

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Jovana V. Jakovljević Uzelac

**UTICAJ VITAMINA B6 I FOLNE KISELINE NA
FUNKCIONALNE, BIOHEMIJSKE I
IMUNOHISTOHEMIJSKE KARAKTERISTIKE
KARDIOVASKULARNOG SISTEMA PACOVA
SA SRČANOM INSUFICIJENCIJOM
IZAZVANOM MONOKROTALINOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Jovana V. Jakovljević Uzelac

**THE INFLUENCE OF VITAMIN B6 AND
FOLIC ACID ON FUNCTIONAL,
BIOCHEMICAL AND
IMMUNOHISTOCHEMICAL
CHARACTERISTICS OF THE
CARDIOVASCULAR SYSTEM OF RATS WITH
HEART FAILURE CAUSED BY
MONOCROTALINE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

MENTOR doktorske disertacije je Prof. dr DRAGAN ĐURIĆ, redovni profesor na Institutu za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

KOMISIJA ZA OCENU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE:

1. Prof. dr TATJANA SIMIĆ, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu, dopisni član SANU
2. Prof. dr BRANISLAV MILOVANOVIĆ, vanredni profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu
3. Prof. dr VLADIMIR JAKOVLJEVIĆ, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu

Datum odbrane:

Ova doktorska teza je realizovana u:

- *Laboratoriji za kardiovaskularnu fiziologiju Instituta za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“ Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom Prof. dr Dragana Đurića,*
- *Laboratoriji Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom Prof. dr Tatjane Simić,*
- *Laboratoriji Instituta za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“ Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom Prof. dr Milice Labudović Borović.*

Doktorska teza je realizovana u okviru projekta Ministarstva nauke Republike Srbije broj 175043 „Efekti homocisteina i homocisteinu srodnih supstanci na kardiovaskularni sistem: uloga gasnih transmitera NO, H₂S i CO“, čiji je rukovodilac Prof. dr Dragan Đurić.

Zahvaljujem mentoru, Prof. dr Draganu Đuriću na svesrdnoj i bezrezervnoj podršci, pravilnom usmeravanju, motivaciji i strpljenju tokom rada na ovoj doktorskoj tezi.

Značajnu zahvalnost izražavam članovima komisije, Prof. dr Tatjani Simić, prof. dr Branislavu Milovanoviću i prof. dr Vladimiru Jakovljeviću, na korisnim sugestijama koje su doprinele kvalitetu teze.

Zahvalnost izražavam i svojim dragim kolegama Doc. dr Mariji Stojanović, asistentima dr Slavici Mutavdžin i dr Dušanu Todoroviću, laborantima Jovanu Despotoviću i Sanji Sekulić, domaru Draganu Dimitrijeviću, kao i ostalom osoblju Instituta za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“ na nesebičnoj pomoći prilikom eksperimentalnog rada, i na tehničkoj podršci u toku izvođenja eksperimenata.

Posebno zahvaljujem Doc. dr Tatjani Đukić za saradnju, česte i korisne konsultacije tokom eksperimentalnog rada i uobličavanja teze.

Zahvaljujem Prof. dr Milici Labudović Borović i Doc. dr Jeleni Rakočević na pomoći oko pripreme, obrade i analize histoloških preparata.

Zahvaljujem Prof. dr Nini Japundžić Žigon i dr Marku Vasiću na pomoći oko ehokardiografske evaluacije eksperimentalnih životinja.

Zahvalnost izražavam Prof. dr Nataši Milić na statističkoj analizi rezultata.

Zahvaljujem Doc. dr Sanji Stanković, višem naučnom saradniku, na saradnji i korisnim savetima u toku izrade teze.

Zahvaljujem Prof. dr Danijeli Krstić i višem naučnom saradniku Mirjani Čolović na pomoći u eksperimentalnom radu.

Posebnu zahvalnost upućujem svojoj porodici koja me podržava i veruje u mene.

UTICAJ VITAMINA B6 I FOLNE KISELINE NA FUNKCIONALNE, BIOHEMIJSKE I IMUNOHISTOHEMIJSKE KARAKTERISTIKE KARDIOVASKULARNOG SISTEMA PACOVA SA SRČANOM INSUFICIJENCIJOM IZAZVANOM MONOKROTALINOM

REZIME

Cilj: U ovoj studiji istraživali smo efekte subhronične primene vitamina B6 i folne kiseline na ehokardiografske, kardiometaboličke, parametre oksidativnog stresa, histomorfometrijske i imunohistohemijske promene u srčanoj insuficijenciji izazvanoj monokrotalinom.

Materijal i metode: Istraživanje je sprovedeno tokom 4 nedelje, i evaluirano je 9 eksperimentalnih grupa (8 životinja / grupi): kontrolne grupe (K fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno; K28 fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. 28 dana), monokrotalinom-indukovana srčana insuficijencija (M 50 mg/kg t.m. ip. jednokratno), vitamin B6 (B6 7 mg/kg t.m. ip. 28 dana), folna kiselina (FK 5 mg/kg t.m. ip. 28 dana), vitamin B6 + folna kiselina (B6 7 mg/kg t.m. ip. 28 dana, FK 5 mg/kg t.m. ip. 28 dana), monokrotalin + vitamin B6 (M 50 mg/kg t.m. ip. jednokratno, B6 7 mg/kg t.m. ip. 28 dana), monokrotalin + folna kiselina (M 50 mg/kg t.m. ip. jednokratno, FK 5 mg/kg t.m. ip. 28 dana) i monokrotalin + vitamin B6 + folna kiselina (M 50 mg/kg t.m. ip. jednokratno, B6 7 mg/kg t.m. ip. 28 dana, FK 5 mg/kg t.m. ip. 28 dana). Ehokardiografska merenja su sprovedena radi potvrde modela srčane insuficijencije indukovane monokrotalinom. Određivani su različiti kardiometabolički biomarkeri u krvi, aktivnosti enzima superoksid dismutaze (SOD) i glutation peroksidaze (GPx), sadržaj glutationa, parametri oksidativnog oštećenja proteina, tiol- i karbonilne grupe, sadržaj nitrotirozina i ukupna S-glutationilacija. Pored toga, određivani su histomorfometrijski i imunohistohemijski parametri (markeri proliferacije Ki67 i PCNA) srčanog tkiva pacova.

Rezultati: Monokrotalin je doveo do hipertrofije zida desne komore i do povećanja dimenzije kardiomiocita zida leve komore, povećanja unutrašnjeg prečnika desne komore, praćene značajnim porastom troponina T, glukoze i von Willebrand-ovog faktora, uz očuvane parametre inflamacije i funkcije bubrega i jetre, kao i do promenjenih pokazatelja oksidativnog stresa. Tretman vitaminom B6 značajno je uticao na određene kardiometaboličke markere: troponin T, glukozu, HDL holesterol, aktivnosti aminotransferaza, alkalne fosfataze i amilaze, vrednosti von Willebrand-ovog faktora, uree i kreatinina. Pored toga, tretman vitaminom B6 je uticao na sadržaj glutationa i sadržaj reaktivnih karbonilnih derivata, kao i dimenzije kardiomiocita zida leve komore. Takođe, pokazano je smanjenje Ki67 i PCNA pozitivnosti u zidu desne komore. Efekti folne kiseline su se odrazili kroz značajno smanjenu aktivnost SOD-a, smanjenu Ki67 i PCNA pozitivnost u zidu desne komore i neznatno smanjen nivo ukupne glutationilacije. Primena folne kiseline modulirala je nivo oksidativnog stresa i uticala na smanjenje proliferacije kardiomiocita u zidu desne komore. Posle istovremene aplikacije vitamina B6 i folne kiseline, primećene su promene lipidnih parametara i aktivnosti određenih enzima, kao i smanjenje von Willebrand-ovog faktora, dok su određeni parametri oksidativnog stresa pokazali značajnije promene. Zajednička primena vitamina B6 i folne kiseline nije umanjila hipertrofiju zida desne komore izazvanu monokrotalinom, već je povećala vrednosti određenih histomorfometrijskih parametara. Ustanovljeno je i povećanje Ki67 i PCNA pozitivnosti u zidu desne komore nakon ko-aplikacije vitamina B6 i folne kiseline.

Zaključci: Pojedinačni i kombinovani četvoronedeljni tretman vitaminom B6 i folnom kiselinom u eksperimentalnom modelu monokrotalinom indukovane srčane insuficijencije kod pacova doveo je do brojnih značajnih efekata na kardiometaboličke, parametre oksidativnog stresa, histomorfometrijske i imunohistohemijske parametre.

Ključne reči: srčana insuficijencija, monokrotalin, vitamin B6, folna kiselina, biohemijski markeri, oksidativni stres, imunohistohemijski markeri, pacov

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Fiziološke nauke

udk br: _____

THE INFLUENCE OF VITAMIN B6 AND FOLIC ACID ON FUNCTIONAL, BIOCHEMICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE CARDIOVASCULAR SYSTEM OF RATS WITH HEART FAILURE CAUSED BY MONOCROTALINE

ABSTRACT

Purpose: In this study, it has been investigated the effects of vitamin B6 and folic acid on echocardiographic, cardiometabolic, oxidative stress-biomarker changes, histomorphometric and immunohistochemical changes in monocrotaline-induced heart failure (HF).

Methods: The investigation was conducted during a 4-week period, using 9 experimental groups (8 animals/group): blank solution-exposed controls (K physiological saline 1ml/kg b.w. ip. one day; K28 physiological saline 1 ml/kg b.w. ip. 28 days), monocrotaline-induced HF (M 50 mg/kg b.w. ip. one day), vitamin B6 (B6 7 mg/kg b.w. ip. 28 days), folic acid (FA 5 mg/kg b.w. ip. 28 days), vitamin B6 + folic acid (B6 7 mg/kg b.w. ip. 28 days, FA 5 mg/kg b.w. ip. 28 days), monocrotaline + vitamin B6 (M 50 mg/kg b.w. ip. one day, B6 7 mg/kg b.w. ip. 28 days), monocrotaline + folic acid (M 50 mg/kg b.w. ip. one day, FA 5 mg/kg b.w. ip. 28 days), and monocrotaline + vitamin B6 + folic acid (M 50 mg/kg b.w. ip. one day, B6 7 mg/kg b.w. ip. 28 days, FA 5 mg/kg b.w. ip. 28 days). In order to confirm monocrotaline-induced HF, echocardiography was performed. Different cardiometabolic biomarkers in blood, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) activities, glutathione content, parameters of oxidative damage of proteins, thiol- and carbonyl groups, nitrotyrosine content, and total S-glutathionylation were determined. As well as, histomorphometric and certain immunohistochemical parameters (proliferation markers Ki67 and PCNA) of rat cardiac tissue were designated.

Results: The right ventricular wall hypertrophy, increase of dimension of cardiomyocyte of the left ventricle and increase of thickness of interventricle septum were followed by significant increase of troponin T, glucose and von Willebrand factor, and maintained parameters of inflammation and renal and liver function, as well as certain changes of oxidative stress parameters. The treatment with vitamin B6 significantly affected certain cardiometabolic markers: troponin T, glucose, HDL cholesterol, activities of aminotransferase, alkaline phosphatase and amylase, and values of von Willebrand factor, urea and creatinine. Furthermore, glutathione content and the content of reactive carbonyl derivates, as well as dimension of cardiomyocyte of the left ventricle free wall were affected by vitamin B6 treatment. Also, a decrease in Ki67 and PCNA positivity in the right ventricular wall was shown. The effects of folic acid were reflected through significantly decreasing SOD activity, reducing Ki67 and PCNA positivity in right ventricle wall, and slightly decreasing of total glutathionylation level. Folic acid administration modulated the level of oxidative stress, and affected the reduction of cardiomyocyte proliferation in wall of right ventricle. After treatment with co-administered vitamins B6 and folic acid there were detected some changes of lipid parameters and activities of certain enzymes, as well as the decrease of von Willebrand factor, while several parameters of oxidative stress were more pronounced. Co-application of vitamins B6 and folic acid did not attenuate hypertrophy of right ventricle wall, but aggravated the values of certain histomorphometric parameters. An increase in Ki67 and PCNA positivity in the right ventricular wall was also found after co-application of vitamin B6 and folic acid.

Conclusions: Four week treatment with vitamins B6 and folic acid, alone and in combination, on experimental model of HF induced by monocrotaline in rats, showed many significant effects on cardiometabolic and oxidative stress parameters as well as on histomorphometric and immunohistochemical parameters.

Key words: heart failure, monocrotaline, vitamin B6, folic acid, biochemical markers, oxidative stress, immunohistochemical markers, rat

Research area: Medicine

Research field: Physiological sciences

udk no: _____

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1	Definicija i značaj srčane insuficijencije.....	1
1.2	Socioepidemiološki podaci srčane insuficijencije.....	1
1.3	Etiologija srčane insuficijencije.....	2
1.4	Patofiziološki mehanizmi srčane insuficijencije; mogući novi mehanizmi.....	2
1.4.1	Neuroendokrine promene.....	3
1.4.2	Oksidativni stres i endotelna disfunkcija u srčanoj insuficijenciji.....	5
1.4.3	Remodelovanje miokarda.....	8
1.5	Klinički i terapijski aspekti srčane insuficijencije.....	10
1.5.1	Klasifikacija srčane insuficijencije.....	11
1.5.1.1	Sistolna i dijastolna srčana insuficijencija.....	11
1.5.1.2	NYHA klasifikacija srčane insuficijencije.....	11
1.6	Značaj vitamina B grupe i deficita kod ljudi.....	13
1.6.1	Efekti deficita vitamina B grupe kod eksperimentalnih životinja.....	13
1.7	Vitamin B6.....	15
1.8	Folna kiselina (vitamin B9).....	16
1.9	Eksperimentalni animalni modeli srčane insuficijencije.....	18
2.	CILJEVI.....	24
3.	MATERIJAL I METODE.....	25
3.1	Eksperimentalne životinje.....	25
3.2	Eksperimentalne grupe.....	25
3.3	Eksperimentalni protokol.....	26
3.3.1	Indukcija srčane insuficijencije.....	26
3.3.2	Varijable merene u studiji.....	26
3.3.3	Ehokardiografska merenja.....	26
3.3.4	Određivanje biohemijskih parametara u serumu i plazmi.....	27
3.3.5	Priprema tkiva srca za biohemijske analize.....	27
3.3.6	Određivanje parametara oksidativnog stresa u tkivu srca pacova.....	28
3.3.6.1	Određivanje karbonilnog sadržaja u tkivu srca pacova.....	28
3.3.6.2	Određivanje sadržaja nitrotirozina u tkivu srca pacova.....	28
3.3.6.3	Određivanje tiolnog statusa u tkivu srca pacova.....	28
3.3.6.4	Određivanje koncentracije oksidovanog (GSSG) i ukupnog glutationa (GSH) u tkivu srca pacova.....	28
3.3.6.5	Određivanje ukupne S – glutationilacije proteina u tkivu srca pacova.....	29
3.3.7	Histološka i morfometrijska analiza.....	29
3.3.8	Imunohistohemijska analiza uzoraka tkiva srca.....	29
3.3.9	Korišćene supstance.....	30
3.4	Statistička analiza.....	30
4.	REZULTATI.....	31
4.1	Rezultati aplikacije monokrotalina u odnosu na kontrolnu grupu.....	31
4.1.1	Promena telesne mase eksperimentalnih životinja.....	31
4.1.2	Razlika u vrednosti kardiosomatskog indeksa između eksperimentalnih životinja.....	32

4.1.3	Biohemijska analiza.....	33
4.1.4	Histomorfometrijska analiza.....	35
4.1.5	Imunohistohemijska analiza.....	36
4.1.6	Analiza parametara oksidativnog stresa.....	37
4.1.7	Determinacija ukupne S-glutationilacije.....	43
4.1.8	Ehokardiografska procena morfologije i funkcije srca.....	45
4.2	Aplikacija vitamina B6.....	48
4.2.1	Promena telesne mase eksperimentalnih životinja.....	48
4.2.2	Razlika u vrednosti kardiosomatskog indeksa između eksperimentalnih životinja.....	49
4.2.3	Biohemijska analiza.....	50
4.2.4	Histomorfometrijska analiza.....	52
4.2.5	Imunohistohemijska analiza.....	54
4.2.6	Analiza parametara oksidativnog stresa.....	56
4.2.7	Determinacija ukupne S-glutationilacije.....	62
4.3	Aplikacija folne kiseline (vitamina B9).....	64
4.3.1	Promena telesne mase eksperimentalnih životinja.....	64
4.3.2	Razlika u vrednosti kardiosomatskog indeksa između eksperimentalnih životinja.....	65
4.3.3	Biohemijska analiza.....	66
4.3.4	Histomorfometrijska analiza.....	68
4.3.5	Imunohistohemijska analiza.....	70
4.3.6	Analiza parametara oksidativnog stresa.....	72
4.3.7	Determinacija ukupne S-glutationilacije.....	78
4.4	Udružena aplikacija vitamina B6 i B9 (folne kiseline).....	80
4.4.1	Promena telesne mase eksperimentalnih životinja.....	80
4.4.2	Razlika u vrednosti kardiosomatskog indeksa između eksperimentalnih životinja.....	81
4.4.3	Biohemijska analiza.....	82
4.4.4	Histomorfometrijska analiza.....	84
4.4.5	Imunohistohemijska analiza.....	86
4.4.6	Analiza parametara oksidativnog stresa.....	88
4.4.7	Determinacija ukupne S-glutationilacije.....	94
5.	DISKUSIJA.....	95
6.	ZAKLJUČCI.....	101
7.	LITERATURA.....	103

1. UVOD

1.1 Definicija i značaj srčane insuficijencije

Srčana insuficijencija (SI) je klinički sindrom koji se odlikuje značajnom prevalencijom i mortalitetom, čestim hospitalizacijama, lošim kvalitetom života i složenim režimima lečenja. To je hronična bolest srca, jedan od vodećih uzroka smrtnosti u svetu. Sveobuhvatno gledano, kardiovaskularne bolesti su jedan od najznačajnijih uzroka morbiditeta i mortaliteta u svetu (World Health Organization, 2020). Srčana insuficijencija je multisistemski poremećaj uzrokovan narušenom strukturom i/ili funkcijom srca čime je onemogućeno da se zadovolje potrebe organizma za kiseonikom, neophodne za izbalansirani metabolizam perifernih tkiva. Dakle, metaboličke potrebe tela nisu zadovoljene zbog nemogućnosti srca da održi neophodan protok krvi (Goldberg, 2010). Naime, srčana insuficijencija je sindrom koji je nastao kao posledica nemogućnosti srca da dopremi kiseonik i hranljive materije neophodne za bazalne metaboličke potrebe, kao i nemogućnosti srca da održi normalne srčane pritiske punjenja. Ovaj sindrom nastaje ne samo kao rezultat preopterećenja volumenom i/ili pritiskom, već i kao rezultat složenih interakcija genetskih, neurohumoralnih, inflamatornih i biohemijskih mehanizama. Sa druge strane, istraživanja navode da se SI potencijalno može svrstati u grupu tzv. oksidativnih oboljenja, usled nekontrolisane produkcije slobodnih radikala čiji se uticaj ogleda kroz procese progresije SI i neadekvatnog dejstva antioksidativnih sistema zaštite (Sies, 1991). Progresija SI je složen proces, a najznačajnijom determinantom tog procesa smatra se remodelovanje miokarda, uzrokovano direktnim uticajem slobodnih radikala na metabolizam miocita i/ili na ekstracelularni matriks i aktivnost fibroblasta (Mehrabi et al., 1999; Scherer i Deamer, 1986).

1.2 Socioepidemiološki podaci srčane insuficijencije

Prema poslednjim podacima Svetske zdravstvene organizacije, 17.5 miliona smrtnih ishoda godišnje predstavlja direktnu posledicu neke kardiovaskularne bolesti (WHO. Int., 2020). Srčana insuficijencija, jedan je od vodećih zdravstvenih problema kako sa povećanom incidencom, tako i sa povećanom prevalencom tokom proteklih decenija. Procenjuje se da 64.3 miliona ljudi živi sa srčanom insuficijencijom širom sveta (GBD, 2017). Epidemiološke studije su pokazale da 2% svetske populacije boluje od srčane insuficijencije. Takođe se procenjuje da oko 2% odraslih stanovnika zemalja Evropske unije boluje od SI. Zabeležen je eksponencijalni rast broja pacijenata i broja novodijagnostikovanih slučajeva sa starosnom dobi. Taj broj nakon 65. godine starosti raste na 6-10% (Roger et al., 2004; Dickstein et al., 2008; Ramadan et al., 2008). O tome koliko je bitno pravovremeno lečenje govori podatak da je u 5% svih medicinskih i gerijatrijskih hospitalizacija starijih od 65 godina uzrok upravo srčana insuficijencija (Zannad et al., 1998; Fang et al., 2008). U uznapredovaloj fazi bolesti nalazi se 0.1% populacije, a na transplantaciju srca čeka 0.001%. Epidemiološka istraživanja pokazuju da letalni ishod nastaje kod čak 30-40% pacijenata u prvoj godini od postavljanja dijagnoze, a 60-70% unutar nekoliko godina, najčešće zbog progresije bolesti i posledičnih komplikacija. Većina pacijenata, čak 80%, primljenih zbog srčane insuficijencije su osobe starije životne dobi. Prosečna hospitalizacija traje 17 dana i posle kratkog perioda često se dešava da budu ponovo hospitalizovani. Ovaj podatak ima tendenciju porasta čime se lečenje pacijenta sa srčanom insuficijencijom postavlja na lestvicu prioriteta (Schocken, 2000). Primećuje se da je mortalitet veći kod pacijenata koji su bili hospitalizovani (Masoudi et al., 2004 ; Najafi et al., 2008). Nakon pet godina od postavljanja dijagnoze, preživljavanje pacijenata sa srčanom insuficijencijom koji se nalaze u odmakloj fazi bolesti izjednačava se sa preživljavanjem obolelih od malignih bolesti. Dok žene imaju znatno nižu stopu incidencije srčane insuficijencije u

poređenju sa muškarcima (u svim starosnim kategorijama osim preko 74 godine) (Christiansen et al., 2017), oni i dalje čine približno polovinu rasprostranjenih slučajeva.

Podaci Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ ukazuju da su kardiovaskularne bolesti vodeći uzrok mortaliteta u našoj zemlji sa učestalošću od 53.3%. Prema podacima Statističkog godišnjaka Republike Srbije iz 2017. godine (www.sta.gov.rs) u centralnoj Srbiji i Vojvodini je 2016. godine umrlo 100 834 osoba od kardiovaskularnih bolesti, što je 51.7% od ukupnog broja preminulih. Međutim, nedostaju precizni podaci o ukupnom broju obolelih i stopi mortaliteta od srčane insuficijencije na teritoriji Republike Srbije.

1.3 Etiologija srčane insuficijencije

Srčana insuficijencija može nastati kao posledica morfoloških, mehaničkih i poremećaja električne aktivnosti srca, ali i kao posledica pojedinačnih ili udruženih složenih interakcija genetskih, neurohumoralnih, inflamatornih i biohemijskih mehanizama. Uzroci nastanka srčane insuficijencije mogu biti: koronarna bolest, hipertenzija, plućna arterijska hipertenzija, dijabetes, kardiomiopatije (dilataciona i hipertrofična), valvularna bolest srca, anemija, mikrobiološki, toksički i drugi faktori. Najčešće do nastanka srčane insuficijencije dovodi udruženo dejstvo nekoliko faktora rizika.

Međutim kada govorimo o pojedinačnim uzročnicima, idiopatska dilataciona kardiomiopatija jedan je od najčešćih etioloških faktora za nastanak srčane insuficijencije. Čak kod 15-20% ovakvih pacijenata dolazi do nastanka srčane insuficijencije (Mohan et al., 2002; Fauchier et al., 2004; Gaetano et al., 2004). Pacijenti sa poremećajem glikoregulacije imaju veći rizik oboljevanja od srčane insuficijencije u odnosu na one sa normalnom glikoregulacijom. Dijabetes dovodi do pogoršanja bubrežne, plućne i endotelne funkcije, čime se pogoršava i stanje postojeće srčane insuficijencije (Maish et al., 2003; Collins i Storrow, 2009). Direktni uzročnik srčane insuficijencije može biti i pretkomorska fibrilacija usled izostajanja adekvatnog pretkomorskog doprinosa srčanom ciklusu, ali i zbog skraćanja dijasolnog punjenja izazvanog tahikardijom (Gronefeld i Hohnloser, 2003; Yang et al., 2008).

Hipertenzija doprinosi nastanku srčane insuficijencije kod 75% pacijenata, a većina njih ima i koronarnu bolest (Cleland et al., 2001). Poznato je da srčana insuficijencija može nastati i kao posledica plućne hipertenzije. Plućna arterijska hipertenzija se karakteriše poremećajem u regulaciji plućnog vaskularnog tonusa, kao i plućnog vaskularnog remodelovanja, a što takođe dovodi do povećanja plućnog vaskularnog otpora, hipertrofije desne komore, disfunkcije i insuficijencije desne polovine srca, dekompenzacije i na kraju i do smrtnog ishoda (McLaughlin, 2011).

1.4 Patofiziološki mehanizmi srčane insuficijencije; mogući novi mehanizmi

Srčana insuficijencija je zajednički krajnji ishod progresivnih kardiovaskularnih bolesti. Najčešće se definiše kao klinički sindrom koji je posledica poremećaja u strukturi i/ili funkciji srca što ga onemogućava da zadovolji potrebe organizma za kiseonikom neophodnog za izbalansirani metabolizam svih tkiva. Dakle, to je patofiziološko stanje u kome cirkulacija krvi koju obezbeđuje aktivnost srca ne isporučuje kiseonik brzinom proporcionalnom metaboličkim potrebama tkiva. Srčana insuficijencija najčešće je uzrokovana oštećenjem srca koje je povezano sa infarktom miokarda, miokarditisom ili srčanim toksinima, ili hroničnim preopterećenjem srca pritiskom ili volumenom povezanih sa hipertenzijom ili bolešću srčanih zalistaka. Dugi niz godina proučavani su molekularni mehanizmi u SI koji su usmereni na hipertrofiju, inflamaciju, angiogenezu i apoptozu u srcu. Takođe je proučavana neurohumoralna stimulacija srčane hipertrofije i disfunkcije, oksidativni stres, endotelna disfunkcija, biomehanički stimulusi, sistemska proinflamatorna hipoteza, hipoteza multi-organske disfunkcije, disinhronizacija leve komore, komorbiditeti i drugo (Hilfiker-Kleiner et al., 2006; Lakhani et al., 2019).

1.4.1 Neuroendokrine promene

U sindromu srčane insuficijencije, simpatička stimulacija utiče na nekoliko ključnih organa za održavanje udarnog volumena, posebno na srce, bubrege i periferne krvne sudove. Povećana simpatička aktivnost pojačava kontraktilnost komora i srčanu frekvencu kako bi održala normalne vrednosti udarnog volumena, dovodi do pojačanog venskog tonusa i povećava proksimalnu tubularnu reapsorpciju natrijuma kako bi se poboljšao prethodno opterećenje (*eng. preload*), i takođe dovodi do sistemske vazokonstrikcije što povećava sistemski vaskularni otpor i krvni pritisak. α -adrenergički receptori prisutni su u vaskularnim glatkim mišićima mnogo više nego u srčanim miocitima. Međutim, receptori α_1 -podtipa pokazuju značajnu zastupljenost i u miokardu, a njihov broj se umereno povećava kod srčane insuficijencije, što dovodi do hipertrofije miocita. Stimulacija ovih receptora u kardiomiocitima indukuje rast i hipertrofiju miocita i ekspresiju fetalnih izoformi kontraktilnih proteina. β_1 -adrenergički receptori prisutni su u više od 80% u srcu. Ovaj sistem igra presudnu ulogu u modulaciji srčane aktivnosti, posebno inotropnog, hronotropnog i luzotropnog efekta. Međutim, hronično povišena stimulacija simpatičkog sistema ima štetne posledice kod insuficijentnog srca i dovodi do smanjenja ekspresiranosti β_1 receptora u miokardu, čime se i smanjuje sposobnost autonomne regulacije srčanog rada, a takođe dolazi i do povećane ekspresije kinaze β -adrenergičkih receptora koja fosforiliše β_1 i β_2 receptore i time ih inhibira (Florea i Cohn, 2014).

Postoje tri natriuretska peptida, slične građe, i oni vrše širok spektar efekata na srce, bubrege i centralni nervni sistem. Atrijalni natriuretski peptid (ANP) se oslobađa iz pretkomora kao odgovor na istežanje, što dovodi do povećanog izlučivanja natrijuma putem bubrega i vazodilatacije, i kao krajnji ishod nastaje sniženje krvnog pritiska. Moždani natriuretski peptid (BNP) se takođe oslobađa iz srca, pretežno iz komora, a njegovi efekti su slični efektima ANP. Delovanje C natriuretskog peptida je ograničeno na vaskularni endotel i centralni nervni system, i ima ograničene efekte na natriurezu i vazodilataciju.

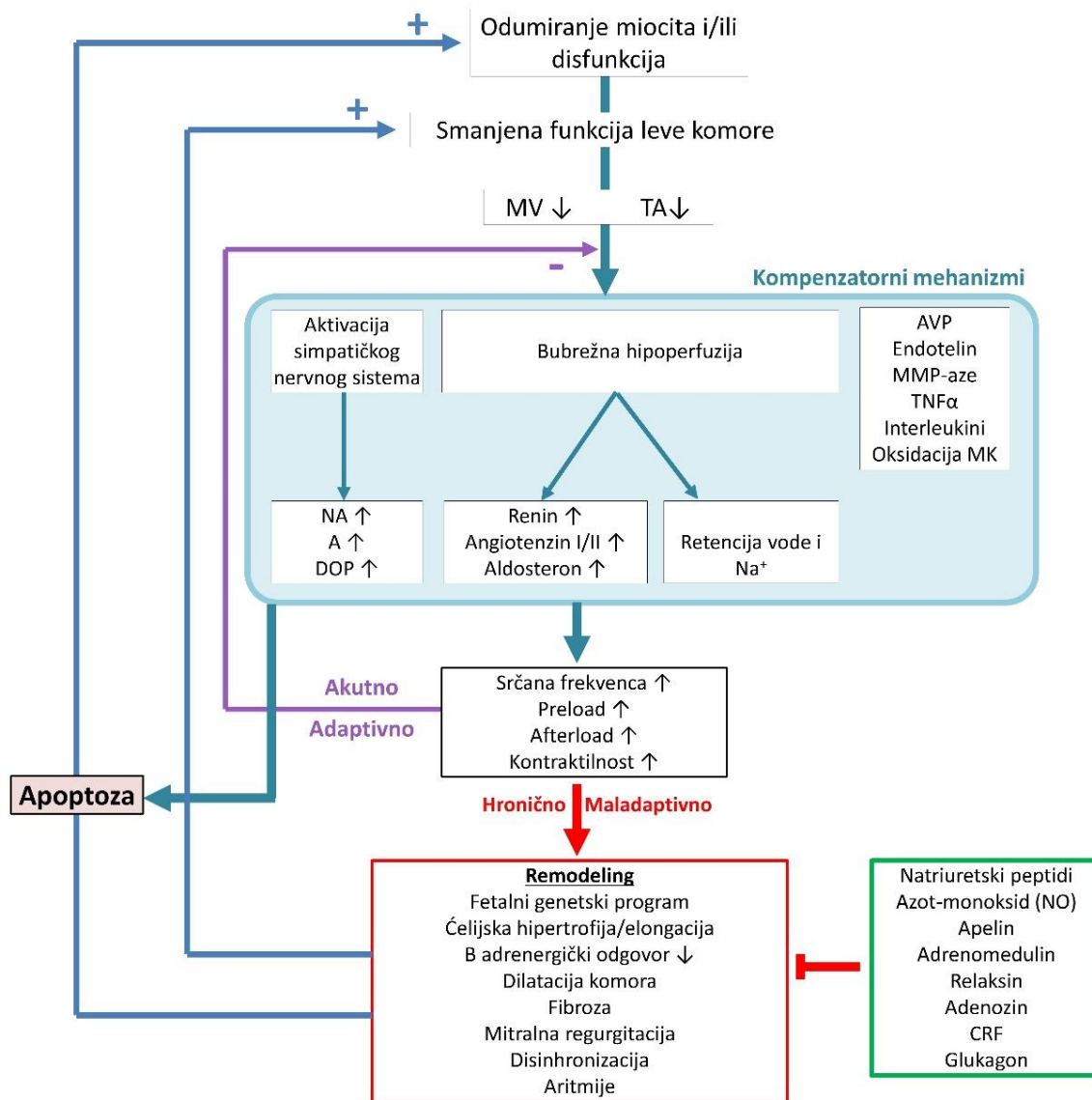
Atrijalni i moždani natriuretski peptidi se oslobađaju kao odgovor na povećanje zapremine srca i njegovo opterećenje pritiskom, i deluju kao fiziološki antagonisti angiotenzina II na vaskularni tonus, sekreciju aldosterona i tubulsku reapsorpciju natrijuma u bubrežima. Natriuretski peptidi su prisutni u povećanoj koncentraciji kod pacijenata sa srčanom insuficijencijom i mogu da budu potentni dijagnostički i prognostički parametri. Međutim, važan je i terapijski potencijal sistema natriuretskih peptida, gde povoljne efekte mogu da ostvare supstance koje deluju kao inhibitori enzima koji metabolišu ANP (neutralna endopeptidaza), ili ligandi koji deluju kao agonisti za A i B receptore natriuretskih peptida (Wilkins, 1997).

Koncentracija ADH je takođe povećana u stanjima teške hronične srčane insuficijencije. Visoke koncentracije ADH su posebno česte kod pacijenata koji primaju diuretike u sklopu terapije, što sve zajedno predstavlja rizik za razvoj hiponatremije, kako zbog povećanog izlučivanja natrijuma tako i zbog dilucionog efekta reapsorbovane vode (Packer, 1992).

Endotelin predstavlja snažan vazokonstriktorni peptid koga stvaraju endotelne ćelije. Endotelin ostvaruje vazokonstriktorni efekat na sudovima bubrega, čime se pospešuje zadržavanje natrijuma. Koncentracija endotelina u plazmi ima prognostički značaj i povećava se proporcionalno sa pogoršanjem simptoma i hemodinamske težine srčane insuficijencije. Koncentracija endotelina je takođe u korelaciji sa vrednostima plućnog kapilarnog pritiska, potrebom za hospitalizacijom i smrtnim ishodom kao posledicom komplikacija srčane insuficijencije. S obzirom na vazokonstriktorna svojstva endotelina, nauka je pokazala interesovanje za razvijanje supstanci koje deluju kao antagonisti endotelinskih receptora, čime se postiže kardioprotektivni efekat i prevenira vaskularno i miokardno remodelovanje (Love, 1997).

Metabolički prelazak na glikolizu može imati štetan uticaj na kontraktilnu funkciju ćelija srčanog mišića, znajući da ravnoteža između metabolizma masnih kiselina i oksidacije lipida može podstaći optimalnu sistolnu i dijastolnu funkciju. Smanjena kontraktilna funkcija srca dovodi do aktivacije kompenzatornih mehanizama. Kompenzatorni mehanizmi, kardiološki i ne-kardiološki, kao što su dilatacija ili hipertrofija miokarda, neurohumoralni faktori, citokini i aktivacija endotela,

obezbeđuju adaptaciju koja može progredirati u maladaptivni odgovor, a u krajnjem slučaju vodi do dekompenzacije i srčane insuficijencije. Maladaptacija se ogleda kroz hemodinamske poremećaje, neurohumoralni disbalans, izuzetno veliko oslobađanje citokina i disfunkciju endotelna (Voors et al., 2016). Aktivacija i disfunkcija srčanog endotela praćena je promenama u autokrinim i parakrinim signalnim putevima, u distribuciji i broju receptora, kao i anti-inflamatornim i antikoagulantnim osobinama (Sun et al., 2016) (Slika 1.1).



Slika 1.1 Shematski prikaz međusobno povezanih neurohumoralnih mehanizama aktiviranih u srčanoj insuficijenciji i njihovih (pato) fizioloških dejstava na cirkulaciju (MV-minutni volumen, TA- krvni pritisak, NA-noradrenalin, A-adrenalin, DOP-dopamin, AVP-arginin vazopresin, MMP-matriksne metaloproteinaze, faktor nekroze tumora- α (eng. tumor necrosis factor- α - TNF- α), MK-masne kiseline, CRF-kortikotropin oslobađajući factor) (Ilustracija preuzeta i prevedena iz Capote et al., 2015.)

Trajna simpatička stimulacija aktivira renin-angiotenzin-aldosteronski sistem i druge neurohormone. Stimulacija sistema renin-angiotenzin-aldosterona dovodi do povećanih koncentracija renina, angiotenzina II u plazmi i aldosterona. Angiotenzin II je moćan vazokonstriktor bubrežne (eferentne arteriole) i sistemske cirkulacije, gde stimuliše oslobađanje noradrenalina iz terminala simpatičkih nerva, inhibira vagalni tonus i pospešuje oslobađanje aldosterona. To dovodi do zadržavanja natrijuma i vode i povećanog izlučivanja kalijuma. Pored toga, angiotenzin II ima važne efekte na srčane miocite i može doprineti endotelnoj disfunkciji koja se registruje kod hronične srčane insuficijencije.

1.4.2 Oksidativni stres i endotelna disfunkcija u srčanoj insuficijenciji

Patofiziološki mehanizam srčane insuficijencije obuhvata: endotelnu aktivaciju, disfunkciju i insuficijenciju, uključujući disfunkciju kompletnog vaskularno-endotelnog sistema sa značajnom disfunkcijom endokardnog endotela i endotela miokardnih kapilara; aktivaciju citokina (faktor nekroze tumora- α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6)); neurohumoralni disbalans sa povećanjem nivoa kateholamina, renina, angiotenzina, aldosterona, antidiuretskog hormona, natriuretskih peptida, prostaglandina i dopamine, i konačno hemodinamsku abnormalnost koja uključuje srčanu disfunkciju, prethodno opterećenje (povećanje *preload*-a) i naknadno opterećenje (povećanje *afterload*-a) sa srčanom dilatacijom i remodelovanjem srca uz smanjenje miokardne kontraktilnosti. Insuficijencija srca kao pumpe dovodi do kongestivne srčane insuficijencije i smrti.

Endotelna aktivacija i disfunkcija imaju značajnu ulogu u nastanku i progresiji srčane insuficijencije. Poremećena funkcija vaskularnog endotela doprinosi patogenezi srčane insuficijencije kroz nekoliko mehanizama. Endotel odgovara na moguća oštećenja promenom u fenotipu kao delu fiziološkog adaptivnog odgovora. Ove fenotipske promene uključuju promene u citoskeletu, promene u kaskadnoj signalizaciji, faktorima transkripcije sa rearanžiranjem genske ekspresije. Širok spektar ispitanih fenotipskih promena upućuje na različiti stepen i preklapanje sa statusom endotelne aktivacije, koja može prethoditi manifestnoj endotelnoj disfunkciji (McCormick et al., 2017). Endotelna disfunkcija predstavlja deo patofizioloških poremećaja kada endotelna aktivacija postaje neodgovarajuća ili nedovoljna. U nekim formama srčani endotel nakon aktivacije može ponovo uspostaviti svoju normalnu funkciju dok u drugima postaje i/ili ostaje disfunkcionalan. Endotelna disfunkcija može u ekstremnim slučajevima prethoditi vidljivim strukturnim promenama, kao i endotelnoj nekrozi i denudaciji (Kurvilla i Kurtha, 2003).

Neke studije potvrđuju da je kod eksperimentalne i kliničke srčane insuficijencije smanjena endotel-zavisna vazodilatacija (Treasure et al., 1990; Kubo et al., 1991; Katz et al., 1992; Hirai et al., 1995). Vaskularni endotel je autokrini/parakrini organ u regulaciji vaskularne strukture (Langille i O'Donnell, 1986; Pollman et al., 1999). Naime, u srčanoj insuficijenciji smanjena je i endotel-zavisna vazodilatacija, koja nastaje kao posledica delovanja azot-monoksida (NO). Usled smanjene endotel-zavisne vazodilatacije koronarnih arterija dolazi do smanjene miokardne perfuzije, dok usled smanjene periferne vazodilatacije dolazi do povišenja sistemskog vaskularnog otpora, što sveukupno dovodi do povećanog otpora pražnjenju leve komore i opterećenja volumenom leve komore. Dakle, opterećenje pritiskom i volumenom pogoršavaju simptome SI.

U kliničkoj praksi endotelna disfunkcija se ogleda kroz smanjenu produkciju endotelnog NO i njegovu bioraspoloživost. Smatra se da je endotelna disfunkcija nastupila kada izostane očekivana vazodilatacija posredovana NO endotelnog porekla u odgovoru na acetilholin, bradikinin, supstancu P i/ili serotonin. NO takođe moduliše kontraktilnost srca i potrošnju kiseonika (Djuric et al., 2004).

Iako su sprovedena brojna istraživanja, još uvek nisu u potpunosti rasvetljeni mehanizmi koji dovode do endotelne disfunkcije kod bolesnika sa SI. Osim nedostatka NO, u dijagnozi endotelne disfunkcije treba uzeti u obzir i mnoge druge cirkulatorne faktore, auto/parakrine medijatore koji su povišeni u serumu, kao što su endotelin-1 (Li et al., 1999; Stanimirovic et al., 1994), prostaglandini, noradrenalin (Steinberg et al., 1984; Bachetti et al., 1998) ili angiotenzin II (Skena et al., 1999; Pueyo et al., 1998; Rajagopalan et al., 1996). Sinteza i oslobađanje medijatora inflamacije

(citokini), oksidativnih stresora (superoksidni anjoni), i hipoksija indukuju promene na endotelu koje prevazilaze neuravnoteženost parakrine signalizacije (Brutsaert et al., 1998). Endotel-zavisna vazodilatacija, u čijoj etiologiji leže neurohumoralni ili mehanički faktori (povećan *eng. shear stress*) je smanjena kod pacijenata sa srčanom insuficijencijom, i objašnjava se smanjenom sintezom NO ili povećanom sintezom endotelin-1 i angiotenzina I (Hirai et al., 1995). Na taj način dolazi do redukcije dijametra arteriola čime se smanjuje maksimalna perfuzija skeletnih mišića u toku fizičkog napora (Pollman et al., 1996).

Disfunkcija endotela perifernih krvnih sudova dokazano doprinosi nastanku i razvoju srčane insuficijencije (Maccarthy i Shah, 2000). U obe grupe krvnih sudova, kako provodničkim tako i otporničkim, kao na primer u skeletnim mišićima, endotelnom disfunkcijom se objašnjava raniji zamor i intolerancija na opterećenje u srčanoj insuficijenciji. Endotelom posredovani vazokonstriktorni odgovor sa smanjenjem vazodilatatornog kapaciteta utiče na povećanje perifernog vaskularnog otpora (Drexler et al., 1992; Kaiser et al., 1989). Endotelna disfunkcija perifernih krvnih sudova pokazala je da progresija u srčanoj insuficijenciji nastupa usled snižene aktivnosti endotelne azot-monoksid sintaze (eNOS, *eng. endothelial nitric oxide synthase*) i ciklooksigenaze (COX-1) (Vila-Petrof, 1999; Bayraktutan, 1998). Promene na plućnom vaskularnom endotelu mogu imati štetne posledice zbog same razmene gasova koja se odvija u plućima što u daljem razvoju kardiovaskularnih događaja dovodi do pogoršanja sveukupne regulacije.

Endotelna disfunkcija koronarnih krvnih sudova utiče na nastanak mikrosпазма u koronarnoj cirkulaciji. Kod pacijenata sa srčanom insuficijencijom, uticaj acetilholina ili bradikinina na koronarnu cirkulaciju se ogleda kroz smanjen vazodilatatorni odgovor (Maccarthy i Shah, 2000). Koronarna endotelna disfunkcija doprinosi smanjenju endotelne sinteze NO, što dovodi do koronarne vazokonstrikcije, proliferacije i remodelovanja glatkih mišićnih ćelija, povećanja lipidnih depozita u zidu krvnog suda i moguće koronarne tromboze. Svi ovi procesi dovode do oštećenja koronarnih arterija, utiču na pogoršanje perfuzije miokarda i time podstiču progresiju srčane insuficijencije (Massion et al., 2003).

Oksidativni stres u SI posledica je povećanih nivoa neurohormona u cirkulaciji i hemodinamskog poremećaja, kao i inflamacije i smanjene isporuke kiseonika. S druge strane, poremećena redoks ravnoteža kod pacijenata sa SI može doprineti daljem oštećenju srčane funkcije, bilo oksidativnim oštećenjem vitalnih ćelijskih molekula, bilo uticajem na ćelijsku signalizaciju koja je uključena u preživljavanje i smrt ćelija. Mehanizam oksidativnog stresa u SI ogleda se kroz pojačanu proizvodnju slobodnih radikala i smanjenu antioksidativnu odbranu. Važno je napomenuti da su povećana proizvodnja slobodnih radikala i inflamacija uključeni u apoptozu kardiomiocita i progresiju SI. Kontinuirano oslobađanje slobodnih radikala kao odgovor na angiotenzin II i kateholamine učestvuje u srčanoj hipertrofiji. Dakle, svi ovi procesi koji zavise od slobodnih radikala doprinose nastanku završne faze SI.

Proizvodnja slobodnih radikala od strane ćelija endotela, miocita, fibroblasta, makrofaga i neutrofila može značajno uticati na funkciju endotela (Singh et al., 1995; Mann et al., 1994). Ne treba zanemariti ni proizvodnju slobodnih radikala mitohondrijalnom respiracijom, putevima arahidonske kiseline, dejstvom enzima lipooksigenaze i ciklooksigenaze, ksantin oksidaze, NO sintaze i membranski vezane NAD(P)H-oksidaze.

Ukoliko nema dovoljne količine L-arginina kao supstrata ili tetrahidrobipterina kao esencijalnog kofaktora za sintezu azot-monoksida, NO-sintaza može proizvoditi anjone superoksida ili vodonik peroksida umesto azot-monoksida (Pou et al., 1992; Heinzl et al., 1992).

U prisustvu superoksid anjona ($O_2^{\cdot-}$), azot-monoksid reaguje sa njim i prevodi ga u toksičniji peroksinitrit ($ONOO^{\cdot-}$). Ova reakcija sa jedne strane dovodi do smanjenja količine azot-monoksida neophodnog za vazodilataciju, a sa druge strane do povećanja proizvodnje peroksinitrita koji ispoljava svoje osobine slobodnog radikala kroz citotoksična i inflamatorna dejstva (Beckman et al., 1990). U kontaktu sa protonom, peroksinitrit dobija osobine slične onim koje poseduje hidroksil radikal (OH^{\cdot}) koji je najtoksičniji kiseonični radikal, i kao takav može oštetiti brojne biološke makromolekule (proteine, lipoproteine, DNK, ugljene hidrate i visoko nezasićene masti).

U fiziološkim uslovima, sprečavanje prevođenja azot-monoksida u peroksinitrit se ostvaruje kontinuiranim uklanjanjem superoksid anjona kroz reakciju katalisanu od strane superoksid dizmutaze (SOD). Superoksid dizmutaza prevodi superoksid anjon u vodonik peroksid dok se vodonik peroksid katalitičkom aktivnošću glutathion peroksidaze redukuje u vodu. Sinhronizovanost dejstva ova dva enzima je od izuzetnog značaja, jer u suprotnom može doći do nagomilavanja vodonik peroksida usled povećane aktivnosti superoksid dizmutaze u odnosu na glutathion peroksidazu, odnosno do nagomilavanja superoksid anjona usled smanjene aktivnosti superoksid dizmutaze u odnosu na glutathion peroksidazu. Značaj očuvanog antioksidativnog kapaciteta je od neprocenjivog značaja za očuvanje integriteta endotelne funkcije.

Termin reaktivne vrste (*eng. reactive species*, RS), obuhvata klase supstanci elektrofilnog elektrofilnog karaktera visoke reaktivnosti, tj. oksidacione agense koji posreduju u oksidativnom/nitrozativnom oštećenju biomolekula. Reaktivne vrste mogu biti molekuli, joni i slobodni radikali. U grupu **reaktivnih kiseoničnih vrsta** ubrajaju se slobodni radikali kiseonika (superoksid anjon, $O_2^{\cdot-}$; hidrosil radikal, OH \cdot ; peroksilni radikal, ROO \cdot ; hidrosiperoksilni radikal HOO \cdot), kao i slobodni neradikali (vodonik peroksid, H_2O_2 ; hipohlorasta kiselina, HClO). Iako reaktivne vrste kiseonika predstavljaju najvažnije slobodne radikale koji učestvuju u oštećenju ćelijskih makromolekula i ćelijskom „signalingu“, i druge reaktivne vrste (azota, ugljenika i sumpora) mogu da učestvuju u nastanku i razvoju procesa oksidativnog oštećenja proteina, lipida, nukleinskih kiselina i ostalih makromolekula u ćeliji. U grupu **reaktivnih azotnih vrsta** ubrajaju se slobodni radikali azota (azot (II) oksid, azot-monoksid, NO \cdot ; azot (IV) oksid, NO $_2$ \cdot), kao i slobodni neradikal peroksinitrit, ONOO $^-$. U grupu **slobodnih radikala ugljenika (karbonilne vrste)** ubrajaju se alkil radikal, R \cdot , alkoksil radikal, RO \cdot , peroksil radikal, ROO \cdot . U grupu **slobodnih radikala sumpora** ubrajaju se RS \cdot , tiil radikal, GS \cdot , glutatiil radikal, GSSG $^-$, diglutatiil anjon radikal (Halliwell i Gutteridge, 2015). Superoksid anjon je vrlo reaktivan, ne difunduje daleko od mesta nastanka pošto je slabo rastvorljiv u mastima, ali stvara moćne oksidanse poput vodonik peroksida, hidrosil radikala i peroksinitrita. Vodonik peroksid, za razliku od superoksidnog anjona, lako difunduje kroz ćelijske membrane. Nije pravi slobodan radikal (nema nespareni elektron u poslednjoj orbitali), ali učestvuje u stvaranju drugih slobodnih radikala, poput hidrosilnog radikala i hipohlorne kiseline, u reakciji sa metalima promenljive valence. Najreaktivniji slobodni kiseonični radikal jeste hidrosilni radikal koji nastaje kao proizvod nepotpune redukcije O_2 primanjem tri elektrona. Toksične efekte ostvaruje na mestu stvaranja. Može nastati u Fentonovoj reakciji, a u prisustvu Fe^{2+} , započinje lančanu reakciju u kojoj nastaju lipidni peroksidi i organski radikali. Hidroperoksil radikal predstavlja protonizovanu forma superoksidnog radikala. Peroksil radikal nastaje tokom lipidne peroksidacije, a hipohlorasta kiselina tokom oksidativnog praska u fagocitima. Azot (II) -monoksid, NO, predstavlja slobodni radikal azota koji je u isto vreme neophodan za ćelijske procese (hormon sa vazodilatatornim efektom), ali i toksičan. Nastaje iz L-arginina pod dejstvom azot-monoksid sintaze, a u većim koncentracijama gradi azotne radikale. NO u reakciji sa superoksidnim anjonom gradi peroksinitrit (ONOO $^-$). Peroksinitrit pak, ukoliko veže proton, dobija svojstva slična peroksil radikal, oštećuje DNK, izaziva peroksidaciju lipida, oksidaciju tiol grupa proteina, hidrosilaciju i nitraciju aromatičnih aminokiselina; ima citostatska, citotoksična i inflamatorna dejstva (Halliwell i Gutteridge, 2015; Hayashi et al., 2004). U uslovima povećanog stvaranja NO dolazi do nitrovanja slobodnog tirozina i tirozinskih ostatka proteina i nastaje 3-nitrotirozin koji u molekulu proteina remeti njegovu funkciju. Povećana proizvodnja NO se javlja kod inflamatornih, infektivnih i degenerativnih procesa, što dovodi do povećanja količine nitrozilovanog tirozina (Shigenaga et al., 1997).

Stanje u kome je ravnoteža između prooksidanasa, slobodnih radikala, i ćelijskih antioksidanasa pomešana u pravcu prooksidanasa, sa posledničnim oksidativnim oštećenjem esencijalnih ćelijskih biomolekula naziva se oksidativni stres (Sies, 1991). Odnosno, oksidativni stres predstavlja poremećaj redoks zavisnih signalnih puteva i procesa koje oni kontrolišu (Jones, 2006). U uslovima oksidativnog stresa nastaju različita oštećenja ćelijskih proteina koja mogu dovesti gubitka njihove katalitičke funkcije, modifikacije aminokiseline, nastanka karbonilnih grupa, formiranje S-S mostova, protein-protein unakrsnih veza (agregacija), veće proteolitičke

osetljivosti. Reakcije oksidativnog oštećenja proteina se dešavaju na nivou aminokiselina, a posebno osjetljive na oksidaciju su prolin, histidin, arginin, cistein i metionin. Kao krajnji proizvod najčešće nastaju karbonilne grupe i mada njihova pojava nije apsolutno specifična za oksidativnu modifikaciju proteina, one se najčešće koriste kao markeri oksidativnog oštećenja proteina. Kao markeri oksidativnog oštećenja proteina koriste se i tiol grupe. Tiol grupe su sulfhidrilne grupe (SH) vezane za ugljeni skelet aminokiseline cistein i predstavljaju njenu funkcionalnu grupu. Tiolne grupe učestvuju u formiranju disulfidne veze (-S-S-) koje stabilizuju terciarnu i kvaternarnu strukturu proteina. Delovanjem slobodnih radikala tiol grupe bivaju izložene i postaju podložne oksidaciji. Oksidativnim oštećenjem proteina narušava se njegova konformacija, što utiče na njegovu biološku funkciju. Među ćelijskim makromolekulima, DNK je jedan od glavnih meta slobodnih radikala. Kada hidroksilni radikal ili singlet kiseonik hidroksiliše C-8 poziciju 2'-deoksiguanozina proizvodi se 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), što može poslužiti kao marker oksidativnog oštećenja DNK (Dalle-Donne et al., 2006).

1.4.3 Remodelovanje miokarda

Složeni niz neurohumoralnih i inflamatornih odgovora na oštećenje srca i/ili preopterećenje indukuje remodelovanje komora, karakterisano progresivnom hipertrofijom miocita i intersticijumskom fibrozom, sa pridruženim abnormalnostima u miocelularnom metabolizmu i kontraktilnoj funkciji.

Proces remodelovanja povezan je sa progresivnim gubitkom miocita putem apoptoze i sa kliničkim napredovanjem bolesti. Simptomatska srčana insuficijencija javlja se kada je proces remodelovanja komora napredovao do kasnih faza i može se pripisati kombinaciji kardioloških i nekardioloških faktora koji ograničavaju srčanu rezervu, regionalni protok krvi i periferno iskorišćenje kiseonika (Francis, 2001).

Patofiziologiju srčane insuficijencije karakterišu hemodinamske abnormalnosti koje nastaju zbog neravnoteže unutar autonomnog nervnog sistema (ANS) i neurohumoralnog odgovora. Promene u aktivaciji receptora mogu da dovedu do neravnoteže (ANS) sa povećanom simpatičkom aktivnošću i smanjenom vagalnom aktivnošću, što ima značajan uticaj na srčanu funkciju i strukturu. Neurohumoralne promene deluju kao složeni i kombinovani kompenzacioni mehanizam za podršku i održavanje perfuzije tkiva tokom srčane insuficijencije. Međutim, ovi odgovori ukoliko postanu dekompenzovani mogu i da pospešuju napredovanje srčane insuficijencije.

U patofiziologiji SI učestvuju simpatički nervni sistem, renin-angiotenzin-aldosteron sistem, neurohumoralne alteracije funkcije bubrega (arginin vazopresin i natriuretčki peptidi), neurohumoralne alteracije u perifernoj vaskulaturi: vazokonstriktori (endotelin, neuropeptid Y, urotenzin II, tromboksan A₂), vazodilatatori (azot-monoksid, bradikinin, adrenomedulin, prostaglandini PGI₂ i PGE₂, adipokini), faktori remodelovanja (faktor nekroze tumora, solubilni ST₂, faktor diferencijacije rasta-15, galektin-3), aktivacija interleukina i disfunkcije anabolizma (insulinska rezistencija, rezistencija na faktor rasta, rezistencija na anaboličke steroide) (Kiralı et al., 2017).

U miokardu koji propada, složene metaboličke promene praćene oštećenom redoks regulacijom uključene su u hipertrofiju srca, inflamaciju, fibrozu, angiogenezu i apoptozu. Javljaju se strukturne alteracije (ultrastrukturno remodelovanje, remodelovanje mitohondrija, remodelovanje ekstraćelijskog matriksa, metaboličko remodelovanje), elektrofiziološke alteracije (remodelovanje akcionih potencijala, remodelovanje procesa ekscitacija-kontraktacija, remodelovanje repolarizacije), i alteracije signalnih puteva u kojima učestvuju β -adrenergički receptori (Kiralı et al., 2017).

