experimental acute distal colitis. *Physiol Res* 2004; 53(5): 493–9.
40. *Gregorevic P, Lynch GS, Williams DA.* Hyperbaric oxygen modulates antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscles. *Eur J Appl Physiol* 2001; 86(1): 24–7.

Received on January 10, 2017.

Revised on July 18, 2017.

Accepted on July 24, 2017.

Online First September, 2017.

Comparison of training and detraining on redox state of rats: gender specific differences

Jovana Bradic¹, Radica Dragojlovic Ruzicic², Jovana Jeremic¹, Anica Petkovic¹, Isidora Stojic¹, Tamara Nikolic¹, Vladimir Zivkovic³, Ivan Srejovic³, Dragan Radovanovic⁴ and Vladimir Lj. Jakovljevic^{3,5}

¹ University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacy, Kragujevac, Serbia

² Belgrade, Serbia, High Medical College of professional Studies “Milutin Milankovic”, Belgrade, Serbia

³ University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Physiology, Kragujevac, Serbia

⁴ University of Nis, Faculty of Sport and Physical Education, Department of Physiology, Nis, Serbia

⁵ University IM Sechenov, 1st Moscow State Medical, Department of Human Pathology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Given the fact that oxidative stress response induced by training/detraining has still not been clarified and may be influenced by gender, the aim of our investigation was to compare the effects of swimming training and detraining on oxidative and antioxidative parameters in rats, with a special focus on sex differences. Wistar albino rats ($n = 64$) were divided into 4 groups: control, trained group, groups exposed to 2 and 4 weeks of detraining. Each group included two subgroups: males and females. After sacrificing, hearts were isolated and retrogradely perfused according to Langendorff technique. Levels of superoxide anion radical, hydrogen peroxide, nitrites and thio-barbituric acid reactive substances were measured in plasma and coronary venous effluent, while reduced glutathione, activities of superoxide dismutase and catalase were measured in erythrocytes. Our results indicate that swimming training doesn't promote oxidative damage, nor act protectively within the heart. However, 2 and 4 weeks of detraining led to a partial lost in exercise-induced adaptation. It seems that moderate-intensity physical exercise of sufficient duration leads to beneficial adaptations, which may be partially lost during detraining period. Positive antioxidative effects of training remained longer in males. Findings of present study may help in elucidation of training and detraining effects on modulation of redox homeostasis, especially from aspect of gender differences.

Introduction

Under normal physiological conditions, pro-oxidants are continuously produced as a result of essential metabolic processes and environmental factors (Pham-Huy et al. 2008). Aerobic organisms possess antioxidant system which consists of variety of enzymatic and nonenzymatic antioxidants that serve to counterbalance the effects of oxidants (Birben et al. 2012). Oxidative stress occurs when there is an imbalance between oxidants and antioxidants in favour of oxidants. Since pro-oxidants are very reactive molecules, they can cause tissue damage interacting in a destructive manner

with practically every cellular component (Birben et al. 2012; Rahal et al. 2014).

Regular physical exercise has been shown to exert a myriad of beneficial effects for health, such as promotion of health and lifespan, improvement of quality of life and decrease the incidence of a life-style related diseases (Macera et al. 2003; Vina et al. 2012). Groundbreaking research which gave the first data about the association between exercise and oxidative stress was conducted by Dillard et al. (1978) approximately 4 decades ago. This finding stimulated further curiosity of many authors regarding the role of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) in skeletal muscle and other metabolically active organ during physical exercise (Davies et al. 1982; Ammeren et al. 1992; Gomez-Cabrera et al. 2008). Numerous papers have been published proving that low physiological levels of pro-oxidants produced in the muscles have an important role in maintenance its normal tone and

Correspondence to: Vladimir Lj. Jakovljevic, Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, 34 000 Kragujevac, Serbia
E-mail: drvladakbg@yahoo.com

contractility. On the contrary, excessive production of ROS leads to a contractile dysfunction which is followed by muscle weakness and fatigue (Powers and Jackson 2008; Rahal et al. 2014). It has been established that swimming training causes changes in antioxidant enzymes, alters muscle gene expression, thus contributing to exercise-induced adaptations to skeletal muscle (Venditti and Di Meo 1997; Elikov 2016; Ruzicic et al. 2016). However it should be taken into consideration that various factors influence the oxidative stress response to swimming training, such as type of exercise, intensity, duration, gender and age of athletes etc. (Ruzicic et al. 2016).

Interestingly, prolonged cessation of training stimulus, known as detraining, may abolish training-induced adaptations in response to oxidative stress and antioxidant status markers (Fatouros et al. 2004; Agarwal et al. 2012). Nevertheless there is a lack of data referring to the oxidative stress response to detraining.

Gender differences in response to exercise-induced oxidative stress have gained increased attention despite controversial results (Liu et al. 2000; Balci and Pepe 2012; Farhat et al. 2017). To our best knowledge there are just a few studies which explored the potential gender difference in oxidative stress markers and antioxidant defense system in the period of detraining.

Given the fact that oxidative stress response induced by detraining has still not been clarified and may be influenced by gender, the aim of our investigation was to compare the effects of swimming training and detraining on oxidative stress parameters and parameters of antioxidant defense system in rats, with a special focus on sex differences.

Materials and Methods

The study was performed in the laboratory for cardiovascular physiology of the Faculty of Medical Sciences, University

of Kragujevac, Serbia. It was approved and performed in accordance with the regulatives of the Faculty's Ethical committee for the welfare of laboratory animals and principles of the Good laboratory practice and European Council Directive (86/609/EEC).

Subjects

Sixty four Wistar albino rats (males and females, eight weeks old at the beginning of the experiment, body weight 200 ± 50 g) were included in the study. The animals were housed at temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$, with 12 hours of automatic illumination daily. They consumed commercial rat food (20% protein rat food, Veterinary institute Subotica, Serbia) and water *ad libitum*.

Exercise training protocol

Rats were divided into 4 groups, while each group consisted of 2 subgroups, males (M) and females (F). The first group was control group (C), subgroups CM and CF ($n = 8$ for each subgroup). The second group was trained group (T), subgroups TM and TF ($n = 8$ for each subgroup). The third group included 2 weeks detrained animals (D2), i.e., animals who were subjected to training, followed by 2 weeks of detraining period, subgroups DM2 and DF2 ($n = 8$ for each subgroups). The fourth group consisted of 4 weeks detrained animals (D4), i.e., animals who were subjected to training followed by 4 weeks of detraining, subgroups DM4 and DF4 ($n = 8$ for each subgroup). Rats from the control group were placed in the pool 5 times a week for 3 minutes to achieve water induced-stress (Lima et al. 2013; Stojanovic Tosic et al. 2015). Trained group included rats who were subjected to moderate intensity exercise, such as swimming training (8 weeks, 5 days/week, 60 min/day) in a specially designed pool according to the protocol in

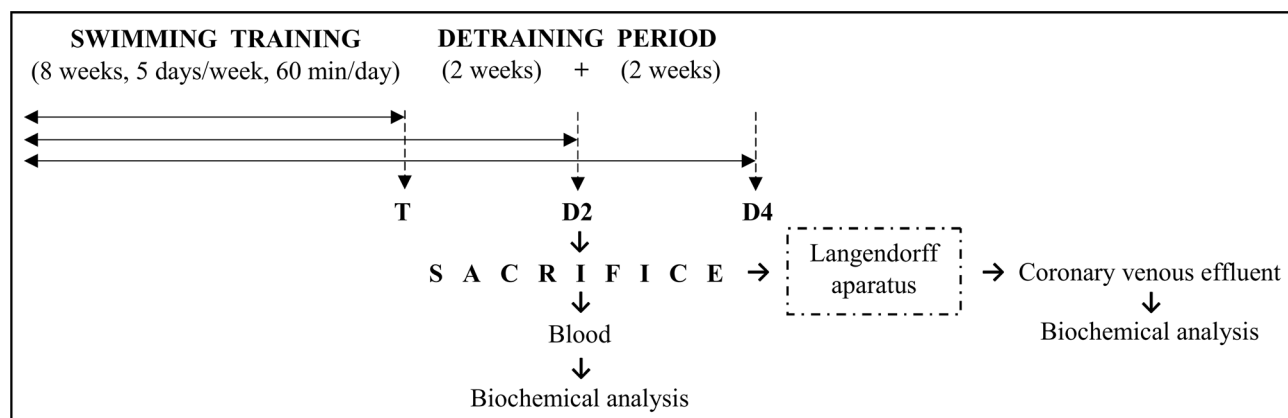


Figure 1. Experimental protocol

Figure 1A. Week before the experiment, rats were gradually exposed to swimming training from 5 to 15 minutes, in order to familiarize them to the swimming exercise. Subsequently they started with 8 weeks training process. Rats were sacrificed a day after accomplishing training process. On the same day, rats (the same age as in T group) from C groups were sacrificed as well. Animals from DM2, DF2 and DM4, DF4 groups were sacrificed after 2 and 4 weeks of cessation, respectively (Figure 1).

Isolated rat heart preparation

After a short-term ketamine/xylazine-induced narcosis rats were sacrificed by decapitation. The chest was then opened via midline thoracotomy. The hearts were immediately removed and immersed in cold saline and were then mounted on a stainless steel cannula of the Langendorff perfusion apparatus to provide retrograde perfusion under gradually increasing coronary perfusion pressure (CPP from 40 to 120 cmH₂O). Krebs-Henseleit buffer was used for retrograde perfusion (in mmol/l: NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂×2H₂O 2.5, MgSO₄×7H₂O 1.7, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, glucose 11, and pyruvate 2). The buffer was balanced with 95% O₂ and 5% CO₂, with a pH of 7.4 and a temperature of 37°C. Following the establishment of heart perfusion, the preparations were stabilized within 30 min with a basal coronary perfusion pressure of 70 cmH₂O. After the stabilization period, the perfusion pressure was reduced to 50 and 40 cmH₂O and then gradually increased to 60, 80, 100 and 120 cmH₂O to establish coronary autoregulation.

Biochemical analysis

In order to test systemic oxidative stress response to training, after animal sacrifice blood samples for biochemical analysis were collected from jugular vein. After centrifugation of heparinised venous blood, plasma and erythrocytes were separated. In plasma the following parameters of redox balance were determined: the levels of superoxide anion radical (O₂⁻), nitrites (NO₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂) and index of lipid peroxidation (measured as thiobarbituric acid reactive substances-TBARS). Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and reduced glutathione (GSH) were determined in erythrocytes samples. During each CPP coronary venous effluent was collected for the purpose of determination of levels of pro-oxidants such as O₂, NO₂⁻, H₂O₂ and TBARS. Analyses of the pro-oxidants were performed using the same methods as when analyzing plasma samples and coronary venous effluent except NO₂⁻ where the protocol differs. Biochemical parameters were measured spectrophotometrically, using UV-1800 Shimadzu UV spectrophotometer, Japan.

Superoxide anion radical determination (O₂⁻)

The level of superoxide anion radical (O₂⁻) was measured using nitro blue tetrazolium (NBT) reaction in TRIS-buffer combined with plasma sample or coronary venous effluent. The measurement was performed at a wavelength of 530 nm. For O₂⁻ determination in coronary venous effluent the Krebs-Henseleit solvent was used as the blank control, while in case of plasma samples distilled water served as a blank control (Auclair and Voisin 1985).

Hydrogen peroxide determination (H₂O₂)

The protocol for measurement of hydrogen peroxide (H₂O₂) is based on oxidation of phenol red in the presence of horseradish peroxidase. 200 µl sample with 800 µl PRS (phenol red solution) and 10 µl POD (horseradish peroxidase) were combined (1:20). The level of H₂O₂ was measured at 610 nm. For H₂O₂ determination in coronary venous effluent the Krebs-Henseleit solvent was used as the blank control, while in case of plasma samples distilled water served as a blank control (Pick and Keisari 1980).

Nitrite determination (NO₂⁻)

Nitric oxide (NO) decomposes rapidly to form stable metabolite nitrite/nitrate products. Nitrite (NO₂⁻) was determined as an index of nitric oxide production with Griess reagent. For NO₂⁻ determination in plasma 0.1 ml 3 N PCA (perchloric acid), 0.4 ml 20 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and 0.2 ml plasma were put on ice for 15 min, then centrifuged 15 min at 6,000 rpm. After pouring off the supernatant, 220 µl K₂CO₃ was added. Nitrites were measured at 550 nm. Distilled water was used as a blank probe.

For NO₂⁻ determination in coronary venous effluent, 0.5 ml of the perfusate was precipitated with 200 µl of 30% sulfosalicylic acid, mixed for 30 min and centrifuged at 3000 × g. Equal volumes of the supernatant and Griess reagent were mixed and stabilized for 10 min in the dark, and then the sample was measured spectrophotometrically at a wavelength of 543 nm. The nitrite concentrations were determined using sodium nitrite as the standard (Green et al. 1982).

Determination of the index of lipid peroxidation measured as TBARS

The degree of lipid peroxidation in the sample (plasma and coronary venous effluent) was estimated by measuring of TBARS using 1% TBA (thiobarbituric acid) in 0.05 NaOH, incubated with sample at 100°C for 15 min and read at 530 nm. TBA extract was obtained by combining 0.8 ml

sample and 0.4 ml trichloro acetic acid (TCA), then samples were put on ice for 10 min, and centrifuged for 15 min at 6,000 rpm. The Krebs-Henseleit solvent was used as a blank control when TBARS was determined in coronary venous effluent, while in case of plasma sample distilled water was used (Ohkawa et al. 1979).

Determination of antioxidant enzymes (CAT, SOD)

Isolated RBCs were washed three times with three volumes of ice-cold 0.9 mmol/l NaCl and hemolysates containing about 50 g Hb/l (prepared according to McCord and Fridovich 1969) were used for the determination of CAT activity (Beutler 1982). Then 50 μ l CAT buffer, 100 μ l sample, and 1 ml 10 mM H₂O₂ were added to the samples. Detection was performed at 360 nm. SOD activity was determined by the epinephrine method (Misra and Fridovich 1972). A 100 μ l lysate and 1 ml carbonate buffer were mixed, and then 100 μ l of epinephrine was added. Detection was performed at 470 nm. Distilled water was used as a blank probe.

Determination of reduced glutathione (GSH)

Level of GSH was determined spectrophotometrically, and it is based on GSH oxidation via 5,5-dithiobis-6,2-nitrobenzoic acid. GSH extract was obtained by combining 0.1 ml 0.1% EDTA, 400 μ l haemolysate, and 750 μ l precipitation solution (containing 1.67 g metaphosphoric acid, 0.2 g EDTA, 30 g NaCl, and filled with distilled water until 100 ml; the solution is stable for 3 weeks at +4°C). After mixing in the vortex machine and extraction on cold ice (15 min), it was centrifuged on 4000 rpm (10 min). Distilled water was used as a blank probe. Measuring was performed at 420 nm. The concentration is expressed as nanomoles *per* milliliter of RBCs (Beutler 1975).

Statistical analysis

IBM SPSS Statistics 20.0 for Windows was used for statistical analysis. Values were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Descriptive statistics were used to calculate arithmetic mean with dispersion measures (standard deviation SD and standard error SE). Distribution of data was checked by Shapiro-Wilk test. Where distribution between groups was normal, statistical comparisons were performed using the one-way ANOVA tests with a Tukey's post hoc test for multiple comparisons. Kruskal-Wallis was used for comparison between groups where the distribution of data was different than normal. Values of $p < 0.05$ were considered to be statistically significant, while values of $p < 0.01$ were considered to be statistically high significant.

Results

Cardiac oxidative stress markers

Levels of superoxide anion radical (O₂⁻)

There was a statistically significant difference between groups in the level of O₂⁻ as determined by one-way ANOVA (F(7,121) = 7,362, $p = 0.00$ for CPP 40 cmH₂O, F(7,121) = 3,155, $p = 0.01$ for CPP 60 cmH₂O, F(7,121) = 9.229, $p = 0.00$ for CPP 80 cmH₂O, F(7,121) = 9,769, $p = 0.00$ for CPP 100 cmH₂O, F(7,121) = 11,322, $p = 0.00$ for CPP 120 cmH₂O). A Tukey post hoc test revealed significant decrease in the level of O₂⁻ in trained females compared to their controls at all CPP ($p = 0.009$ at CPP 40 cmH₂O, $p = 0.015$ at CPP 60 cmH₂O, $p = 0.018$ at CPP 80 cmH₂O, $p = 0.006$ at CPP 100 cmH₂O, $p = 0.002$ at CPP 120 cmH₂O). The same trend was revealed in trained males compared to their controls at all CPP values ($p = 0.004$ at CPP 40 cmH₂O, $p = 0.008$ at CPP 60 cmH₂O, $p = 0.005$ at CPP 80 cmH₂O, $p = 0.003$ at CPP 100 cmH₂O, $p = 0.002$ at CPP 120 cmH₂O (Figure 2A). This parameter was significantly higher in 4 weeks detrained females than in 2 weeks detrained females at CPP 80–120 cmH₂O ($p = 0.039$ at CPP 80 cmH₂O, $p = 0.032$ at CPP 100 cmH₂O, $p = 0.029$ at CPP 120 cmH₂O). On the other hand, level of O₂⁻ in 4 weeks detrained males was lower than in 2 weeks detrained males at CPP 40–80 cmH₂O ($p = 0.029$ at CPP 40 cmH₂O, $p = 0.021$ at CPP 60 cmH₂O, $p = 0.034$ at CPP 80 cmH₂O). Significantly lower level of O₂⁻ was revealed in 4 weeks detrained males compared to 4 weeks detrained females at all CPP values ($p = 0.031$ at CPP 40 cmH₂O, $p = 0.007$ at CPP 60 cmH₂O, $p = 0.002$ at CPP 80 cmH₂O, $p = 0.004$ at CPP 100 cmH₂O, $p = 0.006$ at CPP 120 cmH₂O) (Figure 2B). There was a decrease in the level of this parameter in trained females compared to 2 weeks detrained females at all CPP ($p = 0.023$ at CPP 40, $p = 0.005$ at CPP 60, $p = 0.007$ at CPP 80 cmH₂O, $p = 0.014$ at CPP 100 cmH₂O, $p = 0.034$ at CPP 120 cmH₂O) and 4 weeks detrained females at all CPP ($p = 0.020$ at CPP 40 cmH₂O, $p = 0.006$ at CPP 60 cmH₂O, $p = 0.002$ at CPP 80 cmH₂O, $p = 0.003$ at CPP 100 cmH₂O, $p = 0.015$ at CPP 120 cmH₂O) (Figure 2C). Training led to a decrease in the level of O₂⁻ in males compared to 2 weeks detrained males at all CPP values ($p = 0.015$ at CPP 40 cmH₂O, $p = 0.011$ at CPP 60 cmH₂O, $p = 0.017$ at CPP 80 cmH₂O, $p = 0.019$ at CPP 100 cmH₂O, $p = 0.015$ at CPP 120 cmH₂O). In 4 weeks detrained males values were higher than in trained males at 100 and 120 cmH₂O ($p = 0.036$ at CPP 100 cmH₂O, $p = 0.033$ at CPP 120 cmH₂O) (Figure 2D).

Levels of nitrites (NO₂⁻)

One-way ANOVA revealed there was a significant difference between groups in the level of O₂⁻ (F(7,121) = 2,112, $p = 0.03$

for CPP = 40 cmH₂O, $F(7,121) = 2,267, p = 0.02$ for CPP = 60 cmH₂O, $F(7,121) = 3,569, p = 0.00$ for CPP = 80 cmH₂O, $F(7,121) = 7,562, p = 0.00$ for CPP = 100 cmH₂O, $F(7,121) = 6,7822, p = 0.00$ for CPP = 120 cmH₂O). There was a decrease in the level of this parameter in trained females compared to control females at 100 and 120 cmH₂O ($p = 0.023$ at CPP 100 cmH₂O, $p = 0.021$ at CPP 120 cmH₂O) (Figure 3A). In addition level of NO₂⁻ observed in trained females in comparison to 2 ($p = 0.032$) and 4 weeks detrained females were lower at CPP = 120 cmH₂O ($p = 0.039$) (Figure 3C).

Levels of hydrogen peroxide (H₂O₂)

A significant difference between groups in the level of H₂O₂ was found ($F(7,121) = 2,122, p = 0.002$ for CPP =

40 cmH₂O, $F(7,121) = 2,346, p = 0.00$ for CPP = 60 cmH₂O, $F(7,121) = 8,791, p = 0.00$ for CPP = 80 cmH₂O, $F(7,121) = 7,269, p = 0.00$ for CPP = 100 cmH₂O, $F(7,121) = 10,289, p = 0.00$ for CPP = 120 cmH₂O). After the training, level of H₂O₂ was significantly decreased compared to the control group at male rats ($p = 0.030$ at CPP 40 cmH₂O, $p = 0.032$ at CPP 60 cmH₂O, $p = 0.031$ at CPP 80 cmH₂O, $p = 0.026$ at CPP 100 cmH₂O, $p = 0.029$ at CPP 120 cmH₂O). The same trend was noticed in female rats ($p = 0.043$ at CPP 40 cmH₂O, $p = 0.035$ at CPP 60 cmH₂O, $p = 0.033$ at CPP 80 cmH₂O, $p = 0.029$ at CPP 100 cmH₂O, $p = 0.026$ at CPP 120 cmH₂O) (Figure 4A). Gender difference in the level of H₂O₂ in 2 weeks detrained females compared to 2 weeks detrained males was observed, where levels were lower in female rats ($p = 0.028$ at CPP 100 cmH₂O, $p = 0.022$ at CPP

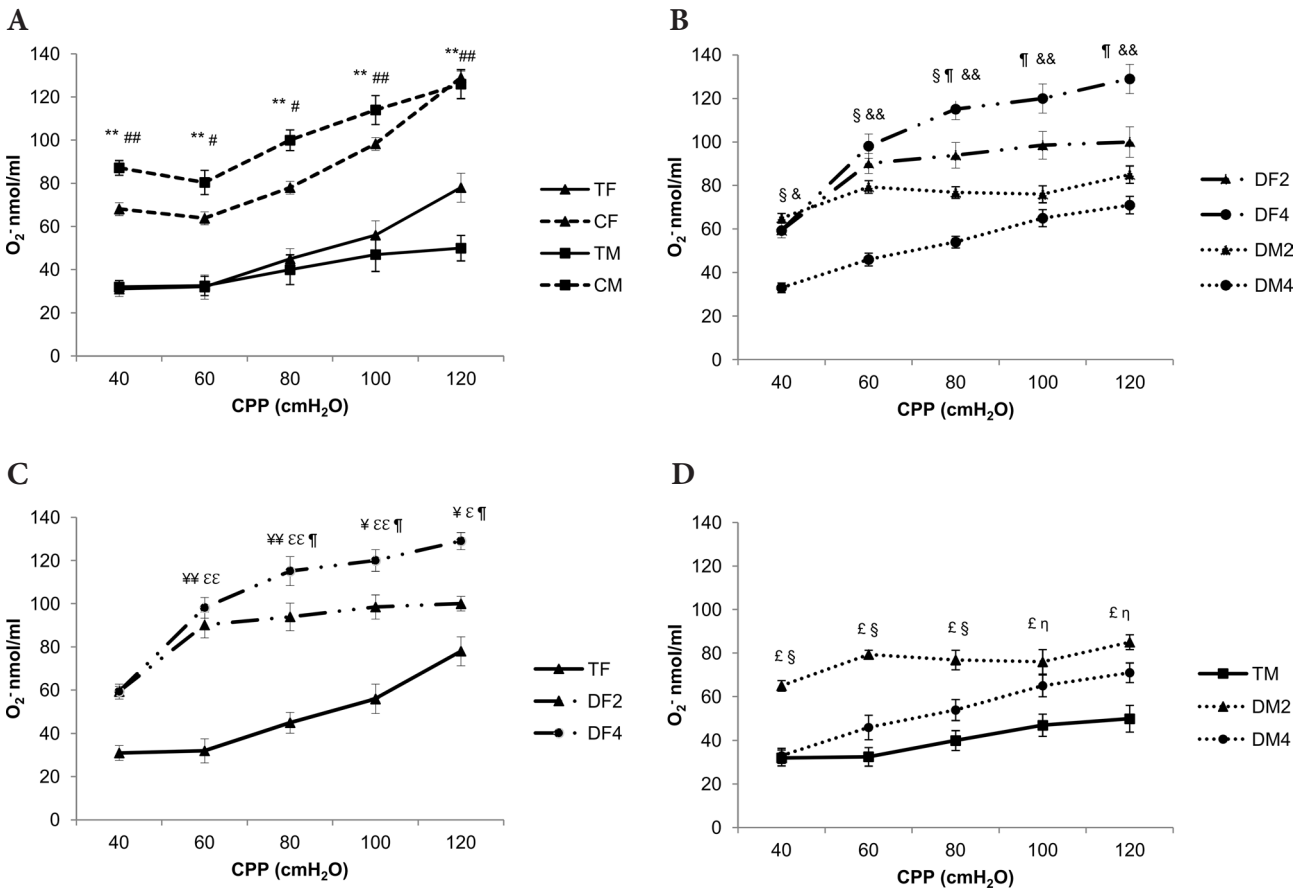


Figure 2. Effects of training/detraining on superoxide anion radical level determined in coronary venous effluent (O₂⁻). **A.** Comparison between control and trained groups. **B.** Comparison between 2 and 4 weeks detrained groups. **C.** Comparison between trained, 2 and 4 weeks detrained females. **D.** Comparison between trained, 2 and 4 weeks detrained males. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ TM vs. CM; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ TF vs. CF; § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$ DM2 vs. DM4; ¶ $p < 0.05$, ¶¶ $p < 0.01$ DF2 vs. DF4; £ $p < 0.05$, ££ $p < 0.01$ TM vs. DM2; ¥ $p < 0.05$, ¥¥ $p < 0.01$ TF vs. DF2; ¶¶ $p < 0.05$, ¶¶¶ $p < 0.01$ TM vs. DM4; ε $p < 0.05$, εε $p < 0.01$ TF vs. DF4; Ω $p < 0.05$, ΩΩ $p < 0.01$ DM2 vs. DF2; & $p < 0.05$, && $p < 0.01$ DM4 vs. DF4. Data are means ± SD. CPP, coronary perfusion pressure; TM, trained males; DM2, 2 weeks detrained males; DM4, 4 weeks detrained males; CM, control males; TF, trained females; DF2, 2 weeks detrained females; DF4, 4 weeks detrained females; CF, control females.

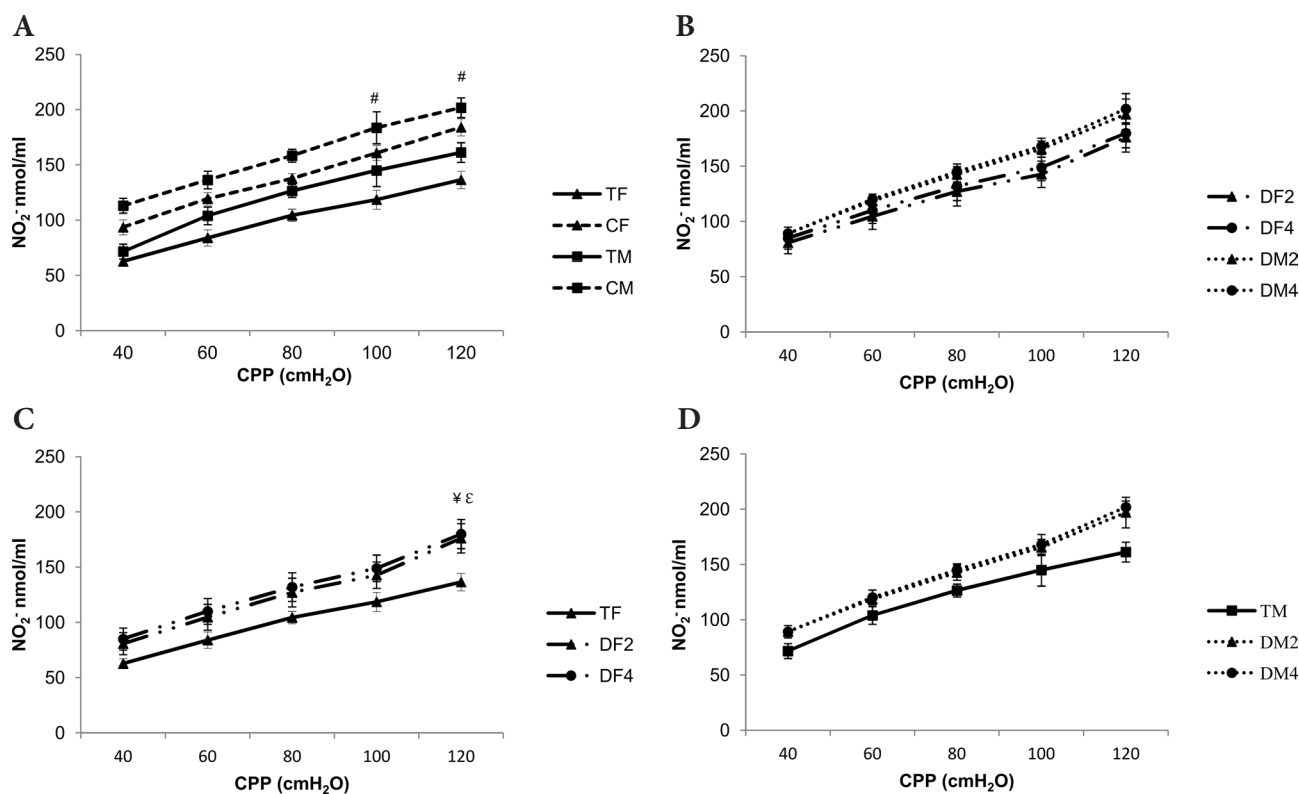


Figure 3. Effects of training/detraining on nitrite level determined in coronary venous effluent (NO_2^-). **A.** Comparison between control and trained groups. **B.** Comparison between 2 and 4 weeks detrained groups. **C.** Comparison between trained, 2 and 4 weeks detrained females. **D.** Comparison between trained, 2 and 4 weeks detrained males. ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ TM vs. CM; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ TF vs. CF; § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$ DM2 vs. DM4; ¶ $p < 0.05$, ¶¶ $p < 0.01$ DF2 vs. DF4; £ $p < 0.05$, ££ $p < 0.01$ TM vs. DM2; ¥ $p < 0.05$, ¥¥ $p < 0.01$ TF vs. DF2; ¶¶ $p < 0.05$, ¶¶¶ $p < 0.01$ TM vs. DM4; £ $p < 0.05$, ££ $p < 0.01$ TF vs. DF4; Ω $p < 0.05$, ΩΩ $p < 0.01$ DM2 vs. DF2; & $p < 0.05$, && $p < 0.01$ DM4 vs. DF4. Data are means \pm SD. For abbreviations, see Fig. 2.

120 cmH_2O). Furthermore, level of this parameter was lower in 4 weeks detrained females compared to 4 weeks detrained males ($p = 0.013$ at CPP 100 cmH_2O , $p = 0.018$ at CPP 120 cmH_2O) (Figure 4B). In trained females, level of H_2O_2 was significantly lower than in 2 weeks detrained at CPP 60–120 cmH_2O ($p = 0.046$ at CPP 60 cmH_2O , $p = 0.038$ at CPP 80 cmH_2O , $p = 0.029$ at CPP 100 cmH_2O , $p = 0.035$ at CPP 120 cmH_2O). In 4 weeks detrained females, level of this parameter was higher in comparison to trained females ($p = 0.045$ at CPP 60 cmH_2O , $p = 0.039$ at CPP 80 cmH_2O , $p = 0.037$ at CPP 120 cmH_2O) (Figure 4C). The same trend was revealed in males when compared trained group to 2 weeks detrained ($p = 0.035$ at CPP 40 cmH_2O , $p = 0.031$ at CPP 60 cmH_2O , $p = 0.022$ at CPP 80 cmH_2O , $p = 0.007$ at CPP 100 cmH_2O , $p = 0.006$ at CPP 120 cmH_2O). There was an increase after 4 weeks of detraining in males compared to training at all CPP values ($p = 0.029$ at CPP 40 cmH_2O , $p = 0.027$ at CPP 60 cmH_2O , $p = 0.018$ at CPP 80 cmH_2O , $p = 0.009$ at CPP 100 cmH_2O , $p = 0.005$ at CPP 120 cmH_2O) (Figure 4D).

Levels of TBARS

There was a significant difference between groups in the level of TBARS ($F(7,121) = 7.229$, $p = 0.00$ for CPP = 40 cmH_2O , $F(7,121) = 5,671$, $p = 0.00$ for CPP = 60 cmH_2O , $F(7,121) = 3,362$, $p = 0.000$ for CPP = 80 cmH_2O , $F(7,121) = 2,469$, $p = 0.004$ for CPP = 100 cmH_2O , $F(7,121) = 10,322$, $p = 0.00$ for CPP = 120 cmH_2O). In the trained group, a decrease in level of TBARS was noticed by comparing to the control group in male rats at all CPP ($p = 0.019$ at CPP 40 cmH_2O , $p = 0.009$ at CPP 60 cmH_2O , $p = 0.005$ at CPP 80 cmH_2O , $p = 0.008$ at CPP 100 cmH_2O , $p = 0.009$ at CPP 120 cmH_2O). Training led to the decrease in the level of this parameter in females at all CPP values compared to controls ($p = 0.013$ at CPP 40 cmH_2O , $p = 0.009$ at CPP 60 cmH_2O , $p = 0.007$ at CPP 80 cmH_2O , $p = 0.006$ at CPP 100 cmH_2O , $p = 0.002$ at CPP 120 cmH_2O) (Figure 5A). There was a significant increase in 2 weeks detrained females compared to 2 weeks detrained males at all CPP values ($p = 0.022$ at CPP 40 cmH_2O , $p = 0.018$ at CPP 60 cmH_2O , $p = 0.025$ at CPP

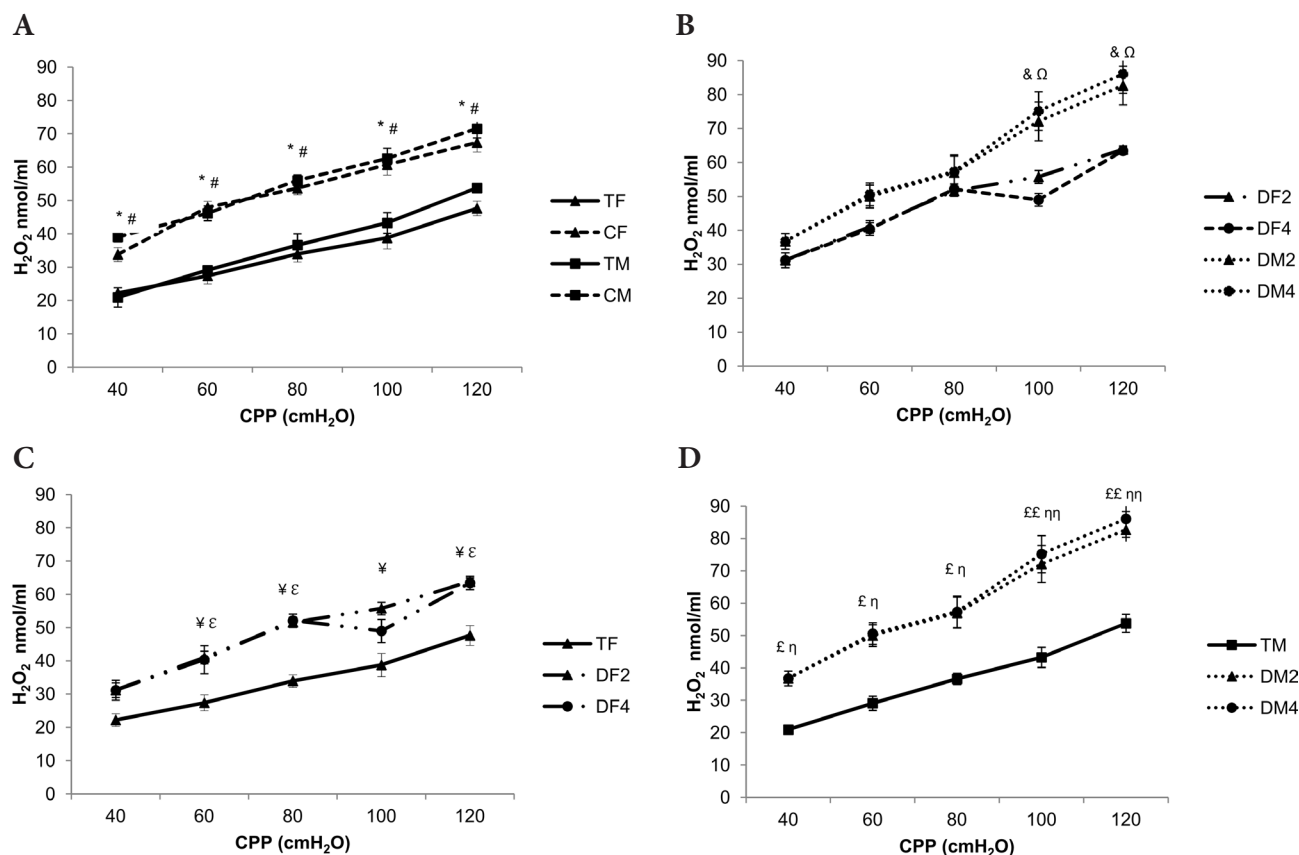


Figure 4. Effects of training/detraining on hydrogen peroxide level determined in coronary venous effluent (H_2O_2). **A.** Comparison between control and trained groups. **B.** Comparison between 2 and 4 weeks detraining groups. **C.** Comparison between trained, 2 and 4 weeks detraining females. **D.** Comparison between trained, 2 and 4 weeks detraining males. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ TM vs. CM; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ TF vs. CF; § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$ DM2 vs. DM4; ¶ $p < 0.05$, ¶¶ $p < 0.01$ DF2 vs. DF4; ε $p < 0.05$, εε $p < 0.01$ TM vs. DM2; ¶¶ $p < 0.05$, ¶¶¶ $p < 0.01$ TF vs. DF2; ¶¶ $p < 0.05$, ¶¶¶ $p < 0.01$ TM vs. DM4; ε $p < 0.05$, εε $p < 0.01$ TF vs. DF4; Ω $p < 0.05$, ΩΩ $p < 0.01$ DM2 vs. DF2; & $p < 0.05$, && $p < 0.01$ DM4 vs. DF4. Data are means \pm SD. For abbreviations, see Fig. 2.

80 cmH_2O , $p = 0.031$ at CPP 100 cmH_2O , $p = 0.033$ at CPP 120 cmH_2O) (Figure 5B). In group of male rats, there was a decrease in values of this parameter in 2 weeks detraining compared to trained rats, but only in the lowest CPP ($p = 0.029$ at CPP 40 cmH_2O , $p = 0.032$ at CPP 60 cmH_2O). In 4 weeks detraining males levels were lower than in trained males at the highest CPP ($p = 0.022$ at CPP 80 cmH_2O , $p = 0.027$ at CPP 100 cmH_2O , $p = 0.029$ at CPP 120 cmH_2O) (Figure 5D).

Systemic redox state

Levels of superoxide anion radical (O_2^-)

There was a significant difference between groups in the level of O_2^- ($F(7,56) = 8.229$, $p = 0.00$). Significantly lower levels were noticed in trained females compared to 2 weeks detraining females ($p = 0.007$) and trained males in

comparison to 2 weeks ($p = 0.008$) and 4 weeks detraining males ($p = 0.007$). There was a decrease in 4 weeks detraining females compared to 2 weeks detraining females ($p = 0.009$). Level of O_2^- in 4 weeks detraining females was significantly lower than in 4 weeks detraining males ($p = 0.006$) (Figure 6A).

Levels of nitrites (NO_2^-)

A significant difference between groups in the level of NO_2^- was noticed ($F(7,56) = 9,125$, $p = 0.00$). There was a decrease in the level of NO_2^- parameter in 2 weeks detraining females in comparison to trained females ($p = 0.024$) and 2 weeks detraining males in comparison to trained males ($p = 0.029$). Level of this parameter in 4 weeks detraining males was decreased compared to trained males ($p = 0.028$). In addition, level of NO_2^- in 4 weeks detraining females was increased compared to 2 weeks detraining females ($p =$

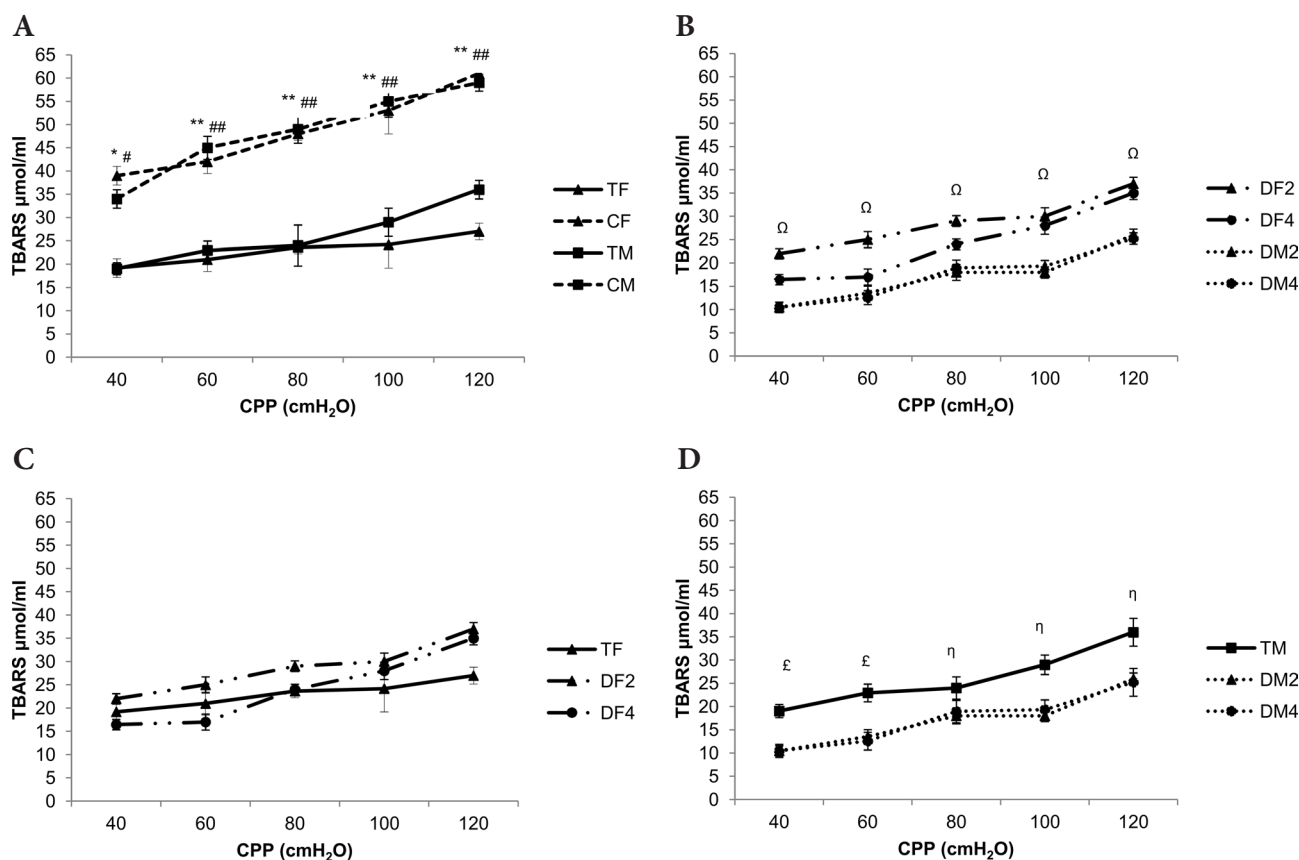


Figure 5. Effects of training/detraining on index of lipid peroxidation determined as TBARS level in coronary venous effluent (TBARS). **A.** Comparison between control and trained groups. **B.** Comparison between 2 and 4 weeks detrained groups. **C.** Comparison between trained, 2 and 4 weeks detrained females. **D.** Comparison between trained, 2 and 4 weeks detrained males. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ TM vs. CM; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ TF vs. CF; § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$ DM2 vs. DM4; ¶ $p < 0.05$, ¶¶ $p < 0.01$ DF2 vs. DF4; ε $p < 0.05$, εε $p < 0.01$ TM vs. DM2; η $p < 0.05$, ηη $p < 0.01$ TF vs. DF2; Ω $p < 0.05$, ΩΩ $p < 0.01$ TM vs. DM4; ΩΩΩ $p < 0.001$ DM2 vs. DF2; & $p < 0.05$, && $p < 0.01$ DM4 vs. DF4. Data are means \pm SD. For abbreviations, see Fig. 2.

