



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

Јована Н. Јеремић

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

Докторска дисертација

Ментори: др Невена Јеремић, доцент

др Suresh Tyagi, редовни професор

Крагујевац, јул 2019. године

САЖЕТАК

Увод: Диалил трисулфид (ДАТС) је природни донор водоник сулфида, који се издваја као најснажнији и најважнији полисулфид изолован из белог лука.

Циљ: Циљ ове студије био је да се испитају ефекти хроничне примене ДАТС-а код здравих, пацова са дијабетес мелитусом (ДМ) и пацова са метаболичким синдромом (МетС). Посебна пажња била је усмерена ка испитивању кардиопротективне улоге ДАТС-а, у *ex vivo* индукованој исхемијско/реперфузионој (И/Р) повреди миокарда, али и његовој способности да умањи симптоме дијабетеса и метаболичког синдрома.

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

Резултати: ДАТС примењен код наведених група пацова је показао значајне кардиопротективне ефекте, побољшао је опоравак миокарда и допринео очувању његове функције након И/Р повреде. Такође, код пацова са ДМ значајно је умањио нивое глукозе, док је код пацова са МетС-ом ублажио симптоме ове болест (који се угледају кроз смањење нивоа триглицерида, холестерола, глукозе, инсулина и крвног притиска).

Закључак: ДАТС највероватније преко комплексних механизма који укључују антиоксидационе, антиинфламацијске и антиапоптотске ефекте остварује кардиопротективне ефекте и доприноси у ограничавању И/Р повреде и очувању функције миокарда.

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

ABSTRACT

Introduction: Diallyl trisulfide (DATS) is a natural donor of hydrogen sulfide, which is distinguished as the most powerful and most important polysulfide isolated from the onion.

Aim: The aim of this study was to examine the effects of chronic DATS consumption in healthy, rats with diabetes mellitus (DM) and rats with metabolic syndrome (MetS). Particular attention was paid to examining the cardioprotective role of DATS in *ex vivo*-induced ischemia/reperfusion (I/R) myocardial injury, but also DATS ability to reduce the symptoms of diabetes and metabolic syndrome.

Material and methods: In this chronic, experimental study, 72 *Wistar albino* rats were included, which were classified into 6 basic groups: healthy treated and untreated rats (CTRL and DATS), DM treated and untreated rats (DM and DM+DATS) and MetS treated and untreated rats (MS and MS+DATS). The DATS treatment included administration of DATS every other day at a dose of 40 mg/kg for 3 weeks. After chronic treatment, the animals were sacrificed, each of the basic groups being divided into two subgroups depending on the protocol on the Langendorff apparatus (90 minutes retrograde perfusion or I/R myocardial injury).

Results: The DATS consumption in mentioned rat groups showed significant cardioprotective effects, improved myocardial damage and contributed to the preservation of its function after I/R injury. Also, in rats with DM, DATS significantly reduced glucose levels, while in rats with MetS DATS relieved the symptoms (decrease in triglyceride, cholesterol, glucose, insulin and blood pressure levels).

Conclusions: DATS most likely through complex mechanisms that include antioxidant, anti-inflammatory and antiapoptotic effects, achieves cardioprotective effects and contributes to limiting I/R injury and preserving myocardial function.

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

САДРЖАЈ

1. УВОД	2
1.1. ВОДОНИК СУЛФИД КАО СИГНАЛНИ МОЛЕКУЛ	2
1.1.1. БИОСИНТЕЗА, МЕТАБОЛИЗАМ И ЕЛИМИНАЦИЈА H ₂ S	3
1.1.2. БИОЛОШКИ ЕФЕКТИ H ₂ S	5
1.2. ДОНОРИ H₂S	7
1.2.1. СИНТЕТИЧКИ H ₂ S ДОНОРИ	8
1.2.2. ПРИРОДНИ ДОНОРИ H ₂ S	9
1.3. ДИАЛИЛ ТРИСУЛФИД	11
1.3.1. КАРАКТЕРИСТИКЕ ДАТС-А	11
1.3.2. МЕТАБОЛИЗАМ И ФАРМАКОКИНЕТИКА ДАТС-А	12
1.4. H₂S/H₂S ДОНОРИ И КАРДИОВАСКУЛАРНЕ БОЛЕСТИ: УЛОГА ДАТС-А	14
1.4.1. H ₂ S И ИСХЕМИЈСКО/РЕПЕРФУЗИОНА ПОВРЕДА МИОКАРДА	15
1.4.2. H ₂ S И ДИЈАБЕТЕС МЕЛИТУС	16
1.4.2.1. H ₂ S И ДИЈАБЕТЕС МЕЛИТУС ТИП 1	17
1.4.2.2. H ₂ S И МЕТАБОЛИЧКИ СИНДРОМ/ДИЈАБЕТЕС МЕЛИТУС ТИП 2	18
1.5. ЗАШТИТНЕ УЛОГЕ H₂S/ДОНОРА H₂S У КАРДИОВАСКУЛАРНИМ БОЛЕСТИМА	19
1.5.1. АНТИОКСИДАЦИОНИ ЕФЕКТИ	20
1.5.2. АНТИАПОПТОТСКИ ЕФЕКТИ	22
1.5.3. АНТИИНФЛАМАЦИЈСКИ ЕФЕКАТ	23
2. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ	26
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	28
3.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ	29
3.2. <i>IN VIVO</i> ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ	29
3.2.1. СТРЕПТОЗОТОЦИНОМ ИНДУКОВАН ДИЈАБЕТЕС	33
3.2.1.1. Експериментални модел за изазивање дијабетес мелитуса тип 1	33
3.2.1.2. Експериментални модел за изазивање метаболичког синдрома	34
3.2.2. ХРОНИЧНИ ТРЕТМАН ПАЦОВА	35
3.2.3. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦОВА ПРАЂЕНЕ <i>IN VIVO</i> ТОКОМ ХРОНИЧНОГ ПРОТОКОЛА	35
3.2.4. МЕРЕЊА НАКОН ТРОНЕДЕЉНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ	36
3.2.4.1. <i>In vivo</i> срчана функција	36