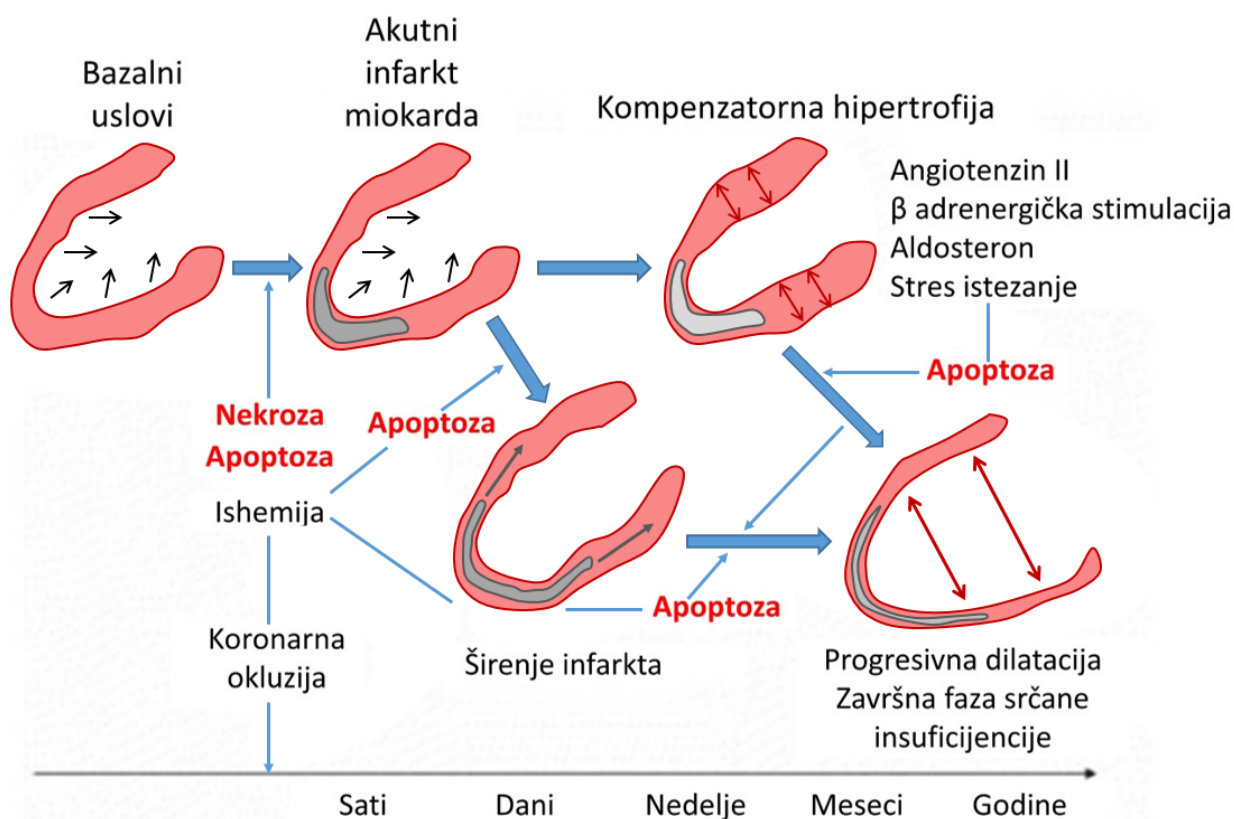
Koncept ventrikularnog remodelovanja su izučavali Janice Pfeffer et al., još 1985. godine, podvezivanjem koronarne arterije miševa i utvrđivanjem uzroka i mehanizama dilatacije leve komore (LK), kao i poremećaja funkcije. Savremeno tumačenje remodelovanja dovodi ovaj pojam

u vezu sa određivanjem promena u fiziologiji kardiomiocita, zapremine i sastava kardiomiocitnih i ne-kardiomiocitnih elemenata, morfoloških promena leve komore u odgovoru na infarkt miokarda, kardiomiopatska i druga oštećenja miokarda. Zapravo, aktiviranjem kompenzatornih mehanizama dolazi do nastanka izmenjenog odgovora kardiomiocita i fibroblasta, čime se pokreću patološka hipertrofija i remodelovanje (Dash et al., 2001).

Remodelovanje miokarda (svi molekularni, ćelijski i intersticijski događaji) striktno je praćeno napredovanjem srčane insuficijencije (Cohn et al., 2000). Nekoliko patofizioloških stimulusa koji vode smanjenju kontraktilnosti i/ili povećanju stresa na zidu uključeno je u remodelovanje, kao što su ishemija/reperfuzija (I/R), infarkt miokarda (IM) (Slika 1.2), preopterećenje pritiskom i volumenom, genetska predispozicija, hipertenzija, plućna arterijska hipertenzija (PAH) i neuroendokrina aktivacija (Cohn et al., 2000; Nian et al., 2004). Sve ove promene nastaju kao rezultat adaptivnih ili maladaptivnih mehanizama (Cohn et al., 2000). Kao adaptivni mehanizam, strukturne promene srca imaju kompenzatorni efekat, održavajući normalnu funkciju srca (Dorn 2007; Opie et al., 2006). S druge strane, remodelovanje miokarda dovodi do progresivne disfunkcije srca nakon dužeg stresa (Hill i Olson, 2008). Glavni ćelijski mehanizmi koji dovode do remodelovanja miokarda uključuju kako kardiomiocite, tako i ne-kardiomiocite (ostale vrste ćelija). Zapravo, tokom remodelovanja, nekroza, nekroptoza, apoptoza ili autofagija utiču na gubitak kardiomiocita, dok fibroza nastaje proliferacijom fibroblasta i promenom ekstracelularnog matriksa. Pored toga, mitohondrijalna disfunkcija kao i metaboličke abnormalnosti takođe su uključeni u progresiju srčanog remodelovanja, smanjujući kontraktilnost (Burchfield et al., 2013). Svi ovi molekularni mehanizmi mogu biti potencijalna meta terapije. U ovom aspektu, odgovarajući dodatak vitamina u ishrani mogao bi potencijalno da pogoduje energetske ravnoteži u srčanoj insuficijenciji (Krim et al., 2013).

Srčana insuficijencija, kao oboljenje koje spada u grupu tzv. oksidativnih oboljenja, nastaje kao posledica neravnoteže između pro-oksidativnih i anti-oksidativnih efekata. Neurohumoralne promene, kao jedan od vodećih aktivatora progresije srčane insuficijencije, mogu imati pro-oksidativne efekte, a pre svega se to odnosi na efekte aktivacije sistema renin-angiotenzin-aldosteron. Povećana proizvodnja reaktivnih vrsta kiseonika (ROS, *eng. reactive oxygen species*) u već insuficijentnom srcu, sa disfunkcionalnim mitohondrijalnim elektron-transportnim lancem (gde CoQ, vitamin B12, folna kiselina, vitamin B1 deluju kao koenzimi) može dovesti do negativnog remodelovanja miokarda (Hilfiker-Kleiner et al., 2006).

Prilagođavanje srca kao odgovor na unutrašnji ili spoljašnji stres uključuje složen proces remodelovanja komore i molekularnih modifikacija miocita. Temeljni odgovor na pojačani biomehanički stres je kardiomiocitna i komorna hipertrofija. Iako ovo može pružiti početnu „spasonosnu“ nadoknadu stresa, dugotrajna hipertrofična stimulacija postaje neprilagođena, pogoršavajući rizik od morbiditeta i mortaliteta zbog kongestivne srčane insuficijencije i iznenadne smrti (Frey i Olson, 2003). Veliki broj istraživanja ističe oksidativni i nitrozativni stres kao važne mehanizme ovih promena (McMurray et al., 1993; Keith et al., 1998; Sawyer et al., 2002; Valgimigli et al., 2004; Giordano, 2005; Murdoch et al., 2006). Oksidativni stres nastaje kada se stvara višak ROS-a kojima se ne mogu adekvatno suprotstaviti unutrašnji antioksidativni sistemi. Superoksidni anjon (O_2^-) može se dalje kombinovati sa NO, formirajući reaktivna jedinjenja poput peroksinitrita, stvarajući nitro-redoks neravnotežu (Hare i Stamler, 2005). Proizvodnja ROS-a je normalna komponenta oksidativne fosforilacije i igra važnu ulogu u normalnoj redoks kontroli fizioloških signalnih puteva (Murdoch et al., 2006; Sawyer et al., 2002; Giordano, 2005). Međutim, prekomerna proizvodnja ROS pokreće ćelijsku disfunkciju, peroksidaciju lipida i mutagenezu DNK i može dovesti do nepovratnog oštećenja i/ili smrti ćelije (Murdoch et al., 2006; Sawyer et al., 2002; Giordano, 2005).



Slika 1.2 Vremenski tok remodelovanja komore i napredovanja do srčane insuficijencije (Ilustracija preuzeta i prevedena iz Abbate et al., 2006.)

1.5 Klinički i terapijski aspekti srčane insuficijencije

Na početku se javljaju umor i nedostatak vazduha, kao karakteristični i nespecifični simptomi srčane insuficijencije. Ovakva simptomatologija se pre svega javlja kod starijih osoba, gojaznih i kod ženske populacije. Znaci kongestije u sistemskim venama su periferni edemi koji često mogu biti odsutni kod dobro lečenih pacijenata, zatim povećan venski pritisak, kao i hepatomegalija. Ukoliko je pacijent lečen blokatorima beta receptora, povišen jugularni venski pritisak i tahikardija ne moraju biti prisutni (Varela-Roman et al., 2005; Canetti et al., 2003). Treći srčani ton nije patognomoničan, ali je često prisutan kod uznapredovale srčane insuficijencije. Ukoliko se uoči i dijagnostikuje više kliničkih znakova srčane insuficijencije, poput pomenog udara srčanog vrha, edema, povišenog venskog pritiska i prisutnog trećeg srčanog tona, klinička dijagnoza SI je najčešće i potvrđena.

Jedan od glavnih uzroka simptoma nedostatka vazduha u SI je povišen pritisak u plućnim kapilarima. Umor je takođe značajan simptom koji se vrlo teško kvantifikuje. Slaba je korelacija perifernih edema sa pritiscima u desnom srcu. U proceni težine stanja i odabiru odgovarajućeg terapijskog pristupa kod ovakvih pacijenata, najveći značaj ima upoređivanje težine simptoma bolesti i stepena SI (Agarwal et al., 2000; Subramanian et al., 2005).

Smanjenje morbiditeta i mortaliteta pacijenata koji boluju od srčane insuficijencije, kao i poboljšanje toka i prognoze bolesti je osnovni cilj svih terapijskih protokola srčane insuficijencije. Kod najvećeg broja pacijenata prisutna je asimptomatska ili oligosimptomatska srčana insuficijencija, pa je stoga prevencija od velikog značaja. Ona podrazumeva sprečavanje nastajanja i

progresije oštećenja miokarda, sprečavanje procesa remodelovanja miokarda, i nastanka simptoma. Takođe, prevencija se ogleda i u smanjenju broja hospitalizacija.

Pravovremena i pravilno odabrana terapija srčane insuficijencije trebalo bi da smanji morbiditet kroz poboljšanje simptoma i znakova bolesti (smanjenje simptoma kongestije, smanjenje simptoma gušenja, povećanje fizičkog kapaciteta). U medikamentoznom tretmanu srčane insuficijencije primenjuju se diuretici, inhibitor konvertujućeg enzima, inhibitor angiotenzina II, blokator beta receptora i antagonist aldosterona (Dickstein et al., 2008).

1.5.1 Klasifikacija srčane insuficijencije

1.5.1.1 Sistolna i dijastolna srčana insuficijencija

Razlikuju se dva glavna tipa srčane insuficijencije: sa smanjenom frakcijom izbacivanja (*eng. heart failure with reduced ejection fraction-HFrEF*), poznat i kao sistolna SI; i sa očuvanom frakcijom izbacivanja (*eng. heart failure with preserved ejection fraction-HFpEF*), poznat i kao dijastolna SI (Taylor et al., 2014). Nedavno je Evropsko kardiološko društvo (*eng. European Society of Cardiology-ESC*) preporučilo opisivanje trećeg tipa: SI sa frakcijom izbacivanja srednjeg dometa (*eng. heart failure with mid-range ejection fraction-HFmrEF*) (Ponikowski et al., 2016).

Smernice ESC preporučuju da se dijagnoza HFpEF zasniva na tipičnim simptomima i znacima SI (preopterećenje zapremine, otežano disanje, netolerancija vežbanja) i frakcija izbacivanja leve komore (*eng. left ventricle ejection fraction-LVEF*) veća od 50%. Specifičniji dijagnostički kriterijumi razvijali su se tokom vremena i uključuju znakove i simptome SI, objektivne dokaze dijastolne disfunkcije (poremećena relaksacija leve komore (LK) ili povećana dijastolna ukočenost, poremećeno punjenje LK, strukturne bolesti srca i povišeni natriuretički peptid tipa B (BNP) ili njegov prekursor N-terminalni pro-BNP (NT proBNP) (Paulus et al., 2007; Vasan et al., 2000; McMurray et al., 2012). Međutim, može se dogoditi da HFpEF oponaša restriktivnu kardiomiopatiju, dinamičku mitralnu regurgitaciju, ishemijsku bolest srca, perikardijalnu bolest i plućnu hipertenziju izazvanu vežbanjem (Oghlakan et al., 2011). Iako je ESC predložio dijagnostičke kriterijume za HFpEF, kriterijumi za upis u HFpEF ispitivanja znatno su varirali tokom poslednje decenije (Pitt et al., 2014; Fu et al., 2016).

Procenjuje se da oko polovine svih pacijenata koji imaju znake i simptome SI imaju HFpEF. U protekloj deceniji povećao se relativni udeo pacijenata sa dijagnozom HFpEF u poređenju sa onima sa HFrEF, što sugeriše sve veći značaj sindroma, ali i sve veću svest o njegovom prisustvu (Metra, 2016; Primessnig et al., 2016).

1.5.1.2 NYHA klasifikacija srčane insuficijencije

Funkcionalna klasifikacija Njujorškog udruženja za srce (NYHA) (Dolgin, 1994) zasniva se na intenzitetu aktivnosti potrebne za izazivanje simptoma kod pacijenta i pruža jednostavan način klasifikovanja stepena srčane insuficijencije. Pacijente svrstava u jednu od četiri kategorije na osnovu toga koliko su ograničeni tokom fizičke aktivnosti; ograničenja/simptomi se odnose na normalno disanje i različit stepen otežanog disanja i/ili angine (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 NYHA klasifikacija srčane insuficijencije

Klasa	Simptomi
Klasa I	bez ograničenja, uobičajeno fizičko opterećenje ne dovodi do zamora, gušenja ili palpitacija
Klasa II	manje ograničenje fizičke aktivnosti, pacijent se oseća dobro u stanju mirovanja, ali uobičajene aktivnosti izazivaju zamor, gušenje ili palpitacije
Klasa III	značajno ograničenje fizičke aktivnosti, pacijent se oseća dobro u stanju mirovanja, ali male uobičajene aktivnosti izazivaju zamor, gušenje ili palpitacije
Klasa IV	i najmanja fizička aktivnost dovodi do tegoba, simptomi srčane insuficijencije su prisutni u mirovanju i pogoršavaju se i pri najmanjem fizičkom naporu

1.5.1.3 Klasifikacija Američkog koledža za kardiologiju/ Američkog udruženja za srce

Američki koledž za kardiologiju (*eng. American College of Cardiology-ACC*) i Američko udruženje za srce (*eng. American Heart Association-AHA*) zajedno su radili na stvaranju još jednog sistema klasifikacije koji dopunjuje pristup NYHA. Razmatra ljude koji još nemaju srčanu insuficijenciju, ali su u velikom riziku da ga razviju. Američki koledž za kardiologiju/ Američko udruženje za srce (ACC/ AHA) opisuje progresiju u razvoju srčane insuficijencije kroz 4 faze (Hunt et al., 2005; Hunt et al., 2009) (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 ACC/AHA klasifikacija srčane insuficijencije

Faza	Nivo progresije srčane insuficijencije
Faza A	Visok rizik od srčane insuficijencije, ali bez strukturnih bolesti srca ili simptoma srčane insuficijencije (pre-srčana insuficijencija)
Faza B	Strukturne bolesti srca, ali bez simptoma srčane insuficijencije (pre-srčana insuficijencija)
Faza C	Strukturne bolesti srca i simptomi srčane insuficijencije
Faza D	Refraktorna srčana insuficijencija koja zahteva specijalizovane intervencije

1.6 Značaj vitamina B grupe i deficita kod ljudi

U poslednje vreme se mnogo pažnje posvećuje vitaminima B grupe i njihovom uticaju na kardiovaskularni sistem, zbog mogućih terapijskih efekata vitamina B grupe.

Vitamini B čine grupu od osam vitamina rastvorljivih u vodi (B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9 i B12) koji deluju kao kofaktori i supstrati za brojne biološke procese.

B1 (tiamin) je kofaktor za enzime u metabolizmu glukoze, katabolizmu aminokiselina, sintezi nukleotida i sintezi masnih kiselina (Kerns i Gutierrez, 2017).

B2 (riboflavin) je prekursor za flavin mononukleotid (FMN) i flavin adenin dinukleotid (FAD) koji učestvuju u ćelijskom disanju (Institute of Medicine, 1999).

B3 (niacin) je prekursor za nikotinamid adenin dinukleotid (NAD) koji učestvuje u biosintetskim putevima, energetsom metabolizmu i zaštiti od reaktivnih vrsta kiseonika (Sauve, 2008).

B5 (pantotenska kiselina) je prekursor za koenzim A (CoA), koji je neophodan za aktivnost mnogih enzima (Plesofsky-Vig i Brambl, 1988).

B6 (piridoksin) je kofaktor za preko 150 enzima koji su uglavnom uključeni u sintezu i razgradnju aminokiselina (Ueland et al., 2015).

B7 (biotin) igra bitnu ulogu u reakcijama karboksilacije (McMahon, 2002).

B9 (folat) je supstrat za sintezu nukleotida i metil-donore u metaboličkom putu sa jednim ugljenikom (Institute of Medicine, 1999).

B12 (kobalamin) je kofaktor za enzime u metaboličkom putu sa jednim ugljenikom i kataboličkom putu propionata (Institute of Medicine, 1999).

Nedostatak vitamina B1 povećava rizik od nastanka srčane insuficijencije (DiNicolantonio et al., 2013; Frank, 2015), dok nedostatak vitamin B2, B6, B9 i B12 dovodi do povećanja koncentracije homocisteina u plazmi i povećava rizik od nastanka kardiovaskularnih bolesti (Porter et al., 2016).

Vitamin B3, u obliku nikotinske kiseline, daje se pacijentima za lečenje dislipidemija, kao glavng faktora rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti, kao što su bolest koronarnih arterija, srčani udar i moždani udar. *Cochrane*-ov pregled 23 randomizirane, kontrolisane studije o suplemenatima nikotinske kiseline u prevenciji kardiovaskularnih bolesti, otkriva da suplementi nisu smanjili ukupnu smrtnost, smrtnost od kardiovaskularnih bolesti, srčanog i moždanog udara (Schandelmaier et al., 2017).

Vitamin B5 može imati antioksidativni efekat smanjući inflamatorni proces niskog stepena, koji je prisutan u ranim fazama srčanih bolesti (Jung et al., 2017).

1.6.1 Efekti deficita vitamina B grupe kod eksperimentalnih životinja

Nedostatak vitamina B1 može se lako izazvati i proizvodi anoreksiju, gubitak težine (Tagliaferro i Levitski, 1982) i koprofagiju (Fajardo i Hornicke, 1989). Pacovi kojima nedostaje tiamin izbegavaju da jedu saharozu (Yudkin, 1979). Posle 7 dana nedostatka dolazi do smanjenja broja leukocita i eritrocita i pada hemoglobina. Posle 30 dana ovo se menja i povećavaju se retikulociti i eritropoetin u plazmi, ali 2,3-difosfoglicerat eritocita, holesterol u membrani i fosfolipidi se smanjuju (Hobara i Yasuhara, 1981). Posle 4 nedelje dolazi do smanjenja tiamina jetre i povećanja aminokiselina razgranatog lanca (Shigematsu et al., 1989). Nedostatak tokom trudnoće rezultirao je intrauterinom retardacijom rasta (Roecklein et al., 1985) i smanjenom aktivnošću tiamin-zavisnih enzima (Fournier i Butterworth, 1990) i gangliozida u mozgu novorođenih pacova (Vaswani, 1985).

Klasični znaci nedostatka vitamina B2 su dermatitis, alopecija, slabost i smanjen rast. Mogu se javiti vaskularizacija i ulceracija rožnjače, stvaranje katarakte, anemija i degeneracija mijelina (Horwitt, 1954). Pacovi sa nedostatkom riboflavina mogu imati masnu jetru, abnormalne mitohondrije hepatocita i metaboličke abnormalnosti hepatocita (Garthoff et al., 1973).

Reproduktivne performanse su smanjene i kod mužjaka i kod ženki. Potomci mogu imati urođene anomalije.

Nedostatak vitamina B3 uzrokuje smanjenu brzinu rasta, grubu dlaku, alopeciju i smanjene koncentracije NAD i NADP u tkivima. Koncentracije mijelina u moždanom tkivu smanjene su kao rezultat smanjene sinteze cerebrozida (Nakashima i Suzue, 1982, 1984).

Nedostatak vitamina B5 izaziva akromotrihiju, ekfolijativni dermatitis, oralnu hiperkeratozu, nekrozu i ulceracije gastrointestinalnog trakta. Može se javiti žarišna ili generalizovana hemoragična nekroza nadbubrežnih žlezda, a smrt rezultira nakon 4 do 6 nedelja nedostatka (Ralli i Dumm, 1953). Deficitarni pacovi su imali oštećenu sintezu antitela. Obnova sinteze antitela postignuta je parenteralnom primenom kalcijum-pantotenata (Lederer et al., 1975).

Pacovi na dijetama kojima nedostaje vitamina B6 razvijaju dermatitis (najizraženije promene su na repu, šapama, licu i ušima, mikrocitnu anemiju, hiperekscitabilnost i konvulzije (Sherman, 1954). Amplituda odgovora na akustičke i taktilne stimuluse je snižena pod uticajem nedostatka vitamina B6 (Schaeffer, 1987), kao i razlike u uglu i širini hoda zadnjih nogu (Schaeffer i Kretsch, 1987; Schaeffer et al., 1990). Imali su deficite u učenju aktivnog i pasivnog izbegavanja (Stewart et al., 1975). Piramidalne ćelije moždane kore pacova hranjenih ishranom deficitarnom u vitaminu B6 tokom 2 ili 3 meseca pokazale su delimični do gotovo potpuni gubitak dendrita i otok aksona u hipokampusu (Root i Longenecker, 1983). Smanjene koncentracije vitamina B6, dopamina, D-2 dopaminskih receptora, dekarboksilaze glutaminske kiseline u mozgu, gama amino-buterne kiseline (GABA) i transaminaze gama-amino-buterne kiseline izmerene su pacovima kojima nedostaje vitamin B6 (Driksell i Chuang, 1974; Aycock i Kirksey, 1976; Rajeswari i Radha, 1984; Guilarte, 1989). Sadržaj cerebrozida, gangliozida, masnih kiselina (18: 2, 20: 1, 20: 4, 22: 6 i 24: 0) i n-6 masnih kiselina (18: 2, 20: 4 i 22: 4) su sniženi u mozgu kao rezultat nedostatka vitamina B6 (Thomas i Kirksey, 1976).

U nedostatku, reproduktivne performanse i ženki i mužjaka su smanjene. Može doći do smanjene proizvodnje insulina (Huber et al., 1964). Osmonedeljni nedostatak rezultirao je smanjenjem alanin aminotransferaze i aspartat aminotransferaza, a sposobnost upotrebe alanina za glukoneogenezu bila je smanjena (Angel, 1980). Ukupne aktivnosti i aspartat aminotransferaze i alanin aminotransferaze su smanjene (Ludwig i Kaplowitz, 1980). Nedostatak piridoksina smanjio je crevni unos glukoze, glicina, alanina i leucina, kao i aktivnosti laktaze, alkalne fosfataze, leucin aminopeptidaze i sinteze membrane (Mahmood et al., 1985). Kod pacova koji su hranjeni visoko proteinskom hranom sa nedostatkom vitamina B6, izlučivanje uree, slobodnog amonijaka i slobodnih aminokiselina iz urina je promenjeno (Okada i Suzuki, 1974). Ženke pacova hranjene ishranom deficitarnom u vitaminu B6 izlučivale su manje taurina od kontrolne grupe (Levis et al., 1982; Lombardini, 1986). Pacovi sa nedostatkom vitamina B6 imali su niži homocistein u plazmi (Smolin i Benevenga, 1984). Kreatin u skeletnim mišićima i jetri bio je viši, a izlučivanje kreatinina niže (Loo et al., 1986). Nedostatak vitamina B6 proizveo je smanjenje aktivnosti glukozo-6-fosfat dehidrogenaze u periosteumu i kalusu u razvoju (Dodds et al., 1986) i smanjenje formiranja unakrsnih veza kolagena (Fujii et al., 1979). Primećene su promene u oksidaciji masnih kiselina i ugradnji masnih kiselina u trigliceride, fosfolipide i frakcije holesterola (Dussault i Lepage, 1979).

Nedostatak vitamina B7 uzrokuje kod pacova progresivni ekfolijativni dermatitis, akromotrihiju (kod crnih pacova) i opštu alopeciju. Sa ozbiljnim nedostatkom, mnoge životinje razvijaju spastičan hod ili zauzimaju stav poput kengura. Imuni odgovori su sniženi kod pacova kojima nedostaje biotin (Rabin, 1983).

Indukcija nedostatka vitamina B9 zahteva duži period hranjenja, obično hranom na bazi aminokiselina i/ili antibiotikom za inhibiciju crevnih bakterija (Clifford et al., 1989; Ward i Nixon, 1990). Uočena je smanjena stopa rasta, leukopenija, anemija.

Indukcija izolovanog nedostatka vitamina B12 kod pacova, kao i kod drugih eksperimentalnih životinja, postiže se sa poteškoćama i uglavnom ne reprodukuje znakove nedostatka humanog vitamina B12 – megaloblastne krvne ćelije i neurološke lezije. Nedostatak se može izazvati kod pacova koji se hrane biljnim, a ne životinjskim proteinima (koji sadrže vitamin B12). Ženke pacova su se hranile ishranom koja je sadržala sojine proteine dopunjene metioninom i

holinom, ali ne i vitaminom B12, rasle su normalno ili sa malo smanjenom brzinom i uzgajale se i legle normalno. Prosečna težina njihovog potomstva je smanjena, a 10 % legla bilo je hidrocefalno. Ukidanje holina iz ishrane povećalo je učestalost urođenih anomalija kod novorođenčadi. Dodatak 50 µg vitamina B12/kg podržao je normalan rast majki i sprečio razvoj hidrocefalnih potomaka (Woodard i Newberne, 1966).

1.7 Vitamin B6

Vitamin B6 je hemijsko jedinjenje rastvorljivo u vodi. Prirodno se javlja u šest različitih oblika: piridoksin, piridoksin 5'-fosfat, piridoksal, piridoksal 5'-fosfat, piridoksamin, i piridoksamin 5'-fosfat. Najvažniji biološki aktivan oblik vitamina B6 je piridoksal 5'-fosfat, koji deluje kao koenzim u preko 140 biohemijskih reakcija, uključujući karboksilaciju, transaminaciju, cepanje aldola, deaminaciju i racemizaciju (Hellmann, 2010). Zbog toga je vitamin B6 uključen u različite biološke procese, poput metabolizma aminokiselina i homocisteina, metabolizma glukoze i lipida, sinteze DNK/RNK i modulacije ekspresije gena (Spinneker et al., 2007). Utiče na sintezu neurotransmitera, pretvarajući levodopu u dopamin i olakšavajući konverziju glutamata u GABA (McCarty, 2000). Takođe utiče na funkciju imunih ćelija i procese stvaranja krvnih elemenata (Bessler i Djaldetti, 2016; Lamers et al., 2009). Vitamin B6 se apsorbira u jejunumu, a u aktivnoj formi se metaboliše u jetri. Višak vitamina B6 eliminiše se putem bubrega (poluživot eliminacije iznosi 15-20 dana) (Brown, 2018). Nedostatak vitamina B6 uzrokuje dermatitis i glositis (Hawkins, 1955), narušava funkciju nervnog sistema (depresija, konfuzija, neuropatija) (Tong, 2014) i imunitet (Kirksey et al., 1990), i pospešuje razvoj i napredovanje karcinoma (Qian et al., 2017). Smanjeni nivoi vitamina B6 u telu nalaze se u brojnim patološkim stanjima, kao što su hronična zavisnost od alkohola, gojaznost, zapaljenske bolesti creva, hronična bubrežna insuficijencija i reumatoidni artritis (Wu i Lu, 2012; Schumacher et al., 1975; Ligaarden i Farup, 2011). Nedostatak vitamina B6 najčešće se javlja kada su i ostali vitamini B grupe u nedostatku, naročito vitamin B12 i folna kiselina.

Značajni izvori vitamina B6 su kvasac, ljuska pirinča, zrno žitarica i soje. Međutim, za ishranu čoveka od značaja su sledeće namirnice: meso, iznutrice, riblja ikra, mleko, jaja, pirinač, proizvodi celog zrna žitarica (posebno raži i kukuruza), mahunarke, banane i orasi.

Preporučeni dnevni unos (*eng. Recommended Dietary Allowance-RDA*) za muškarce uzrasta od 14 do 50 godina je 1.3 mg, i preko 50 godina je 1.7 mg. Dok je za žene uzrasta od 14 do 18 godina 1.2 mg, od 19 do 50 godina 1.3 mg, i preko 50 godina 1.5 mg. Za trudnoću i dojenje količina se povećava na 1.9 mg, odnosno 2.0 mg (Institute of Medicine, 1999).

Opseg normalnih vrednosti vitamina B6 u krvi se kreće 5-50 mcg/L kod ljudi.

Vitamin B6 u svom aktivnom obliku, piridoksal 5'-fosfat (PLP), kao kofaktor širokog spektra enzima koji su neophodni za metabolizam aminokiselina, lipida i ugljenih hidrata (Shane et al., 2000), ima i važnu ulogu kofaktora u mnogim inflamatornim putevima (Ueland et al., 2017). On ima značajnu ulogu u: funkcionisanju nervnog sistema (omogućava sintezu neurotransmitera serotonina, dopamina, GABA- γ -aminobuterne kiseline i norepinefrina), sintezi hema, potrebnog za sintezu hemoglobina, biosintezi niacina, smanjuje delovanje steroidnih hormona (estrogena i testosterona), sintezi nukleinskih kiselina i omogućava imunom sistemu da sintetiše antitela. Vitamin B6 služi kao kofaktor dva glavna enzima u transulfuracionom metaboličkom putu homocisteina, cistationin β -sintaze i cistationin γ -lijaze (Kraus et al., 2009; Miles et al., 2004). Ovaj put je važan za sintezu H₂S i cisteina koji je ključna aminokiselina za funkciju tripeptida glutaciona (GSH) (Stipanuk et al., 2011). GSH je važna unutarćelijska antioksidativna zaštita koja formira reaktivne vrste kiseonika, a takođe učestvuje u regulaciji inflamatornog odgovora posredovanjem u sintezi citokina i aktivaciji faktora transkripcije poput nuklearnog faktora-kappa B i faktora-1a inducirano hipoksijom (HIF-1a) (Haddad et al., 2005). Vitamin B6 je hidrosolubilni kofaktor, koji pokazuje antioksidativna i anti-inflamatorna svojstva (Stocker et al. 2003; Chen i Ksiong, 2005; Matxain et al., 2006; Friso et al., 2004). Ranije studije su potvrdile da vitamin B6 pokazuje efekte

antioksidansa u sličnoj meri, kao i vitamini C i E (Bilski et al., 2000). Blagotvorno deluje na kardiovaskularni sistem smanjujući upalu i stepen oksidativnog stresa (Martinez et al., 2000). Utvrđeno je da vitamin B6 deluje i anti-ishemijski, blokiranjem purinergičkih receptora (Dhalla et al., 2013). Mahfouz i Kummerow (2004) pokazali su da je primena vitamina B6 i vitamina C postigla antioksidativne efekte kod pacova sa eksperimentalno razvijenom hiperhomocisteinemijom i održavanjem sposobnosti njihovih aorti da proizvode prostaciklin normalnom brzinom. Sa druge strane, jedna od studija je pokazala da se povećan nivo vitamina B6 dovodi u vezu sa nižim vrednostima C-reaktivnog proteina i 8-hidroksi-2'-deoksiguanozina, što je u korelaciji sa povećanim rizikom od nastanka kardiovaskularnih oboljenja (Shen et al., 2010).

Nedostatak vitamina B6 povećava peroksidaciju lipida i smanjuje antioksidativnu zaštitu, pa se stoga može povezati sa aterogenezom (Matxain et al., 2009; Keles et al., 2010). Nizak nivo vitamina B6 može biti faktor rizika za nastanak koronarne bolesti zbog povećanja nivoa homocisteina (Friso et al., 2004; Martinez et al., 2000). Nedostatak jednog ili više vitamina B grupe može doprineti disfunkciji miokarda, pre svega iscrpljivanjem adenzin trifosfata (ATP) iz kardiomiocita, što izaziva slabljenje srčanog mišića (Neubauer et al., 1997). Nedostatak vitamina B6 je zaista redak u razvijenim zemljama, međutim niski nivoi vitamina B6 otkriveni su kod pacijenata sa alkoholizmom (Ulvik et al., 2010), dijabetesom (da Silva et al., 2012), kod žena koje su koristile oralne kontraceptive (Spinneker et al., 2007) i kod pušača (Ulvik et al., 2010).

1.8 Folna kiselina (vitamin B9)

Vitamin B9 (međunarodna nomenklatura: folna kiselina, pteroilglutaminska kiselina; zastareli nazivi: folacin, vitamin B10) je esencijalni mikronutrijent koji se prirodno i najčešće nalazi u lisnatom zelenom povrću. „Folat“ je generički termin za članove porodice vitamina B9, koji igraju presudnu ulogu u ključnim biosintetskim procesima u ćelijama sisara. Matična struktura je folna kiselina, farmakološko sredstvo koje se ne nalazi u prirodi. Zbog svoje stabilnosti, folna kiselina se koristi kao izvor folata. Usled hidrofилne prirode naelektrisanog molekula folata, postoji minimalna pasivna difuzija kroz ćelijske membrane. Stoga, folat i njegovi derivati zavise od visoko specifičnih transportera za njegovu apsorpciju u crevnom traktu i drugim sistemskim tkivima (Zhao et al., 2009).

Folna kiselina je rastvorljiva u vodi. Molekul folata se sastoji od pteridinskog dela sa A i B prstenovima. Redukuje se na B prstenu prvo na dihidrofolat (DHF), a zatim na tetrahidrofolat (THF), koji predstavlja aktivan oblik folne kiseline u kome ona kao koenzim učestvuje u biološki aktivnim procesima. Biljke i bakterije su sposobne za sintezu folata. Međutim, ljudi i životinje nisu sposobni da sintetišu folnu kiselinu. Kod čoveka crevne bakterije sintetišu folnu kiselinu. Vitamin B9 je potreban za sintezu purinskih nukleotida i timidilata i, prema tome, neophodan za *de novo* proizvodnju RNK i DNK. Folati su takođe potrebni za sintezu metionina zavisnu od vitamina B12, iz koje se formira S-adenozilmetionin, potreban za metilaciju DNK, histona, lipida i neurotransmitera (Stokstad, 1990). Ćelije sisara, za razliku od bakterija, nemaju metaboličku mašineriju za sintezu folata. Dakle, potrebe za folnom kiselinom moraju biti u potpunosti zadovoljene iz prehrambenih izvora. Tradicionalno, folati se dobijaju iz namirnica poput jetre i tamnozelenog lisnatog povrća. Od nedavno komercijalno obogaćivanje žitarica, žitarica i hleba folnom kiselinom sada predstavlja važan izvor folata. To je rezultiralo porastom nivoa folata u tkivima i krvi (Jacques et al., 1999). Preporučeni dnevni unos (*eng. Recommended Dietary Allowance-RDA*) za muškarce i žene starije od 19 godina treba da bude 400 mcg. Trudnice i dojilje zahtevaju 600 mcg, odnosno 500 mcg.

Kod odraslih, normalna vrednost ukupnih folata u organizmu je između 10 i 30 mg, sa opsegom u krvi većim od 7 nmol/L (3 ng/ml).

Folna kiselina aktivno učestvuje u procesima regulisanja sinteze krvnih ćelija, kao i u regulisanju nekih vrsta anemije. Pozitivno utiče na rad želuca i jetre, kao i na rad imunog sistema.

Posebno značajnu ulogu folna kiselina ima tokom trudnoće, jer utiče na formiranje nervnih ćelija embriona.

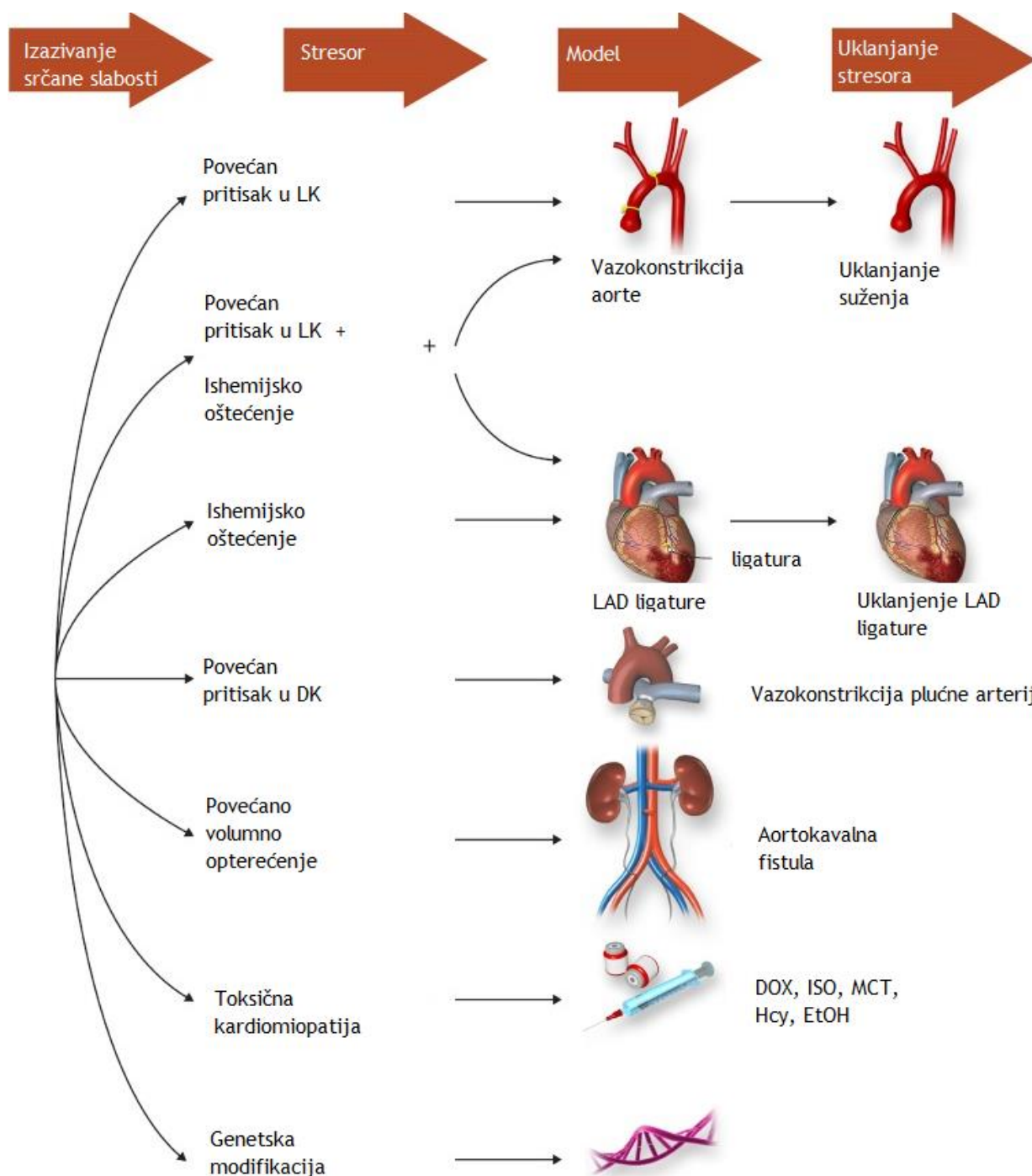
Vitamin B9-folna kiselina (FA) je neophodan za sintezu NO (Verhaar, 1998) i zbog toga je neophodan za pravilno funkcionisanje endotela (Chambers, 2000). Različita istraživanja pokazala su da primena folne kiseline smanjuje nivo homocisteina u plazmi (Joseph i Loscalzo, 2013). Direktna, intrakoronarna aplikacija folne kiseline (30 mg) dovodi do koronarne vazodilatacije i do blagog sniženja arterijskog krvnog pritiska kod obolelih od koronarne bolesti. Takođe kroz ovu studiju je pokazan nezavisan uticaj folne kiseline na vaskularnu funkciju u odnosu na efekte sniženja homocisteina (Tawakol et al., 2005). Moens et al. (2008) primetili su da primena folata smanjuje ishemijsku miokardnu ishemiju i postreperfuziona oštećenja kod pacova. U istraživanju izolovanog srca pacova, ustanovljeno je da perfuzija srca folnom kiselinom značajno povećava protok kroz koronarne arterije i smanjuje stvaranje superoksidnog anjona, ali dovodi do povećanja indeksa peroksidacije lipida (Djuric et al., 2007). Sa druge strane, folna kiselina primenjena subhronično (5 mg/kg i 10 mg/kg) pokazala je anti-epileptogeno dejstvo na DL-homocistein tiolaktonom indukovanoj epilepsiji (Markovic et al., 2011). Istraživanje u Japanu iz 2010. godine pokazalo je da je unos folne kiseline u obrnutom odnosu s rizikom za kardiovaskularne bolesti, uključujući SI, takođe (Cui et al., 2010). Otkriveno je da suplementacija koja kombinuje folnu kiselinu i vitamine B6 i B12 tokom pet godina ne smanjuje rizik od pojave kardiovaskularnih događaja kod visoko rizične populacije sa vaskularnim bolestima (Cui et al., 2010). Suprotno tome, velika randomizirana studija, HOPE-2, u kojoj su se primenjivali vitamini B grupe (B6, folat-B9 i B12) kod pacijenata sa vaskularnom bolešću nije pokazala protektivan uticaj ovih vitamina na smrtnost od SI (Lonn E et al., 2016).

Pokazano je da pacijenti sa SI imaju neadekvatan unos folata (Roger et al., 2004). Pojedini autori navode da folati pozitivno utiču na endotelnu funkciju, i to nezavisno od efekata folata na snižavanje homocisteinemije (Moens et al., 2007; Shirodaria et al., 2007). Primena folata smanjuje miokardnu ishemijsku povredu i post-reperfuzijske povrede kod pacova (Moens et al., 2008). Neadekvatan unos folne kiseline, vitamina B6 i B12 dovodi do povećanja vrednosti homocisteina u plazmi. Hiperhomocisteinemija je nezavisan faktor rizika za aterosklerozu, vensku trombozu i koronarnu bolest, kao i za srčanu insuficijenciju.

Nedostatak folne kiseline je povezan sa mnogim poremećajima. Tu se ubrajaju megaloblastna anemija, vaskularne bolesti i tromboza, neurološki poremećaji. Nedostaci vitamina B9 i B12 povezani su sa lošim ishodima trudnoće, kao što su mala porođajna težina, prevremeni porođaj i *abruptio placenta* (Molloy et al., 2008). Pokazana je i korelacija između niskog nivoa folata ili B12 i rizika od oštećenja „nervne cevi“ (NTD) (Smithells et al., 1976), a perikonceptualni dodaci vitamina koji sadrže folnu kiselinu (FA) značajno smanjuju NTD (Smithells et al., 1980; Laurence et al., 1981; Czeizel i Dudas, 1992). Nedostatak folne kiseline može se javiti u bilo kojoj starosnoj grupi, iako iz mnogo različitih razloga. Promene koje mogu rezultirati nedostatkom folata mogu se javiti na nivou i apsorpcije i metabolizma.

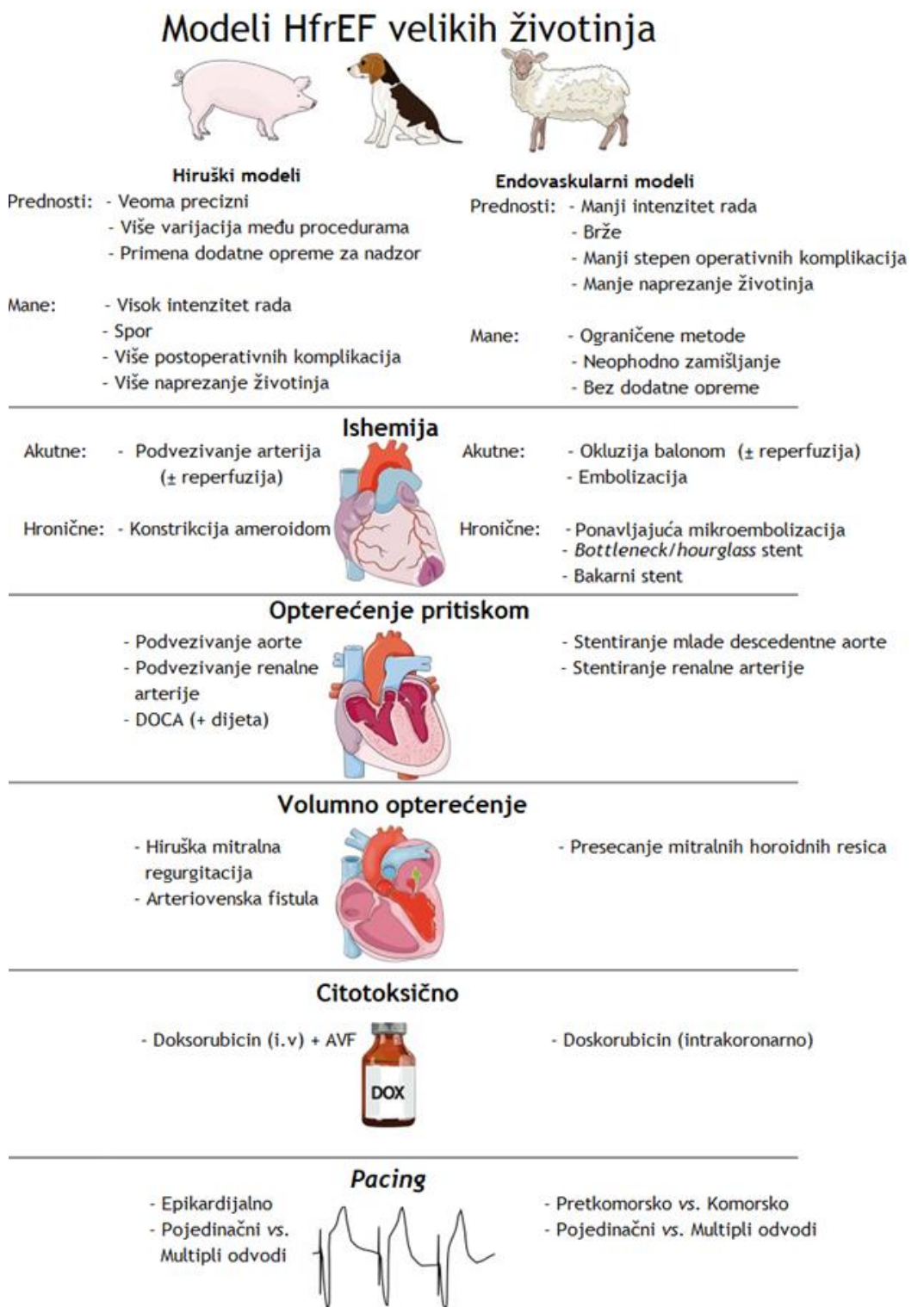
1.9 Eksperimentalni animalni modeli srčane insuficijencije

Animalni modeli mogu u potpunosti oponašati određeno stanje čoveka. Animalni modeli srčane insuficijencije imaju brojne prednosti u proučavanju ovog složenog oboljenja. Možemo ih podeliti na modele malih i velikih eksperimentalnih životinja. Modeli malih eksperimentalnih životinja (miševi, pacovi i zamorčići) nam pomažu u razumevanju složenih mehanizama nastanka i progresije SI, kao i u razvoju novih pristupa u lečenju. Oni su relativno jeftini i zbog kratkih perioda gestacije može se proizvesti veliki broj uzorka u relativno kratkom vremenskom periodu. Ovi modeli obično koriste genetske modifikacije, farmako-toksikološki i hirurški pristup, koji se takođe mogu kombinovati (Riehle i Bauersachs, 2019). Stoga se npr. modeli pacova intenzivno koriste za proučavanje dugoročnih farmakoloških intervencija, uključujući studije dugoročnog preživljavanja (Pfeffer et al., 1979; Sakai et al., 1996). Na Slici 1.3 prikazani su različiti modeli srčane insuficijencije razvijeni kod malih eksperimentalnih životinja.



Slika 1.3 Shematski prikaz različitih stresora u modelovanju srčane insuficijencije sa smanjenom ejectionom frakcijom (HFrEF) kod malih eksperimentalnih životinja. Ovi modeli mogu proizvesti i SI sa očuvanom ejectionom frakcijom (HFpEF), koja prethodi kasnijoj HFrEF. DOX, doksorubicin; EtOH, etanol; Hcy, homocistein; I/R, ishemijska/reperfuzijska; ISO, izoproterenol; LAD, leva anteriorna descendenta arterija; LV, leva komora; MCT, monokrotalin; RV, desna komora (Ilustracija preuzeta i prevedena iz Riehle i Bauersachs, 2019.)

U poređenju sa modelima malih eksperimentalnih životinja, veliki životinjski modeli su radno zahtevniji, skuplji i zahtevaju veće i više specijalizovane objekte. Na Slici 1.4 su grafički prikazani različiti modeli SI kod velikih eksperimentalnih životinja.



Slika 1.4 Grafički prikaz hirurških i endovaskularnih modela SI sa redukovanom ejectionom frakcijom (HfrEF) kod velikih eksperimentalnih životinja (Ilustracija preuzeta i prevedena iz Spannauer et al., 2019.)

Postoji vrlo malo transgenih modela velikih eksperimentalnih životinja, i nove je teško uspostaviti. Međutim, ovi modeli imaju i nekoliko značajnih prednosti što opravdava njihovo korišćenje u proučavanju etiopatogeneze i terapije srčane insuficijencije (Riehle i Bauersachs, 2019). Naime, postoji nekoliko ograničenja u upotrebi modela pacova, kao jednog od modela malih eksperimentalnih životinja, u pogledu razlika u funkciji miokarda u poređenju sa ljudskim srcem. Miokard pacova pokazuje razlike u akcionom potencijalu, u smislu trajanja akcionog potencijala (Bers, 1991), uklanjanjem Ca^{+2} iz citosola dominira aktivnost Ca^{+2} pumpe sarkoplazmatskog retikuluma, dok je aktivnost $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ -izmenjivača manje značajna (Bers, 1991; Pieske et al., 1997), srčana frekvencija u mirovanju je pet puta veća kod pacova (Bers, 1991). Takođe, stepen bazalnog metabolizma i korišćenje kiseonika se razlikuju u pacova i miševa, u odnosu na čoveka (Spannbauer et al., 2019). Pored toga, animalni modeli se često razvijaju na definisanoj genetskoj osnovi koja ne odražava raznolikost ljudske populacije, što može rezultirati različitim fenotipovima iz istog monogenog poremećaja. Uprkos ovim ograničenjima, pravilno kreirani životinjski modeli mogu umnogome da pruže razumevanju patofizioloških mehanizama i unapređenju terapijskih protokola.

U pogledu zahvaćenosti dela srca, postoji leva i desna srčana insuficijencija. Kod leve srčane insuficijencije podela je izvršena na sistolnu i dijastolnu srčanu insuficijenciju. Razvijena je velika većina životinjskih modela za sistolnu srčanu insuficijenciju odnosno SI sa smanjenom ejakcionom frakcijom. Osim što je prilično teško replikovati čistu dijastolnu srčanu insuficijenciju (odnosno SI sa očuvanom ejakcionom frakcijom) u životinjskim modelima, ovo su takođe modeli koji su vrlo zahtevni i vremenski se dugo razvijaju. Stoga ne iznenađuje činjenica da većina do sada razvijenih modela SI predstavlja model sistolne srčane insuficijencije (Gomes et al., 2013). Insuficijencija desnog srca može biti krajnji uzrok smrti kod pacijenata sa akutnom ili hroničnom plućnom arterijskom hipertenzijom (PAH). Kako PAH često nastaje sekundarno u odnosu na druge kardiovaskularne bolesti, cilj lečenja je terapija bolesti koja je u osnovi nastanka PAH. Međutim, znamo da je insuficijencija desnog srca nezavisan faktor rizika, te stoga terapija koja vodi poboljšanju funkcije desnog srca može poboljšati morbiditet i mortalitet pacijenata sa plućnom hipertenzijom. Postoji nekoliko eksperimentalnih modela desne srčane insuficijencije (Andersen et al., 2020):

1. Modeli akutne desnostrane srčane insuficijencije
 - a. Plućna embolija:
 - I farmakološka vazokonstrikciona koagulacija
 - II spoljašni arteficialni koagulum
 - III spoljašnji autologi koagulum
 - IV duboka venska tromboza
 - b. Okluzija plućne arterije:
 - I podvezivanje plućne arterije
 - II balon plućne arterije
2. Modeli izazvani povećanim pritiskom
 - a. Okluzija plućne arterije
 - b. Plućna hipertenzija:
 - I monokrotalin
 - II monokrotalin + hipoksija
 - III monokrotalin + pneumonektomija
 - IV hronična hipoksija
 - V sugen + hipoksija
 - VI hronična tromboembolijska hipertenzija

3. Modeli kombinovanog opterećenja volumenom i pritiskom:
 - a. Opterećenje volumenom + plućna hipertenzija:
 - I monokrotalin + šant
 - II hronično arterio-vensko šantovanje
 - III fetalni aorto-pulmonalni šant
 - b. Opterećenje volumenom + ligatura plućne arterije:
 - I šant + ligature plućne arterije
 - II plućna regurgitacija + ligature plućne arterije

Hronična izloženost hipoksiji i primena monokrotalina koji uzrokuje oštećenje plućnih endotelnih ćelija (Kay et al., 1967) su dva glavna modela za istraživanje PAH i posledične srčane insuficijencije, razvijena u proteklim decenijama (Stenmark et al., 2009). Monokrotalin je biljni toksin, jedanaestočlani ciklični pirolizidinski alkaloid, izveden iz semena biljke *Crotalaria spectabilis*, koji se može primeniti intraperitonealnom, subkutanom ili intravenskom aplikacijom da bi se indukovala disfunkcija desne komore i SI u periodu od 4–6 nedelja (Buermans et al., 2005; Usui et al., 2006). Alkaloid monokrotalin prevodi se u reaktivni pirol metabolit dehidromonokrotalin u jetri, u reakciji koju katalizuje citohrom P450 (Gomez-Arroyo et al., 2012). On izaziva oštećenje endotela i dovodi do disbalansa između vazodilatatornih i vazokonstriktornih supstanci, što uzrokuje promene vaskularnog zida, porast plućnog vaskularnog otpora i hipertrofije desnog srca, kao i oksidativni stres, i u krajnjem ishodu srčanu insuficijenciju. Toksičnost monokrotalina u plućima uzrokovana je njegovim efektima na metabolizam azotnog monooksida, antiapoptotičke i proliferativne faktore i membranske proteine (Huang et al., 2010). Takođe, on utiče i na put Nrf2 što dovodi do povećane aktivacije kaspaze 3, oksidativnog oštećenja i inflamacije (Nakayama et al., 2010).

Dhalla et al. (1996) su u svom istraživanju na pacovima sa indukovanom srčanom insuficijencijom izazvanom podvezivanjem aorte, pokazali da su rani znaci kompenzatorne hipertrofije leve komore u sprezi sa smanjenjem antioksidantnih enzima (superoksid dizmutaza-SOD i katalaza-CAT) u miokardu. Tokom istraživanja na ovim životinjama je primenjena suplementacija vitaminom E koji je povećao koncentraciju antioksidantnih enzima kako u krvi tako i u miokardu, ali je pozitivno uticao i na histomorfometrijske parametre. Kroz ovo istraživanje je pokazano da oksidativni stres može biti u osnovi događaja od hipertrofije srca do dilatacije i progresivne srčane insuficijencije.

Infarkt miokarda nakon ligacije koronarne arterije kod pacova široko je korišćen model srčane insuficijencije. Ako leva koronarna arterija nije u potpunosti podvezana, srčana insuficijencija može nastati kao posledica hronične ishemijske miokarda (Kajstura et al., 1994).

Još jedan životinjski model koji može biti pogodan za proučavanje prelaska sa kompenzovane hipertrofije na insuficijenciju je Dahl soj pacova osetljiv na so (Dahl et al., 1962; Inoko et al., 1994). Ovaj soj pacova razvija sistemsku hipertenziju nakon što je primenjena dijeta sa visokim sadržajem soli. Srčana insuficijencija je u sprezi sa smanjenim performansama miokarda, kao što je prikazano na izolovanim preparatima (Inoko et al., 1994).

Model spontanog hipertenzivnog pacova je takođe jedan od modela srčane insuficijencije, koji je uspostavljen kao model genetske hipertenzije (Okamoto i Aoki, 1963). Nastanak insuficijencije je povezan sa značajnim promenama u ekspresiji gena koji kodiraju vanćelijski matriks (Boluyt et al., 1994).

Doksorubicin pokazuje akutnu i hroničnu kardiotoksičnost i koristi se za izazivanje srčane insuficijencije kod različitih životinjskih vrsta. Nekoliko različitih mehanizama uključeno je u patofiziologiju srčane insuficijencije izazvane doksorubicinom, uključujući stvaranje slobodnih radikala i peroksidaciju lipida, reaktivne sulfhidrilne grupe, vezivanje za regulatorna mesta kanala ili inhibiciju sinteze mRNA i proteina (Dodd et al., 1993).

Pored doksorubicina, i izoproterenol može izazvati srčanu insuficijenciju tokom vremena i nakon dovoljnog oštećenja miokarda (Oudit et al., 2003). I ovaj model se karakteriše apoptozom miocita i oksidativnim stresom (Wang et al., 2004).

Hiperhomocisteinemija je identifikovana kao uzročni faktor srčanog stresa i disfunkcije i kod spontano hipertenzivnih i normotenzivnih pacova. Kod pacova, suplementacija homocisteinom tokom 10 nedelja dovodi do hiperhomocisteinemije i posledične ventrikularne disfunkcije sa ugroženom sistolnom i dijastolnom funkcijom. Glavni faktori uključeni u razvoj ove srčane insuficijencije su oksidativni stres i inflamatorni medijatori (Andersen et al., 2020).