0.032). In a 4 weeks detrained group, levels of NO_2^- was significantly higher in female rats than in male rats ($p = 0.026$) (Figure 6B).

Levels of hydrogen peroxide (H_2O_2)

According to the results of one-way ANOVA, there was a statistically significant difference between groups in the level of H_2O_2 ($F(7,56) = 8,125$, $p = 0.00$). A decrease in the level of H_2O_2 in 2 weeks detrained males compared to trained males ($p = 0.009$) and 2 weeks detrained females group compared to trained females group was revealed (0.008). In addition, there was a significant decrease in the level of this parameter in 4 weeks detrained males compared to trained males ($p = 0.007$). In 4 weeks detrained females levels were increased compared to 2 weeks detrained females ($p = 0.006$). In a group of rats who were subjected to 4 weeks of detraining, levels of H_2O_2 were higher in females ($p = 0.004$) (Figure 6C).

Levels of TBARS

There was a significant difference between groups in the level of TBARS ($F(7,56) = 5,125$, $p = 0.01$). Level of TBARS in plasma increased in trained groups compared to control at females ($p = 0.07$) and males ($p = 0.004$). An increase in the level of this parameter in 4 weeks detrained females compared to trained females ($p = 0.029$) and 2 weeks detrained females ($p = 0.034$) was noticed as well (Figure 6D).

Activity of superoxide dismutase (SOD)

Activity of SOD differed between groups ($F(7,56) = 7,221$, $p = 0.00$). A significant increase in the activity of this enzyme in trained group in males was observed in comparison to control males ($p = 0.023$). There was a decrease in the activity of SOD in 2 weeks detrained females ($p = 0.021$) and 4 weeks detrained females ($p = 0.009$) compared to trained females.

In 4 weeks detrained males activity of SOD was decreased in comparison to 2 weeks detrained males ($p = 0.006$) and trained males ($p = 0.008$). There was a statistically significant increase in SOD activity in male rats compared to female rats in the period of 2 weeks detraining (0.003) (Figure 7A).

Activity of catalase (CAT)

Statistically significant difference between groups in the activity of catalase ($F(7,56) = 10,221$, $p = 0.00$) was found. There was an increase in the activity of catalase (CAT) in trained group compared to the control group in females ($p = 0.008$), while in males the difference was not significant. In 2 weeks detrained females the activity was decreased compared to trained females ($p = 0.009$). A decrease in the activity of CAT was observed in 4 weeks detrained females compared to trained females ($p = 0.032$), and that value was increased compared to 2 weeks detrained females ($p = 0.029$). An increased activity was noticed in 4 weeks detrained males compared to trained males ($p = 0.009$) and 2 weeks

detrained males ($p = 0.016$). The only difference in values between males and females was found in trained groups, where females had higher values of CAT activity ($p = 0.006$) (Figure 7B).

Levels of reduced glutathione (GSH)

There was a statistically significant difference between groups in the level of GSH ($F(7,56) = 4,298$, $p = 0.02$). Level of reduced glutathione (GSH) was significantly increased in trained groups compared to control groups in females ($p = 0.002$) and males ($p = 0.003$). In 2 weeks detrained males values were increased compared to trained males ($p = 0.027$). In 4 weeks detrained males group level of GSH was increased compared to trained males ($p = 0.022$). In addition, level of GSH was lower in 4 weeks detrained females than in 2 weeks detrained females ($p = 0.021$). Gender difference in 4 detrained females in comparison to the 4 weeks detrained males group was noticed, where values in female rats were lower than in male rats (0.018) (Figure 7C).

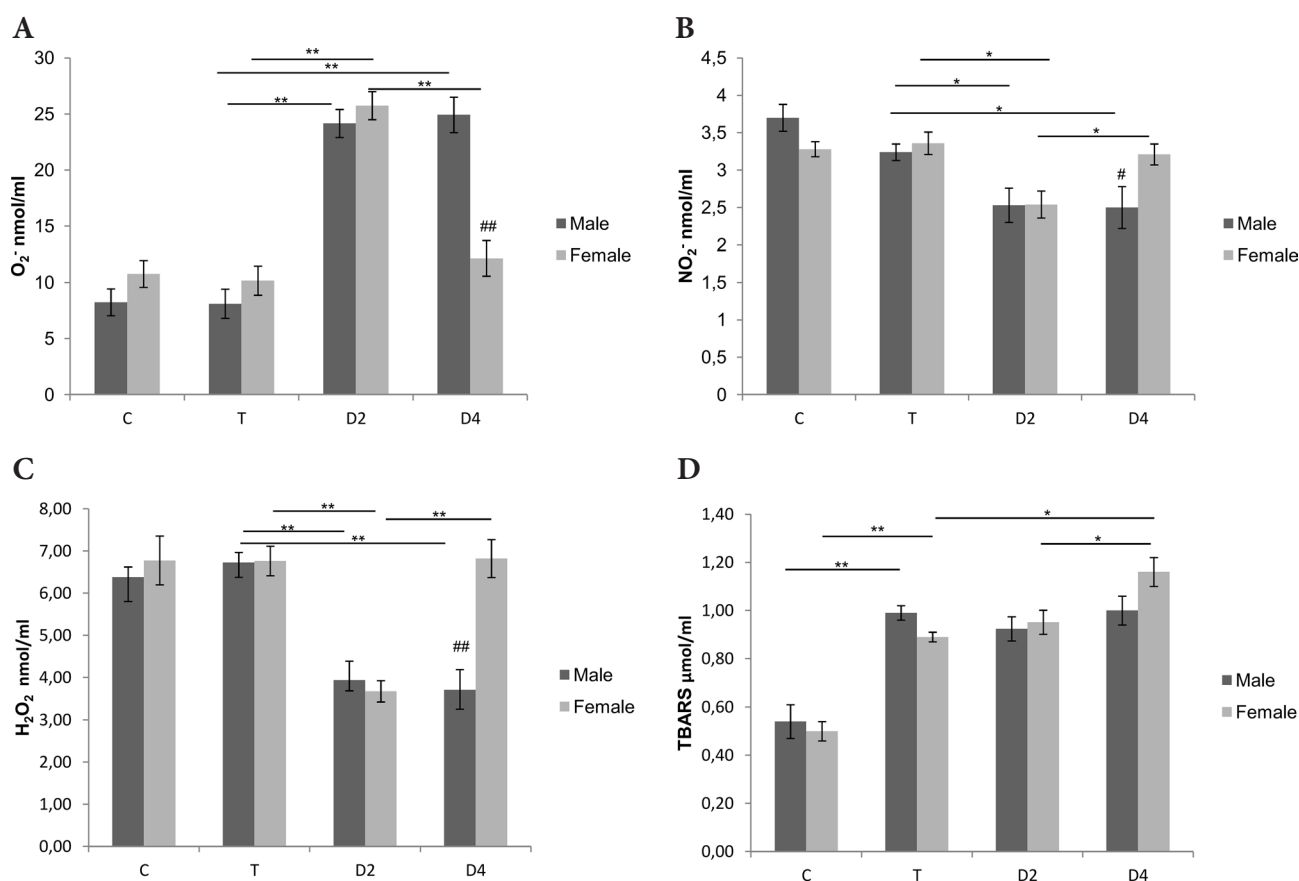


Figure 6. Effects of training/detraining on level of pro-oxidants determined in plasma: O₂· (A), NO₂⁻ (B), H₂O₂ (C), TBARS (D). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ C vs. T vs. D2 vs. D4; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ males vs. females. Data are means \pm SD. C, control group; T, trained group; D2, 2 weeks detrained group; D4, 4 weeks detrained group.

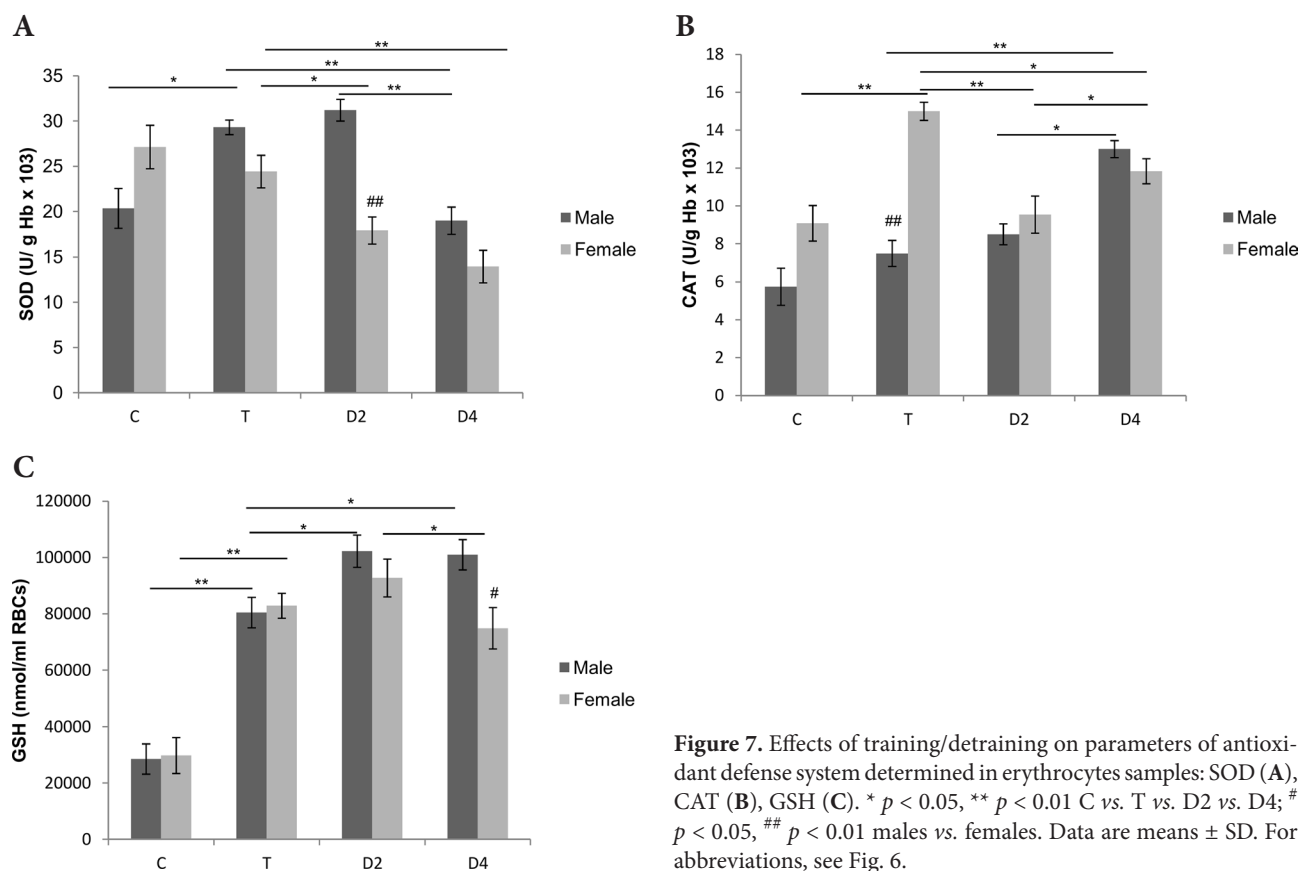


Figure 7. Effects of training/detraining on parameters of antioxidant defense system determined in erythrocytes samples: SOD (A), CAT (B), GSH (C). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ C vs. T vs. D2 vs. D4; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ males vs. females. Data are means \pm SD. For abbreviations, see Fig. 6.

Discussion

Potential source of oxidative stress during anaerobic training is an increased aerobic metabolism (Stankovic and Radovanovic 2012). ROS and RNS production during exercise follows the principal of hormesis and may represent an adaptive response of cells to stressors, such as physical activity. The responses of biological systems may be described with a bell-shaped curve whose two endpoints are inactivity and overtraining (Stojanovic Tosic et al. 2015; Radak et al. 2017).

Numerous investigations aimed to examine the influence of aerobic exercise on oxidative stress markers were mostly focused on treadmill or cycle ergometer (Powers et al. 2016). We've chosen to examine the effects of swimming training due to the fact that swimming is considered as a natural ability of rats and it has also been proposed as a convenient model for studying the physiological changes and stress response to training (Balci and Pepe 2012; Araujo et al. 2015).

Results of our study clearly show that 8 weeks of swimming training led to the decrease of almost all pro-oxidants measured in the heart both in male and female rats. Analysis of aforementioned parameters in the coronary venous efflu-

ent during coronary autoregulation refers to the oxidative stress in the endocardium of the left ventricle and endothelium of the coronary circulation as well. In order to complete the picture about the role of oxidative stress in physiology of effort, we investigated the systemic oxidative stress response to training and detraining. Generally viewed, there were no changes in the release of the measured pro-oxidants in plasma, thus suggesting that applied intensity and duration of swimming training may affect only local production of ROS (in the heart), while systemic response was not changed. In addition, having in mind that release of pro-oxidants was even decreased in the heart, it seems that swimming training of this type doesn't promote oxidative damage, nor act protectively within the heart.

Regarding the components of antioxidant defense system, SOD, CAT and GSH, training led to the significant increase of GSH values at both sexes, CAT in females and SOD in males. It can be assumed that effects of training on these antioxidant parameters depend on their chemical characteristics. Also, results for these enzymes can not be interpreted independently of O_2^-/H_2O_2 dynamic. In female, unchanged activity of SOD in training induced less scavenging of O_2^- , leading to higher H_2O_2 values (compared to 2 weeks detrained group), which can induce enhanced CAT

activity. Increased activity of antioxidants is in correlation with unaltered levels of pro-oxidants in the plasma and may explain these results.

Our results are in agreement with the study conducted by Balci et al. who found decreased malondialdehyde (MDA) levels in the heart of female rats at rest, however they didn't observe any change in MDA and NO levels in male rats in the heart (Balci and Pepe 2012). Neither did we reveal the difference in level of NO_2^- in the heart when compared trained and untrained rats both sexes at rest. The potential explanation for this may be the interaction of NO with reactive oxygen species (ROS), particularly O_2^- . Significantly lower levels of O_2^- in the present study may be a consequence of this interaction resulting in generation of peroxynitrite (ONOO^-).

A group of researchers whose methodology differed from ours in case of duration of swimming training noticed that this type of activity reduced lipid peroxidation in the heart (Venditti and Di Meo 1997). It should be taken into consideration that pro-oxidants detected in blood plasma and erythrocytes reflect the redox state of all components which are included in the motor act during physical exercise. In that sense it's logical to expect the different values of parameters of oxidative stress response measured in heart and in plasma (Elikov 2016). Furthermore, Hu et al. (2000) observed no change in the lipid peroxidation level in heart, which may be explained by a shorter period of swimming training (7 days, 45 minutes *per day*) insufficient to establish positive adaptations to exercise.

When discussing antioxidant defense system, our results are not in accordance with the results of Balci and Pepe (2012) who revealed that 8 weeks of swimming training caused a decrease in SOD activity and didn't affect total GSH levels in rat heart. Furthermore, Lima and co-workers proved increased reduced glutathione (GSH) content and reduced/oxidized (GSH/GSSG) ratio, higher superoxide dismutase activity in liver mitochondria after 6-week swimming training protocol (Lima et al. 2013). Others showed an increase in serum superoxide dismutase activity induced by swimming as well (Botezelli et al. 2011). We expected that gender differences in response to training exist, since it's been reported that female rats often show lower oxidative damage than males (Stankovic and Radovanovic 2012). However, values of all measured pro-oxidants were similar in female and male rats in training.

It's been known that the exercise-induced adaptive process is reversible in case of cardiovascular function and mitochondrial enzyme activity (Mujika and Padilla 2000). After 2 weeks of detraining, the release of O_2 and H_2O_2 in the heart was increased compared to the values in training. Regarding the systemic response, we noticed the same trend in O_2 production, while levels of NO_2^- and H_2O_2 were decreased in comparison to the levels in training. The

explanation for decreased plasma level in H_2O_2 detraining period may be an increased catalase activity during training, which catalyzed the decomposition of hydrogen peroxide to water and oxygen. Furthermore, SOD and CAT activity were lower after 2 weeks of training cessation in females and level of GSH was higher in males in comparison with the values in training. The difference between gender that we noticed was an increased activity of SOD in males and higher TBARS production in heart of females.

We detected an increase in cardiac release of O_2 at both sexes and H_2O_2 at males after four weeks of training cessation compared to the values in training. Interestingly, after 4 weeks of detraining levels of the most of measured pro-oxidants in females were similar to those in training. Regarding the parameters of antioxidant defense system, 4 weeks detraining led to the decrease in SOD activity at both sexes and CAT in females compared with training. On the contrary, GSH and CAT values in males remained increased in detraining. There is a data that increased total antioxidant capacity was associated with an increased circulating $\text{CD34}^+/\text{VEGFR2}^+$ cells in detraining (Witkowski et al. 2010).

Radak et al. examined the effects of 8 weeks of swimming and 8 weeks of detraining on the level of free radical species in the cerebellum. They proved that positive effects of training were maintained during detraining (Radak et al. 2006). Others showed that 16 week of walking/jogging at 50–80% of HR(max) decreased MDA levels and increased total antioxidant capacity (TAC) and glutathione peroxidase activity (GPX) (Fatouros et al. 2004). However after 4 months of training cessation those effects were eliminated. It has been previously reported that effects of treadmill training on paraventricular nucleus in hypertensive rats reversed after 2 weeks of training cessation (Agarwal et al. 2012).

Although estrogen 17β -estradiol and different levels of ferritin may be responsible for the higher antioxidant protection noticed in females compared to males, we revealed lower antioxidant protection in females during detraining (Català-Niell et al. 2008; Stankovic and Radovanovic 2012). Based on our results we may hypothesize that probably there are other mechanisms independent of the change in estrogen and iron metabolism, thus contributing to sex differences in oxidative-stress response to exercise cessation. Beside mentioned mechanisms involved in effects of training/detraining on diversity between male and female antioxidative status, a very recent study on rats have shown gender difference in mitochondrial function which can be affected by exercise or cessation of it (Farhat et al. 2017). It can be assumed that diminished mitochondrial activity can lead to depressed production of mitochondrial SOD and thus impair functioning of cellular antioxidant pathways (Macak-Safranko et al. 2011). Lower antioxidant values in our study support higher pro-oxidant levels after 4 weeks of detraining noticed in females.

We confirmed the fact that sexual dimorphism in oxidative capacity exists. These results suggest different dynamic of production of specific pro-oxidants among sexes during period of training cessation. One of limitations of our investigation was the absence of technique through which cellular mechanisms of obtained effects could be proved. Therefore further studies are necessary for better understanding the possible mechanisms underlying the gender differences in response to training and detraining.

Our results illustrated that moderate-intensity physical exercise of sufficient duration leads to the beneficial adaptations, manifested as improvement of antioxidant defense system. In addition, these results suggest that 2 and 4 weeks of training cessation may lead to a partial lost in exercise-induced adaptation. Positive antioxidative effects of training remained longer in males. Findings of the present study may help in elucidation of training and detraining effects on modulation of redox homeostasis, especially from aspect of gender differences.

Acknowledgement. This work was supported by Junior project 09/11, by Faculty of Medical Sciences, Kragujevac, Serbia.

References

- Agarwal D, Dange RB, Vila J, Otamendi AJ, Francis J (2012): De-training differentially preserved beneficial effects of exercise on hypertension: effects on blood pressure, cardiac function, brain inflammatory cytokines and oxidative stress. *PLoS One* **7**, e52569 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052569>
- Ammeren J, Powers S, Lawler J, Criswell D, Martin D, Lowenthal D, Pollock M (1992): Exercise training-induced alterations in skeletal muscle oxidative and antioxidant enzyme activity in senescent rats. *Int. J. Sports Med.* **13**, 412–416 <https://doi.org/10.1055/s-2007-1021290>
- Araujo LC, de Souza IL, Vasconcelos LH, Brito AF, Queiroga FR, Silva AS, da Silva PM, Cavalcante FA, da Silva BA (2015): Chronic aerobic swimming exercise promotes functional and morphological changes in rat ileum. *Biosci. Rep.* **35**, e00259 <https://doi.org/10.1042/BSR20150001>
- Auclair C, Voisin E (1985): Nitroblue tetrazolium reduction. In: *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. (Ed. RA Greenvald), pp. 123–132, Boca Raton, CRC Press, Greenvald Inc
- Balci SS, Pepe H (2012): Effects of gender, endurance training and acute exhaustive exercise on oxidative stress in the heart and skeletal muscle of the rat. *Chin. J. Physiol.* **55**, 236–244
- Beutler E (1975): Reduced glutathione (GSH). In: *Red Cell Metabolism, a Manual of Biochemical Methods*. (Ed. E. Beutler), pp. 112–114, Grune and Stratton, New York
- Beutler E (1982): Catalase. In: *Red Cell Metabolism, a Manual of Biochemical Methods*. (Ed. E. Beutler), pp. 105–106, Grune and Stratton, New York
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012): Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.* **5**, 9–19 <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Botezelli JD, Cambri LT, Ghezzi AC, Dalia RA, Scariot MPP, Ribeiro C, Voltarelli FA, Mello MA (2011): Different exercise protocols improve metabolic syndrome markers, tissue triglycerides content and antioxidant status in rats. *Diabetol. Metab. Syndr.* **3**, 35 <https://doi.org/10.1186/1758-5996-3-35>
- Català-Niell A, Estrany ME, Proenza AM, Gianotti M, Lladó I (2008): Skeletal muscle and liver oxidative metabolism in response to a voluntary isocaloric intake of a high fat diet in male and female rats. *Cell Physiol. Biochem.* **22**, 327–336 <https://doi.org/10.1159/000149811>
- Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **107**, 1198–1205 [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(82\)80124-1](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(82)80124-1)
- Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, Dumelin EE, Tappel AL (1978): Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.* **45**, 927–932 <https://doi.org/10.1152/jappl.1978.45.6.927>
- Elikov AV (2016): Oxidative balance in rats during adaptation to swimming load. *Bull. Exp. Biol. Med.* **162**, 180–183 <https://doi.org/10.1007/s10517-016-3570-4>
- Farhat F, Amérand A, Simon B, Guegueniat N, Moisan C (2017): Gender-dependent differences of mitochondrial function and oxidative stress in rat skeletal muscle at rest and after exercise training. *Redox Rep.* **1**, 1–7 <https://doi.org/10.1080/13510002.2017.1296637>
- Fatouros IG, Jamurtas AZ, Villiotou V, Pouliopoulou S, Fotinakis P, Taxildaris K, Deliconstantinos G (2004): Oxidative stress responses in older men during endurance training and detraining. *Med. Sci. Sports Exerc.* **36**, 2065–2072 <https://doi.org/10.1249/01.MSS.0000147632.17450.FF>
- Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Romagnoli M, Arduini A, Borrás C, Pallardo FV, Sastre J, Vina J (2008): Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am. J. Clin. Nutr.* **87**, 142–149 <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.1.142>
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982): Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131–138 [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X)
- Hu Y, Gursoy E, Cardounel A, Kalimi M (2000): Biological effects of single and repeated swimming stress in male rats. *Endocrine* **13**, 123–129 <https://doi.org/10.1385/ENDO:13:1:123>
- Lima FD, Stamm DN, Della-Pace ID, Dobrachinski F, de Carvalho NR, Royes LF, Soares FA, Rocha JB, González-Gallego J, Bresciani G (2013): Swimming training induces liver mitochondrial adaptations to oxidative stress in rats submitted to repeated exhaustive swimming bouts. *PLoS One* **8**, e55668 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055668>
- Liu J, Yeo HC, Overvik-Douki E, Hagen T, Doniger SJ, Chyu DW, Brooks GA, Ames BN (2000): Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J. Appl. Physiol.* **89**, 21–28 <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.89.1.21>

- Macak-Safranko Z, Sobocanec S, Saric A, Balog T, Sverko V, Kusic B, Marotti T (2011): Cytochrome P450 gender-related differences in response to hyperoxia in young CBA mice. *Exp. Toxicol. Pathol.* **63**, 345–350
<https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.02.009>
- Macara CA, Hootman JM, Sniezek JE (2003): Major public health benefits of physical activity. *Arthritis Rheum.* **49**, 122–128
<https://doi.org/10.1002/art.10907>
- McCord JM, Fridovich I (1969): The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J. Biol. Chem.* **244**, 6056–6063
- Misra HP, Fridovich I (1972): The role of superoxide-anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **247**, 3170–3175
- Mujika I, Padilla S (2000): Detraining: loss of training-induced physiological and performance adaptations. Part I: short term insufficient training stimulus. *Sports Med.* **30**, 79–87
<https://doi.org/10.2165/00007256-200030020-00002>
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979): Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351–358
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C (2008): Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci.* **4**, 89–96
- Pick E, Keisari Y (1980): A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods* **38**, 161–170
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(80\)90340-3](https://doi.org/10.1016/0022-1759(80)90340-3)
- Powers SK, Jackson MJ (2008): Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev.* **88**, 1243–1276
<https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2007>
- Powers SK, Radak Z, Ji LL (2016): Exercise-induced oxidative stress: past, present and future. *J. Physiol.* **594**, 5081–5092
<https://doi.org/10.1113/JP270646>
- Radak Z, Ishihara K, Tekus E, Varga C, Posa A, Balogh L, Boldogh I, Koltai E (2017): Exercise, oxidants, and antioxidants change the shape of the bell-shaped hormesis curve. *Redox Biol.* **12**, 285–290
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.02.015>
- Radak Z, Toldy A, Szabo Z, Siamilis S, Nyakas C, Silye G, Jakus J, Goto S (2006): The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochem. Int.* **49**, 387–392
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.02.004>
- Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K (2014): Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 761264
<https://doi.org/10.1155/2014/761264>
- Ruzicic RD, Jakovljevic V, Djordjevic D (2016): Oxidative stress in training, Overtraining and detraining: from experimental to applied research. *Ser. J. Exp. Clin. Res.* **17**, 343–348
<https://doi.org/10.1515/sjocr-2016-0002>
- Stanković M, Radovanović D (2012): Oxidative stress and physical activity. *Sport Logia* **8**, 1–11
<https://doi.org/10.5550/sgia.120801.en.001S>
- Stojanovic Tomic JT, Jakovljevic VLj, Zivkovic VV, Srejovic IM, Valdevit ZJ, Radovanovic DS, Djuric DM, Ahmetovic ZK, Peric DB, Cankovic MB, Jovanovic MS (2015): Biphasic response of cardiodynamic adaptations to swimming exercise in rats. *Gen. Physiol. Biophys.* **34**, 301–310
https://doi.org/10.4149/gpb_2015001
- Venditti P, Di Meo S (1997): Effect of training on antioxidant capacity, tissue damage, and endurance of adult male rats. *Int. J. Sports Med.* **18**, 497–502
<https://doi.org/10.1055/s-2007-972671>
- Vina J, Sanchis-Gomar F, Martinez-Bello V, Gomez-Cabrera MC (2012): Exercise acts as a drug; the pharmacological benefits of exercise. *Br. J. Pharmacol.* **167**, 1–12
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01970.x>
- Witkowski S, Lockard MM, Jenkins NT, Obisesan TO, Spangenburg EE, Hagberg JM (2010): Relationship between circulating progenitor cells, vascular function and oxidative stress with long-term training and short-term detraining in older men. *Clin. Sci. (Lond)* **118**, 303–311
<https://doi.org/10.1042/CS20090253>

Received: July 28, 2017

Final version accepted: November 2, 2017

Research Article

Impact of hyperbaric oxygenation on oxidative stress in diabetic patients

Sandra Tepić, PhD ¹; Anica Petković, Assist. ²; Ivan Srejšević, Assist. Prof. ³;
Nevena Jeremić, PhD Assist. Prof. ²; Vladimir Živković, Assist. Prof. ³;
Slobodan Lončarević, Assist. Prof. ⁴; Jovana Bradić, Assist. ²; Vladimir Jakovljević, Prof. ^{3,5};
Miodrag Živković, MD ⁶

- ¹ Department of Urgent Medicine, Clinical Center “Zvezdara,” Belgrade, Serbia
- ² Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia
- ³ Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia
- ⁴ Department of Dentistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia
- ⁵ Department of Human Pathology, 1st Moscow State Medical University IM Sechenov, Moscow, Russia
- ⁶ HBO Medical Center, Belgrade, Serbia

CORRESPONDING AUTHOR: Prof. Vladimir Lj. Jakovljevic, MD, PhD – drvladakbg@yahoo.com

ABSTRACT

Taking into consideration that high concentration of oxygen can express toxic effects due to production of reactive oxygen species (ROS), the aim of our investigation was to establish the influence of hyperbaric oxygenation on oxidative stress parameters and antioxidant enzymes in patients with diabetes mellitus (DM) type 2. Investigation included 50 patients with DM type 2 divided into two groups. The first group consisted of 25 patients, mean age 70 years, mean duration of illness 12 years and without manifest peripheral vascular complications (Wagner 0). The second group consisted of 25 patients, mean age 74 years, mean duration of illness 17 years and with manifest peripheral vascular complications (Wagner 1-5).

All patients underwent the same therapeutic protocol, which included 10 hyperbaric oxygenation therapies, once a day for a duration of 60 minutes, with an average partial oxygen pressure of 1.7 atmospheres absolute (ATA). In blood samples the following parameters of redox balance were determined: levels of nitrites (NO₂⁻), index of lipid peroxidation (TBARS), superoxide anion radical (O₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂) and antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT).

Our results clearly show that hyperbaric oxygen (HBO₂) therapy does not have a pro-oxidative effect. Additionally, it seems that this procedure strongly mobilized the antioxidant enzyme system, thus improving defense from oxidative damage. All significant data are marked as P<0.05. Our results have shown that in terms of ROS production, HBO₂ can be safe to use in patients suffering from DM type 2 with or without vascular complications.

INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM) is a progressive metabolic disorder characterized by hyperglycemia resulting from lack of insulin secretion or action. This in turn leads to disorders of lipid, protein and carbohydrate metabolism. According to absolute or relative deficiency of insulin, diabetes is classified as type 1 and type 2 [1]. DM is associated with cardiovascular complications, nephropathy, neuropathy and retinopathy due to glucose uptake regardless of the presence of insulin. In developed countries, this disease is an important source of mortality and morbidity [2]. The World Health Organization (WHO) has assessed that 346 million people have diabetes; this number is predicted to double by 2030 [3].

It has been proposed that one of the crucial events in the pathogenesis of diabetes mellitus is the extent of release of ROS (reactive oxygen species). There is also additional evidence that damage caused by free radicals is possibly involved in beta-cell destruction [4]. Persistent hyperglycemia is present in both types of diabetes and causes increased production of oxygen free radicals. Mechanisms responsible for production of free radicals imply autooxidation of glucose, glycosylation of protein and increased lipid peroxidation. Production of free radicals leads to oxidative stress, which is associated with several health complications [5]. Reduction of glutathione concentration leads to disruptions in cellular signaling and upregulation of NF-κB trans-

KEYWORDS: diabetes mellitus; hyperbaric oxygen treatment; redox status

cription, leading to oxidative conditions [6]. In cases of catalase deficiency, β -cells undergo oxidative stress by producing excess ROS, which leads to β -cells dysfunction and ultimately diabetes. The antioxidant enzymes also play an important protective role in the pathogenesis of diabetes mellitus [4].

Hyperbaric oxygen (HBO₂) therapy is a therapeutic modality which provides extra oxygen to tissues. HBO₂ has been suggested as valuable addition to conventional treatment for many indications (e.g., decompression sickness, gas or air embolism, carbon monoxide poisoning, clostridial myositis and myonecrosis, arterial insufficiencies, osteomyelitis, diabetic foot ulcer) [7]. During HBO₂ therapy a person breathes pure oxygen (100%) at pressures greater than 1 atmosphere, usually 2 to 3 atmospheres absolute (ATA). By increasing blood oxygen content, HBO₂ creates a favorable gradient for the diffusion of oxygen into the tissues. In hypoxic tissues, the enhanced oxygen supply has multiple effects: a direct antihypoxic effect, a reduction in plasma viscosity, an increase in elasticity of erythrocytes, and a reduction of platelet aggregation. Furthermore, this treatment stimulates neocapillarization by increasing capillary penetrance of oxygen to about three times, and allows for nitric oxide (NO) production, thus supporting normal endothelium function [8]. HBO₂ is usually used in DM for the treatment of diabetic foot and peripheral vascular disease [9].

Considering the standpoint that high concentrations of oxygen can cause toxic effects due to production of ROS, the aim of our investigation was to establish the influence of hyperbaric oxygenation on oxidative stress parameters and antioxidant enzymes in patients with diabetes mellitus type 2 (DM2).

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The investigation included 50 patients with DM2 who were divided into two groups classified according to the Wagner scale. The first group consisted of 25 patients, mean age 70 years, mean duration of illness 12 years and without manifest peripheral vascular complications (Wagner 0). The second group included 25 patients, mean age 74 years, mean duration of illness 17 years and with manifest peripheral vascular complications (Wagner 1-5). The study protocol was

approved by the Ethical Committee of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, and it was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. All the participants were informed about the research protocol before giving their written consent to participate in the study.

Hyperbaric oxygen therapy protocol

Hyperbaric treatment was performed at HBO Medical Center in Belgrade. All patients underwent the same therapeutic protocol, which included 10 hyperbaric oxygenation treatments, once daily with a duration of 60 minutes, with an average partial pressure of oxygen of 1.7 ATA. Therapy was conducted in monoplace hyperbaric chambers, BKL-S 303.

Sample collection protocol

Blood samples for biochemical analysis were collected before treatment and then on the third, fifth, seventh and tenth day of treatment. After centrifugation of heparinized venous blood, plasma and erythrocytes were separated. Routine laboratory analyses were measured pre- and post-HBO₂, including: blood glucose levels (BGL), glycosylated hemoglobin (HbA1c), urea, creatinine, creatine kinase and electrolytes such as potassium chloride and sodium chloride. These parameters of redox balance were then determined: levels of nitrites (NO₂-), index of lipid peroxidation (TBARS), superoxide anion radical (O₂-), hydrogen peroxide (H₂O₂), and antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT).

Biochemical assays

Blood samples were drawn from an antecubital vein into a vacutainer test tube containing sodium citrate anticoagulant. Blood samples were analyzed immediately. Blood was centrifuged to separate plasma and red blood cells (RBCs). Biochemical parameters were measured spectrophotometrically, using a UV-1800 Shimadzu UV Spectrophotometer.

Superoxide anion radical determination

The level of superoxide anion radical (O₂-) was measured using nitro blue tetrazolium (NBT) reaction in TRIS-buffer combined with plasma samples and read at 530 nm [10].

Hydrogen peroxide determination

The protocol for measurement of hydrogen peroxide (H₂O₂) is based on oxidation of phenol red in the presence of horseradish peroxidase [11]. A 200- μ l sample with 800 μ l of PRS (phenol red solution) and 10 μ l of POD (horseradish peroxidase) were combined (1:20). The level of H₂O₂ was measured at 610 nm.

Nitric oxide determination

NO decomposes rapidly to form stable metabolite nitrite/nitrate products. Nitrite (NO₂⁻) was determined as an index of nitric oxide production with Griess reagent [12]. Then 0.1 mL 3 N PCA (perchloric acid), 0.4 mL 20 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and 0.2 mL plasma were put on ice for 15 minutes, then centrifuged 15 minutes at 6,000 rpm. After pouring off the supernatant, 220 μ l K₂CO₃ was added. Nitrites were measured at 550 nm. Distilled water was used as a blank probe.

Index of lipid peroxidation: thiobarbituric acid reactive substances

The degree of lipid peroxidation in plasma was estimated by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) using 1% thiobarbituric acid (TBA) in 0.05 NaOH, incubated with plasma at 100°C for 15 minutes and read at 530 nm. Distilled water was used as a blank probe. TBA extract was obtained by combining 0.8 mL of plasma and 0.4 mL trichloroacetic acid (TCA), then samples were put on ice for 10 min, and centrifuged for 15 minutes at 6,000 rpm. This method was described previously [13].

Determination of antioxidant enzymes SOD and CAT

Isolated RBCs were washed three times with three volumes of ice-cold 0.9 mmol/L NaCl, and hemolysates containing about 50 g Hb/L (prepared according to McCord and Fridovich [14] were used for the determination of CAT activity. CAT activity was determined according to Beutler [15]. Then 50 μ l of CAT buffer, 100 μ l hemolysate, and 1 mL 10 mM H₂O₂ were added to the samples. Detection was performed at 360 nm. Distilled water was used as a blank probe. SOD activity was determined by the epinephrine method of Misra and Fridovich [16]. A 100- μ l hemolysate and 1-mL carbonate buffer were mixed, and then 100 μ l of epinephrine were added. Detection was performed at 470 nm.

Statistical analysis

IBM SPSS Statistics 20 was used for statistical analysis. Values were expressed as mean \pm SE. The Student's t-test and analysis of variance (ANOVA) were used for comparison between groups and inside groups. P-values lower than 0.05 were considered to be significant.

RESULTS

There were no statistically significant changes in BGL, Hb1Ac, urea, creatinine, creatine kinase and levels of electrolytes after HBO₂ compared to baseline values (Table 1).

Levels of nitrites

During the observed 10-day period of HBO₂ therapy, there were statistically significant changes in NO₂⁻ between both groups. In the group with vascular complications a significant increase in this parameter was noticed on the third day at the beginning of therapy. Values of NO₂⁻ decreased statistically significantly (P-values lower than 0.05 were considered to be significant) at the fifth day compared to the third day. Values of NO₂⁻ in the group without vascular complications were increasing until the end of treatment. A statistically significant increase was seen in values of NO₂⁻ measured on the 10th day versus its values measured on the seventh day (Figure 1A).

Levels of index of lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid reactive substances

During the observed 10-day period of HBO₂ therapy, there were no statistically significant changes of TBARS values between both groups. However, values of TBARS in the group without vascular complications were lower compared to the other group. On the other hand, in the group with vascular complications, values of TBARS significantly differed between the fifth and seventh days, when values of this parameter increased (Figure 1B).

Levels of superoxide anion radical

Values of superoxide anion radical were statistically significantly increased in diabetic patients with vascular complications at 10th day compared to baseline values. However the highest values of this parameter were noticed on 3rd day of therapy. We have also found that levels of O₂⁻ were decreased after HBOT compared to baseline values in group without vascular complications (Figure 1C).

TABLE 1. The effects of HBO₂ on laboratory parameters in patients with DM type 2 with and without vascular complications

laboratory parameter	Wagner 0		Wagner 1-5	
	before HBO ₂	after HBO ₂	before HBO ₂	after HBO ₂
glucose [mmol/L] (ref. values: 4.1 – 5.9)	5.1	5.0	5.4	4.9
urea [mmol/L] (ref. values: 2.5 – 7.5)	10.2	10.0	10.3	10.1
creatinine [μmol/L] (ref. values: 62 – 115)	113	109	110	108
potassium [mmol/L] (ref. values: 3.5 – 5.1)	4.9	4.8	5.1	5.0
sodium [mmol/L] (ref. values: 136 – 148)	145	144	142	144
chlorides [mmol/L] (ref. values: 98 – 111)	101	95	98	105
creatine kinase [U/L] (ref. values: 32 – 300)	416	401	420	396
HbA1c [mmol/mol] (ref. values: 24 – 43)	50	45	57	49

Levels of hydrogen peroxide

During the observed 10-day period of HBO₂ therapy, there were no statistically significant change in H₂O₂ between groups. Baseline values in the group without vascular complications were significantly higher than values during 10 days of HBO₂. We saw a significant decrease of this parameter on the third day and a significant increase on the seventh day of therapy in the group without vascular complications. In the group with vascular complications, values of this parameter showed a continuous decrease (Figure 1D).