3.2.4.2. Липидни параметри мерени у серуму пацова	37
3.2.4.3. Нивои инсулина и глукозе током теста оралног оптерећења глукозом (ОГТТ)	37
3.2.4.4. Мерење крвног притиска и фреквенце срца	38
3.2.4.5. Биохемијско одређивање системских прооксидационх и антиоксидационих параметара	39
3.2.4.5.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS)	39
3.2.4.5.2. Одређивање нитрита (NO_2^-)	40
3.2.4.5.3. Одређивање супероксид анјон радикала (O_2^-)	41
3.2.4.5.4. Одређивање водоник пероксида (H_2O_2)	42
3.2.4.5.5. Одређивање активности каталазе (CAT)	42
3.2.4.5.6. Одређивање активности супероксид дисмутазе (SOD)	43
3.2.4.5.7. Одређивање редукованог глутатиона (GSH)	43
3.2.4.6. Нивои хомоцистеина у серуму (Hcy)	44
3.3. EX VIVO ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ	45
3.3.1. ПРИНЦИПИ РЕТРОГРАДНЕ ПЕРФУЗИЈЕ СРЦА: LANGENDORFF-ОВА ТЕХНИКА	45
3.3.1.1. Опис Langendorff-овог апарата	47
3.3.1.2. Изоловање и препарација срца пацова	48
3.3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ EX VIVO ПРОТОКОЛ: 90 МИНУТА РЕТРОГРАДНЕ ПЕРФУЗИЈЕ СРЦА	50
3.3.3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ EX VIVO ПРОТОКОЛ: 30 МИНУТА ИСХЕМИЈЕ И 60 МИНУТА РЕПЕРФУЗИЈЕ	50
3.3.4. МАРКЕРИ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА МЕРЕНИ У КОРОНАРНОМ ВЕНСКОМ ЕФЛУЕНТУ	51
3.3.4.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS)	51
3.3.4.2. Одређивање нитрита (NO_2^-)	51
3.3.4.3. Одређивање супероксид анјон радикала (O_2^-)	52
3.3.4.4. Одређивање водоник пероксида (H_2O_2)	52
3.3.5. ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКА БОЈЕЊА ТКИВА МИОКАРДА	52
3.3.5.1. Бојење хематоксилин/еозином	53
3.3.5.2. Бојење срчаног тропонина Т	53
3.3.6. РЕЛАТИВНА ЕКСПРЕСИЈА АНТИОКСИДАЦИОНИХ, (АНТИ)АПОПТОТСКИХ И (АНТИ)ИНФЛАМАЦИЈСКИХ ГЕНА У ЛЕВОЈ КОМОРИ СРЦА	54
3.3.6.1. Квантитативна полимеразна ланчана реакција у реалном времену (qPCR)	56
3.4. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА	58
4. РЕЗУЛТАТИ	60
4.1. ЕФЕКТИ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА ЗДРАВЕ ПАЦОВЕ	60
4.1.1. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦОВА ПРАЂЕНЕ ТОКОМ ХРОНИЧНОГ ПРОТОКОЛА	60

4.1.2. ФУНЦИЈА МИОКАРДА ПРАЂЕНА IN VIVO	62
4.1.3. ЛИПИДНИ ПАРАМЕТРИ МЕРЕНИ НАКОН ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ	63
4.1.4. НИВОИ ИНСУЛИНА И ГЛУКОЗЕ ТОКОМ ТЕСТА ОРАЛНОГ ОПТЕРЕЂЕЊА ГЛУКОЗОМ (ОГТТ)	64
4.1.5. КРВНИ ПРИТИСАК И СРЧАНА ФРЕКВЕНЦА	66
4.1.6. НИВОИ ПРООКСИДАЦИОНИХ И АНТИОКСИДАЦИОНИХ ПАРАМЕТАРА МЕРЕНИ У СИСТЕМСКОЈ ЦИРКУЛАЦИЈИ	67
4.1.7. НИВОИ ХОМОЦИСТЕИНА	69
4.1.8. EX VIVO ПРОТОКОЛ: 90 МИНУТА РЕТРОГРАДНЕ ПЕРФУЗИЈЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	70
4.1.8.1. Кардиодинамски параметри	70
4.1.8.2. Прооксидациони маркери мерени у коронарном венском ефлуенту	72
4.1.8.3. Бојење срчаног ткива хематоксилин/еозином	74
4.1.9. EX VIVO ПРОТОКОЛ: 30 МИНУТА ИСХЕМИЈЕ И 60 МИНУТА РЕПЕРФУЗИЈЕ	75
4.1.9.1. Кардиодинамски параметри	75
4.1.9.2. Прооксидациони параметри мерени у коронарном венском ефлуенту	77
4.1.9.3. Бојење срчаног ткива хематоксилин/еозином	79
4.1.9.4. Бојење тропонина Т у ткиву миокарда	80
4.1.9.6. Релативна експресија антиоксидационих, (анти)апоптотских и (анти)инфламацијских гена у левој комори срца	81
4.2. ЕФЕКТИ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА ПАЦОВЕ СА ДИЈАБЕТЕСОМ	84
4.2.1. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦОВА ПРАЂЕНЕ ТОКОМ ХРОНИЧНОГ ПРОТОКОЛА	84
4.2.2. ФУНЦИЈА МИОКАРДА ПРАЂЕНА IN VIVO	86
4.2.3. ЛИПИДНИ ПАРАМЕТРИ МЕРЕНИ НАКОН ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ	87
4.2.4. НИВОИ ПРООКСИДАЦИОНИХ И АНТИОКСИДАЦИОНИХ ПАРАМЕТАРА МЕРЕНИ У СИСТЕМСКОЈ ЦИРКУЛАЦИЈИ	88
4.2.5. НИВОИ ХОМОЦИСТЕИНА	90
4.2.6. EX VIVO ПРОТОКОЛ: 90 МИНУТА РЕТРОГРАДНЕ ПЕРФУЗИЈЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	91
4.2.6.1. Кардиодинамски параметри	91
4.2.6.2. Прооксидациони маркери мерени у коронарном венском ефлуенту	93
4.2.6.3. Бојење срчаног ткива хематоксилин/еозином	95
4.2.7. EX VIVO ПРОТОКОЛ: 30 МИНУТА ИСХЕМИЈЕ И 60 МИНУТА РЕПЕРФУЗИЈЕ	96
4.2.7.1. Кардиодинамски параметри	96
4.2.7.2. Прооксидациони параметри мерени у коронарном венском ефлуенту	98
4.2.7.3. Бојење срчаног ткива хематоксилин/еозином	100
4.2.7.4. Бојење тропонина Т у ткиву миокарда	101
4.2.7.6. Релативна експресија антиоксидационих, (анти)апоптотских и (анти)инфламацијских гена у левој комори срца	102

4.3. ЕФЕКТИ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА ПАЦОВЕ СА МЕТАБОЛИЧКИМ СИНДРОМОМ	105
4.3.1. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦОВА ПРАЋЕНЕ ТОКОМ ХРОНИЧНОГ ПРОТОКОЛА	105
4.3.2. ФУНКЦИЈА МИОКАРДА ПРАЋЕНА IN VIVO	107
4.3.3. ЛИПИДНИ ПАРАМЕТРИ МЕРЕНИ НАКОН ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ	108
4.3.4. НИВОИ ИНСУЛИНА И ГЛУКОЗЕ МЕРЕНИ ТОКОМ ТЕСТА ОПТЕРЕЋЕЊА ГЛУКОЗОМ (ОГТТ)	109
4.3.5. КРВНИ ПРИТИСАК И СРЧАНА ФРЕКВЕНЦА	111
4.3.6. НИВОИ ПРООКСИДАЦИОНИХ И АНТИОКСИДАЦИОНИХ ПАРАМЕТАРА У СИСТЕМСКОЈ ЦИРКУЛАЦИЈИ	112
4.3.7. НИВОИ ХОМОЦИСТЕИНА	114
4.3.8. EX VIVO ПРОТОКОЛ: 90 МИНУТА РЕТРОГРАДНЕ ПЕРФУЗИЈЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	115
4.3.8.1. Кардиодинамски параметри	115
4.3.8.2. Прооксидациони параметри мерени у коронарном венском ефлуенту	117
4.3.8.3. Бојење срчаног ткива хематоксилин/еозином	119
4.3.9. EX VIVO ПРОТОКОЛ: 30 МИНУТА ИСХЕМИЈЕ И 60 МИНУТА РЕПЕРФУЗИЈЕ	120
4.3.9.1. Кардиодинамски параметри	120
4.3.9.2. Прооксидациони параметри мерени у коронарном венском ефлуенту	122
4.3.9.3. Бојење срчаног ткива хематоксилин/еозином	124
4.3.9.4. Бојење тропонина Т у ткиву миокарда	125
4.3.9.6. Релативна експресија антиоксидационих, (анти)апоптотских и (анти)инфламацијских гена у левој комори срца	126
5. ДИСКУСИЈА	130
5.1. ЕФЕКТИ ДИАЛИЛ ТРИСУЛФИДА НА ЗДРАВЕ ПАЦОВЕ	132
5.1.1. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦОВА И БИОХЕМИЈСКЕ ПАРАМЕТРЕ (БЕЗБЕДНОСНИ АСПЕКТИ ДАТС ТРЕТМАНА)	132
5.1.2. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА НИВОЕ ХОМОЦИСТЕИНА (ДАТС КАО ДОНОР ВОДНИК СУЛФИДА)	133
5.1.3. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА ОКСИДАЦИОНИ СТАТУС (АНТИОКСИДАЦИОНИ ПРОФИЛ ДАТС-А КОД ЗДРАВИХ ПАЦОВА)	134
5.1.4. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА СРЧАНУ ФУНКЦИЈУ (КАРДИОПРОТЕКТИВНИ ПРОФИЛ ДАТС-А КОД ЗДРАВИХ ПАЦОВА)	135
5.1.5. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА EX VIVO ИНДУКОВАНУ И/Р ПОВРЕДУ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА (ДАТС КАО ПРЕКОНДИЦИОНИРАЈУЋИ АГЕНС КОД ЗДРАВИХ ПАЦОВА)	136
5.2. ЕФЕКТИ ДИАЛИЛ ТРИСУЛФИДА НА ПАЦОВЕ СА ДИЈАБЕТЕСОМ ТИП 1	141

