



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Јована Н. Јеремић

**Кардиопротективни ефекти диалил трисулфида на  
исхемијско-реперфузиону повреду изолованог срца  
пацова са метаболичким синдромом: улога  
оксидационог стреса**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Коментори: др сци. мед. Невена Јеремић, доцент  
др Suresh Tyagi, редовни професор

Крагујевац, 2019. године

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

|   |
|---|
| <b><i>I Аутор</i></b>   |
| Име и презиме: Јована Јеремић   |
| Датум и место рођења: 31.12.1991. године, Крагујевац, Србија  |
| Садашње запослење: асистент за ужу научну област Фармацеутска биотехнологија, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу  |
|   |
| <b><i>II Докторска дисертација</i></b>  |
| Наслов: Кардиопротективни ефекти диалил трисулфида на исхемијско-реперфузиону повреду изолованог срца пацова са метаболичким синдромом: улога оксидационог стреса   |
| Број страница: 191  |
| Број слика: 20 слика, 9 схема, 45 графика, 12 табели  |
| Број библиографских података: 328   |
| Установа и место где је рад израђен: Лабораторија за кардиоваскуларну физиологију, Институт Факултета медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац, Србија   |
| Научна област (УДК): Медицина   |
| Ментор: др сци. мед. Невена Јеремић, доцент<br>др Suresh Tyagi, редовни професор  |
|   |
| <b><i>III Оцена и одбрана</i></b>   |
| Датум пријаве теме: 8.3.2018. године  |
| Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-878/11 од 5.11.2018. године   |
| Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: <ol style="list-style-type: none"><li>1. Проф. др Слободан Новокмет, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Фармацеутска биотехнологија</i>, председник;</li><li>2. Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Физиологија</i>, члан;</li><li>3. Проф. др Драган Ђурић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област <i>Физиологија</i>, члан;</li><li>4. Доц. др Маријана Станојевић Пирковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Биохемија</i>, члан;</li><li>5. Доц. др Иван Срејовић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Физиологија</i>, члан.</li></ol> |
| Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: <ol style="list-style-type: none"><li>1. Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Физиологија</i>, председник;</li><li>2. Проф. др Слободан Новокмет, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Фармацеутска биотехнологија</i>, члан;</li><li>3. Проф. др Драган Ђурић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област <i>Физиологија</i>, члан.</li></ol>  |
| Датум одбране дисертације:  |

## САЖЕТАК

Циљ овог истраживања био је да се испитају ефекти хроничне примене диалил трисулфида (ДАТС), најснажнијег и најважнијег природног донора водоник сулфида изолованог из белог лука, код здравих, пацова са дијабетес мелитусом (ДМ) и пацова са метаболичким синдромом (МетС). Посебна пажња усмерена је ка испитивању кардиопротективне улоге ДАТС-а, у *ex vivo* индукованој исхемијско-реперфузионој (И/Р) повреди миокарда, али и његовој способности да умањи манифестације дијабетеса и метаболичког синдрома. У ову експерименталну, хроничну студију било је укључено 72 пацова *Wistar albino* соја који су разврстани у 6 основних група: здрави пацови нетретирани и третирани ДАТС-ом (КТР и ДАТС), ДМ пацови нетретирани и третирани ДАТС-ом (ДМ и ДМ+ДАТС) и МетС пацови нетретирани и третирани ДАТС-ом (МС и МС+ДАТС). Третман ДАТС-ом подразумевао је тронедељну *per os* примену ДАТС-а сваког другог дана у дози од 40 mg/kg. Након хроничног третмана, животиње су жртвоване, при чему се свака од основних група разврставала на две подгрупе у зависности од протокола на *Langendorff*-овом апарату (90 минута ретроградна перфузија или И/Р повреда миокарда). ДАТС, примењен код наведених група пацова, показао је значајне кардиопротективне ефекте, побољшао је опоравак миокарда и допринео очувању његове функције након И/Р повреде. Такође, код пацова са ДМ значајно је умањио нивое глукозе, док је код пацова са МетС-ом ублажио манифестације ове болести (који се огледају кроз смањење нивоа триглицерида, холестерола, глукозе, инсулина и крвног притиска). ДАТС, највероватније преко комплексних механизма, који укључују антиоксидационе, антиинфламацијске и антиапоптоске ефекте остварује кардиопротекцију и доприноси у ограничавању И/Р повреде и очувању функције миокарда. Показани протективни ефекти ДАТС-а, од посебног су значаја за будућа истраживања, која би испитивала додатне терапијске могућности и механизме који су одговорни за његову фармаколошку активност. Такође, увођење ДАТС-а у терапијски алгоритам може имати велики значај у смислу унапређења, разумевања и терапијске примене нових видова прекондиционарања у исхемијској болести срца, што би олакшало лечење многобројне популације болесника и уједно имало несумњив економски значај.

**Кључне речи:** диалил трисулфид, дијабетес, метаболички синдром, изоловано срце, исхемија/реперфузија.

## ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of chronic administration of diallyl trisulfide (DATS), distinguished as the most potent natural donor of hydrogen sulfide isolated from garlic, in healthy, diabetic rats (DM) and metabolic syndrome (MetS) rats. The focus was to examine the cardioprotective role of DATS in *ex vivo*-induced myocardial ischemia-reperfusion (I/R) injury, but also to its ability to reduced symptoms of DM and MetS. This chronic, experimental study, included 72 *Wistar albino* rats, divided into 6 main groups: healthy rats untreated and treated with DATS (CTRL and DATS), DM rats untreated and treated with DATS (DM, DM+DATS), and MetS rats untreated and treated with DATS (MS and MS+DATS). DATS treatment consisted of three weeks *per os* administration of DATS every other day at a dose of 40 mg/kg. After chronic treatment, the animals were sacrificed and each of the main groups were divided into two subgroups depending on the protocol on the Langendorff apparatus (90 minutes retrograde perfusion or I/R myocardial injury). DATS treatment showed significant cardioprotective effects, improved myocardial recovery and contributed to the preservation of its function after I/R injury. Also, DATS treatment significantly decreased glucose levels in DM rats, while in rats with MetS DATS treatment alleviated the symptoms of disease (reflected by a decrease in triglyceride, cholesterol, glucose, insulin and blood pressure). DATS, most likely via complex mechanisms, which include antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects, exerts cardioprotection and contributes to limiting I/R injury and preserving myocardial function. The aforementioned effects of DATS are of particular relevance for future research that would examine additional therapeutic possibilities and mechanisms responsible for its pharmacological activity. Also, the introduction of DATS into a therapeutic algorithm can be of undoubted importance in terms of understanding and therapeutic application of new types of preconditioning in ischemic heart disease, which would facilitate the treatment of a large population of patients and have unquestionable economic significance.

**Key words:** diallyl trisulfide, diabetes, metabolic syndrome, isolated heart, ischemia/reperfusion.

Ову докторску дисертацију чини више од 47 хиљада речи, а свака од њих, производ је вишегодишњег учења, константног рада, енергије и знања, не само мене као аутора, већ и мојих цењених колега.

На путу развоја мене, као истраживача, стоји проф. др Владимир Јаковљевић, као путоказ који усмерава толико, да не намеће своје ставове и путеве, већ дозвољава да се умерено развијам, док корачам путевима које сама откривам. Овакав приступ, пробудио је жељу у мени, да широм отворених очију посматрам свет око себе и трагам за новим одговорима. Овакав приступ изградио је мене као научника.

Неисцрпну мотивацију већ годинама налазим у свом ментору, доц. др Невени Јеремић. Њена посвећеност и широко знање проткани су кроз ову докторску дисертацију, чинећи је комплетном. Она је прва која је веровала у мене и велика ми је част што сам њен први докторант.

Велику захвалност дугујем и ментору, професору *Suresh Tyagi*, који годинама уназад, своје богато искуство из света науке несебично дели са нама.

Данас је пред вама једна од круна сарадње Лабораторије за кардиоваскуларну физиологију, где своје знање и вишегодишње искуство деле моје колеге које су експериментални део овог рада обогатили својим саветима и пружили ми помоћ и подршку кад год је требало проф. др Владимиру Живковићу, доц. др Ивану Срејовићу, доц. др Исидори Милосављевић и доц. др Тамари Николић Турнић. Ако се речима може исказати захвалност, желим да знате да сам бескрајно захвална и својим колегама Марку Равићу, Јовани Брадић, Александри Стојановић, Аници Петковић, Катарини Радоњић, Јасмини Сретеновић, Маји Савић, Невени Драгинић, Маријани Анђић и Марини Ранковић, који путевима науке корачају раме уз раме са мном и подстичу ме да се константно развијам и усавршавам.

Хвала Предрагу Равићу и Љиљани Ђоковић, на помоћи у лабораторијском раду, као и Душану Томашевићу, на техничкој подршци. А пре свега, велико им хвала, што су увек оптимистични, ведри и насмејани.

Велику захвалност дугујем и члановима своје катедре, а пре свега проф. др Слободану Новокмету и доц. др Исидори Милосављевић, на свој подршци и подстреку током претходних година.

Неизмерну захвалност дугујем и проф. др Слободанки Митровић и доц. др Немањи Јовичићу који су своје знање и вештине несебично поделили са мном и увели ме у свет патохистолошких метода.

Хвала Мићи, који је увек ту за мене и који мој успех чини комплетним.

Захваљујем се свима који су учинили да се осећам поносно на свој научни допринос, који ће са искуством у будућности бити све већи и значајнији.

*Своју докторску дисертацију посвећујем породици, мами Весни, тати Ненаду и сестри Александри, који ми пружају сву подршку и разумеју моју посвећеност науци.*

## САДРЖАЈ

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. УВОД</b>  | <b>2</b>  |
| <b>1.1. ВОДОНИК СУЛФИД КАО СИГНАЛНИ МОЛЕКУЛ</b>   | <b>2</b>  |
| 1.1.1. Биосинтеза, метаболизам и елиминација H <sub>2</sub> S                                   | 3         |
| 1.1.2. Биолошки ефекти H <sub>2</sub> S   | 5         |
| <b>1.2. ДОНОРИ H<sub>2</sub>S</b>   | <b>7</b>  |
| 1.2.1. Синтетички донори H <sub>2</sub> S   | 8         |
| 1.2.2. Природни донори H <sub>2</sub> S   | 9         |
| <b>1.3. ДИАЛИЛ ТРИСУЛФИД</b>  | <b>11</b> |
| 1.3.1. Карактеристике ДАТС-А  | 11        |
| 1.3.2. Метаболизам и фармакокинетика ДАТС-А   | 12        |
| <b>1.4. H<sub>2</sub>S И ДОНОРИ H<sub>2</sub>S У КАРДИОВАСКУЛАРНИМ БОЛЕСТИМА: УЛОГА ДАТС-А</b>  | <b>14</b> |
| 1.4.1. H <sub>2</sub> S и исхемијско/реперфузиона повреда миокарда                              | 15        |
| 1.4.2. H <sub>2</sub> S и дијабетес мелитус   | 16        |
| 1.4.2.1. H <sub>2</sub> S и дијабетес мелитус тип 1   | 17        |
| 1.4.2.2. H <sub>2</sub> S и метаболички синдром/дијабетес мелитус тип 2                         | 18        |
| <b>1.5. ЗАШТИТНЕ УЛОГЕ H<sub>2</sub>S И ДОНОРА H<sub>2</sub>S У КАРДИОВАСКУЛАРНИМ БОЛЕСТИМА</b> | <b>20</b> |
| 1.5.1. Антиоксидациони ефекти   | 20        |
| 1.5.2. АнтиапоптоТСКИ ефекти  | 22        |
| 1.5.3. Антиинфламацијски ефекат   | 23        |
| <b>2. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ</b>  | <b>26</b> |
| <b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b>  | <b>28</b> |
| <b>3.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ</b>  | <b>29</b> |
| <b>3.2. <i>IN VIVO</i> ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ</b>   | <b>29</b> |
| 3.2.1. Стрептозотоцином индукован дијабетес   | 33        |
| 3.2.1.1. Експериментални модел за изазивање дијабетес мелитуса тип 1                            | 33        |
| 3.2.1.2. Експериментални модел за изазивање метаболичког синдрома                               | 34        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.2.2. ХРОНИЧНИ ТРЕТМАН ПАЦОВА   | 35        |
| 3.2.3. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦОВА ПРАЋЕНЕ IN VIVO ТОКОМ ХРОНИЧНОГ ПРОТОКОЛА                   | 35        |
| 3.2.4. МЕРЕЊА НАКОН ТРОНЕДЕЉНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ   | 36        |
| 3.2.4.1. In vivo срчана функција   | 36        |
| 3.2.4.2. Липидни параметри мерени у серуму пацова  | 37        |
| 3.2.4.3. Нивои инсулина и глукозе током теста оралног оптерећења глукозом (ОГТТ)         | 38        |
| 3.2.4.4. Мерење крвног притиска и фреквенце срца   | 38        |
| 3.2.4.5. Биохемијско одређивање системских прооксидационих и антиоксидационих параметара | 39        |
| 3.2.4.5.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS)                    | 39        |
| 3.2.4.5.2. Одређивање нитрита ( $\text{NO}_2^-$ )  | 40        |
| 3.2.4.5.3. Одређивање супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ )                       | 41        |
| 3.2.4.5.4. Одређивање водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )                       | 42        |
| 3.2.4.5.5. Одређивање активности каталазе (CAT)  | 42        |
| 3.2.4.5.6. Одређивање активности супероксид дисмутазе (SOD)                              | 43        |
| 3.2.4.5.7. Одређивање редукованог глутатиона (GSH)                                       | 43        |
| 3.2.4.6. Одређивање нивоа $\text{H}_2\text{S}$ у плазми                                  | 44        |
| 3.2.4.7. Одређивање нивоа хомоцистеина (Hcy) у серуму                                    | 44        |
| <b>3.3. EX VIVO ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ</b>   | <b>45</b> |
| 3.3.1. ПРИНЦИПИ РЕТРОГРАДНЕ ПЕРФУЗИЈЕ СРЦА: LANGENDORFF-ОВА ТЕХНИКА                      | 46        |
| 3.3.1.1. Опис Langendorff-овог апарата   | 47        |
| 3.3.1.2. Изоловање и препарација срца пацова   | 48        |
| 3.3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ EX VIVO ПРОТОКОЛ: 90 МИНУТА РЕТРОГРАДНЕ ПЕРФУЗИЈЕ СРЦА            | 50        |
| 3.3.3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ EX VIVO ПРОТОКОЛ: 30 МИНУТА ИСХЕМИЈЕ И 60 МИНУТА РЕПЕРФУЗИЈЕ      | 50        |
| 3.3.4. МАРКЕРИ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА МЕРЕНИ У КОРОНАРНОМ ВЕНСКОМ ЕФЛУЕНТУ                  | 51        |
| 3.3.4.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS)                      | 51        |
| 3.3.4.2. Одређивање нитрита ( $\text{NO}_2^-$ )  | 51        |
| 3.3.4.3. Одређивање супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ )                         | 52        |
| 3.3.4.4. Одређивање водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )                         | 52        |
| <b>3.4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛИ НА ТКИВУ МИОКАРДА</b>                                  | <b>52</b> |
| 3.4.1. ПАТОХИСТОЛОШКА АНАЛИЗА ТКИВА МИОКАРДА   | 52        |
| 3.4.1.1. Бојење ткива миокарда хематоксилин/еозин методом                                | 53        |
| 3.4.1.2. Бојење срчаног тропонина T  | 53        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.4.1.3. ТУНЕЛ есеј   | 54        |
| 3.4.2. РЕЛАТИВНА ЕКСПРЕСИЈА АНТИОКСИДАЦИОНИХ, (АНТИ)АПОПТОТСКИХ И (АНТИ)ИНФЛАМАЦИЈСКИХ ГЕНА У ЛЕВОЈ КОМОРИ СРЦА   | 55        |
| 3.4.2.1. Квантитативна полимеразна ланчана реакција у реалном времену (RT-PCR)                                    | 57        |
| <b>3.5. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА</b>   | <b>59</b> |
| <b>4. РЕЗУЛТАТИ</b>   | <b>61</b> |
| <b>4.1. ЕФЕКТИ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА ЗДРАВЕ ПАЦОВЕ</b>  | <b>61</b> |
| 4.1.1. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦОВА ПРАЂЕНЕ ТОКОМ ХРОНИЧНОГ ПРОТОКОЛА  | 61        |
| 4.1.2. ФУНЦИЈА МИОКАРДА ПРАЂЕНА IN VIVO   | 63        |
| 4.1.3. ЛИПИДНИ ПАРАМЕТРИ МЕРЕНИ НАКОН ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ  | 64        |
| 4.1.4. НИВОИ ИНСУЛИНА И ГЛУКОЗЕ ТОКОМ ТЕСТА ОРАЛНОГ ОПТЕРЕЂЕЊА ГЛУКОЗОМ (ОГТТ)                                    | 65        |
| 4.1.5. КРВНИ ПРИТИСАК И СРЧАНА ФРЕКВЕНЦА  | 67        |
| 4.1.6. НИВОИ ПРООКСИДАЦИОНИХ И АНТИОКСИДАЦИОНИХ ПАРАМЕТАРА МЕРЕНИ У СИСТЕМСКОЈ ЦИРКУЛАЦИЈИ                        | 68        |
| 4.1.7. НИВОИ ВОДНИК СУЛФИДА И ХОМОЦИСТЕИНА У СЕРУМУ   | 70        |
| 4.1.8. EX VIVO ПРОТОКОЛ: 90 МИНУТА РЕТРОГРАДНЕ ПЕРФУЗИЈЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА                                   | 71        |
| 4.1.8.1. Кардиодинамски параметри   | 71        |
| 4.1.8.2. Прооксидациони маркери мерени у коронарном венском ефлуенту  | 73        |
| 4.1.8.3. Бојење срчаног ткива хематоксилин/еозин методом  | 75        |
| 4.1.9. EX VIVO ПРОТОКОЛ: 30 МИНУТА ИСХЕМИЈЕ И 60 МИНУТА РЕПЕРФУЗИЈЕ   | 76        |
| 4.1.9.1. Кардиодинамски параметри   | 76        |
| 4.1.9.2. Прооксидациони параметри мерени у коронарном венском ефлуенту  | 78        |
| 4.1.9.3. Бојење срчаног ткива хематоксилин/еозин методом  | 80        |
| 4.1.9.4. Бојење тропонина Т у ткиву миокарда  | 81        |
| 4.1.9.5. ТУНЕЛ тест   | 82        |
| 4.1.9.6. Релативна експресија антиоксидационих, (анти)апоптотских и (анти)инфламацијских гена у левој комори срца | 83        |
| <b>4.2. ЕФЕКТИ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА ПАЦОВЕ СА ДИЈАБЕТЕСОМ</b>  | <b>86</b> |
| 4.2.1. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦОВА ПРАЂЕНЕ ТОКОМ ХРОНИЧНОГ ПРОТОКОЛА  | 86        |
| 4.2.2. ФУНЦИЈА МИОКАРДА ПРАЂЕНА IN VIVO   | 88        |



|   |            |
|---|------------|
| 4.2.3. Липидни ПАРАМЕТРИ МЕРЕНИ НАКОН ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ  | 89         |
| 4.2.4. НИВОИ ПРООКСИДАЦИОНИХ И АНТИОКСИДАЦИОНИХ ПАРАМЕТАРА МЕРЕНИ У СИСТЕМСКОЈ ЦИРКУЛАЦИЈИ                        | 90         |
| 4.2.5. НИВОИ ВОДНИК СУЛФИДА И ХОМОЦИСТЕИНА У СЕРУМУ   | 92         |
| 4.2.6. ЕХ VIVO ПРОТОКОЛ: 90 МИНУТА РЕТРОГРАДНЕ ПЕРФУЗИЈЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА                                   | 93         |
| 4.2.6.1. Кардиодинамски параметри   | 93         |
| 4.2.6.2. Прооксидациони маркери мерени у коронарном венском ефлуенту  | 95         |
| 4.2.6.3. Бојење срчаног ткива хематоксилин/еозин методом  | 97         |
| 4.2.7. ЕХ VIVO ПРОТОКОЛ: 30 МИНУТА ИСХЕМИЈЕ И 60 МИНУТА РЕПЕРФУЗИЈЕ   | 98         |
| 4.2.7.1. Кардиодинамски параметри   | 98         |
| 4.2.7.2. Прооксидациони параметри мерени у коронарном венском ефлуенту  | 100        |
| 4.2.7.3. Бојење срчаног ткива хематоксилин/еозин методом  | 102        |
| 4.2.7.4. Бојење тропонина Т у ткиву миокарда  | 103        |
| 4.2.7.5. ТУНЕЛ тест   | 104        |
| 4.2.7.6. Релативна експресија антиоксидационих, (анти)апоптотских и (анти)инфламацијских гена у левој комори срца | 105        |
| <b>4.3. ЕФЕКТИ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА ПАЦОВЕ СА МЕТАБОЛИЧКИМ СИНДРОМОМ</b>   | <b>108</b> |
| 4.3.1. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦОВА ПРАЂЕНЕ ТОКОМ ХРОНИЧНОГ ПРОТОКОЛА  | 108        |
| 4.3.2. ФУНЦИЈА МИОКАРДА ПРАЂЕНА IN VIVO   | 110        |
| 4.3.3. Липидни ПАРАМЕТРИ МЕРЕНИ НАКОН ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ  | 111        |
| 4.3.4. НИВОИ ИНСУЛИНА И ГЛУКОЗЕ МЕРЕНИ ТОКОМ ТЕСТА ОПТЕРЕЂЕЊА ГЛУКОЗОМ (ОГТТ)                                     | 112        |
| 4.3.5. КРВНИ ПРИТИСАК И СРЧАНА ФРЕКВЕНЦА  | 114        |
| 4.3.6. НИВОИ ПРООКСИДАЦИОНИХ И АНТИОКСИДАЦИОНИХ ПАРАМЕТАРА У СИСТЕМСКОЈ ЦИРКУЛАЦИЈИ                               | 115        |
| 4.3.7. НИВОИ ВОДНИК СУЛФИДА И ХОМОЦИСТЕИНА У СЕРУМУ   | 117        |
| 4.3.8. ЕХ VIVO ПРОТОКОЛ: 90 МИНУТА РЕТРОГРАДНЕ ПЕРФУЗИЈЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА                                   | 118        |
| 4.3.8.1. Кардиодинамски параметри   | 118        |
| 4.3.8.2. Прооксидациони параметри мерени у коронарном венском ефлуенту  | 120        |
| 4.3.8.3. Бојење срчаног ткива хематоксилин/еозин методом  | 122        |
| 4.3.9. ЕХ VIVO ПРОТОКОЛ: 30 МИНУТА ИСХЕМИЈЕ И 60 МИНУТА РЕПЕРФУЗИЈЕ   | 123        |

|   |     |
|---|-----|
| 4.3.9.1. Кардиодинамски параметри   | 123 |
| 4.3.9.2. Прооксидациони параметри мерени у коронарном венском ефлуенту  | 125 |
| 4.3.9.3. Бојење срчаног ткива хематоксилин/еозин методом  | 127 |
| 4.3.9.4. Бојење тропонина Т у ткиву миокарда  | 128 |
| 4.3.9.5. ТУНЕЛ тест   | 129 |
| 4.3.9.6. Релативна експресија антиоксидационих, (анти)апоптотских и (анти)инфламацијских гена у левој комори срца | 130 |

## **5. ДИСКУСИЈА** **134**

---

### **5.1. ЕФЕКТИ ДИАЛИЛ ТРИСУЛФИДА НА ЗДРАВЕ ПАЦОВЕ** **136**

|   |     |
|---|-----|
| 5.1.1. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦОВА И БИОХЕМИЈСКЕ ПАРАМЕТРЕ (БЕЗБЕДНОСНИ АСПЕКТИ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ)                          | 136 |
| 5.1.2. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА НИВОЕ ВОДНИК СУЛФИДА И ХОМОЦИСТЕИНА (ДАТС КАО ДОНОР ВОДНИК СУЛФИДА)   | 137 |
| 5.1.3. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА ОКСИДАЦИОНИ СТАТУС (АНТИОКСИДАЦИОНИ ПРОФИЛ ДАТС-А КОД ЗДРАВИХ ПАЦОВА)   | 138 |
| 5.1.4. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА СРЧАНУ ФУНКЦИЈУ (КАРДИОПРОТЕКТИВНИ ПРОФИЛ ДАТС-А КОД ЗДРАВИХ ПАЦОВА)  | 139 |
| 5.1.5. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА ЕХ VIVO ИНДУКОВАНУ И/Р ПОВРЕДУ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА (ДАТС КАО ПРЕКОНДИЦИОНИРАЈУЋИ АГЕНС КОД ЗДРАВИХ ПАЦОВА) | 140 |

### **5.2. ЕФЕКТИ ДИАЛИЛ ТРИСУЛФИДА НА ПАЦОВЕ СА ДИЈАБЕТЕСОМ ТИП 1** **145**

|   |     |
|---|-----|
| 5.2.1. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦОВА И БИОХЕМИЈСКЕ ПАРАМЕТРЕ (АНТИДИЈАБЕТСКИ КАПАЦИТЕТ ДАТС-А)                   | 145 |
| 5.2.2. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА ВРЕДНОСТИ ВОДНИК СУЛФИДА И ХОМОЦИСТЕИНА (ДАТС КАО ДОНОР ВОДНИК СУЛФИДА КОД ПАЦОВА СА ДИЈАБЕТЕСОМ) | 146 |
| 5.2.3. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА (АНТИОКСИДАЦИОНИ КАПАЦИТЕТ ДАТС-А КОД ПАЦОВА СА ДИЈАБЕТЕСОМ)        | 148 |
| 5.2.4. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА ФУНКЦИЈУ МИОКАРДА (КАРДИОПРОТЕКТИВНИ КАПАЦИТЕТ ДАТС-А КОД ПАЦОВА СА ДИЈАБЕТЕСОМ)                  | 149 |

|   |            |
|---|------------|
| 5.2.5. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА ЕХ VIVO ИНДУКОВАНУ И/Р ПОВРЕДУ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА (ДАТС КАО ПРЕКОНДИЦИОНИРАЈУЋИ АГЕНС КОД ПАЦОВА СА ДИЈАБЕТЕСОМ)            | 151        |
| <b>5.3. ЕФЕКТИ ДИАЛИЛ ТРИСУЛФИДА НА ПАЦОВЕ СА МЕТАБОЛИЧКИМ СИНДРОМОМ</b>  | <b>155</b> |
| 5.3.1. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦОВА И БИОХЕМИЈСКЕ ПАРАМЕТРЕ (ПОТЕНЦИЈАЛ ДАТС-А ДА СМАЊИ МАНИФЕСТАЦИЈЕ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА)                  | 155        |
| 5.3.2. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНЕ УПОТРЕБЕ ДАТС-А НА НИВОЕ ВОДНИК СУЛФИДА И ХОМОЦИСТЕИНА (ДАТС КАО ДОНОР ВОДНИК СУЛФИДА КОД ПАЦОВА СА МЕТАБОЛИЧКИМ СИНДРОМОМ)                          | 159        |
| 5.3.3. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА (АНТИОКСИДАЦИОНИ КАПАЦИТЕТ ДАТС-А КОД ПАЦОВА СА МЕТАБОЛИЧКИМ СИНДРОМОМ)                           | 160        |
| 5.3.4. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА СРЧАНУ ФУНКЦИЈУ (КАРДИОПРОТЕКТИВНИ КАПАЦИТЕТ ДАТС-А КОД ПАЦОВА СА МЕТАБОЛИЧКИМ СИНДРОМОМ)                                       | 162        |
| 5.3.5. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА ЕХ VIVO ИНДУКОВАНУ И/Р ПОВРЕДУ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА (ДАТС КАО ПРЕКОНДИЦИОНИРАЈУЋИ АГЕНС КОД ПАЦОВА СА МЕТАБОЛИЧКИМ СИНДРОМОМ) | 163        |
| <b>5.4. ПОРЕЂЕЊЕ ЕФЕКТА ДАТС-А ИЗМЕЂУ ЗДРАВИХ, ПАЦОВА СА ДИЈАБЕТЕСОМ И ПАЦОВА СА МЕТАБОЛИЧКИМ СИНДРОМОМ</b>   | <b>166</b> |
| <b>5.5. БУДУЋА ИСТРАЖИВАЊА</b>  | <b>167</b> |
| <b>6. ЗАКЉУЧЦИ</b>  | <b>170</b> |
| <b>7. РЕФЕРЕНЦЕ</b>   | <b>172</b> |

# I

## УВОД

## 1. УВОД

### 1.1. ВОДОНИК СУЛФИД КАО СИГНАЛНИ МОЛЕКУЛ

Водоник сулфид ( $H_2S$ ) први пут је описан 1713. године као веома отрован гас. Од тада,  $H_2S$  био је познат само као еколошки и индустријски загађивач, способан да се веже за цитохром у митохондријама и да инхибира ћелијско дисање. Данас је добро познато да на овај начин  $H_2S$  оштећује неколицину органских система. Нелагодан, карактеристичан мирис "покварених јаја" допринео је томе да  $H_2S$  дуги низ година буде познат само као отрован гас (1, 2). Међутим, од 1950-их до 1970-их година интензивно су проучавани ензими укључени у путеве синтезе  $H_2S$  (3).  $H_2S$  је први пут пронађен у мозгу пацова 1989. године, а касније, током деведесетих година објављено је да се природно синтетише у ћелијама и ткивима и да има улогу као сигнални молекул (4, 5).

Данас је познато да заједно са азот моноксидом (NO), угљен моноксидом (CO) и метаном ( $CH_4$ ),  $H_2S$  чини породицу ендогено синтетисаних гасних сигналних молекула који се једним именом називају гасотрансмитери (6).

$H_2S$  задовољава свих шест критеријума за гасотрансмитере (7, 8):

1.  $H_2S$  је гас мале молекулске масе, делимично растворан у биолошкој средини у слободној или везаној форми и непотпуно дисосован на  $HS^-$ ;
2.  $H_2S$  слободно дифундује кроз ћелијске мембране и може да делује ендокрино и паракрино;
3.  $H_2S$  се ендогено и ензимски синтетише у ћелијама сисара, како у физиолошким, тако и у патофизиолошким стањима;
4.  $H_2S$ , у физиолошким концентрацијама, има прецизно дефинисане специфичне функције у организму;
5. ендогене функције  $H_2S$  могу да се замене егзогено примењеним брзо или споро ослобађајућим донорима  $H_2S$ ;
6.  $H_2S$  је укључен у сигналну трансдукцију, индукује S-сулфхидратацију многих протеина, регулише нивое и активност бројних секундарних гласника и има специфичне ћелијске и молекулске мете, односно циљеве у организму.

### 1.1.1. Биосинтеза, метаболизам и елиминација $H_2S$

$H_2S$  је најједноставнији тиол који се може наћи у ћелијама, а ендогено се синтетише ензимским и неензимским путевима. Неензимски,  $H_2S$  се може генерисати помоћу неколико механизма. Наиме, еритроцити, у комбинацији са глукозом, сумпором, никотинамид аденин динуклеотидом (NADH) и/или никотинамид аденин динуклеотид фосфатом (NADPH) (који служе као носачи електрона) и редукованим глутатионом (GSH), могу спонтано да реагују са сумпором и да синтетишу  $H_2S$  (9). Такође, кластери гвожђа и сумпора, персулфиди у неуронима и астроцитима су важан извор неензимски генерисаног  $H_2S$  (10, 11).

Ендогени  $H_2S$  се у ткивима у високом проценту (96%) синтетише заједно са аминокиселинама које садрже сумпор, односно L-цистеином и L-хомоцистеином (Hcy). L-цистеин се транссулфурацијом синтетише из L-метионина, док L-хомоцистеин и L-цистатинин генеришу  $H_2S$  уз пиридоксал 5'-фосфат (витамин Б6) који служи као кофактор (12). У недавно објављеној студији показано је да за производњу  $H_2S$  може да се користи D-цистеин који се метаболише D-амино оксидазом (DAO) (13). Ове аминокиселине метаболишу се у реакцијама транссулфурације и трансминације уз учешће четири ензима, који се једним именом називају "H<sub>2</sub>S-синтетишући ензими", у које се убрајају: цистатинин  $\gamma$ -лиаза (CSE), цистатинин  $\beta$ -синтаза (CBS), цистеин аминотрансфераза (CAт) и 3-меркаптопируват сулфуртрансфераза (3-MST). Кључне реакције у синтези  $H_2S$  су: десулфурација L-цистеина у пируват (реакција:  $\alpha$ ,  $\beta$ -елиминација) помоћу ензима CSE; кондензација L-хомоцистеина са L-цистеином (реакција:  $\beta$ -замена) и десулфурација L-цистеина у L-серин (реакција:  $\beta$ -елиминација) помоћу CBS ензима; трансминација L-цистеина са  $\alpha$ -кетоглутаратом уз посредство CAт и производњу 3-меркаптопирувата (3MP). Такође,  $H_2S$  се може синтетисати посредством 3-MST и кофактора (глутатион, тиоредоксин и дихидролипоична киселина) (14, 15).

Постоје и многи други алтернативни извори  $H_2S$ : десулфурација L-цистеина у L-тиоцистеин (реакција:  $\alpha$ ,  $\beta$ -елиминација) помоћу CSE; кондензација два молекула L-хомоцистеина (реакција:  $\gamma$ -замена) на L-хомолантион помоћу CSE; десулфурација L-хомоцистеина до L-хомосерина помоћу CSE; кондензација два молекула L-цистеина (реакција:  $\beta$ -замена) на L-лантионин уз учешће CSE или CBS; као и реакције независне од пиридоксал 5'-фосфата: оксидација D-цистеина до 3-меркаптопирувата помоћу D-

амино киселинске оксидазе (DAAO); редукција тиосулфат-анјона помоћу тиосулфат-дителиол сулфуртрансферазе (TST) (14-17). Алтернативни извори нису толико значајни за синтезу H<sub>2</sub>S у физиолошким концентрацијама, али у многоме могу утицати на производњу H<sub>2</sub>S код хиперхомоцистеинемije или хиперцистеинемije, које се често јављају заједно (18) (Схема 1).

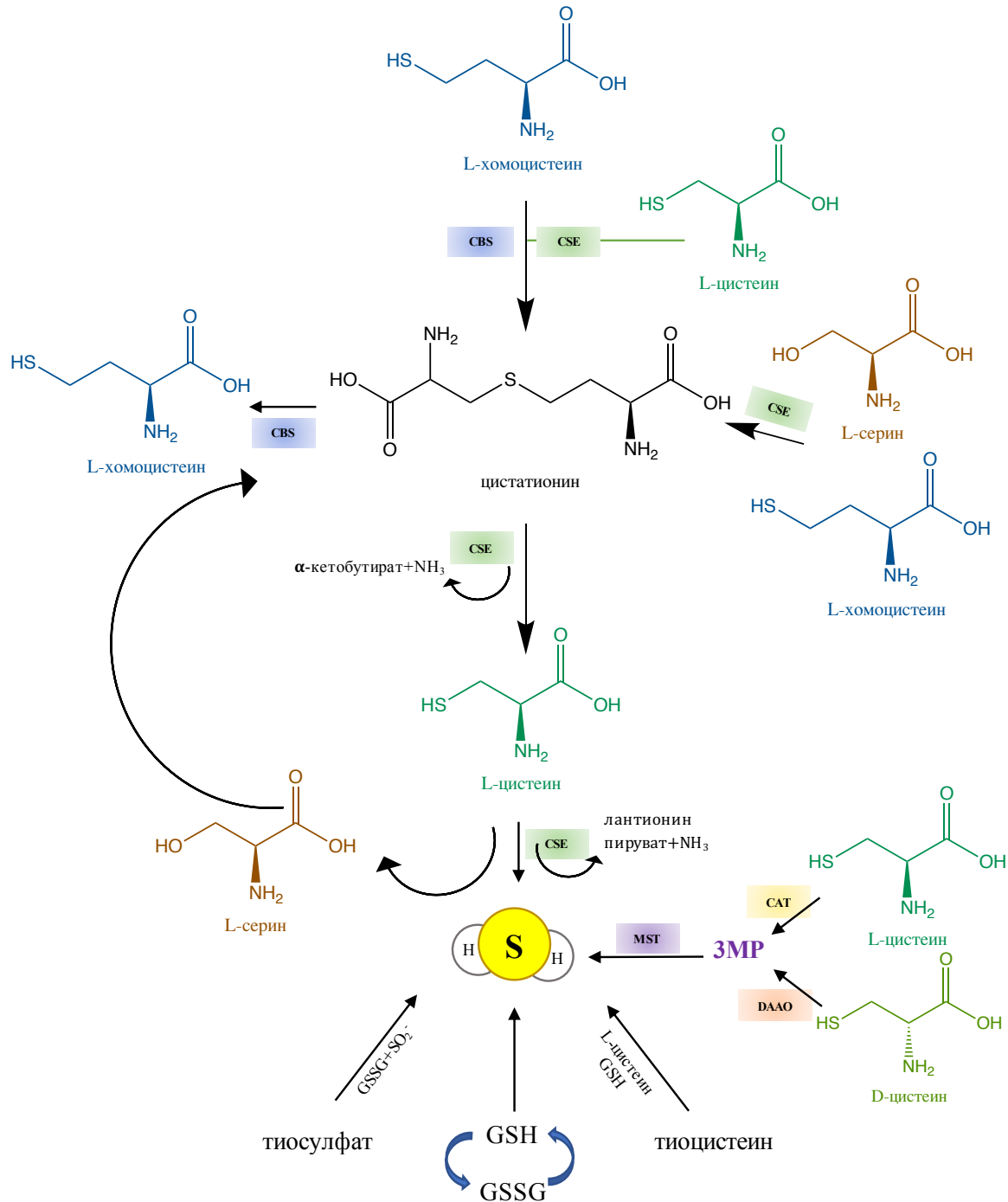


Схема 1. Најважнији путеви генерисања H<sub>2</sub>S (биосинтеза и катаболизам) (12-18).

$H_2S$  је безбојан гас, растворљив у води, који је релативно стабилан у свим телесним течностима. У физиолошким условима, концентрација  $H_2S$  се креће између 30 и 300  $\mu M$  у плазми и крви, али у неким ткивима може бити виша (на пример у мозгу је 3 пута већа). Ниво  $H_2S$  у хуманом ткиву, као и у биолошким течностима, углавном зависи од старости особе, али се вредности могу значајно разликовати и у зависности од примењене методе мерења (12, 17).

Слободни  $H_2S$  (у циркулацији или у цитоплазми) може се везати за метхемоглобин, метало- или дисулфидне-макромолекуле, јер у својој структури имају сулфан-сумпор, односно везани сулфат (19). Да би се одржала физиолошка равнотежа,  $H_2S$  се може дезинтегрисати кроз неколико процеса. Прво,  $H_2S$  се оксидује у митохондријама до тиосулфата уз посредство неколико ензима као што су кинон оксидоредуктаза, S-диоксигеназа и S-трансфераза. Након тога се тиосулфат може конвертовати у сулфит, а потом и у сулфат као крајњи производ. Сулфид-кинон редуктаза је митохондријални ензим чија је кључна улога оксидација  $H_2S$  (20). Такође, метиловање до метантиола и диметилсулфида преко тиол S-метилтрансферазе у цитосолу може бити један од могућих механизма за метаболизам  $H_2S$ , а са друге стране не сме се заборавити ни способност  $H_2S$  да се метаболише приликом његове интеракције са метхемоглобином, при чему настаје сулфхемоглобин.  $H_2S$  се елиминише као слободни сулфат, слободни сулфид или тиосулфат преко мокраће, флатуса и издах (21).

### ***1.1.2. Биолошки ефекти $H_2S$***

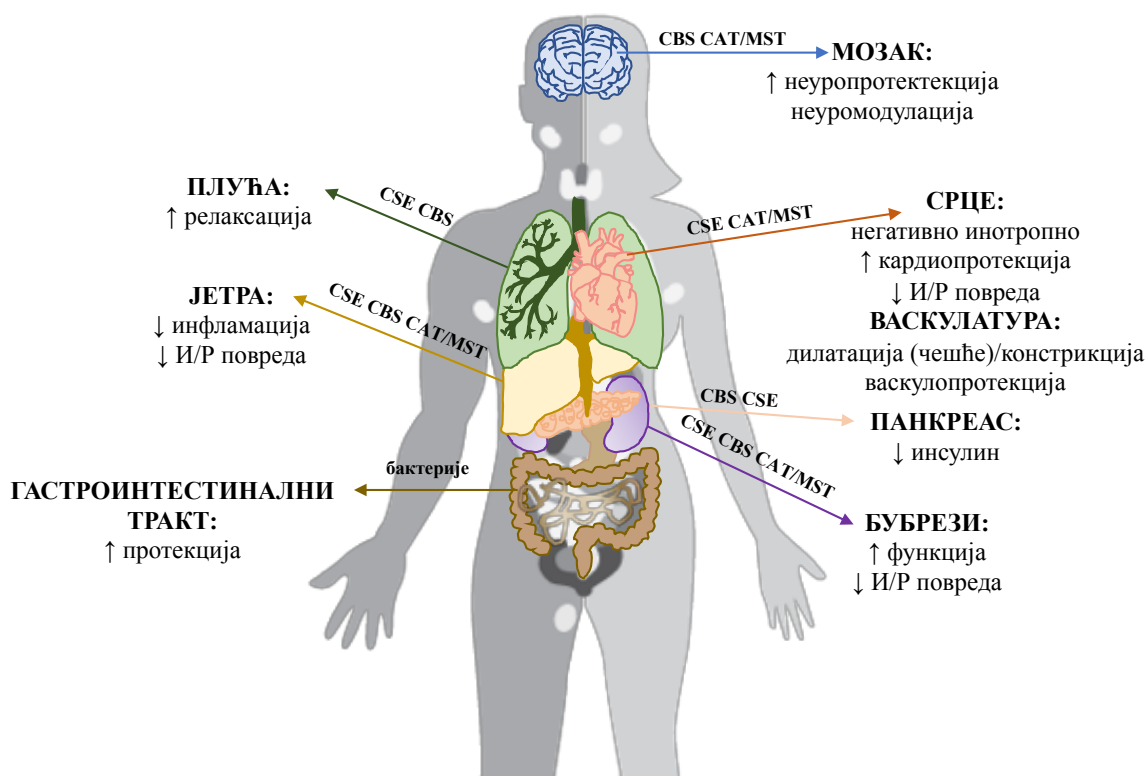
У последњих неколико деценија дошло је до вишеструког напретка у познавању улоге и механизма којима  $H_2S$  утиче на физиолошке и патофизиолошке процесе. Оптимални нивои  $H_2S$  доприносе хомеостази организма, а абнормално повећана или смањена производња  $H_2S$  често може бити повезана са појединим патофизиолошким стањима. До данас је познат велики број биолошких ефеката, ендеогеног и егзогено примењеног  $H_2S$ , али се ова листа увећава готово на недељном нивоу (11, 16).

$H_2S$  се може синтетисати у различитим органима помоћу претходно споменутих ензима, како у анималном, тако и у хуманом организму. CBS је водећи извор  $H_2S$  у



централном нервном систему, док је CSE водећи извор у васкуларном систему, али је такође присутан у јетри и бубрезима. Нижа експресија CSE и смањена ендогена продукција  $H_2S$  повезана је са различитим кардиоваскуларним болестима (КВБ), као што су метаболички синдром (МетС), дијабетес мелитус (ДМ), хипертензија, атеросклероза и друге (18, 19).  $H_2S$  поседује кардиопротективне ефекте код инфаркта миокарда и срчане инсуфицијенције и може спречити атеросклерозу и помоћи у лечењу болести периферних артерија. Примећено је да  $H_2S$  штити од исхемијско-реперфузионе (И/Р) повреде срца, бубрега, јетре и мозга (20). Такође, у фокусу научних испитивања су и антиинфламацијска, као и неуропротективна својства  $H_2S$  (18, 21).

Дистрибуција ендогеног  $H_2S$ , као и продукција ензима у ткивима сисара је веома сложена. Најважнији физиолошки ензими одговорни за производњу, као и различите физиолошке и патолошке функције  $H_2S$  приказане су на **Схеми 2**.



**Схема 2.** Најважнији физиолошки ензими одговорни за производњу  $H_2S$ , као и његове различите физиолошке и патолошке улоге у организму човека.

Интересантно је напоменути да су ензими који су укључени у производњу  $H_2S$  присутни у многобројним ћелијама и ткивима, а њихова експресија може бити подстакнута различитим обољењима. Научници су најчешће проучавали обољења

кардиоваскуларног, гастроинтестиналног, ендокриног и нервног система и њихову повезаност са  $H_2S$  (22).

Примењен у кратком временском периоду (у болусу) или при високој концентрацији  $H_2S$  постаје токсичан. Механизми одговорни за токсичне ефекте  $H_2S$  укључују инхибицију митохондријалног ензима цитохром С-оксидазе и митохондријалну респирацију (16). Стога, да би се разумеле биолошке улоге  $H_2S$  и развио адекватан терапијски приступ, неопходна су једињења која могу да ослободе  $H_2S$  у организму, такозвани донори  $H_2S$  (23).

## 1.2. ДОНОРИ $H_2S$

Донори  $H_2S$ , односно агенси који ослобађају  $H_2S$ , се примењују са циљем да *in vivo* повећају његову концентрацију. У последњој деценији, развој нових донора  $H_2S$  доживео је експанзију, тако да се данас испитују различите групе једињења са истим циљем (23, 24). Треба напоменути да донори  $H_2S$ , због различитог механизма дејства, немају исте способности ослобађања  $H_2S$ , тако да су и њихови ефекти, често сасвим различити (25). Због тога је, пре него што се отпочне са истраживањима, првенствено неопходан избор одговарајућег донора  $H_2S$ .

Једињења попут неорганских сулфидних соли, у које се убрајају натријум сулфид ( $Na_2S$ ) и натријум хидроген сулфид ( $NaHS$ ), се тестирају већ дуги низ година.  $NaHS$  дисосује на  $Na^+$  и  $HS^-$ , делимично се везује за  $H^+$ , при чему се синтетише  $H_2S$ . Главна предност сулфидних соли је њихова способност да врло брзо повећавају концентрацију  $H_2S$ , а да уз то не стварају споредне производе. Са друге стране, главни проблем, односно недостатак ове врсте донора је то што је ослобађање  $H_2S$  веома тешко контролисати. Наиме, одмах након растварања сулфидних соли у воденим пуферима ослобађа се  $H_2S$ , међутим, у првих пет минута губи се готово половина (26, 27). Ови недостаци су допринели потрази за новим донорима  $H_2S$  који пружају истраживачима могућност да контролишу дозу, дужину трајања, време и место ослобађања.

Данас се донори  $H_2S$  према начину синтезе могу класификовати на синтетичке и природне, међу којима, се према брзини синтетисања  $H_2S$ , могу разликовати спори и брзи донори (23-27).

### 1.2.1. Синтетички донори $H_2S$

Многи синтетички донори  $H_2S$  се активирају хидролизом, а у овом поглављу биће описани само најистраживанији из ове групе.

**GY4137** као један од највише проучаваних, комерцијално доступних донора  $H_2S$ , је у води растворљив дериват *Lawesson*-овог реагенса. Примарно је синтетисан као вулканизациони агенс за гуме 1957. године. Овај споро ослобађајући донор, ослобађа  $H_2S$  у фосфатном пуферу при чему, значајно дуже одржава максималну концентрацију  $H_2S$  у односу на  $NaHS$  (~10 минута *vs.* ~10 секунди) (28). Са друге стране, максимална, такозвана пик концентрација  $H_2S$ , у случају **GY4137** је приближно 40 пута нижа него за  $NaHS$ . Такође, иако и  $NaHS$  и **GY4137** смањују крвни притисак, **GY4137** узрокује спорији и дуготрајнији пад, док  $NaHS$  иницира само акутни, пролазни, вазодилаторни ефекат (28, 29). Међутим, постоји неколико недостатака који се доводе у везу са **GY4137**. Он се синтетише као дихлорометански комплекс чијим метаболизмом се ослобађа  $CO$ , тако да неки од ефеката који се приписују  $H_2S$  могу заправо да потичу и од угљен монооксида. Такође, постоје и нуспродукти који настају након хидролизе **GY4137** и компликују закључке у научно-истраживачким студијама (30). Због ових недостатака развијене су серије фосфородитиоатних аналога **GY4137**, који су познати као **JK донори  $H_2S$**  (31).

Још једна интересантна група донора  $H_2S$ , који се такође активирају хидролизом, је класа **дитиолтионских (ДТТ)** једињења. Они се једноставно синтетишу и могу да награде коњугат ДТТ-лек. Међутим, количине  $H_2S$  које се ослободе помоћу ДТТ-а остају нејасне. У најновијим истраживањима, ДТТ се испитују у комбинацији са нестероидним антиинфламацијским лековима (НСАИЛ) са идејом да се кроз комбиновану испоруку постигне синергистички ефекат (32).

**Тиол-активирани донори  $H_2S$**  представљају бројну групу која укључује: *N*-бензоилтиобензамиде, арилтиоамиде, ацил пертиоле, дитиопероксианхидриде, полисулфиде, *S*-арилтиооксиде, и друге. Донори из ове групе могу ослободити  $H_2S$  нуклеофилном адицијом, разменом дисулфида, раскидањем *S-S* везе или другим механизмима. Сви они су синтетисани са идејом да се њихови ефекти могу контролисати на основу сумпорних веза ( $-SH$ ,  $-S-$ ,  $-S-S-$ ) које се налазе у њиховим структурама (33).

**Донори активирани светлошћу** користе видљиво светло као окидач за продукцију  $H_2S$ . Овај тип донора је користан за *in vivo* студије јер се може изабрати регија у коју светлост треба да продре, односно у регију где треба да дође до ослобађања  $H_2S$  без модификовања природних биохемијских процеса. У ову групу се убрајају: геминал-дитиоли (енгл. *geminal-dithiols*), кетопрофенски деривати (енгл. *ketoprofenate photocages*), алфа тиоетарски кетони (енгл. *alpha-thioetherketones*). На пример, геминал-дитиоли су синтетисани третирањем *орто*-нитробензилтиола или сродних деривата, ацетоном и адекватном концентрацијом титанијум (IV) хлорида ( $TiCl_4$ ), чија је улога у везивању два тиола преко тиоацеталне везе (33, 34). *Орто*-нитро група када је изложена UV светлости (365 nm) се раскида, при чему се добија геминални дитиолни интермедијер. Овај интермедијер хидролизује и генерише  $H_2S$  релативно брзо (33-35), тако да сви донори ослобађају  $H_2S$  у периоду од око 30 минута. Такође, важно је напоменути да је за ослобађање  $H_2S$  неопходна UV светлост (35).

Употреба **ензима као окидача за ослобађање  $H_2S$**  такође пружа неке од предности у односу на друге поменуте окидаче. Ензими су присутни у свим живим организмима и често су специфични за супстрат и ткиво. У комбинацији, ови донори-ензими могу да омогуће специфично везивање лека за ткиво од интереса. Иако је до сада познато само неколико оваквих донора-ензима, сматра се да ће тек у наредним годинама овај тип донора доживети своју експанзију (36-38).

### 1.2.2. Природни донори $H_2S$

Донори  $H_2S$  који постоје у природи одлични су за *in vivo* испитивања, посебно јер се најчешће без бојазни, могу примењивати у хуманој популацији. Различите врсте полисулфида су изоловане из великог броја биљака, али научници широм света, најчешће као најадекватније бирају оне који се могу изоловати из лука, па су самим тим они највише и проучавани (39).

Род *Allium* (породица *Alliaceae/Liliaceae*), у који се убрајају бели лук (*Allium sativum L.*), црни лук (*Allium cepa L.*), влашац (*Allium schoenoprasum L.*), сремеш (*Allium ursinum L.*), и други, је још од давнина познат у лечењу бројних обољења (40). Иако су детаљи о заштитним механизмима још увек нејасни и захтевају даља истраживања,

многи аутори претпостављају да је већина благотворних учинака рода *Allium* узрокована сумпорним једињењима (41, 42). Богата органосумпорна једињења која се налазе у белом луку, у интеракцији са тиолним групама или једињењима која садрже тиол из биолошких система повећавају биорасположивост  $H_2S$  (40, 43).

Сиров, неоштећен чен белог лука садржи  $\gamma$ -глутамилцистеин, који може да хидролизује или оксидује и формира неактивни дериват цистеина познат као алин (енгл. *alliin*, S-алил цистеин сулфоксид). Било које оштећење белог лука резањем, дробљењем или ингестијом активира ензим алиназу (енгл. *Allinase*, *alliin lyase*) који метаболише алин у алицин (енгл. *allicin*, диалил тиосулфинат), преко формирања алилсулфенске киселине (44). Формирање алицина је изузетно брзо и за око 6 секунди скоро половина алина се претвара у алицин при чему се ослобађа пирувична киселина и амонијак (45). Алицин као веома нестабилан, активан метаболит без мириса, подложен је даљој оксидацији и врло брзо се разлаже на друга једињења која садрже сумпор, алил сулфиде, S-алилмеркаптоцистеин, винилдитиин и ајоен (42). Алил сулфиди изоловани из белог лука међусобно се разликују само по броју атома сумпора који раздвајају две терминалне алил групе, при чему најчешће настају диалил дисулфид (ДАДС), диалил трисулфид (ДАТС) и диалил сулфид (ДАС) (46) (Схема 3).

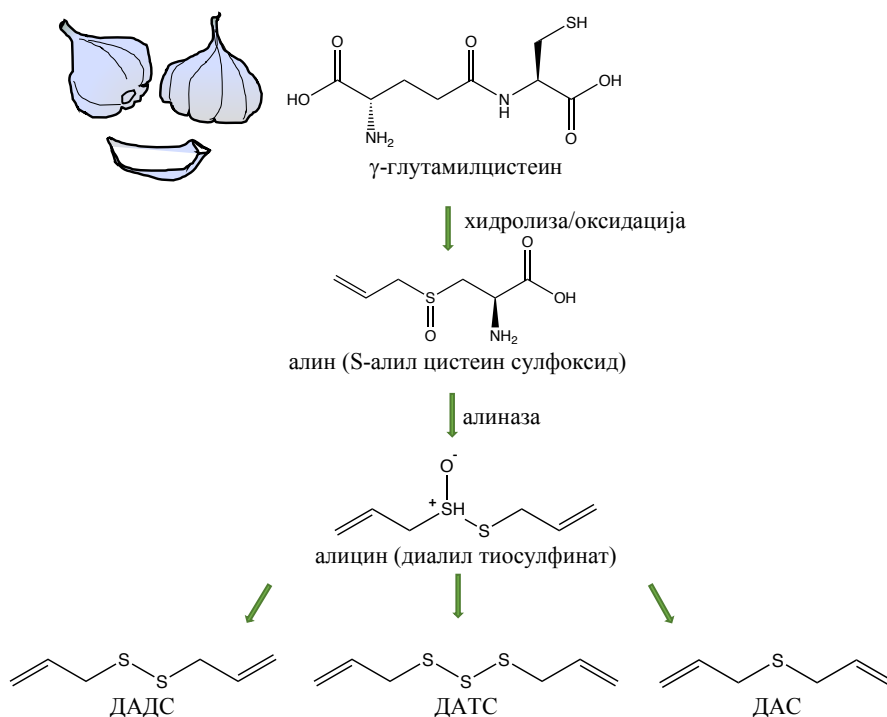


Схема 3. Пут синтезе органосумпорних једињења (донора  $H_2S$ ) изолованих из белог лука.

Ова класа донора се посебно издваја јер је повезана са најнижим степеном токсичности, а уз то предност је и што су поједини донори комерцијално доступни. Главни недостаци ДАС-а, ДАДС-а и ДАТС-а су то што нису подложни структурним, хемијским трансформацијама, имају слабу растворљивост у води и генеришу различите нуспродукте након ослобађања  $H_2S$  (47). Поред тога, изоловање ових једињења из белог лука може смањити жељене физиолошке ефекте. Међутим, потребна су даља истраживања да би се описали и објаснили сви детаљи и улоге ове групе донора (48).

На основу истраживања *Miles*-а и *Kraus*-а, еритроцити уз присуство слободних тиола су неопходни за конверзију ДАС-а, ДАДС-а и ДАТС-а у  $H_2S$ . У организму, уз еритроците најчешће природни тиоли, попут редукованог глутатиона (GSH), цистеина, хомоцистеина и N-ацетилцистеина, учествују у ослобађању  $H_2S$  (49). Такође, утврђено је да ДАТС, као полисулфид са највећим бројем атома сумпора у својој структури, се издваја као најснажнији и најважнији полисулфид изолован из белог лука (50). Имајући то у виду, наше истраживање је осмишљено са циљем да испита могуће кардиопротективне ефекте ДАТС-а на различитим анималним моделима.

### 1.3. ДИАЛИЛ ТРИСУЛФИД

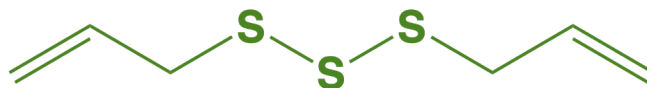
#### 1.3.1. Карактеристике ДАТС-а

До маја 2019. године објављено је скоро 400 научних радова (прегледних и оригиналних истраживања) о ДАТС-у, који се могу наћи у *PubMed* бази података. Међутим и даље нису потпуно јасни поједини детаљи о ДАТС-у и његовим карактеристикама, па су даља истраживања неопходна како би се сазнале све специфичности о овом полисулфиду. Такође, важно је напоменути да је већина радова који су се бавили ДАТС-ом објављена у последњих 10 година, што је уједно и показатељ актуелности истраживања.

Са три атома сумпора у својој структури, ДАТС се издваја као најреактивније органосумпорно једињење изоловано из белог лука. Стабилнији је од добро проучених неорганских сулфидних соли ( $NaHS$  и  $Na_2S$ ), а  $H_2S$  ослобађа споро и током дужег

временског периода (50, 51).

ДАТС је такође познат као алитридин, 4,5,6-тритиа-1,8-нонадиен, односно ди-(2-пропенил) трисулфид са формулом  $S(SCH_2CH=CH_2)_2$  (51). У литератури се за ДАТС спомињу и друга имена попут, алитриди, алитридијум, алил трисулфид, дасуансу (52). На основу хемијске структуре ДАТС се може класификовати као алифатични алкен трисулфид (51) (**Схема 4**).



**Схема 4.** Диалил трисулфид, органосумпорно једињење изоловано из белог лука.

Када је реч о растворљивости, ово испарљиво, жуто уље са специфичним мирисом белог лука, растворљиво је у ацетону, а слабо растворљиво у етанолу (3 mg/ml), диметил сулфоксиду (5 mg/ml), 2-пропанолу и диметилформаиду (10 mg/ml) (53).

### 1.3.2. Метаболизам и фармакокинетика ДАТС-а

Код људи, одмах након конзумације сировог белог лука или других производа белог лука, у издисају се могу идентификовати алил меркаптан, алил метил сулфид, алил метил дисулфид, ДАС и ДАДС. Са друге стране, помоћу течне хроматографије високих перформанси (HPLC), гасне хроматографије (GC), масене спектрометрије (MS) или њихове комбинације, у урину се могу идентификовати метаболити попут N-ацетил-S-(2-карбоксипропил)-цистеина, N-ацетил-S-алилцистеина и хексахидро-хипурна киселина (54-56).

Треба имати у виду да су велики напори уложени да се *in vivo* измере нивои појединих алил сулфида и других метаболита белог лука. Споменуте методе се заправо односе на идентификацију метаболита након ингестије белог лука и имају ниску осетљивост и селективност за директно, *in vivo* мерење нивоа ДАТС-а и самим тим нису специфични за његово одређивање. Метаболизам ДАТС-а је још увек недовољно познат, при чему је његова фармакокинетика истраживана у само неколико студија. Sun и његови сарадници су концентрацију ДАТС-а у крви пацова одређивали користећи GC и идентификовали његов главни метаболит помоћу GC-MS. Они су закључили да је тешко

одредити нивое ДАТС-а због његове испарљивости, UV-апсорпције и нестабилности. Овај полисулфид је сам по себи, толико нестабилан да нема времена за центрифугирање и одвајање плазме да би се тачно измерила његова концентрација у крви, али је познато да су нивои ДАТС-а значајно смањени када органски растварач под атмосферским притиском испари до сува. Такође, ацетонитрил се мора директно додати у узорке крви да би се зауставила деградација и тиме успорио његов метаболизам (53).

После двонедељног третмана ДАТС-ом (интраперитонеално, у дози од 10 mmol/kg телесне тежине на дан), примећено је значајно повећање активности кинон редуктазе, глутатион пероксидазе и глутатион S-трансферазе код пацова (57). Исто тако, ДАТС који је *per os* примењиван код пацова у дози од 89 mg/kg/дан током шест узастопних дана, значајно је повећао активност кинон редуктазе и глутатион S-трансферазе у различитим ткивима (58). Активност глутатион S-трансферазе је такође, значајно повећана након 6 недеља конзумирања ДАТС-а (70 mg/kg три пута недељно) код пацова, док је активност N-нитрозодиметиламин деметилазе смањена (59). На основу података из литературе, зна се да еритроцити богати GSH могу довести до ослобађања H<sub>2</sub>S из ДАТС-а. Биолошки тиоли, посебно мембрански протеини који у себи имају тиол групу уз трансмембранске редуктаза системе, играју важну улогу у производњи H<sub>2</sub>S. NADH, NADPH и GSH одржавају ниво биолошких тиола, чиме се одржава и производња H<sub>2</sub>S (60). С обзиром да блокирање тиол групе у мембранским протеинима не спречава производњу H<sub>2</sub>S у потпуности, ДАТС пролази кроз мембрану и интереагује са интрацелуларним GSH при чему долази до синтетисања H<sub>2</sub>S (61-63). Додавање ДАТС-а у концентрацији од 50 μM до 500 μM у раствор глутатиона доводи до тренутне производње H<sub>2</sub>S, док додавање ДАТС у концентрацији од 50 μM у раствор глутатиона не доводи до детектабилне концентрације H<sub>2</sub>S. На основу истраживања *Liang*-а и сарадника, ДАТС вероватно реагује са GSH преко тиол-дисулфидне размене и генерише алил меркаптан и S-алил глутатион-дисулфид, док у случају ДАТС-а постоје два могућа тиол-дисулфидна нуклеофилна напада на GSH. Алил сумпор генерише S-алил глутатион-дисулфид и алил-пертиол. Редукција са GSH или централним атомом сумпора ДАТС доводи до производње алил меркаптана и S-алил глутатион трисулфида уз ослобађање H<sub>2</sub>S. Након тога, концентрација ових једињења се уз присуство GSH смањује, при чему се ослобађа H<sub>2</sub>S (64).



#### 1.4. H<sub>2</sub>S И ДОНОРИ H<sub>2</sub>S У КАРДИОВАСКУЛАРНИМ БОЛЕСТИМА: УЛОГА ДАТС-а

Кардиоваскуларне болести (КВБ) представљају групу најзначајнијих хроничних обољења широм света и водећи су узрочници изненадне смрти. Добро је познато да КВБ чине 45% свих смртних случајева у Европи, односно да сваке године изазивају преко 4 милиона смртних случајева у Европи и око 1,8 милиона смртних случајева у Европској унији (65). Термин КВБ се користи за стања која погађају срце и/или крвне судове, али такође могу бити повезане са оштећењем и повредама артерија, како у срцу тако и у мозгу, бубрезима и очима (66). Примарне болести укључене у КВБ су хронична срчана инсуфицијенција, хипертензија и коронарна артеријска обољења (попут атеросклерозе). Иако се овим болестима може управљати различитим лековима, дугорочна прогноза и контрола компликација и даље су на веома лошем нивоу. Узимајући у обзир претходно наведено, као и да је у популацији све већи број пацијената који се лече неодговарајућом терапијом, постоји снажан подстицај да се пронађу третмани, који би били ефикаснији у лечењу, ублажавању знакова и симптома или, још боље у спречавању настанка КВБ (67). Последњих година, све већи број студија је спроведен како би се испитале улоге H<sub>2</sub>S и његових донора у КВБ-ма срца и крвних судова (68). У овом делу биће описани само неки од познатих протективних ефеката H<sub>2</sub>S.

До данас је добро утврђено да H<sub>2</sub>S може утицати на васкулатуру глатких мишића тако што изазива релаксацију или контракцију. Једна од најважнијих улога H<sub>2</sub>S је способност да активира АТФ зависне калијумове канале (К-АТФ), чијом се активацијом у ћелијама глатких мишића постиже хиперполаризација и релаксација, док је у срцу исти механизам одговоран за кардиопротекцију (69). H<sub>2</sub>S такође утиче на ниво неколико проинфламацијских цитокина као што су нуклеарни фактор-κВ (NF-κВ), интерлеукин (IL)-6, IL-8 и фактор некрозе тумора алфа (TNF-α) (70). Осим тога, H<sub>2</sub>S смањује стварање водоник пероксида и повећава ниво GSH (71).

У овој студији, фокус је био на испитивању биолошких ефеката H<sub>2</sub>S и његовог донора ДАТС-а, релевантних за кардиоваскуларни систем, посебно исхемију/реперфузију (И/Р), дијабетес мелитус (ДМ) и метаболички синдром (МетС). Поред тога, с обзиром да су Нсу и хиперхомоцистеинемија (ННсу) постали широко

признати као важни маркери ризика за КВБ, покушали смо да објаснимо и повежемо утицај ДАТС-а на нивое Нсу, посебно у наведеним болестима.

#### **1.4.1. H<sub>2</sub>S и исхемијско/реперфузиона повреда миокарда**

Исхемија миокарда најчешће настаје услед оклузије крвних судова. Поред оштећења срца која настају у тренутку исхемије, битно је напоменути и да након поновног успостављања протока крви долази до продукције низа стресогених фактора па се зато и повреде миокарда називају исхемијско/реперфузионе (И/Р). Исхемија представља чест клинички симптом у КВБ, а услед ниских рН вредности, смањеног нивоа кисеоника и поремећаја у концентрацији K<sup>+</sup> и Ca<sup>2+</sup>, може доћи до срчане дисфункције, аритмија, инфаркта миокарда и изненадне смрти (72). Са друге стране, оштећење и умањена функција миокарда настали услед исхемије могу се поправити током реперфузије. Међутим, најчешће као резултат активације комплексног инфламацијског одговора у реперфузионом периоду долази до иререверзибилног оштећења које се назива реперфузиона повреда (73, 74). Фактори који доприносе И/Р повреди су веома комплексни и поред већ споменутих, укључују микроваскуларне дисфункције, ослобађање реактивних врста кисеоника (енгл. *reactive oxygen species*, ROS), као и активацију митохондријалне апоптозе и некрозе. Због тога је неопходно разумети потенцијалне механизме који доводе до И/Р повреде миокарда, побољшати кардиопротективне стратегије и пронаћи нова једињења, такозване прекондиционарајуће агенсе, како би се побољшао капацитет миокарда и смањено ризик од настанка кардиоваскуларних догађаја (75).

Као што је раније споменуто, H<sub>2</sub>S се убраја у веома значајне сигналне молекуле кардиоваскуларног система. Кардиопротективни ефекти H<sub>2</sub>S испитивани су на различитим експерименталним моделима И/Р повреде, *in vivo*, *ex vivo* и на кардиомиоцитима (76-78). H<sub>2</sub>S вероватно активира сложене механизме који се супротстављају онима који доводе до повреде миокарда у И/Р, чиме изазива кардиопротективне ефекте. На основу података из литературе, кардиопротективни механизми укључују PI3K/Akt, протеин киназу С (PKC), екстрацелуларно регулисану киназу (ERK) 1/2, и Nrf2 (енгл. *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*) (79). Уз ове, у

литератури је предложено и много других кардиопротективних механизма  $H_2S$ : регулација протеинске киназе B, ендотелне азотмоноксид синтазе (eNOS) (80), комбинација антиапоптотских, антиинфламацијских и антиоксидационих ефеката (81), инхибиција митохондријалног комплекса IV, повећање активности супероксид дисмутазе (SOD) (82), активирање експресије протеина топлотног шока (HSP) 72 (83), K-АТФ/РКС зависна индукција експресије циклооксигеназе 2 (COX-2) и NO-индукована активација COX-2 (84), као и активација РКС да би се регулисали интрацелуларни нивои  $Ca^{2+}$  (85) и други.

$H_2S$  такође побољшава штетне физиолошке промене изазване оклузијом аорте и обезбеђује заштиту од И/Р повреде смањујући ћелијску некрозу, повећавајући експресију фосфорилваног p44/42 MAPK и смањујући експресију протеина бекалин-1 (86). Примећено је да NaHS смањује величину инфаркта миокарда који утиче на пут цикличног гуанозин монофосфата (cGMP)/протеин киназа G (PKG) (87), али се и многи други донори  $H_2S$  испитују као агенси за прекондиционирање.

#### **1.4.2. $H_2S$ и дијабетес мелитус**

Дијабетес мелитус (ДМ) представља групу комплексних метаболичких поремећаја, коју углавном карактерише повишен ниво глукозе у крви, као и поремећај производње инсулина. Глукоза, али и различити стимулуси, као што су сулфониуреа и аргинин су одговорни за производњу инсулина, хормона који се синтетише у бета ћелијама панкреаса (88, 89). Хронично повећање нивоа глукозе може довести до макро и микроваскуларних компликација, углавном на нивоу бубрега и срца. Поред хипергликемије и хиперлипидемије, оксидациони стрес игра значајну улогу у патогенези дијабетеса и настанку бројних компликација (90).

Сматра се да је дијабетес достигао размере глобалне епидемије, јер данас постоји око 390 милиона пацијената са овом дијагнозом широм света. Током наредних неколико година, предвиђа се удвостручење преваленце, односно да ће овом болешћу бити погођено више од пола милијарде људи.

Постоје бројне класификације дијабетеса, али је Америчка асоцијација за дијабетес (2018) разврстала ову болест на 4 основне категорије:

- дијабетес мелитус тип 1 (Т1ДМ), познат као ДМ зависан од инсулина;
- дијабетес мелитус типа 2 (Т2ДМ), познат као ДМ независан од инсулина;
- гестацијски дијабетес, први пут дијагностикован у другом или трећем триместру трудноће;
- специфични типови дијабетеса (генетски условљен услед мутације појединих гена или дефеката у дејству инсулина, услед болести егзокриног панкреаса и ендокриних обољења, изазван лековима или другим хемијским агенсима, индукован инфекцијама) и дијабетес код младих.

Међутим, у популацији се најчешће јављају два основна типа ДМ: Т1ДМ и Т2ДМ (91), а у оба је испитивана улога  $H_2S$ . Такође, посебна пажња је посвећена кардиомиопатији у дијабетесу, која је дефинисана постојањем абнормалних структура и/или функција миокарда, која се јавља као једна од компликација ДМ. *Sun* и сарадници су у својој студији показали да  $H_2S$  може побољшати енергетски метаболизам срчаног ткива, тако што повећава експресију и активност SIRT3 и смањује инфламацију, оксидациони стрес и апоптозу (92).

#### 1.4.2.1. $H_2S$ и дијабетес мелитус тип 1

У Т1ДМ због аутоимуне или идиопатске деструкције бета ћелија панкреаса, које производе инсулин, постоји недостатак секреције инсулина који доводи до хипергликемије, инфилтрације моноцита, лимфоцита, мешавине псеудоатрофичних острваца на панкреасу и прогресије болести. Т1ДМ је један од најчешћих ендокриних и метаболичких хроничних болести и обично доводи до апсолутног недостатка инсулина у организму пацијента (93).

Патофизиологија Т1ДМ је повезана са перзистентним присуством два или више аутоантитела, а на основу недавно објављених водича у Т1ДМ могу се идентификовати 3 различите фазе (стадијума) овог обољења:

- стадијум 1 карактерише: аутоимуност, нормогликемија, одсуство симптома;
- стадијум 2 карактерише: аутоимуност, дисгликемија (абнормалност нивоа гликемије у крви било да се јави хипергликемија или хипогликемија), одсуство или благи симптоми;
- стадијум 3 карактерише: хипергликемија уз многобројне симптоме (94).

Улога  $H_2S$  у стању Т1ДМ је засигурно незаобилазна, с обзиром да су на анималним моделима код којих је индукован Т1ДМ, примећени измењени нивои  $H_2S$ , као и експресија ензима који учествују у синтези  $H_2S$ . Такође, све је више доказа о корисним ефектима  $H_2S$  код оболелих од Т1ДМ. *Yusuf* и сарадници су показали да у панкреасу пацова са дијабетесом долази до повишене експресије CSE и CBS ензима, као и повећаног нивоа  $H_2S$  у плазми (95). Такође, код CSE<sup>-/-</sup> мишева примећено је да недостатак овог ензима штити мишеве од стрептозотоцина (СТЗ) тако што спречава да дође до оштећења и дисфункције панкреасних острваца (96). Са друге стране, у појединим студијама је показано да код СТЗ-ом третираних пацова са дијабетесом, као и код људи са дијабетесом, долази до смањења нивоа  $H_2S$  у циркулацији (97, 98).

#### 1.4.2.2. $H_2S$ и метаболички синдром/дијабетес мелитус тип 2

MetC је познат и као синдром X, синдром резистенције на инсулин, полиметаболички синдром, цивилизацијски синдром или смртоносни квартет. Карактерише га група патофизиолошких абнормалности, као што су централна гојазност, инсулинска резистенција, поремећај у толеранцији глукозе, дислипидемије и висок крвни притисак (КП). Међутим, неки пацијенти имају MetC упркос томе што немају све ове абнормалности, стога је тешко поставити дијагнозу метаболичког синдрома (99).

Према најновијем водичу за лечење дијабетеса *Adult Treatment Panel-III*, MetC се дијагностикује када је присутно најмање три од пет следећих абнормалности: висцерална гојазност (обим струка: код мушкараца > 102 cm, код жена > 88 cm); артеријски КП (> 130/85 mm Hg); гликемија у крви (наште > 6 mmol/L); инсулин у крви (наште > 5 mmol/L); триглицериди (> 150 mg/dL); липопротеини високе густине (HDL) (код мушкараца < 40 mg/dL, код жена < 50 mg/dL) (100). Важно је напоменути да присуство MetC-а доводи до повећаног ризика за кардиометаболичке факторе ризика, укључујући Т2ДМ, интолеранцију глукозе, инсулинску резистенцију, абдоминалну гојазност, дислипидемије, безалкохолну масну јетру (енгл. *non-alcoholic fatty liver*, NAFL), хипертензију, као и коронарну или периферну атеросклерозу и инфаркт миокарда. Такође, бројна клиничка стања као што су дислипидемија, хипертензија, NAFL, синдром полицистичних јајника, синдром апнеје у сну, алцхајмерова болест, рак

---

плућа, простате или панкреаса, прихваћена су као могуће клиничке манифестације, односно компликације овог синдрома (101).

*Okamoto* у свом истраживању наводи да је код шестомесечних CSE<sup>-/-</sup> мишева, 8 недеља храњених храном са високим садржајем масти (енгл. *high-fat diet*, HFd), побољшана експресија гена тиоредоксин везујући протеин 2 (енгл. *thioredoxin-binding protein-2*, TBP-2). Имајући у виду да TBP-2 повећава сензитивност инсулина и изазива интолеранцију на глукозу, резултати ове студије указују да је експресија, односно активност CSE укључена у исход и тежину T2DM (102). Као што је већ споменуто, H<sub>2</sub>S смањује КП углавном јер утиче на отварање K-ATP канала у ћелијама васкуларних глатких мишића, али треба имати у виду да су ови канали такође важни за секрецију инсулина у бета ћелијама панкреаса (103). Наиме, H<sub>2</sub>S инхибира секрецију инсулина из бета ћелија активирањем K-ATP канала и инхибирањем L-типа волтажно зависних калцијумских (Ca<sup>2+</sup>) канала (104). H<sub>2</sub>S инхибира преузимање глукозе стимулисано инсулином и смањује осетљивост белих адипоцита на инсулин код пацова, вероватно путем инхибиције транспортера глукозе-4 (ГЛУТ-4) (105). Међутим, у појединим студијама је показано да је синтеза H<sub>2</sub>S повећана код пацова са дијабетесом и да би као терапијски приступ требало испитати инхибицију H<sub>2</sub>S (106, 107). Са друге стране, T2DM се често наводи и као стање које се значајно погоршава услед дефицијенције H<sub>2</sub>S (108-110), јер се зна да H<sub>2</sub>S штити бета ћелије од апоптозе индуковане високим нивоима глукозе (102). Такође, услед хондроитин сулфат пребиотичке дијете, ниво H<sub>2</sub>S се повећава, при чему се стимулише пептид сличан глукагону 1 (енгл. *glucagon like peptide 1*, GLP-1) који изазива антидијабетске ефекте (111).

## 1.5. ЗАШТИТНЕ УЛОГЕ H<sub>2</sub>S И ДОНОРА H<sub>2</sub>S У КАРДИОВАСКУЛАРНИМ БОЛЕСТИМА

Као што је раније споменуто, H<sub>2</sub>S показује различита физиолошка дејства на различитим ткивима и органима, варирајући од срца до мозга, односно од васкулатуре до неурона. Молекуларни механизми који су укључени у кардиопротективне ефекте H<sub>2</sub>S у КВБ-има, последњих деценија добили су велику пажњу у научној јавности (112-114). Најзначајнији заштитни ефекти H<sub>2</sub>S и његових донора у КВБ-има сумирани су у овом поглављу.

Генерално посматрано, H<sub>2</sub>S и његови доноси индукују кардиопротективне ефекте најчешће преко антиоксидационих, антиинфламацијских и антиапоптоских путева, што је и био фокус ове студије.

### 1.5.1. Антиоксидациони ефекти

Оксидациони стрес је процес који се дефинише као неравнотежа између производње прооксидационих и антиоксидационих параметара. У прооксидансе се убрајају слободни радикали који настају у ћелијама током њиховог метаболизма (115). ROS су веома реактивне, нестабилне честице кисеоника, које се састоје од атома, молекула или јона са једним или више неспарених електрона у структури. ROS настају као природни нуспродукти метаболизма кисеоника и имају важну улогу у ћелијској сигнализацији и хомеостази у физиолошким условима. Међутим, услед болести или оксидационог стреса, продукција ROS може се значајно повећати и довести до оштећења структура ћелија. У ROS се убрајају слободни радикали кисеоника и нерадикалске честице кисеоника које се производе у организму. Најважнији слободни радикали кисеоника су супероксидни анјон радикал (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), хидроксилни радикал (OH<sup>-</sup>), пероксилни радикал (ROO<sup>-</sup>), док је најбитнији нерадикал водоник пероксид (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (116, 117). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> је једна од стабилнијих ROS чија производња током оксидационих процеса у стањима инфламације драматично расте (118). Поред запаљења, постоје и многи други извори ROS. У васкуларном систему, значајни извори су NADPH оксидазе који доводе до продукције O<sub>2</sub><sup>-</sup> преношењем електрона из NADPH кроз Nox субјединицу на молекулски

кисеоник. Када говоримо о оксидационом стресу и ROS, веома је важно описати и липидну пероксидацију, тј. инкорпорацију молекуларног кисеоника у структуру полинезасићених масних киселина (енгл. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) (119, 120). Због пероксидације липида долази до смањене флуидности ћелијске мембране, повећане пропустљивости за једновалентне и двовалентне јоне, као и до оштећења система за пренос информација са мембранских рецептора на интрацелуларне системе, а самим тим и до деактивације ензима (121).

Поред ROS, реактивне врсте азота (енгл. *reactive nitrogen species*, RNS) такође имају висок оксидациони потенцијал. Најважнији RNS је азот моноксид ( $\cdot\text{NO}$ ), а услед његовог метаболизма и његове велике реактивности долази до стварања првенствено пероксинитрита ( $\text{ONOO}^-$ ), азот диоксида ( $\text{NO}_2$ ), диазот триоксида ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) и диазот тетраоксида ( $\text{N}_2\text{O}_4$ ). Све ове RNS заједно са ROS имају велики утицај на ћелије (122-124). Антиоксидациони систем одбране има улогу у ограничавању или смањењу (поправљању) оштећења изазваног ROS и RNS. Овај систем обухвата примарну (ензимску и неензимску) и секундарну антиоксидациону заштиту, а антиоксиданси могу деловати пре или током реакције слободних радикала (125). Ензимске компоненте укључују супероксид дисмутазу (SOD), каталазу (CAT), ензиме глутатион редокс циклуса, цитохром оксидазу и друге, док неензимски укључују витамин Е, провитамин А (бета каротен), коензим Q, витамин C (аскорбинску киселину), редуковани глутатион (GSH), мокраћну киселину, албумин, трансферин, биливердин, цистеин, хистидин, и друге (126). У секундарну антиоксидациону заштиту убрајају се компоненте као што су протеин специфичне оксидоредуктазе (тиол трансферазе), протеин ADP рибозил трансферазе и АТФ и  $\text{Ca}^{2+}$  независне протеазе, које могу да обнове ДНК гликозилазу, ДНК полимеразу, ДНК лигазу и ендонуклеазу и поправе новонасталу штету, (127). Осим антиоксидационих молекула који делују унутар ћелијских структура, постоје и молекули који делују ван ћелија. У ову групу се убрајају метални протеини, који задржавају гвожђе и бакар у нереактивној форми и спречавају њихову реакцију са  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{O}_2^-$  (128).

Оксидациони стрес је један од штетних етиолошких фактора и важан механизам за развој КВБ. Хиперлипидемија, хиперинсулинемија и дијабетес повезани су са повећаним оксидационим стресом, што такође може довести до различитих компликација, али и погоршања основне болести.



Повезаност гасотрансмитера и оксидационог стреса проучава се годинама уназад. Међутим, за разлику од NO, јако мало се зна како CO, CH<sub>3</sub> и H<sub>2</sub>S утичу на оксидациони стрес и потребна су опсежнија истраживања која би дала адекватне одговоре. У досадашњој литератури, предложени су поједини механизми којима H<sub>2</sub>S изазива антиоксидационе ефекте. Сматра се да H<sub>2</sub>S највероватније уништава липидне хидропероксиде у оксидованом липопротеину мале густине (ox-LDL) (129, 130) и уклања прооксидансе (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HOCl/OCl и ONO<sup>-</sup>/ONOO<sup>-</sup>). Међутим, у физиолошкој концентрацији, H<sub>2</sub>S не може у потпуности да испољи своје антиоксидационе ефекте, што указује да поред његове хемијске редокс природе постоје и други механизми. Самим тим, KEAP1/Nrf2 пут S-сулфидације може послужити као пример за модулацију хомеостазе редокс равнотеже (131).

*Sun* и сарадници (82) су у свом истраживању открили да H<sub>2</sub>S инхибира активност митохондријалног комплекса IV, повећава активност Mn-SOD и CuZn-SOD и смањује нивое ROS у кардиомиоцитима током И/Р повреде. H<sub>2</sub>S такође смањује липидну пероксидацију уклањањем H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и O<sub>2</sub><sup>-</sup>, на моделу оштећења миокарда изазваног изопротеренолом (107). Активација Nrf2 зависног пута посредованог H<sub>2</sub>S доводи до појачане експресије гена за HO-1, GSH, глутатион S-трансферазу, тиоредоксин и CAT, а сви они су важни у ендегеном антиоксидационом систему заштите. Осим тога, H<sub>2</sub>S има инхибиторни ефекат на фосфодиестеразу-5 (PDE-5), што доводи до смањења стварања NADPH оксидазе, док се ниво антиоксидационих ензима повећава (132).

Све претходно наведено, указује на то да H<sub>2</sub>S може спречити стварање реактивних кисеоничних и азотних врста, уклонити их и самим тим ојачати ендегени антиоксидациони систем.

### **1.5.2. Антиапоптоски ефекти**

Термин апоптоза се користи у циљу објашњења морфолошких процеса којима организам природно, зависно од енергије и генетике контролише елиминацију непотребних ћелија и њихову самодеструкцију. Апоптоза се разликује од других облика ћелијске смрти, као што је некроза, која представља процес у коме токсини, физички стимулуси или исхемија могу изазвати повреду ћелија (133). Главни модулатори

ћелијске смрти по типу апоптозе представљају протеински регулатори Bcl-2 фамилије који су кодирани Bcl-2 геном. Убрзо након открића Bcl-2 протеина, откривена је и фамилија хомологих протеина. Поједини имају стимулаторни, а поједини инхибиторни ефекат на процес апоптозе. Активатори апоптозе, попут Вах, Вак, Вок, Diva, Bcl-xs, Bik, Bim, Hrk, Nip3, Nix, Bad и Bid, формирају канале на мембранама митохондрија, кроз које молекули цитохрома С напуштају митохондрије и самим тим долази до апоптозе. Са друге стране, инхибитори апоптозе, попут Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, Nr13 и A1/Bfl-1, везују Вах протеине (у форми хетеродимера) и онемогућавају настанак проапоптозних хомодимера (133-136).

У више наврата је показано да H<sub>2</sub>S поседује антиапоптотске ефекте, које највероватније остварује тако што доприноси очувању митохондријалне функције. Такође, важно је напоменути да многа цитопротективна својства H<sub>2</sub>S током И/Р повреде могу бити резултат дејстава на митохондрије (137). H<sub>2</sub>S такође може заштитити кардиомиоците од апоптозе изазване глукозом, највероватније тако што утиче на експресију гена за Вах и Bcl-2. Битно је напоменути да постоје и докази на експерименталним моделима који сведоче да NaHS, као донор H<sub>2</sub>S, смањује активацију каспазе-3 и редукује број апоптотских ћелија, што сугерише да H<sub>2</sub>S може инхибирати напредовање апоптозе након И/Р повреде (138). Као једно од значајних упоришта срчане повреде након исхемије, у литератури се издвојила гликоген синтезе киназа 3 бета (GSK-3β). *Osipov* и *Yao* у својим независним истраживањима су уочили да H<sub>2</sub>S и NaHS значајно повећавају експресију фосфорилисане GSK-3β форме, што касније доводи до инхибиције отварања пермеабилних митохондријалних транзиторних пора (енгл. *mitochondrial permeability transition pore*), а спречава апоптозу, чиме се директно штити миокард од исхемијске повреде (86, 139).

### **1.5.3. Антиинфламацијски ефекат**

Инфламација је интензиван дегенеративни процес који узрокује локалну акумулацију катаболичких производа ниске молекулске масе. Улога инфламације као једног од главних патолошких процеса у КВБ-има добро је испитана током протеклих неколико деценија.

Различити цитокини и хемокини, продуковани инфламацијским ћелијама и васкуларним ендотелом, регулишу функцију лимфоцита активирањем (IL-2, IL-4, IFN- $\alpha$  и IFN- $\beta$ ) или инхибирањем (IL-10 и TGF- $\beta$ ) имуног одговора. Цитокини активирају инфламацијске ћелије (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  и IL-6) или стимулишу хематопоезу, као и раст и диференцијацију леукоцита (IL-3 и IL-7). Цитокини посредују у развоју исхемијске повреде срца и смањују његову функцију (140, 141).

Услед И/Р оштећења срца ослобађају се IL-6 и IL-8, који потом утичу на повећање адхезије неутрофила и инфламацијски одговор (142, 143). TNF- $\alpha$  има неколико улога у патогенези И/Р повреде миокарда: индукује адхезију ендотелних молекула, омогућава инфилтрацију неутрофила, повећава продукцију ROS, доприноси инфламацијском одговору и доводи до апоптотских ефеката и директне депресије миокарда (144). Сам инфламацијски процес је патолошки процес, док се природни антиинфламацијски одговор јавља након акутне инфламације и има тенденцију да одржи хомеостазу ткива и стога се треба сматрати стварном одбрамбеном реакцијом ткива (140).

Претходне студије су показале да H<sub>2</sub>S игра контроверзне улоге у процесу инфламације. У занимљивом прегледном чланку, *Whiteman* и *Winyard* су представили „добре“ (антиинфламацијске) и „лоше“ (проинфламацијске) ефекте ендогеног и егзогеног H<sub>2</sub>S (145). Међутим, код КВБ антиинфламацијски ефекат H<sub>2</sub>S игра доминантну улогу (146, 147). У периоду реперфузије, H<sub>2</sub>S смањује број леукоцита унутар зоне исхемије, као и број неутрофила унутар ткива миокарда (147). Такође је примећено да су нивои IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, као и *in vivo* интеракције између леукоцита и ендотелних ћелија, значајно смањене након примене H<sub>2</sub>S. Према томе, H<sub>2</sub>S је ограничио ниво инфламације и величину инфаркта миокарда, тако што је спречио трансмиграцију леукоцита и додатно ослобађање цитокина (70). У другој студији показано је да H<sub>2</sub>S донори, Na<sub>2</sub>S и NaHS, инхибирају адхеренцу леукоцита и инфламацијске процесе активирајући K-АТФ канале (148). Такође, нови модулатор ендогеног водоник сулфида, S-пропаргил-цистеин (SPRC), спречава активацију NF- $\kappa$ B, супримира фосфорилацију ERK1/2 и продукцију ROS у липополисахаридно индукованој инфламацији у ембрионим ћелијама миокарда пацова (H9C2 ћелије) (149). Ова студија је пружила значајне доказе о функцији H<sub>2</sub>S као антиинфламацијског агенса јер је у њој наведено да SPRC доводи до овог ефекта путем CSE/H<sub>2</sub>S путева оштећујући I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B сигнализацију и активирајући PI3K/Akt сигнални пут (150).

**II**

**ЦИЉЕВИ**

**СТУДИЈЕ**

---

## 2. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ

Општи циљ студије био је да се испита кардиопротективна улога ДАТС-а након *ex vivo* индуковане И/Р повреде код пацова. Посебан фокус био је на пацовима са дијабетес мелитусом и метаболичким синдромом.

Специфични циљеви били су:

- испитати безбедносни профил ДАТС-а, који се код пацова примењивао сваки други дан током 3 недеље у дози од 40 mg/kg;
- проучити способност ДАТС-а да утиче на нивое H<sub>2</sub>S и хомоцистеина, када се примени код здравих, односно пацова са дијабетесом или метаболичким синдромом;
- истражити антиоксидациони потенцијал ДАТС-а након три недеље конзумације код здравих, као и код пацова са дијабетесом или метаболичким синдромом;
- утврдити кардиопротективна својства ДАТС-а код здравих и пацова са дијабетес мелитусом и метаболичким синдромом;
- истражити ДАТС, као прекондиционарајући агенс, односно његову способност да спречи промене у срцу здравих и пацова са дијабетес мелитусом или метаболичким синдромом;
- испитати способност ДАТС-а да ублажи манифестације дијабетеса код пацова;
- открити улогу ДАТС-а у лечењу метаболичког синдрома код пацова;
- предложити механизме којима ДАТС, након тронедељне *per os* примене, остварује протективне ефекте.

**III**  
**МАТЕРИЈАЛ И**  
**МЕТОДЕ**

### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Процедуре коришћене у овом истраживању, одобрене су од стране Етичког комитета за добробит експерименталних животиња Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, Србија, број: 01-1811 и спроведене у складу са Европском директивом о добробити лабораторијских животиња број: 2010/63/ЕУ и према принципима добре лабораторијске праксе. Такође, сви експериментални поступци спроведени су у складу са прописаним процедурама Директиве Европске Уније о заштити животиња коришћених у експерименталне и друге научне сврхе 86/609/ЕЕС, као и принципима етике.

Супстанце коришћене у овом истраживању су високе чистоће, набављене од произвођача *Sigma-Aldrich Chemie GmbH* из Немачке.