2. CILJEVI

Ciljevi ovog rada bili su:

1. Da se u grupi zdravih eksperimentalnih životinja (kontrolna grupa) i u grupi životinja tretiranih monokrotalinom (M) ispituju funkcionalne karakteristike srca (ehokardiografski) i koncentracija pokazatelja oštećenja srca u serumu (koncentracija troponina T (hs cTnT)) radi potvrde animalnog modela SI, kao i da se u grupama životinja tretiranih vitaminom B6 (B6), folnom kiselinom (FK), kombinacijom vitamina B6 i folne kiseline (B6+FK), monokrotalinom i vitaminom B6 (M+B6), monokrotalinom i folnom kiselinom (M+FK) i monokrotalinom, vitaminom B6 i folnom kiselinom (M+B6+FK) ispita koncentracija troponina T (hs cTnT).
2. Da se u grupi zdravih eksperimentalnih životinja (kontrolna grupa) i u grupama životinja tretiranih monokrotalinom (M), vitaminom B6 (B6), folnom kiselinom (FK), kombinacijom vitamina B6 i folne kiseline (B6+FK), monokrotalinom i vitaminom B6 (M+B6), monokrotalinom i folnom kiselinom (M+FK) i monokrotalinom, vitaminom B6 i folnom kiselinom (M+B6+FK) odredi koncentracija homocisteina, glukoze, ukupnog holesterola, HDL, triglicerida, aktivnosti enzima transaminaza (AST, ALT), alkalne fosfataze i α -amilaze, pokazatelja funkcije bubrega (urea, kreatinin), ukupnih proteina, albumina, mokraćne kiseline i IL-6, CRP, fibrinogena, D-dimera i *von Willebrand* –ovog faktora u krvi pacova.
3. Da se u grupi zdravih eksperimentalnih životinja (kontrolna grupa) i u grupama životinja tretiranih monokrotalinom (M), vitaminom B6 (B6), folnom kiselinom (FK), kombinacijom vitamina B6 i folne kiseline (B6+FK), monokrotalinom i vitaminom B6 (M+B6), monokrotalinom i folnom kiselinom (M+FK) i monokrotalinom, vitaminom B6 i folnom kiselinom (M+B6+FK) odrede parametri oksidativnog stresa u tkivu srca pacova (aktivnost enzima: superoksid dismutaze (SOD), glutation peroksidaze (GPx), status tiola, sadržaj nitrotirozina, sadržaj karbonilnih grupa), koncentracija oksidovanog (GSSG) i ukupnog glutationa (GSH) i ukupna S – glutationilacija proteina u tkivu srca pacova.
4. Da se u grupi zdravih eksperimentalnih životinja (kontrolna grupa) i u grupama životinja tretiranih monokrotalinom (M), vitaminom B6 (B6), folnom kiselinom (FK), kombinacijom vitamina B6 i folne kiseline (B6+FK), monokrotalinom i vitaminom B6 (M+B6), monokrotalinom i folnom kiselinom (M+FK) i monokrotalinom, vitaminom B6 i folnom kiselinom (M+B6+FK) ispituju strukturne karakteristike srca određivanjem histomorfoloških promena u srcu (debljina zida leve i desne komore, i međukomorskog zida, kao i dimenzija kardiomiocita u zidu leve komore), i imunohistohemijski odredi ekspresija pokazatelja proliferativnog kapaciteta (Ki67, PCNA) u kardiomiocitima i fibroblastima intersticijuma.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Eksperimentalne životinje

U eksperimentu su korišćeni mužjaci pacova, soja Wistar albino, početne telesne mase 140-160 g i starosti 25-30 dana na početku eksperimenta. Životinje su nabavljene iz akreditovanog vivarijuma u Beogradu. Životinje su bile smeštene pojedinačno ili grupno u pleksiglas-transparentnim kavezima sa dnom obloženim šuškom, sa hranom i vodom bez ograničenja u konstantnim ambijentalnim uslovima: temperatura $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, vlažnost $55\pm 5\%$ i dvanaestočasovni ciklus svetlo-tama (svetlo 07:30-19:30 h). Pre započetih eksperimenata životinje su se aklimatizovale na laboratorijske uslove tokom 3 dana.

Svi eksperimentalni postupci su bili u skladu sa Evropskom direktivom o dobrobiti laboratorijskih životinja (br. 2010/63/EU) i odobreni su od strane Etičkog komiteta za brigu o životinjama, Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, Direkcije za veterinu, Republike Srbija (licenca broj 323-07-01339/2017-05/2).

3.2 Eksperimentalne grupe

Sve eksperimentalne životinje (ukupno 72) su raspoređene u 9 grupa (po 8 životinja u svakoj pojedinačnoj grupi):

- I grupa (n=8; K): jednokratni ip. tretman fiziološkim rastvorom (0.9 % NaCl)
- II grupa (n=8; K28): fiziološki rastvor (0.9 % NaCl) ip., svakodnevno tokom 28 dana
- III grupa (n=8; M): jednokratno ip., monokrotalin (50 mg/kg t.m.)
- IV grupa (n=8; B6): vitamin B6 (7 mg/kg t.m.) ip., svakodnevno tokom 28 dana
- V grupa (n=8; FK): folna kiselina (vitamin B9) (5mg/kg t.m.) ip., svakodnevno tokom 28 dana
- VI grupa (n=8; B6+FK): vitamin B6 (7mg/kg t.m.) i folna kiselina (vitamin B9) (5mg/kg t.m.) ip., svakodnevno tokom 28 dana
- VII grupa (n=8; M+B6): jednokratno ip. monokrotalin (50 mg/kg t.m.) i vitamin B6 (7 mg/kg t.m.) ip., svakodnevno tokom 28 dana
- VIII grupa (n=8; M+FK): jednokratno ip. monokrotalin (50 mg/kg t.m.) i folna kiselina (vitamin B9) (5mg/kg t.m.) ip., svakodnevno tokom 28 dana
- IX grupa (n=8; M+B6+FK): jednokratno ip. monokrotalin (50 mg/kg t.m.) i zajedno vitamin B6 (7mg/kg t.m.) i folna kiselina (vitamin B9) (5mg/kg t.m.) ip., svakodnevno tokom 28 dana.

Inicijalno, za svaku eksperimentalnu grupu je planirano 10 eksperimentalnih životinja, osim za monokrotalinsku grupu za koju je planirano 11 životinja, a konačan broj rezultata od eksperimentalnih životinja po grupama prikazan je u odnosu na potrebu za uklanjanjem ekstremnih vrednosti i rezultata onih životinja koje su uginule tokom trajanja eksperimenta.

3.3 Eksperimentalni protokol

3.3.1 Indukcija srčane insuficijencije

Indukcija SI je izvršena jednokratnom intraperitonealnom (ip.) primenom monokrotalina ($C_{16}H_{23}NO_6$, molekulske mase 325.361 g/mol) u dozi od 50 mg/kg telesne mase.

3.3.2 Varijable merene u studiji

Pre početka, ali i tokom istraživačkog perioda, sve životinje su bile pod stalnim praćenjem, pri čemu je nedeljno registrovana telesna masa svake životinje. Nakon završenog eksperimentalnog perioda izvršeno je žrtvovanje životinja giljotinom za pacove, uzimanje krvi za analize i potom hirurško izolovanje srca pacova. Nakon izolovanja srce je isprano fiziološkim rastvorom (0.9 % NaCl) i osušeno filter papirom. Srce pacova je izmereno za računanje kardio-somatskog indeksa (KSI je određen pomoću formule: $KSI = [\text{masa srca (g)} / \text{telesna masa pacova (g)}] * 100$) (Kang et al., 2007). Krv za određivanje koncentracije biohemijskih parametara dobijena je prikupljanjem krvi u specijalne epruvete postupkom iskrvarenja životinje. Nakon prikupljanja uzorci krvi su odstojali 15 min na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirani (15 min na 3000 g), i analizirani (plazma ili serum). Potom je za potrebe biohemijskih ispitivanja tkivo homogenizovano i centrifugirano, i nadtalog je zamrznut na $-80^{\circ}C$ do analize. Za histološku analizu tkivo srca pacova je odloženo u pripremljene posude sa formalinom koje su čuvane na sobnoj temperaturi.

3.3.3 Ehokardiografska merenja

Morfologija i funkcija srčanog mišića procenjavani su ultrazvučnim pregledom na pacovima pod blagom sedacijom acepromazinom (0.5 mg/kg im. 15 minuta pre pregleda), prenosivim ALOKA ProSound 2 aparatom i linearnom sondom podešenom na frekvencu od 13 MHz. Životinje su na stolu za pregled postavljane da leže na levom boku i pregled se obavljao u desnoj parasternalnoj kratkoj osi, kratkom preseku na nivou papilarnih mišića u B- i M-modalitetu¹. U M-modalitetu su, potom, vršena sledeća merenja:

- prečnik međukomorne pregrade u dijastoli (*eng. interventricular septum at diastole – IVSd*),
- unutrašnji prečnik leve komore u dijastoli (*eng. left ventricular diastolic internal diameter – LVIDd*),
- debljina srčanog zadnjeg zida u dijastoli (*eng. posterior wall thickness at diastole – PWd*),
- prečnik međukomorne pregrade u sistoli (*eng. interventricular septum in systole – IVSs*),
- unutrašnji prečnik leve komore u sistoli (*eng. left ventricular systolic internal diameter – LVIDs*),
- debljina zadnjeg srčanog zida u sistoli (*eng. posterior wall thickness at systole – PWs*)
- unutrašnji prečnik desne komore (*eng. right ventricular internal diameter – RVID*).

Ostali parametri računati su prema Teicholzovim formulama (Brown et al., 2002), i to:

- frakciono skraćnje leve komore (engl. left ventricular fractional shortening – FS)
$$FS (\%) = \frac{(LVIDd - LVIDs)}{LVIDd} \times 100$$

¹ B od engleske reči *brightness* – bistrina i M od engleske reči *motility* – gibanje, pokretljivost

- zapremina leve komore na kraju dijastole (*eng. left ventricular end diastolic volume – EDV*)
EDV (mL) = 1.047x(LVIDd)³
- zapremina leve komore na kraju sistole (*eng. end systolic volume – ESV*)
ESV (mL) = 1.047x(LVIDs)³
- udarni volumen (*eng. stroke volume – SV*) SV (mL) = EDV–ESV
- e젝ciona frakcija leve komore (*engl. left ventricular ejection fraction – LVEF*)

$$\text{LVEF (\%)} = \frac{\text{SV}}{\text{EDV}} \times 100$$

3.3.4 Određivanje biohemijskih parametara u serumu i plazmi

Biohemijski parametri u serumu i plazmi određivani su komercijalnim kitovima (Siemens Healthcare Diagnostics Ltd., Frimley, Camberley UK) na automatskom analizatoru (Dimension Xpand, Siemens, Germany) i spektrofotometrijskom metodom. Homocistein u serumu (Hcy) meren je kompetitivnim imuno-testom koristeći direktnu, hemiluminescentnu tehnologiju na ADVIA Centaur KSP sistem (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrivov, Nev Iork, USA). Nivoi glukoze (GLUC), uree (UREA), kreatinina (CREA) i parametri lipidnog profila (ukupni holesterol (TC), lipoproteinski holesterol velike gustine (HDL-C), trigliceridi (TG)), ukupni proteini (TP), albumin (ALB), aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), α -amilaza (α -AMY) i alkalna fosfataza (ALP) izmereni su pomoću komercijalnih kompleta za spektrofotometriju (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark, New Jersey, SAD) na automatskom analizatoru (Dimension Kspand, Siemens). Nivo LDL-C je određivan Friedewald-ovom jednačinom. Nivoi mokraćne kiseline u serumu (UA) određeni su spektrofotometrijski pomoću komercijalnih kompleta (Siemens Healthcare Diagnostics Ltd., Frimley, Camberley, UK) na automatskom biohemijskom analizatoru (Dimension Xpand, Siemens). Koncentracija C-reaktivnog proteina (CRP) u serumu je bila merena komercijalnim testom na automatskom biohemijskom analizatoru (Dimension Xpand, Siemens). Nivoi srčanog troponina T (hs cTnT) mereni su visoko osetljivim testom koristeći Roche Cobas e601 automatizovani analizator (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemačka). Koncentracija interleukina IL-6 izmerena je pomoću automatizovanog elektrohemiluminescentnog imunološkog testa na Cobas E601 analizatoru (Roche Diagnostics). Koncentracija fibrinogena određena je modifikovanim Clauss testom (sedište kompanije Siemens Healthineers, Erlangen, Nemačka). Koncentracija D-dimera određivana je imunoturbidimetrijski, dok je aktivnost *von Willebrand*-ovog faktora (vWF) utvrđena testom INNOVANCE® VWF Ac korišćenjem BCS KSP analizatora (sedište kompanije Siemens Healthineers).

3.3.5 Priprema tkiva srca za biohemijske analize

Tkivo srca je homogenizovano u 50 mM RIPA (*engl. Radio-Immunoprecipitation Assay*) puferu (50 mM TRIS-HCl pH 7.4, 1% NP-40, 0.25% natrijum deoksiholat, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 0.001 M DTT, 1mM fenoksimetilsulfonil fluorid, 0.2 mM natrijum ortovanadat i komercijalno dostupan koktel inhibitora proteaza (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), a zatim centrifugirano na 14000 rpm 30 minuta na +4 °C. Nadtalog je korišćen kao polazni materijal za citosolnu aktivnost glutation peroksidaze (GPx), superoksid dizmutaze (SOD), sadržaj tiol grupa, karbonilni sadržaj i sadržaj nitrotirozina i čuvan je na -80⁰ C do analize.

Za određivanje koncentracije oksidovanog i ukupnog glutationa, tkivo srca je homogenizovano u 5% sulfosalicilnoj kiselini i centrifugirano na 3000 g 20 minuta na +4°C. Ovako dobijeni supernatant korišćen je za analizu i čuvan na -80⁰ C do spektrofotometrijske analize.

Za merenje koncentracije proteina u homogenatu i citosolnim frakcijama korišćen je komplet za ispitivanje proteina (*eng. Bicinchoninic Acid Protein Assay*, Sigma–Aldrich, USA). Princip metode zasnovan je na kvantifikovanju smanjenja Cu⁺² na Cu⁺¹, srazmerno koncentraciji

proteina u uzorku. Standardna kriva proteina goveđeg serumskog albumina (*eng. bovine serum albumin-BSA*) je korišćena za određivanje koncentracija proteina na kraju izraženih kao g/L.

3.3.6 Određivanje parametara oksidativnog stresa u tkivu srca pacova

Aktivnost SOD je određivana spektrofotometrijski po metodi Misra-Fridovich (Misra i Fridovich, 1972), dok je aktivnost GPx određivana po metodi Gunzler i saradnici (1974).

3.3.6.1 Određivanje karbonilnog sadržaja u tkivu srca pacova

Karbonilni sadržaj u tkivu srca određivan je primenom ELISA metoda. Uzorci koji sadrže protein reagovali su sa dinitrofenilhidrazinom (DNPH). Zatim su neproteinski sastojci i nekonjugovani DNPH razdvojeni korišćenjem ultracentrifuge. Proteini su adsorbovani na ELISA ploči i inkubirani sa anti-DNPH antitelom praćenim antitelo-povezanim peroksidazom izolovanom iz rena. Apsorbance su povezane sa standardnom krivom pripremljenom sa oksidovanim serum albuminom. Sadržaj karbonilnih proteina je računat iz procenjene karbonilne koncentracije i ukupnog sadržaja proteina u uzorku. Iz tog razloga, potrebno je paralelno određivanje sadržaja proteina (Buss et al., 1997; Levine et al., 1994).

3.3.6.2 Određivanje sadržaja nitrotirozina u tkivu srca pacova

Za merenje sadržaja nitrotirozina u tkivu srca pacova korišćen je ELISA test. Esej se zasniva na „sendvič” tehnici. Standardi, kontrole i razblaženi uzorci u kojima se analizira sadržaj nitrotirozina su dodati u „bunare” ELISA ploče koji su prekriveni sa poliklonalnim kozjim anti-nitrotirozin antitelima. Tokom prve inkubacije nitrirani proteini se vezuju imobilizovanim primarnim antitelom. Zatim peroksidaza-konjugovana poliklonalna kozja anti-humana antitela su dodata u svaki „bunar” i formirali su „sendvič” koga čine primarno antitelo - nitrirani protein - peroksidaza-konjugat. Tetrametilbenzidin je korišćen kao supstrat za peroksidazu. Na kraju, reakcija je prekinuta dodavanjem H₂SO₄. Boja je promenjena iz plave u žutu. Intenzitet žute boje je direktno proporcionalan koncentraciji nitrotirozina. Optička gustina je merena na 450 nm. Sadržaj nitrotirozina je određivan na osnovu standardnih kriva (Peluffo i Radi, 2007).

3.3.6.3 Određivanje tiolnog statusa u tkivu srca pacova

Za određivanje tiolnog statusa je primenjen ELISA test. Kada su uzorci dodati u reakcioni pufer, slobodne i vezane SH grupe u uzorcima podvrgnutim reakciji rezultirale su u nastanku žuto prebojenih proizvoda sa apsorpcionim maksimumom na 412nm (Himmelfarb et al., 2004; Jocelyn, 1987; Belch et al., 1991).

3.3.6.4 Određivanje koncentracije oksidovanog (GSSG) i ukupnog glutaciona (GSH) u tkivu srca pacova

Koncentracije oksidovanog (GSSG) i ukupnog glutaciona (GSH) je određivana spektrofotometrijski korišćenjem glutation reciklirajućeg metoda. Za merenje ukupnog GSH, uzorak je inkubiran u 1ml natrijum fosfatnog pufera koji sadrži 0.6 mM 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoične kiseline) (DTNB) i 1 U/ml GSH reduktaze. Reakcija je započeta dodavanjem 1.2mM NADPH i promena apsorbanse je praćena na 412 nm. Vrednost ukupnog GSH je određena korišćenjem standardne krive za GSH. Za određivanje GSSG, primenjen je isti reciklirajući esej

nakon korišćenja 2-vinilpiridina za uklanjanje redukovanog GSH. Koncentracija redukovanog glutationa je izračunata oduzimanjem koncentracije oksidovanog glutationa od koncentracije ukupnog glutationa i izražena kao nmol/mg proteina (Ravindranath, 1994).

3.3.6.5 Određivanje ukupne S – glutationilacije proteina u tkivu srca pacova

Za određivanje ukupne S-glutationilacije, tkiva su homogenizovana u RIPA puferu (*eng. Radio-Immunoprecipitation Assay*) puferu (50 mM TRIS-HCl pH 7.4, 1% NP-40, 0.25% natrijum deoksiholat, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM fenoksimetilsulfonil fluorid, 0.2 mM natrijum ortovanadat i komercijalno dostupan koktel inhibitora proteaza (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) za ispitivanje radioimunoprecipitacije-RIPA (*eng. Radio-Immunoprecipitation Assay*) sa inhibitornim koktelom-proteaza i N-etilmaleimidom (NEM), a zatim centrifugirano na 10000 g na +4°C. Dobijeni nadtalog je korišćen za dalju analizu. Jednake količine proteina (40 µg) iz homogenata razdvojene su elektroforezom natrijum-dodecil-sulfat (SDS)-poliakrilamidnim gelom na prekrivanim gelovima za Criterion™ TGKS (4–15%) (Bio-Rad, SAD) pod neredukujućim uslovima. Nakon transfera proteina na nitroceluloznu membranu, imunodetekcija je izvršena korišćenjem primarnog mišjeg monoklonskog anti-glutation-antitela (Abcam, Cambridge, UK) nakon čega je usledila inkubacija sa kozjim sekundarnim anti-mišjim antitelom (Dako, Glostrup, Danska). Vizualizacija je izvedena korišćenjem hemiluminiscentnog sistema za detekciju (komplet ECL Western blotting analiza, GE Healthcare/Amersham). Denzitometrijska analiza izvršena je korišćenjem ImageLab softvera (Bio-Rad, SAD).

3.3.7 Histološka i morfometrijska analiza

Za morfološku i morfometrijsku, kao i imunohistohemijsku analizu korišćeno je tkivo srca pacova. Srce je orijentisano i isečeno na poprečne rezove debljine 3 mm. Tkivo je fiksirano imerzionim postupkom u 4% neutralno puferisanom formaldehidu u toku najmanje 24 h. Potom je dehidratirano alkoholima rastućih koncentracija, prosvetljavano u ksilolu i kalupljeno u paraplastu aparatom za kalupljenje (Tissue Tech II Tissue Embedding Center). Svaki kalup je pažljivo nivelisan i sečen do pojave cele debljine zida srca. Kalupi tkiva su serijski sečeni mikrotomom (Leica Reinhart Austria i Leica SM 2000 R) na isečke debljine 5 µm, i obojeni hematoksilinom i eozinom. Za grubu morfologiju, urađeno je višestruko merenje (10 po srcu) od endokarda do epikarda zida leve komore (LK), desne komore (DK) i interventrikularnog septuma (IVS). Prosečna dimenzija kardiomiocita je izračunata merenjem prečnika 100 kardiomiocita (na nivou jezgra) slobodnog zida LK. Svi slajdovi su analizirani pomoću Olympus BX 41 mikroskopa i fotografisani Olympusovim digitalnim fotoaparatom širokog zuma C-5060 i programom Olympus DP-soft Image Analyzer. Sve vrednosti su izražene u mikrometrima (µm).

3.3.8 Imunohistohemijska analiza uzoraka tkiva srca

Svi uzorci tkiva imunohistohemijski su obojeni korišćenjem anti-Ki67 (RM-9106-S0 Ki67 klon SP6, odnos razblaženja 1:200, ThermoSciaching) i anti-PCNA (RB-9055-P0 PCNA zečji poliklonal 1:200, ThermoSciaching). Nakon odmaščivanja i rehidratacije, na svim presecima tkiva izvršen je postupak demaskiranja antigena izazvanog toplotom, koristeći Tris-EDTA, pri pH 9.0, tokom 30 minuta. Isečci su zatim isprani sa TBS-om (*eng. Tris buffer saline*) i inkubirani sa primarnim antitelom razblaženim u odnosu 1:50. Isečci su tretirani primenom komercijalnog seta za bojenje UltraVision/DAB (Thermo Scientific LabVision TL-060-HD). Imunoreakcije su potom razvijene korišćenjem DAB. Isečci su kontrastno bojani Majerovim hematoksilinom. Negativne

kontrole izvršene su na presecima tkiva miokarda koristeći istu metodologiju, ali uz izostavljanje primarnog antitela.

Svi isecci su analizirani pomoću Olympus BX 41 mikroskopa i fotografisani Olympusovim digitalnim fotoaparatom širokog zuma C-5060 i programom Olympus DP-soft Image Analyzer. Rezultati su analizirani na 100 prebrojanih kardiomiocita određivanjem broja ćelija koje izražavaju procenat Ki67 i PCNA pozitivnosti i izraženi su u procentima (%).

3.3.9 Korišćene supstance

U eksperimentu su korišćene sledeće supstance:

- monokrotalin (Sigma Aldrich Inc., Munich, Nemačka, C16H23NO6, molekulske mase 325.361 g/mol, u koncentraciji 50 mg/kg t.m.)
- vitamin B6 (Sigma Aldrich Inc., Munich, Nemačka). Rastvor se pravi *ex tempore*, rastvaranjem supstance u fiziološkom rastvoru. Supstanca se administrira intraperitonealno (ip.) u koncentraciji 7 mg/kg t.m. (*Dijeta koja sadrži vitamin B6 7 mg/kg t.m. je opšte prihvaćena-Martinez et al., 2000*).
- folna kiselina (vitamin B9) (Sigma Aldrich Inc., Munich, Nemačka). Rastvor se pravi *ex tempore*, rastvaranjem supstance u fiziološkom rastvoru. Supstanca se administrira intraperitonealno (ip.) u koncentraciji 5 mg/kg t.m. (*Dijeta koja sadrži 2 mg/kg t.m. folne kiseline je opšte prihvaćena kao osnovni prehrambeni zahtev za pacove (Pododbor Nacionalnog istraživačkog saveta (SAD) za laboratorijsku ishranu životinja 1995). Ako dijeta sadrži 8 mg/kg t.m. folne kiseline, ona pruža umereno dodavanje folne kiseline i izabrano je da iznosi približno 1-6 mg/dan folne kiseline kod ljudi. Ove doze odgovaraju preporučenim dozama koje se mogu konzumirati kod ljudi-Martinez-Vega et al., 2015*).
- fiziološki rastvor (Hemofarm, Vršac, Srbija)
- kit za nitrotirozin (*Nitrotyrosine ELISA*, Immundiagnostik AG, Bensheim, Nemačka)
- kit za tiolni status (*Thiol Status, Photometric Assay for the Determination of Sulfhydryl Status*, Immundiagnostik AG, Bensheim, Nemačka)

3.4 Statistička analiza

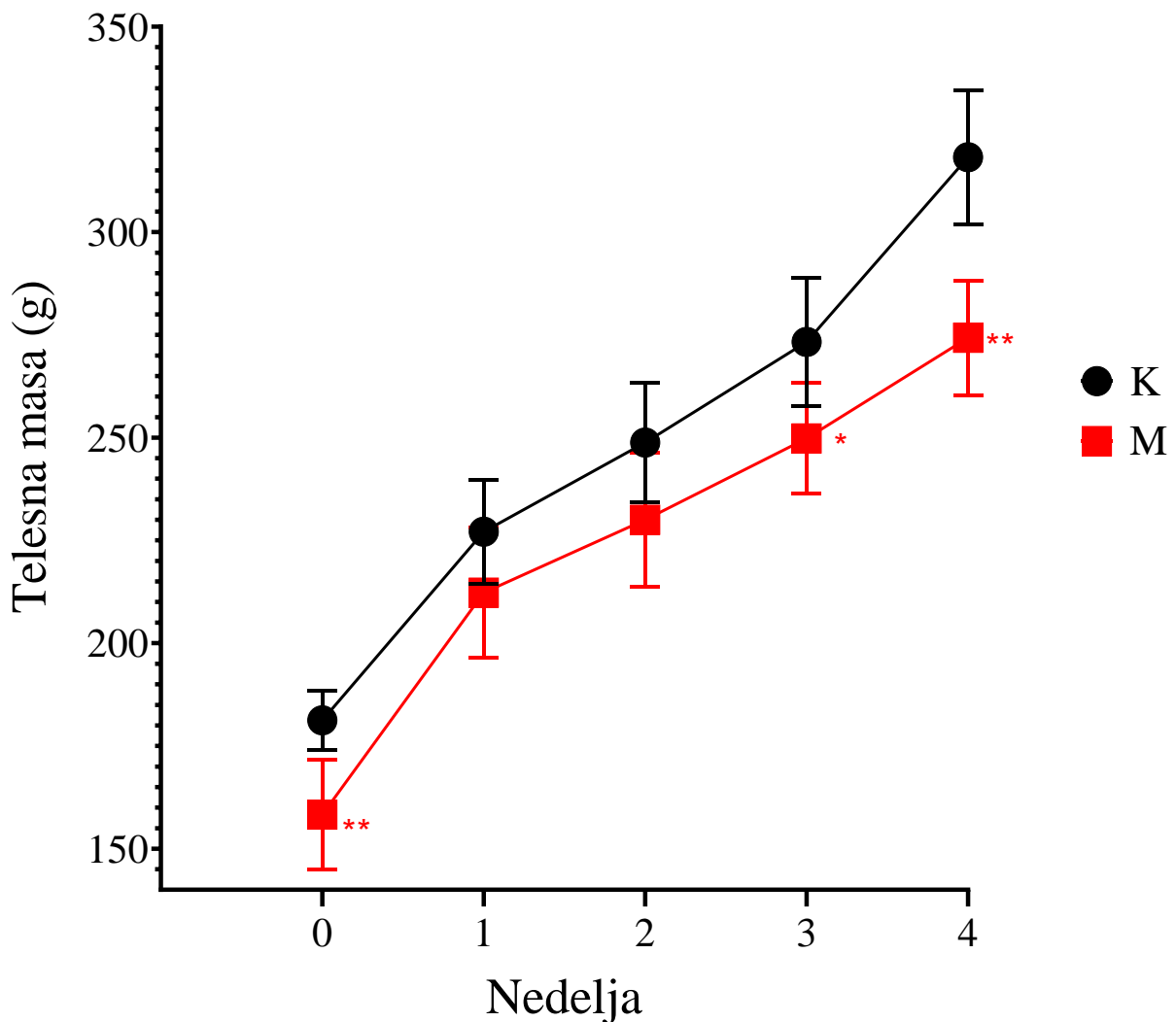
Za poređenje prosečnih vrednosti parametarskih obeležja između grupa korišćena je analiza varijanse (ANOVA) sa *post hoc* analizom, neparametarska varijanta testa po Kruskal-Wallis-u u zavisnosti od raspodele podataka, multipli T test, kao i T test za nevezane uzorke. Svi dobijeni rezultati su prikazani tabelarno ili grafički. Vrednost $p < 0.05$ smatrana je statistički značajnom, a vrednost $p < 0.01$ statistički visoko značajnom.

4. REZULTATI

4.1 REZULTATI APLIKACIJE MONOKROTALINA (M) U ODNOSU NA KONTROLNU GRUPU (K)

4.1.1 Promena telesne mase eksperimentalnih životinja

Na Slici 4.1 su prikazane telesne mase pacova unutar grupa K i M. Uočava se da u trećoj nedelji dolazi do statistički značajnog smanjenja telesnih masa pacova unutra M grupe u odnosu na K grupu koje se održava do kraja eksperimentalnog protokola.

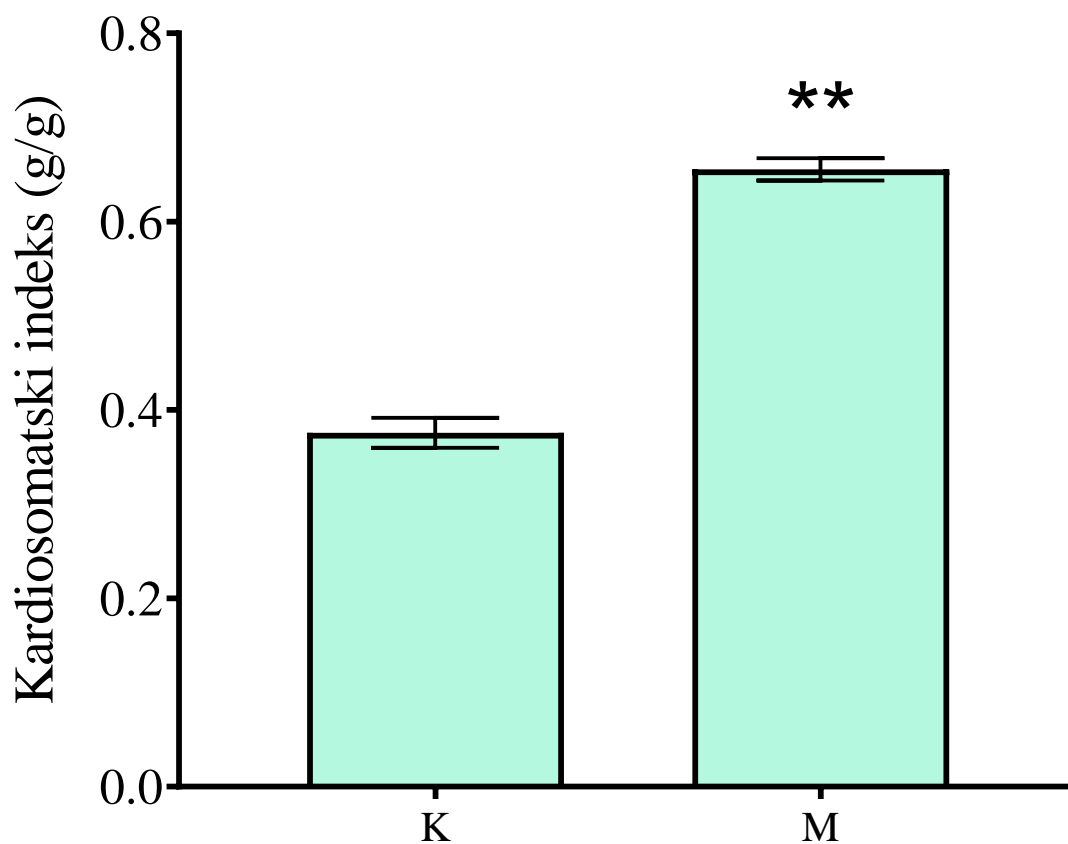


Slika 4.1 Promena telesne mase eksperimentalnih životinja u grupama K i M kroz nedelje eksperimentalnog protokola.

* $p < 0.05$ vs. K, ** $p < 0.01$ vs. K – Multipli T test

4.1.2 Razlika u vrednosti kardiosomatskog indeksa između eksperimentalnih životinja

Na Slici 4.2 uočava se statistički visoko značajno manja vrednost KSI kod pacova unutar M grupe u odnosu na kontrolu ($p < 0.01$).



Slika 4.2 Razlika u vrednosti KSI između eksperimentalnih životinja K i M grupe
** $p < 0.01$ vs. K – T test za nevezane uzorke

4.1.3 Biohemijska analiza

Primena monokrotalina rezultirala je značajnim povećanjem vrednosti hs cTnT u odnosu na kontrolnu grupu K (199 (58-251) ng/L naspram 17 (16-25) ng/L). Nivo Hcy u serumu, kao i markeri bubrežne funkcije (urea i kreatinin) i funkcije jetre (aspartat-aminotransferaza, alanin-aminotransferaza i alkalna fosfataza) gotovo su nepromenjeni u grupi M u poređenju sa K grupom. Nivo glukoze je visoko statistički značajno povećan u grupi M u odnosu na grupu K (7 ± 1.20 mmol/L naspram 6 ± 0.63 mmol/L). Vrednost HDL u serumu je značajno smanjena u M grupi u poređenju sa K grupom (0.84 ± 0.26 mmol/L u odnosu na 1.21 ± 0.13 mmol/L), ali nije bilo razlike u drugim parametrima lipidnog profila (CHL i TGL), između ove dve testirane grupe (1.37 ± 0.24 mmol/L naspram 1.38 ± 0.15 mmol/L i 0.95 ± 0.33 mmol/L naspram 0.89 ± 0.16 mmol/L). Nivo albumina i ukupni sadržaj proteina bili su značajno niži između M i K grupe (391.55 ± 156.74 g/L naspram 497.90 ± 71.15 g/L i 52.55 ± 5.39 g/L naspram 62.20 ± 2.35 g/L). Sadržaj mokraćne kiseline u K grupi nije različit u poređenju sa M grupom (85.45 ± 22.96 μ mol/L naspram 74.40 ± 14.28 μ mol/L). Srednji nivoi α -amilaze su značajno niži u grupi M u poređenju sa K grupom (2530.00 ± 657.01 U/L u odnosu na 3560.75 ± 580.49 U/L). U svim testiranim grupama CRP u svakom uzorku je bio ispod 2 mg/L (granična vrednost detekcije). U 100% uzoraka u svim testiranim grupama, CRP je bio ispod 2 mg/L (granična vrednost detekcije). Skoro ista situacija je bila i sa IL 6 (100% uzoraka je bilo ispod 1.5 pg/mL u svim procenjenim grupama). Vrednosti fibrinogena bile su ispod 1.8 g/L u svim uzorcima u K grupi i u 75% uzoraka u M grupi, ali vrednost faktora *von Willebrand* bila je značajno veća u M grupi u poređenju sa K grupom (227.65 ± 41.01 naspram 156.00 ± 37.19 %) (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 Biohemijski parametri u serumu /plazmi eksperimentalnih životinja

Grupe/ parametri	K	M
∨ hsTnT (ng/L)	17 (16-25)	199 (58-251)*
°Hcy (μmol/L)	8.36 ± 2.48	8.01 ± 1.08
°GLUC (mmol/L)	6.19 ± 0.63	7.33 ± 1.20*
°UREA (mmol/L)	13.66 ± 1.96	18.27 ± 6.97
°CREA (μmol/L)	43.90 ± 2.56	47.18 ± 14.43
°CHL (mmol/L)	1.38 ± 0.15	1.37 ± 0.24
°HDL (mmol/L)	1.21 ± 0.13	0.84 ± 0.26*
°TGL (mmol/L)	0.89 ± 0.16	0.95 ± 0.33
°AST (U/L)	343.20 ± 76.03	352.91 ± 119.57
°ALT (U/L)	129.20 ± 25.47	76.27 ± 28.34
°ALP (U/L)	497.90 ± 71.15	391.55 ± 156.74*
°TP (g/L)	62.20 ± 2.35	52.55 ± 5.39*
°ALB (g/L)	36.40 ± 0.84	29.36 ± 2.87*
°UA (μmol/L)	74.40 ± 14.28	85.45 ± 22.96
°α-AMY (U/L)	3560.75 ± 580.49	2530.00 ± 657.01*
¥IL-6 < 1.5 (pg/mL)	8 (100%)	8 (100%)
¥CRP < 2 (mg/L)	8 (100%)	8 (100%)
¥Fibrinogen < 1.8 (g/L)	8 (100%)	6 (75%)
¥vWF (%)	156.00 ± 37.19	227.65 ± 41.01*

hsTnT (*eng. troponin T*–troponin T), Hcy (*eng. homocysteine*–homocistein), GLUC (*eng. glucose*-glukoza), UREA (*eng. urea*-urea), CREA (*eng. creatinine*–kreatinin), CHL (*eng. total cholesterol*–ukupni holesterol), HDL (*eng. high density lipoprotein*–lipoprotein visoke gustine), TGL (*eng. triglycerides*–trigliceridi), AST (*eng. aspartate-aminotransferase*–aspartat-aminotransferaze), ALT (*eng. alanine-aminotransferase*–alanin-aminotransferaze), ALP (*eng. alkaline phosphatase*–alkalna fofataza), TP (*eng. total proteins*–ukupni proteini), ALB (*eng. albumin*–albumin), UA (*eng. uric acid*–mokraćna kiselina), α-AMY (*eng. α-amylase*–α-amilaza), IL-6 (*eng. interleukin 6*–interleukin 6), CRP (*eng. C-reactive protein*–C reaktivni protein), vWF (*eng. von Willebrand Factor*–von Vilebrand-ov faktor); ∨- rezultati su prikazani u percentilima; °- rezultati su prikazani kao $x \pm SD$; ¥ - rezultati su prikazani kao n (%); * – $P < 0.05$ nasuprot grupi K

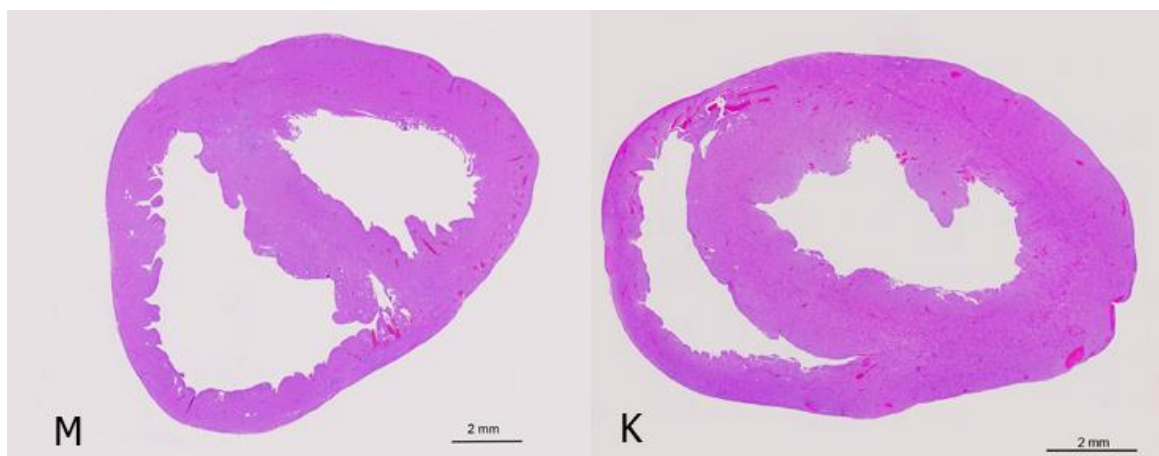
4.1.4 Histomorfometrijska analiza

Debljina zida desne komore bila je značajno veća u grupi monokrotalinom indukovane srčane insuficijencije (M) u poređenju sa kontrolnom grupom K ($1229.63 \pm 231.80 \mu\text{m}$ naspram $731.55 \pm 131.26 \mu\text{m}$). Suprotno tome, primećena je tendencija smanjenja debljine zida leve komore i interventrikularnog septuma između monokrotalinske i kontrolne grupe. U grupi M u poređenju sa K grupom, prosečna dimenzija kardiomiocita slobodnog zida leve komore bila je značajno veća ($21.20 \pm 1.55 \mu\text{m}$ naspram $17.99 \pm 1.90 \mu\text{m}$). Rezultati su prikazani na Tabeli 4.2 i Slici 4.3.

Tabela 4.2 Histomorfometrijski i imunohistohemijski parametri srca pacova

Grupe/Parametri	K	M
Debljina zida LK ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)	1950.80 ± 227.33	1676.26 ± 208.07
Debljina zida DK ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)	731.55 ± 131.26	$1229.63 \pm 231.80^*$
Debljina IVS ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)	1848.82 ± 144.96	1651.02 ± 293.95
Dimenzije kardiomiocita zida LK ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)	17.99 ± 1.90	$21.20 \pm 1.55^*$
Ki67 (DK) ($\% \pm \text{SD}$)	1.00 ± 0.82	23.00 ± 6.38
Ki67 (LK) ($\% \pm \text{SD}$)	0.75 ± 0.50	16.50 ± 2.10
PCNA(DK) ($\% \pm \text{SD}$)	0.20 ± 0.48	7.20 ± 1.48
PCNA(LK) ($\% \pm \text{SD}$)	0 ± 0	2.60 ± 0.89

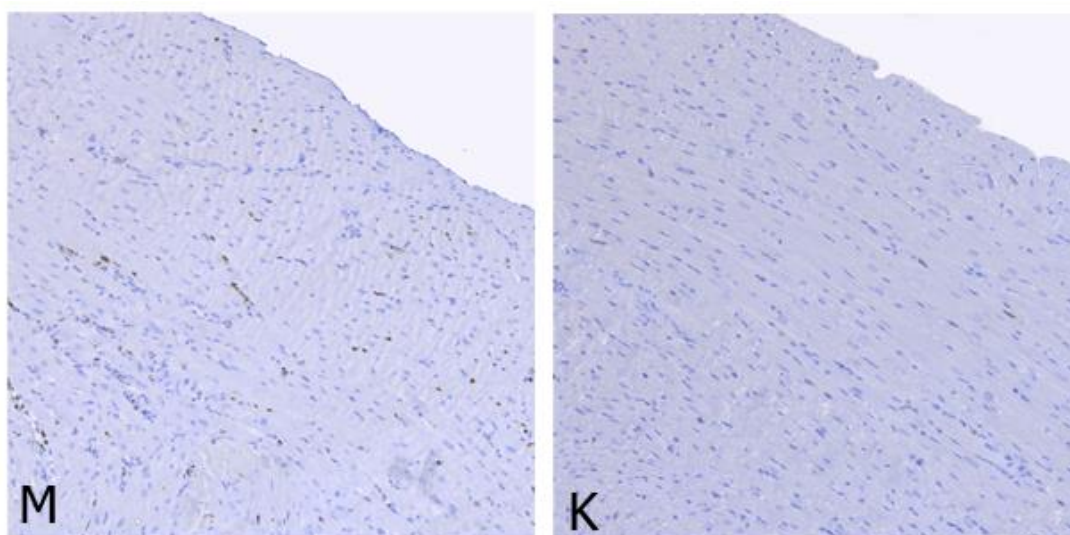
LK-leva komora; DK-desna komora; IVS–interventrikularni septum; SD-standardna devijacija * – $P < 0.05$ nasuprot grupi K



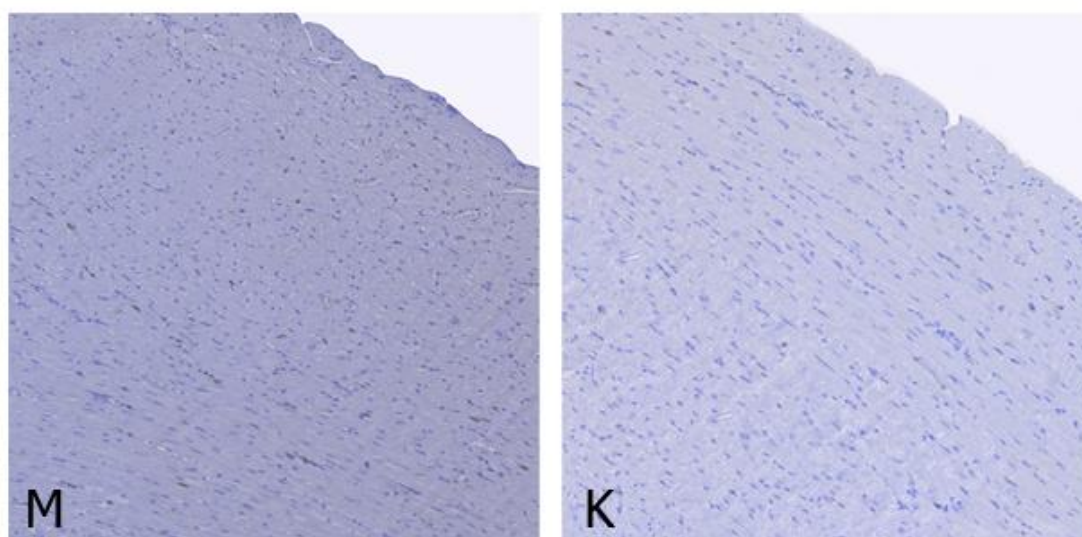
Slika 4.3. Poprečni presek srca pacova uz prikaz desne i leve komore različitih eksperimentalnih grupa (hematoksilin/eozin bojenje, M-jednokratno ip., monokrotalin; K-jednokratni ip. tretman fiziološkim rastvorom)

4.1.5 Imunohistohemijska analiza

Pozitivnost Ki67 u zidu desne komore značajno je porasla u grupi monokrotalinom indukovane srčane insuficijencije (M) u poređenju sa kontrolnom grupom K (23.00 ± 6.38 naspram $1.00 \pm 0.82\%$, $p < 0.05$), kao što se sličan trend zabeležio i u zidu leve komore (16.50 ± 2.10 naspram $0.75 \pm 0.50\%$, $p < 0.05$). Pozitivnost PCNA kako u zidu desne komore tako i zidu leve komore je porasla u grupi M u odnosu na kontrolnu grupu K (7.20 ± 1.48 naspram $0.20 \pm 0.48\%$, 2.60 ± 0.89 naspram $0 \pm 0\%$). Rezultati su prikazani na Tabeli 4.2 i Slikama 4.4 i 4.5.



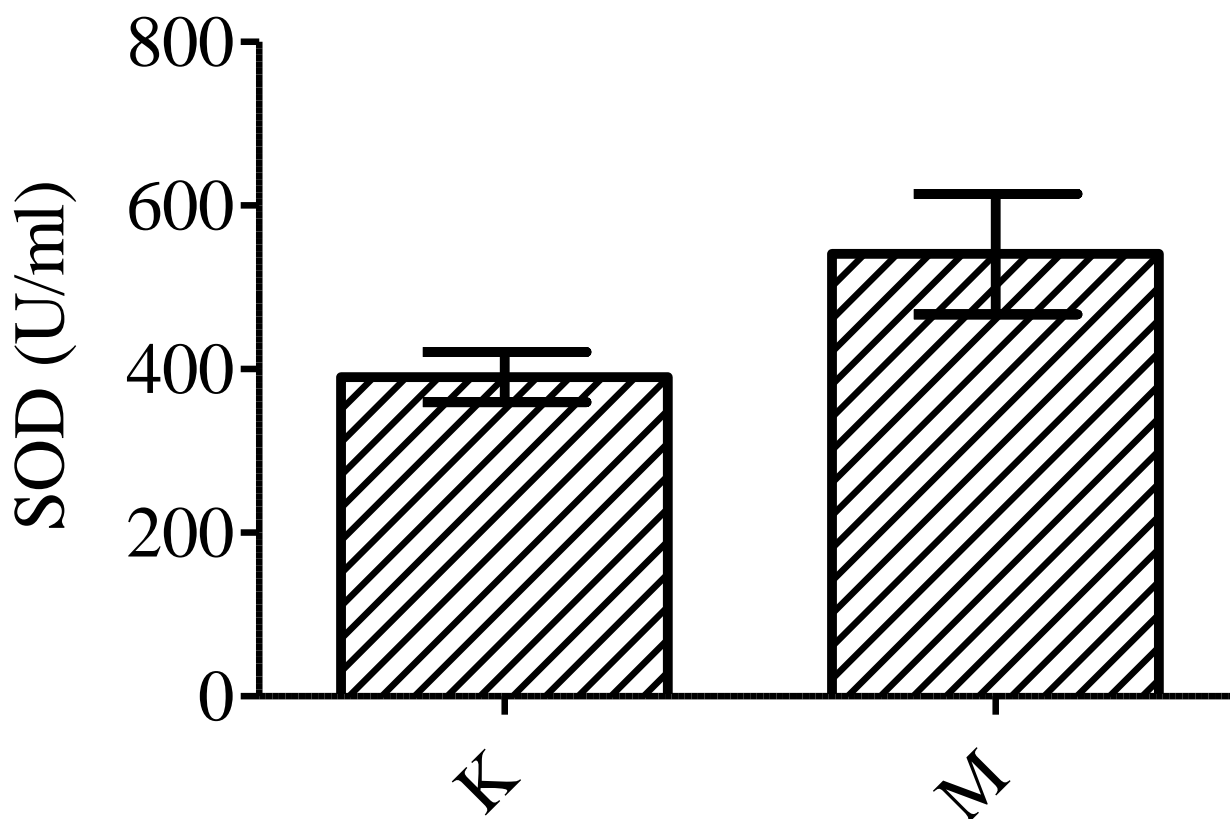
Slika 4.4 Imunohistohemijska ekspresija Ki67 u desnoj komori (M-jednokratno ip., monokrotalin; K-jednokratni ip. tretman fiziološkim rastvorom)



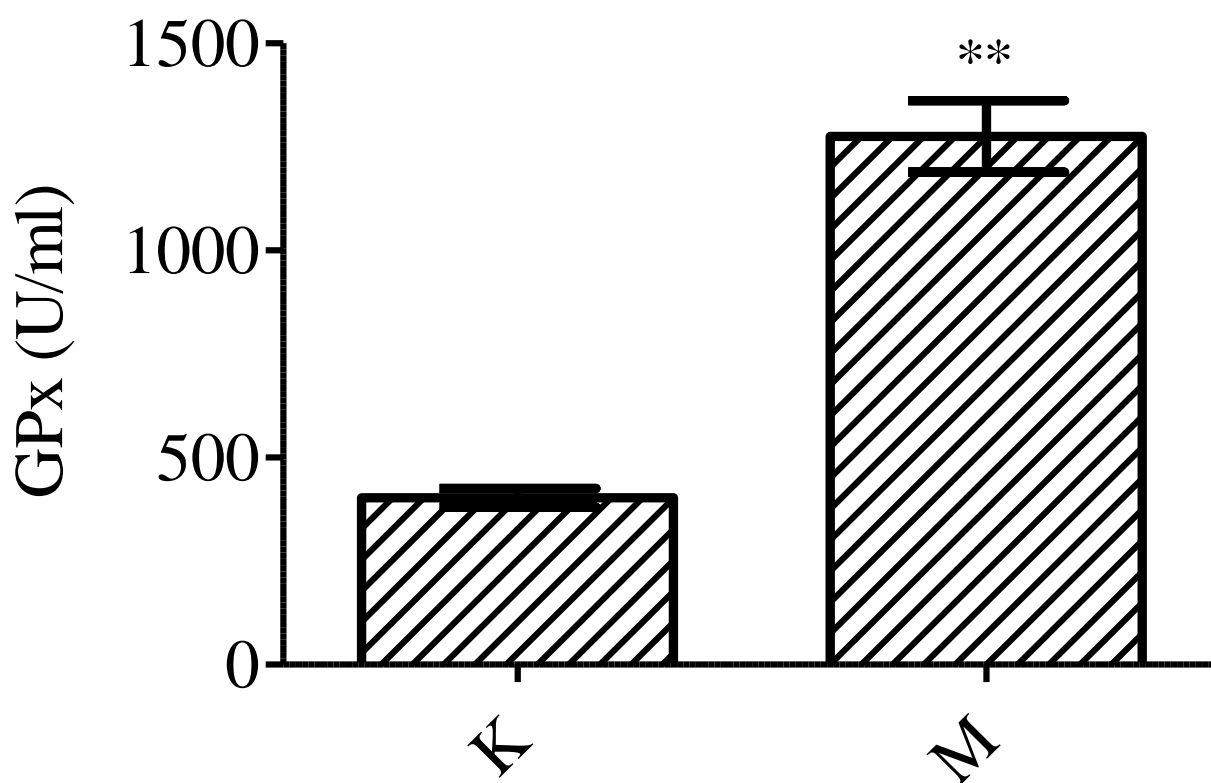
Slika 4.5 Imunohistohemijska ekspresija PCNA u desnoj komori (M-jednokratno ip., monokrotalin; K-jednokratni ip. tretman fiziološkim rastvorom)

4.1.6 Analiza parametara oksidativnog stresa

Mereni su antioksidativni enzimi superoksid dismutaza, glutation peroksidaza i glutation, zajedno sa parametrima oksidativnog oštećenja proteina kao što su sadržaj tiol grupa, karbonilnih grupa i nitrotirozina. Tretman indukovanim monokrotalinom povećava aktivnost oba antioksidantna enzima, SOD i GPx, koji su u slučaju GPx dostigli visoku statističku značajnost (390.60 ± 68.46 naspram 540.75 ± 147.36 U/ml; 402.83 ± 50.92 naspram 1276.10 ± 172.34 U/ml, $p < 0.01$) (Slike 4.6 i 4.7). Suprotno tome, ukupni sadržaj glutationa bio je niži u M grupi u poređenju sa kontrolnom grupom K, sa visokom statističkom značajnošću (58.83 ± 14.75 u odnosu na 25.70 ± 3.08 nmol/mg proteina, $p < 0.01$) (Slika 4.8). Nivo tiolnog statusa takođe je bio značajno smanjen u M grupi u poređenju sa K grupom (387.36 ± 73.92 naspram 202.64 ± 28.35 μ mol/g proteina, $p < 0.01$) (Slika 4.9), kao i sadržaj karbonilnih grupa (25.84 ± 6.79 u odnosu na 42.06 ± 10.29 μ mol/g proteina, $p < 0.01$) (Slika 4.10). Sadržaj nitrotirozina takođe je bio smanjen u M grupi u poređenju sa kontrolnom grupom K, ali nije bilo statistički značajne razlike (9 ± 3 naspram 7 ± 2 nmol/L) (Slika 4.11).