5.2.1. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦОВА И БИОХЕМИЈСКЕ ПАРАМЕТРЕ (АНТИДИЈАБЕТСКИ КАПАЦИТЕТ ДАТС-А)	141
5.2.2. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА ВРЕДНОСТИ ХОМОЦИСТЕИНА (ДАТС КАО ДОНОР ВОДОНИК СУЛФИДА КОД ПАЦОВА СА ДИЈАБЕТЕСОМ)	142
5.2.3. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА (АНТИОКСИДАЦИОНИ КАПАЦИТЕТ ДАТС-А КОД ПАЦОВА СА ДИЈАБЕТЕСОМ)	143
5.2.4. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА ФУКЦИЈУ МИОКАРДА (КАРДИОПРОТЕКТИВНИ КАПАЦИТЕТ ДАТС-А КОД ПАЦОВА СА ДИЈАБЕТЕСОМ)	145
5.2.5. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА ЕХ VIVO ИНДУКОВАНУ И/Р ПОВРЕДУ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА (ДАТС КАО ПРЕКОНДИЦИОНИРАЈУЋИ АГЕНС КОД ПАЦОВА СА ДИЈАБЕТЕСОМ)	147
5.3. ЕФЕКТИ ДИАЛИЛ ТРИСУЛФИДА НА ПАЦОВЕ СА МЕТАБОЛИЧКИМ СИНДРОМОМ	151
5.3.1. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦОВА И БИОХЕМИЈСКЕ ПАРАМЕТРЕ (ПОТЕНЦИЈАЛ ДАТС-А ДА СМАЊИ СИМПТОМЕ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА)	151
5.3.2. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНЕ УПОТРЕБЕ ДАТС-А НА НИВОЕ ВОДОНИК СУЛФИДА И ХОМОЦИСТЕИНА (ДАТС КАО ДОНОР ВОДОНИК СУЛФИДА КОД ПАЦОВА СА МЕТАБОЛИЧКИМ СИНДРОМОМ)	154
5.3.3. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА (АНТИОКСИДАЦИОНИ КАПАЦИТЕТ ДАТС-А КОД ПАЦОВА СА МЕТАБОЛИЧКИМ СИНДРОМОМ)	155
5.3.4. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА СРЧАНУ ФУНКЦИЈУ (КАРДИОПРОТЕКТИВНИ КАПАЦИТЕТ ДАТС-А КОД ПАЦОВА СА МЕТАБОЛИЧКИМ СИНДРОМОМ)	157
5.3.5. ЕФЕКТИ ХРОНИЧНОГ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА ЕХ VIVO ИНДУКОВАНУ И/Р ПОВРЕДУ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА (ДАТС КАО ПРЕКОНДИЦИОНИРАЈУЋИ АГЕНС КОД ПАЦОВА СА МЕТАБОЛИЧКИМ СИНДРОМОМ)	159
5.4. ПОРЕЂЕЊЕ ЕФЕКТА ДАТС-А ИЗМЕЂУ ЗДРАВИХ, ПАЦОВА СА ДИЈАБЕТЕСОМ И ПАЦОВА СА МЕТАБОЛИЧКИМ СИНДРОМОМ	162
5.5. БУДУЋА ИСТРАЖИВАЊА	163
6. ЗАКЉУЧЦИ	165
7. РЕФЕРЕНЦЕ	167

I

УВОД

1. УВОД

1.1. ВОДОНИК СУЛФИД КАО СИГНАЛНИ МОЛЕКУЛ

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

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

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

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

1.1.1. Биосинтеза, метаболизам и елиминација H_2S

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

Ендогени H_2S се у високом проценту (96%) у ткивима синтетише заједно са аминокиселинама које садрже сумпор, односно L-цистеином и L-хомоцистеином (Hcy). L-цистеин се транссулфурацијом синтетише из L-метионина, док L-хомоцистеин и L-цистатинин генеришу H_2S уз пиридоксал 5'-фосфат (витамин Б6) који служи као кофактор (12). У недавно објављеној студији показано је да за производњу H_2S може да се користи D-цистеин који се метаболише D-амино оксидазом (DAO) (13). Ове аминокиселине метаболишу се у реакцијама транссулфурације и трансминације уз учешће четири ензима, који се једним именом називају "H₂S-синтетишући ензими", у које се убрајају: цистатинин γ -лиаза (CSE), цистатинин β -синтаза (CBS), цистеин аминотрансфераза (CAт) и 3-меркаптопируват сулфуртрансфераза (3-MST). Кључне реакције у синтези H_2S су: десулфурација L-цистеина у пируват (реакција: α , β -елиминација) помоћу ензима CSE; кондензација L-хомоцистеина са L-цистеином (реакција: β -замена) и десулфурација L-цистеина у L-серин (реакција: β -елиминација) помоћу CBS ензима; трансминација L-цистеина са α -кетоглутаратом уз посредство CAт и производњу 3-меркаптопирувата (3MP). Такође, H_2S се може синтетисати посредством 3-MST и кофактора (глутатион, тиоредоксин и дихидролипоична киселина) (14, 15).

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

амино киселинске оксидазе (DAAO); редукција тиосулфат-анјона помоћу тиосулфат-дителиол сулфуртрансферазе (TST) (14-17). Алтернативни извори нису толико значајни у синтези физиолошких концентрација H_2S , али у многоме могу утицати на производњу H_2S код хиперхомоцистеинемije или хиперцистеинемije, које се често јављају заједно (18) (Схема 1).