Superoxide dismutase activity

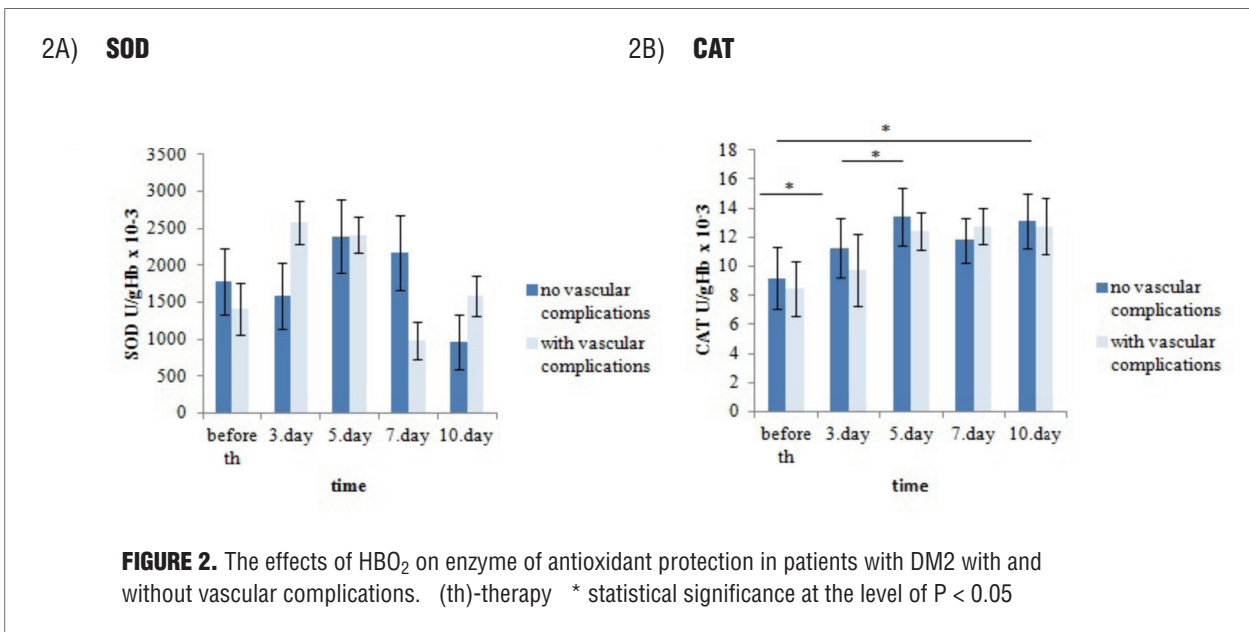
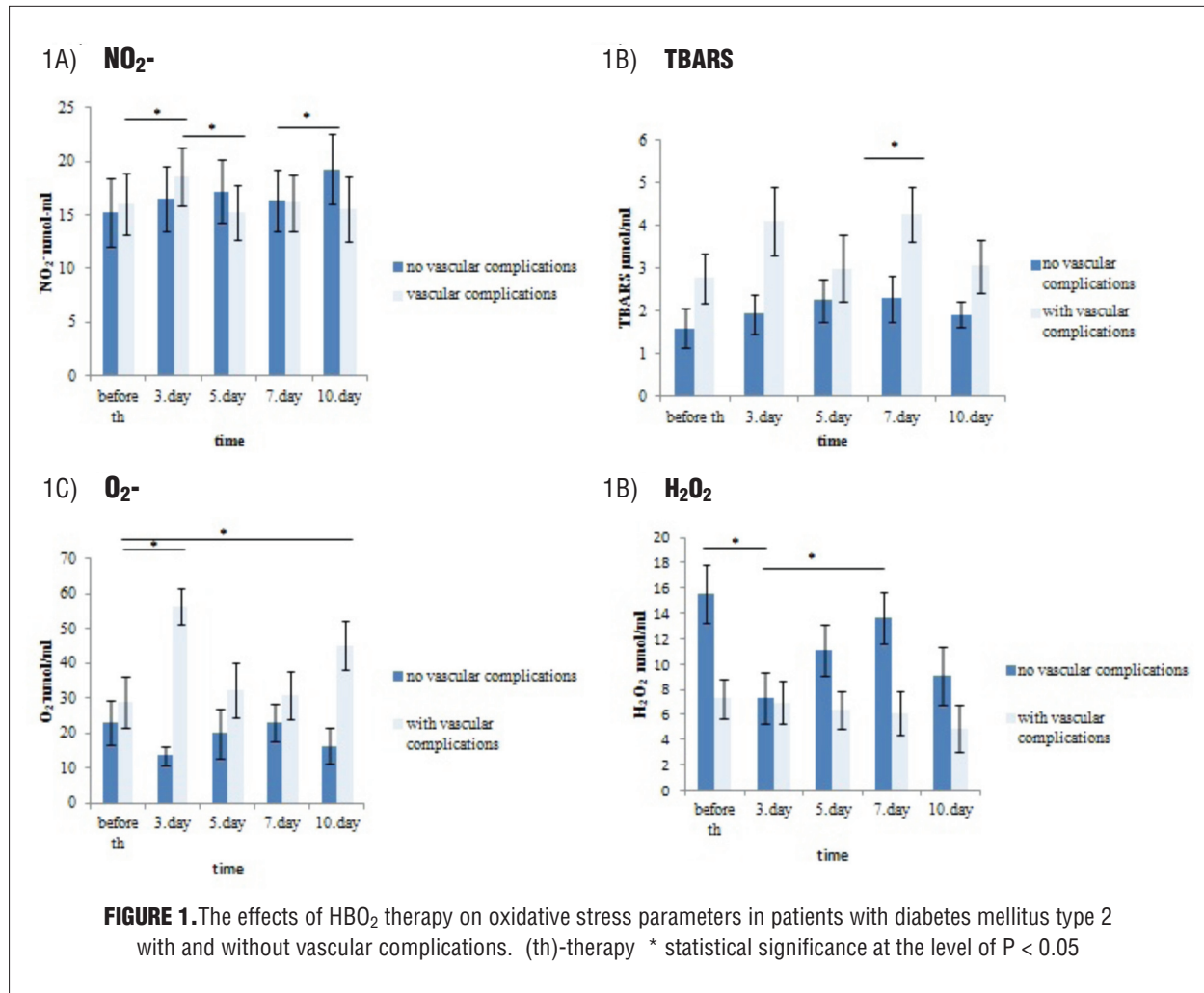
During the observed 10-day period of HBO₂ therapy, there were no statistically significant changes in SOD values between groups. In the group without vascular complications the values of SOD were high until the fifth day and then began decreasing until the end of HBO₂ treatment. However SOD activity in the group with vascular complications were lowest at the seventh day in comparison to values on the other days (Figure 2A).

Catalase activity

During the observed 10-day period of HBO₂ therapy, there were statistically significant changes of CAT values between groups. In the group without vascular complications, values of this parameter increased statistically significantly on the third, fifth and 10th day from the beginning of treatment. On the other hand, continuous increase of CAT was noticed in the group with vascular complications (Figure 2B).

DISCUSSION

Numerous studies have underlined the controversy that exists regarding the effect of HBO₂ on oxidative stress and enzymes of antioxidative defense in several pathophysiological models. Using healthy rats, a study by Ay and co-authors has shown a pro-oxidative activity of HBO₂ as a result of an increased index of lipid peroxidation (TBARS) and activity by SOD and CAT enzymes. In this study one HBO₂ treatment was applied for 90 minutes [17]. Otec and co-workers found that the pro-oxidative effect of HBO₂ is time-dependent [18]. Furthermore, HBO₂ reduced infarct size and



increased catalytic activity of CAT in an experimental infarct of the myocardium [19]. As regards clinical studies, some of them support HBO₂ treatment in different pathophysiological states while others not [20-24].

Chronic vascular complications are the main causes of mortality and morbidity in diabetic patients [25]. The main role in the development of chronic vascular complication is endothelial dysfunction, which leads to production of vasoconstrictors via oxidative degradation of NO and decreased synthesis of NO. Increased production of O₂⁻ interacts with NO, producing one of the most harmful free radicals, peroxynitrite (ONOO⁻), which leads to vasoconstriction and hypoxia [26].

First, we examined the effects of HBO₂ on levels of pro-oxidants, such as NO₂⁻ and TBARS in patients with DM2 without and with vascular complications. Our study has shown continuous increase of NO₂⁻ values in diabetic patients without vascular complications. Also, values of this parameter were higher at the end of the therapy in comparison to the beginning of HBO₂ treatment.

On the other hand, in the group with vascular complications values of NO₂⁻ were lower at the end of the HBO₂ in comparison to the beginning. Studies dealing with influence of HBO₂ on NO bioavailability show controversial results. Some of them have shown that HBO₂ acts via activation of nitric oxide synthase (NOS) [27]. Other studies have shown opposite effects of HBO₂ in the reduction of NO bioavailability [28].

An investigation of Chen and co-workers found that patients with DM2 had significantly increased levels of NO after HBO₂. Our results as well as those of aforementioned studies could be consequence of high insulin levels, which might have a main role in NO production [29].

We found that the values of TBARS in the group without vascular complication slightly increased from the beginning of HBO₂ treatment until the seventh day. However, in a group with vascular complications the values of this parameter statistically increased on the third day. Literature data showed that indices of lipid peroxidation (TBARS) were higher in diabetic patients than in healthy patients who received HBO₂ therapy. As regards diabetic patients with vascular complications the levels of this parameter and allene oxide synthase (AOS) enzyme were much higher than

in patients without vascular complications [30-31]. Similar results were noticed in a study by Grudol and co-authors, where values of the index of lipid peroxidation in diabetic patients with terminal complications were high at the beginning of therapy and then unchanged 15 days after therapy [32].

Furthermore, other pro-oxidants, such as the superoxide anion radical and hydrogen peroxide were also significantly affected by HBO₂. We have found decreased levels of O₂⁻ after HBO₂ compared to baseline values in group without vascular complications, while levels of this parameter were higher in group with vascular complication. This indicates that patients with vascular complications have a lower activity of antioxidant enzymes in comparison to patients without vascular complications. Decreased levels of H₂O₂ in the group with vascular complications might be due to increased CAT activity, which detoxifies hydrogen peroxide to water. Furthermore, one study revealed that levels of H₂O₂ reduced due to increased activity by SOD and CAT, which are the major scavenging enzymes [33].

It is thought that HBO₂ therapy may increase oxidative stress via the production of reactive oxygen species, but literature data indicate that although oxidative stress can occur with HBO₂ treatment, it appears to be less of a concern at hyperbaric pressures under 2.0 ATA [34]. Our results clearly show that HBO₂ does not have a pro-oxidative effect. Parameters of oxidative stress were smoothly decreased during the treatment, which is in compliance with our previous study [35].

In order to complete a picture of the influence of HBO₂ on redox status we examined the activity of antioxidant enzyme systems such as SOD and CAT. Considering the fact that SOD is an enzyme that catalyzes the transformation of the superoxide anion radical to hydrogen peroxide, we can note that these two parameters are in correlation in both groups. Increase of O₂⁻ is followed by decrease in SOD, particularly in the group with vascular complications. In the group without vascular complications, SOD values were high until the fifth day and then decreased until the end of HBO₂ treatment. These findings may suggest that HBO₂ should be used from the fifth day in diabetic patients without vascular complications, while therapy for patients who have diabetes with vascular complications should last longer.

As regards values of CAT during 10 days of HBO₂

treatment, there was significant change in both investigated groups. Similar to SOD values, CAT levels in the group without vascular complications were high until the fifth day. High CAT values were followed by a drop in H₂O₂ values particularly in the group with vascular complications. These results are in agreement with the results of previously conducted research that showed that hyperbaric oxygen treatment below 2.0 ATA can increase the activity of antioxidant enzymes including SOD and CAT [35].

There were no statistically significant changes in BGL, Hb1Ac, urea, creatinine, creatine kinase and levels of electrolytes after HBO₂. This is not in accordance with the previously published papers in this field. Several studies suggest an increase in insulin production or modification of metabolism favorable to the diabetic, resulting in lower blood sugar. However, most of these studies have included diabetes mellitus type 1 (DM1) patients [36-38]. The possible mechanisms of hypoglycemia involve an increase in activity of insulin receptor sites and changes in insulin sensitivity due to upregulation of PPAR- γ signaling associated with hyperbaric oxygen [39]. There are data that show insulin sensitivity increased within three days of hyperbaric oxygen treatment and maintained for 30 sessions [40].

Few studies have revealed that hypoglycemia might be encountered after HBO₂ among DM1 and DM2 patients [41-43]. The possible reason for a discrepancy between our results and results of mentioned authors may be duration of HBO₂ treatment. The shorter period of exposure to hyperbaric oxygenation present in our study might have not been sufficient to cause changes in parameters. There are limited data regarding effects of HBO₂ on kidney function and levels of electrolytes on the human population. Our

results are in agreement with literature data that HBO₂ does not cause renal impairment in a rat model [44,45], which reinforces the assumption that HBO₂ is safe in healthy rats.

Of course, better information about oxidative stress during HBO₂ treatment in such patients could be more scientifically significant if patients can be divided in several groups, especially those with vascular complications according to the Wagner scale.

A limitation of our study is a small sample size. Regarding that, we compared only effects in groups of patients with versus without general vascular complications.

CONCLUSION

Our study has shown that in terms of the production of reactive oxygen species, hyperbaric oxygen therapy can be safe to use in patients suffering from diabetes mellitus type 2 with or without vascular complications. Moreover, it seems that this procedure strongly mobilizes the antioxidant enzyme system, thus improving defense from oxidative damage. Based on our results, treatment for patients without vascular complications should last five days; for diabetics with vascular complications treatment should last longer than five days. However, more research is required to establish the complete mechanism by which HBO₂ therapy can modify oxidation-reduction reactions in patients with DM2 in order to become an additional routine therapeutic strategy in the treatment of diabetes. Keeping in mind that HBO₂ was not connected to the changes in BGL, its usage can be considered safe in terms of this parameter. ■

The authors declare that no conflicts of interest exist with this submission.

REFERENCES

1. Rayburn WF. Diagnosis and classification of diabetes mellitus: highlights from the American Diabetes Association. *J Reprod Med.* 1997; 42:585-586.
2. Shrivastava SR, Shrivastava PS, Ramasamy J. Role of self-care in management of diabetes mellitus. *J Diabetes Metab Disord.* 2013; 12:14.
3. World health organization: Diabetes – Factsheet. 2012. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>.
4. Szaleczky E, Prechl J, Fehér J, Somogyi A. Alterations in enzymatic antioxidant defence in diabetes mellitus--a rational approach. *Postgrad Med J.* 1999; 75:13-17.
5. Matough FA, Budin SB, Hamid ZA, Alwahaibi N, Mohamed J. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2012; 12:5-18.
6. Pitocco D, Tesauro M, Alessandro R, Ghirlanda G, Cardillo C. Oxidative stress in diabetes: implications for vascular and other complications. *Int J Mol Sci.* 2013; 14:21525-21550. Review.
7. Stoekenbroek RM, Santema TB, Legemate DA, Ubbink DT, van den Brink A, Koelemay MJ. Hyperbaric oxygen for the treatment of diabetic foot ulcers: a systematic review. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2014; 47:647-655.
8. Health Quality Ontario. Hyperbaric oxygen therapy for non-healing ulcers in diabetes mellitus: an evidence-based analysis. *Ont Health Technol Assess Ser.* 2005; 5:1-28.
9. Chen SJ, Yu CT, Cheng YL, Yu SY, Lo HC. Effects of hyperbaric oxygen therapy on circulating interleukin-8, nitric oxide, and insulin-like growth factors in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem.* 2007; 40:30-36.
10. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research.* CRC Press, Boca Raton, 1985:123-132.
11. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980; 38:161-170
12. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982; 126:131-138.
13. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95:351-358.
14. McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem.* 1969; 244:6056-6063.
15. Beutler E. Catalase. In: Beutler E (ed) *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods.* Grune and Stratton, New York, 1982:105-106.
16. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide-anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972; 247:3170-3175.
17. Ay H, Topal T, Ozler M, et al. Persistence of hyperbaric oxygen-induced oxidative effects after exposure in rat brain cortex tissue. *Life Sci.* 2007; 80:2025-2029.
18. Oter S, Topal T, Sadir S, et al. Oxidative stress levels in rats following exposure to oxygen at 3 atm for 0-120 min. *Aviat Space Environ Med.* 2007; 78:1108-1113.
19. Kim CH, Choi H, Chun YS, Kim GT, Park JW, Kim MS. Hyperbaric oxygenation pretreatment induces catalase and reduces infarct size in ischemic rat myocardium. *Pflugers Arch.* 2001; 442:519-525.
20. Dennog C, Radermacher P, Barnett YA, Speit G. Antioxidant status in humans after exposure to hyperbaric oxygen. *Mutat Res.* 1999; 428:83-89.
21. Yogarathnam JZ, Laden G, Madden LA, et al. Hyperbaric oxygen: a new drug in myocardial revascularization and protection? *Cardiovasc Revasc Med.* 2006; 7:146-154. Review.
22. Rossignol DA, Rossignol LW, James SJ, Melnyk S, Mumper E. The effects of hyperbaric oxygen therapy on oxidative stress, inflammation, and symptoms in children with autism: an open-label pilot study. *BMC Pediatr.* 2007; 7:36.
23. Bader N, Boser-Westphal A, Koch A, Rimbach G, Weimann A, Poulsen HE, Müller MJ. Effect of hyperbaric oxygen and vitamin C and E supplementation on biomarkers of oxidative stress in healthy men. *Br J Nutr* 2007; 98:826-833.
24. Benedetti S, Lamorgese A, Piersantelli M, Pagliarani S, Benvenuti F, Canestrari F. Oxidative stress and antioxidant status in patients undergoing prolonged exposure to hyperbaric oxygen. *Clin Biochem.* 2004; 37:312-317.
25. Bild DE, Selby JV, Sincock P, Browner WS, Braveman P, Showstack JA. Lower-extremity amputation in people with diabetes. *Epidemiology and prevention.* *Diabetes Care.* 1989; 12:24-31.
26. Aydin A, Orhan H, Sayal A, Ozata M, Sahin G, Isimer A. Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control. *Clin Biochem.* 2001; 34:65-70.
27. Cabigas BP, Su J, Hutchins W, et al. Hyperoxic and hyperbaric-induced cardioprotection: role of nitric oxide synthase 3. *Cardiovasc Res.* 2006; 72:143-151.
28. Hink J, Thom SR, Simonsen U, Rubin I, Jansen E. Vascular reactivity and endothelial NOS activity in rat thoracic aorta during and after hyperbaric oxygen exposure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291:1988-1998.
29. Chen SJ, Yu CT, Cheng YL, Yu SY, Lo HC. Effects of hyperbaric oxygen therapy on circulating interleukin-8, nitric oxide, and insulin-like growth factors in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem.* 2007; 40:30-36.

30. Sundaram RK, Bhaskar A, Vijayalingam S, Viswanathan M, Mohan R, Shanmugasundaram KR. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. *Clin Sci (Lond)*. 1996; 90:255-260.
31. Srivatsan R, Das S, Gadde R, et al. Antioxidants and lipid peroxidation status in diabetic patients with and without complications. *Arch Iran Med*. 2009; 12:121-127.
32. Gürdöl F, Cimsit M, Oner-Iyidogan Y, Körpınar S, Yalçinkaya S, Koçak H. Early and late effects of hyperbaric oxygen treatment on oxidative stress parameters in diabetic patients. *Physiol Res*. 2008; 57:41-47.
33. Matsunami T, Sato Y, Sato T, Ariga S, Shimomura T, Yukawa M. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the streptozotocin-induced diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure. *Int J Clin Exp Pathol*. 2010; 3: 177-188.
34. Yatsuzuka H. Effects of hyperbaric oxygen therapy on ischemic brain injury in dogs. *Masui*. 1991; 40:208-223.
35. Tepic S, Zivkovic M, Terzic N, Krivokuca R, Ljesevic B, Jakovljevic V. Effect of hyperbaric oxygen treatment on oxidative stress in patients having diabetes mellitus type 2. *Med Pregl*. 2009; 62:225-230.
36. Ekanayake L, Doolette D. Effects of hyperbaric oxygen treatment on blood sugar levels and insulin levels in diabetics. *SPUMS J*. 2001; 31:16-20.
37. Longoni C, Camporesi EM, Buizza M, et al. Reduction in insulin requirements during hyperbaric therapy. *Undersea Biomed Res*. 1998; 15:16-17.
38. Rose RE, Rice JH, Kraft KL, et al. An ongoing study of plasma glucose measurement in diabetic patients during hyperbaric oxygen therapy. *Undersea Hyperbar Med*. 2001; 28:32.
39. Nwafor TS, Collins N. Managing low blood glucose levels in patients undergoing hyperbaric oxygen therapy. *Ostomy Wound Manage*. 2014; 60:12-5.
40. Wilkinson D, Chapman IM, Heilbronn LK. Hyperbaric oxygen therapy improves peripheral insulin sensitivity in humans. *Diabet Med*. 2012; 29:986-969.
41. Al-Waili NS, Butler GJ, Beale J, et al. Influences of hyperbaric oxygen on blood pressure, heart rate and blood glucose levels in patients with diabetes mellitus and hypertension. *Arch Med Res*. 2006; 37:991-997.
42. Trytko B, Bennett MH. Blood sugar changes in diabetic patients undergoing hyperbaric oxygen therapy. *SPUMS J*. 2003; 33:62-69.
43. Karadurmus N, Sahin M, Tasci C, et al. Potential benefits of hyperbaric oxygen therapy on atherosclerosis and glycaemic control in patients with diabetic foot. *Pol J Endocrinol*. 2010; 61:275-279.
44. Berkovitch M, Tsadik R, Kozler E, Abu-Kishk I. The effect of hyperbaric oxygen therapy on kidneys in a rat model. *Scientific World Journal*. 2014; 2014:105069.
45. Rubinstein I, Abassi Z, Milman F et al. Hyperbaric oxygen treatment improves GFR in rats with ischaemia/reperfusion renal injury: a possible role for the antioxidant/oxidant balance in the ischaemic kidney. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2009; 24:428-436.



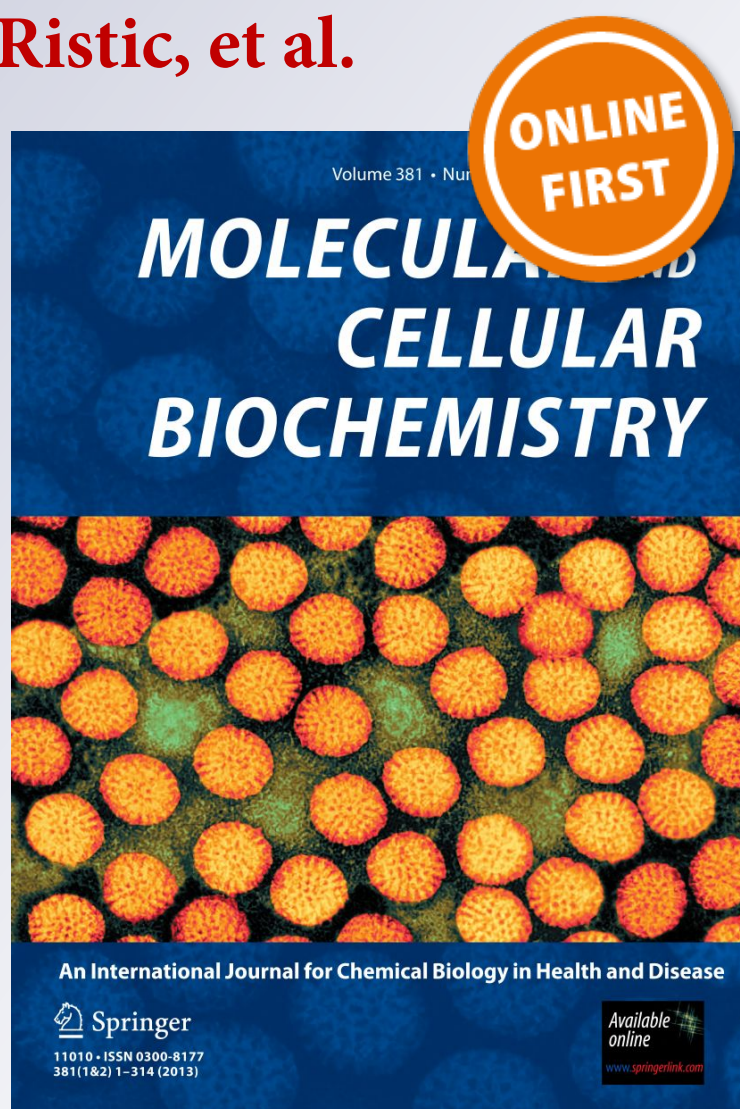
Interleukin-6 as possible early marker of stress response after femoral fracture

Goran Pesic, Jovana Jeremic, Tamara Nikolic, Vladimir Zivkovic, Ivan Srejovic, Aleksandra Vranic, Jovana Bradic, Branko Ristic, et al.

Molecular and Cellular Biochemistry
An International Journal for Chemical
Biology in Health and Disease

ISSN 0300-8177

Mol Cell Biochem
DOI 10.1007/s11010-017-2967-3



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science +Business Media New York. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Interleukin-6 as possible early marker of stress response after femoral fracture

Goran Pesic¹ · Jovana Jeremic² · Tamara Nikolic² · Vladimir Zivkovic³ · Ivan Srejovic³ · Aleksandra Vranic² · Jovana Bradic² · Branko Ristic⁴ · Aleksandar Matic⁴ · Nikola Prodanovic⁴ · Vladimir Jakovljevic³

Received: 10 November 2016 / Accepted: 2 February 2017
© Springer Science+Business Media New York 2017

Abstract Bone fracture healing is a complex process which at best results in full recovery of function and structure of injured bone tissue, but all the mechanisms involved in this process, and their mutual interaction, are not fully understood. Despite advancement of surgical procedures, this type of fractures is still a major public health concern. In the last few decades, a lot of attention is focused on the oxygen-free radicals and inflammatory response markers as important factors of skeletal injury. Thus, the aim of the present study was to follow the changes in redox balance and inflammatory response in elderly patients with femoral fractures during the earliest stages of fracture healing, by measuring the values of the observed markers immediately after fracture, as well as the first, third, and seventh post-operative day. Present study was performed on a group of 65 elderly patients with femoral neck fractures, recruited from the Orthopedic Clinic, Clinical Centre Kragujevac in the period from February to May 2015. Redox status was measured spectrophotometrically and evaluated by measuring the levels of index of lipid peroxidation (measured as TBARS), nitrite (NO_2^-), superoxide anion radical (O_2^-), and hydrogen peroxide (H_2O_2) in plasma, while activities

of corresponding antioxidative enzymes, catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and reduced glutathione (GSH) were measured in erythrocytes. The cytokine concentrations of interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α were determined in plasma, using ELISA assays specific for human cytokines. Our study showed that redox status and TNF- α in elderly patients with femoral fractures did not show statistically significant changes during the early phase of fracture healing. On the other hand, IL-6 increased statistically in first day after intervention. This preliminary study has shown our observations, and we hope that these results may help in better understanding mechanisms which are included at fracture healing. More importantly, this study attempted to create a platform for further research.

Keywords Femoral fracture · Redox status · Oxidative stress · Antioxidative enzymes · Interleukin-6 · Tumor necrosis factor alpha

Introduction

Femoral fractures are a significant cause of morbidity, reduced quality of life, and increase mortality especially in the elderly population [1, 2]. Worldwide, approximately 1.6 million patients suffer from a hip fracture per year [3]. In future, this number is expected to increase to 4.5 or even to 6.3 million due to anticipated demographic changes [4, 5]. The risk for femoral fractures directly correlates with a bone mineral density and bone strength [6]. In accordance to that, the main causes of fractures in the elderly are osteoporosis, osteopenia, muscle atrophy, or age-related bone loss [7, 8]. On the other hand, in young patients, major

✉ Vladimir Jakovljevic
drvladakgbg@yahoo.com

¹ Orthopedic and Traumatology Clinic, Podgorica, Montenegro

² Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

³ Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

⁴ Clinic of Orthopedic Surgery, Clinical Center of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

cause of fractures is trauma such as traffic accidents, fall from heights [9].

Bone fracture healing is a complex process which at best results in full recovery of function and structure of injured bone tissue, but all the mechanisms involved in this process, and their mutual interaction, are not fully understood. Fracture healing process is even more complicated if there are additional aggravating factors such as osteoporosis or osteopenia, which is a relatively commonly found in people of older age [10, 11]. In addition to damage of the bone tissue, there is often significant damage of the surrounding soft tissues. The process of fracture healing can be divided into three phases: (1) the early inflammatory phase, (2) the repair phase, and (3) the remodeling phase [12]. The early inflammatory phase of bone fracture healing is characterized by formation of granulation tissue, which is changed during the early period of next, reparative phase, due to proliferation and chondroblastic differentiation of periosteal precursor cells, resulting in a hyaline cartilage callus around the wounded bone [12, 13]. Disbalance of the activity of osteoblasts and osteoclasts, as well as changes in the microarchitecture and loss of bone substance, may delay bone healing [14]. Considering that increased production of reactive oxygen species leads to oxidative stress, which causes tissue injury and plays important role in many diseases [15, 16], not surprising that in recent years increases the number of investigations dealing with role of oxidative stress in a variety of fractures [17, 18]. Results of previous investigations indicate that there are important changes in redox balance in elderly patients with hip fractures which partially can be brought into connection with pathogenesis and generation of fracture, as well as prooxidative effects of processes that follow after fracture [19–22]. Many investigators suggest that increased production of free radicals is associated with reduced bone density [23]. Increased activity of osteoclasts and decreased activity of osteoblasts may contribute to the imbalance between pro-oxidants and antioxidants in patients with various types of fractures [24]. However, literature data concerning link between oxidative stress and bone fractures as well as bone healing are still very scarce.

Bone metabolism is regulated by several kinds of hormones, growth factors, and cytokines. Interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α are members of a large family of inflammatory cytokines, and recent data indicate their role in immune activity in traumatized patients [25]. These cytokines produced predominantly by activated lymphocytes or mononuclear cells located in inflamed tissue and bone tissue in the vicinity of the fracture, exhibit greater number of effects both on osteoblasts and osteoclasts through several signaling pathways [26]. Skeletal fractures may cause a hyper-inflammatory reaction of the immune system manifested by increased secretion

of proinflammatory cytokines [27, 28]. Also, secondary inflammatory reactions, known as the “secondary hit,” in fractures that require surgical intervention should not be neglected. Actually, data suggest that “secondary hit” cause postoperative complications, such as acute respiratory distress syndrome and multiple organ failure [29, 30]. IL-6 and TNF- α are important cytokines in cellular communication in the musculoskeletal system, but their role in the fracture healing response remains uncertain.

Despite advancement of surgical procedures, this type of fractures is still a major public health concern. In the last few decades, a lot of attention is focused on the oxygen-free radicals and inflammatory response markers as important factors of skeletal injury. The current data dealing with the interaction between the fracture healing on one hand, and oxidative stress and inflammatory markers on the other hand, are controversial, so we hypothesized that dynamics of some of these parameters, in the early stage of healing, may have prognostic role or might emphasize some pathogenic mechanism which plays a key role in the fracture occurrence and the early stage of fracture healing. Thus, the aim of the present study was to follow the changes in redox balance and inflammatory response in elderly patients with femoral fractures during the earliest stages of fracture healing, by measuring the values of the observed markers immediately after fracture, as well as the first, third, and seventh postoperative day.

Patients and methods

Patients

This research was performed on a group of 65 elderly patients with femoral neck fractures, recruited from the Orthopedic Clinic, Clinical Centre Kragujevac in the period from February to May 2015. All the patients were with an indication for surgical intervention. Exclusion criteria were patients younger than 65 years, lack of thigh, tibia, and fibula or/and unsuitable for prosthesis (stump unsuitable for prosthesis is considered a stump where there are trophic changes, by islands, ulcer, fistula, a painful neuroma, deformities stump, extensive scarring, extreme muscle atrophy), with damage to the spinal cord or peripheral nerve injury (quadriplegia, paraplegia, and hemiplegia), with or without loss of control of urination and defecation, with tertiary stages of malignant diseases. Additionally, to avoid any exogenous source of antioxidants, we ensured that no vitamin preparations were prescribed to these patients, as this could have potentially altered the values of the total endogenous antioxidant status. Written informed consent was obtained from all patients, and the study protocol was approved by the hospital's Ethics Committee prior

to the onset of the study. The investigation was conducted in accordance with the principles outlined in the Declaration of Helsinki and principles of Good Clinical Practice (GCP).

Patients included in this study have not had medical history of osteoporosis and have never used medications for osteoporosis. Taking into account that average age of patients included in study was 79.8, and that all patients were older than 65 years, trophic changes in bone density could be classified only as primary osteoporosis, due to age (postmenopausal women and people over 70 years old) [31].

Protocol

The examinations were performed in a quiet, air-conditioned, temperature-controlled room (22–24 °C). The antecubital vein was cannulated using a 19-gauge polyethylene catheter for taking blood samples. The blood sampling was performed within 12 h after fracture, and then within first, third, and seventh day after the operative reposition of the fracture.

Biochemical assays

Blood samples were taken from the antecubital veins into a Vacutainer test tube containing sodium citrate anticoagulant. Blood was centrifuged to separate plasma and red blood cells (RBCs).

Redox status

Redox status was measured spectrophotometrically and evaluated by measuring the levels of superoxide anion radical, hydrogen peroxide, nitrite, and index of lipid peroxidation in plasma, while activities of corresponding antioxidative enzymes superoxide dismutase, catalase, and reduced glutathione were measured in erythrocytes.

Index of lipid peroxidation (thiobarbituric acid reactive substances)

The degree of lipid peroxidation in plasma was estimated by measuring of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) using 0.4 ml 1% thiobarbituric acid (TBA) in 0.05 NaOH mixed with 0.8 ml of plasma, incubated at 100 °C for 15 min and measured at 530 nm. Distilled water was used as a blank probe. TBA extract was obtained by combining 0.8 ml plasma and 0.4 ml TCA (trichloroacetic acid), then samples were put on ice for 10 min, and centrifuged for 15 min at 6000 rpm [32].

Nitrite determination

Nitric oxide ($\cdot\text{NO}$) decomposes rapidly to form stable metabolite nitrite/nitrate products. The method for detection of the plasma nitrite levels is based on the Griess reaction. Nitrites (NO_2^-) were determined as an index of NO production with Griess reagent (forms purple diazo-complex) [33]. 0.1 ml 3 N PCA (perchloric acid), 0.4 ml 20 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), and 0.2 ml plasma were put on ice for 15 min, then centrifuged 15 min at 6000 rpm. After pouring off the supernatant, 220 μl K_2CO_3 was added. Nitrites were measured at 550 nm. Distilled water was used as a blank probe.

Superoxide determination

The level of superoxide anion radical (O_2^-) was measured using Nitro Blue Tetrazolium (NBT) reaction in TRIS-buffer with plasma and read at 550 nm. Distilled water was used as a blank probe [34].

Hydrogen peroxide determination

Determination of hydrogen peroxide (H_2O_2) concentration is based on oxidation of phenol red using hydrogen peroxide, in reaction catalyzed by enzyme peroxidase from horse radish (POD) [35]. 200 μl sample with 800 μl PRS (phenol red solution) and 10 μl POD were combined (1:20). The level of H_2O_2 was measured at 610 nm.

Determination of catalase, superoxide dismutase, and reduced glutathione

Isolated RBCs were washed three times with 3 volumes ice-cold 0.9 mmol/l NaCl and hemolysates containing about 50 g Hb/l, prepared according to McCord and Fridovich [36], were used for the determination of catalase (CAT) activity. Determination of CAT activity was determined according to Beutler [37]. Lysates were diluted with distilled water (1:7 v/v) and treated with chloroform–ethanol (0.6:1 v/v) to remove hemoglobin. Then 50 μl CAT buffer, 100 μl sample, and 1 ml 10 mM H_2O_2 were added to the samples. Detection was performed at 360 nm. Distilled water was used as a blank probe.

Determination of superoxide dismutase (SOD) activity is based on epinephrine method of Misra and Fridovich [38]. A hundred μl lysate and 1 ml carbonate buffer were mixed, and then 100 μl of epinephrine was added. Detection was performed at 470 nm. This method belongs to 'negative' type group of methods, since it monitors

decrease of autoxidation speed in alkaline medium, which is dependent of $O_2^{\cdot-}$.

The level of reduced glutathione (GSH) concentration was determined based on GSH oxidation with 5,5-dithio-bis-6,2-nitrobenzoic acid, using Beutler method [39]. Measurement of the absorbance is carried out at a wavelength of maximum absorption of 420 nm.

Measurement of the plasma levels of cytokines (TNF- α and IL-6)

The cytokine concentrations in the plasma were determined using ELISA assays specific for human cytokines (Human IL-6 DUOSET ELISA Development kit, R & D Systems, USA; Human TNF- α /TNFSF1A DUOSET ELISA Development kit, R & D Systems, USA) [40, 41].

The standards were dissolved before use in phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.2) until an initial concentration of 2000 pg/ml. Stock solutions were serially diluted 7 times in a solvent twice (Reagent Diluent-in (1% BSA in PBS)) to obtain a standard curve of 7 points. Next, 100 μ l of capture antibody was added to the wells of microtiter plates (MTPs). The plates were taped with ELISA plate sealers and left overnight at room temperature, after which the wells were washed with wash buffer in an automatic washing machine for MTF. In all the wells, block buffer was added to a final volume of 300 μ l, and the MTPs were incubated for a minimum of 1 h at room temperature. Then, the MTPs were washed with wash buffer. All the samples were previously diluted 10 times in deionized water. The diluted samples and standards were added to the wells of the MTPs, which were covered with plate sealers and allowed to incubate for 2 h at room temperature. After the incubation and washing of the MTPs, 100 μ l of detection antibody was added to each well, and the plates were again covered with plate sealers and incubated for 2 h at room temperature. MTPs were washed again, and 100 μ l of streptavidin horseradish peroxidase was added to all the wells. Incubation at room temperature was stopped after 20 min by washing the MTPs. In the next step, 100 μ l of substrate solution (Color reagent A + Color reagent B, 1:1) was added. After 20 min, 50 ml of stop solution (2 N H_2SO_4) was added, and the optical density was directly measured in each well using a Microplate Reader (Zenyth, Anthos, United Kingdom) set at 450 nm [40, 41].

All the measured values were reduced for the absorbance values of the blanks (deionized water). A standard curve was made based on the measured values of the standards, and it was calculated as values for each individual sample. All the samples were measured in triplicate.

Biochemical analyses of cytokine concentrations were carried out at the Laboratory of Immunology, Faculty of Medical Sciences in Kragujevac. The measurements

were performed on the apparatus Zenyth, Anthos, United Kingdom.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the statistical package SPSS 20.0 for Windows. The results are expressed as means \pm standard deviation of the mean (SD). The differences between parameters in different time measurements were assessed by analysis of variance test with repeated measures and paired samples *t*-test as post hoc. The alpha level for significance was set to $P < 0.05$.

Results

Subjects characteristics

Demographic and clinical characteristics of the study population are presented in Table 1.

Redox status parameters

The dynamics of oxidative stress parameters (TBARS, NO_2^- , $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2) in elderly patients after femoral neck fracture and first, third, and seventh postoperative day are shown in Fig. 1, while activities of the antioxidative enzymes (SOD, CAT, GSH) are shown in Fig. 2. None of the examined parameters of oxidative stress and antioxidative enzymes did not shown statistically significant change in the early phase (7 days) of healing fractured femur. Comparing values of redox status parameters between genders has not obtained statistically significant differences (Table 2).

Inflammatory response markers

The plasma levels of IL-6 in elderly patients after femoral neck fracture and 1st, 3rd, and 7th days after intervention

Table 1 Demographic and clinical characteristics of the study population

Subjects characteristics	
Average age (years) (range)	78.9 (65–87)
Gender (n, %)	
Male	36 (55.38%)
Female	29 (44.62%)
History of osteoporosis (n, %)	21 (32.30%)
Smokers (n, %)	
Current smokers	23 (35.38%)
Past smokers	3 (4.61%)

Fig. 1 The values of free oxygen radicals. *0* In first 12 h after fracture; *1* First postoperative day; *3* Third postoperative day; *7* Seventh postoperative day. The values are represented as $X \pm SD$; X mean, SD standard deviation; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; **a** Levels of index of lipid peroxidation (measured as TBARS); **b** Levels of nitrites (NO_2^-); **c** Levels of superoxide anion radical (O_2^-); **d** Levels of hydrogen peroxide (H_2O_2)

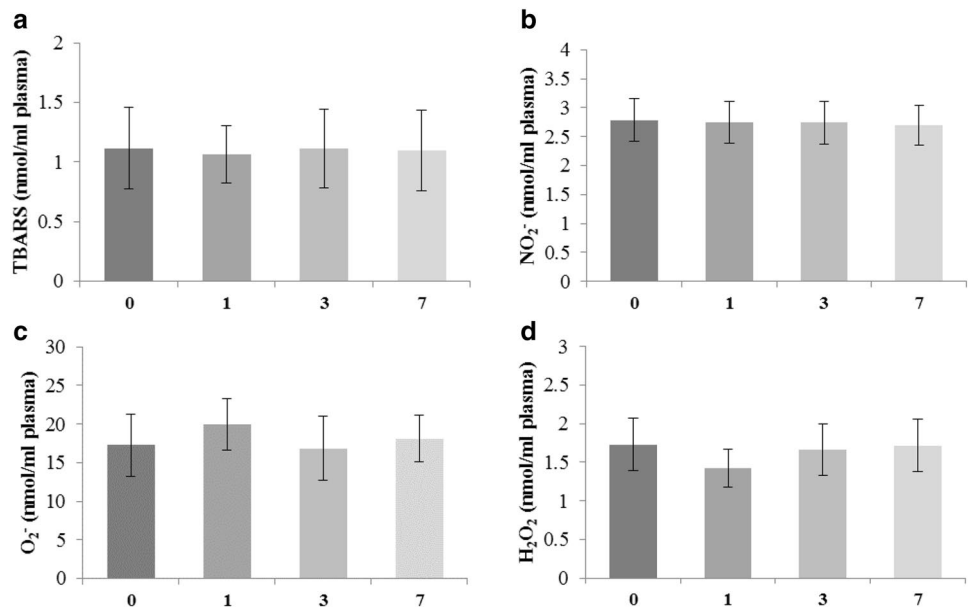
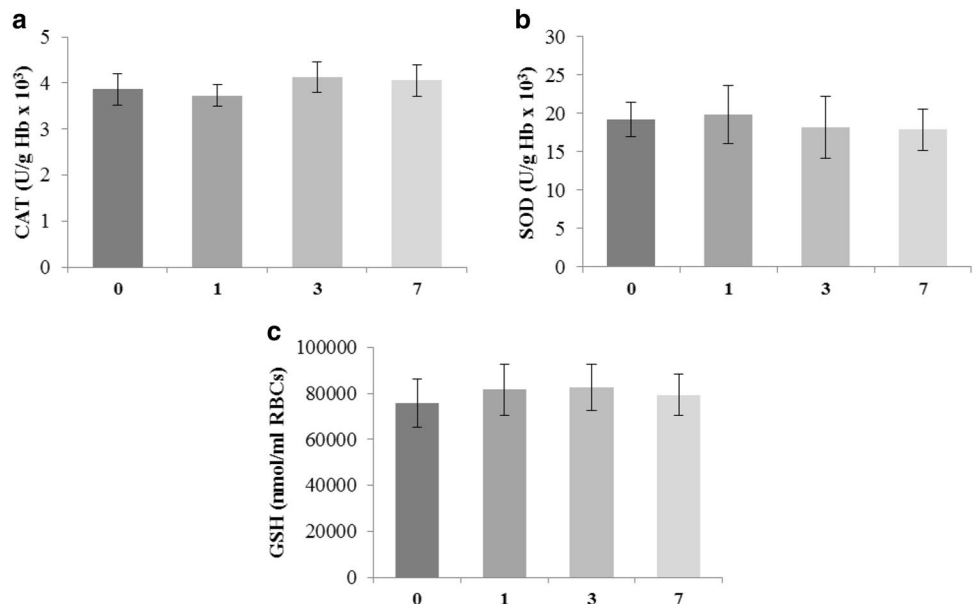


Fig. 2 The values of antioxidant enzymes. *0* In first 12 h after fracture; *1* First postoperative day; *3* Third postoperative day; *7* Seventh postoperative day. The values are represented as $X \pm SD$; X mean, SD standard deviation; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; **a** Levels of catalase (CAT); **b** Levels of superoxide dismutase (SOD); **c** Levels of reduced glutathione (GSH)



are shown in Fig. 3a. IL-6 is statistically increased 1st day after intervention compared to the other measured points.

The plasma levels of $\text{TNF-}\alpha$ in elderly patients after femoral fracture and 1st, 3rd, and 7th days after intervention are shown in Fig. 3b. Values of $\text{TNF-}\alpha$ did not show statistically significant change in the early phase of healing femoral fracture.

Differences of measured inflammatory response markers between genders are not found (Table 2).

Discussion

The aim of the present study was to follow the changes in redox balance and inflammatory response in elderly patients with femoral fractures during the earliest stages of fracture healing, by measuring the values of the observed markers immediately after fracture, as well as the first, third, and seventh postoperative day.