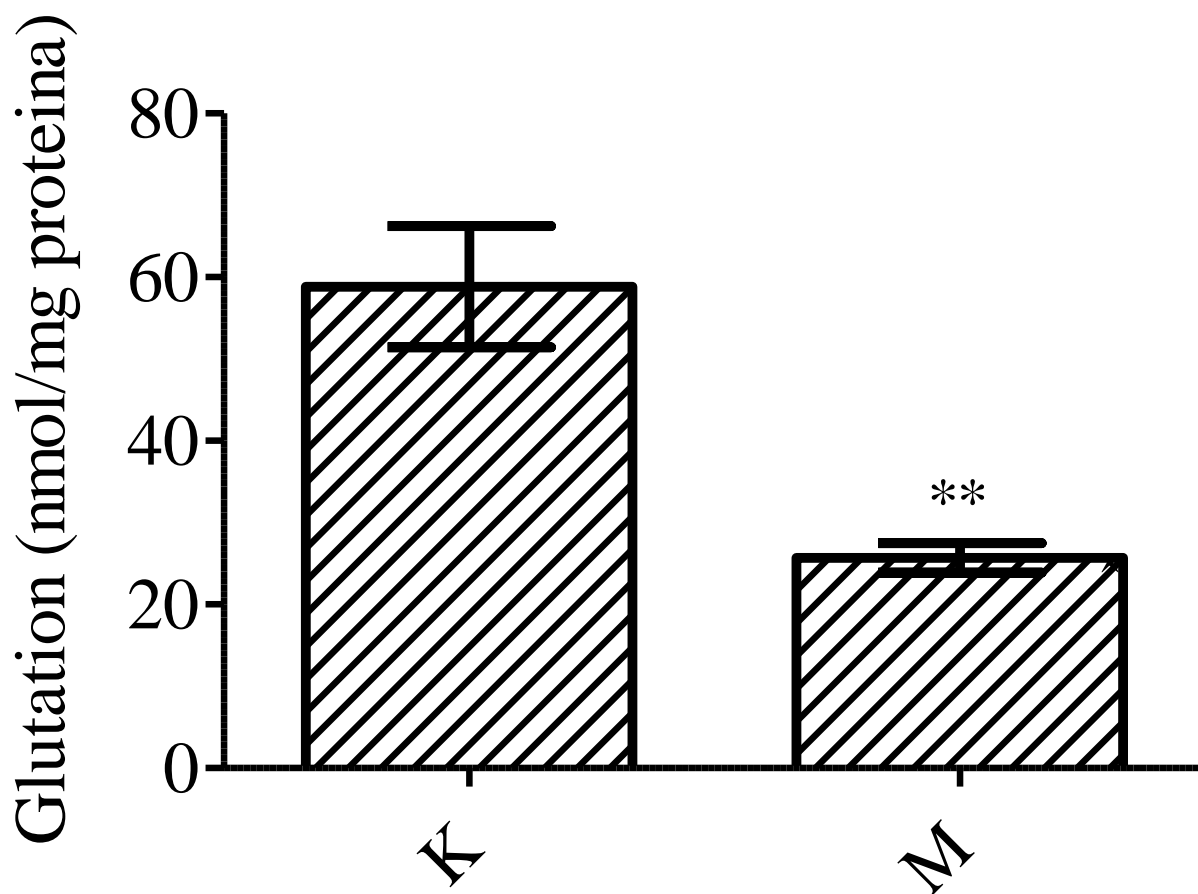


Slika 4.6 Aktivnost SOD u srčanom tkivu pacova
K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg ip. jednokratno); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno)

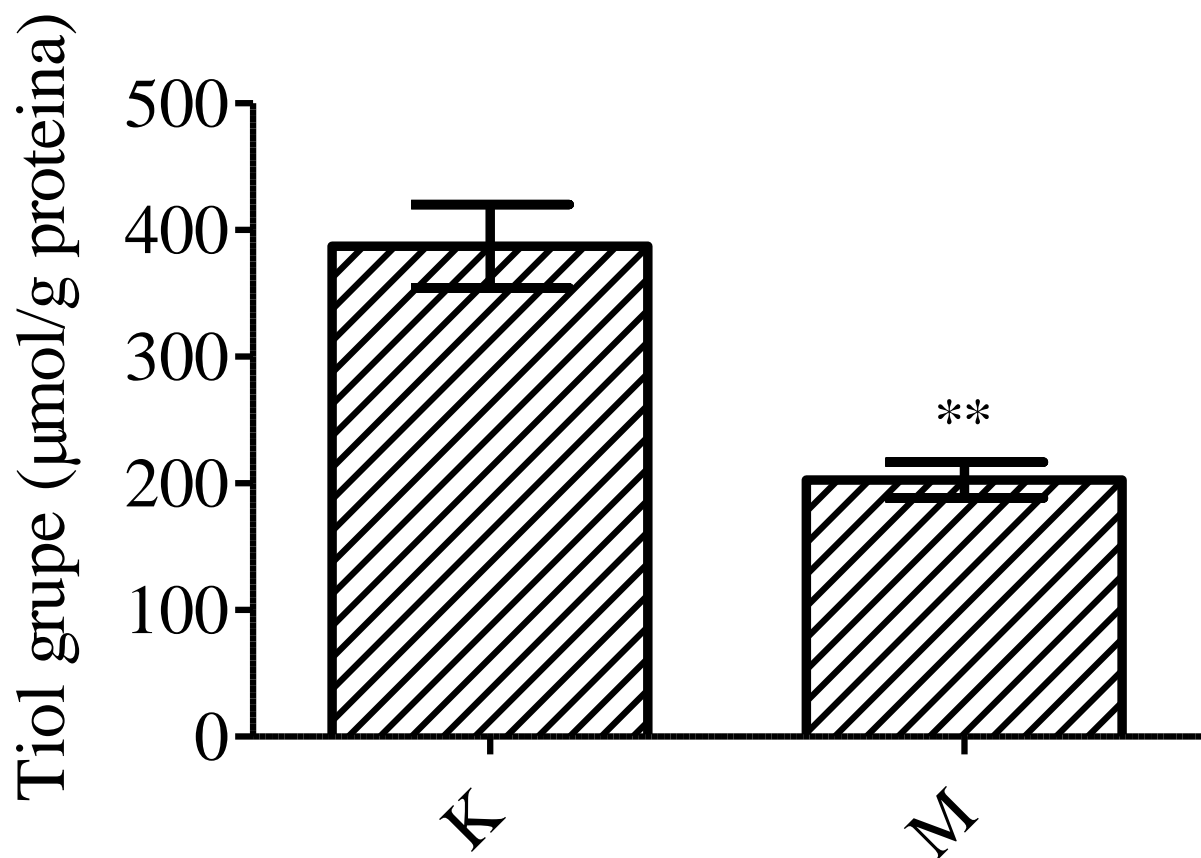


Slika 4.7 Aktivnost GPx u srčanom tkivu pacova

K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg ip. jednokratno); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); * *- P < 0.01 naspram grupe K

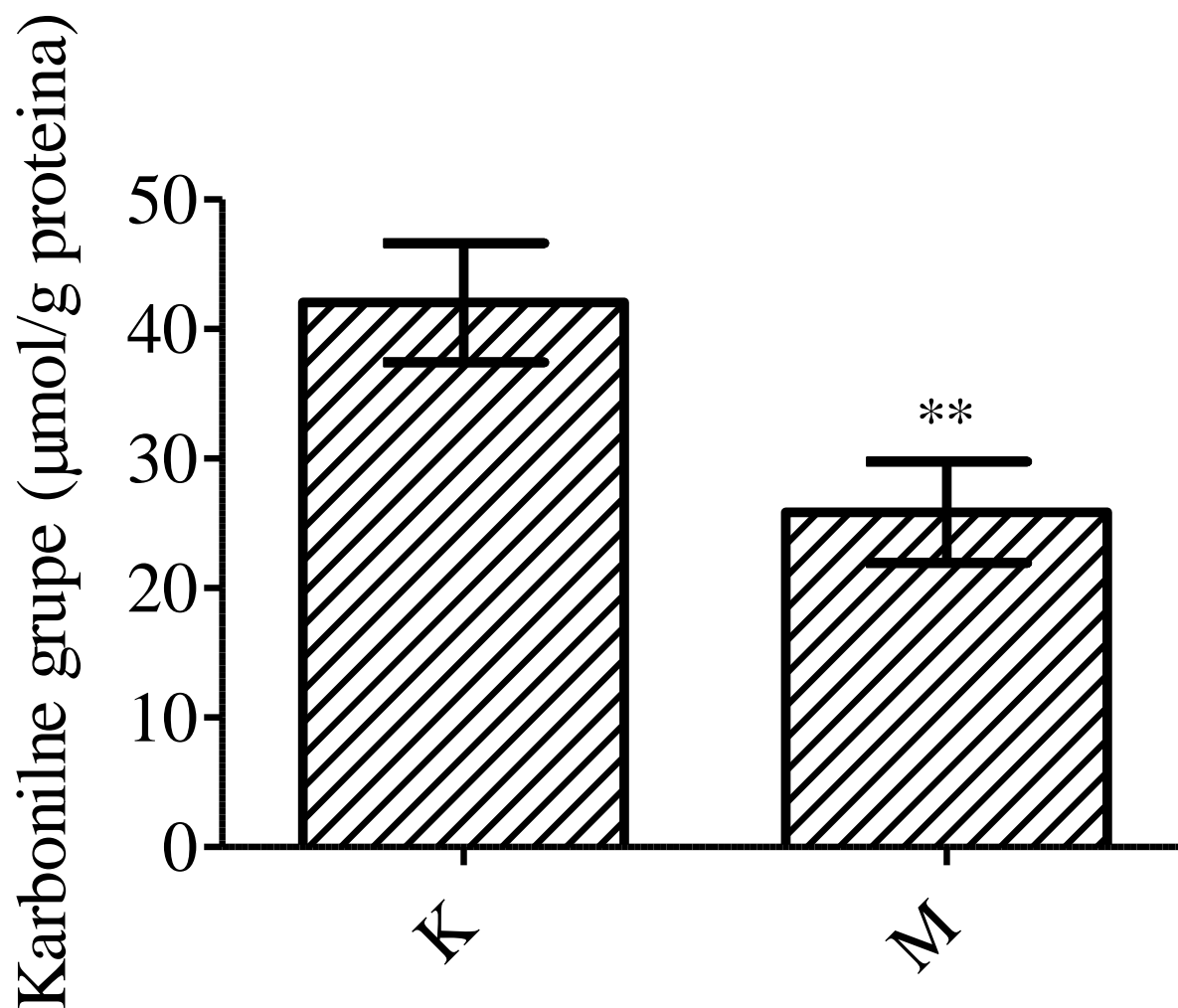


Slika 4.8 Sadržaj glutationa u srčanom tkivu pacova
K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg ip. jednokratno); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); * *- P < 0.01 naspram grupe K

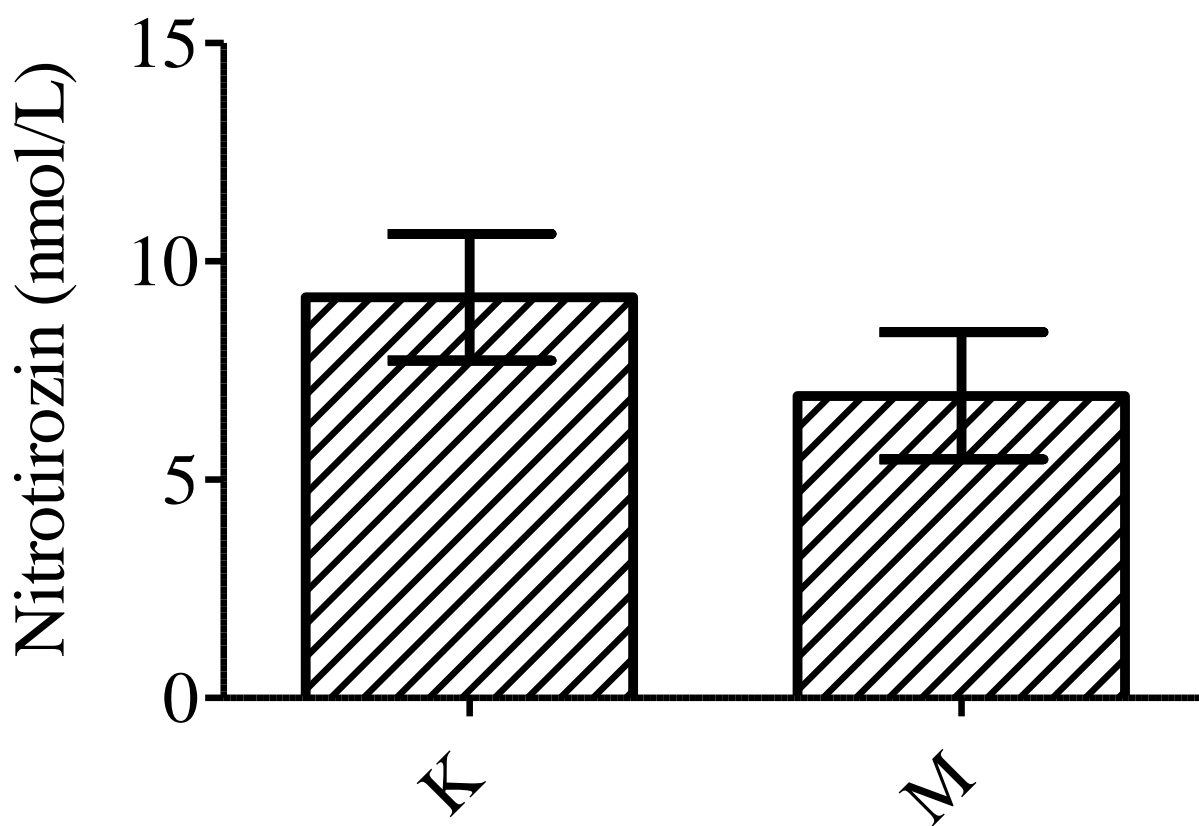


Slika 4.9 Sadržaj tiol grupa u srčanom tkivu pacova

K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg ip. jednokratno); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); * *- P < 0.01 naspram grupe K



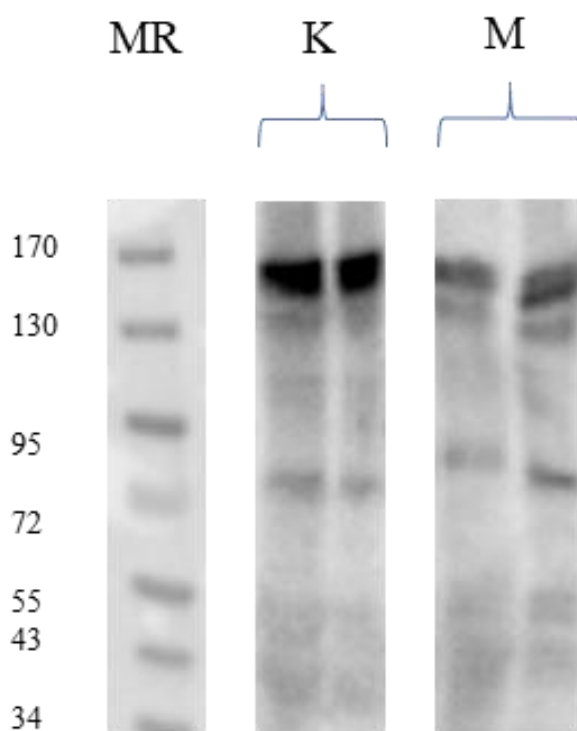
Slika 4.10 Sadržaj karbonilnih grupa u srčanom tkivu pacova
K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg ip. jednokratno); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); * *- P < 0.01 naspram grupe K



Slika 4.11 Sadržaj nitrotirozina u srčanom tkivu pacova
K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg ip. jednokratno); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); * *- $P < 0.01$ naspram grupe K

4.1.7 Determinacija ukupne S-glutationilacije

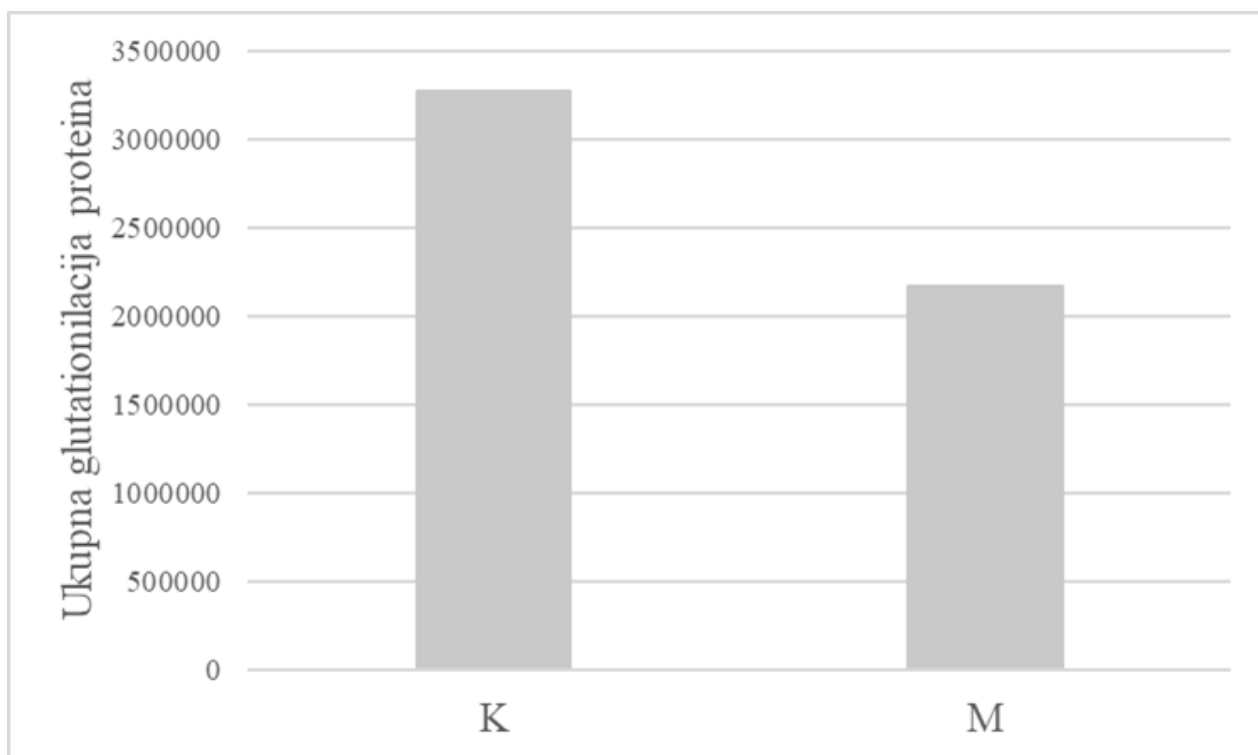
Nivo glutacionilacije ukupnih proteina procenjen je *Western blot*-om. Monoklonsko glutation-antitelo korišćeno je za ispitivanje ukupne glutacionilacije proteina. Slika 4.12 prikazuje trake koje reaguju sa antitelom protiv glutationa u K i M grupama. Densitometrijska analiza je pokazala smanjeni nivo glutacionilacije proteina u M grupi u poređenju sa K grupom ($p = 0.063$) (Slika 4.13).



Slika 4.12 Nivo ukupne glutacionilacije proteina *Western blot*-om

MR-marker molekularne težine (kDA)

K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg ip. jednokratno); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno)



Slika 4.13 Denzitometrijska analiza dobijenih *blot*-ova - softver ImageLab (Bio-Rad, SAD)
K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg ip. jednokratno); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno)

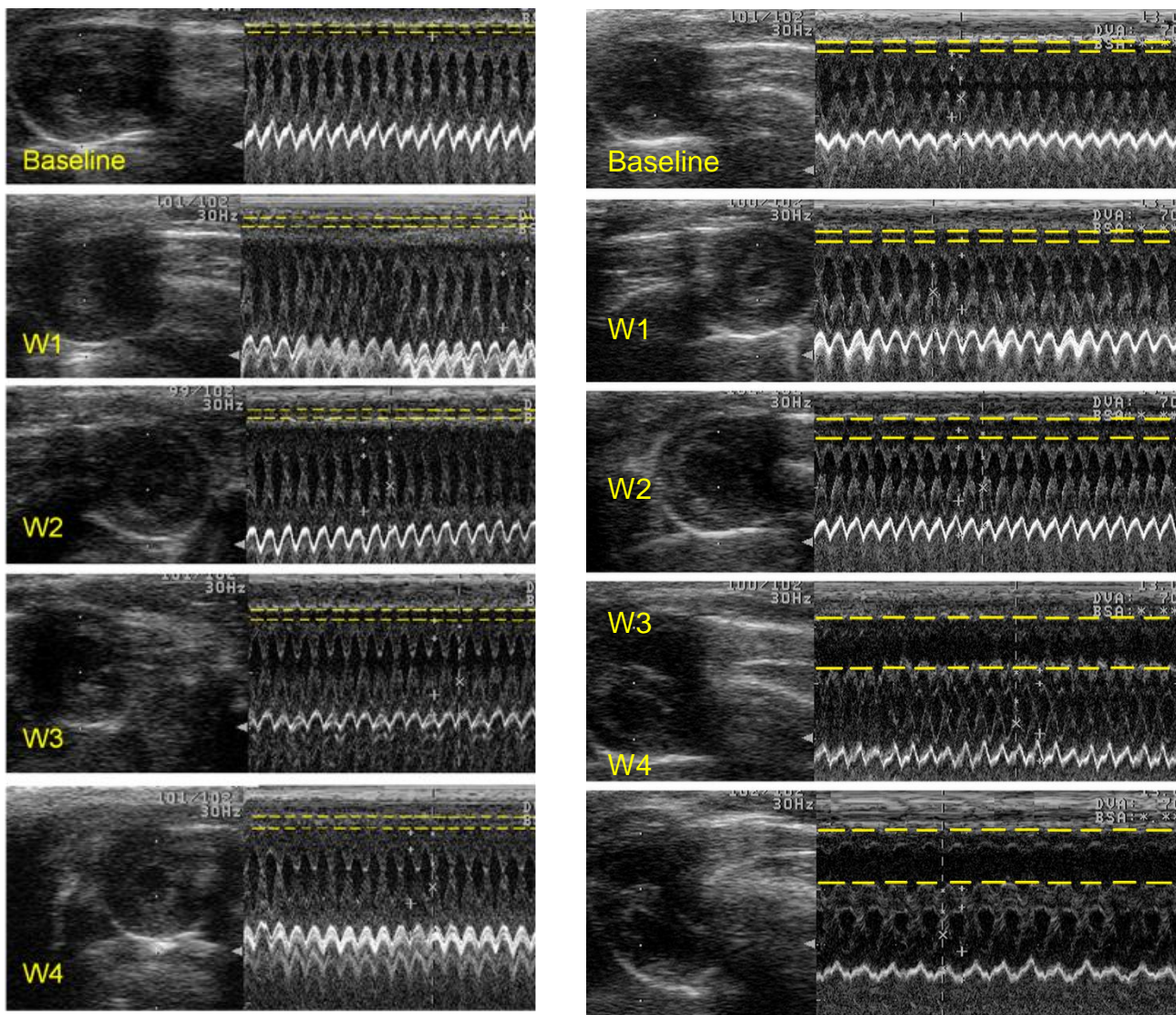
4.1.8 Ehokardiografska procena morfologije i funkcije srca

Otkriveni znaci srčane insuficijencije izazvane monokrotalinom pojavili su se samo nakon dve nedelje od tretmana. Unutrašnji prečnik desne komore (RVID) statistički značajno se povećao u poređenju sa početnim vrednostima kod pacova tretiranih monokrotalinom (0.21 ± 0.04 cm naspram 0.11 ± 0.01 cm i 0.28 ± 0.04 cm naspram 0.11 ± 0.01 cm u trećoj i četvrtoj nedelji) i u poređenju sa kontrolnom grupom ($0,21 \pm 0,04$ cm naspram $0,11 \pm 0,01$ cm i 0.28 ± 0.04 cm naspram 0.11 ± 0.01 cm u trećoj i četvrtoj nedelji). Nije bilo promena u ejakcionoj frakciji leve komore (LVEF) u poređenju sa početnim vrednostima kod pacova tretiranih monokrotalinom ($85.53 \pm 1.42\%$ naspram $86.56 \pm 1.27\%$ i $82.72 \pm 1.43\%$ naspram $86.56 \pm 1.27\%$ u trećoj i četvrtoj nedelji) i kontrolne grupe ($85.53 \pm 1.42\%$ naspram $86.25 \pm 1.70\%$ i $82.72 \pm 1.43\%$ naspram $87.76 \pm 1.60\%$ u trećoj i četvrtoj nedelji) (Tabela 4.3). Slika 4.14 prikazuje tipični ehokardiogram promena morfologije srca pacova: pre tretmana, 7 dana, 14 dana, 21 dan i 28 dana nakon tretmana.

Tabela 4.3 Ehokardiografski parametri pacova tretiranih monokrotalinom

Grupe/Parametri	K				
	Početno stanje	W1	W2	W3	W4
IVSd (cm)	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01
LVIDd (cm)	0.47 ± 0.01	0.52 ± 0.01	0.52 ± 0.01	0.52 ± 0.01	0.53 ± 0.01
PWd (cm)	0.23 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.27 ± 0.03
IVSs (cm)	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01
LVIDs (cm)	0.24 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.26 ± 0.02	0.25 ± 0.01
PWs (cm)	0.29 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.36 ± 0.01	0.31 ± 0.01
EF (%)	86.13 ± 0.93	86.40 ± 1.31	86.26 ± 1.04	86.25 ± 1.70	87.76 ± 1.60
FS (%)	48.12 ± 2.46	50.16 ± 1.55	53.08 ± 1.48	50.98 ± 2.23	52.82 ± 2.04
EDV (ml)	0.34 ± 0.03	0.34 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.33 ± 0.03	0.35 ± 0.02
RVID (cm)	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01
Grupe/Parametri	M				
	Početno stanje	W1	W2	W3	W4
IVSd (cm)	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.17 ± 0.01*†	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01
LVIDd (cm)	0.44 ± 0.02	0.50 ± 0.02*	0.51 ± 0.02*	0.49 ± 0.02*	0.46 ± 0.01*†
PWd (cm)	0.25 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.26 ± 0.03
IVSs (cm)	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.23 ± 0.01*	0.23 ± 0.01	0.22 ± 0.01
LVIDs (cm)	0.21 ± 0.01	0.26 ± 0.01*	0.26 ± 0.02*	0.25 ± 0.02*	0.23 ± 0.01
PWs (cm)	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.32 ± 0.01†	0.32 ± 0.01†
EF (%)	86.56 ± 1.27	84.60 ± 2.23	83.92 ± 3.78	85.53 ± 1.42	82.72 ± 1.43
FS (%)	50.76 ± 1.78	49.21 ± 2.53	49.43 ± 3.29	49.58 ± 1.67	49.82 ± 1.88
EDV (ml)	0.30 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.33 ± 0.03	0.31 ± 0.04	0.24 ± 0.02**†††
RVID (cm)	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.02*	0.21 ± 0.04**††	0.28 ± 0.04***†††

Rezultati su prikazani kao $\bar{x} \pm \text{SD}$; IVSd (*eng. interventricular septum in diastole*); LVIDd (*eng. left ventricular internal diameter in diastole*); PWd (*eng. posterior wall in diastole*); IVSs (*eng. interventricular septum in systole*); LVIDs (*eng. left ventricular internal diameter in systole*); PWs (*eng. posterior wall in systole*); EF (*eng. left ventricular ejection fraction*); FS (*eng. Fractional shortening*); EDV (*eng. left ventricular end diastolic volume*); RVID (*eng. right ventricular internal diameter*); K-kontrolna grupa (jednokratni ip. tretman fiziološkim rastvorom); M-monokrotalinska grupa (jednokratni ip. tretman monokrotalinom, 50 mg/kg t.m.); W (*eng. week-nedelja*, W1: prva nedelja; W2: druga nedelja; W3: treća nedelja; W4: četvrta nedelja); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ naspram početnog stanja u okviru iste eksperimentalne grupe, † $p < 0.05$; †† $p < 0.01$; ††† $p < 0.001$ naspram kontrolne grupe K

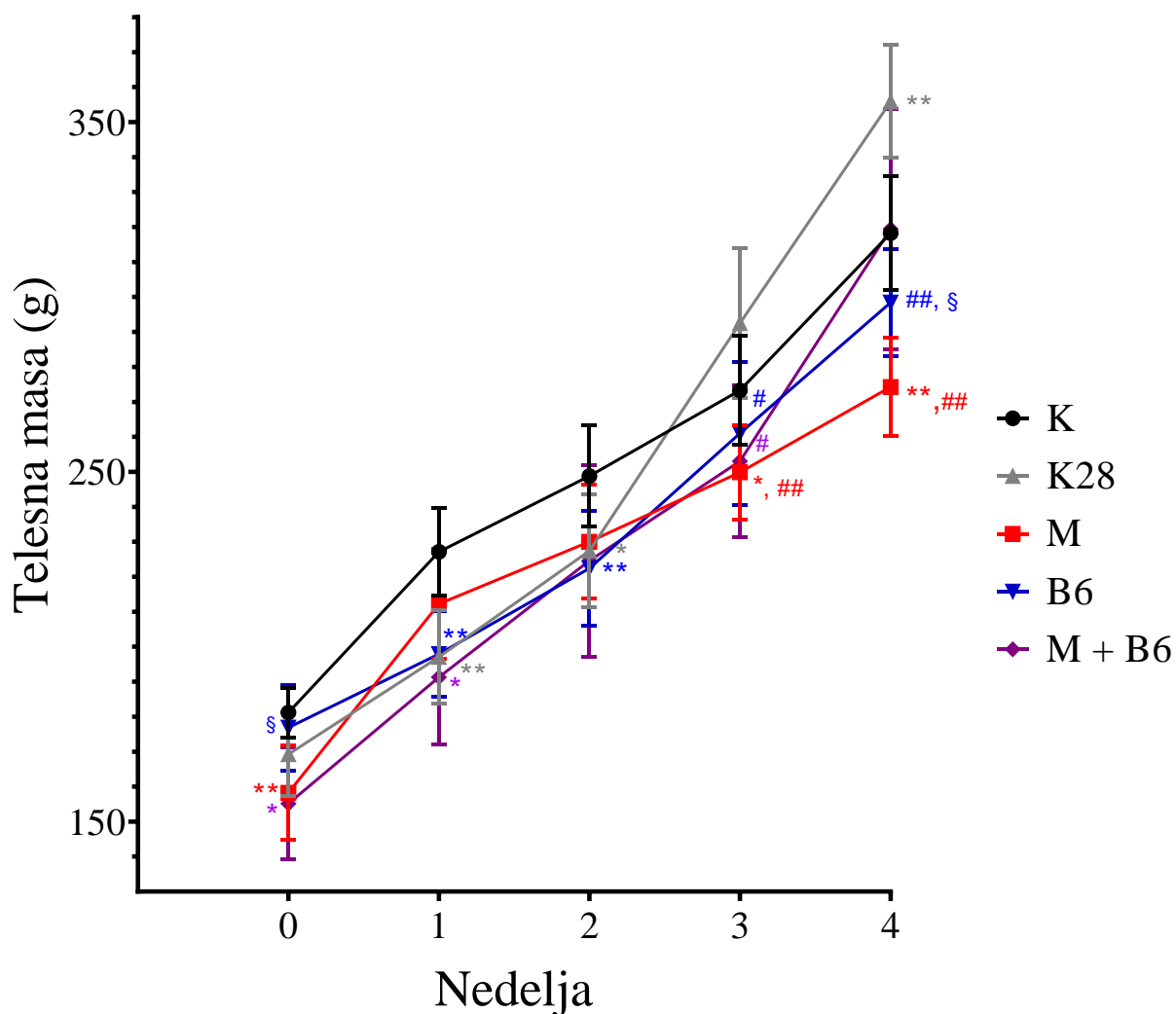


Slika 4.14 Ehokardiogrami pacova tretiranih fiziološkim rastvorom (levi panel) i pacova tretiranih monokrotalinom (desni panel). Crtice označavaju unutrašnji prečnik desne komore. Primetiti značajnu dilataciju desne komore (povećanje prečnika) u trećoj i četvrtoj nedelji nakon aplikacije monokrotalina. *Baseline*: početno stanje; W1: prva nedelja; W2: druga nedelja; W3: treća nedelja; W4: četvrta nedelja

4.2 APLIKACIJA VITAMINA B6

4.2.1 Promena telesne mase eksperimentalnih životinja

Na Slici 4.15 je predstavljena dinamika promene telesnih masa pacova u grupama K, K28, M, B6 i M+B6 kroz nedelje eksperimentalnog protokola.

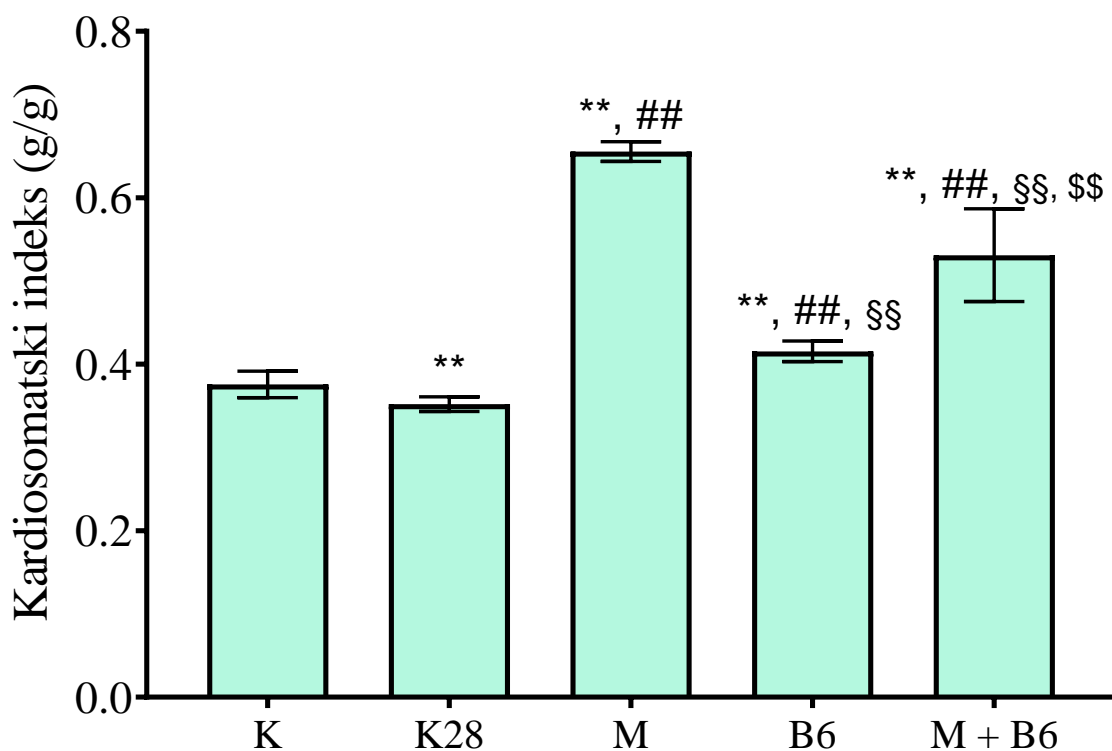


Slika 4.15 Promena telesne mase eksperimentalnih životinja u grupama K, K28, M, B6 i M+B6 kroz nedelje eksperimentalnog protokola.

* $p < 0.05$ vs. K, ** $p < 0.01$ vs. K, # $p < 0.05$ vs. K28, ## $p < 0.01$ vs. K28, § $p < 0.05$ vs. M—Two-Way ANOVA with Tukey posthoc test

4.2.2 Razlika u vrednosti kardiosomatskog indeksa između eksperimentalnih životinja

Na Slici 4.16 su prikazane vrednosti KSI eksperimentalnih životinja K, K28, M, B6 i M+B6 grupe. Uočava se statistički značajno povećanje vrednosti KSI kod životinja M grupe u odnosu na kontrolu ($p < 0.01$). Kod životinja koje su bile tretirane vitaminom B6 životinja u uslovima srčane insuficijencije koja je izazvana aplikacijom monokrotalina vrednosti KSI su statistički značajno niže u odnosu na vrednosti životinja M grupe ($p < 0.01$).



Slika 4.16. Razlika u vrednosti KSI između eksperimentalnih životinja K, K28, M, B6 i M+B6 grupe

** $p < 0.01$ vs. K, ## $p < 0.01$ vs. K28, §§ $p < 0.01$ vs. M, \$\$ $p < 0.01$ vs. B6 – One-way ANOVA sa Tukey posthoc testom

4.2.3 Biohemijska analiza

Primena vitamina B6 kod monokrotalinom indukovane srčane insuficijencije nije imala značajan uticaj na promenu vrednosti troponina T (M+B6 grupa naspram M grupe: 171 (122-277) naspram 199 (58-251) ng/L). Srednji nivo glukoze takođe je ostao nepromenjen u odnosu na M grupu (M+B6 grupa naspram M grupe: 7.33 ± 0.78 naspram 7.33 ± 1.20 mmol/L). Markeri funkcije bubrega (urea i kreatinin) i jetre (alanin-aminotransferaza i alkalna fosfataza) nisu se značajno razlikovali između M+B6 i M grupa, ali je aktivnost AST povećana u grupi M+B6 (190.29 ± 30.32 U/L) u poređenju sa M grupom (352.91 ± 119.57 U/L). Nivoi ukupnog holesterola i njegove frakcije lipoproteina visoke gustine značajno su povećani u serumima pacova koji su tretirani vitaminom B6 nakon oštećenja srca izazvanog monokrotalinom (CHL = 2.18 ± 0.48 mmol/L; HDL = 1.47 ± 0.29 mmol/L), u poređenju sa pacovima koji su primili samo monokrotalin bez suplementacije vitamina B6 (CHL = 1.37 ± 0.24 mmol/L; HDL = 0.84 ± 0.26 mmol/L). Nivoi triglicerida nisu se značajno razlikovali među grupama. Ukupni sadržaj proteina je ostao gotovo nepromenjen nakon aplikacije vitamina B6, dok se nivo albumina statistički značajno smanjio kod pacova koji su primili samo monokrotalin bez naknadne primene vitamina B6 (M+B6 grupa naspram M grupe: 22.43 ± 1.62 naspram 29.36 ± 2.87 g/L). Koncentracija mokraćne kiseline nije bila značajno promenjena između grupa. Aktivnost α -amilaze u serumima pacova bila je značajno niža u M grupi u poređenju sa MCT+B6 grupom (3460.00 ± 80.41 U/L).

U 100% uzoraka u svim ispitivanim grupama, CRP je bio ispod 2 mg/L (granična detekcija), a takođe smo dobili slične rezultate za koncentraciju IL-6 (100% uzoraka bilo je ispod 1.5 pg/mL u svim ispitivanim grupama).

Vrednosti fibrinogena bile su ispod 1.8 g/L u svim uzorcima u grupi K i K28 i u 75% uzoraka u grupi M i grupi M+B6. Vrednost *von Willebrand*-ovog faktora bila je značajno veća u M grupi (227.65 ± 41.01 %) u poređenju sa K grupom (156.00 ± 37.19 %), a tretman vitaminom B6 prouzrokovalo je smanjenje koncentracije vWF kod pacova sa srčanom insuficijencijom izazvanom monokrotalinom (36.87 ± 26.01 %) (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 Biohemijski parametri u serumu / plazmi eksperimentalnih životinja

Grupe/ parametri	K	K28	M	B6	M+B6
° hsTnT (ng/L)	17 (16-25)	25 (19-37)	199 (58-251)*	12 (8-18)	171 (122-277) ^
°Hcy (µmol/L)	8.36 ± 2.48	10.19 ± 3.87	8.01 ± 1.08	7.21 ± 1.05	7.68 ± 2.26
°GLUC (mmol/L)	6.19 ± 0.63	7.17 ± 0.58	7.33 ± 1.20 *	5.88 ± 0.31 #	7.33 ± 0.78 ^
°CHL (mmol/L)	1.38 ± 0.15	1.45 ± 0.23	1.37 ± 0.24	1.35 ± 0.13	2.18 ± 0.48 □ ^
°HDL (mmol/L)	1.21 ± 0.13	0.64 ± 0.09	0.84 ± 0.26 *	1.12 ± 0.11 #	1.47 ± 0.29 □ ^
°TGL (mmol/L)	0.89 ± 0.16	0.77 ± 0.17	0.95 ± 0.33	0.91 ± 0.21	1.18 ± 0.30
°AST (U/L)	343.20 ± 76.03	222.80 ± 49.56	352.91 ± 119.57	331.00 ± 36.26 #	190.29 ± 30.32 □ ^
°ALT (U/L)	129.20 ± 25.47	69.50 ± 8.77	76.27 ± 28.34	121.40 ± 13.33 #	61.14 ± 11.91 ^
°ALP (U/L)	497.90 ± 71.15	347.80 ± 70.38	391.55 ± 156.74*	540.40 ± 119.90 #	346.00 ± 80.41 ^
°TP (g/L)	62.20 ± 2.35	60.60 ± 1.96	52.55 ± 5.39*	58.20 ± 2.97	52.43 ± 2.82 ^
°ALB (g/L)	36.40 ± 0.84	30.40 ± 1.58	29.36 ± 2.87*	34.30 ± 1.34 #	22.43 ± 1.62 □
°UA (µmol/L)	74.40 ± 14.28	77.20 ± 14.11	85.45 ± 22.96	62.25 ± 11.68	73.14 ± 20.05
°α-AMY (U/L)	3560.75 ± 580.49	3097.4 ± 386.83	2530.00 ± 657.01*	3856.90 ± 952.10	3460.00 ± 80.41 □ ^
°IL6 < 1.5 (pg/mL)	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)
°CRP < 2 (mg/L)	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)
°Fibrinogen < 1.8 (g/L)	7 (87.5%)	8 (100%)	6 (75 %)	3 (37.5%)	6 (75%)
°D-dimer < 0.5 (mg/L)	8 (100%)	2 (25%)	8 (100%)	6 (75 %)	7 (87.5%)
°vWF (%)	156.00 ± 37.19	15.40 ± 0.89	227.65 ± 41.01*	130.52 ± 31.34 #	36.87 ± 26.01 □ ^
°UREA (mmol/L)	13.66 ± 1.96	9.90 ± 0.54	18.27 ± 6.97	12.30 ± 2.18	22.77 ± 8.56 ^
°CREA (µmol/L)	43.90 ± 2.56	29.00 ± 1.76	47.18 ± 14.43	38.10 ± 2.92	55.71 ± 5.09 ^

hsTnT (*eng. troponin T*–troponin T), Hcy (*eng. homocysteine*–homocistein), GLUC (*eng. glucose*-glukoza), CHL (*eng. total cholesterol*–ukupni holesterol), HDL (*eng. high density lipoprotein*–lipoprotein visoke gustine), TGL (*eng. triglycerides*–trigliceridi), AST (*eng. aspartate-aminotransferase*–aspartat-aminotransferaze), ALT (*eng. alanine-aminotransferase*–alanin-aminotransferaze), ALP (*eng. alkaline phosphatase*–alkalna fofataza), TP (*eng. total proteins*–ukupni proteinia), ALB (*eng. albumin*–albumin), UA (*eng. uric acid*–mokraćna kiselina), α-AMY (*eng. α-amylase*–α-amilaza), IL-6 (*eng. interleukin 6*–interleukin 6), CRP (*eng. C-reactive protein*–C reaktivni protein), vWF (*eng. von Willebrand Factor*–von Willebrand-ov faktor), UREA (*eng. urea*-urea), CREA (*eng. creatinine*–kreatinin);

°- rezultati su prikazani u percentilima; °- rezultati su prikazani kao x±SD; ¥ - rezultati su prikazani kao n (%);

* – P < 0.05 naspram grupe K; # – P < 0.05 naspram grupe K28, □ – P < 0.05 naspram grupe M, ^ – P < 0.05 naspram grupe B6;

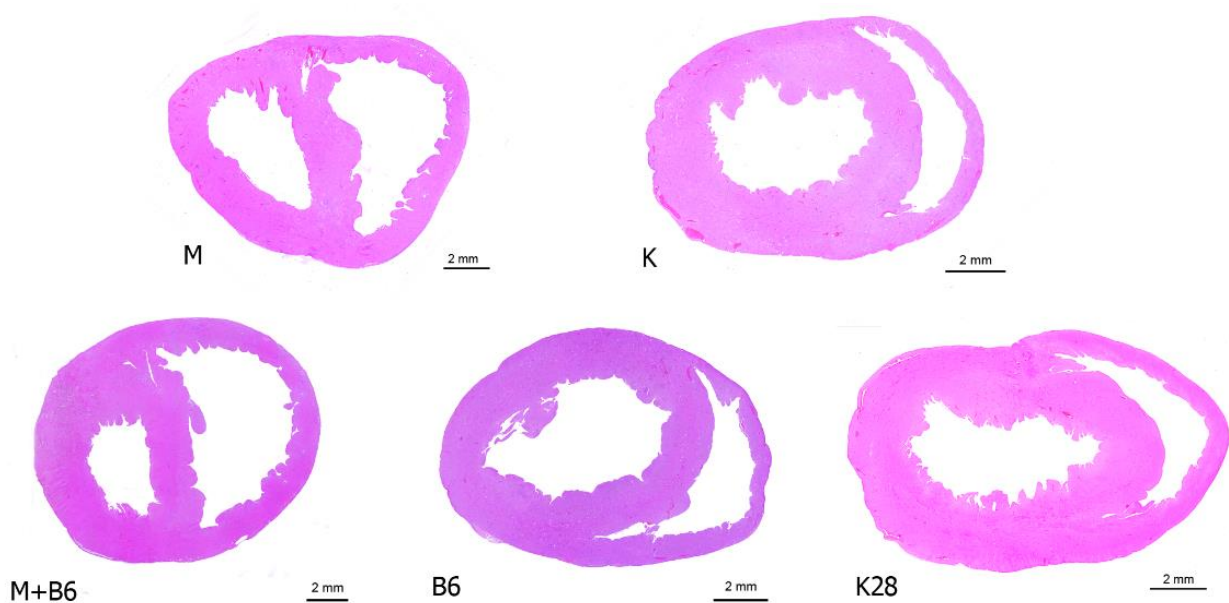
4.2.4 Histomorfometrijska analiza

Zabeležen je trend ka debljem zidu desne komore u grupi M+B6 u poređenju sa grupom M (1000.71 ± 292.25 naspram $1229.63 \pm 231.80 \mu\text{m}$). Debljina interventrikularnog septuma bila je značajno veća u grupi M+B6 u poređenju sa grupom M (2194.91 ± 410.28 naspram $1651.02 \pm 293.95 \mu\text{m}$, $p < 0.05$). Prosečna dimenzija kardiomiocita zida leve komore nije se značajno razlikovala između grupa M+B6 i M (25.21 ± 2.83 naspram $21.20 \pm 1.55 \mu\text{m}$). Nije bilo razlika između grupa B6 i K u svim analiziranim histomorfometrijskim parametrima, ali je prosečna dimenzija kardiomiocita zida leve komore bila značajno niža u grupi B6 u poređenju sa grupom K28 (17.62 ± 1.43 naspram $22.50 \pm 1.90 \mu\text{m}$, $p < 0.05$). Rezultati su prikazani u Tabeli 4.5 i na Slici 4.17.

Tabela 4.5 Histomorfometrijski i imunohistohemijski parametri srca pacova

Grupe/Parametri	K	K28	M	B6	M+B6
Debljina zida LK ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)	1950.80 ± 227.33	2363.81 ± 346.21	1676.26 ± 208.07	1943.37 ± 96.36	$2259.30 \pm 382.00 \alpha$
Debljina zida DK ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)	731.55 ± 131.26	835.48 ± 144.63	$1229.63 \pm 231.80^*$	707.58 ± 100.63	1000.71 ± 292.25
Debljina IVS ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)	1848.82 ± 144.96	2112.61 ± 296.05	1651.02 ± 293.95	1762.42 ± 79.28	$2194.91 \pm 410.28 \alpha$
Dimenzije kardiomiocita zida LK ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)	17.99 ± 1.90	22.50 ± 1.90	$21.20 \pm 1.55^*$	$17.62 \pm 1.43 \#$	$25.21 \pm 2.83 \wedge$
Ki67 (DK) (% \pm SD)	1.00 ± 0.82	1.25 ± 1.26	23.00 ± 6.38	1.60 ± 0.89	17.50 ± 10.60
Ki67 (LK) (% \pm SD)	0.75 ± 0.50	1.00 ± 0.82	16.50 ± 2.10	1.00 ± 0.71	5.00 ± 4.24
PCNA(DK) (% \pm SD)	0.20 ± 0.48	0.20 ± 0.45	7.20 ± 1.48	0.40 ± 0.55	6.3 ± 1.41
PCNA(LK) (% \pm SD)	0 ± 0	0.20 ± 0.45	2.60 ± 0.89	0.20 ± 0.45	6.6 ± 0.78

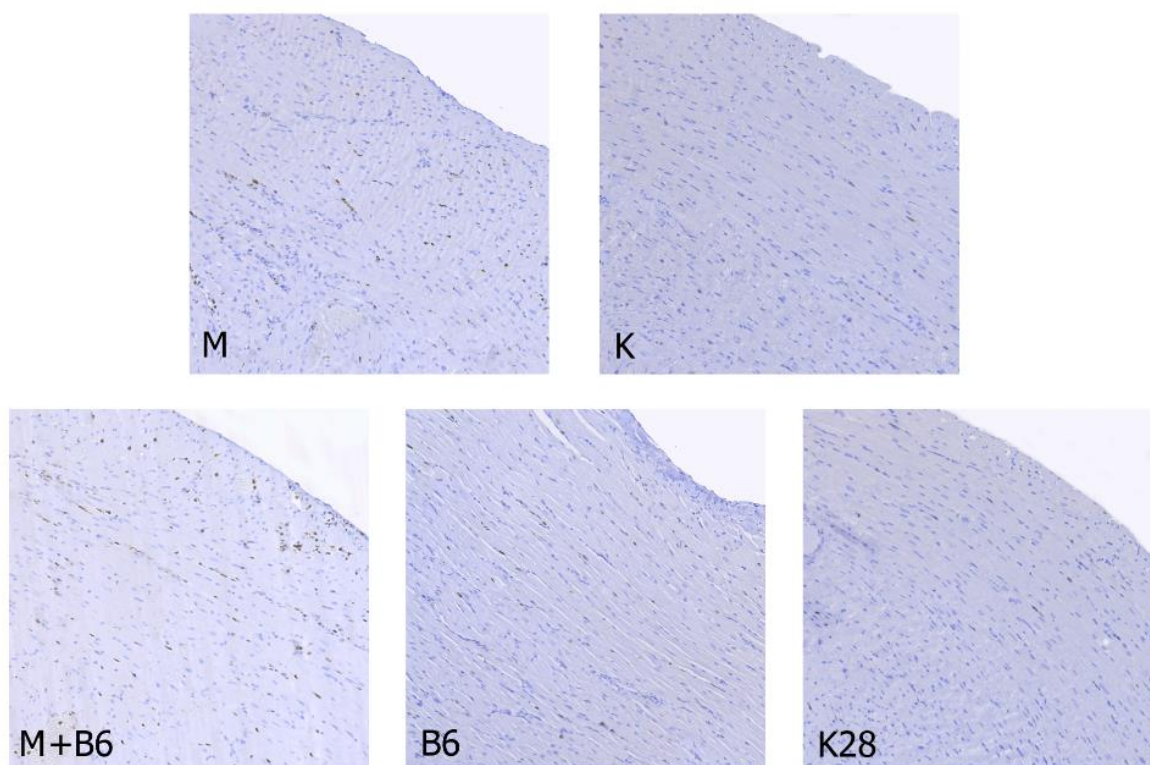
LK–leva komora; DK–desna komora; IVS–interventrikularni septum; SD–standardna devijacija * – $P < 0.05$ naspram grupe K, # – $P < 0.05$ naspram grupe K28, α – $P < 0.05$ naspram grupe M, \wedge – $P < 0.05$ naspram grupe B6



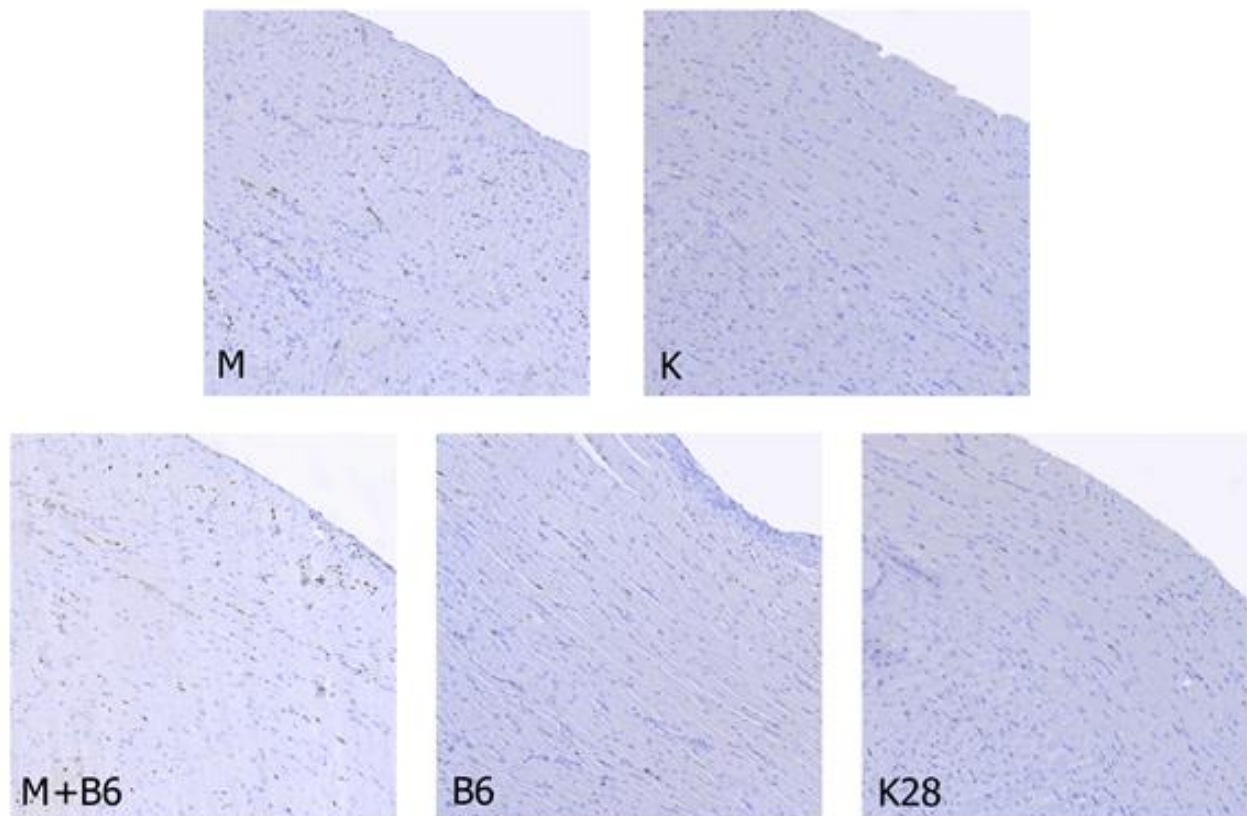
Slika 4.17 Poprečni presek srca pacova uz prikaz desne i leve komore različitih eksperimentalnih grupa (hematoksilin/eozin bojenje; K-jednokratni ip. tretman fiziološkim rastvorom; K28-fiziološki rastvor ip., svakodnevno tokom 28 dana; M-jednokratno ip., monokrotalin; B6-vitamin B6 ip., svakodnevno tokom 28 dana; M+B6-jednokratno ip. monokrotalin i vitamin B6 ip., svakodnevno tokom 28 dana)

4.2.5 Imunohistohemijska analiza

Pozitivnost Ki67 u zidu desne komore nakon intraperitonealne aplikacije vitamina B6 je smanjena u poređenju sa M grupom (M+B6 naspram M: 17.50 ± 10.60 naspram $23.00 \pm 6.38\%$). Smanjenje pozitivnosti Ki67 zabeleženo je i u zidu leve komore nakon primene vitamina B6 (M+B6 naspram M: 5.00 ± 4.24 naspram $16.50 \pm 2.10\%$). Pozitivnost PCNA u zidu desne komore nakon intraperitonealne aplikacije B6 smanjena je u poređenju sa M grupom (M+B6 naspram M: 6.3 ± 1.41 naspram $7.20 \pm 1.48\%$), dok je primećeno povećanje u zidu leve komore (M+B6 naspram M: 6.6 ± 0.78 naspram $2.60 \pm 0.89\%$). Rezultati su predstavljeni u Tabeli 4.5 i na Slikama 4.18 i 4.19.



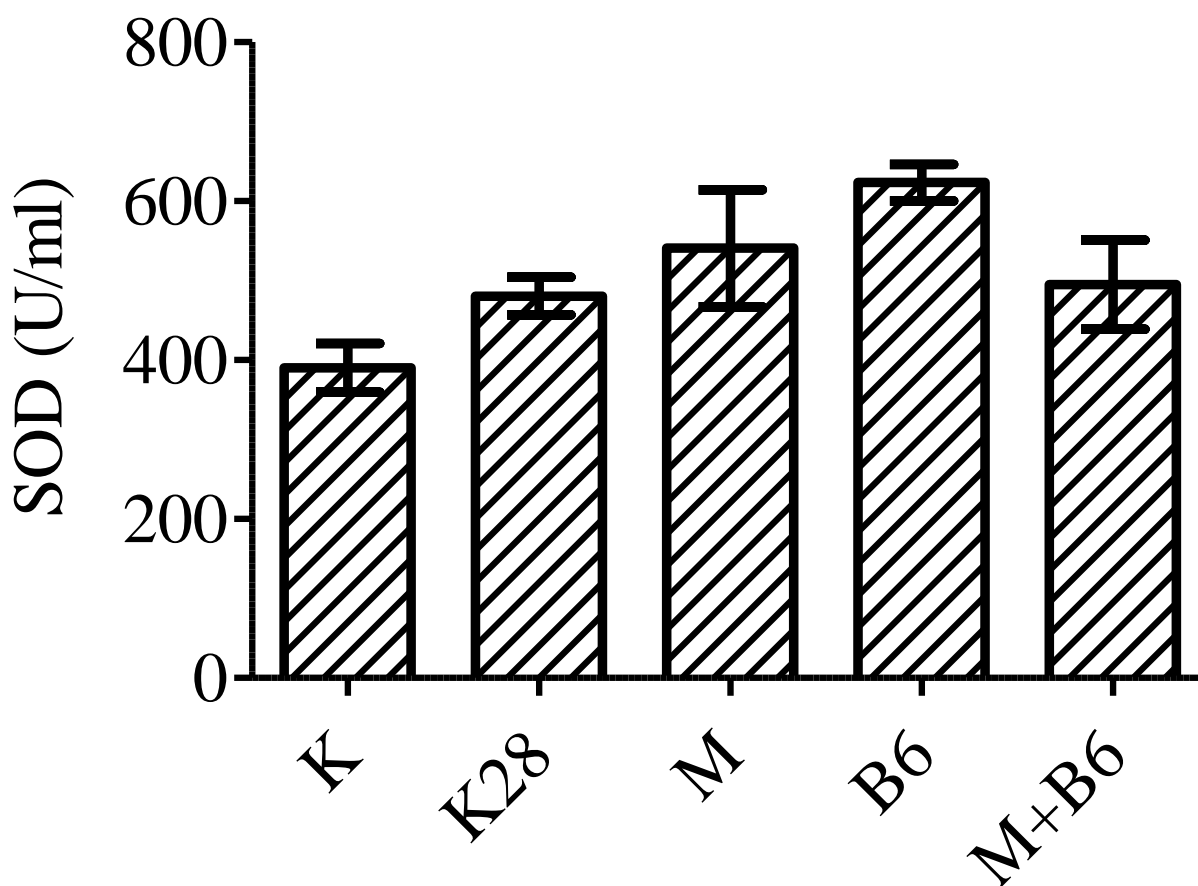
Slika 4.18 Imunohistohemijska ekspresija Ki67 u desnoj komori (K-jednokratni ip. tretman fiziološkim rastvorom; K28-fiziološki rastvor ip., svakodnevno tokom 28 dana; M-jednokratno ip., monokrotalin; B6-vitamin B6 ip., svakodnevno tokom 28 dana; M+B6-jednokratno ip. monokrotalin i vitamin B6 ip., svakodnevno tokom 28 dana)



Slika 4.19 Imunohistohemijska ekspresija PCNA u desnoj komori (K-jednokratni i.p. tretman fiziološkim rastvorom; K28-fiziološki rastvor ip., svakodnevno tokom 28 dana; M-jednokratno ip., monokrotalin; B6-vitamin B6 ip., svakodnevno tokom 28 dana; M+B6-jednokratno ip. monokrotalin i vitamin B6 ip., svakodnevno tokom 28 dana)

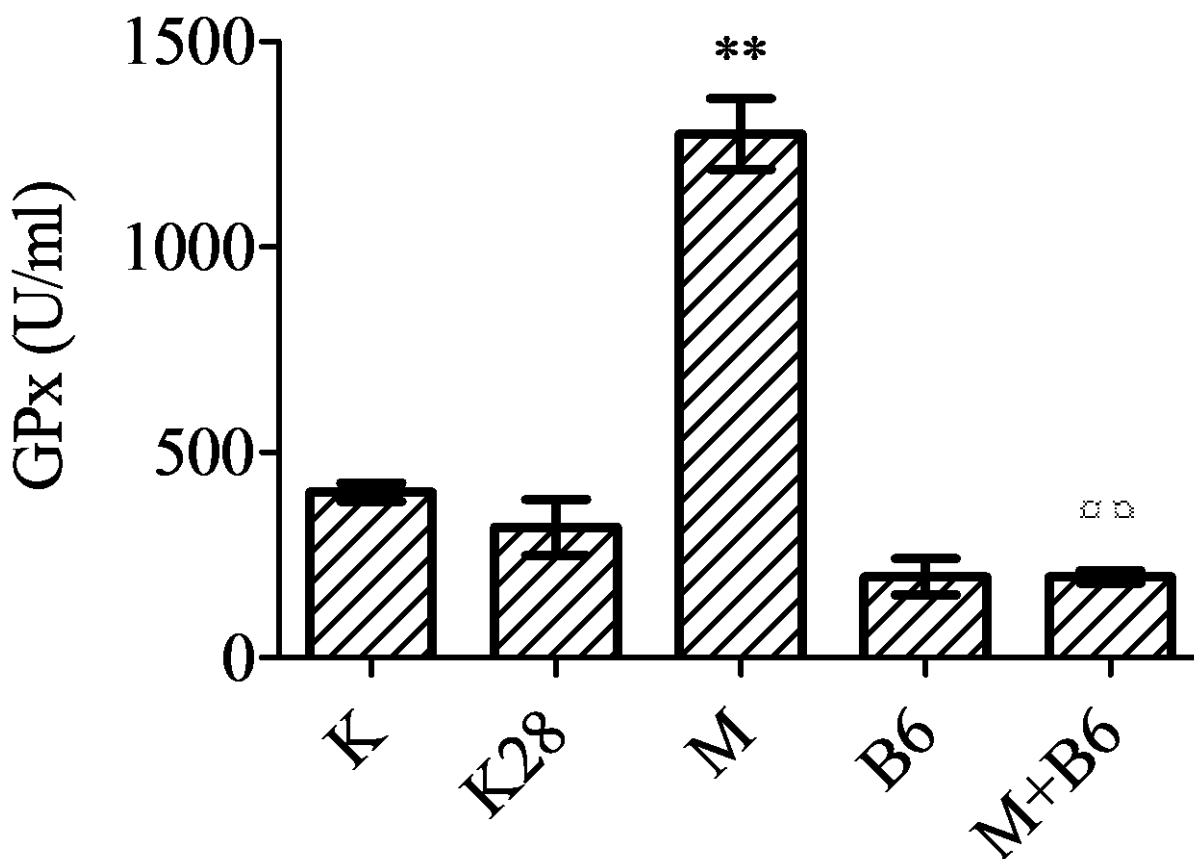
4.2.6 Analiza parametara oksidativnog stresa

Antioksidativni odbrambeni sistem, uključujući GSH, kao snažni antioksidans i ključni antioksidativni enzimi SOD i GPx, zajedno sa parametrima oksidativnog oštećenja proteina, kao što su tiol grupe, karbonilne grupe i nitrotirozin, procenjeni su u svim testiranim grupama. Nakon primene vitamina B6, aktivnost SOD-a je blago smanjena u grupi M+B6 u poređenju sa M grupom (495.00 ± 96.42 naspram 480.60 ± 53.43 U/ml) (Slika 4.20), dok je aktivnost GPx-a visoko statistički značajno smanjena u grupi M + B6 u poređenju sa M grupom (197.27 ± 29.90 naspram 317.60 ± 151.48 U/ml, $p < 0.01$) (Slika 4.21). Vrednosti ukupnog GSH imale su trend porasta u M+B6 grupi u poređenju sa M grupom (33.23 ± 3.06 naspram 70.62 ± 11.44 nmol/mg proteina) (Slika 4.22). Intraperitonealna aplikacija vitamina B6 sa monokrotalin indukovanom SI veoma je povećala sadržaj tiol grupa u poređenju sa M grupom (211.71 ± 38.96 naspram 308.45 ± 39.24 $\mu\text{mol/g}$ proteina) (Slika 4.23). Sadržaj RCD i nitrotirozina pokazao je sličan trend u poređenju sa M grupom, ali bez postizanja statističke značajnosti (26.99 ± 13.68 naspram 18.22 ± 5.40 $\mu\text{mol/g}$ proteina i 5.13 ± 0.35 naspram 5.23 ± 0.82 nmol/L, redom) (Slike 4.24 i 4.25).