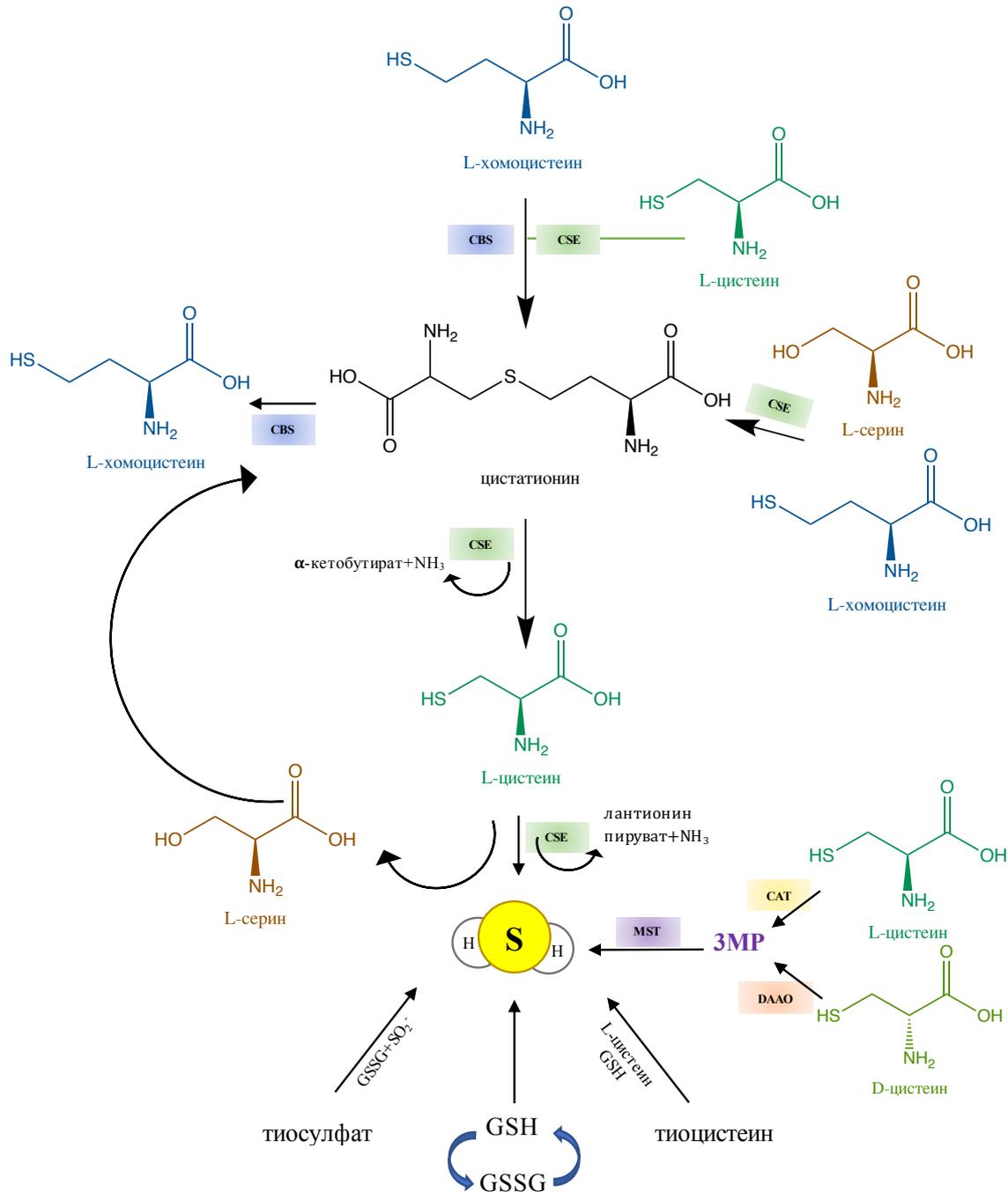


Схема 1. Најважнији путеви генерисања H_2S (биосинтеза и катаболизам) (12-18).

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

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

1.1.2. Биолошки ефекти H_2S

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

H_2S се може синтетисати у различитим органима помоћу претходно споменутих ензима, како у анималном, тако и у хуманом организму. CBS је водећи извор H_2S у централном нервном систему, док је CSE водећи извор у васкуларном систему, али је

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

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

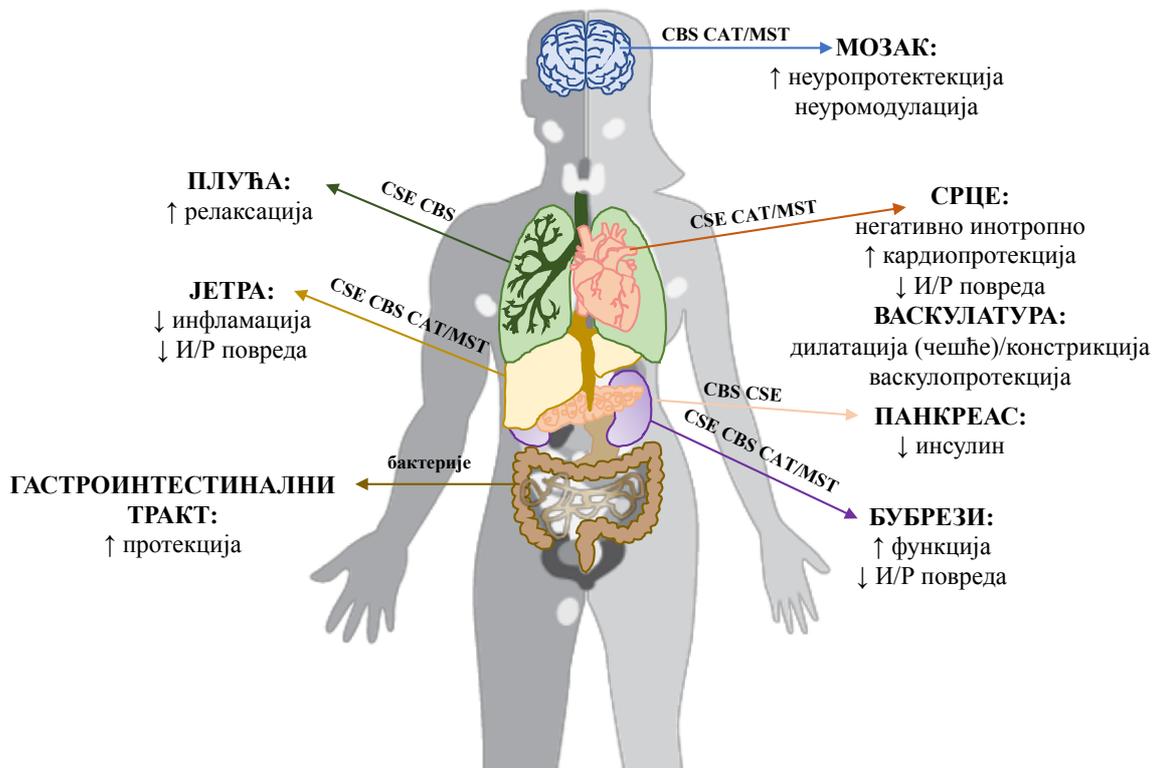


Схема 2. Најважнији физиолошки ензими одговорни за производњу H_2S , као и његове различите физиолошке и патолошке улоге у организму човека.