None of the observed parameters of oxidative stress (TBARS , NO_2^- , O_2^- , H_2O_2) did not change significantly

Table 2 Comparison of redox status and inflammatory response markers between male and female patients

	Male vs female patients			
	0	1	3	7
TBARS	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
NO ₂ ⁻	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
O ₂ ⁻	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
H ₂ O ₂	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
CAT	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
SOD	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
GSH	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
IL-6	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
TNF- α	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

0 In first 12 h after fracture; 1 First postoperative day; 3 Third postoperative day; 7 Seventh postoperative day

during the observation period (Fig. 1). The fact that tissue damage can induce a high yield of reactive oxygen species (ROS) that can lead to an imbalance between an excessive generation of oxidant compounds and insufficient antioxidant defense mechanisms has been known for a certain period of time [42]. Excessive and prolonged ROS activity cause tissue damage therewith impedes osteoblast differentiation and instigates long healing times [43]. However, oxidative damage is also an important contributor to the functional and morphological changes in osteoporotic bone. Also, not less important that aging increases the levels of ROS and decreases the levels of antioxidative enzymes that cause oxidative stress and induce osteoblast apoptosis [44].

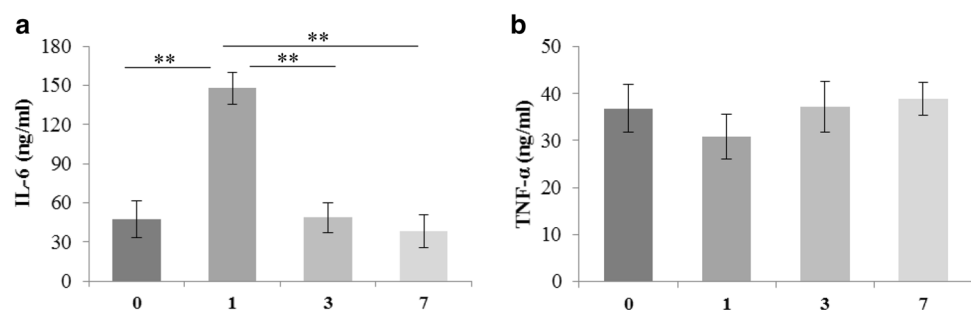
Wang and coauthors in their study compared the values of oxidative stress biomarkers, oxidative stress induced toxicity, and the related mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation in granulocytes between patients with fractures of long bones under the 50 years and above 65 years old [21]. Their results showed significant increase in lipid peroxidation levels only in older patients within the first 6 h after the fracture occurrence, while in younger patients there were no changes. Important result of this research also is significantly higher value of oxidative stress in older people without fractures compared to younger

people. Above-mentioned authors also showed increase in p38 MAPK activation, which can initiate the production of proinflammatory cytokines (TNF- α and IL-6) [21, 45]. On the other hand, our results are in correlation with study by Gokturk and coworkers [46] which evaluated oxidant status during bone healing in rats, using MDA levels in bone specimens as an indicator of oxidative stress. They concluded that statistically significant increases in MDA levels were noted by them during the 2nd and 3rd weeks after a fracture [46]. Furthermore, Prasad and coauthors pointed out that values of MDA were almost unchanged in first 7 days after femur fracture and then increased during 2nd and 3rd weeks post fracture [47]. They also showed that oxidative stress is proportional to number of fractured bones, so it is much higher in multiple fractures. One of the proposed mechanisms of unchanged values of MDA, and therefore oxidative stress, is ischemia in region of fracture [47, 48]. Furthermore, during the healing process, callus begins to form and produce new cells, which includes new capillary vessels. Increase in vascularization in this region and increase of inflammatory cells leads to the increasing production of oxygen-free radicals [47, 49].

Considering that antioxidative enzymes provide the internal defense against free radicals and may neutralize them before they are able to attack membrane and cause damage, it is important to examine their values during the healing and thus their role in fracture [50]. As there are very limited data about antioxidative enzymes parameters during period of healing bone fracture, this study could be a starting point for further investigations and for possible implementation of some antioxidants in the treatment of femur fracture.

Values of all examined parameters of antioxidative defense system (superoxide dismutase, catalase, and reduced glutathione) showed no statistically significant change in any measurement points (Fig. 2). In study by Prasad and coworkers, values of endogenous ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) did not show statistically significant change during the 1st week but during 2nd and 3rd week after fracture value of FRAP was increased. However, at the end of the 4th week, total endogenous antioxidant status showed gradual decline [47].

Fig. 3 The values of inflammatory markers. 0 In first 12 h after fracture; 1 First postoperative day; 3 Third postoperative day; 7 Seventh postoperative day. The values are represented as $X \pm SD$; X mean, SD standard deviation * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; **a** Levels of interleukin 6 (IL-6); **b** Levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- α)



Our previous study has shown statistical significant decline of all measured antioxidative parameters (CAT, SOD, and GSH) in elderly patients with femoral neck fractures compared to health subjects' same characteristics [51]. These results are in correlation with previously mentioned study by Wang and colleagues [21]. Namely, these results may indicate the role of decreased antioxidative defense system in pathogenesis of femoral fractures. Therefore, oxidative stress due to decreased antioxidative defense could be an important contributor to the morphological and functional changes in osteoporotic bone.

Many investigators set as a goal of their research to understand the role of inflammatory response and cytokines that it involves in the healing process after different types of trauma, as well as the roles of specific cytokines in the development of the inflammatory response following the surgical trauma, but values of these markers varied widely between studies [52]. In present study, we analyzed the changes in plasma levels of the inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α during the first week after fracture, i.e., intervention (Fig. 3).

IL-6 is a pleiotropic cytokine expressed and secreted by cells of the osteoblastic lineage and osteoclasts; among others, IL-6 is a fairly weak stimulator of the formation of osteoclasts *in vitro* [53]. In our study, levels of IL-6 were greater in patients first day after intervention than immediately after fracture or during first seven days of bone healing (Fig. 3a). A surgical intervention due to fracture reparation is a posttraumatic immune stimulus which contributes to the systemic inflammatory response syndrome and is expected to be an increase of IL-6 in plasma after the intervention. Also, we postulated that these results show that IL-6 may be responsible for stimulation of the early stage of fracture healing in hours after intervention. This is in agreement with previously published data [54, 55]. Beeton and coworkers indicated that the activity of circulating IL-6 could stimulate the early stages of fracture repair because complex of IL-6 and receptor may be capable of stimulating cells of the mesenchymal lineage and therefore increasing the formation of bone tissue by osteoblasts [54]. Volpin and coauthors found that levels of IL-6 in patients with different types of fractures are decreased six months after initial injury [55]. Although we did not follow the patients for so long, we have observed downward trend in values of IL-6 in our patients. Based on study which examined the effects of this cytokine in IL-6 knockout mice, IL-6 appeared to play a role in the early stages of fracture healing, but its role diminished over time [56].

Immune cells of peripheral blood and osteoclasts originate from pluripotent hematopoietic stem cells, so cytokines that take part in the regulation of immune responses, such as TNF, IL-1, IL-6, and IL-7, also affect

the osteoclast function and consequently emergence of osteoporosis [57]. Obesity is also associated with osteoporosis, wherein inflammation and interleukin-6 play an important role [58, 59].

TNF- α is potent stimulator of bone resorption and inhibitors of bone formation [60] possibly influencing bone resorption by increasing the formation of osteoclasts and early osteoclast precursors. Plasma TNF- α levels did not change significantly before and after intervention (Fig. 3b) in our study. These results correlate with earlier data reported by Marino and coworkers. In a study with 20 patients with femoral fracture they found similar results for TNF- α levels [61].

In conclusion, our study showed that redox status and TNF- α in elderly patients with femoral fractures did not show statistically significant changes during the early phase of fracture healing, while IL-6 were statistically increased after intervention. Results highlighted the importance of the process of inflammation during this healing phase, so therapeutic approach should be targeted in this direction. Taking into account decreased levels of antioxidant defense enzymes in these patients compared to healthy population, oxidative stress also might play important role in bone fracture pathogenesis and changes in bone density. Based on previous studies, antioxidants such as vitamin C, vitamin E, α -lipoic acid, and flavonoids, as well as antioxidant defense enzymes, including superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and thioredoxin, and various therapies that reduce oxidative stress could accelerate the healing process and reduce the likelihood of potential complications [62].

However, monitoring the values of these parameters over a long period of time will provide more information about their role in bone healing. Further studies will be needed to investigate whether manipulation of the redox balance in bone cells, as well as the use of anti-inflammatory therapy, shows potential to support healing of fractures. Furthermore, comorbidity (hypertension, heart status, diabetes) and other factors which may affect redox balance (alcohol consumption, body mass index, dietary habits) should be taken into consideration. Also, bearing in mind the obvious differences between patients of different ages, it is necessary to assign the patients in several age categories in order to clearly determine dynamics of changing the values of oxidative stress parameters, as well as antioxidative defense system.

This preliminary study has showed our observations, and we hope that these results may help in better understanding mechanisms which are included at fracture healing. More importantly, this study attempted to create a platform for further research.

References

1. Diamantopoulos AP, Rohde G, Johnsrud I, Skoie IM, Johnsen V, Hochberg M, Haugeberg G (2012) Incidence rates of fragility hip fracture in middle-aged and elderly men and women in southern Norway. *Age Ageing* 41:86–92
2. Brauer CA, Coca-Perrailon M, Cutler DM, Rosen AB (2009) Incidence and mortality of hip fractures in the United States. *JAMA* 302:1573–1579
3. Icks A, Haastert B, Glaeske G, Stumpf U, Windolf J, Hoffmann F (2012) Correction factor for the analysis of the hip fracture incidence-differences between age, sex, region, and calendar year. *Wien Klin Wochenschr* 124:391–394
4. Gullberg B, Johnell O, Kanis JA (1997) Worldwide projections for hip fracture. *Osteoporos Int* 7:407–413
5. Kannus P, Parkkari J, Sievanen H, Heinonen A, Vuori I, Jarvinen M (1996) Epidemiology of hip fractures. *Bone* 18:57–63
6. Fernández-Ruiz M, Guerra-Vales JM, Trincado R, Medrano MJ, Benito-León J, Bermejo-Pareja F (2014) Hip fracture in three elderly populations of central Spain: data from the NEDICES study. *Intern Emerg Med* 9:33–41
7. Papakostidis C, Bhandari M, Giannoudis PV (2013) Distraction osteogenesis in the treatment of long bone defects of the lower limbs: effectiveness, complications and clinical results; a systematic review and meta-analysis. *Bone Joint J* 95-B:1673–1680
8. Perrini S, Laviola L, Carreira MC, Cignarelli A, Natalicchio A, Giorgino F (2010) The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *J Endocrinol* 205:201–210
9. Rubin CD (2012) Evaluation and management of hip fracture risk in the aged. *Am J Med Sci* 343:233–242
10. Gajdobranski D, Zivković D (2003) Disorders in fracture healing. *Med Pregl* 56:146–151
11. Shuid AN, Mohamad S, Muhammad N et al (2011) Effects of α -tocopherol on the early phase of osteoporotic fracture healing. *J Orthop Res* 29:1732–1738
12. Wehner T, Gruchenberg K, Bindl R, Recknagel S, Steiner M, Ignatius A, Claes L (2014) Temporal delimitation of the healing phases via monitoring of fracture callus stiffness in rats. *J Orthop Res* 32:1589–1595
13. Ketenjian AY, Jafri AM, Arsenis C (1978) Studies on the mechanism of callus cartilage differentiation and calcification during fracture healing. *Orthop Clin N Am* 9:43–65
14. Hapuarachchi KS, Ahluwalia RS, Bowditch MG (2014) Neck of femur fractures in the over 90s: a select group of patients who require prompt surgical intervention for optimal results. *J Orthop Traumatol* 15:13–19
15. Zhang YB, Zhong ZM, Hou G, Jiang H, Chen JT (2011) Involvement of oxidative stress in age-related bone loss. *J Surg Res* 169:e37–e42
16. Sheweita SA, Khoshhal KI (2007) Calcium metabolism and oxidative stress in bonefractures: role of antioxidants. *Curr Drug Metab* 8:519–525
17. Rangan U, Bulkley GB (1993) Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *Br Med Bull* 49:700–718
18. Banfi G, Iorio EL, Corsi MM (2008) Oxidative stress, free radicals and bone remodeling. *Clin Chem Lab Med* 46:1550–1555
19. Keskin D, Kiziltunc A (2015) Reduction of total antioxidant capacity after femoral fracture. *Acta Chir Orthop Traumatol Cechoslov* 82:293–295
20. Maggio D, Barabani M, Pierandrei M, Polidori MC, Catani M, Mecocci P, Senin U, Pacifici R, Cherubini A (2003) Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of a cross-sectional study. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1523–1527
21. Wang Z, Ehnert S, Ihle C, Schyschka L, Pscherer S, Nussler NC, Braun KF, Van Griensven M, Wang G, Burgkart R, Stöckle U, Gebhard F, Vester H, Nussler AK (2014) Increased oxidative stress response in granulocytes from older patients with a hip fracture may account for slow regeneration. *Oxid Med Cell Longev* 2014:819847
22. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB (1991) Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 161:488–503
23. Basu S, Michaëlsson K, Olofsson H, Johansson S, Melhus H (2001) Association between oxidative stress and bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun* 288:275–279
24. Jyoti A, Singh S, Mukhopadhyay B, Gavel R, Mishra SP (2015) Free radicals and antioxidant status in chronic osteomyelitis patients: a case control study. *J Clin Diagn Res* 4:8–10
25. Nakase T, Takaoka K, Masuhara K, Shimizu K, Yoshikawa H, Ochi T (1997) Interleukin-1 β enhance and tumor necrosis factor- α inhibits bone morphogenetic protein-2-induced alkaline phosphatase activity in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Bone* 21:17–21
26. Nanes MS (2003) Tumor necrosis factor- α : molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. *Gene* 321:1–15
27. Craig S, Roberts CS, Pape HC, Jones AL, Malkani AL, Rodriguez JL, Giannoudis PV (2005) Damage control orthopaedics. Evolving concepts in the treatment of patients who have sustained orthopaedic trauma. *J Bone Joint Surg Am* 87:434–449
28. Sears BW, Strover MD, Callaci J (2009) Pathoanatomy and clinical correlation of the immunoinflammatory response following orthopaedic trauma. *J AAOS* 17:255–265
29. Reikeras O (2010) Immune depression in musculoskeletal trauma. *Inflamm Res* 59:409–414
30. Biffl W, Moore EE, Moore FA, Peterson VM (1996) Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation? *Ann Surg* 224:647–664
31. Marcucci G, Brandi ML. Rare causes of osteoporosis. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2015 May-Aug;12(2):151–156
32. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351–358
33. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PI, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131–138
34. Auclair C, Voisin E (1985) Nitrobluetetrazolium reduction. In: Greenwald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRP Press, Boca Raton, pp 123–132
35. Pick E, Keisari Y (1980) A simple colometric method for the measurement of hydrogen peroxide by cells in culture. *J Immunol Methods* 38:161–170
36. McCord JM, Fridovich I (1969) The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem* 244:6056–6063
37. Beutler E (1982) Catalase. In: Beutler E (ed) *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*. Grune and Stratton, New York, pp 105–106
38. Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247:3170–3175
39. Beutler E (1975) Reduced glutathione (GSH). In: Beutler E (ed) *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*. Grune and Stratton, New York, pp 112–114
40. Radosavljevic G, Jovanovic I, Majstorovic I, Mitrovic M, Lisnic VJ, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML (2011) Deletion of galectin-3 in the host attenuates metastasis of murine melanoma by modulating tumor adhesion and NK cell activity. *Clin Exp Metastasis* 28:451–462

41. Crowther JR (1995) ELISA. Theory and practice. *Methods Mol Biol* 42:1–218
42. Halliwell B, Cross CE (1994) Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect* 102(Suppl 10):5–12
43. Ilyas A, Odatsu T, Shah A, Monte F, Kim HK, Kramer P, Aswath PB, Varanasi VG (2016) Amorphous silica: a new antioxidant role for rapid critical-sized bone defect healing. *Adv Healthc Mater* 5:2199–2213
44. Ardura JA, Portal-Núñez S, Castelbón-Calvo I, Martínez de Toda I, De la Fuente M, Esbrit P (2016) Parathyroid hormone-related protein protects osteoblastic cells from oxidative stress by activation of MKP1 phosphatase. *J Cell Physiol* 9999:1–12
45. Ono K, Han J (2000) The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 12:1–13
46. Gokturk E, Turgut A, Baycu C, Gunal J, Seber S, Gulbas Z (1995) Oxygen free radicals impair fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 66:473–475
47. Prasad G, Dhillon MS, Khullar M, Nagi ON (2003) Evaluation of oxidative stress after fractures. A preliminary study. *Acta Orthop Belg* 69:546–551
48. Lafforgue P (2006) Pathophysiology and natural history of avascular necrosis of bone. *Joint Bone Spine* 73:500–507
49. Rangan U, Bulkley GB (1993) Prospects for treatment of free radical mediated tissue injury. *Br Med Bull* 49:700–718
50. Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G (1991) Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem* 37:1932–1937
51. Pestic G, Jeremic J, Stojic I, Vranić A, Cankovic M, Nikolic T, Jeremic N, Matic A, Srejovic I, Zivkovic V, Jakovljevic V (2016) Redox status in patients with femoral neck fractures. *Ser J Exp Clin Res* 17:1–1
52. Pietschmann P, Mechtcheriakova D, Meshcheryakova A, Föger-Samwald U, Ellinger I (2016) Immunology of osteoporosis: a mini-review. *Gerontology* 62:128–137
53. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH et al (1990) IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol* 145:3297–3303
54. Beeton CA, Chatfield D, Brooks RA, Rushton N (2004) Circulating levels of interleukin-6 and its soluble receptor in patients with head injury and fracture. *Bone Joint J* 86:912–917
55. Volpin G, Cohen M, Assaf M, Meir T, Katz R, Pollack S (2014) Cytokine levels (IL-4, IL-6, IL-8 and TGFβ) as potential biomarkers of systemic inflammatory response in trauma patients. *Int Orthop* 38:1303–1309
56. Yang X, Ricciardi BF, Hernandez-Soria A, Shi Y, Camacho NP, Bostrom MP (2007) Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone* 41:928–936
57. Roy B, Curtis ME, Fears LS, Nahashon SN, Fentress HM. Molecular mechanisms of obesity-induced osteoporosis and muscle atrophy. *Front Physiol* 2016 Sep 29;7:439.
58. Wang TT, He CQ, Yu XJ. Pro-Inflammation Cytokines: New Potential Therapeutic Targets for Obesity-Related Bone Disorders. *Curr Drug Targets* 2017 Jan 4.
59. Yamasaki M, Hasegawa S, Imai M, Takahashi N, Fukui T. High-fat diet-induced obesity stimulates ketone body utilization in osteoclasts of the mouse bone. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Apr 29;473(2):654–661.
60. Lange J, Sapozhnikova A, Lu C et al (2010) Action of IL-1β during fracture healing. *J Orthop Res* 28:778–784
61. Marino M, Palmieri G, Peruzzi M, Scuderi F, Bartoccioni E (2015) A study of inflammatory/necrosis biomarkers in the fracture of the femur treated with proximal femoral nail antirotation. *Mediators Inflamm*. doi:[10.1155/2015/189864](https://doi.org/10.1155/2015/189864).
62. Turk CY, Halici M, Guney A, Akgun H, Sahin V, Muhtaroglu S (2004) Promotion of fracture healing by vitamin E in rats. *J Int Med Res* 32:507–512

experimental group this phenomenon was not present (Kalogeris *et al.* 2016). Additionally, pronounced vacuolation of cells in the control group may be a consequence of acting free radicals. Results of morphological analysis are in accordance with measured cardiodynamic parameters, thus suggesting that *G. verum* has the potential to preserve both function and structure of the heart under ischemic conditions.

Our study demonstrates for the first time that *G. verum* extract preserved cardiac contractile function, systolic and diastolic function and alleviated the deterioration of coronary circulation after ischemia. Additionally *G. verum* consumption prevented the structural damage of the heart. Furthermore, *G. verum* tended to modulate the activity of myocardial antioxidant enzymes and decrease the generation of pro-oxidants, thus mitigating oxidative stress-induced heart dysfunction. Promising potential of *G. verum* in the present study in a model of pharmacological preconditioning may be a starting point for further researches which would fully clarify its effects on cardiac function and redox status in various models of I/R injury. Additionally, studies oriented on isolation and characterisation of the antioxidants present in *G. verum* extract are certainly necessary for better understanding the mechanisms through which this plant species triggers cardioprotection.

Disclosure statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding

The authors would like to express gratitude to the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for Grant No. JP 06/17.

ORCID

Jovana Bradic  <http://orcid.org/0000-0001-5388-6085>
 Nevena Jeremic  <http://orcid.org/0000-0002-5284-8180>
 Ivan Srejovic  <http://orcid.org/0000-0002-3835-1856>

References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- Akhlaghi, M., and Bandy, B., 2009. Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 46 (3), 309–317.
- Auclair, C., and Voisin, E., 1985. Nitroblue tetrazolium reduction. In: R.A. Greenvald, ed. *Handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton, FL: CRC Press, 123–132.
- Barteková, M., *et al.*, 2010. Acute treatment with polyphenol quercetin improves postischemic recovery of isolated perfused rat hearts after global ischemia. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 88 (4), 465–471.
- Beutler, E., 1984. Superoxide dismutase. In: E. Beutler, ed. *Red cell metabolism a manual of biochemical methods*. Philadelphia, PA: Grune & Stratton, 83–85.
- Beutler, E., Duron, O., and Kelly, B.M., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 61, 882–888.
- Birben, E., *et al.*, 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *The World Allergy Organization Journal*, 5 (1), 9–19.
- Brighente, I.M.C., *et al.*, 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. *Pharmaceutical Biology*, 45 (2), 156–161.
- Debnath, J., and Nath, L. K., 2014. A review on pathophysiology of ischemic-reperfusion injury of heart and ameliorating role of flavonoids and polyphenols. *Journal of medicinal plants research*, 8, 607–614.
- Demirezer, L.O., *et al.*, 2006. Iridoids, flavonoids and monoterpene glycosides from *Galium verum* subsp. *Verum*. *Turkish journal of chemistry*, 30, 525–534.
- Duarte, J., Francisco, V., and Perez-Vizcaino, F., 2014. Modulation of nitric oxide by flavonoids. *Food & function*, 5 (8), 1653–1668.
- Green, L.C., *et al.*, 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical biochemistry*, 126 (1), 131–138.
- Hijazi, A., *et al.*, 2015. Effect of different ethanol concentrations, using different extraction techniques, on the antioxidant capacity of Lebanese *Eryngium creticum*. *Journal of pharmaceutical, chemical and biological sciences*, 3, 262–271.
- Kalogeris, T., *et al.*, 2012. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *International review of cell and molecular biology*, 298, 229–317.
- Kalogeris, T., *et al.*, 2016. Ischemia/reperfusion. *Comprehensive physiology*, 7 (1), 113–170.
- Kanno, Y., *et al.*, 2013. Chlorogenic acid attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *International heart journal*, 54 (3), 176–180.
- Lakić, N., *et al.*, 2010. Antioxidant properties of *Galium verum* L. (Rubiaceae) extracts. *Central European journal of biology*, 5, 331–337.
- Li, W., *et al.*, 2015. Pharmacological preconditioning and postconditioning with nicorandil attenuates ischemia/reperfusion-induced myocardial necrosis and apoptosis in hypercholesterolemic rats. *Experimental and therapeutic medicine*, 10 (6), 2197–2205.
- Mattera, R., *et al.*, 2017. Effects of polyphenols on oxidative stress-mediated injury in cardiomyocytes. *Nutrients*, 9 (5). doi:10.3390/nu9050523
- Milic, P., *et al.*, 2013. Antioxidant activity of *Galium mollugo* L. extracts obtained by different recovery techniques. *Hemijaska Industrija*, 67 (1), 89–94.
- Mocan, A., *et al.*, 2016. Phytochemical investigations on four *Galium* species (Rubiaceae) from Romania. *Farmacia*, 64, 95–99.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95 (2), 351–358.
- Panche, A.N., Diwan, A.D., and Chandra, S.R., 2016. Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5, e47.
- Pick, E., and Keisari, Y., 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of immunological methods*, 38 (1–2), 161–170.
- Singleton, V., Orthofer, R., and Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152–175.
- Vlase, L., Mocan, A., and Hanganu, D., 2014. Comparative study of polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of four *Galium* species (Rubiaceae). *Digest journal of nanomaterials and biostructures*, 9, 1085–1094.
- Wang, C.Z., *et al.*, 2011. Botanical flavonoids on coronary heart disease. *The American journal of Chinese medicine*, 39 (4), 661–671.
- Xia, Z., Li, H., and Irwin, M.G., 2016. Myocardial ischaemia reperfusion injury: the challenge of translating ischaemic and anaesthetic protection from animal models to humans. *British journal of anaesthesia*, 117, ii44–ii62.
- Zhang, Y., 2016. Total flavonoid extract from *Coreopsis tinctoria* Nutt. protects rats against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Iranian journal of basic medical sciences*, 19, 1016–1023.

An evaluation of the redox state in professional scuba divers

Radmila Radojevic-Popovic¹, Vladimir Zivkovic², Nevena Jeremic³, Jasmina Sretenovic², Nevena Velicanin², Jovana Bradic², Vladimir Jakovljevic²

¹ Special Hospital for Hyperbaric Medicine, Belgrade, Serbia

² Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

³ Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

CORRESPONDING AUTHOR: Prof. Vladimir Lj. Jakovljevic, M.D., Ph.D. – drvkladakgbg@yahoo.com

ABSTRACT

Taking into consideration limited data regarding molecular interactions during and after diving, this investigation was intended to determine the oxidative status of divers before and after scuba diving by monitoring the oxidative status parameters. The prevalence study included a group of 32 male professional police scuba divers, 32 ± 5.1 years old. The examination took place twice: in a resting state before scuba diving and immediately after the dive (to 30 meters for 30 minutes). The oxidative status of the scuba divers was determined by measuring levels of the following oxi-

dativ stress markers: the index of lipid peroxidation (measured as TBARS), nitrites (NO_2^-), superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Statistically significant increases in levels of NO_2^- and TBARS were observed after the dive, while there were no statistically relevant changes in levels of $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , SOD and CAT. Our results have shown that a dive with these characteristics only slightly disturbs redox homeostasis, without serious intermolecular changes that can lead to prominent oxidative stress.

INTRODUCTION

Since the development of self-contained underwater breathing apparatus (scuba) in the 1940s, millions of people have been involved in diving for both professional and recreational purposes [1]. Sport or recreational scuba diving refers to diving to a depth of not more than 40 meters, using only compressed air or nitrox (a mixture of nitrogen and oxygen) with no more than 40% oxygen as a breathing gas, and having direct vertical access to the surface, without a decompression stop.

Technical scuba diving usually requires a mandatory decompression stop upon surfacing and/or the use of multiple gas mixtures such as trimix (a mixture of nitrogen, oxygen and helium), heliox (a mixture of helium and oxygen) or nitrox (a mixture of nitrogen and oxygen) as breathing media [2].

Recreational diving is a popular sport, although the human ability to stay in and under water is severely limited physiologically [3]. It exposes individuals to

environmental stresses such as increased ambient pressure, a raised partial pressure of oxygen (O_2), increased resistance to movement, added weight and the drag of diving equipment, cold stress, and a higher breathing resistance [4]. The safety of scuba diving has been greatly improved through the development of better equipment and diving procedures [5].

Hyperoxia and hyperbaria during scuba diving could increase reactive oxygen species (ROS) production and thereby induce oxidative stress [6]. Oxidative stress, defined as an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defenses [7], play an important role in many physiological and pathological conditions [8].

Literature data have shown that scuba diving can induce an antioxidant response in plasma and erythrocytes by increasing the erythrocytes' glutathione peroxidase activity (GPx), plasma superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities [8,9].

KEYWORDS: sports medicine, scuba diving, professional scuba divers, oxidative stress, free radicals, tests

Some studies found that plasma malondialdehyde (MDA) levels, as markers of cellular damage, remained unchanged after a diving session [5,8], while another study revealed an increase in its levels [9]. Data on the effects of scuba diving on lipid peroxidation are also controversial. It was reported that scuba diving led to a significant increase in the levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) [10]. However, in another investigation, scuba diving did not induce an increase of lipid peroxidation [11]. Hyperoxia associated with scuba diving leads to increased lymphocyte hydrogen peroxide (H_2O_2) production, nitric oxide ($\bullet NO$) synthesis and anti-oxidant enzyme adaptations [12].

Given the fact that most of our limited knowledge regarding the connection between scuba diving and oxidative stress was gathered from volunteers, the aim of this study was to evaluate the influence of scuba diving on oxidative status markers in healthy male professional police scuba divers.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The prevalence study included 32 professional police divers during the training process – the dive training at sea. All examinees were male, 32 ± 5.1 years old, well trained, with diving experience of a minimum of three to a maximum of 18 years. During their diving service, participants have all been subjected to regular annual medical check-ups by a specialist. During this study, divers had no signs of any acute or chronic disease. They had valid medical documentation that proves they are able to perform the duties of professional divers. All subjects were non-smokers with normal values of arterial blood pressure, echocardiogram, ECG, EEG, and spirometry, with regular values of fat and sugar in the blood. All divers received an explanation of the study's purposes, risks and benefits and were familiarized with the study's protocol. All gave written consent. The study was approved by the Ethical Committee of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac.

Diving protocol

Testing was performed at the seaside, during a dive training of professional police divers held in May. All divers were dressed in neoprene drysuits and were

equipped with open-circuit scuba diving apparatus. The primary cylinders were 18-liter bottles, filled with compressed air, with an average pressure of 205 bars. The morning medical examination was conducted before the dive and included auscultatory findings from the lungs and measurements of blood pressure and pulse.

After arriving at the location, each diving pair made a dive to the specified depth. Each set of divers launched every five minutes. The specified depth was 30 meters, controlled with either a Suunto and Mares dive computer, and specified duration of the dive was 30 minutes. During the dive, divers were instructed to moderate their loads. The descent was at 10 meters/minute and the ascent was 9 meters/minute, with a three-minute decompression/safety stop at a depth of 3 meters. All 32 divers completed the dive successfully, without any sign of decompression sickness. Average air consumption was 56 liters (L) per minute. Air temperature during the examination was $23^\circ C$, and sea temperature was $15^\circ C$ to $19^\circ C$.

Sample collection protocol

Immediately before and after the dive, blood samples were taken from the divers in order to determine levels of pro-oxidant markers: superoxide anion radical ($O_2^{\bullet -}$), H_2O_2 , nitrites (NO_2^-) and TBARS, as well as antioxidant enzymes activity (SOD and CAT). Four weeks prior to blood sampling, the divers were instructed to refrain from any vitamin or antioxidant dietary supplementation. None of the participants reported any eating disorders, had any ongoing or previous (last half-year) injuries, and were not on any medication known to affect oxidative stress. To exclude the influence of different dietary intakes on nitrite level, all participants were on the same dietary protocol for three days before the study and during the study.

Biochemical assays

Blood samples were taken from antecubital veins into Vacutainer test tubes containing sodium citrate anticoagulant. Blood samples were processed and stored immediately. Blood was centrifuged to separate plasma and red blood cells (RBCs). Biochemical parameters were measured spectrophotometrically.

Index of lipid peroxidation (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) determination

The level of lipid peroxidation was determined indirectly via products of lipid peroxidation reaction with thiobarbituric acid (TBA) – thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). This method is based on determination of the level of one of the lipid peroxides (malondialdehyde, or MDA) with thiobarbituric acid [13]. Extract was obtained by combining 400 μl of 28% trichloroacetic acid (TCA) and 800 μl of plasma, and then incubated in a cold-water jacket (-4°C) for 10 minutes. After incubation, the samples were centrifuged at 15,000 RPMs for four minutes to form a supernatant. 800 μl of plasma extract and 200 μl of 1% TBA were combined and incubated in a water jacket at 100°C for 15 minutes. Distilled water was used as a blank probe. Measuring was performed at $\lambda=530$ nm. The concentration of released TBARS was calculated using the following equation:

$$\text{nmol TBARS/ml plasma} = \Delta A (A_s - A_{bp}) / 1.56 \times 1.25$$

A_s = absorbance of sample;

A_{bp} = absorbance of blank probe;

1.56, 1.25 – correction factors for this assay.

Nitrites (NO_2^-) determination

Nitric oxide ($\bullet\text{NO}$) decomposes rapidly to form stable metabolite nitrite/nitrate products. Considering that $\bullet\text{NO}$ in reaction with molecular oxygen forms equimolar amount of nitrites ($\bullet\text{NO} + \frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^-$), we can assert with great certainty that the amount of released nitrites represent the amount of released $\bullet\text{NO}$. The method for detection of the plasma nitrite levels is based on the Griess reaction. Nitrite (NO_2^-) was determined as an index of $\bullet\text{NO}$ production with Griess reagent (forms purple diazo complex) [14]. Griess reagent was prepared *ex tempore* just before the experiment by mixing equal amounts of stocks: 1% (weight/volume) sulfanilamide dissolved in 5% hydrochloric acid (HCl) and 0.1% (w/v) aqueous solution of N-1-naphthyl-ethylenediamine-dihydrochloride (N-NEDA). Extraction was obtained by combining 100 μl of 3M PCA (perchloric acid), 400 μl of 20 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) and 200 μl of plasma, put on ice for 15 minutes, and then centrifuged for 15 minutes at 6000 RPMs. After pouring off the supernatant, 220 μl potassium carbonate (K_2CO_3) was added to

set pH at 7.4. 200 μl of plasma extract (previously described), 250 μl of Griess reagent, and ammonium buffer (pH=9) (containing ammonium chloride – NH_4Cl – and sodium tetraborate – $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) were then combined in order to stabilize the diazo complex. As a blank probe, an adequate amount of distilled water was used. The concentration of released nitrites was calculated using the calibration curve.

The calibration curve was constructed from extinction samples (which consist of a specific concentration of nitrites after their reaction with the Griess reagent and in the presence of an ammonium buffer). For that purpose, different amounts of 1 mM sodium nitrite (NaNO_2) (3, 6, 12, 24 μl) in 1 ml of distilled water was used. After color stabilization at room temperature (five to 10 minutes), measuring was performed at $\lambda=550$ nm. The concentration and amount of released nitrites was calculated via determination of a standard factor (F):

$$\text{extinction of blank probe} / \text{concentration of } \text{NaNO}_2 \text{ in standard}$$

For each standard (F1-F4), mean was calculated:

$$\text{nmol } \text{NO}_2^- / \text{ml extract} = \Delta E (\text{Es-Ebp}) / F$$

Superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\bullet-}$) determination

Determination of superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\bullet-}$) concentration is based on reaction of $\text{O}_2^{\bullet-}$ with nitroblue tetrazolium (NBT) and forms nitroblue formazan [15]. Maximum absorption for measuring was $\lambda_{\text{max}} = 550$ nm. Assay mixture consisted of 50 mM of Tris-HCl buffer (pH=8.6), 0.1 mM of EDTA, 0.1 mg/ml of gelatin and 0.1 mM of NBT. Before use, the solution needs to be gassed with nitrogen (under pressure) for 60 minutes. 50 μl of plasma and 950 μl of assay mixture were combined. For the blank probe, an adequate volume of distilled water was used. At the beginning of the reaction, extinction of mixture was measured and noted as E1. Mixing was performed (with plastic stick) every 60 seconds, and extinction was noted after mixing until it was stable, which considers two consecutive extinctions of the same approximate size. The last extinction was noted as E2. The same procedure was applied for measuring the blank probe. The concentration of released $\text{O}_2^{\bullet-}$ was calculated using the following equation:

$$\begin{aligned} \Delta E_s &= E_{2s} - E_{1s} \text{ (for sample)} \\ \Delta E_{bp} &= E_{2bp} - E_{1bp} \text{ (for blank probe)} \\ \Delta E &= \Delta E_s - \Delta E_{bp} \\ \text{nmol } O_2^{\cdot-} / \text{ml plasma} &= \Delta E / 0.015 \times 1 / 0.05 \end{aligned}$$

Hydrogen peroxide (H₂O₂) determination

Determination of hydrogen peroxide (H₂O₂) concentration is based on oxidation of phenol red using hydrogen peroxide, in reaction catalyzed by the enzyme peroxidase from horseradish (HRPO) [16]. This reaction results in the formation of a compound with the maximum absorption of $\lambda_{\text{max}} = 610$ nm. The linear dependence of H₂O₂ concentration absorbance on 610 nm is stable for 1-60 mM of ratio concentration (1-60 nmol/ml). 200 ml of plasma and 800 ml of freshly prepared phenol red solution (PRS) consisting of 140 mM NaCl, 10 mM potassium phosphate buffer (pH=7), 5.5 mM D(+) glucose and 0.28 mM phenol red were combined. After that, 10 ml (1:20) HRPO (made ex tempore) was added. Samples were left at room temperature for 10 minutes, and pH was adjusted to >12 using 1M sodium hydroxide (NaOH). Distilled water was used as a blank probe. The concentration of released H₂O₂ in venous blood was calculated using a calibration diagram (standard curve) for each assay. For constructing a standard curve (cuv), a standard (stock) H₂O₂ solution was used, after checking concentration (for 10 mM H₂O₂, A₂₃₀ = 0.810). Then 5, 10 and 20 ml of 1 mM H₂O₂ solution were combined (instead of plasma) with 200 μ l of distilled water, 800 μ l of phenol red solution and 10 ml of (1:20) HRPO. Samples were kept at room temperature for 10 minutes and pH-adjusted >12 by using 1M NaOH (10 ml).

For calculating concentration and volume of H₂O₂, the following formula was used:

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

On the basis of the sample absorbance (A_s) and comparing it with the blank probe (A_{bp}), final absorbance was calculated (ΔA) ($A = A_s - A_{bp}$).

F (factor of absorbance) = $\Delta A / \text{nmol } H_2O_2 / \text{cuv}$

Determination of activities of antioxidant enzymes

Hemoglobin determination, necessary for the calculation of activity of endogenous antioxidants, was performed according to the Drabkin method [17].

The determination of superoxide dismutase (SOD) activity is based on the epinephrine method. This method belongs to the "negative" type group of methods, since it monitors the decrease of auto-oxidation speed in an alkaline medium, which is dependent on O₂^{•-} [18]. SOD removes O₂^{•-} and thus inhibits auto-oxidation of epinephrine. The speed of epinephrine auto-oxidation is detectable spectrophotometrically via changing the absorbance on 480 nm. The accumulation of epinephrine induces increase of absorbance on 480 nm. The percentage of inhibition was used as a unit for measuring the catalytic activity of this enzyme. The speed of epinephrine auto-oxidation in the absence of SOD represents reference (control), while the speed of epinephrine auto-oxidation in the presence of SOD (i.e., protein in cytosol) represents part of the referent values. In 3.2 ml of a reaction assay containing a 3-ml carbonate buffer (pH = 12) and 0.1 ml of epinephrine solution, 0.01 ml of supernatant was added. Auto-oxidation of epinephrine was monitored for four minutes at $\lambda = 480$ nm. Reaction was stable at the temperature ratio 26°C to 30°C. Control reaction was simultaneously performed. For calculating SOD activity, the percentage of epinephrine auto-oxidation inhibition in the presence of SOD from the sample vs. the control reaction was used [19]. The amount of SOD was expressed in units of SOD activity per gram of Hb (unit/gHb). This unit was defined as the volume of proteins that induces 50% of epinephrine auto-oxidation speed inhibition in the linear part of the absorption increase. The concentration of SOD activity was calculated using the following equation:

$$\text{SOD-I} = 2(\Delta K - \Delta A) \times R / V \times Hb \times \Delta K$$

ΔK – change of control reaction absorption per minute

ΔA – change of sample reaction absorption per minute

V – sample volume (ml)

Hb – amount of hemoglobin (g/100ml lysate)

R – dilution

Determination of catalase activity in the sonificate is based on the method by Beutler [20]. Lysates were diluted with distilled water (1:7 volume/volume) and treated with chloroform-ethanol (0.6 : 1 v/v) to remove hemoglobin [21]. Then 50 μ L of the catalase buffer, 100 μ L of the sample, and 1 mL of 10 mM H₂O₂ were mixed. The decrease of absorbance was monitored spectrophotometrically at 230 nm, for three minutes.

Table 1. Values of oxidative stress parameters before and after the dive

parameter (mean ± SD)	before dive	after dive	before vs. after dive
TBARS (µmol/ml plasma)	4.27 ± 3.46	5.66 ± 3.08	**
NO ₂ ⁻ (nmol/ml plasma)	10.10 ± 4.27	21.45 ± 9.99	**
O ₂ ⁻ (nmol/ml plasma)	8.25 ± 4.99	14.40 ± 11.48	p>0.05
H ₂ O ₂ (nmol/ml plasma)	4.46 ± 2.93	5.51 ± 3.56	p>0.05
CAT (U/g Hb x 10 ³)	5.21 ± 2.38	6.39 ± 3.25	p>0.05
SOD (U/g Hb x 10 ³)	1416.26 ± 334.15	1275.91 ± 378.51	p>0.05

** statistical significance at the level of p < 0.01.

The CAT activity was expressed in unit/mg protein, and this unit was defined as the amount of reduced H₂O₂ (µM per minute). For calculation, the following equation was used:

$$CAT = \Delta A \times R / 0.71 \times Low \times V$$

ΔA – change of absorbance per minute

R – dilution

V – sample of volume (ml)

Low – amount of protein (mg/ml by sonification)

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using SPSS 19.0 for Windows. The results are expressed as means ± standard deviation of the mean (SD). Data distribution was checked with the Shapiro-Wilk test and depending on its results, the appropriate parametric or non-parametric test was used. The differences between the values of means from two related samples (before and after the dive) were assessed by Wilcoxon's test, while the difference between two unrelated samples (characteristics of exercises protocol) was assessed by t-test. The alpha level for significance was set to p < 0.05.

RESULTS

TBARS values

The values of TBARS were statistically increased after diving compared to the baseline conditions (before diving), (p < 0.01) (Table 1).

NO₂⁻ values

The values of NO₂⁻ were also significantly increased after diving compared to the baseline conditions (before diving), (p < 0.01) (Table 1).

O₂⁻ values

The values of O₂⁻ were not statistically changed after diving. (p>0.05) (Table 1).

H₂O₂ values

The values of H₂O₂ were not significantly changed after diving (Table 1).

Values of antioxidative enzymes, CAT and SOD

The values of both antioxidative enzymes, CAT and SOD, were not statistically changed after diving compared with before diving (p>0.05) (Table 1).

DISCUSSION

Scuba diving differs from other physical activities due to different environmental conditions such as increased ambient pressure, increased resistance to movement, the elevated partial pressure of oxygen, added weight and drag of diving equipment, cold water temperatures and higher breathing resistance [4]. Intensified physical activity, hyperoxia and exposure to cold temperatures during scuba diving can lead to the increased production of free radicals [12].

In that sense, the present study was aimed to determine the redox state of professional police scuba divers during immersion at a depth of 30 meters for a duration of 30 minutes. All estimated parameters were measured before and immediately after the diving session. In the case of pro-oxidative markers, our results showed that values of TBARS and NO₂⁻ were statistically increased after diving compared to baseline conditions (before diving), while values of O₂⁻ and H₂O₂ remained unchanged (Table 1). However, it is important to emphasize the short half-life of these parameters (except

TBARS) which could affect interpretation of results and comparison with findings of other investigations. Unfortunately, there are lack of studies dealing with this topic.