Спроведено истраживање представља хроничну, експерименталну студију, изведену на 72 *Wistar albino* пацова, мушког пола. На почетку студије, сви пацови били су разврстани у 3 основне групе: здраве пацове, пацове са дијабетесом и пацове са метаболичким синдромом. Затим, у зависности од третмана, односно да ли је код пацова из групе примењиван ДАТС, у групи здравих пацова разликовале су се КТР и ДАТС групе, у групи пацова са дијабетесом ДМ и ДМ+ДАТС групе, а у групи пацова са МетС-ом МС и МС+ДАТС групе. Након жртвовања, у зависности од *ex vivo* протокола, све наведене групе су расподељене на још две подгрупе. Назив подгрупа у којима су изолована срца пацова била подвргнута *ex vivo* перфузији у трајању од 90 минута, остао је исти као и назив основне групе, док је подгрупама у којима су срца била подвргнута *ex vivo* исхемији у трајању од 30 минута и реперфузији у трајању од 60 минута на назив основне групе, додат је наставак И/Р, тако да су се на самом крају разликовале по четири подгрупе у оквиру три основне групе:

- код здравих пацова: **КТР, И/Р, ДАТС** и **ДАТС+И/Р**;
- код пацова са дијабетесом: **ДМ, ДМ+И/Р, ДМ+ДАТС** и **ДМ+ДАТС+И/Р**;
- код пацова са МетС-ом: **МС, МС+И/Р, МС+ДАТС** и **МС+ДАТС+И/Р**.

У студију је укључено по 6 животиња (односно срца) из наведених подгрупа.

### 3.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ

За потребе истраживања коришћени су *Wistar albino* пацови, мушког пола, допремљени са Војномедицинске академије у Београду, који су након транспорта смештени у стандардне, контролисане услове влажности ваздуха, температуре ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) и осветљености (при чему се поштовао 12/12 часовни циклус светлост/тама). Да би се прилагодили на ново окружење, пацови су седам дана пре почетка истраживања распоређени у кавезе. Од 96 пацова који су на самом почетку били укључени у студију, 72 је до краја остало у истраживању, а 14 пацова је избачено из студије због немогућности изазивања болести или због превеликих одступања из групе. На самом крају истраживања, у свакој групи био је подједнак број животиња, односно срца (6 по групи). У тренутку жртвовања, сви пацови били су стари 13 недеља.

Одговарајућа храна (стандардна или храна са високим садржајем масти, у зависности од групе) и вода су обезбеђени *ad libitum*. Стандардна дијета садржала је 9% масти, 20% протеина, 53% скроба, 5% влакана, док је исхрана са високим садржајем масти (енгл. *high-fat diet*, HFD) садржала 25% масти, 15% протеина, 51% скроба и 5% влакана.

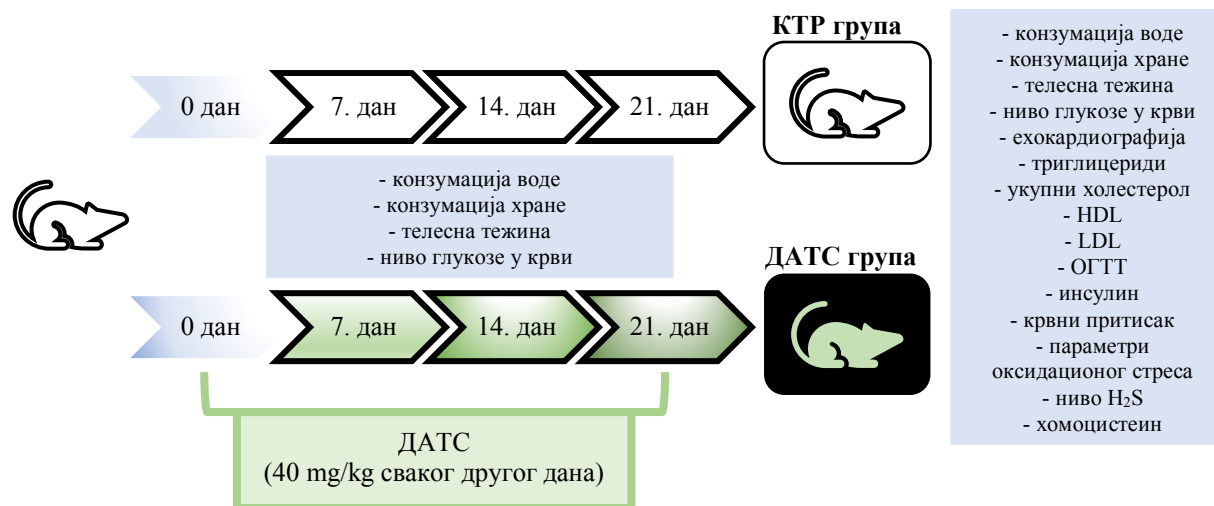
Ради лакшег праћења, опис експерименталног протокола ове студије хронолошки је подељен на три дела: *in vivo* испитивања (ефекти на живим пацовима и у биолошким течностима), *ex vivo* испитивања (ефекти на изоловано срце пацова) и патохистолошке и молекуларне анализе (ефекти на срчано ткиво).

### 3.2. *IN VIVO* ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ

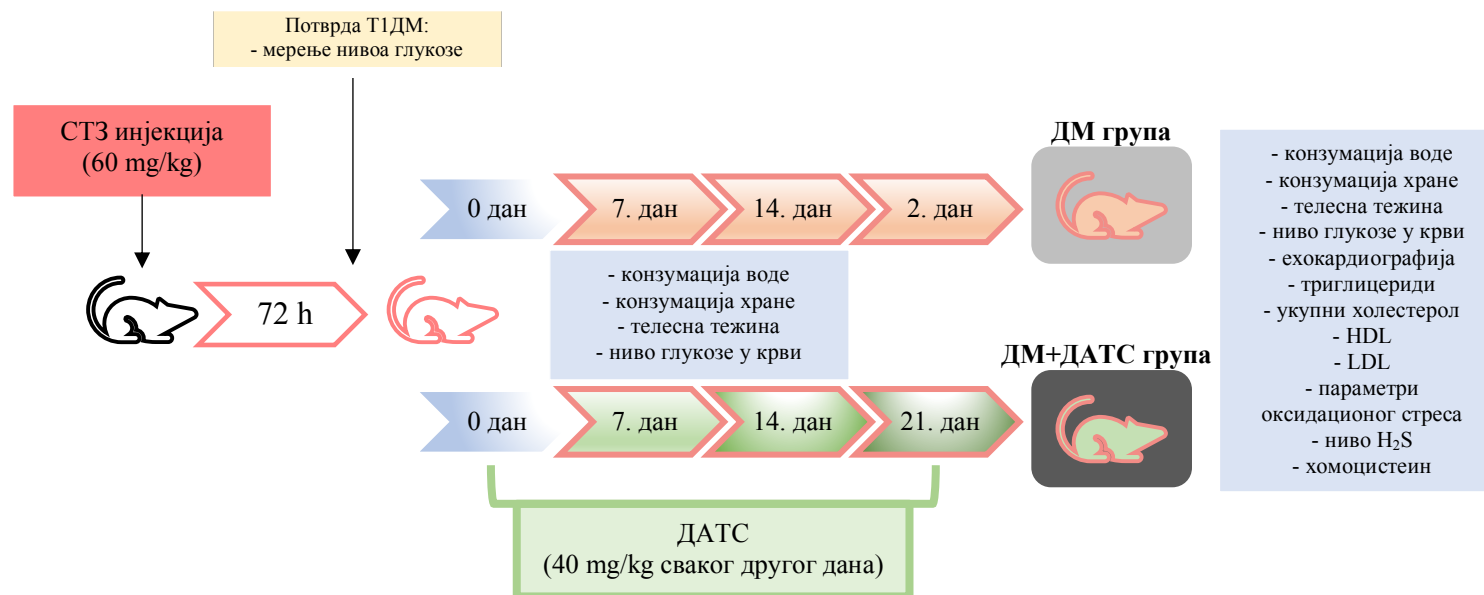
Експерименталне процедуре изведене *in vivo* на *Wistar albino* пацовима укључују индукцију Т1ДМ и МетС-а, третман ДАТС-ом и све параметре мерене током хроничног протокола. Све процедуре, поступци и параметри који су *in vivo* праћени у овом пројекту, хронолошки су приказани на **Схемама 5, 6 и 7** и у наставку поглавља детаљније описани.

---

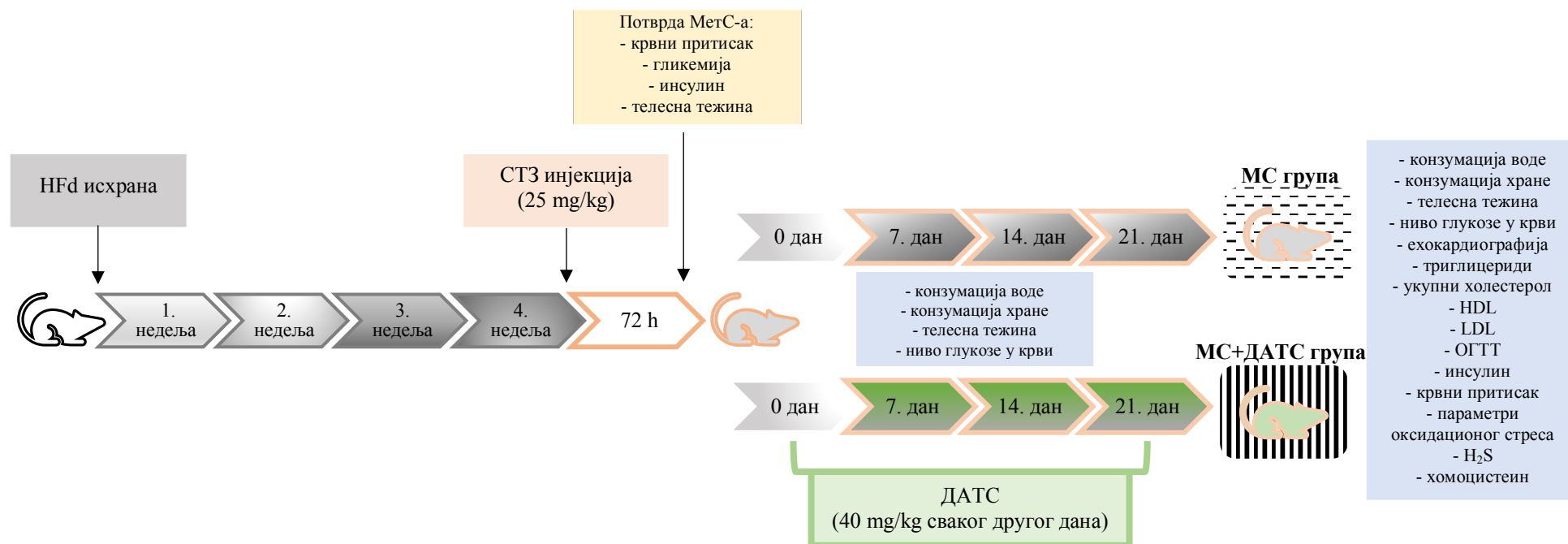




**Схема 5.** Хронолошки приказане експерименталне процедуре спроведене на здравим пацовима (КТР и ДАТС) – *in vivo* протокол. Зелена боја приказује групу и недеље у којима је ДАТС конзумиран, док су у плавим правоугаоницима приказани параметри који су одређивани током или на крају хроничног протокола. ДАТС, диалил трисулфид; HDL, липопротеин велике густине; LDL, липопротеин мале густине; ОГТТ, тест оралног оптерећења глукозом.



**Схема 6.** Хронолошки приказане експерименталне процедуре спроведене на пацовима са Т1ДМ (ДМ и ДМ+ДАТС) – *in vivo* протокол. Роза боја приказује тренутак и групе којима је инјектован СТЗ и индукован дијабетес. Зелена боја приказује групу и недеље у којима је ДАТС конзумиран, док су у плавим правоугаонцима приказани параметри који су одређивани током или на крају хроничног протокола. ДАТС, диалил трисулфид; HDL, липопротеин велике густине; LDL, липопротеин мале густине.



**Схема 7.** Хронолошки приказане експерименталне процедуре спроведене на пацовима са MetC-ом (MC и MC+ДАТС) – *in vivo* протокол. Сива боја приказује тренутак и групе које су конзумирале HFd, док светло роза боја приказује тренутак и групе којима су дате ниске дозе СТЗ и индуован MetC-ом. Зелена боја приказује групу и недеље у којима је ДАТС конзумиран, док су у плавим квадратима приказани параметри који су одређивани током или на крају хроничног протокола. ДАТС, диалил трисулфид; HDL, липопротеин велике густине; LDL, липопротеин мале густине; ОГТТ, тест оралног оптерећења глукозом.

### 3.2.1. Стрептозотоцином индукован дијабетес

Стрептозотоцин (СТЗ) је антибиотик изолован из *Streptomyces achromogenes* који изазива селективну деструкцију  $\beta$ -ћелија панкреасних острваца и поседује дијабетогена својства (151, 152). У више наврата показано је да СТЗ изазива цитотоксичне ефекте на  $\beta$ -ћелије панкреаса миша, пацова и мајмуна. Када се примењује код животиња, СТЗ индукује хипергликемију, дефицит инсулина, полидипсију, полиурију и друге клиничке манифестације које су карактеристичне за Т1ДМ и Т2ДМ код људи (153). СТЗ је агенс који се најчешће примењује у експерименталним студијама на мишевима и пацовима за индукцију како дијабетеса типа 1, тако и дијабетеса тип 2.

За потребе ове студије СТЗ (број производа C0130) је набављен од *Sigma-Aldrich Chemie GmbH Eschenstrasse 5, 82024 Taufkirchen*, Немачка. Да би се избегло исушивање производа, СТЗ је чуван на  $-20^{\circ}\text{C}$  у оригиналној тамној бочици, заштићен од светлости. Имајући у виду да је раствор СТЗ-а у цитратном пуферу веома нестабилан, увек се припремао свеж, непосредно пред употребу.

#### 3.2.1.1. Експериментални модел за изазивање дијабетес мелитуса тип 1

Изазивање дијабетес мелитуса код пацова првенствено зависи од дозе СТЗ. Према подацима из литературе, за пацове старости од 6 до 12 недеља, најчешће се раствор СТЗ-а примењује интраперитонеално у једној дози која се креће у опсегу од 40 до 70 mg/kg (154).

У нашој студији, дијабетес мелитус (Т1ДМ) индукован је код 24 *Wistar albino* пацова (старости 9 недеља, телесне тежине  $200 \pm 20$  грама). Након 12 часова гладовања, примењена је једна интраперитонеална инјекција стрептозотоцина у дози од 60 mg/kg телесне тежине, који је претходно растворен у 1 ml 0,05 М раствора цитратног пуфера, при чему је рН раствора износио 4,5 (155). Након 72 часова од инјекције СТЗ-а, наште је мерена гликемија. За тестирање нивоа глукозе у крви преносивим мерачем (*Accu-Chek, Roche*), кап крви је узета из латералне репне вене пацова. Пацови код којих је измерена

---

хипергликемија, односно код којих је ниво гликемије био већи од 20 mmol/L укључени су у студију и сврстани у групу пацова са Т1ДМ.

Пацови са успешно изазваним дијабетесом (укупно 24), распоређени су у две (односно четири) групе: ДМ (ДМ и ДМ+И/Р) и ДМ+ДАТС (ДМ+ДАТС и ДМ+ДАТС+И/Р). Битно је напоменути да су сви пацови, укључени у ову групу, имали приближно исти ниво гликемије који је износио око 30 mmol/L.

### 3.2.1.2. Експериментални модел за изазивање метаболичког синдрома

Имајући у виду да већина пацијената са Т2ДМ има инсулинску резистенцију и да постоји све већи број пацијената са метаболичким синдромом, анимални модели са овим карактеристикама су од велике користи за експериментална истраживања. Умерена доза СТЗ-а уз претходну исхрану, базирану на високом садржају масти, је једна од најчешће коришћених метода за изазивање МетС-а код пацова. На овај начин се хипергликемија, повезана са хиперинсулинемијом и инсулинском резистенцијом, индукује код животиња (156).

У овој студији, МетС је индукован код 24 *Wistar albino* пацова (старости 6 недеља, телесне тежине  $180 \pm 20$  грама). Најпре су пацови током 4 недеље храњени HFd, након којих је, после дванаесточасовног гладовања, примењен СТЗ у једној дози од 25 mg/kg. Три дана (односно 72 h) касније, мерена је гликемија, инсулин и крвни притисак. Пацови који су имали гликемију наше преко 7 mmol/L, инсулин наше изнад 6 mmol/L и крвни притисак изнад 130/90 mmHg укључени су у студију, односно у групу пацова са МетС-ом (155).

Пацова са успешно индукованим МетС-ом су разврстани у две (тј. четири) групе: МС (МС и МС+И/Р) и МС+ДАТС (МС+ДАТС и МС+ДАТС+И/Р). Битно је напоменути да су сви пацови, укључени у ову групу, имали приближно исти ниво глукозе ( $\sim 9$  mmol/L), ниво инсулина ( $\sim 8$  mmol/L) и крвни притисак (сistolни крвни притисак  $\sim 140$  mmHg; дијастолни крвни притисак  $\sim 100$  mmHg и фреквенцу срца  $\sim 410$  bpm) .

### 3.2.2. Хронични третман пацова

Да би се опонашао најчешћи и најједноставнији пут примене, ДАТС је пацовима примењиван *per os* (гаважом), сваки други дан, у дози од 40 mg/kg телесне тежине у ДАТС (ДАТС и ДАТС+И/Р), ДМ+ДАТС (ДМ+ДАТС и ДМ+ДАТС+И/Р) и МС+ДАТС (МС+ДАТС и МС+ДАТС+И/Р) групама током три недеље. Доза и начин примене су изабрани на основу релевантних литературних података (157, 158).



Слика 1. Оригинална фотографија бочица ДАТС-а које су се користиле у овој студији.

ДАТС (чистоћа > 98%) је набављен од *Sigma-Aldrich Chemie GmbH Eschenstrasse 5, 82024 Taufkirchen*, Немачка. ДАТС је чуван на  $-20^{\circ}\text{C}$  у тамним, оригиналним бочицама, у складу са препорукама произвођача.

### 3.2.3. Карактеристике пацова праћене *in vivo* током хроничног протокола

Количина воде и хране коју су пацови конзумирали током дана, мерена је свакога дана, а у резултатима је приказана просечна потрошња током једне недеље, која је нормализована, односно прерачуната на основу појединачне телесне тежине пацова. Тако да је потрошња воде за пиће приказана у јединицама ml воде по 100 g телесне тежине, а потрошња хране у јединицама g хране по 100 g телесне тежине пацова. Телесна тежина и глукоза у крви наште мерене су једном недељно, сваког понедељка ујутру.

Наведени параметри (конзумација воде, хране, телесна тежина и нивои глукозе) праћени су у свим групама и у резултати су представљени пре примене ДАТС-а (почетак протокола, у даљем тексту означен као 0) и током тронедељног протокола (означени као 7, 14 и 21), тако да је на крају студије било укупно 4 мерења.

### 3.2.4. Мерења након тронедељног третмана ДАТС-ом

#### 3.2.4.1. *In vivo* срчана функција

Ехокардиографија је веома моћна, неинвазивна метода која се користи за праћење промена у структури и функцији срца, као и за праћење урођених дефеката, прогресије болести и процену ефикасности терапије. Трансторакална ехокардиографија је сигурна, поуздана и поновљива аналитичка техника која се користи за одређивање структурних и функционалних кардиоваскуларних параметара код глодара (159).

Ехокардиографски мониторинг је изведен у свим групама пацова, коришћењем *Hewlett-Packard Sonas 5500*, Андовер, МА, САД (Слика 2), са сондом од 15,0-МHz (159, 160). Трансторакална ехокардиографија је спроведена у последњој седмици експерименталног протокола, након тронедељне примене ДАТС-а. Пацови су анестезирани интраперитонеалном инјекцијом у којој је комбиновано 50 mg/kg кетамина (100 mg/mL; *Ketaset, Fort Dodge, Fort Dodge, IA*) и 10 mg/kg ксилазина (100 mg/mL; *Anased, Lloyd Laboratories, Shenandoah, IA*). У дводимензионалном режиму рада ехокардиограма, сонда је перпендикуларно постављена, јер се на овај начин јасно уочава интервентрикуларни септум и задњи зид леве коморе на нивоу папиларних мишића. Након проналажења најадекватнијег положаја, из М-режима је направљена слика, на којој су мерене следеће структурне варијабле: дебљина зида интервентрикуларног септума на крају дијастоле (енгл. *interventricular septal wall thickness at end diastole, IVSd*), унутрашња димензија леве коморе на крају дијастоле (енгл. *left ventricle internal dimension at end diastole, LVIDd*), дебљина задњег зида леве коморе на крају дијастоле (енгл. *left ventricle posterior wall thickness at end diastole, LVPWd*), као и дебљина зида интервентрикуларног септума на крају систоле (енгл. *interventricular septal wall thickness*



Слика 2. Оригинална фотографија ехокардиограма (*Hewlett-Packard Sonas 5500*) који је коришћен у овом истраживању.

---

at end systole, IVSs), унутрашња димензија леве коморе на крају систоле (енгл. *left ventricle internal dimension at end systole*, LVIDs), дебљина задњег зида леве коморе на крају систоле (енгл. *left ventricle posterior wall thickness at end systole*, LVPWs) и проценат фракционог скраћења (енгл. *fractional shortening*, FS). Средње вредности су добијене праћењем пет или више срчаних циклуса током М-режима, за најмање шест срца из исте групе.

*In vivo* срчана функција мерена је након завршетка протокола, непосредно пред жртвовање пацова, код свих испитиваних група пацова. Такође, ехокардиографска мерења су изведена код свих животиња и пре било какве манипулације (пре почетка примене ДАТС-а, инјекције СТЗ-ом или храћења HFd) како би били сигурни да су вредности кардиодинамских параметара животиња укључених у студију у физиолошком распону.

#### 3.2.4.2. Липидни параметри мерени у серуму пацова

Имајући у виду да је код оболелих од МетС-а повећање нивоа глукозе у крви, често праћено поремећајима вредности липида, у овом истраживању су такође испитивани ефекти ДАТС-а на укупни серумски холестерол (ТС), триглицериде (TG), LDL и HDL. Стога су, након завршетка хроничног протокола, наведени параметри мерени у крви здравих (КТР и ДАТС) и пацова са МетС-ом (МС и МС+ДАТС).

Биохемијски параметри, попут нивоа ТС, TG, HDL и LDL су одређивани у серуму. Мерења су спроведена на програмираном биохемијском анализатору (*Dimension Xpand, Siemens, IL, САД*), помоћу спектрофотометријских метода и комерцијално доступних комплета (*Siemens Healthcare Diagnostics, Frimley, Camberley, Surrey, УК*).



### 3.2.4.3. Нивои инсулина и глукозе током теста оралног оптерећења глукозом (ОГТТ)

Вредности глукозе и инсулина мерене наше и током ОГТ теста се углавном користе за постављање дијагнозе Т2ДМ или преддијабетеса, тј. повећаног ризика за Т2ДМ. Обично се концентрације глукозе прате од једног до три сата, док се концентрације инсулина мере наше и у последњем сату ОГТ теста (161).

У овој студији, ОГТТ је изведен након тронедељног третмана ДАТС-ом (дан пред жртвовање животиња). Након 12-14 часова гладовања животиња, узорак крви је узиман из репа да би се одредио ниво глукозе у крви наше, као и ниво инсулина (у даљем тексту и на графицима означен 0). Затим је пацовима *per os* давана глукоза у дози од 2 g/kg телесне тежине, а потом су узорци крви сакупљани из репа пацова након 30-ог, 60-ог, 120-ог и 180-ог минута. Гликемија је у наведеним интервалима мерена помоћу глукометра са трачицама (*Accu-Chek, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, САД*). У нултом (0) и 180-ом минути, нивои инсулина су мерени у узорцима плазме ELISA (енгл. *enzyme-linked immunosorbent assay*) методом, као што је претходно описано (162).

ОГТТ је у нашој студији спроведен на здравим (КТР и ДАТС) и пацовима са MetC-ом (МС и МС+ДАТС).

### 3.2.4.4. Мерење крвног притиска и фреквенце срца

Поред претходно наведених параметара, MetC карактерише повишен крвни притисак (КП). Због тога су и у овој студији испитивани ефекти третмана ДАТС-ом на систолни и дијастолни КП, као и на фреквенцу срца (енгл. *heart rate, HR*) (163).

Један дан пре жртвовања животиња, КП и HR су мерени неинвазивном *tail-cuff* методом (метода помоћу манжетне која се поставља на реп пацова и помоћу које се процењује системски крвни притисак (MRBP-R), *ИТС Life Science Inc., Los Angeles, CA, USA*) (164). Приликом сваке серије, мерење је понављано осам до десет пута, након чега је за коначну вредност узета средња вредност. КП и HR су одређивани код здравих (КТР и ДАТС) и пацова са MetC-ом (МС и МС+ДАТС).

### 3.2.4.5. Биохемијско одређивање системских прооксидационих и антиоксидационих параметара

Имајући у виду, да је оксидациони стрес повезан са патогенезом ДМ и МетС-а, да би се испитао утицај тронедељне примене ДАТС-а на системску редокс хомеостазу, у узорцима крви мерени су нивои прооксиданаса, као и капацитет антиоксидационог система заштите.

Биохемијско одређивање системских прооксиданаса и антиоксиданаса рађено је у узорцима крви који су сакупљени у тренутку жртвовања пацова. Најпре, узорци пуне крви су центрифугирани да би се еритроцити (енгл. *red blood cells*, RBCs) раздвојили од плазме. Укратко, током процеса центрифугирања, RBCs се скупљају на дну *Vacutainer* тубе (црвени слој), док плазма остаје на површини као горња фаза (жути слој), након издвајања плазме, еритроцити се испирају и чувају у облику лизата.

У узорцима плазме мерени су нивои прооксидационих параметара: индекс липидне пероксидације (мерен као TBARS - реактивне супстанце тиобарбитурне киселине, енгл. *thiobarbituric acid reactive substances*), нитрити ( $\text{NO}_2^-$ ), супероксид анјон радикал ( $\text{O}_2^-$ ) и водоник пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), док је у лизату еритроцита одређивана активност ензимског система одбране проценом концентрације каталазе (CAT) и супероксид дисмутазе (SOD), као и активност неензимског антиоксиданса, као што је редуковани глутатион (GSH). Сви наведени биохемијски параметри одређивани су спектрофотометријски, помоћу *Shimadzu UV 1800* спектрофотометра (Јапан), у свим експерименталним групама.

#### 3.2.4.5.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS)

За одређивање липидне пероксидације у плазми, коришћена је индиректна метода за одређивање концентрације продукта реакције тиобарбитурне киселине (TBARS). У ту сврху коришћено је 0,4 ml плазме и 0,2 ml 28% трихлорацетатне киселине. Након пар секунди мешања и петнаестоминутне инкубације на леду, узорци су центрифугирани при брзини од 6000 rpm, током 15 минута. Затим је издвојено 0,4 ml супернатанта и помешано са 0,1 ml 1% тиобарбитурне киселине у NaOH. После 15

минута у воденом купатилу на 100 °C и 10 минута инкубације на собној температури, мерена је концентрација TBARS на таласној дужини од 530 nm, на основу једначине:

$$\mu\text{mol TBARS/ml плазма} = \Delta A (A_s - A_{bt}) / 1,56 \times 1,25$$

$\Delta A$  – коначна (финална) апсорбанца

$A_s$  – апсорбанца узорка

$A_{bt}$  – апсорбанца слепе пробе

1,56 и 1,25 су фактори корекције коришћени у овом есеју

Коришћена метода се заснива на одређивању степена липидне пероксидације у реакцији малондиалдехида са тиобарбитурном киселином. За слепу пробу, уместо узорка плазме, коришћена је дестилована вода (165).

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

Одређивање ослобођених нитрита представља индиректну методу за одређивање азот монооксида, на основу следеће реакције:  $\text{NO} + \frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^-$ . С обзиром да настаје еквимоларна количина азота, што се јасно види и у приказаној хемијској реакцији, можемо бити сигурни да су количине нитрита једнаке ослобођеном азот монооксиду (NO).

У 0,1 ml перхлорне киселине пипетирана је четири пута већа количина етилендиаминтетраацетатне киселине (20 mM) и 0,2 ml узорка плазме. Након мешања и инкубације на леду у трајању од 15 минута, узорци су центрифугирани 15 минута при брзини од 6000 rpm. Затим је у талог додато 220  $\mu\text{l}$  калијум карбоната, а после пар минута је у нове епендорфе пипетирано 220  $\mu\text{l}$  тог узорка и додато 250  $\mu\text{l}$  свеже припремљеног Griess-овог реагенса и 125  $\mu\text{l}$  пуфера за NO. После 15 минута, мерена је апсорбанца на таласној дужини од 550 nm. Уместо узорка плазме, одговарајућа количина дестиловане воде је коришћена као слепа проба (166).

Да би се одредила концентрација ослобођеног  $\text{NO}_2^-$  у узорцима, конструисана је калибрациона крива тако што су познате концентрације  $\text{NaNO}_2$  додаване у 1 ml *Krebs-Hensenleit*-овог раствора, а апсорбанца је мерена на таласној дужини од 550 nm.

Стандардни фактор (F) прерачунао је из следеће једначине:

(екстинкција стандарда – екстинкција слепе пробе)/концентрација  $\text{NaNO}_2$  у стандардима

Ова једначина је коришћена за сваки стандард (F1-F4), а коначна вредност (F), која се користила за прерачунавање узорака, представља њихову аритметичку средину. Затим је разлика екстинкција узорака и слепе пробе подељена са вредношћу која је добијена за стандарде:

$$\text{nmol NO}_2/\text{ml плазма} = \Delta E (E_s - E_{bt})/F$$

$\Delta E$  – коначна (финална) апсорбанца

$E_s$  – апсорбанца узорка

$E_{bt}$  – апсорбанца слепе пробе

F – аритметичка средина добијених стандарда

### 3.2.4.5.3. Одређивање супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ )

Квантификација супероксид анјон радикала заснива се на реакцији  $\text{O}_2^-$  са нитро тетразолијумом плавим (енгл. *nitro blue tetrazolium*) при чему настаје нитро формазон плави (енгл. *nitro formazon blue*). Концентрација супероксидног анјон радикала одређивана је у узорцима плазме на следећи начин: у 50  $\mu\text{l}$  плазме, *ex tempore* је додато 950  $\mu\text{l}$  есејне смеше, при чему је апсорбанца, мерена три пута на сваких 60 секунди, уз мешање, на таласној дужини од 550 nm. За слепу пробу, уместо узорка плазме, коришћена је иста количина дестиловане воде (167). Концентрација ослобођеног  $\text{O}_2^-$  добијена је на основу следећих једначина:

$$\Delta E_s = E_{2s} - E_{1s} \text{ (за узорке)}$$

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

$$\Delta E = \Delta E_s - \Delta E_{bt}$$

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

$\Delta E$  – коначна (финална) апсорбанца

$E_s$  – апсорбанца узорка

$E_{bt}$  – апсорбанца слепе пробе

0,015 и 0,05 су корекциони фактори коришћени у овом есеју

#### 3.2.4.5.4. Одређивање водоник пероксида ( $H_2O_2$ )

Одређивање  $H_2O_2$  се заснива на оксидацији фенол црвеног (енгл. *phenol red*) дејством водоник пероксида, ова реакција је катализована ензимом пероксидаза из рена (енгл. *peroxidase from horseradish*, HRPO). За одређивање водоник пероксида, у 200  $\mu$ l узорка плазме најпре је потребно додати 800  $\mu$ l раствора фенол црвеног и 10  $\mu$ l пероксидазе (POD). Након инкубације на собној температури у трајању од 10 минута, мерена је апсорбанца на 610 nm. Уместо узорка плазме, за слепу пробу коришћена је дестилована вода. Мерење је било у предвиђеном временском интервалу, од 5 до 60 минута, јер је то период настанка и ослобађања  $H_2O_2$  (168).

Концентрација  $H_2O_2$  у узорцима рачуната је помоћу стандардне криве, која је конструисана стандардним *Stock* раствором  $H_2O_2$ . Наиме, у три епрувете пипетирано је 5, 10 и 20  $\mu$ l стандарда  $H_2O_2$  и у епрувете је додато 200  $\mu$ l дестиловане воде, 800  $\mu$ l фенол-црвеног раствора и 10  $\mu$ l HRPO. Након претходно споменутих инкубација мерене су коначне концентрације. Концентрација и количина  $H_2O_2$  у узорцима израчуната је према следећој једначини:

$$\Delta A = A_s - A_{bt}$$

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

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

F је фактор апсорбанце/nmol  $H_2O_2$

$\Delta A$  – коначна (финална) апсорбанца

$A_s$  – апсорбанца узорка

$A_{bt}$  – апсорбанца слепе пробе

#### 3.2.4.5.5. Одређивање активности каталазе (CAT)

Каталаза је ензим који садржи хем групу на активном месту и претвара два молекула  $H_2O_2$  у кисеоник и воду. Каталаза се сврстава у један од најефикаснијих ензима у ћелијама и верује се да у једној секунди сваки молекул каталазе може да разложи милионе молекула  $H_2O_2$ . С обзиром да се супротстављају веома реактивним молекулима, каталазе су неочекивано стабилни ензими (169).

У нашој студији, активност каталазе је мерена у разблаженим лизираним еритроцитима у којима је удео воде био 1:7, а етанола 0,1:1 (у даљем тексту меша). У епрувете са 50  $\mu$ l САТ пуфера, додато је 100  $\mu$ l меше и 1 ml 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. За слепу пробу, уместо узорка коришћена је дестилована вода. Сваки узорак је мерен шест узастопних пута на таласној дужини од 360 nm. Коначне вредности добијене су на основу схеме за прорачунавање која подразумева одузимање, а потом и аритметичку средину добијених вредности (170).

#### 3.2.4.5.6. Одређивање активности супероксид дисмутазе (SOD)

Супероксид дисмутаза представља групу ензима који претварају супероксидни радикал у водоник пероксид и молекуларни кисеоник, обезбеђујући одбрану ћелија од реактивних врста кисеоника. У својој структури SOD може да садржи бакар и цинк (Cu-Zn-SOD), манган (Mn-SOD) или гвожђе (Fe-SOD). У зависности од тога где се налази, у организму се разликују три облика SOD: у цитоплазми - SOD1, у митохондријама - SOD2 и изван ћелија (екстрацелуларни) - SOD3. Сматра се да SOD штити од слободних радикала који настају у процесу старења или током исхемије и смањује инфламацију (171).

Да би се одредила активност SOD у 100  $\mu$ l лизираних еритроцита, пипетирано је 1000  $\mu$ l карбонатног пуфера, а након мешања додато је 100  $\mu$ l адреналина. Одређивање SOD се заснива на епинефринској методи по *Beutler*-у. За слепу пробу, коришћене су одговарајуће количине споменутих раствора, а сви узорци, као и слепа проба, мерени су на таласној дужини од 470 nm (171, 172).

#### 3.2.4.5.7. Одређивање редукованог глутатиона (GSH)

Глутатион је широко распрострањен у ћелијама и важно је напоменути да је укључен у многе биолошке функције. Глутатион је присутан у оксидованој форми као GSSG, који се ензимом глутатион-редуктазом лако претвара у редуковани облик GSH.

---

За мерење активности GSH у лизату еритроцита, коришћена је спектрофотометријска метода базирана на реакцији оксидације глутатиона са 5,5-дитиобис-6,2-нитробензоевом киселином, методом према *Beutler*-у. У 50  $\mu\text{l}$  лизираних еритроцита додато је 200  $\mu\text{l}$  0,1% етилендиаминтетраацетата и 385  $\mu\text{l}$  преципитационог пуфера. После 15 минута инкубације на леду и 10 минута центрифугирања при брзини од 4000 rpm, добија се екстракт. У епрувете са 300  $\mu\text{l}$  екстракта додато је 750  $\mu\text{l}$  натријум дифосфата и 100  $\mu\text{l}$  5,5-дитиобис-6,2-нитробензоеве киселине. Након инкубације у трајању од 10 минута, узорци су мерени на таласној дужини од 412 nm. За слепу пробу коришћена је дестилована вода у комбинацији са наведеним растворима. Да би се одредила концентрација GSH у узорцима, конструисана је калибрациона крива помоћу четири стандарда са познатим концентрацијама глутатиона (173).

#### 3.2.4.6. Одређивање нивоа $\text{H}_2\text{S}$ у плазми

Метилен плава (енгл. *methylene blue*) метода коришћена је за мерење укупног нивоа водоник сулфида у плазми. Плазма (100  $\mu\text{l}$ ) је пипетирана у епрувете са 350  $\mu\text{l}$  100mM фосфатног пуфера и 250  $\mu\text{l}$  1% цинк ацетата. Након 10 секунди мешања додато је 133  $\mu\text{l}$  20 mM N,N-диметил-р-фенилендиамин сулфата у 7,2 М хлороводоничној киселини и 133  $\mu\text{l}$  30 mM гвожђе (III) хлорида у 1,2 М хлороводоничне киселине. После 30 минута инкубације на 30 °C, да би се зауставила реакција додато је 250  $\mu\text{l}$  50% трихлор ацетатне киселине и узорци су центрифугирани при брзини од 5000 rpm. Супернатант је сакупљен, а укупни сулфиди су одређивани коришћењем стандардне калибрационе криве NaHS стандарда, чија је апсорбанца мерена на таласној дужини од 670 nm. За одређивање концентрације  $\text{H}_2\text{S}$ , коришћен је *microplate* читач (*Zenyth, Anthos, UK*) (174).

#### 3.2.4.7. Одређивање нивоа хомоцистеина (Hcy) у серуму

Укупна концентрација Hcy у серуму мерена је помоћу течне хроматографије високих перформанси (енгл. *high-performance liquid chromatography, HPLC*) са

сепарацијом реверзне фазе и флуоресцентне детекције. Укратко, у 100  $\mu\text{l}$  серума додато је 30  $\mu\text{l}$  натријум борохидрида и 5  $\mu\text{l}$  *n*-октанола. Као стандард је коришћен *N*-ацетилцистеин, док је уклањање протеина постигнуто са 100  $\mu\text{l}$  0,6 М перхлорне киселине са 1 mM етилендиаминтетраацетатне киселине (ЕДТА). Затим су узорци центрифугирани на 15000 g у трајању од 10 минута да би се уклонили протеини. У супернатант је додато 10  $\mu\text{l}$  NaOH и 125  $\mu\text{l}$  борат-ЕДТА пуфера, а потом су узорци са дериватизационим раствором инкубирани сат времена на 60 °C у мраку. Охлађени узорци (40  $\mu\text{l}$ ) су убризгани у HPLC колону, где је мобилна фаза садржала 0,08 М сирћетну киселину са 2% метанола при брзини протока од 0,8 mL/мин током 12 минута. Флуоресценција је мерена на 390 nm, док је емисија мерена на 470 nm (175).

### 3.3. *EX VIVO* ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ

Да би се детаљније испитала функција срца, коришћен је *Langendorff*-ов апарат за ретроградну перфузију. Као што је претходно објашњено, све групе (КТР, ДАТС, ДМ, ДМ+ДАТС, МС и МС+ДАТС) које су праћене *in vivo* разврстане су на две подгрупе, у зависности од *ex vivo* протокола. Сходно томе, у *ex vivo* протоколу који подразумева 90 минута ретроградне перфузије разликовале су се следеће групе: КТР, ДАТС, ДМ, ДМ+ДАТС, МС и МС+ДАТС, док су се у *ex vivo* протоколу који подразумева 30 минута исхемије и 60 минута ретроградне реперфузије разликовале: И/Р, ДАТС+И/Р, ДМ+И/Р, ДМ+ДАТС+И/Р, МС+И/Р и МС+ДАТС+И/Р групе. На овај начин, осим што је након хроничног третмана ДАТС-ом, испитана функција срца *ex vivo*, испитана је и његова способност да смањи повреду након *ex vivo* индуковане исхемијско-реперфузионе повреде.



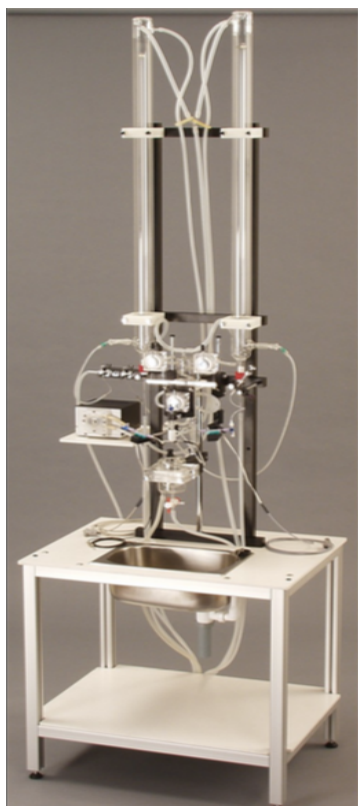
### 3.3.1. Принципи ретроградне перфузије срца: *Langendorff*-ова техника

*Langendorff*-ова методологија перфузије срца у основи је остала непромењена до данас. Главни принцип је ретроградна перфузија раствора кроз аорту, супротно физиолошком току. На овај начин, преко отвора коронарних артерија у одговарајућим синусима валсалве, у коронарну артеријску васкулатуру доспева перфузиони раствор, који даље пролази кроз васкуларно корито и десну преткомору. На овај начин, омогућава се несметани рад срца, иако перфузиони раствор не долази до васкуларних комора (176).

Најважније предности *Langendorff*-ове технике су поновљивост, способност испитивања акутних ефеката бројних супстанци, широка применљивост на различитим врстама (мишеви, пацови, зечеви, пси, свиње, па чак и људи), могућност изазивања И/Р повреде, једноставност припреме и финансијски аспект. Са друге стране, постоје и ограничења која треба имати на уму. Наиме, ефекти на изолованом срцу нису у потпуности клинички релевантни, иако изоловано срце може несметано да ради током времена (неколико сати), ипак крајњи исход је нефункционални препарат. Односно, фреквенца срца и контрактилна способност се погоршавају од 5 до 10 % на сваких сат времена (177-179).

*Oscar Langendorff* (1895.) описао је перфузију кроз коронарно васкуларно корито под константним притиском, али данас постоји и модификована метода за перфузију кроз коронарно васкуларно корито уз константан проток. Код оба експериментална модела испитују се средње вредности променљивих параметара, јер се због специфичности миокарда апсолутне вредности не могу сматрати поузданим. Појам специфичност миокарда односи се, пре свега, на неуједначено трајање систоле и дијастоле срца, великих варијација у срчаној фреквенци, минималних разлика у температури комплексног физиолошког раствора којим се срце перфундује и други параметри на које истраживачи не могу да утичу. Да би се избегле варијације, сви кардиодинамски параметри се прате најмање 5 минута. У овој студији, за оба протокола, изабран је модел са константним притиском (70 cm H<sub>2</sub>O) и варијабилним коронарним протоком.

### 3.3.1.1. Опис Langendorff-овог апарата



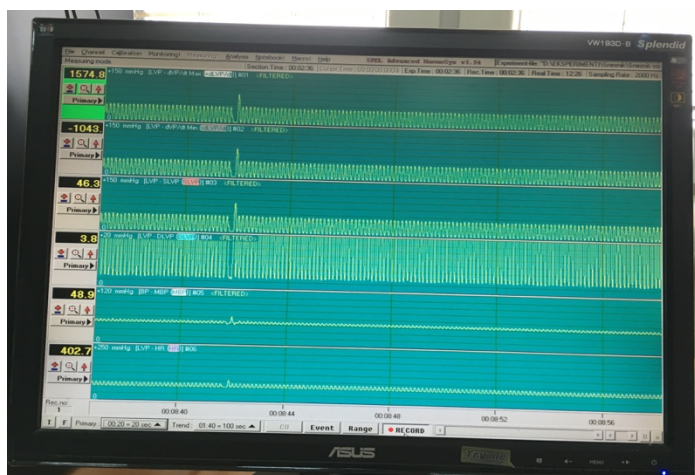
Слика 3. Langendorff-ов апарат

*Ex vivo* експерименти у нашем истраживању спроведени су на Langendorff-овом апарату, произвођача *Experimetria Ltd*, 1062 Будимпешта, Мађарска (Слика 3).

Langendorff-ов апарат састоји се из две вертикалне цеви где је цев са мањим пречником постављена унутар веће. Водено купатило загрева воду која пролази између цеви и загрева читав систем. У цев са мањим пречником се убризгава комплексан физиолошки (*Krebs-Henseleit*-ов) раствор који се у стакленој боци, али и у самом систему, гасира мешавином  $O_2$  и  $CO_2$  у односу 95:5%. Вода која циркулише између цеви се загрева, док *Krebs-Henseleit*-ов раствор у мањој цеву не достигне  $37^\circ C$ . На крају излаза мање цеви налази се канила на коју се поставља срце.

Континуирано снимање функције миокарда омогућено је преко сензора, односно трансдјусера, који је повезан са изолованим срцем пацова и рачунаром који у себи садржи одговарајући софтвер (у нашем случају *Spel Advanced HaemoSys v3.24*). Три типа сензора је коришћено у овом истраживању. Први сензор (трансдјусер BS4 73-0184) са балоном на крају, који се преко леве преткоморе убацује у леву комору омогућава континуирано регистровање следећих параметара леве коморе: максимална стопа промене притиска у левој комори (означена као  $dp/dt \max$ , јединица - mmHg); минимална стопа промене притиска у левој комори (означена као  $dp/dt \min$ , јединица - mmHg); систолни притисак у левој комори (означен као SLVP, јединица - mmHg); дијастолни притисак у левој комори (означен као DLVP, јединица - mmHg) и фреквенца рада срца (означен као HR, јединице - bpm) (Слика 4). Поред ових параметара, у студији је праћен и коронарни проток (означен као CF јединица - ml/min) тако што су вредности очитане након сакупљања ефлуента током једног минута. Други сензор (трансдјусер

перфузионог притиска) постављен директно на канилу, омогућава мерење притисак у аорти, а трећи сензор, постављен је директно у стакленој комори и прати температуру изолованог срца.



**Слика 4.** Оригинална фотографија снимљена током експеримента, показује снимање кардиодинамских параметара

*Krebs Hensenleit*-ов раствор, који се користи за перфузију срца, осигурава адекватну исхрану, имитира екстрацелуларну течност и омогућава несметан рад срца. Састоји се од 118 mmol/L натријум хлорида, 4,7 mmol/L калијум хлорида, 1,66 mmol/L магнезијум сулфата, 24,88 mmol/L натријум хидроген карбоната, 1,18 mmol/L калијум дихидроген фосфата, 5,55 mmol/L глукозе и 2,52 mmol/L калцијум хлорида, при чему рН раствора износи 7,4.

### 3.3.1.2. Изоловање и препарација срца пацова

На крају хроничног протокола и после свих споменутих *in vivo* мерења, животиње су анестезиране комбинацијом кетамина и ксилазина (100 mg/kg и 10 mg/kg) и жртвоване. Након пресецања перикарда, сви срчани крвни судови су ресецирани, срце је изоловано и одмах стављено у физиолошки раствор (температура око  $-4^{\circ}\text{C}$ ) чиме су његове потребе сведене на минимум. Овај поступак стављања срца у ледени физиолошки раствор се симболично назива "физиолошка клешта".

Даља припрема срца, односно уклањање делова који скривају узлазну аорту, спроведена је у леденом раствору. Време од отварања грудног коша до постављања срца на апарат за перфундовање, било је мање од 5 минута, да би се избегла потенцијална оштећења миокарда која могу да настану услед хипоксије и одложене перфузије. Аорта је затим постављана на канилу *Langendorff*-овог апарата, након чега се приступило даљој препарацији срчаног ткива. Након постављања изолованог срца пацова на канилу, отвара се лева преткомора и одвајају се митралне валвуле, да би се обезбедио адекватан положај сензора у левој комори.

Након постављања на *Langendorff*-ов апарат, срце треба да постигне стабилно стање, односно да задовољи одређене функционалне захтеве. Сматра се да је срце стабилизовано онда када сви кардиодинамски параметри буду без значајних промена у више серија мерења и то се постиже током првих 15 до 20 минута. Када се утврди да су сви кардиодинамски параметри константни и да су њихове вредности у оквиру физиолошки прихватљивих, отпочиње се са *ex vivo* протоколом на *Langendorff*-овом апарату (176).

У овој студији, за испитивање ефеката на изолованом миокарду, коришћена су два различита *ex vivo* протокола. Први је подразумевао 90 минута ретроградне перфузије срца, док је други подразумевао 30 минута исхемије и 60 минута реперфузије да би се изазвала И/Р повреда. Ова два протокола заједно, дају целокупну слику потенцијалних кардиопротективних ефеката ДАТС-а на здравим, пацовима са дијабетесом и пацовима са МетС-ом.

Исхемија се експериментално може индуковати као глобална исхемија (која се постиже потпуним прекидом коронарног протока), *low-flow* исхемија, односно исхемија ниског протока (која се постиже слабљењем коронарног протока) или регионална исхемија (која подразумева оклузију коронарне артерије). У нашој студији коришћена је глобална исхемија у трајању од 30 минута, која је праћена шездесетоминутном реперфузијом. Овај протокол, се према литературним подацима сматра оптималним, јер исхемија и реперфузија трају довољно дуго да изазову оштећења на миокарду (176).

На крају *ex vivo* протокола, мерена је тежина срца и нормализована помоћу телесне тежине.

### 3.3.2. Експериментални *ex vivo* протокол: 90 минута ретроградне перфузије срца

Након стабилизације срца, сакупља се коронарни венски ефлуент и бележе се кардиодинамски параметри и коронарни поток. Иста процедура спроведена је и 30 минута након стабилизације у 31, 33, 35, 40, 45, 60, 75. и 90. минути (Схема 8). Групе КТР, ДАТС, ДМ, ДМ+ДАТС, МС и МС+ДАТС биле су подвргнуте овом протоколу.

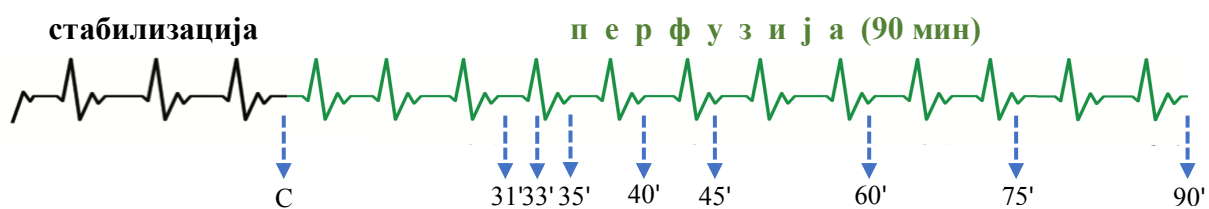


Схема 8. *Ex vivo* протокол: након периода стабилизације (C), срце је праћено 90 минута током ретроградне перфузије.

### 3.3.3. Експериментални *ex vivo* протокол: 30 минута исхемије и 60 минута реперфузије

Након стабилизације, заустављен је проток *Krebs-Henseleit*-овог раствора у трајању од 30 минута, чиме је миокард подвргнут глобалној исхемији. Након тога, проток је поново успостављен и праћени су сви параметри током шездесетоминутне реперфузије. Током стабилизације, као и у 1, 3, 5, 10, 15, 30, 45. и 60. минути реперфузије бележени су кардиодинамски параметри и сакупљан је коронарни венски ефлуент (Схема 9). Групе И/Р, ДАТС+И/Р, ДМ+И/Р, ДМ+ДАТС+И/Р, МС+И/Р и МС+ДАТС+И/Р биле су подвргнуте овом протоколу.

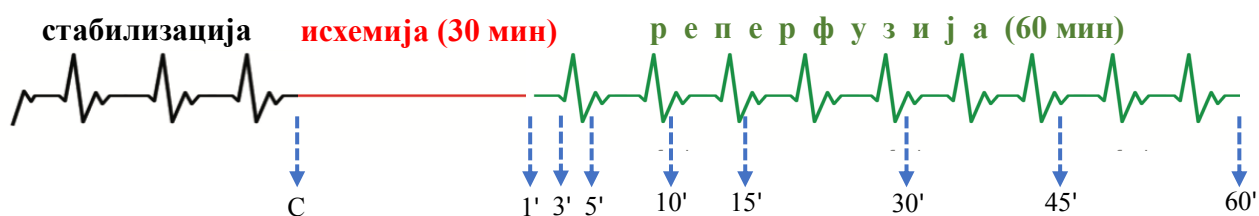


Схема 9. *Ex vivo* протокол: након периода стабилизације (C), изоловано срце је подвргнуто глобалној исхемији у трајању од 30 минута, а потом и реперфузији у трајању од 60 минута.

### 3.3.4. Маркери оксидационог стреса мерени у коронарном венском ефлуенту

Параметри оксидационог стреса мерени у плазми пацова TBARS,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{O}_2^-$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , такође су мерени и у коронарном венском ефлуенту. Прооксидациони параметри мерени у коронарном венском ефлуенту одражавају оксидациони стрес у ендокардијуму леве коморе и коронарном ендотелу. Методологија за одређивање ових параметара у коронарном венском ефлуенту разликује се од оне која се примењује за њихово одређивање у плазми, у само неколико корака, али је принцип исти. У наредним поглављима укратко су описани протоколи за мерење наведених прооксидационих параметара у ефлуенту.

#### 3.3.4.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS)

За одређивање TBARS у коронарном венском ефлуенту коришћено је 0,8 ml ефлуента и 0,2 ml 0,1 M 1% тиобарбитурне киселине растворене у NaOH. Након 15 минута инкубације на 100 °C и 10 минута инкубације на собној температури апсорбанца је мерена на таласној дужини од 530 nm. Као слепа проба, уместо коронарног венског ефлуента коришћена је дестилована вода. Коначне вредности добијене су помоћу истих једначина које су коришћене за узорке плазме (165).

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

За одређивање нитрита у коронарном венском ефлуенту, у епрувете је пипетирано 1000  $\mu\text{l}$  ефлуента, 250  $\mu\text{l}$  свеже припремљеног Griess-овог реагенса и 125  $\mu\text{l}$  пуфера за NO. Након 15 минута мерена је апсорбанца на таласној дужини од 550 nm. За слепу пробу, уместо узорка ефлуента, коришћена је одговарајућа количина дестиловане воде. Коначне вредности добијене су помоћу истих једначина које су коришћене за узорке плазме (166).

### 3.3.4.3. Одређивање супероксид анјон радикала ( $O_2^-$ )

За одређивање  $O_2^-$  у коронарном венском ефлуенту коришћен је исти протокол као и за његово одређивање у узорцима плазме, а подразумевао је следеће кораке: у 50  $\mu$ l узорка ефлуента, *ex tempore* је додато 950  $\mu$ l есејне смеше. Апсорбанца је мерена на 550 nm три пута на сваких 60 секунди уз мешање. Уместо ефлуента, за слепу пробу је коришћена адекватна количина есејне смеше (167).

### 3.3.4.4. Одређивање водоник пероксида ( $H_2O_2$ )

За одређивање водоник пероксида у коронарном венском ефлуенту коришћен је исти протокол као и у узорцима плазме. Овај протокол је подразумевао следеће: у 200  $\mu$ l узорка ефлуента додато је 800  $\mu$ l раствора фенол црвеног и 10  $\mu$ l пероксидазе (POD). Након десетоминутне инкубације на собној температури мерена је апсорбанца на 610 nm. Уместо коронарног венског ефлуента, за слепу пробу коришћена је подједнака запремина дестиловане воде (168).

## 3.4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛИ НА ТКИВУ МИОКАРДА

### 3.4.1. Патохистолошка анализа ткива миокарда

Након *ex vivo* протокола на *Langendorff*-овом апарату, срца су урођена у 4% пуферисан раствор *para*-формалдехида на собној температури. Након тога, сва ткива су дехидратисана помоћу 95% етанола (два пута током 30 минута) и инкубирана у ксилену током 60 минута на температури од 60 до 70 °C, а потом стављена у парафин током 12 часова да би се обезбедила њихова фиксација. Калупи са ткивима су исечени на секције дебљине 4  $\mu$ m, а потом бојени различитим техникама.

---

Микроскопску анализу уздужних пресека срца свих пацова, радио је специјалиста за патологију који није знао који узорак којој групи припада, чиме је максимално обезбеђена објективност и избегнут *bias*. Акцент је био на хистолошким променама леве коморе миокарда, а пре свега на латерални зид, септум и апекс.

#### 3.4.1.1. Бојење ткива миокарда хематоксилин/еозин методом

Хематоксилин/еозин једна је од најчешће коришћених техника бојења у хистологији, посебно за дијагнозу болести. За бојење хематоксилином и еозином доступни су многобројни протоколи, а у нашем истраживању коришћен је *Mayer*-ов протокол за хематоксилин. Парафинске секције су најпре загрејане на 56 °C током 45 минута, а потом ткива рехидратисана у опадајућим концентрацијама етанола. Секције су затим бојене *Mayer*-овим хематоксилином током 10 минута, а потом испране дестилованом водом (10 минута), па текућом водом (5 минута). Након испирања, секције су бојене еозином. За дехидратацију коришћене су растуће концентрације етанола, након чега су секције ткива потопљене у смешу ксилена и апсолутног алкохола, а затим два пута само у ксилолу. На самом крају, секције ткива су премазане канада балзамом и прекривене покровним стаклима. После 24 часова сушења, препарати су анализирани под светлосним микроскопом (*Olympus*, Јапан) (181). Срчана ткива пацова из свих експерименталних група бојена су овом техником.

#### 3.4.1.2. Бојење срчаног тропонина Т

Тропонин је протеински комплекс, који се састоји од I, C и T тропонина. Тропонин T одговоран је за везивање тропомиозина и калцијума, као и за контрактилност стријатних влакана. Разликују се три изоформе тропонина T: брза скелетна, спора скелетна и срчана. Срчана тропонин T (енгл. *cardiac troponin T*, cTnT) изоформа јавља се у два типа cTnT-I и cTnT-II. Заједно са cTnI, cTnT се издваја као значајни дијагностички маркер, али и као биомаркер за процену ризика за акутни



коронарни синдром. Да би се испитао степен оштећења срца након И/Р повреде у нашој студији, у ткиву миокарда бојен је cTnT.

Секције ткива инкубиране су 30 минута у 3% коњском серуму (енгл. *horse normal serum*, NHS), а затим 90 до 120 минута у примарном антителу (cTnT; 200 µg/ml, 1: 200, *Thermo Fisher Scientific, Kalamazoo, MI 49008*). Након уклањања примарног антитела и три испирања PBS-ом, секције су инкубиране антимишјим имуноглобулином G у трајању од 40 минута. Потом су секције опет испране, а онда и инкубиране 30 минута у пероксидаза ензиму (*horseradish peroxidase avidin D*). Након испирања PBS-ом, секције су бојене комплетом диаминобензидином (енгл. *diaminobenzidine*, DAB), а потом дехидратисане етанолом у растућим концентрацијама, очишћене ксиленом и покривене (182). cTnT је бојен само у ткивима срца која су била подвргнута исхемији и реперфузији на *Langendorff*-овом апарату, односно ткива срца из И/Р, ДАТС+И/Р, ДМ+И/Р, ДМ+ДАТС+И/Р, МС+И/Р и МС+ДАТС+И/Р група.

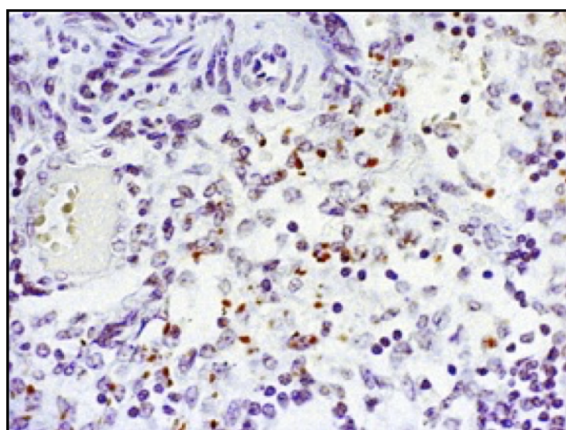
#### 3.4.1.3. ТУНЕЛ есеј

Да би се проценила апоптоза у срцу, коришћена је терминална деоксинуклеотидил трансфераза посредована dUTP-ом (ТУНЕЛ). ТУНЕЛ техника бојења је рађена помоћу комплета за детекцију ћелијске смрти (*Click-iT™ TUNEL Colorimetric IHC Detection Kit, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific*, каталoшки број C10625). Наиме, секције ткива су депарафисане према упутствима произвођача, након чега су плочице потопљене у 4% *para*-формалдехид 15 минута, а потом испране у PBS-у, потопљене у протеиназу К и инкубиране 15 минута на собној температури. Након тога, поновљен је поступак са 4% *para*-формалдехидом и испирањем. Потом је уследила TdT реакција која је подразумевала да се на сваку плочицу пипетира 100 µl TdT реакционог пуфера, а 10 минута након тога, 50 µl TdT реакционе смеше. Након испирања, да би се уклонили ендогени ензими пероксидазе, плочице се потапају у 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и поново испирају PBS-ом, па 1X *Click-iT™ TUNEL Colorimetric* раствором за испирање и на крају дејонизованом водом. Пола сата након инкубације плочица са 1X *Streptavidin-Peroxidase Conjugate*, плочице се опет испирају већ наведеним растворима, према упутству произвођача. За визуелизацију апоптотских миоцита коришћена је

смеша DAB хромогена и DAB супстратног пуфера у односу 1:20. Као контраст коришћен је хематоксилин (183).

Заступљеност миоцита са ТУНЕЛ позитивним једром квантификована је у пет случајно изабраних видних поља (на увељачању 200X и 400X). Овом бојењу била су подвргнута срца која су претходно била изложена И/Р повреди, односно срчана ткива из И/Р, ДАТС+И/Р, ДМ+И/Р, ДМ+ДАТС+И/Р, МС+И/Р и МС+ДАТС+И/Р група.

У студији је за повреду специфичности и квалитета имунохистохемијске методе постојала позитивна контрола. Ткиво лимфног чвора, за које је раније утврђено да има ћелије са ТУНЕЛ позитивним једром је коришћено у ту сврху (Слика 5). Пресеци позитивне контроле третирани су на исти начин и у истом тренутку као и испитивана ткива срца.



Слика 5. Репрезентативни приказ обојеног лимфног чвора (позитивна спољашња контрола).

#### ***3.4.2. Релативна експресија антиоксидационих, (анти)апоптотских и (анти)инфламацијских гена у левој комори срца***

Супероксид дисмутаза **Cu-Zn** позната као SOD-1 је ензим кодиран SOD-1 геном, који се налази на 21. хромозому. Везује Cu и Zn и убраја се у једну од три супероксид дисмутазе која учествује у уклањању слободних радикала из организма. Претпоставља се да се SOD-1 налази на мембрани митохондрија и његови агрегати на мембрани су повезани са Bcl-2. SOD-1 поседује значајна антиапоптотска својства, а

---

подаци из литературе указују да SOD инхибира апоптозу тако што интерагује са Bcl-2 протеинима или са самим митохондријама (184).

**Манган зависна SOD** такође позната као SOD-2, је ензим кодиран SOD-2 геном, који се налази на 6. хромозому. Убраја се у гвожђе/манган SOD фамилију и трансформише токсичне супероксиде у водоник пероксид и молекулски кисеоник. Најзначајније је да овај протеин поседује антиапоптотске ефекте и да се супротставља ROS, јонизујућем зрачењу и инфламацијским цитокинима (185).

SOD-1 и SOD-2 су пресудни за уклањање ROS током И/Р повреде, посебно у миокарду. ROS ослобођен током И/Р директно делује на ћелије и апоптотске сигнале који доприносе оштећењу и смрти ћелија. Познато је да SOD-1 и -2 могу да ограниче штетне ефекте ROS, омогуће значајну кардиопротекцију током И/Р повреде и имају важну улогу у регулисању апоптозе и ћелијске смрти (186).

**Ендотелна азот моноксид синтаза (eNOS)** је ендогени вазодилататорни гас који регулише пречник крвних судова и спречава пролиферацију и апоптозу у зиду крвних судова. У недавно спроведеним студијама, показано је да инсулин активира eNOS фосфорилацију и повећава продукцију NO у ткивима која су била изложена И/Р повреди (187).

**В-ћелијски лимфом 2 (Bcl-2)** је снажан антидот ћелијске смрти и може се супротставити и онима који су зависни од каспазе и онима који нису. Упркос томе што се означава као инхибитор апоптозе, Bcl-2 поседује и значајна антиоксидациона својства (188).

**Вах и каспазе** су укључени у иницијалну и завршну фазу апоптозе. Међутим, поједини докази указују да играју и значајну проинфламацијску улогу у И/Р повреди миокарда. **Каспаза-3** која је пронађена у кардиомиоцитима, може да утиче на раскидање веза унутар Bcl-2, при чему долази до ослобађања цитохрома C и даљег оштећења ћелија. Поред тога, активација каспазе-9 регулише транскрипција Bcl-2 чиме се утиче на инхибицију тирозин киназе. Према томе, производња и функција Bcl-2 могу бити манипулисане изменом активности каспаза (189, 190).

**Нуклеарни транскрипциони фактор Б** (енгл. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, **NF-κB**) је протеински комплекс који контролише транскрипцију ДНК, продукцију цитокина и преживљавање ћелија. Активација NF-κB

---

доводи до производње проинфламацијских цитокина, док његова повећана експресија утиче на ширење површине захваћене инфарктом у срцу, бубрезима или мозгу (191).

**Фактор некрозе тумора  $\alpha$**  (енгл. *tumor necrosis factor*, **TNF- $\alpha$** ) производе миоцити, као одговор на стрес у ћелијама. Подаци из литературе указују да продукција **TNF- $\alpha$**  у миокарду расте у првим сатима након И/Р повреде или као одговор на липополисахариде (192).

Најновији подаци указују да "инфламацијски цитокини" могу имати значајне ефекте на функцију миокарда. **Интерлеукин (IL)-6** може да изазове депресију срца зависну од азот монооксида, а његова улога у срчаним миоцитима захваћеним инфарктом још увек се испитује (193). **IL-17A** који углавном производе гама делта ( $\gamma\delta$ ) Т ћелије, има улогу у патогенези И/Р повреде, највероватније јер изазива апоптозу кардиомиоцита и инфилтрацију неутрофила (194).

Антиинфламацијски цитокин **IL-10** је пронађен у плазми пацијената са И/Р повредом срца, где највероватније инхибира TNF- $\alpha$  и NO чиме остварује протективне ефекте. Такође, постоје и претпоставке да се IL-10 може користити у терапији различитих форми И/Р повреда.

Иако се наслућује да **IL-13** има улогу у И/Р повреди, још увек се не може са сигурношћу рећи да ли промовише протективне, или пак штетне ефекте (195, 196).

Због свега наведеног, у овој студији испитивани су ефекти хроничне примене ДАТС-а на релативну експресију споменутих антиоксидационих, (анти)апоптотских и (анти)инфламацијских гена у левој комори срца пацова.

#### 3.4.2.1. Квантитативна полимеразна ланчана реакција у реалном времену (RT-PCR)

Укупна РНК из леве коморе ткива миокарда изолована је помоћу TRIzol реагенса (*Invitrogen, Carlsbad, CA*) према упутствима произвођача. Затим је извршена реверзна транскрипција РНК ( $\mu\text{g}$ ) помоћу комплекта за cDNA (*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City, California, USA*). Квантитативна полимеразна ланчана реакција у реалном времену (енгл. *real-time quantitative polymerase chain reaction*, RT-PCR) изведена је помоћу *Thermo Scientific Luminaris Color HiGreen*

---

qPCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) и мРНК специфичних, комерцијално доступних прајмера за:

- маркере оксидационог стреса: SOD-1, SOD-2 и eNOS;
  - (анти)апоптотске маркере: Вах, Bcl-2, каспазе-3 и каспазе-9;
  - (анти)инфламацијске маркере: NFkB, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-13 и IL-17A.
- $\beta$ -актин је коришћен као *housekeeping gene* (Invitrogen, Carlsbad, CA) (Табела 1).

PCR је рађен у *Mastercycler ep realplex* (Eppendorf, Hamburg, Germany), а подаци су анализирани и релативна експресија гена је прерачуната према *Livak*-у и *Schmittgen*-у (197).

Табела 1. Комерцијално доступни прајмери коришћени у qPCR анализи

|                                 | Леви прајмер             | Десни прајмер           |
|---------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| <b><math>\beta</math>-актин</b> | GATCAGCAAGCAGGAGTACGAT   | GTAACAGTCCGCCTAGAAGCAT  |
| <b>SOD-1</b>                    | TGAAGAGAGGCATGTTGGAGAC   | CACACGATCTTCAATGGACACA  |
| <b>SOD-2</b>                    | AATCAACAGACCCAAGCTAGGC   | CACAATGTCACTCCTCTCCGAA  |
| <b>eNOS</b>                     | GAGGGAGTCAGCCTAAATCCTG   | ATCAAAGCATAACGAAGAGGGCA |
| <b>Bcl-2</b>                    | GCAAAGCACATCCAATAAAAAGCG | GTAATTCATCACGATCTCCCGG  |
| <b>Вах</b>                      | GCTACAGGGTTTCATCCAGGAT   | ATGTTGTTGTCCAGTTCATCGC  |
| <b>каспаза-3</b>                | GGAAGATCACAGCAAAAAGGAGC  | GCAGTAGTCGCCTCTGAAGAAA  |
| <b>каспаза-9</b>                | TGTAATCCAGGGAAGATCGAGA   | CGTTGTTGATGATGAGGCAGTG  |
| <b>NF-kB</b>                    | GTTTGGTTTGAGACATCCCTGC   | CTGTCTTATGGCTGAGGTCTGG  |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b>  | GAAAGCATGATCCGAGATGTGG   | CAGGAATGAGAAGAGGCTGAGG  |
| <b>IL-6</b>                     | GATACCACCCACAACAGACCAG   | GTGCATCATCGCTGTTCATACA  |
| <b>IL-10</b>                    | CTTACTGGCTGGAGTGAAGACC   | CTGGGAAGTGGGTGCAGTTATT  |
| <b>IL-13</b>                    | GCAAGTGTCTGAAGCAGCTATG   | TCTGTCAGCCTCAAAGAACAGG  |
| <b>IL-17</b>                    | GCAAGAGATCCTGGTCCTGAAG   | AGGTCTCTGTTTAGGACGCATG  |

Квантификација наведених маркера спроведена је у И/Р, ДАТС+И/Р, ДМ+И/Р, ДМ+ДАТС+И/Р, МС+И/Р и МС+ДАТС+И/Р групама.

### 3.5. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА

Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација (СД). Све фигуре и табеле су израђене у *Microsoft Excel* програму за *Mac* рачунаре, верзија 16.

За статистичку анализу, поређене су групе од интереса: контролна група здравих пацова, пацова са дијабетесом или метаболичким синдромом и пацова са дијабетесом или метаболичким синдромом третираних ДАТС-ом. За анализирање података који су прикупљани током експерименталног протокола (унос хране и воде, телесна тежина, вредности глукозе) коришћена је двосмерна анализа варијансе (енгл. *two-way mixed ANOVA*), уз *Fisher post-hoc* тест. За остале параметре коришћена је једносмерна анализа варијансе (енгл. *one-way ANOVA*).

За резултате који се односе на *ex vivo* део, поређења су рађена у групи и између група. У оба случаја за поређење су коришћене следеће тачке од интереса: С (стабилизација), (тридесет)први и последњи минут (ре)перфузије (означени као 31 и 90, односно 1 и 60). За поређења у групи, наведене тачке од интереса су поређене међусобно, док су се исте тачке у различитим групама користиле за поређење између група.

Р вредности  $<0,05$  сматране су за статистички значајне. Статистичка анализа је спроведена у *IBM-SPSS* програму, верзија 20.

**IV**

**РЕЗУЛТАТИ**

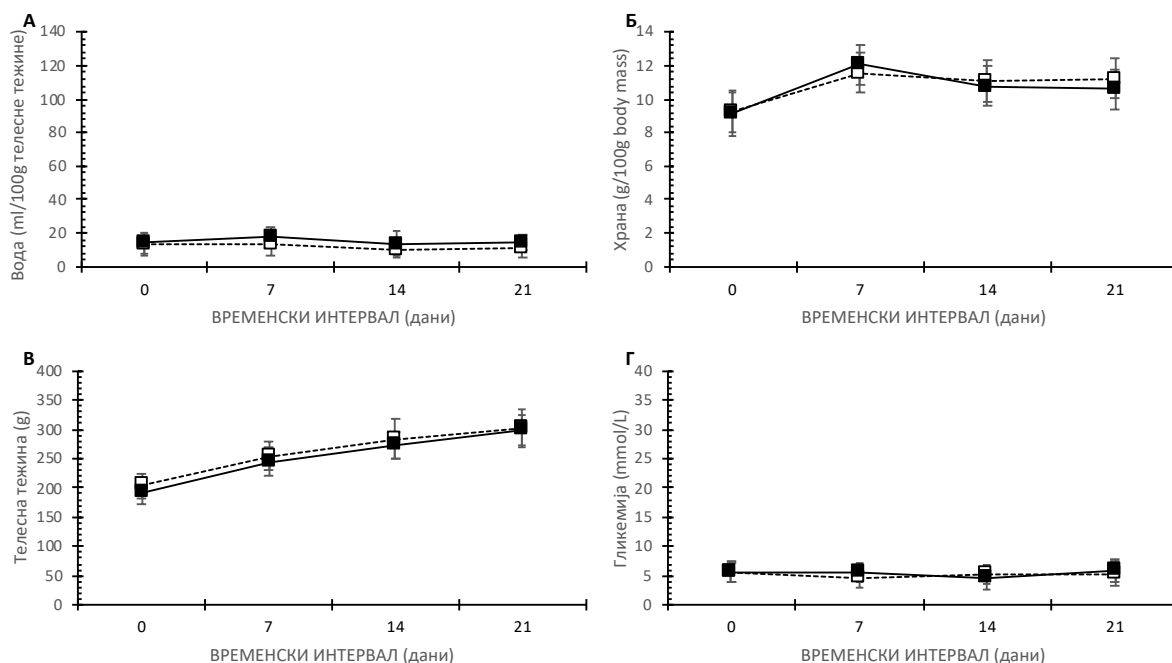
## 4. РЕЗУЛТАТИ

У циљу лакшег праћења, резултати студије су представљени у три засебне целине: ефекти третмана ДАТС-ом на здраве пацове, пацове са дијабетесом и пацове са метаболичким синдромом.

### 4.1. ЕФЕКТИ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА ЗДРАВЕ ПАЦОВЕ

#### 4.1.1. Карактеристике пацова праћене током хроничног протокола

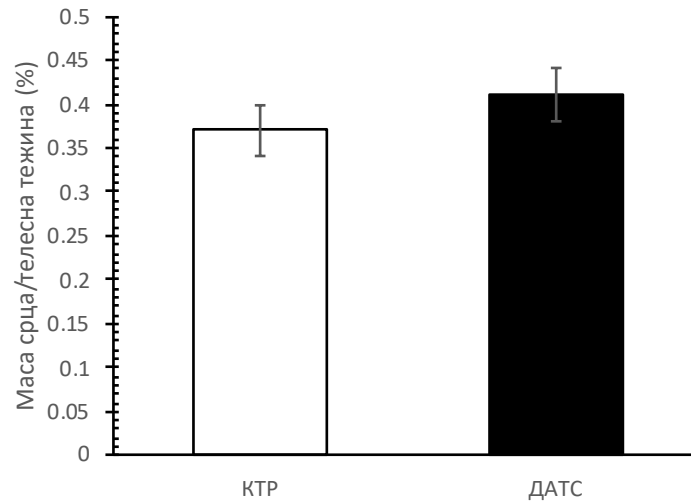
Третман ДАТС-ом није утицао на унос воде и хране код здравих пацова. Такође, телесна тежина и нивои глукозе у крви били су без значајних разлика између третираних и нетретираних здравих пацова (КТР и ДАТС групе) (График 1).



**График 1.** Ефекти третмана ДАТС-ом на (А) конзумацију воде, (Б) конзумацију хране, (В) телесну тежину и (Г) гликемију наше током тронедељног третмана ДАТС-ом код здравих, нетретираних пацова - КТР (---□---) и здравих, третираних пацова – ДАТС (—■—). 0 – непосредно пре третмана ДАТС-ом; 7 – након 7 дана од третмана ДАТС-ом; 14 – након 14 дана од третмана ДАТС-ом; 21 – након 21 дан од третмана ДАТС-ом. Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n = 12, по групи.



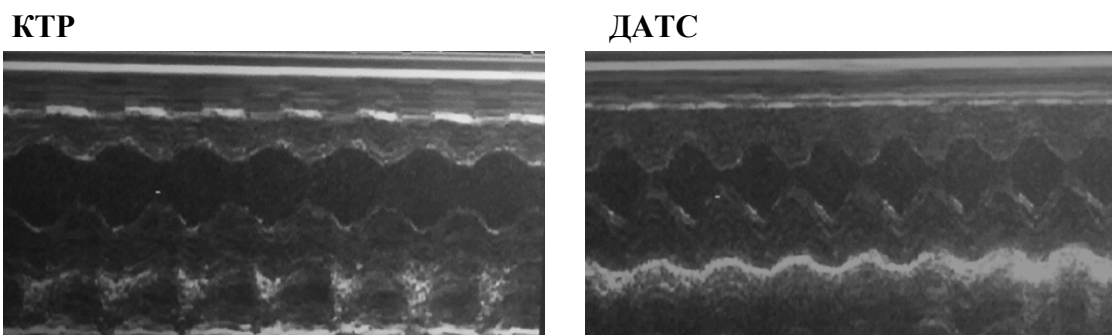
Третман ДАТС-ом није утицао на однос тежине срца и телесне тежине, односно промене у процентима који су добијени прерачунавањем овог односа (**График 2**).



**График 2.** Ефекти третмана ДАТС-ом на однос масе срца и телесне тежине пацова. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД,  $n = 12$ , по групи.

#### 4.1.2. Функција миокарда праћена *in vivo*

Тронедељни третман ДАТС-ом довео је до статистички значајних побољшања вредности IVSd и FS код здравих пацова, али није утицао на остале кардиодинамске параметре мерене *in vivo*, ехокардиографијом (Слика 6 и Табела 2).



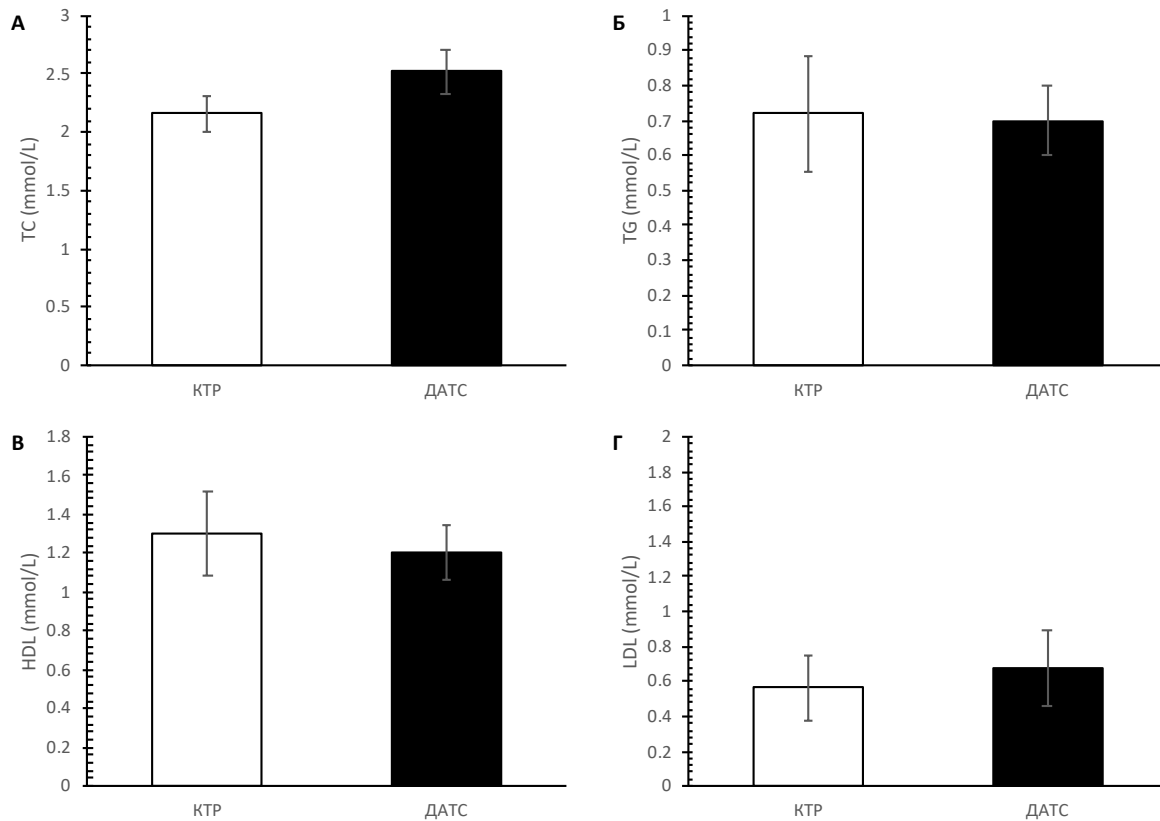
**Слика 6.** Репрезентативна фотографија ехокардиографије миокарда из М-режима у КТР и ДАТС групама.

**Табела 2.** Кардиодинамски параметри мерени *in vivo* код здравих, нетретираних (КТР) пацова и здравих, третираних (ДАТС) пацова. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД,  $n = 12$ , по групи. \*  $P < 0,05$  ДАТС vs. КТР.

|            | КТР              | ДАТС              |
|------------|------------------|-------------------|
| IVSd (cm)  | 0,163 $\pm$ 0,02 | 0,149 $\pm$ 0,02* |
| LVIDd (cm) | 0,638 $\pm$ 0,05 | 0,610 $\pm$ 0,01  |
| LVPWd (cm) | 0,204 $\pm$ 0,05 | 0,222 $\pm$ 0,04  |
| IVSs (cm)  | 0,301 $\pm$ 0,03 | 0,275 $\pm$ 0,04  |
| LVIDs (cm) | 0,267 $\pm$ 0,08 | 0,213 $\pm$ 0,06  |
| LVPWs (cm) | 0,322 $\pm$ 0,05 | 0,387 $\pm$ 0,01  |
| FS (%)     | 58,55 $\pm$ 4,13 | 66,80 $\pm$ 4,81* |

### 4.1.3. Липидни параметри мерени након хроничног третмана ДАТС-ом

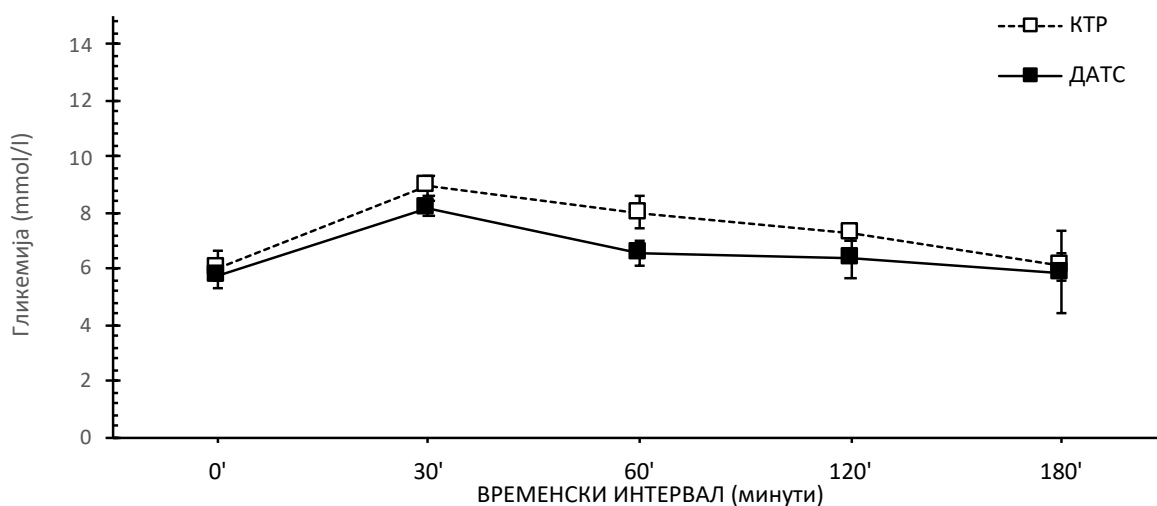
Третман здравих пацова ДАТС-ом није утицао ни на један од измерених липидних параметара (График 3).



**График 3.** Ефекти третмана ДАТС-ом на липидне параметре у КТР и ДАТС групама. (А) укупни холестерол – TC, (Б) триглицериди – TG, (В) липопротеин високе густине – HDL и (Г) липопротеин ниске густине – LDL. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД,  $n = 12$ , по групи.

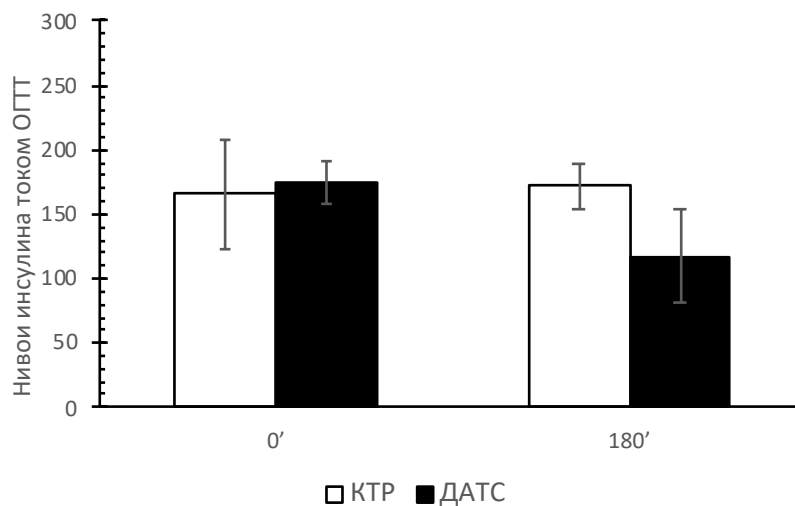
#### 4.1.4. Нивои инсулина и глукозе током теста оралног оптерећења глукозом (ОГТТ)

На **Графику 4**, приказане су просечне вредности глукозе, измерене у крви током ОГТ теста. Ниво глукозе у крви био је сличан у обе испитиване групе здравих пацова (КТР vs. ДАТС) непосредно пред администрацију глукозе, као и током ОГТТ (током 180 минута праћења).



**График 4.** Ефекти третмана ДАТС-ом код здравих пацова на нивое глукозе током ОГТ теста. Гликемија наше (означена као 0'), и нивои глукозе у 30', 60', 120' и 180' након администрације глукозе у дози од 2 g/kg телесне тежине. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД,  $n = 6$ , по групи.

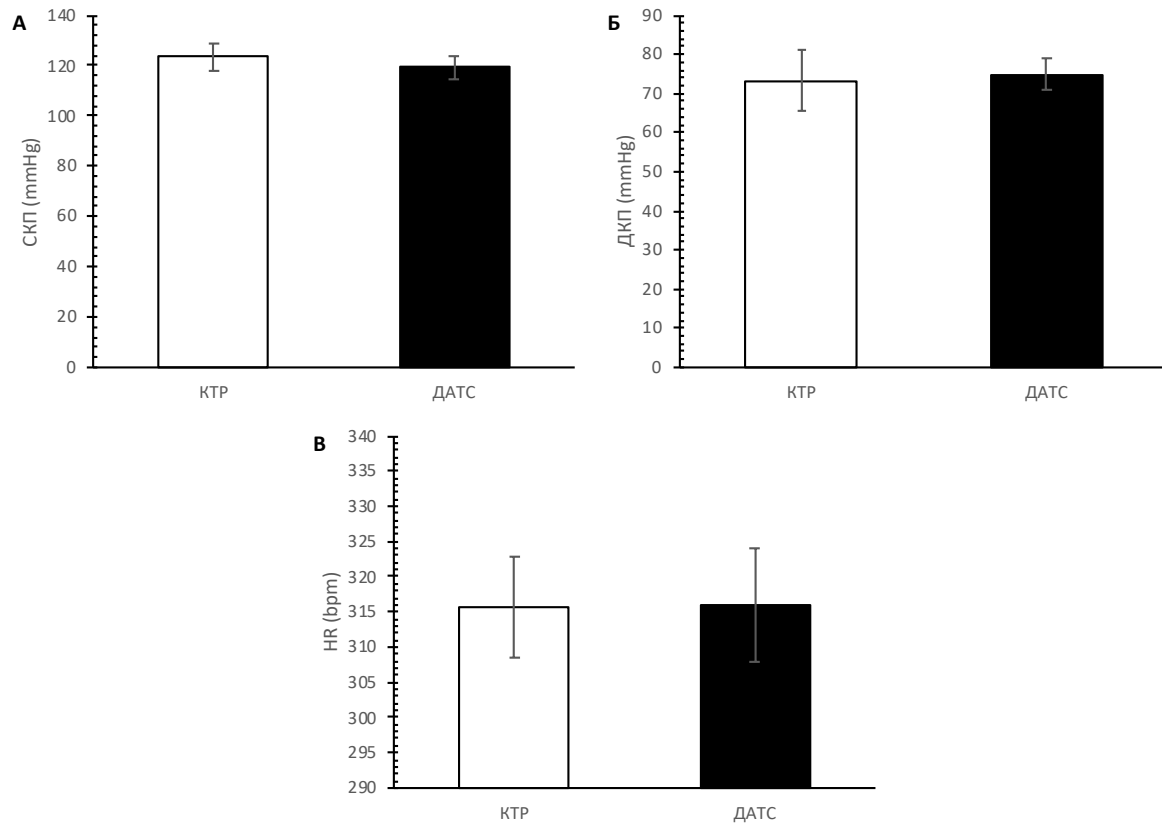
Просечне вредности инсулина мереног у крви, непосредно пре и 180 минута након администрације глукозе, приказане су на **Графику 5**. Ниво инсулина био је приближно исти у обе групе здравих пацова (КТР и ДАТС).



**График 5.** Ефекти третмана ДАТС-ом код здравих пацова на нивое инсулина непосредно пре (0') и 180 минута (180') након администрације глукозе у дози од 2 g/kg телесне тежине. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД, n = 12, по групи.