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

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

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

1.2. ДОНОРИ H_2S

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

Једињења попут неорганских сулфидних соли, у које се убрајају натријум сулфид (Na_2S) и натријум хидроген сулфид ($NaHS$) се тестирају већ дуги низ година. $NaHS$ дисосује на Na^+ и HS^- , делимично се везује за H^+ , при чему се синтетише H_2S . Главна предност сулфидних соли је њихова способност да врло брзо повећавају концентрацију H_2S , а да уз то не стварају споредне производе. С друге стране, главни проблем, односно недостатак, код ове врсте донора је то што је ослобађање H_2S веома тешко контролисати. Одмах након растварања сулфидних соли у воденим пуферима, H_2S се ослобађа. Међутим, половина ослобођеног H_2S се губи у првих 5 минута (26, 27). Ови недостаци су допринели потрази за новим H_2S донорима који пружају истраживачима могућност да контролишу дозу, дужину трајања, време и место ослобађања.

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

1.2.1. Синтетички H_2S донори

Многи синтетички H_2S донори се активирају хидролизом, а у овом поглављу биће описани само неки од њих.

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

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

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

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

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

1.2.2. Природни донори H_2S

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

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

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

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

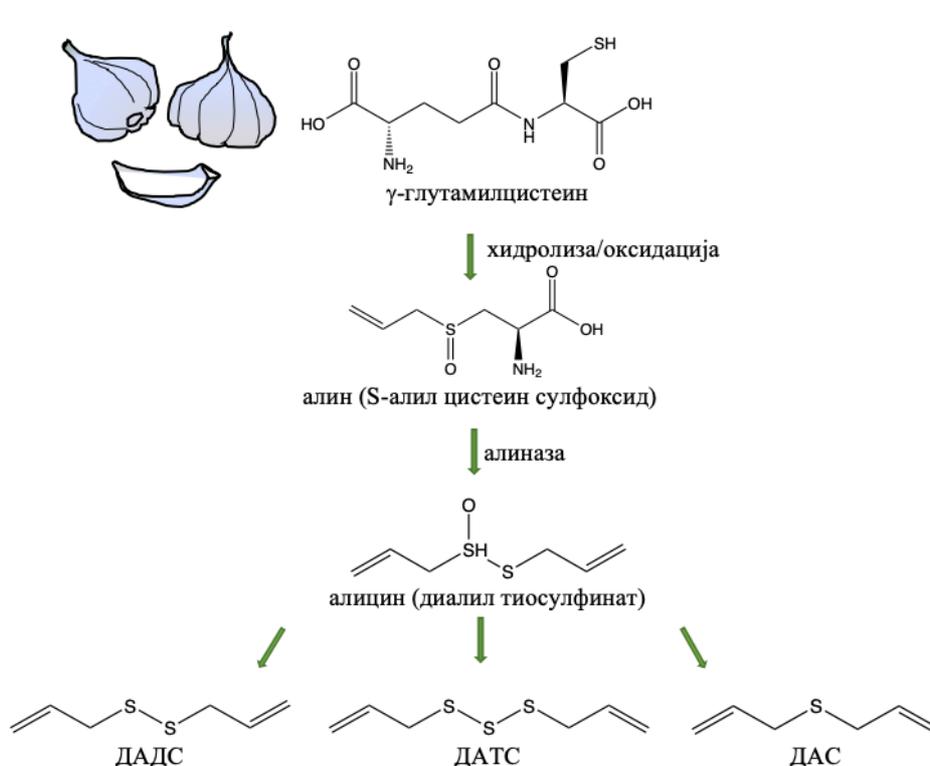


Схема 3. Пут синтезе органосумпорних једињења (H_2S донора) изолованих из белог лука.

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

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

1.3. ДИАЛИЛ ТРИСУЛФИД

1.3.1. Карактеристике ДАТС-а

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

Са три атома сумпора у својој структури, ДАТС се издваја као најреактивније органосумпорно једињење изоловано из белог лука. Стабилнији је од добро проучених неорганских сулфидних соли ($NaHS$ и Na_2S), а H_2S ослобађа, споро, током дужег временског периода (50, 51).

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

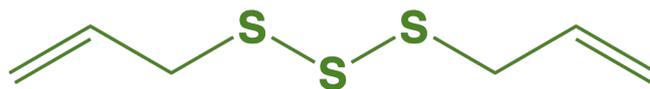


Схема 4. Диалил трисулфид, органосумпорно једињење изоловано из белог лука.

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

1.3.2. Метаболизам и фармакокинетика ДАТС-а

Код људи, одмах након конзумације сировог белог лука или других производа белог лука, алил меркаптан, алил метил сулфид, алил метил дисулфид, ДАС и ДАДС се могу идентификовати у издисају. С друге стране, помоћу течне хроматографије високих перформанси (HPLC), гасне хроматографије (GC), масене спектрометрије (MS) или њихове комбинације, метаболити попут N-ацетил-S-(2-карбоксипропил)-цистеин, N-ацетил-S-алилцистеин и хексахидрохипурнска киселине могу се идентификовати у урину (54-56). Велики напори су уложени да се *in vivo* измере нивои појединих алил сулфида и других метаболита изолованих из белог лука. Споменуте методе имају ниску осетљивост и селективност која је потребна за директно одређивање нивоа ДАТС-а *in vivo* јер се све наведено заправо односи на бели лук и самим тим није специфично за ДАТС. Метаболизам ДАТС-а је још увек недовољно познат, при чему је његова фармакокинетика истраживана у само неколико студија.

Sup и његови сарадници су концентрацију ДАТС-а у крви пацова одређивали користећи GC и идентификовали његов главни метаболит помоћу GC-MS. Они су

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

После двонедељног третмана ДАТС-ом (интрапеитонеално, у дози од 10 mmol/kg телесне тежине на дан), примећено је значајно повећање активности кинон редуктазе, глутатион пероксидазе и глутатион S-трансферазе код пацова (57). Исто тако, ДАТС који је *per os* даван пацовима у дози од 89 mg/kg/дан током 6 узастопних дана значајно је повећао активност кинон редуктазе и глутатион S-трансферазе у различитим ткивима (58). Активност глутатион S-трансферазе је такође, значајно повећана након 6 недеља конзумирања ДАТС-а (70 mg/kg три пута недељно) код пацова, док је активност N-нитрозодиметиламин деметилазе смањена (59).

Такође, у доступној литератури показано је да еритроцити богати GSH могу изазвати ослобађање H₂S из ДАТС-а. Биолошки тиоли, посебно мембрански протеини који у себи имају тиол групу уз трансмембранске редуктаза системе, играју важну улогу у производњи H₂S. NADH, NADPH и GSH одржавају ниво биолошких тиола, чиме се одржава и производња H₂S (60). С обзиром да блокирање тиол групе у мембранским протеинима не спречава производњу H₂S у потпуности, ДАТС пролази кроз мембрану и реагује са интрацелуларним GSH при чему долази до синтетисања H₂S (61-63).

Додавање ДАТС-а у концентрацији од 50 μM до 500 μM у раствор глутатиона доводи до тренутне производње H₂S, док додавање ДАТС у концентрацији од 50 μM у раствор глутатиона не доводи до детектабилне концентрације H₂S. На основу истраживања Liang-а и сарадника, ДАТС вероватно реагује са GSH преко тиол-дисулфидне размене и генерише алил меркаптан и S-алил глутатион-дисулфид, док у случају ДАТС-а постоје два могућа тиол-дисулфидна нуклеофилна напада на GSH. Алилни сумпор генерише S-алил глутатион-дисулфид и алил-пертиол. Након редукције са GSH или централним атомом сумпора ДАТС доводи до производње алил меркаптана и S-алил глутатион трисулфида уз ослобађање H₂S. Након тога, концентрација ових једињења се уз присуство GSH смањује, при чему се ослобађа H₂S (64).