Most of these studies were performed by Sureda and his group. During one investigation, nine male divers performed a dive to a depth of 50 meters for a total time of 35 minutes. Blood samples were obtained at rest, after the dive, and three hours after the dive session [5]. Among other markers, they measured nitrites and found increased protein nitrotyrosine levels after diving and during recovery [5]. Further, neutrophil nitrite values (as indicative of inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity) progressively increased after diving and recovery [5]. Compared with our study, their methodology for assessment of nitrite metabolism was more complex and thus more precise: namely, nitrotyrosine levels were measured by using high-performance liquid chromatography (HPLC) while neutrophil activity (for nitrite production) through an MTT assay. Although methodologies were different, findings of both studies support the hypothesis that scuba diving induces nitrosative damage with elevation of nitrite levels.

Having in mind the fact that ROS have extremely short half-lives, they are difficult to measure directly. Instead, what can be measured are several products of the damage produced by oxidative stress, such as TBARS [22]. TBARS assay values are usually reported in malondialdehyde (MDA) equivalents, a compound that results from the decomposition of polyunsaturated fatty acid lipid peroxides. The TBARS assay is a well-recognized, established method for quantifying these lipid peroxides, although it has been criticized for its reactivity toward compounds other than MDA [22].

Another study from the previously mentioned investigation group has shown a rise in MDA levels after the dive [9]. The dive was performed again at a depth of 50 meters for a total time of 35 minutes, while the values of MDA were measured by using the HPLC method. In the present study, the index of lipid peroxidation (measured as TBARS) was also significantly increased after immersion (Table 1). It is well known that HPLC often provides the advantages of higher specificity and higher sensitivity when compared to other available methods [23], such as spectrophotometric assays, which have been used in this study.

Nevertheless, it is obvious that in both cases diving induces an increase in levels of markers describing the destruction of lipid membranes, which is associated with and may be consequence of enhanced nitrite production (nitrosative stress) [6,24].

As previously mentioned, in our study diving did not affect $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 values (Table 1). Still, these results should be considered with caution, having in mind that assays for these ROS generated in biological systems is a difficult task because of the high reactivity and short half-life of $O_2^{\cdot-}$ [25,26]. Unchanged values of $O_2^{\cdot-}$ may be associated with an increased release of NO_2 , taking into consideration that these two molecules strongly interact in situations of $O_2^{\cdot-}$ overproduction, which leads to decreased bioavailability of NO [27]. In the case of H_2O_2 , Ferrer and co-authors [12] examined the effects of a single scuba diving episode, at a depth of 40 meters for 25 minutes, on lymphocyte H_2O_2 production and showed an increased level of this ROS [12]. However, they used an MTT assay for measuring this marker. With respect to this fact, it is clear that this methodology provides more relevant data about the H_2O_2 concentration, and that our results may not with certainty serve for estimation of oxidative damages by this ROS.

On the other hand, it could also be expected that during a dive, the functioning of the antioxidative enzymatic system may be changed. Thus, we investigated the activity of two major antioxidative enzymes, CAT and SOD, in order to create the most complete picture of the divers' redox state. SOD catalyzes dismutation of the $O_2^{\cdot-}$ to H_2O_2 and thus can serve for better interpretation of results regarding $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 [28]. Our results have shown that, compared to control conditions, SOD remained unchanged after the dive (Table 1). A recent study investigated the effects of a long-term dive (living in an underwater habitat for the duration of 12 days) on SOD and found decreased activity of this enzyme at the end of dive and seven days after the dive [29]. The SOD was measured spectrophotometrically, similar to our study. However, this investigation had other protocols (prolonged time of dive and habitat located 19 meters below the ocean surface), which could provide an explanation for differences in results when compared to the present study. Based on the findings of our study and others, it seems that during a long period

of diving, the antioxidant capacity can be exhausted, thus allowing the occurrence of oxidative stress.

On the other hand, CAT decomposes H_2O_2 to H_2O and O_2 [30]. Similar to SOD there were no changes in activity of this enzyme after the dive (Table 1). Unchanged activity of both antioxidative enzymes (SOD and CAT) could confirm $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 dynamics in our investigation. Taking into account that the present study involved professional divers, we can assume that, due to frequent dives, their antioxidant systems had adjusted already, and thus new immersions did not lead to significant changes in these markers. Sureda and his group have carried out another investigation with a similar design [31]. Namely, divers were immersed at a depth of 40 meters for a total time of 25 minutes; blood samples were obtained after overnight fasting before beginning the dive session, immediately after diving and three hours after the

dive session. They found a rise in CAT activity immediately after diving, with a return to basal values after recovery.

Our results indicate that dives up to 30 meters cause only initial damage of the membrane lipids, while production of harmful ROS, such as $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 remains relatively unaffected. In addition, antioxidative-protecting enzymes (CAT and SOD) remained unchanged. Based on this, it seems that dives with these characteristics (30 meters for a total time of 30 minutes) only slightly disturbs redox homeostasis, without serious intermolecular changes that can lead to prominent oxidative stress and finally reduce the physical performance and recovery of professional scuba divers.

Conflict of interest

The authors report no conflict of interest with this submission. ■

REFERENCES

1. Eftedal I, Ljubkovic M, Flatberg A, Jørgensen A, Brubakk AO, Dujic Z. Acute and potentially persistent effects of scuba diving on the blood transcriptome of experienced divers. *Physiol Genomics* 2013; 45:965-972.
2. Perovic A, Unic A, Dumic J. Recreational scuba diving: negative or positive effects of oxidative and cardiovascular stress? *Biochem Med* 2014; 24:235-247.
3. Lin YC. Applied physiology of diving. *Sports Med* 1988; 5:41-56.
4. Doubt TJ. Cardiovascular and thermal responses to SCUBA diving. *Med Sci Sports Exerc* 1996; 28:581-586.
5. Sureda A, Batle JM, Capó X, Martorell M, Córdova A, Tur JA, Pons A. Scuba diving induces nitric oxide synthesis and the expression of inflammatory and regulatory genes of the immune response in neutrophils. *Physiol Genomics* 2014; 46:647-654.
6. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism* 2000; 49:3-8.
7. Vendemiale G, Grattagliano I, Altomare E. An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. *Int J Clin Lab Res* 1999; 29:49-55.
8. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int* 2014; 2014: article ID 761264.
9. Sureda A, Batle JM, Ferrer MD, Mestre-Alfaro A, Tur JA, Pons A. Scuba diving activates vascular antioxidant system. *Int J Sports Med* 2012; 33:531-536.
10. Obad A, Marinovic J, Ljubkovic M, Breskovic T, Modun D, Boban M et al. Successive deep dives impair endothelial function and enhance oxidative stress in man. *Clin Physiol Funct Imaging* 2010; 30:432-438.
11. Vince RV, McNaughton LR, Taylor L, Midgley AW, Laden G, Madden LA. Release of VCAM-1 associated endothelial microparticles following simulated SCUBA dives. *Eur J Appl Physiol* 2009; 105:507-513.
12. Ferrer MD, Sureda A, Batle JM, Tauler P, Tur JA, Pons A. Scuba diving enhances endogenous antioxidant defenses in lymphocytes and neutrophils. *Free Radic Res* 2007; 41:274-281.
13. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95:351-358.
14. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PI, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126:131-138.
15. Auclair C, Voisin E. Nitrobluetetrazolium reduction. In: Greenwald RA, ed. *Handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton; CRP Press 1985; 123-132.

EXERCISE TREADMILL TEST IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS TYPE 2

Aleksandar Antonijević¹, Jovana Bradić², Vladimir Živković³

¹Medical Center in Užice/Organizational Unit-Health Center in Pozega, Pozega

²University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacy, Kragujevac

³University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Physiology, Kragujevac

TEST FIZIČKOG OPTEREĆENJA NA TREDMILU KOD PACIJENATA SA DIJABETES MELITUSOM TIPA 2

Aleksandar Antonijević¹, Jovana Bradić², Vladimir Živković³

¹Zdravstveni centar Užice/Organizaciona jedinica Dom zdravlja Požega, Požega

²Univerzitet u Kragujevcu, Fakultet medicinskih nauka, Katedra za farmaciju, Kragujevac

³Univerzitet u Kragujevcu, Fakultet medicinskih nauka, Katedra za fiziologiju, Kragujevac

Received / Priljen: 14.05.2018.

Accepted / Prihvaćen: 22. 05. 2018.

ABSTRACT

There is a concern regarding the high incidence of coronary heart disease (CHD) among patients with diabetes mellitus (DM) type 2 since it is a leading cause of mortality in those patients. Exercise treadmill test (ETT) is proposed as a suitable, non-invasive method for identifying asymptomatic patients with ischemic changes, who would benefit from pharmacological treatment, thus contributing to a reduction of adverse cardiovascular events. Therefore the objective of our study was to evaluate myocardial ischemia in asymptomatic patients with DM type 2 by performing ETT. The present investigation was conducted in Health Center Pozega during the year 2018. 40 insulin-dependent, aged 33.05 ± 2.01 years, with DM type 2 were included in the study. They had no history nor symptoms of cardiac disease. All patients underwent ETT according to Bruce protocol, while 12-lead ECG was recorded and blood pressure was monitored. All patients had negative ETT results. Also no ST segment depression, no signs of insufficiency of peripheral circulation, no changes in heart rhythm, no symptoms by the central nervous system were observed. Additionally response of heart rate and blood pressure to exercise was within physiological range. These promising findings indicate that diabetes didn't alter myocardial integrity and function, thus suggesting that coronary reserve in examined patients was preserved.

Keywords: Diabetes mellitus type 2, Exercise treadmill test, Coronary heart disease

SAŽETAK

Postoji zabrinutost zbog visoke stope incidence koronarne bolesti srca (KBS) kod pacijenata sa dijabetes melitusom (DM) tip 2, jer su one vodeći uzrok smrtnosti kod tih pacijenata. Test fizičkog opterećenja na tredmilu (TFOT) predložen je kao pogodna neinvazivna metoda za identifikaciju asimptomatskih pacijenata sa ishemijskim promjenama, koji bi imali korist od farmakološkog tretmana, čime bi se doprinelo smanjenju neželjenih kardiovaskularnih događaja. Stoga je cilj naše studije bio da ispita prisustvo ishemijske miokarda kod asimptomatskih pacijenata sa DM tip 2 izvođenjem TFOT. Istraživanje je sprovedeno u Domu zdravlja Požega tokom 2018. godine. U studiju je bilo uključeno 40 insulin zavisnih pacijenata, starosti $33,05 \pm 2,01$ godina, sa DM tip 2. Nisu imali istoriju ni simptome bolesti srca. Svi pacijenti su podvrgnuti TFOT po Bruce protokolu, uz snimanje elektrokardiograma (EKG) u 12 odvoda i merenje krvnog pritiska. Svi pacijenti su imali negativan test opterećenja. Takođe uočeno je odsustvo ST depresije, znakova insuficijencije periferne cirkulacije, promena u srčanom ritmu i simptoma od strane centralnog nervnog sistema. Dodatno odgovor srčane frekvence i krvnog pritiska na fizičko opterećenje je bio u fiziološkim granicama. Ovi obećavajući rezultati ukazuju na to da dijabetes nije izmenio integritet i funkciju miokarda, što ukazuje da je koronarna rezerva kod ispitivanih pacijenata očuvana.

Ključne reči: dijabetes melitus tip 2, test fizičkog opterećenja na tredmilu, koronarna bolest srca



INTRODUCTION

Diabetes mellitus remains one of the most *rapidly growing* chronic diseases, with a prevalence increasing at an alarming rate (1). It presents a group of metabolic disorders characterized by inadequate fasting or postprandial hyperglycemia, as a result of lack of insulin secretion or diminished tissue responses to insulin. Consequently metabolism of carbohydrates, fats and proteins is impaired (2). In DM type 2 insulin resistance and/or progressive decrease in the insulin secretion occurs, thus preventing insulin from reaching target tissue (2, 3). Condition of chronic hyperglycemia is associated with numerous microvascular and macrovascular complications, leading to a dysfunction of various organs, involving heart and blood vessels, muscle, skin, eyes, kidneys, nerves etc (4). Management of diabetic complications represents a great challenge of the 21st century, both for physicians and scientists, especially when it comes to cardiovascular disorders. There is a great concern regarding the development of coronary heart disease among patients with DM type 2 since it's the main cause of death in those patients. Furthermore numerous data has confirmed that patients with DM type 2 have 2-4 fold higher risk for CHD in comparison to the age-adjusted general population, thus indicating the urgent need for obtaining the correct *diagnosis* in an asymptomatic stage (5-7).

Regular physical exercise exerts myriad health benefits, involving a regulation of blood pressure, glycemia, lipidemia. Therefore it's been proposed as one of the most efficient non-pharmacological treatment modalities in control of DM type 2. Hypoglycemic effect may be reached by increased need for glucose utilization by skeletal muscle during different training protocols (8, 9). Nevertheless, long-term hyperglycemia alters structural and functional properties of the heart, with an emphasis on endothelial dysfunction (10, 11). Exercise tolerance test, as non-invasive test, which involves treadmill and bicycle ergometer exercise, is proposed a great method for assessment of physical capacity of persons with DM type 2 if considering to start with moderate or vigorous fitness program. Additionally diabetic patients are strongly recommended to undergo this test for early detection of ischemic changes in myocardium, taking into consideration the high incidence of CHD (12-14).

Regarding all above mentioned data, the aim of our study was to establish ischemic heart changes in asymptomatic patients with diabetes type 2 by performing exercise treadmill screening test.

SUBJECTS AND METHODS

Study design

This study was conducted in the year 2018. The study protocol was approved by the Medical Ethics Committee

of The Health Center Pozega and was carried out according to the Declaration of Helsinki. All the participants were informed about the research protocol before giving their written consent to participate in the study.

Study population

In total 40 patients suffering from DM type 2 were included in the study. They were insulin-dependent patients, whose therapy included long- and rapid-acting insulin, in combination with metformine and sulfonylurea derivatives or other oral hypoglycemic drugs. A dose of long-acting insulin or insulin analogue was 14 units daily and rapid-acting insulin or its analogue was 24 units daily.

Procedure

All patients were subjected to physical examination, routine biochemical analysis, electrocardiography and echocardiography. Body weight, height and waist circumference were measured. All patients were instructed to prepare for exercise testing by excluding beta blockers from their therapy on the testing day. It was not necessary to exclude coronary dilators since there were no patients receiving this group of drugs, as well as amiodaron and propafen. Three hours before testing, patients had light meals, smokers (10 patients) didn't smoke and they received a dose of insulin reduced for 4 and regular dose of oral hypoglycemic medications.

Excluding criteria were reflected in the following: presence of aortic stenosis, inflammatory conditions such as pericarditis, myocarditis or endocarditis, blood pressure higher than 135/85 mmHg during resting and relaxation, rapid uncontrolled atrial fibrillation or other disorders of heart rhythm and cardiac decompensation. Exercise treadmill test (ETT) was conducted according to Bruce protocol. Maximum predicted heart rate was calculated by subtracting the person's age from 220 (210 for women).

12-lead ECG was used for continuously monitoring during the test and blood pressure was measured at rest and every 2 minutes during exercise and recovery period. Furthermore symptoms of all patients were continuously observed. If patient reached 85% of maximum predicted heart rate it was considered as satisfactory myocardial response. ETT test was considered positive if there is a horizontal (planar) or downsloping ST-segment depression of > 1mm. The value of BP up to 225 mm Hg is interpreted as normal. If patients had experienced fatigue and breathlessness, we would have interrupted test (16, 17).

Statistical analysis

IBM SPSS Statistics 19.0 for Windows was used for statistical analysis. Descriptive statistics was used to calculate average value \pm standard deviation (SD). If there were patients with positive test results, the association between



their clinical and laboratory characteristics and test results would be assessed using *Chi-square test for categorical data*. Value of $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

RESULTS

Clinical characteristics of patients are presented in Table 1, while laboratory characteristics are presented in Table 2. Laboratory values were within reference range. All patients had negative screening test results, with no changes in echocardiography. They were able to complete the ETT, and changes in HR were presented in Figure 1. No ST segment elevations, no signs of insufficiency of peripheral circulation, no symptoms by the central nervous system such as dizziness, presyncope, ataxia were observed. Furthermore the test was not interrupted due to patient request for any reason. Values of BP were within referent range during whole period of measurement. Additionally there were no changes in heart rhythm during the entire duration of the test.

DISCUSSION

It's been reported that mild inflammation, increased generation of pro-oxidants, enhanced coagulability, endothelial dysfunction etc play role in occurrence of CDV in patients with DM (17). People with diabetes have six to eight years shorter life expectancy compared to general population and the main reason doesn't lie in diabetes per se, but in developed CHD (18). The complex mechanisms associating CHD and diabetes have been under extensive investigation with the aim to discover novel approach, which would decrease *mortality* and morbidity rate in these patients. More severe manifestations of CHD are recorded in patients with diabetes, involving multiple, more peripheral and smaller blood vessels, which is closely related to pronounced difficulties in treatment (19, 20). Additionally due to the absence of symptoms, silent ischemia delays time for diagnosis and make the prognosis unfavorable. Therefore application of certain diagnostic procedures which would

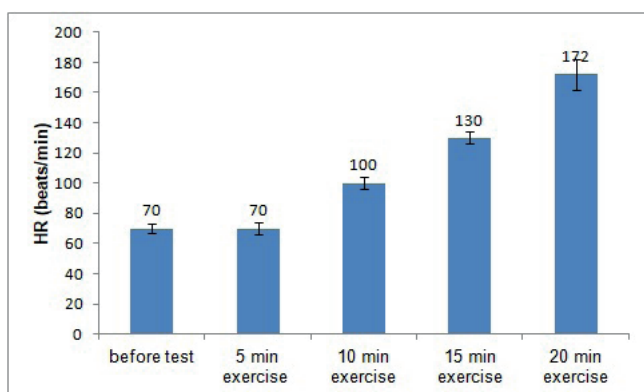


Figure 1. The change of HR during exercise treadmill test. Data are presented as *mean* \pm *SD*.

Table 1. Clinical characteristics of patients. Data are expressed as mean \pm SD.

Variables	Mean \pm SD
Age	33.05 \pm 2.01
Sex M/F	25/10
Weight (kg)	87.5 \pm 5.21
Height (cm)	177.5 \pm 11.02
Waist circumference (cm)	90 \pm 4.5
Duration of disease (years)	5.5 \pm 1,1

Table 2. Laboratory analysis and values of blood pressure and heart rate of patients. Data are presented as mean \pm SD. rHR- resting heart rate; rSBP- resting systolic blood pressure; rDBP- resting diastolic blood pressure; BG- blood glucose; HbA1c- glycated haemoglobin; TC- Total cholesterol; TG- total triglycerides; LDL-C- low-density lipoproteins cholesterol; HDL-C- high-density lipoproteins cholesterol; AST- aspartate aminotransferase; ALT- alanine aminotransferase; GGT- gamma-glutamyltransferase; TB- total bilirubin; AI- atherogenic index of plasma; CRP- C reactive protein; ESR- erythrocyte sedimentation rate; WBC- white blood cells; RBC- red blood cell; PLT- platelets; HgB- haemoglobine.

Variables	Mean \pm SD
rHR beats/min	77 \pm 4
rSBP (mmHg)	135 \pm 15
rDBP (mmHg)	85 \pm 10
BG (mmol/l)	5.8 \pm 0.1
HbA1c (%)	8.12 \pm 1.51
TC (mmol/l)	5.9 \pm 0.3
TG (mmol/l)	1.5 \pm 0.1
LDL-C (mmol/l)	3 \pm 0.8
HDL-C (mmol/l)	1.5 \pm 0.1
AST (U/l)	30 \pm 2
ALT (U/l)	25 \pm 2
GGT (U/l)	25 \pm 1
TB (Umol/l)	10 \pm 0.6
Urea (mmol/l)	5.2 \pm 1.4
Creatinine (mmol/l)	88 \pm 3.1
AI	1 \pm 0.23
CRP (mg/l)	1 \pm 0.2
ESR (mm/hr)	4 \pm 1
WBC (cells /l)	8.4 $\times 10^9$
RBC (cells/l)	4,4 $\times 10^{12}$
PLT (cells/l)	233 $\times 10^9$
HGB (g/l)	126 $\times 10^{12}$
K (mmol/l)	4 \pm 0.2
Urine	Normal

detect early ischemic myocardial changes is of a great importance in management of diabetes (21).

We have chosen to apply ETT in our study since it has been proposed as a convenient test for assessing the presence of silent ischemia among patients with diabetes (22).



Our results have shown that no ST segment depression was found among observed patients and all ECG recordings were within reference range. It's been previously confirmed that not only ST-segment behavior during exercise may predict cardiovascular events, but also exercise time, heart rate and recovery of blood pressure. Moreover abnormal values of heart rate and recovery of blood pressure correlate with a greater risk for adverse cardiovascular outcome (23). Due to the presence of autonomic dysfunction it may be expected that chronotropic response to ETT in diabetic patients is deteriorated, reflected in inability of the heart to increase heart rate when exposed to physical activity (24). A drop in blood pressure after the exercise suggests poor prognosis regarding cardiovascular complications (16). In our study heart rate increased from the baseline 70 beats/min, up to 172 beats/min at the end of 20 minute exercise. We revealed physiological response of the blood pressure to exercise and the absence of progressive decline which would indicate failure of the heart muscle due to possible distinctive coronary disease. Moreover our findings clearly show that the coronary reserve in all examined patients is preserved, indicating that DM 2 doesn't progress in all persons so rapidly and duration time of about 5,5 years in our patients didn't alter myocardial integrity and function. It has been known that symptomatic patients with CHD have a longer disease history in comparison to asymptomatic patients with CHD. The link between the age and presence of CHD has also been reported, thus suggesting that higher positive predictive values of ETT for coronary artery stenosis is among patients older than 55 years (25).

On the one hand, the fact that CHD is frequently missed in the asymptomatic phase of disease emphasizes the need for performing ETT screening test in order to identify individuals who need to receive anti-ischemia therapy (26). Sensitivity of the exercise stress tests is 45–61%, while specificity is in range 70–90% (27). Beside the frequent use in clinical practice there are several limitations for the test application, such as impossibility of the patients with peripheral neuropathy, peripheral vascular diseases etc to exercise (13). Interestingly data regarding the performance of ETT in asymptomatic patients are controversial. Possibility of false positive responses to ETT in those patients require further confirmation by radionuclide imaging techniques (28). There is a recommendation for application of ETT in elderly patients with more than 10 years history of DM type 2 or shorter if the risk factors such as hypertension, hyperlipidemi, smoking are present (25).

A strong correlation between the presence of hypertension and dyslipidemia and CHD was revealed in patients with diabetes (13). However we weren't able to test the link between associated patients' characteristics and coronary artery stenosis since routine laboratory analysis, general medical examinations as well as ETT result of our selected patients proved to be in reference range. When encountering diabetes as a contemporary disease of mankind bringing so many cardiological complications (numerous forms

of heart attacks, stents, by-passes etc), negative ETT results obviously indicate a hope that appropriate insulin and oral hypoglycemic therapy may preserve coronary function. However impact of novel medication, modification of nutrition intake or implementation of physical activity on maintenance of cardiovascular homeostasis shouldn't be missed.

Based on our result we may conclude that patients with DM type 2 achieved predicted heart rate during exercise stress test, without associated ST segment depression, followed by a physiological response of blood pressure. Our promising results provide insight into the favourable prognosis of these patient in terms of cardiovascular events. Further studies are certainly necessary in order to gain more information about the role of ETT in early diagnosis of CHD in asymptomatic patients with diabetes, management of recognized patients with CHD and necessity for different treatment strategies.

REFERENCES

1. Tabish SA. Is Diabetes Becoming the Biggest Epidemic of the Twenty-first Century? *Int J Health Sci (Qassim)*. 2007; 1(2):V-VIII.
2. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003; 52(1):102-10.
3. Ahrén B. Type 2 diabetes, insulin secretion and beta-cell mass. *Curr Mol Med*. 2005; 5(3):275-86
4. Cade WT. Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. *Phys Ther*. 2008; 88(11):1322-35.
5. Laakso M. Cardiovascular disease in type 2 diabetes from population to man to mechanisms: the Kelly West Award Lecture 2008. *Diabetes Care*. 2010; 33(2):442-9.
6. Dokken B. The Pathophysiology of Cardiovascular Disease and Diabetes: Beyond Blood Pressure and Lipids. *Diabetes Spectrum* 2008; 21(3): 160-165.
7. Ali MK, Narayan KM, Tandon N. Diabetes & coronary heart disease: current perspectives. *Indian J Med Res*. 2010; 132:584-97.
8. Tuomilehto T. Nonpharmacologic Therapy and Exercise in the Prevention of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2009; 32(Suppl 2): S189–S193.
9. Yanai H, Adachi H, Masui Y, Katsuyama H, Kawaguchi A, Hakoshima M et al. Exercise Therapy for Patients With Type 2 Diabetes: A Narrative Review. *J Clin Med Res*. 2018;10(5):365-369.
10. Lee JH, Lee R, Hwang MH, Hamilton MT, Park Y. The effects of exercise on vascular endothelial function in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetol Metab Syndr*. 2018; 6:10-15.
11. Adegate E, Singh J. Structural changes in the myocardium during diabetes-induced cardiomyopathy. *Heart Fail Rev*. 2014; 19(1):15-23.



12. Kharlip J, Naglieri R, Mitchell BD, Ryan KA, Donner TW. Screening for silent coronary heart disease in type 2 diabetes: clinical application of American Diabetes Association guidelines. *Diabetes Care*. 2006; 29(3):692-4.
13. Gheydari ME, Jamali M, Hajsheikholeslami F, Yazdani S, Jamali M. Value of exercise tolerance testing in evaluation of diabetic patients presented with atypical chest discomfort. *Int J Endocrinol Metab*. 2013; 11(1):11-5.
14. Amsterdam EA, Kirk JD, Diercks DB, Turnipseed SD, Lewis WR. Early exercise testing for risk stratification of low-risk patients in chest pain centers. *Crit Pathw Cardiol*. 2004; 3 (3):114-20.
15. Gibbons RJ, Balady GJ, Beasley JW, Bricker JT, Duvernoy WF, Froelicher VF et al. ACC/AHA Guidelines for Exercise Testing. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Exercise Testing). *J Am Coll Cardiol*. 1997; 30(1):260-311.
16. Hill J, Timmis A. Exercise tolerance testing. *BMJ*. 2002; 324(7345): 1084–1087.
17. Matheus AS, Tannus LR, Cobas RA, Palma CC, Negrato CA, Gomes MB. Impact of diabetes on cardiovascular disease: an update. *Int J Hypertens*. 2013; 2013:653789
18. Franco OH, Steyerberg EW, Hu FB, Mackenbach J, Nusselder W. Associations of diabetes mellitus with total life expectancy and life expectancy with and without cardiovascular disease. *Arch Intern Med*. 2007; 167(11):1145-51.
19. Hammoud T, Tanguay JF, Bourassa MG. Management of coronary artery disease: therapeutic options in patients with diabetes. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 36(2):355-65.
20. Melidonis A, Dimopoulos V, Lempidakis E, Hatzissavas J, Kouvaras G, Stefanidis A et al. Angiographic study of coronary artery disease in diabetic patients in comparison with nondiabetic patients. *Angiology*. 1999; 50(12):997-1006.
21. Wackers FJ, Young LH, Inzucchi SE, Chyun DA, Davey JA, Barrett EJ et al. Detection of Ischemia in Asymptomatic Diabetics Investigators. Detection of silent myocardial ischemia in asymptomatic diabetic subjects: the DIAD study. *Diabetes Care*. 2004; 27(8):1954-61.
22. Karanam A, Kumar BG, Koriginja R. Treadmill test to detect silent myocardial ischemia in asymptomatic type 2 diabetes mellitus. *J Assoc Physicians India*. 2016; 64(1):77.
23. Slavich G, Mapelli P, Fregolent R, Slavich M, Tuniz D. [Non ST ergometric variables in the diabetic patient and their prognostic significance]. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2010; 74(1):28-35.
24. Ho PM, Maddox TM, Ross C, Rumsfeld JS, Magid DJ. Impaired chronotropic response to exercise stress testing in patients with diabetes predicts future cardiovascular events. *Diabetes Care*. 2008; 31(8):1531-3.
25. Joshi AS, Lahane CG, Kashid AA. The result of treadmill test in asymptomatic type 2 diabetes mellitus. *Int J Sci Rep*. 2017; 3(6):166-172.
26. Rutter MK, Nesto RW. The changing costs and benefits of screening for asymptomatic coronary heart disease in patients with diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007;3(1):26-35
27. Makrilakis K, Liatis S. Cardiovascular Screening for the Asymptomatic Patient with Diabetes: More Cons Than Pros. *J Diabetes Res*. 2017; 2017:8927473.
28. Acampa W, Cantoni V, Green R, Maio F, Daniele S, Nappi C et al. Prognostic value of normal stress myocardial perfusion imaging in diabetic patients: a meta-analysis. *J Nucl Cardiol*. 2014; 21(5):893-902.

PHYTOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF SOME SPECIES OF THE GENUS *GALIUM* L. (*GALIUM VERUM* AND *MOLLUGO*)

Jovana Bradic¹, Anica Petkovic¹, Marina Tomovic¹

¹ Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

FITOHEMIJSKE I FARMAKOLOŠKE KARAKTERISTIKE NEKIH VRSTA IZ RODA *GALIUM* L. (BELO I ŽUTO IVANJSKO CVEĆE)

Jovana Bradic¹, Anica Petkovic¹, Marina Tomovic¹

¹ Katedra za farmaciju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

Received / Priljen: 10. 10. 2017.

Accepted / Prihvaćen: 29. 10. 2017.

ABSTRACT

Galium verum L. and *Galium mollugo* L. are perennial herbaceous plants, belonging to the Rubiaceae family. Several classes of bioactive compounds, such as iridoid glycosides, phenolic compounds, anthraquinones and triterpenes, as well as small amounts of tannins, saponins, essential oils have been isolated from *Galium* species so far. Plants belonging to this genus have a long history of use in a traditional medicine for the treatment of many diseases and conditions. The main application of *G. verum* is as diuretic, choleric and as the treatment for gout and epilepsy. On the other hand, *G. mollugo* has been used to treat hysteria, epilepsy, as vulnerary. Over the past decades, numerous papers have been published referring to the chemical constituents presented in *G. verum* and *G. mollugo* extracts. Additionally, chemical composition and pharmacological effects of *G. verum* have been investigated, however data related to the effects of *G. mollugo* is limited. In this review, we summarized the current knowledge on the phytochemical and pharmacological properties of *G. verum* and *G. mollugo*. Finally, we proposed directions for future research in this field, which can improve our understanding of the potential health benefits of *Galium* species.

Keywords: *Galium verum*, *Galium mollugo*, biological activity, chemical composition

SAŽETAK

Belo i žuto ivanjsko cveće su višegodišnje zeljaste biljke koje pripadaju porodici Rubiaceae. Do sada je iz roda *Galium* izolovano nekoliko vrsta bioaktivnih jedinjenja, kao što su iridoidni glikozidi, fenolna jedinjenja, antrahinoni, triterpeni, kao i male količine tanina, saponina i etarskih ulja. Biljne vrste iz ovog roda imaju dugu istoriju upotrebe u tradicionalnoj medicini u lečenju mnogih bolesti i stanja. Glavna primena belog ivanjskog cveća je kao diuretik, holeretik i u lečenju gihta i epilepsije. S druge strane, žuto ivanjsko cveće se koristi u lečenju epilepsije i hysterije, za zarastanje rana. Tokom proteklih decenija objavljeni su brojni radovi koji se odnose na hemijska jedinjenja prisutna u ekstraktima žutog i belog ivanjskog cveća. Dodatno, hemijski sastav i farmakološki efekti belog ivanjskog cveća su proučavani, dok su podaci o efektima žutog ivanjskog cveća ograničeni. U ovom preglednom radu smo rezimirali trenutna saznanja o farmakološkim i fitohemijskim karakteristikama žutog i belog ivanjskog cveća. Konačno, predložili smo smernice za buduća istraživanja u ovoj oblasti, koja bi mogla poboljšati naše razumevanje potencijalnih zdravstvenih koristi roda *Galium*.

Ključne reči: belo ivanjsko cveće, žuto ivanjsko cveće, biološka aktivnost, hemijski sastav



INTRODUCTION

Galium genus belongs to the Rubiaceae family and comprises about 400 herbaceous plant species, 145 of which are distributed in Europe (1). Furthermore there are 37 species from *Galium* genus distributed in Serbian flora (2). Among them, the herb Lady's Bedstraw (*G. verum* L.) is renowned for the most frequent use in traditional medicine (3). It is com-

mon throughout Europe, North Africa and Asia, tropical Asia and Europe, but it can occur in southern Canada and northern U.S. In addition, *G. mollugo* (hedge bedstraw or false baby's breath) is widely distributed in Europe and North Africa and it is naturalized in the Russian Far East, New Zealand, Norfolk Island and much of North America (4).



Descripton

G. verum L. is a perennial herbaceous plant, with elongated stems growing to 60-120 cm. Leaves are glossy and dark green, while flowers are golden yellow, grouped in many-flowered panicles. The aerial parts of this plant are collected during dry and sunny days of the blooming period. Its golden yellow flowers are present from June to September. It occurs at elevations between sea level and 2.600 m, at mountain meadows and temperate grasslands.

Galium mollugo L. is a perennial herb, with the stems growing to 15–100 cm, with bright green leaves and white to greenish white flowers. The flowering period extends from May to September and arterial parts are collected during dry and sunny days of the blooming period (2-4).

Since both *G. verum* and *G. mollugo* have a perennial habit they can be easily confused. What make them differ are stems, which are thinner and firmer in case of *G.*

verum, while the panicles in *G. mollugo* are looser, almost leafless (4).

Chemical constituents

Several kinds of bioactive compounds have been isolated from *Galium* species so far. Previous phytochemical investigations of the *G. verum* and *G. mollugo* species reported the presence of iridoid glycosides, phenolic compounds, anthraquinones and triterpenes, as well as small amounts of tannins, saponins, essential oils, waxes, pigments and vitamin C (3).

Iridoids

It's been known that both *G. verum* and *G. mollugo* are rich in iridoids (Table 1). Secogalioside is marked as an important chemotaxonomic marker of the *G. mollugo* group (1).

Table 1. Iridoids in *G. verum* and *G. mollugo* species

Chemical name	Source <i>G. verum</i> References	Source <i>G. mollugo</i> References
Asperuloside	Bojthe-Horvath K et al ^{5,6} Demirezer ⁷	Mitova MI ¹ Iavarone C ⁸ Uesato S ⁹
Monotropein	Bojthe-Horvath K et al ^{5,6} Demirezer LO ⁷	Mitova MI ¹ Iavarone C ⁸ Uesato S ⁹
Scandoside	Bojthe-Horvath K et al ^{5,6}	Iavarone C ⁸ Uesato S ⁹
Geniposidic acid	Bojthe-Horvath K et al ^{5,6}	Uesato S ⁹
Deacetylasperulosidic acid	Bojthe-Horvath K et al ^{5,6} Demirezer LO ⁷	Mitova MI ¹
Asperulosidic acid	Bojthe-Horvath K et al ^{5,6} Demirezer LO ⁷	Mitova MI ¹ Iavarone C ⁸ Uesato S ⁹
6-o-epi-acetylscandosid	Demirezer LO ⁷	Nf
Daphylloside	Demirezer LO ⁷	Nf
Apigenine glycosides	Mitova MI ¹	Mitova MI ¹
Luteoline glycosides	Mitova MI ¹	Mitova MI ¹
Diosmetin glycosides	Mitova MI ¹	Mitova MI ¹
Deacetyl-daphylloside	Demirezer LO ⁷	Nf
6-O-epi-acetylscandosid	Demirezer LO ⁷	Nf
Loganin	Mitova MI ¹	Iavarone C ⁸
Secogaliosid	Mitova MI ¹	Uesato S ⁹
6-acetylscandoside	Mitova MI ¹	Mitova MI ¹ Iavarone C ⁸
Galioside	Nf	Mitova MI ¹ Uesato S ⁹
Mollugoside	Nf	Mitova MI ¹
Secogalioside	Nf	Mitova MI ¹ Uesato S ⁹
Gardenosidic acid	Nf	Uesato S ⁹
Scandoside methyl ester	Nf	Iavarone C ⁸ Uesato S ⁹
Daphylloside	Nf	Iavarone C ⁸ Uesato S ⁹
10-hydroxymorroniside	Nf	Uesato S ⁹
10-hydroxyloganin	Nf	Iavarone C ⁸

*Nf-not found so far



Table 2. Phenolic compounds in *G. verum* and *G. mollugo* species

Chemical name	Source <i>G. verum</i> References	Source <i>G. mollugo</i> References
Isorhamnetin	Zhao C et al ^{10,11} Matei AO et al ¹²	Nf
Isorhamnetin 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1-6)- β -D-glucopyranoside	Zhao C et al ^{10,11}	Nf
Kaempferol	Zhao C et al ^{10,11} Vlase L ¹⁵	Nf
Quercetin	Zhao C et al ^{10,11}	Nf
Diosmetin	Zhao C et al ^{10,11}	Nf
Diosmetin 7-O- β -D-glucopyranoside	Zhao C et al ^{10,11}	Nf
Diosmetin 7-O- β -D-xylopyranosyl-(1-6)- β -D-glucopyranoside	Zhao C et al ^{10,11}	Nf
Diosmetin 7-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)-[β -D-xylopyranosyl-(1-6)]- β -D-glucopyranoside	Zhao C et al ^{10,11}	Nf
3,5,7,3',4',3'',5'',7'',3''',4''''-decahydroxyl-[8-CH(2)-8'']-biflavone	Zhao C et al ^{10,11}	Nf
Quercetin	Matei AO et al ¹² Vlase L et al ¹⁵	Vlase L et al ¹⁵ Matei AO et al ¹²
Quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside	Zhao C et al ¹¹	Nf
Fisetin	Matei AO et al ¹²	Nf
Chrysin	Matei AO et al ¹²	Nf
Catechin	Matei AO et al ¹²	Nf
Epicatechin	Matei AO et al ¹²	Nf
Coumaric acid	Matei AO et al ¹² Vlase L et al ¹⁵	Vlase L et al ¹⁵
Ferulic acid	Matei AO et al ¹² Vlase L et al ¹⁵	Vlase L et al ¹⁶
Hesperidin	Matei AO et al ¹²	Nf
Astragalin	Demirezer LO ⁷ Tamas M ¹³	Demirezer LO ⁷ Tamas M ¹³
Rutin	Demirezer LO ⁷ Matei AO et al ¹² Tamas M ¹³ Vlase L ¹⁵	Tamas M ¹³ Vlase L ¹⁵
Hyperozide	Tamas M ¹³	Tamas M ¹³
Rutoside	Tamaş M et al ¹³	Tamaş M et al ¹³
Hispidulin	Mocan A et al ¹⁴	Mocan A et al ¹⁴
Chlorogenic acid	Matei AO et al ¹¹ Tamas M ¹³ Mocan A et al ¹⁴	Tamas M ¹³ Mocan A et al ¹⁴
Caffeic acid	Matei AO et al ¹² Tamas M ¹³ Mocan A et al ¹⁴	Tamas M ¹³ Mocan A et al ¹⁴ Vlase L ¹⁵
Luteoline	Nf	Vlase L ¹⁵
Chalcone	Shafaghat A ¹⁶	Nf

Phenolic compounds

Phytochemical investigation of *G. verum* L. has led to the isolation of several phenolic compounds in *G. verum* and *G. mollugo* extracts (Table 2). Chemical analysis of ethanolic extracts [30, 50 and 70% (w/v)] of *G. verum* was observed and the results indicate that concentration of certain phenolic depends on the solvent (12). Qualitative differences in the flavonoid fractions between *G. verum* and *G. mollugo* species exist, suggesting that the content of the flavonoids is about three times higher in *G. verum* (13). Regarding the amount of phenolics ob-

tained by different extraction techniques (maceration, reflux and ultrasonic extraction), it was shown that the highest amount of phenolics from *G. mollugo* extracts has been obtained by the reflux extraction. Authors explained this fact by oxidation and degradation of some bioactive compounds during sonication of the aqueous solution. In addition, increased solubility of phenols and flavonoids in the extracting solvent at higher extraction temperatures may be an explanation for such composition of the extracts (17).



Terpenes and anthraquinones

Data suggests the presence of triterpenic saponins in *Galium* species (18). However there is a lack of data referring to the amount of terpenes in *G. verum* or *G. mollugo*. Two monoterpene glycosides, such as betulalbuside A and (2E)-2,6-dimethyl-2,7-octadien-1,6-diol-6-O- β -glucopyranoside were isolated from the aerial parts of *G. verum* (7). In the ethanolic extract of *G. verum* L 1,3-dihydroxy-2-methylanthraquinone, physcion, 2-hydroxy-1,3-dimethoxyanthraquinone and 2,5-dihydroxy-1,3-dimethoxyanthraquinone were identified (19). It's been shown that anthraquinones are located in the vacuole of *G. mollugo* (20). In addition, anthraquinones production from *G. verum* lines of calus was proven as well (21). Unfortunately, data regarding the presence of anthraquinones and terpenes in this *Galium* species is limited, thus suggesting that they are probably present in a smaller quantities compared to other bioactive compounds.

Mineral composition

A significant chemical compounds identified in white lady's bedstraw are certainly minerals such as potassium, calcium and magnesium (22, 23). Study which examined mineral composition of the extracts of *G. mollugo* flowers obtained by maceration, extraction under reflux and ultrasonic extraction, using *atomic absorption spectrometry*, suggested that the highest calcium and magnesium yield could be achieved at the ultrasonic extraction, while type of extraction didn't affect K yield (23).

Phytosterols

Phytosterols, known as plant sterols structurally similar to cholesterol, may also be found in *Galium* species. It's been reported that *G. mollugo* was richer in β -sitosterol ($19.02 \pm 7.24 \mu\text{g/g}$) and campesterol ($15 \pm 0.08 \mu\text{g/g}$) than *G. verum* ($85.46 \pm 1.24 \mu\text{g/g}$ for β -sitosterol and $9.86 \pm 0.04 \mu\text{g/g}$ for campesterol) (14).

Essential oil

Essential oil obtained by hydro-distillation from the aerial parts of *G. verum* contains β -caryophyllane, caryophyllene oxide, germacrene D, terpinene, benzyl alcohol, squalene and cis-3-Hexen-1-ol (24, 25). On the other hand, essential oil from the aerial parts of *G. mollugo* is yellow-green oil which was rich in palmitic acid, tetradecanal and ethyl linoleolate (26).

G. verum and *G. mollugo* usage

Galium species have been traditionally used for the treatment of many diseases and conditions. Furthermore they are renowned for its usage in milk coagulation due to an enzyme in their chemical composition and that's the

reason for knowing this plant as "Yogurt herb" (3, 14, 27). In Scotland the plant is still used in cheese manufacturing. Since the coumarin scent of the plants acted as a flea killer, dried plants were widely used to stuff mattresses (3, 27). Furthermore, *G. verum* may serve as a food additive and yellow and red pigments presented in its aerial parts and roots allow usage of this plant in dyeing (10). However there is a limited number of studies which examined the effects of *G. verum* and *G. mollugo* extracts both in animal models and humans.