#### 4.1.5. Крвни притисак и срчана фреквенца

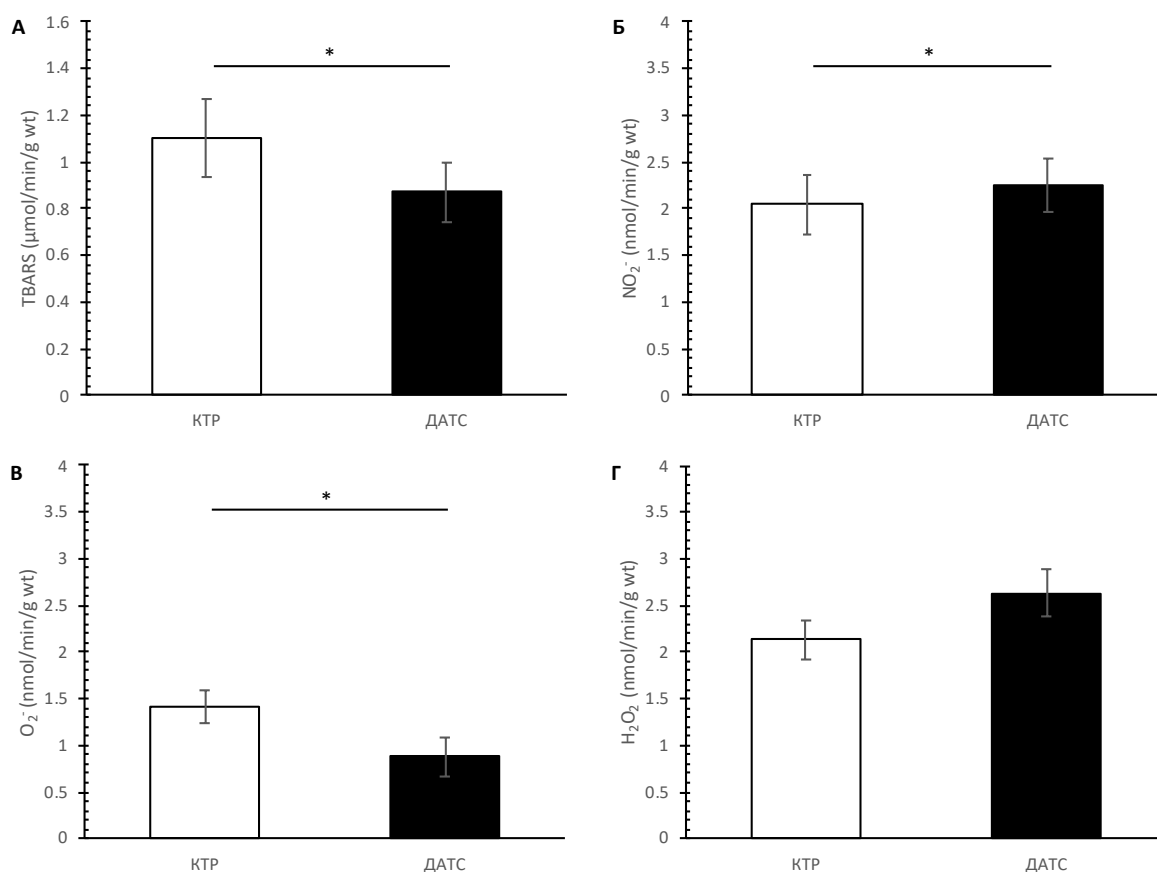
Тронеделњи третман ДАТС-ом код здравих пацова, није утицао на промену систолног и дијастолног крвног притиска, као ни на фреквенцу срца (**График 6**).



**График 6.** Ефекти третмана ДАТС-ом код здравих пацова на (А) систолни крвни притисак – СКП, (Б) дијастолни крвни притисак – ДКП и (В) срчану фреквенцу – HR. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД,  $n = 6$ , по групи.

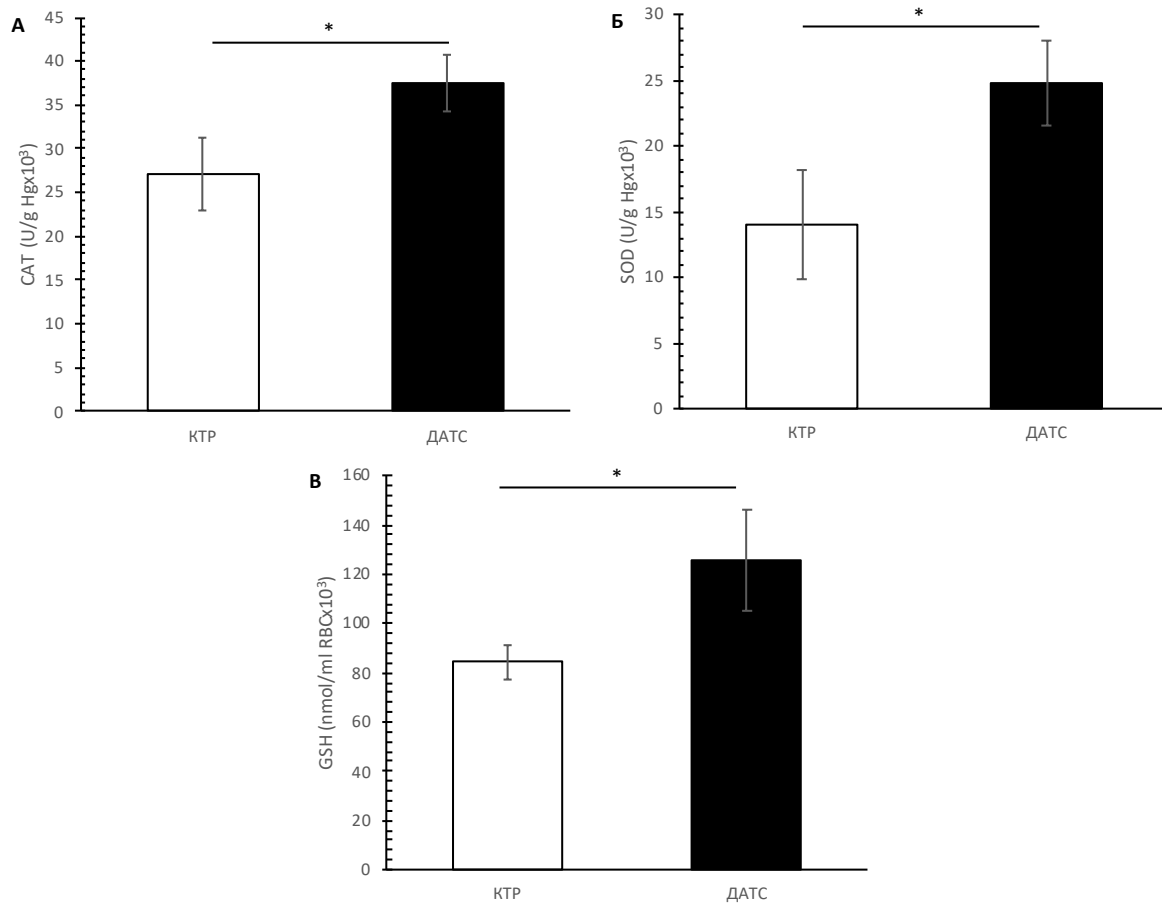
#### 4.1.6. Нивои прооксидационих и антиоксидационих параметара мерени у системској циркулацији

Третман ДАТС-ом код здравих пацова довео је до значајног снижења нивоа ТВАРС и  $O_2^-$ . Са друге стране, ниво  $NO_2^-$  био је значајно виши у ДАТС, у односу на КТР групу (График 7).



**График 7.** Ефекти третмана ДАТС-ом код здравих пацова на (А) индекс липидне пероксидације – мерен као ТВАРС, (Б) нитрите –  $NO_2^-$ , (В) супероксид анјон радикал –  $O_2^-$  и (Г) водоник пероксид –  $H_2O_2$ . Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД,  $n=12$ , по групи. \*  $P<0,05$  ДАТС vs. КТР.

Третман ДАТС-ом код здравих пацова, довео је до статистички значајно виших вредности свих мерених антиоксидационих параметара (CAT, SOD и GSH) (График 8).

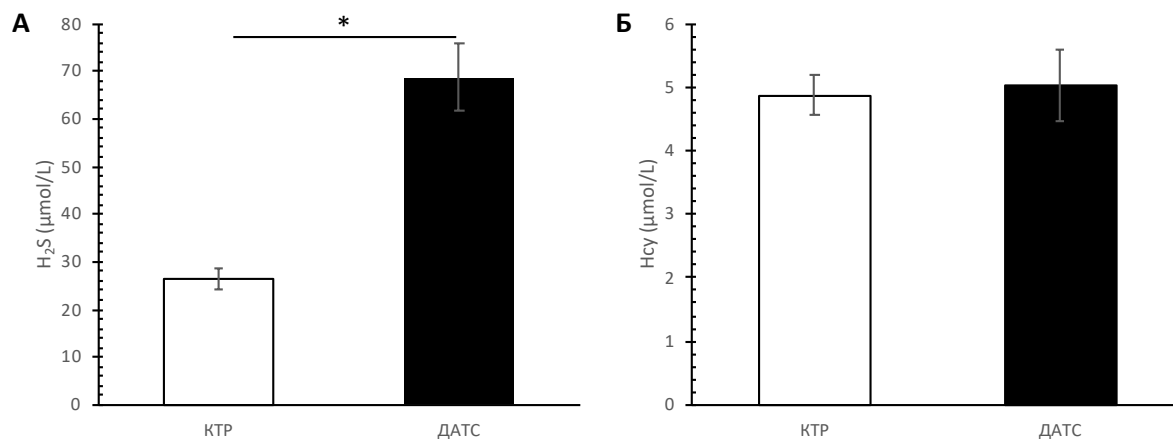


**График 8.** Ефекти третмана ДАТС-ом код здравих пацова на активност (А) каталазе – CAT, (Б) супероксид дисмутазе – SOD и (В) редукованог глутатиона – GSH. Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n =12, по групи. \* P<0,05 ДАТС vs. КТР.



#### 4.1.7. Нивои водоник сулфида и хомоцистеина у серуму

Третман ДАТС-ом утицао је на статистички значајно повећање нивоа  $H_2S$  у серуму, док је са друге стране, ниво хомоцистеина остао непромењен у односу на вредности измерене у КТР групи (График 9).



**График 9.** Ефекти третмана ДАТС-ом код здравих пацова на нивое (А)  $H_2S$  у серуму и (Б) хомоцистеина у серуму –  $Hcy$ . Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД,  $n =12$ , по групи. \*  $P < 0,05$  ДАТС vs. КТР.

#### 4.1.8. Ex vivo протокол: 90 минута ретроградне перфузије изолованог срца пацова

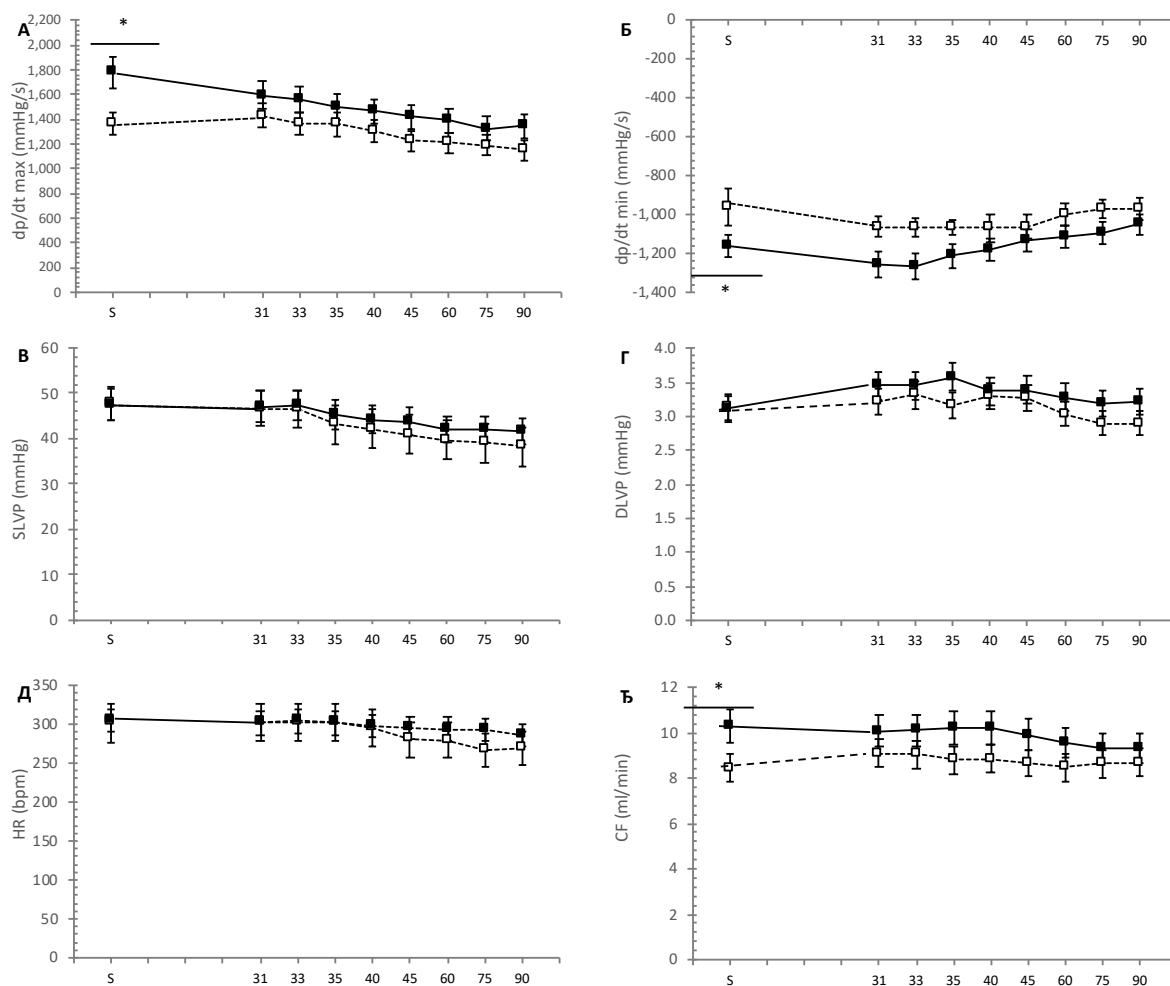
##### 4.1.8.1. Кардиодинамски параметри

Промене кардиодинамских параметара након стабилизације и током деведесетоминутне ретроградне перфузије изолованог срца пацова, приказане су у **Табели 3**. У КТР групи примећен је статистички значајан пад SLVP током времена (C vs. 31 и 31 vs. 90). Са друге стране, у ДАТС групи, вредности dp/dt max (C vs. 90) и SLVP (C vs. 90 и 31 vs. 90) биле су значајно снижене на крају периода перфузије.

**Табела 3.** Кардиодинамски параметри праћени током деведесетоминутне ex vivo ретроградне перфузије изолованог срца здравих пацова (здрави, нетретирани пацови - КТР и здрави третиран пацови - ДАТС). Стабилизација – C; 31. минут ретроградне перфузије – 31 и 90. минут ретроградне перфузије – 90. Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n = 6, по групи. <sup>a</sup> P<0,05 C vs. 31; <sup>b</sup> P<0,05 C vs. 90; <sup>c</sup>P<0,05 31 vs. 90.

|      |    | dp/dt max (mmHg)              | dp/dt min (mmHg)  | SLVP (mmHg)                |
|------|----|-------------------------------|-------------------|----------------------------|
| КТР  | C  | 1363,85 ± 105,43              | -962,43 ± 98,74   | 47,80 ± 3,74               |
|      | 31 | 1426,43 ± 131,20              | -1061,61 ± 48,96  | 46,70 ± 3,74               |
|      | 90 | 1146,83 ± 85,85               | -970,48 ± 57,60   | 38,25 ± 4,28 <sup>bc</sup> |
| ДАТС | C  | 1776,08 ± 143,91              | -1157,65 ± 249,50 | 47,48 ± 3,51               |
|      | 31 | 1592,10 ± 182,09              | -1257,46 ± 139,35 | 47,12 ± 3,28               |
|      | 90 | 1345,58 ± 224,70 <sup>b</sup> | -1051,25 ± 95,84  | 41,48 ± 5,51 <sup>bc</sup> |
|      |    | DLVP (mmHg)                   | HR (bpm)          | CF (ml/min)                |
| КТР  | C  | 3,13 ± 0,22                   | 301,18 ± 15,56    | 8,45 ± 0,84                |
|      | 31 | 3,22 ± 0,20                   | 301,63 ± 16,13    | 9,10 ± 0,37                |
|      | 90 | 2,90 ± 0,28                   | 268,70 ± 17,96    | 8,70 ± 0,37                |
| ДАТС | C  | 3,10 ± 0,24                   | 304,60 ± 23,86    | 10,32 ± 0,97               |
|      | 31 | 3,45 ± 0,19                   | 301,60 ± 15,82    | 10,07 ± 1,05               |
|      | 90 | 3,22 ± 0,42                   | 285,88 ± 25,00    | 9,33 ± 0,67                |

Ефекти конзумације ДАТС-а код здравих пацова, на *ex vivo* праћене кардиодинамске параметре приказани су на **Графику 10**. Брзине развоја притиска у комори ( $dp/dt$  max и  $dp/dt$  min), као и CF значајно су побољшани, у периоду стабилизације (С), код пацова који су били подвргнути терапији ДАТС-ом, у односу на КТР групу.



**График 10.** Ефекти третмана ДАТС-ом на (А) максималну стопу развоја притиска у левој комори –  $dp/dt$  max, (Б) минималну стопу развоја притиска у левој комори –  $dp/dt$  min, (В) систолни притисак у левој комори – SLVP, (Г) дијастолни притисак у левој комори – DLVP, (Д) фреквенцу срца – HR и (Ђ) коронарни проток – CF. КТР - здрави, нетретирани (---□---) и ДАТС - здрави, третирани пацови (—■—). Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n = 6, по групи. \* P<0,05 ДАТС vs. КТР.

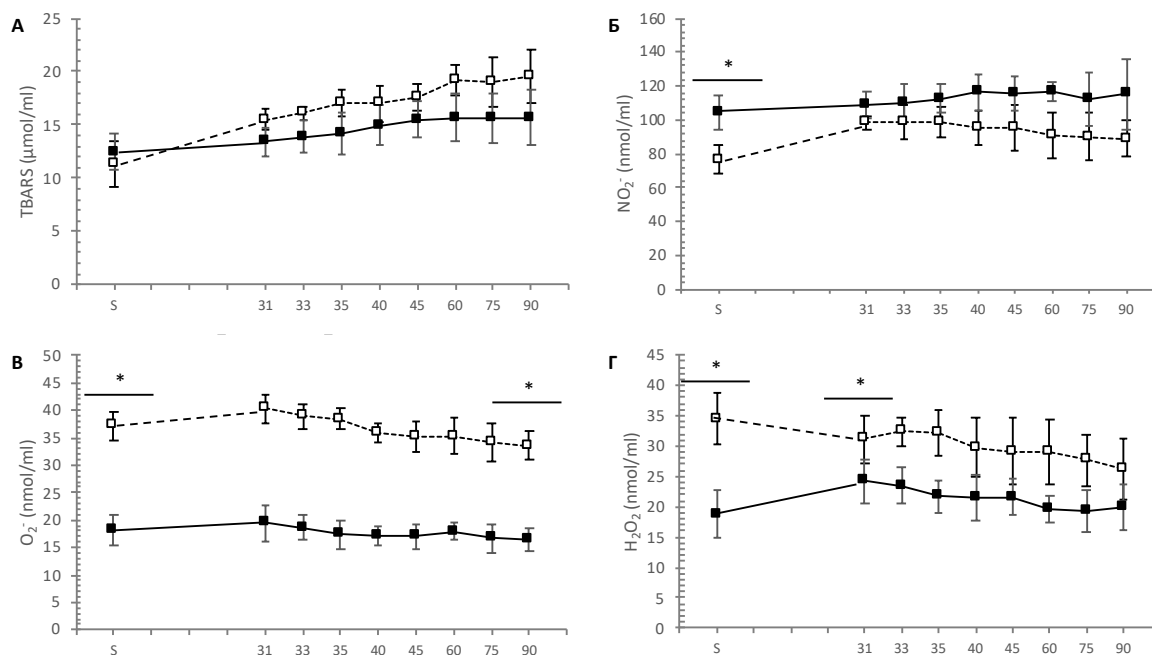
## 4.1.8.2. Прооксидациони маркери мерени у коронарном венском ефлуенту

Током периода перфузије, нивои TBARS и  $\text{NO}_2^-$  статистички значајно су повећани у КТР групи (TBARS - C vs. 31 и C vs. 90, као и  $\text{NO}_2^-$  - C vs. 31). Са друге стране, у ДАТС групи нису уочене значајне разлике у нивоима измерених параметара током *ex vivo* перфузије срца (Табела 4).

**Табела 4.** Прооксидациони параметри мерени у коронарном венском ефлуенту који је прикупљан током деведесетоминутне ретроградне перфузије изолованог срца здравих пацова (здрави, нетретирани пацови - КТР и здрави третиран пацови - ДАТС). Стабилизација – C; 31. минут ретроградне перфузије – 31 и 90. минут ретроградне перфузије – 90. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД, n = 6, по групи. <sup>a</sup> P<0,05 C vs. 31; <sup>b</sup> P<0,05 C vs. 90.

|      |    | TBARS<br>( $\mu\text{mol/ml}$ ) | $\text{NO}_2^-$<br>( $\text{nmol/ml}$ ) | $\text{O}_2^-$<br>( $\text{nmol/ml}$ ) | $\text{H}_2\text{O}_2$<br>( $\text{nmol/ml}$ ) |
|------|----|---------------------------------|---|--|--|
| КТР  | C  | 11,39 $\pm$ 2,14                | 76,49 $\pm$ 8,36                        | 31,14 $\pm$ 5,58                       | 34,47 $\pm$ 4,15                               |
|      | 31 | 15,50 $\pm$ 1,04 <sup>a</sup>   | 98,44 $\pm$ 3,95 <sup>a</sup>           | 40,34 $\pm$ 5,01                       | 31,09 $\pm$ 3,86                               |
|      | 90 | 19,57 $\pm$ 2,45 <sup>b</sup>   | 89,14 $\pm$ 10,60                       | 33,59 $\pm$ 7,04                       | 26,25 $\pm$ 5,08                               |
| ДАТС | C  | 12,45 $\pm$ 1,71                | 104,54 $\pm$ 10,34                      | 18,08 $\pm$ 4,59                       | 18,79 $\pm$ 3,98                               |
|      | 31 | 13,39 $\pm$ 1,27                | 109,26 $\pm$ 7,82                       | 19,44 $\pm$ 4,40                       | 24,22 $\pm$ 3,63                               |
|      | 90 | 15,69 $\pm$ 2,57                | 115,22 $\pm$ 20,88                      | 16,34 $\pm$ 11,12                      | 19,93 $\pm$ 3,68                               |

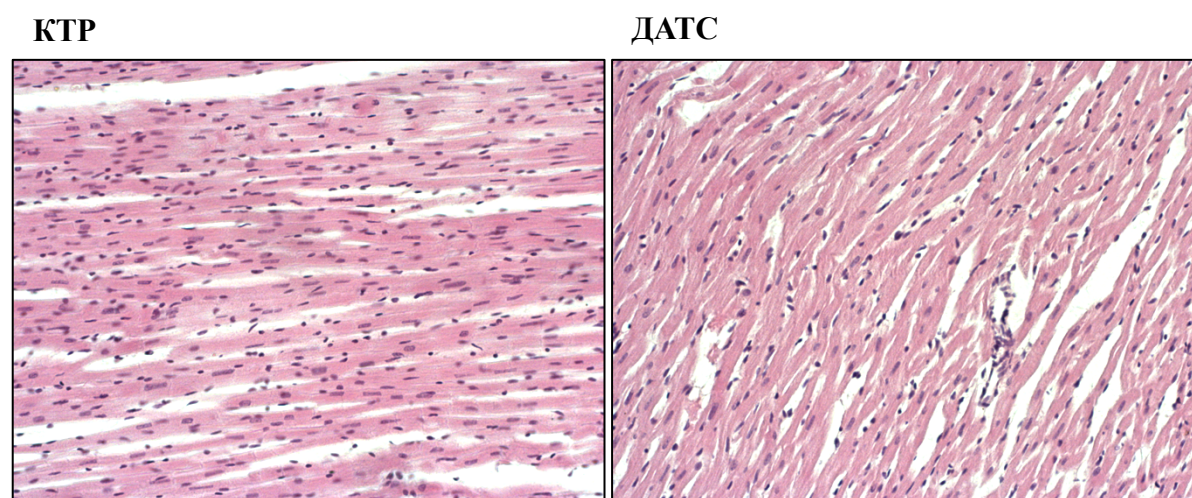
Разлике у концентрацијама измерених параметара оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту код здравих нетретираних (КТР) и здравих третираних (ДАТС) пацова приказане су на **Графику 11**. Хронични третман ДАТС-ом, утицао је на статистички значајно повећање нивоа  $\text{NO}_2^-$  (у С тачки) и снижење вредности  $\text{O}_2^-$  (у тачкама С, 31 и 90) и  $\text{H}_2\text{O}_2$  (у тачкама С и 31).



**График 11.** Ефекти третмана ДАТС-ом на (А) индекс липидне пероксидације – мерен као TBARS, (Б) нитрите –  $\text{NO}_2^-$ , (В) супероксид анјон радикал –  $\text{O}_2^-$  и (Г) водоник пероксид –  $\text{H}_2\text{O}_2$ . КТР - здрави, нетретирани пацови (---□---) и ДАТС - здрави, третирани пацови (—■—). Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД,  $n = 6$ , по групи. \*  $P < 0,05$  ДАТС vs. КТР.

## 4.1.8.3. Бојење срчаног ткива хематоксилин/еозин методом

Као што је приказано на **Слици 7**, код обе испитиване групе здравих пацова, КТР и ДАТС, срчано ткиво било је уобичајених особина. Срчане структуре су очуване, уз минималне, дискретне дегенеративне промене које укључују фокалну и уницелуларну некрозу, која је највероватније последица *ex vivo* модела, којем је срце било подвргнуто. Миофибрили су симетрични, добро организовани са Z линијама у саркомерама.



**Слика 7.** Репрезентативни приказ обојеног ткива миокарда хематоксилин/еозин техником, срца која су претходно била подвргнута деведесетоминутној ретроградној перфузији (КТР – здрави, нетретирани пацови и ДАТС – здрави, третирани пацови), увећање 200 х; скала 2 mm.

4.1.9. *Ex vivo* протокол: 30 минута исхемије и 60 минута реперфузије

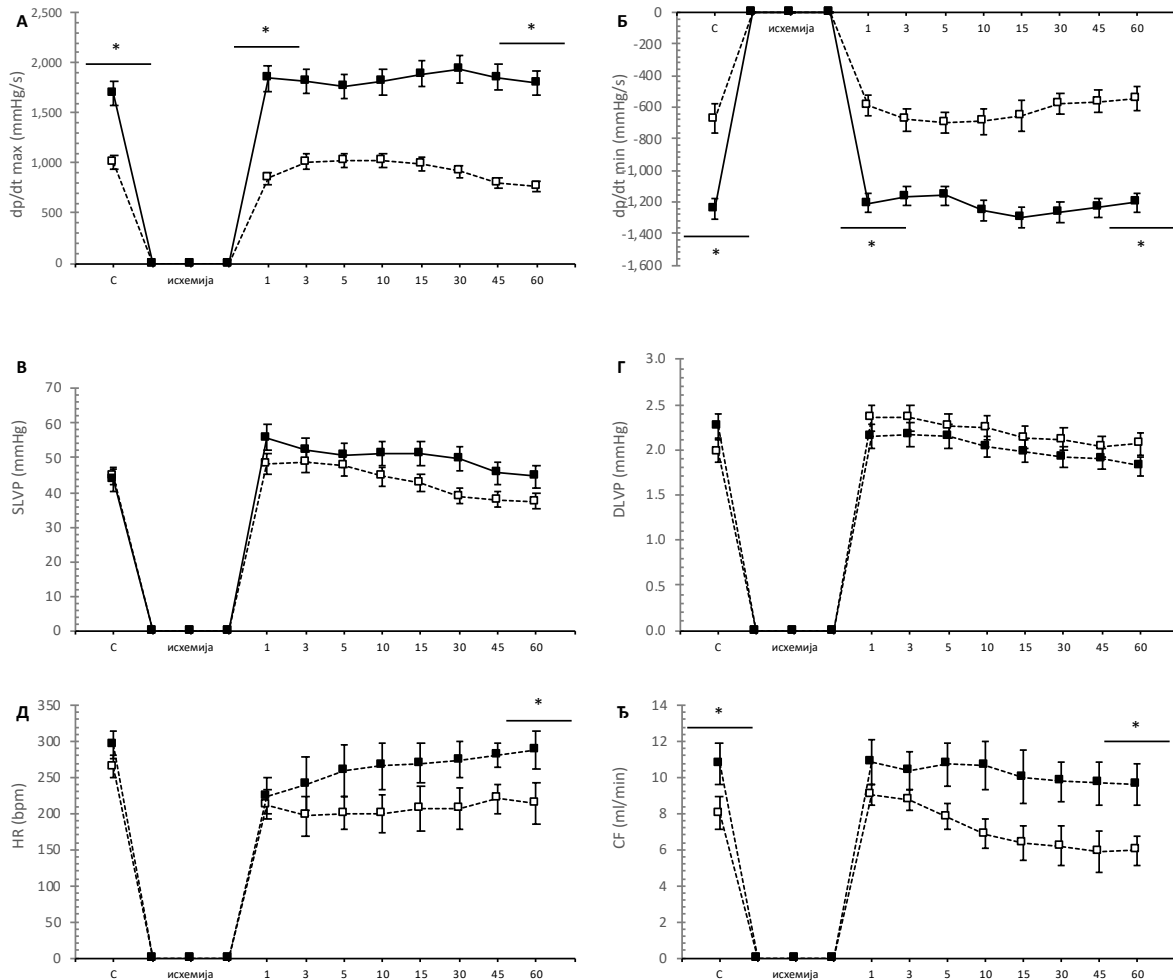
## 4.1.9.1. Кардиодинамски параметри

Промене у кардиодинамским параметрима током *ex vivo* индуковане И/Р повреде приказане су у Табели 5. У И/Р групи, примећује се значајно смањење контрактилне способности миокарда током времена (dp/dt max - C vs. 1 и C vs. 60, као и dp/dt min - C vs. 60). Такође, SLVP (1 vs. 60), HR (C vs. 1 и C vs. 60) и CF (C vs. 60 и 1 vs. 60) су били значајно смањени током периода реперфузије. Са друге стране, забележене су значајно повећане вредности SLVP и значајно снижене вредности HR у ДАТС групи у 1. минуту реперфузије у односу на тачку стабилизације (C vs. 1).

**Табела 5.** Кардиодинамски параметри праћени током *ex vivo* индуковане И/Р повреде изолованог срца здравих пацова (здрави, нетретирани пацови – И/Р и здрави третирани пацови – ДАТС+И/Р). Стабилизација – C; 1. минут реперфузије – 1 и 60. минут реперфузије – 60. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД, n = 6, по групи. <sup>a</sup> P<0,05 C vs. 31; <sup>b</sup> P<0,05 C vs. 90; <sup>c</sup> P<0,05 31 vs. 90.

|               |    | dp/dt max (mmHg)                 | dp/dt min (mmHg)                 | SLVP (mmHg)                   |
|---------------|----|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| И/Р           | C  | 1011,87 $\pm$ 123,29             | -672,51 $\pm$ 93,53              | 44,75 $\pm$ 4,04              |
|               | 1  | 851,17 $\pm$ 136,28 <sup>a</sup> | -585,77 $\pm$ 68,07              | 48,22 $\pm$ 6,27              |
|               | 60 | 767,30 $\pm$ 118,89 <sup>b</sup> | -543,85 $\pm$ 75,33 <sup>b</sup> | 37,45 $\pm$ 3,87 <sup>c</sup> |
| ДАТС<br>+ И/Р | C  | 1696,18 $\pm$ 253,26             | -1243,95 $\pm$ 158,12            | 43,57 $\pm$ 9,23              |
|               | 1  | 1845,62 $\pm$ 251,44             | -1206,90 $\pm$ 207,77            | 55,95 $\pm$ 9,68 <sup>a</sup> |
|               | 60 | 1796,07 $\pm$ 282,51             | -1201,53 $\pm$ 148,27            | 44,67 $\pm$ 9,57              |
|               |    | DLVP (mmHg)                      | HR (bpm)                         | CF (ml/min)                   |
| И/Р           | C  | 1,98 $\pm$ 0,28                  | 264,87 $\pm$ 14,82               | 8,03 $\pm$ 0,84               |
|               | 1  | 2,35 $\pm$ 0,37                  | 212,47 $\pm$ 20,85 <sup>a</sup>  | 9,03 $\pm$ 0,37               |
|               | 60 | 2,07 $\pm$ 0,30                  | 213,68 $\pm$ 28,75 <sup>b</sup>  | 5,93 $\pm$ 0,37 <sup>bc</sup> |
| ДАТС<br>+ И/Р | C  | 2,27 $\pm$ 0,18                  | 295,90 $\pm$ 18,78               | 10,77 $\pm$ 0,97              |
|               | 1  | 2,15 $\pm$ 0,34                  | 224,33 $\pm$ 25,83 <sup>a</sup>  | 10,87 $\pm$ 1,05              |
|               | 60 | 1,82 $\pm$ 0,57                  | 287,87 $\pm$ 26,87               | 9,60 $\pm$ 0,67               |

Разлике у срчаној функцији након *ex vivo* индуковане И/Р повреде код здравих пацова, приказане су на **Графику 12**. Стопе развоја притиска у левој комори ( $dp/dt$  max и  $dp/dt$  min, у свим тачкама од интереса), као и HR (на крају периода реперфузије) и CF (у С и 90 тачки) значајно су побољшани у ДАТС+И/Р групи, у односу на И/Р групу.



**График 12.** Ефекти третмана ДАТС-ом на *ex vivo* индуковану И/Р повреду миокарда здравих пацова (А) максимална стопа развоја притиска у левој комори –  $dp/dt$  max, (Б) минимална стопа развоја притиска у левој комори –  $dp/dt$  min, (В) систолни притисак у левој комори – SLVP, (Г) дијастолни притисак у левој комори – DLVP, (Д) фреквенца срца – HR и (Ђ) коронарни проток – CF. И/Р - здрави пацови (---□---) и ДАТС+И/Р - здрави, третирани пацови (—■—). Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n = 6, по групи. \* P<0,05 ДАТС+И/Р vs. И/Р.



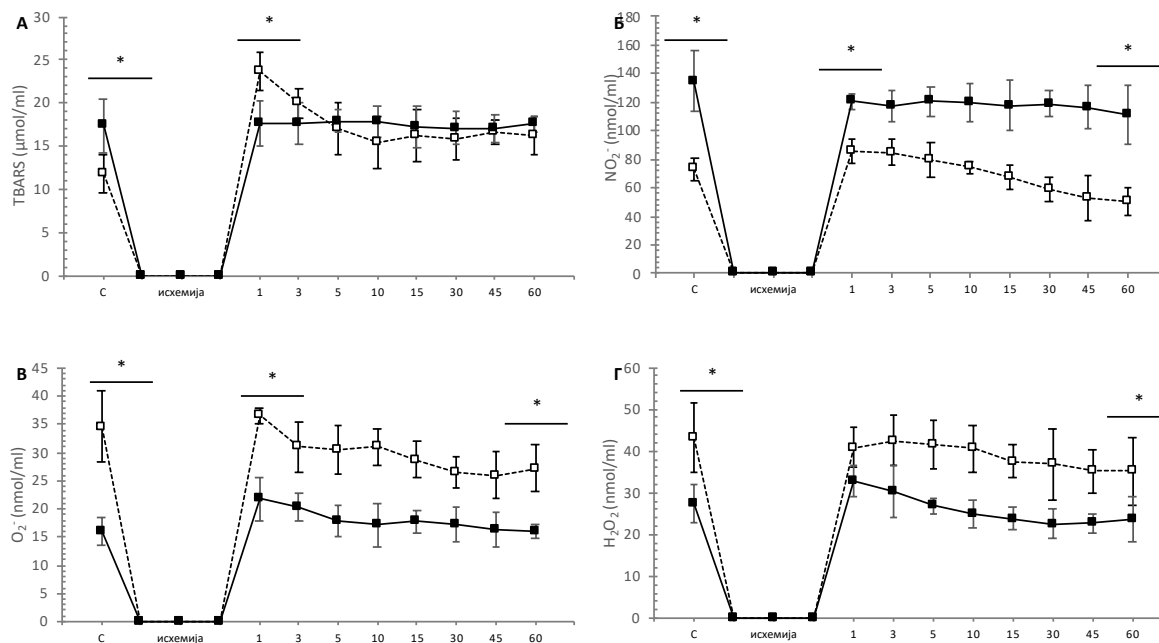
## 4.1.9.2. Прооксидациони параметри мерени у коронарном венском ефлуенту

Нивои TBARS (C vs. 1, C vs. 60 и 1 vs. 60) и  $\text{NO}_2^-$  (S vs. 60 и 1 vs. 60) су се значајно променили у коронарном венском ефлуенту И/Р групе, у периоду реперфузије. Са друге стране,  $\text{O}_2^-$  је значајно повећан у 1. и поново смањен у последњем минути периода реперфузије (Табела 6).

**Табела 6.** Прооксидациони параметри мерени у коронарном венском ефлуенту који је прикупљен у стабилизацији и током реперфузије изолованог срца пацова (здрави, нетретирани пацови - И/Р и здрави, третиран пацови - ДАТС+И/Р). Стабилизација – С; 1. минут реперфузије – 1 и 60. минут реперфузије – 60. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД, n = 6, по групи. <sup>a</sup>P<0,05 C vs. 31; <sup>b</sup>P<0,05 C vs. 90; <sup>c</sup>P<0,05 1 vs. 60.

|               |    | TBARS<br>( $\mu\text{mol/ml}$ ) | $\text{NO}_2^-$<br>( $\text{nmol/ml}$ ) | $\text{O}_2^-$<br>( $\text{nmol/ml}$ ) | $\text{H}_2\text{O}_2$<br>( $\text{nmol/ml}$ ) |
|---------------|----|---------------------------------|---|--|--|
| И/Р           | C  | 11,71 $\pm$ 2,23                | 72,89 $\pm$ 7,87                        | 34,57 $\pm$ 6,40                       | 43,07 $\pm$ 8,37                               |
|               | 1  | 23,68 $\pm$ 2,13 <sup>a</sup>   | 85,71 $\pm$ 10,51                       | 36,47 $\pm$ 1,34                       | 40,86 $\pm$ 4,68                               |
|               | 60 | 16,22 $\pm$ 2,24 <sup>bc</sup>  | 50,93 $\pm$ 12,33 <sup>bc</sup>         | 27,12 $\pm$ 4,13                       | 35,23 $\pm$ 8,12                               |
| ДАТС<br>+ И/Р | C  | 17,40 $\pm$ 3,14                | 134,82 $\pm$ 21,2                       | 15,98 $\pm$ 2,35                       | 27,33 $\pm$ 4,52                               |
|               | 1  | 17,68 $\pm$ 2,65                | 120,66 $\pm$ 5,58                       | 21,73 $\pm$ 3,75 <sup>a</sup>          | 32,84 $\pm$ 3,72                               |
|               | 60 | 17,53 $\pm$ 0,91                | 111,29 $\pm$ 20,35                      | 15,97 $\pm$ 1,25 <sup>c</sup>          | 23,68 $\pm$ 5,40                               |

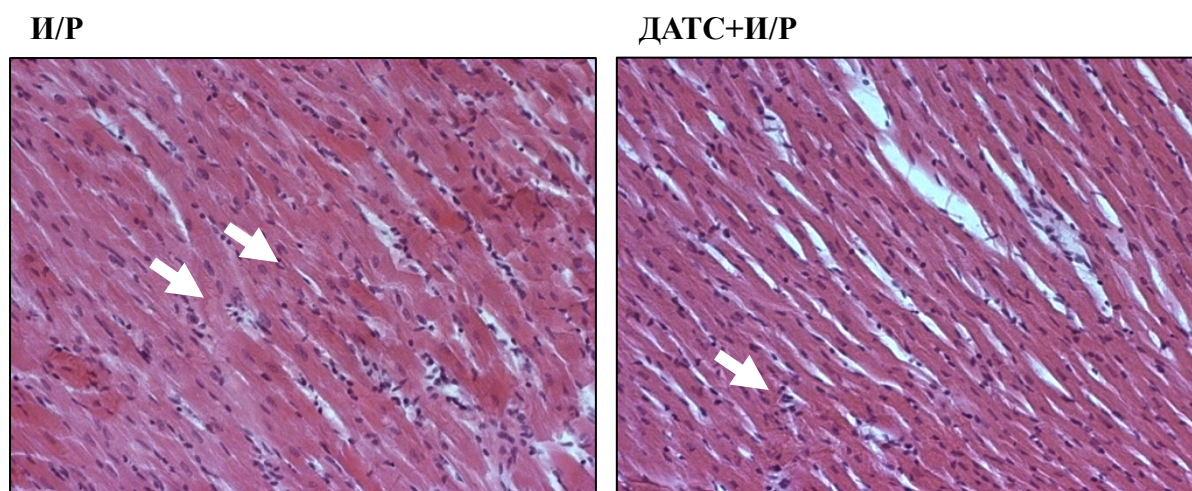
Ниво ТВАРС значајно је повећан у тачки стабилизације и значајно смањен у првом минуту реперфузије у ДАТС+И/Р у поређењу са И/Р групом. Са друге стране, нивои  $\text{NO}_2^-$  били су значајно повећани, док су нивои  $\text{O}_2^-$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  били значајно смањени, током целокупног *ex vivo* протокола у ДАТС+И/Р у односу на И/Р групу (График 13).



**График 13.** Ефекти третмана ДАТС-ом на *ex vivo* индуковану И/Р повреду миокарда здравих пацова (А) индекс липидне пероксидације – мерен као ТВАРС, (Б) нитрити –  $\text{NO}_2^-$ , (В) супероксид анјон радикал –  $\text{O}_2^-$  и (Г) водоник пероксид –  $\text{H}_2\text{O}_2$ . И/Р - здрави, нетретирани пацови (---□---) и ДАТС+И/Р - здрави, третирани пацови (—■—). Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n = 6, по групи. \* P<0,05 ДАТС+И/Р vs. И/Р.

#### 4.1.9.3. Бојење срчаног ткива хематоксилин/еозин методом

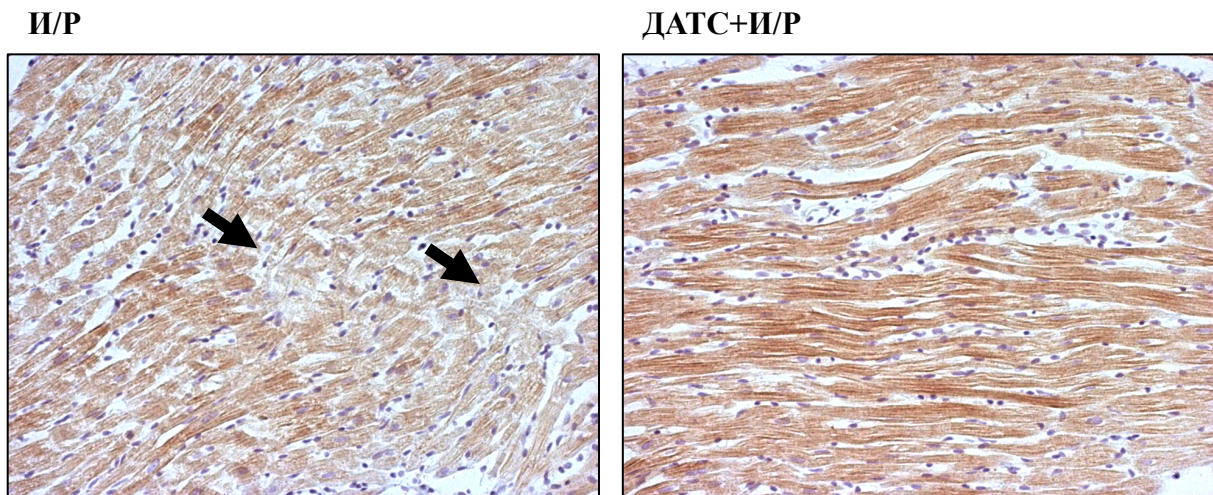
Као што је приказано на **Слици 8**, у И/Р групи јасно се могу уочити неправилно распоређена мишићна влакна, интерстицијални едем и оштећене мишићне мембране. Иако су све ове патохистолошке промене присутне и у ДАТС+И/Р групи, може се приметити да је њихов степен значајно нижи. Такође, поље некрозе значајно је смањено код пацова којима је примењиван ДАТС.



**Слика 8.** Репрезентативни приказ обојеног ткива миокарда хематоксилин/еозин техником, срца која су претходно била подвргнута И/Р повреди (И/Р – здрави, нетретирани пацови и ДАТС+И/Р – здрави, третирани пацови), увећање 200 х; скала 2 mm.

## 4.1.9.4. Бојење тропонина Т у ткиву миокарда

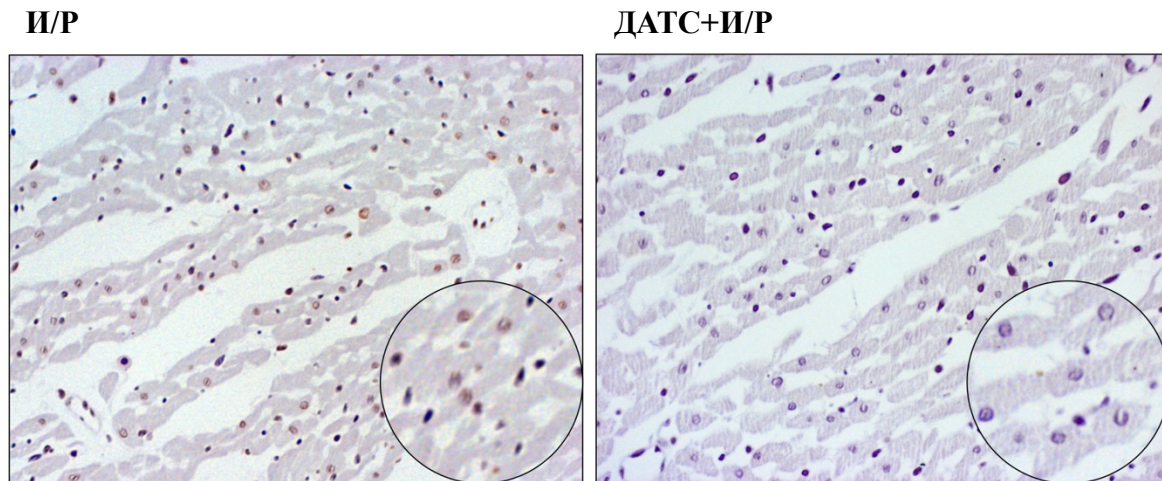
Као што је приказано на **Слици 9**, у И/Р групи се може приметити да је ткиво обојено позитивно (браон), али да постоје површине где се уочава губитак браон боје, док је у ДАТС+И/Р групи губитак браон боје сведен на минимум.



**Слика 9.** Репрезентативни приказ обојеног сТпТ у ткиву срца пацова, која су претходно била подвргнута *ex vivo* изазваној И/Р повреди (И/Р – здрави, нетретирани пацови и ДАТС+И/Р – здрави, третирани пацови), увећање 200 х; скала 2 mm.

## 4.1.9.5. ТУНЕЛ тест

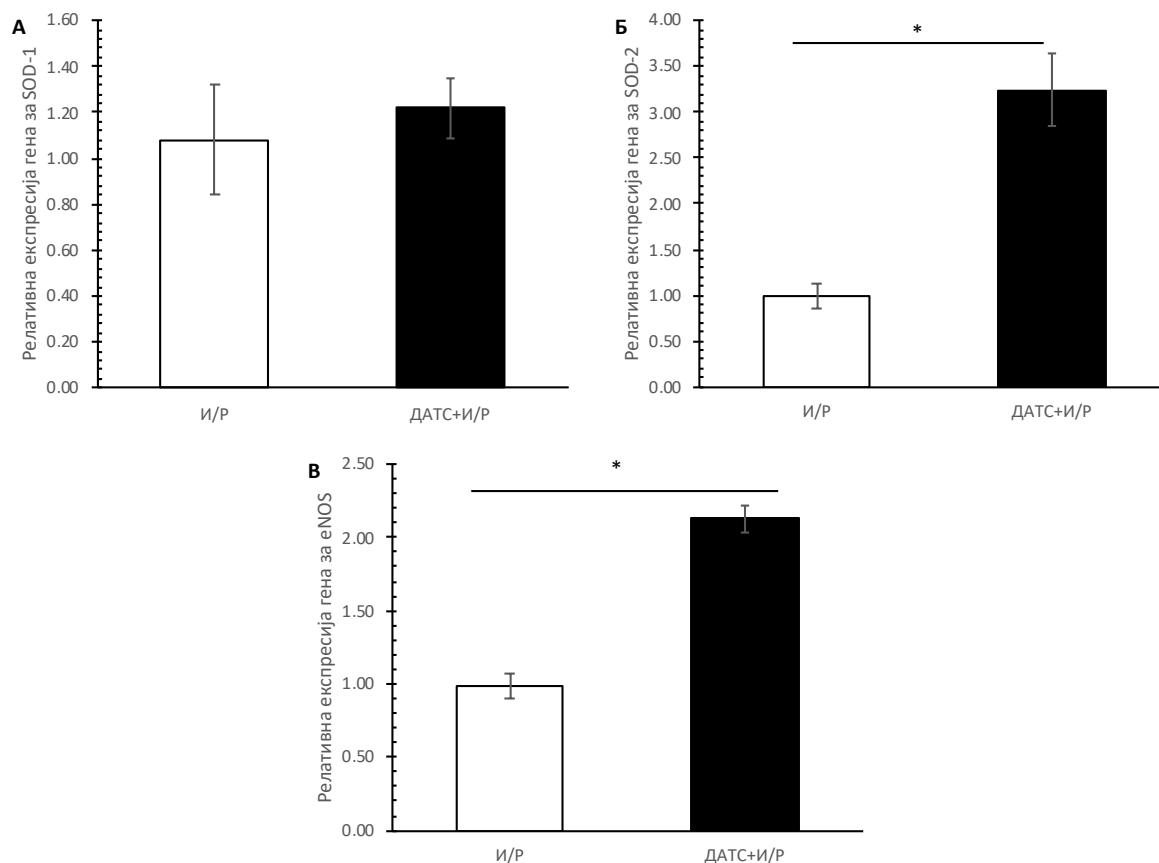
Учесталост миоцита са ТУНЕЛ позитивним једром након И/Р повреде, значајно је смањена код пацова којима је примењиван ДАТС, у односу на контролну групу пацова (Слика 10).



**Слика 10.** Репрезентативни приказ заступљености миоцита са ТУНЕЛ позитивним једром, у ткиву срца пацова која су претходно била подвргнута *ex vivo* изазваној И/Р повреди (И/Р – здрави, нетретирани пацови и ДАТС+И/Р – здрави, третирани пацови), увећање 200x и 400x.

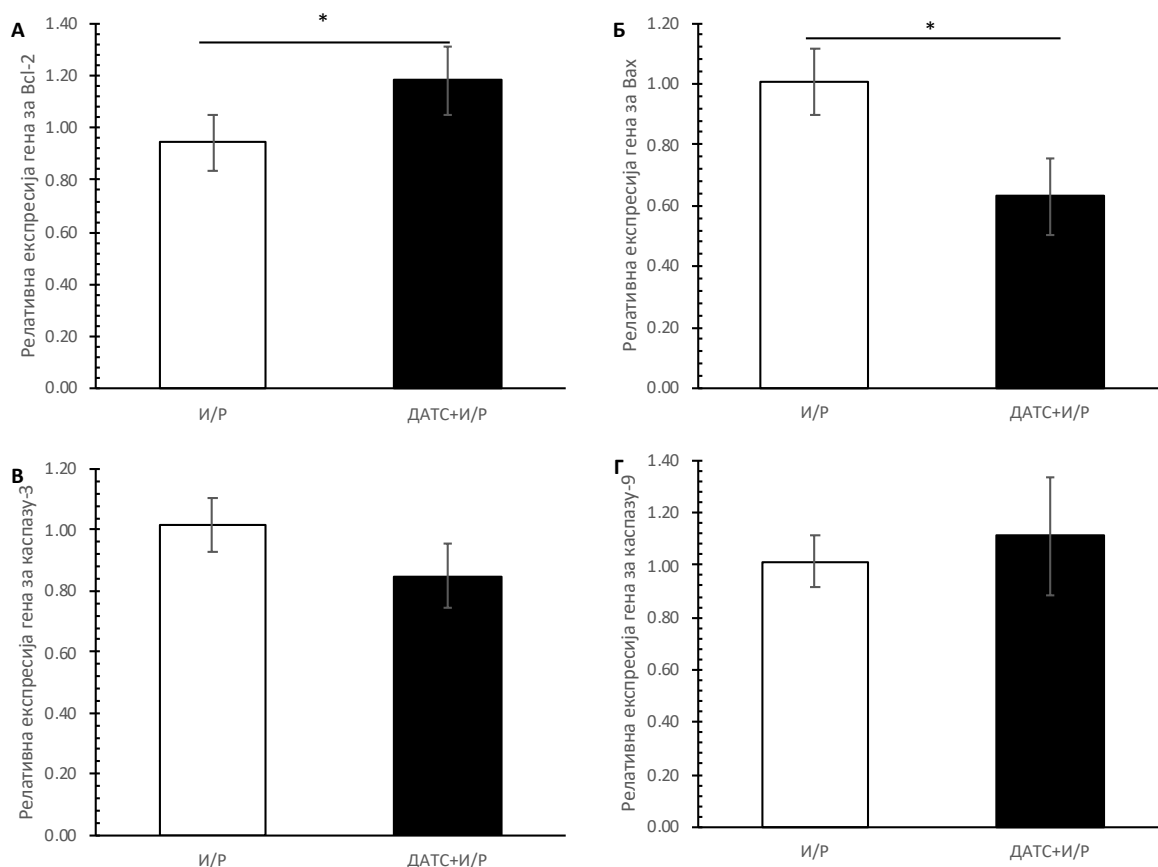
4.1.9.6. Релативна експресија антиоксидационих, (анти)апоптотских и (анти)инфламацијских гена у левој комори срца

Релативна експресија гена за SOD-2 и eNOS била је значајно повећана у ДАТС+И/Р групи у поређењу са И/Р групом, док је релативна експресија гена за SOD-2 била скоро слична у обе испитиване групе (**График 14**).



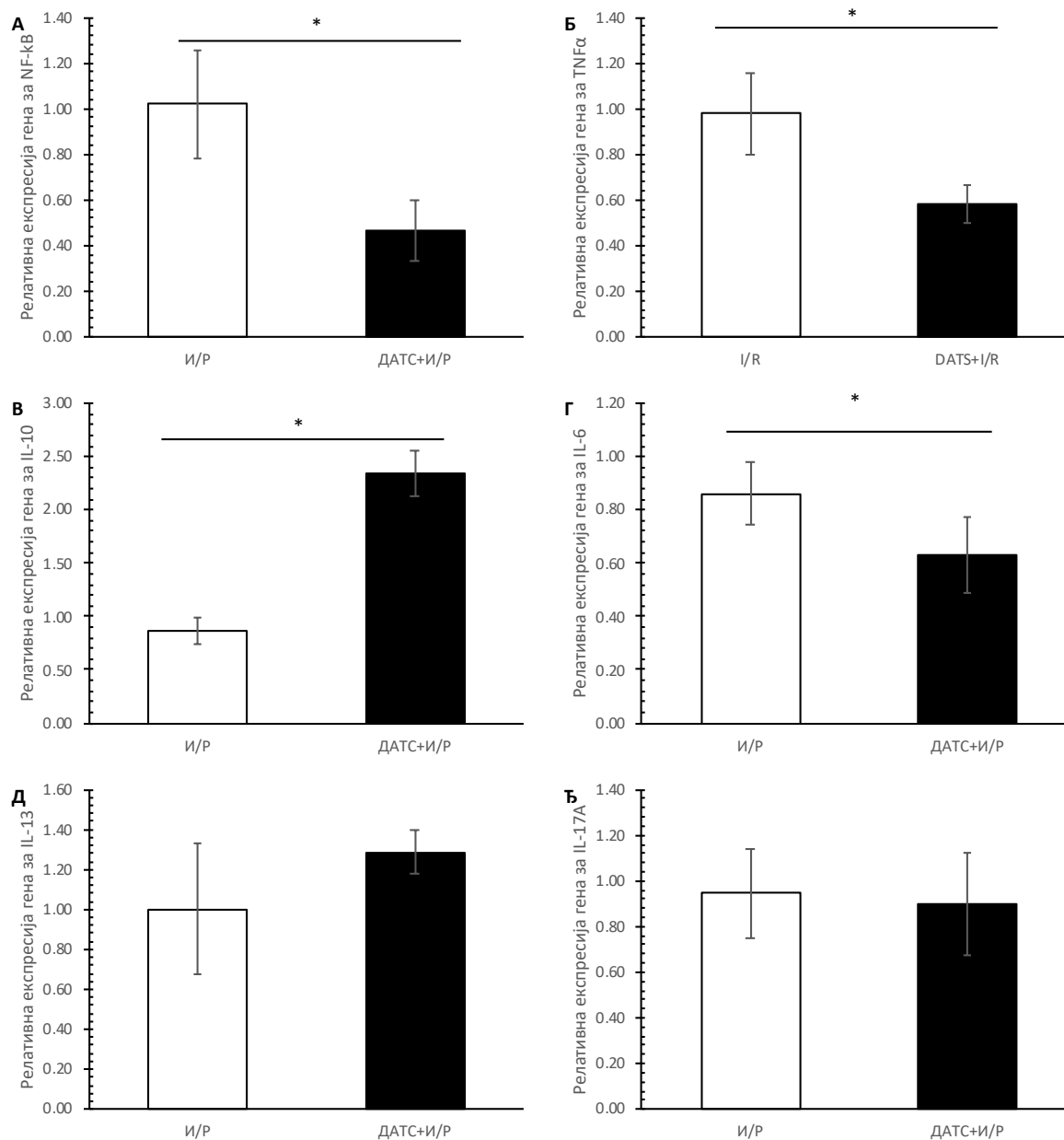
**График 14.** Ефекти третмана ДАТС-ом на релативну експресију антиоксидационих гена за (А) супероксид дисмутазу 1 – SOD-1, (Б) супероксид дисмутазу 2 – SOD-2, (В) ендотелну азот монооксид синтазу – eNOS, у левој комори здравих пацова након *ex vivo* изазване И/Р повреде. И/Р - здрави, нетретирани пацови и ДАТС+И/Р - здрави, третирани пацови. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД, n = 6, по групи. \* P<0,05 ДАТС+И/Р vs. И/Р.

Релативна експресија гена за Bcl-2 била је значајно повећана, док је експресија гена за Вах била значајно смањена у ДАТС+И/Р у односу на И/Р групу. Са друге стране, релативна експресија гена за мерене каспазе, -3 и -9, била је слична у испитиваним групама (График 15).



**График 15.** Ефекти третмана ДАТС-ом на релативну експресију (анти)апоптотских гена за (А) Всl-2, (Б) Вах, (В) каспазу-3 и (Г) каспазу-9, у левој комори здравих пацова након *ex vivo* изазване И/Р повреде. И/Р - здрави, нетретирани пацови и ДАТС+И/Р - здрави, третирани пацови. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД,  $n = 6$ , по групи. \*  $P < 0,05$  ДАТС+И/Р vs. И/Р.

Релативна генска експресија за NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  и IL-6 била је значајно смањена, док је за IL-10 била значајно повећана у ДАТС+И/Р групи у поређењу са И/Р групом. Са друге стране, релативна експресија гена за IL-13 и IL-17A била је слична у поређеним групама (График 16).



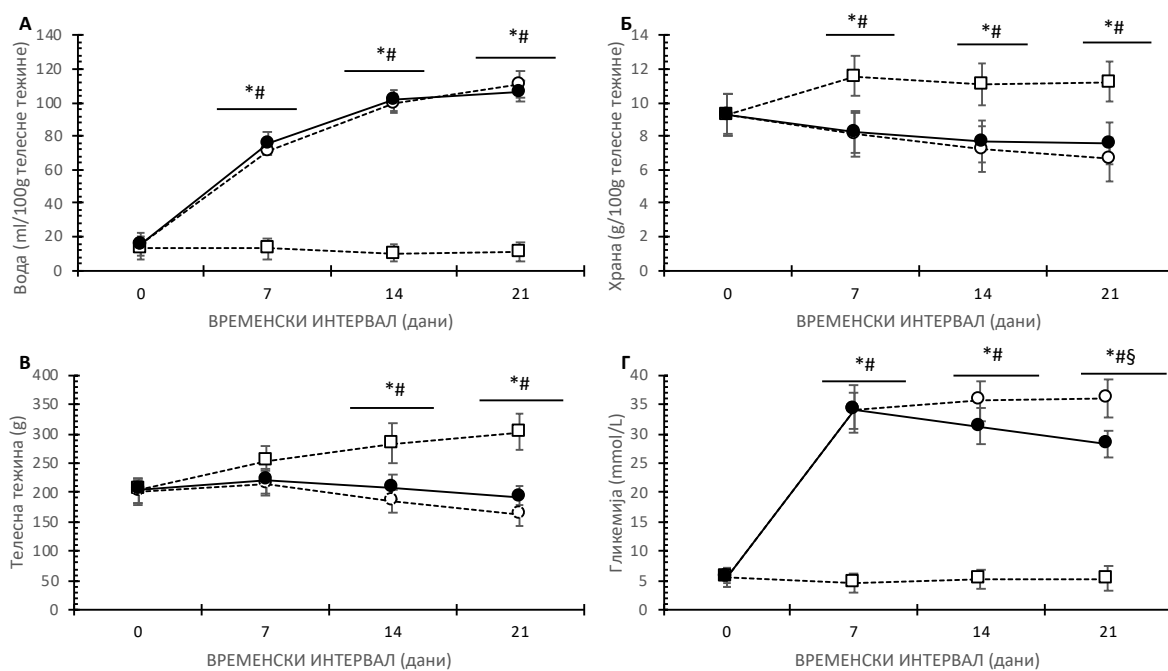
**График 16.** Ефекти третмана ДАТС-ом на релативну експресију (анти)инфламацијских гена за (А) NF- $\kappa$ B, (Б) TNF- $\alpha$ , (В) IL-10, (Г) IL-6, (Д) IL-13 и (Ђ) IL-17A у левој комори здравих пацова након *ex vivo* изазване И/Р повреде. И/Р - здрави, нетретирани пацови и ДАТС+И/Р - здрави, третирани пацови. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД, n = 6, по групи. \* P < 0,05 ДАТС+И/Р vs. И/Р.



## 4.2. ЕФЕКТИ ТРЕТМАНА ДАТС-ом НА ПАЦОВЕ СА ДИЈАБЕТЕСОМ

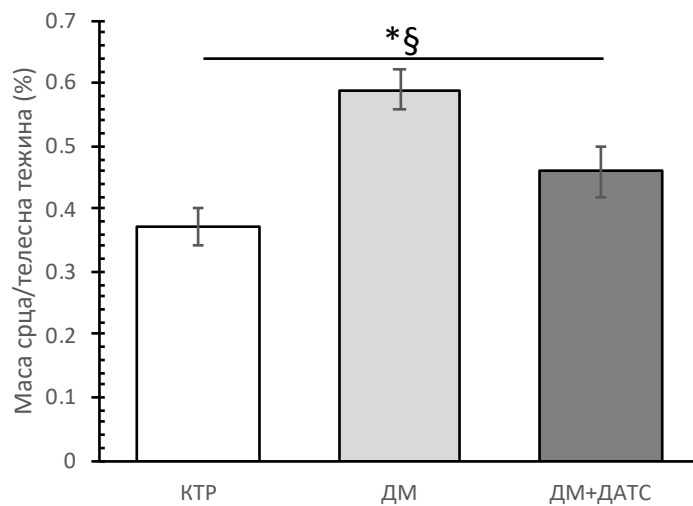
### 4.2.1. Карактеристике пацова праћене током хроничног протокола

Код пацова са дијабетесом примећене су карактеристике типичне за дијабетес: конзумирали су више воде, мање хране и имали су мању телесну тежину од контролне групе пацова. Третман ДАТС-ом није значајно модификовао ове параметре. Концентрације глукозе наше у крви након индукције ДМ тип 1 биле су, као што је и очекивано, значајно више него код КТР групе и наставиле су да се постепено повећавају током експерименталног периода. Ниво глукозе у ДМ+ДАТС групи, значајно је смањен у поређењу са ДМ групом пацова, након тронедељне конзумације ДАТС-а (График 17).



**График 17.** Ефекти третмана ДАТС-ом на (А) конзумацију воде, (Б) конзумацију хране, (В) телесну тежину и (Г) гликемију наше током тронедељног третмана ДАТС-ом код здравих нетретираних пацова -КТР (---□---), нетретираних пацова са дијабетесом - ДМ (---○---) и третираних пацова са дијабетесом – ДМ+ДАТС (—●—). 0 – непосредно пре третмана ДАТС-ом; 7 – након 7 дана од третмана ДАТС-ом; 14 – након 14 дана од третмана ДАТС-ом; 21 – након 21 дан од третмана ДАТС-ом. Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n = 12, по групи. \* P<0,05 КТР vs. ДМ, # P<0,05 КТР vs. ДМ+ДАТС, § P<0,05 ДМ vs. ДМ+ДАТС.

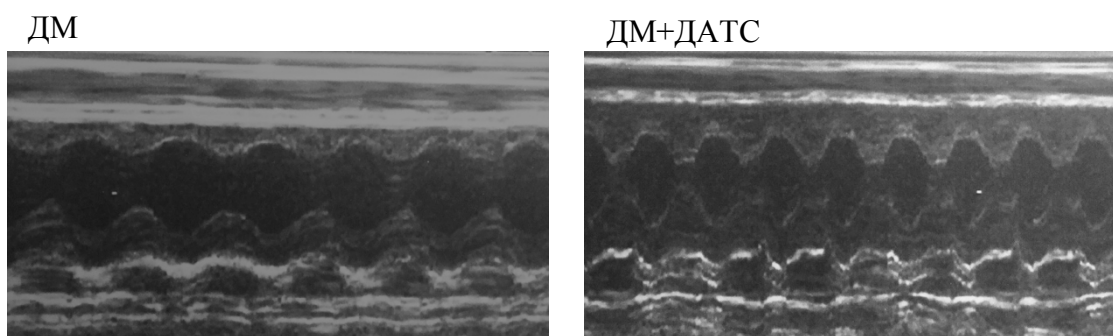
Конзумација ДАТС-а током три недеље, довела је до статистички значајног снижења односа масе срца и телесне тежине, код пацова са дијабетесом (**График 18**).



**График 18.** Ефекти третмана ДАТС-ом на однос тежине срца и телесне тежине пацова са дијабетесом. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД,  $n = 12$ , по групи. \*  $P < 0,05$  КТР vs. ДМ, §  $P < 0,05$  ДМ vs. ДМ+ДАТС.

#### 4.2.2. Функција миокарда праћена *in vivo*

У ДМ групи LVPW је био значајно повећан на крају систоле и дијастоле, док је FS био значајно смањен у односу на КТР групу. Код ДМ+ДАТС групе IVSd је био значајно смањен, док је LVPWd био значајно повећан у односу на КТР и ДМ групу. Поред тога, ДАТС је побољшао LVPWs (у поређењу са КТР) и FS (у поређењу са ДМ) (Слика 11 и Табела 7).



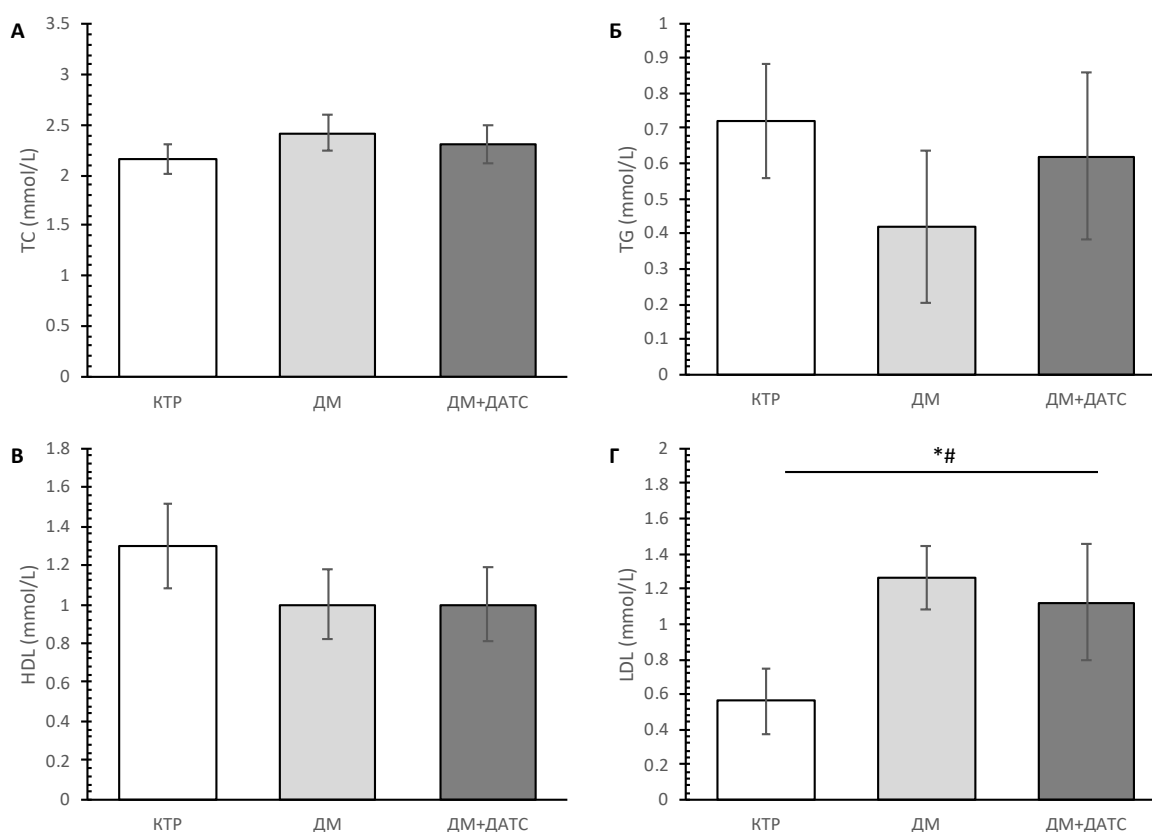
Слика 11. Репрезентативна фотографија ехокардиографије миокарда из М-режима у ДМ и ДМ+ДАТС групама.

Табела 7. *In vivo* мерени кардиодинамски параметри код здравих, нетретираних пацова (КТР), нетретираних пацова са дијабетесом (ДМ) и третираних пацова са дијабетесом (ДМ+ДАТС). Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД,  $n = 12$ , по групи. \*  $P < 0,05$  КТР vs. ДМ, #  $P < 0,05$  КТР vs. ДМ+ДАТС, §  $P < 0,05$  ДМ vs. ДМ+ДАТС.

|            | КТР              | ДМ                | ДМ+ДАТС            |
|------------|------------------|-------------------|--------------------|
| IVSd (cm)  | 0,163 $\pm$ 0,02 | 0,164 $\pm$ 0,03  | 0,133 $\pm$ 0,04#§ |
| LVIDd (cm) | 0,638 $\pm$ 0,05 | 0,593 $\pm$ 0,08  | 0,619 $\pm$ 0,02   |
| LVPWd (cm) | 0,204 $\pm$ 0,05 | 0,376 $\pm$ 0,01* | 0,328 $\pm$ 0,03#§ |
| IVSs (cm)  | 0,301 $\pm$ 0,03 | 0,310 $\pm$ 0,05  | 0,311 $\pm$ 0,05   |
| LVIDs (cm) | 0,267 $\pm$ 0,08 | 0,285 $\pm$ 0,09  | 0,223 $\pm$ 0,03   |
| LVPWs (cm) | 0,322 $\pm$ 0,05 | 0,500 $\pm$ 0,01* | 0,537 $\pm$ 0,10#  |
| FS (%)     | 58,55 $\pm$ 4,13 | 52,01 $\pm$ 4,45* | 63,90 $\pm$ 4,99§  |

### 4.2.3. Липидни параметри мерени након хроничног третмана ДАТС-ом

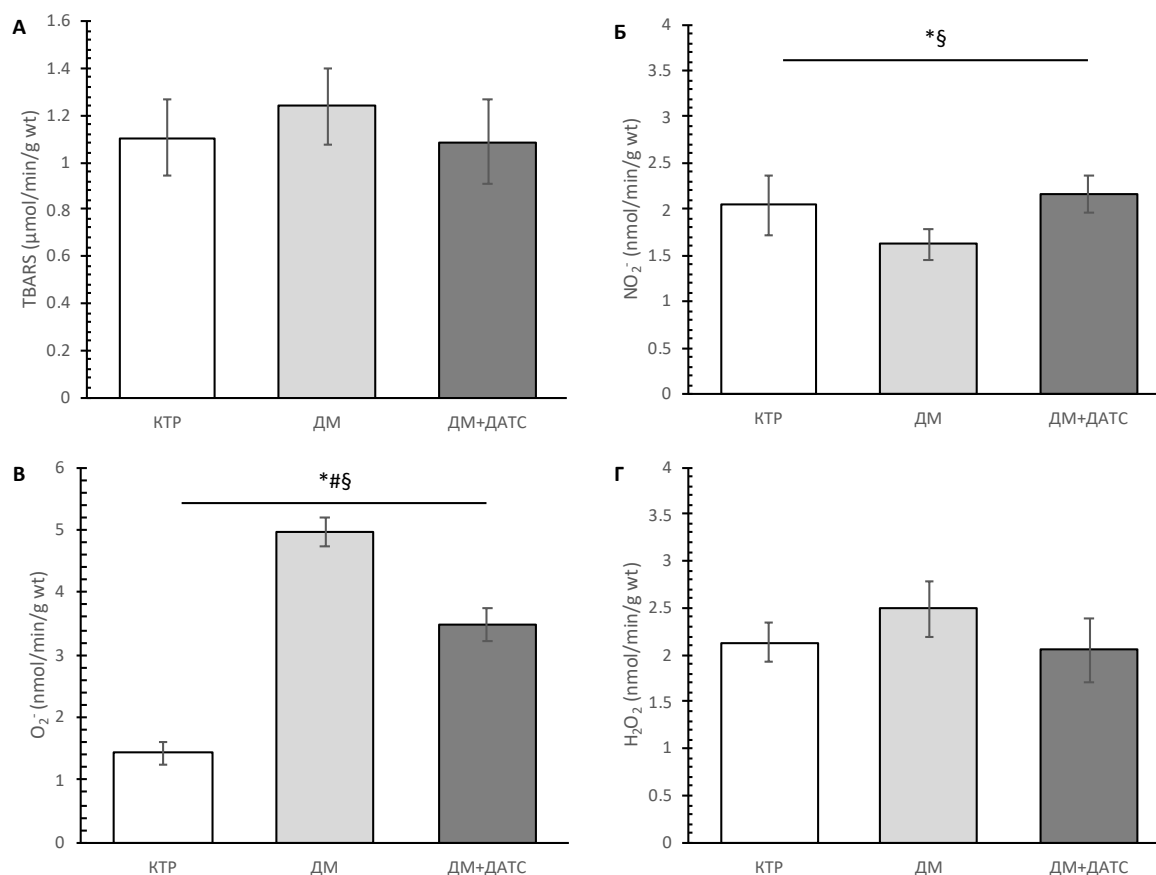
Код пацова са дијабетесом, без обзира да ли су били на третману ДАТС-ом или не (у ДМ и ДМ+ДАТС групама), LDL је био статистички значајно повећан, у поређењу са КТР. Међутим, нивои ТС, TG и HDL били су скоро исти у испитиваним групама (График 19).



**График 19.** Ефекти третмана ДАТС-ом на липидне параметре код нетретираних, здравих пацова (КТР), нетретираних пацова са дијабетесом (ДМ) и третиранх пацова са дијабетесом (ДМ+ДАТС). (А) укупни холестерол – ТС, (Б) триглицериди – TG, (В) липопротеин високе густине – HDL и (Г) липопротеин ниске густине – LDL. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД,  $n = 12$ , по групи. \*  $P < 0,05$  КТР vs. ДМ, #  $P < 0,05$  КТР vs. ДМ+ДАТС.

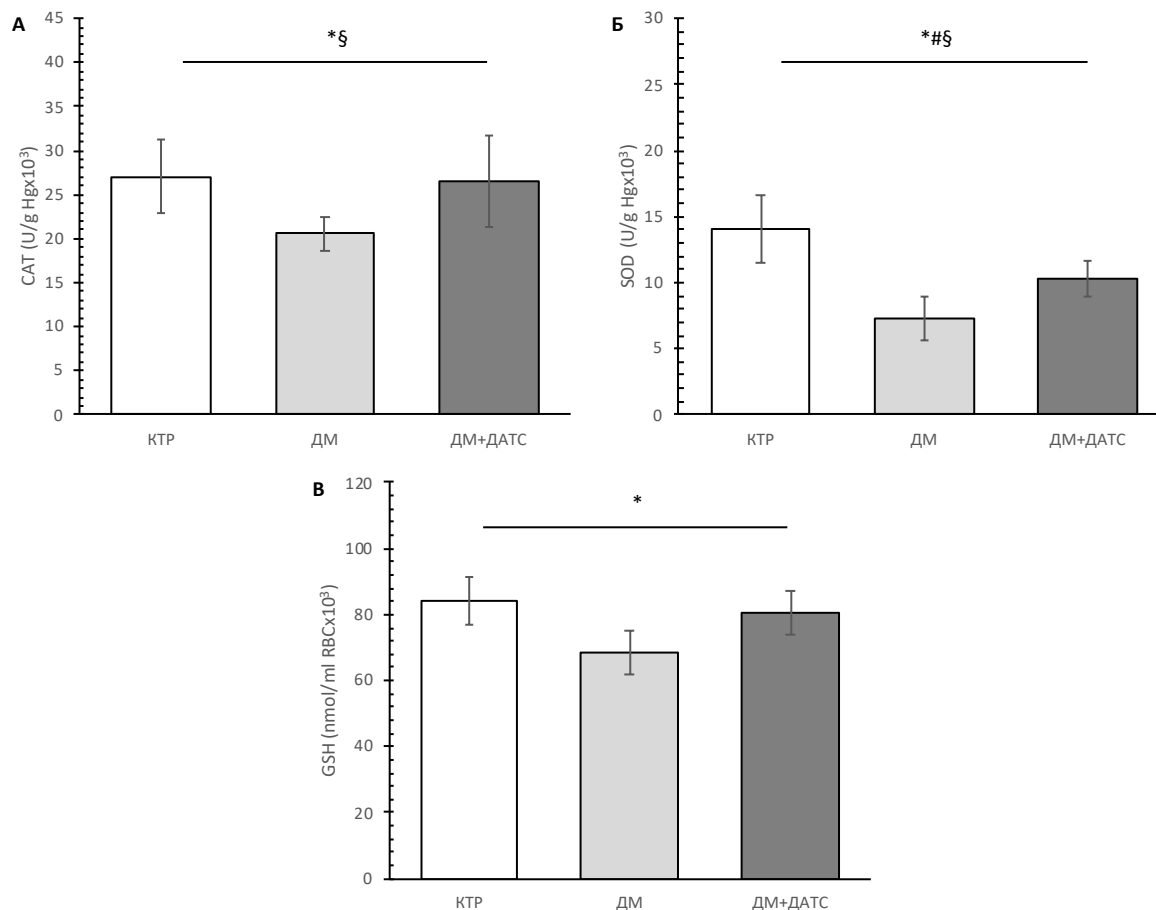
#### 4.2.4. Нивои прооксидационих и антиоксидационих параметара мерени у системској циркулацији

Нивои  $\text{NO}_2^-$  били су статистички значајно смањени у ДМ у поређењу са КТР и ДМ+ДАТС групама. Са друге стране, ниво  $\text{O}_2^-$  је био значајно већи у ДМ у односу на КТР и ДМ+ДАТС групе, као и у ДМ+ДАТС у односу на КТР групу (**График 20**).



**График 20.** Ефекти третмана ДАТС-ом код пацова са дијабетесом (А) индекс липидне пероксидације – мерен као ТВАРС, (Б) нитрити –  $\text{NO}_2^-$ , (В) супероксид анјон радикал –  $\text{O}_2^-$  и (Г) водоник пероксид –  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n=12, по групи. \* P<0,05 КТР vs. ДМ, # P<0,05 КТР vs. ДМ+ДАТС, § P<0,05 ДМ vs. ДМ+ДАТС.

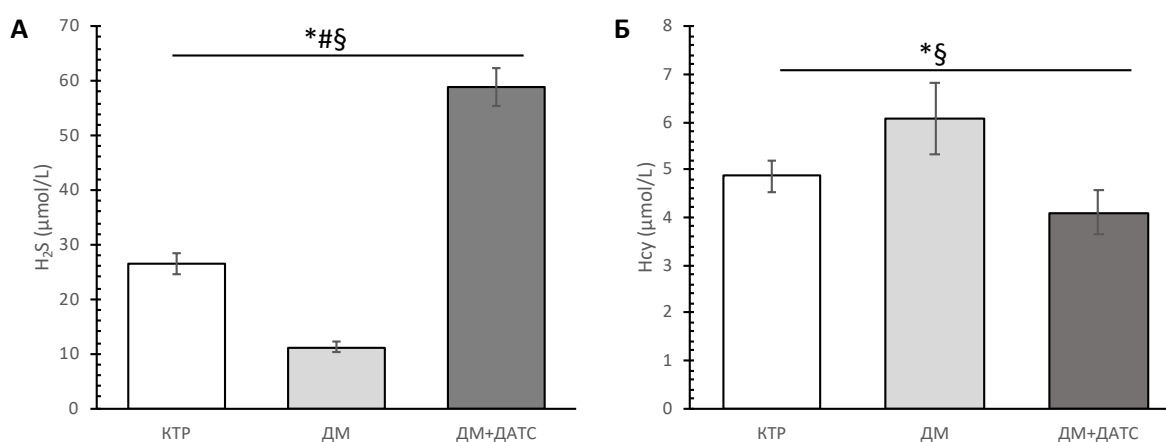
Сви мерени антиоксидациони параметри (CAT, SOD и GSH) били су значајно смањени у ДМ у поређењу са КТР групом. Третман ДАТС-ом је утицао на статистички значајно повећање активности CAT и SOD код пацова са дијабетесом (**График 21**).



**График 21.** Ефекти третмана ДАТС-ом код пацова са дијабетесом на активност (А) каталазе – CAT, (Б) супероксид дисмутазе – SOD и (В) редукованог глутатиона – GSH. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД, n = 12, по групи. \* P < 0,05 КТР vs. ДМ, # P < 0,05 КТР vs. ДМ+ДАТС, § P < 0,05 ДМ vs. ДМ+ДАТС.

#### 4.2.5. Нивои водоник сулфида и хомоцистеина у серуму

Унос ДАТС-а, код пацова са дијабетесом утицао је на статистички значајно повећање нивоа  $H_2S$  у серуму, како у односу на здраве пацове, тако и у односу на пацове са дијабетесом. Са друге стране значајно је и напоменути чињеницу да је ниво овог гасотрансмitera био статистички значајно нижи код пацова са дијабетесом, у односу на здраве пацове. Ниво хомоцистеина био је значајно повећан у ДМ групи у поређењу са КТР и ДМ+ДАТС групама (График 22).



**График 22.** Ефекти третмана ДАТС-ом код пацова са дијабетесом на нивое (А)  $H_2S$  у серуму и (Б) хомоцистеина у серуму – Hcy. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД, n =12, по групи. \*P<0,05 КТР vs. ДМ, # P<0,05 КТР vs. ДМ+ДАТС, § P<0,05 ДМ vs. ДМ+ДАТС.

#### 4.2.6. *Ex vivo* протокол: 90 минута ретроградне перфузије изолованог срца пацова

##### 4.2.6.1. Кардиодинамски параметри

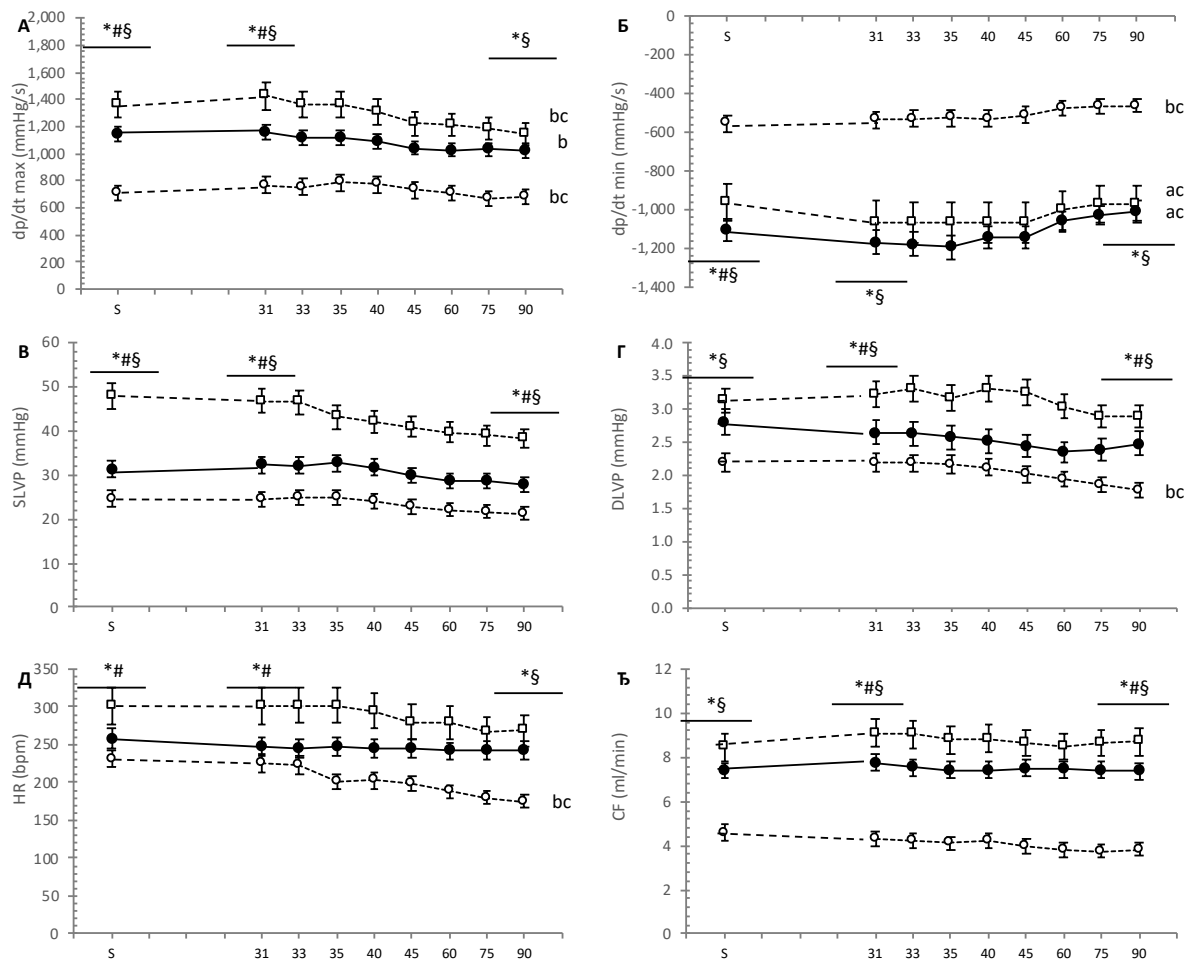
Промене кардиодинамских параметара након периода стабилизације и током деведесетоминутне ретроградне перфузије изолованог срца нетретираних пацова оболелих од дијабетеса (ДМ) и третираних (ДМ + ДАТС) пацова, приказане су у **Табели 8**. У ДМ групи, већина мерених параметара била је смањена на крају периода перфузије (dp/dt min, SLVP, DLVP и HR). Насупрот томе, у ДМ+ДАТС групи, није било статистички значајних разлика у вредностима параметара током периода ретроградне перфузије изолованих срца.

**Табела 8.** Кардиодинамски параметри праћени током деведесетоминутне *ex vivo* ретроградне перфузије изолованог срца пацова (нетретирани пацови са дијабетесом - ДМ и третиран пацови са дијабетесом – ДМ+ДАТС). Стабилизација – С; 31. минут ретроградне перфузије – 31 и 90. минут ретроградне перфузије – 90. Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n = 6, по групи. <sup>a</sup> P<0,05 С vs. 31; <sup>b</sup> P<0,05 С vs. 90; <sup>c</sup> P<0,05 31 vs. 90.

|         |    | dp/dt max (mmHg)          | dp/dt min (mmHg)              | SLVP (mmHg)                |
|---------|----|---------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| ДМ      | С  | 707,30 ± 116,81           | -555,96 ± 83,33               | 24,65 ± 5,35               |
|         | 31 | 767,30 ± 128,82           | -535,84 ± 56,87               | 24,32 ± 5,47               |
|         | 90 | 685,93 ± 100,01           | -460,90 ± 46,73 <sup>bc</sup> | 21,20 ± 3,12 <sup>bc</sup> |
| ДМ+ДАТС | С  | 1143,51 ± 121,26          | -1105,58 ± 39,79              | 31,22 ± 5,35               |
|         | 31 | 1160,75 ± 101,53          | -1167,19 ± 78,47              | 32,27 ± 4,19               |
|         | 90 | 1022,62 ± 77,14           | -1004,91 ± 58,49              | 27,82 ± 2,21               |
|         |    | DLVP (mmHg)               | HR (bpm)                      | CF (ml/min)                |
| ДМ      | С  | 2,20 ± 0,15               | 231,60 ± 18,03                | 4,58 ± 0,74                |
|         | 31 | 2,20 ± 0,21               | 225,62 ± 22,05                | 4,30 ± 0,94                |
|         | 90 | 1,78 ± 0,27 <sup>bc</sup> | 175,22 ± 24,46 <sup>bc</sup>  | 3,84 ± 1,28                |
| ДМ+ДАТС | С  | 2,80 ± 0,14               | 258,38 ± 18,11                | 7,40 ± 1,54                |
|         | 31 | 2,65 ± 0,19               | 248,35 ± 30,04                | 7,76 ± 1,90                |
|         | 90 | 2,48 ± 0,27               | 241,73 ± 20,34                | 7,36 ± 1,95                |



Разлике између срчане функције, праћене *ex vivo* код нетретираних и третираних пацова са дијабетесом, приказане су на **Графику 23**. Сви мерени параметри су значајно смањени у ДМ групи и готово сви ( $dp/dt \max$ ,  $dp/dt \min$ , SLVP, DLVP и CF) су били значајно побољшани код пацова третираних ДАТС-ом (ДМ+ДАТС група). Такође, третман ДАТС-ом код дијабетичних пацова значајно је повећао HR у последњем минуту реперфузије.



**График 23.** Ефекти третмана ДАТС-ом на (А) максималну стопу развоја притиска у левој комори –  $dp/dt \max$ , (Б) минималну стопу развоја притиска у левој комори –  $dp/dt \min$ , (В) систолни притисак у левој комори – SLVP, (Г) дијастолни притисак у левој комори – DLVP, (Д) фреквенцу срца – HR и (Е) коронарни проток – CF. Здрави пацови - КТР (---□---), пацови са дијабетесом - ДМ (---○---) и третирани пацови са дијабетесом - ДМ+ДАТС (—●—). Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n = 6, по групи. \* P<0,05 КТР vs. ДМ, # P<0,05 КТР vs. ДМ+ДАТС, § P<0,05 ДМ vs. ДМ+ДАТС.