1.4. H₂S/H₂S ДОНОРИ И КАРДИОВАСКУЛАРНЕ БОЛЕСТИ: УЛОГА ДАТС-а

Кардиоваскуларне болести (КВБ) представљају групу најзначајнијих хроничних обољења широм света и водећи су узрок за изненадну смрт. Добро је познато да КВБ чине 45% свих смртних случајева у Европи. Сваке године КВБ изазивају преко 4 милиона смртних случајева у Европи и око 1,8 милиона смртних случајева у Европској унији (65). Термин КВБ се користи за стања која погађају срце и/или крвне судове, али такође могу бити повезане са оштећењем и повредама артерија, како у срцу тако и у мозгу, бубрезима и очима (66). Примарне болести укључене у КВБ су: хронична срчана инсуфицијенција, хипертензија и коронарна артеријска обољења (попут атеросклерозе). Иако се овим болестима данас може управљати различитим лековима, дугорочна прогноза и контрола компликација и даље су на јако лошем нивоу. Имајући у виду да је у популацији све већи број пацијената, често лечен неодговарајућим терапијом, постоји снажан подстицај да се пронађу третмани, који би били ефикаснији у лечењу, ублажавању симптома или, још боље у спречавању настанка КВБ (67). Последњих година, све већи број студија је спроведен како би се испитале улоге H₂S и његових донора у КВБ срца и крвних судова (68). У овом делу биће описани само неки од, до сада познатих заштитних ефеката.

До данас је добро утврђено да H₂S може утицати на васкулатуру глатких мишића тако што изазива релаксацију или контракцију. Једна од најважнијих улога H₂S је способност да активира АТП зависне калијумове канале (К-АТП). У ћелијама глатких мишића, активацијом К-АТП канала постиже се хиперполаризација и релаксација, док је у срцу исти механизам одговоран за кардиопротекцију (69). H₂S такође утиче на ниво неколико проинфламацијских цитокина као што су нуклеарни фактор-кВ (NF-кВ), интерлеукин (IL)-6, IL-8 и фактор некрозе тумора алфа (TNF-α) (70). Осим тога, H₂S смањује стварање водоник пероксида и повећава ниво GSH (71).

У овој студији, фокус је био на испитивању биолошких ефеката H₂S и његовог донора ДАТС-а, релевантних за кардиоваскуларни систем, посебно исхемију/реперфузију (И/Р), дијабетес мелитус (ДМ) и метаболички синдром (МетС). Поред тога, с обзиром да су Нсу и хиперхомоцистеинемија (ННсу) постали широко признати као важни маркери ризика за КВБ, покушали смо да објаснимо и повежемо утицај ДАТС-а на нивое Нсу, посебно у наведеним болестима.

1.4.1. H₂S и исхемијско/реперфузиона повреда миокарда

Исхемија миокарда најчешће настаје услед оклузије крвних судова. Поред оштећења срца која настају у тренутку исхемије, битно је напоменути и да након поновног успостављања протока крви долази до продукције низа стресогених фактора па се зато и повреде миокарда називају исхемијско/реперфузионе (И/Р). Исхемија представља чест клинички симптом у КВБ, а услед ниских рН вредности, смањеног нивоа кисеоника и поремећаја у концентрацији K⁺ и Ca²⁺, може доћи до срчане дисфункције, аритмија, инфаркта миокарда и изненадне смрти (72). С друге стране, оштећење и умањена функција миокарда настали услед исхемије могу се поправити током реперфузије. Међутим, најчешће као резултат активације комплексног инфламацијског одговора у реперфузионом периоду долази до иреверзибилног оштећења које се назива реперфузиона повреда (73, 74). Фактори који доприносе И/Р повредама су веома комплексни и поред већ поменутих, укључују микроваскуларне дисфункције, ослобађање реактивних врста кисеоника (енгл. *reactive oxygen species*, ROS), као и активацију митохондријалне апоптозе и некрозе. Због тога је неопходно разумети потенцијалне механизме који доводе до И/Р повреде миокарда, побољшати кардиопротективне стратегије и пронаћи нова једињења, такозване прекондиционарајуће агенсе, како би се побољшао капацитет миокарда и смањио ризик од настанка кардиоваскуларних догађаја (75).

Као што је раније споменуто, H₂S се убраја у веома значајне сигналне молекуле кардиоваскуларног система. Кардиопротективни ефекти H₂S испитивани су на различитим експерименталним моделима И/Р повреде, *in vivo*, *ex vivo* и на кардиомиоцитима (76-78). H₂S вероватно активира сложене механизме који се супротстављају онима који доводе до повреде миокарда у И/Р, чиме изазива кардиопротективне ефекте. На основу података из литературе, кардиопротективни механизми укључују PI3K/Akt, протеин киназу С (PKC), екстрацелуларно регулисану киназу (ERK) 1/2, и Nrf2 (енгл. *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*) (79). Уз ове, у литератури је предложено и много других механизма кардиопротекције H₂S: регулација протеинске киназе В, ендотелне азотмоксид синтазе (eNOS) (80), комбинација антиапоптотских, антиинфламацијских и антиоксидационих ефеката (81), инхибиција митохондријалног комплекса IV, повећање активности супероксид

дисмутазе (SOD) (82), активирање експресије протеина топлотног шока (HSP) 72 (83), K-АТП/РКС зависна индукција експресије циклооксигеназе 2 (COX-2) и NO-индукована активација COX-2 (84), као и активација РКС да би се регулисали интрацелуларни нивои Ca²⁺ (85) и други.

H₂S такође побољшава штетне физиолошке промене изазване оклузијом аорте и обезбеђује заштиту од И/Р повреде смањујући ћелијску некрозу, повећавајући експресију фосфорилваног p44/42 MAPK и смањујући експресију протеина бекалин-1 (86). Такође, многи H₂S донори се испитују као агенси за прекодиционирање. Примећено је да NaHS смањује величину инфаркта миокарда који утиче на пут цикличног гуанозин монофосфата (cGMP)/протеин киназа G (PKG) (87).

1.4.2. H₂S и дијабетес мелитус

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

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

Постоје бројне класификације дијабетеса, али је Америчка асоцијација за дијабетес (2018) поделила ову болест на 4 основне групе, према следећим критеријумима:

- тип 1 дијабетес мелитус (Т1ДМ), познат као ДМ зависан од инсулина;
- дијабетес мелитус типа 2 (Т2ДМ), познат као ДМ независан од инсулина;
- гестацијски дијабетес, дијагностикован у другом или трећем триместру трудноће;

- специфични типови дијабетеса и дијабетеса код одраслих, болести егзокриног панкреаса и дијабетес изазван лековима или другим хемијским агенсима.

Међутим, код ДМ се углавном разликују два основна типа: Т1ДМ и Т2ДМ (91). Улога H_2S је испитивана и у типу 1 и типу 2 ДМ. Такође, посебна пажња је посвећена кардиомиопатији у дијабетесу, која је дефинисана постојањем абнормалних структура и/или функција миокарда, која се јавља као једна од компликација ДМ. *Sun* и сарадници су у својој студији показали да H_2S може побољшати енергетски метаболизам срчаног ткива, тако што повећава експресију и активност SIRT3 и смањује инфламацију, оксидациони стрес и апоптозу (92).