Pharmacological effects of *G. verum* and *G. mollugo*

Studies which evaluated the effects of *Galium* species predominantly were conducted in Asian people. This is expected since traditional medicine is more present in their culture and everyday life compared to Europe and USA continents (27). *G. verum* has been studied both chemically and pharmacologically, however there is a little data related to the effects of *Galium mollugo* (17).

Anticancer effects

Recommendations for using *G. verum* in the treatment of tongue cancer are supported by the reports of patients with tongue and larynx carcinoma successfully treated with the tea of this plant. *G. verum* decoction was proved to inhibit the chemo-sensitive and -resistant laryngeal carcinoma cell lines growth, thus suggesting its possible concomitant therapeutic use for oral or head and neck cancer (27). *Hartwells'* survey indicate that *G. verum* has been traditionally used in Europe and Northern America for the treatment of cancerous ulcers or breast cancer (28). In support of that, there is a data that its ethanolic extract may inhibit the proliferation of human breast cancer cells and induce cell death by apoptosis. Furthermore diosmetin, a flavon, extracted from the traditional Chinese herb *G. verum* L was tested on cervical cell lines and it was shown that it inhibit the tumor growth and protect tumor-induced apoptosis of thymus (29). To our knowledge there are no studies which proved anticancer effects of *G. mollugo* species.

Effects on central nervous system

The aerial parts of *G. verum* were traditionally used as sedative (3, 30, 31) and that was confirmed by an ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Central Serbia (32). It's been proposed that chemical compounds such as iridioides (asperuloside) are responsible for sedative effects of *Galium* species (31). Upper herbaceous parts of *G. verum* have been renowned for beneficial effects on nervousness and phobias (3). Furthermore, both *G. verum* and *G. mollugo* species have been used in traditional medicine in the treatment of epilepsy and hysteria (14, 33, 34). There is an evidence that *G. mollugo* is used as a nerve relaxant (34). Hispidulin, which is proven benzodiazepine



receptor ligand, was recently discovered in some *Galium* species and may be responsible for the anticonvulsive effects of these plants (15, 35).

Effects on gastrointestinal, renal, hepatobiliary and urinary system

G. verum tea has diuretic effect and it may contribute to the cure of pyelitis or cystitis (14, 30, 33). It is effective in cases of bladder and kidney irritation, kidney stones and as anticolic as well (33, 36). *G. verum* may be used as spasmolytic, against diarrhea and in the treatment of some stomach complaints (3, 14, 17). In addition, upper herbaceous parts of *G. verum* exert effects on liver disorders and acts as cholagogues and cholagogue (3, 7). In China it has been used to treat hepatitis (37). There is little data about the pharmacological effects of *G. mollugo* on the function of these systems, but taking into consideration similar chemical composition, we may assume that this species exerts similar activity to *G. verum*.

Other pharmacological effects

It's been reported that both *G. verum* and *G. mollugo* may be useful in the treatment of skin disorders, exogenous treatment of psoriasis or wound healing (3, 27, 32). In addition *G. verum* is effective as diaphoretic and depurative, while *G. mollugo* as antiscorbutic (3, 30, 34). Among various therapeutic properties of these species, *G. verum* herba has beneficial effects on cardiovascular diseases, treatment of gout and rheumatic diseases in folk medicine (3, 17). *Galium verum* extract applied to the animals exposed to anakinetic stress led to a significant stimulation of secretory activity of thyroid and ovary, and to an increase in adrenal and glucocorticoid hormone synthesis (31, 38).

Antioxidant activity

There is an evidence that plants from *Galium* genus possess natural antioxidants. Extracts from aerial parts of *G. verum* express very strong scavenger activity in a dose dependant manner. That antioxidant activity was determined via the neutralization of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals, hydroxyl (OH[•]) radicals, hydrogen peroxide (H₂O₂) and inhibition of lipid peroxidation (3). These results are confirmed by several authors, thus qualifying *G. verum* as a promising natural source of antioxidants (15, 30, 39). Other researchers revealed that methanol extract had greater antioxidant activity than its water extract, while examining *G. verum* aqueous and methanolic extracts in the range 50-500 mg/L (39). Furthermore there was an investigation reporting that compounds found in methanol extract of *G. verum* exerted riboflavin-originated superoxide and xanthine-originated superoxide quenching activities (40). By comparing the antioxidant potential of different extracts, such as aqueous, 30%, 50% and 70% alcoholic, it was noticed that the highest potential

may be expected from 50% alcoholic *G. verum* extract (41). Methanolic extract of *G. verum* exerted great antioxidant potential in tested models which included DPPH and nitric oxide radical scavenging, reducing power and H₂O₂ scavenging (42).

Antioxidant activity of aqueous-ethanolic *G. mollugo* extracts was revealed as well. It's important to emphasize that the activity was changing dependently of the extraction technique applied, where extracts obtained by extraction with reflux showed the best antioxidant activity (17). There is a data referring to the antioxidant potential of *G. mollugo* tested and proven by ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) and trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assays (43). Another study which aimed to compare the antioxidant potential of four *Galium* species suggested that *G. verum* extract exhibited higher antioxidant capacity compared to *G. mollugo* extract (15). Phenolic compounds isolated from *G. mollugo* may protect human fibroblast cells against oxidative stress (44).

Antibacterial and antifungal activity

Galium species have been used in the folk medicine for the treatment of infectious diseases, however antimicrobial activity of these plants is poorly reported. It was shown that chloroform extract of *G. verum* express antibacterial activity in comparison to aqueous and alcohol (70%) extracts, which possess no activity. In addition, *Candida albicans* was generally insensitive to the extracts of this plant. Confirmed antimicrobial activity of *G. verum* predominantly refers to its efficiency against Gram-positive microorganisms and less efficiency in reference to Gram-negative strains (45). Other authors noticed that *G. verum* and *G. mollugo* extracts exhibited effects mainly against the Gram-positive bacteria (*S. aureus*, *L. monocytogenes*) and low activity against Gram-negative bacteria (*S. typhimurium*, *E. coli*). Ethanolic extracts of these two *G.* species showed a weak antifungal capacity against *C. albicans* (46). Furthermore neither chloroform nor methanolic extract of *G. verum* has inhibitory effect against both clinical and standard strains of *Candida* spp (47). It may be hypothesized that the lack of antifungal activity of these plants may be the consequence of the insufficient quantity of compounds responsible for that activity.

CONCLUSION

Numerous studies proved that *G. verum* and *G. mollugo* contain chemical compounds with high therapeutic potential, which may be pharmaceutically exploited. Despite the centuries of successful traditional use in the treatment of many diseases, the number of studies referring to the effects of *G. verum* and *G. mollugo* is limited. This review provides available evidence on these two plants and may help to those intending to research further on these topics. Further researches regarding the effects of *G. verum* and *G.*



mollugo are necessary to make them a possible candidate for medicinal product.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to express gratitude to the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for Grant No. JP 06/17.

REFERENCES

- Mitova MI, Anchev ME, Handjieva NV et al. Iridoid patterns in Galium L. and some phylogenetic considerations. *Z Naturforsch C*. 2002; 57:226-34.
- M. Gajić. Flora of Serbia. Belgrade: Serbian Academy of Sciences and Arts; 1973.
- Lakic N, Mimica-Dukic N, Isak J et al. Antioxidant properties of Galium verum L. (Rubiaceae) extracts. *Cent Eur J Biol*. 2010; 5:331-7.
- Mersereau D, DiTommaso A. The biology of Canadian weeds. 121. Galium mollugo L. *Can. J. Plant Sci.* 2002; 2:453-466.
- Bojthe-Horvath K, Hetenyi F, Kocsis A et al. Iridoid glycosides from Galium verum. *Phytochemistry*. 1980; 21-2917-2919.
- Bojthe-Horvath K, Kocsis A, Parkany L et al. A new iridoid glycoside from Galium verum L. First X-ray analysis of a tricyclic iridoid glycoside. *Tetrahedron Lett*. 1982; 23- 965-966.
- Demirezer LO, Gurbuz F, Guvenalp Z et al. Iridoids, flavonoids and monoterpene glycosides from Galium verum subsp. verum. *Turk J Chem*. 2006; 30- 525-534.
- Iavarone C, Sen A, Trogole C et al. Mollugoside, an iridoid glucoside from Galium mollugo. *Phytochemistry*. 1983; 22:175-178.
- Uesato S, Ueda M, Inouye H et al. Iridoids from Galium mollugo. *Phytochemistry*. 1984; 23:2535-2537.
- Zhao C, Shao J, Li X et al. Flavonoids from Galium verum L. *J Asian Nat Prod Res*. 2008; 10:613-617.
- Zhao C, Shao J, Cao D et al. Chemical constituents of Galium verum. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2009; 34:2761-2764.
- Matei AO, Gatea E, Radu GL. Analysis of Phenolic Compounds in Some Medicinal Herbs by LC-MS. *J Chromatogr Sci*. 2015; 53:1147-1154.
- Tamaş M, Stana D, Timiş S. Comparative phytochemical research of Galium verum L. and G. mollugo L. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj*. 2006; 34:18-20.
- Mocan A, Gianina C, Laurian V et al. Phytochemical investigations on four Galium species (Rubiaceae) from Romania. *Farmacia*. 2016; 64:95-99.
- Vlase L, Mocan A, Hanganu D. Comparative study of polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of four Galium species (Rubiaceae). *Dig J Nanomater Biostruct*. 2014; 9:1085-1094.
- Shafaghat A, Salimi F, Aslaniyan N et al. Flavonoids and an ester derivative isolated from Galium verum L. *World Appl Sci J*. 2010; 11:473-477.
- Milic PS, Stanojevic LP, Rajkovic KM. Antioxidant activity of Galium mollugo L. extracts obtained by different recovery techniques. *Hem Ind*. 2013; 67:89-94
- de Rosa S, Iodice C, Mitova M et al. Triterpene saponins and iridoid glucosides from Galium rivale. *Phytochemistry*. 2000; 54:751-756.
- Zhao CC, Shao JH, Li X et al. A new anthraquinone from Galium verum L. *Nat Prod Res*. 2006; 20:981-984.
- Heide L, Leistner E. Enzyme activities in extracts of anthraquinone-containing cells of Galium mollugo. *Phytochem*. 1983; 22:659-662.
- Banthorpe DV, White JJ. Novel anthraquinones from undifferentiated cell cultures of Galium verum. *Phytochemistry*. 1995; 38:107-111.
- Milic PS, Bekric DM, Milic SM et al. A study of the extraction kinetics of the minerals from the white lady's bedstraw (Galium mollugo L.) by using an artificial neural network. *Hem Ind*. 2011; 65:313-321.
- Milic PS, Rajkovic KM, Milicevic PM et al. Comparison, artificial neural network modeling and genetic algorithm optimization of the resinoid and potassium yields from white lady's bedstraw (Galium mollugo L.) by conventional, reflux and ultrasound-assisted aqueous-ethanolic extraction. *Chem. In. Chem. Eng. Q*. 2013; 19:141-152.
- Mirzam M, Navaei MN, Dini M. Essential oil of Galium verum L. from Iran. *Iran J Pharm Res*. 2004; 3: 88-88.
- Il'ina TV, Kovaleva AM, Goryachaya OV et al. Essential oil from Galium verum flowers. *Chem Nat Compd*. 2009; 45:587-588.
- Ramdani M, Lograda T, Chalard P et al. Chemical composition of essential oils of Galium tunetanum Poir et Galium mollugo L. in Algeria. *Int. J. Med. Arom. Plants*. 2013; 3:362-65
- Schmidt M, Scholz CJ, Gavril GL et al. Effect of Galium verum aqueous extract on growth, motility and gene expression in drug-sensitive and -resistant laryngeal carcinoma cell lines. *Int J Oncol*. 2014; 44:745-60.
- Hartwell JL. Plants used against cancer. A survey. *Lloydia*. 1971; 34:204-55.
- Zhao R, Chen Z, Jia G et al. Protective effects of diosmetin extracted from Galium verum L. on the thymus of U14-bearing mice. *Can J Physiol Pharmacol*. 2011; 89:665-73.
- Mitic VD, Stankov-Jovanovic VP, Ilic MD et al. The antioxidant, hemolytic and cholinesterase inhibition properties of Galium verum L. and Tragopogon pratensis subsp pratensis. *Bulg Chem Commun*. 2014; 46:269-276.
- Roman I, Toma VA, Farcas AD. Protective effects of Galium verum L. extract on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under anakinetic stress conditions, in rats. histological aspects. *Studia Universitatis Vasile Goldis Seria Stiintele Vietii (Life Sciences Series)*. 2015; 25:207-14



32. Jaric S, Popović Z, Macukanović-Jocic M et al. An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia). *J Ethnopharmacol.* 2007; 20:160-75.
33. Menkovic N, Savikin K, Tasic S et al. Ethnobotanical study on traditional uses of wild medicinal plants in Prokletije Mountains (Montenegro). *J Ethnopharmacol.* 2011; 133:97–107.
34. Popovic Z, Smiljanic M, Kostic M et al. Wild flora and its usage in traditional phytotherapy (Deliblato Sands, Serbia, South East Europe). *Indian J Tradit Know.* 2014; 13:9-35
35. Kavvadias D, Sand P, Youdim KA et al. The flavone hispidulin, a benzodiazepine receptor ligand with positive allosteric properties, traverses the blood-brain barrier and exhibits anticonvulsive effects. *Br. J. Pharmacol.* 2004; 142:811-20.
36. Al-Douri NA. A survey of medicinal plants and their traditional uses in Iraq. *Pharm Biol.* 2000; 38:74-9.
37. Bolivar P, Cruz-Paredes C, Hernandez LR et al. Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic activities of *Galium mexicanum*. *J Ethnopharmacol.* 2011; 137:141-7.
38. Roman I, Puica C. Effects of Anakinetic Stress and *Galium verum* Extract on the Thyroid and Ovary Morphology in Wistar Rats. *Bulletin UASVM.* 2013; 70:167-69.
39. Mavi A, Terzi Z, Ozgen U et al. Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum* subsp. *verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae). *Biol Pharm Bull.* 2004; 27:702-5.
40. Kim DK. Superoxide Quenching Activity of Phenolic Compounds from the Whole Plant of *Galium verum* var. *asiaticum*. *Nat Prod Sci.* 2011; 17:261-66.
41. Danila AO, Gatea F and Radu GL. Polyphenol composition and antioxidant activity of selected medicinal herbs. *Chem Nat Compd.* 2011; 47(1): 22-26.
42. Layali I, Ebrahimzadeh MA, Joulaei M. Antioxidant properties of *Galium verum*. *Int. J. Life Sci. Pharma Res.* 2016; 6:31-37.
43. Csepregi R, Bencsik T, Papp N. Examination of secondary metabolites and antioxidant capacity of *Anthyllis vulneraria*, *Fuchsia* sp., *Galium mollugo* and *Veronica beccabunga*. *Acta Biol Hung.* 2016; 67:442-446.
44. Chaher N, Krisa S, Delaunay JC et al. Unusual compounds from *Galium mollugo* and their inhibitory activities against ROS generation in human fibroblasts. *J Pharm Biomed Anal.* 2016; 117:79-84.
45. Vasilevna IT, Volodymyrivna GO, Leonidivna TE et al. Antimicrobial Activity of the Genus *Galium* L. *Pharmacogn. Commn.* 2016; 6:42-47.
46. Ergun F, Deliorman D, Veliog IA et al. Antimicrobial activities of *Galium* species. *J Fac Pharm Gazi.* 199; 16-7–11
47. Yigit D, Yigit N, Ozgen U. An investigation on the anticandidal activity of some traditional medicinal plants in Turkey. *Mycoses.* 2009; 52:135-40.

PHYTOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF ALLIUM URSINUM

Milos Krivokapic¹, Jovana Bradic², Anica Petkovic², Marina Popovic²

¹Agency of Medicines and Medical Devices of Montenegro, Podgorica, Montenegro

²University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacy, Kragujevac, Serbia

FITOHEMIJSKE I FARMAKOLOŠKE KARAKTERISTIKE *ALLIUM URSINUM* (SREMUŠA)

Miloš Krivokapic¹, Jovana Bradić², Anica Petković², Marina Popović²

¹Agencija za lijekove i medicinska sredstva Crne Gore, Podgorica, Crna Gora

²Univerzitet u Kragujevcu, Fakultet medicinskih nauka, Katedra za farmaciju, Kragujevac, Srbija

Received / Priljen: 19. 02. 2018.

Accepted / Prihvaćen: 19. 02. 2018.

ABSTRACT

Allium ursinum L. is a perennial herbaceous plant belonging to the Alliaceae family. Several classes of bioactive compounds have been isolated from *A. ursinum* so far, among them sulfur and phenolic compounds as quantitatively the most distributed constituents, responsible for pharmaceutical effects of the plant. Small amounts of steroidal glucosides, lecithins, fatty acids and several amino acids, as well as the essential oil are also present in *A. ursinum*. This plant species is characterized by a long history of use in traditional medicine in the prevention and treatment of cardiovascular disease, as digestive stimulant, antimicrobial agent, as a remedy in respiratory problems, insomnia and fainting. Despite its widespread use for medicinal purposes since the ancient time, studies referring to its pharmacological activity are still lacking. In this review, we summarized the current knowledge related to the phytochemical and pharmacological properties of *Allium ursinum*. This study may be a starting point for future researches in this field, which would fully clarify therapeutic potential of *A. ursinum* and make it a possible candidate for medicinal product.

Keywords: *Allium ursinum*, wild garlic, ramson, biological activity, chemical composition

SAŽETAK

Sremuš je višegodišnja zeljasta biljka koja pripada porodici Alliaceae. Do sada je iz sremuša izolovano nekoliko klasa biološki aktivnih jedinjenja, među kojima su fenolna i jedinjenja sumporna kvantitativno najzastupljenija i odgovorna za farmakološke efekte ove biljne vrste. Male količine steroidnih glikozida, lecitina, masnih kiselina i aminokiselina, kao i etarskog ulja su takođe prisutna u sremušu. Ova biljna vrsta se karakteriše dugom istorijom upotrebe u tradicionalnoj medicini u prevenciji i lečenju kardiovaskularnih bolesti, kao lek kod respiratornih tegoba, nesаницe i nesvestice. I pored njene široke primene u medicinske svrhe od davnih vremena, I dalje nedostaju istraživanja koja se odnose na njenu farmakološku aktivnost. U ovom preglednom radu sumirana su trenutna saznanja vezana za fitohemijske i farmakološke karakteristike sremuša. Ova studija može biti osnova za dalja istraživanja u ovoj oblasti, koja bi u potpunosti razjasnila terapijski potencijal sremuša i učinila ga mogućim kandidatom za medicinski proizvod.

Ključne reči: Sremuš, divlji luk, medveđi luk, biološka aktivnost, hemijski sastav



INTRODUCTION

Allium ursinum L. (synonyms: wild garlic, ramson or bear garlic) is a perennial plant species which grows in fens and river woods of Europe and Asia. However it isn't distributed in different areas in Russia, but it can occur in Mediterranean region (1, 2). The Latin species name "ursinum" has been derived from "ursus" (bear) since there is a belief that the first thing bears eat after awakening from winter hibernation to remove toxins is exactly this herb (3). *A. ursinum* L. has been used for centuries in traditional

medicine both as prophylactic and therapeutic agents. In the past two decades consumption of this plant species as a dietary supplement and food has gained attention of modern medicine due to its various health benefits (3, 4). Published papers referring to its chemical constituents and protective effects on health place his positive activity even above *Allium sativum* (garlic), the most famous plant from Alliaceae family (5). Numerous biologically active compounds are presented in this herb such as: sulphur



compounds, phenolics, steroidal glycosides etc., however sulphur compounds mostly contribute to its pharmacological activity (3, 6, 7). Despite the history of traditional applications of *Allium* species as both condiments and phytopharmaceuticals, researches based on its composition and pharmacological activity are still lacking. The aim of our study was to summarize the current knowledge referring to the chemical constituents and biological activity of *A. ursinum* and to highlight its therapeutic potential that has been recognized in traditional medicine from ancient times.

Description

There are two subspecies of *A. ursinum* which differs in pedicel morphology: *A. ursinum* ssp. *ursinum* and *A. ursinum* ssp. *Ucrainicum*. First one is distributed in western and middle Europe, while the second one is distributed in eastern and southern Europe (8-10). Both of them grow up to the height of 50 cm in deciduous woodlands with nutrient-rich and moist soils. It is characterized by elongated narrow bulbs (1.5-6 cm in size), dark green leaves with a distinct garlic-like scent (up to 50 cm long) and white flowers (11, 12). The whole herb is edible and curative. Active growth of *A. Ursinum* begins in late February and early March, when there is enough of light. Afterwards the leaves are collected on April and May, while the blooming period lasts from April until the first half of the May (3, 13). Restricting factors for their distribution are the presence of aluminum in high concentration in soil (14).

Chemical constituents

Previously conducted studies revealed the presence of sulfur and phenolic compounds, steroidal glycosides etc in *A. ursinum* (3, 6, 7).

Sulfur compounds

The most important chemical constituents present in *A. ursinum* that has been considered to mostly contribute to therapeutic benefits of the plant are sulfur compounds (6). Characteristic smell and taste of this plant derives from alliin and γ -glutamylcysteines, representatives of a special class of pharmacologically active organo-sulfuric compounds *S*-alk(en)yl-l-cysteine-sulfoxides. Plant disruption leads to a hydrolysis of those non-volatile secondary metabolites and formation of volatile alk(en)yl-thiosulfinates, such as alliin and lipid-soluble allyl sulfur compounds such as diallyl disulfide (DADS) and diallyl trisulfide (DATS) (15, 16). Alliin and methyl-allyl- or dimethyl thiosulfinates are the major thiosulfinates that can be detected after hydrolysis of cysteine sulfoxides. Nevertheless thiosulfinates are unstable and decomposes rapidly to (poly) sulfides, dithiins, ajoenes etc (11, 17).

The presence of methiin ((+)-*S*-methyl-l-cysteine-sulfoxide), alliin ((+)-*S*-2-propenyl-l-cysteine-sulfoxide),

isoalliin ((+)-*S*-(1-propenyl)-l-cysteine-sulfoxide), propiin ((+)-*S*-propyl-l-cysteine-sulfoxide) and ethiin (*S*-ethyl-cysteine-sulfoxide) has been proved in wild garlic. Since methiin and alliin has been found in the highest quantities *A. ursinum* is considered to belong to a methiin/alliin-type *Allium* species (3, 18).

Time of harvest affects the amount of cysteine-sulfoxides in this herb, thus suggesting that the highest concentration would be achieved if it was collected in March and April (12, 19). Sulfur-containing compounds, with the highest amount of allyl polysulfides, have also been identified in the essential oil of *A. ursinum* (12, 20-22).

Phenolic compounds

The presence of phenolic compounds, predominantly kaempferol derivatives, has also been proved in *A. ursinum*. Phytochemical investigation of ethanol extract of wild garlic leaves has led to the isolation of : kaempferol 3-O-beta-neohesperidoside-7-O-[2-O-(trans-p-coumaroyl)]-beta-D-glucopyranoside, kaempferol 3-O-beta-neohesperidoside-7-O-[2-O-(trans-feruloyl)]-beta-D glucopyranoside, kaempferol 3-O-beta-neohesperidoside-7-O-[2-O-(trans-p-coumaroyl)-3-O-beta-D-glucopyranosyl]-beta-D-glucopyranoside, kaempferol 3-O-beta-glucopyranoside and kaempferol 3-O-beta-neohesperidoside (23). Furthermore, extract prepared from dry leaves of *A. ursinum* (fresh leaves were freeze dried) contained 3-O-beta-D-glucopyranoside, 3-O-beta-D-glucopyranosyl-7-O-beta-D-glucopyranoside, 3-O-alpha-l-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-[3-acetyl]-beta-D-glucopyranoside and 3-O-alpha-l-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-[6-acetyl]-beta-D-glucopyranoside in addition to several of the previously mentioned compounds (24). Another study has reported that fresh flowers of wild garlic contain the following constituents: thymidine, adenosine, astragalin (kaempferol-3-O-beta-D-glucopyranoside, kaempferol-3-O-beta-D-glucopyranosyl-7-O-beta-D-glucopyranoside, kaempferol-3-O-beta-D-neohesperoside and kaempferol-3-O-beta-D-neohesperoside-7-O-beta-D-glucopyranoside (21).

It has been confirmed that the yield of phenolic compounds depends on extraction method, extraction solvent and part of the plant used for extraction. A previously conducted research indicate that total polyphenol content in the leaf extract was higher when the extract was prepared by maceration with 70 % ethanol in comparison with the ultrasound-assisted extraction (25). Qualitative differences in the phenolic fractions between acidified methanol extracts of green and yellow leaves, stalks, and seeds of wild garlic exist, suggesting that the content of the kaempferol derivatives and compounds acylated with p-coumaric acid were the highest in yellow leaves followed by green leaves. Generally viewed, seeds contained the minimal amount of phenolic compounds, however more non-acetylated in comparison to acetylated flavonoid glycosides with p-coumaric acid compounds were found in stalks and seeds compared to leaves (26). Additionally other group of authors has revealed that total free phenolics content in bulbs



was lower than in leaves, however the amount of bound phenolics were similar (27). The highest content of gallic acid was found in 96% methanol extract of *A. ursinum*, followed by 80% methanol extract, while the lowest was noticed in 96 % ethanol extract (28). Furthermore the ecotypes of *A. ursinum* differ in chemical composition (29). The possible discrepancy in the amount of phenolics found by different authors may be the consequence of different methods used for quantification.

Steroidal glycosides

Phytochemical researches have reported the common presence of steroidal glycosides in *A. ursinum*. Diosgenin 3-*O*- α -l-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -l-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -l-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -d-glucopyranoside and (25*R*)-spirost-5,25(27)-dien-3 β -ol 3-*O*- α -l-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -l-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -l-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -d-glucopyranoside has been isolated from the bulbs of wild garlic. Furthermore, a pregnane glycoside such as 3-hydroxy-pregna-5,16-dien-20-on 3-*O*- α -l-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -l-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -l-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -d-glucopyranoside were found in the underground parts of wild garlic (30).

Other compounds

The major *predominant* biologically active substances in *A. ursinum* responsible for the effects of *A. ursinum* on maintaining good health are undoubtedly sulfur and phenolic compounds. However there are other chemical constituents presented in this herb: lectins, polysaccharides, fatty acids (palmitic, linoleic, oleic, palmitoleic, stearic, α -linolenic, and myristic acid), many amino acids (asparagine, glutamine, aspartic acid, glutamic acid, arginine, alanine, glycine, threonine), pigments etc (3, 31, 32).

A. ursinum usage

There is an evidence that *A. ursinum* has been extensively used worldwide in the treatment of many disease and conditions even since the Mesolithic period (33). All parts of the plant are edible either raw or cooked and becoming increasingly popular in local cuisines of Europe. Leaves may be used as a salad, spice, boiled as a vegetable. Therapeutic potential of *A. ursinum* is attributed to leaves, herb and bulbs, which are at the same time the most commonly used in traditional medicine (3, 26).

Pharmacological effects of *A. ursinum*

The main application of wild garlic is in the prevention and treatment of cardiovascular diseases and as antimicrobial agent.

Effects of *A. ursinum* on cardiovascular diseases

A. ursinum and its preparations play one of the most important role in prevention and treatment of cardiovascular diseases. The relevant literature showed that consumption of ramson significantly decreased blood pressure, serum cholesterol and triglyceride. Furthermore, this wild plant inhibits platelet aggregation due to the presence of flavonoids and prevents progression of atherosclerosis. Experimental as well as clinical studies demonstrated these favorable cardiovascular effects when various preparation of *A. ursinum* was used (2, 3, 27).

Groundbreaking in vitro investigation conducted in 1992 brought novel information about potential effect of wild garlic aqueous extract on blood pressure. This group of authors showed that leaf water extract administered in concentration of 0.3 mg/kg inhibited angiotensin 1-converting enzyme (ACE) almost two times higher than garlic leaf extract. Assumption for ACE inhibition may be due to gamma-glutamyl peptides which are presented in wild garlic two times more than in cultivated garlic (34). One year later Rietz and co-workers examined plasma ACE activity and size of ischemic zone and ischemia/reperfusion induced arrhythmias. In wild garlic group ACE activity was significantly reduced in comparison to control group. In this study rats were on standard diet with 2 % of pulverized *A. ursinum* leaves for 8 weeks (35). Hypertensive effect of *A. ursinum* was noticed in experiments conducted on Spontaneously Hypertensive Rats. In this investigation rats were divided into following groups: control group fed with standard diet, group fed with diet containing 1% w/w wild garlic and group fed with diet containing 1% w/w garlic for 45 days when SBP were measured. Reduction of final mean systolic blood pressure (SBP) in wild garlic group was 173 ± 0.7 mmHg in comparison to control group 189 ± 1.2 mmHg. Despite the fact that wild garlic was used in lower concentration 0,1% w/w, SBP was significantly lower compared to rats which consumed garlic in the same concentration (5). It has been suggested that hypotensive effect of wild garlic may be due to activation of nitric oxide system and decreased activation of RAS (36).

It has been reported that *A. ursinum* essential oil increased fluidity of deep layers of the artificial liposome membrane. Also they claimed that ramson essential oil may be involved in the regulation of membrane functions in hypertension, as well as an antioxidant (37). In addition one group of researchers conducted investigation on monocrotaline (MCT) induced pulmonary arterial hypertension rat model by comparing 2% wild garlic liophylisate-supplementation to 25 mg/kg sildenafil orally administered for 8 weeks. Findings from this study suggest beneficial effect of wild garlic demonstrated by echocardiographic and isolated heart functions, or histological analyses (38).

As mentioned above, allicin (allyl 2-propenethiosulfinate or diallyl thiosulfinate) belongs to tiosulfonates, main compounds of *A. ursinum* produced by influence of allinase on allin. Some researchers described hypotensive ef-



fect of allicin in Spontaneously Hypertensive Rats as well as in CKD chronic kidney disease rat model. Allicin has been proven to abolish oxidative stress by preventing the generation of free radicals and exert cardioprotective effects likely through downregulation of angiotensin II receptor type 1 (AT1R) and Keap1 expression (39).

Antimicrobial activity

Numerous number of studies support the fact that *A. ursinum* may be used both internally and externally as an antimicrobial agent. Extracts prepared from fresh flowers and leaves exert antifungal and antibacterial activity, predominantly oriented on Gram (+) and less on Gram (-) bacteria (40, 41). Antimicrobial potential of this plant is attributed to sulfide compounds, especially allicin with proven antifungal effect (42).

Flowers and leaves of *A. ursinum* possess different antifungal potential, thus suggesting that flower extract is more *efficient* antifungal agent (41). Additionally, antibacterial, antifungal and antiparasitic activity of bulb juice and water extract from bulbs of *A. ursinum* has also been revealed (3, 43, 44).

Antibacterial and antifungal activity of the plant extract depends on the extraction solvent, thus suggesting that higher effect is expected from methanol compared to water extract. Methanol extract has been shown to exhibit antimicrobial activity against both Gram (+) and Gram (-) bacteria including: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteritidis* and fungi such as: *Cladosporium* sp., *Aspergillus niger*, *Rhizopus nigricans*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium expansum*, *Candida lipolytica*, *Mycoderma*, *Saccharomyces fibuligera*. On the other hand water extract was efficient only against *B. Subtilis*. (3).

Other pharmacological effects

A. ursinum is efficient in treatment of respiratory tract problems (cold, fever, bronchitis), as digestive stimulant, vulnerary antidiarrheal, antiphlogistic, antimicrobial agent (3, 45). Furthermore, its effect in removal of toxic substances from the organism has been also recognized since the ancient time (24) Researches suggested that *A. ursinum* may inhibit the activity of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase (46). The chloroform extract from flower stems showed the most promising cytotoxic effect against murine cancer cell lines melanoma B16 and sarcoma XC (Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability) (47).

This plant possess antioxidant activity due to the presence of phenolic compounds and high antioxidant enzymes activities, including catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase. In that sense, consumption of *A. ursinum* protects cell proteins and membranes against oxidation and consequential damage (2, 32, 45, 48).

CONCLUSION

The results of the mentioned studies clearly demonstrate that wild garlic exert myriad beneficial effects mainly attributed to sulfur compounds, thus absolutely justifying its widespread traditional use. However further studies in this field are necessary in order to fully clarify its therapeutic potential and make it become a source for pharmaceutical exploitation.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to express gratitude to the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for Grant No. JP 06/17.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare there is no actual conflict of interest.

REFERENCES

1. Oborny B, Botta-Dukát Z, Rudolf et al. (2011). [Population ecology of Allium ursinum, a space-monopolizing clonal plant](#). Acta Botanica Hungarica, 53, 371-388.
2. Pavlović DR, Veljković M, Stojanović NM et al. (2017). Influence of different wild-garlic (*Allium ursinum*) extracts on the gastrointestinal system: spasmolytic, antimicrobial and antioxidant properties. J Pharm Pharmacol, 69, 1208-1218.
3. Sobolewska D, Podolak I, Makowska-Wąs J. (2015). [Allium ursinum: botanical, phytochemical and pharmacological overview](#). Phytochem Rev, 14, 81-97.
4. Leporatti ML, Ivancheva S. (2003). Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. J Ethnopharmacol. 87, 123-42.
5. Preuss HG, Clouatre D, Mohamadi A et al. (2001). [Wild garlic has a greater effect than regular garlic on blood pressure and blood chemistries of rats](#). Int Urol Nephrol. 32, 525-30.
6. Carotenuto A, De Feo V, Fattorusso E et al. (1996). [The flavonoids of Allium ursinum](#). Phytochemistry. 41, 531-6.
7. Xu XY, Song GQ, Yu YQ et al. (2013). Apoptosis and G2/M arrest induced by *Allium ursinum* (ramson) water extract in an AGS gastric cancer cell line. Onco Targets Ther. 6, 779-83.
8. Karpaviciene B. (2006). Distribution of *Allium ursinum* L. in Lithuania. Acta Biol Univ Daugavp. 6, 117-122.
9. Rola K. (2012). Taxonomy and distribution of *Allium ursinum* (Liliaceae) in Poland and adjacent countries. Biologia. 67, 1080-1087.



10. Oborny B, Botta-Dukat Z, Rudolf K et al. (2011). Population ecology of *Allium ursinum*, a space-monopolizing clonal plant. *Acta Bot Hung.* 53, 371–388.
11. Sendl A. (1995). *Allium sativum* and *Allium ursinum*: Part 1 Chemistry, analysis, history, botany. *Phytomedicine.* 1, 323–39.
12. Schmitt B, Schulz H, Storsberg J. (2005). Chemical characterization of *Allium ursinum* L. depending on harvesting time. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7288–7294
13. Jandl R, Kopeszki H, Glatzel G. (1997). Effect of dense *Allium ursinum* (L.) ground cover on nutrient dynamics and mesofauna of a *Fagus sylvatica* (L.) woodland. *Plant Soil.* 189, 245–255.
14. Andersson ME. (1993). Aluminium toxicity as a factor limiting the distribution of *Allium ursinum* L. *Ann Bot.* 72, 607–611.
15. Boscher J, Auger J, Mandon N, et al. (1995). Qualitative and quantitative comparison of volatile sulphides and flavour precursors in different organs of some wild and cultivated garlics. *Biochem Syst Ecol.* 23, 787–791.
16. Yoo KS, Pike LM. (1998). Determination of flavor precursor compound S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides by an HPLC method and their distribution in *Allium* species. *Sci Hortic.* 75, 1–10.
17. Bagiu RV, Vlaicu B, Butnariu M. (2012). Chemical composition and in vitro antifungal activity screening of the *Allium ursinum* L. (Liliaceae). *Int J Mol Sci.* 13, 1426–36.
18. Kubec R, Svobodová M, Velíšek J. (2000). Distribution of S-Alk(en)ylcysteine sulfoxides in some *Allium* species. Identification Of a new flavor precursor: S-ethylcysteine sulfoxide (Ethiin). *J Agric Food Chem.* 48, 428–33.
19. Fritsch RM, Keusgen M. (2006). Occurrence and taxonomic significance of cysteine sulphoxides in the genus *Allium* L. (Alliaceae). *Phytochemistry.* 67, 1127–35.
20. Copra-Janicijevic A, Muradic S, Huseinovic S et al. (2008). Isolation of essential oils of *Allium ursinum* L. from Bosnia. *Planta Med.* 74, PI42.
21. Ivanova A, Mikhova B, Najdenski H et al. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of wild garlic *Allium ursinum* of Bulgarian origin. *Nat Prod Commun.* 4, 1059–62.
22. Błażewicz-Woźniak M, Michowska A. (2011). The growth, flowering and chemical composition of leaves of three ecotypes of *Allium ursinum* L. *Acta Agrobot.* 64, 171–180.
23. Carotenuto A, De Feo V, Fattorusso E et al. (1996). The flavonoids of *Allium ursinum*. *Phytochemistry.* 41, 531–6.
24. Wu H, Dushenkov S, Ho CT et al. (2009). Novel acetylated flavonoid glycosides from the leaves of *Allium ursinum*. *Food Chem.* 115, 592–595.
25. Gîtin L, Dinică R, Parnavel R. (2012). The influence of extraction method on the apparent content of bioactive compounds in Romanian *Allium* spp. leaves. *Not Bot Horti Agrobot Cluj Napoca.* 40(1), 93–97.
26. Oszmiański J, Kolniak-Ostek J, Wojdyła A. (2013). Characterization and content of flavonol derivatives of *Allium ursinum* L. plant. *J Agric Food Chem.* 61, 176–84.
27. Djurdjevic L, Dinic A, Pavlovic P et al. (2004). Allelopathic potential of *Allium ursinum* L. *Biochem Syst Ecol.* 32, 533–544.
28. Condrat D, Mosoarca C, Zamfir AD et al. (2010). Qualitative and quantitative analysis of gallic acid in *Alchemilla vulgaris*, *Allium ursinum*, *Acorus calamus* and *Solidago virga-aurea* by chip-electrospray ionization mass spectrometry and high performance liquid chromatography. *Cent Eur J Chem.* 8, 530–535.
29. Błażewicz-Woźniak M, Michowska A. (2011). The growth, flowering and chemical composition of leaves of three ecotypes of *Allium ursinum* L. *Acta Agrobot.* 64, 171–180.
30. Sobolewska D, Janeczko Z, Kisiel W et al. (2006). Steroidal glycosides from the underground parts of *Allium ursinum* L. and their cytostatic and antimicrobial activity. *Acta Pol Pharm Drug Res.* 63, 219–223.
31. Smeets K, Van Damme EJ, Van Leuven F et al. (1997). Isolation, characterization and molecular cloning of a leaf-specific lectin from ramsons (*Allium ursinum* L.). *Plant Mol Biol.* 35, 531–535.
32. Štajner D, Szölloši Varga I. (2003). An evaluation of the antioxidant abilities of *Allium* species. *Acta Biol Szeged.* 47, 103–106.
33. Kubiak-Martens L. (2002). New evidence for the use of root foods in pre-agrarian subsistence recovered from the late Mesolithic site at Halskov, Denmark. *Veg Hist Archaeobot.* 11, 23–31.
34. Clouatre D. (1995). *European Wild Garlic. The Better Garlic.* San Francisco CA: Pax Publishing. pp. 1–38.
35. Rietz B, Isensee H, Strobach H et al. (1993). Cardioprotective actions of wild garlic (*Allium ursinum*) in ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem.* 119, 143–50.
36. Mohamadi A, Jarrell ST, Shi SJ et al. (2000). Effects of wild versus cultivated garlic on blood pressure and other parameters in hypertensive rats. *Heart Dis.* 2, 3–9.
37. Godevac D, Vujsic L, Mojovic M et al. (2008). Evaluation of antioxidant capacity of *Allium ursinum* L. volatile oil and its effect on membrane fluidity. *Food Chem.* 107, 1692–1700.
38. Bombicz M, Priksz D, Varga B et al. (2017). A Novel Therapeutic Approach in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension: *Allium ursinum* Liophylisate Alleviates Symptoms Comparably to Sildenafil. *Int J Mol Sci.* 18(7), pii: E1436.
39. García-Trejo EM, Arellano-Buendía AS, Argüello-García R et al. (2016). Effects of Allicin on Hypertension and Cardiac Function in Chronic Kidney Disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2016:3850402.
40. Mihaylova DS, Lante A, Tinello F, Krastanov AI. (2014). Study on the antioxidant and antimicrobial activities of *Allium ursinum* L. pressurised-liquid extract. *Nat Prod Res.* 28(22), 2000–5.
41. Parvu M, Parvu AE, Vlase L et al. (2011). Antifungal properties of *Allium ursinum* L. ethanol extract. *J Med Plants Res.* 5, 2041–2046.



42. Ankri S, Mirelman D. (1999). Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect.* 1, 125-9.
43. Tynecka Z, Szcześniak Z, Głowniak K. (1993). [The effect of various environmental conditions on the antimicrobial activity of Allium ursinum.](#) *Planta Med.* 59(7 SUPPL), A701.
44. Chudzik B, Malm A, Rajtar B et al. (2010). The fresh extracts of Allium species as potential in vitro agents against planktonic and adherent cells of *Candida* spp. *Ann Univ Mariae Curie-Skłodowska, DDD Pharm.* 23, 73–78
45. Pejatović T, Samardžić D, Krivokapić S. (2017). Antioxidative properties of a traditional tincture and several leaf extracts of *Allium ursinum* L. (collected in Montenegro and Bosnia and Herzegovina). *JMES.* 8, 1929-34
46. Sendl A, Elbl G, Steinke B et al. (1992). Comparative pharmacological investigations of *Allium ursinum* and *Allium sativum*. *Planta Med.* 58, 1-7.
47. Sobolewska D, Galanty A, Michalik M. (2012). Preliminary evaluation of cytotoxic activity of *Allium ursinum* extracts. *Czas Aptek.* 12, 41–44.
48. Stajner D, Popović BM, Canadanović-Brunet J et al. (2008). Antioxidant and scavenger activities of *Allium ursinum*. *Fitoterapia.* 79, 303-5.

EFFECTS OF ISCHEMIC AND PROTON PUMP INHIBITORS PRECONDITIONING ON OXIDATIVE STRESS OF ISOLATED RAT HEART

Nevena Jeremić¹, Vladimir Živković², Ivan Srejšević², Jovana Jeremić³, Anica Petković³, Jovana Bradic³, Vladimir Jakovljević^{2,4}

¹Department of Pharmaceutical chemistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

²Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

³Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

⁴Department of Human Pathology, 1st Moscow State Medical University IM Sechenov, Moscow, Russia

EFEKTI ISHEMIJSKOG I PREKONDICIONIRANJA INHIBITORIMA PROTONSKE PUMPE NA OKSIDACIONI STRES IZOLOVANOG SRCA PACOVA

Nevena Jeremić¹, Vladimir Živković², Ivan Srejšević², Jovana Jeremić³, Anica Petković³, Jovana Bradic³, Vladimir Jakovljević^{2,4}

¹Katedra za farmaceutsku hemiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

²Katedra za fiziologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

³Katedra za farmaciju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

⁴Odsek za humanu patologiju, Prvi Moskovski državni medicinski univerzitet I.M. Sechenov, Moskva, Rusija

Received / Priljen: 11. 03. 2017.

Accepted / Prihvaćen: 14. 03. 2017.

ABSTRACT

Aim of present study was to determine the participation of various biomarkers of oxidative damage: nitrite (NO₂), superoxide anion radicals (O₂⁻), index of lipid peroxidation (TBARS) and hydrogen peroxide (H₂O₂) in coronary circulation after application of the different models of preconditioning such as ischemic and preconditioning with proton pump inhibitors.