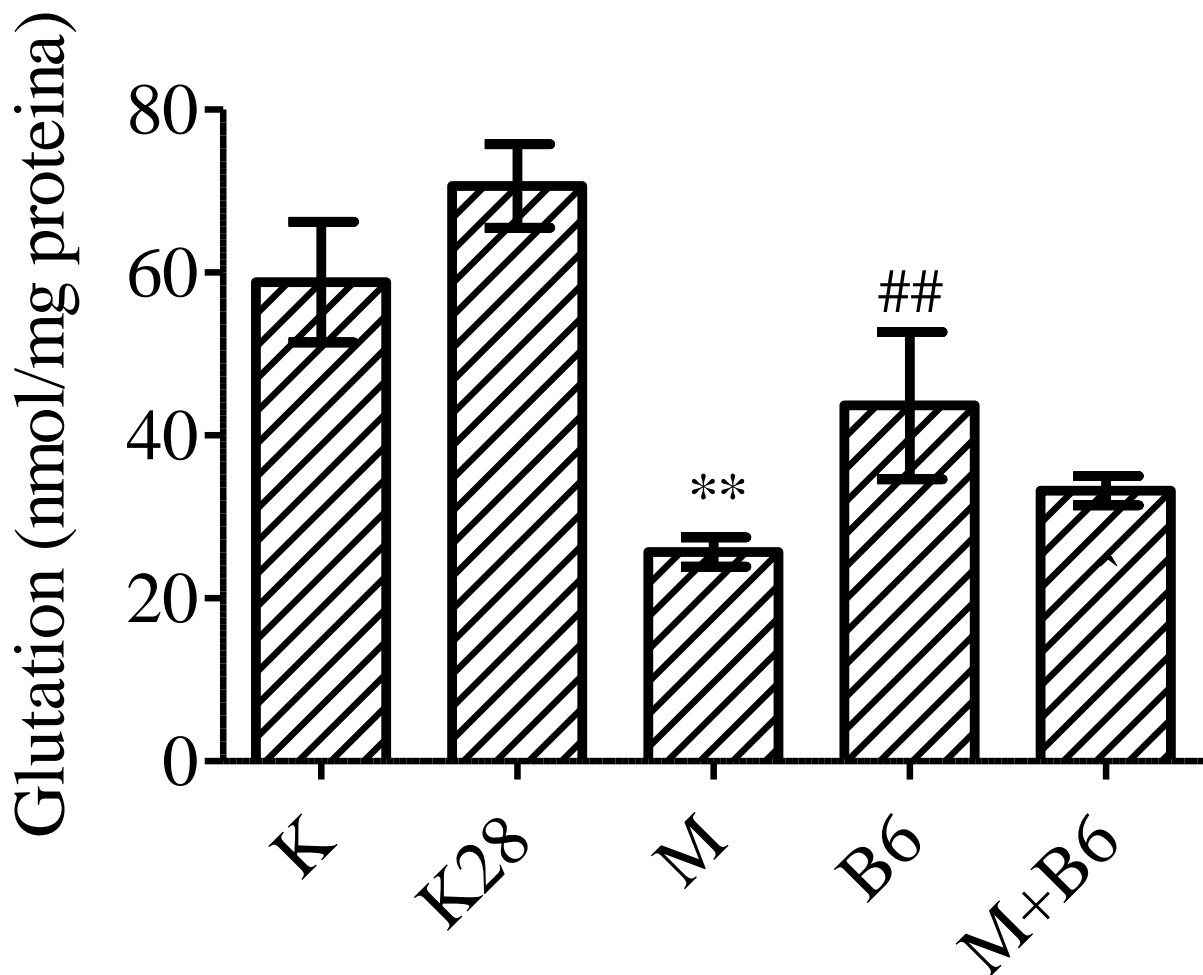
Slika 4.20 Aktivnost SOD u srčanom tkivu pacova

K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); K28-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. 28 dana); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg u fiziološkom rastvoru 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); B6 (vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvor 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); M+B6 (M 50mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. jednokratno i vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana)



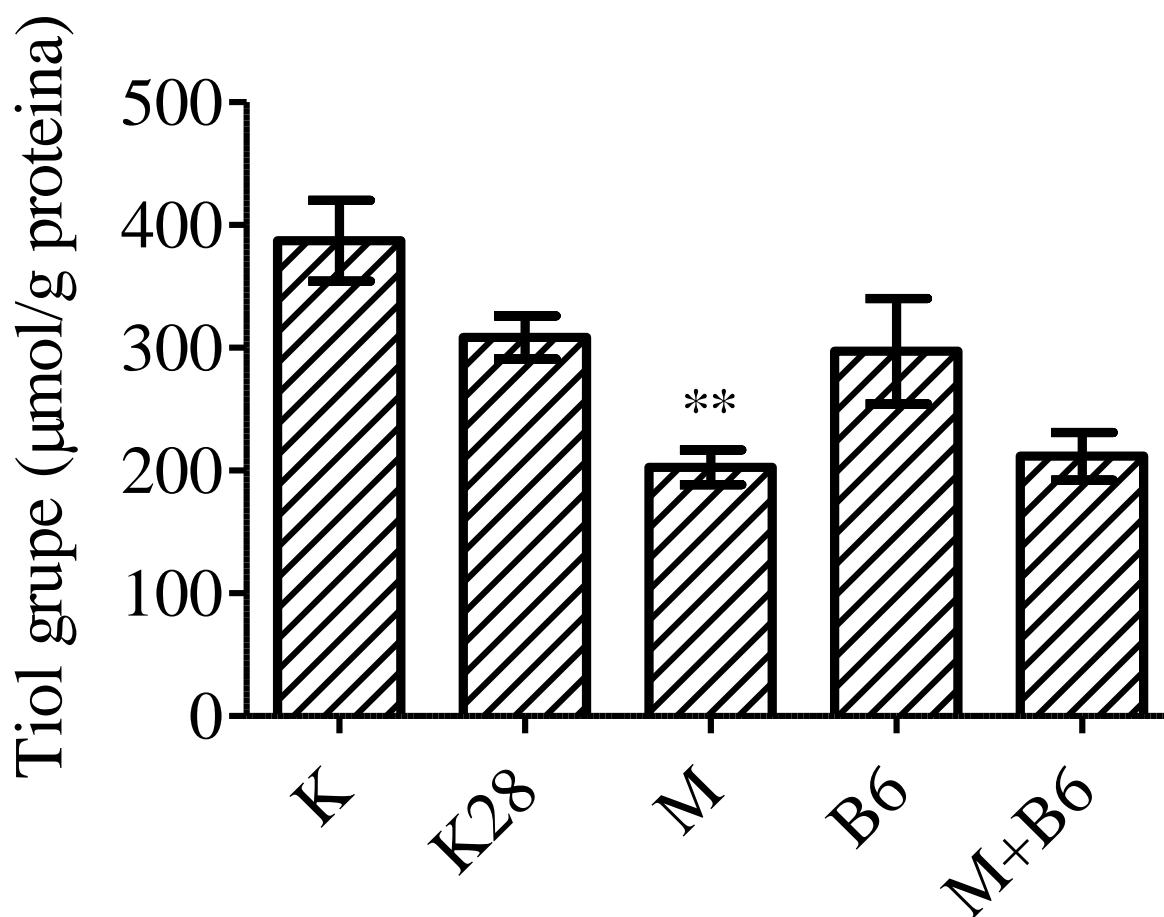
Slika 4.21 Aktivnost GPx u srčanom tkivu pacova

K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); K28-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. 28 dana); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg u fiziološkom rastvoru 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); B6 (vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvor 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); M+B6 (M 50mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. jednokratno i vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); * *- P < 0.01 naspram grupe K, □□- P < 0.01 naspram grupe M



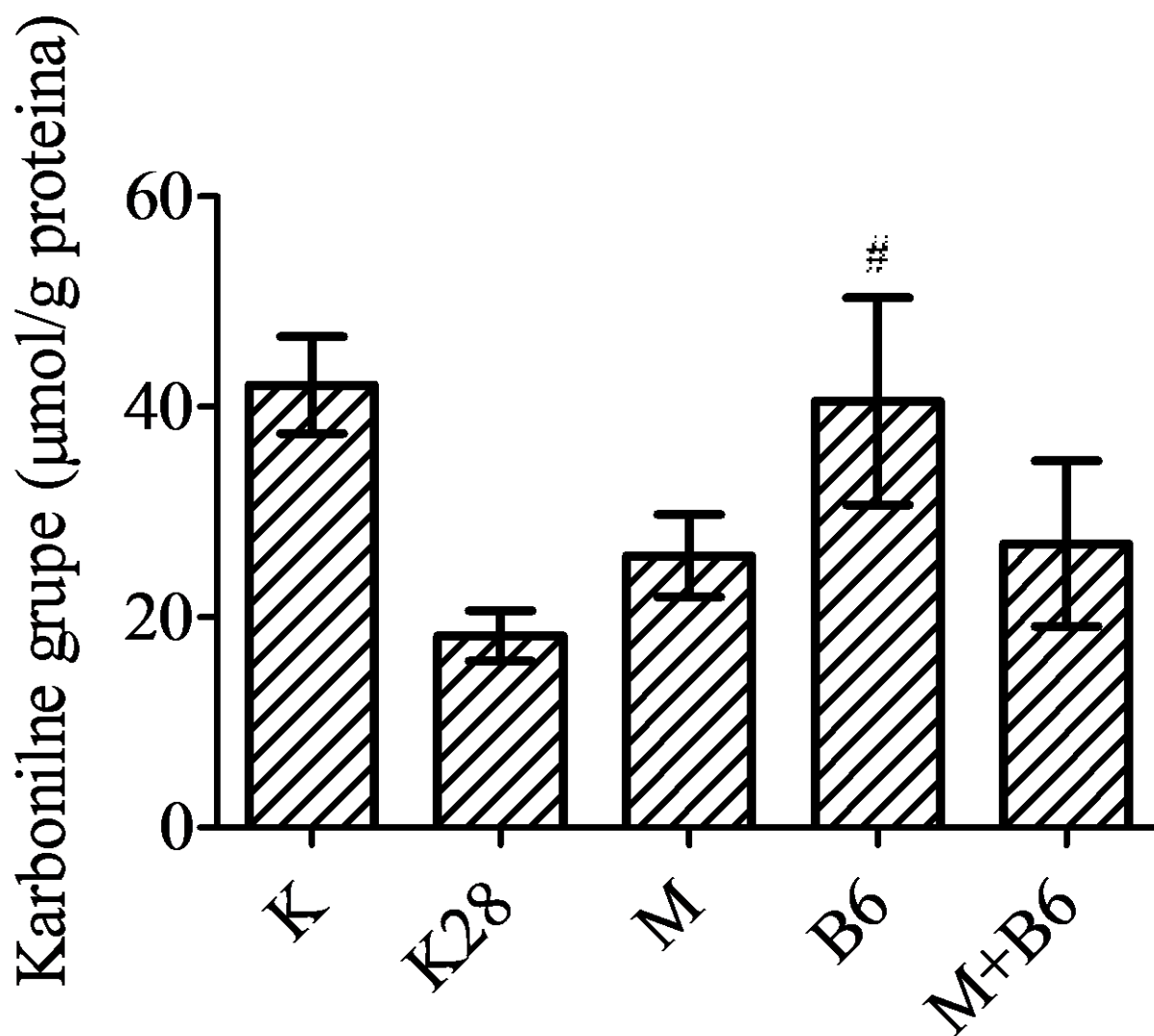
Slika 4.22 Sadržaj glutationa u srčanom tkivu pacova

K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); K28-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. 28 dana); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg u fiziološkom rastvoru 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); B6 (vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvor 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); M+B6 (M 50mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. jednokratno i vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); ##– P < 0.01 naspram grupe K, ^ – P < 0.05 naspram grupe B6



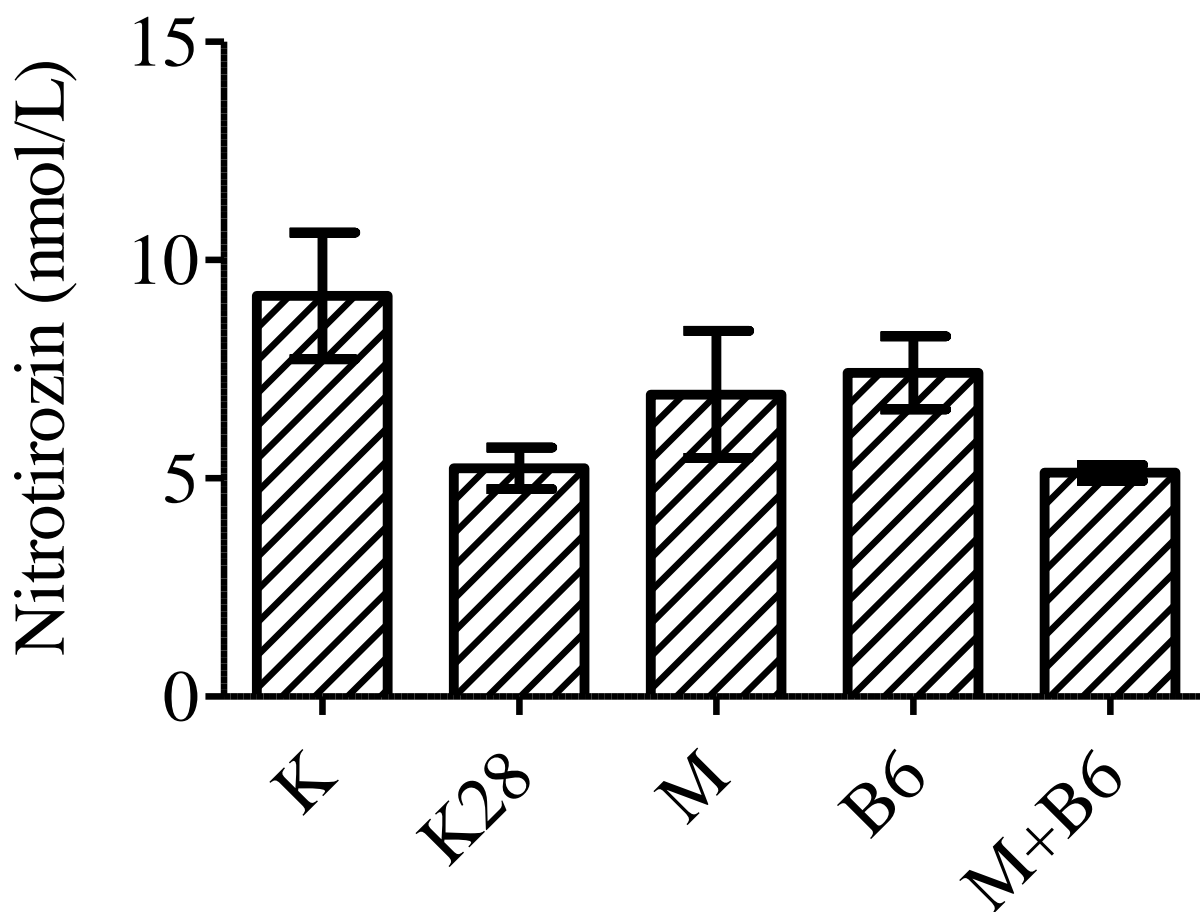
Slika 4.23 Sadržaj tiol grupa u srčanom tkivu pacova

K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); K28-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. 28 dana); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg u fiziološkom rastvoru 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); B6 (vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvor 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); M+B6 (M 50mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. jednokratno i vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); * *- P < 0.01 naspram grupe K



Slika 4.24 Sadržaj karbonilnih grupa u srčanom tkivu pacova

K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); K28-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. 28 dana); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg u fiziološkom rastvoru 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); B6 (vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvor 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); M+B6 (M 50mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. jednokratno i vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); #- P < 0.01 naspram grupe K

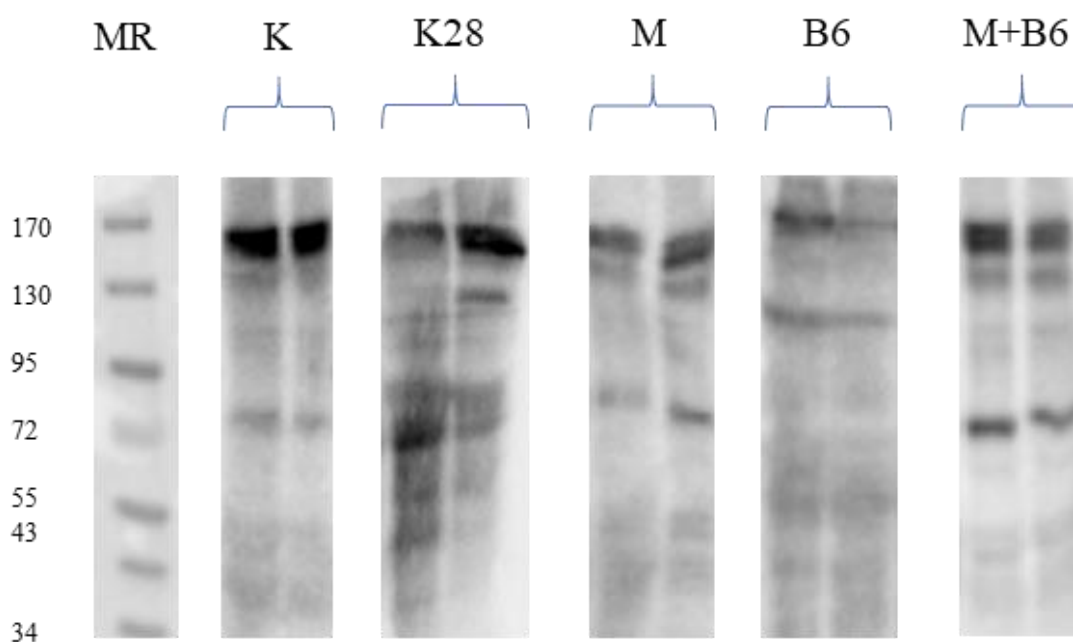


Slika 4.25 Sadržaj nitrotirozina u srčanom tkivu pacova

K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); K28-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. 28 dana); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg u fiziološkom rastvoru 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); B6 (vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvor 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); M+B6 (M 50mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. jednokratno i vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana)

4.2.7 Determinacija ukupne S-glutationilacije

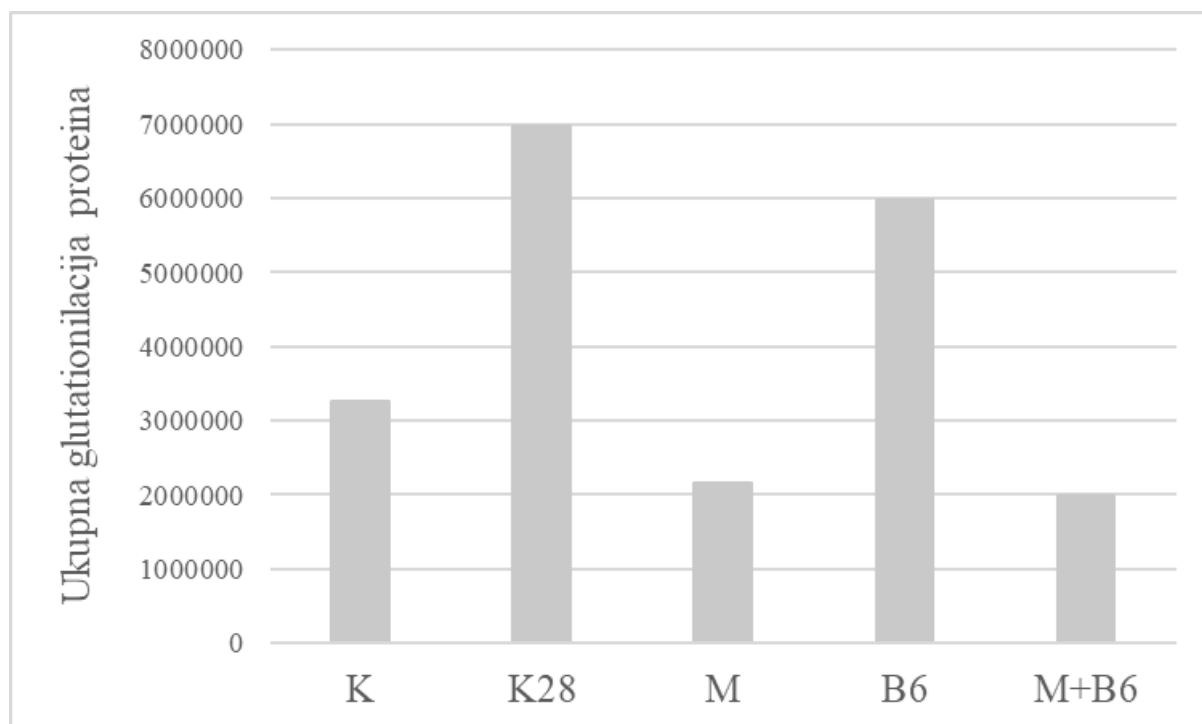
Nivo glutacionilacije ukupnih proteina procenjen je *Western blot*-om u pet grupa uzoraka (K, K28, M, B6 i M+B6). Monoklonsko antitelo protiv glutaciona korišćeno je za ispitivanje ukupne glutacionilacije proteina. Slika 4.26 prikazuje trake koje reaguju sa antitelom protiv glutaciona u pet ispitivanih grupa uzoraka (K, K28, M, B6 i M+B6). Ukupni nivo glutacionilacije je blago smanjen u grupi M+B6 u poređenju sa grupom M bez statistički značajne vrednosti ($p=0.686$) (Slika 4.27). Densitometrijska analiza je takođe pokazala smanjen nivo glutacionilacije proteina u grupi M+B6 u poređenju sa grupom B6 sa graničnim značajem ($p=0.057$). Nije bilo statistički značajne promene kada su upoređene grupe K28 i B6.



Slika 4.26 Nivo ukupne glutacionilacije proteina *Western blot*-om

MR-marker molekularne težine (kDA)

K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); K28-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. 28 dana); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg u fiziološkom rastvoru 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); B6 (vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvor 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); M+B6 (M 50mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. jednokratno i vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana)

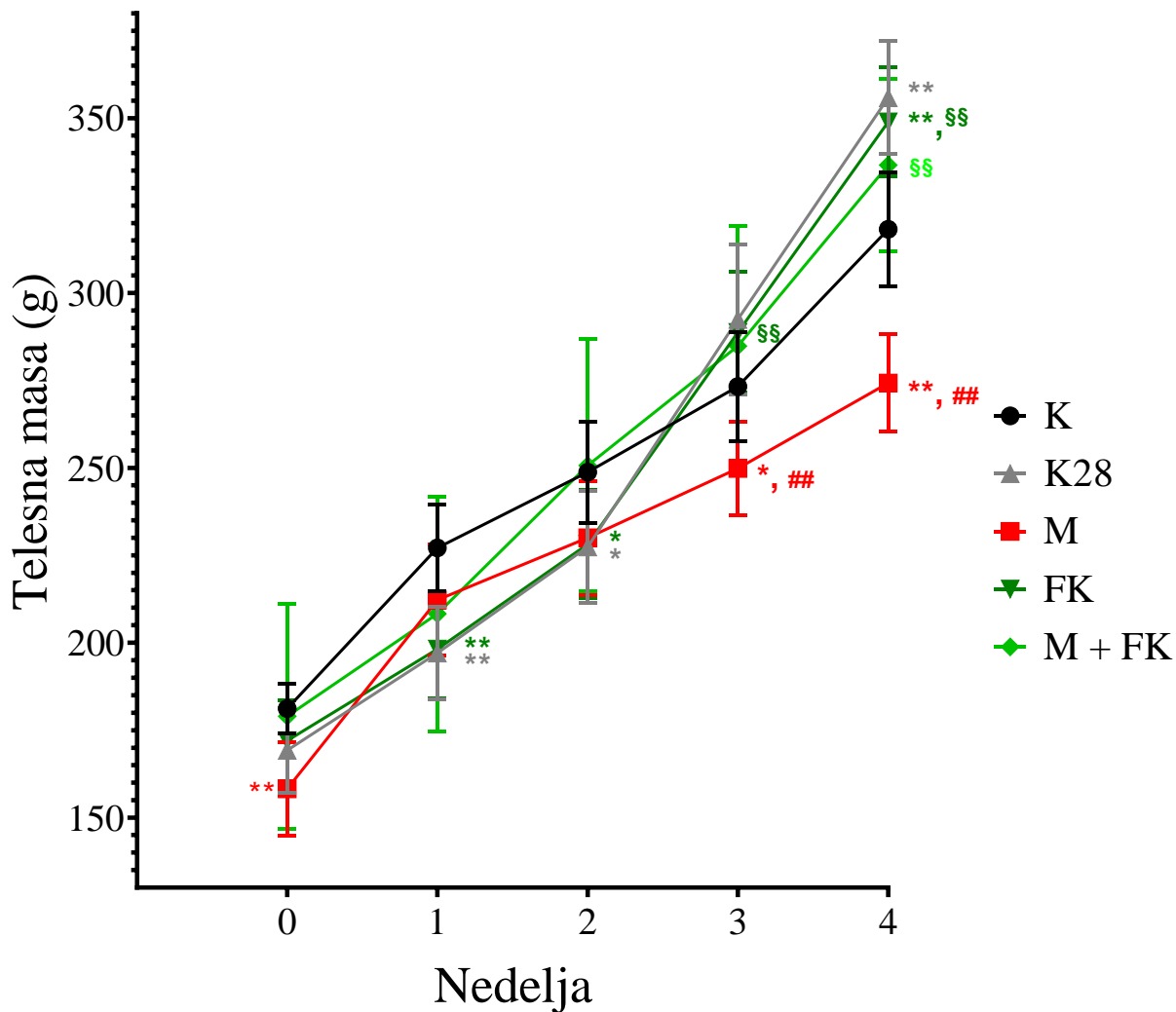


Slika 4.27 Denzitometrijska analiza dobijenih *blot*-ova - softver ImageLab (Bio-Rad, SAD)
 K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); K28-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. 28 dana); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg u fiziološkom rastvoru 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); B6 (vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvor 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); M+B6 (M 50mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. jednokratno i vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana)

4.3 APLIKACIJA FOLNE KISELINE (VITAMINA B9)

4.3.1 Promena telesne mase eksperimentalnih životinja

Na Slici 4.28 je predstavljena dinamika promene telesnih masa pacova u grupama K, K28, M, FK i M+FK kroz nedelje eksperimentalnog protokola.

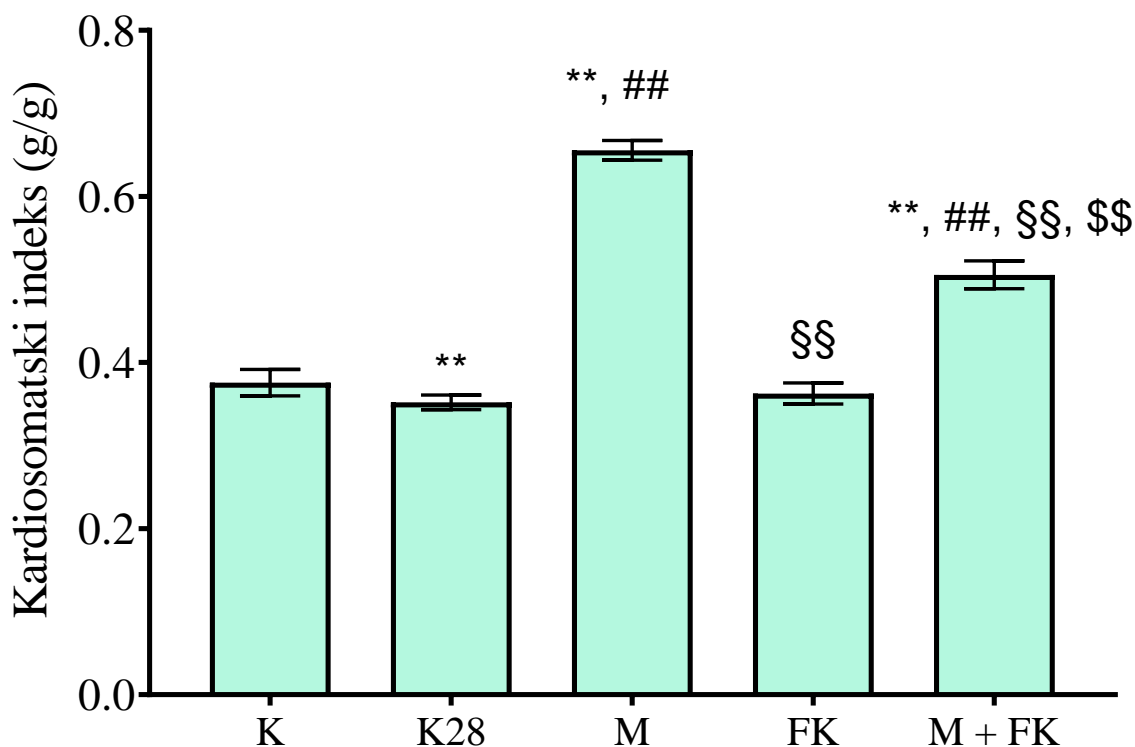


Slika 4.28 Promena telesne mase eksperimentalnih životinja u grupama K, K28, M, FK i M+FK kroz nedelje eksperimentalnog protokola.

* $p < 0.05$ vs. K, ** $p < 0.01$ vs. K, ## $p < 0.01$ vs. K28, §§ $p < 0.01$ vs. M – Two-Way ANOVA with Tukey posthoc test

4.3.2 Razlika u vrednosti kardiosomatskog indeksa između eksperimentalnih životinja

Na Slici 4.29 su prikazane vrednosti KSI eksperimentalnih životinja K, K28, M, FK i M+FK grupe. Uočava se statistički značajno povećanje vrednosti KSI kod životinja M grupe u odnosu na kontrolu ($p < 0.01$). Kod životinja koje su bile tretirane folnom kiselinom životinja u uslovima srčane insuficijencije koja je izazvana aplikacijom monokrotalina vrednosti KSI su statistički značajno niže u odnosu na vrednosti životinja M grupe ($p < 0.01$).



Slika 4.29 Razlika u vrednosti KSI između eksperimentalnih životinja K, K28, M, FK i M+FK grupe

** $p < 0.01$ vs. K, ## $p < 0.01$ vs. K28, §§ $p < 0.01$ vs. M, \$\$ $p < 0.01$ vs. FK – One-way ANOVA sa Tukey posthoc testom

4.3.3 Biohemijska analiza

Troponin T je bio značajno viši u M+FK grupi u poređenju sa FK grupom (139 (94-161) naspram 29 (18-40) ng/L, $p < 0.05$). Nije bilo razlike u nivoima Hcy između M+FK i M grupe. Uočena je tendencija smanjenja nivoa glukoze nakon primene folne kiseline (M+FK naspram M: 6.91 ± 1.65 naspram 7.33 ± 1.20 mmol/L). Ukupni holesterol je bio značajno viši u M+FK grupi u poređenju sa M grupom (2.04 ± 1.20 naspram 1.37 ± 0.24 mmol/L, $p < 0.05$) i FK grupom (2.04 ± 1.20 naspram 1.38 ± 0.12 mmol/L, $p < 0.05$), dok nije bilo razlike u ostalim parametrima lipidnog profila (HDL i TGL) među ovim grupama.

Markeri bubrežne i jetrine funkcije nisu se razlikovali između M+FK i M grupe (UREA, CREA, AST, ALT), dok je ALP aktivnost bila značajno niža u M+FK u poređenju sa M i FK grupama (195.14 ± 64.51 naspram 391.55 ± 156.74 U/L, 195.14 ± 64.51 naspram 400.70 ± 67.17 U/L, redom, $p < 0.05$). Vrednost TP značajno se smanjila u M+FK grupi u poređenju sa FK grupom (50.29 ± 4.35 naspram 60.40 ± 2.68 g/L, $p < 0.05$), dok je nivo ALB značajno opao u odnosu na FK grupu, ali i u odnosu na M grupu (23.00 ± 3.46 naspram 33.60 ± 1.07 g/L, 23.00 ± 3.46 naspram 29.36 ± 2.87 g/L, redom, $p < 0.05$). Nakon primene folne kiseline koncentracija UA se nije značajno promenila u odnosu na M grupu. Nivo vWF značajno se smanjio u grupi M+FK u odnosu na M grupu (150.39 ± 89.72 naspram $227,65 \pm 41,01\%$, $p < 0.05$), ali je značajno porastao u poređenju sa FK grupom (150.39 ± 89.72 naspram $14.00 \pm 0.00\%$, $p < 0.05$).

Srednja aktivnost α -amilaze bila je značajno niža u grupi M+FK u poređenju sa FK grupom (1930.00 ± 1206.50 naspram 3087.90 ± 426.55 U/L, $p < 0.05$). Inflamatorni markeri, IL-6, CRP i fibrinogen bili su ispod granice detekcije, kao i D-dimer (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 Biohemijski parametri u serumu/plazmi eksperimentalnih životinja

Grupe/ parametri	K	K28	M	FK	M+FK
¥ hsTnT (ng/L)	17 (16-25)	25 (19-37)	199 (58-251)*	29 (18-40)	139(94-161)^
°Hcy (µmol/L)	8.36 ± 2.48	10.19 ± 3.87	8.01 ± 1.08	11.80 ± 1.85	7.34 ± 3.18 ^
°GLUC (mmol/L)	6.19 ± 0.63	7.17 ± 0.58	7.33 ± 1.20 *	7.10 ± 0.38	6.91 ± 1.65
°CHL (mmol/L)	1.38 ± 0.15	1.45 ± 0.23	1.37 ± 0.24	1.38 ± 0.12	2.04 ± 1.20 □ ^
°HDL (mmol/L)	1.21 ± 0.13	0.64 ± 0.09	0.84 ± 0.26 *	0.57 ± 0.04	0.95 ± 1.00
°TGL (mmol/L)	0.89 ± 0.16	0.77 ± 0.17	0.95 ± 0.33	0.88 ± 0.22	1.06 ± 0.32
°AST (U/L)	343.20 ± 76.03	222.80 ± 49.56	352.91 ± 119.57	203.50 ± 25.33	485.14 ± 777.90
°ALT (U/L)	129.20 ± 25.47	69.50 ± 8.77	76.27 ± 28.34	73.10 ± 8.91	119.43 ± 189.28
°ALP (U/L)	497.90 ± 71.15	347.80 ± 70.38	391.55 ± 156.74*	400.70 ± 67.17	195.14 ± 64.51□ ^
°TP (g/L)	62.20 ± 2.35	60.60 ± 1.96	52.55 ± 5.39*	60.40 ± 2.68	50.29 ± 4.35^
°ALB (g/L)	36.40 ± 0.84	30.40 ± 1.58	29.36 ± 2.87*	33.60 ± 1.07#	23.00 ± 3.46 □ ^
°UA (µmol/L)	74.40 ± 14.28	77.20 ± 14.11	85.45 ± 22.96	70.80 ± 12.78	88.86 ± 25.65
°α-AMY (U/L)	3560.75 ± 580.49	3097.4 ± 386.83	2530.00 ± 657.01*	3087.90 ± 426.55	1930.00 ± 1206.5 ^
¥IL-6 < 1.5 (pg/mL)	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)
¥CRP < 2 (mg/L)	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)
¥Fibrinogen < 1.8 (g/L)	6 (75%)	8 (100%)	6 (75%)	8 (100%)	7 (87.5%)
¥D-dimer < 0.5 (mg/L)	8 (100%)	2 (25%)	8 (100%)	0 (0%)	7 (87.5%)
¥vWF (%)	156.00 ± 37.19	15.40 ± 0.89	227.65 ± 41.01	14.00 ± 0.00	150.39 ± 89.72□ ^
°UREA (mmol/L)	13.66 ± 1.96	9.90 ± 0.54	18.27 ± 6.97	9.55 ± 0.97	22.06 ± 14.54
°CREA (µmol/L)	43.90 ± 2.56	29.00 ± 1.76	47.18 ± 14.43	33.60 ± 3.20	42.43 ± 21.45

hsTnT (*eng. troponin T*–troponin T), Hcy (*eng. homocysteine*–homocistein), GLUC (*eng. glucose*-glukoza), CHL (*eng. total cholesterol*–ukupni holesterol), HDL (*eng. high density lipoprotein*–lipoprotein visoke gustine), TGL (*eng. triglycerides*–trigliceridi), AST (*eng. aspartate-aminotransferase*–aspartat-aminotransferaze), ALT (*eng. alanine-aminotransferase*–alanin-aminotransferaze), ALP (*eng. alkaline phosphatase*–alkalna fofataza), TP (*eng. total proteins*–ukupni proteinia), ALB (*eng. albumin*–albumin), UA (*eng. uric acid*–mokraćna kiselina), α-AMY (*eng. α-amylase*–α-amilaza), IL-6 (*eng. interleukin 6*–interleukin 6), CRP (*eng. C-reactive protein*–C reaktivni protein), vWF (*eng. von Willebrand Factor*–von Willebrand-ov faktor), UREA (*eng. urea*-urea), CREA (*eng. creatinine*–kreatinin);

¥- rezultati su izraženi u percentilima; °- rezultati su prikazani kao x±SD; ¥- rezultati su prikazani kao n (%); * – P < 0.05 naspram grupe K, # – P < 0.05 naspram grupe K28, □ – P < 0.05 naspram grupe M, ^ – P < 0.05 naspram grupe FK

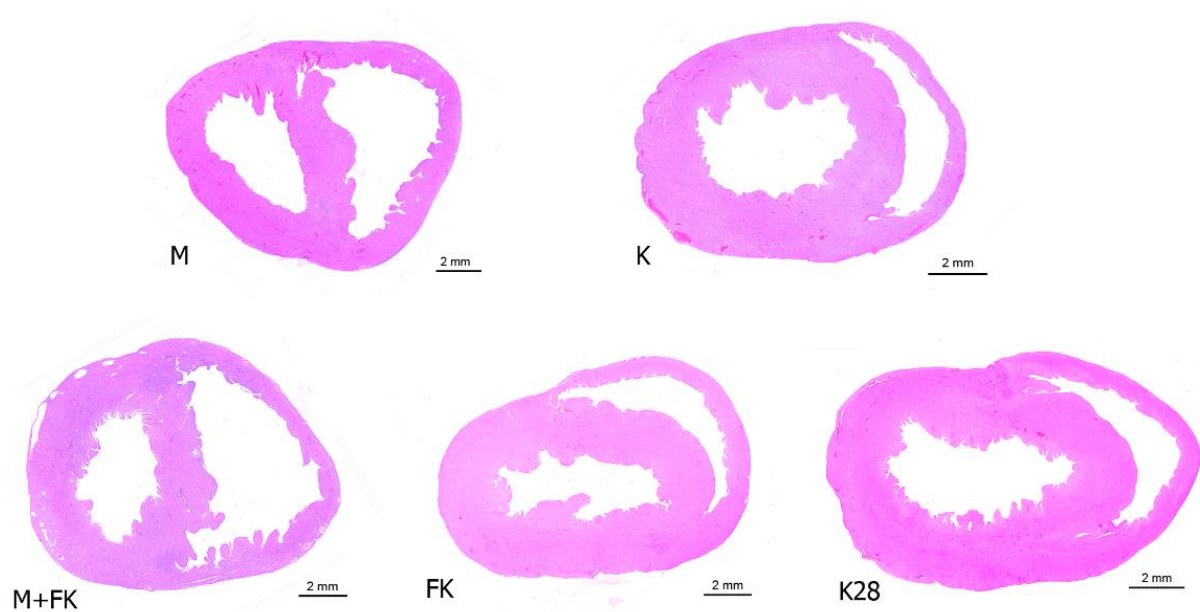
4.3.4 Histomorfometrijska analiza

Postojao je trend ka debljem zidu DK u grupi M+FK u poređenju sa M grupom (1075.77 ± 355.29 naspram $1229.63 \pm 231.80 \mu\text{m}$). Debljina interventrikularnog septuma bila je značajno veća u M+FK grupi u poređenju sa M grupom (2261.46 ± 205.85 naspram $1651.02 \pm 293.95 \mu\text{m}$, $p < 0.05$). Prosečna dimenzija kardiomiocita slobodnog zida LK nije se značajno razlikovala između M+FK i M grupe (23.62 ± 2.15 naspram $21.20 \pm 1.55 \mu\text{m}$). Nije bilo razlike između FK i K28 grupe u svim analiziranim histomorfometrijskim parametrima. Rezultati su prikazani u Tabeli 4.7 i na Slici 4.30.

Tabela 4.7 Histomorfometrijski i imunohistihemijski parametri srca pacova

Grupe/Parametri	K	K28	M	FK	M+FK
Debljina zida LK ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)	1950.80 ± 227.33	2363.81 ± 346.21	1676.26 ± 208.07	2366.60 ± 210.33	2222.78 ± 536.35
Debljina zida DK ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)	731.55 ± 131.26	835.48 ± 144.63	$1229.63 \pm 231.80^*$	880.76 ± 104.40	1075.77 ± 355.29
Debljina IVS ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)	1848.82 ± 144.96	2112.61 ± 296.05	1651.02 ± 293.95	2172.36 ± 234.10	$2261.46 \pm 205.85^{\#}$
Dimenzija kardiomiocita zida LK ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)	17.99 ± 1.90	22.50 ± 1.90	$21.20 \pm 1.55^*$	22.20 ± 1.14	23.62 ± 2.15
Ki67 (DK) (% \pm SD)	1.00 ± 0.82	1.25 ± 1.26	23.00 ± 6.38	1.35 ± 5.34	9.00 ± 1.23
Ki67 (LK) (% \pm SD)	0.75 ± 0.50	1.00 ± 0.82	16.50 ± 2.10	1.55 ± 6.61	9.00 ± 0.52
PCNA(DK) (% \pm SD)	0.20 ± 0.48	0.20 ± 0.45	7.20 ± 1.48	0.40 ± 0.55	5.33 ± 1.53
PCNA(LK) (% \pm SD)	0 ± 0	0.20 ± 0.45	2.60 ± 0.89	0.20 ± 0.45	3.00 ± 1.00

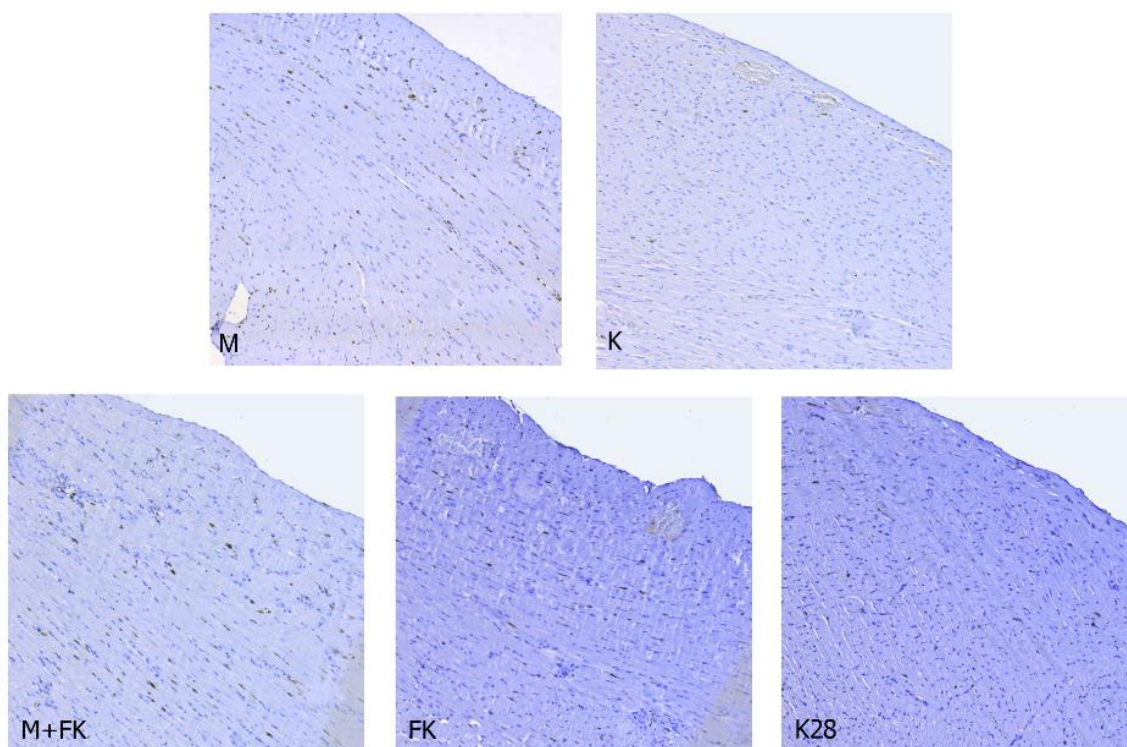
LK–leva komora; DK–desna komora; IVS–interventrikularni septum; SD–standardna devijacija * – $P < 0.05$ naspram grupe K, # – $P < 0.05$ naspram grupe K28, ^ – $P < 0.05$ naspram grupe M, ^ – $P < 0.05$ naspram grupe FK



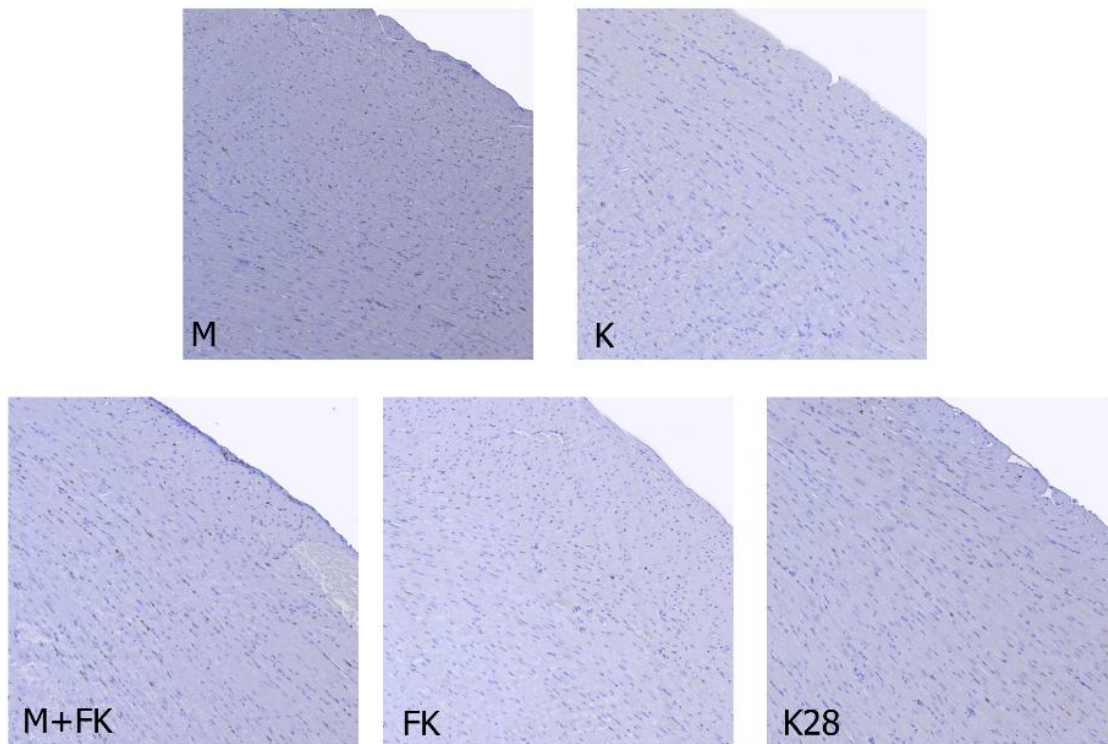
Slika 4.30 Poprečni presek srca pacova uz prikaz desne i leve komore različitih eksperimentalnih grupa (hematoksilin/eozin bojenje; K-jednokratni ip. tretman fiziološkim rastvorom; K28-fiziološki rastvor ip., svakodnevno tokom 28 dana; M-jednokratno ip., monokrotalin; FK-vitamin B9 ip., svakodnevno tokom 28 dana; M+FK- jednokratno ip. monokrotalin i vitamin B9 ip., svakodnevno tokom 28 dana)

4.3.5 Imunohistohemijska analiza

Pozitivnost Ki67 u zidu desne komore značajno se smanjila nakon primene folne kiseline (M+FK u odnosu na M, 9.00 ± 1.23 naspram $23.00 \pm 6.38\%$, $p < 0.05$). Pozitivnost PCNA u zidu desne komore nakon intraperitonealne aplikacije FK smanjena je u poređenju sa M grupom (M+FK naspram M: 5.33 ± 1.53 naspram $7.20 \pm 1.48\%$), dok je u zidu leve komore primećen blagi porast nakon aplikacije FK u poređenju sa M grupom (M+FK naspram M: 3.00 ± 1.00 naspram $2.60 \pm 0.89\%$). Rezultati su prikazani u Tabeli 4.7 i na Slikama 4.31 i 4.32.



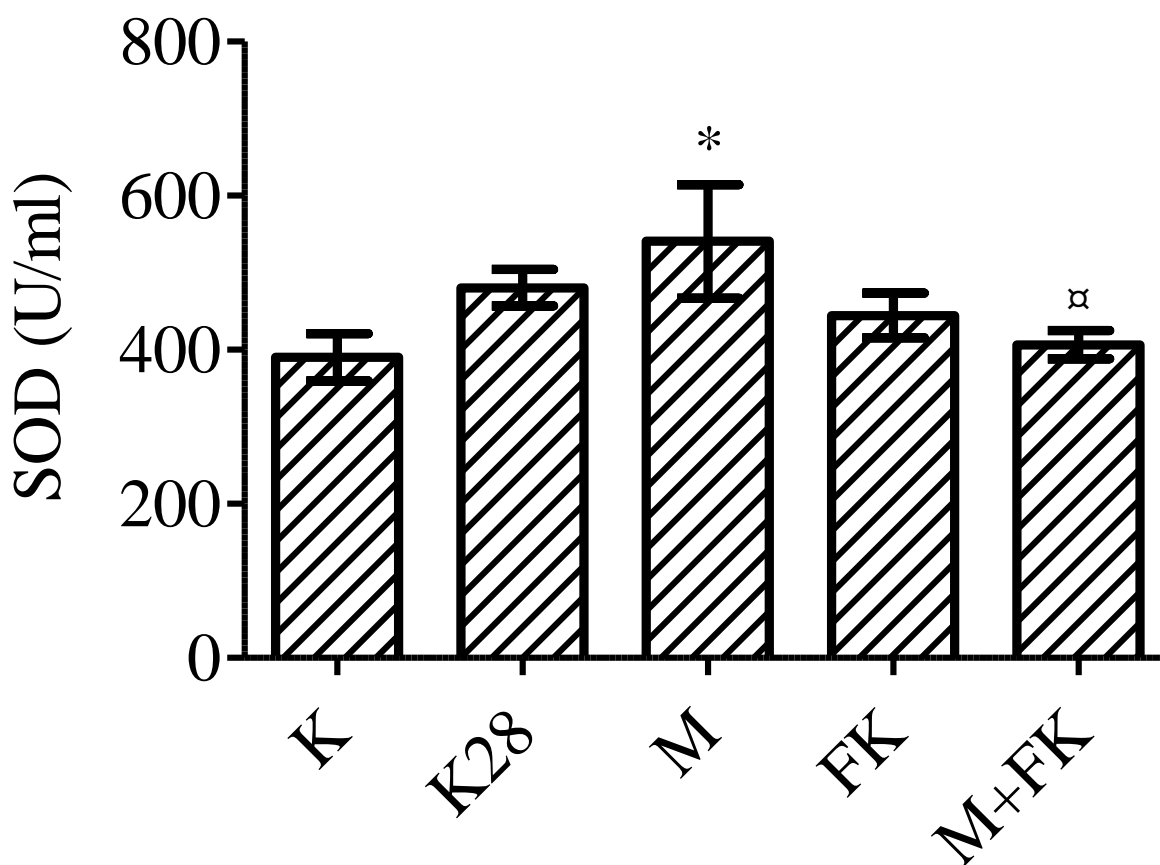
Slika 4.31 Imunohistohemijska ekspresija Ki67 u desnoj komori (K-jednokratni ip. tretman fiziološkim rastvorom; K28-fiziološki rastvor ip., svakodnevno tokom 28 dana; M-jednokratno ip., monokrotalin; FK-vitamin B9 ip., svakodnevno tokom 28 dana; M+FK-jednokratno ip. monokrotalin i vitamin B9 ip., svakodnevno tokom 28 dana)



Slika 4.32 Imunohistohemijška ekspresija PCNA u desnoj komori (K-jednokratni ip. tretman fiziološkim rastvorom; K28-fiziološki rastvor ip., svakodnevno tokom 28 dana; M-jednokratno ip., monokrotalin; FK-vitamin B9 ip., svakodnevno tokom 28 dana; M+FK-jednokratno ip. monokrotalin i vitamin B9 ip., svakodnevno tokom 28 dana)

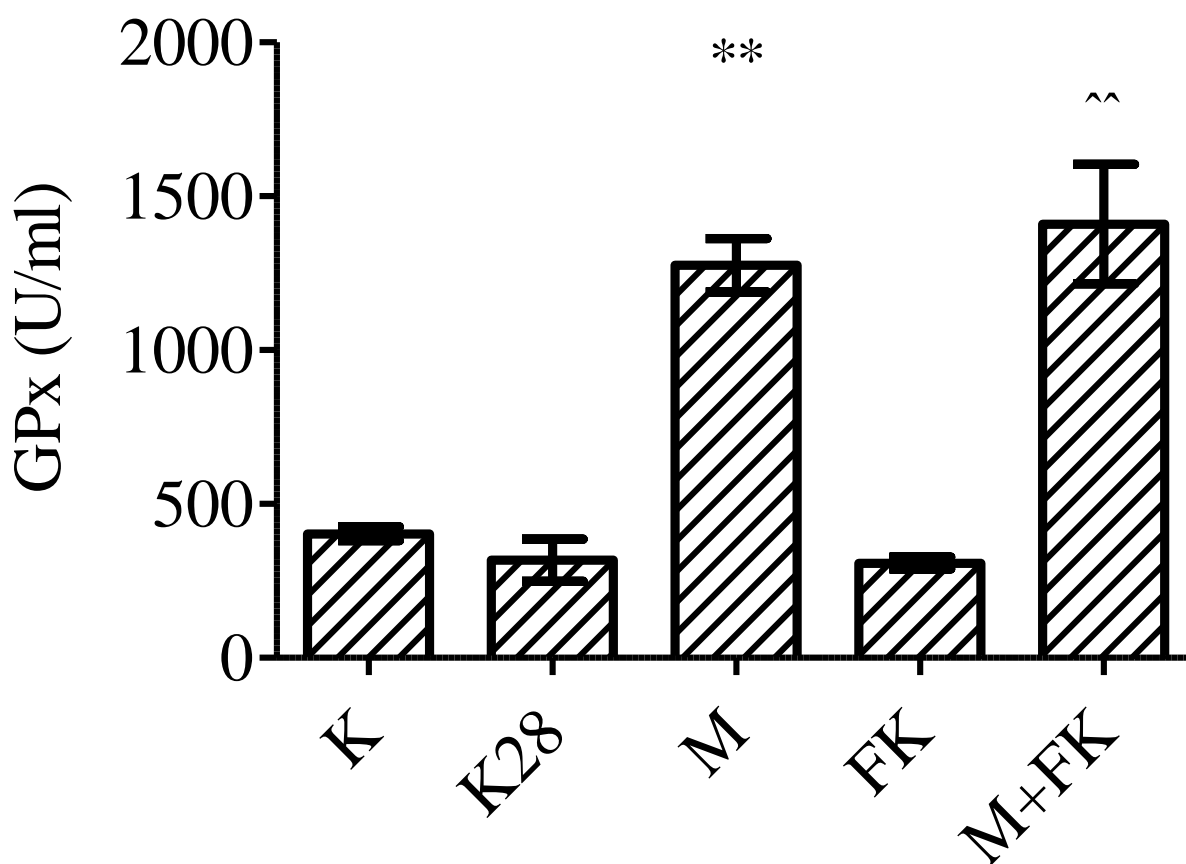
4.3.6 Analiza parametara oksidativnog stresa

Aktivnost SOD-a značajno smanjena nakon aplikacije folne kiseline (M+FA naspram M: 540.75 ± 147.36 naspram 406.5 ± 36.37 U/mL, $p < 0.05$) (Slika 4.33), dok je GPx aktivnost pokazala trend porasta u poređenju sa M grupom (1409.81 ± 388.87 naspram 1276.09 ± 172.34 U/mL) (Slika 4.234). Vrednosti ukupnog glutationa nakon primene folne kiseline smanjene su u poređenju sa M grupom (17.40 ± 3.50 naspram 25.70 ± 3.08 mmol/mg proteina), kao i u FK grupi u poređenju sa K28 grupom (29.90 ± 4.87 naspram 70.62 ± 11.44 mmol/mg proteina) (Slika 4.35). Primena folne kiseline izazvala je dalje smanjenje sadržaja tiolnih grupa u poređenju sa M grupom bez značajne razlike (144.72 ± 31.81 naspram 202.64 ± 28.34 μ mol/g proteina), ali je došlo do statistički značajnog pada u poređenju sa FK grupom (144.72 ± 31.82 naspram 267.46 ± 36.06 μ mol/g proteina, $p < 0.05$) (Slika 4.36). Sadržaj reaktivnih karbonilnih derivata i nitrotirozina pokazao je sličan trend u poređenju sa M grupom, ali bez dostizanja statističke značajnosti (13.57 ± 14.46 naspram 25.84 ± 6.79 μ mol/g proteina, 5.17 ± 0.14 naspram 6.92 ± 2.52 nmol/L) (Slike 4.37 i 4.38).