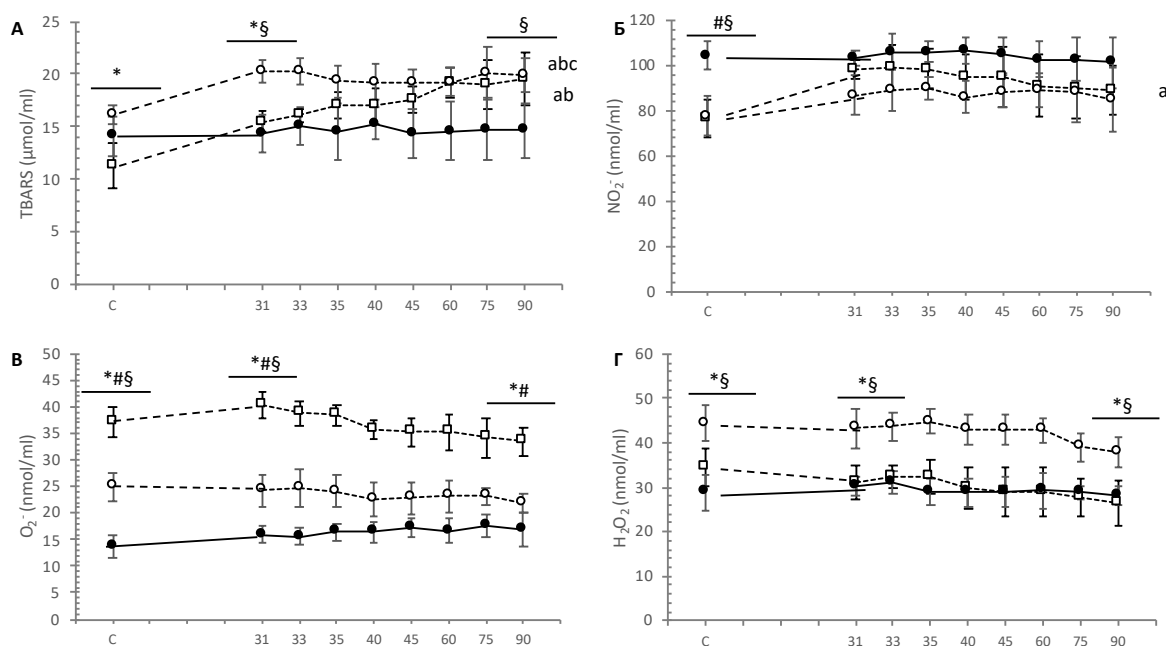
## 4.2.6.2. Прооксидациони маркери мерени у коронарном венском ефлуенту

У ДМ групи, ниво TBARS је значајно повећан у 31. минуту перфузије у односу на период стабилизације. Остали праћени параметри били су без значајнијих осцилација, током целокупног периода перфузије (Табела 9).

**Табела 9.** Прооксидациони параметри мерени у коронарном венском ефлуенту који је прикупљан током деведесетоминутне ретроградне перфузије изолованог срца пацова (нетретирани пацови са дијабетесом - ДМ и третирани пацови са дијабетесом - ДМ+ДАТС). Стабилизација – С; 31. минут ретроградне перфузије – 31 и 90. минут ретроградне перфузије – 90. Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n = 6, по групи. <sup>a</sup> P<0,05 С vs. 31.

|              |    | TBARS<br>( $\mu\text{mol/ml}$ ) | $\text{NO}_2^-$<br>( $\text{nmol/ml}$ ) | $\text{O}_2^-$<br>( $\text{nmol/ml}$ ) | $\text{H}_2\text{O}_2$<br>( $\text{nmol/ml}$ ) |
|--------------|----|---------------------------------|---|--|--|
| ДМ           | С  | 16,13 ± 0,89                    | 77,95 ± 8,85                            | 24,93 ± 2,65                           | 44,47 ± 4,15                                   |
|              | 31 | 20,27 ± 1,09 <sup>a</sup>       | 87,03 ± 8,71                            | 24,25 ± 3,09                           | 43,31 ± 4,54                                   |
|              | 90 | 19,94 ± 1,62                    | 85,42 ± 14,13                           | 21,82 ± 1,67                           | 37,06 ± 3,35                                   |
| ДМ +<br>ДАТС | С  | 14,10 ± 1,92                    | 104,63 ± 6,50                           | 13,18 ± 2,12                           | 28,79 ± 3,98                                   |
|              | 31 | 14,34 ± 1,77                    | 103,44 ± 3,50                           | 15,95 ± 1,64                           | 30,10 ± 2,17                                   |
|              | 90 | 14,66 ± 2,59                    | 101,44 ± 11,00                          | 16,92 ± 3,33                           | 28,12 ± 2,33                                   |

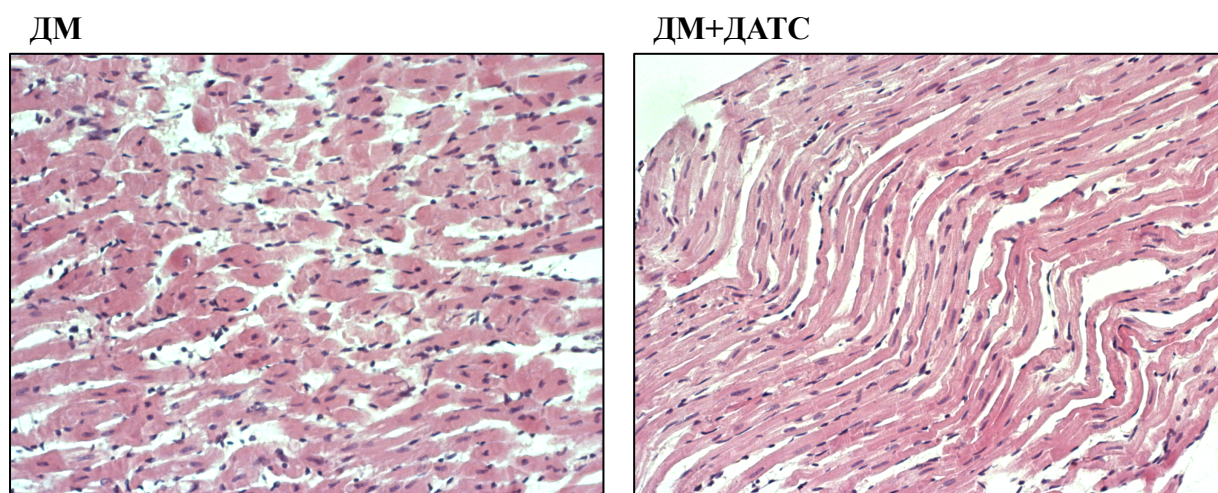
Разлике између нивоа мерених параметара оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту код здравих нетретираних (КТР), нетретираних пацова са дијабетесом (ДМ) и третираних пацова са дијабетесом (ДМ+ДАТС) приказане су на **Графику 24**. Значајно већи ниво TBARS био је забележен у ДМ групи у односу на КТР (у тачкама С и 31) и ДМ+ДАТС (у тачкама 31 и 90) групе. У ДМ+ДАТС групи највећи ниво  $\text{NO}_2^-$  забележен је у стабилизацији. Код дијабетеса нивои  $\text{O}_2^-$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  били су значајно повећани, а третман ДАТС-ом је значајно смањио нивое ова два прооксиданса.



**График 24.** Ефекти третмана ДАТС-ом на (А) индекс липидне пероксидације – мерен као TBARS, (Б) нитрите –  $\text{NO}_2^-$ , (В) супероксид анјон радикал –  $\text{O}_2^-$  и (Г) водоник пероксид –  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Здрави, нетретирани - КТР (---□---), нетретирани пацови са дијабетесом - ДМ (---○---) и третиран пацови са дијабетесом - ДМ+ДАТС (—●—). Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД,  $n = 6$ , по групи. \*  $P < 0,05$  КТР vs. ДМ, #  $P < 0,05$  КТР vs. ДМ+ДАТС, §  $P < 0,05$  ДМ vs. ДМ+ДАТС.

## 4.2.6.3. Бојење срчаног ткива хематоксилин/еозин методом

Као што се може и уочити на **Слици 12**, у групи пацова са дијабетесом присутна су поља некрозе, измењени срчани миофибрили, саркомере, као и перинуклеарна вакуолизација. Међутим, третман ДАТС-ом узроковао је смањење степена озбиљних хистолошких промена у срчаном ткиву.



**Слика 12.** Репрезентативни приказ обојеног ткива миокарда хематоксилин/еозин техником, срца која су претходно била подвргнута деведесетоминутној ретроградној перфузији (ДМ – нетретирани пацови са дијабетесом и ДМ+ДАТС – третирани пацови са дијабетесом), увећање 200 х; скала 2 mm.

4.2.7. *Ex vivo* протокол: 30 минута исхемије и 60 минута реперфузије

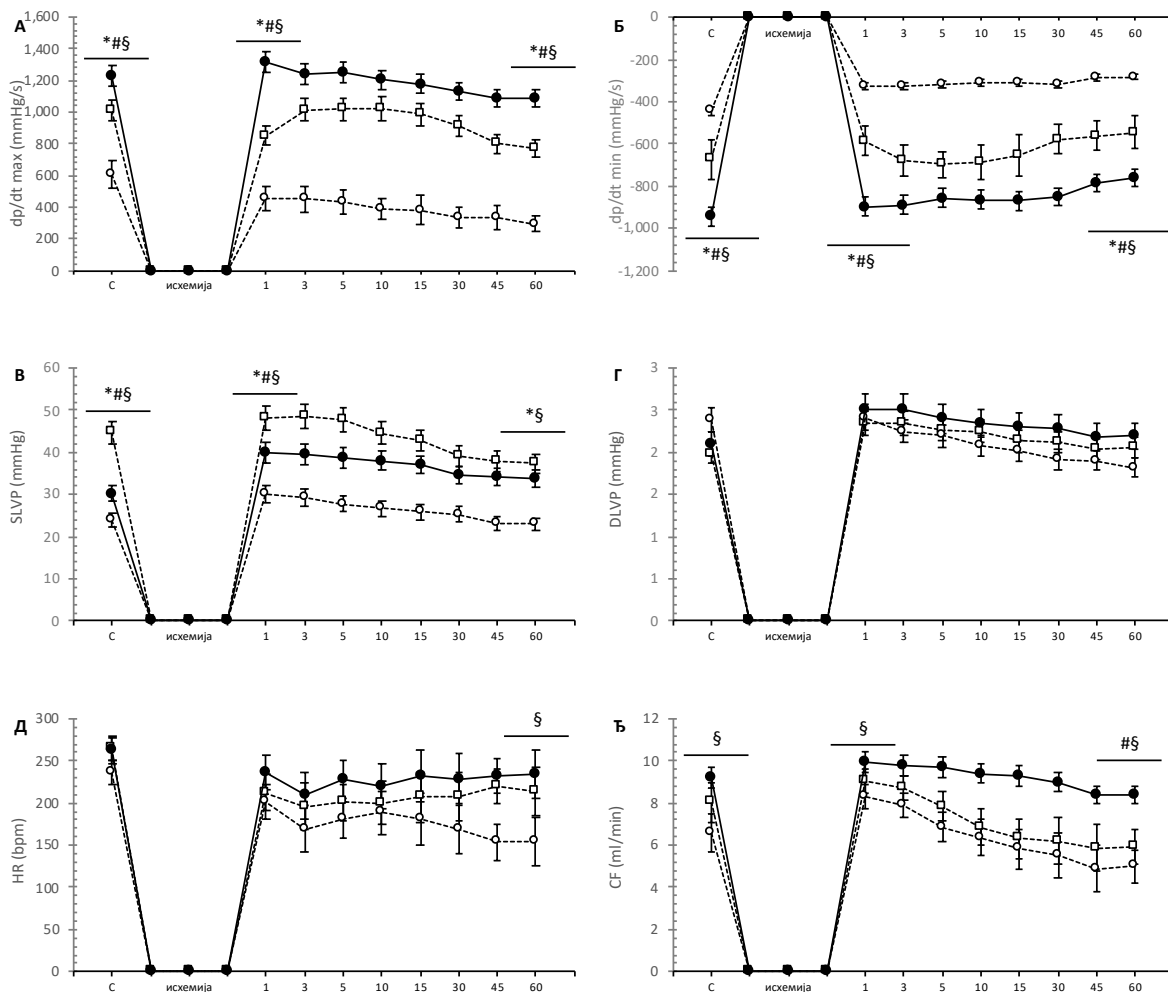
## 4.2.7.1. Кардиодинамски параметри

Промене кардиодинамских параметара током *ex vivo* индуковане И/Р повреде приказане су у **Табели 10**. У ДМ+И/Р групи, током реперфузије је дошло до значајно смањене контрактилне способности миокарда, која се првенствено огледа кроз смањење у  $dp/dt$  max и  $dp/dt$  min, као и CF. Затим, вредности SLVP су биле значајно повећане у 1. минуту реперфузије у односу на C, док се HR (C vs. 1 и C vs. 60) значајно смањивала током периода реперфузије. Са друге стране, током периода реперфузије дошло је до статистички значајног повећања вредности  $dp/dt$  min (1 vs. 60) и SLVP (C vs. 1) у ДМ+ДАТС+И/Р групи.

**Табела 10.** Кардиодинамски параметри праћени током *ex vivo* индуковане И/Р повреде изолованог срца пацова (нетретирани пацови са дијабетесом – ДМ+И/Р и третиран пацови са дијабетесом – ДМ+ДАТС+И/Р). Стабилизација – C; 1. минут реперфузије – 1 и 60. минут 1. минут реперфузије – 60. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД, n = 6, по групи. <sup>a</sup> P<0,05 C vs. 31; <sup>b</sup> P<0,05 C vs. 90; <sup>c</sup> P<0,05 31 vs. 90.

|                      |    | dp/dt max (mmHg)                 | dp/dt min (mmHg)                  | SLVP (mmHg)                   |
|----------------------|----|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| ДМ+<br>И/Р           | C  | 606,91 $\pm$ 83,64               | -444,58 $\pm$ 123,25              | 24,08 $\pm$ 3,49              |
|                      | 1  | 453,63 $\pm$ 73,28 <sup>a</sup>  | -330,42 $\pm$ 111,94 <sup>a</sup> | 30,07 $\pm$ 3,39 <sup>a</sup> |
|                      | 60 | 293,87 $\pm$ 50,38 <sup>bc</sup> | -282,38 $\pm$ 75,13 <sup>bc</sup> | 22,95 $\pm$ 2,80              |
| ДМ+<br>ДАТС<br>+ И/Р | C  | 1229,23 $\pm$ 212,29             | -944,02 $\pm$ 161,24              | 30,23 $\pm$ 4,37              |
|                      | 1  | 1313,20 $\pm$ 277,37             | -897,97 $\pm$ 149,06              | 39,87 $\pm$ 6,11 <sup>a</sup> |
|                      | 60 | 1083,47 $\pm$ 148,75             | -760,51 $\pm$ 159,86 <sup>c</sup> | 33,82 $\pm$ 6,01              |
|                      |    | DLVP (mmHg)                      | HR (bpm)                          | CF (ml/min)                   |
| ДМ+<br>И/Р           | C  | 2,38 $\pm$ 0,19                  | 236,52 $\pm$ 19,48                | 6,57 $\pm$ 0,46               |
|                      | 1  | 2,42 $\pm$ 0,46                  | 201,35 $\pm$ 15,86 <sup>a</sup>   | 8,27 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>  |
|                      | 60 | 1,82 $\pm$ 0,57                  | 153,65 $\pm$ 36,87 <sup>b</sup>   | 5,00 $\pm$ 0,89 <sup>bc</sup> |
| ДМ+<br>ДАТС<br>+ И/Р | C  | 2,10 $\pm$ 0,24                  | 261,98 $\pm$ 18,24                | 9,20 $\pm$ 1,44               |
|                      | 1  | 2,52 $\pm$ 0,40                  | 236,42 $\pm$ 32,23                | 9,97 $\pm$ 0,85               |
|                      | 60 | 2,20 $\pm$ 0,31                  | 235,22 $\pm$ 29,58                | 8,37 $\pm$ 0,84               |

Разлике између функције срца након *ex vivo* индуковане И/Р повреде код нетретираних и третираних пацова са дијабетесом, приказане су на **Графику 25**. Стопа промене притиска у левој комори (dp/dt max и dp/dt min, у свим тачкама од интереса) и CF били су значајно различити између упоређиваних група ДМ+ДАТС+И/Р > И/Р > ДМ+И/Р, док је SLVP био највиши у И/Р, а најнижи у ДМ+И/Р групи. Фреквенца срца (HR) била је значајно виша у последњем минути реперфузије код дијабетичних пацова третираних ДАТС-ом у односу на нетретиране пацове.



**График 25.** Ефекти третмана ДАТС-ом на *ex vivo* индуковану И/Р повреду миокарда пацова (А) максимална стопа развоја притиска у левој комори – dp/dt max, (Б) минимална стопа развоја притиска у левој комори – dp/dt min, (В) систолни притисак у левој комори – SLVP, (Г) дијастолни притисак у левој комори – DLVP, (Д) фреквенца срца – HR и (Ђ) коронарни проток – CF. Здрави, нетретирани пацови - И/Р (---□---), нетретирани пацови са дијабетесом - ДМ+И/Р (---○---) и третирани пацови са дијабетесом – ДМ+ДАТС+И/Р (—●—). Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n = 6, по групи. \* P<0,05 И/Р vs. ДМ+И/Р, # P<0,05 И/Р vs. ДМ+ДАТС+И/Р, § P<0,05 ДМ+И/Р vs. ДМ+ДАТС+И/Р.

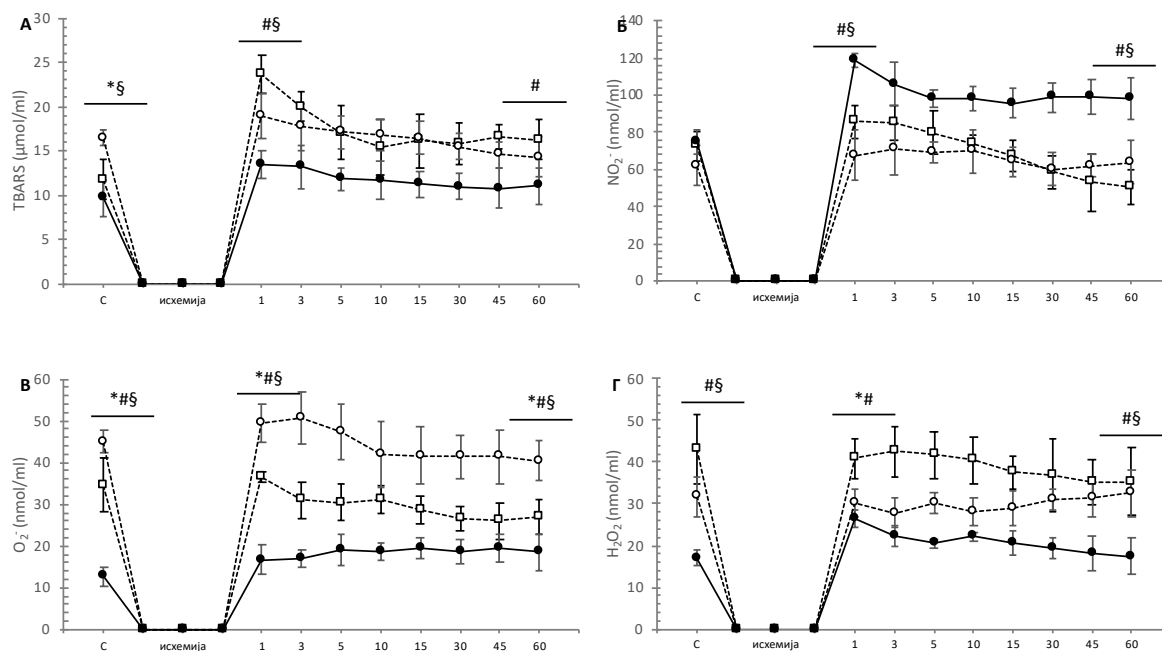
## 4.2.7.2. Прооксидациони параметри мерени у коронарном венском ефлуенту

Нивои  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  били су значајно виши у првом минуту реперфузије у поређењу са стабилизацијом, али је до краја реперфузије ниво  $\text{NO}_2^-$  поново смањен на ниво сличан оном у тачки стабилизације (Табела 11).

**Табела 11.** Прооксидациони параметри мерени у коронарном венском ефлуенту који је прикупљен у стабилизацији и током реперфузије изолованог срца пацова (нетретирани пацови са дијабетесом - ДМ+И/Р и третирани пацови са дијабетесом - ДМ+ДАТС+И/Р). Стабилизација – С; 1. минут реперфузије – 1 и 60. минут реперфузије – 60. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД,  $n = 6$ , по групи. <sup>a</sup> $P < 0,05$  С vs. 31; <sup>b</sup>  $P < 0,05$  С vs. 90; <sup>c</sup>  $P < 0,05$  1 vs. 60.

|                      |    | TBARS<br>( $\mu\text{mol/ml}$ ) | $\text{NO}_2^-$<br>( $\text{nmol/ml}$ ) | $\text{O}_2^-$<br>( $\text{nmol/ml}$ ) | $\text{H}_2\text{O}_2$<br>( $\text{nmol/ml}$ ) |
|----------------------|----|---------------------------------|---|--|--|
| ДМ+<br>И/Р           | С  | 16,46 $\pm$ 0,93                | 62,19 $\pm$ 11,03                       | 44,93 $\pm$ 2,65                       | 31,77 $\pm$ 4,84                               |
|                      | 1  | 18,96 $\pm$ 2,58                | 67,64 $\pm$ 13,29                       | 49,42 $\pm$ 4,67                       | 30,13 $\pm$ 3,32                               |
|                      | 60 | 14,30 $\pm$ 2,31                | 63,95 $\pm$ 11,47                       | 40,47 $\pm$ 4,75                       | 32,60 $\pm$ 5,68                               |
| ДМ+<br>ДАТС<br>+ И/Р | С  | 9,63 $\pm$ 2,04                 | 75,10 $\pm$ 6,50                        | 12,69 $\pm$ 2,38                       | 17,01 $\pm$ 1,86                               |
|                      | 1  | 13,51 $\pm$ 1,55                | 118,66 $\pm$ 3,50 <sup>a</sup>          | 16,78 $\pm$ 3,45                       | 26,48 $\pm$ 2,17 <sup>a</sup>                  |
|                      | 60 | 11,07 $\pm$ 2,05                | 97,96 $\pm$ 11,00 <sup>b</sup>          | 18,52 $\pm$ 4,39                       | 17,45 $\pm$ 4,39                               |

Као што је приказано на **Графику 26**, пацови са дијабетесом имали су значајно повишене вредности TBARS и  $H_2O_2$  у коронарном венском ефлуенту, док је третман ДАТС-ом значајно смањио нивое TBARS,  $O_2^-$  и  $H_2O_2$ , и повећао ниво  $NO_2^-$ .



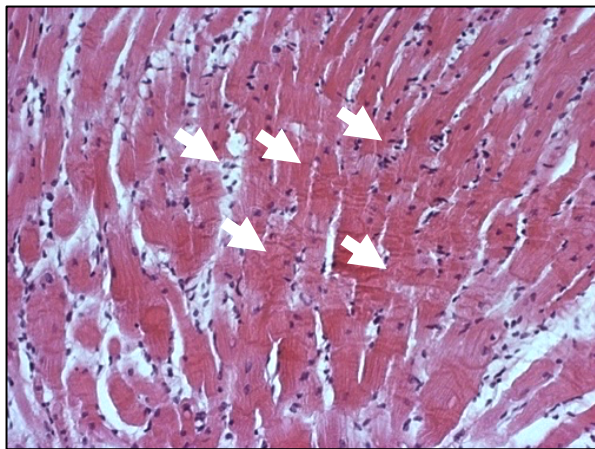
**График 26.** Ефекти третмана ДАТС-ом на *ex vivo* индуковану И/Р повреду изолованог срца пацова (А) индекс липидне пероксидације – мерен као TBARS, (Б) нитрити –  $NO_2^-$ , (В) супероксид анјон радикал –  $O_2^-$  и (Г) водоник пероксид –  $H_2O_2$ . Здрави, нетретирани пацови - И/Р (---□---), нетретирани пацови са дијабетесом - ДМ+И/Р (---○---) и третиран пацови са дијабетесом - ДМ+ДАТС+И/Р (—●—). Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n = 6, по групи. \* P<0,05 И/Р vs. ДМ+И/Р, # P<0,05 И/Р vs. ДМ+ДАТС+И/Р, § P<0,05 ДМ+И/Р vs. ДМ+ДАТС+И/Р.



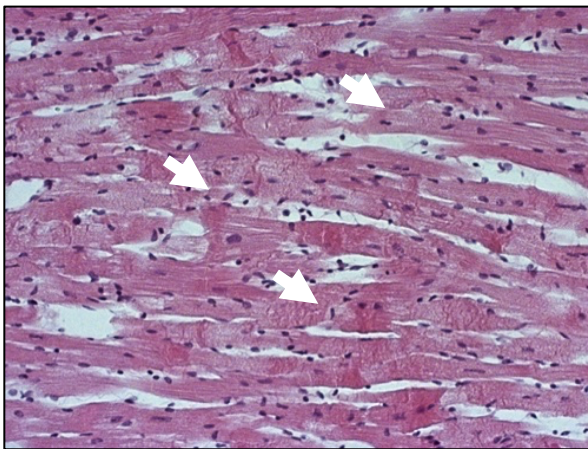
## 4.2.7.3. Бојење срчаног ткива хематоксилин/еозин методом

Као што је приказано на **Слици 13**, у ДМ+И/Р групи јасно се уочава дегенерација миокарда са неуређеним миофибрилима, интерстицијални едем, оштећење мишићне мембране и опсежна поља конфлуентне некрозе. Међутим, третман ДАТС-ом ублажио је већину од наведених промена, што је најочљивије на миофибрилима и миофиламентима.

ДМ+И/Р



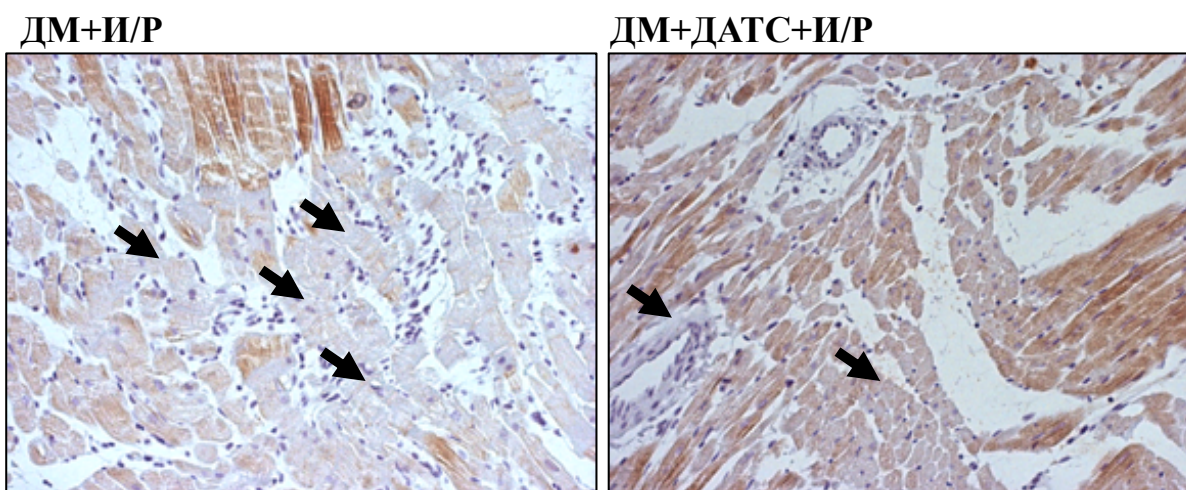
ДМ+ДАТС+И/Р



**Слика 13.** Репрезентативни приказ обојеног ткива миокарда хематоксилин/еозин техником, срца која су претходно била подвргнута И/Р повреди (ДМ+И/Р – нетретирани пацови са дијабетесом и ДМ+ДАТС+И/Р – третирани пацови са дијабетесом), увећање 200 х; скала 2 mm.

## 4.2.7.4. Бојење тропонина Т у ткиву миокарда

Као што је приказано на **Слици 14**, у ДМ+И/Р групи, уочава се врло мало позитивног (смеђег) обојења уз јасан губитак у бојењу сТnТ. Са друге стране, смањење обојења уз позитивне (браонкасте) површине пронађено је у ДМ+ДАТС+И/Р групи.

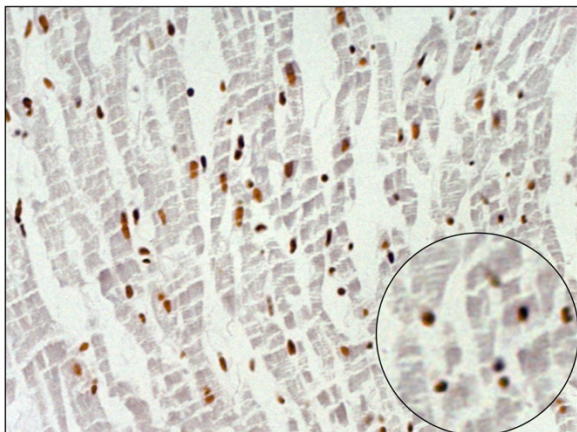


**Слика 14.** Репрезентативни приказ обојеног сТnТ у ткиву срца пацова која су претходно била подвргнута *ex vivo* изазваној И/Р повреди (ДМ+И/Р – нетретирани пацови са дијабетесом и ДМ+ДАТС+И/Р – третирани пацови са дијабетесом), увећање 200 х; скала 2 mm.

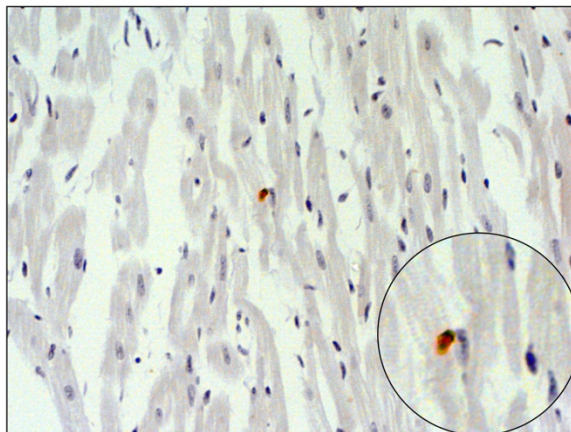
## 4.2.7.5. ТУНЕЛ тест

Учесталост миоцита са ТУНЕЛ позитивним једром у ткиву срца пацова са дијабетесом, била је већа у односу на здраве пацове, али је у групи пацова којима је током три недеље примењиван ДАТС, ова учесталост значајно смањена (Слика 15).

ДМ+И/Р



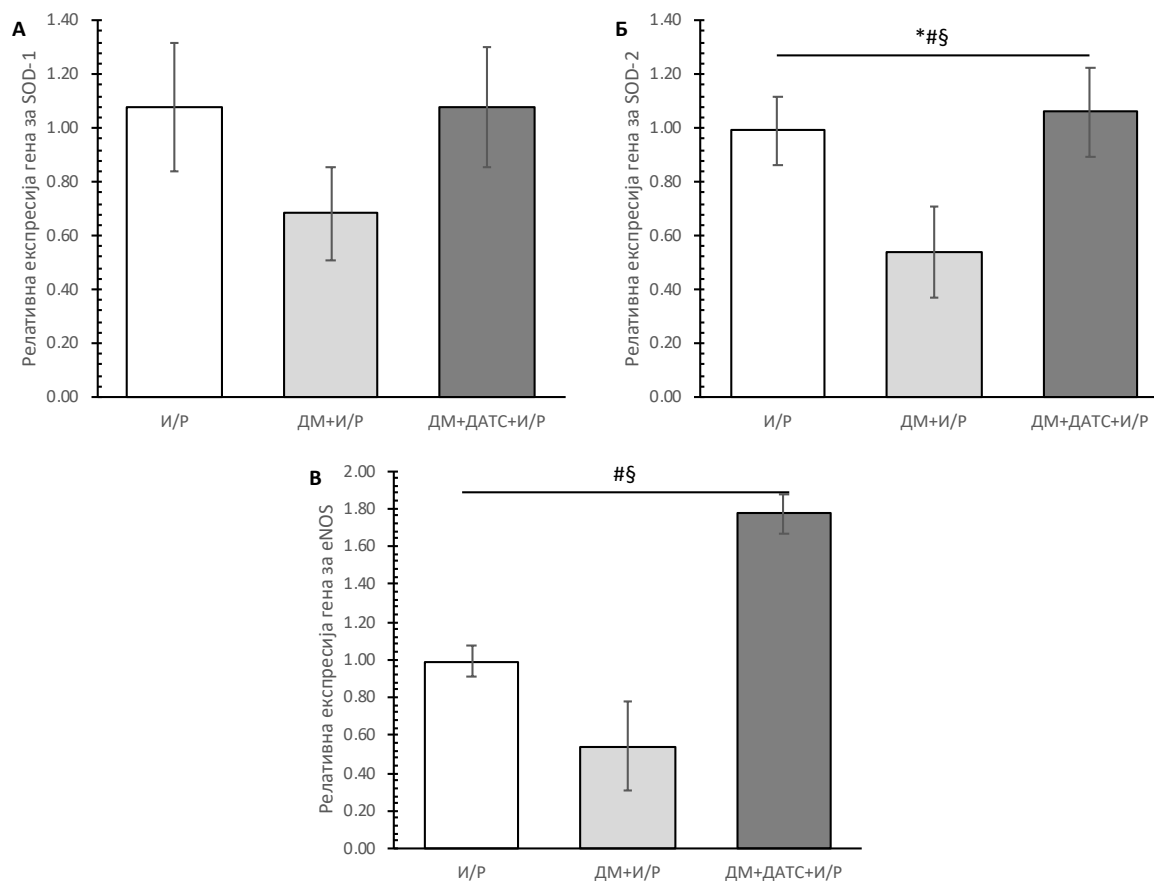
ДМ+ДАТС+И/Р



**Слика 15.** Репрезентативни приказ заступљености миоцита са ТУНЕЛ позитивним једром, у ткиву срца пацова која су претходно била подвргнута *ex vivo* изазваној И/Р повреди (ДМ+И/Р – нетретирани пацови са дијабетесом и ДМ+ДАТС+И/Р – третирани пацови са дијабетесом), увећање 200 х и 400 х.

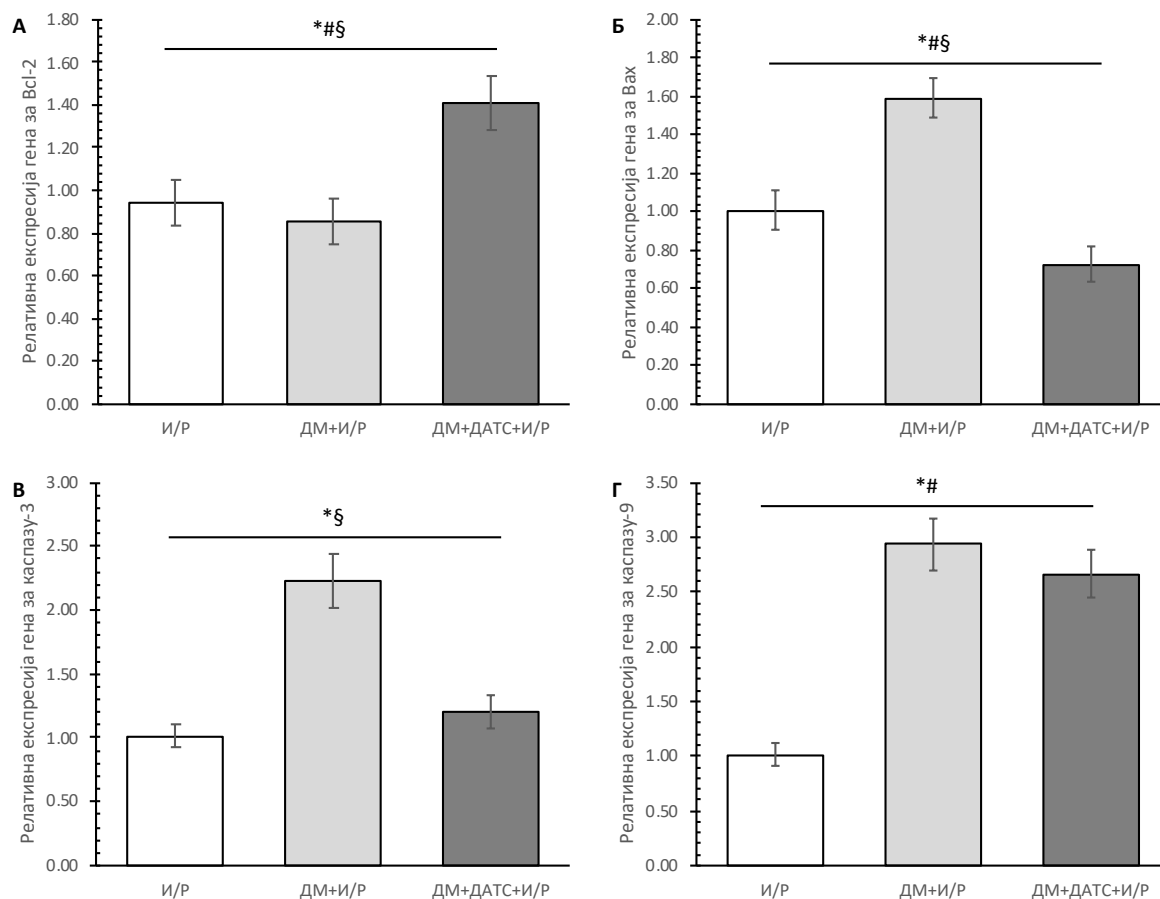
#### 4.2.7.6. Релативна експресија антиоксидационих, (анти)апоптотских и (анти)инфламацијских гена у левој комори срца

Релативна експресија гена за eNOS и SOD-2 била је значајно повећана у ДМ+ДАТС+И/Р групи у поређењу са И/Р и ДМ+И/Р групама, док је релативна експресија гена за SOD-1 била готово слична у упоређеним групама (График 27).



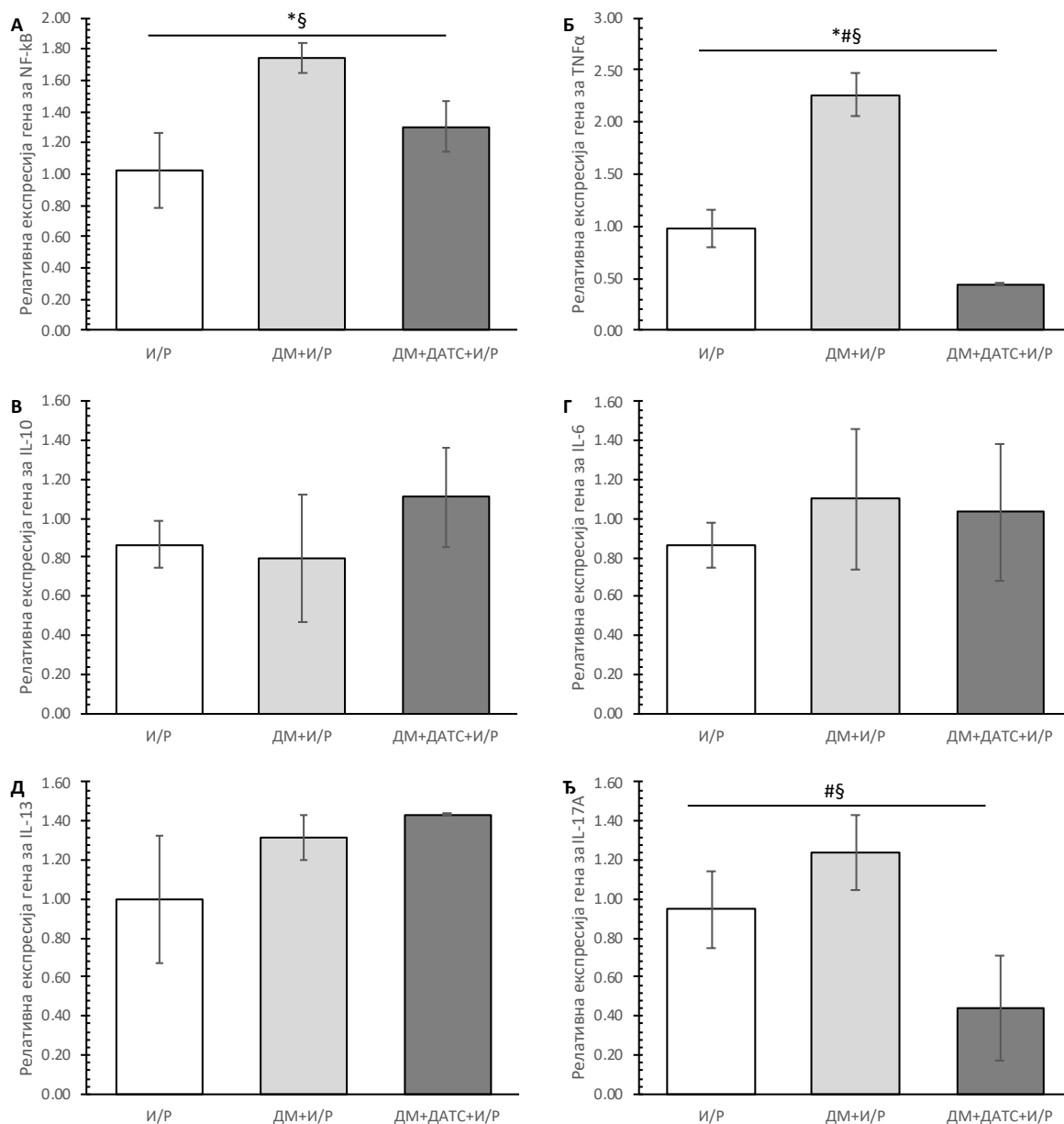
**График 27.** Ефекти третмана ДАТС-ом на релативну експресију антиоксидационих гена за (А) супероксид дисмутазу 1 – SOD-1, (Б) супероксид дисмутазу 2 – SOD-2, (В) ендотелну азот моноксид синтазу – eNOS, у левој комори срца пацова са дијабетесом након *ex vivo* изазване И/Р повреде. И/Р - здрави, нетретирани пацови, ДМ+И/Р - нетретирани пацови са дијабетесом и ДМ+ДАТС+И/Р - третирани пацови са дијабетесом. Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n = 6, по групи. \* P<0,05 И/Р vs. ДМ+И/Р, # P<0,05 И/Р vs. ДМ+ДАТС+И/Р, § P<0,05 ДМ+И/Р vs. ДМ+ДАТС+И/Р.

Релативна експресија гена за Вах, каспазу-3 и каспазу-9 значајно је повећана, док је релативна експресија гена за Bcl-2 значајно смањена у ДМ+И/Р, у односу на И/Р групу. Са друге стране, третман ДАТС-ом је значајно смањио релативну експресију гена за Вах, као и гена за каспазу-3 и повећао релативну експресију гена за Bcl-2 (График 28).



**График 28.** Ефекти третмана ДАТС-ом на релативну експресију (анти)апоптотских гена за (А) Bcl-2, (Б) Вах, (В) каспазу-3 и (Г) каспазу-9, у левој комори пацова са дијабетесом након *ex vivo* изазване И/Р повреде. И/Р - здрави, нетретирани пацови, ДМ+И/Р - нетретирани пацови са дијабетесом и ДМ+ДАТС+И/Р - третирани пацови са дијабетесом. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД,  $n = 6$ , по групи. \*  $P < 0,05$  И/Р vs. ДМ+И/Р, #  $P < 0,05$  И/Р vs. ДМ+ДАТС+И/Р, §  $P < 0,05$  ДМ+И/Р vs. ДМ+ДАТС+И/Р.

Релативна експресија гена за NF-κB и TNF-α била је значајно повећана у ДМ+И/Р групи, а третман ДАТС-ом је значајно смањио експресију ових гена, као и гена за IL-17A (График 29).

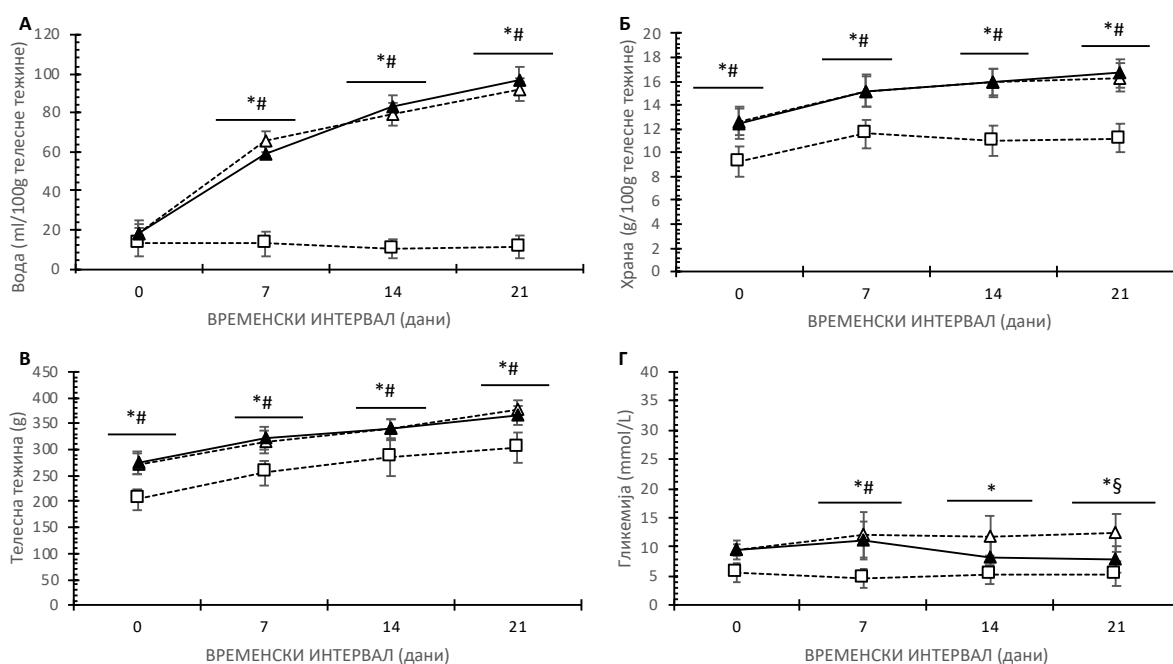


**График 29.** Ефекти третмана ДАТС-ом на релативну експресију (анти)инфламацијских гена за (А) NF-κB, (Б) TNF-α, (В) IL-10, (Г) IL-6, (Д) IL-13 и (Ђ) IL-17A у левој комори пацова са дијабетесом након *ex vivo* изазване И/Р повреде. И/Р - здрави, нетретирани пацови, ДМ+И/Р - нетретирани пацови са дијабетесом и ДМ+ДАТС+И/Р - третирани пацови са дијабетесом. Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n = 6, по групи. \* P<0,05 И/Р vs. ДМ+И/Р, # P<0,05 И/Р vs. ДМ+ДАТС+И/Р, § P<0,05 ДМ+И/Р vs. ДМ+ДАТС+И/Р.

### 4.3. ЕФЕКТИ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА ПАЦОВЕ СА МЕТАБОЛИЧКИМ СИНДРОМОМ

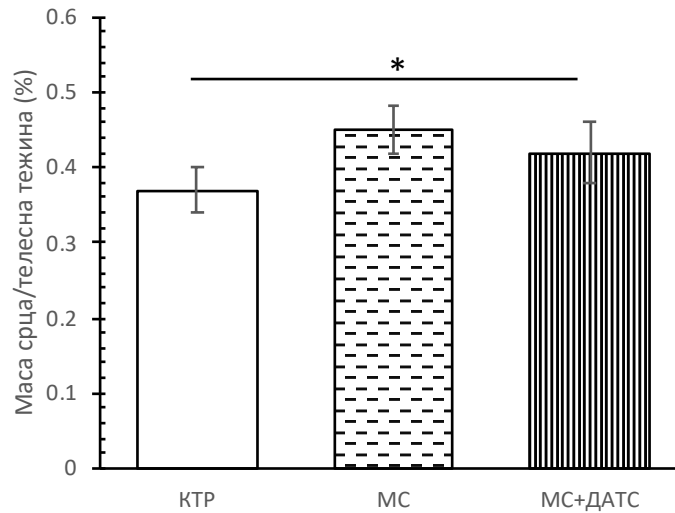
#### 4.3.1. Карактеристике пацова праћене током хроничног протокола

Пацови са МетС-ом су показали карактеристике типичне за ову болест. Наиме, они су конзумирали више воде, више хране и уз то су се гојили тј. имали већу телесну тежину од КТР пацова. Третман ДАТС-ом није значајно модификовао ове параметре. Нивои глукозе наше, након индукције МетС-а, биле су значајно више него у КТР групи и наставиле су са благим повећањем током експерименталног периода. Ниво глукозе у МС+ДАТС групи био је значајно смањен у односу на МС групу (**График 30**).



**График 30.** Ефекти третмана ДАТС-ом на (А) конзумацију воде, (Б) конзумацију хране, (В) телесну тежину и (Г) гликемију наше, током тронедељног третмана ДАТС-ом код здравих нетретираних пацова - КТР (---□---), нетретираних пацова са МетС - МС (---△---) и третираних пацова са МетС – МС+ДАТС (—▲—). 0 – непосредно пре третмана ДАТС-ом; 7 – након 7 дана од третмана ДАТС-ом; 14 – након 14 дана од третмана ДАТС-ом; 21 – након 21 дан од третмана ДАТС-ом. Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n = 12, по групи. \* P < 0,05 КТР vs. МС, # P < 0,05 КТР vs. МС+ДАТС, § P < 0,05 МС vs. МС+ДАТС.

Значајан пораст процентуалног односа масе срца и телесне тежине пацова, примећен је у МС групи у односу на КТР групу. Третман ДАТС-ом, ублажио је ове промене, стога није било статистички значајне разлике између КТР и МС+ДАТС групе (График 31).

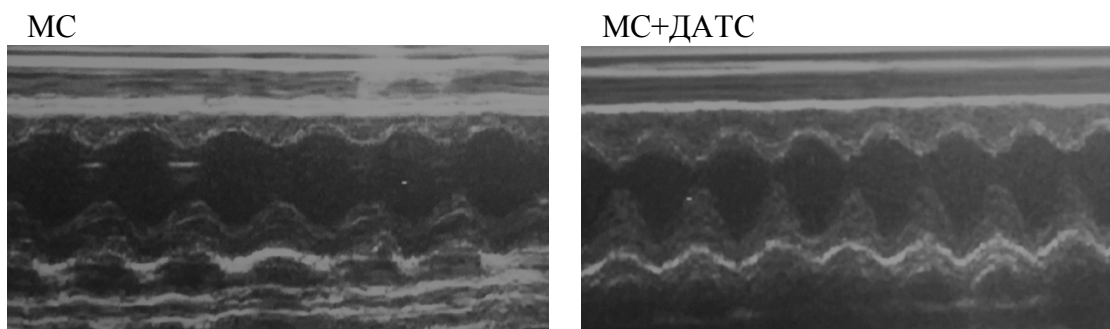


**График 31.** Ефекти третмана ДАТС-ом на однос тежине срца и телесне тежине пацова са МетС-ом. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД,  $n = 12$ , по групи. \*  $P < 0,05$  КТР vs. МС.



### 4.3.2. Функција миокарда праћена *in vivo*

МетС је значајно променио функцију миокарда, што се јасно уочава кроз смањење IVS на крају дијастоле и систоле, као и смањење FS и повећање LVIDd. Међутим, код пацова који су током три недеље били на третману ДАТС-ом, све наведене промене биле су спречене (Слика 16, Табела 12).



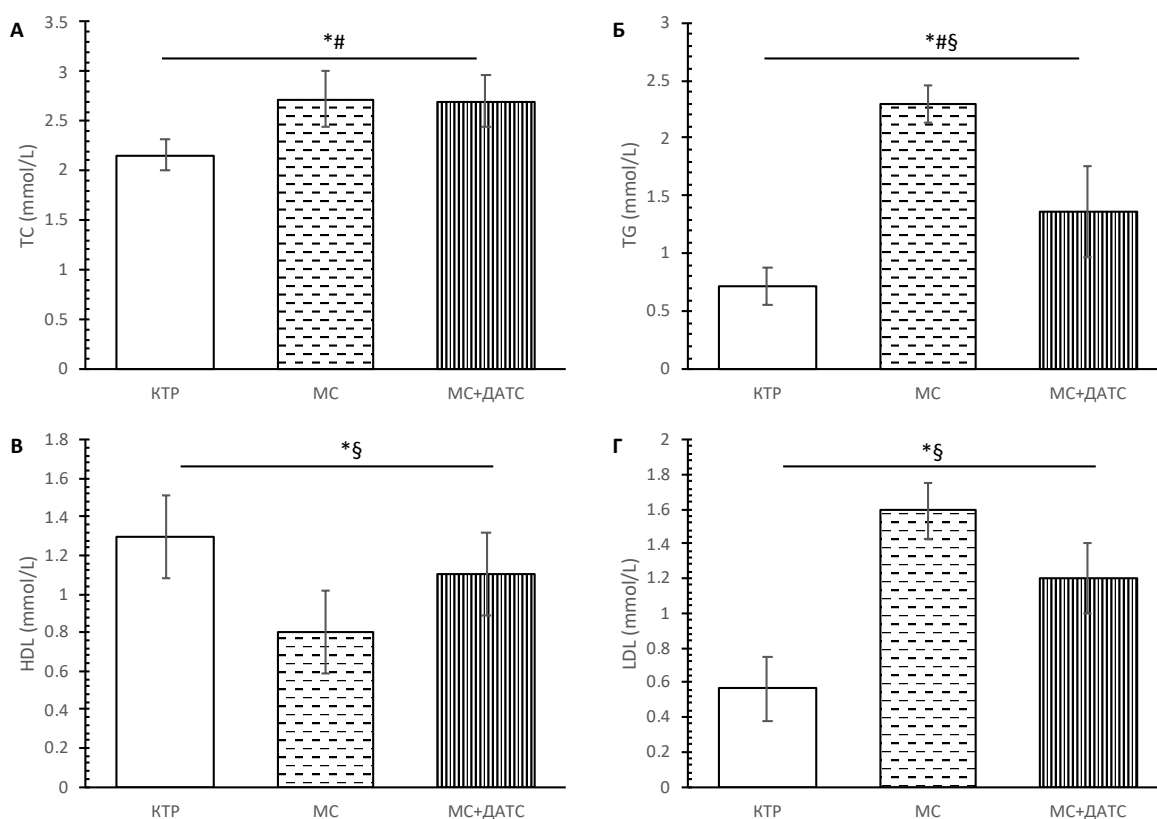
Слика 16. Репрезентативна фотографија ехокардиографије миокарда из М-режима у MC и MC+ДАТС групама.

Табела 12. *In vivo* мерени кардиодинамски параметри код здравих, нетретираних пацова (КТР), нетретираних пацова са МетС-ом (MC) и третираних пацова са МетС-ом (MC+ДАТС). Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД, n = 12, по групи. \* P<0,05 КТР vs. MC, # P<0,05 КТР vs. MC+ДАТС, § P<0,05 MC vs. MC+ДАТС.

|            | КТР               | MC                  | MC+ДАТС             |
|------------|-------------------|---------------------|---------------------|
| IVSd (cm)  | 0,163 $\pm$ 0,021 | 0,128 $\pm$ 0,032*  | 0,159 $\pm$ 0,034§  |
| LVIDd (cm) | 0,638 $\pm$ 0,052 | 0,623 $\pm$ 0,073   | 0,619 $\pm$ 0,032   |
| LVPWd (cm) | 0,204 $\pm$ 0,054 | 0,220 $\pm$ 0,009   | 0,203 $\pm$ 0,037   |
| IVSs (cm)  | 0,301 $\pm$ 0,036 | 0,233 $\pm$ 0,047*  | 0,322 $\pm$ 0,048§  |
| LVIDs (cm) | 0,267 $\pm$ 0,087 | 0,324 $\pm$ 0,010*  | 0,218 $\pm$ 0,032§  |
| LVPWs (cm) | 0,322 $\pm$ 0,054 | 0,316 $\pm$ 0,006   | 0,342 $\pm$ 0,103   |
| FS (%)     | 58,55 $\pm$ 4,131 | 48,975 $\pm$ 4,321* | 66,300 $\pm$ 4,751§ |

### 4.3.3. Липидни параметри мерени након хроничног третмана ДАТС-ом

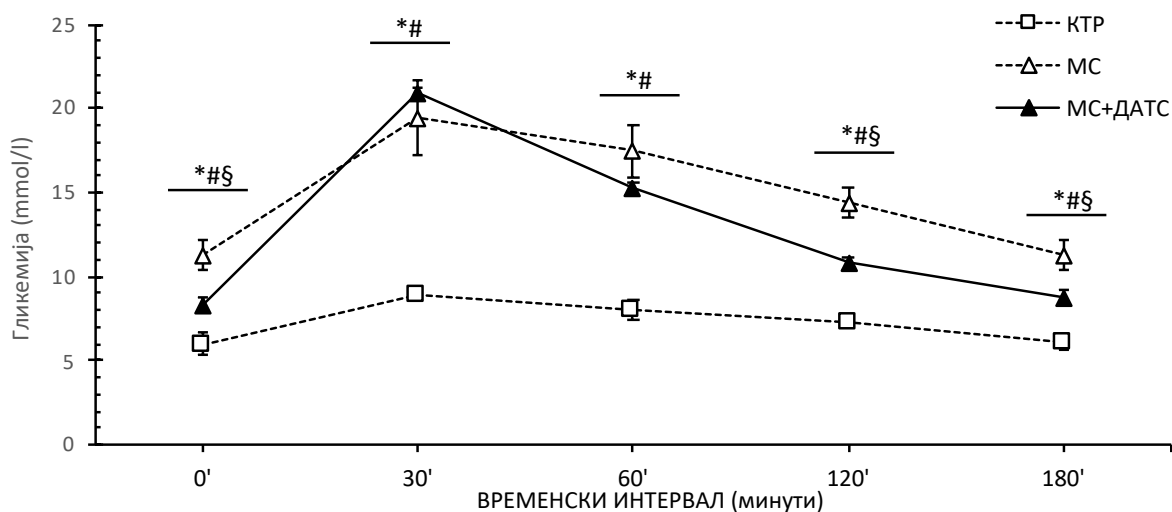
Сви мерени липидни параметри били су повећани (сем HDL који је био смањен) код пацова са MetC-ом у односу на KTP групу. Третман ДАТС-ом код пацова са MetC-ом статистички значајно је смањио TG и LDL и значајно је повећао HDL нивое (**График 32**).



**График 32.** Ефекти третмана ДАТС-ом на липидне параметре код здравих, нетретираних пацова (KTP), нетретираних пацова са дијабетесом (DM) и третираних пацова са дијабетесом (DM+ДАТС). (А) укупни холестерол – TC, (Б) триглицериди – TG, (В) липопротеин високе густине – HDL и (Г) липопротеин ниске густине – LDL Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n = 12, по групи. \* P<0,05 KTP vs. MC, # P<0,05 KTP vs. MC+ДАТС, § P<0,05 MC vs. MC+ДАТС.

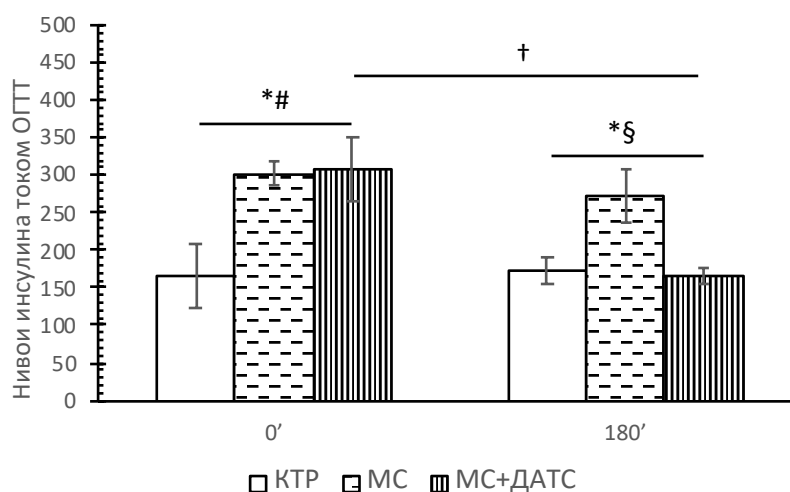
## 4.3.4. Нивои инсулина и глукозе мерени током теста оптерећења глукозом (ОГТТ)

На **Графику 33** приказане су просечне вредности глукозе у крви, измерене током ОГТ теста. Ниво глукозе у крви наше је био значајно повећан у обе групе пацова са МетС-ом у поређењу са КТР групом. Поред тога, ниво глукозе је био значајно нижи у МС+ДАТС групи у поређењу са МС групом (глукоза у крви наше, као и у 120. и 180. минути након администрације глукозе).



**График 33.** Ефекти третмана ДАТС-ом на нивое глукозе током ОГТ теста код пацова са МетС-ом. Гликемија наше (означена као 0'), и нивои глукозе у 30', 60', 120' и 180' након администрације глукозе у дози од 2 g/kg телесне тежине. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД, n = 6, по групи. \* P<0,05 КТР vs. МС, # P<0,05 КТР vs. МС+ДАТС, § P<0,05 МС vs. МС+ДАТС.

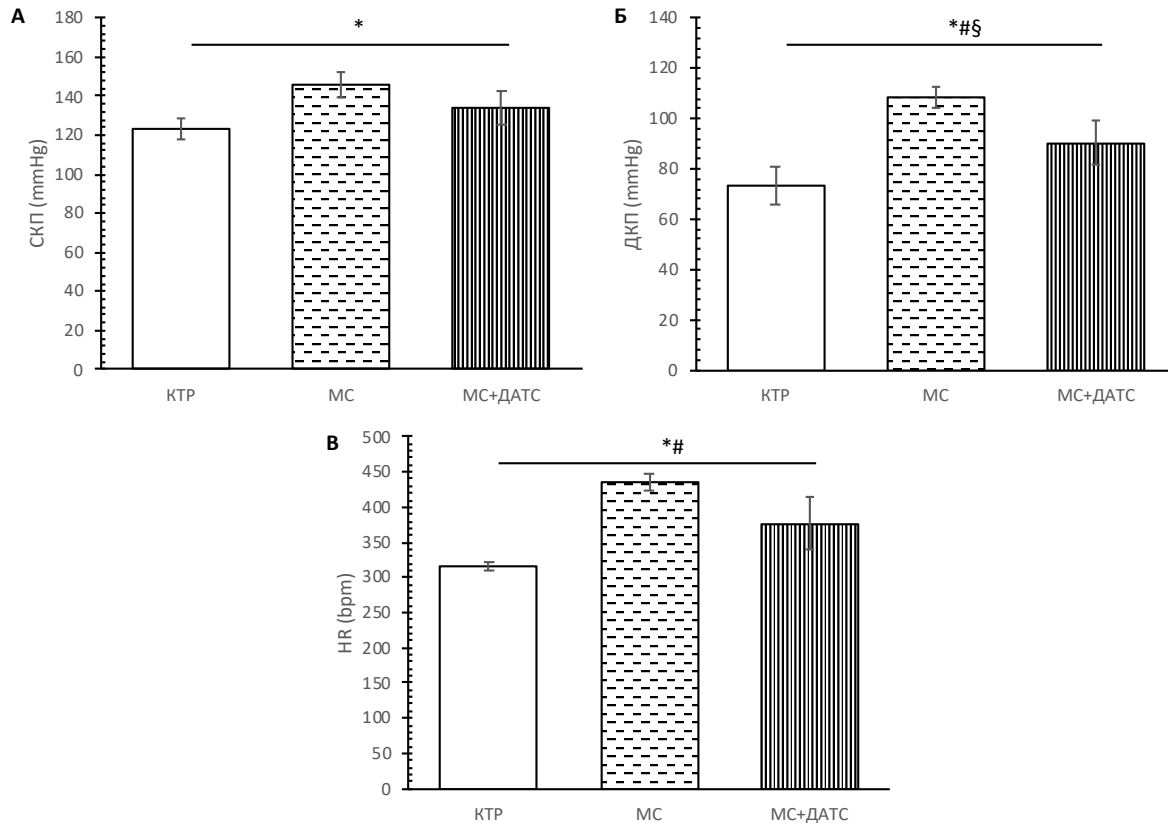
Просечне вредности инсулина током ОГТТ су приказане на **Графику 34**. Концентрације инсулина мереног наشته су биле значајно повећане код пацова са МетС-ом (у МС и МС+ДАТС групама) у поређењу са КТР. Са друге стране, 180 минута након администрације глукозе, ниво инсулина је био значајно повећан у МС групи у поређењу са КТР и МС+ДАТС групама.



**График 34.** Ефекти третмана ДАТС-ом код пацова са МетС-ом на нивое инсулина непосредно пре (0') и 180' након администрације глукозе у дози од 2 g/kg телесне тежине. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД, n = 12, по групи. \* P<0,05 КТР vs. МС, # P<0,05 КТР vs. МС+ДАТС, § P<0,05 МС vs. МС+ДАТС, † P<0,05 МС у 0' vs. МС у 180'.

#### 4.3.5. Крвни притисак и срчана фреквенца

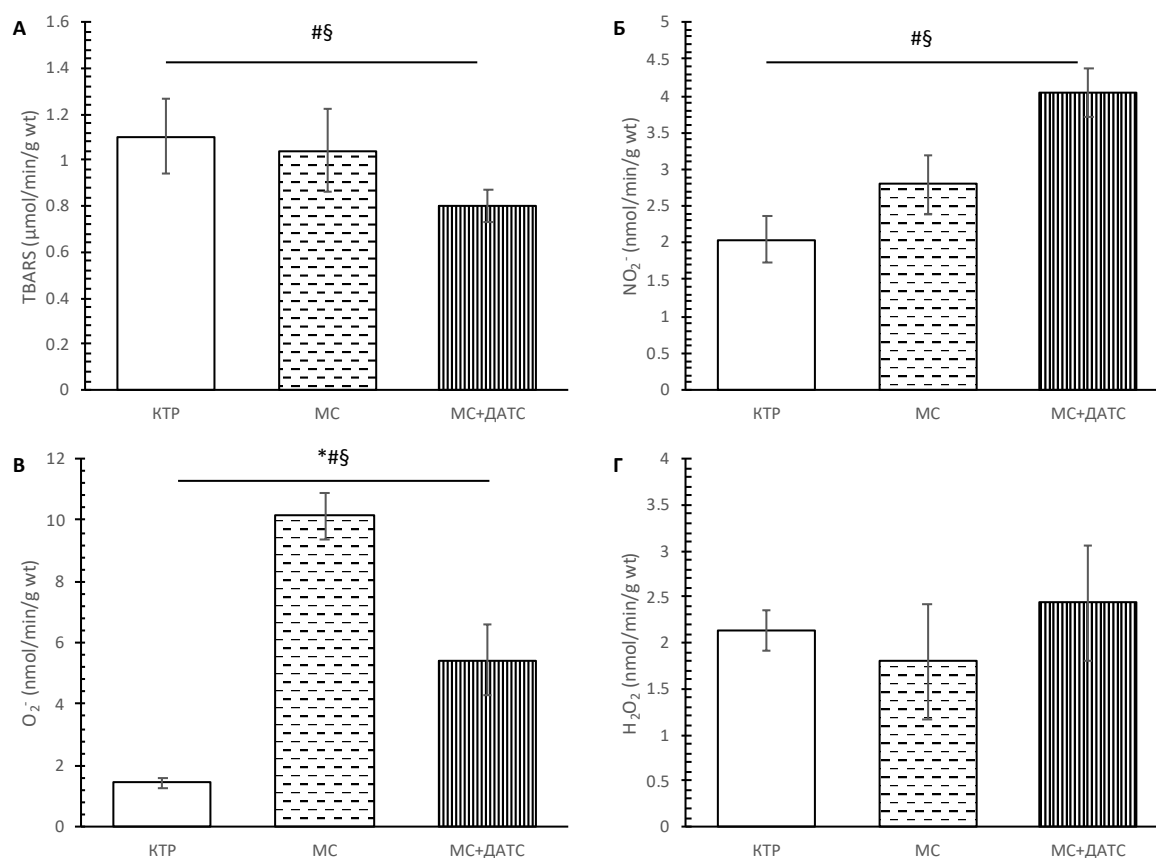
Крвни притисак и фреквенца срца били су значајно повећани код пацова са MetC-ом у поређењу са KTR групом, док је третман ДАТС-ом у трајању од три недеље, статистички значајно, смањио само дијастолни крвни притисак (**График 35**).



**График 35.** Ефекти третмана ДАТС-ом код пацова са MetC-ом (А) систолни крвни притисак – СКП, (Б) дијастолни крвни притисак – ДКП и (В) срчану фреквенцу – HR. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД,  $n = 6$ , по групи. \*  $P < 0,05$  KTR vs. MC, #  $P < 0,05$  KTR vs. MC+ДАТС, §  $P < 0,05$  MC vs. MC+ДАТС.

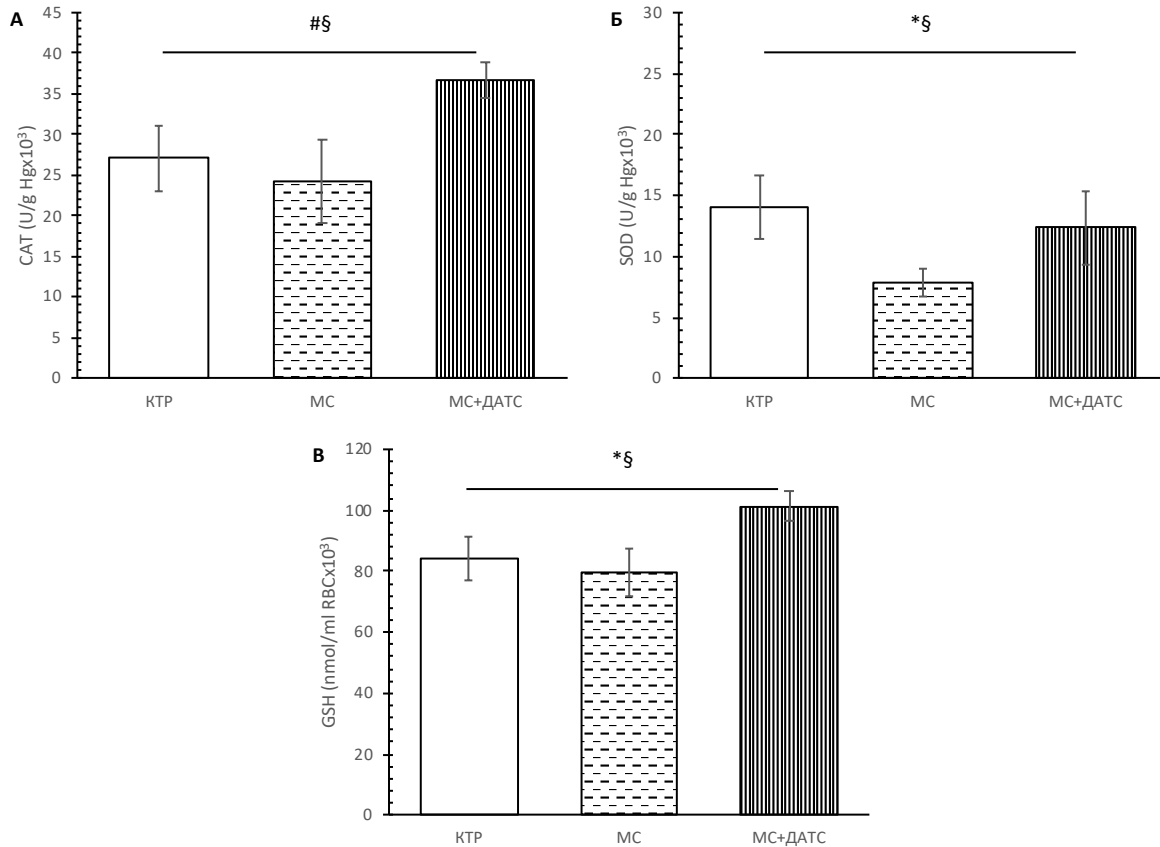
#### 4.3.6. Нивои прооксидационих и антиоксидационих параметара у системској циркулацији

Ниво ТВАРС био је значајно смањен, док је ниво  $\text{NO}_2^-$  био значајно повећан код пацова са МетС-ом којма је ДАТС примењиван, у поређењу са пацовима из КТР и МС групе. Поред тога, ниво  $\text{O}_2^-$  био је статистички значајно повећан у МС групи у односу на КТР и МС+ДАТС (График 36).



**График 36.** Ефекти третмана ДАТС-ом код пацова са МетС-ом (А) индекс липидне пероксидације – мерен као ТВАРС, (Б) нитрити –  $\text{NO}_2^-$ , (В) супероксид анјон радикал –  $\text{O}_2^-$  и (Г) водоник пероксид –  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД,  $n=12$ , по групи. \*  $P<0,05$  КТР vs. МС, #  $P<0,05$  КТР vs. МС+ДАТС, §  $P<0,05$  МС vs. МС+ДАТС.

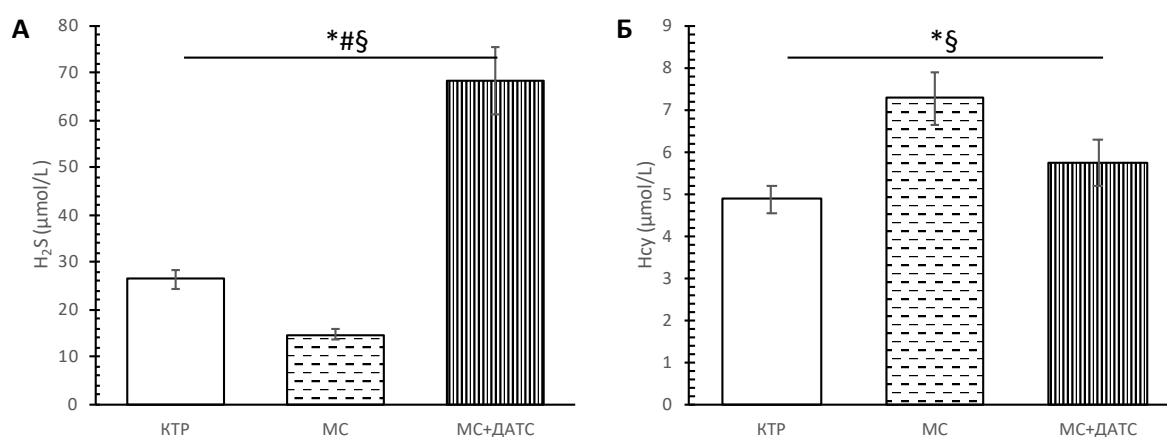
SOD и GSH били су значајно смањени у МС групи, у поређењу са КТР групом. Са друге стране, третман ДАТС-ом довео је до значајног повећања CAT, SOD и GSH код пацова са МетС-ом (График 37).



**График 37.** Ефекти третмана ДАТС-ом код пацова са МетС-ом на активност (А) каталазе – CAT, (Б) супероксид дисмутазе – SOD и (В) редукованог глутатиона – GSH. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД, n =12, по групи. \* P<0,05 КТР vs. МС, # P<0,05 КТР vs. МС+ДАТС, § P<0,05 МС vs. МС+ДАТС.

#### 4.3.7. Нивои водоник сулфида и хомоцистеина у серуму

Узимајући у обзир да је ДАТС донор водоник сулфида, не зачуђује чињеница да је тронедељна употреба овог агенса довела до статистички значајног повећања  $H_2S$  у серуму пацова са метаболичким синдромом, у односу на здраве, али и пацове са истим синдромом који нису били подвргнути терапији. Насупрот овим резултатима, ниво хомоцистеина био је значајно већи у МС групи, у поређењу са КТР и МС+ДАТС групама (График 38).



**График 38.** Ефекти третмана ДАТС-ом код пацова са МетС-ом на нивое (А)  $H_2S$  у серуму и (Б) хомоцистеина у серуму – Hcy. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД,  $n = 12$ , по групи. \*  $P < 0,05$  КТР vs. МС, #  $P < 0,05$  КТР vs. МС+ДАТС, §  $P < 0,05$  МС vs. МС+ДАТС.



#### 4.3.8. Ex vivo протокол: 90 минута ретроградне перфузије изолованог срца пацова

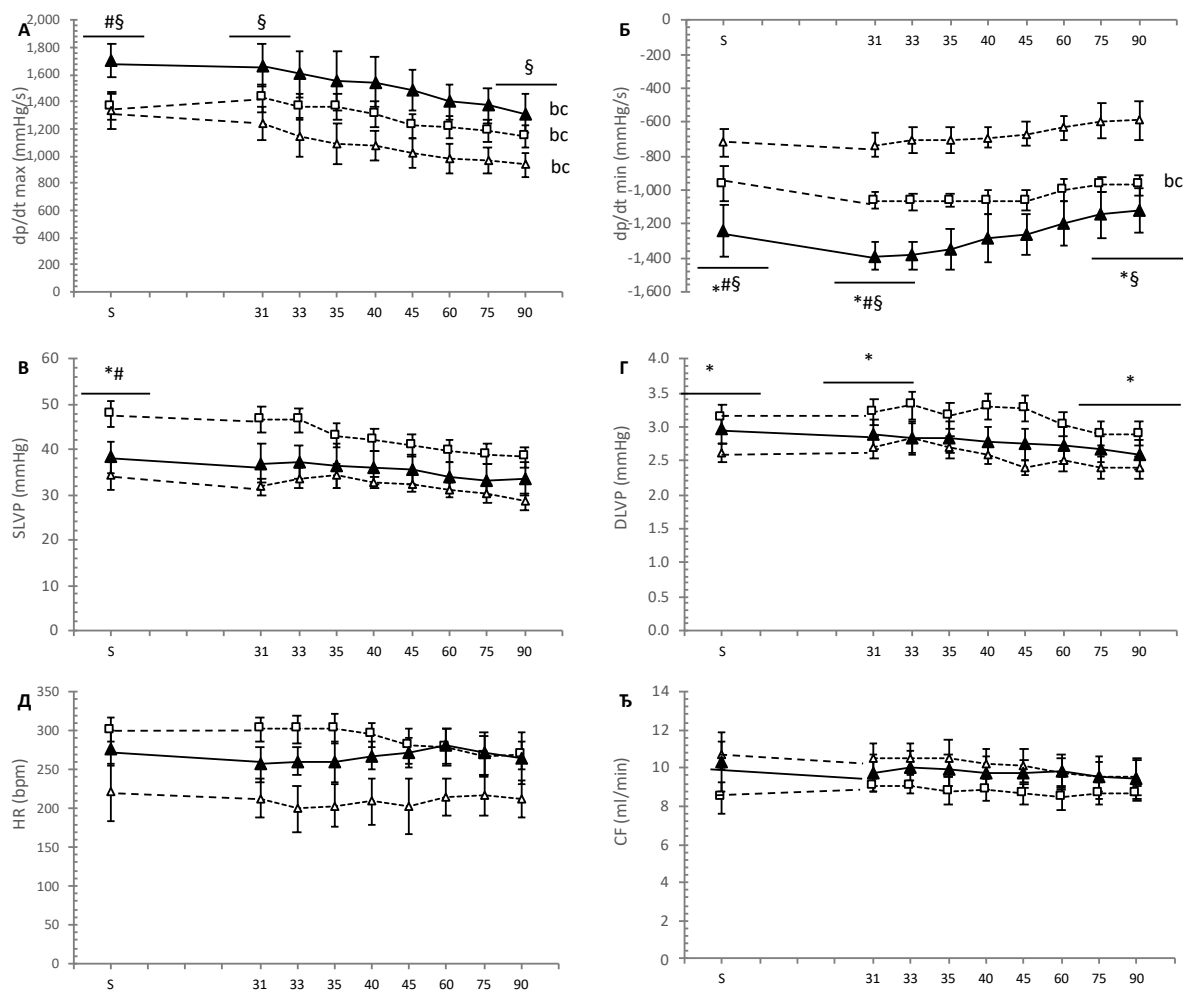
##### 4.3.8.1. Кардиодинамски параметри

Промене кардиодинамских параметара након периода стабилизације и током деведесетоминутне ретроградне перфузије изолованих срца пацова приказане су у **Табели 13**. Током ретроградне перфузије изолованог срца пацова са МетС-ом, забележен је значајан пад контрактилне функције, који се огледа кроз смањење вредности  $dp/dt$  max и  $dp/dt$  min, као и смањење SLVP. Код пацова са МетС-ом третираних ДАТС-ом, вредности  $dp/dt$  max (C vs. 90 и 31 vs. 90), као и SLVP (C vs. 90) биле су смањене.

**Табела 13.** Кардиодинамски параметри праћени током деведесетоминутне *ex vivo* ретроградне перфузије изолованог срца пацова (нетретирани пацови са МетС-ом - МС и третирани пацови са МетС-ом - МС+ДАТС). Стабилизација – С; 31. минут ретроградне перфузије – 31 и 90. минут ретроградне перфузије – 90. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД, n = 6, по групи. <sup>a</sup> P<0,05 C vs. 31; <sup>b</sup> P<0,05 C vs. 90; <sup>c</sup> P<0,05 31 vs. 90.

|         |    | dp/dt max (mmHg)                   | dp/dt min (mmHg)                   | SLVP (mmHg)                    |
|---------|----|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| МС      | C  | 1332,20 $\pm$ 132,88               | -718,39 $\pm$ 81,28                | 34,15 $\pm$ 3,11               |
|         | 31 | 1243,93 $\pm$ 124,92               | -733,65 $\pm$ 68,72                | 31,72 $\pm$ 1,98               |
|         | 90 | 935,96 $\pm$ 88,65 <sup>bc</sup>   | -591,52 $\pm$ 109,45 <sup>bc</sup> | 28,48 $\pm$ 1,87 <sup>bc</sup> |
| МС+ДАТС | C  | 1699,50 $\pm$ 122,95               | -1239,86 $\pm$ 151,78              | 38,38 $\pm$ 3,47               |
|         | 31 | 1664,80 $\pm$ 158,33               | -1387,63 $\pm$ 82,40               | 36,87 $\pm$ 4,34               |
|         | 90 | 1313,50 $\pm$ 148,10 <sup>bc</sup> | -1121,41 $\pm$ 133,41              | 33,40 $\pm$ 3,59 <sup>b</sup>  |
|         |    | DLVP (mmHg)                        | HR (bpm)                           | CF (ml/min)                    |
| МС      | C  | 2,62 $\pm$ 0,13                    | 220,78 $\pm$ 36,50                 | 10,67 $\pm$ 0,71               |
|         | 31 | 2,70 $\pm$ 0,16                    | 212,91 $\pm$ 25,34                 | 10,47 $\pm$ 0,85               |
|         | 90 | 2,40 $\pm$ 0,16                    | 211,62 $\pm$ 23,98                 | 9,50 $\pm$ 0,89                |
| МС+ДАТС | C  | 2,96 $\pm$ 0,21                    | 277,20 $\pm$ 22,25                 | 10,33 $\pm$ 1,54               |
|         | 31 | 2,88 $\pm$ 0,22                    | 256,62 $\pm$ 23,53                 | 9,73 $\pm$ 1,00                |
|         | 90 | 2,58 $\pm$ 0,22                    | 264,76 $\pm$ 32,84                 | 9,45 $\pm$ 1,07                |

Разлике између *ex vivo* праћених кардиодинамских параметара код нетретираних и третираних пацова са МетС-ом, приказане су на **Графику 39**. Код нетретираних пацова са МетС-ом, примећено је значајно смањење  $dp/dt \text{ min}$  (С, 31, 90), DLVP (С, 31, 90) и SLVP (С) у поређењу са КТР групом. Третман ДАТС-ом побољшао је контрактилну функцију миокарда ( $dp/dt \text{ max}$  и  $dp/dt \text{ min}$ ).



**График 39.** Ефекти третмана ДАТС-ом на (А) максималну стопу развоја притиска у левој комори –  $dp/dt \text{ max}$ , (Б) минималну стопу развоја притиска у левој комори –  $dp/dt \text{ min}$ , (В) систолни притисак у левој комори – SLVP, (Г) дијастолни притисак у левој комори – DLVP, (Д) фреквенцу срца – HR и (Е) коронарни проток – CF. Здрави пацови - КТР (---□---), нетретирани пацови са МетС-ом - МС (---△---) и третирани пацови са МетС-ом - МС+ДАТС (—▲—). Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n = 6, по групи. \* P < 0,05 КТР vs. МС, # P < 0,05 КТР vs. МС+ДАТС, § P < 0,05 МС vs. МС+ДАТС.

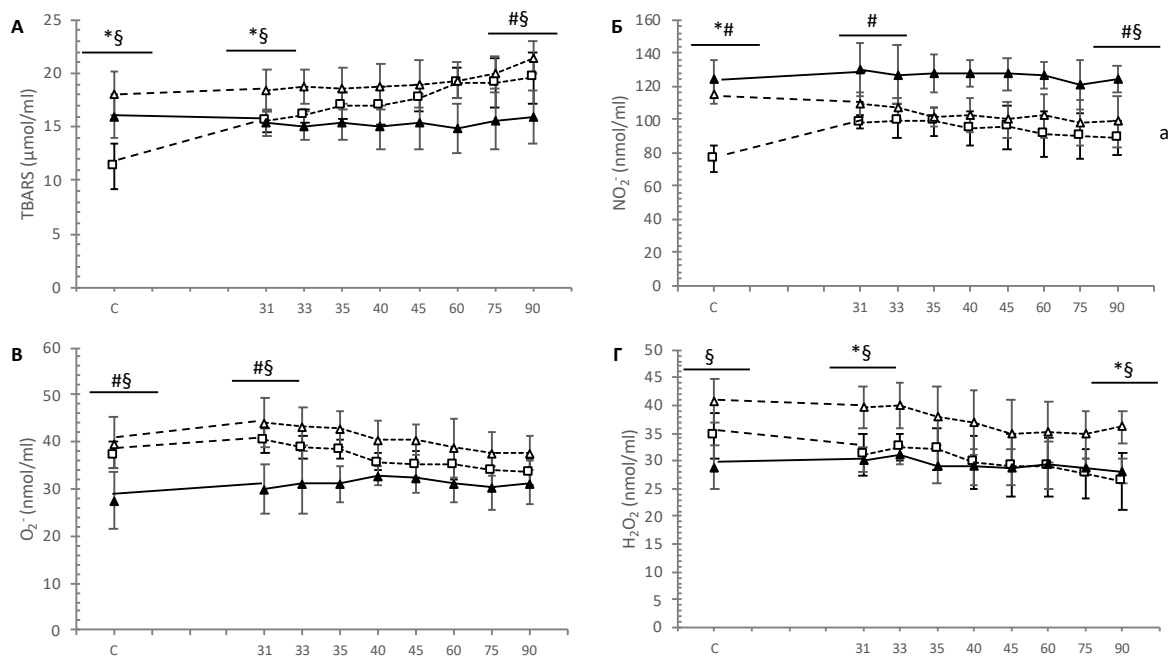
## 4.3.8.2. Прооксидациони параметри мерени у коронарном венском ефлуенту

Као што је приказано у **Табели 14**, вредности прооксидационих параметара који су мерени у коронарном венском ефлуенту изолованог срца пацова у МС и МС+ДАТС групама, нису се значајно мењали током периода ретроградне перфузије.

**Табела 14.** Прооксидациони параметри мерени у коронарном венском ефлуенту који је прикупљан током деведесетоминутне ретроградне перфузије изолованог срца пацова (нетретирани пацови са МетС-ом - МС и третирани пацови са МетС-ом - МС+ДАТС). Стабилизација – С; 31. минут ретроградне перфузије – 31 и 90. минут ретроградне перфузије – 90. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД, n = 6, по групи.

|             |    | TBARS<br>( $\mu\text{mol/ml}$ ) | $\text{NO}_2^-$<br>( $\text{nmol/ml}$ ) | $\text{O}_2^-$<br>( $\text{nmol/ml}$ ) | $\text{H}_2\text{O}_2$<br>( $\text{nmol/ml}$ ) |
|-------------|----|---------------------------------|---|--|--|
| МС          | С  | 18,15 $\pm$ 2,04                | 115,58 $\pm$ 6,09                       | 39,82 $\pm$ 5,42                       | 40,72 $\pm$ 3,92                               |
|             | 31 | 18,50 $\pm$ 1,86                | 109,33 $\pm$ 7,38                       | 44,00 $\pm$ 5,35                       | 39,67 $\pm$ 3,68                               |
|             | 90 | 21,47 $\pm$ 1,52                | 98,73 $\pm$ 15,69                       | 37,62 $\pm$ 3,76                       | 36,14 $\pm$ 2,93                               |
| МС+<br>ДАТС | С  | 16,01 $\pm$ 2,00                | 124,43 $\pm$ 11,80                      | 27,46 $\pm$ 5,95                       | 28,79 $\pm$ 3,98                               |
|             | 31 | 15,32 $\pm$ 1,20                | 129,81 $\pm$ 15,77                      | 29,99 $\pm$ 5,32                       | 30,10 $\pm$ 2,23                               |
|             | 90 | 15,92 $\pm$ 2,54                | 124,46 $\pm$ 7,81                       | 31,35 $\pm$ 4,68                       | 28,12 $\pm$ 2,33                               |

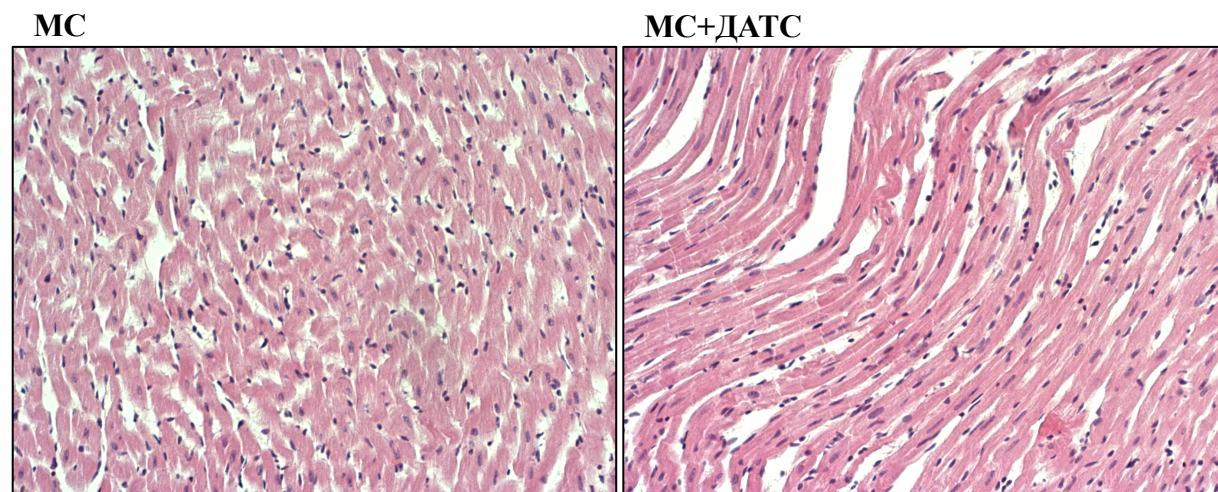
Разлике између нивоа праћених параметара оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту код здравих нетретираних (КТР), нетретираних пацова са МетС-ом (МС) и третираних пацова са МетС-ом (МС+ДАТС) приказане су на **Графику 40**. Значајно виши нивои TBARS и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> примећени су у МС групи у поређењу са КТР групом. Ниво O<sub>2</sub><sup>-</sup> био је значајно смањен, док је ниво NO<sub>2</sub><sup>-</sup> био значајно повећан у МС+ДАТС групи.