Examining a biochemical markers of oxidative damage we did not notice any increased production values of any parameter, according to that we can hypothesize that possible occurrence of reperfusion injury after ischemia and PPIs preconditioning is not mediated by this mechanism.

Due to the very difficult and controversial application of ischemic preconditioning in clinical practice, the results of this study suggest that in the future proton pump inhibitors can contribute to the prevention of myocardial damage following ischemia

Keywords: *ischemic preconditioning, myocardial infarction, proton pump inhibitors, oxidative stress*

INTRODUCTION

There is no doubt that myocardial ischemia (MI) is one of the major causes of morbidity and mortality worldwide. Various medical and surgical strategies have been developed over the years in order to minimize the deep and devastating effects on metabolism and myocardial contractility as well as the sustainability of myocytes due to acute myocardial infarction (AMI). Approaches vary, but usually include the use of thrombolytic agents, antagonist β-adrenergic receptor, inhibitors of angiotensin converting enzyme (ACE), the use of antioxidants, the use of transluminal coronary angioplasty, coronary artery bypass grafting. One of the few interventions that are universally

SAŽETAK

Cilj ove studije bio je ispitati učesće različitih biomarkera oksidacionog oštećenja : nitrita (NO₂), superoksid anjon radikala (O₂⁻), lipidnih peroksida (TBARS) i vodonik peroksida (H₂O₂) pri primeni različitih vrsta prekondicioniranja kao sto su prekondicioniranje ishemijskom i prekondicioniranje lekovima iz grupe inhibitora protonske pumpe.

S obzirom da ispitujući biohemijske markere oksidacionog oštećenja nismo uočili da je došlo do pojačane produkcije vrednosti bilo kog parametra, možemo pretpostaviti da eventualni nastanak reperfuzione povrede nakon prekondicioniranja ishemijskom i lekovima iz grupe inhibitora protonske pumpe nije posredovan ovim mehanizmom.

Zbog veoma teške i kontroverzne primene ishemijskog prekondicioniranja u kliničkoj praksi, rezultati ove studije sugerišu da u budućnosti lekovi iz grupe inhibitora protonske pumpe mogu imati svoj doprinos u prevenciji oštećenja miokarda nakon ishemijske.

Ključne reči: *ishemijsko prekondicioniranje, infarkt miokarda, inhibitori protonske pumpe, oksidacioni stres*



accepted and still causes a great deal of attention by the scientific world is certainly a phenomenon of heart ischemia preconditioning (1).

Over time, a growing number of studies observed different models and effects of preconditioning (2, 3). Preconditioning stimulus itself leads to the start of the whole cascade of endogenous adaptive mechanisms that ultimately result in the development of tolerance. It was also shown that preconditioning is powerful mechanism that protects the myocardium from ischemic damage, to reduce the occurrence of arrhythmia, and that has a role in maintaining contractility of the cardiac muscle (4).



The mechanism of the formation of reactive oxygen species (reactive oxygen species - ROS) is very important in the process of reperfusion injury and experimental studies have shown that reperfusion after ischemia generates oxidative stress, which can then be intermediary for myocardial infarction. The oxygen that reaches infarction who had previously suffered ischemia, leads to the formation of free radicals, primarily superoxide, hydroxyl radicals, peroxynitrite, which just in the first few minutes of establishing blood flow leads to the development of reperfusion injury. ROS can occur as a result of the activation, and neutrophil accumulation during reperfusion resulting in the release of platelet activating factor derived from the endothelium, which attract neutrophils and enhance the production of ROS as well as the degree of reperfusion injury. During reperfusion, oxidative stress has also reduces the bioavailability of intracellular signaling molecules such as nitric oxide, thereby negating its cardio protection (5, 6).

Since the goal of any kind of preconditioning is to reduce infarct size, the available literature data that can be found today used a wide variety of pharmacological agents, among them also proton pump inhibitors (PPI).

Gomes and his associates in its two research looked at the role of omeprazole and pantoprazole as possible preconditioning agents. In a study with omeprazole is observed that the drug significantly contribute to a recovery in isolated rat heart after injury caused by myocardial ischemia and reperfusion. Similar conclusions are performed from a survey conducted with pantoprazole on isolated rat heart and same findings we have from our previous work (7-9).

According to all previous our aim was to determine the participation of various biomarkers of oxidative damage: nitrite (NO_2^-), superoxide anion radicals (O_2^-), index of lipid peroxidation (TBARS) and hydrogen peroxide (H_2O_2) in coronary circulation after application of the different models of preconditioning such as ischemic and preconditioning with proton pump inhibitors.

MATERIAL AND METHODS

Preparation of isolated rat hearts

The hearts of male Wistar albino rats ($n=36$, 12 in each experimental group, body mass 180–200 g) were excised and perfused on a Langendorff apparatus (Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary). After a short-term ketamine/xylasin narcosis, animals were killed by cervical dislocation (Schedule 1 of the Animals/ Scientific Procedures, Act 1986, UK), and premedicated with heparin as an anti-coagulant. After emergency thoracotomy and rapid cardiac arrest by superfusion with ice-cold isotonic saline, rapidly excised, the aortas were cannulated and retrogradely perfused under a constant perfusion pressure (CPP). The composition of the non-recirculating Krebs-Henseleit perfusate was as follows (mM): NaCl 118, KCl 4.7, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.7, NaHCO_3 25, KH_2PO_4 1.2,

glucose 11, pyruvate 2, equilibrated with 95 % O_2 plus 5% CO_2 and warmed to 37°C (pH 7.4). Immediately after the restoration of normal heart rhythm, through the created entrance to the left atrium of the heart and damaged mitral valve, the sensor (transducer BS473-0184, Experimetria Ltd, Budapest, Hungary) was inserted into the left ventricle for continuous monitoring of cardiac function.

Physiological assay and experimental protocol

All study groups underwent 30 min perfusion at CPP of 70 cm H_2O . In control group (CG) after stabilization period, hearts were subjected to global ischemia (perfusion was totally stopped) for 20 minutes and 30 minutes of reperfusion (Protocol 1). Hearts of group II (IPC) were submitted to ischemic preconditioning lasting 2 minutes of ischemia and 4 minutes of reperfusion before global ischemia of 20 minutes and 30 minutes of reperfusion (Protocol 2). Third, fourth and fifth groups were groups with pharmacological preconditioning (proton pump inhibitors). All of these groups first underwent preconditioning lasting 5 minutes with 100 μM of drug (omeprazole, pantoprazole and lansoprazole) then submitted 20 minutes of ischemia and 30 minutes of reperfusion (Protocol 3).

In control group, coronary venous effluent was collected in point of stabilization (S), in first point of reperfusion (R1) and on every 5 minutes in period of reperfusion (R1-R7). In group with ischemic preconditioning coronary venous effluent was collected in point of stabilization (S), in each point on every minute of 4 minute reperfusion period (RP1-RP4) and from first to the last point of 30 minutes reperfusion period on every 5 minutes (R1-R7). In groups of pharmacological preconditioning coronary venous effluent was collected in point of stabilization (S) and from first to the last point of 30 minutes reperfusion period on every 5 minutes (R1-R7).

Drugs

All drugs were purchased from Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Germany.

Biochemical Assays

In the collected samples of coronary venous effluent, following markers of oxidative stress were measured spectrophotometrically: (1) index of lipid peroxidation (measured as TBARS—thiobarbituric acid reactive substances); (2) nitrites (NO_2^-); (3) hydrogen peroxide (H_2O_2); (4) superoxide anion radical (O_2^-).

Index of lipid peroxidation

The degree of lipid peroxidation in the coronary venous effluent was estimated by measuring TBARS using 1 % thiobarbituric acid (TBA) in 0.05 NaOH incubated with the coronary effluent at 100 °C for 15 min and read at 530 nm. Krebs–Henseleit solution was used as a blank probe (10).



Nitrite determination

NO rapidly decomposes to form stable metabolite nitrite/nitrate products. The nitrite (NO_2^-) level was measured as an index of NO production using the Griess reagent. A total of 0.5 ml of perfusate was precipitated with 200 μl of 30 % sulphosalicylic acid, vortexed for 30 min, and centrifuged at 3000 \times g. Equal volumes of the supernatant and Griess reagent, containing 1 % sulphanilamide in 5 % phosphoric acid/0.1 % naphthalene ethylenediamine dihydrochloride, were added, incubated for 10 min in the dark, and read at 543 nm. The nitrite levels were calculated using sodium nitrite as the standard (11).

Determination of superoxide anion radical

The level of the superoxide anion radical (O_2^-) was measured by nitro blue tetrazolium (NBT) reaction in Tris buffer with coronary venous effluent and read at 530 nm. Krebs–Henseleit solution was used as a blank probe (12).

Determination of hydrogen peroxide

The measurement of H_2O_2 is based on the oxidation of phenol red by H_2O_2 in a reaction catalyzed by horseradish peroxidase (HRPO) (13). A volume of 200 μl of perfusate was precipitated with 800 μl of fresh phenol red solution (PRS), along with 10 μl of 1:20 HRPO (made ex tempore). An adequate volume of Krebs–Henseleit solution was used for a blank probe (instead of coronary venous effluent). The level of H_2O_2 was measured at 610 nm.

Statistical analysis

For statistical analysis we examined three measured points, first point was stabilization (S), second was the first and the last point of 30 minutes reperfusion period (R1 and R7). Values are expressed as mean \pm SE. Statistical analysis

was performed by ANOVA test. P values lower than 0.05 were considered to be significant.

Ethical Approval

The experimental protocol was approved by the Faculty of Medical Sciences Ethics Committee for the welfare of experimental animals, University of Kragujevac, number 01-12149 and by Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management, Authority for Veterinary of Serbia number 323-07-09426/2013-05.

RESULTS

Effects of ischemic and PPI preconditioning on index of lipid peroxidation

Control group and group with pantoprazole led to statistically significant difference between first and last point of reperfusion. Although in all other groups we noticed decreased levels of TBARS in reperfusion period that results were not statistically significant. Except in group where we applied lansoprazole, there were no difference between values in point of stabilization compared to last point of reperfusion (Table 1 and Figure 1).

Effects of ischemic and PPI preconditioning on nitrites

In all experimental groups we found decreased levels of nitrites in reperfusion period. However in control and group with lansoprazole there were no difference among values in first and last point of reperfusion. When we compared values in S point with values in R7 point we notice that there were no statistical difference between these points in control group and in groups with ischemic and lansoprazole preconditioning (Table 2, Figure 2).

Table 1. Statistical significance and results for all observed groups

Index of lipid peroxidation (TBARS)					
Points of interest/ Groups	Control	IP	OP	LP	PP
S vs R1	$P < 0.05^*$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$
S vs R7	$P < 0.05^*$	$P > 0.05$	$P < 0.05^*$	$P < 0.01^{**}$	$P > 0.05$
R1 vs R7	$P < 0.01^{**}$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P < 0.05^*$
Decrease (-) or increase (+) values R7 vs R1 (%)	-43,92	-37,26	-58,98	-23,28	-27,83
Decrease (-) or increase (+) values R7 vs S (%)	-25,16	-15,80	-55,66	-25,17	-19,81

Table 2. Statistical significance and results for all observed groups

Nitrites (NO_2^-)					
Points of interest/ Groups	Control	IP	OP	LP	PP
S vs R1	$P > 0.05$	$P < 0.01^{**}$	$P > 0.05$	$P < 0.05^*$	$P < 0.01^{**}$
S vs R7	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P < 0.01^{**}$	$P < 0.05^*$	$P < 0.05^*$
R1 vs R7	$P > 0.05$	$P < 0.01^{**}$	$P < 0.01^{**}$	$P > 0.05$	$P < 0.01^{**}$
Decrease (-) or increase (+) values R7 vs R1 (%)	-39,79	-33,69	-46,97	-29,86	-28,83
Decrease (-) or increase (+) values R7 vs S (%)	-33,18	-4,99	-34,16	-15,97	-14,79

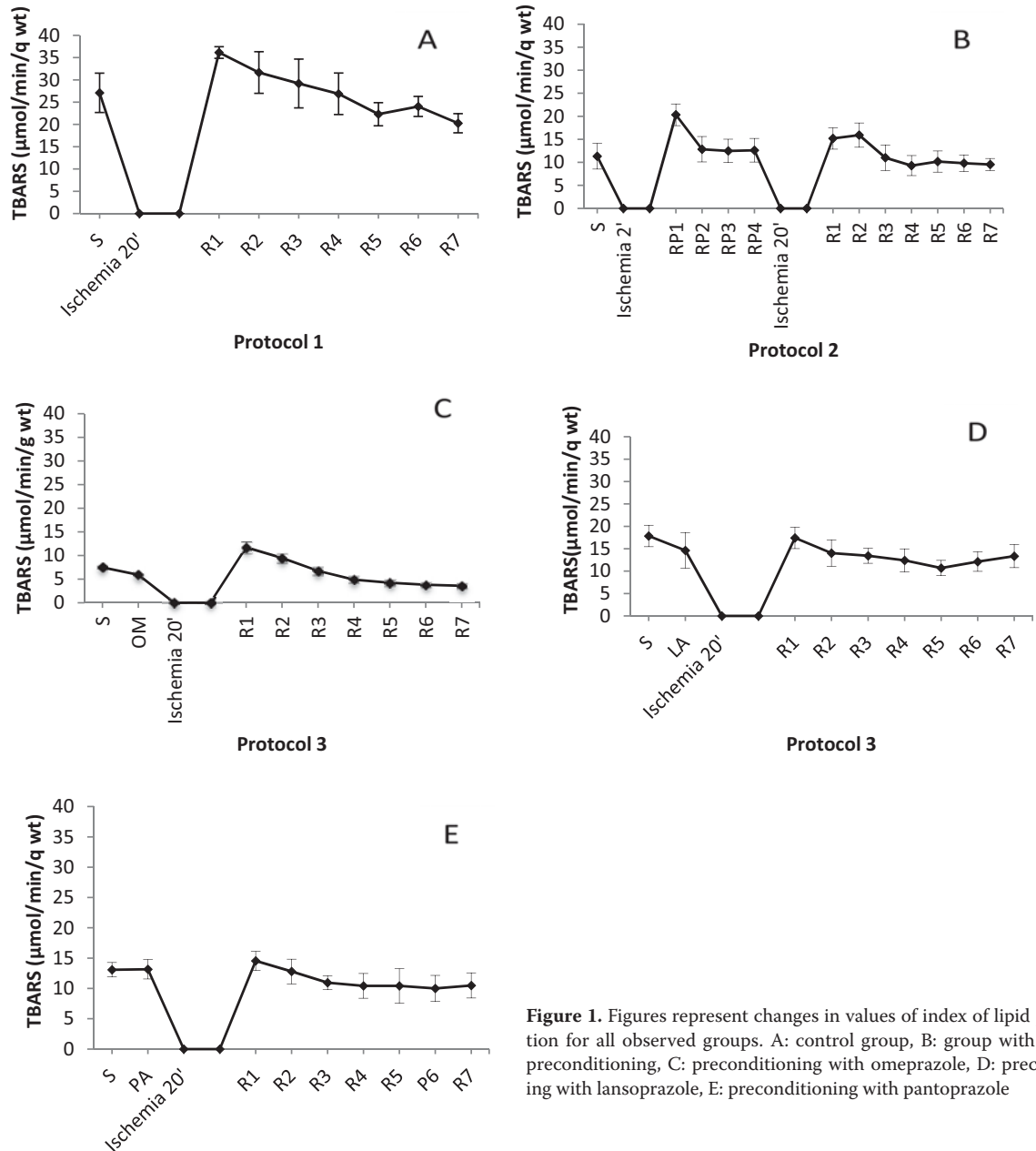


Figure 1. Figures represent changes in values of index of lipid peroxidation for all observed groups. A: control group, B: group with ischemic preconditioning, C: preconditioning with omeprazole, D: preconditioning with lansoprazole, E: preconditioning with pantoprazole

Effects of ischemic and PPI preconditioning on superoxide anion radical

In groups with ischemic and preconditioning with pantoprazole we found statistically significant increase in values of superoxide anion radical in period of reperfusion. Moreover in group with lansoprazole preconditioning in same examined period we showed statistically significant decrease of these values. There were no significant difference between values in S point and values in R7 point in examined groups (Table 3, Figure 3).

Effects of ischemic and PPI preconditioning on hydrogen peroxide

Ischemic and PPI preconditioning had statistically significant effect on values of hydrogen peroxide in reperfu-

sion period. In these groups we found decreased values in R7 point compared to R1 point. There were no significant changes in control group. Moreover, in control group, group with ischemic and omeprazole preconditioning we found that there is no difference between values in S point compared to values in R7 point of examined parameter (Table 4, Figure 4).

DISCUSSION

Determining the level molecule such as: nitric oxide in the form of nitrite, superoxide anion radicals and hydrogen peroxide and marker of oxidative damage (index of lipid peroxidation) in the coronary venous effluent, we wanted to determine whether ischemic preconditioning and phar-

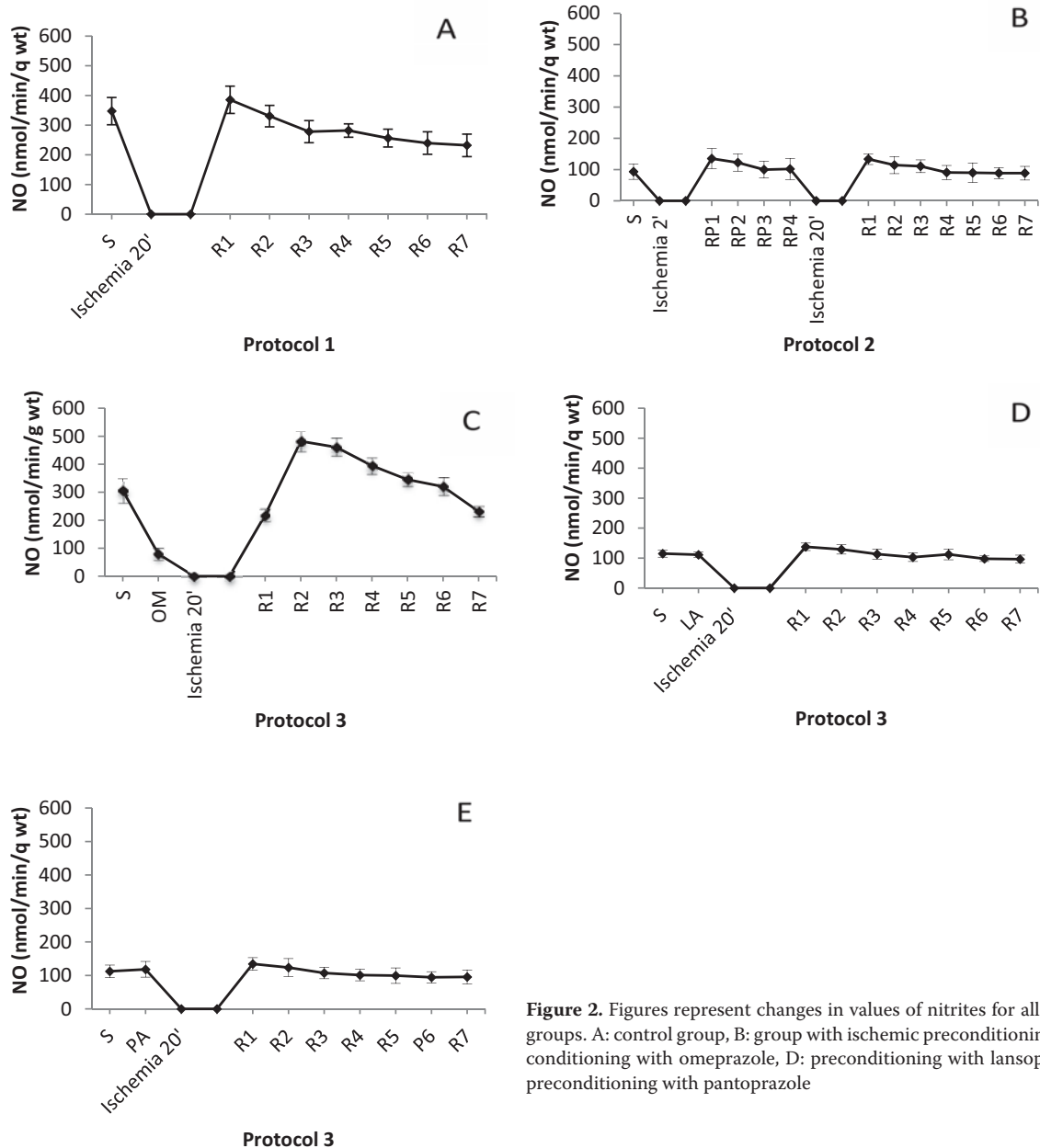


Figure 2. Figures represent changes in values of nitrites for all observed groups. A: control group, B: group with ischemic preconditioning, C: preconditioning with omeprazole, D: preconditioning with lansoprazole, E: preconditioning with pantoprazole

macological preconditioning with PPIs have a positive or negative effect on the free radical production during reperfusion. Myocardial reperfusion injury is an essential consequence of re-establishing the flow after ischemia. Although the exact mechanisms that can protect the myocardium from the occurrence of the injury or which it can alleviate not yet been adequately investigated, the interest in this problem still remain.

Our results show that drugs called proton pump inhibitors significantly reduced the concentration of nitric oxide in reperfusion period compared to the last point and the point of stabilization, but that is largely decreased of nitrite caused by omeprazole. Control group had decrease in nitrite values for 33.18% in reperfusion period. The less reduction in the value of exempt nitrite showed the group

where myocardium was preconditioned with ischemia (Table 2, Figure 2).

The importance of nitric oxide in the I/R injury of the myocardium is especially great due to its reaction with superoxide anion radical resulting in the generation of peroxynitrite (14-16). Peroxynitrite (ONOO⁻) can cause oxidation of the protein as well as lipid peroxidation (14). Our results could be interpreted in the light of these facts, because all groups reduced the release of superoxide anion radicals which can be spent on administration to create peroxynitrite by reaction with nitrogen oxide whose values are also in decline.

Review that at the end of the twentieth century posted Nonami et al., indicates that based on a critical review of previously published works, one cannot claim with cer-

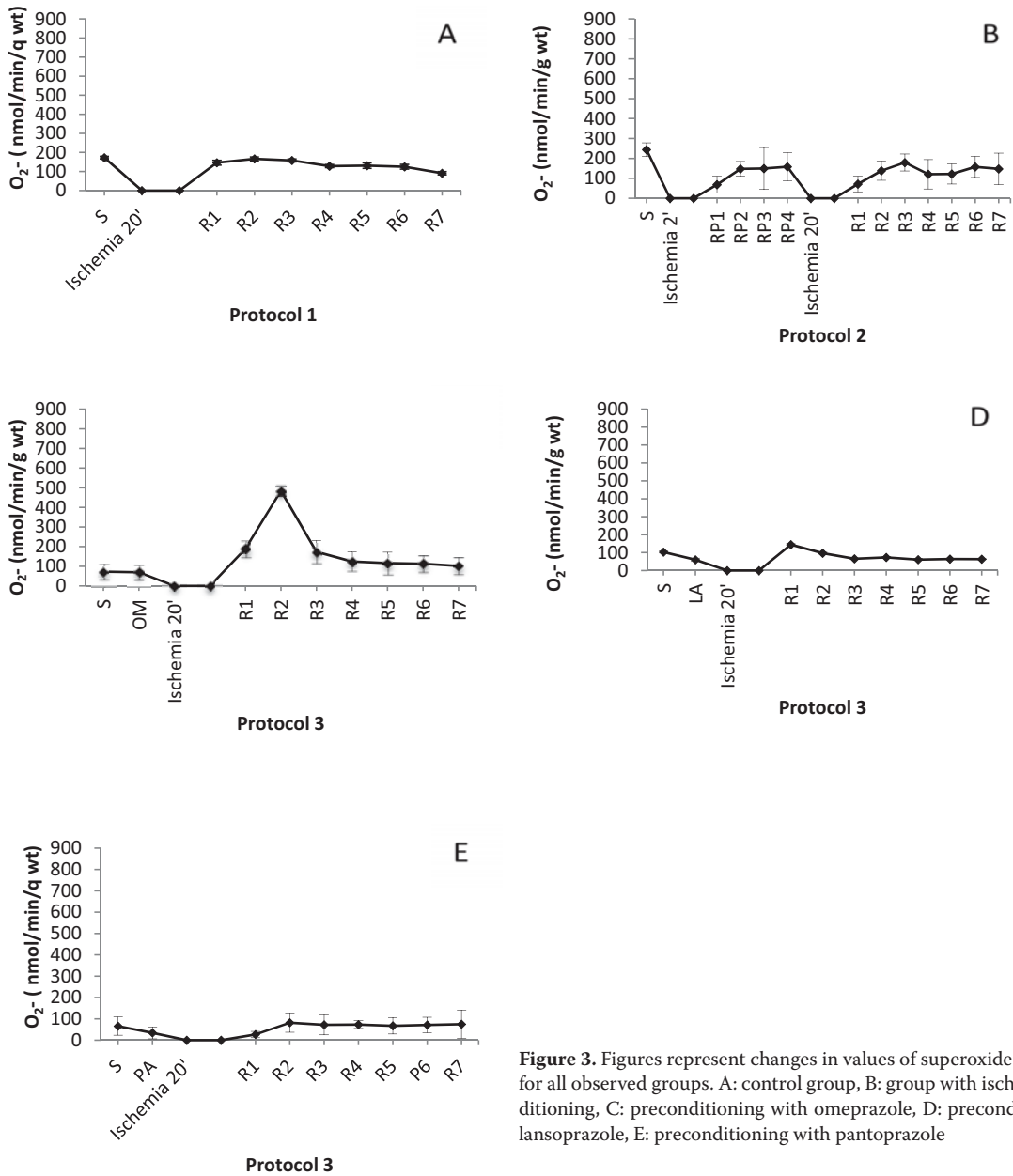


Figure 3. Figures represent changes in values of superoxide anion radical for all observed groups. A: control group, B: group with ischemic preconditioning, C: preconditioning with omeprazole, D: preconditioning with lansoprazole, E: preconditioning with pantoprazole

Table 3. Statistical significance and results for all observed groups

Superoxide anion radical (O_2^-)					
Points of interest/ Groups	Control	IP	OP	LP	PP
S vs R1	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05
S vs R7	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05
R1 vs R7	P>0.05	P<0.05*	P>0.05	P<0.05*	P<0.05*
Decrease (-) or increase (+) values R7 vs R1 (%)	-37,72	+107,28	-37,73	-56,22	+181,83
Decrease (-) or increase (+) values R7 vs S (%)	-47,30	-39,46	-26,92	-38,57	-13,87

tainty that neither donors nor precursors of nitric oxide, as well as inhibitors of nitric oxide synthase sufficient to prevent I/R injuries. In conclusion they indicated that nitric oxide may have different effects in terms of myocardial protection and all depending on the time of its application (17).

Although the superoxide anion radical is a highly reactive molecule, in the physiological conditions this molecule almost immediately after the creation has been translated into hydrogen peroxide using mitochondrial (Mn-SOD) and cytosolic (Cu / Zn-SOD), superoxide dismutase. Further, hydrogen peroxide under the action of the enzyme catalase is converted into oxygen and water. However, under certain circumstances, superoxide anion radical can avoid the cascading time, with consequent production of ROS leading to oxidative damage (14, 18, 19).

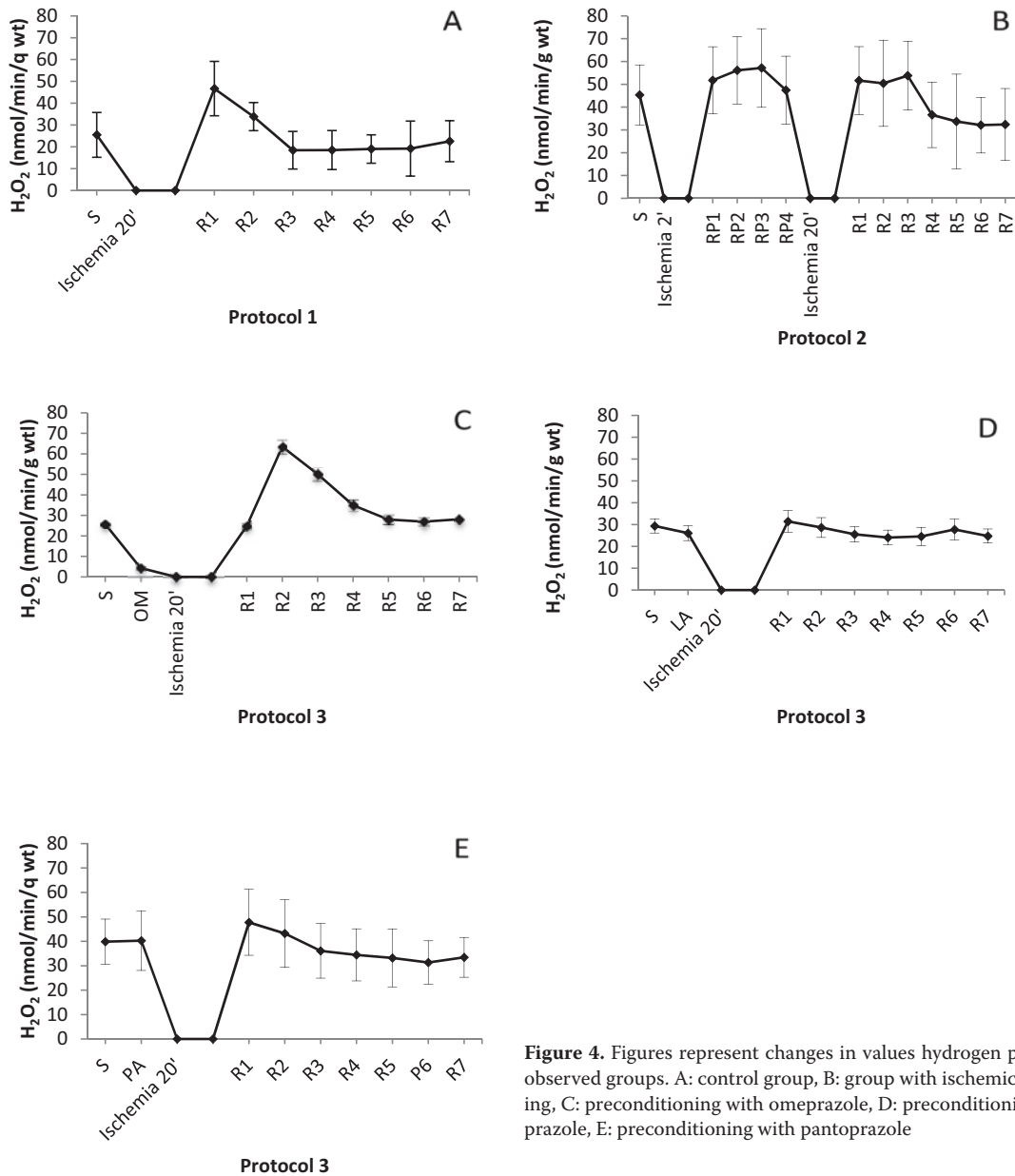


Figure 4. Figures represent changes in values hydrogen peroxide for all observed groups. A: control group, B: group with ischemic preconditioning, C: preconditioning with omeprazole, D: preconditioning with lansoprazole, E: preconditioning with pantoprazole

Table 4. Statistical significance and results for all observed groups

Hydrogen-peroxide (H_2O_2)					
Points of interest/ Groups	Control	IP	OP	LP	PP
S vs R1	$P < 0.05^*$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P < 0.05^*$	$P < 0.05^*$
S vs R7	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P < 0.01^{**}$	$P < 0.05^*$
R1 vs R7	$P > 0.05$	$P < 0.05^*$	$P < 0.01^{**}$	$P < 0.05^*$	$P < 0.01^{**}$
Decrease (-) or increase (+) values R7 vs R1 (%)	-51,65	-37,29	-22,57	-21,27	-30,02
Decrease (-) or increase (+) values R7 vs S (%)	-11,40	-28,56	-26,85	-15,70	-16,10

Our results may be seen from the table and graphics (Table 3, Chart 3), indicating reduced release of superoxide anion radical, which is not statistically significant in either study group when comparing the last point of reperfusion and values at point of stabilization. Decrease in superoxide anion radicals by active metabolite of omeprazole showed Wandall early nineties of the last century on the model of isolated polymorphous (20). In a study in isolated rabbit hearts, Omar et al. came to the conclusion that ischemic preconditioning is not mediated by superoxide anion radicals. Research by various laboratories indicated that the generation of ROS plays a vital role in the oxidative damage after ischemia and in the protection of the myocardium. This paradox may be explained by the specific regulatory resources ROS (14).

When it comes to hydrogen peroxide, we saw that after the application of drugs from the group of PPIs percentage drop in values when we compared the point R7 relative to S.



The values of hydrogen peroxide from the coronary venous effluent had the same trend and in the control group or the groups with the ischemic preconditioning (Table 4, Chart 4).

Pantoprazole in a study conducted in an animal model of rats showing its anti-oxidant and cytoprotective effects (21, 22). Same ability lansoprazole showed also (23). As far as preconditioning with ischemia, Gozal et al. on the model of the dog heart have shown that this type of prevention of myocardium injury leads to a reduction in the concentration of hydroxyl radicals, and thus concluded that ischemic preconditioning does not cause oxidative damage (24).

Although in our study there was no evidence that preconditioning ischemia as well as proton pump inhibitors reduces the value of hydroxyl radicals, due to the overall reduction of all parameters of oxidative damage it can be indicated possible the same scenarios as in the previously described studies.

The process of lipid peroxidation may occur through non-enzymatic and be mediated by reactive oxygen species resulting in the formation of malondialdehyde (MDA). Exposure to high levels of lipid peroxidation products can cause a variety of cellular responses, ranging from acute toxic to the inhibition of cell proliferation (25).

Our results showed that in all groups, there was a decrease in the values of superoxide anion radicals and hydrogen peroxide. How O_2^- leads to lipid peroxidation of membranes of endothelial cells, reduction of the levels of these pro-oxidant is in correlation with the lower values of lipid peroxidation (TBARS) (16). Reducing TBARS values can be traced through all the experimental groups, which clearly shows the percentage drop in the value of the point R7 in relation to point of stabilization. The difference between the values at the end of reperfusion, and the basal value at the beginning of the experiment did not differ statistically in a group where we executed ischemic preconditioning and preconditioning with pantoprazole. This might be a sign that in these groups after a large percentage drop during reperfusion period at the end of reperfusion established that lipid peroxidation and there were no deferens between R7 and S (Table 1, Figure 1).

In the group where omeprazole was applied we found that there has been a decline in the values in the reperfusion period compared to stabilization for 55.56%. Moreover as in this group came up almost the largest decrease in the concentration of hydrogen peroxide, it can be assumed that lipid peroxidation due to at least because the minimum production of hydroxyl radicals. Hayashi et al. on the model of isolated rat liver showed that omeprazole decreases the values of lipid peroxidation (26) while on indomethacin-induced gastritis in rats demonstrated that administration of omeprazole prevent an increase in TBARS values (27).

CONCLUSION

Examining a biochemical markers of oxidative damage we did not notice any increased production values of any parameter, according to that we can hypothesize that possible occurrence of reperfusion injury after ischemia and PPIs preconditioning is not mediated by this mechanism.

Due to the very difficult and controversial application of ischemic preconditioning in clinical practice, the results of this study suggest that in the future drugs called proton pump inhibitors can contribute to the prevention of myocardial damage following ischemia, especially because these days this group of drugs is one of the most prescribing.

Acknowledgment

This study is supported by Junior Project (JP 3/11) of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia.

REFERENCES

1. Przyklenk, K., & Kloner, R. A. (1998). Ischemic preconditioning: exploring the paradox. *Prog Cardiovasc Dis*, 40(6), 517-547.
2. Ara, J., Fekete, S., Frank, M., Golden, J. A., Pleasure, D., & Valencia, I. (2011). Hypoxic-preconditioning induces neuroprotection against hypoxia-ischemia in newborn piglet brain. *Neurobiol Dis*, 43(2), 473-485.
3. Cantagrel, S., Krier, C., Ducrocq, S., Bodard, S., Payen, V., Laugier, J., Chalon, S. (2003). Hypoxic preconditioning reduces apoptosis in a rat model of immature brain hypoxia-ischaemia. *Neurosci Lett*, 347(2), 106-110.
4. Altug, S., Demiryurek, A. T., Kane, K. A., & Kanzik, I. (2000). Evidence for the involvement of peroxynitrite in ischaemic preconditioning in rat isolated hearts. *Br J Pharmacol*, 130(1), 125-131.
5. Verma, S., Maitland, A., Weisel, R. D., Li, S. H., Fedak, P. W., Pomroy, N. C., Rao, V. (2002). Hyperglycemia exaggerates ischemia-reperfusion-induced cardiomyocyte injury: reversal with endothelin antagonism. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 123(6), 1120-1124.
6. Yellon, D. M., & Hausenloy, D. J. (2007). Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*, 357(11), 1121-1135.
7. Gomes, O. M., Magalhaes Mde, M., & Abrantes, R. D. (2010). Myocardium functional recovery protection by omeprazole after ischemia-reperfusion in isolated rat hearts. *Rev Bras Cir Cardiovasc*, 25(3), 388-392.
8. Gomes, O. M., Magalhaes Mde, M., Abrantes, R. D., & Kallas, E. (2011). Pantoprazole provides myocardial protection similar to ischemic preconditioning: experimental study of isolated hearts of rats. *Rev Bras Cir Cardiovasc*, 26(3), 433-439.
9. Jeremic, N., Petkovic, A., Srejovic, I., Zivkovic, V., Djuric, D., & Jakovljevic, V. (2015). Effects of ischemia and omeprazole preconditioning on functional recovery of isolated rat heart. *Rev Bras Cir Cardiovasc*, 30(2), 266-275.
10. Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95(2), 351-358.



11. Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 126(1), 131-138.
12. C Auclair, E Voisin. (1985). Nitroblue tetrazolium reduction Vol. 123. *Handbook of methods for oxygen radical research* (pp. 123–132).
13. Pick, E., & Keisari, Y. (1980). A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods*, 38(1-2), 161-170.
14. Goswami, S. K., Maulik, N., & Das, D. K. (2007). Ischemia-reperfusion and cardioprotection: a delicate balance between reactive oxygen species generation and redox homeostasis. *Ann Med*, 39(4), 275-289.
15. Kurzelewski, M., Czarnowska, E., & Beresewicz, A. (2005). Superoxide- and nitric oxide-derived species mediate endothelial dysfunction, endothelial glycocalyx disruption, and enhanced neutrophil adhesion in the post-ischemic guinea-pig heart. *J Physiol Pharmacol*, 56(2), 163-178.
16. Raedschelders, K., Ansley, D. M., & Chen, D. D. (2012). The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther*, 133(2), 230-255.
17. Nonami, Y. (1997). The role of nitric oxide in cardiac ischemia-reperfusion injury. *Jpn Circ J*, 61(2), 119-132.
18. Hess, M. L., & Manson, N. H. (1984). Molecular oxygen: friend and foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, 16(11), 969-985.
19. Pagliaro, P., & Penna, C. (2015). Redox signalling and cardioprotection: translatability and mechanism. *Br J Pharmacol*, 172(8), 1974-1995.
20. Wandall, J. H. (1992). Effects of omeprazole on neutrophil chemotaxis, super oxide production, degranulation, and translocation of cytochrome b-245. *Gut*, 33(5), 617-621.
21. Hackert, T., Tudor, S., Felix, K., Dovshanskiy, D., Hartwig, W., Simon, W. A., & Werner, J. (2010). Effects of pantoprazole in experimental acute pancreatitis. *Life Sci*, 87(17-18), 551-557.
22. Simon, W. A., Sturm, E., Hartmann, H. J., & Weser, U. (2006). Hydroxyl radical scavenging reactivity of proton pump inhibitors. *Biochem Pharmacol*, 71(9), 1337-1341.
23. Biswas, K., Bandyopadhyay, U., Chattopadhyay, I., Varadaraj, A., Ali, E., & Banerjee, R. K. (2003). A novel antioxidant and antiapoptotic role of omeprazole to block gastric ulcer through scavenging of hydroxyl radical. *J Biol Chem*, 278(13), 10993-11001.
24. Gozal, Y., Chevion, M., Elami, A., Berenshtein, E., Kitrossky, N., & Drenger, B. (2005). Ischaemic preconditioning but not isoflurane prevents post-ischaemic production of hydroxyl radicals in a canine model of ischaemia-reperfusion. *Eur J Anaesthesiol*, 22(1), 49-55.
25. Doucet, A. (1997). H⁺, K⁽⁺⁾-ATPASE in the kidney: localization and function in the nephron. *Exp Nephrol*, 5(4), 271-276.
26. Hayashi, H., Shimamoto, K., Taniai, E., Ishii, Y., Morita, R., Suzuki, K., Mitsumori, K. (2012). Liver tumor promoting effect of omeprazole in rats and its possible mechanism of action. *J Toxicol Sci*, 37(3), 491-501.
27. Petronilho, F., Araujo, J. H., Steckert, A. V., Rezin, G. T., Ferreira, G. K., Roesler, R., Streck, E. L. (2009). Effect of a gastrin-releasing peptide receptor antagonist and a proton pump inhibitor association in an animal model of gastritis. *Peptides*, 30(8), 1460-1465.

16. Pick E, Keisari Y. A simple colometric method for the measurement of hydrogen peroxide by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980; 38:161-170.
17. Drabkin D, Austin H. Spectrophotometric studies II. Preparations from washed blood cells: nitric oxide, hemoglobin and sulfhemoglobin. *J Biol Chem* 1935;112:51-65.
18. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247: 3170-3175.
19. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244(22):6049-6055.
20. Beutler E. Catalase. In: Butler E, ed. *Red cell metabolism. A manual of biochemical methods*. New York: Grune and Stratton; 1982:105-106.
21. Tsuchihashi M. Zur Kernntnis der blutkatalase. *Biochem Zeits* 1923; (140): 65-72.
22. Pryor WA. The antioxidant nutrients and disease prevention--what do we know and what do we need to find out? *Am J Clin Nutr* 1991; 53:391S-393S.
23. Winnik WM, Kitchin KT. Measurement of oxidative stress parameters using liquid chromatography-tandem mass spectroscopy (LC-MS/MS). *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 233:100-106.
24. Grattagliano I, Calamita G, Cocco T, Wang DQ, Portincasa P. Pathogenic role of oxidative and nitrosative stress in primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2014; 20:5746-5759.
25. Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med* 2007;43: 477-503.
26. Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15: 786-801.
27. Heinecke JW, Rosen H, Suzuki LA, Chait A. The role of sulfur containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1987; 262:10098-10103.
28. González RR, Puchades MJ, García RR, Saez G, Tormos MC, Miguel A. Effect of oxidative stress in patients with chronic renal failure. *Nefrol* 2006;26: 218-225.
29. Zwart SR, Kala G, Smith SM. Body iron stores and oxidative damage in humans increased during and after a 10- to 12-day undersea dive. *J Nutr.* 2009; 139:90-95.
30. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61:192-208.
31. Sureda A, Ferrer MD, Batle JM, Tauler P, Tur JA, Pons A. Scuba diving increases erythrocyte and plasma antioxidant defenses and spares NO without oxidative damage. *Med Sci Sports Exerc* 2009; 4:1271-1276.