Slika 4.33. Aktivnost SOD u srčanom tkivu pacova

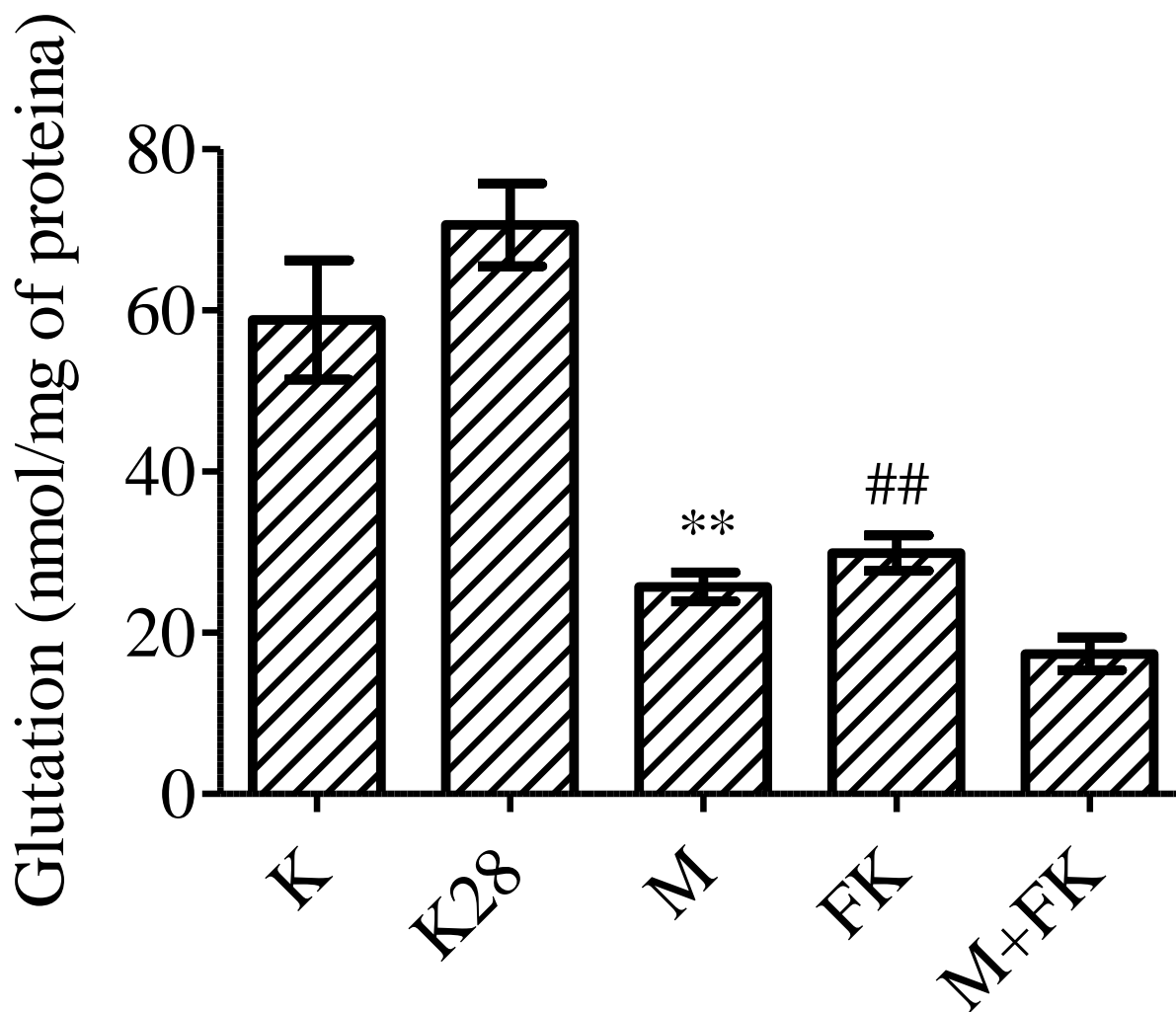
K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); K28-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. 28 dana); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru fiziološkog rastvora 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); FK (vitamin B9 5mg/kg t.m. u fiziološkom rastvor 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); M+FK (M 50mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. jedan dan i vitamin B9 7mg/kg ip. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); * – $P < 0.05$ naspram grupe K, α – $P < 0.05$ naspram grupe M



Slika 4.34 Aktivnost GPx u srčanom tkivu pacova

K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); K28-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. 28 dana); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru fiziološkog rastvora 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); FK (vitamin B9 5mg/kg t.m. u fiziološkom rastvor 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); M+FK (M 50mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. jedan dan i vitamin B9 7mg/kg ip. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana);

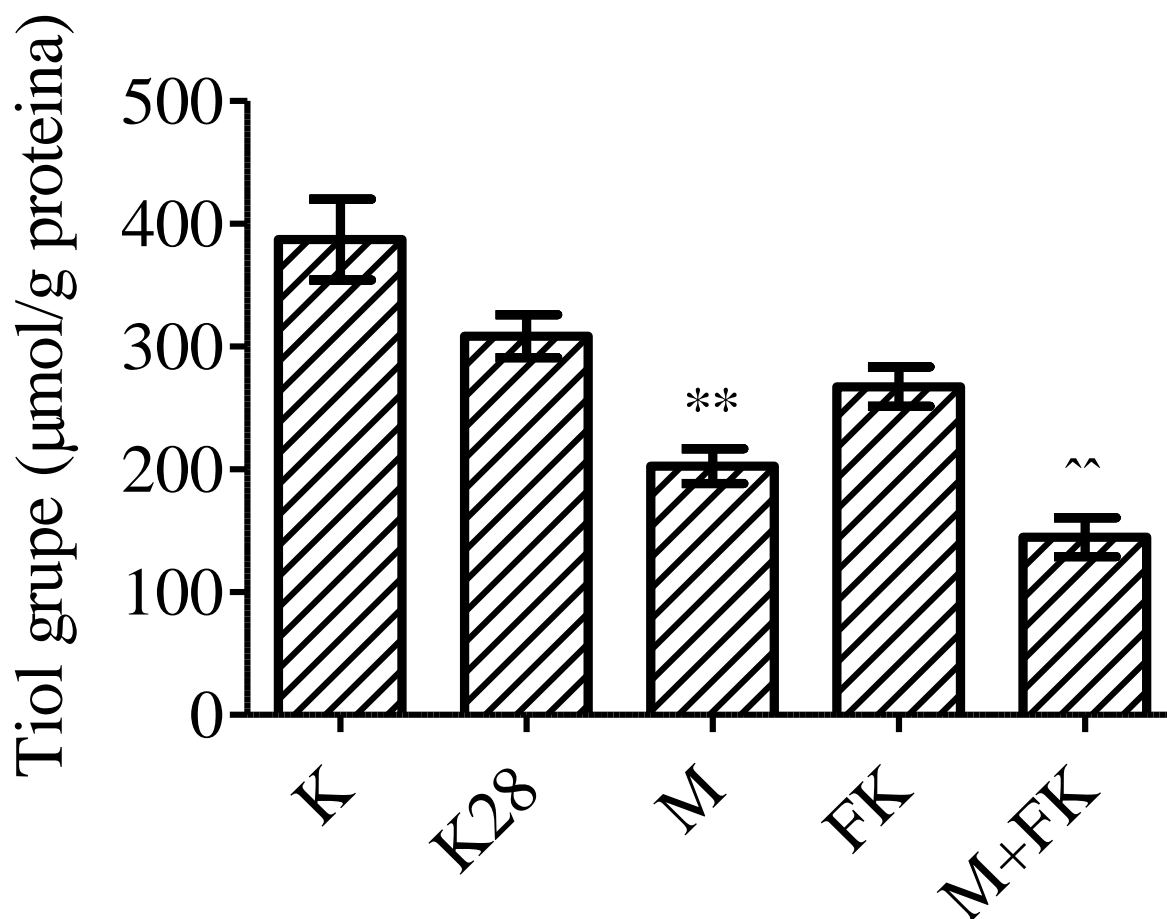
* *- P < 0.01 naspram grupe K, ^^ - P < 0.01 naspram grupe FK



Slika 4.35 Sadržaj glutationa u srčanom tkivu pacova

K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); K28-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. 28 dana); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru fiziološkog rastvora 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); FK (vitamin B9 5mg/kg t.m. u fiziološkom rastvor 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); M+FK (M 50mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. jedan dan i vitamin B9 7mg/kg ip. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana);

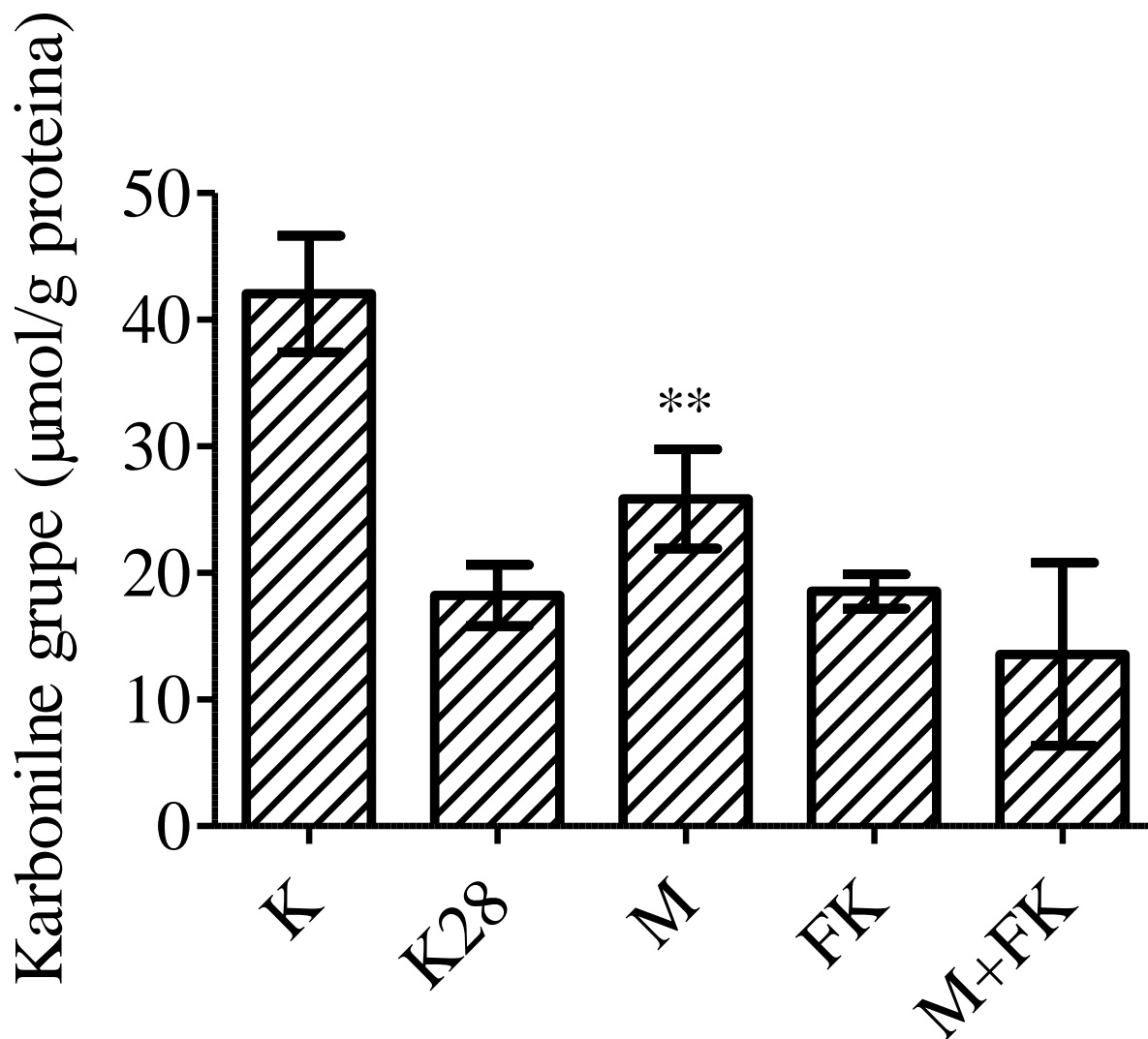
* *- P < 0.01 naspram grupe K, ##- P < 0.01 naspram grupe K28



Slika 4.36 Sadržaj tiol grupa u srčanom tkivu pacova

K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); K28-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. 28 dana); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru fiziološkog rastvora 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); FK (vitamin B9 5mg/kg t.m. u fiziološkom rastvor 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); M+FK (M 50mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. jedan dan i vitamin B9 7mg/kg ip. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana);

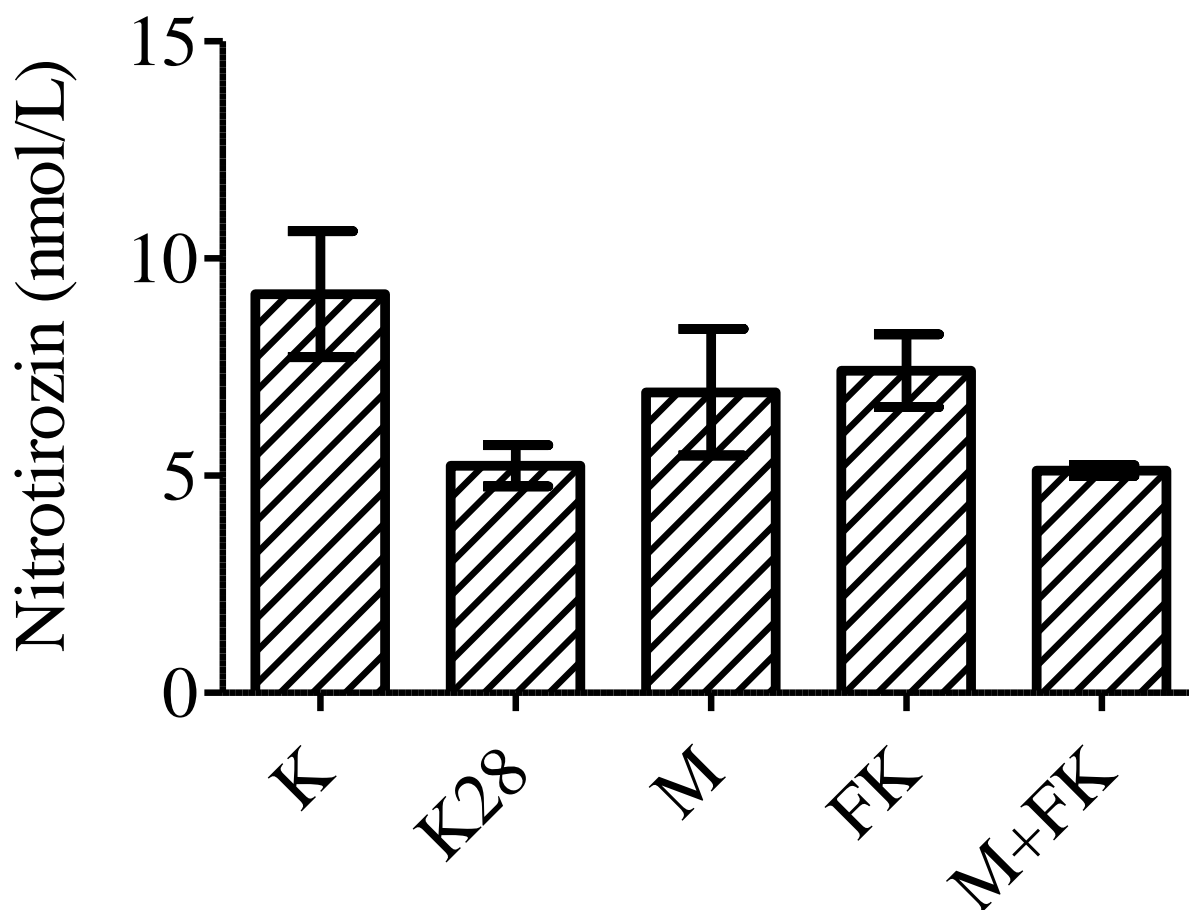
* *- P < 0.01 naspram grupe K, ^^ - P < 0.01 naspram grupe FK



Slika 4.37 Sadržaj karbonilnih grupa u srčanom tkivu pacova

K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); K28-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. 28 dana); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru fiziološkog rastvora 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); FK (vitamin B9 5mg/kg t.m. u fiziološkom rastvor 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); M+FK (M 50mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. jedan dan i vitamin B9 7mg/kg ip. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana);

* *- P < 0.01 naspram grupe K

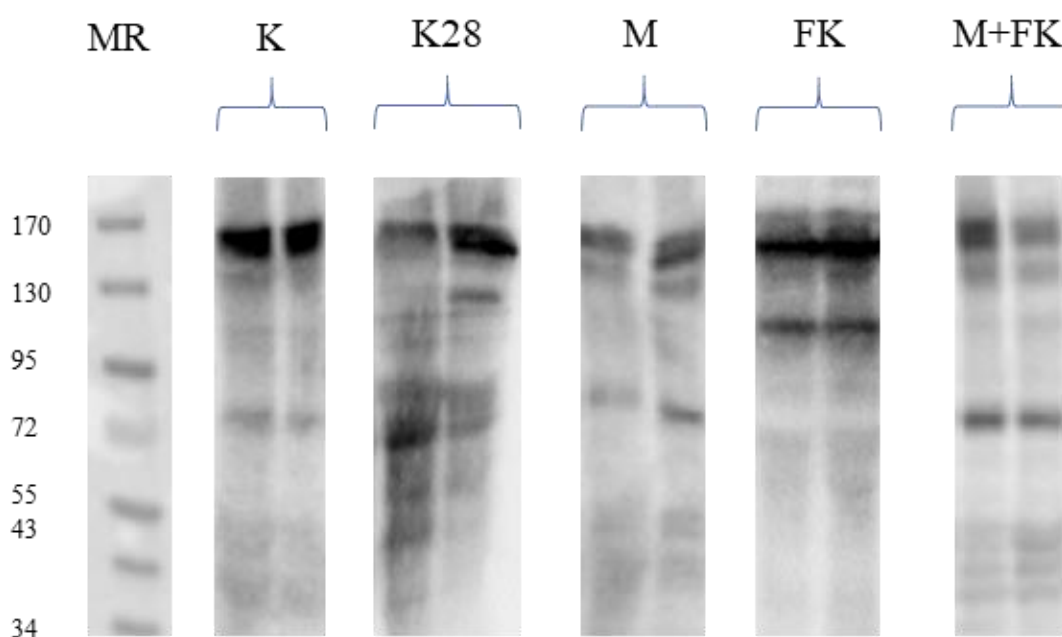


Slika 4.38 Sadržaj nitrotirozina u srčanom tkivu pacova

K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); K28-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. 28 dana); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru fiziološkog rastvora 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); FK (vitamin B9 5mg/kg t.m. u fiziološkom rastvor 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); M+FK (M 50mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. jedan dan i vitamin B9 7mg/kg ip. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana)

4.3.7 Determinacija ukupne S-glutacionilacije

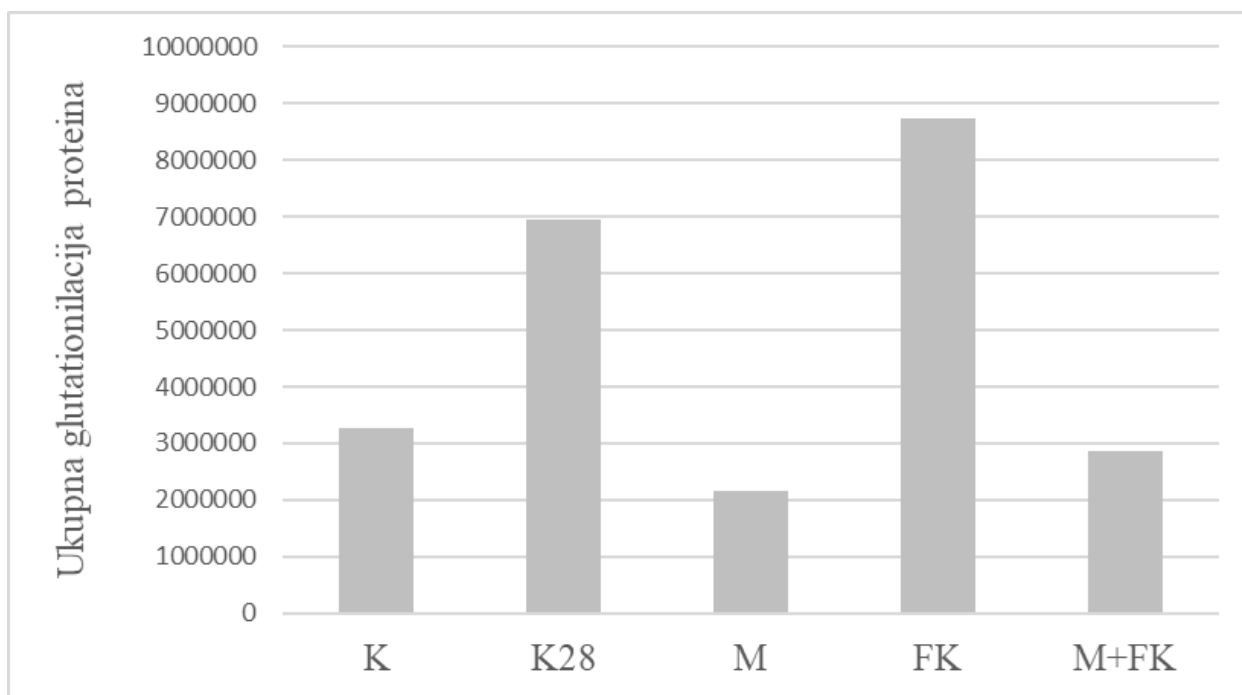
Nivo ukupne glutationalacije proteina procenjen je *Western blot*-om u pet grupa uzoraka (K, K28, M, FK, M+FK). Monoklonsko antitelo, glutation-antitelo, korišćeno je za ispitivanje ukupne glutationalacije proteina. Slika 4.39 prikazuje pojaseve koji reaguju sa antitelom protiv glutaciona u pet ispitivanih grupa uzoraka (K, K28, M, FK, M+FK). Ukupni nivo glutationalacije je porastao u M+FK grupi u poređenju sa M grupom, iako nije zabeležena statistički značajna razlika ($p = 0.200$) (Slika 4.40). Denzitometrijska analiza je takođe pokazala smanjene nivoe glutationalacije proteina u M+FK group u poređenju sa FK grupom koja ima granični značaj ($p = 0.057$). Nije bilo statistički značajne razlike kada su upoređene K28 i FK grupe, niti između K28 i M+FK grupe.



Slika 4.39 Nivo ukupne glutacionilacije proteina *Western blot*-om

MR-marker molekularne težine (kDA)

K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); K28-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. 28 dana); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru fiziološkog rastvora 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); FK (vitamin B9 5mg/kg t.m. u fiziološkom rastvor 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); M+FK (M 50mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. jedan dan i vitamin B9 7mg/kg ip. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana)

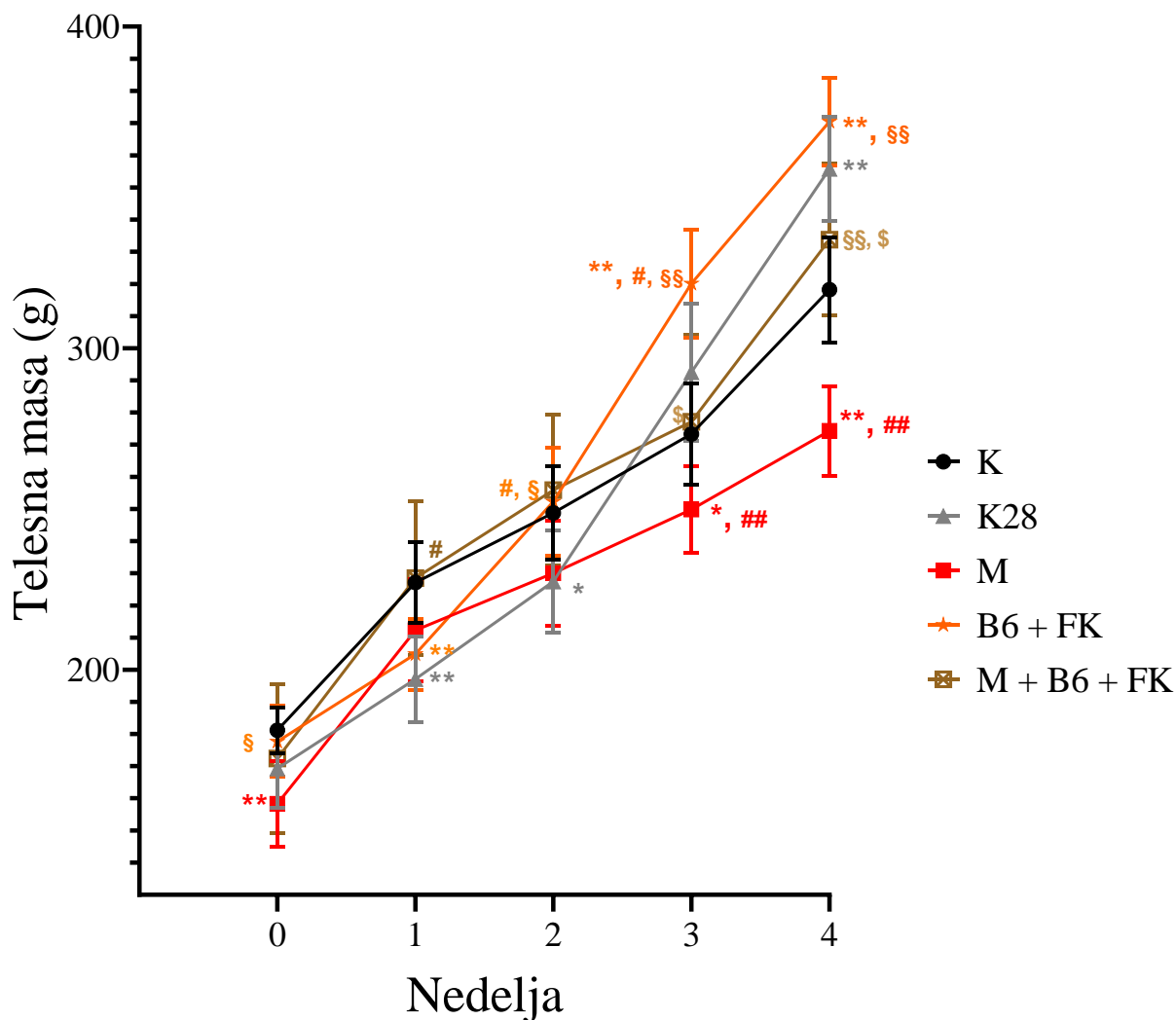


Slika 4.40 Denzitometrijska analiza dobijenih *blot*-ova - softver ImageLab (Bio-Rad, SAD)
 K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); K28-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. 28 dana); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru fiziološkog rastvora 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); FK (vitamin B9 5mg/kg t.m. u fiziološkom rastvor 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); M+FK (M 50mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. jedan dan i vitamin B9 7mg/kg ip. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana)

4.4 UDRUŽENA APLIKACIJA VITAMINA B6 I B9 (FOLNE KISELINE)

4.4.1 Promena telesne mase eksperimentalnih životinja

Na Slici 4.41 je predstavljena dinamika promene telesnih masa pacova u grupama K, K28, M, B6+FK i M+B6+FK kroz nedelje eksperimentalnog protokola.

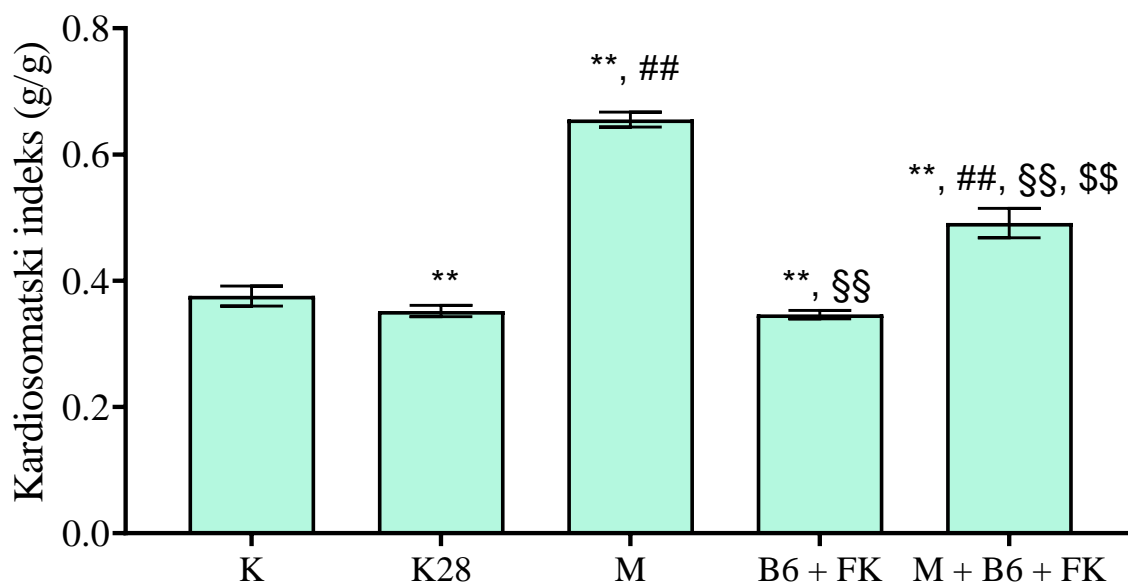


Slika 4.41 Promena telesne mase eksperimentalnih životinja u grupama K, K28, M, B6+FK i M+B6+FK kroz nedelje eksperimentalnog protokola.

* $p < 0.05$ vs. K, ** $p < 0.01$ vs. K, # $p < 0.05$ vs. K28, ## $p < 0.01$ vs. K28, § $p < 0.05$ vs. M, §§ $p < 0.01$ vs. M, \$ $p < 0.05$ vs. B6+FK – Two-Way ANOVA with Tukey posthoc test

4.4.2 Razlika u vrednosti kardiosomatskog indeksa između eksperimentalnih životinja

Na Slici 4.42 su prikazane vrednosti KSI eksperimentalnih životinja K, K28, M, B6+FK i M+B6+FK grupe. Uočava se statistički značajno povećanje vrednosti KSI kod životinja M grupe u odnosu na kontrolu ($p < 0.01$). Kod životinja koje su bile tretirane vitaminom B6 i folnom kiselinom životinja u uslovima srčane insuficijencije koja je izazvana aplikacijom monokrotalina vrednosti KSI su statistički značajno niže u odnosu na vrednosti životinja M grupe ($p < 0.01$).



Slika 4.42 Razlika u vrednosti KSI između eksperimentalnih životinja K, K28, M, B6+FK i M+B6+FK grupe

** $p < 0.01$ vs. K, ## $p < 0.01$ vs. K28, §§ $p < 0.01$ vs. M, \$\$ $p < 0.01$ vs. B6+FK – One-way ANOVA sa Tukey posthoc testom

4.4.3 Biohemijska analiza

Troponin T ostao je povišen nakon istovremene primene vitamina B6 i folne kiseline (B9), mada sa nižim stepenom (163 (119-369) ng/L naspram 199 (58-251) ng/L). Nije bilo razlike u nivou Hcy između grupa, čak ni u grupi u kojoj je izvršena koaplikacija vitamina B6 i folne kiseline (M+B6+FK grupi). Ukupni holesterol i trigliceridi bili su značajno viši u M+B6+FK grupi u poređenju sa M (2.46 ± 1.32 naspram 1.37 ± 0.24 mmol/L, 1.61 ± 1.15 naspram 0.95 ± 0.33 mmol/L, redom) i B6 + FK grupe (2.46 ± 1.32 naspram 1.67 ± 0.23 mmol/L, 1.61 ± 1.15 naspram 0.91 ± 0.2 mmol/L, redom). Nivoi parametara bubrežne funkcije (UA, UREA, CREA), kao i funkcije jetre (AST i ALT) nisu se razlikovali između testiranih grupa. Sadržaj alkalne fosfataze bio je značajno niži u M+B6+FK u poređenju sa M i B6+FK grupama (227.00 ± 65.33 naspram 391.55 ± 156.74 U/L, 227.00 ± 65.33 naspram 434.90 ± 80.24 U/L, redom, $p < 0.05$). Srednji nivoi α -amilaze bili su značajno viši u M+B6+FK grupi u poređenju sa M i B6+FK grupom (3036.75 ± 459.92 naspram 2530.00 ± 657.01 U/L, 3036.75 ± 459.92 naspram 1673.00 ± 226.58 U/L, redom, $p < 0.05$). Vrednost nivoa ukupnih proteina (TP) značajno je smanjena u M+B6+FK grupi u poređenju sa B6 + FK grupom (53.50 ± 5.40 naspram 59.70 ± 2.11 g/L, $p < 0.05$). Vrednosti CRP-a i IL-6 bile su ispod 2 mg/L, odnosno 1.5 pg/mL, u svim uzorcima u M+B6+FK grupi, kao i u svim testiranim grupama. Sadržaj fibrinogena bio je u 50% uzoraka u M+B6+FK grupi ispod 1.8 g/L, a vrednost faktora *von Willebrand* značajno se smanjila u M+B6+FK grupi u poređenju sa M grupom (141.84 ± 115.84 naspram 227.65 ± 41.01 %) (Tabela 4.8).

Tabela 4.8 Biohemijski parametri u serumu/plazmi eksperimentalnih životinja

Grupe/ parametri	K	K28	M	B6+FK	M+B6+FK
∇ hsTnT (ng/L)	17 (16-25)	25 (19-37)	199 (58-251)*	24 (19-26)	163 (119-369) ^
°Hcy (μmol/L)	8.36 ± 2.48	10.19 ± 3.87	8.01 ± 1.08	10.73 ± 1.96	7.08 ± 2.69
°GLUC (mmol/L)	6.19 ± 0.63	7.17 ± 0.58	7.33 ± 1.20*	7.39 ± 0.70	6.92 ± 0.71
°UREA (mmol/L)	13.66 ± 1.96	9.90 ± 0.54	18.27 ± 6.97	9.66 ± 0.71	23.20 ± 12.08
°CREA (μmol/L)	43.90 ± 2.56	29.00 ± 1.76	47.18 ± 14.43	45.80 ± 2.30	56.88 ± 20.29
°CHL (mmol/L)	1.38 ± 0.15	1.45 ± 0.23	1.37 ± 0.24	1.67 ± 0.23	2.46 ± 1.32 □
°HDL (mmol/L)	1.21 ± 0.13	0.64 ± 0.09	0.84 ± 0.26*	0.84 ± 0.11	1.14 ± 0.75
°TGL (mmol/L)	0.89 ± 0.16	0.77 ± 0.17	0.95 ± 0.33	0.91 ± 0.26	1.61 ± 1.15 □
°AST (U/L)	343.20 ± 76.03	222.80 ± 49.56	352.91 ± 119.57	220.70 ± 33.24	325.00 ± 398.93
°ALT (U/L)	129.20 ± 25.47	69.50 ± 8.77	76.27 ± 28.34	75.30 ± 5.72	56.50 ± 41.62
°ALP (U/L)	497.90 ± 71.15	347.80 ± 70.38	391.55 ± 156.74*	434.90 ± 80.24	227.00 ± 65.33 □
°TP (g/L)	62.20 ± 2.35	60.60 ± 1.96	52.55 ± 5.39*	59.70 ± 2.11	53.50 ± 5.40 ^
°ALB (g/L)	36.40 ± 0.84	30.40 ± 1.58	29.36 ± 2.87*	34.90 ± 1.20	24.00 ± 3.96
°UA (μmol/L)	74.40 ± 14.28	77.20 ± 14.11	85.45 ± 22.96	65.60 ± 9.82	78.25 ± 24.85
°α-AMY (U/L)	3560.75 ± 580.49	3097.4 ± 386.83	2530.00 ± 657.01*	1673.00 ± 226.58	3036.75 ± 459.92 □ ^
¥IL-6 < 1.5 (pg/mL)	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)
¥CRP < 2 (mg/L)	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)
¥Fibrinogen < 1.8 (g/L)	8 (100%)	8 (100%)	6 (75%)	8 (100%)	4 (50%)
¥vWF(%)	156.00 ± 37.19	15.40 ± 0.89	227.65 ± 41.01*	14.00 ± 0.00	141.84 ± 115.84 ^

hsTnT (eng. troponin T–troponin T), Hcy (eng. homocysteine–homocistein), GLUC (eng. glucose–glukoza), CHL (eng. total cholesterol–ukupni holesterol), HDL (eng. high density lipoprotein–lipoprotein visoke gustine), TGL (eng. triglycerides–trigliceridi), AST (eng. aspartate-aminotransferase–aspartat-aminotransferaze), ALT (eng. alanine-aminotransferase–alanin-aminotransferaze), ALP (eng. alkaline phosphatase–alkalna fosfataza), TP (eng. total proteins–ukupni proteinia), ALB (eng. albumin–albumin), UA (eng. uric acid–mokraćna kiselina), α-AMY (eng. α-amylase–α-amilaza), IL 6 (eng. interleukin 6–interleukin 6), CRP (eng. C- reactive protein–C reaktivni protein), vWF (eng. von Willebrand Factor – von Willebrand-ov faktor), UREA (eng. urea-urea), CREA (eng. creatinine–kreatinin);

∇- rezultati su izraženi u percentilima; °- rezultati su prikazani kao x±SD; ¥- rezultati su prikazani kao n (%); * – P < 0.05 naspram grupe K, # – P < 0.05 naspram grupe K28, □ – P < 0.05 naspram grupe M, ^ – P < 0.05 naspram grupe B6+FK

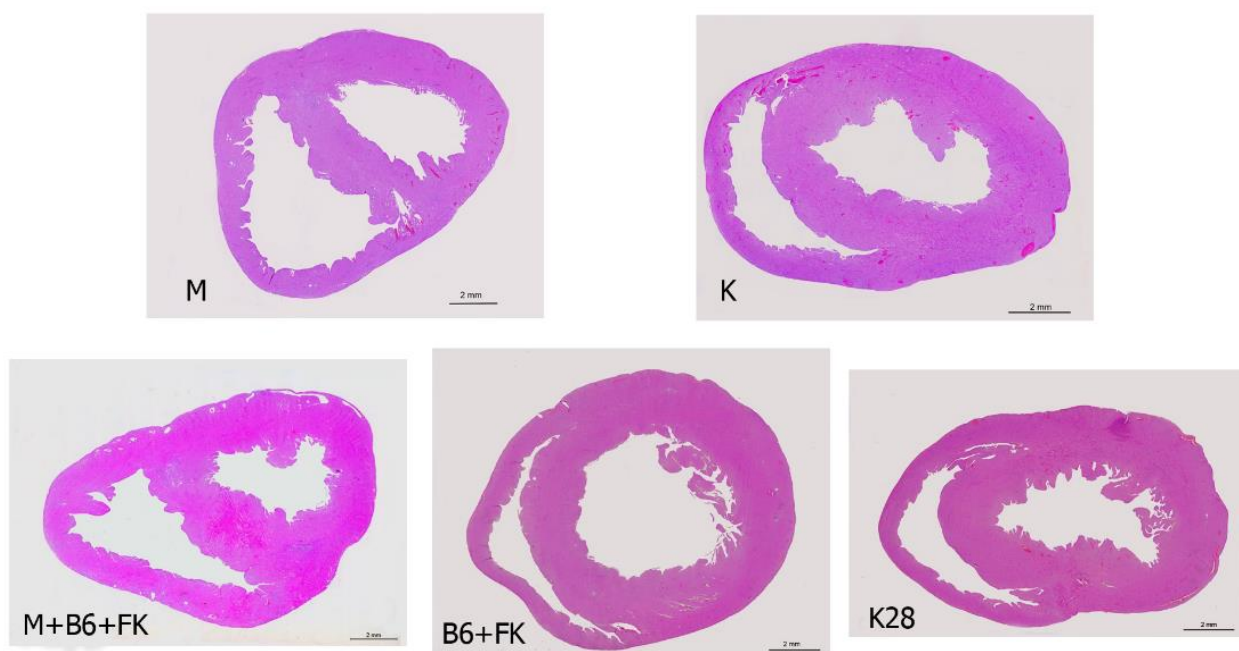
4.4.4 Histomorfometrijska analiza

Debljina zida leve komore bila je značajno veća u M+B6+FK grupi u poređenju sa M grupom ($2453.48 \pm 237.89 \mu\text{m}$ u odnosu na $1676.26 \pm 208.07 \mu\text{m}$, $p < 0.05$). Postojao je trend ka debljem interventrikularnom septumu u M+B6+FK grupi u poređenju sa M grupom ($2163.97 \pm 580.50 \mu\text{m}$ u odnosu na $1651.02 \pm 293.95 \mu\text{m}$) i K28 grupom ($2163.97 \pm 580.50 \mu\text{m}$ u odnosu na $2112.61 \pm 296.05 \mu\text{m}$), ali nije dostigao statistički značaj. Prosečna dimenzija kardiomiocita slobodnog zida leve komore nije se značajno razlikovala između M+B6+FK i M grupe ($21.73 \pm 2.50 \mu\text{m}$ nasuprot $21.20 \pm 1.55 \mu\text{m}$). Nisu postojale razlike između B6+FK i K28 grupe u svim analiziranim histomorfometrijskim parametrima, ali debljina zida desne komore bila je značajno veća u M+B6+FK grupi u poređenju sa B6+FK grupom (1346.06 ± 304.01 naspram $914.70 \pm 134.42 \mu\text{m}$, $p < 0.05$). Rezultati su prikazani u Tabeli 4.9 i na Slici 4.43.

Tabela 4.9 Histomorfometrijski i imunohistihemijski parametri srca pacova

Grupe/Parametri	K	K28	M	B6+FK	M+B6+FK
Debljina zida LK ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)	1950.80 ± 227.33	2363.81 ± 346.21	1676.26 ± 208.07	2446.7692 ± 368.95	2453.48 ± 237.89 α
Debljina zida DK ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)	731.55 ± 131.26	835.48 ± 144.63	$1229.63 \pm 231.80^*$	914.70 ± 134.42	1346.06 ± 304.01 ^
Debljina IVS ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)	1848.82 ± 144.96	2112.61 ± 296.05	1651.02 ± 293.95	2075.65 ± 388.79	2163.97 ± 580.50 α
Dimenzija kardiomiocita zida LK ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)	17.99 ± 1.90	22.50 ± 1.90	$21.20 \pm 1.55^*$	22.51 ± 1.88	21.73 ± 2.50
Ki67 (DK) (%±SD)	1.00 ± 0.82	1.25 ± 1.26	23.00 ± 6.38	7.40 ± 1.40	30.75 ± 7.89
Ki67 (LK) (%±SD)	0.75 ± 0.50	1.00 ± 0.82	16.50 ± 2.10	5.40 ± 0.89	21.25 ± 2.99
PCNA(DK) (%±SD)	0.20 ± 0.48	0.20 ± 0.45	7.20 ± 1.48	6.60 ± 1.14	9.25 ± 1.50
PCNA(LK) (%±SD)	0 ± 0	0.20 ± 0.45	2.60 ± 0.89	2.00 ± 1.22	3.25 ± 1.26

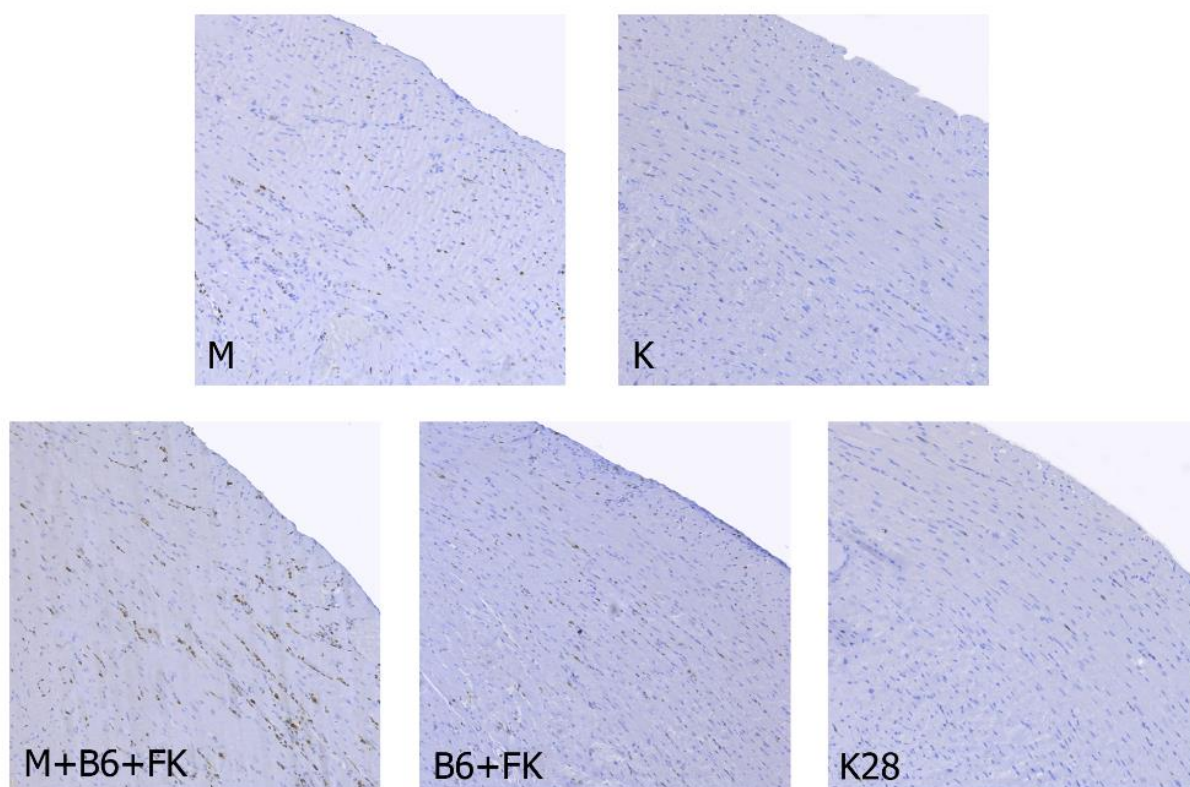
LK–leva komora; DK–desna komora; IVS–interventrikularni septum; SD–standardna devijacija * – $P < 0.05$ naspram grupe K, # – $P < 0.05$ naspram grupe K28, α – $P < 0.05$ naspram grupe M, ^ – $P < 0.05$ naspram grupe B6+FK



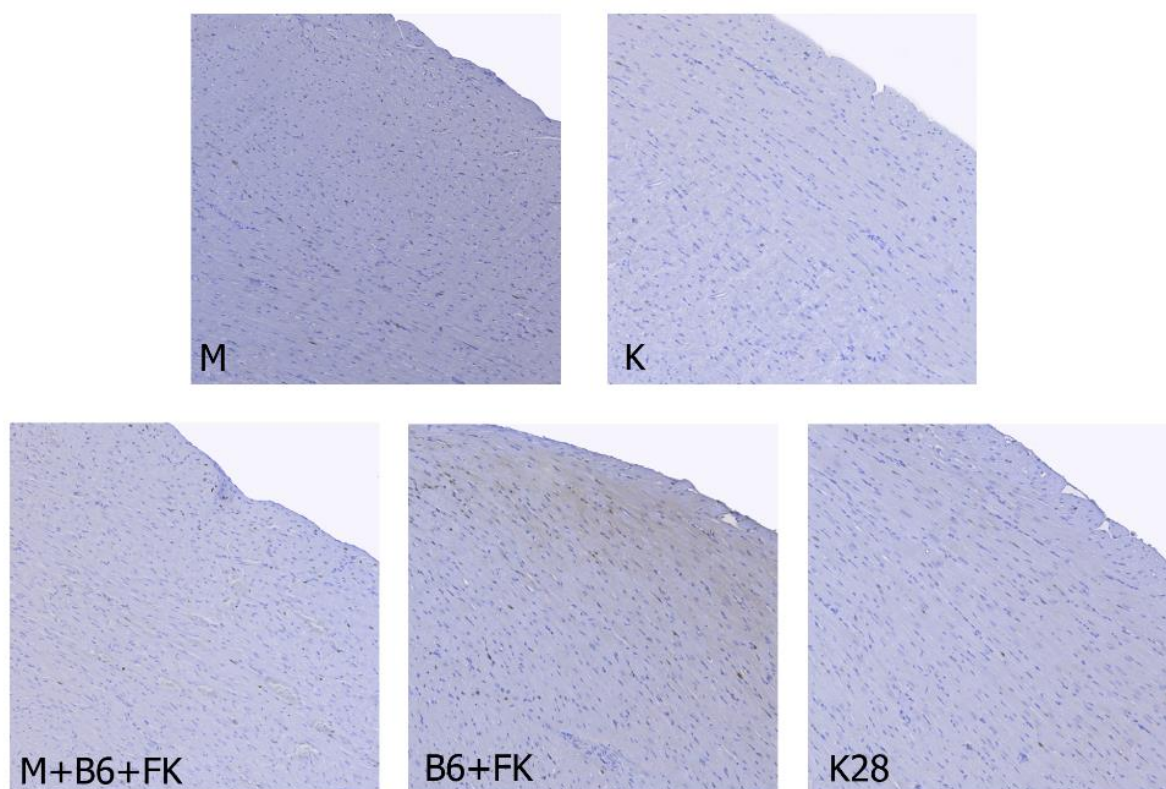
Slika 4.43 Poprečni presek srca pacova uz prikaz desne i leve komore različitih eksperimentalnih grupa (hematoksilin/eozin bojenje; K-jednokratni ip. tretman fiziološkim rastvorom; K28-fiziološki rastvor ip., svakodnevno tokom 28 dana; M-jednokratno ip., monokrotalin; B6+FK-vitamini B6 i B9 ip., svakodnevno tokom 28 dana; M+B6+FK-jednokratno ip. monokrotalin i vitamini B6 i B9 ip., svakodnevno tokom 28 dana)

4.4.5 Imunohistohemijska analiza

Pozitivnost Ki67 u zidu desne komore ima značajan trend povećanja nakon zajedničke primene vitamina B6 i folne kiseline (M+B6+FK grupa u odnosu na M grupu, 30.75 ± 7.89 naspram $23.00 \pm 6.38\%$), kao i u zidu leve komore (M+B6+FK grupa u odnosu na M grupu, 21.25 ± 2.99 naspram $16.50 \pm 2.10\%$). Sličan trend je registrovan i u slučaju pozitivnosti PCNA kako u zidu desne tako i u zidu leve komore (M+B6+FK grupa u odnosu na M grupu, 9.25 ± 1.50 naspram $7.20 \pm 1.48\%$, 3.25 ± 1.26 naspram $2.60 \pm 0.89\%$). Rezultati su prikazani u Tabeli 4.9 i na Slikama 4.44 i 4.45.



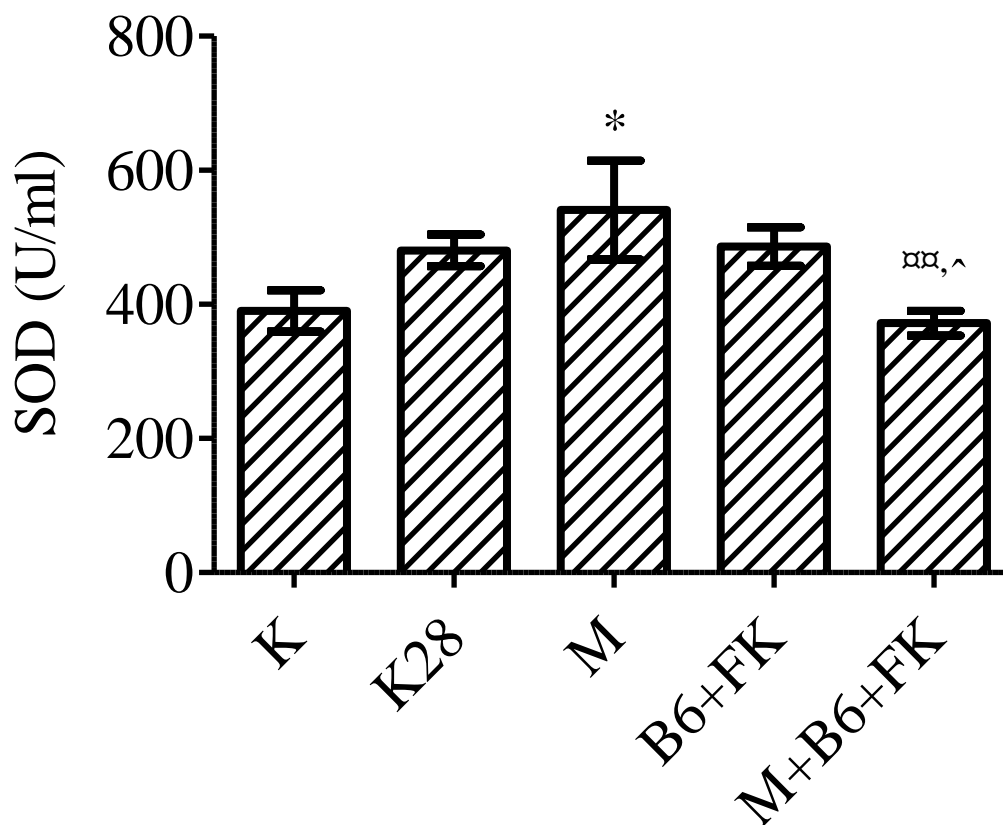
Slika 4.44 Imunohistohemijska ekspresija Ki67 u desnoj komori (K-jednokratni ip. tretman fiziološkim rastvorom; K28-fiziološki rastvor ip., svakodnevno tokom 28 dana; M-jednokratno ip., monokrotalin; B6+FK-vitamini B6 i B9 ip., svakodnevno tokom 28 dana; M+B6+FK-jednokratno ip. monokrotalin i vitamini B6 i B9 ip., svakodnevno tokom 28 dana)



Slika 4.45 Imunohistohemijška ekspresija PCNA u desnoj komori (K-jednokratni ip. tretman fiziološkim rastvorom; K28-fiziološki rastvor ip., svakodnevno tokom 28 dana; M-jednokratno ip., monokrotalin; B6+FK-vitamini B6 i B9 ip., svakodnevno tokom 28 dana; M+B6+FK-jednokratno ip. monokrotalin i vitamini B6 i B9 ip., svakodnevno tokom 28 dana)

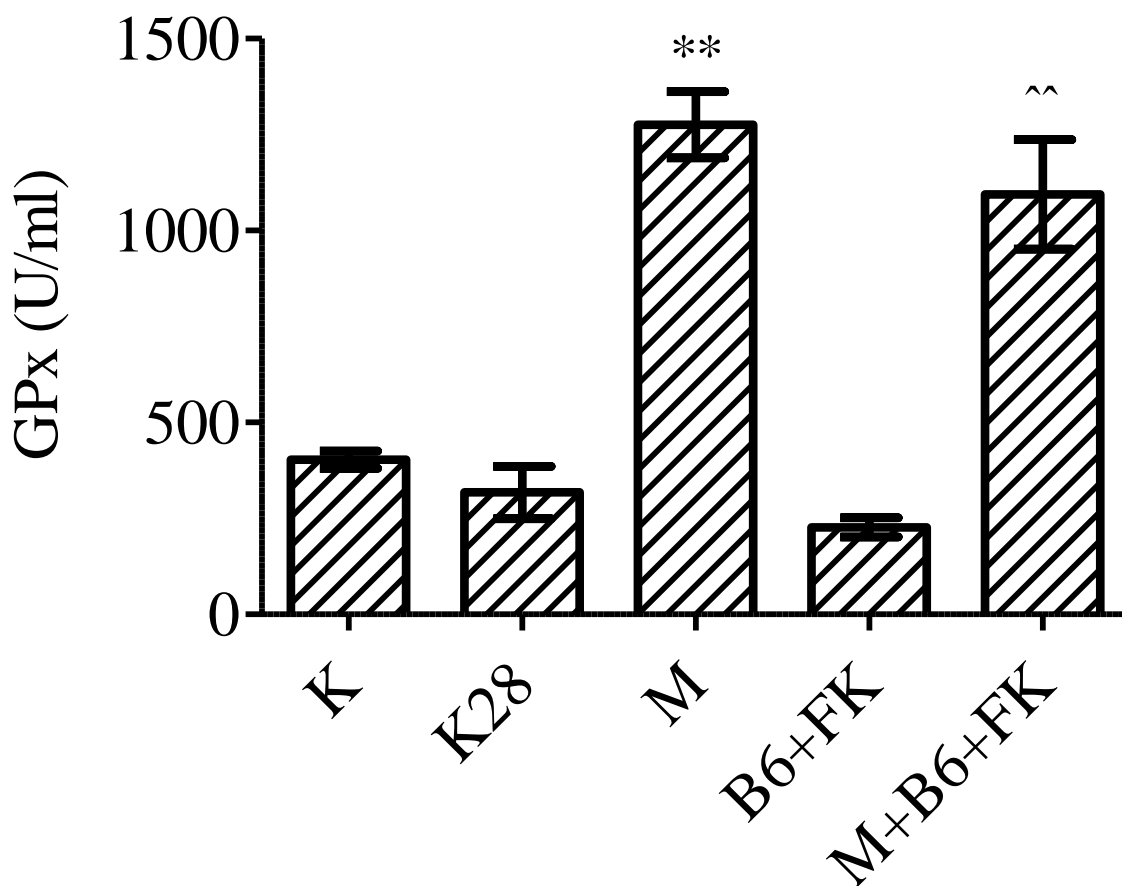
4.4.6 Analiza parametara oksidativnog stresa

Posle primene vitamina B6 i folne kiseline, aktivnost SOD se značajno smanjila u poređenju sa M i B6+FK grupom (372 ± 37.07 naspram 540.75 ± 147.36 U/ml, $p < 0.01$; 372 ± 37.07 naspram 486.60 ± 64.147 U/ml, $p < 0.05$) (Slika 4.46). GPx aktivnost pokazala je sličan trend u poređenju sa M grupom, ali bez dostizanja statističke značajnosti, dok su u poređenju sa B6+FK grupom vrednosti bile visoko statistički značajno veće (1094.21 ± 285.08 u poređenju sa 1276.09 ± 172.34 U/ml; 1094.21 ± 285.08 naspram 226.53 ± 56.02 U/ml, $P < 0.01$) (Slika 4.47). Vrednosti ukupnog glutationa nakon primene vitamina B6 i FK statistički su značajno smanjene u poređenju sa M grupom (15.00 ± 4.64 u odnosu na 25.70 ± 3.08 mmol/mg proteina, $p < 0.05$), a takođe je došlo do statistički značajnog pada u B6+FK grupi u poređenju sa K28 grupom (30.76 ± 5.98 naspram 70.62 ± 11.44 mmol/mg proteina, $p < 0.01$) (Slika 4.48). Istovremena primena vitamina B6 i folne kiseline indukuje dalje smanjenje sadržaja tiolnih grupa, ali ne i veliku statistički značajnu razliku u poređenju sa M grupom, ali statistički je značajno smanjena B6+FK grupa u poređenju sa K28 grupom (143.43 ± 49.82 naspram 202.64 ± 28.35 μ mol/g proteina; 143.43 ± 49.82 u odnosu na 387.35 ± 73.92 μ mol/g proteina; 137.77 ± 63.84 naspram 308.45 ± 39.24 μ mol/g proteina, $p < 0.05$) (Slika 4.49). Sadržaj reaktivnih karbonilnih derivata i nitrotirozina pokazao je sličan trend u poređenju sa M grupom, ali bez dostizanja statističkog značaja (16.32 ± 6.32 naspram 25.84 ± 6.79 μ mol/g proteina i 5 ± 0.21 naspram 7 ± 2 nmol/L) (Slike 4.50 i 4.51).