**График 40.** Ефекти третмана ДАТС-ом на (А) индекс липидне пероксидације – мерен као TBARS, (Б) нитрите – NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, (В) супероксид анјон радикал – O<sub>2</sub><sup>-</sup> и (Г) водоник пероксид – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Здрави, нетретирани пацови - КТР (---□---), нетретирани пацови са МетС-ом - МС (---△---) и третирани пацови са МетС-ом - МС+ДАТС (—▲—). Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n = 6, по групи. \* P<0,05 КТР vs. ДМ, # P<0,05 КТР vs. ДМ+ДАТС, § P<0,05 ДМ vs. ДМ+ДАТС.

## 4.3.8.3. Бојење срчаног ткива хематоксилин/еозин методом

Као што је приказано на **Слици 17**, на ткивима срца, пацова из МС групе може се уочити да су присутна некротична мишићна влакна, неорганизована и без јасно дефинисаних граница. Међутим, третман ДАТС-ом код пацова са МетС-ом, умањио је губитак миокардијалних влакана и миокардну хипертрофију.



**Слика 17.** Репрезентативни приказ обојеног ткива миокарда хематоксилин/еозин техником, срца која су претходно била подвргнута деведесетоминутној ретроградној перфузији (МС – нетретирани пацови са МетС-ом и МС+ДАТС – третирани пацови са МетС-ом), увећање 200 х; скала 2 mm.

4.3.9. *Ex vivo* протокол: 30 минута исхемије и 60 минута реперфузије

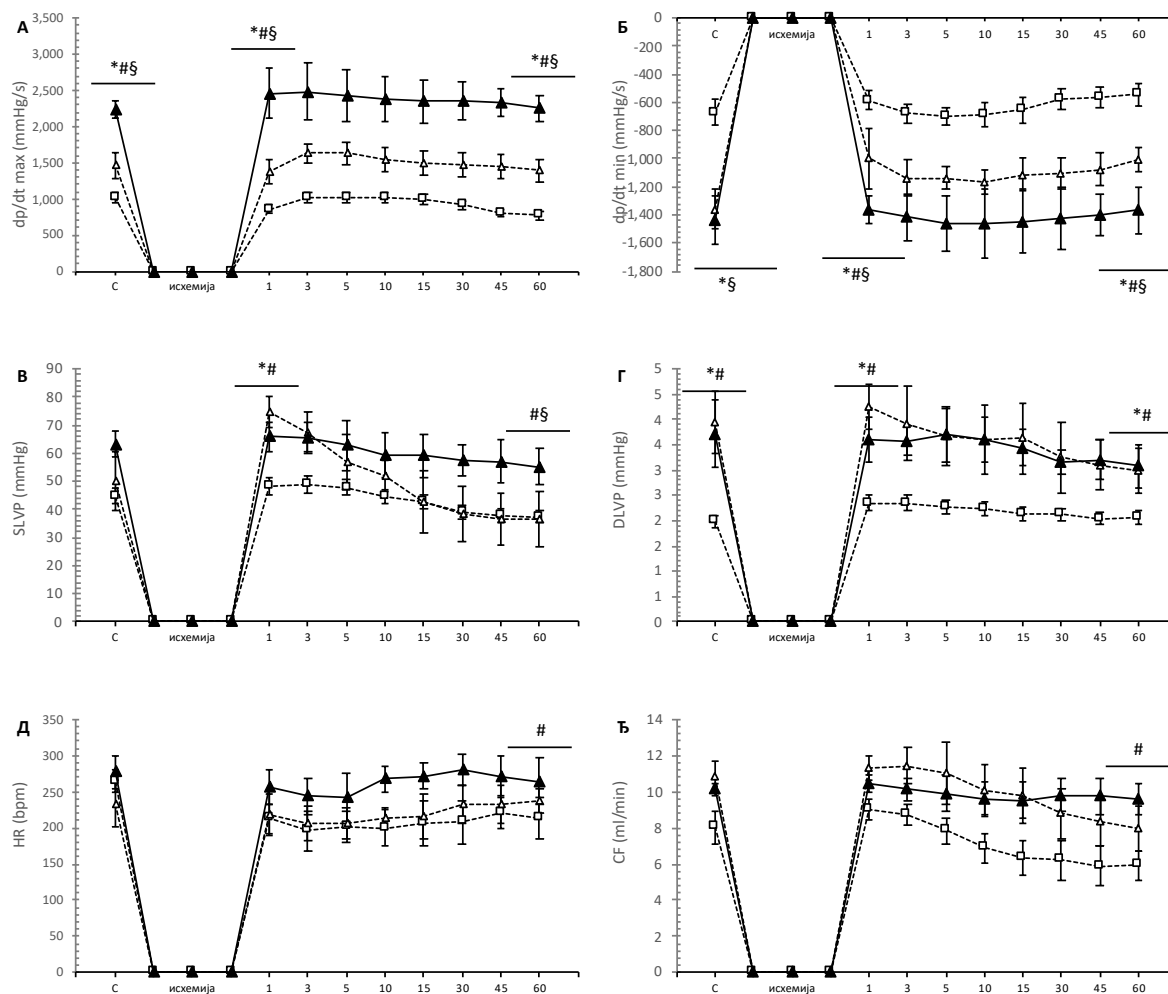
## 4.3.9.1. Кардиодинамски параметри

Промене кардиодинамских параметара током *ex vivo* индуковане И/Р повреде приказане су у **Табели 15**. У МС+И/Р групи, значајно је смањен ниво dp/dt max (С vs. 1 и С vs. 60), SLVP (С vs. 60 и 1 vs. 60), DLVP (1 vs. 60) и CF (С vs. 60 и 1 vs. 60). Тронеделјни третман ДАТС-ом спречио је да дође до промене у кардиодинамским параметрима током периода реперфузије.

**Табела 15.** Кардиодинамски параметри праћени током *ex vivo* индуковане И/Р повреде изолованог срца пацова (нетретирани пацови са МетС-ом – МС+И/Р и третирани пацови са МетС-ом – МС+ДАТС+И/Р). Стабилизација – С; 1. минут реперфузије – 1 и 60. минут реперфузије – 60. Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n = 6, по групи. <sup>a</sup> P<0,05 С vs. 31; <sup>b</sup> P<0,05 С vs. 90; <sup>c</sup> P<0,05 31 vs. 90.

|                      |    | dp/dt max (mmHg)         | dp/dt min (mmHg)              | SLVP (mmHg)                |
|----------------------|----|--------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| МС+<br>И/Р           | S  | 1465,33 ± 184,68         | -1356,88 ± 140,60             | 50,22 ± 10,39              |
|                      | 1  | 1376,77 ± 160,94         | -996,58 ± 214,09 <sup>a</sup> | 74,75 ± 5,34 <sup>a</sup>  |
|                      | 60 | 1392,07 ± 158,33         | -1007,55 ± 87,37 <sup>b</sup> | 36,68 ± 9,96 <sup>bc</sup> |
| МС+<br>ДАТС<br>+ И/Р | S  | 2237,68 ± 127,35         | -1436,66 ± 167,52             | 63,22 ± 4,47               |
|                      | 1  | 2462,40 ± 338,39         | -1364,61 ± 95,01              | 65,79 ± 5,05               |
|                      | 60 | 2254,32 ± 174,38         | -1367,86 ± 162,15             | 55,20 ± 6,46               |
|                      |    | DLVP (mmHg)              | HR (bpm)                      | CF (ml/min)                |
| МС+<br>И/Р           | S  | 3,95 ± 0,61              | 233,08 ± 31,85                | 10,87 ± 0,87               |
|                      | 1  | 4,25 ± 0,44              | 218,20 ± 29,45                | 11,30 ± 0,70               |
|                      | 60 | 2,98 ± 0,44 <sup>c</sup> | 236,28 ± 16,78                | 7,97 ± 1,24 <sup>bc</sup>  |
| МС+<br>ДАТС<br>+ И/Р | S  | 3,72 ± 0,68              | 277,20 ± 22,25                | 10,12 ± 0,33               |
|                      | 1  | 3,60 ± 0,45              | 256,62 ± 23,53                | 10,44 ± 0,48               |
|                      | 60 | 3,08 ± 0,43              | 264,76 ± 32,84                | 9,56 ± 0,86                |

Разлике у функцији миокарда након *ex vivo* индуковане И/Р повреде код нетретираних и третираних пацова са МетС-ом представљене су на **Графику 41**. Стопа промене притиска у левој комори ( $dp/dt$  max и  $dp/dt$  min, у свим тачкама од интереса) и притисак (SLVP и DLVP) били су значајно различити између група према следећем образцу  $MC+ДАТС+И/Р > И/Р > MC+И/Р$ . HR у последњем минути реперфузије, је била највећа у  $MC+ДАТС$  групи, а потом у  $КТР$  групи.



**График 41.** Ефекти третмана ДАТС-ом на *ex vivo* индуковану И/Р повреду миокарда пацова (А) максимална стопа развоја притиска у левој комори –  $dp/dt$  max, (Б) минимална стопа развоја притиска у левој комори –  $dp/dt$  min, (В) систолни притисак у левој комори – SLVP, (Г) дијастолни притисак у левој комори – DLVP, (Д) фреквенца срца – HR и (Ђ) коронарни проток – CF. Здрави, нетретирани пацови - И/Р (---□---), нетретирани пацови са МетС-ом - MC (---△---) и третирани пацови са МетС-ом -  $MC+ДАТС$  (—▲—). Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД,  $n = 6$ , по групи. \*  $P < 0,05$  И/Р vs.  $MC+И/Р$ , #  $P < 0,05$  И/Р vs.  $MC+ДАТС+И/Р$ , §  $P < 0,05$   $MC+И/Р$  vs.  $MC+ДАТС+И/Р$ .

## 4.3.9.2. Прооксидациони параметри мерени у коронарном венском ефлуенту

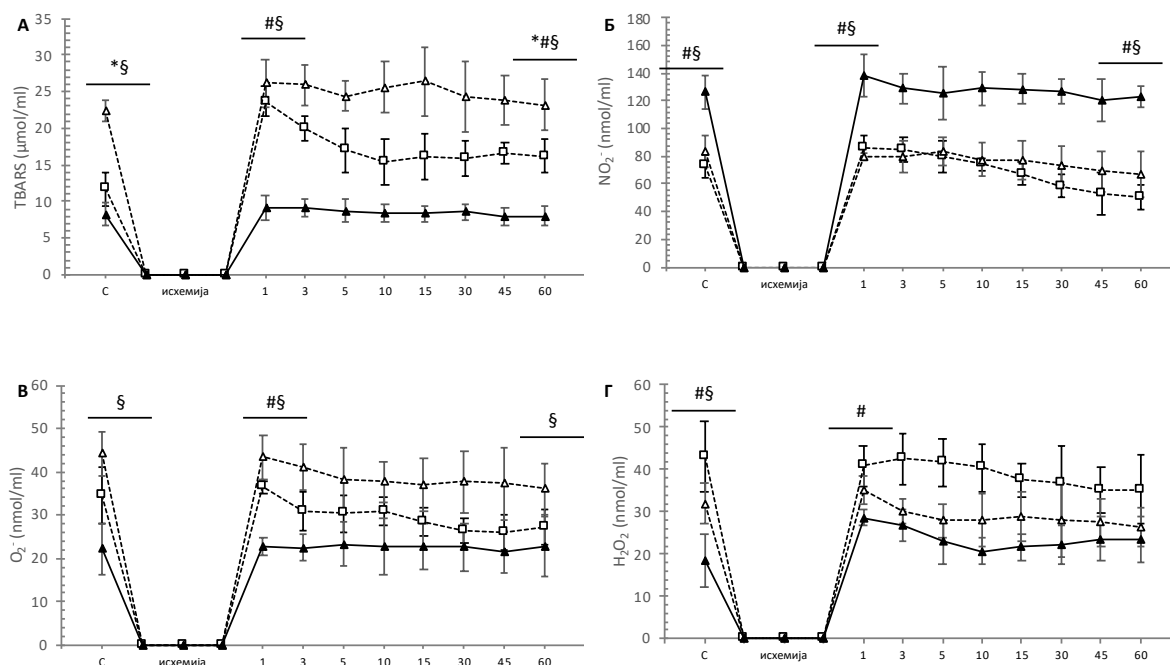
Као што је приказано у **Табели 16**, прооксидациони маркери мерени у коронарном венском ефлуенту изолованог срца пацова у МС+И/Р и МС+ДАТС+И/Р групи нису се значајно мењали током *ex vivo* индуковане И/Р повреде.

**Табела 16.** Прооксидациони параметри мерени у коронарном венском ефлуенту који је прикупљен у стабилизацији и током реперфузије изолованог срца пацова (нетретирани пацови са МетС-ом - МС+И/Р и третирани пацови са МетС-ом - МС+ДАТС+И/Р). Стабилизација – С; 1. минут реперфузије – 1 и 60. минут реперфузије – 60. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД, n = 6, по групи. <sup>a</sup>P<0,05 С vs. 31; <sup>b</sup> P<0,05 С vs. 90; <sup>c</sup> P<0,05 1 vs. 60.

|                      |    | TBARS<br>( $\mu\text{mol/ml}$ ) | $\text{NO}_2^-$<br>( $\text{nmol/ml}$ ) | $\text{O}_2^-$<br>( $\text{nmol/ml}$ ) | $\text{H}_2\text{O}_2$<br>( $\text{nmol/ml}$ ) |
|----------------------|----|---------------------------------|---|--|--|
| МС+<br>И/Р           | С  | 22,33 $\pm$ 1,45                | 83,32 $\pm$ 11,74                       | 44,15 $\pm$ 5,10                       | 31,96 $\pm$ 4,69                               |
|                      | 1  | 26,16 $\pm$ 3,25                | 80,07 $\pm$ 2,50                        | 43,50 $\pm$ 5,07                       | 35,02 $\pm$ 3,34                               |
|                      | 60 | 23,19 $\pm$ 3,45                | 66,53 $\pm$ 16,71                       | 36,12 $\pm$ 5,88                       | 26,35 $\pm$ 4,63                               |
| МС+<br>ДАТС<br>+ И/Р | С  | 8,29 $\pm$ 1,54                 | 126,24 $\pm$ 12,13                      | 22,11 $\pm$ 5,93                       | 18,61 $\pm$ 6,25                               |
|                      | 1  | 9,10 $\pm$ 1,71                 | 138,24 $\pm$ 14,92                      | 22,32 $\pm$ 2,06                       | 28,63 $\pm$ 1,79                               |
|                      | 60 | 7,94 $\pm$ 1,32                 | 123,06 $\pm$ 7,84                       | 19,73 $\pm$ 6,86                       | 23,40 $\pm$ 5,48                               |



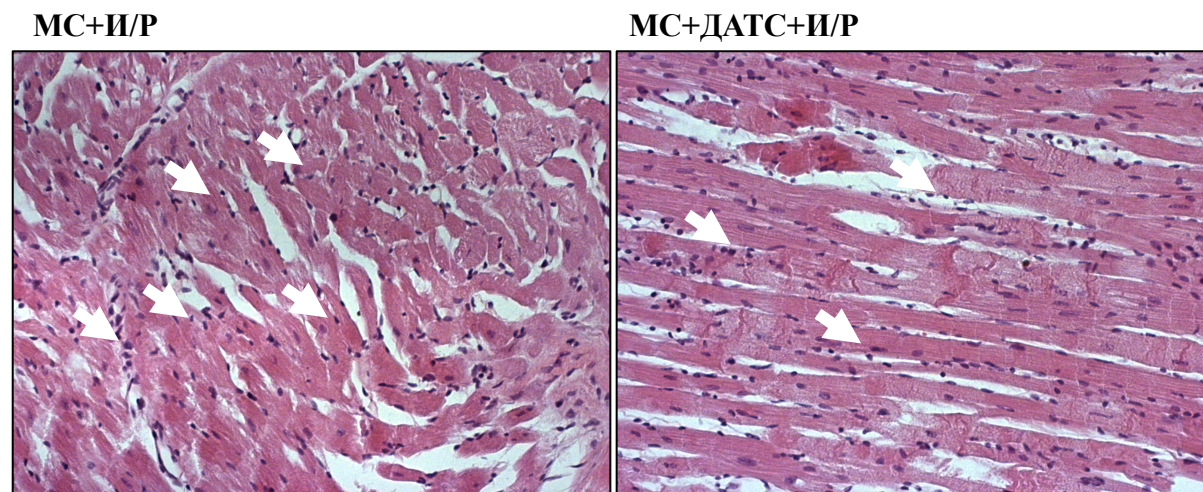
Као што је приказано на **Графику 42**, нетретирани МетС пацови су имали значајно повећане вредности TBARS и  $O_2^-$ , док је третман ДАТС-ом значајно смањио нивое TBARS,  $O_2^-$  и  $H_2O_2$ , и повећао ниво  $NO_2^-$ .



**График 42.** Ефекти третмана ДАТС-ом на *ex vivo* индуковану И/Р повреду изолованог срца пацова (А) индекс липидне пероксидације – мерен као TBARS, (Б) нитрити –  $NO_2^-$ , (В) супероксид анјон радикал –  $O_2^-$  и (Г) водоник пероксид –  $H_2O_2$ . Здрави, нетретирани пацови - И/Р (---□---), нетретирани пацови са МетС-ом - МС+И/Р (---△---) и третирали пацови са МетС-ом - МС+ДАТС+И/Р (—▲—). Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД, n = 6, по групи. \* P<0,05 И/Р vs. МС+И/Р, # P<0,05 И/Р vs. МС+ДАТС+И/Р, § P<0,05 МС+И/Р vs. МС+ДАТС+И/Р.

## 4.3.9.3. Бојење срчаног ткива хематоксилин/еозин методом

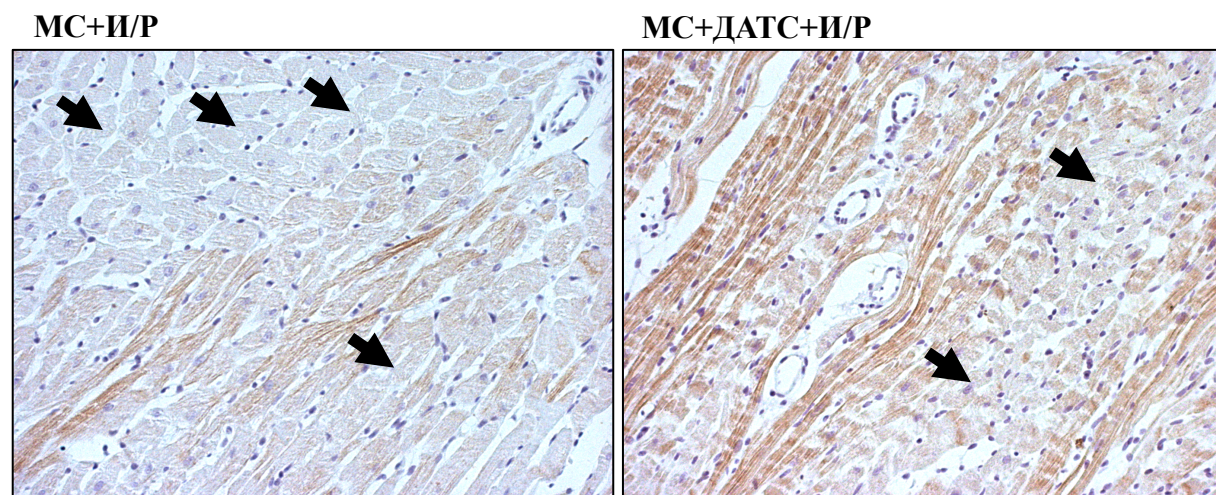
Као што је приказано на **Слици 18**, у МС+И/Р групи, уочава се едем, отицање ћелија и широка зона мрљасте и конфлуентне некрозе уз одвајање мишићних влакана. У групи пацова који су третирани ДАТС-ом присутан је знатно блажи едем и смањена површина захваћена некрозом.



**Слика 18.** Репрезентативни приказ обојеног ткива миокарда хематоксилин/еозин техником, срца која су претходно била подвргнута И/Р повреди (МС+И/Р – нетретирани пацови са МетС-ом и МС+ДАТС+И/Р – третирани пацови са МетС-ом), увећање 200 х; скала 2 mm.

## 4.3.9.4. Бојење тропонина Т у ткиву миокарда

Као што је приказано на Слици 19, у МС+И/Р групи, уочава се јасан губитак бојења сТnТ уз врло мало позитивне (смеђе) боје, док се нешто већа површина смеђег обојења уочава у МС+ДАТС+И/Р групи.

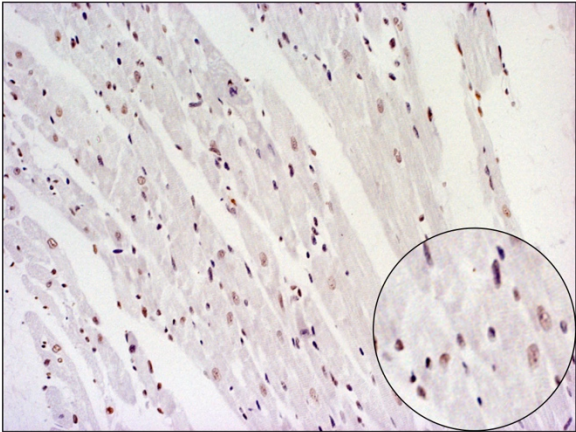


**Слика 19.** Репрезентативни приказ обојеног сТnТ у ткиву срца пацова која су претходно била подвргнута *ex vivo* изазваној И/Р повреди (МС+И/Р – нетретирани пацови са MetС-ом и МС+ДАТС+И/Р – третирани пацови са MetС-ом), увећање 200 х; скала 2 mm.

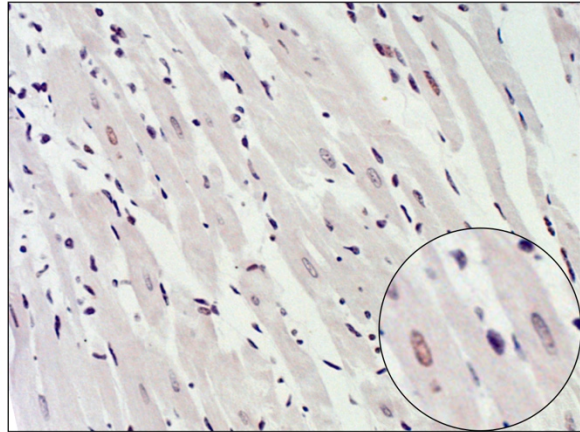
## 4.3.9.5. ТУНЕЛ тест

Учесталост кардиомиоцита са ТУНЕЛ позитивним једром код пацова са метаболичким синдромом, смањена је код оних који су током три недеље конзумирали ДАТС (Слика 20).

МС+И/Р



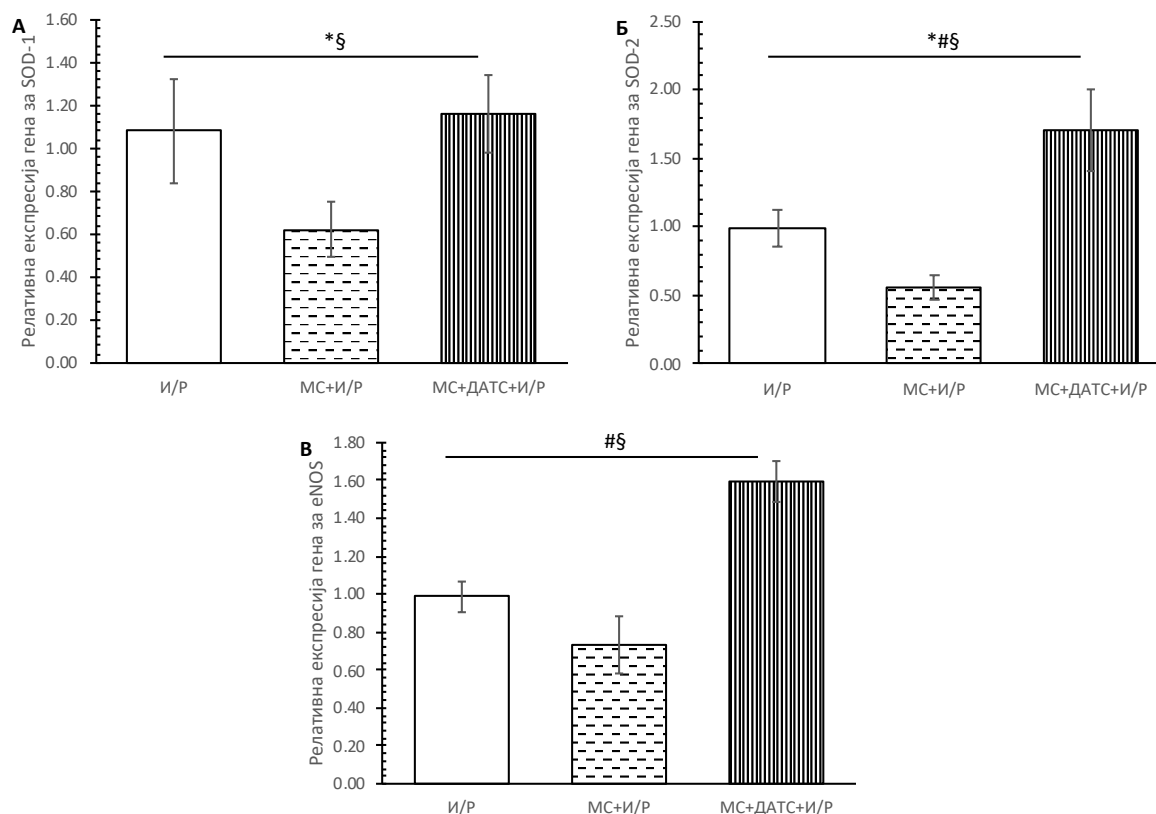
МС+ДАТС+И/Р



**Слика 20.** Репрезентативни приказ заступљености миоцита са ТУНЕЛ позитивним једром у ткиву срца пацова која су претходно била подвргнута *ex vivo* изазваној И/Р повреди (МС+И/Р – нетретирани пацови са МетС-ом и МС+ДАТС+И/Р – третирани пацови са МетС-ом), увећање 200 х и 400 х.

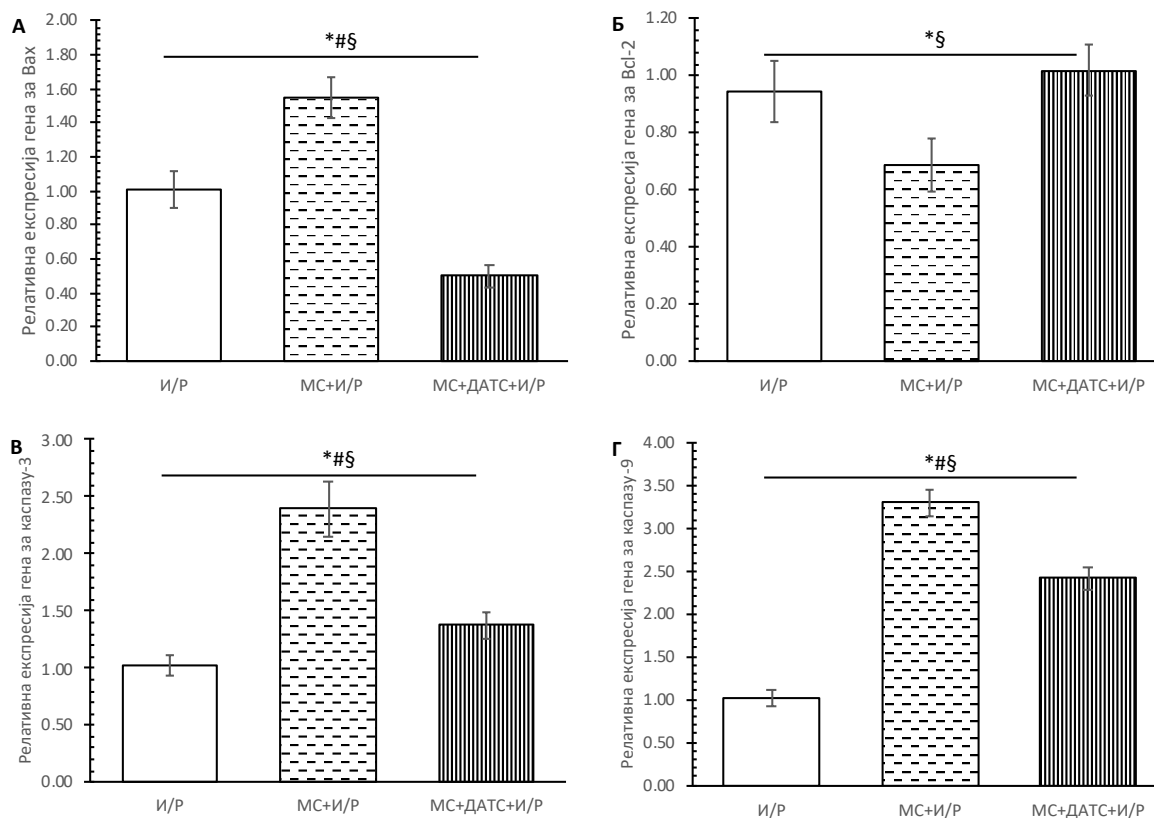
#### 4.3.9.6. Релативна експресија антиоксидационих, (анти)апоптотских и (анти)инфламацијских гена у левој комори срца

Релативна експресија гена за eNOS, SOD-1 и SOD-2 статистички значајно је смањена у МС+И/Р групи, у поређењу са И/Р групом. Са друге стране, третман ДАТС-ом значајно је утицао на повећање релативне експресије наведених гена (**График 43**).



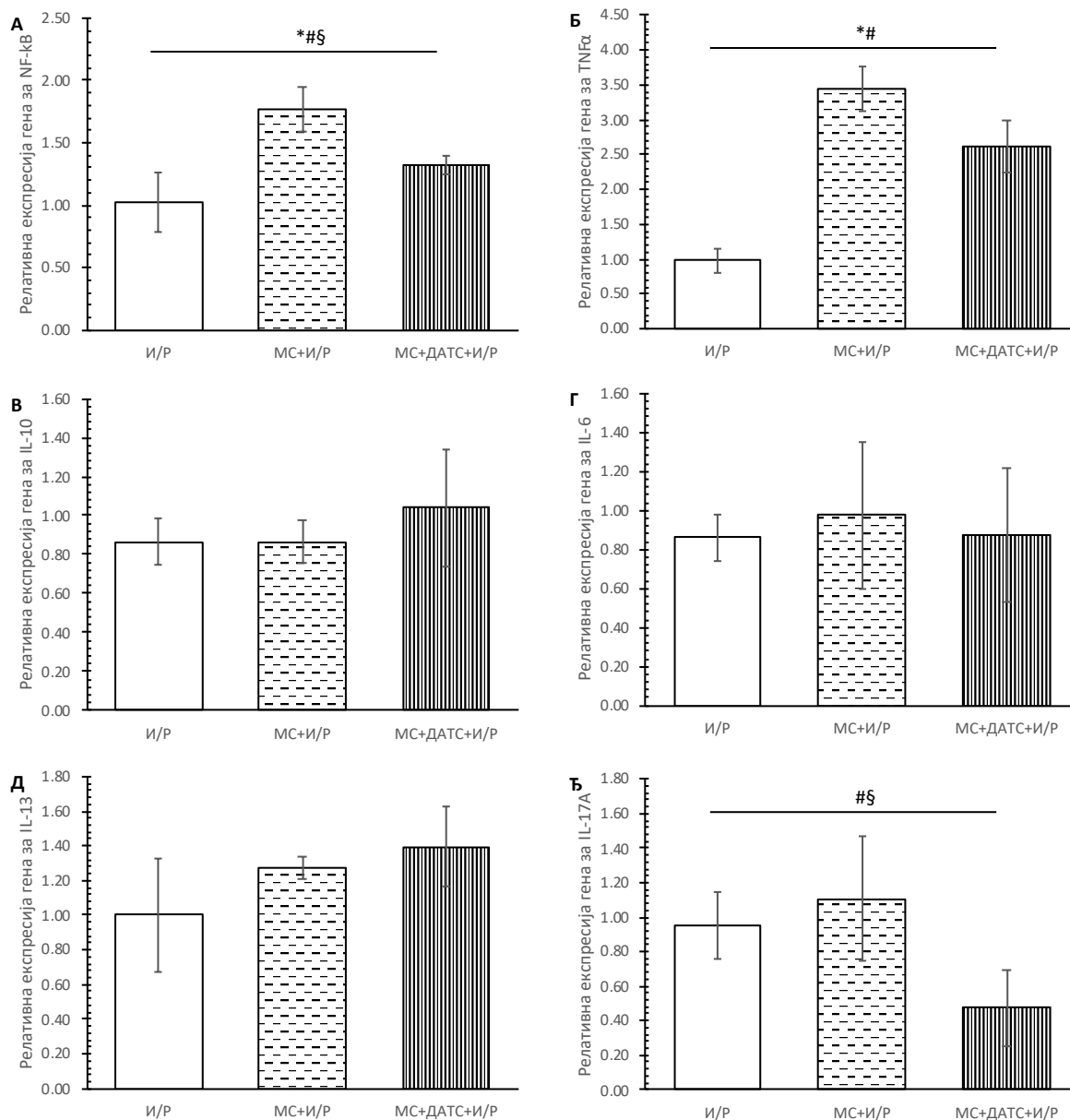
**График 43.** Ефекти третмана ДАТС-ом на релативну експресију антиоксидационих гена за (А) супероксид дисмутазу 1 – SOD-1, (Б) супероксид дисмутазу 2 – SOD-2, (В) ендотелну азот моноксид синтазу – eNOS, у левој комори пацова са МетС-ом након *ex vivo* изазване И/Р повреде. И/Р - здрави, нетретирани пацови, МС+И/Р - нетретирани пацови са МетС-ом и МС+ДАТС+И/Р - третирани пацови са МетС-ом. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД,  $n = 6$ , по групи. \*  $P < 0,05$  И/Р vs. МС+И/Р, #  $P < 0,05$  И/Р vs. МС+ДАТС+И/Р, §  $P < 0,05$  МС+И/Р vs. МС+ДАТС+И/Р.

Релативна експресија гена за Вах, каспазу-3 и каспазу-9 значајно је повећана, док је релативна експресија гена за Bcl-2 значајно смањена у МС+И/Р у поређењу са И/Р групом. Са друге стране, третман ДАТС-ом значајно је смањио релативну експресију гена за Вах и мерене каспазе, а повећао релативну експресију гена за Bcl-2 (График 44).



**График 44.** Ефекти третмана ДАТС-ом на релативну експресију (анти)апоптотских гена за (А) Bcl-2, (Б) Вах, (В) каспазу-3 и (Г) каспазу-9, у левој комори пацова са MetC-ом након *ex vivo* изазване И/Р повреде. И/Р - здрави, нетретирани пацови, МС+И/Р - нетретирани пацови са MetC-ом и МС+ДАТС+И/Р - третирани пацови са MetC-ом. Вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  СД,  $n = 6$ , по групи. \*  $P < 0,05$  И/Р vs. МС+И/Р, #  $P < 0,05$  И/Р vs. МС+ДАТС+И/Р, §  $P < 0,05$  МС+И/Р vs. МС+ДАТС+И/Р.

Релативна експресија гена за NF-κB и TNF-α значајно је повећана у МС+И/Р групи у поређењу са И/Р групом, док је третман ДАТС-ом значајно смањио релативну експресију гена за NF-κB и IL-17A (График 45).



**График 45.** Ефекти третмана ДАТС-ом на релативну експресију (анти)инфламацијских гена за (А) NF-κB, (Б) TNF-α, (В) IL-10, (Г) IL-6, (Д) IL-13 и (Е) IL-17A, у левој комори пацова са МетС-ом након *ex vivo* изазване И/Р повреде. И/Р - здрави, нетретирани пацови, МС+И/Р - нетретирани пацови са МетС-ом и МС+ДАТС+И/Р - третирани пацови са МетС-ом. Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n = 6, по групи. \* P<0,05 И/Р vs. МС+И/Р, # P<0,05 И/Р vs. МС+ДАТС+И/Р, § P<0,05 МС+И/Р vs. МС+ДАТС+И/Р.

**V**

**ДИСКУСИЈА**



## 5. ДИСКУСИЈА

Основни циљ ове студије био је да испита кардиопротективне ефекте ДАТС-а на експерименталном моделу И/Р повреде изолованог срца пацова. Имајући у виду да су кардиоваскуларне компликације веома честе код метаболичких обољења, посебна пажња усмерена је ка проучавању, опису и поређењу ефеката ДАТС-а код пацова са дијабетесом и метаболичким синдромом. Иако је ДАТС, као донор  $H_2S$ , описан пре неколико деценија, многи аспекти његових ефеката на кардиоваскуларни систем још увек нису познати и у потпуности објашњени.

У овој студији, кардиопротективни ефекти ДАТС-а су испитивани помоћу широког спектра приступа, од биохемијских анализа до *in vivo* испитивања на пацовима, као и *ex vivo* испитивања на изолованом срцу и патохистолошкој анализи срчаног ткива. Да би се комплетирао слика о улози  $H_2S$  и ДАТС-а као његовог донора, у физиологији и патофизиологији миокарда, мерен је крвни притисак и рађен ултразвук, на основу којих је *in vivo* праћена функција срца. Такође, помоћу *Langendorff*-овог апарата, кроз функцију леве коморе, која је морфолошки и функционално доминантнија срчана шупљина, *ex vivo* је праћена функција миокарда. Поред тога, на *Langendorff*-овом апарату индукована је и И/Р повреда и посматрана срчана функција током периода реперфузије. На овај начин испитан је и проучен ДАТС, као потенцијални прекондиционарајући агенс. Још важније, као што је раније речено, на основу резултата ове студије предложен је и потенцијални механизам којим ДАТС индукује кардиопротективне ефекте. У ту сврху, најпре су мерени нивои  $H_2S$  и хомоцистеина у серуму, док су параметри оксидационог стреса одређивани у плазми, еритроцитима, али и коронарном венском ефлуенту изолованог срца пацова. Такође, ткиво миокарда је бојено хематоксилин/еозин методом и тропонином, док је у срчаном ткиву леве коморе одређивана релативна експресија антиоксидационих, (анти)апоптотских и (анти)инфламацијских гена, као и учесталост кардиомиоцита са ТУНЕЛ позитивним једром.

Најпре су код здравих пацова третираних ДАТС-ом примећени позитивни функционални ефекти на срцу, који су потом и потврђени мерењем антиоксидационих, антиинфламацијских и антиапоптотских параметара. Осим тога, показано је и да ДАТС не утиче на ниво липида, глукозе ни инсулина код здравих пацова. На основу опажених

резултата и литературних података који указују да  $H_2S$  утиче на функцију и повреду бета ћелија панкреаса, која је у основи патогенезе дијабетеса тип 1, били смо заинтересовани за испитивање ефеката ДАТС-а на пацове са Т1ДМ. У ту сврху, сва наведена истраживања су спроведена и на пацовима са Т1ДМ. У серији експеримената примећени су антидијабетски ефекти ДАТС-а и још важније, потврђени су кардиопротективни ефекти, иако су пацови са дијабетесом имали лошију функцију срца. Имајући у виду све добијене резултате, желели смо испитати ефекте ДАТС-а и на комплексније обољење које укључује групу патофизиолошких абнормалности, као што је метаболички синдром. Према нашим сазнањима, као и према доступној литератури ова студија је прва која је испитивала ефекте ДАТС-а на метаболички синдром. Такође, и у овом делу студије, добијени су занимљиви резултати који су помогли у стварању комплетне слике о кардиопротективној улози ДАТС-а.

Важно је напоменути да смо све експерименталне моделе болести (дијабетес и метаболички синдром) индуковали самостално за потребе ове студије, методологијом која је заснована на добро познатим и више пута потврђеним литературним подацима.

Ради једноставнијег праћења, одељак дискусије подељен је у три основна дела, као и одељак резултата, тако да се разликују: ефекти ДАТС-а на здраве пацове, пацове са дијабетесом и пацове са метаболичким синдромом. Док је наредни део (поглавље 5.4.) базиран на дискутовању подударности и разлика у ефектима ДАТС-а код здравих, пацова са дијабетесом и пацова са метаболичким синдромом. Анализа добијених резултата и поређење са претходним студијама детаљно су описани и објашњени у наставку.

## 5.1. ЕФЕКТИ ДИАЛИЛ ТРИСУЛФИДА НА ЗДРАВЕ ПАЦОВЕ

### 5.1.1. Ефекти хроничног третмана ДАТС-ом на карактеристике пацова и биохемијске параметре (Безбедносни аспекти третмана ДАТС-ом)

Током тронедељног третмана ДАТС-ом, мерени су и праћени основни, физиолошки параметри као што су унос воде и хране, телесна тежина и ниво глукозе. ДАТС није утицао на унос воде или хране код здравих пацова, одакле је изведен закључак да ДАТС не утиче на апетит, што је потврђено и непромењеном телесном тежином (**График 1**). Сви ови резултати, као и непромењени ниво глукозе (**График 1**) и липидних параметара (**График 3**) у крви, указују да је ДАТС највероватније безбедан за употребу. Поред тога, током ОГТ теста мерени су нивои инсулина и глукозе. Иако овај тест прати реакцију тела на глукозу и обично се користи за испитивање Т2ДМ, скоро константни нивои глукозе (**График 4**) и инсулина (**График 5**) код здравих пацова такође доприносе претходним резултатима, на основу којих се може рећи да се ДАТС добро подноси.

Алитридијум (лат. *Allitridium*, у чијем саставу је процентуално најзаступљенији ДАТС) је још пре скоро 30 година у студији спроведеној у Кини описан као изузетно безбедан агенс (198). Са друге стране, алицин је описан као главни иритант у сировом белом луку, док су хидрофобне супстанце (међу којима је и ДАТС) изоловане из алицина, токсичније од хидрофилних једињења (199). Током протеклих деценија, многе студије на животињама и људима су проучавале безбедност белог лука и његових деривата. У студијама које су испитивале ефекте сировог белог лука код људи, 15 g током 25 дана или 10 g током 8 недеља, нису забележени никакви нежељени ефекти (200, 201). Иако америчка агенција за храну и лекове сматра да је бели лук безбедан (енгл. *generally regarded as safe, GRAS*), као и са свим биолошки активним супстанцама, постоје одређене мере предострожности које се морају поштовати да би се смањио ризик од нежељених ефеката. Приликом конзумирања белог лука, због могућих интеракција, мора се водити рачуна о лековима који се користе, као и о количини конзумираног белог лука. Такође, значајно је напоменути да се његова употреба не препоручује пацијентима који су на терапији инхибиторима протеаза или на антикоагулатној терапији. У

комбинацији са антикоагулантним лековима, бели лук може да утиче на време згрушавања крви (202), док у комбинацији са инхибиторима протеаза може изазвати гастроинтестиналну токсичност (203). Због ових нежељених ефеката, пацијенти треба да избегавају бели лук и пре операција (202, 203). Поред тога, бели лук може изазвати нежељене ефекте као што су пецкање, дијареја, гастроинтестинална нелагодност и иритација слузокоже (204), а такође су примећене различите алергије (астма, контактни дерматитис) код радника изложених прашина и праху белог лука (205, 206).

Ни у једном научном раду није темељно тестиран безбедносни профил ДАТС-а. Иако се на основу резултата добијених у овој студији може рећи да се ДАТС добро толерише и подноси, потребна су даља истраживања како би се испитале све специфичности везане за његову безбедност. Такође, посебну пажњу треба посветити интеракцијама ДАТС-а са лековима, храном и витаминима.

### ***5.1.2. Ефекти хроничног третмана ДАТС-ом на нивое водоник сулфида и хомоцистеина (ДАТС као донор водоник сулфида)***

Након тронедељног третмана ДАТС-ом, мерени су нивои  $H_2S$  и хомоцистеина у серуму здравих пацова. Серумски ниво хомоцистеина није се променио у групи пацова третираних ДАТС-ом, док је ниво  $H_2S$  статистички значајно повишен (**График 9**).

Сматра се да су заштитни ефекти ДАТС-а на кардиоваскуларни систем заправо под утицајем продукције  $H_2S$  која је зависна од еритроцита (61). ДАТС полако ослобађа  $H_2S$  у хомогенату срца и инхибира митохондријално дисање и одржава концентрације  $H_2S$  на физиолошким, ниским нивоима током дужег временског периода. У појединим радовима наводи се да су главна ограничења ДАТС-а, као донора  $H_2S$ , једноставност његове структуре, која условљава релативно брзо ослобађање овог гасотрансмитера, што директно утиче и на његову елиминацију (207).

Резултати наше студије потврђују да је ДАТС донор  $H_2S$ , док непромењени нивои хомоцистеина указују да ДАТС не утиче на физиолошке вредности хомоцистеина код здравих пацова. Као непротеинска аминокиселина која садржи тиол, хомоцистеин се формира током метаболизма есенцијалне аминокиселине, метионин и такође се издваја

као независни фактор ризика за КВБ. У физиолошким условима, хомоцистеин се метаболише како би произвео цистеин, који је супстрат CBS и CSE за генерисање ендогеног водоник сулфида (207). То би значило да у нашој студији, услед метаболисања хомоцистеина, његов ниво остаје непромењен, највероватније као последица повећања  $H_2S$ .

### ***5.1.3. Ефекти хроничног третмана ДАТС-ом на оксидациони статус (Антиоксидациони профил ДАТС-а код здравих пацова)***

Након хроничног третмана ДАТС-ом, код здравих пацова примећено је значајно смањење концентрација TBARS и  $O_2^-$ , као и повећање  $NO_2^-$  и свих мерених антиоксидационих параметара (**Графици 7 и 8**).

Повећана концентрација  $NO_2^-$ , заједно са смањеном липидном пероксидацијом и смањеном концентрацијом супероксид анјон радикала, вероватно је један од могућих разлога за очуван коронарни вазодилататорни одговор здравих пацова који су третирани ДАТС-ом. Претходно је показано да  $H_2S$  активира eNOS повећавајући фосфорилацију eNOS на серотонину у положају 1177 (208). ДАТС највероватније активира eNOS истим механизмом као што то чини и  $H_2S$ . Такође, показано је да стент обложен ДАТС-ом побољшава ендотелну функцију у коронарном систему, повећавајући експресију eNOS (209). Са друге стране, непромењене вредности  $H_2O_2$  вероватно су последица повећања активности CAT и SOD, које су одговорне за његову разградњу на воду и кисеоник (210).

У раније објављеним студијама показано је да ДАТС, као и друга сумпорна једињења и бели лук, индукује различите биолошке ефекте путем повећања антиоксидационог капацитета (211, 212). Позитиван утицај ДАТС-а на антиоксидационе параметре у нашој студији је у корелацији са претходним студијама, које такође наводе да ДАТС поседује значајан антиоксидациони потенцијал. Са друге стране, у неколико студија показано је да ДАС, такође полисулфид изолован из белог лука, не изазива исте, већ може довести и до супротних ефеката (негативан утицај на антиоксидационе ензиме) (213, 214). Међутим, ови резултати су донекле логични и очекивани, јер је ДАТС

потентнији у модулирању фазе II антиоксидационих ензима од других органосумпорних једињења изолованих из белог лука (215).

GSH игра важну улогу у јетри у погледу антиоксидационих ефеката, као и у метаболизму лекова, а уз то промовише и смањење оштећења и боље преживљавање упркос повећаном оксидационом стресу током инфаркта миокарда. *Wi* и сарадници су показали да су пацови храњени ДАТС-ом, у крви имали значајно већи садржај GSH (84%) у односу на пацове који су храњени уљем белог лука (50%), ДАДС-ом (47%) или ДАС-ом (2%) (215).

Наши резултати указују на то да смањење кисеоничних врста и повећање антиоксидационих параметара код пацова третираних ДАТС-ом, може бити повезано са његовом способношћу да спречи повећање оксидационог стреса и пад активности антиоксидационих параметара, чиме може помоћи у лечењу многих обољења.

#### **5.1.4. Ефекти хроничног третмана ДАТС-ом на срчану функцију (Кардиопротективни профил ДАТС-а код здравих пацова)**

У овом делу студије, испитивани су ефекти ДАТС-а на миокард. У ту сврху, након тронедељне употребе ДАТС-а, најпре је *in vivo* мерена срчана функција помоћу ултразвука. Добијени резултати показују да ДАТС има улогу у очувању срчане функције јер је побољшао IVSd и FS код здравих пацова (**Слика 6, Табела 2**). Главна предност ДАТС-а је значајно повећање FS што доводи до побољшања систолне функције и контрактилности миокарда код здравих пацова. Све добијене вредности су у складу са претходно наведеним базалним ехокардиографским вредностима за одрасле мужјаче пацова (216). Иако се зна да ДАТС индукује вазодилатацију (217), након 3 недеље конзумације код здравих пацова, крвни притисак и срчана фреквенца су били непромењени (**Фигура 11**). Другим речима, хронична употреба ДАТС-а не утиче на крвни притисак и срчану фреквенцу код нормотензивних пацова.

Да би се детаљно испитали ефекти ДАТС-а на миокард, након хроничне примене изоловано је срце и праћене су промене кардиодинамских параметара током деведесетоминутне ретроградне перфузије срца. Већина кардиодинамских параметара у

обе групе (КТР и ДАТС) била је константна и без значајних промена током периода ретроградне перфузије (Табела 3). Упоредјујући вредности између група, примећено је повећање вредности  $dp/dt$  max и смањење вредности (негативне вредности)  $dp/dt$  min код пацова који су третирани ДАТС-ом (График 10). Ови параметри указују на очување систолне функције и контрактилне способности леве коморе ( $dp/dt$  max) и очување дијастолне функције и релаксационе способности леве коморе ( $dp/dt$  min). Поред тога, коронарни проток је повећан код пацова који су храњени ДАТС-ом, што је у складу са повећаним нивоом  $NO_2^-$  у овој, али и у другим студијама (208).

Током ретроградне перфузије на *Langendorff*-овом апарату, прикупљан је коронарни венски ефлуент у коме су мерени параметри оксидационог стреса. У КТР групи током деведесетоминутне перфузије срца уочено је значајно смањење TBARS и  $NO_2^-$  (Табела 4). Поређењем КТР и ДАТС групе, примећено је значајно смањење нивоа  $O_2^-$  и  $H_2O_2$  у ДАТС групи (График 11). Са друге стране, у периоду стабилизације нивои  $NO_2^-$  су повећани. Ови резултати су у складу са претходно описаним резултатима системског оксидационог стреса, као и са доступним подацима из литературе (209). ДАТС не само да смањује реактивне кисеоничне врсте у плазми, већ их смањује и у коронарном венском ефлуенту, а самим тим вероватно и у срчаном ткиву.

Имајући у виду све до сада наведене резултате и да је у обе групе срчано ткиво било уобичајене морфологије (Слика 7), као и да се однос између масе срца и телесне тежине није разликовао између група (График 2), може се закључити да ДАТС није кардиотоксичан и да позитивно утиче на миокард и читав срчани циклус. Такође, ови резултати подржавају ранији закључак да је ДАТС сигуран и нетоксичан агенс.

#### ***5.1.5. Ефекти хроничног третмана ДАТС-ом на ex vivo индуковану И/Р повреду изолованог срца пацова (ДАТС као прекодиционирајући агенс код здравих пацова)***

Акутни инфаркт миокарда је водећи узрок морбидитета и морталитета широм света, чак и код пацијената без хроничних болести. Стратегије у лечењу подразумевају што брже, поновно успостављање протока крви и смањење инфаркта миокарда. Иако су

познати бројни лекови, потреба за откривањем нових, мање штетних агенаса и бољих, адекватнијих приступа у заштити миокарда је све већа (218).

Исхемијско прекондиционирање је описано пре неколико деценија, као нови приступ у заштити миокарда од И/Р повреде. Од тада се успешно примењује на великом броју експерименталних и клиничких испитивања (219). Са друге стране, фармаколошко прекондиционирање може имитирати исхемијско прекондиционирање и учинити миокард отпорнијим за структурна и функционална оштећења изазвана И/Р. Уз то је фармаколошко прекондиционирање практичније од исхемијског и има велики клинички потенцијал (220). Због свега наведеног, желели смо испитати ефекте ДАТС-а као прекондиционарајућег агенса, на функционални опоравак изолованог срца пацова и предложити могуће заштитне механизме.

Наши резултати показују да су кардиодинамски параметри у И/Р групи значајно смањени током периода реперфузије у поређењу са вредностима пре исхемије. Уочена су смањена инотропна и лузитропна својства, као и депресија срчане функције, коронарног протока и срчане фреквенце у И/Р групи. Насупрот томе, у групи пацова који су били подвргнути хроничној примени ДАТС-а, кардиодинамски параметри имали су мање флукуација током периода реперфузије (**Табела 5**). Такође, наши резултати показују да су три недеље прекондиционарања ДАТС-ом биле довољне да се уоче позитивни ефекти на контрактилну функцију, инотропно и лузитропно својство и да у периоду реперфузије дође до опоравка систолне функције и коронарног протока (**График 12**).

У раније објављеним студијама на мишевима, које су се бавиле испитивањима ефеката ДАТС-а, било да је примењен интравенски или интраперитонеално, након И/Р повреде је забележено значајно смањење оштећења и побољшање функције миокарда. Наиме, ДАТС штити миокард очувањем митохондрија и одржавањем транспорта електрона након И/Р повреде (221). ДАТС може прекондиционирати срце највероватније, тако што се везује за рецепторе (један или већи број, као што је на пример аденозин) и/или тако што доводи до РКС активације и/или тако што блокира прилив  $Ca^{2+}$  који активира заштиту миокарда (222).

Током ране фазе реперфузије, због реоксигенације (поновног сусрета ткива са кисеоником), протеини, нуклеинске киселине, угљени хидрати и липиди се могу оштетити и индуковати ћелијску смрт. Такође, током исхемије, али и реперфузије,



присутан је дисбаланс између прооксиданаса и антиоксиданаса (223). Одређивање прооксиданаса у коронарном венском ефлуенту заправо је одличан показатељ оксидационог стреса у ендокардијуму леве коморе, као и у целокупној коронарној циркулацији. Наши резултати показали су да је И/Р повреда повезана са оксидационим стресом, који је изазван изразито повишеним нивоима  $O_2^-$  и  $H_2O_2$  у коронарном венском ефлуенту, како у периоду стабилизације, тако и током читавог периода реперфузије. Такође, у И/Р групи, TBARS је значајно повећан у првом минуту реперфузије у поређењу са друге две тачке од интереса. Са друге стране, третман ДАТС-ом довео је до смањења мерених ROS ( $O_2^-$  и  $H_2O_2$ ), и спречио је значајне флукуације у нивоима TBARS пре, или током реперфузије (**Табела 6** и **График 13**). Уочено смањење  $O_2^-$  у корелацији је са системским повећањем активности SOD, које је објашњено у поглављу 5.1.3.

Анализом хистолошких препарата ткива миокарда, утврђено је да *ex vivo* индукована И/Р повреда мења структуру срца, што се делимично може спречити ДАТС третманом (**Слика 8**). У групама пацова који су третирани ДАТС-ом (ДАТС+И/Р), примећен је смањен едем, као и умањено оштећење мишићне мембране, језгра и попречних мишићних влакана миокарда. Као последица повећане продукције слободних радикала, вакуолизација ћелија је у већој мери присутна у И/Р групи. Морфолошки резултати срчаног ткива су у сагласности са претходно разматраним кардиодинамским и оксидационим параметрима, али за разоткривање некрозе миокарда у *post-mortem* срчаном прегледу, осетљивије и специфичније је бојење срца тропонином. Стога се у научно-истраживачким радовима некроза миокарда често дијагностикује одређивањем нивоа cTnT и cTnI. У неколико експерименталних студија на различитим моделима инфаркта миокарда показано је да је повећање cTnT у серуму у корелацији са величином инфаркта (182, 224). Такође, у експерименталној студији на псима, примећено је да се нивои тропонина у серуму повећавају паралелно са губитком тропонина у исхемијском ткиву миокарда (225). У нашој студији, већи губитак срчаног тропонина уочен је у нетретираној, у поређењу са групом пацова третираних ДАТС-ом (И/Р *vs.* ДАТС+И/Р) (**Слика 9**).

Да би детаљно проучили механизме којим ДАТС изазива кардиопротекцију током И/Р повреде, испитивана је релативна експресија гена за антиоксидационе, (анти)апоптотске и (анти)инфламацијске параметре у левој комори.

SOD је металоензим који катализује дисмутацију супероксид анјон радикала у кисеоник и водоник пероксид, док GSH-Px штити ћелије од оксидационих повреда. Ови ензими истовремено обезбеђују систем одбране за преживљавање аеробних организама. Резултати ове студије показали су да је након И/Р повреде експресија гена за SOD-2 значајно повећана у групи пацова третираних ДАТС-ом у поређењу са нетретираном групом. Са друге стране, релативна експресија гена за SOD-1 била је слична у обе испитиване групе (**График 14**). Ови резултати указују да би прекондиционарање ДАТС-ом могло ублажити повреду миокарда изазвану И/Р, највероватније кроз повећање антиоксидационог капацитета миокарда. Уједно, ово може бити јасан показатељ антиоксидационог профила ДАТС-а у срчаном ткиву, јер SOD-2 чини више од 70% активности SOD у срцу и преко 90% активности у срчаним миоцитима. Осим тога, NOS са три изоформе, као што су nNOS, eNOS и iNOS, катализује формирање NO (226). У ранијим студијама показано је да ДАТС штити ендотелне ћелије и повећава експресију eNOS, као и биолошку расположивост азот монооксида након коронарне повреде (209). Такође, наши резултати су показали да је eNOS значајно повећан код пацова третираних ДАТС-ом (**График 14**). eNOS утиче на повећање нивоа NO, што је такође у складу са претходно дискутованим резултатима у плазми и коронарном венском ефлуенту. Према томе, eNOS вероватно повећава биорасположивост NO и индукује вазодилатацију у ДАТС+И/Р групи. *Premodore* и сарадници су показали да након примене, ДАТС може да утиче на активирање eNOS дуже од 30 минута, а чак два сата након примене да повећава метаболите азот монооксида (221). Такође, примећено је да H<sub>2</sub>S активира eNOS и повећава биолошку расположивост NO кроз механизам зависан од Akt (208, 227).

Током И/Р повреде некроза миокарда одговорна је за смрт ћелија. Међутим и апоптоза делимично доприноси укупној ћелијској смрти миоцита током периода реперфузије и представља главно упориште оштећења ткива након И/Р повреде (228, 229). У нашем истраживању, показано је да прекондиционарање ДАТС-ом, смањује број (учесталост) кардиомиоцита са ТУНЕЛ позитивним једром (**Слика 10**). Поред тога, имајући у виду да је у неколико студија сугерисано да регулација појединих антиапоптотских фактора, укључујући Bcl-2 ген и регулацију проапоптотских гена као што је Вах, игра важну улогу у ”спашавању” исхемијског ткива (230, 231), може се рећи да је ДАТС, барем делимично, регулатор апоптозе. У нашем истраживању, релативна експресија гена за Bcl-2 (антиапоптотски параметар) је повећана, док је за Вах

(проапоптотски параметар) смањена код здравих пацова који су били третирани ДАТС-ом, али је експресија обе каспазе -3 и -9 била иста у И/Р и ДАТС+И/Р групама (**График 15**). Ови резултати су у сагласности са резултатима добијеним имунохистохемијским бојењем. Показано је да Bcl-2 регулише стварање ROS (посебно супероксид анјон радикала) јер смањује ћелијску смрт изазвану прооксидационим агенсима (232). Антиапоптотска улога Bcl-2 добро је позната у миокарду. Потврђено је да Bcl-2 штити миокард од апоптозе индуковане И/Р повредом (233, 234), а да исхемијско прекондиционирање смањује апоптозу, тако што тако мења експресију Bcl-2, Bax и/или смањује њихов однос (235, 236).

Током исхемије и реперфузије, новонастале реактивне врсте које учествују у повреди миокарда, активирају редокс осетљиви транскрипциони фактор NF-κB и активирају експресију различитих интерлеукина (нпр. 1β, 6), TNF-α и других инфламацијских медијатора (237). Такође, TNF-α и IL-1β, уједно индукују и активацију NF-κB (237, 238). У многобројним студијама потврђено је да исхемија праћена реперфузијом активира каскаду догађаја који укључују и активацију NF-κB и производњу инфламацијских цитокина (239, 240). На основу резултата ове студије, примећено је да третман ДАТС-ом доводи до смањења релативне експресије гена за NF-κB, TNF-α и IL-6, и повећане експресије гена за IL-10, али да не доводи до разлика у релативној експресији гена за IL-13 и IL-17A (**График 16**). Смањење TNF-α и IL-6, услед терапије ДАТС-ом је у складу са побољшаном функцијом миокарда и антиоксидационом активношћу. *Sodha* и његове колеге су показали да су TNF-α, IL-6 и IL-9 значајно смањени код експерименталних свиња које су третиране сулфидом 10 минута пре акутне оклузије која је трајала 60 минута, као и током реперфузије која је трајала такође 60 минута (70). Антиинфламацијски ефекти H<sub>2</sub>S и његових донора су доказани у студијама на срцу, али и другим органима (241, 242).

Иако прецизан механизам деловања још увек није у потпуности разјашњен, до сада приказани синергистички антиоксидациони, антиинфламацијски и антиапоптотски ефекти ДАТС-а могу се односити на његову ефикасност у ограничавању инфаркта миокарда и очувању функције срца. Такође, показано је да је активација калијумских канала зависних од аденозин трифосфата (К-АТФ) кардиопротективна (243).

Досадашње студије су у корелацији са нашим резултатима, тако да њихови резултати иду у прилог томе да H<sub>2</sub>S и његови донори, примећени пре, током или након

периода реперфузије, обезбеђују значајну заштиту миокарда. H<sub>2</sub>S и његови донори ограничавају величину инфаркта, додатно побољшавајући глобалну и регионалну функцију леве коморе, побољшавајући коронарну микроваскуларну функцију и ограничавајући инфламацијски одговор на И/Р повреду у различитим моделима инфаркта миокарда (69, 147, 243, 244).

## 5.2. ЕФЕКТИ ДИАЛИЛ ТРИСУЛФИДА НА ПАЦОВЕ СА ДИЈАБЕТЕСОМ ТИП 1

### 5.2.1. Ефекти хроничног третмана ДАТС-ом на карактеристике пацова и биохемијске параметре (Антидијабетски капацитет ДАТС-а)

Инјекција стрептозотоцина је изазвала карактеристичне манифестације дијабетеса, укључујући значајан губитак тежине, полидипсију и хипергликемију (**График 17**). Такође, примећено је да су пацови имали полиурију, али излучивање урина није праћено током експерименталног периода. Коришћени модел за Т1ДМ показао се ефикасним јер сви добијени резултати указују да СТЗ-ом индукован ДМ на моделу пацова показује сличне патофизиолошке особине као што је то случај код људи (245). Поред тога, примећен је повећан ниво LDL и смањен ниво HDL, али без значајне разлике, код пацова са дијабетесом (**График 19**). Промене у броју липида у системској циркулацији су очигледније у Т2ДМ, тако да су непромењени нивои триглицерида и укупног холестерола очекивани код дијабетеса тип 1.

Третман пацова са дијабетесом, ДАТС-ом (40 mg/kg *per os*, сваки други дан током три недеље) није утицао на физичке манифестације као што су губитак тежине, полидипсија и хипергликемија, док су нивои глукозе наше код дијабетичних пацова били статистички значајно смањени (**График 17**). Механизми укључени у потенцијал ДАТС-а да регулише хипергликемију још увек нису у потпуности разјашњени. Међутим, директно или индиректно повећање секреције инсулина из β-ћелија панкреаса или ослобађање везаног инсулина, свакако су укључени у механизам којим ДАТС остварује антидијабетски ефекат (246). У складу са нашим резултатима, неколико

студија је показало хипогликемијско својство белог лука, приписујући тај ефекат углавном једињењима типа алицина као што је ДАТС (247, 248).

Као што је раније споменуто,  $H_2S$  утиче на функцију и посредује у повреди  $\beta$ -ћелија панкреаса, која је у патогенези Т1ДМ (13, 249). Прецизна функционална улога  $H_2S$  у  $\beta$  панкреасним ћелијама још није темељно истражена. Међутим, према резултатима досадашњих студија,  $H_2S$  делује инхибиторно на ослобађање инсулина (249, 250). Механизам којим  $H_2S$  инхибира секрецију инсулина веома је комплексан. У студијама које су испитивале васкуларне ефекте  $H_2S$ , К-АТФ канали су идентификовани као молекулске мете за  $H_2S$ , што указује на могућу улогу ових канала у регулацији секреције инсулина (103, 247, 251). Међутим, могу бити укључени и други механизми. На пример, NaHS (100  $\mu$ M) и ACS67 (једињење које ослобађа  $H_2S$ , липосолубилни дериват латанопроста) смањују отварање L-типа волтажно-зависних  $Ca^{2+}$  канала у мишићим  $\beta$  ћелијама (104). Поред тога, L-цистеин, као и NaHS, смањује глукозом индуковану акумулацију интрацелуларног АТФ и глукозом индуковано повећање потенцијала унутрашње мембране митохондрија (249). Сви поменути резултати заједно, указују да ДАТС, као донор  $H_2S$ , може смањити ниво глукозе инхибирањем секреције инсулина, активирањем К-АТФ и волтажно-зависних  $Ca^{2+}$  канала или супресијом производње АТФ у  $\beta$  ћелијама.

### ***5.2.2. Ефекти хроничног третмана ДАТС-ом на вредности водоник сулфида и хомоцистеина (ДАТС као донор водоник сулфида код пацова са дијабетесом)***

Једна од највећих непознаница и полемика око  $H_2S$ , односи се на мерење (квантификацију) његових концентрација у биолошким системима, јер они умногоме зависе од метода које су употребљене приликом детерминације, типа ткива, али и многих других фактора (107). У нашој студији, након три недеље конзумирања ДАТС-а код пацова са дијабетесом, забележено је статистички значајно повећање нивоа  $H_2S$  (График 22). Са друге стране, код експерименталних модела дијабетеса, нивои  $H_2S$  у циркулацији су или смањени или имају тенденцију смањења (98, 109), као што је показано и у нашој студији (График 22).

Добро је познато да  $H_2S$  игра неколико заштитних улога у кардиоваскуларном систему, утичући на ангиогенезу, вазодилатацију, инхибицију леукоцитне адхезије и процесе смрти ћелија (20). Код ендотелне дисфункције узроковане хипергликемијом, ензими који производе  $H_2S$  (CBS и/или CSE) могу, али и не морају бити повишени у различитим моделима дијабетеса и то најчешће зависи од тежине болести и природе самог експерименталног модела (98, 109). Парадокс са непромењеним или повећаним нивоима  $H_2S$  у ткивима и нижим нивоима  $H_2S$  у циркулацији највероватније настаје јер ендотелне ћелије у стању хипергликемије "конзумирају" више  $H_2S$  услед повећаног стварања ROS (109), које је уочено и у нашем истраживању. Ова повећана потрошња  $H_2S$  може се смањити тако што се ћелије третирају антиоксидансима или агенсима за одвајање митохондрија (енгл. *mitochondrial uncoupling agents*). Другим речима, повећана продукција митохондријалних ROS је узрок релативног недостатка  $H_2S$  у ендотелним ћелијама у хипергликемији (107).

Повишен ниво хомоцистеина у плазми, које доводи до хиперхомоцистеинемије, смањује ендегену производњу  $H_2S$  у организму, при чему долази до кардиоваскуларних компликација. Код дијабетичара без васкуларних компликација, примећена је смањена концентрација хомоцистеина, док је код пацијената са атеросклерозом или компромитованом функцијом бубрега повећана концентрација хомоцистеина у плазми (252). У нашем истраживању, Т1ДМ изазван стрептозотоцином довео је до значајно повишеног нивоа хомоцистеина, док је третман ДАТС-ом значајно смањио ниво хомоцистеина код дијабетичних пацова (**График 22**). Имајући у виду уочену смањену функцију миокарда код дијабетичних, нетретираних пацова (о чему ће бити речи у наредном поглављу), ови резултати нису изненађујући. Смањењем нивоа хомоцистеина у серуму, ДАТС директно смањује и ризик од кардиоваскуларних обољења, али и степен оштећења других органа (253).

### 5.2.3. Ефекти хроничног третмана ДАТС-ом на параметре оксидационог стреса (Антиоксидациони капацитет ДАТС-а код пацова са дијабетесом)

Резултати појединих студија сведоче о томе да дијабетес може да узрокује оксидациони стрес кроз неколико механизма: аутооксидацију глукозе, формирање споредних продуката гликације и стимулацију полиола. Још један од могућих механизма је повећање слободних масних киселина и лептина који могу допринети и генерацији ROS (254). Системско повећање ROS и RNS, као и смањење ензимске и неензимске антиоксидационе одбране ћелија, кључни су догађаји у развоју компликација у дијабетесу (255). Због тога су и у нашој студији, мерени нивои прооксидационих и антиоксидационих параметара у плазми и лизату еритроцита. Како је и очекивано, у ДМ групи уочена је повећана продукција  $O_2^-$  и смањена активност свих измерених антиоксидационих параметара у односу на КТР групу (**Графици 20 и 21**). Уочено смањење активности SOD погодује повећању концентрације  $O_2^-$ . Као изузетно реактиван радикал  $O_2^-$ , може да реагује са NO и формира цитотоксични кисеонични радикал познат као пероксинитрит ( $ONOO^-$ ). Инактивација NO са  $O_2^-$  може довести до вазоконстрикције, повећања крвног притиска и смањења гломеруларне филтрације (256).

Наши резултати јасно показују да третман ДАТС-ом у дијабетесу утиче на смањење производње  $O_2^-$  и што је још важније утиче на повећање  $NO_2^-$ , SOD и CAT (**График 20 и 21**). Непромењене вредности  $H_2O_2$  вероватно су последица повећања активности SOD и CAT, које су одговорне за његову разградњу, при чему уз издвајање кисеоника, настаје вода (169).

Услед хроничне хипергликемије долази до повећане концентрације реактивних кисеоничних врста и смањене ензимске и неензимске системске оксидационе заштите. Благотворни ефекти ДАТС-а су повезани са антиоксидационим капацитетом овог једињења. Главни састојци белог лука различито утичу на GSH у црвеним крвним зрнцима, али сви повећавају ниво интрацелуларног GSH, који генерално зависи од цистеина. Заправо, у физиолошким условима повећањем локалне концентрације Nrf2 у једру, утиче се на цистеин који последично повећава концентрацију хомоцистеина. Антиоксидациони потенцијал зависи од броја сумпорних атома, па се стога ДАТС, са

своја три атома сумпора, издваја као најснажнији и најпотентнији, а за њим следе ДАДС и ДАС, са два, односно једним атомом сумпора (257). Третман ДАТС-ом може изазвати кардиопротективне ефекте тако што се супротставља оксидационом стресу који је изазван хипергликемијом. Наиме, највероватније уз посредовање  $H_2S$  долази до супримирања оксидационог стреса који је стимулисан с-JN-терминалним киназама (енгл. *c-Jun N-terminal kinases*, JNKs) и NF- $\kappa$ B сигнализацијом паралелно са активирањем Nrf2 пута. На овај начин повећава се експресија гена за многе антиоксидационе параметре (258, 259).

Међутим, за разлику од наше студије, у неколико студија нису откривени хипогликемијски ефекти код дијабетичних животиња третираних  $H_2S$ . Опречни резултати су вероватно последица испитивања различитих донора  $H_2S$ , који су се користили у студијама (108, 260). Такође, у неколико студија је показано да замена  $H_2S$  фармаколошком суплементацијом или прекомерном експресијом CSE аденовирусима, смањује производњу ROS у митохондријама и штити ћелије од хипергликемијског оштећења (109). На основу наших резултата, може се претпоставити да ДАТС вероватно изазива смањење прооксидационих параметара унутар ендотелних ћелија, при чему се физиолошка функција митохондрија одржава.

#### **5.2.4. Ефекти хроничног третмана ДАТС-ом на функцију миокарда (Кардиопротективни капацитет ДАТС-а код пацова са дијабетесом)**

Као што је већ споменуто, дијабетес прати повећан ризик од кардиоваскуларних болести (90). Стога су у нашој студији детаљно испитивани ефекти хроничног третмана ДАТС-ом на функцију миокарда пацова са Т1ДМ.

Наше истраживање указује на статистички значајно повећање односа телесне тежине и масе срца, LVPWd и LVPWs, као и смањење FS, што резултира срчаном кардиомиопатијом коју карактерише хипертрофија у ДМ групи пацова. Међутим, код дијабетичних пацова третираних ДАТС-ом примећена је побољшана дијастолна и систолна функција срца која се јасно уочава на основу вредности IVSd, LVPWd, LVPWs, FS, као и смањеним развојем срчане хипертрофије (Слика 11, Табела 7, График 18).



Поред тога, главна предност ДАТС-а је значајно повећање FS, које директно доводи до побољшања систолне функције и контракције миокарда код пацова са дијабетесом.

Код пацова којима је СТЗ-ом индукован дијабетес, примећена је систолна и дијастолна дисфункција. Као што је раније наведено, смањена *ex vivo* контракција и релаксација (која се огледа кроз вредности  $dp/dt \max$  и  $dp/dt \min$  параметара) се може уочити након 15 дана, као и након 12 недеља од инјекције стрептозотоцина (261, 262). У нашој студији, срчана функција у ДМ групи значајно слаби током деведесетоминутне перфузије, што се посебно може приметити и кроз смањене вредности параметара  $dp/dt \min$ , SLVP и HR. Са друге стране, у групи третираној ДАТС-ом (ДМ+ДАТС), вредности кардиодинамских параметара биле су скоро константне и без значајног смањења током перфузије. Другим речима, функционална карактеристика срца, праћена кроз кардиодинамске параметре, очувана је код ДАТС третираних пацова са дијабетесом (**Табела 8** и **График 23**). Наши резултати указују да ДАТС значајно побољшава индекс контрактилности и обезбеђује довољну контрактилну резерву која може да смањи штетне ефекте дијабетеса на функцију миокарда.

Хипергликемија доводи до повећане синтезе ROS и RNS који узрокују оксидациону повреду срца заједно са повећаном експресијом појединих гена, измењеном сигналном трансдукцијом и активацијом путева који утичу на програмирану смрт кардиомиоцита. Сви ови фактори играју значајну улогу у развоју дијабетесне кардиомиопатије (263). У истим интервалима, током деведесетоминутне перфузије, прооксидациони параметри су мерени у коронарном венском ефлуенту испитиваних група. Наши резултати показују да третман ДАТС-ом има позитивне ефекте на оксидациони стрес у коронарном венском ефлуенту, што се огледа кроз пад нивоа TBARS,  $O_2^-$  и  $H_2O_2$ . Штавише, у ДАТС групи је примећено повећање активности  $NO_2^-$ , који је одговоран за производњу NO и последичну вазодилатацију која се може уочити и кроз повећање CF (**Табела 9** и **График 29**).

Сви ови резултати заједно показују да повећање ROS (у коронарном венском ефлуенту и плазми), уз смањење антиоксидационих параметара могу бити укључени у низ догађаја који на самом крају доводе до стрептозотоцином индукованог дијабетеса (и дијабетесне кардиомиопатије), а да су протективни ефекти ДАТС-а највероватније повезани са његовом способношћу да спречи оксидационе промене. Сличне закључке извели су и *Guan* и сарадници који су показали да  $H_2S$  штити хумане ендотелне ћелије

изолиране из пупка (енгл. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVEC) од апоптозе изазване глукозом (264). Такође, примећено је да се изоловани крвни судови инкубирани у повишеној глукози могу заштитити од повреда, ако се изложе повећаној концентрацији  $H_2S$  (фармаколошком суплементацијом или прекомерном експресијом са CSE). У сличном моделу СЗТ-ом индукованог дијабетеса, показано је да мини пумпе које ослобађају  $H_2S$ , повећавају његове нивое у плазми и побољшавају *ex vivo* релаксацију торакалне аорте (108).

У патохистолошким студијама показано је да код дијабетичних срца постоји масивнија некроза са фрагментацијама влакана срчаног мишића, у поређењу са срцима пацова без дијабетеса (265). У нашој студији добијени су слични резултати (Слика 12). Са друге стране, у ДМ+ДАТС групи уочавају се мање промене на патохистолошким препаратима у односу на нетретирану групу дијабетичних пацова (ДМ). Такође, на моделу дијабетесне кардиомиопатије,  $H_2S$ , апликован интраперитонеално или орално, смањено је степен фиброзе и генерално очувао структуру срца (266).

ДАТС је значајно повећао ензимске и неензимске антиоксидационе параметре у лизату еритроцита, паралелно са смањењем прооксиданаса у плазми и коронарном венском ефлуенту, што указује да би ефекти на редокс статус могли бити један од важних механизма који учествују у протективним ефектима ДАТС-а. Такође, побољшање у функцији миокарда у нашој студији може бити последица ДАТС-ом индукованих антиоксидационих ефеката, али и регулацијом хипергликемије код дијабетичних пацова третираних ДАТС-ом.

### ***5.2.5. Ефекти хроничног третмана ДАТС-ом на *ex vivo* индуковану И/Р повреду изолованог срца пацова (ДАТС као прекондиционирајући агенс код пацова са дијабетесом)***

Имајући у виду да дијабетесна кардиомиопатија настаје као резултат примарне болести и да доводи до структурних и функционалних абнормалности миокарда, а последично и до срчане инсуфицијенције (267), посебна пажња је посвећена

---

потенцијалној улози ДАТС-а у моделу прекондиционирања срца код пацова са дијабетесом.

Наши резултати јасно показују да је присутна дисфункција миокарда у ДМ срцима који су били подвргнути И/Р повреди. Депресија срчане функције и компромитоване инотропне и лузитропне особине срца, као и поремећени CF и HR, очигледнији су у ДМ+И/Р у односу на И/Р групу (**График 25** и **Табела 10**). У складу са претходним *in vivo* и *ex vivo* студијама (59), резултати наше студије јасно показују да ДАТС значајно смањује И/Р повреду код пацова са дијабетесом и побољшава опоравак срца од исхемије. У групи пацова третираних ДАТС-ом повећана је апсолутна вредност срчане контрактилне силе, SLVP и CF током стабилизације, док је након 60 минута реперфузије, осим наведених параметара, значајно повећана и фреквенца (HR) срца. Контракtilна способност и CF су били скоро константни и нису се мењали током периода реперфузије код пацова са дијабетесом третираних ДАТС-ом (ДМ+И/Р+ДАТС). Инхибирање активације p38 митогеном активираних протеин киназа (енгл. *p38 mitogen-activated protein kinases*, p38MAPK) и екстрацелуларних сигнално-регулисаних киназа 1/2 (енгл. *extracellular signal-regulated kinase*, ERK) као и спречавање оксидационог стреса у H<sub>2</sub>C<sub>2</sub> ћелијама су могући механизми одговорни за кардиопротективне ефекте ДАТС-а (268).

Неколико истраживачких група је у својим истраживањима показало да H<sub>2</sub>S може узроковати кардиопротекцију различитим механизмима, али је кључно очување функције митохондрија, смањење оксидационог стреса, смањење инфламације у миокарду и побољшање ангиогенезе (78, 147). У нашем истраживању параметри оксидационог стреса мерени су и у коронарном венском ефлуенту, пре и након тридесетоминутне исхемије током периода реперфузије. Мерењем прооксиданаса у коронарном венском ефлуенту, уочен је значајно виши ниво TBARS, O<sub>2</sub><sup>-</sup> и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> код свих пацова са дијабетесом, при чему је ДАТС третман довео до смањења наведених параметара. Поред тога, у групи пацова третираних ДАТС-ом уочено је и повећање NO<sub>2</sub><sup>-</sup> нивоа у коронарном венском ефлуенту, што је вероватно резултирало повећањем коронарног протока (**Табела 11** и **График 26**). Што се тиче компоненти антиоксидационог система заштите, релативна генска експресија антиоксидационих маркера одређивана је у левој комори. У складу са претходно наведеним резултатима, у нашој студији, присутна је повећана релативна експресија гена за eNOS код

---

дијабетичних пацова третираних ДАТС-ом (**График 27**). Активација eNOS повећава ниво NO истовремено са смањењем нивоа реактивних врста кисеоника, што може бити једно од могућих објашњења за очувани коронарни вазодилаторни одговор код пацова који су били подвргнути ДАТС третману. У више наврата је показано да ДАТС повећава релативну експресију гена за eNOS, спречава eNOS од оштећења које изазива оксидовани липопротеин ниске густине, штити ендотелне ћелије и повећава биорасположивост NO након коронарне повреде (209).

Иницирање и развој кардиоваскуларних компликација у дијабетесу, приписују се, не само хипергликемији и повећању ROS/RNS, већ и повећању активности апоптотских маркера. С тим у вези, желели смо дубље да продремо у механизме кардиопротекције ДАТС-а током И/Р повреде. У неколико студија је сугерисано да регулација појединих антиапоптотских фактора укључујући Bcl-2 ген, као и регулација проапоптотских гена, као што је Вах, игра важну улогу у протекцији исхемијског ткива (230). Високе концентрације глукозе доводе до значајног повећања ROS, који фаворизују генерисање дихидроникотинамид аденин динуклеотид фосфата (енгл. *dihydronicotinamide-adenine dinucleotide phosphate*, NADPH) оксидазе и индукују апоптозу у кардиомиоцитима активирањем сигналног пута JNK/NF-κB (258). Унос ДАТС-а код пацова са дијабетесом (ДМ+ДАТС+И/Р) повећао је релативну експресију Bcl-2 гена и смањио експресију Вах и гена за каспазу-3. Иако је релативна експресија гена за каспазу-9 повећана у левој комори дијабетичних пацова, третман ДАТС-ом није значајно утицао на његову релативну експресију (**График 28**). Наши резултати (**Слика 15**) су у складу са резултатима који показују да су мишеви третирани H<sub>2</sub>S показали смањену активацију каспазе-3 и смањен број позитивних миоцита обележених ТУНЕЛ тестом (147). У *in vivo* моделима где су испитивани ефекти прекоиндиционарања H<sub>2</sub>S, примећено је повећање антиапоптотских (Bcl-2 и Bcl-xL) и неактивираних проапоптотских (Bad) протеина. Такође, повећана је експресија протеина топлотног шока (енгл. *heat shock proteins*, HSP) 70 и 90 који могу спречити апоптозу (255, 269). Додатно, прекоиндиционарање H<sub>2</sub>S промовише антиапоптотске сигналне путеве променом експресије p38, ERK 1/2 и фосфоинозитид-3-киназа (енгл. *phosphoinositide-3-kinase*, PI3K) (270).

Добро је познато да TNF-α, TNF-β и различити интерлеукини, као што су 2, 4, 5, 6, 13 имају доминантну имунорегулаторну улогу у патогенези Т1ДМ (271). Међутим,

постоје контрадикторне информације у вези са нивоима и производњом цитокина у кардиоваскуларним компликацијама изазваних дијабетесом. У нашем истраживању, значајно је повећана релативна експресија гена за NF-κB и TNF-α у ДМ+И/Р групи у односу на И/Р групу (**График 29**). Једно од могућих објашњења је да услед инфаркта миокарда долази до активације инфламацијских ћелија. Инфламација у миокарду је праћена и повећаном експресијом адхезионих ћелијских молекула ICAM-1 (интрацелуларни) и VCAM-1 (васкуларни) (273). Ове ћелије заједно са кардиомиоцитима, IL, TNF-α и другим, директно и индиректно, доводе до кардиодепресивних ефеката, укључујући смањену срчану функцију и апоптозу које настају путем интрацелуларне серин-треонин киназе Akt (274). Наши резултати указују да је релативна експресија гена за NF-κB, TNF-α и IL-17A значајно смањена код дијабетичних пацова третираних ДАТС-ом, у односу на њихову експресију код нетретираних пацова (**График 29**). Због свега наведеног, може се претпоставити да хроничан унос ДАТС-а може ублажити инфламацију која је индукована И/Р повредом миокарда.

Бојење хематоксилином и еозином пружа бољи увид у патохистолошке и морфолошке промене, као што су едеми, дегенеративне промене, некроза и инфламација. Према нашим резултатима, ове промене су очигледније у ДМ групи, док је ДАТС значајно смањено промене у структури миокарда којима је индукована И/Р повреда (**Слика 13**). Очување морфологије миокарда помаже да се очува физиолошка функција срца, што се одразило и на кардиодинамске параметре, чије су вредности биле у физиолошком опсегу. Са друге стране, код нетретираних пацова са дијабетесом запажено је значајно смањење вредности кардиоваскуларних параметара услед ослабљеног срчаног мишића, који настаје као последица некрозе и губитка гликогена. Смањење броја откуцаја срца може бити последица смањене активности пејсмејкер ћелија које се јављају код миокарда дијабетичара (275). Поред тога, резултати *Huang* и коаутора су показали да је пречник лумена леве коморе повећан у групама пацова са ДМ, а да се смањено на приближно физиолошке вредности након третмана ДАТС-ом, ДАТС-ом или уљем белог лука (255). Као што је раније наведено, осетљивије и специфичније за откривање некрозе миокарда у постморталном прегледу је имунохистохемијско бојење сТnТ. Већи губитак срчаног тропонина примећен је у групи која није третирана него у групи која је третирана ДАТС-ом (ДМ+И/Р vs.

ДМ+ДАТС+И/Р) (Слика 14). Поред тога, код ДМ примећено је и последично хистолошко и/или функционално, неповратно оштећење ткива миокарда. У корелацији са нашим резултатима, бројна истраживања показала су да третман ДАТС-ом доводи до смањења серумских нивоа СК-МВ, сТnТ и сТnI и побољшања стопе преживљавања након реперфузије (221, 276, 277). Према нашим сазнањима, сва претходна истраживања су биохемијски испитала ефекте ДАТС-а на ниво тропонина, а ниједно од њих није посматрало ткиво микроскопски, да би се уочио образац губитка сТnТ код оштећеног миокарда.

ДАТС смањује оксидациони стрес, апоптозу и инфламацију у срцу, чиме највероватније остварује кардиопротективне ефекте у срцу дијабетичних пацова који су *ex vivo* били подвргнути И/Р. Такође, на основу наших резултата можемо рећи да ДАТС вероватно отклања слободне радикале и да активира антиоксидационе параметре у ћелијама.

### **5.3. ЕФЕКТИ ДИАЛИЛ ТРИСУЛФИДА НА ПАЦОВЕ СА МЕТАБОЛИЧКИМ СИНДРОМОМ**

#### ***5.3.1. Ефекти хроничног третмана ДАТС-ом на карактеристике пацова и биохемијске параметре (Потенцијал ДАТС-а да смањи манифестације метаболичког синдрома)***

Метаболички синдром као хетерогени поремећај карактерише инсулинска резистенција, дисфункција бета ћелија панкреаса, хипертензија, гојазност и хиперлипидемија. Током протеклих неколико деценија, у развијеним земљама, једна трећина одраслих може се сврстати у групу пацијената оболелих од метаболичког синдрома. Упркос великом броју фармаколошких агенаса који се користе у лечењу метаболичког синдрома, преваленца се алармантно повећава, тако да је све већа потреба за ефикаснијим агенсима (278).

Да би се тестирали нови и ефикаснији лекови, неопходни су клинички релевантни експериментални модели за MetC. У нашој студији MetC индукован је код пацова *Wistar albino* соја. Коришћени модел подразумевао је да животиње буду на исхрани са високим садржајем масти (HFd) током четири недеље да би се индуковала хиперинсулинемија, инсулинска резистенција и интолеранција на глукозу. Након овог периода, животињама је дата инјекција стрептозотоцина, која је имала за циљ да доведе до смањења броја бета ћелија у панкреасу. На основу података из литературе, комбинација ове две методе (HFd и СТЗ) је одлична за анимални модел MetC-а, јер имитира патологију овог синдрома и Т2ДМ код људи (279, 280). Осим тога, исхрана са високим садржајем масти је веома заступљена у целом свету, што такође потврђује чињеницу да је овај модел добар избор и веома близак клиничком моделу (279).

У нашој студији примећено је да су пацови са MetC-ом конзумирали више воде и хране, као и да су имали значајно већу телесну тежину, у односу на здраве пацове (**График 30**). Промене у телесној тежини, вероватно су допринеле повишеним нивоима глукозе, укупног холестерола, триглицерида, LDL и смањеним нивоима HDL код пацова са MetC-ом у поређењу са здравим пацовима (**Графици 30 и 31**). Такође, примећено је да су пацови са MetC-ом имали значајно веће вредности СКП, ДКП, HR, као и да су имали хиперсекрецију инсулина током ОГТ теста (**Графици 33, 34 и 35**). Уједно, наведени резултати указују да је четири недеље исхране богате високим садржајем масти, у комбинацији са инјекцијом СТЗ-а одличан модел за индукцију MetC код *Wistar albino* пацова и да се због тога овај модел може користити за испитивање нових третмана. Сви наведени параметри могу довести до КВБ као што су ендотелна дисфункција, атеросклероза и различита обољења миокарда (281). Због тога је веома важно пронаћи и проучити агенсе који би побољшали знаке и симптоме MetC-а.

Ефекти ДАТС су испитивани током и након тронедељног третмана код пацова са MetC-ом. Иако није утицао на телесну тежину пацова, многи други параметри, попут липидног и гликемијског профила, значајно су побољшани код пацова који су били подвргнути третману ДАТС-ом. Такође, своја корисна својства ДАТС је показао и кроз смањење TG и LDL, као и повећања HDL код пацова којима је овај агенс даван *per os* током три недеље. Као што је више пута споменуто, на основу сазнања аутора, ова студија је једина која испитује ефекте ДАТС код пацова са MetC-ом. Међутим, наши резултати су у сагласности са резултатима студијама у којима су испитивани различити

екстракти белог лука, где је исто примећен побољшан липидни профил (282-284). Механизам одговоран за протективна својства белог лука и ДАТС-а подразумева директну или индиректну инхибицију синтезе ендогеног холестерола и/или промене липопротеинских фракција које могу да утичу на холестерол (285). У претходним студијама доказано је да услед конзумирања белог лука може доћи до инхибиције у синтези масних киселина у јетри и то углавном смањењем активности кључних ензима, а тиме и смањењем акумулације липида у јетри и TG у плазми (286). Такође, примећено је да бели лук има способност да смањи нивое холестерола, при чему је уз повећање унете количине белог лука, овај ефекат израженији (287). Показано је и да суплементација екстрактима белог лука услед инхибиције 3-хидрокси-3-метил-глутарил-СоА (HMG-CoA) спречава повећање нивоа липида у серуму, плазми и различитим ткивима (288). Насупрот овоме, у недавно спроведеној студији на људима, третман ферментисаним белим луком (енгл. *aged garlic*) није довео до побољшања липидног профила код пацијената са Т2ДМ. Резултати њиховог истраживања сугеришу да ефикасност екстракта ферментисаног белог лука може да се разликује у зависности од особина екстраката и степена обољења (289). У скороје објављеној студији показано је да NaHS доводи до активације АМПК пута и одложеног одговора аутофага, што доприноси смањењу нивоа серумског TG код мишева који су били храњени HFd. NaHS повећавајући нивое H<sub>2</sub>S, омогућава улазак аутофага у јетру, док АМПК активацијом блокира mTOR пут и инхибира активацију аутофага (290). ДАТС као донор H<sub>2</sub>S, највероватније истим или сличним механизмима, може да утиче на ниво триглицерида, односно да доведе до њиховог смањења.