1.4.2.1. H_2S и дијабетес мелитус тип 1

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

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

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

Све је више доказа о корисним ефектима H_2S на побољшање Т1ДМ. Измењени нивои H_2S , као и експресија ензима који учествују у синтези H_2S , примећени су код животиња са Т1ДМ. *Yusuf* и сарадници су показали да у панкреасу пацова са дијабетесом долази до повишене експресије CSE и CBS ензима, као и повећаног нивоа H_2S у плазми (95). Такође, код CSE^{-/-} мишева је примећено да недостатак овог ензима штити мишеве од стрептозотоцина (СТЗ) тако што спречава да дође до оштећења и дисфункције

панкреасних острваца (96). Са друге стране, у неким студијама је показано да код СТЗ третираних пацова са дијабетесом, као и код људи са дијабетесом, долази до смањења нивоа H_2S у циркулацији (97, 98).

1.4.2.2. H_2S и метаболички синдром/дијабетес мелитус тип 2

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

Према најновијем водичу за лечење дијабетеса *Adult Treatment Panel-III*, МетС се дијагностикује када је присутно најмање три од пет следећих абнормалности: висцерална гојазност (обим струка: код мушкараца > 102 cm, код жена > 88 cm); артеријски КП (> 130/85 mm Hg); гликемија у крви (наште > 6 mmol/L); инсулин у крви (наште > 5 mmol/L); триглицериди (> 150 mg/dL); липопротеини високе густине (HDL) (код мушкараца < 40 mg/dL, код жена < 50 mg/dL) (100). Важно је напоменути да присуство МетС-а доводи до повећаног ризика за кардиометаболичке факторе ризика, укључујући Т2ДМ, интолеранцију глукозе, инсулинску резистенцију, абдоминалну гојазност, дислипидемије, безалкохолну масну јетру (енгл. *non-alcoholic fatty liver*, NAFL), хипертензију, као и коронарну или периферну атеросклерозу и инфаркт миокарда. Такође, бројна клиничка стања као што су дислипидемија, хипертензија, NAFL, синдром полицистичних јајника, синдром апнеје у сну, алцхајмерова болест, рак плућа, простате или панкреаса, прихваћена су као могуће клиничке манифестације, односно компликације овог синдрома (101).

Okamoto у свом истраживању наводи да је код шестомесечних CSE^{-/-} мишева, 8 недеља храњених храном са високим садржајем масти (енгл. *high-fat diet*, HFd), побољшана експресија гена за везивање тиоредоксина-2 протеина (енгл. *thioredoxin-binding protein-2*, TBP-2). Имајући у виду да TBP-2 повећава сензитивност инсулина и изазива интолеранцију на глукозу, ови налази указују да је експресија, односно

активност CSE укључена у исход и тежину Т2ДМ (102). Као што је већ споменуто, H_2S смањује КП углавном јер утиче на отварање К-АТП канала у ћелијама васкуларних глатких мишића, али К-АТП канали су такође важни за секрецију инсулина у бета ћелијама панкреаса (103). Наиме, H_2S инхибира секрецију инсулина из бета ћелија активирањем К-АТП канала и инхибирањем L-типа волтажно зависних калцијумских (Ca^{2+}) канала (104). H_2S инхибира преузимање глукозе стимулисано инсулином и смањује осетљивост белих адиоцита на инсулин код пацова, вероватно путем инхибиције транспортера глукозе-4 (ГЛУТ-4) (105). Друге студије су показале да је синтеза H_2S повећана код пацова са дијабетесом, при чему је сугерисана инхибиција H_2S као терапијског приступа (106, 107). Т2ДМ се често наводи и као стање које се погоршава услед дефицијенције H_2S (108-110), јер се зна да H_2S штити бета ћелије од апоптозе индуковане високим нивоима глукозе (102). Такође, услед хондроитин сулфат пребиотичке дијете, ниво H_2S се повећава, при чему се стимулише глукагону сличан пептид-1 (ГПП-1) који изазива антидијабетске ефекте (111).

1.5. ЗАШТИТНЕ УЛОГЕ H_2S /ДОНОРА H_2S У КАРДИОВАСКУЛАРНИМ БОЛЕСТИМА

Као што је раније поменуто, H_2S показује различита физиолошка дејства на различитим ткивима и органима, варирајући од срца до мозга, односно од васкулатуре до неурона. Молекуларни механизми који су укључени у кардиопротективне ефекте H_2S у КВБ, добили су велику пажњу последњих деценија (112-114). Најзначајнији заштитни ефекти H_2S и његових донора у КВБ сумирани су у овом поглављу.

Генерално посматрано, H_2S и његови донори индукују кардиопротективне ефектне најчешће преко антиоксидационих, антиинфламацијских и антиапоптотских путева, што је и био фокус у овој студији.

1.5.1. Антиоксидациони ефекти

Оксидациони стрес је процес који се дефинише као неравнотежа између производње прооксидационих и антиоксидационих параметара. У прооксидационе параметре се убрајају слободни радикали који настају у ћелијама, током њиховог метаболизма (115). ROS, су веома реактивне, нестабилне честице кисеоника, које се састоје од атома, молекула или јона са једним или више неспарених електрона у структури. ROS настају као природни нуспродукти метаболизма кисеоника и имају важну улогу у ћелијској сигнализацији и хомеостази у физиолошким условима. Међутим, услед болести или оксидационог стреса, продукција ROS-а може се значајно повећати и може довести до оштећења структура ћелија. У ROS-е се убрајају слободни радикали кисеоника и нерадикалске честице кисеоника, које се производе у организму. Најважнији слободни радикали кисеоника су супероксидни анјон радикал (O_2^-), хидроксилни радикал (OH^-), пероксилни радикал (ROO^-), док је најбитнији нерадикал водоник пероксид (H_2O_2) (116, 117). H_2O_2 је једна од стабилних ROS, али његова производња драматично расте током оксидационих процеса у стањима инфламације (118). Поред запаљења, постоје и многи други извори ROS-а. NADPH оксидазе су значајни извори ROS-а у васкулатури. Они повежавају стварање O_2^- преношењем електрона из NADPH кроз Nox субјединицу на молекулски кисеоник. Када говоримо о оксидационом стресу и ROS-у, веома је важно описати и липидну пероксидацију, тј. инкорпорацију молекуларног кисеоника у структуру полинезасићених масних киселина (енгл. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) (119, 120). Због пероксидације липида долази до смањене флуидности ћелијске мембране, повећане пропустљивости за једновалентне и двовалентне јоне, као и до оштећења система за пренос информација са мембранских рецептора на интрацелуларне системе, а самим тим и до деактивације ензима (121).

Поред ROS-а, реактивне врсте азота (енгл. *reactive nitrogen species*, RNS) такође имају висок оксидациони потенцијал. Најважнија RNS је азот моноксид ($^{\bullet}NO$), а услед његовог метаболизма и његове велике реактивности долази до стварања првенствено пероксинитрита ($ONOO^-$), азот диоксида (NO_2), диазот триоксида (N_2O_3) и диазот тетраоксида (N_2O_4). Све ове RNS заједно са ROS-ма имају велики утицај на ћелије (122-124).