THE EFFECTS OF DICLOFENAC AND IBUPROFEN ON HEART FUNCTION AND OXIDATIVE STRESS MARKERS IN THE ISOLATED RAT HEART

Maja Jevdjević¹, Ivan Srejojić², Vladimir Živković², Nevena Barudžić², Anica Petković², Jovana Bradic², Dragan Djurić³ and Vladimir Jakovljević²

¹College of Health Studies in Cuprija, Cuprija, Serbia

²Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

³Institute of Medical Physiology "Richard Burian", School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

EFEKTI DIKLOFENAKA I IBUPROFENA NA FUNKCIJU I BIOMARKERE OKSIDATIVNOG STRESA NA IZOLOVANOM SRCU PACOVA

Maja Jevdjević¹, Ivan Srejojić², Vladimir Živković², Nevena Barudžić², Anica Petković², Jovana Bradic², Dragan Đurić³ and Vladimir Jakovljević²

¹Visoka medicinska škola strukovnih studija u Cupriji, Srbija

²Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Katedra za fiziologiju, Kragujevac, Srbija

³Institut za medicinsku fiziologiju "Ricard Burijan", Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

Received / Priljen: 12.11.2013.

Accepted / Prihvaćen: 02.12.2013.

ABSTRACT

Eicosanoids lead to the promotion of inflammation, cause fever and pain and have many other effects. NSAIDs block the action of cyclooxygenase (COX) during the process of converting arachidonic acid into inflammatory mediators, thus reducing the symptoms of inflammation. Investigations focusing on nonselective COX inhibitors, used in high doses, revealed harmful effects on myocardial function. The aim of our study was to assess the effects of two nonselective NSAIDs, diclofenac and ibuprofen, on cardiodynamic parameters, coronary flow and oxidative stress biomarkers in isolated rat hearts. The hearts of male Wistar albino rats were excised and retrogradely perfused according to the Langendorff technique at gradually increased coronary perfusion pressures (40–120 cm H₂O). The experiments were performed under controlled conditions (Krebs–Henseleit physiological solution). The hearts were perfused with 10 μmol/l diclofenac and 10 μmol/l ibuprofen. The heart function parameters, including the maximum rate of pressure development (dp/dt max), minimum rate of pressure development (dp/dt min), systolic left ventricular pressure (SLVP), diastolic left ventricular pressure (DLVP), mean perfusion pressure (MBP) and heart rate (HR), were continuously registered. Coronary flow (CF) was measured flowmetrically. Oxidative stress markers, including the index of lipid peroxidation measured as TBARS, nitric oxide measured through nitrites (NO₂⁻), superoxide anion radical (O₂⁻), and hydrogen peroxide (H₂O₂) in the coronary venous effluent, were assessed spectrophotometrically. Our results showed that diclofenac affected cardiodynamic parameters more significantly than did ibuprofen. Furthermore, the present data indicate that both estimated COX inhibitors do not promote the production of reactive oxygen species.

Keywords: Diclofenac, Ibuprofen, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, Isolated rat heart, Oxidative stress

SAŽETAK

Eikosanoidi dovode do zapaljenja, uzrokuju groznicu i bol, i imaju mnoge druge efekte na organizam. NSAID omogućavaju delovanje ciklooksigenaze (COX) u procesu konvertovanja arahidonske kiseline u medijatore zapaljenja, i na taj način smanjuju simptome zapaljenja. Istraživanja koja se bave primenom neselektivnih inhibitora COX, koji se koriste u visokim dozama, pokazala su njihove štetne efekte na funkciju miokarda. Cilj našeg istraživanja je bio da ispita efekte neselektivnih NSAID, diklofenaka i ibuprofena, na kardiodinamske parametre, koronarni protok i biomarkere oksidativnog stresa izolovanog srca pacova. Srca mužijaka Wistar albino pacova su uzimana i retrogradno perfundovana prema Langedorff-ovoj tehnici sa postepenim povećanjem perfuzionog pritiska (40–120 cm H₂O). Eksperimenti su prvo izvođeni u kontrolnim uslovima (primena fiziološkog Krebs–Henseleit-ovog rastvora), nakon čega su srca perfundovana sa: 10 μmol/l diklofenaka i 10 μmol/l ibuprofena. Parametri srčane funkcije koji su kontinuirano praćeni su: maksimalna stopa razvoja pritiska (dp/dt max), minimalna stopa razvoja pritiska (dp/dt min), sistolni pritisak u levoj komori (SLVP), dijastolni pritisak u levoj komori (DLVP), srednji perfuzioni pritisak (MBP) i frekvencija srčanog rada (HR). Koronarni protok (CF) je registrovan flowmetrijski. Markeri oksidativnog stresa: indeks lipidne peroksidacije meren kao TBARS, azot-monoksid utvrđivan preko nitrata (NO₂⁻), superoksid anjon radikal (O₂⁻), i vodonik peroksid (H₂O₂) su mereni spektrofotometrijski u koronarnom venskom efluentu. Naši rezultati su pokazali da diklofenak ispoljava značajniji uticaj na kardiodinamske parametre u odnosu na ibuprofen. Pored toga, rezultati ove studije su pokazali da oba ispitivana inhibitora COX ne dovode do produkcije reaktivnih vrsta kiseonika.

Ključne reči: Diklofenak, Ibuprofen, Nesteroidni-antiinflamatorni lekovi, Izolovano srce pacova, Oksidativni stres

UDK: 615.276.035.2:612.17 / Ser J Exp Clin Res 2014; 15 (1): 11-19

DOI: 10.2478/SJECR-2014-0002

Correspondence to: Prof. Vladimir Lj. Jakovljević, MD, PhD;

Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, SERBIA

Phone: +381 34 342944, Fax: +381 34 306800/ext 112, E-mail: drvladakbg@yahoo.com

Unauthenticated

Download Date | 2/26/17 1:20 PM



ABBREVIATIONS

CF - Coronary flow	NADPH - Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
COX - Cyclooxygenase	NSAID - Nonsteroidal anti-inflammatory drugs
CPP - Coronary perfusion pressure	ROS - Reactive oxygen species
HRPO - Horseradish peroxidase	TBARS - Thiobarbituric acid reactive substances
MBP - Mean blood pressure	TRIS - Tris(hydroxymethyl)aminomethane
NO - Nitric oxide	

INTRODUCTION

Cyclooxygenase (COX) is an intracellular enzyme that catalyses the conversion of arachidonic acid into prostaglandin H_2 , a precursor for the synthesis of prostaglandins, prostacyclin, and thromboxane, also known as eicosanoids. Eicosanoids lead to the promotion of inflammation, cause fever and pain and have many other systemic effects. There are two isoforms of COX: COX-1 and COX-2. COX-1 is the constitutive isoform of COX, and it has clear physiological effects. The inducible isoform, COX-2, is induced by pro-inflammatory stimuli in migratory cells and inflamed tissues (1). It is almost impossible to detect COX-2 in a normal heart, which indicates that the induction of COX-2 is present mostly at the site of inflammation (2).

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are among the most common medications in the world for treating a variety of inflammatory disorders, and they are used as analgesics, anti-inflammatory drugs, and antipyretics (3). NSAIDs block the action of COX in the process of converting arachidonic acid into inflammatory mediators, thus reducing symptoms of inflammation (4). NSAIDs are classified on these as nonselective COX inhibitors and specific COX-2 inhibitors depending on the activity of each isoform (4).

Investigations focusing on nonselective COX inhibitors, used in high dosages, revealed harmful effects on myocardial function and increased mortality in patients with previous myocardial infarction (5) and as well as in patients without a prior clinical diagnosis of cardiovascular diseases (6). Recent data regarding cardiovascular risk associated with selective COX-2 inhibitors are controversial (7, 8). Over the last several years, evidence has accumulated showing that oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of cardiovascular disease (9, 10). One of possible mechanisms by which COX inhibitors exhibit their side effects on the cardiovascular system is the induction of reactive oxygen species (ROS) (11, 12).

Diclofenac, a nonselective non-steroidal anti-inflammatory drug, has been widely used as an anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic drug. Clinical observations have shown that long-term treatment with diclofenac correlates with the onset or aggravation of congestive heart failure, which can cause serious cardiovascular thromboembolic events, such as myocardial infarction and stroke (13). McGettigan et al claimed that diclofenac has the highest cardiovascular risk score of the nonselective NSAIDs (14). This conclusion might be because only diclofenac inhibits L-type Ca^{2+} channels and the Na^+ current in cardiomyocytes (13).

Ibuprofen is a nonselective non-steroidal anti-inflammatory drug that is often used to relieve fever and the symptoms of arthritis. This drug is well-tolerated with infrequent but well-characterised adverse effects, including heart failure (15, 16). A study on isolated guinea pig hearts showed that ibuprofen could induce cardiac arrhythmias due to the inhibition of Na^+ and Ca^{2+} channels and a decrease of the excitation propagation within the heart (17).

Based on the aforementioned discussion, the aim of the present study was to assess the effects of two nonselective NSAIDs, diclofenac and ibuprofen, on cardiodynamic parameters, coronary flow and oxidative stress biomarkers in isolated rat hearts.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of isolated hearts

The hearts ($n=24$; each group 12 rats) were excised from male, eight-week old Wistar albino rats, with a body mass of 180 g to 240 g (obtained from Military Medical Academy, Belgrade, Serbia), and perfused in a Langendorff apparatus (Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary). After a short-term ether narcosis, the animals were killed by cervical dislocation (Schedule 1 of the Animals/Scientific Procedures, Act 1986, UK). After urgent thoracotomy and rapid heart arrest by superfusion with ice-cold isotonic saline, the hearts were rapidly excised, isolated and retrogradely perfused via the aorta according to Langendorff's technique at gradually increased coronary perfusion pressures (CPP) (40–120 cm H_2O). The composition of the non-recirculation Krebs–Henseleit perfusate was as follows (mmol/l): NaCl 118, KCl 4.7, $CaCl_2 \times 2H_2O$ 2.5, $MgSO_4 \times 7H_2O$ 1.7, $NaHCO_3$ 25, KH_2PO_4 1.2, glucose 11, pyruvate 2, equilibrated with 95 % O_2 plus 5 % CO_2 and warmed to 37°C (pH 7.4).

Immediately after the establishment of automatic operation, the sensor was inserted (transducer BS4 73-0184, Experimetria Ltd, Budapest, Hungary) through an opening created in the left atrium of the heart and the destroyed mitral valve into the left ventricle for the continuous registration of myocardial function. Another sensor (perfusion pressure sensor, Experimetria Ltd, Hungary) was set at the same height as the end of the heart perfusion cannula to measure mean blood pressure (MBP).



Physiological assay and experimental protocol

After the heart perfusion started, a 30-min period was allowed for stabilisation of the preparation. It was performed at a basal CPP of 60 cmH₂O. To test coronary vascular reactivity, all hearts were challenged with short-term occlusions (5–30 s) and a bolus injection of 5 mmol/l adenosine (60 µl at a flow rate of 10 ml/min to elicit maximum CF) during the stabilisation period. The hearts were discarded (approximately 25 %) if the flow did not increase by 100 % over the control value (for both tests). After an equilibration period, CPP was lowered to 50 and 40 cmH₂O and then gradually increased to 70, 80, 90, 100, 110, and 120 cmH₂O to establish coronary autoregulation. Properly performed control experiments were included in the study (i.e., the groups of hearts in which the CPP/CF relationship was investigated twice in the absence of any drug for 120 min). It was important to confirm the stability of the preparation and the insubstantial difference between the responses to the first and second runs of changes in perfusion pressure, as described previously (18). After setting up the control experimental protocol (Krebs–Henseleit physiological solution [control group]), the hearts were perfused with 10 µmol/l diclofenac and 10 µmol/l ibuprofen.

In the control and experimental groups, after placing the sensor in the left ventricle, the following myocardial function parameters were continuously registered:

1. Maximum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt max),
2. Minimum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt min),
3. Systolic left ventricular pressure (SLVP),
4. Diastolic left ventricular pressure (DLVP),
5. Mean perfusion pressure (MBP) and
6. Heart rate (HR).

The test period started immediately after the control experiments to avoid time-dependent adverse effects. The flow was considered stable at each value of perfusion pressure when three repeated values of the CF were the same. The CF was measured flowmetrically with the following parameters:

1. Index of lipid peroxidation (measured as TBARS – thiobarbituric acid reactive substances),
2. Superoxide anion radicals (O₂⁻),
3. Hydrogen peroxide (H₂O₂) and
4. Nitric oxide (NO).

The experimental protocol was approved by the Faculty of Medical Sciences Ethics Committee for the welfare of experimental animals, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia.

Biochemical assays

TBARS determination (index of lipid peroxidation)

The degree of lipid peroxidation in the coronary venous effluent was estimated by measuring TBARS using 1 % thiobarbituric acid in 0.05 NaOH incubated with the coronary effluent at 100°C for 15 min and measured at 530 nm. Krebs–Henseleit solution was used as a blank probe (19).

Determination of superoxide anion radical

The level of superoxide anion radical (O₂⁻) was measured by a nitro blue tetrazolium reaction in TRIS buffer with the coronary venous effluent at 530 nm. Krebs–Henseleit solution was used as a blank probe (20).

Determination of hydrogen peroxide

The measurement of hydrogen peroxide (H₂O₂) was based on the oxidation of phenol red by hydrogen peroxide in a reaction catalysed by horseradish peroxidase (HRPO) (21). Two hundred microlitres of perfusate was precipitated with 800 µl of freshly prepared phenol red solution, and then 10 µl of (1:20) HRPO (made ex tempore) was added. For a blank probe (instead of coronary venous effluent), an adequate volume of Krebs–Henseleit solution was used. The level of H₂O₂ was measured at 610 nm.

Nitrite determination

Nitric oxide decomposes rapidly to form stable metabolite nitrite/nitrate products. The nitrite level (NO₂⁻) was measured and used as an index of nitric oxide (NO) production using Griess's reagent. A total of 0.5 ml of perfusate was precipitated with 200 µl of 30 % sulphosalicylic acid, vortexed for 30 min, and centrifuged at 3000 x g. Equal volumes of the supernatant and Griess's reagent, containing 1 % sulphanilamide in 5 % phosphoric acid/0.1 % naphthalene ethylenediamine dihydrochloride, was added and incubated for 10 min in the dark and measured at 543 nm. The nitrite levels were calculated using sodium nitrite as the standard (22).

Drugs

Both diclofenac and ibuprofen were obtained from Sigma-Aldrich Co (USA).

Statistical analysis

Values are expressed as the mean ± SE. A paired t test was used in the statistical analyses; p values less than 0.05 were considered to be statistically significant.

RESULTS

Dp/dt max

Diclofenac at a dose of 10 µmol/l induced a decrease in dp/dt max at CPP = 100 cmH₂O and 120 cmH₂O (Figure 1A), whereas ibuprofen at the same dose did not significantly affect this parameter over the entire CPP range (Figure 2A).

Dp/dt min

Similar to dp/dt max, 10 µmol/l diclofenac significantly affected dp/dt min at CPP = 120 cmH₂O (Figure 1B), and ibuprofen did not cause statistically significant changes in this parameter (Figure 2B).

SLVP

Neither diclofenac nor ibuprofen caused statistically significant changes in SLVP at any CPP (Figure 1C, 2C).



DLVP

There were no changes in the DLVP values during the administration of diclofenac or ibuprofen compared to the controls (Figure 1D, 2D) over the entire CPP range.

Mean perfusion pressure

Diclofenac induced statistically significant changes in the MBP at CPP = 120 cmH₂O (Figure 1E), whereas ibuprofen did not cause any changes in the MBP values compared to the control conditions (Figure 2E).

HR

Both diclofenac and ibuprofen induced statistically significant decreases in HR at CPP = 100 cmH₂O and 120 cmH₂O (Figure 1F, 2F) compared with the control conditions.

CF

Similar to HR, both diclofenac and ibuprofen induced statistically significant decreases in HR at CPP = 100 cmH₂O and 120 cmH₂O (Figure 1G, 2G) compared with the control conditions.

Index of lipid peroxidation (measured as TBARS)

The administration of ibuprofen induced a statistically significant increase in TBARS at CPP = 40 cmH₂O and then a statistically significant decrease at CPP = 100 cmH₂O and 120 cmH₂O (Figure 4A). Diclofenac did not cause any changes in the TBARS values over the entire CPP range (Figure 3A).

NO₂⁻

Compared with the control conditions, the amount of NO₂⁻ released was not changed significantly during the administration of diclofenac or ibuprofen for any CPP value (Figures 3B, 4B).

H₂O₂

Diclofenac induced a significant decrease in H₂O₂ release (Figure 3C) at CPP = 120 cmH₂O, whereas ibuprofen did not significantly affect H₂O₂ release (Figure 4C).

O₂⁻

There were no statistically significant changes in O₂⁻ release during the application of diclofenac or ibuprofen over the entire CPP range (Figures 3D, 4D).

DISCUSSION

The present study aimed to examine the effects of the acute administration of the COX inhibitors diclofenac and ibuprofen on cardiodynamic parameters, coronary autoregulation and oxidative stress biomarkers in isolated rat hearts. This work relates to earlier experiments in our laboratory (23, 12).

In the first part of our study, we focused our attention on the effects of diclofenac and ibuprofen on cardiody-

dynamic parameters as an indicator of myocardial function. Cardiac contractility was estimated by the maximum and minimum rates of LV pressure development (dp/dt max and dp/dt min). Ibuprofen did not cause any changes in myocardial contractility, but diclofenac induced a significant decrease in contractility at higher values of CPP (Figures 1A, 1B, 2A and 2B). Our results related to ibuprofen agree consistent with the findings of Herbreton et al (24). They showed that ibuprofen does not affect left ventricular contractility (24) in the model of porcine endotoxemia. Moreover, Beamer et al explored the possible effect of ibuprofen on hemodynamic parameters during hypovolemic shock in a canine experimental model, and they also showed that this drug had no influence on cardiac contractility (25). Our results concerning diclofenac are in agreement with Yarishkin et al (13), who concluded that diclofenac may depress cardiac excitability and contractility simultaneously.

One of the possible mechanisms by which diclofenac exhibits depressive effects on the heart is through the reversible inhibition of the Na⁺ currents and irreversible inhibition the L-type Ca²⁺ channel currents in cardiac muscle cells (13, 26). Moreover, ibuprofen also exhibits a similar influence (17) on ion channels, but in our results, there was no effect on cardiac contractility.

Both drugs induced decreases in HR and CF at higher CPP values (Figures 1F, 1G, 2F, 2G). Yang et al showed that ibuprofen causes a decrease in HR (17) in the guinea pig isolated heart model. A possible mechanism for this action is decreasing the spontaneous depolarisation rate, thereby slowing the heart rate (17). Diclofenac may also affect the duration of the action potential and heart rate (26). Kristof and co-authors concluded that chronic administration of diclofenac at therapeutic concentrations does not increase the risk of arrhythmia in intact hearts (26). In our experiments, we also used intact hearts, but considering our experimental protocol and acute administration of diclofenac, this mechanism may play a role in decreasing the heart rate.

Although both diclofenac and ibuprofen are classified as nonselective NSAIDs, there are some differences in their COX selectivity; these differences could be a partial cause of their different effects. Namely, ibuprofen is a more potent inhibitor of COX-1 than diclofenac, which is a more selective COX-2 inhibitor (27) (Figure 3). In their meta-analysis, Varas-Lorenzo and co-workers found that diclofenac causes a more increased risk of vascular events compared with ibuprofen (28).

On the other hand, data regarding the influence of these drugs on ROS generation are inconsistent. Li and co-workers demonstrated that diclofenac causes decreased nitrite plasma levels (oxidation product of NO), indicating a reduction in NO bioavailability (11). In the present study, we also found decreased nitrites (Figure 3B). This may lead to vasoconstriction and consequently to a decrease in CF (Figure 1G).

Regarding these findings, we wanted to explore the possible role of oxidative stress in the appearance of side effects with these drugs. However, most of the oxidative

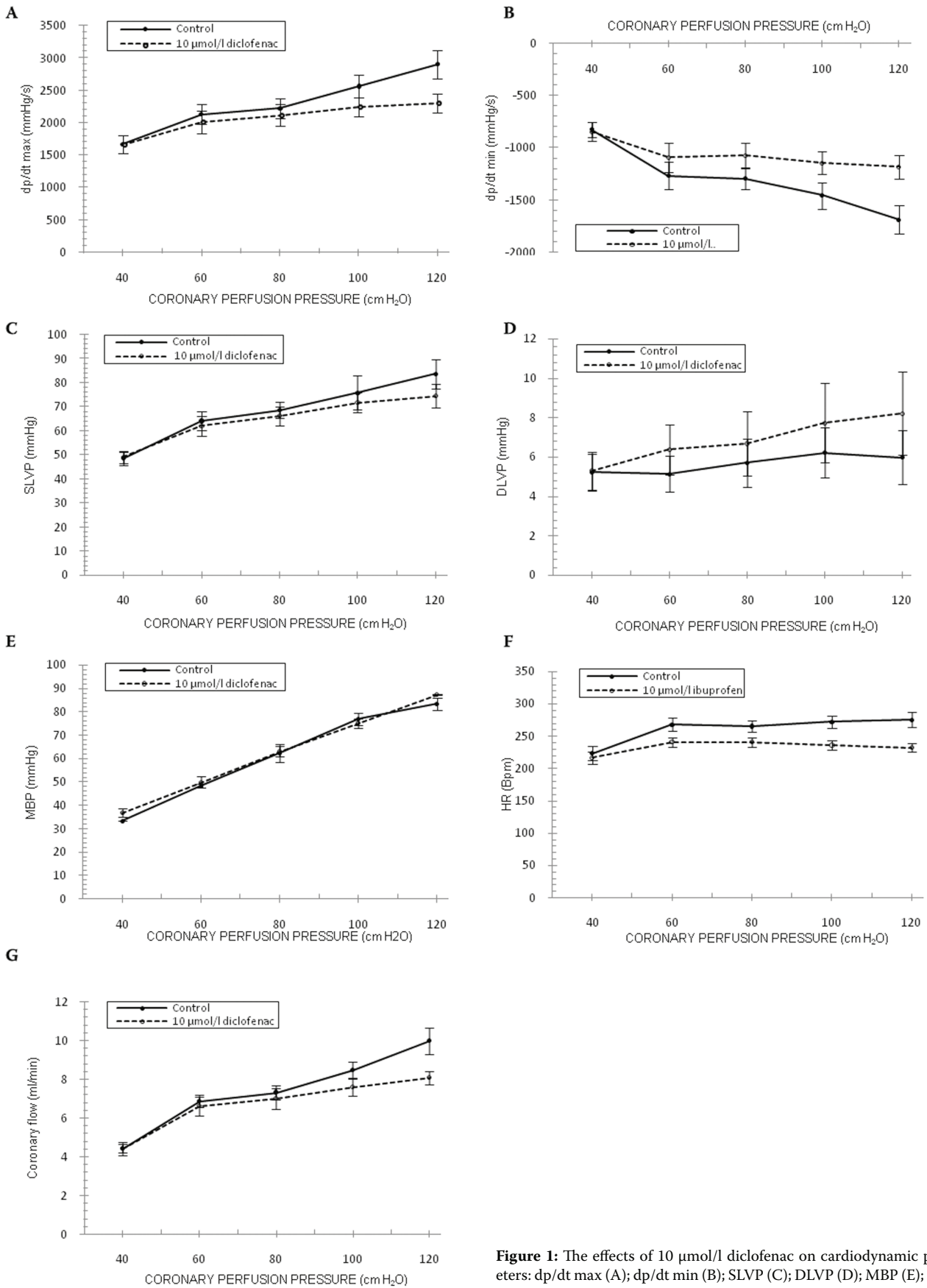


Figure 1: The effects of 10 $\mu\text{mol/l}$ diclofenac on cardiodynamic parameters: dp/dt max (A); dp/dt min (B); SLVP (C); DLVP (D); MBP (E); HR (F) and CF (G). The values represent the mean \pm SE; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$;

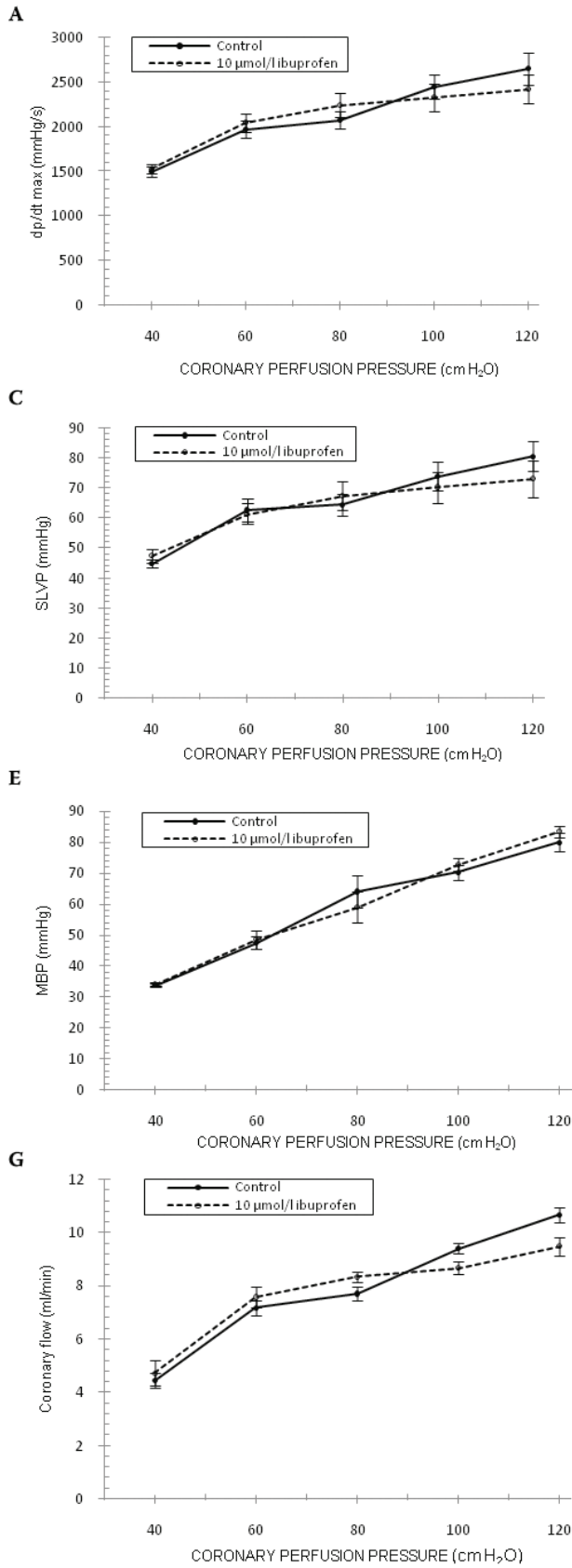


Figure 2: The effects of 10 μmol/l ibuprofen on cardiodynamic parameters: dp/dt max (A); dp/dt min (B); SLVP (C); DLVP (D); MBP (E); HR (F) and CF (G). The values represent the mean ± SE; * p<0.05; ** p<0.01;

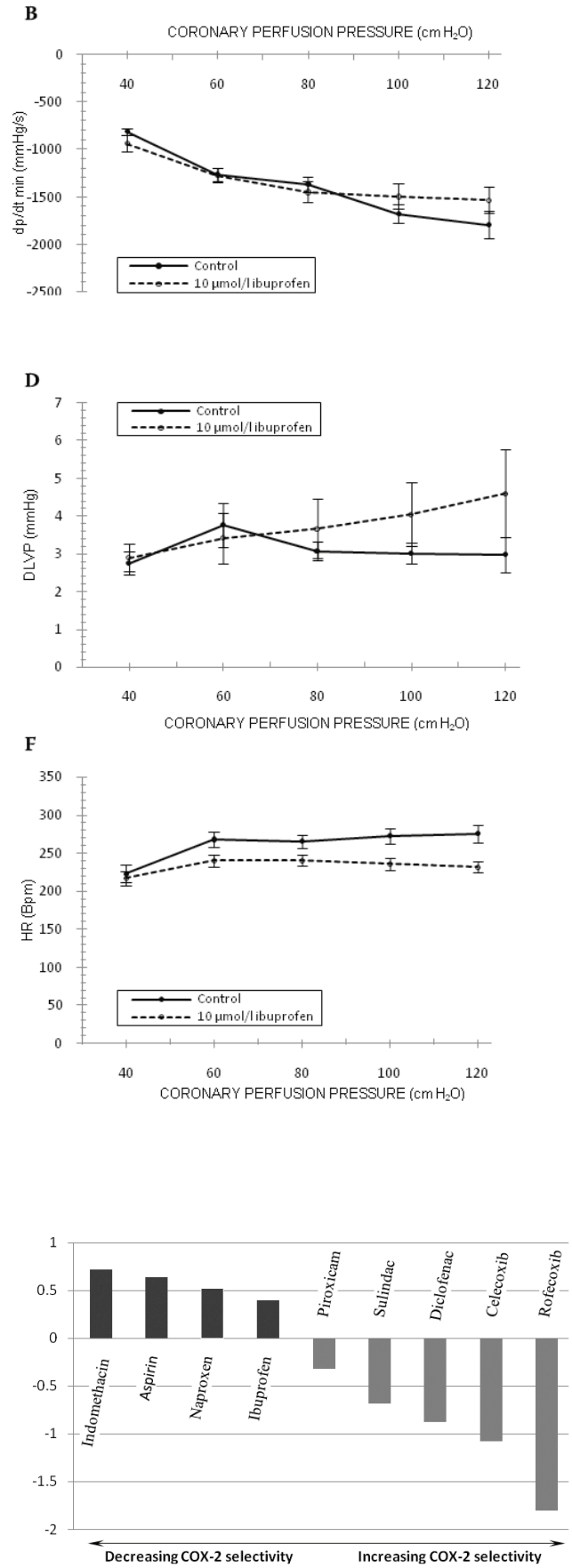


Figure 3: COX selectivity of different NSAIDs.

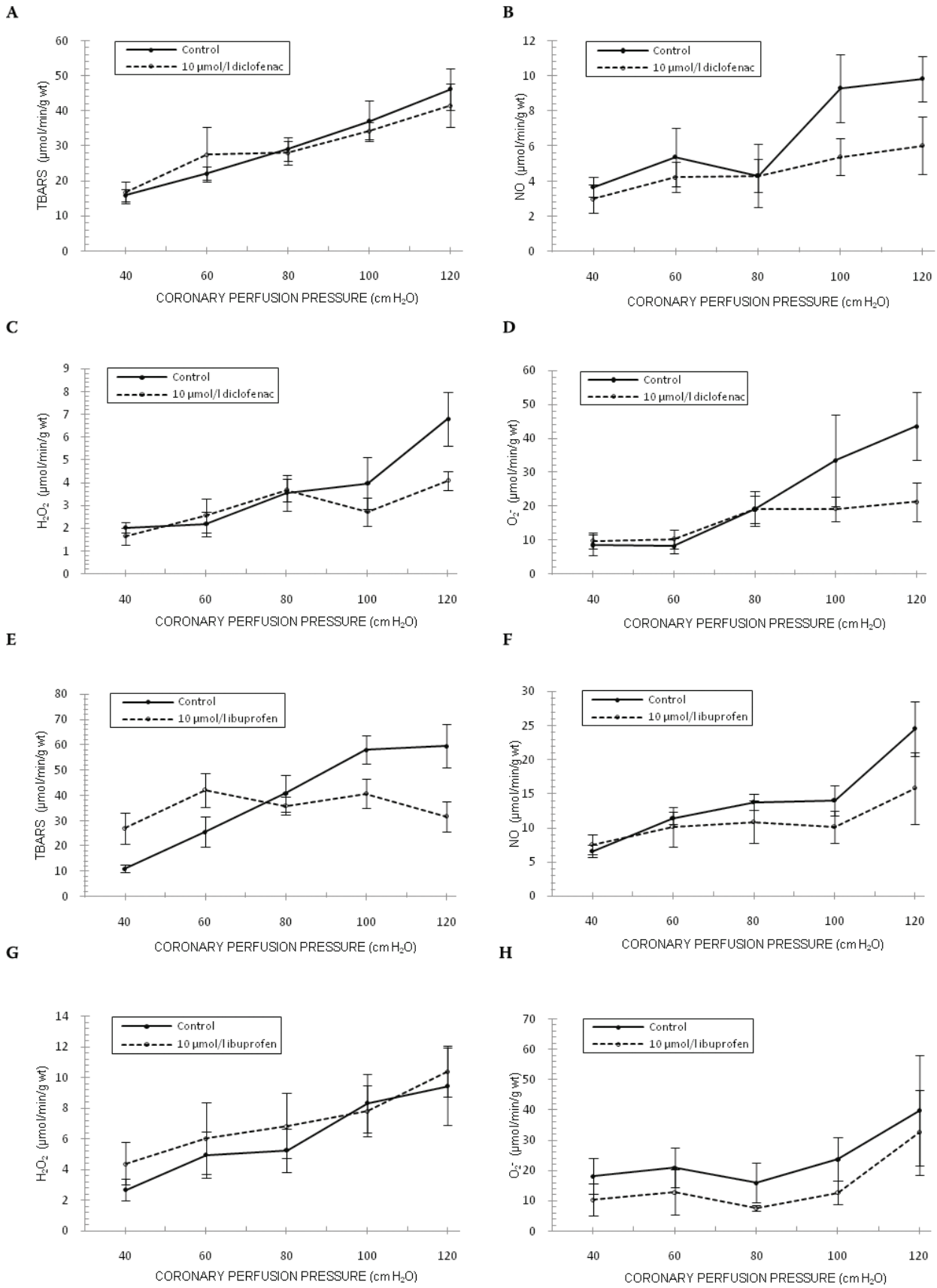


Figure 4: The effects of 10 μmol/l diclofenac and 10 μmol/l ibuprofen on oxidative stress parameters: TBARS diclofenac (A); NO diclofenac (B); H₂O₂ diclofenac (C); O₂⁻ diclofenac (D); TBARS ibuprofen (E); NO ibuprofen (F); H₂O₂ ibuprofen (G) and O₂⁻ ibuprofen (H). The values represent the mean ± SE; *p<0.05; **p<0.01;



stress parameters did not change significantly (Figure 3). Diclofenac caused a decrease in H_2O_2 levels at CPP 40 cm H_2O (Figure 3C), and ibuprofen first induced first an increase in TBARS levels at CPP 40 and then a decrease at CPP 100 and 120 (Figure 3E). This result is in contrast with our hypothesis that oxidative stress may be one of the mechanisms by which NSAIDs exhibit their side effects. There are some results suggesting that diclofenac induces a marked increase in vascular ROS content (11). Li et al used spontaneously hypertensive rats and chronic application of NSAIDs (and among them, diclofenac). Differences between the results of our study and theirs may occur because of the different experimental models.

On the other hand, diclofenac may possess some antioxidant potential, behaving as an ROS scavenger (29). Hermann et al found that diclofenac does not improve endothelial dysfunction or affect oxidative stress parameters (30). Wilkinson and his group concluded that ibuprofen attenuates oxidative damage in the brain and has beneficial effects in Alzheimer's disease (31). The findings of these authors suggest that ibuprofen acts independently of COX inhibition to disrupt signalling cascades leading to microglial Nox2 activation, thus preventing oxidative damage. Moreover, the findings of Zhao et al suggest that ROS specifically derived from Nox2 NADPH oxidase make a substantial contribution to several key processes underlying the development of cardiac contractile dysfunction and remodelling (32). In this study, the authors examined the role of Nox2 NADPH oxidase in the development of doxorubicin-induced cardiac injury and remodelling. Considering this, we can suggest that the unchanged levels of oxidative stress biomarkers in our study could be due to the inhibition of Nox2 NADPH oxidase by ibuprofen.

Based on the present data, we can conclude that diclofenac affects cardiodynamic parameters more significantly than does ibuprofen. Furthermore, our results indicate that both estimated COX inhibitors do not promote the production of ROS; therefore, their cardiac effects do not appear to be mediated via oxidative stress, which could be important in elucidating their potential deleterious influence on cardiac muscle and coronary endothelium.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is supported by Grant No. 175043 from the Ministry of Science and Technical Development of the Republic of Serbia and Junior project 04/2011 Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac.

REFERENCES:

1. Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of antiinflammatory drugs. *Int J Tissue React.* 1998;20(1):3-15. Review.
2. Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isakson PC, Seibert K. Selec-

3. Pawlosky N. Cardiovascular risk: Are all NSAIDs alike? *Can Pharm J (Ott).* 2013 Mar;146(2):80-3.
4. Santos M, Kunkar V, García-Iturralde P, Tendillo FJ. Meloxicam, a specific COX-2 inhibitor, does not enhance the isoflurane minimum alveolar concentration reduction produced by morphine in the rat. *Anesth Analg.* 2004 Feb;98(2):359-63.
5. Fosbøl EL, Folke F, Jacobsen S, Rasmussen JN, Sørensen R, Schramm TK, Andersen SS, Rasmussen S, Poulsen HE, Køber L, Torp-Pedersen C, Gislason GH. Cause-specific cardiovascular risk associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs among healthy individuals. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes.* 2010 Jul;3(4):395-405.
6. Huerta C, Varas-Lorenzo C, Castellsague J, García Rodríguez LA. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of first hospital admission for heart failure in the general population. *Heart.* 2006 Nov;92(11):1610-5. Epub 2006 May 22.
7. Gottlieb S. COX 2 inhibitors may increase risk of heart attack. *BMJ.* 2001 Sep 1;323(7311):471.
8. Straino S, Salloum FN, Baldi A et al (2007) Protective effects of parecoxib, a cyclo-oxygenase-2 inhibitor, in postinfarction remodeling in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 50:571–577.
9. Förstermann U and Münzel T (2006) Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 113: 1708-1714.
10. Griending KK and FitzGerald GA (2003) Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation* 108: 2034-2040.
11. Li H, Hortmann M, Daiber A, Oelze M, Ostad MA, Schwarz PM, Xu H, Xia N, Kleschyov AL, Mang C, Warnholtz A, Münzel T, Förstermann U. Cyclooxygenase 2-selective and nonselective nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce oxidative stress by up-regulating vascular NADPH oxidases. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008 Sep;326(3):745-53.
12. Barudzic N, Turjacanin-Pantelic D, Zivkovic V, Selakovic D, Srejavic I, Jakovljevic J, Djuric DM, Jakovljevic VLj. The effects of cyclooxygenase and nitric oxide synthase inhibition on oxidative stress in isolated rat heart. *Mol Cell Biochem.* 2013 Sep;381(1-2):301-11.
13. Yarishkin OV, Hwang EM, Kim D, Yoo JC, Kang SS, Kim DR, Shin JH, Chung HJ, Jeong HS, Kang D, Han J, Park JY, Hong SG. Diclofenac, a Non-steroidal Anti-inflammatory Drug, Inhibits L-type Ca Channels in Neonatal Rat Ventricular Cardiomyocytes. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2009 Dec;13(6):437-42.
14. McGettigan P, Henry D. Cardiovascular risk and inhibition of cyclooxygenase: a systematic review of the observational studies of selective and nonselective inhibitors of cyclooxygenase 2. *JAMA.* 2006 Oct 4;296(13):1633-44. Epub 2006 Sep 12. Review.



15. de Vries F, Setakis E, van Staa TP. Concomitant use of ibuprofen and paracetamol and the risk of major clinical safety outcomes. *Br J Clin Pharmacol.* 2010 Sep;70(3):429-38.
16. Hernandez-Diaz S, Garcia-Rodriguez LA. Epidemiologic assessment of the safety of conventional nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med.* 2001;110:20S-27S.
17. Yang ZF, Wang HW, Zheng YQ, Zhang Y, Liu YM, Li CZ. Possible arrhythmogenic mechanism produced by ibuprofen. *Acta Pharmacol Sin.* 2008 Apr;29(4):421-9.
18. Jakovljević V, Savić M, Kučević I, Djurić A, Ranković A, Radisavljević M, Azanjac A, Djurić DM (2005) The effects of dipyridamole on coronary flow, nitrite outflow and oxidative stress during coronary autoregulation in isolated rat heart. *Medicus;* 6(2): 57-61.
19. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351-358.
20. Auclair C, Voisin E (1985) Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research.* CRC Press, Boca Raton, pp 123-132.
21. Pick E, Keisari Y (1980) A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 38:161-170.
22. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite and [15 N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131-138.
23. Zivkovic V, Djuric D, Turjacanin-Pantelic D, Marinkovic Z, Stefanovic D, Srejavic I, Jakovljevic V. The effects of cyclooxygenase and nitric oxide synthase inhibition on cardiodynamic parameters and coronary flow in isolated rat hearts. *Exp Clin Cardiol.* 2013 Spring;18(2):e102-10.
24. Herbertson MJ, Werner HA, Studer W, Russell JA, Walley KR. Decreased left ventricular contractility during porcine endotoxemia is not prevented by ibuprofen. *Crit Care Med.* 1996 May;24(5):815-9.
25. Beamer KC, Daly T, Vargish T. Hemodynamic evaluation of ibuprofen in canine hypovolemic shock. *Circ Shock.* 1987;23(1):51-7.
26. Kristóf A, Husti Z, Koncz I, Kohajda Z, Szél T, Juhász V, Biliczki P, Jost N, Baczkó I, Papp JG, Varró A, Virág L. Diclofenac prolongs repolarization in ventricular muscle with impaired repolarization reserve. *PLoS One.* 2012;7(12):e53255.
27. Blain H, Boileau C, Lopicque F, Nédélec E, Loeuille D, Guillaume C, Gaucher A, Jeandel C, Netter P, Jouzeau JY. Limitation of the in vitro whole blood assay for predicting the COX selectivity of NSAIDs in clinical use. *Br J Clin Pharmacol.* 2002 Mar;53(3):255-65.
28. Varas-Lorenzo C, Riera-Guardia N, Calingaert B, Castellsague J, Salvo F, Nicotra F, Sturkenboom M, Perez-Gutthann S. Myocardial infarction and individual nonsteroidal anti-inflammatory drugs meta-analysis of observational studies. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2013 Apr 25. doi: 10.1002/pds.3437.
29. Takayama F, Egashira T, Yamanaka Y. Effect of diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug, on lipid peroxidation caused by ischemia-reperfusion in rat liver. *Jpn J Pharmacol.* 1994 Feb;64(2):71-8.
30. Hermann M, Camici G, Fratton A, Hurlimann D, Tanner FC, Hellermann JP, Fiedler M, Thiery J, Neidhart M, Gay RE, Gay S, Lüscher TF, Ruschitzka F. Differential effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitors on endothelial function in salt-induced hypertension. *Circulation.* 2003 Nov 11;108(19):2308-11.
31. Wilkinson BL, Cramer PE, Varvel NH, Reed-Geaghan E, Jiang Q, Szabo A, Herrup K, Lamb BT, Landreth GE. Ibuprofen attenuates oxidative damage through NOX2 inhibition in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2012 Jan;33(1):197.e21-32.
32. Zhao Y, McLaughlin D, Robinson E, Harvey AP, Hookham MB, Shah AM, McDermott BJ, Grieve DJ. Nox2 NADPH oxidase promotes pathologic cardiac remodeling associated with Doxorubicin chemotherapy. *Cancer Res.* 2010 Nov 15;70(22):9287-97.