Бели лук може да смањи нивое глукозе уз смањену резистенцију на инсулин и повећану инсулинску осетљивост код метаболичког синдрома (291, 292). Као што се и очекивало, слични резултати добијени су у нашој студији након увођења третмана ДАТС-ом код пацова са MetC-ом. Након ОГТТ примећена је боља толеранција глукозе у групи пацова храњених ДАТС-ом (МС+ДАТС) (**Графици 33 и 34**). У неколико научно-истраживачких радова, наводи се да су сумпорна једињења, изолована из белог лука, као што су ДАТС и други (ДАДС, ДАС, аллиин, алицин, ајоене), због слободне -SH групе коју имају у структури, одговорни за хипогликемијски ефекат белог лука (293-295). Такође, бели лук може да утиче на смањење нивоа глукозе у крви, тако што спречава или смањује апсорпцију глукозе из гастроинтестиналног тракта (296). Занимљиво је да



бели лук може изазвати регенеративне и/или заштитне ефекте и повећати величину панкреасних бета ћелија код пацова код којих је стрептозотоцином индукован дијабетес (297). У студији објављеној пре више од пет година, наводи се да уље белог лука може да смањи дегенерацију бета ћелија панкреаса и ниво антитела који повређују Лангерхансова острвца код пацова са дијабетесом (298). Повећањем нивоа  $H_2S$  уништавају се липидни хидропероксиди у оксидованом LDL, чиме се смањује његов атерогени потенцијал (129). Ово такође може бити једно од могућих објашњења за хиполипидемијске ефекте изазване ДАТС третманом.

Висок крвни притисак се издваја као веома битна клиничка манифестација МетС-а. Хронична примена ДАТС-а код пацова са МетС-ом значајно је смањила ДКП и срчану фреквенцу (МС+ДАТС vs. МС) (**График 35**). У прилог овим резултатима говоре и студије које су се бавиле испитивањем ефеката белог лука. У њима је показано да бели лук има способност да снизи КП, што може бити последица повећане производње  $H_2S$  (299, 300). Механизам који је одговоран за овај антихипертензивни, односно хипотензивни ефекат белог лука, највероватније је сличан ефектима простагландина, који утиче на смањење периферне васкуларне резистенције (301). Такође, постоје чврсти докази који потврђују да једињења која се налазе у белом луку могу *in vitro* инхибирати ангиотензин-конвертујући ензим (302).

Повећани нивои NO и смањени нивои  $H_2S$  примећени су у серуму пацијената или експерименталних животиња са дијабетесом. Хронична употреба белог лука код МетС-а "нормализује", односно враћа нивое NO и  $H_2S$  на физиолошке вредности. Имајући у виду да оба гасотрансмитера доводе до ендотелијум зависне или  $K^+$ -АТФ зависне вазодилатације (98, 303), нормализација њихових нивоа у метаболичком синдрому, може да допринесе хипотензивном ефекту ДАТС-а. У нашој студији такође је показано да ДАТС повећава продукцију NO, углавном тако што повећава eNOS (**График 43**). Овај ефекат се огледа и кроз повећане вредности нитрита у коронарном венском ефлуенту и плазми.

У претходно објављеним студијама показано је да бели лук, екстракти белог лука и једињења изолована из белог лука имају корисне ефекте у лечењу поремећаја који су повезани са МетС-ом, међутим већина студија се бавила његовим ефектима на хипертензију и дијабетес. На основу наших и доступних резултата у литератури, ДАТС

---

се као природни суплемент, може користити за третман различитих патофизиолошких абнормалности MetC-а.

### **5.3.2. Ефекти хроничне употребе ДАТС-а на нивое водоник сулфида и хомоцистеина (ДАТС као донор водоник сулфида код пацова са метаболичким синдромом)**

У појединим студијама хомоцистеин је описан као независни фактор ризика, док је у другима дефинисан само као маркер ризика. Без обзира на ове дилеме, са сигурношћу се зна да Hcy и HHcy могу да допринесу настанку КВБ (304, 305). У овој студији покушали смо да откријемо како третман ДАТС-ом утиче на Hcy и HHcy, код пацова са MetC-ом. Као што је приказано на **Графику 38**, HHcy је присутна код пацова са MetC-ом, док ДАТС третман значајно смањује забележено повећање Hcy. С обзиром да је у неколико студија показано да је HHcy присутан у MetC-у, односно да је повезана са дијабетесом који није зависан од инсулина, наши резултати су у потпуности очекивани. HHcy која је присутна у MetC-у, због вишеструких штетних ефеката, доприноси убрзаној атеросклерози. Наиме, аутооксидација Hcy, као и формирање мешовитих дисулфида, доприноси додатној и повећаној продукцији ROS које даље доводе до многобројних оштећења (306) (ефекти ДАТС-а на ROS у MetC-у ће бити више дискутовани у наредном поглављу). Бројни докази указују на то да Hcy индукује повреде у васкулатури, првенствено јер доприноси дисфункцији ДНК, пролиферацији глатких мишићних влакана и промовисању инфламације. Резултати наше студије директно показују да ДАТС има протективне ефекте на кардиоваскуларни систем, јер смањује HHcy за коју се зна да изазива бројне штетне ефекте (305, 306). Механизми помоћу којих ДАТС остварује позитивне ефекте на HHcy укључују промене у различитим процесима интраћелијске сигнализације и производњу H<sub>2</sub>S, али су детаљи и даље непознати.

У овој студији, такође су праћени нивои H<sub>2</sub>S након тронедељног третмана ДАТС-ом, а резултати су у складу са резултатима Hcy (**График 38**). ДАТС ослобађа H<sub>2</sub>S у хомогенату срца и може помоћи у одржавању његових концентрација на физиолошки ниским нивоима, током дужег временског периода. ДАТС заправо преко тиол-

---

---

дисулфидне размене са GSH у хемијским и биолошким системима, хуманим еритроцитима или аорти пацова омогућава да дође до брзог ослобађања H<sub>2</sub>S (64, 221).

### 5.3.3. Ефекти хроничног третмана ДАТС-ом на параметре оксидационог стреса (Антиоксидациони капацитет ДАТС-а код пацова са метаболичким синдромом)

Током хроничних болести, услед неравнотеже у оксидационом систему долази до поремећаја у производњи реактивних кисеоничних и азотних врста, што доводи до дисфункције у ендотелу. Све већи број доказа, добијених у клиничким и анималним студијама, указује на то да оксидациони стрес игра централну улогу у патогенези и компликацијама МетС-а (307). Претходно је објављено да повишени оксидациони стрес у ендотелу пацијената са метаболичким синдромом доприноси развоју хипертензије, хипергликемије, хипертриглицеридемије и пратећих кардиоваскуларних обољења. Услед оксидације глукозе у комбинацији са губитком ендогених антиоксиданаса, долази до повећане продукције слободних радикала који даље утичу на оштећења органела у ћелијама, као и на развој инсулинске резистенције (308). Добро је познато да суплементација антиоксидансима може ублажити МетС и компликације које настају. У неколико студија бели лук је издвојен као значајан антиоксидациони нутријент који у себи садржи веома моћне антиоксидационе супстанце (309). Стога је један од циљева ове студије био да испита ефекте ДАТС-а на редокс статус пацова са МетС-ом.

Након тронедељног третмана ДАТС-ом мерени су параметри оксидационог стреса у плазми, односно лизираним еритроцитима пацова. Резултати ове студије показују да ДАТС може утицати на снижење прооксидационих, односно повећање антиоксидационих параметара (**Графици 36 и 37**). Добијени резултати су у корелацији са претходно објављеним радовима у којима се наводи да бели лук, његово уље и екстракти показују сличне особине (309-312). Показано је да ферментисан бели лук (енгл. *aged black garlic*) примењен *in vitro* у дози од 20-100 mg/ml, може значајно да повећа SOD активност (309) и смањи липидне пероксиде у јетри чак и више од свежег белог лука (284). Поред тога, резултати наше студије показују да је ДАТС ефикасан у смањењу нивоа TBARS и O<sub>2</sub><sup>-</sup> у плазми пацова са МетС-ом. Да би спречиле оштећења

---

---

изазвана ROS, ћелије су развиле антиоксидациони систем одбране. Сматра се да ДАТС, највероватније преко овог система одбране остварује своје антиоксидационе и заштитне ефекте. Као што је приказано на **Графику 37**, нивои свих праћених антиоксидационих параметара били су значајно већи код пацова са МетС-ом третираних ДАТС-ом. У МетС-у, смањени нивои GSH, који највероватније настају као последица смањења GSH прекурсора аминокиселина (цистеин, глутамат, глицин), су директни индикатори оксидационог стреса. У нашем моделу, пацови са МетС-ом имали су смањену активност GSH, али је третман ДАТС-ом ове вредности вратио на физиолошке (сличне онима који су забележени код здравих пацова) (313). ДАТС, вероватно као регулатор H<sub>2</sub>S, зависно од концентрације, утиче на повећање нивоа метилглиоксала у ћелијама васкуларних глатких мишића. Метилглиоксал је добро познат индуктор оксидационог стреса који у хипергликемији настаје као метаболит глукозе. Такође, метилглиоксал се у већим концентрацијама производи и у болестима попут, хипертензије, хиперлипидемије, хиперинулинемије и метаболичког синдрома у целини (314-316). Постоје чврсти докази који потврђују да екстракти белог лука који у себи садрже високе концентрације тиосулфината, утичу на повећање активности NAD(P)H оксидазе (317). Такође, у више научно-истраживачких студија показано је да хипергликемија повећава продукцију ROS, изазива JNK зависну активацију NF-κB, при чему долази до апоптозе ћелија. Третман ДАТС-ом, првенствено спречавајући да дође до повећане продукције ROS, може утицати на смањење апоптозе кардиомиоцита, тако што инхибира JNK/NF-κB сигнални пут (258).

На основу наших, и раније објављених резултата, доказани позитивни ефекти ДАТС-а у великој мери се постижу његовим антиоксидационим ефектом, али све ове резултате и механизме преко којих настају, неопходно је детаљније проучити у будућим истраживањима.

### 5.3.4. Ефекти хроничног третмана ДАТС-ом на срчану функцију (Кардиопротективни капацитет ДАТС-а код пацова са метаболичким синдромом)

Упркос доступној терапији и свеобухватним терапијским водичима, кардиоваскуларне болести су и даље водећи узрок смрти код пацијената са МетС-ом широм света, а посебно у земљама на западу (318). Међутим, још увек нема доступних информација о кардиопротективном ефекту ДАТС-а у метаболичком синдрому. Стога је у овој студији, по први пут испитиван утицај ДАТС-а на функцију миокарда код пацова којима је индукован МетС.

Након хроничног третмана ДАТС-ом, пацови су били подвргнути ехокардиографском прегледу. У групи пацова са МетС-ом, који су третирани ДАТС-ом (МС+ДАТС) забележено је значајно повећање IVSd, IVSs, FS и смањење LVIDs, у односу на групу нетретираних пацова са МетС-ом (**Табела 12** и **Слика 16**). Повећање FS у комбинацији са смањењем системског КП, код пацова из МС+ДАТС групе, указује на побољшану систолну и контрактилну функцију миокарда. Такође, да би се детаљније проучили ефекти ДАТС-а на кардиодинамске параметре, изоловано срце пацова је постављено на *Langendorff*-ов апарат. Током деведесетоминутне *ex vivo* ретроградне перфузије, праћене су промене кардиодинамских параметара, али и продукција прооксидационих параметара у коронарном венском ефлуенту. Примена ДАТС-а током три недеље код пацова са МетС-ом, побољшала је кардиоваскуларну функцију миокарда, што се јасно види, првенствено кроз срчану контрактилну функцију (процењену преко  $dp/dt$  max и  $dp/dt$  min параметара) и смањењене нивое прооксидационих параметара (TBARS,  $O_2^-$  и  $H_2O_2$ ) у коронарном венском ефлуенту (**Табеле 13** и **14**, **Графици 39** и **40**). Такође, и за алицин је показано да уклања реактивне врсте, попут  $OH^-$ ,  $O_2^-$  и  $H_2O_2$  (319). Уклањање реактивних азотних и кисеоничних врста једна је и од карактеристика ДАТС-а, преко којих, највероватније, испољава антиоксидационе ефекте.

Код пацова са МетС-ом, морфологија срца је значајно измењена, па се на срчаном ткиву може уочити некроза, конгестија у крвним судовима, као и неорганизована мишићна влакна без јасних граница. Ипак, као што је приказано на **Слици 16**, третман

ДАТС-ом значајно је нормализовао ове промене код пацова са МетС-ом (МС+ДАТС група). Позитивни ефекти ДАТС-а се манифестују кроз мањи степен губитка миокардних влакана, као и мањом хипертрофијом миокарда.

Претходно је описано да третман екстрактом који се добија од ферментисаног белог лука смањује констрикцију и доприноси релаксацији васкуларних крвних судова, као и да побољшава реактивност артерија у аорти код пацова са МетС-ом. Сматра се да су за, наведене протективне ефекте, најодговорнији S-алил цистеин који се може изоловати из овог екстракта. S-алил цистеин највероватније повећава нивое NO и омогућава вазодилатацију, кроз стимулацију eNOS (320). Резултати нашег истраживања показују да и ДАТС утиче на повећање нивоа NO<sub>2</sub><sup>-</sup> у срцу, који могу бити посредовани NO, који настаје услед повећане активности eNOS у срцу. Наиме, ДАТС може стимулирати H<sub>2</sub>S да активира eNOS и повећа доступност NO у организму (42). Такође, у нашој студији показано је да третман ДАТС-ом значајно утиче на смањење атерогеног индекса који је важан индикатор ризика за коронарне болести срца. ДАТС овај ефекат постиже тако што смањује TG, LDL, TC, прооксидационе параметре и повећава HDL и антиоксидационе параметре.

### ***5.3.5. Ефекти хроничног третмана ДАТС-ом на ex vivo индуковану И/Р повреду изолованог срца пацова (ДАТС као прекодиционирајући агенс код пацова са метаболичким синдромом)***

Имајући у виду да је исхемија миокарда најозбиљнија последица неадекватно третираних кардиоваскуларних болести (163), у нашој студији посебна пажња је посвећена испитивању ефеката третмана ДАТС-ом на ex vivo индуковану И/Р повреду код пацова са МетС-ом. У примећеном моделу, примећено је да пацови са МетС-ом имају значајно смањене вредности SLVP, DLVP и CF током периода реперфузије. Са друге стране, код пацова са МетС-ом који су током три недеље били третирани ДАТС-ом, вредности ових параметара биле су готово константне, током тридесетоминутне реперфузије (**Табела 15, График 41**). Као последица акумулације ендогених метаболита (ROS, калцијум, тромбин, фактор активирања тромбоцита) у срцу током И/Р, на нивоу

ћелија и органа настаје низ комплексних реакција које изазивају аритмије, морфолошке промене ткива миокарда и друге штетне ефекте. Блокада ендogene синтезе  $H_2S$ , може да промени електрофизиологију ћелија (посебно на нивоу јонских канала) и да допринесе настанку аритмија (321). У нашој студији јасно се уочава кардиопротективни ефект ДАТС-а на *ex vivo* индукованој И/Р повреди миокарда, јер су кардиодинамски параметри код срца пацова који су третирани ДАТС-ом, били без значајних флукуација током периода реперфузије. Механизми који су укључени у кардиопротекцију ДАТС-а вероватно су исти као код здравих или пацова са дијабетесом и подразумевају отварање К-АТР канала, активацију РКС (322), уклањање ROS (323) који заједно утичу на спречавање уласка  $Ca^{2+}$  у ћелије и скраћење акционог потенцијала (321). Битно је напоменути да централну улогу у кардиопротекцији, ДАТС постиже отварањем К-АТР канала и активацијом РКС. Иако је улога К-АТР канала у смањењу и спречавању последица које настају услед И/Р повреде показана на више различитих анималних и хуманих модела, још увек није познато који подтип К-АТР канала је најзаслужнији за ове ефекте (324).

Механизми одговорни за *ex vivo* индуковану И/Р повреду миокарда укључују многе реактивне процесе, као што су оксидациони стрес, инфламација, апоптоза и други. Ове биолошке реакције стимулишу једна другу и изазивају бројне промене како у анатомији, тако и у функцији миокарда (321-324). Резултати ове студије потврђују да хронични третман ДАТС-ом пружа заштиту од И/Р повреде у срцу. Наиме, побољшање кардиодинамских параметара праћено је антиоксидационим, антиинфламацијским и антиапоптотским ефектима код пацова са МетС-ом, који су третирани ДАТС-ом. Наши резултати показали су да третман ДАТС-ом инхибира продукцију ROS у коронарном венском ефлуенту и повећава ниво релативне експресије гена за поједине антиоксидационе параметре у левој комори срца пацова са МетС-ом. Као што је приказано на **Графику 42** и у **Табели 16**, третман ДАТС-ом значајно је смањио нивое TBARS,  $O_2^-$  и  $H_2O_2$  у периоду стабилизације, као и током читавог периода реперфузије. Ови резултати били су прилично очекивани, јер ДАТС може да индукује продукцију  $H_2S$  који је добро познат као активатор ендogene антиоксидационе одбране и инхибитор бројних прооксидационих параметара. *Calvert* и његови сарадници су у својој студији дали детаљније објашњење наводећи да се ови ефекти првенствено постижу преко Nrf2 зависног пута (78). У корелацији са овим резултатима и у нашој студији је показано да

третман ДАТС-ом повећава релативну експресију гена за SOD-1 и SOD-2 у левој комори миокарда (**График 43**). Уз то, јако је битна чињеница да повећање SOD директно утиче на смањење кардиомиопатије, док екзогени и ендогени H<sub>2</sub>S доприноси снажним цитопротективним ефектима у различитим моделима срчане инсуфицијенције (258).

Прекомерна продукција ROS уз смањење антиоксидационих параметара, промену морфологије миокарда, стимулацију бројних инфламацијских и апоптотских маркера може допринети развоју патолошких процеса који су повезани са ендотелном дисфункцијом карактеристичном за срца која су била изложена И/Р повреди. У нашем истраживању, третман ДАТС-ом утицао је на смањење едема и инфламацију (**Слика 18**), али и на смањење површине захваћене некрозом (**Слика 19**) у срчаном ткиву пацова са MetC-ом. Имајући на уму резултате који су добијени у нашој студији, може се рећи да ДАТС има потенцијал да сачува како функцију, тако и структуру миокарда који је био изложен исхемији и реперфузији. У претходно објављеним студијама, наводи се да услед дуготрајне конзумације воденог екстракта белог лука долази до смањења системског оксидационог стреса и да се спречавају промене које настају у васкуларној структури артерија бубрега. Слични резултати примећени су у случају ДАТС-а. Наиме, код пацова са MetC-ом који су били третирани ДАТС-ом, примећени су значајно нижи нивои оксидационих, инфламацијских и апоптотских параметара. Испитујући ефекте ДАТС-а на релативну експресију гена за неколико (анти)инфламацијских параметара у левој комори, примећена је значајно смањена експресија гена за NF-κB и IL-17A (**График 45**). У литератури већ постоје чврсти докази који иду у прилог томе да бели лук и једињења изолована из белог лука инхибирају експресију ћелијских адхезионих молекула, тако што регулишу интраћелијске путеве трансдукције попут AP-1 и JNK или NF-κB (258). Прекондиционарање NaHS спречава деградацију и транслокацију NF-κB и доприноси очувању срца и бубрега. Према литературним подацима, још увек се са сигурношћу не може утврдити да ли H<sub>2</sub>S поседује анти или проинфламацијска својства (69, 327), док се на основу резултата наше студије може рећи да ДАТС поседује антиинфламацијске ефекте.

Инфламација са повишеним имунокомпетентним ћелијама у срчаном ткиву игра кључну улогу у патофизиологији кардиомиопатије и обично је праћена са неколико регулаторних гена који посредују сигнаlima за апоптозу. Међу њима, Bcl-2 фамилија се издваја као најзначајнија. У левој комори срца пацова са MetC-ом, који су били



подвргнути И/Р повреди, релативне експресије гена за Вах, каспазу-3 и каспазу-9 биле су значајно повећане, док је експресија гена за Bcl-2 била значајно смањена у поређењу са групом здравих пацова подвргнутих И/Р. Са друге стране, хронични третман ДАТС-ом значајно је смањио релативну експресију гена за Вах и обе испитиване каспазе, док је релативна експресија гена за Bcl-2 била повећана (**График 44**). Утврђени антиапоптотски ефекти ДАТС-а (**Слика 20**), највероватније настају као последица повећаног нивоа  $H_2S$  и његове способности да фосфорилише неколико протеина, као што су ERK, PI3K и Akt који могу да утичу на преживљавање ћелија (78).

На самом крају, на основу наших резултата, можемо рећи да хронични третман ДАТС-ом омогућава опоравак функције миокарда након *ex vivo* индиковане И/Р повреде, тако што промовише вазодилатацију, антиапоптотске, антиинфламацијске и антиоксидационе ефекте.

#### **5.4. ПОРЕЂЕЊЕ ЕФЕКТА ДАТС-а ИЗМЕЂУ ЗДРАВИХ, ПАЦОВА СА ДИЈАБЕТЕСОМ И ПАЦОВА СА МЕТАБОЛИЧКИМ СИНДРОМОМ**

У циљу добијања што потпуније слике о (кардио)протективним својствима ДАТС-а, његови ефекти су испитивани на здравим и пацовим којима је индикован Т1ДМ, односно MetS, док је *ex vivo* функција миокарда проучавана кроз два различита протокола (са и без изазване И/Р повреде). Будући да су ефекти третмана ДАТС-ом на сваком од примењених протокола детаљано описани у претходним поглављима, у овом поглављу само ће се истаћи најбитније сличности, односно разлике које ДАТС третман остварује код испитиваних група пацова. Међусобно поређење ефеката третмана ДАТС-ом код наведених група пацова, има за циљ да утврди специфичности овог третмана у зависности од индивидуалних карактеристика здравих, односно пацова са дијабетесом и метаболичким синдромом.

Иако су кардиопротективни ефекти третмана ДАТС-ом забележени у свим испитиваним групама, ехокардиографским мониторингом утврђено је да су они израженији у МС+ДАТС у односу на ДМ+ДАТС групу (**Табеле 3, 8 и 13**). Са друге стране, третман ДАТС-ом смањио је однос масе срца и тежине пацова, само код пацова

са ДМ (**Графици 2, 18 и 31**). Такође, приликом *ex vivo* испитивања, примећено је да ДАТС третман доприноси побољшању притиска у левој комори, само код пацова са ДМ (**Графици 10, 23 и 39**), док су параметри оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту били слични код свих испитиваних група.

Када је реч о испитиваним параметрима системског оксидационог стреса, занимљива је чињеница да примена ДАТС-а, ни у једном од испитиваних модела није утицао на ниво  $H_2O_2$ , док је ниво TBARS био значајно снижен код здравих и пацова са МетС-ом (**Графици 7, 20 и 36**). Са друге стране иако је третман ДАТС-ом значајно повећао активност оба праћена антиоксидациона ензима (CAT и SOD), ниво GSH, као представника неензимских антиоксидационих параметара, био је значајно повећан само код пацова са МетС-ом који су били третиран ДАТС-ом (**Графици 8, 21 и 37**).

Што се тиче ефеката ДАТС-а на И/Р повреду, битно је напоменути да код већине испитиваних параметара постоје апсолутна поклапања између група, па је тако побољшана контрактилна способност код пацова храњених ДАТС-ом примећена и код здравих, али и код пацова са МетС-ом и ДМ (**Графици 12, 25 и 41**). ДАТС третман је утицао на повећање релативне експресије гена за SOD-1 и каспазу-9 само код пацова са МетС-ом (**Графици 43 и 44**), док су позитивни ефекти на релативну експресију гена за (анти)инфламацијске параметре били израженији у ДМ+ДАТС групи (**График 29**).

Иако постоје поједине специфичности третмана ДАТС-ом у зависности од тога да ли су пацови здрави или болесни, нема сумње да хронични третман може побољшати редокс статус и функцију миокарда код здравих пацова, док код пацова са дијабетесом и метаболичким синдромом може утицати и на смањење манифестација болести.

## 5.5. БУДУЋА ИСТРАЖИВАЊА

Иако су протективни ефекти  $H_2S$  познати годинама, многи аспекти у његовом заштитном механизму су и даље нејасни. За проучавање биолошких ефеката  $H_2S$  и опонашање његове ендogene продукције, најчешће се користе донори  $H_2S$ . Резултати који су у овој студији представљени и дискутовани, могу подстаћи и друга истраживања посвећена испитивању ефеката ДАТС-а у различитим моделима. Такође, било би од

великог значаја испитати ефекте ДАТС-а у превенцији ДМ и МетС-а, као и ефекте третмана ДАТС-ом на *in vivo* индуковану И/Р повреду миокарда. Имајући у обзир резултате наше и претходно објављених студија, ДАТС би могао бити значајан кандидат као суплемент у третману ДМ и МетС-а, али су неопходна даља истраживања која би објаснила све механизме одговорне за наведене протективне ефекте.

Иако су у овом истраживању, у више наврата, показани позитивни ефекти третмана ДАТС-ом, још увек се поставља питање да ли је могуће применити терапију ДАТС-ом и код људи. Узимајући у обзир да метаболизам код људи и животиња није у потпуности исти, не може се ставити знак једнакости између експерименталних и клиничких истраживања (259). Такође, важно је напоменути да испитивана доза ДАТС-а не може бити замењена конзумирањем белог лука код људи, јер човек (просечне телесне тежине око 70 kg) треба да узима 2,8 kg белог лука сваког другог дана, да би се постигла адекватна доза ДАТС-а (328). Стога, да би се отпочело са применом ДАТС-а код људи, неопходне су клиничке студије у којима би се испитивале микрокапсуле са ДАТС-ом у себи. Иако се на основу резултата наше студије може закључити да се ДАТС добро толерише и да је безбедан за употребу, неопходна су даља истраживања у којима би се испитивали детаљи у вези нежељених ефеката ДАТС-а.

**VI**

**ЗАКЉУЧЦИ**

---

## 6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата који су добијени у нашој студији, као и до сада објављених података из литературе, изведени су следећи закључци:

- Пратећи унос воде и хране, телесну тежину, биохемијске и липидне параметре, као и функцију миокарда, закључује се да је ДАТС (у дози од 40 mg/kg, сваког другог дана током три недеље) безбедан за употребу и да се добро толерише и подноси.
- Третман ДАТС-ом код пацова са дијабетесом и пацова са МетС-ом допринео је смањењу нивоа хомоцистеина и враћању његових вредности на физиолошке. Смањењем нивоа хомоцистеина и повећањем  $H_2S$  у серуму, директно се смањује и ризик од кардиоваскуларних обољења, али и степен оштећења других органа.
- Третман ДАТС-ом допринео је значајном повећању ензимских и неензимских антиоксидационих параметара у лизату еритроцита, паралелно са смањењем прооксидационих параметара у плазми и коронарном венском ефлуенту, што указује да су ефекти на редокс статус један од важних механизма који учествују у протективним ефектима ДАТС-а.
- Тронедельни третман ДАТС-ом довео је до снажних кардиопротективних ефеката и спречио оштећења функције и структуре миокарда која настају као последица кардиометаболичких обољења.
- ДАТС се показао као веома ефикасан прекондиционарајући агенс, како код здравих тако и код пацова са дијабетесом, односно метаболичким синдромом. Уз очување функције миокарда која се огледала кроз скоро константне вредности кардиодинамских параметара, третман ДАТС-ом спречио је промене на ткиву миокарда.
- Значајном регулацијом хипергликемије код пацова са дијабетесом, ДАТС је показао снажан потенцијал да умањи манифестације дијабетеса.
- Третман ДАТС-ом допринео је корисним васкуларним и метаболичким ефектима и ублажио манифестације метаболичког синдромом, а уз то смањио је и атерогени индекс који је важан индикатор ризика за коронарне болести срца.
- Наведене протективне улоге, ДАТС остварује преко антиоксидационих, антиинфламацијских и антиапоптозских ефеката.

**VII**

**РЕФЕРЕНЦЕ**

---

**7. РЕФЕРЕНЦЕ**

1. Meister A, Fraser PE, Tice SV. Enzymatic desulfuration of  $\beta$ -mercaptopyruvate to pyruvate. *J Biol Chem.* 1954;206:561–575.
2. Beauchamp R, Bus JS, Popp JA, Boreiko CJ, Andjelkovich DA, Leber P. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *CRC Crit Rev Toxicol.* 1984;13:25–97.
3. Cavallini D, Mondovi B, De Marco C, Scioscia-Santoro A. The mechanism of desulphhydration of cysteine. *Enzymologia.* 1962;24:253–266.
4. Goodwin LR, Francom D, Dieken FP, Taylor JD, Warenycia MW, Reiffenstein RJ, Dowling G. Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: postmortem studies and two case reports. *J Anal Toxicol.* 1989;13:105–109.
5. Warenycia MW, Goodwin LR, Benishin CG, Reiffenstein RJ, Grancom DM, Taylor JD, et al. Acute hydrogen sulfide poisoning. Demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels. *Biochem Pharmacol.* 1989;38:973–981.
6. Wang R. The gasotransmitter role of hydrogen sulfide. *Antioxid Redox Signal* 2003;5:493–501.
7. Wang R. Two's company, three's a crowd – can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J* 2002;16:1792–1798.
8. Wang R. Gasotransmitter: growing pains and joys. *Trends Biochem Sci.* 2014;39:227–232.
9. Searcy DG, Lee SH. Sulfur reduction by human erythrocytes. *J Exp Zool.* 1998;282:310–322.
10. Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y, Nagahara N, Kimura H. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. *J Biochem.* 2009;146:623–626.
11. Yusuf M, Huat BTK, Hsu A, Whiteman M, Bhatia M, Moore PK. Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with enhanced tissue hydrogen sulfide biosynthesis. *Biochemical and biophysical research communications.* 2005;333:1146–1152.
12. Xu S, Liu Z, Liu P. Targeting hydrogen sulfide as a promising therapeutic strategy for atherosclerosis. *International journal of cardiology.* 2014;172:313–317.
13. Kimura H. The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. *Nitric oxide.* 2014;41:4–10.
14. Singh S, Padovani D, Leslie T, Chiku RA, Banerjee R. Relative contributions of cystathionine beta-synthase and gammacystathionase to H<sub>2</sub> S biogenesis via alternative trans-sulfuration reactions. *J. Biol. Chem.* 2009;284:22457–22466.
15. Tanizawa K. Production of H<sub>2</sub>S by 3-mercaptopyruvate sulphurtransferase. *J. Biochem.* 2011;149:357–359.
16. Zhao Z, Liu X, Shi S, Li H, Gao F, Zhong X, et al. Exogenous hydrogen sulfide protects from endothelial cell damage, platelet activation, and neutrophils extracellular traps formation in hyperhomocysteinemia rats. *Experimental cell research.* 2018;370:434–443.
17. Rong-na L, Xiang-jun Z, Yu-han C, Ling-qiao L, Gang H. Interaction between hydrogen sulfide and nitric oxide on cardiac protection in rats with metabolic syndrome. *Zhongguo yi xue ke xue yuan xue bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae.* 2011;33:25–32.
18. Li L, Rose P, Moore PK. Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2011;51:169–187.

19. Caliendo G, Cirino G, Santagada V, Wallace JL. Synthesis and biological effects of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S): development of H<sub>2</sub>S-releasing drugs as pharmaceuticals. *J. Med. Chem.* 2010;53:6275–6286.
20. Levitt MD, Abdel-Rehim MS, Furne J. Free and acid-labile hydrogen sulfide concentrations in mouse tissues: anomalously high free hydrogen sulfide in aortic tissue. *Antioxid. Redox Signal.* 2011;15:373–378.
21. Insko MA, Deckwerth TL, Hill P, Toombs CF, Szabo C. Detection of exhaled hydrogen sulphide gas in rats exposed to intravenous sodium sulphide. *Br. J. Pharmacol.* 2009;157:944–951.
22. Huang CW, Moore PK. H<sub>2</sub>S synthesizing enzymes: biochemistry and molecular aspects. In *Chemistry, biochemistry and pharmacology of hydrogen sulfide* Springer, Cham. 2015; pp. 3–25.
23. Zhao Y, Pacheco A, Xian M. Medicinal chemistry: insights into the development of novel H<sub>2</sub>S donors. In *Chemistry, Biochemistry and Pharmacology of Hydrogen Sulfide*. 2015; pp. 365–388.
24. Zhao Y, Wang H, Xian M. Cysteine-activated hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) donors. *Journal of the American Chemical Society.* 2010;133:15–17.
25. Whiteman M, Li L, Rose P, Tan CH, Parkinson DB, Moore PK. The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. *Antioxidants & redox signaling.* 2010;12:1147–1154.
26. DeLeon ER, Stoy GF, Olson KR. Passive loss of hydrogen sulfide in biological experiments. *Anal Biochem.* 2012;421:203–207.
27. Nagy P, Palinkas Z, Nagy A, Budai B, Toth I, Vasas A. Chemical aspects of hydrogen sulfide measurements in physiological samples. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840:876–891.
28. Li L, Whiteman M, Guan YY, et al. Characterization of a Novel, Water-Soluble Hydrogen Sulfide-Releasing Molecule (GYY4137) Circulation. 2018;117:2351–2360.
29. Lee ZW, Zhou J, Chen CS, et al. The Slow-Releasing Hydrogen Sulfide Donor, GYY4137, Exhibits Novel Anti-Cancer Effects In Vitro and In Vivo. *PLoS One.* 2011;6:e21077.
30. Moore PK, Whiteman M. *Chemistry, biochemistry and pharmacology of hydrogen sulfide.* Springer; 2015. pp. 344–354.
31. Wu J, Li Y, He C, Kang J, Ye J, Xiao Z, et al. Novel H<sub>2</sub>S Releasing Nanofibrous Coating for In Vivo Dermal Wound Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8:27474–27481.
32. Hammers MD, Singh L, Montoya LA, Moghaddam AD, Pluth MD. Synthesis of Amino-ADT Provides Access to Hydrolytically Stable Amide-Coupled Hydrogen Sulfide Releasing Drug Targets. *Synlett.* 2016;27:1349–1353.
33. Powell CR, Dillon KM, Matson JB. A review of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications. *Biochemical pharmacology.* 2018;149:110–123.
34. Xiao Z, Bonnard T, Shakouri-Motlagh A, Wylie RAL, Collins J, White J, et al. Triggered and Tunable Hydrogen Sulfide Release from Photogenerated Thiobenzaldehydes. *Chem Eur J.* 2017;23:11294–11300.
35. Fukushima N, Ieda N, Sasakura K, Nagano T, Hanaoka K, Suzuki T, et al. Synthesis of a photocontrollable hydrogen sulfide donor using ketoprofenate photocages. *Chem Commun.* 2014;50:587–589.



36. Shukla P, Khodade VS, SharathChandra M, Chauhan P, Mishra S, Siddaramappa S, et al. "On demand" redox buffering by H<sub>2</sub>S contributes to antibiotic resistance revealed by a bacteria-specific H<sub>2</sub>S donor. *Chemical Science*. 2017;8:4967–4972.
37. Li Z, Organ CL, Zheng Y, Wang B, Lefer DJ. Novel Esterase-Activated Hydrogen Sulfide Donors Attenuate Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation*. 2016;134:A17903–A17903.
38. Zheng Y, Yu B, Ji K, Pan Z, Chittavong V, Wang B. Esterase-Sensitive Prodrugs with Tunable Release Rates and Direct Generation of Hydrogen Sulfide. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016;55:4514–4518.
39. Pluth MD, Bailey TS, Hammers MD, Hartle MD, Henthorn HA, Steiger AK. Natural Products Containing Hydrogen Sulfide Releasing Moieties. *Synlett*. 2015;26:2633–2643.
40. Rose P, Whiteman M, Moore PK, Zhu YZ. Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents. *Nat Prod Rep*. 2005;22:351.
41. Zeng Y, Li Y, Yang J, Pu X, Du J, et al. Therapeutic role of functional components in *Alliums* for preventive chronic disease in human being. *hindawi.com* [Internet]. 2017.
42. Bradley JM, Organ CL, Lefer DJ. Garlic-Derived Organic Polysulfides and Myocardial Protection. *J Nutr*. 2016;146:403S–409S.
43. Karwi QG, Bice JS, Baxter GF. Pre- and postconditioning the heart with hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) against ischemia/reperfusion injury in vivo: a systematic review and meta-analysis. *Basic Res Cardiol*. 2018;113:1–21.
44. Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y. Intake of Garlic and Its Bioactive Components. *J Nutr*. 2001;131:955S–962S.
45. Kamel A, Saleh M. Recent Studies on the Chemistry and Biological Activities of the Organosulfur Compounds of Garlic (*Allium sativum*). *Stud Nat Prod Chem*. 2000;23:455–485.
46. Iciek M, Kowalczyk-Pachel D, Bilska-Wilkosz A, Kwiecień I, Górny M, Włodek L. S-sulfhydration as a cellular redox regulation. *Biosci Rep*. 2015;36(2).
47. Bayan L, Koulivand PH, Gorji A. Garlic: a review of potential therapeutic effects. *Avicenna J Phytomed*. 2014;4:1–14.
48. Cai YR, Hu CH. Computational Study of H<sub>2</sub>S Release in Reactions of Diallyl Polysulfides with Thiols. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2017;121:6359–6366.
49. Miles EW, Kraus JP. Cystathionine β-Synthase: Structure, Function, Regulation, and Location of Homocystinuria-causing Mutations. *J Biol Chem*. 2004;279:29871–29874.
50. Wen SY, Tsai CY, Pai PY, Chen YW, Yang YC, Aneja R, et al. Diallyl trisulfide suppresses doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis by inhibiting MAPK/NF-κB signaling through attenuation of ROS generation. *Environ Toxicol*. 2018;33:93–103.
51. Tisserand R, Young R. Constituent profiles [Internet]. 2nd ed. *Essential Oil Safety*. Robert Tisserand and Rodney Young. 2014;483–647.
52. Pan LL, Liu XH, Gong QH, Yang HB, Zhu YZ. Role of cystathionine γ-lyase/hydrogen sulfide pathway in cardiovascular disease: a novel therapeutic strategy? *Antioxidants & redox signaling*. 2012;17:106–118.
53. Sun X, Guo T, He J, Zhao M, Yan M, Cui F, et al. Determination of the concentration of diallyl trisulfide in rat whole blood using gas chromatography with electron-capture detection and

- identification of its major metabolite with gas chromatography mass spectrometry. *Yakugaku Zasshi*. 2006;126:521–527.
54. Rosen RT, Hiserodt RD, Fukuda EK, Reginald J, Zhou Z, Lech J, et al. Recent Advances on the Nutritional Effects Associated with the Use of Garlic as a Supplement Determination of Allicin , S -Allylcysteine and Volatile Metabolites of Garlic in Breath , Plasma or Simulated Gastric Fluids. 2001;1:968–971.
  55. Suarez F, Springfield J, Furne J, Levitt M. Differentiation of mouth versus gut as site of origin of odoriferous breath gases after garlic ingestion. *Am J Physiol Liver Physiol*. 1999;276:G425–30.
  56. Egen-Schwind C, Eckard R, Kemper FH. Metabolism of garlic constituents in the isolated perfused rat liver. *Planta Med*. 1992;58:301–305.
  57. Fukao T, Hosono T, Misawa S, Seki T, Ariga T. The effects of allyl sulfides on the induction of phase II detoxification enzymes and liver injury by carbon tetrachloride. *Food Chem Toxicol*. 2004;42:743–749.
  58. Munday R, Munday CM. Relative activities of organosulfur compounds derived from onions and garlic in increasing tissue activities of quinone reductase and glutathione transferase in rat tissues. *Nutr Cancer*. 2001;40:205–210.
  59. Wu CC, Sheen LY, Chen HW, Kuo WW, Tsai SJ, Lii CK. Differential effects of garlic oil and its three major organosulfur components on the hepatic detoxification system in rats. *J Agric Food Chem*. 2002;50:378–383.
  60. Kennett EC, Kuchel PW. Redox Reactions and Electron Transfer Across the Red Cell Membrane. *IUBMB Life*. 2003;55:375–385.
  61. Benavides GA, Squadrito GL, Mills RW, et al. Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *Natl Acad Sci*. 2007;104:17977–17982.
  62. Miron T, Rabinkov A, Mirelman D, Wilchek M, Weiner L. The mode of action of allicin: Its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2000;1463:20–30.
  63. Rabinkov A, Miron T, Konstantinovski L, Wilchek M, Mirelman D, Weiner L. The mode of action of allicin: Trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 1998;1379:233–244.
  64. Liang D, Wu H, Wong MW, Huang D. Diallyl Trisulfide Is a Fast H<sub>2</sub>S Donor, but Diallyl Disulfide Is a Slow One: The Reaction Pathways and Intermediates of Glutathione with Polysulfides. *Org Lett*. 2015;17:4196–4199.
  65. Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Leal J, Luengo-Fernandez R, et al. European cardiovascular disease statistics 2017. European Heart Network: Brussels, Belgium, 2017.
  66. Piche ME, Poirier P, Lemieux I, Despres JP. Overview of epidemiology and contribution of obesity and body fat distribution to cardiovascular disease: an update. *Progress in cardiovascular diseases*. 2018;61:103–113.
  67. Slater T, Abshire M, Davidson P. Assessment of breathlessness: A critical dimension of identifying cardiovascular disease. *Australian Nursing and Midwifery Journal*. 2018;25:36.
  68. Sabino JPJ, Soriano RN, Santos BM, Donatti AF, Fernandez RR, da Silva GS, Branco LG. Central administration of aminooxyacetate, an inhibitor of H<sub>2</sub>S production, affects

- thermoregulatory but not cardiovascular and ventilatory responses to hypercapnia in spontaneously hypertensive rats. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2019;263:38–46.
69. Sivarajah A, McDonald MC, Thiemermann C. The production of hydrogen sulfide limits myocardial ischemia and reperfusion injury and contributes to the cardioprotective effects of preconditioning with endotoxin, but not ischemia in the rat. *Shock*. 2006;26:154–161.
  70. Sodha NR, Clements RT, Feng J, et al. Hydrogen sulfide therapy attenuates the inflammatory response in a porcine model of myocardial ischemia/reperfusion injury. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2009;138:977–984.
  71. Kimura Y, Goto Y, Kimura H. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxidants Redox Signaling*. 2010;12:1–13.
  72. Heusch G, Libby P, Gersh B, et al. Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *The Lancet*. 2014;383:1933–1943.
  73. Andreadou I, Iliodromitis EK, Rassaf T, Schulz R, Papapetropoulos A, Ferdinandy P. The role of gasotransmitters NO, H<sub>2</sub>S and CO in myocardial ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning and remote conditioning. *British Journal of Pharmacology*. 2015;172:1587–1606.
  74. Lee GJ, Kim SK, Kang SW, et al. Real time measurement of myocardial oxygen dynamics during cardiac ischemia-reperfusion of rats. *Analyst*. 2012;137:5312–5319.
  75. Hausenloy DJ, Yellon DM. The therapeutic potential of ischemic conditioning: an update. *Nature Reviews Cardiology*. 2011;8:619–629.
  76. Yong QC, Lee SW, Foo CS, et al. Endogenous hydrogen sulphide mediates the cardioprotection induced by ischemic postconditioning. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 2008;295:H1330–H1340.
  77. Hu Y, Chen X, Pan TT, et al. Cardioprotection induced by hydrogen sulfide preconditioning involves activation of ERK and PI3K/Akt pathways. *Pflugers Archiv*. 2008;455:607–616.
  78. Calvert JW, Jha S, Gundewar S, et al. Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling. *Circulation Research*. 2009;105:365–374.
  79. Zhang H, Zhi L, Mochhala SM, Moore PK, Bhatia M. Endogenous hydrogen sulfide regulates leukocyte trafficking in cecal ligation and puncture-induced sepsis. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007;82:894–905.
  80. Sivarajah A, Collino M, Yasin M, et al. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R. *Shock*. 2009;31:267–274.
  81. Gao Y, Yao X, Zhang Y et al. The protective role of hydrogen sulfide in myocardial ischemia-reperfusion-induced injury in diabetic rats. *International Journal of Cardiology*. 2011;152:177–183.
  82. Sun WH, Liu F, Chen Y, Zhu, YC. Hydrogen sulfide decreases the levels of ROS by inhibiting mitochondrial complex IV and increasing SOD activities in cardiomyocytes under ischemia/reperfusion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012;421:164–169.
  83. Bliksoen M, Kaljusto ML, Vaage J, Stenslokken KO. Effects of hydrogen sulphide on ischaemia-reperfusion injury and ischaemic preconditioning in the isolated, perfused rat heart. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*. 2008;34:344–349.

84. Hu LF, Pan TT, Neo KL, Yong QC, Bian JS. Cyclooxygenase-2 mediates the delayed cardioprotection induced by hydrogen sulfide preconditioning in isolated rat cardiomyocytes *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. 2008;455:971–978.
85. Zhang WJ, Shi ZX, Wang BB, Cui YJ, Guo JZ, Li B. Allitridum mimics effect of ischemic preconditioning by activation of protein kinase C. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2011;22:132–136.
86. Osipov RM, Robich MP, Feng J, et al. Effect of hydrogen sulfide in a porcine model of myocardial ischemia-reperfusion: comparison of different administration regimens and characterization of the cellular mechanisms of protection. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2009;54:287–297.
87. Bibli SI, Andreadou I, Chatzianastasiou A, Tzimas C, Sanoudou D, Kranias E, et al. Cardioprotection by H<sub>2</sub>S engages a cGMP-dependent protein kinase G/phospholamban pathway. *Cardiovasc. Res*. 2015;106:432–442.
88. Joshi SR, Parikh RM, Das AK. Insulin-history, biochemistry, physiology and pharmacology. *Journal-Association of Physicians of India*. 2007;55:19.
89. Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress—a concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2016;24:547–553.
90. Kangralkar VA, Patil SD, Bandivadekar RM. Oxidative stress and diabetes: a review. *International Journal of Pharmaceutical Applications*. 2010;1:38–45.
91. American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes—2018. *Diabetes care*. 2018;41:S13–S27.
92. Sun Y, Tian Z, Liu N, Zhang L, Gao Z, Sun X, et al. Exogenous H<sub>2</sub>S switches cardiac energy substrate metabolism by regulating SIRT3 expression in db/db mice. *J. Mol. Med*. 2018;96:281–299.
93. Newton CA, Raskin P. Diabetic ketoacidosis in type 1 and type 2 diabetes mellitus: clinical and biochemical differences. *Arch Intern Med*. 2004;164:1925–1931.
94. Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, et al. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. *Diabetes*. 2017;66:241–255.
95. Yusuf M, Kwong Huat BT, Hsu A, Whiteman M, Bhatia M, Moore PK. Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with enhanced tissue hydrogen sulfide biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;333:1146–1152.
96. Yang G, Tang G, Zhang L, Wu L, Wang R. The pathogenic role of cystathionine  $\gamma$ -lyase/hydrogen sulfide in streptozotocin-induced diabetes in mice. *Am J Pathol*. 2011;179:869–879.
97. Brancalone V, Roviezzo F, Vellecco V, De Gruttola L, Bucci M, Cirino G. Biosynthesis of H<sub>2</sub>S is impaired in non-obese diabetic (NOD) mice. *Br J Pharmacol*. 2008;155:673–680.
98. Jain SK, Bull R, Rains JL, Bass PF, Levine SN, Reddy S, McVie R, Bocchini JA. Low levels of hydrogen sulfide in the blood of diabetes patients and streptozotocin-treated rats causes vascular inflammation? *Antioxid Redox Signal* 2010;12:1333–1337.
99. Yakubova A, Thorrez L, Svetlichnyy D, Zwarts L, Vulsteke V, Laenen G, et al. ACE-inhibition induces a cardioprotective transcriptional response in the metabolic syndrome heart. *Scientific reports*. 2018;8:16169.
100. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al; American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. *Diagnosis and management of the*

- metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005;112:2735–2752.
101. Ballestri S, Zona S, Targher G, Romagnoli D, Baldelli E, Nascimbeni F, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with an almost twofold increased risk of incident type 2 diabetes and metabolic syndrome. Evidence from a systematic review and meta-analysis. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2016;31:936–944.
  102. Okamoto M, Yamaoka M, Takei M, Ando T, Taniguchi S, Ishii I, Tohya K, Ishizaki T, Niki I, Kimura T. Endogenous hydrogen sulfide protects pancreatic beta-cells from a high-fat diet-induced glucotoxicity and prevents the development of type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;442:227–233.
  103. Yang W, Yang G, Jia X, Wu L, Wang R. Activation of KATP channels by H<sub>2</sub>S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. *J. Physiol*. 2005;569:519–531.
  104. Tang G, Zhang L, Yang G, Wu L, Wang R. Hydrogen sulfide-induced inhibition of L-type Ca<sup>2+</sup> channels and insulin secretion in mouse pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 2013;56:533–541.
  105. Feng X, Chen Y, Zhao J, Tang C, Jiang Z, Geng B. Hydrogen sulfide from adipose tissue is a novel insulin resistance regulator. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2009;380:153–159.
  106. Wu L, Yang W, Jia X, Yang G, Duridanova D, Cao K, Wang R. Pancreatic islet overproduction of H<sub>2</sub>S and suppressed insulin release in Zucker diabetic rats. *Lab. Invest*. 2009;89:59–67.
  107. Szabo C. Roles of hydrogen sulfide in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxid. Redox. Signal*. 2012;17:68–80.
  108. Durante W. Hydrogen sulfide therapy in diabetes-accelerated atherosclerosis: A whiff of success. *Diabetes*. 2016;65:2832–2834.
  109. Suzuki K, Sagara M, Aoki C, Tanaka S, Aso Y. Clinical implication of plasma hydrogen sulfide levels in Japanese patients with type 2 diabetes. *Intern. Med*. 2017;56:17–21.
  110. Whiteman M, Gooding KM, Whatmore JL, Ball CI, Mawson D, Skinner K, Tooke JE, Shore AC. Adiposity is a major determinant of plasma levels of the novel vasodilator hydrogen sulphide. *Diabetologia*. 2010;53:1722–1726.
  111. Pichette J, Fynn-Sackey N, Gagnon J. Hydrogen sulfide and sulfate prebiotic stimulates the secretion of GLP-1 and improves glycemia in male mice. *Endocrinology*. 2017;158:3416–3425.
  112. Chatzianastasiou A, Bibli SI, Andreadou I, Efentakis P, Kaludercic N, Wood ME, et al. Cardioprotection by H<sub>2</sub>S donors: nitric oxide-dependent and-independent mechanisms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2016;358:431–440.
  113. Bibli SI, Szabo C, Chatzianastasiou A, Luck B, Zukunft S, Fleming I, Papapetropoulos A. Hydrogen sulfide preserves eNOS function by inhibiting PYK2: implications for cardiomyocyte survival and cardioprotection. *Molecular Pharmacology*. 2017;117. DOI: <https://doi.org/10.1124/mol.117.109645>
  114. Andreadou I, Iliodromitis EK, Rassaf T, Schulz R, Papapetropoulos A, Ferdinandy P. The role of gasotransmitters NO, H<sub>2</sub>S and CO in myocardial ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning and remote conditioning. *British journal of pharmacology*. 2015;172:1587–1606.
  115. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*. 2017;86:715–748.
  116. Choudhury FK, Rivero RM, Blumwald E, Mittler R. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*. 2017;90:856867.

117. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2016;1863:2977–2992.
118. Brown DI, Griendling KK. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. *Circulation research*. 2015;116:531–549.
119. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and biophysical research communications*. 2017;482:419–425.
120. Kagan VE. Lipid peroxidation in biomembranes. CRC press, Boca Raton, FL, 1988.
121. Islam MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurological research*. 2017;39:73–82.
122. Griendling KK, Touyz RM, Zweier JL, Dikalov S, Chilian W, Chen YR, et al. Measurement of reactive oxygen species, reactive nitrogen species, and redox-dependent signaling in the cardiovascular system: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation research*. 2016;119:e39–e75.
123. Dębowska K, Smulik-Izydorzyc R, Pięta J, Adamus J, Michalski R, Sikora A. Oxidation of the selected probes for detection of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) in aqueous solutions of nitric oxide donors. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018;120:S78.
124. Daiber A, Di Lisa F, Oelze M, Kröller-Schön S, Steven S, Schulz E, Münzel T. Crosstalk of mitochondria with NADPH oxidase via reactive oxygen and nitrogen species signalling and its role for vascular function. *British Journal of Pharmacology*. 2017;174:1670–1689.
125. Robaczewska J, Kedziora-Kornatowska K, Kozakiewicz M, Zary-Sikorska E, Pawluk H, Pawliszak W, Kedziora J. Role of glutathione metabolism and glutathione-related antioxidant defense systems in hypertension. *J Physiol Pharmacol*. 2016;67:331–337.
126. Husain K, Hernandez W, Ansari RA, Ferder L. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. *World journal of biological chemistry*. 2015;6:209.
127. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical chemistry*. 1995;41:1819–1828.
128. Taysi S, Polat F, Gul M, Sari RA, Bakan E. Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology international*. 2002;21:200–204.
129. Muellner MK, Schreier SM, Laggner H, Hermann M, Esterbauer H, Exner M, Gmeiner BM, Kapiotis S. Hydrogen sulfide destroys lipid hydroperoxides in oxidized LDL. *Biochem J*. 2009;420:277–281.
130. Searcy DG, Whitehead JP, Maroney MJ. Interaction of Cu,Zn superoxide dismutase with hydrogen sulfide. *Arch Biochem Biophys*. 1995;318:251–263.
131. Carballal S, Trujillo M, Cuevasanta E, Bartsaghi S, Moller MN, Folkes LK, Garcia-Bereguian MA, Gutierrez-Merino C, Wardman P, Denicola A, Radi R, Alvarez B. Reactivity of hydrogen sulfide with peroxynitrite and other oxidants of biological interest. *Free Radic Biol Med*. 2011;50:196–205.
132. Calvert JW, Coetsee WA, Lefter DJ. Novel insights into hydrogen sulfide-mediated cytoprotection. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2010;12:1203–1217.

133. Hasnan J, Yusof MI, Damitri TD, Faridah AR, Adenan AS, Norbaini TH. Relationship between apoptotic markers (Bax and Bcl-2) and biochemical markers in type 2 diabetes mellitus. *Singapore Med J.* 2010;51:50–55.
134. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* 1998;281:1322–1326.
135. Takemura G, Kanoh M, Minatoguchi S, Fujiwara H. Cardiomyocyte apoptosis in the failing heart—a critical review from definition and classification of cell death. *Int J Cardiol.* 2013;167:2373–2386.
136. Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med.* 1999;107:489–506.
137. Zhou X, Lu X. Hydrogen sulfide inhibits high-glucose-induced apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes. *Experimental Biology and Medicine.* 2013;238:370–374.
138. Sodha NR, Clements RT, Feng J, et al. The effects of therapeutic sulfide on myocardial apoptosis in response to ischemia-reperfusion injury. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery.* 2008;33:906–913.
139. Yao LL, Huang XW, Wang YG, Cao YX, Zhang CC, Zhu YC. Hydrogen sulfide protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis by preventing GSK-3 $\beta$ -dependent opening of mPTP. *American Journal of Physiology—Heart and Circulatory Physiology.* 2010;298:H1310–H1319.
140. Pomerantz BJ, Reznikov LL, Harken AH, Dinarello CA. Inhibition of caspase 1 reduces human myocardial ischemic dysfunction via inhibition of IL-18 and IL-1 beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2001;98:2871–2876.
141. Hennein HA, Ebba H, Rodriguez JL, et al. Relationship of the proinflammatory cytokines to myocardial ischemia and dysfunction after uncomplicated coronary revascularization. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.* 1994;108:626–635.
142. Shen Y, Shen Z, Luo S, Guo W, Zhu YZ. The cardioprotective effects of hydrogen sulfide in heart diseases: from molecular mechanisms to therapeutic potential. *Oxidative medicine and cellular longevity.* 2015; <https://doi.org/10.1155/2015/925167>.
143. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest.* 2000;118:503–508.
144. Li L, Hsu A, Moore PK. Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation – a tale of three gases! *Pharmacol. Ther.* 2009;123:386–400.
145. Whiteman M, Winyard PG. Hydrogen sulfide and inflammation: the good, the bad, the ugly and the promising. *Expert Review of Clinical Pharmacology.* 2011;4:13–32.
146. Chiku T, Padovani D, Zhu W, Singh S, Vitvitsky V, Banerjee R. H<sub>2</sub>S biogenesis by human cystathionine  $\gamma$ -lyase leads to the novel sulfur metabolites lanthionine and homolanthionine and is responsive to the grade of hyperhomocysteinemia. *J. Biol. Chem.* 2009;284:11601–11612.
147. Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, et al. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007;104:15560–15565.
148. Zanardo RCO, Brancaleone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *The FASEB Journal.* 2006;20:2118–2120.

149. Wu WJ, Jia WW, Liu XH, Pan LL, Zhang QY, Yang D, Shen XY, Liu L, Zhu YZ. S-propargyl-cysteine attenuates inflammatory response in rheumatoid arthritis by modulating the Nrf2-ARE signaling pathway. *Redox Biol.* 2016;10:157–167.
150. Pan LL, Liu XH, Gong QH, Zhu YZ. S-Propargyl-cysteine (SPRC) attenuated lipopolysaccharide-induced inflammatory response in H9c2 cells involved in a hydrogen sulfide-dependent mechanism. *Amino Acids.* 2011;41:205–215.
151. Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chemother. Rep.* 1963;29:91.
152. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: Relationship of dose to metabolic response. *J. Clin. Invest.* 1969;48:2129–2139.
153. Kolb H. Mouse models of insulin dependent diabetes: Low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Metab. Rev.* 1987;3:751–778.
154. Furman BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current protocols in pharmacology.* 2015;70:5–47.
155. Brondum E, Nilsson H, Aalkjaer C. Functional abnormalities in isolated arteries from Goto-Kakizaki and streptozotocin-treated diabetic rat models. *Horm. Metab. Res.* 2005;37:56–60.
156. Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, Claypool MD, Pinkett JG, Gadbois TM, Reaven GM. A new rat model of type 2 diabetes: The fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism.* 2000;49:1390–1394.
157. Yu L, Li S, Tang X, et al. Diallyl trisulfide ameliorates myocardial ischemia–reperfusion injury by reducing oxidative stress and endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in type 1 diabetic rats: role of SIRT1 Activation. *Apoptosis.* 2017;22:942–954.
158. Liu CT, Hse H, Lii CK, Chen PS, Sheen LY. Effects of garlic oil and diallyl trisulfide on glycemic control in diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 2005;516:165–173.
159. Brown L, Fenning A, Chan V, Loch D, Wilson K, Anderson B, Burstow D. Echocardiographic assessment of cardiac structure and function in rats. *Heart, lung and Circulation.* 2002;11:167–173.
160. Oliveira-Junior SA, Martinez PF, Fan WYC, et al. Association between echocardiographic structural parameters and body weight in Wistar rats. *Oncotarget.* 2017;8:26100–26105.
161. Hulman A, Vistisen D, Glumer C, Bergman M, Witte DR, Færch K. Glucose patterns during an oral glucose tolerance test and associations with future diabetes, cardiovascular disease and all-cause mortality rate. *Diabetologia.* 2018;61:101–107.
162. Leng SH, Lu FE, Xu LJ. Therapeutic effects of berberine in impaired glucose tolerance rats and its influence on insulin secretion. *Acta Pharmacologica Sinica.* 2014;25:496–502.
163. Grundy SM. Metabolic syndrome update. *Trends in cardiovascular medicine.* 2016;26:364–373.
164. Rivera L, Moron R, Zarzuelo A, Galisteo M. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochemical pharmacology.* 2009;77:1053–1063.
165. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95:351–358.
166. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, et al. Analysis of nitrate, nitrite and [15 N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982;126:131–138.



167. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA, eds. Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton, CRC Press. 1995;123–132.
168. Akhgari M, Abdollahi M, Kebryaezadeh A, Hosseini R, Sabzevari O. Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. *Human & experimental toxicology*. 2003;22:205–211.
169. Luck H. Catalase. In *Methods of enzymatic analysis* Academic Press. 1965; pp. 885–894.
170. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 1984;105:121–126
171. Beutler E. Superoxide dismutase. In: Beutler E, eds. *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*. Philadelphia, Grune & Stratton:PA. 1984;83–85.
172. D'Agnillo F, Chang TM. Polyhemoglobin-superoxide dismutase-catalase as a blood substitute with antioxidant properties. *Nature biotechnology*. 1998;16:667.
173. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood. Glutathione. *J Lab Clin Med*. 1963;61:882–888.
174. Salloum FN, Chau VQ, Hoke NN, Abbate A, Varma A, Ockaili RA, Kukreja RC. Phosphodiesterase-5 inhibitor, tadalafil, protects against myocardial ischemia/reperfusion through protein-kinase G-dependent generation of hydrogen sulfide. *Circulation*. 2009;120:S31–S36.
175. Meng B, Gao W, Wei J, Yang J, Wu J, Pu L, Guo C. Quercetin reduces serum homocysteine level in rats fed a methionine-enriched diet. *Nutrition*. 2013;29:661–666.
176. Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2011;50:940–950.
177. Sutherland FJ, Hearse DJ. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacological Research*. 2000;41:613–627.
178. Kadipasaoglu KA, Bennink GW, Conger JL, Birovljev S, Sartori M, Clubb Jr, FJ, Frazier OH. An ex vivo model for the reperfusion of explanted human hearts. *Texas heart institute journal*. 1993;20:33.
179. Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 1897;66:355–400.
180. Minhaz U, Koide S, Shoitsu A, Fujishima M, Nakazawa H. Perfusion delay causes unintentional ischemic preconditioning in isolated heart preparation. *Basic research in cardiology*. 1995;90:418–423.
181. Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. 4th ed. Bloxham, UK: Scion. 2008;
182. Fishbein MC, Wang T, Matijasevic M, Hong L, Apple FS. Myocardial tissue troponins T and I. An immunohistochemical study in experimental models of myocardial ischemia. *Cardiovasc Pathol*. 2003;12:65–71.
183. Qin F, Liu YX, Zhao HW, Huang X, Ren P, Zhu ZY. Chinese medicinal formula Guan-Xin-Er-Hao protects the heart against oxidative stress induced by acute ischemic myocardial injury in rats. *Phytomedicine*. 2009;16:215–221.
184. Liem DA, Honda HM, Zhang J, Woo D, Ping P. Past and present course of cardioprotection against ischemia-reperfusion injury. *Journal of Applied Physiology*. 2007;103:2129–2136.

185. Maslov LN, Naryzhnaia NV, Podoksenov IuK, Prokudina ES, Gorbunov AS, Zhang I, Pei ZhM. Reactive oxygen species are triggers and mediators of an increase in cardiac tolerance to impact of ischemia-reperfusion. 2015;101:3–24.
186. Sea K, Sohn SH, Durazo A, et al. Insights into the role of the unusual disulfide bond in copper-zinc superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2015;290:2405–2418.
187. Gao F, Gao E, Yue TL, Ohlstein EH, Lopez BL, Christopher TA, Ma XL. Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Circulation*. 2002;105:1497–1502.
188. Gruunenfelder J, Miniati DN, Murata S, Falk V, Hoyt EG, Kown M, et al. Upregulation of Bcl-2 through caspase-3 inhibition ameliorates ischemia/reperfusion injury in rat cardiac allografts. *Circulation*. 2001;104:I–202.
189. Kirsch DG, Doseff A, Chau BN, et al. Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c. *J Biol Chem*. 1999;274:21155–21161.
190. Ohigashi T, Ueno M, Nonaka S, et al. Tyrosine kinase inhibitors reduce bcl-2 expression and induce apoptosis in androgen-dependent cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;278:C66–C72.
191. Ziypak T, Halici Z, Alkan E, Akpinar E, Polat B, Adanur S, et al. Renoprotective effect of aliskiren on renal ischemia/reperfusion injury in rats: electron microscopy and molecular study. *Ren. Fail*. 2015;37:343–354.
192. Meng X, Ao L, Meldrum DR, et al. TNF-alpha and myocardial depression in endotoxemic rats: temporal discordance of an obligatory relationship. *Am J Physiol*. 1998;275:R502–R508.
193. Gwechenberger M, Mendoza LH, Youker KA, Frangogiannis NG, Smith CW, Michael LH, Entman ML. Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation*. 1999;99:546–551.
194. Liao YH, Xia N, Zhou SF, Tang TT, Yan XX, Lv BJ, Yuan J. Interleukin-17A contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating cardiomyocyte apoptosis and neutrophil infiltration. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;59:420–429.
195. Cai ZP, Parajuli N, Zheng X, Becker L. Remote ischemic preconditioning confers late protection against myocardial ischemia-reperfusion injury in mice by upregulating interleukin-10. *Basic research in cardiology*. 2012;107:277.
196. Yang Z, Zingarelli B, Szabo C. Crucial role of endogenous interleukin-10 production in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2000;101:1019–1026.
197. Ke Z, Gao A, Xu P, Wang J, Ji L, Yang J. Preconditioning with PEP-1-SOD1 fusion protein attenuates ischemia/reperfusion-induced ventricular arrhythmia in isolated rat hearts. *Exp Ther Med*. 2015;10:352–356.
198. Davis SR. An overview of the antifungal properties of allicin and its breakdown products—the possibility of a safe and effective antifungal prophylactic. *Mycoses*. 2005;48:95–100.
199. Imada O. Toxicity aspects of garlic. In: *First World Congress on the Health Significance of Garlic and Garlic Constituents*. Nutr. Intl. Irvine. 1999;pp 47.
200. Sucur M. Effect of garlic on serum lipids and lipoproteins in patients suffering from hyperlipoproteinemia. *Diabetol Croat*. 1980;9:323–338.
201. Gadkari JV, Joshi VD. Effect of ingestion of raw garlic on serum cholesterol level, clotting time and fibrinolytic activity in normal subjects. *J Postgrad Med*. 1991;37:128–131.
202. Sunter W. Warfarin and garlic. *Pharm J* 1991;246:72.

203. Laroche M, Choudhri S, Gallicano K, Foster B. Severe gastrointestinal toxicity with concomitant ingestion of ritonavir and garlic. In: Program and Abstracts of the Canadian Association for HIV Research Seventh Annual Canadian Conference on HIV/AIDS, Quebec City, Quebec, Canada, April 30–May 3, 1998 (abstract 471P).
204. Hoshino T, Kashimoto N, Kasuga S. Effects of garlic preparations on the gastrointestinal mucosa. *J. Nutr.* 2001;131:109S–1113S.
205. Jappe U, Bonnekoh B, Hausen BM, Gollnick H. Garlic-related dermatoses: case report and review of the literature. *Am J Contact Dermat* 1999;10:37–39.
206. Anibarro B, Fontela JL, De La Hoz F. Occupational asthma induced by garlic dust. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:734–738.
207. Sen U, Mishra PK, Tyagi N, Tyagi SC. Homocysteine to hydrogen sulfide or hypertension. *Cell biochemistry and biophysics.* 2010;57:49–58.
208. Predmore BL, Julian D, Cardounel AJ. Hydrogen sulfide increases nitric oxide production from endothelial cells by an Akt-dependent mechanism. *Front Physiol.* 2011;2:104.
209. Nie XM, Zhou YJ, Xie Y, Li YF, Yang Q, Zhou ZM. Effect of stent coated with diallyl trisulfide on endothelial structure and function after coronary injury: experiment with dogs. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2006;86:1125–1128.
210. Amagase H. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *The Journal of nutrition.* 2006;136:716S-725S.
211. Banerjee SK, Mukherjee PK, Maulik SK. Garlic as an antioxidant: the good, the bad and the ugly. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives.* 2003;17:97–106.
212. Agarwal KC. Therapeutic actions of garlic constituents. *Medicinal research reviews.* 1996;16:111–124.
213. Chen L, Hong JY, Hussin AH, Cheng WF, Yang CS. Decrease of hepatic catalase level by treatment with diallyl sulfide and garlic homogenates in rats and mice. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 1999;13:127–134.
214. Shaik IH, George JM, Thekkumkara TJ, Mehvar R. Protective effects of diallyl sulfide, a garlic constituent, on the warm hepatic ischemia–reperfusion injury in a rat model. *Pharmaceutical research.* 2008;25:2231.
215. Wu CC, Sheen LY, Chen HW, Tsai SJ, Lii CK. Effects of organosulfur compounds from garlic oil on the antioxidation system in rat liver and red blood cells. *Food and chemical toxicology.* 2001;39:563–569.
216. Watson LE, Sheth M, Denyer RF, Dostal DE. Baseline echocardiographic values for adult male rats. *Journal of the American Society of Echocardiography.* 2004;17:161–167.
217. Mitidieri E, Tramontano T, Gurgone D, et al. Mercaptopyruvate acts as endogenous vasodilator independently of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase activity. *Nitric Oxide.* 2018;75:53–59.
218. Hausenloy DJ, Yellon DM. Ischaemic conditioning and reperfusion injury. *Nature Reviews Cardiology.* 2016;13:193.
219. Spannbaauer A, Traxler D, Lukovic D, Zlabinger K, Winkler J, Gugerell A, et al. Effect of Ischemic Preconditioning and Postconditioning on Exosome-Rich Fraction microRNA Levels, in Relation with Electrophysiological Parameters and Ventricular Arrhythmia in Experimental Closed-Chest Reperfused Myocardial Infarction. *Int J Mol Sci.* 2019;20.

220. Ma L, Zhu J, Gao Q, Rebecchi MJ, Wang Q, Liu L. Restoring Pharmacologic Preconditioning in the Aging Heart: Role of Mitophagy/Autophagy. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2017;72:489–498.
221. Predmore BL, Kondo K, Bhushan S, Zlatopolsky MA, King AL, Aragon JP, et al. The polysulfide diallyl trisulfide protects the ischemic myocardium by preservation of endogenous hydrogen sulfide and increasing nitric oxide bioavailability. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 2012;302:H2410–H2418.
222. Zhang WJ, Shi ZX, Wang BB, Cui YJ, Guo JZ, Li B. Allitridum mimics effect of ischemic preconditioning by activation of protein kinase C. *Acta Pharmacol Sin.* 2001;22:132–136.
223. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Ischemia/Reperfusion, *Compr. Physiol.* 2016;7: 113–170.
224. O'Brien PJ, Dameron GW, Beck ML, Kang YJ, Erickson BK, Di Battista TH, Miller KE, Jackson KN, Mittelstadt S. Cardiac troponin T is a sensitive specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. *Lab Anim Sci.* 177;47:5.
225. Ricchiuti V, Sharkey SW, Murakami MM, Voss EM, Apple FS. Cardiac troponin I and T alterations in dog hearts with myocardial infarction: correlation with infarct size. *Am J Clin Pathol.* 225;110:241–247.
226. fang Jin H, Wang Y, bao Wang X, Sun Y, shu Tang C, bao Du J. Sulfur dioxide preconditioning increases antioxidative capacity in rat with myocardial ischemia reperfusion (I/R) injury. *Nitric Oxide.* 2013;32:56–61.
227. Cai WJ, Wang MJ, Moore PK, Jin HM, Yao T, Zhu YC. The novel proangiogenic effect of hydrogen sulfide is dependent on Akt phosphorylation. *Cardiovasc Res.* 2007;76:29–40.
228. Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, et al. Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc Res.* 2000;45:651–60.
229. Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest.* 1996;74:86–107.
230. Zhou X, An G, Lu X. Hydrogen sulfide attenuates the development of diabetic cardiomyopathy. *Clin Sci.* 2015;128:325–335.
231. Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation.* 1998;97:276–281.
232. Bogdanov MB, Ferrante RJ, Mueller G, Ramos LE, Martinou JC, Beal MF. Oxidative stress is attenuated in mice overexpressing BCL-2. *Neurosci Lett.* 1999;262:33–36.
233. Brocheriou V, Hagege AA, Oubenaissa A, et al. Cardiac functional improvement by a human Bcl-2 transgene in a mouse model of ischemia/reperfusion injury. *J Gene Med.* 2000;2:326–333.
234. Chen ZY, Chua CC, Ho YS, Hamdy RC, Chua BHL. Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *Am J Physiol.* 2001;280:H2313–2320.
235. Nakamura M, Wang NP, Zhao ZQ, et al. Preconditioning decreases Bax expression, PMN accumulation and apoptosis in reperfused rat heart. *Cardiovasc Res.* 2000;45:661–670.
236. Maulik N, Engelman RM, Rousou JA, et al. Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating anti-death gene Bcl-2. *Circulation.* 1999;100:II369–375.
237. Bowie A, O'Neill LAJ. Oxidative stress and nuclear factor-kB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol.* 2000;59:13–23.

238. Bonizzi G, Piette J, Merville M-P, et al. Cell type-specific role for reactive oxygen species in nuclear factor-kappaB activation by Interleukin-1. *Biochem Pharmacol.* 2000;59:7–11.
239. Chandrasekar B, Smith JB, Freeman GL. Ischemia-reperfusion of rat myocardium activates nuclear factor- $\kappa$ B and induces neutrophil infiltration via lipopolysaccharide-induced CXC chemokine. *Circulation.* 2001;103:2296–2302.
240. Chandrasekar B, Streitman JE, Colston JT, Freeman GL. Inhibition of nuclear factor  $\kappa$ B attenuates proinflammatory cytokine and inducible nitric-oxide synthase expression in postischemic myocardium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease.* 1998;1406:91–106.
241. Whiteman M, Armstrong JS, Chu SH, Jia-Ling S, Wong BS, Cheung NS, et al. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite ‘scavenger’? *J Neurochem.* 2004;90:765–8.
242. Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, Rizzo G, Mencarelli A, Orlandi S, et al. Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. *Gastroenterology.* 2005;129:1210–1224.
243. Zhu YZ, Wang ZJ, Ho P, Loke YY, Zhu YC, Huang SH, et al. Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats. *J Appl Physiol.* 2007;102:261–268.
244. Johansen D, Ytrehus K, Baxter GF. Exogenous hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) protects against regional myocardial ischemia-reperfusion injury—Evidence for a role of K ATP channels. *Basic Res Cardiol.* 2006;101:53–60.
245. Shiomi T, Tsutsui H, Ikeuchi M, et al. Streptozotocin-induced hyperglycemia exacerbates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiol.* 2003;42:165–172.
246. Londhe VP. Role of garlic (*allium sativum*) in various diseases-an overview. *J Pharm Res.* 2011;4:129–134.
247. Eidi A, Eidi M, Esmaeili E. Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine.* 2006;13:624–629.
248. Chang MLW, Johnson MA. Effect of garlic on carbohydrate metabolism and lipid synthesis in rats. *J Nutr.* 1980;110:931–936.
249. Kaneko Y, Kimura Y, Kimura H, Niki I. L-cysteine inhibits insulin release from the pancreatic beta-cell: possible involvement of metabolic production of hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter. *Diabetes.* 2006;55:1391–1397.
250. Ali MY, Whiteman M, Low CM, and Moore PK. Hydrogen sulphide reduces insulin secretion from HIT-T15 cells by a KATP channel-dependent pathway. *J Endocrinol.* 2007;195:105–112.
251. Tang G, Wu L, Liang W, Wang R. Direct stimulation of KATP channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol.* 2005;68:1757–1764.
252. Schalinske KL. Interrelationship between diabetes and homocysteine metabolism: hormonal regulation of cystathionine betasynthase. *Nutr. Rev.* 2003;61:136–138.
253. Azad MAK, Huang P, Liu G, Ren W, Teklebrh T, Yan W, et al. Hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease in animal model. *Amino acids.* 2018;50:3–9.
254. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet.* 2013;383:69–82.

255. Huang YT, Yao CH, Way CL, Lee KW, Tsai CY, Ou HC, Kuo WW. Diallyl trisulfide and diallyl disulfide ameliorate cardiac dysfunction by suppressing apoptotic and enhancing survival pathways in experimental diabetic rats. *J App Physiol*. 2012;114:402–410.
256. Rivas-Cabanero L, Rodriguez-Lopez AM, Martinez-Salgado C, Saura M, Lamas S, Lopez-Novoa JM. Gentamicin treatment increases mesangial cell nitric oxide production. *Experimental nephrology*. 1997;5:23–30.
257. Chen YL, Chen Q, Cheng YF, Jin HH, Kong DS, Zhang F, Wu L, Shao JJ, Zheng SZ. Diallyl trisulfide attenuates ethanol-induced hepatic steatosis by inhibiting oxidative stress and apoptosis. *Biomed. Pharmacother*. 2016;79:35–43.
258. Kuo WW, Wang WJ, Tsai CY, Way CL, Hsu HH, Chen LM. Diallyl trisulfide (DATS) suppresses high glucose-induced cardiomyocyte apoptosis by inhibiting JNK/NF $\kappa$ B signaling via attenuating ROS generation. *Int J Cardiol*. 2013;168:270–280.
259. Polhemus D, Kondo K, Bhushan S, Bir SC, Kevil CG, Murohara T, Lefer DJ, Calvert JW. Hydrogen sulfide attenuates cardiac dysfunction following heart failure via induction of angiogenesis. *Circ Heart Fail*. 2013;6:1077–1086.
260. Yuan P, Xue H, Zhou L, Qu L, Li C, Wang Z, Ni J, Yu C, Yao T, Huang Y, Wang R, and Lu L. Rescue of mesangial cells from high glucose-induced over-proliferation and extracellular matrix secretion by hydrogen sulfide. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26:2119–2126.
261. Borges GR, de Oliveira M, Salgado HC, Fazan Jr R. Myocardial performance in conscious streptozotocin diabetic rats. *Cardiovascular Diabetology*. 2006;5:26.
262. Sun D, Shen M, Li J et al. Cardioprotective effects of tanshinone IIA pretreatment via kinin B2 receptor-Akt-GSK-3 $\beta$  dependent pathway in experimental diabetic cardiomyopathy. *Cardiovascular Diabetology*. 2011;10:4.
263. Moussa S. Oxidative stress in diabetes mellitus. *Romanian Journal of Biophysics*. 2008;18:225–236.
264. Guan Q, Zhang Y, Yu C, Liu Y, Gao L, Zhao J. Hydrogen sulfide protects against high glucose-induced apoptosis in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011;152:177–183.
265. Badole SL, Chaudhari SM, Jangam GB, Kandhare AD, Bodhankar SL. Cardioprotective activity of *Pongamia pinnata* in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *BioMed research international*. 2015;dx.doi.org/10.1155/2015/403291.
266. El-Seweidy MM, Sadik NA, Shaker OG. Role of sulfurous mineral water and sodium hydrosulfide as potent inhibitors of fibrosis in the heart of diabetic rats. *Arch Biochem Biophys*. 2011;506:48–57.
267. Xu W, Wu W, Chen J, Guo R, Lin J, Liao X, Feng J. Exogenous hydrogen sulfide protects H9c2 cardiac cells against high glucose-induced injury by inhibiting the activities of the p38MAPK and ERK1/2 pathways. *Int J Mol Med*. 2013;32:917–925.
268. Wei WB, Hu X, Zhuang XD, Liao LZ, Li WD. GYY4137, a novel hydrogen sulfide-releasing molecule, likely protects against high glucose-induced cytotoxicity by activation of the AMPK/mTOR signal pathway in H9c2 cells. *Mol Cell Biochem*. 2014;389:249–256.
269. Yang Z, Yang C, Xiao L, Liao X, Lan A, Wang X, Guo R, Chen P, Hu C, Feng J. Novel insights into the role of HSP90 in cytoprotection of H<sub>2</sub>S against chemical hypoxia-induced injury in H9c2 cardiac myocytes. *Int J Mol Med*. 2011;28:397–403.

270. Luan HF, Zhao ZB, Zhao QH, Zhu P, Xiu MY, Ji Y. Hydrogen sulfide postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia and reperfusion injury mediated by the JAK2/STAT3 survival pathway. *Braz J Med Biol Res.* 2012;45:898–905.
271. Devaraj S, Glaser N, Griffen S, Wang-Polagruto J, Miguelino E, Jialal I. Increased monocytic activity and biomarkers of inflammation in patients with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2006;55:774–779.
272. Westermann D, Van Linthout S, Dhayat S, Dhayat N, Escher F, Bücker-Gärtner C. Cardioprotective and anti-inflammatory effects of interleukin converting enzyme inhibition in experimental diabetic cardiomyopathy. *Diabetes.* 2007;56:1834–1841.
273. Tschope C, Walther T, Escher F, Spillmann F, Du J, Altmann C, et al. Transgenic activation of the kallikrein-kinin system inhibits intramyocardial inflammation, endothelial dysfunction, and oxidative stress in experimental diabetic cardiomyopathy. *FASEB J* 2005;19:2057–2059.
274. Shiraishi I, Melendez J, Ahn Y, Skavdahl M, Murphy E, Welch S, et al. Nuclear targeting of Akt enhances kinase activity and survival of cardiomyocytes. *Circ Res.* 2004;94:884–891.
275. Saponaro F, Sonaglioni A, Rossi A, Montefusco L, Lombardo M, Adda G, Arosio M. Improved diastolic function in type 2 diabetes after a six month liraglutide treatment. *Diabetes research and clinical practice.* 2016;118:21–28.
276. Sun X, Wang W, Dai J, Jin S, Huang J, Guo C, Wang C, Pang L, Wang Y. A Long-Term and Slow-Releasing Hydrogen Sulfide Donor Protects against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Sci Rep.* 2017;7:3541.
277. Khatua TN, Adela R, Banerjee SK. Garlic and cardioprotection: insights into the molecular mechanisms. *Can J Physiol Pharmacol.* 2013;91:448–458.
278. McCracken E, Monaghan M, Sreenivasan S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clinics in dermatology.* 2018;36:14–20.
279. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 2008;51:216–226.
280. Skovso S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *Journal of diabetes investigation.* 2014;5:349–358.
281. Choi CU, Seo HS, Lee EM, Shin SY, Choi UJ, Na JO, Lim HE, Kim JW, Kim EJ, Rha SWea. Statins do not decrease small, dense low-density lipoprotein. *Tex Heart Inst J.* 2010;37:421–428.
282. Perez-Torres I, Torres-Narvaez JC, Pedraza-Chaverri J, Rubio-Ruiz ME, Diaz-Diaz E, Del Valle-Mondragon L, Martinez-Memije R, Varela Lopez E, Guarner-Lans V. Effect of the Aged Garlic Extract on Cardiovascular Function in Metabolic Syndrome Rats. *Molecules.* 2016;21:1425.
283. Ha AW, Ying T, Kim WK. The effects of black garlic (*Allium sativum*) extracts on lipid metabolism in rats fed a high fat diet. *Nutr. Res. Pract.* 2015;9:30–36.
284. Lee YM, Gweon OC, Seo YJ, Im J, Kang MJ, Kim MJ, Kim JI. Antioxidant effect of garlic and aged black garlic in animal model of type 2 diabetes mellitus. *Nutr. Res. Pract.* 2009;3:156–161.
285. Aouadi R, Aouidet' A, Elkadhi A, Rayana CB, Jaafoura' H, Tritar B, Nagati K. Effect of fresh garlic (*Allium sativum*) on lipid metabolism in male rats. *Nutr Res.* 2000;20:273–280.
286. Thomson M, Al-Qattan KK, Bordia T. including garlic in the diet may help lower blood glucose, cholesterol and triglycerides. *J. Nutr.* 2006;136:800–802.

287. Ali M, Al-Qattan KK, Al-Enezi F, Khanafer RMA, Mustafa T. Effect of allicin from garlic powder on serum lipids and blood pressure in rats fed with a high cholesterol diet. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2000;62:253–259.
288. Shrivastava A, Chaturvedi U, Sonkar R, Saxena JK, Khanna AK, Bhatia G. Antidyslipidemic, antiatherogenic and antioxidant activity of *Allium sativum* in Charles Foster rats. *Int J Curr Pharm Rev Res (IJCPR)*. 2011;2:110–119.
289. Atkin M, Laight D, Cummings MH. The effects of garlic extract upon endothelial function, vascular inflammation, oxidative stress and insulin resistance in adults with type 2 diabetes at high cardiovascular risk. A pilot double blind randomized placebo-controlled trial. *J. Diabetes Complic*. 2016;30:723–727.
290. Sun L, Zhang S, Yu C, Pan Z, Liu Y, Zhao J, et al. Hydrogen sulfide reduces serum triglyceride by activating liver autophagy via the AMPK-mTOR pathway. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2015;309:E925–E935.
291. Thomson M, Al-Amin ZM, Al-Qattan KK, Shaban LH, Ali M. Anti-diabetic and hypolipidaemic properties of garlic (*Allium sativum*) in streptozotocin- induced diabetic rats. *Int J Diabetes Metabol*. 2007;15:108–115.
292. Padiya R, Banerjee SK. Garlic as an anti-diabetic agent: recent progress and patent reviews. *Recent Pat Food Nutr Agric*. 2013;5:105–127.
293. Tripathi P, Gupta PP, Lal VK. Effect of Co-administration of *Allium sativum* extract and metformin on blood glucose of Streptozotocin induced diabetic rats. *J Intercult Ethnopharmacol*. 2013;2:81–84.
294. Kasuga S, Ushijima M, Morihara N. Effect of aged garlic extract (AGE) on hyperglycemia induced by immobilization stress in mice. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 1999:191–197.
295. Orekhov AN, Grunwald J. Effects of garlic on atherosclerosis. *Nutrition*. 1997;13:656–663.
296. Belemkar S, Dhameliya K, Pata MK. Comparative study of garlic species (*Allium sativum* and *Allium porrum*) on glucose uptake in diabetic rats. *Ind J Clin Biochem*. 2013;8:80–85.
297. Albajali AA, Nagi AH, Shahzad M, Ullah MI, Hussain S. Effect of *Allium sativa* L. on pancreatic  $\beta$  cells in comparison to *Nigella sativa* L. in streptozotocin induced diabetic rats. *J Med Plants Res*. 2011;5:5779–5784.
298. Osman M, Adnan A, Bakar NS, Alashkham F. Allicin has significant effect on autoimmune anti-islet cell antibodies in type 1 diabetic rats. *Pol J Pathol*. 2012;63:248–254.
299. Foushee DB, Ruffin J, Baanerjee U. Garlic as a natural agent for the treatment of hypertension: A preliminary report. *Cytobios*. 1982;34:145–152.
300. Reinhart KM, Coleman CI, Teevan C, Vachhani P, White CM. Effects of garlic on blood pressure in patients with and without systolic hypertension: A meta-analysis. *Ann. Pharmacother*. 2008;42:1766–1771.
301. Rashid A, Khan HH. The mechanism of hypotensive effect of garlic extract. *J. Pak. Med. Assoc*. 1985;35:357–362.
302. Sendl A, Elbl G, Steinke B, Redl K, Breu W, Wagner H. Comparative pharmacological investigations of *Allium ursinum* and *Allium sativum*. *Planta Med*. 1993;58:1–7.
303. Asdaq SM, Inamdar MN. Potential of garlic and its active constituent, S-allyl cysteine, as antihypertensive and cardioprotective in presence of captopril. *Phytomedicine*. 2010;17:1016–1026.



304. Guillard JC, Favier A, Potier de Courcy G, Galan P, Hercberg S. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor or a simple marker of vascular disease? 1. Basic data. *Pathol Biol (Paris)*. 2003;51:101–110.
305. Guillard JC, Favier A, Potier de Courcy G, Galan P, Hercberg S. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor or a simple marker of vascular disease? 2. Epidemiological data. *Pathol Biol (Paris)*. 2003;51:111–112.
306. Hayden MR, Tyagi SC. Homocysteine and reactive oxygen species in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atheroscleropathy: the pleiotropic effects of folate supplementation. *Nutrition journal*. 2004;3:4.
307. Ceriello A. Oxidative stress and diabetes-associated complications. *Endocr Pract*. 2006;12:60–62.
308. Kaneto H, Nakatani Y, Kawamori D, Miyatsuka T, Matsuoka TA, Matsuhisa M, Yamasaki Y. Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and c-Jun N-terminal kinase in pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction and insulin resistance. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37:1595–1608.
309. Jang EK, Seo JH, Lee SP. Physiological activity and antioxidative effects of aged black garlic (*Allium sativum* L.) extract. *Korean Society of Food Science and Technology*. 2008;40:443–448.
310. Kang YH, Park YK, Lee GD. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean Society of Food Science and Technology*. 1996;28:232–239.
311. Shin CH, Ihm J. Effects of S-allylcysteine on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Korean Society of Endocrinology*. 2008;23:129–136.
312. Ahmad MS, Pischetsrieder M, Ahmed A. Aged garlic extract and S-allyl cysteine prevent formation of advanced glycation endproducts. *Eur J Pharmacol*. 2007;561:32–38.
313. Qu Z, Mossine VV, Cui J, Sun GY, Gu Z. Protective effects of AGE and its components on neuroinflammation and neurodegeneration. *NeuroMol. Med*. 2016;18:474–482.
314. Dhar A, Desai K, Kazachmov M, Yu P, Wu L. Methylglyoxal production in vascular smooth muscle cells from different metabolic precursors. *Metabolism*. 2008;57:1211–1220.
315. Desai KM, Wu L. Free radical generation by methylglyoxal in tissues. *Drug Metabol. Drug Interact*. 2008;23:151–173.
316. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest*. 2004;114:1752–1761.
317. Vazquez-Prieto MA, González RE, Renna NF, Galmarini CR, Miatello RM. Aqueous garlic extracts prevent oxidative stress and vascular remodeling in an experimental model of metabolic syndrome. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010;58:6630–6635.
318. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsén B, Lahti K, Nisseń M, Taskinen MR, Groop L. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2001;24:683–689.
319. Rybka J, Kupczyk D, Kędziora-Kornatowska K, Motyl J, Czuczejko J, Szewczyk-Golec K, Kozakiewicz M, Pawluk H, Carvalho LA, Kędziora J. Glutathione-related antioxidant defense system in elderly patients treated for hypertension. *Cardiovasc. Toxicol*. 2011;11:1–9.
320. Ried K, Travica N, Sali A. The effect of aged garlic extract on blood pressure and other cardiovascular risk factors in uncontrolled hypertensives: The AGE at Heart trial. *Integr. Blood Press. Control*. 2016;9:9–21.

- 
321. Bian JS, Yong QC, Pan TT, Feng ZN, Ali MY, Zhou S, Moore PK. Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2006;316:670–678.
  322. Eisen A, Fisman EZ, Rubenfire M, Freimark D, McKechnie R, Tenenbaum A, Motro M, Adler Y. Ischemic preconditioning: nearly two decades of research: a comprehensive review. *Atherosclerosis*. 2004;172:201–210.
  323. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J*. 2001;20:6008–6016.
  324. Geng B, Chang L, Pan C, Qi Y, Zhao J, Pang Y, Du J, Tang C. Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:756–763.
  325. Gross GJ, Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res*. 1992;70:223–233.
  326. Desai KM, Chang T, Untereiner A, Wu L. Hydrogen sulfide and the metabolic syndrome. *Expert review of clinical pharmacology*. 2011;4:63–73.
  327. Tripatara P, Patel NS, Collino M, Gallicchio M, Kieswich J, Castiglia S, Benetti E, Stewart KN, Brown PA, Yaqoob MM, Fantozzi R, Thiemermann C. Generation of endogenous hydrogen sulfide by cystathionine gamma-lyase limits renal ischemia/reperfusion injury and dysfunction. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2008;88:1038–1048.
  328. Shukla Y, Kalra N. Cancer chemoprevention with garlic and its constituents. *Cancer Lett*. 2007;247:167-181.