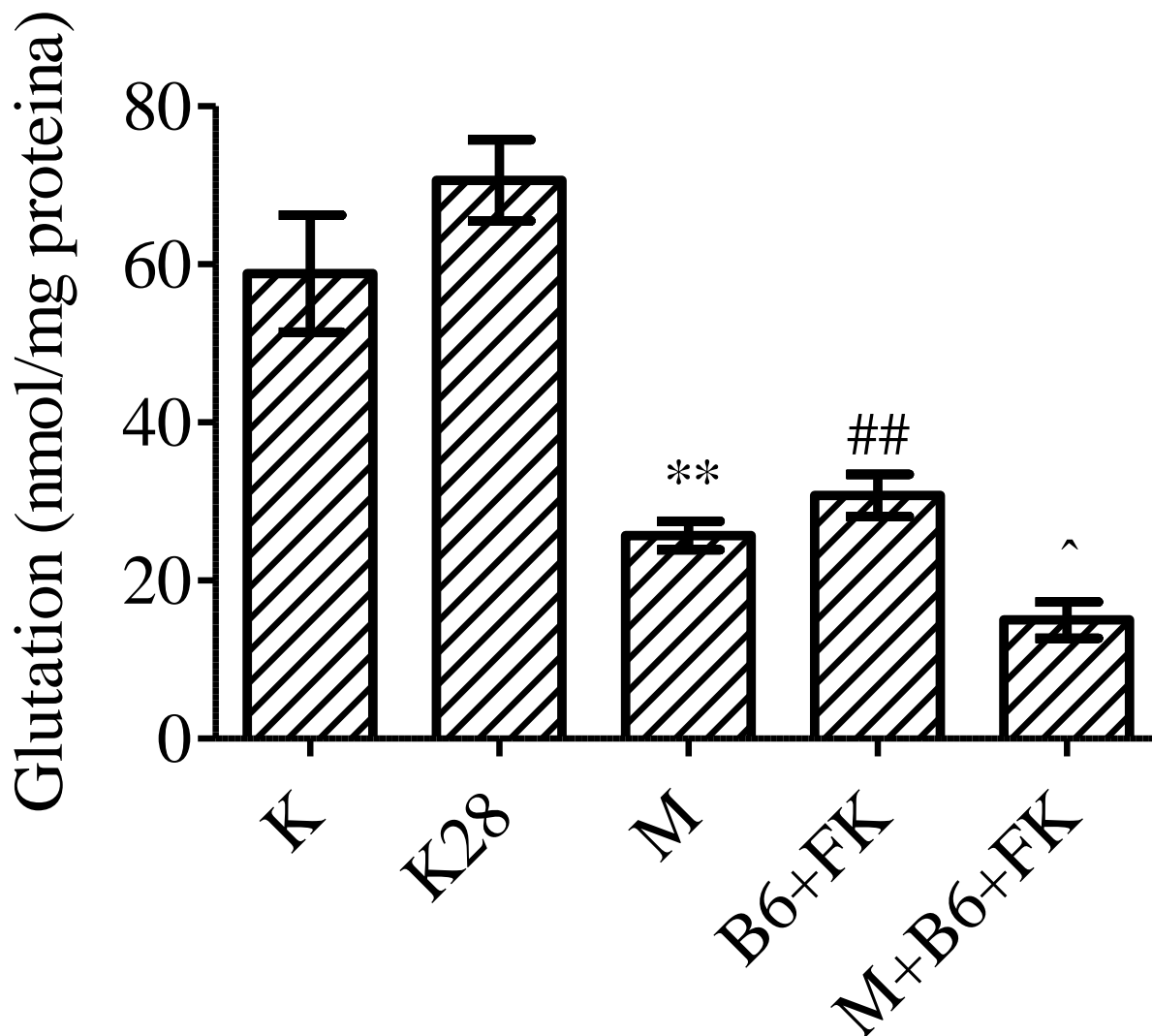
Slika 4.46 Aktivnost SOD u srčanom tkivu pacova

K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); K28-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. 28 dana); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru fiziološkog rastvora 1 ml/kg ip. jednokratno); B6+FK (vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvor 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana i vitamin B9 5mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); M+B6+FK (M 50mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. jednokratno i vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg ip. tokom 28 dana vitamin B9 5mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); * – $P < 0.05$ naspram grupe K, αα – $P < 0.01$ naspram grupe M, ^ – $P < 0.05$ naspram grupe B6+FK



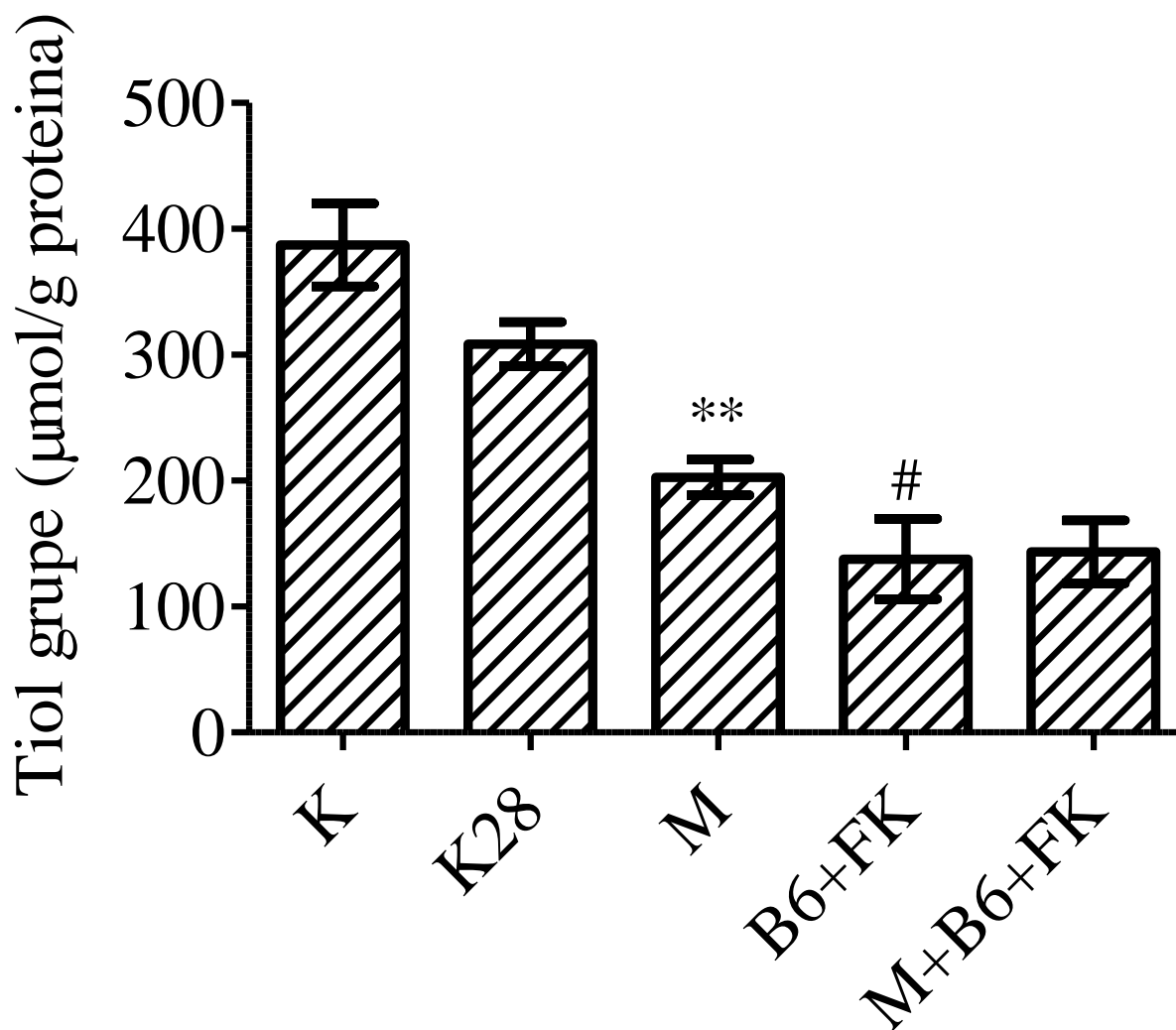
Slika 4.47 Aktivnost GPx u srčanom tkivu pacova

K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); K28-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. 28 dana); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru fiziološkog rastvora 1 ml/kg ip. jednokratno); B6+FK (vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvor 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana i vitamin B9 5mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); M+B6+FK (M 50mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. jednokratno i vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg ip. tokom 28 dana vitamin B9 5mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); * *- P < 0.01 naspram grupe K, ^^ - P < 0.01 naspram grupe B6+FK



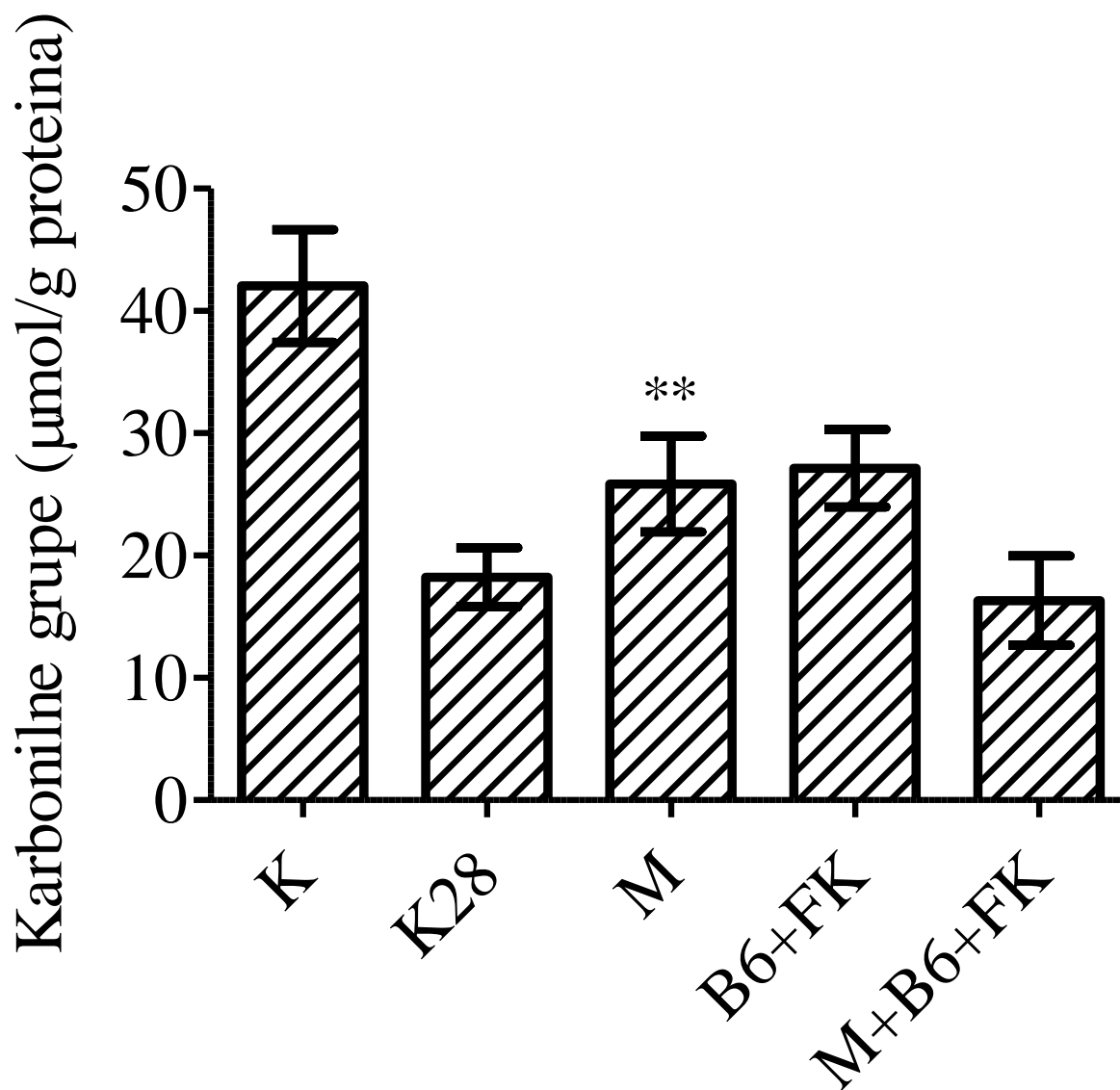
Slika 4.48 Sadržaj glutationa u srčanom tkivu pacova

K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); K28-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. 28 dana); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru fiziološkog rastvora 1 ml/kg ip. jednokratno); B6+FK (vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvor 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana i vitamin B9 5mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); M+B6+FK (M 50mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. jednokratno i vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg ip. tokom 28 dana vitamin B9 5mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); * *- P < 0.01 naspram grupe K, ##- P < 0.01 naspram grupe K28, ^ - P < 0.05 naspram grupe B6+FK



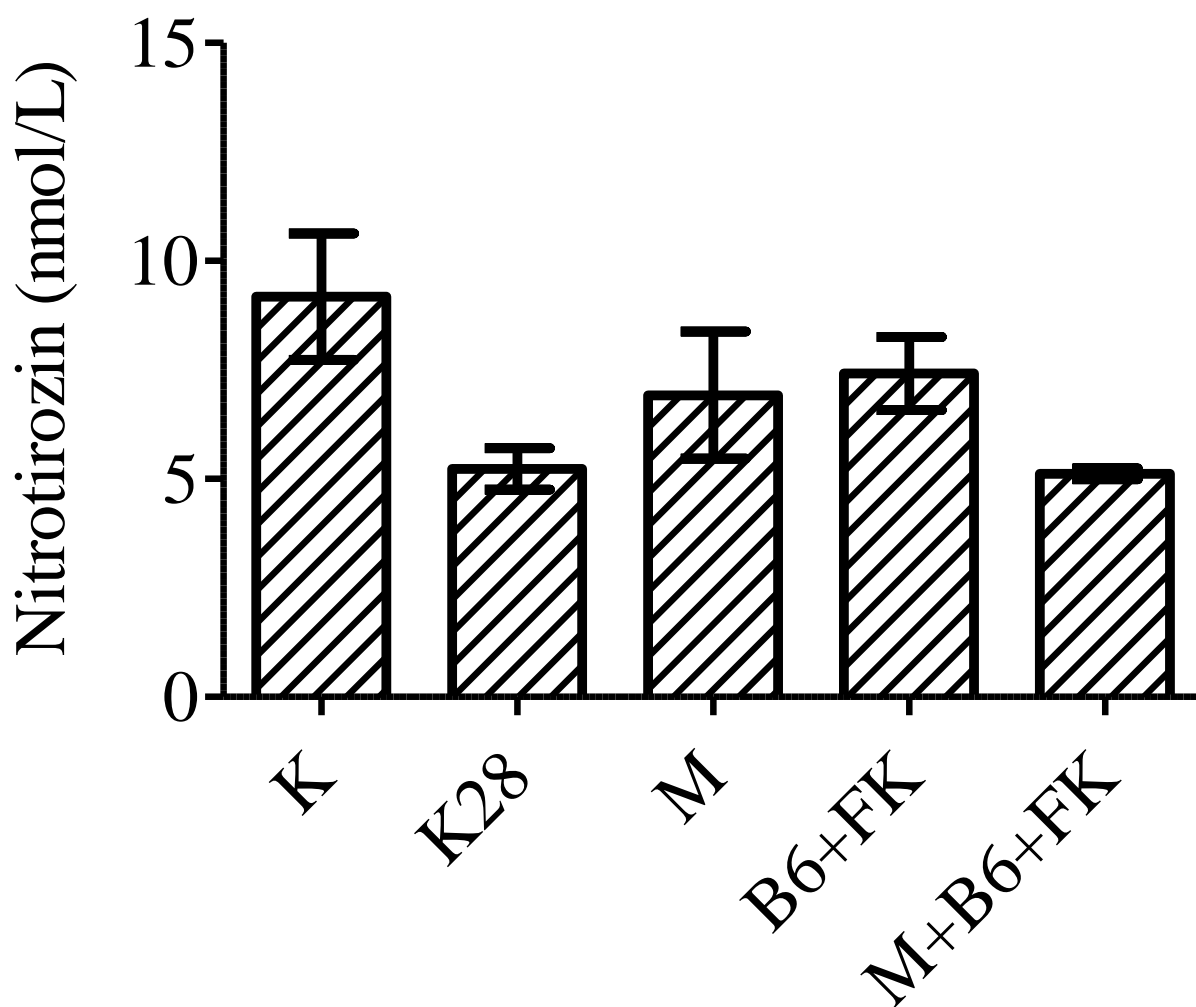
Slika 4.49 Sadržaj tiol grupa u srčanom tkivu pacova

K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); K28-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. 28 dana); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru fiziološkog rastvora 1 ml/kg ip. jednokratno); B6+FK (vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvor 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana i vitamin B9 5mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); M+B6+FK (M 50mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. jednokratno i vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg ip. tokom 28 dana vitamin B9 5mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); * *- P < 0.01 naspram grupe K, #- P < 0.05 naspram grupe K28



Slika 4.50 Sadržaj karbonsilnih grupa u srčanom tkivu pacova

K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); K28-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. 28 dana); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru fiziološkog rastvora 1 ml/kg ip. jednokratno); B6+FK (vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvor 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana i vitamin B9 5mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); M+B6+FK (M 50mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. jednokratno i vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg ip. tokom 28 dana vitamin B9 5mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); * *- P < 0.01 naspram grupe K

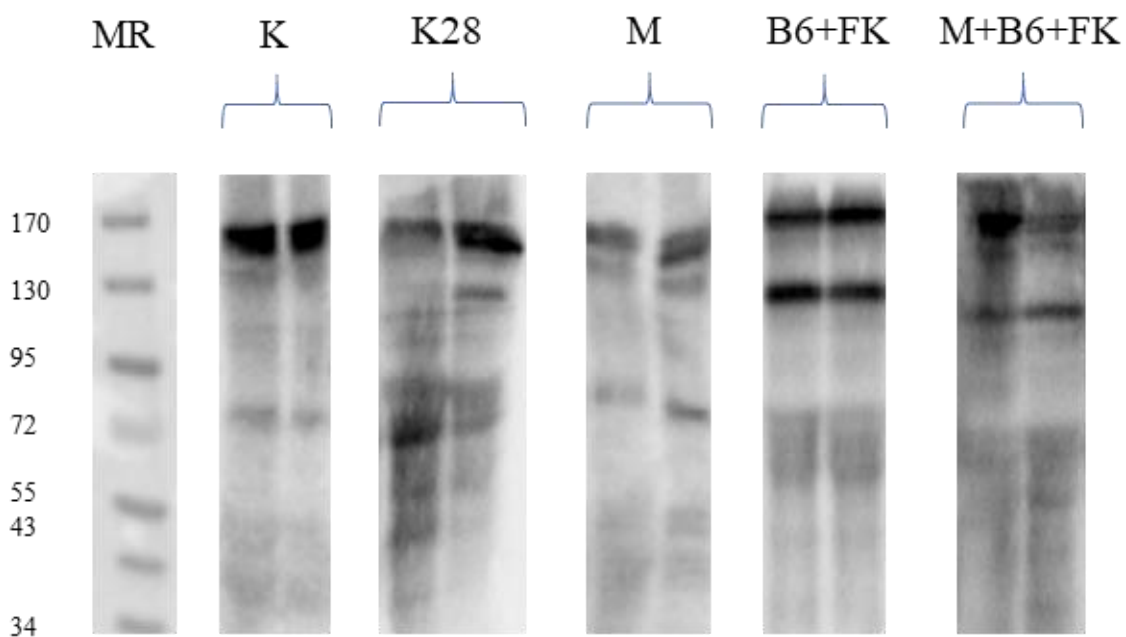


Slika 4.51 Sadržaj nitrotirozina u srčanom tkivu pacova

K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); K28-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. 28 dana); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru fiziološkog rastvora 1 ml/kg ip. jednokratno); B6+FK (vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvor 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana i vitamin B9 5mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); M+B6+FK (M 50 mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. jednokratno i vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg ip. tokom 28 dana vitamin B9 5mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana)

4.4.7 Determinacija ukupne S-glutationilacije

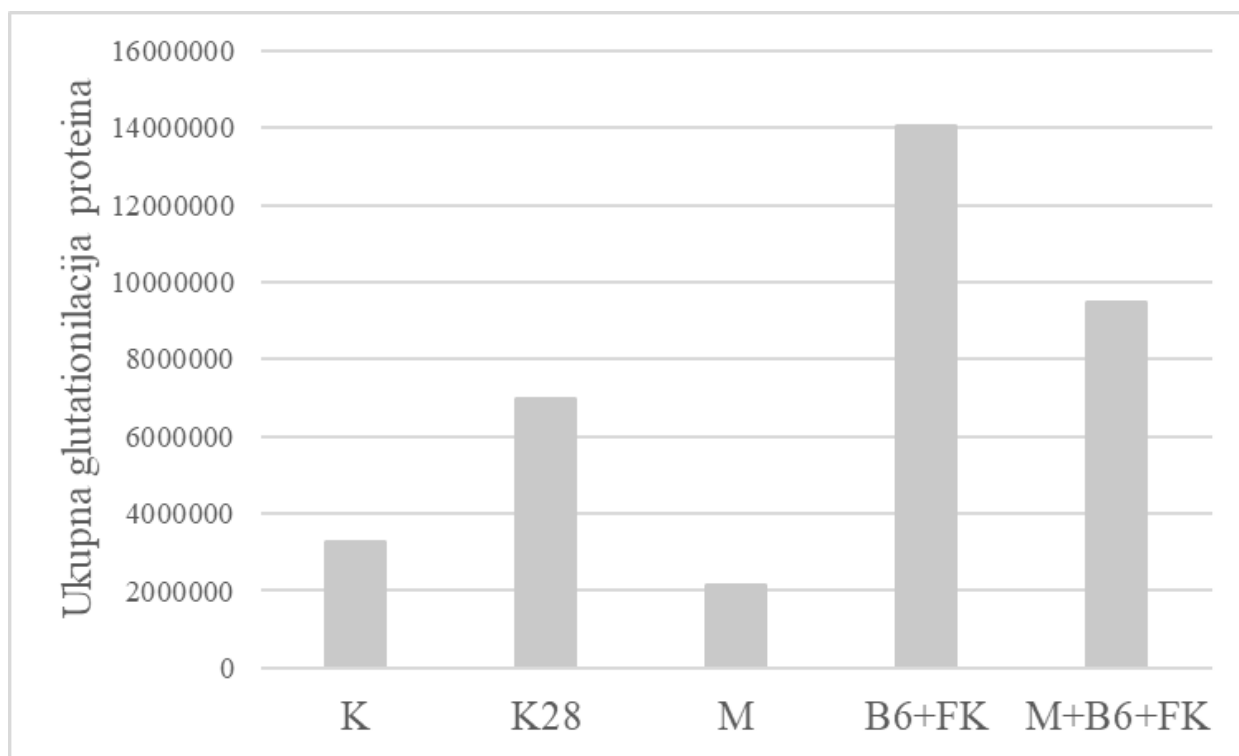
Nivo ukupne glutationalacije proteina procenjen je *Western blot*-om u pet grupa uzoraka (K, K28, M, B6+FK, M+B6+FK). Za ispitivanje ukupne glutationalacije proteina korišćeno je monoklonsko glutation-antitelo. Slika 4.52 prikazuje pojaseve koji reaguju sa antitelom protiv glutaciona u pet ispitivanih grupa uzoraka (K, K28, M, B6+FK, M+B6+FK). Ukupan nivo glutationalacije se povećao u M+B6+FK grupi u poređenju sa M grupom ($p = 0.001$) (Slika 4.53). Densitometrijska analiza je takođe pokazala smanjene nivoe glutationalacije proteina u M+B6+FK grupi u poređenju sa B6+FK grupom koja ima granični značaj ($p = 0.064$). Nije bilo statistički značajne razlike kada su upoređene K28 i B6+FK grupe.



Slika 4.52 Nivo ukupne glutationalacije proteina *Western blot*-om

MR-marker molekularne težine (kDA)

K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); K28-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. 28 dana); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru fiziološkog rastvora 1 ml/kg ip. jednokratno); B6+FK (vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvor 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana i vitamin B9 5mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); M+B6+FK (M 50mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. jednokratno i vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg ip. tokom 28 dana vitamin B9 5mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana)



Slika 4.53 Denzitometrijska analiza dobijenih *blot*-ova - softver ImageLab (Bio-Rad, SAD)

K-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. jednokratno); K28-kontrola (fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. ip. 28 dana); M-monokrotalinska grupa (M 50 mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru fiziološkog rastvora 1 ml/kg ip. jednokratno); B6+FK (vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvor 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana i vitamin B9 5mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana); M+B6+FK (M 50mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. jednokratno i vitamin B6 7mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg ip. tokom 28 dana vitamin B9 5mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru 1ml/kg t.m. ip. tokom 28 dana)

5. DISKUSIJA

U ovoj studiji ispitivan je uticaj četvoronedeljne intraperitonealne pojedinačne ili udružene aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na kardiometaboličke biomarkere i parametre oksidativnog stresa, kao i na histomorfometrijske i imunohistohemijske promene na modelu srčane insuficijencije kod pacova indukovane monokrotalinom. Brojni podaci iz literature ukazuju na to da eksperimentalno indukovana srčana insuficijencija, izazivanjem plućne arterijske hipertenzije, što se postiže primenom makrocikličnog pirolizidin alkaloida-monokrotalina, dovodi do promena vaskularnog zida, povećanja plućnog vaskularnog otpora, hipertrofije desnog srca i oksidativnog stresa (Gomez-Arroyo et al., 2012; Jakovljevic Uzelac et al., 2020).

Najčešće korišćeni animalni modeli za plućnu arterijsku hipertenziju i posledičnu insuficijenciju desnog srca su hronični hipoksični model i monokrotalinski model. Mnogi istraživači favorizuju monokrotalinski model zbog vrlo jednostavnog, a time i tehnički privlačnog animalnog modela. Monokrotalin pirol (MCTP) mora biti aktiviran do reaktivnog bifunkcionalnog jedinjenja u jetri, vaskulotoksičnog, što dovodi do vaskularnih oštećenja. Odgovor na monokrotalin je različit među različitim animalnim vrstama i sojevima, što je uzrokovano i razlikama u metabolizmu citohroma P-450 u jetri (Huxtable, 1990; Campian et al., 2006). Tačan mehanizam PAH izazvanog monokrotalinom nije poznat, ali mnogi istraživači pretpostavljaju da on izaziva direktno oštećenje plućnog endotela što dovodi do povećanja plućnog vaskularnog otpora (PVR), što desna komora kompenzuje hipertrofijom i na kraju otkazuje. U ovom istraživanju korišćena je ehokardiografska procena radi potvrde monokrotalinskog animalnog modela. Ovaj relativno kratak vremenski interval praćenja, od 28 dana, nije mogao obezbediti razvoj bilo kakvog uticaja desne komore na smanjenje lumena leve komore, odnosno na promene parametara vezanih za levu komoru.

Primena mikronutrijenata mogla bi da optimizuje ukupni metabolizam insuficijentnog srca i modulira molekularne mehanizme odgovorne za progresiju srčane slabosti, uključujući hipertrofiju, oksidativni stress, inflamaciju, disfunkciju endotela, fibrozu, angiogenezu i apoptozu. Sa druge strane, neadekvatna suplementacija mogla bi biti povezana sa neželjenim efektima. Supstance poput folne kiseline, vitamina B6, B12 i C, L-arginina, albumina i magnezijuma mogu imati određenu ulogu, ali i terapijske efekte u SI. Neke studije su pokazale da vitamin B6 ima antioksidativni efekat inhibirajući stvaranje superoksidnog radikala, smanjujući peroksidaciju lipida (Cabrini et al., 1998; Maranesi et al., 2004; Selvam i Ravichandran, 1991). Ova zapažanja zajednički sugerišu da primena vitamina B6 može modulirati kardiovaskularni rizik svojim antioksidativnim efektom. Nedostatak vitamina B6 povećava peroksidaciju lipida i smanjuje antioksidativnu odbranu, pa se stoga može povezati sa aterogenezom (Chambers, 2000). Mnoga zapažanja ističu važnost vitamina B6 kao značajnog, nezavisnog faktora rizika za kardiovaskularne bolesti, a u nekim (Robinson et al., 1998), ali ne u svim studijama kontrole slučaja, nedostatak vitamina B6 je očigledno povezan sa većim rizikom od kardiovaskularnih bolesti (Friso et al., 2004; Robinson et al., 1998), iako su klinička ispitivanja svedočila o neefikasnosti suplementacije vitaminom B6 na ponavljanje kardiovaskularnih događaja (Wilmink et al., 2004; Albert et al., 2008; Toole et al., 2004). Studija HOPE 2 (Lonn et al., 2006), studija NORVIT (Bonna et al., 2006) i studija VITRO (den Heijer et al., 2007) dosledno su pokazale da suplementacija vitaminom B6 nije efikasna u prevenciji ponavljanja kardiovaskularnih događaja, uključujući bolest koronarnih arterija, moždani udar i duboku vensku trombozu. Dalje, takođe je predloženo da dodatak vitamina B6 može imati zaštitne efekte u primarnoj prevenciji, ali ne i u sekundarnoj (Jayedi i Zargar, 2018). Kroz našu studiju registrovali smo i analizirali rezultate u vezi sa potencijalnim uticajem vitamina B6 i utvrdili efekte subhronične intraperitonealne aplikacije vitamina B6 na kardiometaboličke biomarkere i parametre oksidativnog stresa, kao i efekte na histomorfometrijske i imunohistohemijske promene u monokrotalinom-indukovanoj srčanoj insuficijenciji.

Visok nivo homocisteina u plazmi podstiče hronično sistemsko zapaljenje kroz indukciju oksidativnog stresa u različitim vrstama tkiva i naknadna unutarćelijska i vanćelijska oštećenja (Kolling et al., 2011; Matté et al., 2009; Li et al., 2015). Taj odnos (između Hcy i hronične upale)

nije samo jednosmerana interakcija. Steele et al. (2013) pokazali su u *in vitro* eksperimentima efekte koji zavise od koncentracije. Pro-inflamatorni citokini (interleukin-1b (IL-1b) i TNF-alfa) modifikovali su redoks-stanje ćelija i povećali vanćelijsku koncentraciju Hcy. Dalje, Ulvik et al. (2014) pokazali su da je sistemsko zapaljenje povećalo katabolizam vitamina B6 i unošenje u ćeliju, a rezultiralo smanjenim koncentracijama vitamina B6 u plazmi. Nedostatak vitamina B grupe (prvenstveno folata, vitamina B6 i B12) može rezultirati hiperhomocisteinemijom, zbog ometanja Hcy detoksifikacije, dovodi do oksidativne neravnoteže i prekomerne produkcije ROS-a (kao što su peroksidi i slobodni radikali). Slobodni radikali su izazvali oštećenje baza DNK, raskidanje lanca DNK i ubrzali skraćivanje telomera (Fan et al., 2017). Neke studije koje opisuju vezu između Hcy i skraćivanja telomera su u suprotnosti. Određeni broj njih je našao obrnutu vezu između dužine telomera i Hcy (Richards et al. 2008, Rane et al. 2015, Shin i Baik 2016), a drugi nisu (Liu et al., 2013; Milne et al., 2015; Nomura et al., 2017). Dodatno, vitamin B6 je bio snažni prediktor smrtnih ishoda. Ispitanici sa najvišim koncentracijama vitamina B6 imali su 59% manji rizik da umru tokom praćenja. Pokazano je da su ispitanici sa najvećom dužinom telomere leukocita korigovane uzrastom (LTL) imali veću srednju koncentraciju vitamina B6 i istovremeno nižu koncentraciju Hcy u plazmi. Posle tretmana vitaminom B6 primetili smo pozitivno dejstvo ove primene na parametre oksidativnog stresa. Naime, povećanje ukupnog sadržaja glutaciona i tiolne grupe u poređenju sa monokrotalinskim tretmanom podrazumeva njegov značajni efekat u smanjenju oksidativnog stresa. Pored toga, nakon primene vitamina B6, aktivnost superoksid dismutaze je samo neznatno smanjena, dok je aktivnost glutation peroksidaze značajno smanjena. Ovi podaci mogu biti biološki verodostojni, imajući u vidu sposobnost vitamina B6 da neutrališe superoksidni anjon (Mahfouz i Kummerov, 2004). Štaviše, ovaj efekat relativno nepromenjene aktivnosti SOD-a i smanjene GPx-a može dovesti do povećanja koncentracije vodonik-peroksida, koji je nedavno prepoznat kao važan signalni molekul. Kako SOD katalizuje konverziju superoksid anjona ($O_2^{\cdot-}$) u vodonik-peroksid (H_2O_2) i elementarni kiseonik O_2 , kao takav, smatra se izuzetno važnim antioksidansom u aerobnim ćelijama. Akumulacija ROS-a, uključujući slobodni radikal superoksida (O_2), može oštetiti membrane lipida, proteine i DNK. Pored toga, vrste ROS-a mogu biti važan odlučujući faktor sa superoksidnim anjonom koji dovodi do rasta ćelija, a vodonik peroksid do ćelijske smrti. Konkretno, adaptivni porast GPx aktivnosti koji je primećen nakon tretmana monokrotalinom, prekinut je aplikacijom vitamina B6, dok je aktivnost SOD-a ostala gotovo ista. Podaci iz literature sugerišu da vitamin B6 ima sposobnost da neutrališe superoksidni anjon, što može da poništi adaptivnu regulaciju SOD-a, GPx-a, ukupnog GSH, sadržaja tiolnih i karbiničnih grupa, što dodatno potencira duboke oksidativne modifikacije ključnih makromolekula (Mahfouz i Kummerov, 2009). Iako vitamin B6 deluje antioksidativno i anti-inflamatorno (Lotto et al., 2011; Joshi et al., 2001) i koristi se u primarnoj prevenciji koronarne bolesti srca, otkrili smo značajno zadebljanje prečnika zida leve komore i interventrikularnog septuma u M+B6 grupi. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima naše prethodne studije (Jakovljević Uzelac et al., 2020), pa bi to moglo biti posledica direktnog uticaja suplementacije ili sekundarnog remodelovanja miokarda.

Aktuelne studije ukazuju da suplementacija vitaminom B6 nije efikasna u sprečavanju recidiva kardiovaskularnih bolesti. Ipak, još uvek je potrebno utvrditi da li je suplementacija vitaminom B6 efikasna za primarnu prevenciju kardiovaskularnih bolesti. S obzirom na to da je vitamin B6 dostupan kroz mnogo različitih fizioloških oblika i u kombinaciji sa drugim nutrijentima i ostalim vitaminima B grupe koji su uključeni u složeni metabolizam vitamina B6, postavlja se pitanje da li je suplementacija jednom visokom dozom vitamina B6 efikasna kao dovoljan unos ovog vitamina. Potrebno je više studija kako bi se pronašla optimalna doza i odgovarajuća kombinacija oblika vitamina B6 koji povećavaju efikasnost i smanjuju neželjene efekte, čak i na osnovu genetske osetljivosti i uzimajući u obzir druge faktore životne sredine, kako bi se adekvatno procenila uloga kako vitamina B6, ali i ostalih vitamina B grupe, u primarnoj prevenciji kardiovaskularnih bolesti.

U ovoj studiji utvrđeni su poremećaji redoks regulacije koji su rezultirali oksidativnim stresom u srčanom tkivu nakon primene monokrotalina. Štaviše, ustanovili smo porast koncentracije mokraćne kiseline u plazmi, verovatno nastao kao posledica sistemskog oksidativnog stresa. Neke epidemiološke studije otkrile su da visoki nivoi mokraćne kiseline snažno koreliraju sa

povećanim kardiovaskularnim rizikom, ali osnovni mehanizmi još nisu ustanovljeni (Doehner et al., 2007). Kao što je već poznato, mokraćna kiselina predstavlja surogat marker aktivnosti ksantin oksidaze, jedan od ključnih enzimskih izvora reaktivnih vrsta kiseonika. Primećeno je da inhibicija ksantin oksidaze alopurinolom smanjuje proizvodnju reaktivnih vrsta kiseonika i nivo oksidativnog stresa, nezavisno od njegovih efekata na mokraćnu kiselinu (Farquharson et al., 2002; George et al., 2006). Oksidativni stres ima ključnu ulogu u patogenezi i napredovanju srčane insuficijencije. Proizvodnja reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) mogla bi uticati na vitalne ćelijske molekule i signalne puteve ćelija uključenih u ćelijsku smrt, oštećenje mitohondrijalne DNK (mtDNA), mitohondrijsku disfunkciju, proliferaciju fibroblasta, oštećenu kontraktilnost i srčanu hipertrofiju. Sve ove promene konačno dovode do remodelovanja miokarda i srčane disfunkcije. U mnogim studijama je pokazano da je desna komora znatno slabija u antioksidativnim mehanizmima odbrane u odnosu na levu komoru. Stoga je desna komora podložnija većim oštećenjima od oksidativnog stresa u odnosu na levu komoru (Reddy i Bernstein, 2015; Schreckenberget al., 2015; Borchiet al., 2010). Schreckenberget al. (2015) otkrili su da je desna komora izložena većem oštećenju od oksidativnog stresa, kao što je otkriveno bojenjem dihidroetidijuma za superoksid i merenjima peroksinitrita. Kvantifikacija nitrotirozina indirektno pokazuje proizvodnju peroksinitrita i oksidativnog oštećenja u endotelnim ćelijama (Baez et al., 2018). Utvrđeni su i različiti nivoi superoksida između dve komore, što može biti uzrokovano različitom ekspresijom mangan-superoksid-dizmutaze. Ta studija je pokazala da u uslovima nedostatka azot-monoksida desna komora nema sposobnost da pojačano reguliše mangan-superoksid-dizmutazu, kao i da se specifična oksidacija proteina može desiti u SU5416/ovalbumin-induciranom modelu plućne hipertenzije izazvanom otkazivanjem desne komore. Ukupna karbonilacija proteina nije promenjena u desnoj komori pacova sa plućnom arterijskom hipertenzijom u poređenju sa kontrolama (Wang et al., 2017), takođe primećenim u našoj studiji.

Primena folne kiseline u zdravoj populaciji pokazala je da je veći unos folata koristan za smanjenje rizika od koronarne bolesti (Alfthan et al., 2003; Tucker et al., 1996; Medrano et al., 2000). Folna kiselina (vitamin B9) je neophodna za pravilno funkcionisanje endotela (Chambers, 2000). Takođe, primećeno je da dvomesečna suplementacija folata kod zdravih ispitanika nije smanjila nivo NT-pro BNP-a (Herrmann et al., 2007). Posle tretmana folnom kiselinom primetili smo negativne efekte ove primene na oksidativni stres. Naime, u grupi M+FK smanjen je nivo tiolnih grupa, ukupnog glutaciona i karbonilnih grupa u odnosu na M grupu. Adaptivni porast aktivnosti SOD-a koji je primećen nakon tretmana monokrotalinom prekinut je primenom folne kiseline, dok je aktivnost GPx-a bila gotovo ista. Hunaiti i Saleh su primetili smanjenje aktivnosti SOD-a kod trudnica nakon suplementacije vitaminima (Hunaiti i Saleh, 1996). U našim nalazima folna kiselina može imati „štetne“ efekte na već oštećeno srce, iako mehanizmi odgovorni za ove efekte i dalje nisu poznati. S-glutationilacija proteina, kao postranslaciona modifikacija, uključena je u kritične signalne mehanizme kod kardiovaskularnih bolesti. Regulira kontrakciju miocita, oksidativnu fosforilaciju, sintezu proteina, vazodilataciju, glikolitički metabolizam i odgovor na insulin. S-glutationilacija proteina se odigrava reverzibilnom interakcijom tripeptida glutaciona sa proteinskim tiolom stvaranjem disulfidne veze. Usled oksidativnog stresa, veliki broj mehanizama odgovoran je za pojavu S-glutationilacije (Zweier et al., 2011). S-glutationilacija utiče ili na fosfataze i/ili kinaze i taj odnos između glutacionilacije i fosforilacije može biti presudan za pravilno funkcionisanje srčanih proteina. Poremećaji u statusu glutacionilacionih proteina mogu doprineti etiologiji mnogih kardiovaskularnih bolesti, poput infarkta miokarda, srčane hipertrofije i ateroskleroze (Pastore i Piemonte, 2013). Srčani proteini se mogu modulisati pomoću S-glutationilacije. Promene eNOS-a mogu dovesti do hipertenzije uzrokujući gubitak relaksacije zavisne od endotela. Glavni regulator signalizacije faktora rasta u vaskulaturi p21Ras, modulisan S-glutationilacijom može da izazove hipertrofiju indukovanu angiotenzinom II u vaskularnim ćelijama glatkih mišića (Adachi et al., 2004). U ovom istraživanju nisu registrovane značajne promene u statusu glutacionilacije srčanih proteina. Međutim, primećeni trend povećanja ukupne glutacionilacije nakon primene folne kiseline u kontrolnoj i grupi u kojoj je indukovana srčana insuficijencija ukazuje na njen efekat, na redoks signalizaciju i regulaciju.

U ovoj studiji utvrđeno je da je broj miocita zapravo povećan nakon indukcije srčane insuficijencije aplikacijom monokrotalina, što je potvrđeno prisustvom Ki67 i PCNA pozitivnih kardiomiocita. Protein Ki67 prisutan je tokom svih aktivnih faza ćelijskog ciklusa (G1, S, G2 i mitoze), ali odsustvuje u G0 fazi (Scholzen et al., 2000), što dovodi do činjenice da Ki67 može biti marker proliferacije, ali ne mora nužno rezultirati dupliranjem ćelija (Novoyatleva et al., 2010; Tamamori-Adachi et al., 2008). Kajstura et al. (1998) pokazali su proliferaciju miocita kod srčane insuficijencije. Primetili su da u miokardu odraslog čoveka nije došlo do diferencijacije subpopulacije miocita koji su ponovo ušli u ćelijski ciklus. Neke studije su pokazale da kod srčane insuficijencije može započeti ćelijski ciklus (povećana ekspresija Ki-67 antigena), ali ne i nužno dovršiti, i još uvek nije poznato da li ove promene imaju bilo kakvu prognostičku ulogu. U ovoj studiji proliferacija kardiomiocita je smanjena primenom vitamina B grupe nakon 4 nedelje tretmana i pokazala je pozitivnu korelaciju sa debljinom zida desne komore.

I pored antioksidativnog i anti-inflamatornog dejstva vitamina B6 i folne kiseline, ustanovili smo značajno zadebljanje zida leve komore i istu tendenciju u debljini interventrikularnog septuma u M+B6+FK grupama. Razlog tome može biti direktan uticaj ovih supstanci u srcu ili sekundarno remodelovanje srca. Većina studija koje uključuju primenu vitamina B6 i folne kiseline rađena je u zdravoj populaciji, bez postojećih kardiovaskularnih bolesti. Dobro je poznato da je veći unos vitamina B grupe i folata koristan i povezan je sa nižim rizikom od srčanih bolesti (Alfthan et al., 2003). Međutim, nekoliko studija nije otkrilo smanjenje rizika od koronarne bolesti (Bazzano et al., 2006; Clarke et al., 2010; Li et al., 2016; Miller et al., 2010). Dodatno, studija rađena na osobama ženskog pola, ukazuje da dugotrajno kombinovano lečenje folnom kiselinom, vitaminom B6 i vitaminom B12 ne menja biomarkere inflamacije i endotelne disfunkcije (Christen et al., 2018). Smatra se da suplementi vitamina B6 i folne kiseline imaju „dva lica“, gde se benefiti mogu uočiti u fazi prevencije, a kada već dođe do pojave bolesti, efekat je oslabljen. Pretpostavlja se da je suplementacija vitaminima B grupe efikasna kod pacijenata bez kardiovaskularnih događaja, dok je neefikasna kod pacijenata koji su ih već imali (Lotto et al., 2011). U ovoj studiji vitamin B6 i folna kiselina su aplikovani nakon indukcije srčane insuficijencije monokrotalinom, što potvrđuje činjenicu da mogu imati „štetne efekte“ na već oštećeno srce. Ovo istraživanje je pokazalo da pacovi u modelu srčane insuficijencije izazvanom monokrotalinom pokazuju oksidativni stres na osnovu smanjenog nivoa proteinskih tiol grupa, ukupnog sadržaja glutaciona i karbonilnih grupa, što je praćeno povećanjem aktivnosti SOD i GPx. Oksidativni stres predstavlja patološko stanje u kome se ravnoteža stvaranja i detoksikacije oksidanata usmerava prema pro-oksidantnom stanju, antioksidativna odbrana je „preplavljena“ i akumuliraju se reaktivne vrste. U patofiziologiji srčane insuficijencije sugerisano je da oksidativni stres može biti posledica povećanog nivoa cirkulišućih neurohormona, narušenog redoks balansa, i hemodinamskog poremećaja, zajedno sa inflamacijom i smanjenom distribucijom kiseonika. S druge strane, poremećeni redoks balans u srčanoj insuficijenciji može doprineti daljem oštećenju srčane funkcije, bilo oksidativnim oštećenjem vitalnih ćelijskih molekula, bilo uticajem na ćelijsku signalizaciju koja je uključena u apoptozu. Negativna strana reaktivnih kiseoničnih vrsta ogleda se kroz aktivaciju širokog spektra signalnih puteva povezanih sa ćelijskom smrću, proliferacijom srčanih fibroblasta, aktivacijom matičnih metaloproteinaza, oštećenjem mtDNK, disfunkcijom mitohondrija, i srčanom hipertrofijom, što sve na kraju dovodi do neprilagođenog remodelovanja miokarda i srčane disfunkcije.

Superoxid dizmutaza (SOD) i glutation peroksidaza (GPx) deluju na međusobno podržavajući način da bi uklonili višak superoksida, H_2O_2 i drugih lipidnih peroksida. Posle kombinovanog tretmana sa vitaminom B6 i folnom kiselinom, primetili smo negativne efekte ove primene na oksidativni stres. Naime, sadržaj tiolne grupe bio je dvostruko niži nego u M grupi, dok je ukupan glutation takođe smanjen. Sadržaj nitrotirozina modifikovan je istim trendom. Stvaranje nitrotirozina predstavlja specifičnu modifikaciju proteina posredovanu peroksinitritima i smatra se biomarkerom za endogenu aktivnost peroksinitrita. Naši rezultati su u korelaciji sa rezultatima Baez-a et al. (2018). Može se pretpostaviti da je faktor koji doprinosi pojačavanju oksidativnog stresa nakon zajedničke primene smanjena aktivnost SOD-a. Konkretno, adaptivni porast aktivnosti

SOD-a koji je primećen nakon tretmana monokrotalinom, prekinut je primenom vitamina B6 i folne kiseline, dok je GPx ostao isti. S obzirom na nalaze da u srčanoj insuficijenciji izazvanoj monokrotalinom, nakon aplikacije vitamin B6 i folna kiselina imaju i nepoželjne efekte, ovi rezultati su biološki verodostojni, iako odgovorni mehanizmi ostaju nepoznati. Čini se da se aktivnosti antioksidativnih enzima u srčanoj insuficijenciji izazvanoj monokrotalinom razlikuju u odnosu na ćelijski tip, a rezultati različitih studija bili su suprotni. Dakle, Mohammadi et al. (2012), otkrili su da su vanćelijski nivoi superoksid dismutaze i glutation peroksidaze, kod pacova tretiranih monokrotalinom, značajno smanjeni četiri nedelje nakon tretmana. Slična regulacija antioksidativnih enzima u srčanoj insuficijenciji izazvanoj monokrotalinom takođe je pronađena u mišićnom tkivu *soleus-a* (SOL-oksidativni i spori trzaji mišića) (Bertaglia et al., 2011). S druge strane, istraživanje Picharda et al. (1999), koji su merili aktivnosti antioksidativnih enzima 3 nedelje nakon primene monokrotalina, nisu pokazali razliku između kontrolne grupe i grupe tretirane monokrotalinom. Štaviše, Farahmand et al. (2004), a u skladu sa našim rezultatima, pokazali su značajan porast aktivnosti antioksidativnih enzima u srčanom tkivu, praćen povećanjem debljine zida septuma 2 nedelje nakon primene monokrotalina. Srčani mišić nije jedino mišićno tkivo koje u početku reaguje povećanjem aktivnosti ovih enzima nakon monokrotalinskog tretmana. Dakle, u modelu plućne arterijske hipertenzije i posledične srčane insuficijencije kod pacova indukovane sa 60 mg/kg monokrotalina, ekspresija proteina SOD2 i katalaze (CAT) je značajno povećana u mišićima dijafragme. Kada se uzmu u obzir svi ovi podaci, oni ukazuju na složenu regulaciju transkripcije antioksidativnih enzima nakon monokrotalinskog tretmana, koju treba dalje istražiti. Ekspresija za tkivo specifičnih izoformi antioksidativnih enzima dalje doprinosi heterogenosti kao odgovor na monokrotalin. U drugim studijama pokazano je da stadijumske patobiološke promene igraju ulogu u toku razvoja insuficijencije leve komore, gde je predložen dvofazni odgovor na oksidativni stres. Naime, u stadijumu hipertrofije leve komore primećen je značajan porast aktivnosti antioksidativnih enzima usled njihove reaktivne regulacije kao odgovor na oksidativni stres, dok je fazu „neuspeha“ karakterisao pad aktivnosti antioksidativnih enzima i posledično povećanje biomarkera oksidativne aktivnosti. Zanimljivo je da je u pomenutoj studiji Farahmand et al. (2004), početna regulacija aktivnosti antioksidativnih enzima nakon primene monokrotalina praćena njihovim smanjenjem i pojačanom peroksidacijom lipida 6 nedelja nakon tretmana, sugerišući da sličan dvofazni obrazac promena može takođe postojati u razvoju insuficijencije desne komore, barem u monokrotalinskom modelu.

Preostaje da se kroz nova istraživanja ispita tačna korelacija između nivoa odgovarajućih primenjenih suplemenata u plazmi i težine srčane insuficijencije, kao i do koje mere bi ovi nutritivni faktori mogli da imaju pozitivan učinak na srčanu insuficijenciju.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

[1] Nakon aplikacije monokrotalina (M) u odnosu na kontrolnu grupu (K)

- Tretman monokrotalinom praćen je značajnim porastom troponina T, glukoze, faktora *von Willebrand*, zatim značajnim smanjenjem HDL, ukupnih proteina i albumina, kao i značajnim smanjenjem aktivnosti α -amilaze, ali i očuvanom funkcijom bubrega i jetre
- Pokazana je hipertrofija zida desne komore
- Prisutno je značajno povećanje Ki67 i PCNA pozitivnosti u zidu desne komore
- Aplikacijom monokrotalina povećava se aktivnost oba antioksidantna enzima, SOD i GPx, koji su u slučaju GPx dostigli visoku statističku značajnost
- Suprotno tome, ukupni sadržaj glutaciona bio je niži u M grupi u poređenju sa kontrolnom grupom K, sa visokom statističkom značajnošću
- Nivo tiolnog statusa takođe je bio značajno smanjen u M grupi u poređenju sa K grupom, kao i sadržaj karbonilnih grupa
- Sadržaj nitrotirozina takođe je bio smanjen u M grupi u poređenju sa kontrolnom grupom K, ali nije bilo statistički značajne razlike
- Denzitometrijska analiza je pokazala smanjeni nivo glutationilacije proteina u M grupi u poređenju sa K grupom
- Nakon dve nedelje od tretmana unutrašnji prečnik desne komore (*RVID*) statistički značajno se povećao u poređenju sa početnim vrednostima kod pacova tretiranih monokrotalinom i u poređenju sa kontrolnom grupom; nije bilo promena u ejectionoj frakciji leve komore (*LVEF*) u poređenju sa početnim vrednostima kod pacova tretiranih monokrotalinom i u poređenju sa kontrolnom grupom

[2] Nakon aplikacije vitamina B6 kod monokrotalinom indukovane srčane insuficijencije

- Prisutan je trend smanjenja troponina T, značajno smanjenje AST, albumina i *von Willebrand*-ovog faktora, porast aktivnosti α -amilaze, kao i povećanje CHL i HDL
- Prisutno je značajno zadebljanje zida leve komore i interventrikularnog septuma, i trend smanjenja debljine zida desne komore
- Smanjena je Ki67 i PCNA pozitivnost u zidu desne komore
- Aktivnost SOD-a je blago smanjena u grupi M+B6 u poređenju sa M grupom, dok je aktivnost GPx-a visoko statistički značajno smanjena u grupi M+B6 u poređenju sa M grupom
- Vrednosti ukupnog GSH imale su trend porasta u M+B6 grupi u poređenju sa M grupom
- Intraperitonealna aplikacija vitamina B6 sa monokrotalinom indukovanom SI veoma je povećala sadržaj tiol grupa u poređenju sa M grupom
- Sadržaj RCD i nitrotirozina pokazao je sličan trend u poređenju sa M grupom, ali bez postizanja statističke značajnosti
- Ukupni nivo glutationilacije je blago smanjen u grupi M+B6 u poređenju sa grupom M bez statistički značajne vrednosti. Denzitometrijska analiza je takođe pokazala smanjen nivo glutationilacije proteina u grupi M+B6 u poređenju sa grupom B6 sa graničnim značajem

[3] Nakon aplikacije folne kiseline kod monokrotalinom indukovane srčane insuficijencije

- Prisutan je trend smanjenja troponina T, značajno smanjenje albumina i *von Willebrand*-ovog faktora, kao i povećanje CHL, ali i značajno smanjenje aktivnosti enzima ALP
- Prisutno je značajno zadebljanje interventrikularnog septuma, i trend smanjenja debljine zida desne komore
- Smanjena je Ki67 i PCNA pozitivnost u zidu desne komore
- Aktivnost SOD-a značajno je smanjena, dok je GPx aktivnost pokazala trend porasta u poređenju sa M grupom
- Vrednosti ukupnog glutaciona nakon primene folne kiseline smanjene su u poređenju sa M grupom
- Primena folne kiseline izazvala je trend smanjenja sadržaja tiolnih grupa u poređenju sa M grupom bez značajne razlike
- Sadržaj reaktivnih karbonilnih derivata i nitrotirozina pokazao je sličan trend smanjenja vrednosti u poređenju sa M grupom, ali bez dostizanja statističke značajnosti
- Ukupni nivo glutationilacije je porastao u M+FK grupi u poređenju sa M grupom, iako nije zabeležena statistički značajna razlika

[4] Nakon udružene aplikacije vitamina B6 i folne kiseline kod monokrotalinom indukovane srčane insuficijencije

- Prisutan je trend smanjenja troponina T i *von Willebrand*-ovog faktora, kao i značajno povećanje CHL i TGL, dok je aktivnost enzima ALP značajno smanjena, a aktivnost α -amilaze je značajno povećana
- Prisutno je značajno zadebljanje zida leve komore i interventrikularnog septuma, i trend zadebljanja zida desne komore bez dostizanja statističke značajnosti
- Povećana je Ki67 i PCNA pozitivnost u zidu desne komore
- Posle primene vitamina B6 i folne kiseline, aktivnost SOD se značajno smanjila u poređenju sa M grupom. GPx aktivnost pokazala je sličan trend u poređenju sa M grupom, ali bez dostizanja statističke značajnosti
- Vrednosti ukupnog glutaciona statistički su značajno smanjene u poređenju sa M grupom
- Istovremena primena vitamina B6 i folne kiseline indukovala je smanjenje sadržaja tiolnih grupa, ali ne i statistički značajnu razliku u poređenju sa M grupom
- Sadržaj reaktivnih karbonilnih derivata i nitrotirozina pokazao je sličan trend smanjenja vrednosti u poređenju sa M grupom, ali bez dostizanja statističkog značaja
- Ukupan nivo glutationilacije se povećao u M+B6+FK grupi u poređenju sa M grupom.