## **БИОГРАФИЈА**

### **1. ЛИЧНИ ПОДАЦИ**

Име и презиме: Јована Јеремић

Датум и место рођења: 31.12.1991. године, Крагујевац, Република Србија

Адреса: Михаила Ивеше 7/10

Телефон: +381641051151

### **2. ОБРАЗОВАЊЕ**

Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, интегрисане академске студије фармације, 2010 – 2015;

Специјализација из области Медицинска биохемија, 2018 – данас;

### **3. ПОЗНАВАЊЕ СТРАНИХ ЈЕЗИКА**

Енглески језик

### **4. РАДНО ИСКУСТВО**

Фацилитатор на катедри за фармацеутску биотехнологију, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, 2015 – 2016;

Асистент на катедри за фармацеутску биотехнологију, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, 2016 – данас;

### **5. РАЗНО**

Добитник је награде *Young Investigator Awards* за постер презентацију на конгресу одржаном у Смоленицама (Словачка) 2018. године, као и награде *Gary Lopaschuk*, на конгресу одржаном у Врњачкој Бањи 2019. године.

## БИБЛИОГРАФИЈА

### РАДОВИ ШТАМПАНИ У ЧАСОПИСИМА НА СС/SCI ЛИСТИ

1. 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;460(1-2):151-64. doi: 10.1007/s11010-019-03577-w.
2. Radonjic T, Rankovic M, Ravic M, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic J, Jeremic N, Sretenovic J, Matic S, Jakovljevic V, Nikolic Turnic T. The Effects of Thiamine Hydrochloride on Cardiac Function, Redox Status and Morphometric Alterations in Doxorubicin-Treated Rats. *Cardiovasc Toxicol.* 2019. doi: 10.1007/s12012-019-09536-7.
3. 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.
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. *Archives of physiology and biochemistry.* 2019;11:1-8. doi:10.1080/13813455.2018.1551904.
5. 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.
6. 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. doi: 10.1155/2019/4235405.
7. Obradovic V, Srejovic I, Zivkovic V, Nikolic T, Jeremic J, Djuric D, Jakovljevic V. Markers of Oxidative Stress in Adolescents with Skeletal Class II Division 1 Malocclusion. *Iran J Public Health.* 2018;47(12):1963-1964.
8. Jakovljevic B, Nikolic Turnic T, Jeremic N, Savic M, Jeremic J, Srejovic I, Belic B, Ponorac N, Jakovljevic V, Zivkovic V. The impact of high-intensity interval training and moderateintensity continuous training regimes on cardiodynamic parameters in isolated heart of normotensive and hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2019;97(7):631-637. doi:10.1139/cjpp-2018-0610.
9. 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. doi:10.1080/13813455.2018.1551904.

10. 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). doi: 10.3390/ijms20010006.
11. 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.* 2019;454(1-2):111-21. doi: 10.1007/s11010-018-3457-y.
12. Nikolic Turnic TR, Jakovljevic VL, Djuric DM, Jeremic NS, Jeremic JN, Milosavljevic IM, Srejovic IM, Selakovic DV, Zivkovic VI. Efficiency of atorvastatin and simvastatin in improving cardiac function during the different degrees of hyperhomocysteinemia. *Can J Physiol Pharmacol.* 2018;96(10):1040-1049. doi: 10.1139/cjpp-2018-0102.
13. 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.
14. Simonovic N, Jakovljevic V, Jeremic J, Finderle Z, Srejovic I, Nikolic Turnic T, Milosavljevic I, Zivkovic V. Comparative effects of calcium and potassium channel modulators on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *Mol Cell Biochem.* 2019;450(1-2):175-85. doi: 10.1007/s11010-018-3384-y.
15. Jeremic J, Nikolic Turnic T, Zivkovic V, Jeremic N, Milosavljevic I, Srejovic I, Obrenovic R, Jancic S, Rakocevic M, Matic S, Djuric D, Jakovljevic V. Vitamin B complex mitigates cardiac dysfunction in high-methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2018;45(7):683-693. doi: 10.1111/1440-1681.12930.
16. Stojic IM, Zivkovic VI, Srejovic IM, Nikolic TR, Jeremic NS, Jeremic JN, Djuric DM, Jovicic N, Radonjic KG, Bugarcic ZD, Jakovljevic VLJ, Novokmet SS. Cisplatin and cisplatin analogues perfusion through isolated rat heart: the effects of acute application on oxidative stress biomarkers. *Mol Cell Biochem.* 2018;439(1-2):19-33. doi: 10.1007/s11010-017-3132-8.
17. Plecevic S, Jakovljevic B, Savic M, Zivkovic V, Nikolic T, Jeremic J, Milosavljevic I, Srejovic I, Tasic N, Djuric D, Jakovljevic V. Comparison of short-term and medium-term swimming training on cardiodynamics and coronary flow in high salt-induced hypertensive and normotensive rats. *Mol Cell Biochem.* 2018;447(1-2):33-45. doi: 10.1007/s11010-018-3291-2.
18. 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. doi: 10.4149/gpb\_2017053.
19. Radoman K, Zivkovic V, Nikolic T, Stojic I, Raicevic D, Jeremic J, Srejovic I, Jakovljevic V. Differences between  $\alpha$ -linolenic and linoleic acid supplementation on

- the redox status and cardiodynamic parameters of male and female Wistar albino rats. *Archives of Biological Sciences* 2018;70(2):223-231.
20. Nikolic T, Zivkovic V, Srejovic I, Stojic I, Jeremic N, Jeremic J, Radonjic K, Stankovic S, Obrenovic R, Djuric D, Jakovljevic V. Effects of atorvastatin and simvastatin on oxidative stress in diet-induced hyperhomocysteinemia in Wistar albino rats: a comparative study. *Mol Cell Biochem.* 2018;437(1-2):109-118.
  21. Stojic IM, Jakovljevic VL, Zivkovic VI, Srejovic IM, Nikolic TR, Jeremic JN, Jeremic NS, Djuric DM, Radonjic KG, Labudovic-Borovic M, Bugarcic ZD, Bogojeski J, Novokmet SS. The perfusion of cisplatin and cisplatin structural analogues through the isolated rat heart: The effects on coronary flow and cardiodynamic parameters. *Gen Physiol Biophys.* 2018;37(5):515-525. doi:10.4149/gpb\_2018004.
  22. 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.
  23. Srejovic I, Zivkovic V, Nikolic T, Jeremic N, Stojic I, Jeremic J, Djuric D, Jakovljevic V. Modulation of N-methyl-D-aspartate receptors in isolated rat heart. *Can J Physiol Pharmacol.* 2017;95(11):1327-1334.
  24. Simovic Markovic B, Gazdic M, Arsenijevic A, Jovicic N, Jeremic J, Djonov V, Arsenijevic N, Lukic M, Volarevic V. Mesenchymal Stem Cells Attenuate Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in iNOS-Dependent Manner. *Stem Cells International.* 2017:1315378. doi.org/10.1155/2017/1315378.
  25. Jevdjevic M, Jovanovic M, Jeremic N, Cankovic M, Jeremic J, Zivkovic V, Srejovic I, Djuric D, Jakovljevic V. Acute effects of nandrolone decanoate on oxidative stress in isolated rat heart. *Arch Biol Sci, Belgrade,* 2015;67(1):331-337.
  26. Nikolic Turnic T, Arsic A, Vucic V, Petrovic S, Ristic-Medic D, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic J, Radonjic T, Milosavljevic I, Bolevich S, Bolevich S, Djuric D, Jakovljevic V. Hydroxymethylglutaryl Coenzyme a Reductase Inhibitors Differentially Modulate Plasma Fatty Acids in Rats With Diet-Induced-Hyperhomocysteinemia: Is  $\omega$ -3 Fatty Acids Supplementation Necessary? *Front Physiol.* 2019;10:892. doi: 10.3389/fphys.2019.00892.
  27. 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 Jul 29. doi:10.1007/s11010-019-03597-6.

#### РАДОВИ ШТАМПАНИ У ЧАСОПИСИМА ЦИТИРАНИМ У ЕМБАСЕ-У

1. Pesic G, Jeremic J, Stojic I, Vranic A, Cankovic M, Nikolic T, Jeremic N, Matic A, Srejovic I, Zivkovic V, Jakovljevic V. Redox status in patients with femoral neck fractures. *Ser J Exp Clin Res.* 2016;17:199–205.

2. Novokmet S, Stojic I, Radonjic K, Savic M, Jeremic J. Toxic effects of metallopharmaceuticals. *Ser J Exp Clin Res.* 2017;18:191–194.
3. Ristic J, Nikolic T, Jeremic J, Stojic I, Janicijevic-Hudomal S, Popovic M, Arsic-Komljenovic G, Radojevic-Popovic R, Srejovic I, Zivkovic V. The impact of positive acceleration (+GZ) on antioxidant capacity and histopathological alterations in different organs and tissues in rats. *Ser J Exp Clin Res.* 2017;18:203–212.
4. Radonjic K, Stojic I, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic J, Jakovljevic V, Djuric D, Novokmet S. The Platinum(II) complexes induced oxidative stress of isolated rat heart. *Ser J Exp Clin Res* 2017;18:111–117.
5. Stefanovic B, Vukasinovic Z, Stankovic S, Jeremic J, Jeremic N, Stojic I. Emergency or delayed surgical treatment of unstable supracondylar humeral fractures in children? *Ser J Exp Clin Res* 2017;18:145–150.
6. Radojevic-Popovic R, Nikolic T, Stojic I, Jeremic J, Srejovic I, Pesic G, Jakovljevic V. The influence of different types of physical activity on the redox status of scuba divers. *Ser J Exp Clin Res* 2017;18:19–25.
7. Smigic J, Stojic I, Zivkovic V, Srejovic I, Nikolic T, Jeremic J, Sabo T, Jakovljevic V. The effects of chronic administration of cisplatin on oxidative stress in the isolated rat heart. *Ser J Exp Clin Res* 2018;19:11–16.
8. Simonovic N, Jeremic J. Role of Calcium Channel Blockers in Myocardial Preconditioning. *Ser J Exp Clin Res.* 2017;18:281–287.

## **AUTHORS CURRICULUM VITAE**

### **1. PERSONAL DATA**

Name and surname: Jovana Jeremic

Date and place of birth: December 31, 1991, Kragujevac, Republic of Serbia

Address: Mihaila Ivese 7/10

Phone: +381641051151

### **2. EDUCATION**

Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, 2010 – 2015;

Specialization in Medical biochemistry, 2018 – present.

### **3. FOREIGN LANGUAGE**

English

### **4. WORK EXPERIENCE**

Facilitator at Department of Pharmaceutical biotechnology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, 2015 – 2016;

Assistant trainee at Department of Pharmaceutical biotechnology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, 2016 – present.

### **5. MISCELLANEOUS**

She won Young Investigator Awards for poster presentation (Smolenice, 2018) and Gary Lopaschuk student award (Vrnjacka Banja, 2019).



## LIST OF PUBLICATIONS

### ARTICLES PUBLISHED IN CC/SCI JOURNALS

1. 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;460(1-2):151-64. doi: 10.1007/s11010-019-03577-w.
2. Radonjic T, Rankovic M, Ravic M, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic J, Jeremic N, Sretenovic J, Matic S, Jakovljevic V, Nikolic Turnic T. The Effects of Thiamine Hydrochloride on Cardiac Function, Redox Status and Morphometric Alterations in Doxorubicin-Treated Rats. *Cardiovasc Toxicol.* 2019. doi: 10.1007/s12012-019-09536-7.
3. 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.
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. *Archives of physiology and biochemistry.* 2019;11:1-8. doi:10.1080/13813455.2018.1551904.
5. 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.
6. 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. doi: 10.1155/2019/4235405.
7. Obradovic V, Srejovic I, Zivkovic V, Nikolic T, Jeremic J, Djuric D, Jakovljevic V. Markers of Oxidative Stress in Adolescents with Skeletal Class II Division 1 Malocclusion. *Iran J Public Health.* 2018;47(12):1963-1964.
8. Jakovljevic B, Nikolic Turnic T, Jeremic N, Savic M, Jeremic J, Srejovic I, Belic B, Ponorac N, Jakovljevic V, Zivkovic V. The impact of high-intensity interval training and moderateintensity continuous training regimes on cardiodynamic parameters in isolated heart of normotensive and hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2019;97(7):631-637. doi:10.1139/cjpp-2018-0610.
9. 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. doi:10.1080/13813455.2018.1551904.
10. 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). doi: 10.3390/ijms20010006.
  11. 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.* 2019;454(1-2):111-21. doi: 10.1007/s11010-018-3457-y.
  12. Nikolic Turnic TR, Jakovljevic VL, Djuric DM, Jeremic NS, Jeremic JN, Milosavljevic IM, Srejovic IM, Selakovic DV, Zivkovic VI. Efficiency of atorvastatin and simvastatin in improving cardiac function during the different degrees of hyperhomocysteinemia. *Can J Physiol Pharmacol.* 2018;96(10):1040-1049. doi: 10.1139/cjpp-2018-0102.
  13. 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.
  14. Simonovic N, Jakovljevic V, Jeremic J, Finderle Z, Srejovic I, Nikolic Turnic T, Milosavljevic I, Zivkovic V. Comparative effects of calcium and potassium channel modulators on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *Mol Cell Biochem.* 2019;450(1-2):175-85. doi: 10.1007/s11010-018-3384-y.
  15. Jeremic J, Nikolic Turnic T, Zivkovic V, Jeremic N, Milosavljevic I, Srejovic I, Obrenovic R, Jancic S, Rakocevic M, Matic S, Djuric D, Jakovljevic V. Vitamin B complex mitigates cardiac dysfunction in high-methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2018;45(7):683-693. doi: 10.1111/1440-1681.12930.
  16. Stojic IM, Zivkovic VI, Srejovic IM, Nikolic TR, Jeremic NS, Jeremic JN, Djuric DM, Jovicic N, Radonjic KG, Bugarcic ZD, Jakovljevic VLJ, Novokmet SS. Cisplatin and cisplatin analogues perfusion through isolated rat heart: the effects of acute application on oxidative stress biomarkers. *Mol Cell Biochem.* 2018;439(1-2):19-33. doi: 10.1007/s11010-017-3132-8.
  17. Plecevic S, Jakovljevic B, Savic M, Zivkovic V, Nikolic T, Jeremic J, Milosavljevic I, Srejovic I, Tasic N, Djuric D, Jakovljevic V. Comparison of short-term and medium-term swimming training on cardiodynamics and coronary flow in high salt-induced hypertensive and normotensive rats. *Mol Cell Biochem.* 2018;447(1-2):33-45. doi: 10.1007/s11010-018-3291-2.
  18. 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. doi: 10.4149/gpb\_2017053.

19. Radoman K, Zivkovic V, Nikolic T, Stojic I, Raicevic D, Jeremic J, Srejovic I, Jakovljevic V. Differences between  $\alpha$ -linolenic and linoleic acid supplementation on the redox status and cardiodynamic parameters of male and female Wistar albino rats. *Archives of Biological Sciences* 2018;70(2):223-231.
20. Nikolic T, Zivkovic V, Srejovic I, Stojic I, Jeremic N, Jeremic J, Radonjic K, Stankovic S, Obrenovic R, Djuric D, Jakovljevic V. Effects of atorvastatin and simvastatin on oxidative stress in diet-induced hyperhomocysteinemia in Wistar albino rats: a comparative study. *Mol Cell Biochem.* 2018;437(1-2):109-118.
21. Stojic IM, Jakovljevic VL, Zivkovic VI, Srejovic IM, Nikolic TR, Jeremic JN, Jeremic NS, Djuric DM, Radonjic KG, Labudovic-Borovic M, Bugarcic ZD, Bogojeski J, Novokmet SS. The perfusion of cisplatin and cisplatin structural analogues through the isolated rat heart: The effects on coronary flow and cardiodynamic parameters. *Gen Physiol Biophys.* 2018;37(5):515-525. doi:10.4149/gpb\_2018004.
22. 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.
23. Srejovic I, Zivkovic V, Nikolic T, Jeremic N, Stojic I, Jeremic J, Djuric D, Jakovljevic V. Modulation of N-methyl-D-aspartate receptors in isolated rat heart. *Can J Physiol Pharmacol.* 2017;95(11):1327-1334.
24. Simovic Markovic B, Gazdic M, Arsenijevic A, Jovicic N, Jeremic J, Djonov V, Arsenijevic N, Lukic M, Volarevic V. Mesenchymal Stem Cells Attenuate Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in iNOS-Dependent Manner. *Stem Cells International.* 2017:1315378. doi.org/10.1155/2017/1315378.
25. Jevdjevic M, Jovanovic M, Jeremic N, Cankovic M, Jeremic J, Zivkovic V, Srejovic I, Djuric D, Jakovljevic V. Acute effects of nandrolone decanoate on oxidative stress in isolated rat heart. *Arch Biol Sci, Belgrade,* 2015;67(1):331-337.
26. Nikolic Turnic T, Arsic A, Vucic V, Petrovic S, Ristic-Medic D, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic J, Radonjic T, Milosavljevic I, Bolevich S, Bolevich S, Djuric D, Jakovljevic V. Hydroxymethylglutaryl Coenzyme a Reductase Inhibitors Differentially Modulate Plasma Fatty Acids in Rats With Diet-Induced-Hyperhomocysteinemia: Is  $\omega$ -3 Fatty Acids Supplementation Necessary? *Front Physiol.* 2019;10:892. doi: 10.3389/fphys.2019.00892.
27. 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 Jul 29. doi:10.1007/s11010-019-03597-6.

## ARTICLES PUBLISHED IN JOURNALS CITED IN EMBASE

1. Pesic G, Jeremic J, Stojic I, Vranic A, Cankovic M, Nikolic T, Jeremic N, Matic A, Srejovic I, Zivkovic V, Jakovljevic V. Redox status in patients with femoral neck fractures. *Ser J Exp Clin Res.* 2016;17:199–205.
2. Novokmet S, Stojic I, Radonjic K, Savic M, Jeremic J. Toxic effects of metallopharmaceuticals. *Ser J Exp Clin Res.* 2017;18:191–194.
3. Ristic J, Nikolic T, Jeremic J, Stojic I, Janicijevic-Hudomal S, Popovic M, Arsic-Komljenovic G, Radojevic-Popovic R, Srejovic I, Zivkovic V. The impact of positive acceleration (+GZ) on antioxidant capacity and histopathological alterations in different organs and tissues in rats. *Ser J Exp Clin Res.* 2017;18:203–212.
4. Radonjic K, Stojic I, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic J, Jakovljevic V, Djuric D, Novokmet S. The Platinum(II) complexes induced oxidative stress of isolated rat heart. *Ser J Exp Clin Res* 2017;18:111–117.
5. Stefanovic B, Vukasinovic Z, Stankovic S, Jeremic J, Jeremic N, Stojic I. Emergency or delayed surgical treatment of unstable supracondylar humeral fractures in children? *Ser J Exp Clin Res* 2017;18:145–150.
6. Radojevic-Popovic R, Nikolic T, Stojic I, Jeremic J, Srejovic I, Pesic G, Jakovljevic V. The influence of different types of physical activity on the redox status of scuba divers. *Ser J Exp Clin Res* 2017;18:19–25.
7. Smigic J, Stojic I, Zivkovic V, Srejovic I, Nikolic T, Jeremic J, Sabo T, Jakovljevic V. The effects of chronic administration of cisplatin on oxidative stress in the isolated rat heart. *Ser J Exp Clin Res* 2018;19:11–16.
8. Simonovic N, Jeremic J. Role of Calcium Channel Blockers in Myocardial Preconditioning. *Ser J Exp Clin Res.* 2017;18:281–287.

## 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 Јеремић

**Ментор/коментор - МН:** др сци. мед. Невена Јеремић, доцент и др Suresh Tyagi, редовни професор

**Наслов рада - НР:** Кардиопротективни ефекти диалил трисулфида на исхемијско-реперфузиону повреду изолованог срца пацова са метаболичким синдромом: улога оксидационог стреса

**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:** 191 страна, 20 слика, 9 схема, 45 графика, 12 табели

**Научна област - УДК:** Медицина

**Научна дисциплина - ДИ:** Експериментална физиологија

**Предметна одредница/ кључне речи - ПО:** диалил трисулфид, дијабетес, метаболички синдром, изоловано срце, исхемија/реперфузија

**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 се испитају ефекти хроничне примене диалил трисулфида (ДАТС), најснажнијег и најважнијег природног донора водоник сулфида изолованог из белог лука, код здравих, пацова са дијабетес мелитусом (ДМ) и пацова са метаболичким синдромом (МетС). Посебна пажња била је усмерена ка испитивању кардиопротективне улоге ДАТС-а, у *ex vivo* индукованој исхемијско-реперфузионој (И/Р) повреди миокарда, али и његовој способности да умањи манифестације дијабетеса и метаболичког синдрома.

**Метод:** У ову експерименталну, хроничну студију било је укључено 72 пацова *Wistar albino* соја који су били разврстани у 6 основних група: здрави пацови нетретирани и третирани ДАТС-ом (КТР и ДАТС), ДМ пацови нетретирани и третирани ДАТС-ом (ДМ и ДМ+ДАТС) и МетС пацови нетретирани и третирани ДАТС-ом (МС и МС+ДАТС). Третман ДАТС-ом подразумевао је тронедељну *per os* примену ДАТС-а сваког другог дана у дози од 40 mg/kg. Након хроничног третмана, животиње су жртвоване при чему се свака од основних група разврставала на две подгрупе у зависности од протокола на *Langendorff*-овом апарату (90 минута ретроградна перфузија или И/Р повреда миокарда).

**Резултати:** ДАТС, примењен код наведених група пацова, показао је значајне кардиопротективне ефекте, побољшао је опоравак миокарда и допринео очувању његове функције након И/Р повреде. Такође, код пацова са ДМ значајно је умањио нивое глукозе, док је код пацова са МетС-ом ублажио манифестације ове болести (који се огледају кроз смањење нивоа триглицерида, холестерола, глукозе, инсулина и крвног притиска). ДАТС, највероватније преко комплексних механизма, који укључују антиоксидационе, антиинфламацијске и антиапоптотске ефекте остварује кардиопротекцију и доприноси у ограничавању И/Р повреде и очувању функције миокарда.

**Закључак:** Показани протективни ефекти ДАТС-а, од посебног су значаја за будућа истраживања, која би испитивала додатне терапијске могућности и механизме који су одговорни за његову фармаколошку активност. Такође, увођење ДАТС-а у терапијски алгоритам може имати несумњив значај у смислу унапређења, разумевања и терапијске примене нових видова преко кондиционарања у исхемијској болести срца, што би олакшало лечење многобројне популације болесника и уједно имало несумњив економски значај.

**Датум прихватања теме од стране ННВ - ДП:** 5.11.2018. године

**Датум одбране - ДО:**

**Чланови комисије - КО:**

1. Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, председник;
2. Проф. др Слободан Новокмет, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Фармацеутска биотехнологија*, члан;
3. Проф. др Драган Ђурић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област *Физиологија*, 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 Jeremic

**Menthor/co-mentor - MN:** Nevena Jeremic, *PhD*, Assistant Professor and Suresh Tyagi, PhD, Full Professor

**Title - TI:** Cardioprotective effects of diallyl trisulfide on ischemic-reperfusion injury of isolated rat heart with metabolic syndrome: the role of oxidative stress

**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:** 191 pages, 20 pictures, 9 schemes, 45 graphs, 12 tables

**Scientific field - SF:** Medicine

**Scientific discipline - SD:** Experimental physiology



**Subject/key words - SKW:** diallyl trisulfide, diabetes, metabolic syndrome, isolated heart, ischemia/reperfusion

**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 investigate the effects of chronic administration of diallyl trisulfide (DATS), distinguished as the most potent natural donor of hydrogen sulfide isolated from garlic, in healthy, diabetic rats (DM) and metabolic syndrome (MetS) rats. The focus was to examine the cardioprotective role of DATS in *ex vivo*-induced myocardial ischemia-reperfusion (I/R) injury, but also to its ability to reduced symptoms of DM and MetS.

**Methods:** This chronic, experimental study, included 72 *Wistar albino* rats, divided into 6 main groups: healthy rats untreated and treated with DATS (CTRL and DATS), DM rats untreated and treated with DATS (DM, DM+DATS), and MetS rats untreated and treated with DATS (MS and MS+DATS). DATS treatment consisted of three weeks *per os* administration of DATS every other day at a dose of 40 mg/kg. After chronic treatment, the animals were sacrificed and each of the main groups were divided into two subgroups depending on the protocol on the Langendorff apparatus (90 minutes retrograde perfusion or I/R myocardial injury).

**Results:** DATS treatment showed significant cardioprotective effects, improved myocardial recovery and contributed to the preservation of its function after I/R injury. Also, DATS treatment significantly decreased glucose levels in DM rats, while in rats with MetS DATS treatment alleviated the symptoms of disease (reflected by a decrease in triglyceride, cholesterol, glucose, insulin and blood pressure). DATS, most likely via complex mechanisms, which include antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects, exerts cardioprotection and contributes to limiting I/R injury and preserving myocardial function.

**Conclusion:** The aforementioned effects of DATS are of particular relevance for future research that would examine additional therapeutic possibilities and mechanisms responsible for its pharmacological activity. Also, the introduction of DATS into a therapeutic algorithm can be of undoubted importance in terms of understanding and therapeutic application of new types of preconditioning in ischemic heart disease, which would facilitate the treatment of a large population of patients and have unquestionable economic significance.

**Accepted by the Scientific Board on - ASB:** 5.11.2018.

**Defended on - DE:**

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

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

Full professor Slobodan Novokmet, PhD, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific domain Pharmaceutical biotechnology, member;

Full professor Dragan Djuric, MD, PhD, Medical Faculty, University of Belgrade, scientific domain Physiology, member.

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

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

Кардиопротективни ефекти диалил трисулфида на  
исхемијско-реперфузиону повреду изолованог срца пацова са  
метаболичким синдромом: улога оксидационог стреса

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, 15.11.2019. године,

  
\_\_\_\_\_  
потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Јована Јеремић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

Кардиопротективни ефекти диалил трисулфида на  
исхемијско-реперфузиону повреду изолованог срца пацова са  
метаболичким синдромом: улога оксидационог стреса

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 дозвољавам<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 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 прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу \_\_\_\_\_, 15.11.2019. године,

  
\_\_\_\_\_   
потпис аутора

---

<sup>2</sup> 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/>

## Радови који су били услов за пријаву завршене докторске дисертације

1. **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;460(1-2):151-164. doi: 10.1007/s11010-019-03577-w.
2. **Jeremic J**, Nikolic Turnic T, Zivkovic V, Jeremic N, Milosavljevic I, Srejovic I, Obrenovic R, Jancic S, Rakocevic M, Matic S, Djuric D, Jakovljevic V. Vitamin B complex mitigates cardiac dysfunction in high-methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2018;45(7):683-693. doi: 10.1111/1440-1681.12930.
3. Simonovic N, **Jeremic J**. Role of Calcium Channel Blockers in Myocardial Preconditioning. *Ser J Exp Clin Res.* 2017;18(4):281-287. doi: 10.1515/SJECR-2016-0073.

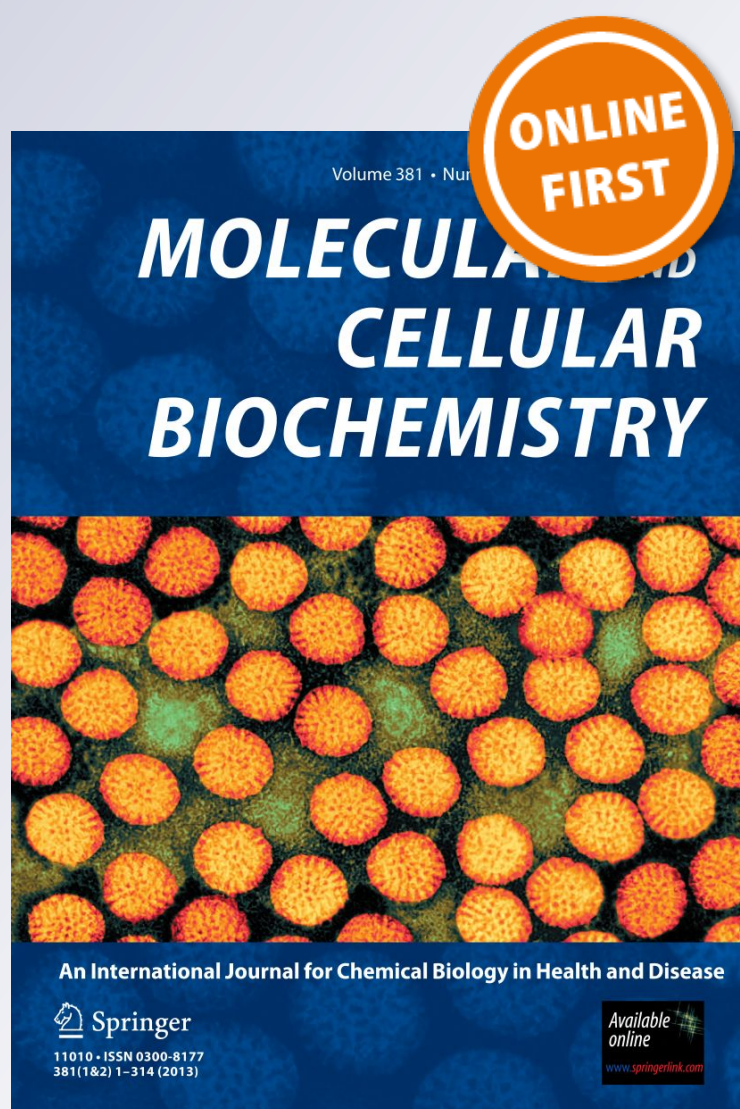
*The cardioprotective effects of diallyl trisulfide on diabetic rats with ex vivo induced ischemia/reperfusion injury*

**Jovana N. Jeremic, Vladimir Lj. Jakovljevic, Vladimir I. Zivkovic, Ivan M. Srejovic, Jovana V. Bradic, Sergey Bolevich, 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/s11010-019-03577-w



**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature. 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](http://link.springer.com)".**



# The cardioprotective effects of diallyl trisulfide on diabetic rats with ex vivo induced ischemia/reperfusion injury

Jovana N. Jeremic<sup>1</sup> · Vladimir Lj. Jakovljevic<sup>2,3</sup> · Vladimir I. Zivkovic<sup>2</sup> · Ivan M. Srejovic<sup>2</sup> · Jovana V. Bradic<sup>1</sup> · Sergey Bolevich<sup>3</sup> · Tamara R. Nikolic Turnic<sup>1</sup> · Slobodanka Lj. Mitrovic<sup>4</sup> · Nemanja U. Jovicic<sup>5</sup> · Suresh C. Tyagi<sup>6</sup> · Nevena S. Jeremic<sup>1</sup>

Received: 8 February 2019 / Accepted: 21 June 2019  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

## Abstract

Diallyl trisulfide (DATS) is distinguished as the most potent polysulfide isolated from garlic. The aim of our study was to investigate effects of oral administration of DATS on healthy and diabetic rats, with special attention on heart function. Rats were randomly divided into four groups: CTRL (healthy rats), DATS (healthy rats treated with DATS), DM (diabetic rats), DM + DATS (diabetic rats treated with DATS). DATS (40 mg/kg of body weight) was administered every other day for 3 weeks, at the end of which rats underwent echocardiography, glycemic measurement and redox status assessment. Isolated rat hearts were subjected to 30 min global ischemia and 60 min reperfusion, after which heart tissue was counterstain with hematoxylin and eosin and cardiac Troponin T staining (cTnT), while expression of Bax, B cell lymphoma 2 (Bcl-2), caspase-3, caspase-9 and superoxide dismutase-2 were examined in the left ventricle. DATS treatment significantly reduced blood glucose levels of diabetic rats, and improved cardiac function recovery, diminished oxidation status, attenuated cardiac remodeling and inhibited myocardial apoptosis in healthy and diabetic rats. DATS treatment causes promising cardioprotective effects on ex vivo-induced ischemia/reperfusion (I/R) injury in diabetic and healthy rat heart probably mediated by inhibited myocardial apoptosis. Moreover, appropriate DATS consumption may provide potential co-therapy or prevention of hyperglycemia and various cardiac complications in rats with DM.

**Keywords** Cardioprotection · Diallyl trisulfide · Diabetes · Ischemia–reperfusion injury · Isolated heart

✉ Nevena S. Jeremic  
nbarudzic@hotmail.com

- <sup>1</sup> Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Kragujevac 34 000, Serbia
- <sup>2</sup> Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Kragujevac 34 000, Serbia
- <sup>3</sup> Department of Human Pathology, 1st Moscow State Medical, University IM Sechenov, Trubetskaya Street 8, Moscow, Russia 119991
- <sup>4</sup> Department of Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Kragujevac 34 000, Serbia
- <sup>5</sup> Department of Histology and Embryology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Kragujevac 34 000, Serbia
- <sup>6</sup> Department of Physiology, School of Medicine, University of Louisville, 500 S Preston Street, Louisville, KY 40202, USA

## Introduction

Autoimmune (type 1) diabetes mellitus (DM) is one of the most common endocrine and metabolic chronic disease, characterized by loss of the pancreatic islet  $\beta$ -cells, insulin deficiency and hyperglycemia. Cardiovascular complications are responsible for most of the diabetes-related deaths. It was noticed that the rate of unrecognized myocardial infarction is 10% greater in diabetic than in nondiabetic patients. In addition to myocardial dysfunction, patients with DM are predisposed to vascular disorders and diabetic cardiomyopathy [1, 2]. Since the long-standing type 1 DM, as well as various antidiabetic drugs, are associated with devastating microvascular and macrovascular complications, it is essential to find and apply adequate supplements from natural plant sources with minimal side effects and persuasive antioxidant nature.

Garlic (*Allium sativum* L.) is one of the most versatile medicinal food with proven antioxidant, antimicrobial, antiinflammatory, antitumor and other biological activities



[3, 4]. Several studies have linked consumption of garlic and garlic oil with antidiabetic effects and improvement of myocardial function [2]. Significant cardioprotective effects are achieved by causing vasodilatation, inhibiting platelet aggregation, regulating blood pressure, lowering triglyceride levels and phospholipids [5, 6]. The crude intact garlic bulb contains high amounts of  $\gamma$ -glutamylcysteine, after its hydrolysis or oxidation, an inactive derivate-alliin (S-allyl cysteine sulfoxide) is formed. Chopping or cutting garlic leads to releasing of allinase which can metabolize alliin to an active derivate-allycin (diallyl thiosulfinate). Allycin rapidly disintegrates on sulfur-rich compounds: diallyl sulfide (DAS), diallyl disulfide (DADS) and diallyl trisulfide (DATS), and other, less significant [2–4]. DATS, also known as Allitridin, is distinguished as the most potent polysulfide isolated from garlic. Contains three sulfur atoms, it is stable and contributes to the slow release of hydrogen sulfide ( $H_2S$ ) which possess significant antiapoptotic, antioxidant and antiinflammatory properties [7–9].

We hypothesized that DATS can ameliorate type 1 DM and provide protection against ex vivo I/R injury in diabetic and healthy rat hearts. However, it is still unknown which mechanisms are contributing to DATS cardioprotection against I/R injury in diabetes. Consequently, this study was designed to examine whether dietary DATS supplementation taken orally exerts antidiabetic effect and modulates ex vivo-induced I/R injury using a Langendorff-perfused healthy and diabetic rat heart. Possible mechanisms related to DATS consumption including cardiac function, oxidative stress and apoptotic markers, were also evaluated in the current study.

## Materials and methods

### Experimental animals

Animals were obtained from the Military Medical Academy, Belgrade, Serbia and housed under controlled standard environmental conditions, with a temperature of  $22 \pm 2$  °C and a 12/12 h light/dark cycle. Food and water were provided ad libitum. All research procedures were carried out in accordance with European Directive for welfare of laboratory animals No: 2010/63/EU and principles of Good Laboratory Practice. The protocol was approved by Ethics Committee for experimental animal well-being of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia (No: 01-1811). All experimental procedures were performed in accordance with the prescribed regulations (EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EES) and the principles of ethics.

DATS (purity  $\geq 98\%$ ), streptozotocin (STZ) and all substances used in the study were purchased from

Sigma-Aldrich Chemie GmbH Eschenstrasse 5, 82024 Taufkirchen, Germany.

Study was conducted on 48 adult, male *Wistar albino* rats (8 weeks old,  $200 \pm 20$  g body weight), randomly divided into four groups: CTRL (healthy rats), DATS (healthy rats fed with DATS), DM (diabetic rats), DM + DATS (diabetic rats fed with DATS).

### Induction of diabetes and DATS supplementation regime

Diabetes was induced in 24 rats, after a 12-h starvation by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (dose 60 mg/kg of body weight, dissolved in 1 ml of 0.05 M citrate buffer solution, pH 4.5) [2]. Blood glucose was quantitated after overnight fasting in a drop of lateral tail vein-blood using a portable glucose meter. Animals manifesting symptoms of hyperglycemia ( $> 20$  mmol/L), after 48–72 h of STZ-injection, were considered diabetic. 72 h after STZ-injection and at the same day as diabetes was confirmed, we started with treatment. DATS was administered per os by oral gavage, every other day at dose of 40 mg/kg of body weight in DATS and DM + DATS groups for 3 weeks [6].

### Physiological parameter determination

Body weight, food and water intake were assessed weekly. Water and food consumption were calculated by subtracting the total water or food consumed after 24 h from the known amount available a day before and were normalized by the total body weight in each collective cage (5 rats per cage). Blood glucose was measured in fasted rats weekly, from the baseline day (before DM-induction or DATS treatment, marked as 0) to the end of experimental period, for a total of four measurements. At the end of the study, we measured heart weight and normalized to body weight.

### In vivo cardiac function

In the last week of the experimental protocol, transthoracic echocardiograms were performed in all groups. Rats were anesthetized with a combination of 50 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine intraperitoneally. 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 [7]. From the parasternal long-axis view in two-dimensional 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 and at end systole (IVSd and IVSs), LV internal dimension at end diastole and at end systole (LVIDd and LVIDs),

LV posterior wall thickness at end diastole and at end systole (LVPWd and LVPWs) and fractional shortening (FS) percentage were recorded with M-mode.

### Langendorff perfused rat heart and induction of I/R injury

After echocardiographic measurement, all animals were anesthetized with ketamine/xylazine mixture and killed. The isolated rat hearts were perfused retrogradely on Langendorff apparatus (*Langendorff apparatus, Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary*) through the ascending aorta at a constant coronary perfusion pressure of 70 cmH<sub>2</sub>O. The hearts were perfused with Krebs–Henseleit solution, while transducer was inserted in the left ventricle to continuously record the following parameters of myocardial function: maximum and minimum rate of left ventricular pressure development (dp/dt max, dp/dt min); systolic and diastolic left ventricular pressure (SLVP and DLVP); heart rate (HR). Coronary flow (CF) was measured flowmetrically. Perfused hearts were allowed to equilibrate until HR and contractility reached steady-state. After stabilization (marked as S), hearts underwent to global ischemia (complete cessation of coronary flow) for 30 min followed by 60 min reperfusion, as previously described [10]. In the moment of S, as well as in 1st, 3rd, 5th, 10th, 15th, 30th, 45th, and 60th minute of reperfusion earlier mentioned cardiodynamic parameters were registered.

### Biochemical assessments of systemic pro-oxidants and antioxidants

In the moment of killing, we collected blood for the assay of systemic oxidative stress parameters. In plasma samples were measured: index of lipid peroxidation (measured as TBARS—thiobarbituric acid reactive substances), nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), while in lysate of erythrocytes, were determined activity of enzymatic defense system by evaluating of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) concentration as well as activity of nonenzymatic antioxidant such as reduced glutathione (GSH). All biochemical parameters were determined spectrophotometrically, using Shimadzu

UV 1800 spectrophotometer (Japan) and previously well described in one of our manuscript [11].

### Expression of genes in the LV of 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 polymerase chain reaction (qPCR) was performed using Thermo Scientific Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) and mRNA-specific primer for oxidative stress SOD-2, apoptosis markers (Bax, Bcl-2, caspase-3, caspase-9), and β-actin as a housekeeping gene (Invitrogen, Carlsbad, CA) (Table 1). PCR reactions were done in a Mastercycler ep realplex (Eppendorf, Hamburg, Germany). Data were analyzed and relative gene expression was calculated according to Livak and Schmittgen [12].

### Immunohistochemical staining

Myocardial tissue samples were fixed in 4% buffered paraformaldehyde solution and embedded in paraffin. Subsequently, 4-μm-thick sections were stained with hematoxylin and eosin. The detailed methods have been previously described [7]. To estimate the degree of heart injury after I/R the cardiac troponin T (cTnT) was measured. After incubation in 3% horse normal serum, sections were incubated with 200 μg/ml of primary antibodies cTnT (1:200, Thermo Fisher Scientific, Kalamazoo, MI 49008) according to the manufacturer's instructions.

### Statistical analysis

All values are expressed as mean ± standard deviation (SD). For statistical analysis we used three specific points of interest: S, the first and the last minute of reperfusion (marked as 1 and 60). For comparison within the group, we compared these points with each other, while for comparison between groups we compared the same interest point between groups. After confirmation of normal distribution using the

**Table 1** Primers used for qPCR analysis

|           | Left primers            | Right primers          |
|-----------|-------------------------|------------------------|
| β-Actin   | GATCAGCAAGCAGGAGTACGAT  | GTAACAGTCCGCCTAGAAGCAT |
| Bax       | GCTACAGGGTTTCATCCAGGAT  | ATGTTGTTGTCCAGTTCATCGC |
| Bcl-2     | GCAAAGCACATCCAATAAAAGCG | GTACTTCATCACGATCTCCCGG |
| Caspase-3 | GGAAGATCACAGCAAAGGAGC   | GCAGTAGTCGCCTCTGAAGAAA |
| Caspase-9 | TGTACTCCAGGGAAGATCGAGA  | CGTTGTTGATGATGAGGCAGTG |
| SOD-2     | AATCAACAGACCCAAGCTAGGC  | CACAATGTCACTCCTCTCCGAA |

Shapiro–Wilk test and homogeneity of variance with Levene's test, a one-way analysis of variance (ANOVA) and the post hoc Bonferroni test for multiple comparisons were used. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## Results

### Effects of DATS on physiological parameters

Significant differences between water and food consumption as well as fasting blood glucose concentration, body weight and heart weight to body weight ratio were found among all groups. STZ-injected rats displayed characteristics typical for diabetes, they consumed more water, less food and had lower body weight than healthy rats. DATS treatment did not significantly modify these parameters. Fasting blood glucose concentrations after induction of type 1 DM were significant higher in the diabetic than in healthy group and continued to slightly increase throughout the experimental period. Glucose level in DM+DATS significantly decreased compared to DM rats after 3 weeks DATS consumption. Significant increase of heart weight to body weight ratio in DM group compared to DM+DATS and CTRL groups was observed. This ratio in DM+DATS group was slightly increased compared to CTRL and DATS groups, however, without statistical significance (Fig. 1a–e).

### DATS altered in vivo cardiac function

In DM group LVPW at end systole and diastole was significantly increased, while FS was significantly decreased compared to CTRL group. DATS consumption significantly reduced IVSd and increased FS in both healthy and diabetic rats. In DM+DATS group IVSd was significantly decreased compared to CTRL, while LVPW at end systole and diastole was significantly increased compared to healthy groups (Table 2).

### DATS intake protects healthy and diabetic hearts against ex vivo-induced I/R injury

Indexes of left ventricle contractility (dp/dt max and min) were significantly reduced at the end of reperfusion (60) compared to stabilization (S) in CTRL hearts, while in DM group there was a significant decrease of dp/dt max and min at 1st and 60th minutes of reperfusion in comparison to the S. DATS consumption caused markedly improved cardiac contractility in both healthy and diabetic rats in all points of interest. A significant drop in SLVP was noticed in CTRL and DM+DATS groups at 60th when compared to 1st minutes of reperfusion, and a significant rise in DM and DM+DATS groups at the 1st minute of reperfusion when

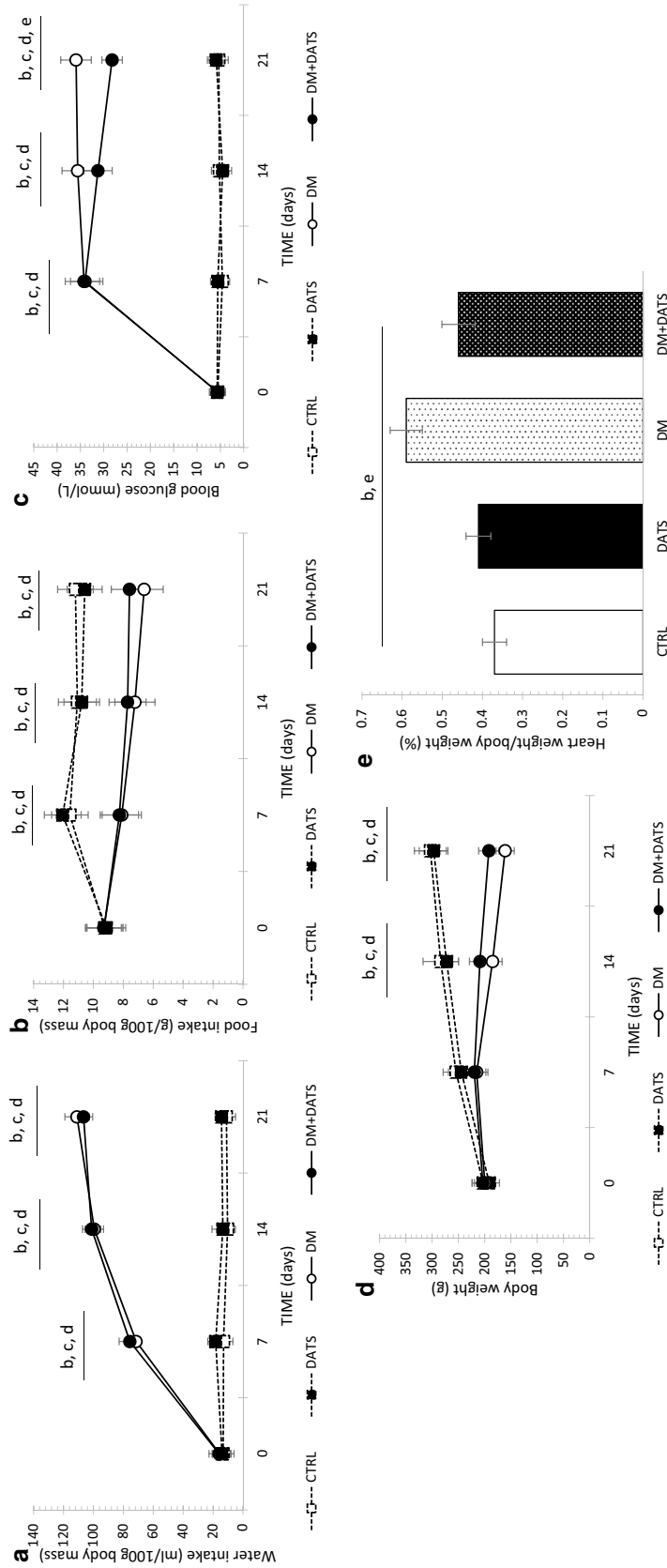
compared to S. SLVP was significantly decreased in DM compared to other examined groups, while intake of DATS significantly increased this parameter in both healthy and diabetic rats. On the other hand, DLVP was similar in all groups and did not alter during reperfusion. At the 1st minute of recovery period in CTRL, DATS and DM groups HR was significantly decreased in comparison to the values in S and 60th minute of reperfusion (except in DATS). Furthermore, a significantly higher value of HR was noticed at S in CTRL compared to DM and in DATS than in DM+DATS group. On the other hand, in CTRL at the end of 60-min reperfusion value of HR was statistically lower than in DATS, and notably higher than in DM. Supplementation of DATS in diabetic rats significantly increased HR, especially in the last minute of reperfusion. The CF decreased significantly during the reperfusion period in CTRL and DM groups. DATS intake significantly increased CF before and 60 min after ischemia in DATS and DM+DATS compared to CTRL and DM groups (Fig. 2a–f).

### DATS improved the systemic oxidative stress state in healthy and diabetic rats

TBARS concentration was significantly decreased in DATS group in relation to the CTRL, and DM+DATS group. Level of  $\text{NO}_2^-$  was significantly reduced in DM compared with CTRL and DM+DATS. Level of  $\text{O}_2^-$  was significantly increased in diabetic compared to healthy rats, while DATS consumption caused statistically decreased generation of  $\text{O}_2^-$  in both. The level of  $\text{H}_2\text{O}_2$  did not vary significantly within examined groups. In DATS group, the concentrations of SOD, CAT and GSH were notably higher compared to other groups, while in DM group were significantly decreased compared to CTRL. Consumption of DATS in diabetic rats statistically increased both CAT and SOD activity (Fig. 3a–g).

### Effect of DATS on the expression of apoptotic and oxidative stress marker on heart tissue

Relative gene expression of Bcl-2 was decreased in DM compared to CTRL, while more increased expression levels were noticed in the groups fed with DATS. In comparison with CTRL, relative gene expression of proapoptotic markers (Bax, caspase-3 and -9) was significantly upregulated in DM group, but showed significantly less increased expression levels in DATS and DM+DATS groups, especially Bax and caspase-3. Relative gene expression of SOD-2 was notably decreased in DM compared to other examined groups, while DATS treatment drastically increased expression, especially in healthy rats (Fig. 4a–e).



**Fig. 1** Effects of DATS consumption on: **a** water intake, **b** ingestion, **c** fasting glucose level, **d** body weight measured weekly, during a 3-week DATS treatment and **e** heart weight/body weight ratio in the moment of killing. Results are shown as mean  $\pm$  SD,  $n = 12$ , per group. Significant difference ( $p < 0.05$ ) between examined groups are marked by letters: <sup>a</sup>CTRL versus DATS; <sup>b</sup>CTRL versus DM; <sup>c</sup>CTRL versus DM + DATS; <sup>d</sup>DATS versus DM + DATS; <sup>e</sup>DM versus DM + DATS

**Table 2** Effects of DATS treatment of healthy and diabetic rats on in vivo cardiac function

|            | CTRL         | DATS                      | DM                          | DM + DATS                   |
|------------|--------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| IVSd (cm)  | 0.163 ± 0.02 | 0.149 ± 0.02 <sup>a</sup> | 0.164 ± 0.03                | 0.133 ± 0.04 <sup>c,e</sup> |
| LVIDd (cm) | 0.638 ± 0.05 | 0.610 ± 0.01              | 0.593 ± 0.08                | 0.619 ± 0.02                |
| LVPWd (cm) | 0.204 ± 0.05 | 0.222 ± 0.04              | 0.376 ± 0.01 <sup>b</sup>   | 0.328 ± 0.03 <sup>c,d</sup> |
| IVSs (cm)  | 0.301 ± 0.03 | 0.275 ± 0.04              | 0.310 ± 0.05                | 0.311 ± 0.05                |
| LVIDs (cm) | 0.267 ± 0.08 | 0.213 ± 0.06              | 0.285 ± 0.09                | 0.223 ± 0.03                |
| LVPWs (cm) | 0.322 ± 0.05 | 0.387 ± 0.01              | 0.500 ± 0.01 <sup>b</sup>   | 0.537 ± 0.10 <sup>c,d</sup> |
| FS (%)     | 58.55 ± 4.13 | 66.80 ± 4.81 <sup>a</sup> | 52.01 ± 4.45 <sup>b,e</sup> | 63.90 ± 4.99                |

Results are shown as mean ± SD, *n* = 12, per group

Significant difference (*p* < 0.05) between examined groups are marked by letters: <sup>a</sup>CTRL versus DATS; <sup>b</sup>CTRL versus DM; <sup>c</sup>CTRL versus DM + DATS; <sup>d</sup>DATS versus DM + DATS; <sup>e</sup>DM versus DM + DATS

### DATS reduced myocardial injury

As shown in Fig. 5 in all groups we have found: irregularly arranged muscle fibers, interstitial substance exhibited edema, damaged muscle membrane, degeneration, and necrosis. These histopathological changes are more obvious in DM than in CTRL and DM + DATS groups. Compared with CTRL group, DATS group showed significantly reduced I/R-induced myocardial structure turbulence.

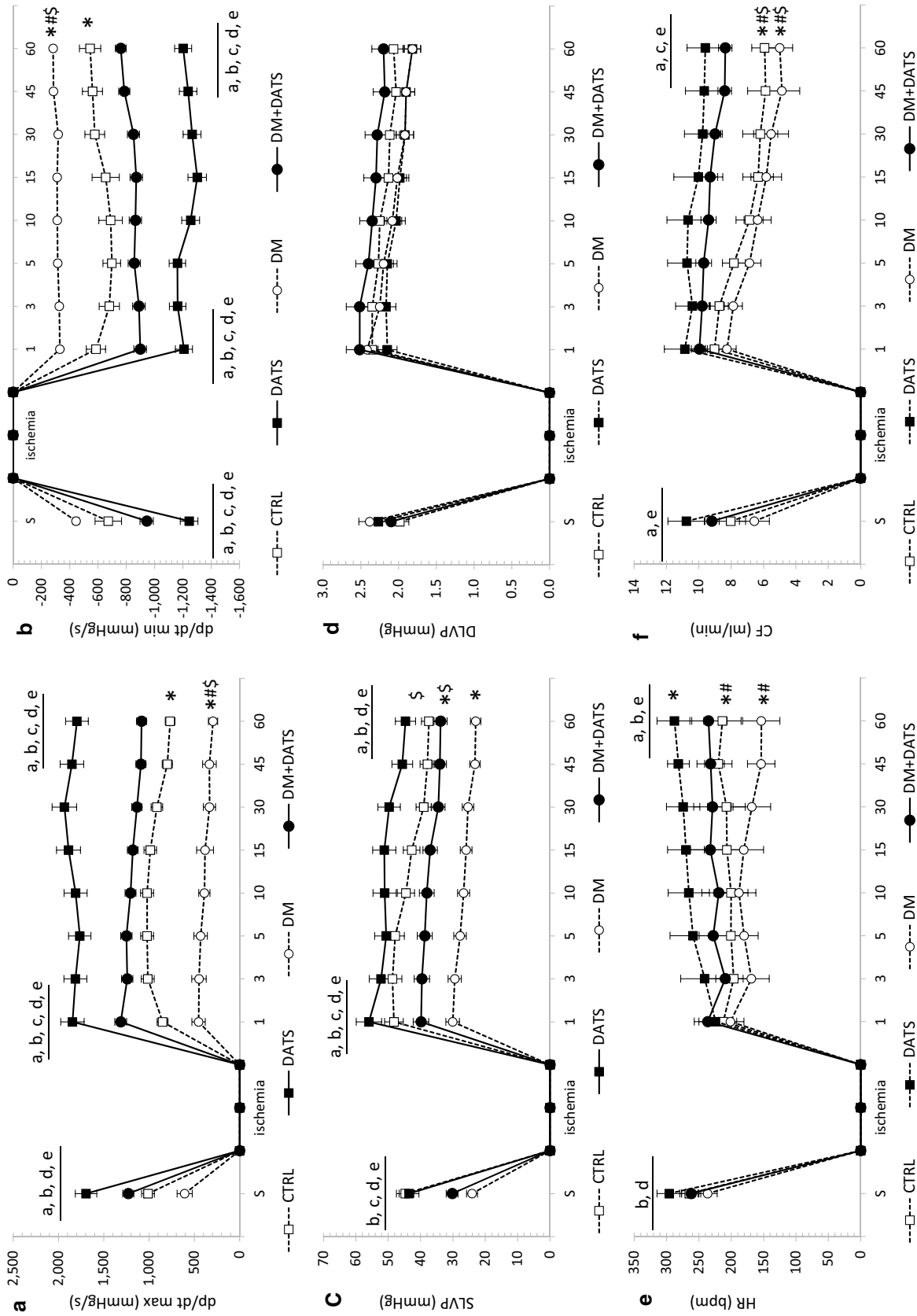
As shown in Fig. 6 clear loss of cTnT staining and very little positive (brown) staining was observed in DM group; decrease in staining with several positivity (brown color) remaining was detected in DM + DATS and CTRL groups; minimal (almost no) loss of staining was noticed in DATS group.

### Discussion

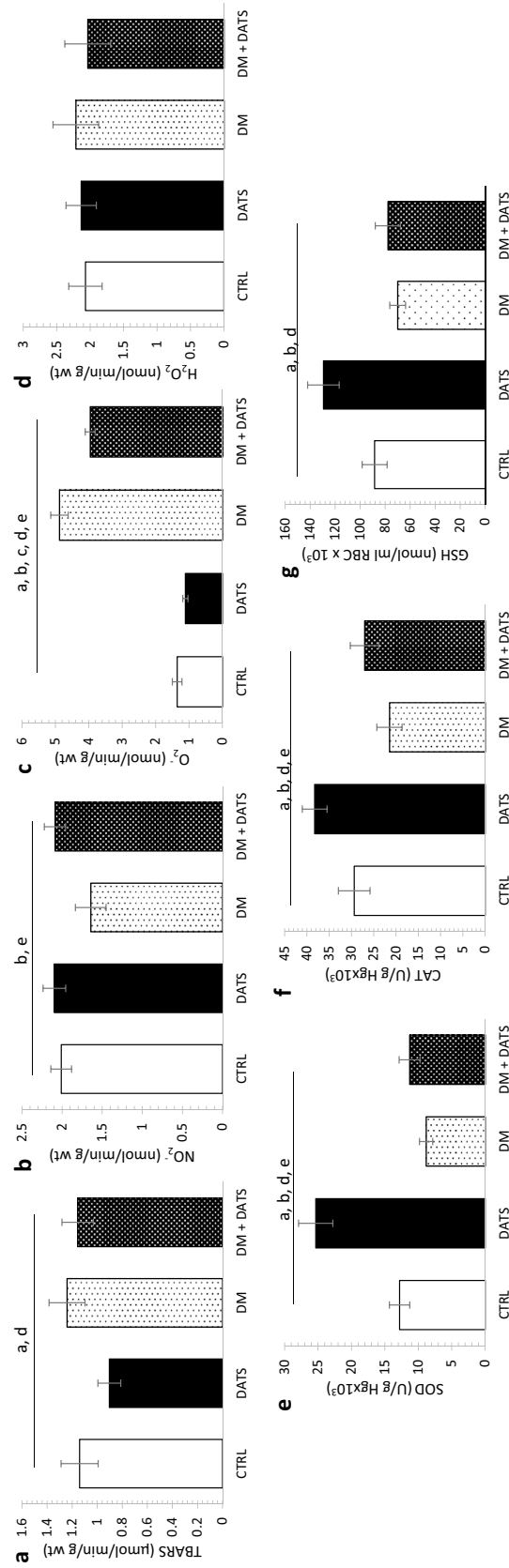
Our results show that 3-week DATS treatment did not alter physical symptoms of type 1 DM such as weight loss, polydipsia and hyperglycemia, induced by STZ-injection, whereas fasting glucose levels in diabetic rats were notably reduced. Mechanisms involve in the antidiabetic potential of DATS are still unclear. However, direct or indirect increase in insulin secretion from  $\beta$ -cells pancreatic islets or release of bound insulin might be possible pathways [4]. In agreement with our results, several studies have shown the hypoglycemic effect of garlic, attributing mainly to allicin-type compounds such as DATS [3, 13].

As already mentioned, diabetes is usually followed by an increased risk of cardiovascular disease, therefore, we have thoroughly examined the effects of DATS on the heart. Our study also indicates a statistically significant increase in heart weight/body weight ratio, LVPWd and LVPWs, as well as a decrease in FS resulting in heart cardiomyopathy characterized by eccentric hypertrophy in the DM group. However, we noticed improved diastolic and systolic heart function in DM + DATS group assessed by IVSd, LVPWd,

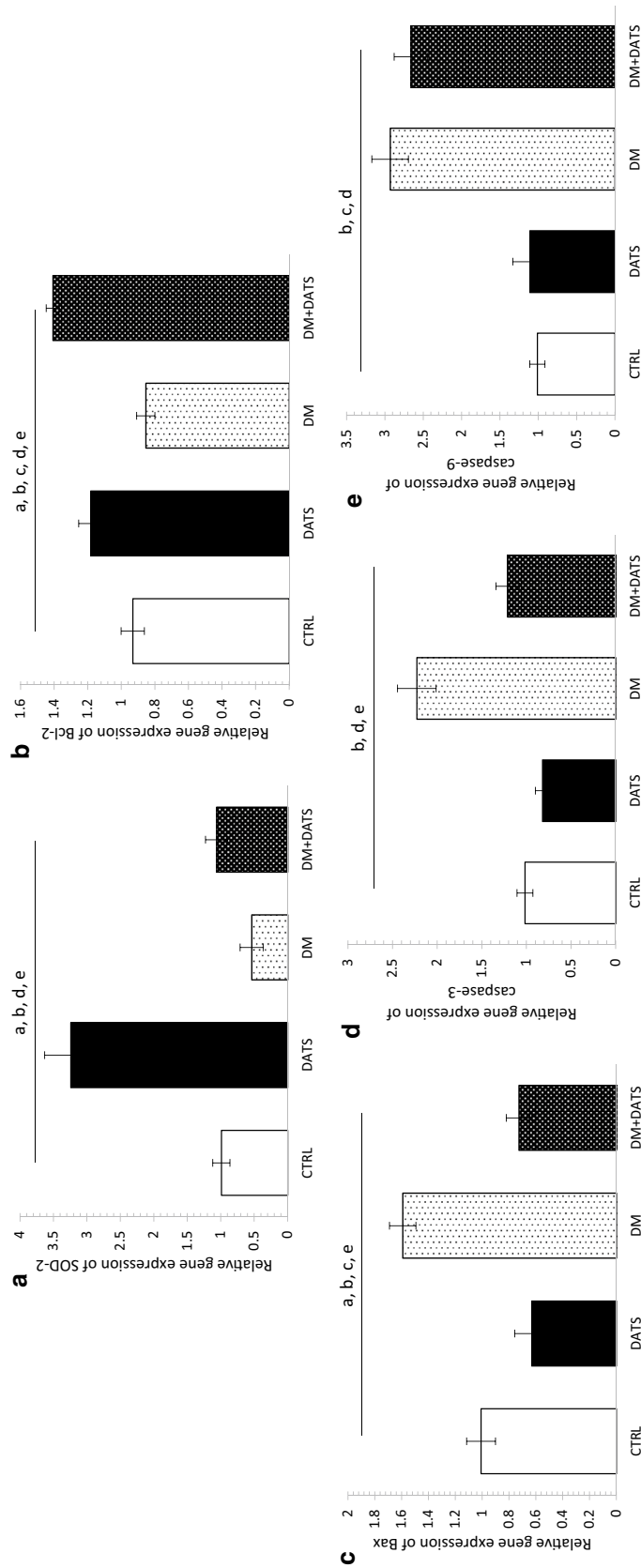
LVPWs, FS and reduced development of cardiac hypertrophy. Additionally, the main advantage of DATS is a significant increase in FS which leads to an improvement in systolic function and myocardial contractility in healthy and diabetic rats. These findings are in correlation with previous, which confirmed that both exogenous and endogenous derived H<sub>2</sub>S exhibit powerful cytoprotective effects in different models of heart failure [14]. These favorable effects could be explained via antioxidative capacity of DATS. Considering that diabetic cardiomyopathy is a distinct primary disease process which results in structural and functional abnormalities of the myocardium leading to heart failure [15], special attention was paid to potential role of DATS in a model of heart preconditioning. Our results clearly show that myocardial dysfunction is present in DM hearts exposed to I/R. Depression of cardiac function and compromised inotropic and lusitropic properties of the heart, as well as disturbed CF and HR, were notable in DM compared to CTRL. Consistent with previous in vivo and ex vivo studies [12], our study clearly demonstrated that DATS significantly reduces I/R injury in healthy and diabetic rats by improving cardiac recovery. DATS consumption increased the absolute values of cardiac contractility force, SLVP, and CF at S point, while after 60 min of reperfusion, in addition to the mentioned parameters, HR also increased significantly. The contractile force and CF were almost constant and did not alter during reperfusion period in rats fed with DATS. Inhibiting the activation of p38 mitogen-activated protein kinases (p38MAPK) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 pathways as well as preventing oxidative stress in H<sub>9</sub>C<sub>2</sub> cells are possible mechanisms behind cardioprotective effects of DATS [16]. Activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) which raise the NO level simultaneously with diminished reactive oxygen species (ROS) levels may be one of the possible explanations for preserved coronary vasodilatory response in groups fed with DATS. DATS has been shown to protect eNOS against oxidized low-density lipoprotein damage, protect endothelial cells and increase eNOS expression and NO bioavailability



**Fig. 2** Effects of DATS preconditioning on cardiodynamic parameters: **a** dp/dt max, **b** dp/dt min, **c** SLVP, **d** DLVP, **e** HR, **f** CF in CTRL, DATS, DM and DM + DATS groups. Results are shown as mean  $\pm$  SD,  $n = 12$ , per group. Significant difference ( $p < 0.05$ ) between examined groups are marked by letters: <sup>a</sup>CTRL versus DATS; <sup>b</sup>CTRL versus DM; <sup>c</sup>CTRL versus DM + DATS; <sup>d</sup>DATS versus DM + DATS; <sup>e</sup>DM versus DM + DATS. Statistical differences between points of interest within the group: <sup>#</sup>S versus 1; <sup>\*</sup>S versus 60; <sup>\$</sup>1 versus 60

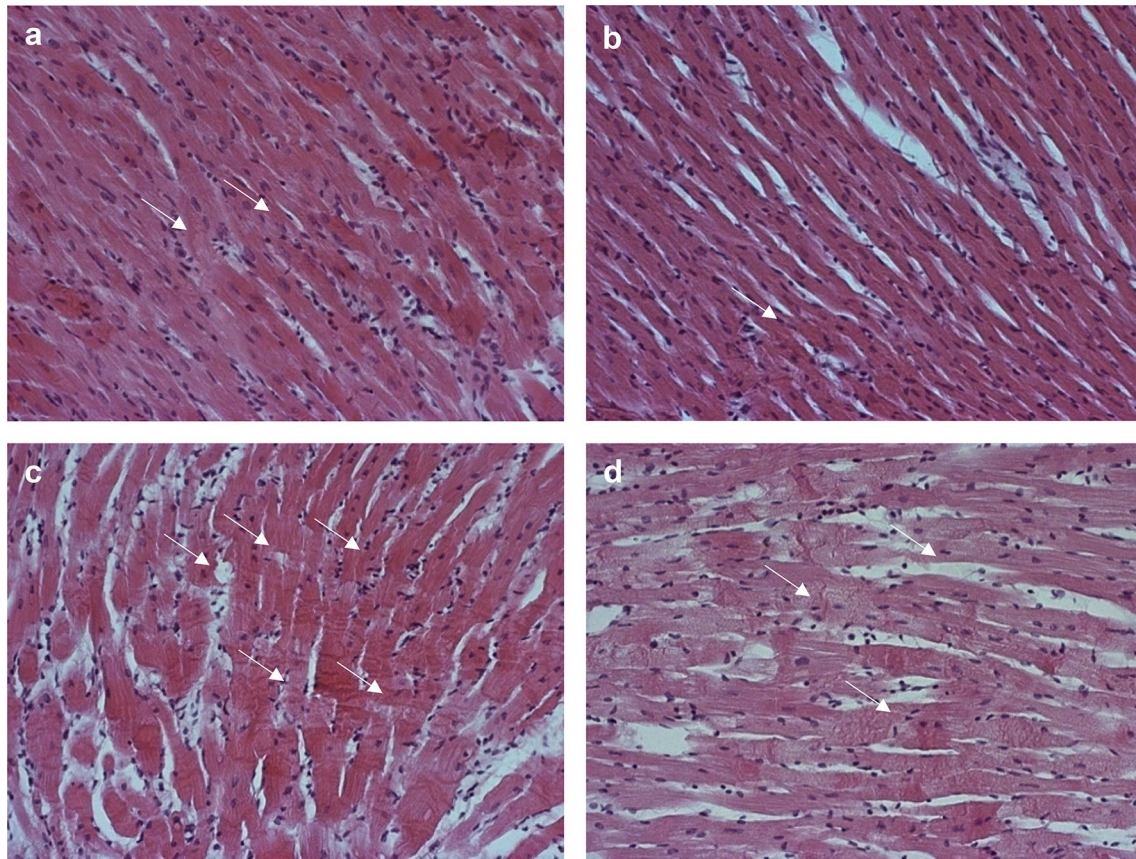


**Fig. 3** Effects of DATS on systemic oxidative stress state in healthy and diabetic rats: **a** TBARS, **b** NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, **c** O<sub>2</sub><sup>-</sup>, **d** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, **e** SOD, **f** CAT, **g** GSH. Results are shown as mean ± SD, n = 12, per group. Significant difference (p < 0.05) between examined groups are marked by letters: <sup>a</sup>CTRL versus DATS; <sup>b</sup>CTRL versus DM; <sup>c</sup>CTRL versus DM + DATS; <sup>d</sup>DATS versus DM + DATS; <sup>e</sup>DM versus DM + DATS



**Fig. 4** Effect of DATS preconditioning on relative gene expression of: **a** SOD-2, **b** Bcl-2, **c** Bax, **d** caspase-3, **e** caspase-9 on healthy and diabetic hearts. Results are shown as mean  $\pm$  SD,  $n = 10$ , per group. Significant difference ( $p < 0.05$ ) between examined groups are marked by letters: <sup>a</sup>CTRL versus DATS; <sup>b</sup>CTRL versus DM; <sup>c</sup>CTRL versus DM + DATS; <sup>d</sup>DATS versus DM + DATS; <sup>e</sup>DM versus DM + DATS



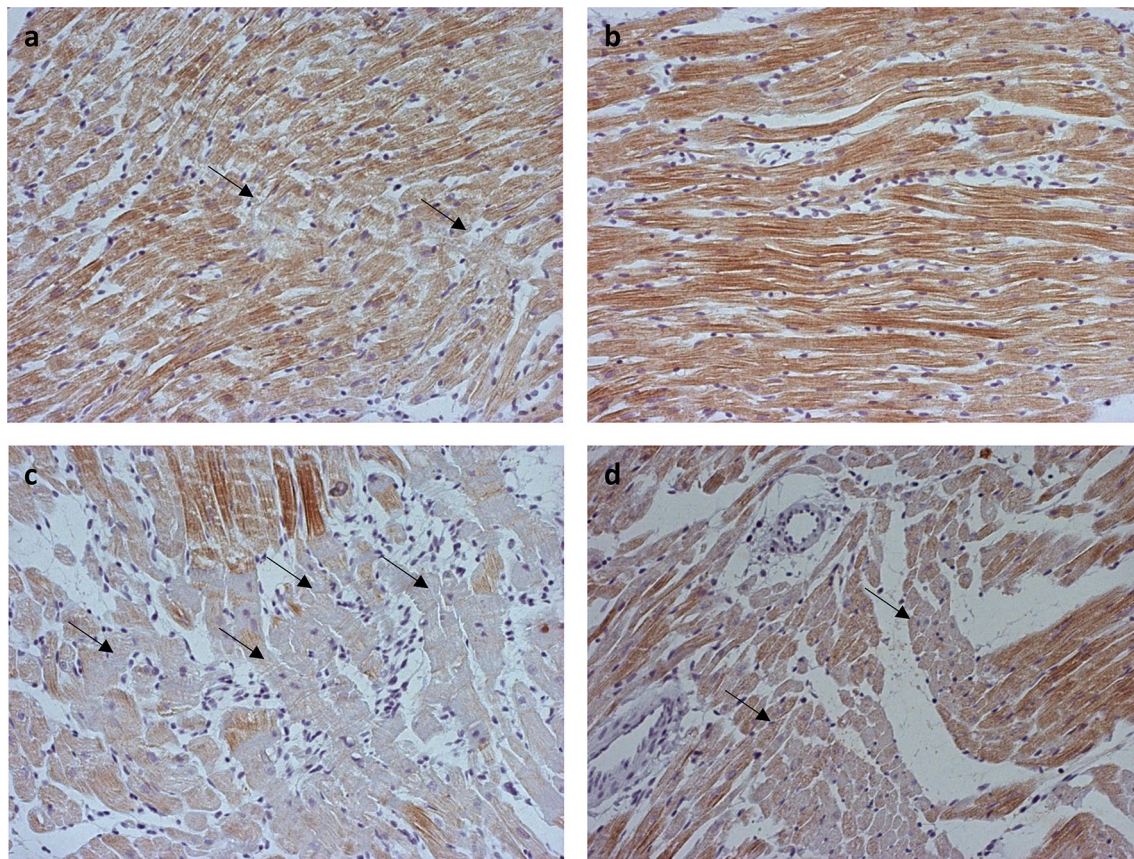


**Fig. 5** Representative hematoxylin and eosin staining photos of left ventricular tissue in: **a** CTRL, **b** DATS, **c** DM and **d** DM+DATS groups

after coronary injury [17]. Previously have been shown that  $H_2S$  activates eNOS by increasing the phosphorylation of eNOS at Ser<sup>1177</sup> [18]. The mechanism proposed for the eNOS activation by DATS is similar to that described for  $H_2S$ . Furthermore, striking evidence also indicate that stent coated with DATS improved the endothelial function in the coronary by increasing the eNOS expression [17].

Systemic increases in ROS and reactive nitrogen species (RNS), as well as the decrease of enzymatic and nonenzymatic cell antioxidant defences, are the key events in the development of diabetic complications [7]. In that sense, we measured levels of pro-oxidants and antioxidants in either plasma or erythrocyte lysate. Our results clearly showed that DATS consumption in DM affects the reduction of  $O_2^-$  production and more importantly affects the increment of  $NO_2^-$ , SOD and CAT. Antioxidative potential of DATS is more superior in healthy rats, so besides aforementioned we also found a decrease of TBARS and increase of GSH in DATS group. Unchanged values of  $H_2O_2$  are probably due to increment in CAT and SOD activity which are responsible for its decomposition to water and oxygen. As it was expected, increased generation of  $O_2^-$  and diminished activity of all measured antioxidant parameters were noticed in DM group

compared to CTRL. A report stated that DM can trigger oxidative stress through several mechanisms: glucose autooxidation, formation of advanced glycation end-products, and stimulation of the polyol pathway. One more possible mechanism is the elevation of free fatty acids and leptin which can contribute to ROS generation as well [1]. The main garlic constituents differently modulate the red blood cell GSH-related antioxidation system but all affect the enhanced intracellular GSH generally depending on cysteine by increasing the local the nuclear factor-E-2-related factor (Nrf2) concentration in the nucleus. Antioxidant potential depends on the number of sulfur atoms, hence DATS stands out as the most potent, followed by DADS and DAS [8]. DATS consumption can perform cardioprotection against the hyperglycemia-induced oxidative stress by mediating  $H_2S$  and suppressing oxidative stress-stimulated c-Jun N-terminal kinases (JNKs) and nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) signaling parallel with activating Nrf2 pathway and thereby upregulating the gene expression of many antioxidant enzymes [9]. Our results highlighted that DATS consumption, especially in healthy rats, extremely increased relative gene expression of SOD-2 in LV which produce mitochondrial enzyme manganese-SOD. This may be a clear



**Fig. 6** Representative cTnT immunostaining photos of left ventricular tissue in: **a** CTRL, **b** DATS, **c** DM and **d** DM+DATS groups

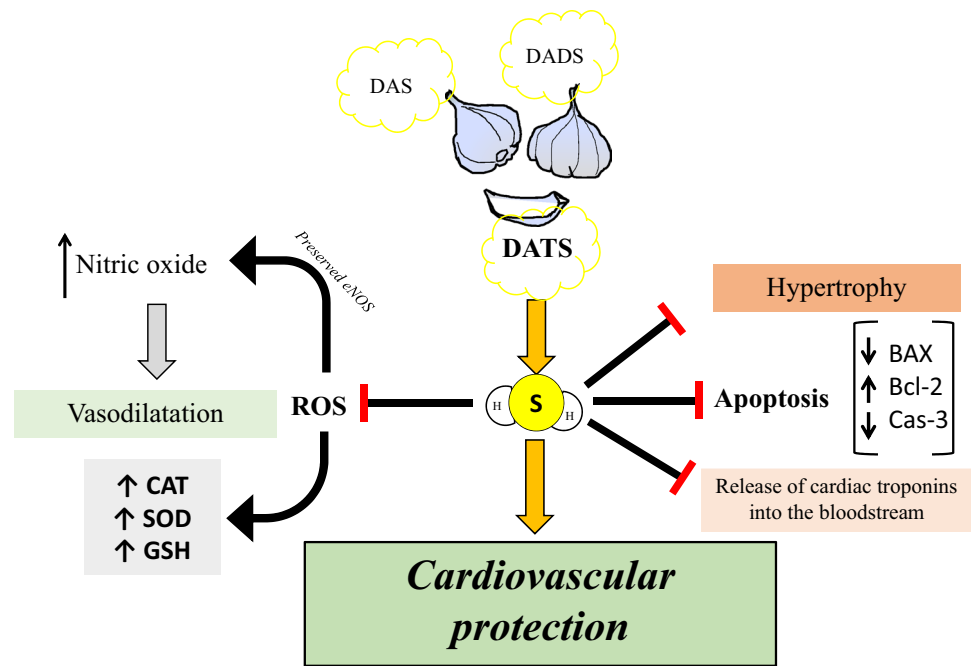
indicator of the antioxidative potential of DATS in heart tissue because SOD-2 makes more than 70% of the SOD activity in the heart and over 90% of the activity in cardiac myocytes. Additionally, increment of SOD-2 directly affects the reduction of cardiomyopathy present in DM [19].

Initiation and development of diabetic cardiac-complications attribute not only to hyperglycemia and enhancement of ROS/RNS but also to the activity of apoptotic markers. Looking further into the mechanisms of DATS cardioprotection during I/R injury, we investigated the levels of apoptotic markers expression in LV. Apoptosis is a mainstay of tissue damage after I/R injury. Several studies have suggested that the upregulation of few antiapoptotic factors including the Bcl-2 gene and downregulation of proapoptotic genes such as Bax play an important role in rescue of ischemic tissue [20]. High glucose concentrations led to a marked increase in levels of dihydronicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase-generated ROS which induced apoptosis in cardiomyocytes by activating the JNK/NF- $\kappa$ B signaling pathway [9]. Intake of DATS increased relative gene expression of Bcl-2, and decrease Bax and caspase-3. Influence of DATS on proapoptotic markers is probably slightly different in healthy and diabetic rats.

DATS supplementation in diabetic rats significantly reduced the relative gene expression of Bax and caspase-3, while in healthy rats only Bax decreased significantly. Although caspase-9 was increased in the LV of the DM heart, supplementation of DATS did not significantly affect its gene expression. Our results are in line with reports showing that H<sub>2</sub>S treated mice exhibited diminished activation of caspase-3 and a decreased TUNEL positive nuclei count [21]. Moreover, using an in vivo model of H<sub>2</sub>S preconditioning lead to increased antiapoptotic (Bcl-2 and Bcl-xL) and inactivated proapoptotic (Bad) proteins. In addition, the expression of heat shock proteins (HSP70 and HSP90) which can suppress apoptosis were increased [7, 22]. Additionally, preconditioning with H<sub>2</sub>S promotes antiapoptotic signaling pathways by altering p38, ERK 1/2, and phosphoinositide-3-kinase (PI3K) expression [23]. Generally, and according to our results, the mechanism of myocardial apoptosis inhibition by DATS treatment might be related to the fact that DATS induce antioxidant activities and eliminate the free oxygen radicals.

Hematoxylin and eosin staining gave us inside in pathohistological and morphological changes such as edema, degenerative changes, necrosis and inflammation, which

**Fig. 7** Proposed mechanisms of DATS cardioprotection, based on our results: as a donor or/and mediator of H<sub>2</sub>S, DATS activates endothelial nitric oxide synthase (eNOS) which raise the NO level simultaneously with diminished reactive oxygen species (ROS) levels and preserve coronary vasodilatory response. On the other hand, DATS reduces the development of cardiac hypertrophy in DM, inhibits myocardial apoptosis and preserve myocardium



were present in all examined groups. However, according to our data, these changes are more obvious in DM, while DATS significantly reduced I/R-induced myocardial structure turbulence. Additionally, the results of Huang and coauthors showed that the diameter of the left ventricular lumen is increased in the DM groups, and decreased to the roughly normal value upon the treatment of DADS, DATS or garlic oil [7]. More sensitive and more specific for the detection of myocardial necrosis in post-mortem heart examination is immunohistochemical staining of cTnT. Myocardial necrosis can be diagnosed by determining cTnT and cTnI levels. Therewith, several studies on animal models of myocardial infarction have shown that increases in cTnT in the serum are highly correlated with the size of the infarct [24, 25]. In an experimental study on dogs, it has been observed that serum troponin levels rise in parallel with the loss of troponin in the ischemic myocardial tissue [26]. Greater loss of cardiac troponin was observed in untreated groups when compared with DATS-treated groups. In addition, in DM and CTRL groups, there was consequential histologic and/or functional evidence of irreversibly injured myocardial tissue. In correlation to our results, multiple studies have reported that DATS consumption is associated with decreased CK-MB, cTnT and cTnI serum levels and improved survival rates after reperfusion [27–29]. To the researchers' knowledge, all previous studies have biochemically examined the effects of DATS on the level of troponins, and neither of them observed the tissue microscopically to visualize the pattern of cTnT loss from the injured myocardium.

In this study, for the first time, the cardioprotective effects of DATS have been thoroughly examined. More importantly, functional effects are associated with antioxidant and antiapoptotic effects. The observed findings indicated that DATS may represent a promising agent in the treatment of T1DM and the prevention of cardiovascular complications. DATS releases H<sub>2</sub>S in the heart homogenate and may help maintain H<sub>2</sub>S concentrations at physiological (healthy) low levels over an extended period of time. DATS immediate release H<sub>2</sub>S via thiol-disulfide exchange with GSH in both chemical and biological systems, human red blood cells or rat aorta [28, 30]. It is important to note that the examined dose of DATS cannot be replaced by garlic consumption in human. Namely, the average human should ingest 2.8 kg of garlic every other day to achieve the 40 mg/kg of DATS [31].

As to future perspectives, it will be interesting to explore the effects of DATS on female rats, although we do not expect gender differences, further investigations are needed to confirm our beliefs. In addition, bearing in mind the significant antioxidant effects it is clear that the DATS supplementation may help delay or prevent the onset of T1DM and T2DM, but more studies are essential to understanding the mechanisms underlying prevention of these diseases. In the previous studies, as in our case, no significant adverse effects of this agent have been reported [6–9].

## Conclusion

Taken together, our findings show that DATS consumption significantly reduced blood glucose levels of diabetic rats, and improved cardiac function recovery, diminished oxidation status, inhibited myocardial apoptosis, attenuated cardiac remodeling and preserving the myocardium in healthy, as well as in diabetic rats. Our findings reveal that DATS acts as a natural antioxidant, and causes promising cardioprotective effects on ex vivo-induced I/R injury in the diabetic and healthy rat heart probably by inhibiting myocardial apoptosis (Fig. 7). Additionally, appropriate DATS consumption may potential be used as a co-therapy for regulation of hyperglycemia and prevention of various cardiac complications in DM.

**Acknowledgements** This work was supported by Junior Project 03/18 by the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors have declared no conflict of interest.


## References

- Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW (2013) Type 1 diabetes. *Lancet* 383:69–82
- Yu L, Li S, Tang X, Li Z, Zhang J, Xue X, Han J, Liu Y, Zhang Y, Zhang Y, Xu Y, Yang Y, Wang H (2017) Diallyl trisulfide ameliorates myocardial ischemia–reperfusion injury by reducing oxidative stress and endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in type 1 diabetic rats: role of SIRT1 Activation. *Apoptosis* 22:942–954
- Eidi A, Eidi M, Esmaeili E (2006) Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine* 13:624–629
- Londhe VP (2011) Role of garlic (*Allium sativum*) in various diseases-an overview. *J Pharm Res* 4:129–134
- Bradley JM, Organ CL, Lefer DJ (2016) Garlic-derived organic polysulfides and myocardial protection. *J Nutr* 146:403S–409S
- Liu CT, Hse H, Lii CK, Chen PS, Sheen LY (2005) Effects of garlic oil and diallyl trisulfide on glycemic control in diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 516:165–173
- Huang YT, Yao CH, Way CL, Lee KW, Tsai CY, Ou HC, Kuo WW (2012) Diallyl trisulfide and diallyl disulfide ameliorate cardiac dysfunction by suppressing apoptotic and enhancing survival pathways in experimental diabetic rats. *J App Physiol* 114:402–410
- Chen YL, Chen Q, Cheng YF, Jin HH, Kong DS, Zhang F, Wu L, Shao JJ, Zheng SZ (2016) Diallyl trisulfide attenuates ethanol-induced hepatic steatosis by inhibiting oxidative stress and apoptosis. *Biomed Pharmacother* 79:35–43
- Kuo WW, Wang WJ, Tsai CY, Way CL, Hsu HH, Chen LM (2013) Diallyl trisulfide (DATS) suppresses high glucose-induced cardiomyocyte apoptosis by inhibiting JNK/NFκB signaling via attenuating ROS generation. *Int J Cardiol* 168:270–280
- Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM (2011) Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol* 50:940–950
- Jeremic J, Nikolic Turnic T, Zivkovic V, Jeremic N, Milosavljevic I, Srejovic I, Obrenovic R, Jancic S, Rakocevic M, Matic S, Djuric D, Jakovljevic V (2018) Vitamin B complex mitigates cardiac dysfunction in high-methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 45:683–693
- Wu CC, Sheen LY, Chen HW, Kuo WW, Tsai SJ, Lii CK (2002) Differential effects of garlic oil and its three major organosulfur components on the hepatic detoxification system in rats. *J Agric Food Chem* 50:378–383
- Chang MLW, Johnson MA (1980) Effect of garlic on carbohydrate metabolism and lipid synthesis in rats. *J Nutr* 110:931–936
- Polhemus D, Kondo K, Bhushan S, Bir SC, Kevil CG, Murohara T, Lefer DJ, Calvert JW (2013) Hydrogen sulfide attenuates cardiac dysfunction following heart failure via induction of angiogenesis. *Circ Heart Fail* 6:1077–1086
- Xu W, Wu W, Chen J, Guo R, Lin J, Liao X, Feng J (2013) Exogenous hydrogen sulfide protects H9c2 cardiac cells against high glucose-induced injury by inhibiting the activities of the p38MAPK and ERK1/2 pathways. *Int J Mol Med* 32:917–925
- Wei WB, Hu X, Zhuang XD, Liao LZ, Li WD (2014) GYY4137, a novel hydrogen sulfide-releasing molecule, likely protects against high glucose-induced cytotoxicity by activation of the AMPK/mTOR signal pathway in H9c2 cells. *Mol Cell Biochem* 389:249–256
- Nie XM, Zhou YJ, Xie Y, Li YF, Yang Q, Zhou ZM (2006) Effect of stent coated with diallyl trisulfide on endothelial structure and function after coronary injury: experiment with dogs. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 86:1125–1128
- Predmore BL, Julian D, Cardounel AJ (2011) Hydrogen sulfide increases nitric oxide production from endothelial cells by an Akt-dependent mechanism. *Front Physiol* 2:104
- Calvert JW, Jha S, Gundewar S, Elrod JW, Ramachandran A, Pattillo CB, Kevil CG, Lefer DJ (2009) Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling. *Circ Res* 105:365–374
- Zhou X, An G, Lu X (2015) Hydrogen sulfide attenuates the development of diabetic cardiomyopathy. *Clin Sci* 128:325–335
- Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, Doeller JE, Kraus DW, Tao L, Jiao X, Scalia R, Kiss L, Szabo C, Kimura H, Chow CW, Lefer DJ (2007) Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:15560–15565
- Yang Z, Yang C, Xiao L, Liao X, Lan A, Wang X, Guo R, Chen P, Hu C, Feng J (2011) Novel insights into the role of HSP90 in cytoprotection of H<sub>2</sub>S against chemical hypoxia-induced injury in H9c2 cardiac myocytes. *Int J Mol Med* 28:397–403
- Luan HF, Zhao ZB, Zhao QH, Zhu P, Xiu MY, Ji Y (2012) Hydrogen sulfide postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia and reperfusion injury mediated by the JAK2/STAT3 survival pathway. *Braz J Med Biol Res* 45:898–905
- Fishbein MC, Wang T, Matijasevic M, Hong L, Apple FS (2003) Myocardial tissue troponins T and I: an immunohistochemical study in experimental models of myocardial ischemia. *Cardiovasc Pathol* 12:65–71
- O'Brien PJ, Dameron GW, Beck ML, Kang YJ, Erickson BK, Di Battista TH, Miller KE, Jackson KN, Mittelstadt S (1977) Cardiac troponin T is a sensitive specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. *Lab Anim Sci* 47:5
- Ricchiuti V, Sharkey SW, Murakami MM, Voss EM, Apple FS (1998) Cardiac troponin I and T alterations in dog hearts with myocardial infarction: correlation with infarct size. *Am J Clin Pathol* 110:241–247
- Sun X, Wang W, Dai J, Jin S, Huang J, Guo C, Wang C, Pang L, Wang Y (2017) A long-term and slow-releasing hydrogen sulfide

- donor protects against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Sci Rep* 7:3541
28. Predmore BL, Kondo K, Bhushan S, Zlatokopsky MA, King AL, Aragon JP, Grinsfelder BD, Condit ME, Lefer DJ (2012) The polysulfide diallyl trisulfide protects the ischemic myocardium by preservation of endogenous hydrogen sulfide and increasing nitric oxide bioavailability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302:H2410–H2418
  29. Khatua TN, Adela R, Banerjee SK (2013) Garlic and cardioprotection: insights into the molecular mechanisms. *Can J Physiol Pharmacol* 91:448–458
  30. Liang D, Wu H, Wong MW, Huang D (2015) Diallyl trisulfide is a fast H<sub>2</sub>S donor, but diallyl disulfide is a slow one: the reaction pathways and intermediates of glutathione with polysulfides. *Org Lett* 17:4196–4199
  31. Shukla Y, Kalra N (2007) Cancer chemoprevention with garlic and its constituents. *Cancer Lett* 247:167–181

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

# Vitamin B complex mitigates cardiac dysfunction in high-methionine diet-induced hyperhomocysteinemia

Jovana Jeremic<sup>1</sup> | Tamara Nikolic Turnic<sup>1</sup> | Vladimir Zivkovic<sup>2</sup> | Nevena Jeremic<sup>1</sup> | Isidora Milosavljevic<sup>1</sup> | Ivan Srejovic<sup>2</sup> | Radmila Obrenovic<sup>3</sup> | Snezana Jancic<sup>4</sup> | Milena Rakocevic<sup>4</sup> | Stevan Matic<sup>4</sup> | Dragan Djuric<sup>5</sup> | Vladimir Jakovljevic<sup>2,6</sup> 

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>2</sup>Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>3</sup>Institute for Medical Biochemistry, Clinical Centre of Serbia, Belgrade, Serbia

<sup>4</sup>Department of Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>5</sup>Institute of Medical Physiology "Richard Burian", School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

<sup>6</sup>Department of Human Pathology, 1st Moscow State Medical, University IM Sechenov, Moscow, Russian Federation

## Correspondence

Vladimir Jakovljevic, Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia. Email: drvladakbg@yahoo.com

## Funding information

This work was supported by the Ministry of Science and Technical Development of the Republic of Serbia (Grant No. 175043) and Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac (Junior Project No. 09/2011).

## Summary

This research is designed to test the hypothesis that elevated homocysteine (Hcy) levels in vivo, caused by a deficit in vitamin B complex, promote changes in cardiac function and redox status that lead to heart failure. In order to conduct the study, we used adult male *Wistar albino* rats ( $n = 30$ ; 4 weeks old;  $100 \pm 15$  g body weight). Hyperhomocysteinaemia (HHcy) in these animals was achieved by dietary manipulation. For 4 weeks, the animals were fed with a standard rodent chow (control, CF), a diet enriched in methionine with no deficiency in B vitamins (i.e., folic acid, B6 and B12) (HMNV) or a diet enriched in methionine and deficient in B vitamins (HMLV). After 28 days of dietary manipulation, all animals were killed. The rat hearts were isolated and retrogradely perfused according to the Langendorff technique at a gradually increasing perfusion pressure. We found a negative correlation between elevated serum Hcy and total body and heart weight. The maximum rate of left ventricular pressure development was significantly increased in the HMNV group compared with in the other groups. Systolic left ventricular pressure was significantly changed in all groups. HHcy induces remodelling of the cardiac tissues, as moderate HHcy is associated with more prominent interstitial and perivascular fibrosis. Our results suggest that a high methionine diet without vitamin B complex causes profound negative effects associated with HHcy.

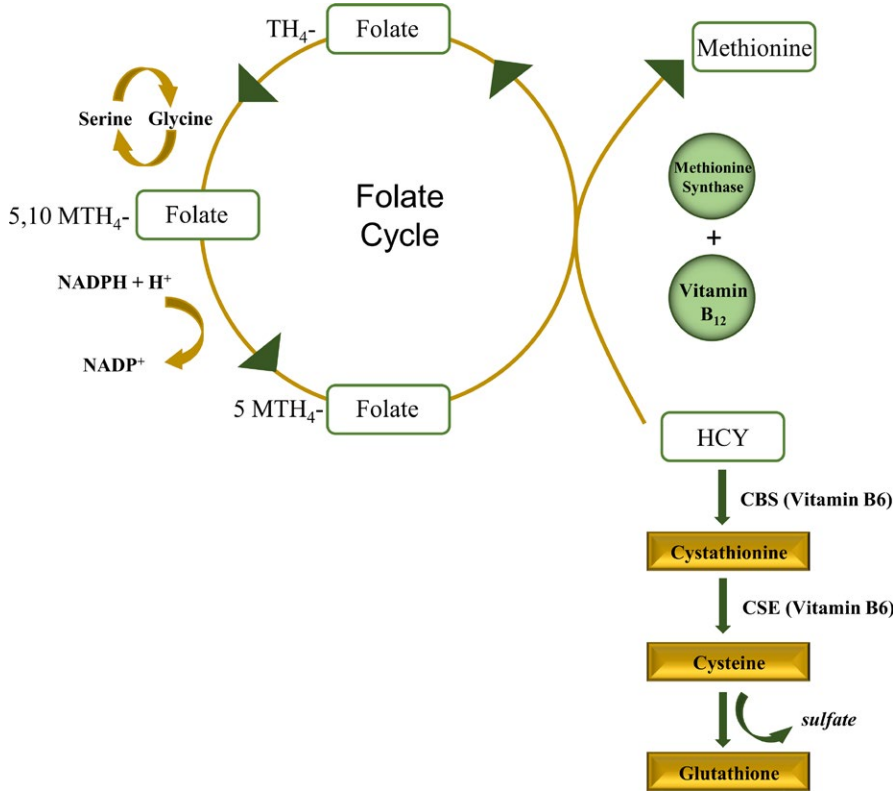
## KEYWORDS

cardiac function, fibrosis, hyperhomocysteinaemia, oxidative stress, vitamin B complex

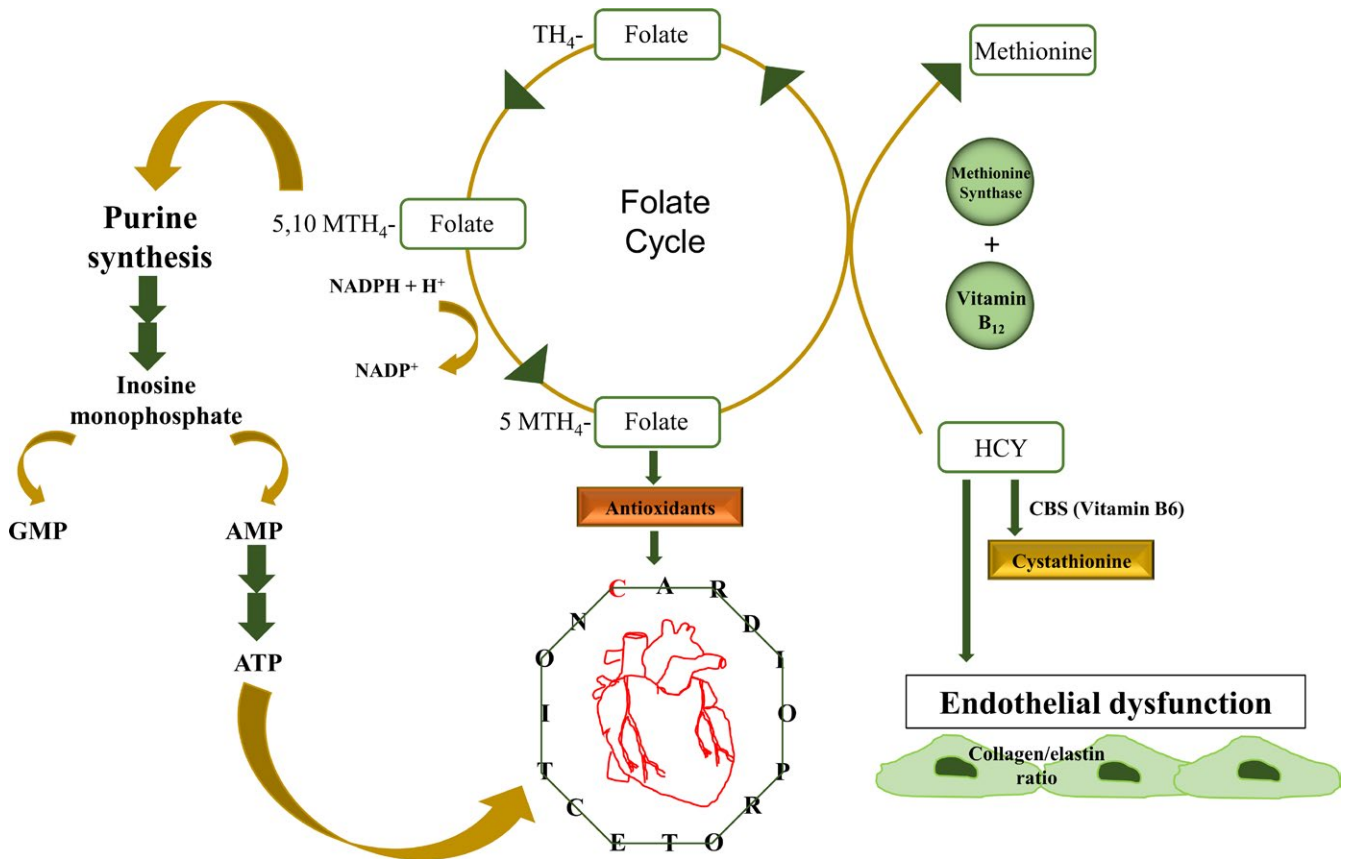
## 1 | INTRODUCTION

Homocysteine (Hcy) is a nonessential amino acid containing sulphur that is formed by a methionine demethylation pathway. The methyl group-rich amino acid methionine is first activated to form *S*-adenosylmethionine (SAM), which serves as a methyl donor in over 115 methyl transfer reactions. The loss of the methyl group results in the residual product *S*-adenosylhomocysteine (SAH), and the hydrolysis of SAH yields Hcy (Figure 1).<sup>1-3</sup>

Hyperhomocysteinemia (HHcy) may be a consequence of a genetic cystathione  $\beta$ -synthase deficiency or a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. It may also be related to a deficiency of vitamins B<sub>6</sub> (pyridoxine), B<sub>12</sub> (cobalamin) and B<sub>9</sub> (folic acid), because those factors are essential for methionine synthesis, and pyridoxal-5 phosphate is essential for cystathionine synthesis.<sup>4,5</sup> A deficiency of these co-factors results in HHcy because Hcy remethylation is "blocked" (Figure 2).<sup>6,7</sup> Cobalamin has been the subject of considerable recent investigations in the



**FIGURE 1** Folate cycle. Metabolism of homocysteine<sup>1-3</sup>



**FIGURE 2** Overall hypothesis

context of oxidative stress.<sup>8,9</sup> The results of these studies suggest that even a modest reduction in vitamin B<sub>12</sub> levels will cause an elevation of plasma Hcy and that HHcy is a symptom of a possible vitamin B<sub>12</sub> deficiency. Kang et al.<sup>10</sup> have classified HHcy as moderate (Hcy concentration from 15 to 30 μmol/L), intermediate (30–100 μmol/L) and severe (above 100 μmol/L) on the basis of the concentrations measured in the blood during fasting. Numerous studies suggest that even moderate HHcy (>15 μmol/L) is an independent risk factor for cardiovascular disease (CVD), including ischaemic heart disease, stroke, and peripheral vascular disease.<sup>4,11</sup>

HHcy and other cardiovascular risk factors have been suggested to be implicated in an aggravation of the imbalance of pro-oxidants and antioxidants linked to its pro-oxidant properties or in the impairment of antioxidant systems.<sup>12,13</sup> Hcy contains a highly reactive thiol (-SH) group which readily self-oxidizes to form a disulphide linkage with another free thiol along with the generation of superoxide radicals as a by-product. Hcy can also shift the nitric oxide synthase (NOS) reaction towards the production of peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) rather than nitric oxide (NO), which might contribute to the development of CVD.<sup>7</sup>

Even though in conditions such as vascular, renal, arterial hypertension or neurovascular disease, HHcy may be moderate or even severe, cardiovascular disease is not a known complication of a folate or vitamin B<sub>12</sub> deficiency. In the last few decades, more studies in various animal models have investigated the effects of HHcy on the cardiovascular system and different biochemical parameters. Thus far, the precise mechanisms of how Hcy interferes with the cardiovascular system have not yet been revealed.<sup>14,15</sup>

This study was aimed to test the hypothesis that elevated Hcy levels in vivo caused by a deficit in the vitamin B complex promote changes in cardiac function and redox status that lead to heart failure.

## 2 | RESULTS

### 2.1 | Homocysteine concentration

In the HMLV and HMNV groups, the average serum concentrations of Hcy were 63.89 ± 0.1 and 22.43 ± 0.3 μmol/L, or 7.8 and 2.8-fold higher than those in the control group (8.11 ± 0.1).

### 2.2 | Growth

We found significant differences in body weight and food intake in all groups. The HMLV group consumed less food and had lower weight gain, and heart and liver weight than the CF and HMNV groups, while HMNV had only lower weight gain and food consumption than in the CF group. Additionally, a high-methionine diet caused a statistically significant increase in the heart weight/body weight and the liver weight/body weight compared to that of the control (Table 1).

### 2.3 | Cardiodynamic parameters of the isolated rat heart

The results of the isolated rat heart retrograde perfusion test at different coronary perfusion pressures (CPP) from 40 cm H<sub>2</sub>O to 120 cm H<sub>2</sub>O after treatment with different diets are shown in Table 2.

The dp/dt max was significantly increased in the HMNV group compared with in the HMLV and CF groups at almost all CPPs. Interestingly, at a CPP of 60 cm H<sub>2</sub>O, no differences were seen between the HMLV and HMNV groups, but a significantly different increase in this parameter separately compared with that of the CF group was noted for each treatment group. Over the entire CPP range, the dp/dt min was significantly increased in the HMNL and HMLV groups compared to that of the CF group. systolic left ventricular pressure (SLVP) was significantly increased in the HMNV and HMLV groups at lower CPP values from 40 cm H<sub>2</sub>O to 80 cm H<sub>2</sub>O. On the other hand, SLVP was significantly different between all groups at the highest CPP values (100 and 120 cm H<sub>2</sub>O), and remarkably high values of this parameter were seen in the HMNV group. Compared to that of the HMLV and CF groups, DLVP was increased in the HMNV group at all CPP, with high statistical significance. HR was significantly increased at the highest CPP values (100 and 120 cm H<sub>2</sub>O) in the HMLV group compared to in the CF and HMNV groups, but at lower perfusion pressures (40–80 cm H<sub>2</sub>O), no significant differences between groups were observed. Finally, Cf was significantly decreased in the HMLV group compared to in the HMNV

**TABLE 1** Morphometric characteristics of all animals (n = 10 in each group)

|       | CF group                      |                             | HMNV group                    |                           | HMLV group                    |                           |
|-------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|
|       | Weight (g)                    | Organ to BW ratio (%)       | Weight (g)                    | Organ to BW ratio (%)     | Weight (g)                    | Organ to BW ratio (%)     |
| tBW   | 413.01 ± 13.15 <sup>a,b</sup> |                             | 356.75 ± 12.08 <sup>a,c</sup> |                           | 258.75 ± 9.32 <sup>b,c</sup>  |                           |
| tFI   | 934.12 ± 25.22 <sup>a,b</sup> |                             | 659.12 ± 19.55 <sup>a,c</sup> |                           | 562.68 ± 42.12 <sup>b,c</sup> |                           |
| Heart | 1.61 ± 0.02 <sup>b</sup>      | 0.391 ± 0.05 <sup>a,b</sup> | 1.49 ± 0.02 <sup>c</sup>      | 0.418 ± 0.07 <sup>a</sup> | 1.09 ± 0.04 <sup>b,c</sup>    | 0.417 ± 0.06 <sup>b</sup> |
| Liver | 17.94 ± 0.91 <sup>b</sup>     | 4.34 ± 0.27 <sup>b</sup>    | 17.25 ± 0.88 <sup>c</sup>     | 4.72 ± 0.33               | 14.25 ± 0.97 <sup>b,c</sup>   | 5.51 ± 0.41 <sup>b</sup>  |

tBW, total body weight; tFI, total food intake; CF, organ (heart and liver) weights/ratios and organ to BW ratio of control-fed; HMNV, high methionine with normal vitamin concentration diet-fed; HMLV, high methionine with low vitamin concentration diet-fed rats.

Organ-to-body weight ratio was calculated from (organ × 100)/BW (%). Data are expressed as the means ± SD and compared using ANOVA, post hoc Scheffé Test.

Statistical significance (*P* < .05) between groups is expressed as the following: a = CF vs HMNV; b = CF vs HMLV; c = HMNV vs HMLV.



**TABLE 2** Cardiodynamic parameters of isolated rat hearts

| Diet | CPP | dp/dt max (mm Hg/s)            | dp/dt min (mm Hg/s)             | SLVP (mm Hg)               | DLVP (mm Hg)               | HR (b.p.m.)                  | Cf (mL/min)                |
|------|-----|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|
| CF   | 40  | 1604.88 ± 209.2 <sup>a,b</sup> | -809.63 ± 124.1 <sup>a,b</sup>  | 33.48 ± 2.5 <sup>a,b</sup> | 0.65 ± 0.02 <sup>a</sup>   | 274.53 ± 10.8                | 7.53 ± 2.5                 |
|      | 60  | 2014.13 ± 245.1 <sup>a,b</sup> | -1119.00 ± 158.8 <sup>a,b</sup> | 42.70 ± 3.5 <sup>a,b</sup> | 0.93 ± 0.01 <sup>a</sup>   | 294.98 ± 15.6                | 10.40 ± 3.1 <sup>b</sup>   |
|      | 80  | 2172.01 ± 321.1 <sup>a,b</sup> | -1191.78 ± 164.7 <sup>a,b</sup> | 45.83 ± 4.2 <sup>a,b</sup> | 1.30 ± 0.03 <sup>a</sup>   | 294.05 ± 11.7                | 13.27 ± 3.2 <sup>b</sup>   |
|      | 100 | 2272.83 ± 298.2 <sup>a,b</sup> | -1284.13 ± 158.7 <sup>a,b</sup> | 49.45 ± 3.9 <sup>a,b</sup> | 1.55 ± 0.04 <sup>a</sup>   | 300.08 ± 15.7 <sup>b</sup>   | 15.80 ± 4.8 <sup>b</sup>   |
|      | 120 | 2591.18 ± 255.8 <sup>a,b</sup> | -1428.03 ± 148.1 <sup>a,b</sup> | 56.28 ± 3.7 <sup>a,b</sup> | 1.88 ± 0.05 <sup>a</sup>   | 309.15 ± 22.1 <sup>b</sup>   | 18.90 ± 4.6 <sup>a,b</sup> |
| HMNV | 40  | 2173.03 ± 289.4 <sup>a,c</sup> | -1186.93 ± 111.4 <sup>a</sup>   | 45.03 ± 1.9 <sup>a</sup>   | 2.10 ± 0.03 <sup>a,c</sup> | 274.08 ± 22.6                | 7.40 ± 1.9                 |
|      | 60  | 2399.93 ± 321.5 <sup>a</sup>   | -1549.55 ± 129.5 <sup>a</sup>   | 55.48 ± 2.8 <sup>a</sup>   | 2.33 ± 0.02 <sup>a,c</sup> | 288.58 ± 24.8                | 10.70 ± 2.5 <sup>c</sup>   |
|      | 80  | 2752.55 ± 402.6 <sup>a,c</sup> | -1715.45 ± 130.4 <sup>a</sup>   | 61.20 ± 3.9 <sup>a</sup>   | 2.50 ± 0.02 <sup>a,c</sup> | 303.60 ± 17.7                | 14.10 ± 2.7 <sup>c</sup>   |
|      | 100 | 2947.68 ± 399.7 <sup>a,c</sup> | -1807.55 ± 198.7 <sup>a</sup>   | 65.18 ± 5.7 <sup>a,c</sup> | 2.83 ± 0.03 <sup>a,c</sup> | 299.70 ± 23.7 <sup>c</sup>   | 17.20 ± 3.3 <sup>c</sup>   |
|      | 120 | 3224.30 ± 344.5 <sup>a,c</sup> | -1879.73 ± 174.4 <sup>a</sup>   | 71.58 ± 6.1 <sup>a,c</sup> | 3.40 ± 0.06 <sup>a,c</sup> | 300.65 ± 33.8 <sup>c</sup>   | 15.15 ± 4.1 <sup>a</sup>   |
| HMLV | 40  | 1752.27 ± 254.2 <sup>b,c</sup> | -1027.61 ± 133.5 <sup>b</sup>   | 42.29 ± 3.7 <sup>b</sup>   | 0.81 ± 0.01 <sup>c</sup>   | 263.40 ± 29.1                | 6.14 ± 1.1                 |
|      | 60  | 2370.76 ± 278.2 <sup>b</sup>   | -1530.19 ± 189.7 <sup>b</sup>   | 54.67 ± 3.7 <sup>b</sup>   | 0.94 ± 0.01 <sup>c</sup>   | 294.13 ± 22.4                | 8.23 ± 2.1 <sup>b,c</sup>  |
|      | 80  | 2549.56 ± 301.8 <sup>b,c</sup> | -1607.03 ± 211.5 <sup>b</sup>   | 56.90 ± 8.7 <sup>b</sup>   | 1.14 ± 0.02 <sup>c</sup>   | 302.17 ± 29.9                | 11.09 ± 2.2 <sup>b,c</sup> |
|      | 100 | 2678.19 ± 336.6 <sup>b,c</sup> | -1680.76 ± 229.7 <sup>b</sup>   | 59.13 ± 9.2 <sup>b,c</sup> | 1.20 ± 0.03 <sup>c</sup>   | 310.59 ± 31.7 <sup>b,c</sup> | 13.40 ± 3.8 <sup>b,c</sup> |
|      | 120 | 2824.36 ± 324.7 <sup>b,c</sup> | -1776.33 ± 205.7 <sup>b</sup>   | 63.51 ± 6.7 <sup>b,c</sup> | 1.56 ± 0.04 <sup>c</sup>   | 316.86 ± 25.6 <sup>b,c</sup> | 16.46 ± 5.7 <sup>b</sup>   |

Isolated rat heart (n = 30) retrograde perfusion tests at different coronary perfusion pressures (CPP) from 40 cm H<sub>2</sub>O to 120 cm H<sub>2</sub>O after treatment with different diets (CF (control), standard rodent chow; HMNV, high methionine normal B vitamin diet; HMLV, high methionine low B vitamin diet). All data are presented as the mean ± SD. Statistical analysis conducted using Mann-Whitney test and nonparametric analogue of the 1-way ANOVA Kruskal-Wallis test.

Statistical significance ( $P < .05$ ) between groups is expressed as the following: a = CF vs HMNV; b = CF vs HMLV; c = HMNV vs HMLV.

and CF groups at CPP values from 60 to 100 cm H<sub>2</sub>O. Interestingly, at the highest CPP (120 cm H<sub>2</sub>O), Cf in the HMLV and HMNV groups was significantly decreased compared to in the CF group, and a non-significant increase of this parameter was seen in the HMLV group compared to in the HMNV group.

## 2.4 | Pro-oxidative parameters (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TBARS) in the plasma

The NO<sub>2</sub><sup>-</sup> level was significantly increased in the HMNV group compared with in the control and HMLV groups, while in the HMLV group, the NO<sub>2</sub><sup>-</sup> level was reduced compared with that of the HMNV group but was similar to that of the control group. The O<sub>2</sub><sup>-</sup> level was significantly increased in the HMLV group compared with that of the HMNV and control groups. In the HMNV group, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level was significantly increased compared with that of the control and HMLV groups, where this marker level was not affected. The TBARS concentration was significantly decreased in the HMNV group and increased in the HMLV group compared with in the control group (Figure 3A-D).

## 2.5 | Non-enzymatic antioxidant (GSH) and enzymatic defence system (CAT and SOD) in blood

In the HMLV and HMNV groups, the GSH level, and the CAT and SOD activities, were decreased compared with that of the CF group. Furthermore, in the HMNV group, the CAT activity was significantly

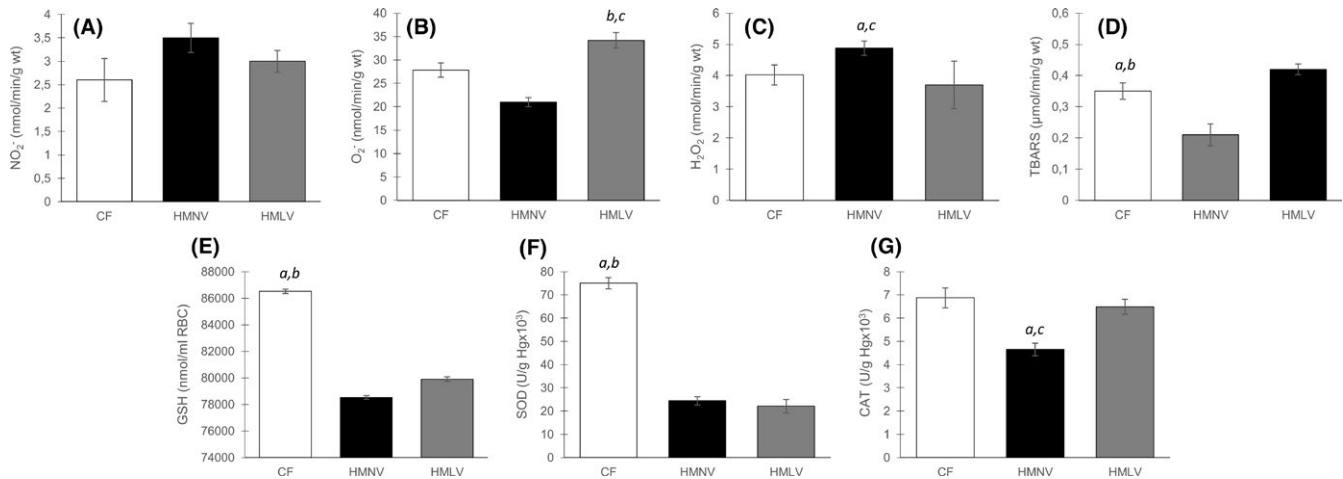
decreased compared with that of the HMLV group, while the SOD activity was nearly the same in the HMNV and HMNL groups (Figure 3E-G).

## 2.6 | Histopathological evaluation of the myocardial tissue

The results of a histopathological evaluation of the myocardial tissue in the various groups are shown in Figure 4. In the CF group, we found loose connective tissue between the cells in the myocardial tissue, which was rich in capillaries. On the other hand, we observed interstitial myocardial fibrosis in the HMLV group. The vessels were had thickened walls, accompanied by hyperplasia of the endothelial cells with prominent perivascular fibrosis. Also, in the HMNV group, the muscle fibres were partially hypertrophic, hypereosinophilic, and partially thinned and degenerated with evidence of sparse interstitial fibrosis. The total collagen content and total number of fibres was significantly increased in the HMLV group compared with in the HMNV and control groups.

## 2.7 | Correlations among serum homocysteine, growth, redox status and cardiodynamic parameters

There was strong negative significant correlation among elevated serum Hcy and the total body weight, heart weight and total food intake. The liver weight and SOD activity showed moderate and negative significant correlations with the total serum Hcy concentration in



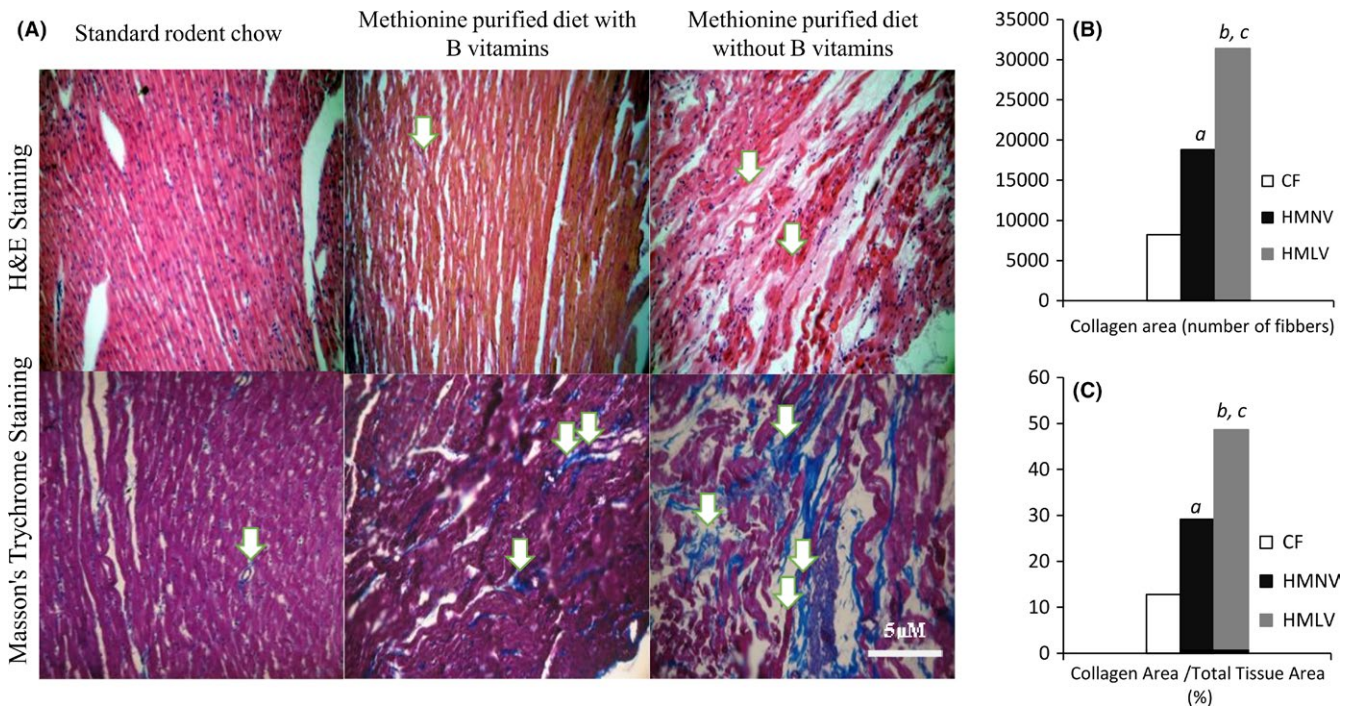
**FIGURE 3** Level of nitric oxide (NO) measured in the form of nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) (A) superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). (B) hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). (C) level of index of lipid peroxidation (TBARS), (D) level of reduced glutathione (GSH), (E) activity of superoxide dismutase (SOD), (F) and activity of catalase (CAT), (G) among all groups. Statistical analysis conducted using 1-way ANOVA Kruskal-Wallis test. Statistical significance (*P* < .05) between groups is expressed as the following: a = CF vs HMNV; b = CF vs HMLV; c = HMNV vs HMLV

all groups. GSH level had a slight negative significant correlation with Hcy among the HMNV, HMLV and CF groups, but the CAT activity was not correlated with a higher total serum Hcy concentration (Table 3).

The NO<sub>2</sub><sup>-</sup> level was strongly negatively correlated with the serum Hcy concentration, but in contrast, the TBARS level had a strong positive correlation with Hcy in all groups. Furthermore, the

Hcy level was moderately correlated with the O<sub>2</sub><sup>-</sup> level but was not in significantly correlated with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level (Table 3).

The dp/dt max and SLVP were positively correlated with Hcy, while dp/dt min and DLVP were in moderately negatively correlated with the Hcy among the groups. HR and Cf were not correlated with tHcy (Table 3).



**FIGURE 4** Haematoxylin and eosin staining (H&E staining) and Masson's trichrome staining of heart after a 4-week diet (A). Representative left and right ventricular sections of the CF, HMNV and HMLV groups are presented in both staining protocol of the rats (*n* = 8). White arrows presented on Figure 4A show greater interstitial and perivascular collagen accumulation and arteriolar wall thickening in the HMLV group as visualized by Masson's trichrome staining. Similarly, compared with that of the control animals, stained sections from the HMLV group show increased interstitial collagen expression but less in the HMNV group. Original magnification: Masson's trichrome ×200; H&E × 100. Quantification data of Figure A is shown in B and C. Statistical significance (*P* < .05) between groups is expressed as the following: a = CF vs HMNV; b = CF vs HMLV; c = HMNV vs HMLV

**TABLE 3** Correlation matrix of tested parameters

| Parameter                                   | Homocysteine ( $\mu\text{mol/L}$ ) |         |
|---|------------------------------------|---------|
|   | P value                            | P value |
| BW (g)                                      | -.840                              | .001*   |
| HW (g)                                      | -.711                              | .002*   |
| LW (g)                                      | -.639                              | .001*   |
| tFI (g)                                     | -.870                              | .002*   |
| SOD (U/g Hg $\times 10^3$ )                 | -.581                              | .001*   |
| CAT (U/g Hg $\times 10^3$ )                 | -.114                              | .298    |
| GSH (nmol/mL RBC)                           | -.363                              | .041*   |
| O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/mL/gwt)   | .575                               | .003*   |
| NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/mL/gwt)  | -.878                              | .001*   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol/mL/gwt) | .538                               | .002*   |
| TBARS ( $\mu\text{mol/mL/gwt}$ )            | .915                               | .001*   |
| dp/dt max (mm Hg/s)                         | .533                               | .007*   |
| dp/dt min (mm Hg/s)                         | -.502                              | .012*   |
| SLVP (mm Hg)                                | .417                               | .042*   |
| DLVP (mm Hg)                                | -.450                              | .028*   |
| HR (b.p.m.)                                 | -.208                              | .329    |
| Cf (mL/min)                                 | -.049                              | .819    |

r, Spearman correlation coefficient; BW, between body weight; HW, heart weight; LW, liver weight; tFI, total food intake; SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; GSH, reduced glutathione; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, superoxide anion radical; NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, nitrite; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide; TBARS, index of lipid peroxidation; dp/dt max and dp/dt min, maximum and minimum development rate of pressure; SLVP, DLVP, systolic and diastolic ventricle pressure; HR, heart rate; Cf, coronary flow; CF, HMNV and HMLV, homocysteine serum levels among all groups of rats.

Spearman correlation coefficient: Low or no correlation  $0 \leq r \leq .3$ ; moderate correlation  $.3 \leq r \leq .7$ ; strong correlation  $.7 \leq r < 1$  ("-" indicates negative correlation).

P value < .05 was considered as significant (\* $P \leq .05$ ).

### 3 | DISCUSSION

In the present study, we used a model of diet-induced HHcy due to a high-methionine intake to mimic the clinical condition of HHcy as much as possible. This type of experimental design can update our current knowledge about elevated Hcy levels in the presence and absence of deficiencies in vitamin B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> and folic acid.

Based on the literature data concerning the classification of HHcy,<sup>10</sup> our results confirm that at the termination of treatment, rats in the HMLV group developed mild (intermediate) HHcy and moderate HHcy in the HMNV group. HHcy has various mechanisms by which it can influence the cardiovascular system, such as a role in endothelial dysfunction, proliferation, inflammation and oxidative processes.<sup>10,16</sup>

In the first part of the study, we examined the effects of HHcy on basic anthropometric characteristics. We found significant differences among body weights and food intake for all study groups. Animals fed a high-methionine diet containing vitamins B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> and folic acid had a slightly lower body weight compared with those

fed the control diet, but moderate HHcy and a B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub>, and B<sub>12</sub> deficiency was associated with the highest reduction of body and organ weights (Table 1). Clearly, Hcy was strongly negatively correlated with body weight (BW) and organ weights. Beck et al.<sup>17</sup> investigated the effects of increased Hcy on body weight after a long-term high-methionine diet in rats. Our data support the notion that HHcy decreases the body, heart and liver weights, which is in accordance with other clinical studies.<sup>18</sup> In particular it should be emphasized that a weight change did not predict a change in the Hcy level, and the ingestion of folate-rich foods or even folate supplementation should be considered if a long-term high-methionine diet is used for weight loss.

In the second part of the investigation, we assessed the influence and dose-dependency of Hcy on myocardial function and the coronary circulation. Indeed, experimental and clinical data support the concept that blood Hcy levels influence left ventricular (LV) function and remodelling.<sup>19,20</sup> However, clinical data that relate blood Hcy levels to LV function are limited and have yielded inconsistent results.

To estimate cardiac contractility during chronic moderate or intermediate HHcy, we observed the maximum and minimum rate of LV pressure development (dp/dt max and dp/dt min), which are also indirect indicators of the inotropic and lusitropic properties of the heart. Our results have shown that both mild and moderate HHcy do not perturb the contractile force (or inotropic and lusitropic features) of an isolated rat heart (Table 2). Moreover, the absolute values of these cardiodynamic parameters were even higher (especially in the HMNV group) compared to the group that had a normal Hcy concentration (CF). The effects of HHcy on cardiac contractility are poorly investigated but show similar findings as ours. Walker et al.<sup>21</sup> examined the effect of HHcy on cardiac structure and function in rats. They concluded that the initial effect of a 2-week-long Hcy administration involves loss of myocardial structure without a direct effect on the myocardial contractile function, which is in accordance with our results. One possible explanation of this phenomenon could be that the HHcy is not able to produce a reduction of contractility in the rat heart after 2-4 weeks. These assumptions have been confirmed by many scientific reports. Joseph et al.<sup>22,23</sup> demonstrated that HHcy has direct adverse effects on cardiac structure and function, but these occurred only after 10 weeks of dietary treatment, whereby the diastolic function of the LV became abnormal. It has already been established that HHcy causes an enhancement of systolic and diastolic pressure both in an animal model and in humans.<sup>24,25</sup> These results are consistent with our findings. We observed SLVP, DLVP to assess LV function, and they were in accordance with previous markers, showing even higher values compared to those of the control-fed animals. Again, the values were the highest in the HMNV group at all perfusion pressures (Table 2). In the present study, SLVP was significantly altered in HHcy-hearts among all groups, with the most prominent changes associated with the highest CPP values. Sutton-Thyrell et al.<sup>26</sup> showed in a human model that an increase in the Hcy level leads to the dose-dependent enhancement of systolic pressure. Compared with that of the HMLV and CF groups, the DLVP

was increased in the HMNV group. HR was significantly increased at the higher CPP values of 100 and 120 cm H<sub>2</sub>O in the HMLV group than in the CF and HMNV groups, but at lower perfusion pressures of 40–80 cm H<sub>2</sub>O, no significant differences were seen among the groups. Related to this finding, HR was not impaired in HHcy and followed previous cardiodynamic results. However, HHcy induced a reduction of Cf, especially in the HMLV group, suggesting a dose-dependent effect of Hcy on the coronary circulation. A decrease in the Cf in HHcy groups might be a consequence of vessel wall thickening, which was greater in moderate HHcy, and it could also be correlated with increased aortic stiffness as described by Liu et al.<sup>25</sup> A study conducted by Karni et al.<sup>27</sup> suggested that the mechanical properties of ventricular myocytes were altered in HHcy rats due to a change the HR by an alteration of calcium homeostasis, leading to a decline in myocyte contractility. Literature data indicate that LV failure occurs mainly in severe HHcy, even in the absence of other hypertrophic stimuli.<sup>22</sup> A possible explanation of our results and of their difference in comparison to others may be the duration of HHcy or the severity of HHcy.

Generally, it seems that although increased Hcy values caused morphological changes in the heart, the cardiac function was not compromised. An intermediate rise of the Hcy levels is associated with higher values of cardiodynamic parameters than a moderate increase, suggesting the dose-dependent characteristics of the effects of Hcy. Furthermore, HHcy can be viewed as the first risk factor for atherosclerosis, which is believed to exert its effects through a mechanism involving oxidative damage.<sup>28</sup> HHcy promotes oxidative stress, which induces endothelial dysfunction leading to atherosclerosis and other cardiovascular diseases. Clinical *in vivo* studies have confirmed the occurrence of endothelial dysfunction in HHcy.<sup>29</sup> To assess a potential mechanism of the effect of HHcy on cardiac function, we measured oxidative stress indicators and the activity of the antioxidant enzyme system (Figure 3). Our results showed that mild and moderate HHcy did not induced an increased in O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production (O<sub>2</sub><sup>-</sup> was even decreased in the HMLV group).

Actually, the mechanism by which free oxygen species are generated during HHcy is well known. The basis of the oxidative stress hypothesis relies on the chemical auto-oxidation of Hcy. Hcy is readily oxidized when added to plasma, principally as a consequence of auto-oxidation leading to the formation of Hcy, homocysteine-mixed disulphides, and homocysteine thiolactone. During the oxidation of the sulphhydryl group, O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are generated, and these oxygen-derived molecules are believed to account for the endothelial cytotoxicity of homocyst(e)ine. In the present study, we noted increased lipid peroxidation in both mild and moderate HHcy, suggesting that effect of Hcy occurs both at the endothelial cell surface as well as within the lipoprotein particles in plasma.

Sulphhydryl compounds such as Hcy are believed to attenuate the endothelial production of bioactive nitric oxide through the reaction of O<sub>2</sub><sup>-</sup> generated during their auto-oxidation with NO, resulting in the formation of the adduct peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>). The NO level was no different in the HMLV group than in the control and HMNV groups. The vasodilator properties of normal endothelial

cells are also altered by Hcy, specifically with respect to endothelial nitric oxide (NO<sup>-</sup>) production. *In vivo* studies showed that mild and severe HHcy is associated with impaired vasodilation<sup>7,30</sup> and the impairment of NO bioavailability.<sup>19,28</sup> Additionally, Tyagi et al.<sup>31</sup> suggested that HHcy increases oxidative stress due to the accumulation of asymmetric dimethylarginine (ADMA), an endogenous nitric oxide (NO) synthase (NOS) inhibitor that inhibits the activity of endothelial NOS (eNOS) and inducible NOS (iNOS) with a significant consequent reduction of NO bioavailability.

Finally, to complete the picture of the influence of HHcy on redox homeostasis, we examined the activity of the antioxidant status (AOS). After feeding with purified diets, blood concentrations of all the antioxidants measured were significantly affected (Figure 3E–G). GSH is an important endogenous antioxidant and a primary scavenger of free radicals in cells. Hcy inhibits the activity of GSH *in vitro* and leads to a dramatic reduction of GSH. In conjunction with this reduction, other studies confirm that Hcy also significantly decreases the thiol redox state of vascular cells, as measured by the ratio of GSH/GSSG, through the oxidation of GSH.<sup>31,32</sup> Superoxide dismutase is essential to catalyse the dismutation of superoxide and has been shown to protect cells from oxygen free radicals. SOD activity had a moderate and significant negative correlation with the total serum Hcy concentration in all groups, suggesting that Hcy induces oxidative stress. Nonako et al.<sup>33</sup> reported that Hcy reduced the expression of SOD mRNA in cultured rat smooth muscle cells. Another possible explanation is that Hcy decreases SOD activity by disturbing the formation of its disulphide bond and/or inhibiting glycosylation, resulting in the incorrect assembly of the protein during SOD synthesis.<sup>28,30</sup> Additionally, Hcy reduces the O<sub>2</sub><sup>-</sup> scavenging capacity and thereby potentiates endothelial cell injury.<sup>31</sup> Exposure to reactive oxygen species (ROS) from a variety of sources leads to the development of a series of defence mechanisms to neutralize these species and protect cells against their toxic effects. That protection is achieved mainly by enzymatic antioxidants such as catalase.<sup>34,35</sup> In the present investigation, Hcy reduced CAT activity and interestingly, in the HMNV group CAT activity was lower than in the HMLV group (Figure 3G). It is known that CAT reacts efficiently in peroxisomes with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to form water and molecular oxygen and that the reaction can be a reason for decreased activity of CAT and an increased level of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in our study.<sup>35,36</sup> The CAT activity was probably insufficient to neutralize the very high levels of pro-oxidant markers, which are excessively produced during HHcy. Other potential mechanisms of CAT activity reduction in HHcy can inhibit CAT activity by nitrite oxide, which can bind reversibly to the ferric iron.<sup>34,37</sup> Regarding the possible mechanisms of HHcy, different antioxidant agents have been evaluated for the prevention of HHcy in many trials, such as resveratrol and other polyphenols, vitamin C, and folic acid.<sup>38,39</sup>

Furthermore, in the control group we found small amounts of loose connective tissue between the myocardial tissue cells. In the HMNV group, the muscle fibres were partially hypertrophic and hypereosinophilic and were partially thinned and degenerated with sparse interstitial fibrosis. Our results correlate with findings of

Chen et al.<sup>40</sup> The total collagen content and total fibre number in the HMLV group were significantly lower than in the HMNV and control group (Figure 4).

A limitation of our study is that we did not determine intermediate factors such as peroxynitrite, hydroxyl radical (OH<sup>•</sup>), iNOS or NADPH oxidase expression to clearly verify the level of production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, so we cannot dismiss the possibility that there was increased ROS production caused by HHcy.

Finally, the findings of this study indicate that HHcy induces cardiac tissue remodelling, keeping in mind that moderate HHcy is associated with more prominent interstitial and perivascular fibrosis. The effects of HHcy seem to be mediated through reduced AOS activity and increased production of pro-oxidant markers. All morphological changes were not followed by diminished myocardial function.

The role of the vitamin B complex in these negative effects of HHcy might be very important, and these results suggest that a high-methionine diet in the absence of the vitamin B complex causes profound negative effects of HHcy. Supplementation of the vitamin B complex in different states of cardiovascular disease that include HHcy might lead to the promising amelioration of disease and the suppression of HHcy.

## 4 | METHODS

### 4.1 | Animals and dietary manipulation

This study was conducted on adult male *Wistar albino* rats ( $n = 30$ ; 4 weeks old;  $100 \pm 15$  g body weight), and HHcy was achieved by dietary manipulation. The animals were fed with one of the following diets (Mucedola SRL., Milan, Italy) for 4 weeks: standard rodent chow ( $n = 10$ ; control fed, CF); a diet enriched in methionine (7.7 g/kg) with no deficiency of B vitamins (folic acid 2 mg/kg, B<sub>6</sub> 0.03 mg/kg; B<sub>12</sub> 70 mg/kg;  $n = 10$ ; HMNV); a diet enriched in methionine and deficient in B vitamins (folic acid 0.08 mg/kg; B<sub>6</sub> 0.01 mg/kg; B<sub>12</sub> 0.01 mg/kg;  $n = 10$ ; HMLV).

The animals were acclimatized for 2 weeks in the animal house of Faculty of Medical Sciences in Kragujevac before the dietary manipulation was initiated. Two rats were housed per wire floored cage in an air-conditioned room ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) with a 12/12 h light/dark cycle and had free access to standard or a special laboratory chow diet and water ad libitum. The rats were weighed when they were assigned to treatment groups and subsequently every day. The food intake was measured daily, always at the same time during the 4-week experimental period, prior to euthanasia. The total food intake was calculated by measuring the daily consumption of food in grams as the difference between the food provided on the previous day and that left unconsumed per cage (2 rats per cage).

All research procedures were carried out in accordance with the European Directive for the welfare of laboratory animals No: 2010/63/EU and the principles of Good Laboratory Practice. The protocol of the current study was approved by the Ethics Committee for experimental animal well-being of the Faculty of Medical Sciences of the University of Kragujevac, Serbia (No: 01-11794).

The investigators understand the ethical principles under which the journal operates and that their work complies with the animal ethics checklist.

### 4.2 | Isolated rat heart preparation

After 4 weeks of dietary manipulation and confirmation of a state of HHcy in the experimental groups (tHcy  $> 15$   $\mu\text{mol/L}$ ), all animals were killed. The animals were killed with 100  $\mu\text{L}$  of a 10:1 mixture of ketamine (100 mg/mL; Ketaset, Fort Dodge, IA, USA) and xylazine (100 mg/mL; Anased, Lloyd Laboratories, Shenandoah, IA, USA) delivered by injection into the lateral tail vein. After ketamine/xylazine-induced narcosis, an emergency thoracotomy was performed, and the hearts of rats were isolated, attached via an aortic cannula and retrogradely perfused according to the Langendorff technique at a gradually increasing perfusion pressure between 40–120 cm H<sub>2</sub>O. The hearts were perfused with Krebs-Henseleit solution (118 mmol/L NaCl, 4.7 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 1.7 mmol/L mgSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O, 25 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.5 mmol/L glucose, equilibrated with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) and warmed to 37°C (pH = 7.4). After heart perfusion commenced, a 30-minute period was allowed for the stabilization of the heart. A sensor was placed in the left ventricle, and the following parameters of myocardial function were continuously recorded in the control and experimental groups: the maximum rate of left ventricular pressure development (dp/dt max), the minimum rate of left ventricular pressure development (dp/dt min), the systolic left ventricular pressure (SLVP), the diastolic left ventricular pressure (DLVP), and the heart rate (HR). The coronary flow (Cf) was measured flowmetrically.

### 4.3 | Biochemical assay in blood

Blood samples were collected into 2 different types of vacutainer tubes after 30 days of dietary treatment and during sacrifice by exsanguinating the rats. One vacutainer tube contained EDTA as an anticoagulant for the assay of pro-oxidative markers in the plasma and antioxidant markers in the lysate, while the second had no additives and was to be used for serum preparation for Hcy determination. The samples were centrifuged at 1200 g for 10 minutes at 4°C using a Centurion centrifuge (K280R, Centurion, Scientific, Bosham, UK). The plasma and erythrocyte lysate were then stored at  $-20^\circ\text{C}$ , and the serum was aliquoted and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . All assays were performed within 2 months after sample collection.

### 4.4 | Determination of concentrations of Hcy, pro-oxidant and antioxidant parameters in blood

The total serum Hcy concentrations were measured with a high-performance liquid chromatography (HPLC) procedure with reverse phase separation and fluorescence detection, as described previously.<sup>41</sup>

In plasma samples, the following markers of oxidative stress were measured spectrophotometrically: nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide anion

radical ( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), and the index of lipid peroxidation (measured as TBARS, thiobarbituric acid reactive substances).

Nitric oxide decomposes rapidly to form stable metabolite nitrite/nitrate products. The nitrite level was measured and used as an index of nitric oxide (NO) production using the Griess reagent. A total of 0.5 mL of plasma was precipitated with 200  $\mu$ L of 30% sulphosalicylic acid, vortexed for 30 minutes, and centrifuged at 3000 g. Equal volumes of the supernatant and the Griess reagent containing 1% sulphanilamide in 5% phosphoric acid/0.1% naphthalene ethylenediamine dihydrochloride were added and incubated for 10 minutes in the dark, and the sample was measured at 543 nm. The nitrite levels were calculated using sodium nitrite as the standard.<sup>42</sup> The concentration of the  $O_2^-$  was measured after the reaction of nitro blue tetrazolium in Tris buffer with the plasma at 530 nm. Distilled water served as a blank.<sup>43</sup> The measurement of  $H_2O_2$  is based on the oxidation of phenol red by  $H_2O_2$ , in a reaction catalysed by horseradish peroxidase (HRPO). Two hundred millilitres of plasma was precipitated with 800 mL of freshly prepared phenol red solution, followed by the addition of 10  $\mu$ L of (1:20) HRPO (made ex tempore). Distilled water was used for the blank instead of the plasma sample.  $H_2O_2$  was measured at 610 nm.<sup>44</sup> The degree of lipid peroxidation in the plasma samples was estimated by measuring TBARS using 1% thiobarbituric acid in 0.05 NaOH, incubated with the plasma at 100°C for 15 minutes and measured at 530 nm. Distilled water served as the blank.<sup>36</sup>

We determined the activity of non-enzymatic antioxidants in the lysate such as reduced glutathione (GSH) and the activity of the enzymatic defence system by evaluating the catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activity. The level of reduced glutathione was determined based on GSH oxidation with 5,5-dithiobis-6,2-nitrobenzoic acid using a method by Beutler.<sup>45</sup> The CAT activity was determined according to Aebi.<sup>46</sup> The lysates were diluted with distilled water (1:7 v/v) and treated with chloroform-ethanol (0.6:1 v/v) to remove haemoglobin, and then 50  $\mu$ L of CAT buffer, 100  $\mu$ L of sample and 1 mL of 10 mmol/L  $H_2O_2$  were added to the samples. The detection was performed at 360 nm. SOD activity was determined by the epinephrine method of Beutler.<sup>47</sup> Lysate (100  $\mu$ L) and 1 mL carbonate buffer were mixed, and then 100  $\mu$ L of epinephrine was added. The detection was performed at 470 nm.

#### 4.5 | Histopathological evaluation

The fixed heart sample was embedded in paraffin and cut into sections 6  $\mu$ m thick. The sections were stained using a haematoxylin and eosin (H&E) Staining Kit (Beyotime, Shanghai, China) according to the manufacturer's instructions and photographed with a digital camera connected to a microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). The extent of cardiac myocyte hypertrophy and the myocyte cross-sectional area was determined on the H&E stained sections, as described by Frustaci et al.<sup>48</sup> The extent of cardiac fibrosis was determined by Masson's trichrome staining (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), while differences between groups in collagen were quantified by the ImageJ software programme.

#### 4.6 | Reagents

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

#### 4.7 | Statistical analysis

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD to show the variability of the data. After a normal distribution and homogeneity of variance were respectively confirmed using the Shapiro-Wilk test and Levene's test, we performed a statistical analysis for all measured parameters. The effects of dietary methionine and folate intake on animal growth, food intake, cardiodynamic and oxidative parameters, antioxidant status and collagen content between groups were analysed by a 1-way ANOVA (Scheffé's *F* test) and nonparametric analogue test of ANOVA (Kruskal-Wallis test). Differences were considered significant at  $P < .05$ . The Spearman correlation coefficients were used to measure the association among morphometric, oxidative, antioxidative and cardiodynamic markers and serum homocysteine variables. Statistical analysis was performed using spss 20.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA).

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge Ministry of Science and Technical Development of the Republic of Serbia (Grant No 175043) and Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac (JP No 17/16) for funding. The manuscript was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts (Certificate Verification Key: 5A2E-1097-2AC3-8C8F-E4F1).

#### DISCLOSURE

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

#### ORCID

Vladimir Jakovljevic  <http://orcid.org/0000-0002-0071-8376>

#### REFERENCES

1. Perla-Kajan J, Jakubowski H. Paraoxonase 1 and homocysteine metabolism. *Amino Acids*. 2012;43:1405-1417.
2. Partearroyo T, Vallecillo N, Pajares MA, Varela-Moreiras G, Varela-Nieto I. Cochlear homocysteine metabolism at the crossroad of nutrition and sensorineural hearing loss. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:107.
3. Ducker GS, Rabinowitz JD. One-carbon metabolism in health and disease. *Cell Metab*. 2017;25:27-42.
4. Jakubowski H, Perla-Kajan J, Finnell RH, et al. Genetic or nutritional disorders in homocysteine or folate metabolism increase protein N-homocysteinylation in mice. *FASEB J*. 2009;23:1721-1727.

5. McCully KS. Homocysteine and the pathogenesis of atherosclerosis. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2015;8:211-219.
6. Shiran A, Remer E, Asmer I, et al. Association of vitamin B12 deficiency with homozygosity of the TT MTHFR C677T genotype, hyperhomocysteinemia, and endothelial cell dysfunction. *Isr Med Assoc J*. 2015;17:288-292.
7. Nigwekar SU, Kang A, Zoungas S, et al. Interventions for lowering plasma homocysteine levels in dialysis patients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;5:468-473.
8. Sharma M, Tiwari M, Tiwari RK. Hyperhomocysteinemia: impact on neurodegenerative diseases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2015;117:287-296.
9. Molina-López J, Florea D, Quintero-Osso B, de la Cruz AP, Rodríguez-Elvira M, Del Pozo EP. Pyridoxal-5'-phosphate deficiency is associated with hyperhomocysteinemia regardless of antioxidant, thiamine, riboflavin, cobalamin, and folate status in critically ill patients. *Clin Nutr*. 2016;35:706-712.
10. Kang SS, Wong PW, Malinow MR. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu Rev Nutr*. 1992;12:279-298.
11. Faeh D, Chioloro A, Paccaud F. Homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: should we (still) worry about it? *Swiss Med Wkly*. 2006;136:745-756.
12. Dayal S, Baumbach GL, Arning E, Bottiglieri T, Faraci FM, Lentz SR. Deficiency of superoxide dismutase promotes cerebral vascular hypertrophy and vascular dysfunction in hyperhomocysteinemia. *PLoS ONE*. 2017;12:e0175732.
13. Perla-Kajan J, Twardowski T, Jakubowski H. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids*. 2007;32:561-572.
14. Akgullu C, Huyut MA, Boyacioglu M, et al. Nebivolol to attenuate the effects of hyper-homocysteinemia in rats. *Atherosclerosis*. 2015;240:33-39.
15. Pravenec M, Kozich V, Krijt J, et al. Folate deficiency is associated with oxidative stress, increased blood pressure, and insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 2013;26:135-140.
16. Bickel C, Schnabel RB, Zengin E, et al. Homocysteine concentration in coronary artery disease: influence of three common single nucleotide polymorphisms. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2017;27:168-175.
17. Beck B, Bossenmeyer-Pouricé C, Jeannesson E, Richy S, Guéant JL. Increased homocysteinemia is associated with beneficial effects on body weight after long-term high-protein, low-fat diet in rats. *Nutrition*. 2012;28:932-936.
18. Park SB, Georgiades A. Changes in body composition predict homocysteine changes and hyperhomocysteinemia in Korea. *J Korean Med Sci*. 2013;28:1015-1020.
19. Nasir K, Tsai M, Rosen BD, et al. Elevated homocysteine is associated with reduced regional left ventricular function: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Circulation*. 2007;115:180-187.
20. Xiao Q, Han H, Li J. The correlation between morning blood pressure surge, homocysteine and left ventricular hypertrophy in elderly patients with primary hypertension. *World J Cardiovasc Dis*. 2017;7:458.
21. Walker E, Black J, Parris C, et al. Effect of experimental hyperhomocysteinemia on cardiac structure and function in the rat. *Ann Clin Lab Sci*. 2004;34:175-180.
22. Joseph J, Joseph L, Shekhawat NS, et al. Hyperhomocysteinemia leads to pathological ventricular hypertrophy in normotensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:679-686.
23. Joseph J, Washington A, Joseph L, et al. Hyperhomocysteinemia leads to adverse cardiac remodeling in hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:2567-2574.
24. Famil'tseva A, Chaturvedi P, Kalani A, et al. Toll-like receptor 4 mutation suppresses hyperhomocysteinemia-induced hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2016;311:596-606.
25. Liu J, Liu H, Zhao H, Zhou Y, Li L, Wang H. Relationship between cardio-ankle vascular index and homocysteine in hypertension subjects with hyperhomocysteinemia. *Clin Exp Hypertens*. 2016;38:652-657.
26. Sutton-Tyrrell K, Bostom A, Selhub J, Zeigler-Johnson C. High homocysteine levels are independently related to isolated systolic hypertension in older adults. *Circulation*. 1997;96:1745-1749.
27. Karni SM, Srinivas MT, Thomas PV, et al. Mitochondrial matrix metalloproteinase activation decreases myocyte contractility in hyperhomocysteinemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:890-897.
28. Chernyavskiy I, Veeranki S, Sen U, Tyagi SC. Atherogenesis: hyperhomocysteinemia interactions with LDL, macrophage function, paraoxonase 1, and exercise. *Ann N Y Acad Sci*. 2016;1363:138-154.
29. Reule CA, Goyvaerts B, Schoen C. Effects of an L-arginine-based multi ingredient product on endothelial function in subjects with mild to moderate hypertension and hyperhomocysteinemia - a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *BMC Complement Altern Med*. 2017;1:92.
30. Toda N, Okamura T. Hyperhomocysteinemia impairs regional blood flow: involvements of endothelial and neuronal nitric oxide. *Pflugers Arch*. 2016;468:1517-1525.
31. Tyagi N, Sedoris KC, Steed M, Ovechkin AV, Moshal KS, Tyagi SC. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:2649-2656.
32. Mendes RH, Mostarda C, Candido GO, et al. Moderate hyperhomocysteinemia provokes dysfunction of cardiovascular autonomic system and liver oxidative stress in rats. *Auton Neurosci*. 2014;180:43-47.
33. Nonaka H, Tsujino T, Watari Y, Emoto N, Yokoyama M. Taurine prevents the decrease in expression and secretion of extracellular superoxide dismutase induced by homocysteine: amelioration of homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress by taurine. *Circulation*. 2001;104:1165-1170.
34. Noichri Y, Chalghoum A, Chkioua L, et al. Low erythrocyte catalase enzyme activity is correlated with high serum total homocysteine levels in Tunisian patients with acute myocardial infarction. *Diagn Pathol*. 2013;8:68.
35. Milton NG. Homocysteine inhibits hydrogen peroxide breakdown by catalase. *Open Enzym Inhib J*. 2008;1:34-41.
36. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95:351-358.
37. Baggott JE, Tamura T. Homocysteine, iron and cardiovascular disease: a hypothesis. *Nutrients*. 2015;7:1108-1118.
38. Noll C, Hamelet J, Ducros V, et al. Resveratrol supplementation worsen the dysregulation of genes involved in hepatic lipid homeostasis observed in hyperhomocysteinemic mice. *Food Chem Toxicol*. 2009;47:230-236.
39. Boyacioglu M, Sekkin S, Kum C, et al. The protective effects of vitamin C on the DNA damage, antioxidant defenses and aorta histopathology in chronic hyperhomocysteinemia induced rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2014;66:407-413.
40. Chen FY, Guo YH, Gao W, Feng XH, Chen L, Tang CS. Effect of hyperhomocysteinemia on cardiac remodeling in rats. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2006;38:179-183.
41. Concepción-Alvarez A, Camayd-Viera I, Nuevas-Paz L. Validation of an HPLC method for total homocysteine quantification in plasma. *Rev Lab Clin*. 2016;9:40-47.
42. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and 15 N nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982;126:131-138.
43. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA, ed. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1985:123-132.
44. 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.

45. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood. Glutathione. *J Lab Clin Med.* 1963;61:882-888.
46. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-126.
47. Beutler E. Superoxide dismutase. In: Beutler E, ed. *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods.* Philadelphia, PA: Grune & Stratton; 1984:83-85.
48. Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, et al. Myocardial cell death in human diabetes. *Circ Res.* 2000;87:1123-1132.

**How to cite this article:** Jeremic J, Nikolic Turnic T, Zivkovic V, et al. Vitamin B complex mitigates cardiac dysfunction in high-methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2018;45:683–693.  
<https://doi.org/10.1111/1440-1681.12930>



# ROLE OF CALCIUM CHANNEL BLOCKERS IN MYOCARDIAL PRECONDITIONING

Nina Simonovic<sup>1</sup>, Jovana Jeremic<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Health Center "Voždovac", Belgrade, Serbia

<sup>2</sup>Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

## ULOGA BLOKATORA KALCIJUMSKIH KANALA U PREKONDICIONIRANJU SRCA

Nina Simonović<sup>1</sup>, Jovana Jeremić<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Klinički Centar Voždovac, Beograd, Srbija

<sup>2</sup>Katedra za farmaciju, Fakultet medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

\*The authors Jovana Jeremic and Nina Simonovic contributed equally to this manuscript

\*Autori Jovana Jeremić i Nina Simonović su podjednako učestvovali u svim elementima izrade ove studije

Received / Priljen: 10. 05. 2016.

Accepted / Prihvaćen: 10. 05. 2016.

### ABSTRACT

Coronary heart disease is the leading cause of mortality and morbidity worldwide. The effects of coronary heart disease are usually attributable to the detrimental effects of acute myocardial ischaemia-reperfusion injury. Newer strategies such as ischaemic or pharmacological preconditioning have been shown to condition the myocardium to ischaemia-reperfusion injury and thus reduce the final infarct size. This review investigates the role of calcium channel blockers in myocardial preconditioning. Additionally, special attention is given to nicorandil whose mechanism of action may be associated with the cardioprotective effects of preconditioning. There are still many uncertainties in understanding the role of these agents in preconditioning, but future research in this direction will certainly help reduce coronary heart disease.

**Keywords:** Preconditioning, Calcium channel blockers, Nicorandil

### SAŽETAK

Koronarna bolest srca je vodeći uzrok mortaliteta i morbiditeta širom sveta. Efekti koronarne bolesti srca se najčešće pripisuju štetnim efektima akutnog infarkta, odnosno ishemijsko-reperfuzionij povredi. Novije strategije, kao što su ishemijsko i farmakološko prekonicioniranje, su pokazale da uticajem na ishemijsko-reperfuzione povrede srca konačna veličina infarkta može biti smanjena. Ovaj pregledni članak ispituje ulogu blokatora kalcijumskih kanala u prekonicioniranju srca. Takodje, posebna pažnja je posvećena nikorandilu, čiji bi mehanizam dejstva mogao biti povezan sa kardioprotektivnim efektima prekonicioniranja. Još uvek postoji mnogo nejasnoća u razumevanju uloge ovih lekova u prekonicioniranju ali buduća istraživanja u ovom pravcu bi svakako doprinela smanjenju koronarne bolesti srca.

**Ključne reči:** Prekonicioniranje, Blokatori kalcijumskih kanala, Nikorandil



### ABBREVIATIONS

ATP - Adenosine triphosphate  
CCBs - Calcium channel blockers  
CHD - Coronary heart disease  
I/R - Ischaemia-reperfusion

IPC - Ischaemic preconditioning  
K(ATP) - ATP-sensitive K<sup>+</sup>  
PKC - protein kinase C  
ROS - reactive oxygen species

### INTRODUCTION

Coronary heart disease (CHD) is the leading cause of mortality and morbidity worldwide. According to the World Health Organization, 12.8% of all deaths result from CHD. The effects of CHD are usually attributable to the detrimental effects of acute myocardial ischaemia-reperfusion (I/R) injury (1, 2). This injury includes different clinical manifestations such as myocardial necrosis, arrhythmia,

myocardial stunning and endothelial and microvascular dysfunction. Depending on the severity of the condition, the patient may be treated with medications, surgery or both. The treatment includes the use of thrombolytic agents, beta-antagonists, angiotensin-converting enzyme inhibitors, calcium channel blockers (CCBs), coronary artery bypass surgery, angioplasty and stenting (3-5). Despite



several therapeutic advances, both medical and surgical, there is still no effective therapy for preventing myocardial I/R injury.

In the past few decades, it has become clear that the myocardial response to I/R injury can be reduced. Based on recent studies, a universally accepted potential endogenous strategy for protecting the heart against acute ischaemia-reperfusion injury is preconditioning. Research into the mechanisms of preconditioning has revealed multiple receptors, pathways, and end effectors. Recent studies suggest that certain pharmacological agents may stimulate these mechanisms. Our understanding of the complex mechanism of preconditioning is still incomplete, and its disclosure could contribute to the treatment of acute myocardial infarction.

## PHENOMENON OF MYOCARDIAL PRECONDITIONING

Myocardial preconditioning is a process where myocardium cells or tissues are exposed to a sublethal stimulus to protect them from a subsequent normally lethal stress. Preconditioning can attenuate the subsequent prolonged or lethal tissue injury by increasing the cell tolerance to the stress (6). The term “preconditioning” was used for the first time in 1964 by Janoff to refer to the phenomenon of stress-induced endogenous tolerance against traumatic or endotoxic insults (7). The protective effect of preconditioning in the heart can be demonstrated by the reduction in infarct size and myocardial stunning, prevention of arrhythmias, or the acceleration of the recovery of myocardial function after ischaemia (8-10). Myocardium can be preconditioned by two basic techniques including ischaemic and pharmacological preconditioning.

### *Ischaemic preconditioning (IPC)*

Ischaemic preconditioning was described for the first time in 1986 by Murry and colleagues when they found that a “preconditioned” heart in a canine model became resistant to ischaemia-induced infarction. In fact, infarct size and the degree of reperfusion injury were reduced by single or multiple cycles of ischaemia and reperfusion (11). The same beneficial effect has since been confirmed in every species studied, independently of both the presence of collaterals in the coronary circulation and the size of the animal model (12-14), and has more recently been confirmed in the human (15).

The underlying mechanisms of IPC are still a matter of debate. Protective effects of IPC on the heart can be a consequence of the reduction in reactive oxygen species (ROS) generation, delay in adenosine triphosphate (ATP) depletion, and the reduction of the infarct size, apoptosis and neutrophil accumulation. It is possible that adenosine, noradrenaline and bradykinin play a role in this mechanism (16-18). In addition,, activation of protein

kinase C (PKC), which is known to be a key player in numerous intracellular signal transduction pathways, is believed to be one of the main causative mechanisms in the protection of IPC across various species (19). Nevertheless, for many of the proposed mechanisms, a modulation of intracellular calcium ion ( $[Ca^{2+}]_i$ ) homeostasis may be the final common pathway in the protection against ischaemic injury. A rise in intracellular free  $[Ca^{2+}]_i$  has been postulated to be an important factor in ischaemic myocardial injury (20, 21).

Notably, there are many candidates for the mechanism of IPC. Recently it has been reported that the activation of PKC opens the ATP-sensitive  $K^+$  (K(ATP)) channels which is currently thought to be the end-effector of many signal transduction systems related to the IPC mechanism. Therefore, it is thought that K(ATP) channel openers are also effective in protecting against human ischaemic injury (22).

Myocardial ischaemia occurs when blood flow to the heart muscle (myocardium) is obstructed by a partial or complete blockage of a coronary artery. Coronary arteries can be occluded by thrombi, atherosclerotic plaques, vasoconstriction or inflammation (23). During myocardial ischaemia, the absence of oxygen and metabolic substrates in cardiomyocytes can cause functional, structural and metabolic diseases (24). As a result, the cells switch to anaerobic metabolism, which leads to the accumulation of lactate and a drop in intracellular pH. The main result is intracellular  $Na^+$  overloading. Therefore, diminished intracellular concentrations of ATP and creatine phosphate cause decreased activity of adenosine triphosphate-reliant ion pumps, including the  $Na^+/K^+$  ATP-ase pump, and the exacerbation of contractile function. This induces the  $Na^+-H^+$  exchanger to extrude  $H^+$  and results in intracellular  $Na^+$  overload, which activates the  $2Na^+-Ca^{2+}$  exchanger to function in reverse to extrude  $Na^+$  and leads to intracellular  $[Ca^{2+}]_i$  overload. These processes and the generation of ROS can lead to cell death induced by ischaemic episodes (20, 25-27).

Furthermore, with reperfusion, the restoration of blood flow after an ischaemic episode may result in paradoxical cardiomyocyte dysfunction caused by ROS, intracellular and mitochondrial  $Ca^{2+}$  overload and accumulation of inflammatory cells. The phenomenon called “reperfusion injury” occurs when prompt changes in intracellular ions and normalization of pH cause cell death and greater damage than what is induced by pre-reperfusion ischaemia (26, 28).

### *Pharmacological preconditioning*

As we mentioned above, in addition to IPC, preconditioning can be induced in the heart with pharmacological agents. However, it is still unclear whether the various forms of pharmacological preconditioning have the same molecular mechanisms as ischaemic preconditioning. In recent years, many investigators have studied myocardial



pharmacological preconditioning with various agents (29–32), but particular attention has been directed towards pharmacological agents that modulate  $\text{Ca}^{2+}$  (33, 34).

$\text{Ca}^{2+}$  channel blockers are well known to be cardioprotective when taken after I/R injury (35, 36), but little is known about a possible preconditioning effect before ischaemia. Controversy remains about their ability to reduce infarct size or at least delay the necrotic process. With this in mind, the aim of this review was to examine the possible role of calcium channel blockers as a mediator of ischaemic preconditioning.

## CALCIUM CHANNEL BLOCKING AGENTS

Calcium antagonists or calcium channel blockers (CCBs) were introduced into clinical medicine in the 1960s and were approved for the treatment of hypertension in the 1980s (37, 38). CCBs have been one of the mainstays in therapy for cardiovascular diseases, such as angina pectoris, paroxysmal supraventricular tachyarrhythmia, hypertrophic cardiomyopathy, Raynaud phenomenon, pulmonary hypertension, diffuse oesophageal spasm, and cerebral vasospasm, for many years (39). CCBs as a group are heterogeneous and, based on the chemical structure and functional distinctions, include 3 main classes: dihydropyridine, phenylalkylamine and benzothiazepine derivative (40, 41). The differences in chemical structures provide heterogeneity in the action of these agents. However, all CCBs inhibit calcium influx by binding to the  $\alpha_1$  subunit of calcium channels and inhibit cell excitability (42). Inhibition leads to the relaxation of vascular smooth muscle cells, vasodilation and a lowering of blood pressure. In cardiac muscle, contractility is reduced, and the sinus pacemaker and atrioventricular conduction velocities are slowed (43, 44). CCBs also reduce angiotensin II-mediated vasoconstriction and decrease the angiotensin II-stimulatory effect on adrenal biosynthesis and secretion of aldosterone (45). Unlike other vasodilators, calcium antagonists induce mild natriuresis and do not cause volume retention. Thus, calcium antagonists lower blood pressure mainly by reducing peripheral vascular resistance (46).

Furthermore, in many clinical trials, there is controversial data on taking CCBs and an increase in cardiovascular mortality (47, 48). Although several theories have been offered, the mechanism by which CCBs increase cardiovascular mortality is still unknown.

However, the hypothesis that cellular calcium overload may contribute to the onset of irreversible ischaemic cell injury suggested a possible role for CCBs in the protection of ischaemic myocardium (49).

### *Dihydropyridine CCBs in myocardial preconditioning*

Dihydropyridine CCBs include amlodipine, felodipine, isradipine, lacidipine, lercanidipine, nicardipine, nifedipine, nisoldipine, and others (40). Experimental

data suggest that this group of CCBs binds to both dihydropyridine and nondihydropyridine binding sites. Dihydropyridines selectively inhibit calcium ion influx across cell membranes, with a greater effect on vascular smooth muscle cells than on cardiac muscle cells (50). Dihydropyridine CCBs have variable effects on heart rate. Acutely, these drugs tend to induce a reflex tachycardia, but long-term studies have shown similar heart rates before and during therapy (51).

Higher doses of these drugs are generally associated with an increase in heart rate. A group of authors even suggested that the use of short-acting nifedipine in moderate to high doses causes an increase in total mortality. In patients with poor or no collateral flow, nifedipine reduced ischaemic episodes, while in patients with good collateral flow nifedipine significantly increased them (52). Nicardipine and isradipine show the same effects (53).

In vitro experiments on human atrial trabeculae indicate that patients using CCBs (amlodipine  $n=7$ , diltiazem  $n=4$ , verapamil  $n=1$ ) were not functionally protected by transient ischaemia. However, a difference in functional performance after I/R between atrial trabeculae with and without CCB exposure was not detected (54).

Likewise, not all studies have demonstrated increased cardiovascular mortality with CCBs. Wallbridge and colleagues studied whether pretreatment with nisoldipine could modify cardioprotective effects of IPC in pigs. Their results indicate that continuous infusion of nisoldipine throughout the entire protocol until onset of reperfusion does not attenuate the potential protective mechanism of IPC; in fact, it may have even exerted a small additional cardioprotective effect (55). These findings are in accordance with an experimental study in guinea pig isolated hearts by Camara and colleagues. They suggest that nifedipine given before ischaemia induces a preconditioning effect as shown by improved left ventricular pressure and lower  $[\text{Ca}^{2+}]$  on reperfusion after ischaemia (56).

### *Phenylalkylamine CCBs in myocardial preconditioning*

Phenylalkylamine CCBs are relatively selective for myocardium and are often used to treat angina; they also reduce myocardial oxygen demand, reverse coronary vasospasm. Within this group are verapamil, gallopamil, and others (41), which inhibit the alpha and beta subunits of voltage-dependent calcium channels. Specifically, their effect on L-type calcium channels in the heart causes a reduction in inotropy and chronotropy, reducing heart rate and blood pressure. The most commonly used drug from this group is verapamil (57).

Miyawaki and colleagues have indicated that pretreatment with verapamil alone ( $0.63 \mu\text{mol/L}$ ; 15 minutes before I/R) did not exert a significant effect on ischaemic injury in the Langendorff-perfused rat model compared with no pretreatment in ischaemic control hearts. On the other hand, verapamil administered during IPC, at the same dose, significantly attenuated the salutary effects of IPC



(33). In addition, another study by the same authors demonstrated that ATP contents were significantly higher and cell structure was better preserved in  $\text{Ca}^{2+}$  preconditioned hearts than in ischaemic control hearts. In other groups,  $\text{Ca}^{2+}$  influx during  $\text{Ca}^{2+}$  preconditioning was inhibited with low doses of verapamil (0.2 and 0.5  $\mu\text{mol/L}$ ), but verapamil did not influence the cardioprotection of  $\text{Ca}^{2+}$  preconditioning. On the contrary, in hearts treated with 2  $\mu\text{mol/L}$  verapamil, lactate dehydrogenase release was significantly increased, ATP content was reduced, mitochondria were swollen and partly disrupted, glycogen was depleted, and myofibrils were partly transformed into contraction bands (58).

The effects of verapamil preconditioning are controversial. Yu and colleagues found that verapamil preconditioning (20  $\mu\text{mol/L}$ ; 10 min) significantly improved diastolic and systolic functions and reduced the incidence of arrhythmias. One of the possible mechanisms for this effect is a reduction in the influx of  $[\text{Ca}^{2+}]$ , thereby stabilizing cardiomyocytes in myocardial stunning and avoiding the occurrence of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $[\text{Ca}^{2+}]$  release during I/R injury (59).

#### *Benzothiazepine CCBs in myocardial preconditioning*

This class of drugs is an intermediate class between phenylalkylamine and dihydropyridines in their selectivity for vascular calcium channels. By having both cardiac depressant and vasodilator actions, benzothiazepines are able to reduce arterial pressure without producing the same degree of reflex cardiac stimulation caused by dihydropyridines (41). The main representative of this group is diltiazem. Diltiazem is effective in the treatment of angina, and the longer-acting formulation is effective in the treatment of hypertension. It is less negatively inotropic than verapamil but should still be used cautiously with beta-blockers (60).

Okuda and colleagues have suggested that diltiazem (10 mg/kg) preconditioning leads to a reduction in the infarct area in the coronary artery of an adult mongrel dog (61). De Jong and colleagues studied the effects of diltiazem administered before or during myocardial ischaemia in the Langendorff-perfused rat heart. They observed that diltiazem decreases adenine nucleotide catabolism and presumably does not protect by negative inotropy during myocardial ischaemia. Myocardial function measured by the capacity to develop tension was decreased by diltiazem, and pretreated hearts did not show arrhythmias. Diltiazem also reduced myocardial oxygen demand, thereby diminishing the effect of flow impairment (62).

#### *Nicorandil in myocardial preconditioning*

As already mentioned, besides CCBs, K(ATP) channel openers are also effective in protecting against human ischaemic injury; therefore, we pay special attention to nicorandil.

Nicorandil is an antianginal drug whose properties lie between those of nitrates and  $\text{K}^+$  channel openers. Activation of K(ATP) channels causes  $\text{K}^+$  efflux, hyperpolarization of the smooth muscle cell membrane, and closure of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. Closure of  $\text{Ca}^{2+}$  channels reduces intracellular levels of  $\text{Ca}^{2+}$ , resulting in relaxation of vascular smooth muscle and dilation of systemic and coronary arterioles. The nitrate moiety produces relaxation of vascular smooth muscle with dilation of systemic venous circulation and epicardial coronary arteries (63). This drug has been shown to be effective after oral administration in patients with stable angina and acute myocardial infarction (64, 65). Nicorandil allows for simultaneous dilation and relaxation of arterial and venous vasculature via its effect on smooth muscles (64).

Ohno and colleagues have shown that nicorandil preconditioning reduced the size of myocardial infarcts by opening the K(ATP) channels, and this effect was dependent on the plasma nicorandil concentrations immediately before the ischaemia induced in rabbits (66). This study corroborates the findings of Matsubara and co-authors where the preconditioning mechanism of nicorandil is explained by opening K(ATP) channels (67). Nicorandil reduces myocardial infarct size in various animal models. A chronic experiment on rabbits has shown that nicorandil (100  $\mu\text{g/kg}$  bolus + 30  $\mu\text{g/kg-1-min-1}$  iv for 60 min) induces delayed cardioprotection against myocardial infarction (68). Similar findings were obtained in the study where rats were administered nicorandil (in oral dose; 3 or 6 mg/kg; 5 consecutive days). Rats were then subjected to myocardial I/R (40 min/10 min). Nicorandil was effective in attenuating the ischaemia/reperfusion-induced ventricular arrhythmias, creatine kinase-MB release, lactate accumulation and oxidative stress (69). Another possible mechanism of preconditioning is the upregulation in the expression of COX-2 and Bcl-2 as it occurs after IPC and nicorandil preconditioning (68, 70).

Several clinical studies have shown that nicorandil improves functional and clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction (71, 72). Intravenous preadministration of nicorandil attenuates ST-segment elevation and improves lactate metabolism during coronary angioplasty, suggesting that pharmacological preconditioning is induced by nicorandil. Also a level of troponin T, one of the reliable metabolic markers of myocardial injury, is suppressed after coronary angioplasty as well as ST-segment elevation during coronary angioplasty (72). In the I-WIND trial, Kitakaze and colleagues randomized patients with an anterior ST-segment elevation myocardial infarction to receive intravenous nicorandil as a bolus or placebo after primary percutaneous coronary intervention. The overall morbidity and mortality were the same in both groups after 3 years. However, 61 patients continued on oral nicorandil after discharge, and in this group, the LV ejection fraction was better at the 6-month follow-up (73). Larger trials are needed, however, to examine the cardioprotective action of nicorandil.



Although many investigators have studied the role of calcium channel blockers in myocardial preconditioning, there are many open questions that future research should seek to answer. Nevertheless, the use of calcium channel blockers to mimic preconditioning in selected clinical settings may be a desirable future therapeutic goal. Based on current knowledge, we can say that nicorandil preconditioning is certainly worth investigation. More importantly, future studies should reveal simpler and even more effective therapeutic interventions for protecting the heart from ischaemia/reperfusion.

## REFERENCES

1. Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 1998;38(2):291-300.
2. Vinod NK, Rupinder SM, Murugesan C. Myocardial ischaemic preconditioning. *Indian Journal of Anaesthesia.* 2004;48:93.
3. Duan HF, Wu CT, Wu DL, et al. Treatment of myocardial ischemia with bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing hepatocyte growth factor. *Molecular therapy.* 2003;8(3):467-74.
4. Przyklenk K, Kloner RA. Ischemic preconditioning: exploring the paradox. *Progress in cardiovascular diseases.* 1998;40:517-47.
5. Alserius T, Hammar N, Nordqvist T, Ivert T. Risk of death or acute myocardial infarction 10 years after coronary artery bypass surgery in relation to type of diabetes. *Am Heart J.* 2006;152(3):599-605.
6. Cutrn JC, Perrelli MG, Cavalieri B, Peralta C, Rosell Catafau J, Poli J. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *Free Radic Biol Med.* 2002;33(9):1200-8.
7. Janoff A. Alterations in lysosomes (intracellular enzymes) during shock; effects of preconditioning (tolerance) and protective drugs. *International anesthesiology clinics.* 1964;2(2):251-70.
8. Muller DWM, Topol EJ, Califf RM, Sigmon KN, Gorman L. Relationship between antecedent angina pectoris and short term prognosis after thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *Am Heart J.* 1990;119:224-31.
9. Pomerantz BJ, Joo K, Shames BD, Cleveland JC Jr, Banerjee A, Harken AH. Adenosine preconditioning reduces both pre and postischemic arrhythmias in human myocardium. *J Surg Res.* 2000;90(2):191-6.
10. Luh SP, Yang PC. Organ preconditioning: the past, current status, and related lung studies. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2006;7(5):331-41.
11. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986;74:1124-36.
12. Liu Y, Downey JM. Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart. *Am J Physiol.* 1992;263:H1107-12.
13. Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, et al. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation.* 1991;84:350-6.
14. Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, et al. Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res.* 1990;66:1133-42.
15. Kloner Ra, Shook T, Przyklenk K, et al. Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI 4: a clinical correlate to preconditioning? *Circulation.* 1995;91:37-45.
16. Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301(5):1723-41.
17. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med.* 2007;357(11):1121-35
18. Iliodromitis EK, Lazou A, Kremastinos DT. Ischemic preconditioning: protection against myocardial necrosis and apoptosis. *Vasc Health Risk Manag.* 2007;3(5):629-37.
19. Speechly-Dick ME, Mocanu MM, Yellon DM. Protein kinase C: its role in ischemic preconditioning in the rat. *Circ Res.* 1994;75:586-90.
20. Steenbergen C, Fralix TA, Murphy E. Role of increased cytosolic free calcium concentration in myocardial ischemic injury. *Basic Res Cardiol* 1993;88:456-70.
21. Silverman HS, Stern MD. Ionic basis of ischaemic cardiac injury: insights from cellular studies. *Cardiovasc Res* 1994;28:581-97.
22. Liu Y, Sato T, O'Rourke B, Marban E. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation.* 1998;97(24):2463-9.
23. Crossman DC. The pathophysiology of myocardial ischaemia. *Heart.* 2004;90(5):576-80.
24. Jones CJ, Kuo L, Davis MJ, et al. Role of nitric oxide in the coronary microvascular responses to adenosine and increased metabolic demand. *Circulation.* 1995;91:1807-13.
25. Meldrum DR. Mechanisms of cardiac preconditioning: ten years after the discovery of ischemic preconditioning. *J Surg Res.* 1997;73(1):1-13.
26. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest.* 2013;123(1):92-100.
27. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med.* 1991;42:225-46.
28. Verma S, Fedak PW, Weisel RD, et al. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation.* 2002;105(20):2332-6.
29. Mittal D, Taliyan R, Sharma PL, Yadav HN. Effect of pioglitazone on the abrogated cardioprotective effect of ischemic preconditioning in hyperlipidemic rat heart. *Indian J Pharmacol.* 2016;48(1):59-63.
30. Dorsch M, Behmenburg E, Raible M, et al. Morphine-Induced Preconditioning: Involvement of Protein Kinase A and Mitochondrial Permeability Transition Pore. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151025.



31. Müllenheim J, Ebel D, Frässdorf J, Preckel B, Thämer V, Schlack W. Isoflurane preconditions myocardium against infarction via release of free radicals. *Anesthesiology*. 2002;96(4):934-40.
32. Jeremic N, Petkovic A, Srejovic I, Zivkovic V, Djuric D, Jakovljevic V. Effects of ischemia and omeprazole preconditioning on functional recovery of isolated rat heart. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2015;30(2):266-75.
33. Miyawaki H, Ashraf M. Ca<sup>2+</sup> as a mediator of ischemic preconditioning. *Circ Res*. 1997;80: 790-9.
34. Smith GB, Stefanelli T, Wu ST, Wilkman-Coffelt J, Parmley WW, Zaugg CE. Rapid adaptation of myocardial calcium homeostasis to short episodes of ischemia in isolated rat hearts. *Am Heart J*. 1996;131:1106-1112.
35. Dagenais F, Cartier R, Hollmann C, Buluran J. Calcium-channel blockers preserve coronary endothelial reactivity after ischemia-reperfusion. *Ann Thorac Surg*. 1997;63:1050-6.
36. Hugtenburg JG, Van Voorst MJ, Van Marle J, et al. The influence of nifedipine and miflozine on mitochondrial calcium overload in normoxic and ischaemic guinea-pig hearts. *Eur J Pharmacol*. 1990;178:71-8.
37. Braunwald E. Mechanism of action of calcium-channel-blocking agents. *New England Journal of Medicine*. 1982; 307(26):1618-27.
38. Brichard G, Zimmermann PE. Verapamil in cardiac dysrhythmias during anesthesia. *British Journal of anaesthesia*. 1970;42(11):1005-12.
39. Freher M, Challapalli S, Pinto JV, Schwartz J, Bonow RO, Gheorgiade M. Current status of calcium channel blockers in patients with cardiovascular disease. *Curr Probl Cardiol*. 1999;24:236-40.
40. Weir MR. Calcium channel blockers: differences between subclasses. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2007;7:5-15.
41. Frishman W.H. Calcium channel blockers: differences between subclasses. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2007;7:17-23.
42. Hofmann F, Lacinova L, Klugbauer N. Voltage-dependent calcium channels: From structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1999;139:33-87.
43. Cleophas TJ, van Marun R. Meta-analysis of efficacy and safety of second-generation dihydropyridine calcium channel blockers in heart failure. *Am J Cardiol*. 2001;87:487-90.
44. Ruzicka M, Leenen FH. Relevance of 24 H blood pressure profile and sympathetic activity for outcome on short- versus long-acting 1,4-dihydropyridines. *Am J Hypertens*. 1996;9:86-94.
45. Millar JA, McLean KA, Sumner DJ, et al. The effect of the calcium antagonist nifedipine on pressor and aldosterone responses to angiotensin II in normal man. *Eur J Clin Pharmacol*. 1983;24:315-21.
46. Krishna GG, Riley LJ, Deuter G, et al. Natriuretic effect of calcium-channel blockers in hypertensives. *Am J Kidney Dis*. 1991;18:566-72.
47. Cutler JA. Calcium-channel blocker for hypertension-uncertainty continues. *N Engl J Med*. 1998; 338:679-81.
48. Psaty BM, Heckbert SR, Koepsell TD, et al. The risk of myocardial infarction associated with antihypertensive drug therapies. *JAMA*. 1995;274:620-5.
49. Shen AC, Jennings RB. Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury. *Am J Pathol*. 1972;67(3):417-40.
50. Kiowski W, Buhler FR, Fadayomi MO, et al. Age, race, blood pressure and renin: predictors for antihypertensive treatment with calcium antagonists. *Am J Cardiol*. 1985;56:81-5.
51. Sica DA. Pharmacotherapy review: calcium channel blockers. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2006;8(1):53-6.
52. Curt FD, Psaty MB, Meyer VJ. Nifedipine dose-related increase in mortality in patients with coronary heart disease. *Circulation*. 1995;92:1326-31.
53. Waters D. Proischemic complications of dihydropyridine calcium channel blockers. *Circulation*. 1991;84:2598-2600.
54. Cain BS, Meldrum DR, Cleveland JC Jr, Meng X, Bannerjee A, Harken AH. Clinical L-type Ca<sup>2+</sup> channel blockade prevents ischemic preconditioning of human myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31(12):2191-7.
55. Wallbridge DR, Schulz R, Braun C, Post H, Heusch G. No attenuation of ischaemic preconditioning by the calcium antagonist nisoldipine. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28(8):1801-10.
56. Camara AK, Chen Q, Rhodes SS, Riess ML, Stowe DF. Negative inotropic drugs alter indexes of cytosolic [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-left ventricular pressure relationships after ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287(2):H667-80.
57. Dilmac N, Hilliard N, Hockerman GH. Molecular determinants of frequency dependence and Ca<sup>2+</sup> potentiation of verapamil block in the pore region of Cav1.2. *Mol Pharmacol*. 2004;66(5):1236-47.
58. Miyawaki H, Zhou X, Ashraf M. Calcium preconditioning elicits strong protection against ischemic injury via protein kinase C signaling pathway. *Circ Res*. 1996;79:137-146.
59. Henry PD. Comparative pharmacology of calcium antagonists: nifedipine, verapamil and diltiazem. *The American journal of cardiology*. 1980;46(6):1047-58.
60. Yu W, Wang JJ, Gan WY, Lin GS, Huang CX. Effects of verapamil preconditioning on cardiac function in vitro and intracellular free Ca<sup>2+</sup> and L-type calcium current in rat cardiomyocytes post ischemia-reperfusion injury. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2010;38(3):225-9.
61. Okuda K, Nohara R, Ogino M, et al. Limitation of infarct size with preconditioning and calcium antagonist (Diltiazem): Difference in <sup>99m</sup>Tc-PYP uptake in the myocardium. *Annals of nuclear medicine*. 1996;10(2):201-9.
62. De Jong JW, Harmsen E, De Tombe PP. Diltiazem administered before or during myocardial ischemia decreases adenine nucleotide catabolism. *J Mol Cell Cardiol*. 1984;16(4):363-70.
63. Taira N. Nicorandil as a hybrid between nitrates and potassium channel activators. *Am J Cardiol*. 1989;63:18J-24J.



64. The IONA Study Group. Effect of nicorandil on coronary events in patients with stable angina: the impact of nicorandil in angina (IONA) randomized trial. *Lancet* 2002;359:1269–75.
65. Lablanche JM, Bauters C, Leroy F et al. Prevention of coronary spasm by nicorandil: Comparison with nifedipine. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992;20:S82–5.
66. Ohno Y, Minatoguchi S, Uno Y, Kariya T, Arai M, Yamashita K, Fujiwara T, Fujiwara H. Nicorandil reduces myocardial infarct size by opening the K(ATP) channel in rabbits. *Int J Cardiol*. 1997;62(3):181-90.
67. Matsubara T, Minatoguchi S, Matsuo H, et al. Three minute, but not one minute, ischemia and nicorandil have a preconditioning effect in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35(2):345-51.
68. Tang XL, Xuan YT, Zhu Y, Shirk G, Bolli R. Nicorandil induces late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286(4):H1273-80.
69. Ahmed LA, Salem HA, Attia AS, Agha AM. Pharmacological preconditioning with nicorandil and pioglitazone attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Eur J Pharmacol*. 2011;663(1-3):51-8.
70. Rajesh KG, Sasaguri S, Zhitian Z, Suzuki R, Asakai R, Maeda H. Second window of ischemic preconditioning regulates mitochondrial permeability transition pore by enhancing Bcl-2 expression. *Cardiovasc Res*. 2003;59(2):297-307.
71. Matsuo H, Watanabe S, Segawa T, et al. Evidence of pharmacologic preconditioning during PTCA by intravenous pretreatment with ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel opener nicorandil. *Eur Heart J*. 2003;24(14):1296-303.
72. Sakai K, Yamagata T, Teragawa H, Matsuura H, Chayama K. Nicorandil enhances myocardial tolerance to ischemia without progressive collateral recruitment during coronary angioplasty. *Circulation journal*. 2002;66(4):317-22.
73. Kitakaze M, Asakura M, Kim J, et al. Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): 2 randomised trials. *Lancet*. 2007;370(9597):1483-93.