7. LITERATURA

- Abbate A, Bussani R, Amin M, et al. Acute myocardial infarction and heart failure: role of apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38(11): 1834–40.
- Adachi T, Pimentel D.R, Heibeck T, et al. S-glutathiolation of Ras mediates redox-sensitive signaling by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 29857–29862.
- Agarwal AK, Venugopalan P, Woodhouse C, de Bono D. Catecholamine levels in heart failure due to dilated cardiomyopathy and their relationship to the severity of heart failure. *Eur J Heart Fail* 2000; 2(3): 261-263.
- Albert CM, Cook NR, Gaziano JM, et al. Effect of folic acid and B vitamins on risk of cardiovascular events and total mortality among women at high risk for cardiovascular disease: a randomized trial. *JAMA* 2008; 299: 2027–2036.
- Alfthan G, Laurinen MS, Valsta LM, et al. Folate intake, plasma folate and homocysteine status in a random Finnish population. *European Journal of Clinical Nutrition* 2003; 57(1): 81–8.
- Andersen A, van der Feen DE, Andersen S, et al. Animal models of right heart failure. *Cardiovasc Diagn Ther* 2020; 10(5): 1561-1579.
- Angel JF. Gluconeogenesis in meal-fed, vitamin B6 deficient rats. *J Nutr* 1980; 110: 262–269.
- Aycock JE, Kirksey A. Influence of different levels of dietary pyridoxine on certain parameters of developing and mature brains in rats. *J Nutr* 1976; 106: 680–688.
- Bachetti T, Comini L, Agnoletti L, et al. Effects of chronic noradrenaline on the nitric oxide pathway in human endothelial cells. *Basic Res Cardiol* 1998; 93: 250-256.
- Baez MC, Scribano MP, Tarán M. Nitrotyrosine as a biomarker: recovery of histopathological atherogenic lesions in rats treated with ascorbic acid. *Trends Med* 2018; 18(4): 5-5.
- Bayraktutan U, Yang ZK, Shah AM. Selective dysregulation of nitric oxide synthase type 3 in cardiac myocytes but not coronary microvascular endothelial cells of spontaneously hypertensive rat. *Cardiovasc Res* 1998; 38: 719–726.
- Bazzano LA, Reynolds K, Holder KN, He J. Effect of folic acid supplementation on risk of cardiovascular diseases: A meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 2006; 296 (22): 2720–6.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 1620-1624.
- Belch JJ, Bridges AB, Scott N, Chopra M. Oxygen free radicals and congestive heart failure. *British Heart Journal* 1991; 65 (5): 245-8.
- Bers DM. Control of cardiac contraction by SR-Ca release and sarcolemmal-Ca fluxes. In: Bers DM, editor. *Excitation–contraction coupling and cardiac contractile force. Developments in cardiovascular medicine*, Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers, 1991; 122: 149–170.
- Bertaglia RS, Reissler J, Lopes FS, et al. Differential morphofunctional characteristics and gene expression in fast and slow muscle of rats with monocrotaline-induced heart failure. *J Mol Hist* 2011; 42(3): 205-15.
- Bessler H, Djaldetti M. Vitamin B6 modifies the immune cross-talk between mononuclear and colon carcinoma cells. *Folia Biol (Praha)* 2016; 62: 47-52.

- Bilski P, Li MY, Ehrenshaft M, et al. Vitamin B6 (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants. *Photochem Photobiol* 2000; 71: 129-34.
- Boluyt MO, O'Neill L, Meredith AL, et al. Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components. *Circ Res* 1994; 75: 23–32.
- Bønaa K, Njølstad I, Ueland P, et al. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 354: 1578-1588.
- Borch E, Bargelli V, Stillitano F, et al. Enhanced ROS production by NADPH oxidase is correlated to changes in antioxidant enzyme activity in human heart failure. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1802: 331–338.
- Brown MJ, Ameer MA, Beier K. Vitamin B6 Deficiency. In: *StatPearls*. Treasure Island: StatPearls Publishing; 2021.
- Brutsaert DL, Franssen P, Andries LJ, et al. Cardiac endothelium and myocardial function. *Cardiovascular Research* 1998; 38 (2): 281-290.
- Buermans HP, Redout EM, Schiel AE, et al. Microarray analysis reveals pivotal divergent mRNA expression profiles early in the development of either compensated ventricular hypertrophy or heart failure. *Physiol Genomics* 2005; 21: 314–323.
- Burchfield JS, Xie M, Hill JA. Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2, *Circulation* 2013; 128 (4): 388–400.
- Buss H, Chan TP, Sluis KB, et al. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radic Biol Med* 1997; 23: 361-366.
- Cabrini L, Bergami R, Fiorentini D, et al. Vitamin B6 deficiency affects antioxidant defences in rat liver and heart. *Biochem Mol Biol Int* 1998; 46: 689-697.
- Campian ME, Hardziyenka M, Michel MC, et al. How valid are animal models to evaluate treatments for pulmonary hypertension? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006; 373: 391–400.
- Canetti M, Akhter MW, Lerman A, et al. Evaluation of myocardial blood flow reserve in patients with chronic congestive heart failure due to idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2003; 92(10): 1246-1249.
- Capote L, Nyakundi R, Martinez B, et al. Pathophysiology of Heart Failure. In: Gowraganahalli J, Pitchai B, Maung-U Khin, editors. *Pathophysiology and Pharmacotherapy of Cardiovascular Disease*. Auckland: Adis; 2015. p. 37–55.
- Cardiovascular diseases (CVDs) [Internet]. WHO. Int. 2020 [2. Januar 2020]. Dostupno: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
- Chambers JC, Ueland PM, Obeid OA, et al. Improved vascular endothelial function after oral B vitamins: an effect mediated through reduced concentrations of free plasma homocysteine. *Circulation* 2000; 102: 2479–2483.
- Chen H, Xiong L. Pyridoxine is required for post embryonic root development and tolerance to osmotic and oxidant stresses. *Plant J* 2005; 44: 396-60.
- Christen WG, Cook NR, Van Denburgh M, et al. Effect of combined treatment with folic acid, vitamin B₆, and vitamin B₁₂ on plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction in women. *J Am Heart Assoc* 2018;18; 7(11).
- Christiansen MN, Køber L, Weeke P, et al. Age-specific trends in incidence, mortality, and comorbidities of heart failure in Denmark, 1995 to 2012. *Circulation* 2017; 135: 1214–1223.
- Clarke R, Halsey J, Lewington S, et al. Effects of lowering homocysteine levels with B vitamins on cardiovascular disease, cancer, and cause-specific mortality: Meta-analysis of 8 randomized trials involving 37485 individuals. *Archives of Internal Medicine* 2010; 170 (18): 1622.
- Cleland JG, Khand A, Clark A. The heart failure epidemic: exactly how big is it? *Eur Heart J* 2001; 22:623–6.

- Clifford AJ, Wilson DS, Bills ND. Repletion of folate-depleted rats with an amino acid-based diet supplemented with folic acid. *J Nutr* 1989; 119: 1956–1961.
- Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. On behalf of an international forum on cardiac remodeling. *Journal of the American College of Cardiology* 2000; 35 (3): 569–582.
- Collins SP, Storrow AB. Acute heart failure risk stratification: can we define low risk? *Heart Fail Clin* 2009; 5(1): 75-83.
- Cui R, Iso H, Chigusa D, et al. Dietary folate and vitamin B6 and B12 intake in relation to mortality from cardiovascular diseases, Japan Collaborative Cohort Study. *Stroke* 2010; 41: 1285–9.
- Czeizel AE, Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992; 327: 1832–1835.
- da Silva VR, Russel KA, Gregory III JF „Vitamin B6“ in present knowledge in nutrition (Wiley-Blackwell, New York), 2012; 307-320.
- Dahl LK, Heine M, Tassinari L. Role of genetic factors in susceptibility to experimental hypertension due to chronic excess salt ingestion. *Nature* 1962; 194: 480–482.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006; 52(4): 601-623.
- Dash R, Kadambi V, Schmidt AG, et al. Interactions between phospholamban and beta-adrenergic drive may lead to cardiomyopathy and early mortality. *Circulation* 2001; 103: 889-896.
- den Heijer M, Willems H, Blom H, et al. Homocysteine lowering by B vitamins and the secondary prevention of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: A randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Blood* 2007; 109: 139-144.
- Dhalla AK, Hill MF, Singal PK. Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28: 506-14.
- Dhalla NS, Takeda S, Elimban V. Mechanisms of the beneficial effects of vitamin B6 and pyridoxal 5'-phosphate on cardiac performance in ischemic heart disease. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51: 535-43.
- Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008. The task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail* 2008; 10(10): 933-989.
- DiNicolantonio JJ, Niazi AK, Lavie CJ, et al. Thiamine supplementation for the treatment of heart failure: a review of the literature. *Congest Heart Fail* 2013; 19: 214–222.
- Djuric D, Kojic Z, Jakovljevic V, Pavlovic M. Nitric oxide modulates contractility and oxygen consumption in isolated ventricle of the rat heart. *Iugoslavica Physiologica et Pharmacologica Acta* 2004; 40: 11-20.
- Djuric D, Vusanovic A, Jakovljevic V. The effects of folic acid and nitric oxide synthase inhibition on coronary flow and oxidative stress markers in isolated rat heart. *Mol Cell Biochem* 2007; 300(1-2): 177-83.
- Dodd DA, Atkinson JB, Olson RD, et al. Doxorubicin cardiomyopathy is associated with a decrease in calcium release channel of the sarcoplasmic reticulum in a chronic rabbit model. *J Clin Invest* 1993; 91: 1697–1705.
- Dodds RA, Catterall A, Bitensky L, Chayen J. Abnormalities in fracture healing induced by vitamin B6 deficiency in rats. *Bone* 1986; 7: 489–495.
- Doehner W, von Haehling S, Anker SD. Uric acid as a prognostic marker in acute heart failure new expectations from an old molecule. *Eur J Heart Fail* 2007; 9: 437–9.
- Dolgin M, Committee NYHAC. In: Dolgin M, editor. Nomenclature and criteria for diagnosis of diseases of the heart and great vessels. Boston: Little, Brown; 1994.

- Dorn GW. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension* 2007; 49 (5): 962–970.
- Drexler H, Hayoz D, Munzel T, et al. Endothelial function in chronic congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1992; 69: 1596–160.
- Driskell JA, Chuang SLL. Relation between glutamate decarboxylase activities in brains and the vitamin B6 requirement of male rats. *J Nutr* 1974; 104: 1657–1661.
- Dussault PE, Lepage M. In vitro studies of fatty acid metabolism in vitamin B6 deficient rats. *J Nutr* 1979; 109: 138–141.
- Fajardo G, Hornicke H. Problems in estimating the extent of coprophagy in the rat. *Br J Nutr* 1989; 62:551–561.
- Fan R, Zhang A, Zhong F. Association between homocysteine levels and all-cause mortality: a dose-response meta-analysis of prospective studies. *Sci Rep* 2017; 7: 4769.
- Fang J, Mensah GA, Croft JB, Keenan NL. Heart failure related hospitalization in the U.S., 1979 to 2004. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52(6): 428-434.
- Farahmand F, Hill MF, Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. 2004; 260(1-2): 21-9.
- Farquharson CA, Butler R, Hill A, et al. Allopurinol improves endothelial dysfunction in chronic heart failure. *Circulation* 2002; 106: 221–6.
- Fauchier L, Cosnay P, Babuty D, Fauchier JP. Prognosis of heart failure in idiopathic dilated cardiomyopathy: has it improved in tertiary referral centres over the last 10 years? *Eur Heart J* 2004; 25(21): 1967.
- Florea VG, Cohn JN. The autonomic nervous system and heart failure. *Circ Res* 2014; 114: 1815–1826.
- Fournier H, Butterworth RF. Effects of thiamin deficiency on thiamin-dependent enzymes in regions of the brain of pregnant rats and their offspring. *Metab Brain Dis* 1990; 5: 77–84.
- Francis GS. Pathophysiology of chronic heart failure. *Am J Med* 2001; 110(Suppl 7A): 37S–46.
- Frank LL. Thiamin in clinical practice. *J Parenter Enteral Nutr* 2015; 39: 503–520.
- Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Ann Rev Physiol* 2003; 65: 45–79.
- Friso S, Girelli D, Martinelli N, et al. Low plasma vitamin B6 concentrations and modulation of coronary artery disease risk. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 992-998.
- Fu M, Zhou J, Thunström E, et al. Optimizing the management of heart failure with preserved ejection fraction in the elderly by targeting comorbidities (OPTIMIZEHFPEF). *J Card Fail* 2016; 22: 539-544.
- Fujii K, Kajiwara T, Kurosu H. Effect of vitamin B6 deficiency on the crosslink formation of collagen. *FEBS Lett* 1979; 97: 193–195.
- Gaetano T, Domenico C, Cristina B. Cardiomyopathies: is it time for a molecular classification? *Eur Heart J* 2004; 25: 1772-1775.
- Garthoff LH, Garthoff SK, Tobin RB, Mehlman MA. The effect of riboflavin deficiency on key gluconeogenic enzyme activities in rat liver. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973; 143: 693–697.
- GBD 2017 Disease and injury incidence and prevalence collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2018; 392: 1789–1858.
- George J, Carr E, Davies J, et al. High-dose allopurinol improves endothelial function by profoundly reducing vascular oxidative stress and not by lowering uric acid. *Circulation*. 2006; 114: 2508–16.

- Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* 2005; 115: 500–508.
- Goldberg LR. In the clinic. Heart failure. *Annals of Internal Medicine*. 2010; 152 (11): ITC61-15.
- Gomes AC, Falcão-Pires I, Pires AL, et al. Rodent models of heart failure: an updated review. *Heart Fail Rev* 2013; 18(2): 219-49.
- Gomez-Arroyo JG, Farkas L, Alhussaini AA, et al. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 302: L363-9.
- Gronefeld GC, Hohnloser SH. Heart failure complicated by atrial fibrillation: mechanistic, prognostic, and therapeutic implications. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2003; 8(2): 107-113.
- Guilarte TR. Effect of vitamin B6 nutrition on the levels of dopamine, dopamine metabolites, dopa decarboxylase activity, tyrosine, and GABA in the developing rat corpus striatum. *Neurochem Res* 1989; 14: 571–578.
- Gunzler WA, Kremers H, Flohe L. An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase in blood. *Zeitschrift Fuer Klinische Chemie Und Klinische Biochemie* 1974; 12: 444–8.
- Haddad JJ, Harb HL. L-gamma-glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s). *Mol Immunol* 2005; 42, 987-1014.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 5th edition. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press; 2015.
- Hare JM, Stamler JS. NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J Clin Invest* 2005; 115: 509 –517.
- Hawkins WW. Skin symptoms of vitamin-B6 deficiency in the dog. *Science* 1955; 121: 880.
- Hayashi Y, Sawa Y, Nishimura M, et al. Peroxynitrite, a product between nitric oxide and superoxide anion, plays a cytotoxic role in the development of post-bypass systemic inflammatory response. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004; 26(2): 276-80.
- Heinzl B, John M, Klatt P, et al. Calcium/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J* 1992; 281: 627-630.
- Hellmann H, Mooney S. Vitamin B6: a molecule for human health? *Molecules* 2010;15: 442-459.
- Herrmann M, Stanger O, Paulweber B, et al. Effect of folate supplementation on N-terminal pro-brain natriuretic peptide. *Int J Cardiol* 2007; 118: 267-9.
- Hilfiker-Kleiner D, Landmesser U, Drexler H. Molecular mechanisms in heart failure. Focus on cardiac hypertrophy, inflammation, angiogenesis and apoptosis *JACC* 2006; 48: A56-A66
- Hill JA, Olson EN Cardiac plasticity. *N Engl J Med* 2008; 358 (13): 1370– 1380.
- Himmelfarb J, McMonagle E, Freedman S, et al. Oxidative stress is increased in critically ill patients with acute renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology* 2004; 15(9): 2449-56.
- Hirai T, Zelis R, Musch TI. Effects of nitric oxide synthase inhibition on the muscle blood flow response to exercise in rats with heart failure. *Cardiovasc Res* 1995; 30: 469-476.
- Hobara R, Yasuhara H. Erythrocytosis in thiamine deficient rats. *Jpn J Pharmacol* 1981; 31: 985–993.
- Horwitt MK. Riboflavin. In: W. H. Sebrell, Jr., R. S. Harris, editors. *The Vitamins*. New York: Academic Press; 1954. p. 380-391.
- Huang J, Wolk JH, Gewitz MH, Mathew R. Progressive endothelial cell damage in an inflammatory model of pulmonary hypertension. *Exp Lung Res* 2010; 36: 57–66.

- Huber AM, Gershoff SN, Hegsted DM. Carbohydrate and fat metabolism and response to insulin in vitamin B6-deficient rats. *J Nutr* 1964; 82: 371.
- Hunaiti AA, Saleh MS. Effects of iron, zinc, calcium, and vitamins on the activity and contents of human placental copper/zinc and manganese superoxide dismutases. *Biol Trace Elem Res* 1996; 54 (3): 231-8.
- Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, et al. 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 guidelines for the diagnosis and management of heart failure in adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association task force on practice guidelines. *Circulation* 2009; 119: e391– e479.
- Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, et al. ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (writing committee to update the 2001 guidelines for the evaluation and management of heart failure). *Circulation* 2005; 112: e154 – e235.
- Huxtable RJ. Activation and pulmonary toxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Pharmacol Ther* 1990; 47: 371–389.
- Inoko M, Kihara Y, Morii I, et al. Transition from compensatory hypertrophy to dilated, failing left ventricles in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol* 1994; 267: H2471–H2482.
- Institute of Medicine. Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. Washington, DC: National Academy Press, 1999.
- Jacques PF, et al. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N Engl J Med* 1999; 340: 1449–1454.
- Jakovljevic Uzelac J, Djukic T, Mutavdzin S, et al. The influence of subchronic co-application of vitamins B6 and folic acid on cardiac oxidative stress and biochemical markers in monocrotaline-induced heart failure in male Wistar albino rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2020; 98: 93–102.
- Jayedi A, Zargar MS. Intake of vitamin B6, folate, and vitamin B12 and risk of coronary heart disease: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2018; 15: 1-11.
- Jocelyn PC. Spectrophotometric assay of thiols. *Methods Enzymol* 1987; 143: 44–67.
- Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8(9-10): 1865-1879.
- Joseph J, Loscalzo J. Methoxistasis: integrating the roles of homocysteine and folic acid in cardiovascular pathobiology. *Nutrients* 2013; 5(8): 3235-56.
- Joshi RS, Adhikari BS, Patro S, et al. Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine* 2001; 30 (12): 1390–9.
- Jung S, Kim MK, Choi BY. The long-term relationship between dietary pantothenic acid (vitamin B5) intake and C-reactive protein concentration in adults aged 40 years and older. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2017; 27(9): 806-16.
- Kaiser L, Spickard RC, Oliver NB. Heart failure depresses endothelium-dependent responses in canine femoral artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1989; 256: H962–H967.
- Kajstura J, Leri A, Finato N, et al. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8801–5.
- Kajstura J, Zhang X, Reiss K, et al. Myocyte cellular hyperplasia and myocyte cellular hypertrophy contribute to chronic ventricular remodeling in coronary artery narrowing-induced cardiomyopathy in rats. *Circ Res* 1994; 74: 383–400.
- Kang L, Ge CJ, Hu SJ. Beneficial effect of atorvastatin on left ventricular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacology* 2007; 80(2-3): 120-6.

- Katz SD, Biasucci L, Sabba C, et al. Impaired endothelium-mediated vasodilation in the peripheral vasculature of patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19: 918-925.
- Kay JM, Harris P, Heath D. Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds. *Thorax* 1967; 22: 166-169.
- Keith M, Geranmayegan A, Sole MJ, et al. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 1352–1356.
- Keles M, Behcet A, Gumustekin K, et al. Antioxidative status and lipid peroxidation in kidney tissue of rats fed with vitamin B6-deficient diet. *Renal Failure* 2010; 32(5): 618–622.
- Kerns JC, Gutierrez JL. Thiamin. *Adv. Nutr.* 2017; 8: 395–397.
- Kirali K, Özer T, Özgür MM. Pathophysiology in Heart Failure. In: Kaan Kirali, editor. *Cardiomyopathies - Types and Treatments*. London: IntechOpen; 2017.
- Kirksey A, Morr e DM, Wasynczuk AZ. Neuronal development in vitamin B6 deficiency. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 585: 202-218.
- Kolling J, Scherer EB, da Cunha AA, et al. Homocysteine induces oxidative-nitrative stress in heart of rats: Prevention by folic acid. *Cardiovasc Toxicol* 2011; 11: 67–73.
- Kraus JP, Hasek J, Kozich V, et al. Cystathionine gamma-lyase: clinical, metabolic, genetic, and structural studies. *Mol Genet Metab* 2009; 97: 250-259.
- Krim SR, Campbell P, Lavie CJ, Ventura H. Micronutrients in chronic heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 2013; 10: 46-53.
- Kubo SH, Rector TS, Bank AJ, et al. Endothelium-dependent vasodilation is attenuated in patients with heart failure. *Circulation* 1991; 84: 1589-1596.
- Kurvilla L, Kurtha CC. Molecular mechanisms in endothelial regulation cardiac function. *Mol Cell Biochem* 2003; 253 (1-2): 113-23.
- Lakhani I, Leung KSK, Tse G, Lee APW. Novel mechanisms in heart failure with preserved, midrange, and reduced ejection fraction. *Front Physiol* 2019; 10: 874.
- Lamers Y, O'Rourke B, Gilbert LR, et al. Vitamin B-6 restriction tends to reduce the red blood cell glutathione synthesis rate without affecting red blood cell or plasma glutathione concentrations in healthy men and women. *Am J Clin Nutr* 2009; 90: 336-343.
- Langille BL, O'Donnell F. Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium-dependent. *Science* 1986; 231: 405-407.
- Laurence KM, James N, Miller MH, et al. Double-blind randomised controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural-tube defects. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1981; 282: 1509–1511.
- Lederer WH, Kumar M, Axelrod AE. Effects of pantothenic acid deficiency on cellular antibody synthesis in rats. *J Nutr* 1975; 105: 17–25.
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1994; 233: 346–57.
- Lewis CJ, Shannon B, Kleeman B. Taurine and cystathionine excretion in female rats as influenced by dietary vitamin B6 and estradiol administration. *Nutr Rep Int* 1982; 25: 269–276.
- Li D, Tomson K, Yang B, et al. Modulation of constitutive nitric oxide synthase, Bcl-2 and Fas expression in cultured human coronary endothelial cells exposed to anoxia-reoxygenation and angiotensin II: role of AT1 receptor activation. *Cardiovasc Res* 1999; 41: 109-115.
- Li JJ, Li Q, Du HP, et al. Homocysteine triggers inflammatory responses in macrophages through inhibiting CSE-H2S signaling via DNA hypermethylation of CSE promoter. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 12560–12577.

- Li Y, Huang T, Zheng Y, et al. Folic acid supplementation and the risk of cardiovascular diseases: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of the American Heart Association* 2016; 5(8): e003768.
- Ligaarden SC, Farup PG. Low intake of vitamin B6 is associated with irritable bowel syndrome symptoms. *Nutr Res* 2011; 31: 356-361.
- Lindsay B, Fenning A, Chan V, et al. Echocardiographic assessment of cardiac structure and function in rats. *Heart, Lung & Circulation* 2002; 11 (3): 167–73.
- Liu JJ, Prescott J, Giovannucci E, et al. One-carbon metabolism factors and leukocyte telomere length. *Am J Clin Nutr* 2013; 97: 794–799.
- Lombardini JB. Taurine levels in blood and urine of vitamin B6 deficient and estrogen-treated rats. *Biochem Med Metab Biol* 1986; 35: 125–131.
- Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, et al. Heart outcomes prevention evaluation (HOPE) 2 Investigators. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med* 2006; 354: 1567-77.
- Loo G, Goodman PJ, Hill KA, Smith JT. Creatine metabolism in the pyridoxine-deficient rat. *J Nutr* 1986; 116: 2403–2408.
- Lotto V, Choi SW, Friso S. Vitamin B6: a challenging link between nutrition and inflammation in CVD. *British Journal of Nutrition* 2011; 106 (02): 183-195.
- Love MP, McMurray JJV. Endothelin in heart failure: a promising therapeutic target. *Heart*. 1997; 77: 93-4.
- Ludwig S, Kaplowitz N. Effect of pyridoxine deficiency on serum and liver transaminases in experimental liver injury in the rat. *Gastroenterology* 1980; 79: 545–549.
- Maccarthy PA, Shah AM. Impaired endothelium-dependent regulation of ventricular relaxation in pressure-overload cardiac hypertrophy. *Circulation* 2000; 101: 1854–1860.
- Mahfouz MM, Kummerow FA. Vitamin C or vitamin B6 supplementation prevent the oxidative stress and decrease of prostacyclin generation in homocysteinemic rats. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 1919-1932.
- Mahfouz MM, Zhou SQ, Kummerow FA. Vitamin B6 compounds are capable of reducing the superoxide radical and lipid peroxide levels induced by H₂O₂ in vascular endothelial cells in culture. *Int J Vitam Nutr Res* 2009; 79(4): 218-29.
- Mahmood S, Dani HM, Mahmood A. Effect of dietary pyridoxine deficiency on intestinal functions in rats. *Nutr Res* 1985; 5: 299–304.
- Maish B, Ristic AD, Funck R, et al. Dilated cardiomyopathies and congestive heart failure. In: *Cardiac remodelling and failure*. Kluwer Academic Publishers, Boston, 2003; 37-65.
- Mallat Z, Philip I, Lebreton M, et al. Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F₂alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. *Circulation* 1998; 97: 1536 –1539.
- Maranesi M, Bochicchio D, Zamboni L, et al. Effects of different dietary amounts of LCPUFA n3 and vitamin B6 on lipid composition and antioxidant defences in rat kidney. *J Nutr Biochem* 2004; 15: 396-401.
- Marković AR, Hrnčić D, Macut D, et al. Anticonvulsive effect of folic acid in homocysteine thiolactone-induced seizures. *Cell Mol Neurobiol* 2011; 31(8): 1221-8.
- Martinez M, Cuskelly GJ, Williamson J, et al. Vitamin B-6 deficiency in rats reduces hepatic serine hydroxymethyltransferase and cystathionine beta-synthase activities and rates of in vivo protein turnover, homocysteine remethylation and transsulfuration. *J Nutr* 2000; 130: 1115-23.
- Martínez-Vega R, Garrido F, Partearroyo T, et al. Folic acid deficiency induces premature hearing loss through mechanisms involving cochlear oxidative stress and impairment of homocysteine metabolism. *FASEB J* 2015; 29 (2): 418-32.

- Masoudi FA, Rumsfeld JS, Havranek EP, et al. Cardiovascular outcomes research Consortium. Age, functional capacity, and health-related quality of life in patients with heart failure. *J Card Fail* 2004; 10 (5): 368-373.
- Massion PB, Dessy C, Balligand J-L. Nitric oxide and cardiac function ten years after, and continuing. *Circ Res* 2003; 93: 388-398.
- Matté C, Mackedanz V, Stefanello FM, et al. Chronic hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increases DNA damage in brain and blood of rats: Protective effect of folic acid. *Neurochem Int* 2009; 54: 7–13.
- Matxain JM, Padro D, Ristila M, et al. Evidence of high OH radical quenching efficiency by vitamin B6. *J Phys Chem* 2009; 113(29): 9629–9632.
- Matxain JM, Ristila M, Strid A, Eriksson LA. Theoretical study of the antioxidant properties of pyridoxine. *J Phys Chem* 2006; 110(48): 13068–13072.
- McCarty MF. High-dose pyridoxine as an “anti-stress” strategy. *Med Hypotheses*. 2000; 54: 803-807.
- McCormick EM, Manduchi E, Witschey RTW, et al. Spatial phenotyping of the endocardial endothelium as a function of intracardiac hemodynamic shear stress. *Journal of Biomechanics* 2017; 50: 11–19.
- McLaughlin VV. Looking to the future: a new decade of pulmonary arterial hypertension therapy. *Eur Respir Rev* 2011; 20: 262–269.
- McMahan RJ. Biotin in metabolism and molecular biology. *Ann Rev Nutr* 2002; 22: 221–239.
- McMurray J, Chopra M, Abdullah I, et al. Evidence of oxidative stress in chronic heart failure in humans. *Eur Heart J* 1993; 14: 1493–1498.
- McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 2012; 33: 1787-847.
- Medrano MJ, Sierra MJ, Almazan J, et al. The association of dietary folate, B6, and B12 with cardiovascular mortality in Spain: An ecological analysis. *American Journal of Public Health* 2000; 90 (10): 1636–8.
- Mehrabi MR, Ekmekcioglu C, Tatzber F, et al. The isoprostane, 8-epi-PGF2alpha, is accumulated in coronary arteries isolated from patients with coronary heart disease. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 492-499.
- Metra M. Epidemiology, renal impairment, heart failure with preserved ejection fraction. *Eur J Heart Fail* 2016; 18: 587.
- Miles EW, Kraus JP. Cystathionine beta-synthase: structure, function, regulation, and location of homocystinuria-causing mutations. *J Biol Chem* 2004; 279: 29871-29874.
- Miller ER, Juraschek S, Pastor-Barriuso R, et al. Meta-analysis of folic acid supplementation trials on risk of cardiovascular disease and risk interaction with baseline homocysteine levels. *American Journal of Cardiology* 2010; 106 (4): 517–27.
- Milne E, O’Callaghan N, Ramankutty P, et al. Plasma micronutrient levels and telomere length in children. *Nutrition* 2015; 31: 331–336.
- Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247(10): 3170–3175.
- Moens AL, Champion HC, Claeys MJ, et al. High-dose folic acid pretreatment blunts cardiac dysfunction during ischaemia coupled to maintenance of high-energy phosphates and reduces postreperfusion injury. *Circulation* 2008; 117: 1810–1819.
- Moens AL, Claeys MJ, Wuyts FL, et al. Effect of folic acid on endothelial function following acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2007; 99: 476–481.

- Mohammadi S, Najafi M, Hamzeiy H, et al. Protective effects of methylsulfonylmethane on hemodynamics and oxidative stress in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Adv Pharmacol Sci* 2012; 2012: 507278.
- Mohan SB, Parker M, Wehbi M, Douglass P. Idiopathic dilated cardiomyopathy: a common but mystifying cause of heart failure. *Clev Clin J Med* 2002; 69(6): 481-487.
- Molloy AM, Kirke PN, Brody LC, et al. Effects of folate and vitamin B12 deficiencies during pregnancy on fetal, infant, and child development. *Food Nutr Bull* 2008; 29: S101–S111.
- Murdoch CE, Zhang M, Cave AC, Shah AM. NADPH oxidase dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. *Cardiovasc Res* 2006; 71: 208–215.
- Najafi F, Dobson AJ, Hobbs M, Jamrozik K. Late-onset heart failure after myocardial infarction: trends in incidence and survival. *Eur J Heart Fail* 2008; 10(8): 765-771.
- Nakashima Y, Suzue R. Effect of nicotinic acid on myelin lipids in the brain of developing rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 1982; 28: 491–500.
- Nakashima Y, Suzue R. Influence of nicotinic acid on cerebroside synthesis in the brain of developing rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 1984; 30: 525–534.
- Nakayama WLS, Lamé MW, Jones AD, Wilson DW. Differential cellular responses to protein adducts of naphthoquinone and monocrotaline pyrrole. *Chem Res Toxicol* 2010; 23: 1504–1513.
- Neubauer S, Horn M, Cramer M, et al. Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1997; 96: 2190-6.
- Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circulation Research* 2004; 94 (12): 1543–1553.
- Nomura SJ, Robien K, Zota AR. Serum folate, vitamin B-12, vitamin A, γ -tocopherol, α -tocopherol, and carotenoids do not modify associations between cadmium exposure and leukocyte telomere length in the general US adult population. *J Nutr* 2017; 147: 538–548.
- Novoyatleva T, Diehl F, van Amerongen MJ, et al. TWEAK is a positive regulator of cardiomyocyte proliferation. *Cardiovasc Res* 2010; 85: 681–690.
- Oghlakian GO, Sipahi I, Fang JC. Treatment of heart failure with preserved ejection fraction: have we been pursuing the wrong paradigm? *Mayo Clin Proc* 2011; 86: 531-9.
- Okada M, Suzuki K. Amino acid metabolism in rats fed a high protein diet with pyridoxine. *J Nutr* 1974; 104: 287–293.
- Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963; 27: 282–293.
- Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodeling. *Lancet* 2006; 367 (9507): 356–367.
- Oudit GY, Crackower MA, Eriksson U, et al. Phosphoinositide 3-kinase gamma-deficient mice are protected from isoproterenol-induced heart failure. *Circulation* 2003; 108: 2147–2152.
- Packer M. The neurohormonal hypothesis: a theory to explain the mechanisms of disease progression in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20: 248-54.
- Pastore A, Piemonte F. Protein glutathionylation in cardiovascular diseases. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 20845-20876.
- Paulus WJ, Tschope C, Sanderson JE, et al. How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2007; 28: 2539-50.
- Peluffo G, Radi R. Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. *Cardiovasc Res* 2007; 75(2): 291-302.

- Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 1979; 44: 503–512.
- Pichardo J, Palace V, Farahmand F, Singal PK. Myocardial oxidative stress changes during compensated right heart failure in rats. *Mol Cell Biochem* 1999; 196(1-2): 51-7.
- Pieske B, Maier LS, Weber T, et al. Alterations in sarcoplasmic reticulum Ca-content in myocardium from patients with heart failure. *Circulation* 1997; 96(Suppl I): 199.
- Pitt B, Pfeffer MA, Assmann SF, et al. TOPCAT Investigators. Spironolactone for heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med* 2014; 370: 1383-92.
- Plesofsky-Vig N, Brambl R. Pantothenic acid and coenzyme A in cellular modification of proteins. *Annu Rev Nutr* 1988; 8: 461–482.
- Pollman MJ, Naumovski L, Gibbons GH. Vascular cell apoptosis: cell type specific modulation by transforming growth factor-beta 1 in endothelial cells versus smooth muscle cells. *Circulation* 1999; 99: 2019-2026.
- Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M, et al. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis: countervailing influences of nitric oxide and angiotensin. *Circ Res* 1996; 79: 748-756.
- Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. 2016 ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail* 2016; 18: 891-975.
- Porter K, Hoey L, Hughes CF, et al. Cases, consequences and public health implications of low B-vitamin status in ageing. *Nutrients* 2016; 8. pii: E725.
- Pou S, Pou WS, Brecht DS, et al. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992; 267: 24173-24176.
- Primessnig U, Schönleitner P, Höll A, et al. Novel pathomechanisms of cardiomyocyte dysfunction in a model of heart failure with preserved ejection fraction. *Eur J Heart Fail* 2016; 18: 987-97.
- Pueyo ME, Arnal JF, Rami J, et al. Angiotensin II stimulates the production of NO and peroxynitrite in endothelial cells. *Am J Physiol* 1998; 274: C214-220.
- Qian B, Shen S, Zhang J, Jing P. Effects of vitamin B6 deficiency on the composition and functional potential of T cell populations. *J Immunol Res* 2017: 2197975.
- Rabin BS. Inhibition of experimentally induced autoimmunity in rats by biotin deficiency. *J. Nutr* 1983; 113: 2316–2322.
- Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996; 97: 1916-1923.
- Rajeswari TS, Radha E. Age-related effects of nutritional vitamin B6-dependent enzymes of glutamate, gamma-aminobutyrate and glutamine systems in the rat brain. *Exp Gerontol* 1984; 19: 87–93.
- Ralli EP, Dumm ME. Relation of pantothenic acid to adrenal cortical function. *Vitam Horm* 1953; 11: 133–154.
- Ramadan MM, Okura Y, Ohno Y, et al. Comparative analysis of systolic and isolated diastolic dysfunction: Sado heart failure study. *Int Heart J* 2008; 49(4): 459-469.
- Rane G, Koh WP, Kanchi MM, et al. Association between leukocyte telomere length and plasma homocysteine in a Singapore Chinese population. *Rejuvenation Res* 2015; 18; 203–210.
- Ravindranath V. Animal models and molecular markers for cerebral ischemia-reperfusion injury in brain. *Methods Enzymol* 1994; 233: 610–619.

- Reddy S, Bernstein D. Molecular mechanisms of right ventricular failure. *Circulation* 2015; 132: 1734–1742.
- Richards JB, Valdes AM, Gardner JP, et al. Homocysteine levels and leukocyte telomere length. *Atherosclerosis* 2008; 200; 271–277.
- Riehle C, Bauersachs J. Small animal models of heart failure. *Cardiovasc Res* 2019; 115(13): 1838-1849.
- Robinson K, Arheart K, Refsum H, et al. Low circulating folate and vitamin B6 concentrations: risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease. European COMAC Group. *Circulation* 1998; 97: 437-43.
- Roecklein B, Levin SW, Comly M, Mukherjee AB. Intrauterine growth retardation induced by thiamin deficiency and pyrithiamine during pregnancy in the rat. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 151: 455–460.
- Roger VL, Weston SA, Redfield MM, et al. Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. *JAMA* 2004; 292(3): 344-350.
- Root EJ, Longnecker JB. Brain cell alterations suggesting premature aging induced by dietary deficiency of vitamin B6 and/or copper. *Am J Clin Nutr* 1983; 37: 540–552.
- Sakai S, Miyauchi T, Kobayashi M, et al. Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature* 1996; 384: 353–355.
- Sauve AA. NAD⁺ and vitamin B3: From metabolism to therapies. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 324: 883–893.
- Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, et al. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 379 –388.
- Schaeffer M, Kretsch MJ. Quantitative assessment of motor and sensory function in vitamin B6 deficient rats. *Nutr Res* 1987; 7: 851–864.
- Schaeffer MC, Cochary EF, Sadowski JA. Subtle abnormalities of gait detected early in vitamin B6 deficiency in aged and weanling rats with hind leg gait analysis. *J Am Coll Nutr* 1990; 9: 120–127.
- Schaeffer MC. Attenuation of acoustic and tactile startle responses of vitamin B6 deficient rats. *Physiol Behav* 1987; 40: 473–478.
- Schandelmaier S, Briel M, Saccilotto R, et al. Niacin for primary and secondary prevention of cardiovascular events. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2017(6).
- Schena M, Mulatero P, Schiavone D, et al. Vasoactive hormones induce nitric oxide synthase mRNA expression and nitric oxide production in human endothelial cells and monocytes. *Am J Hypertens* 1999; 12: 388-397.
- Scherer NM, Deamer DW. Oxidative stress impairs the function of sarcoplasmic reticulum by oxidation of sulfhydryl groups in the Ca²⁺-ATPase. *Arch Biochem Biophys* 1986; 246: 589-601.
- Schocken DD. Epidemiology and risk factors for heart failure in the elderly. *Clin Geriatr Med* 2000; 16(3): 407-18.
- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182: 311–322.
- Schreckenber R, Rebelo M, Deten A, et al. Specific mechanisms underlying right heart failure: The missing upregulation of superoxide dismutase-2 and its decisive role in antioxidative defense. *Antioxid Redox Signal* 2015; 23: 1220–1232.
- Schumacher HR, Bernhart FW, György P. Vitamin B6 levels in rheumatoid arthritis: effect of treatment. *Am J Clin Nutr* 1975; 28: 1200-1203.
- Selvam R, Ravichandran V. Effect of oral methionine and vitamin E on blood lipid peroxidation in vitamin B6 deficient rats. *Biochem Int* 1991; 23: 1007-1017.
- Shane B. Folate, vitamin B12, and vitamin B6. In: Stipanuk MH, editor. *Biochemical and physiological aspects of human nutrition*. Philadelphia: WB Saunders; 2000. p. 483–518.

- Shen J, Lai CQ, Mattei J, et al. Association of vitamin B-6 status with inflammation, oxidative stress, and chronic inflammatory conditions: the Boston Puerto Rican Health Study. *Am J Clin Nutr* 2010; 91: 337-42.
- Sherman H. Pyridoxine and related compounds. In: W. H. Sebrell, Jr., R. S. Harris, editors. *The Vitamins*. New York: Academic Press; 1954. p. 265–276.
- Shigematsu Y, Kikawa Y, Sudo M, Itokawa Y. Branched-chain α -ketoacids and related acids in thiamin-deprived rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 1989; 35: 163–70.
- Shigenaga MK, Lee HH, Blount BC, et al. Inflammation and NO(X)-induced nitration: assay for 3-nitrotyrosine by HPLC with electrochemical detection. *PNAS* 1997; 94(7): 3211-3216.
- Shin C, Baik I. Leukocyte telomere length is associated with serum vitamin B12 and homocysteine levels in older adults with the presence of systemic inflammation. *Clin Nutr Res* 2016; 5: 7–14.
- Shirodaria C, Antoniadou C, Lee J, et al. Global improvement of vascular function and redox state with low-dose folic acid: implications for folate therapy in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2007; 115: 2262–2270.
- Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991; 91(3C): 31S-38S.
- Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ, et al. Possible prevention of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *Lancet* 1980; 1: 339–340.
- Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child* 1976; 51: 944–950.
- Smolin LA, Benevenga NJ. Factors affecting the accumulation of homocyst(e)ine in rats deficient in vitamin B6. *J Nutr* 1984; 114: 103–111.
- Spannauer A, Traxler D, Zlabinger K, et al. Large animal models of heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF). *Front Cardiovasc Med* 2019; 6: 117.
- Spinneker A, Sola R, Lemmen V, et al. Vitamin B-6 status, deficiency and its consequences an overview. *Nutr Hosp* 2007; 22: 7-24.
- Stanimirovic DB, Yamamoto T, Uematsu S, et al. Endothelin-1 receptor binding and cellular signal transduction in cultured human brain endothelial cells. *J Neurochem* 1994; 62: 592-601.
- Steele ML, Fuller S, Maczurek AE, et al. Chronic inflammation alters production and release of glutathione and related thiols in human U373 astroglial cells. *Cell Mol Neurobiol* 2013; 33: 19–30.
- Steinberg SF, Jaffe EA, Bilezikian JP. Endothelial cells contain beta adrenoreceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1984; 325: 310-313.
- Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, et al. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009; 297(6): L1013-L1032.
- Stewart CN, Coursin DB, Bhagavan HN. Avoidance behavior in vitamin B6-deficient rats. *J Nutr* 1975; 105: 1363–1370.
- Stipanuk MH, Ueki I. Dealing with methionine/homocysteine sulfur: cysteine metabolism to taurine and inorganic sulfur. *J Inher Metab Dis* 2011; 34: 17-32.
- Stocker P, Lesgards JF, Vidal N, et al. ESR study of a biological assay on whole blood: antioxidant efficiency of various vitamins. *Biochem Biophys Acta* 2003; 162: 1-8.
- Stokstad ELR. Historical perspective on key advances in the biochemistry and physiology of folates. In: Picciano MF, E. Stokstad LR, editors. *Folic Acid Metabolism in Health and Disease*. New York: Wiley-Liss; 1990. p. 1–21.
- Subramanian U, Weiner M, Gradus-Pizlo I, et al. Patient perception and provider assessment of severity of heart failure as predictors of hospitalization. *Heart Lung* 2005; 34(2): 89-98.

- Sun HJ, Hou B, Wang X, et al. Endothelial dysfunction and cardiometabolic diseases: Role of long non-coding RNAs. *Life Sc* 2016; 167: 6-11.
- Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiological Reviews* 1999; 79(1): 215–262.
- Tagliaferro AR, Levitsky DA. Spillage behavior and thiamin deficiency in the rat. *Physiol Behav* 1982; 28: 933–937.
- Tamamori-Adachi M, Takagi H, Hashimoto K, et al. Cardiomyocyte proliferation and protection against post-myocardial infarction heart failure by cyclin D1 and Skp2 ubiquitin ligase. *Cardiovasc Res* 2008; 80: 181–190.
- Tawakol A, Migrino RQ, Aziz KS, et al. High-dose folic acid acutely improves coronary vasodilator function in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45(10): 1580-4.
- Taylor R, Sagar VA, Davies EJ., et al. Exercise-based rehabilitation for heart failure. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; 4: CD003331.
- Thomas MR, Kirksey A. Postnatal patterns of brain lipids in progeny of vitamin B6-deficient rats before and after pyridoxine supplementation. *J Nutr* 1976; 106: 1404–1420.
- Tong Y. Seizures caused by pyridoxine (vitamin B6) deficiency in adults: a case report and literature review. *Intractable Rare Dis Res* 2014; 3: 52-56.
- Toole JF, Malinow MR, Chambless LE, et al. Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291: 565–575.
- Treasure CB, Vita JA, Cox DA, et al. Endothelium-dependent dilation of the coronary microvasculature is impaired in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1990; 81: 772-779.
- Tucker KL, Selhub J, Wilson PW, Rosenberg IH. Dietary intake pattern relates to plasma folate and homocysteine concentrations in the Framingham heart study. *The Journal of Nutrition* 1996; 126 (12): 3025–31.
- Ueland PM, McCann A, Midttun Ø, Ulvik A. Inflammation, vitamin B6 and related pathways. *Mol Aspects Med* 2017; 53: 10-27.
- Ueland PM, Ulvik A, Rios-Avila L, et al. Direct and functional biomarkers of vitamin B6 status. *Ann Rev Nutr* 2015; 35: 33–70.
- Ulvik A, Ebbing M, Hustad S, et al. Long- and short-term effects of tobacco smoking on circulating concentrations of B vitamins. *Clin Chem* 2010; 56: 755-763.
- Ulvik A, Midttun Ø, Pedersen ER, et al. Evidence for increased catabolism of vitamin B-6 during systemic inflammation. *Am J Clin Nutr* 2014; 100: 250–255.
- Usui S, Yao A, Hatano M, et al. Upregulated neurohumoral factors are associated with left ventricular remodeling and poor prognosis in rats with monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Circ J* 2006; 70: 1208–1215.
- Valgimigli M, Merli E, Malagutti P, et al. Hydroxyl radical generation, levels of tumor necrosis factor alpha, and progression to heart failure after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 43: 2000 –2008.
- Varela-Roman A, Grigorian L, Barge E, et al. Heart failure in patients with preserved and deteriorated left ventricular ejection fraction. *Heart* 2005; 91(4): 489-494.
- Vasan RS, Levy D. Defining diastolic heart failure: a call for standardized diagnostic criteria. *Circulation* 2000; 101: 2118-21.
- Vaswani KK. Effect of neonatal thiamin and vitamin A deficiency on rat brain gangliosides. *Life Sci* 1985; 37: 1107–1115.
- Verhaar MC. 5-methyltetrahydrofolate, the active form of folic acid, restores endothelial function in familial hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 97: 237–41.

- Vila-Petrof MG. Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circ Res* 1999; 84: 1020–103.
- Voors AA, Anker DS, Bueno H, et al. 2016 ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 2016; 37 (27): 2129-2200.
- Wang QD, Bohlooly YM, Sjoquist PO. Murine models for the study of congestive heart failure: implications for understanding molecular mechanisms and for drug discovery. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2004; 50: 163–174.
- Wang X, Shults NV, Suzuki YJ. Oxidative profiling of the failing right heart in rats with pulmonary hypertension. *PLoS ONE* 2017; 12(5): e0176887.
- Ward GJ, Nixon PF. Modulation of pterylpolyglutamate concentration and length in response to altered folate nutrition in a comprehensive range of rat tissues. *J Nutr* 1990; 120: 476–484.
- Wilkins MR, Redondo J, Brown LA. The natriuretic-peptide family. *Lancet* 1997; 349: 1307-10.
- Wilmink AB, Welch AA, Quick CR, et al. Dietary folate and vitamin B6 are independent predictors of peripheral arterial occlusive disease. *J Vasc Surg* 2004; 39: 513–516.
- Woodard JC, Newberne PM. Relation of vitamin B12 and 1-carbon metabolism to hydrocephalus in the rat. *J Nutr* 1966; 88: 375–381.
- World Health Organization [homepage on the Internet]. Projections of mortality and causes of death, 2016 to 2060 Geneva: World Health Organization; 2020. Available at: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/en/
- Wu XY, Lu L. Vitamin B6 deficiency, genome instability and cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 5333-5338.
- Yang JF, Liu B, Liu DG, et al. Prevalence and risk factors of atrial fibrillation in preterminal inpatients aged 60 years and over. *Chin Med J* 2008; 121(20): 2046-2049.
- Yudkin, J. The avoidance of sucrose by thiamin-deficient rats. *Int J Vitam Nutr Res* 1979; 49: 127–135.
- Zannad F, Briancon S, Juilliere Y, et al. Incidence, clinical and etiologic features and outcomes advanced chronic heart failure: the EPICAL study. *JACC* 1998; 33: 734-742.
- Zhao R, Matherly LH, Goldman ID. Membrane transporters and folate homeostasis: Intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert Rev Mol Med* 2009;11: e4.
- Zweier JL, Chen CA, Druhan LJ. S-glutathionylation reshapes our understanding of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and nitric oxide/reactive oxygen species-mediated signaling. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14 (10): 1769-75.

SPISAK SKRAĆENICA

A	Adrenalin
α -AMY	α -amilaza
ACC	Američki koledž za kardiologiju (<i>eng. American College of Cardiology</i>)
ADH	Antidiuretski hormon
AHA	Američko udruženje za srce (<i>eng. American Heart Association</i>)
ALB	Albumin
ALP	Alkalna fosfataza
ALT	Alanin aminotransferaza
ANOVA	Analiza varijanse
ANP	Atrijalni natriuretski peptid
AST	Aspartat aminotransferaza
ATP	Adenozin trifosfata
AVP	Arginin vazopresin
b.w.	Telesna masa (<i>eng. body weight</i>)
BNP	Moždani natriuretski peptid
BSA	Govedi serumski albumin (<i>eng. bovine serum albumin</i>)
CAT	Katalaza
COX-1	Ciklooksigenaza 1
CREA	Kreatinin
CRF	Kortikotropin oslobadajući factor
CRP	C-reaktivni protein
DK, DV	Desna komora
DNK	Deoksiribonukleinska kiselina
DNPH	Dinitrofenilhidrazin
DOP	Dopamin
DOX	Doksorubicin
DTNB	5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoične kiseline)
EDV	Zapremina leve komore na kraju dijastole (<i>eng. left ventricular end diastolic volume</i>)
eNOS	Endotelna azot-monoksid sintaza (eNOS, <i>eng. endothelial nitric oxide synthase</i>)
ESV	Zapremina leve komore na kraju sistole (<i>eng. end systolic volume</i>)
EtOH	Etanol
FK	Vitamin B9 - Folna kiselina
FA	Folna kiselina (<i>eng. folic acid</i>)
FK+B6	Kombinacija folne kiseline i vitamina B6
FS	Frakciono skraćenje leve komore (<i>eng. left ventricular fractional shortening</i>)
GLUC	Glukoza
GPx	Glutation peroksidaza
GS \cdot	Glutatiil radikal
GSH	Ukupni glutacion
GSH	Glutacion
GSSG	Oksidovani glutacion
GSSG \cdot	Diglutatiil anjon radikal
H ₂ O ₂	Vodonik peroksid
HClO	Hipohlorasta kiselina
Hcy	Homocistein u serumu
HDL-C	Holesterol velike gustine

HFmrEF	Srčana insuficijencija sa frakcijom izbacivanja srednjeg dometa (<i>eng. heart failure with mid-range ejection fraction</i>)
HFpEF	Srčana insuficijencija sa očuvanom frakcijom izbacivanja (<i>eng. heart failure with preserved ejection fraction</i>)
HFrEF	Srčana insuficijencija sa smanjenom frakcijom izbacivanja (<i>eng. heart failure with reduced ejection fraction</i>)
HIF-1a	Faktor-1a induciran hipoksijom
HOO·	Hidroksiperoksilni radikal
hs cTnT	Troponin T
I/R	Ishemija / reperfuzija
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IM	Infarkt miokarda
ISO	Izoproterenol
IVS	Interventrikularni septum
IVSd	Prečnik međukomorne pregrade u dijastoli (<i>eng. interventricular septum at diastole</i>)
IVSs	Prečnik međukomorne pregrade u sistoli (<i>eng. interventricular septum in systole</i>)
KSI	Kardiosomatski indeks
LAD	Leva anteriorna descendentna arterija
LK, LV	Leva komora
LVEF	Ejeksiona frakcija leve komore (<i>eng. left ventricular ejection fraction</i>)
LVEF	Frakcija izbacivanja leve komore (<i>eng. left ventricle ejection fraction</i>)
LVIDd	Unutrašnji prečnik leve komore u dijastoli (<i>eng. left ventricular diastolic internal diameter</i>)
LVIDs	Unutrašnji prečnik leve komore u sistoli (<i>eng. left ventricular systolic internal diameter</i>)
M+B6	Monokrotalin i vitamin B6
M+FK	Monokrotalin i folna kiselina
M+B6+FK	Monokrotalin, vitamin B6 i folna kiselina
M, MCT	Monokrotalin
MCTP	Monokrotalin pirol
MK	Masne kiseline
MMP	Matriksne metaloproteinaze
MV	Minutni volumen
NA	Noradrenalin
NFκB	Nuklearni faktor-kappa B
NO	Azot-monoksid, azot (II) oksid
NO ₂	Azot (IV) oksid
NTD	Oštećenje nervne cevi (<i>eng. neural tube damage</i>)
NT-proBNP	N-terminalni pro-BNP
NYHA	Njujorško udruženje za srce
O ₂ ·	Superoksid anjon
OH·	Hidroksil radikal
8-OHdG	8-hidroksi-2'deoksiguanozin
ONOO·	Peroksinitrit
PAH	Plućna arterijska hipertenzija
PWd	Debljina srčanog zadnjeg zida u dijastoli (<i>eng. posterior wall thickness at diastole</i>)
PWs	Debljina zadnjeg srčanog zida u sistoli (<i>eng. posterior wall thickness at systole</i>)
R·	Alkil radikal
RIPA	<i>eng. Radio-Immunoprecipitation Assay</i>
RNK	Ribonukleinska kiselina
RO·	Alkoksil radikal

ROO·	Peroksilni radikal
ROS	Reaktivne kiseonične vrste (<i>eng. reactive oxygen species</i>)
RS	Reaktivne vrste (<i>eng. reactive species</i>)
RS·	Tiil radikal
RVID	Unutrašnji prečnik desne komore (<i>eng. right ventricular internal diameter</i>)
SI	Srčana insuficijencija
SOD	Superoksid dizmutaza
SV	Udarni volumen (<i>eng. stroke volume</i>)
TA	Krvni pritisak
TBS	<i>eng. Tris buffer saline</i>
TC	Ukupni holesterol
TG	Trigliceridi
t.m.	Telesna masa
TNF- α	Faktor nekroze tumora- α (<i>eng. tumor necrosis factor-α</i>)
TP	Ukupni protein
UA	Mokraćna kiselina
UREA	Urea

Biografija autora

Jovana Jakovljević Uzelac (devojačko Jakovljević) je rođena 06.05.1984.godine u Beogradu. Osnovnu školu i IX beogradsku gimnaziju „Mihailo Petrović Alas“ završila je u Beogradu kao đak generacije. Studije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu započela je 2003.godine, a diplomirala je 2010.godine sa prosečnom ocenom 9,51 (devet, pedeset i jedan). Dr Jakovljević Uzelac je bila stipendista Ministarstva prosvete Republike Srbije (2004-2010. godine), Zadužbine Dragoljuba Marinkovića (2006-2009. godine), Zadužbine Đoke Vlajkovića (2005-2006. godine) i Kluba privrednika (Hemofarm) (2005-2010.godine). Doktorske studije na Medicinskom fakultetu u Beogradu dr Jakovljević Uzelac je upisala 2012. godine, modul Fiziološke nauke. Lekarski staž je završila i stručni ispit položila u martu 2011. godine. Specijalizaciju iz Kliničke biohemije je upisala 2019. godine. Na Institutu za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“ Medicinskog fakulteta u Beogradu dr Jakovljević Uzelac se zaposlila 2012.godine kao saradnik u nastavi, a u zvanje asistenta je izabrana 2014. godine, i reizabrana 2017. godine. Od 2011. godine angažovana je na projektima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja broj 175043 „Efekti homocisteina i homocisteinu srodnih supstanci na kardiovaskularni sistem: uloga gasnih transmitera NO, H₂S i CO“, čiji je rukovodilac Prof.dr Dragan Đurić, i broj 175052 „Značaj polimorfizma glutation-S-transferaze u podložnosti za nastanak oboljenja“ čiji je rukovodilac Prof. dr Tatjana Simić. Dr Jakovljević Uzelac je bila angažovana i na bilateralnom projektu „Polyoxopalladates: ATPases inhibition studies and toxicity evaluation“ (Bilateral project Germany (DAAD-PPP) - Serbia (MESTD)) (2016-2017. godine). Doktorska disertacija pod naslovom „Uticaj vitamina B6 i folne kiseline na funkcionalne, biohemijske i imunohistohemijske karakteristike kardiovaskularnog sistema pacova sa srčanom insuficijencijom izazvanom monokrotalinom“ odobrena je odlukom Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu od 05.06.2018. godine (br. 61206-2458/2-18), čiji je mentor Prof. dr Dragan Đurić. Dr Jakovljević Uzelac je polaznik većeg broja naučnih skupova u zemlji i inostranstvu. U septembru 2019. godine bila je polaznik letnje škole (“COST CLINIMARK TRAINING SCHOOL-Approaches for Biomarker Discovery and Validation) (Speces, Grčka). Posедуje aktivno znanje engleskog jezika. Udata za Uzelac Nikolu, majka Lane i Ane.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора ЈОВАНА ЈАКОВЉЕВИЋ УЗЕЛАЦ

Број индекса FN-05/11

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

УТИЦАЈ ВИТАМИНА Б6 И ФОЛНЕ КИСЕЛИНЕ НА ФУНКЦИОНАЛНЕ,
БИОХЕМИЈСКЕ И ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ КАРДИОВАСКУЛАРНОГ
СИСТЕМА ПАЦОВА СА СРЧАНОМ ИНСФИЦИЈЕНЦИЈОМ ИЗАЗВАНОМ МОНОКРОТАЛИНОМ

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 14.05.2021.

Јована Јаковљевић Узелац

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора ЈОВАНА ЈАКОВЉЕВИЋ УЗЕЛАЧ

Број индекса FN-05/11

Студијски програм ФИЗИОЛОШКЕ НАУКЕ

Наслов рада УТИЦАЈ ВИТАМИНА Б6 И ФОЛНЕ КИСЕЛИНЕ НА ФУНКЦИОНАЛНЕ, БИОХЕМИЈСКЕ И ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ КАРДИОВАСКУЛАРНОГ СИСТЕМА ПАЧОВА СА СРЧАНОМ ИДСЕРИЈИЈЕМИЈОМ И ЗАВРАТНИМ МОНОКРОТАЛИТОМ

Ментор ПРОФ. ДР. ПРАГАН БУРИЋ

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 14.05.2021.

Јована Јаковљевић Узелац

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

УТИЦАЈ ВИТАМИНА Б6 И ФОЛНЕ КИСЕЛИЦЕ НА ФУНКЦИОНАЛНЕ, БИОХЕМИЈСКЕ И ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ КАРДИОВАСКУЛАРНОГ СИСТЕМА ПЛОЦОВА СА СРЧАНОМ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈОМ ИЗАЗВАНОМ МОНОКРОТАЛИНОМ
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 14.05.2021.

Јована Јанковић Узелац