Антиоксидациони систем одбране има улогу у ограничавању или смањењу (поправљању) оштећења изазваног ROS-ом и RNS-ом. Овај систем обухвата примарну (ензимску и неензимску) и секундарну антиоксидациону заштиту, а антиоксиданси могу деловати пре или током реакције слободних радикала (125). Ензимске компоненте укључују супероксид дисмутазу (SOD), каталазу (CAT), ензиме глутатион редокс циклуса, цитохром оксидазу и друге, док неензимски укључују витамин Е, провитамин А, тј. каротен и коензим Q тј. аскорбинску киселину, редуковани глутатион (GSH), мокраћну киселину, албумин, трансферин, биливердин, цистеин, хистиди, и друге (126). У секундарну антиоксидациону заштиту убрајају се компоненте које могу да обнове ДНК гликозилазу, ДНК полимеразу, ДНК лигазу и ендонуклеазу и поправе новонасталу штету, као што су протеин специфичне оксидоредуктазе (тиол трансферазе), протеин ADP рибозил трансферазе и АТФ и Ca^{2+} независне протеазе (127). Осим антиоксидационих молекула који делују унутар ћелијских структура, постоје и молекули који делују ван ћелија. У ову групу се убрајају метални протеини, који задржавају гвожђе и бакар у нереактивној форми и спречавају њихову реакцију са H_2O_2 и O_2^- (128).

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

Повезаност гасотрансмитера и оксидационог стреса проучава се годинама уназад. Међутим, за разлику од NO, јако мало се зна како CO и H_2S утичу на оксидациони стрес и потребна су опсежнија истраживања која би дала адекватне одговоре. У досадашњој литератури, предложени су поједини механизми којима H_2S изазива антиоксидационе ефекте. Сматра се да H_2S највероватније уништава липидне хидропероксиде у оксидованом липопротеину мале густине (ox-LDL) (129, 130) и уклања прооксидансе (O_2^- , H_2O_2 , HOCl/OCl и ONOOH/ONOO $^-$). Међутим, у физиолошкој концентрацији, H_2S не може у потпуности да испољи своје антиоксидационе ефекте, што указује да поред његове хемијске редокс природе постоје и други механизми. Самим тим, KEAP1/Nrf2 пут S-сулфидације може послужити као пример за модулацију хомеостазе редокс равнотеже (131).

Sun и сарадници (82) су у свом истраживању открили да H_2S инхибира активност митохондријалног комплекса IV, повећава активност Mn-SOD и CuZn-SOD и смањује

нивое ROS-а у кардиомиоцитима током И/Р. H₂S је такође смањio липидну пероксидацију уклањањем H₂O₂ и O₂⁻ у моделу оштећења миокарда изазваног изопротеренолом (107). Активација Nrf2 зависног пута посредованог H₂S доводи до појачане експресије гена за HO-1, GSH, глутатион S-трансферазу, тиоредоксин и CAT, а сви они су важни у ендегеном антиоксидационом систему заштите. Осим тога, H₂S има инхибиторни ефекат на фосфодиестеразу-5 (ПДЕ-5), што доводи до смањења стварања NADPH оксидазе, док се ниво антиоксидационих ензима повећава (132).

Све претходно наведено, заједно указује на то да H₂S може спречити стварање реактивних врста, уклонити их и самим тим ојачати ендегени антиоксидациони систем.

1.5.2. Антиапоптотски ефекти

Термин апоптоза се користи да објасни морфолошке процесе којима организам природно, зависно од енергије и генетике контролише елиминацију непотребних ћелија и њихову самодеструкцију. Апоптоза се разликује од других облика ћелијске смрти, као што је некроза, која представља процес у коме токсини, физички стимулуси или исхемија могу изазвати повреду ћелија (133). У Bcl-2 фамилију гена се убрајају инхибитори апоптозе (као што су Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, Nr13 и A1/Bfl-1) и активатори апоптозе (као што су Bax, Bak, Bok, Diva, Bcl-xs, Bik, Bim, Hrk, Nip3, Nix, Bad и Bid) (134). Bax припада породици протеина који у неколико региона деле своју хомологију са Bcl-2. Протеини који инхибирају апоптозу су укључени у њену регулацију и промоцију, односно супресију ћелијске смрти (133-136).

У више наврата је показано да H₂S поседује антиапоптотске ефекте, које највероватније остварује тако што доприноси очувању митохондријалне функције. Такође, важно је напоменути да многа цитопротективна својства H₂S током И/Р повреде могу бити резултат дејстава на митохондрије (137). H₂S такође може заштитити кардиомиоците од глукозом изазване апоптозе, највероватније тако што утиче на експресију гена за Bax и Bcl-2. Битно је напоменути да постоје и докази на експерименталним моделима који сведоче да NaHS, као донор H₂S, смањује активацију каспазе-3 и редукује број апоптотских ћелија, што сугерише да H₂S може инхибирати напредовање апоптозе након И/Р повреде (138).

Гликогена синтеза киназе-3 (GSK-3 β) је предложена као главно упориште срчане повреде након исхемије. *Osipov* и *Yao* у својим независним истраживањима су уочили да H₂S и NaHS значајно повећавају експресију фосфорилисане GSK-3 β форме, што касније доводи до инхибиције отварања пермеабилних митохондријалних транзиторних пора (енгл. *mitochondrial permeability transition pore*), а спречава апоптозу, чиме се директно штити миокард од исхемијске повреде (86, 139).

1.5.3. Антиинфламацијски ефекат

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

Различити цитокини и хемокини, продуковани инфламацијским ћелијама и васкуларним ендотелом, регулишу функцију лимфоцита активирањем (као што су IL-2, IL-4, IFN- α и IFN- β) или инхибирањем (као што су IL-10 и TGF- β) имуног одговора. Цитокини активирају инфламацијске ћелије (као што су TNF- α , IL-1 β , IFN- γ и IL-6) или стимулишу хематопоезу, као и раст и диференцијацију леукоцита (као што су IL-3 и IL-7). Цитокини посредују у развоју исхемијске повреде срца и смањују његову функцију (140, 141). IL-6 и IL-8 се ослобађају услед И/Р оштећења срца, а затим повећавају адхезију неутрофила и инфламацијски одговор (142, 143). TNF- α има неколико улога у патогенези И/Р повреде миокарда: индукује адхезију ендотелних молекула, омогућава инфилтрацију неутрофила, повећава продукцију ROS-а, доприноси инфламацијском одговору и доводи до апоптотских ефеката и директне депресије миокарда (144). Сам инфламацијски процес је патолошки процес, док се природни антиинфламацијски одговор јавља након акутне инфламације и има тенденцију да преокрене хомеостазу ткива на нормалну, физиолошку и стога се треба сматрати стварном одбрамбеном реакцијом ткива (140).

Претходне студије су показале да H₂S игра контроверзне улоге у процесу инфламације. У занимљивом прегледном чланку, *Whiteman* и *Winyard* су представили „добре“ (антиинфламацијске) и „лоше“ (проинфламацијске) ефекте ендемог и

егзогеног H_2S (145). Међутим, код КВБ антиинфламацијски ефекат H_2S игра доминантну улогу (146, 147). У периоду реперфузије, H_2S смањује број леукоцита унутар зоне исхемије, као и број неутрофила унутар ткива миокарда (147). Такође је примећено да су $IL-1\beta$, $TNF-\alpha$, $IL-6$, $IL-8$, као и *in vivo* интеракције између леукоцита и ендотелних ћелија, значајно смањене након примене H_2S . Према томе, H_2S је ограничио ниво инфламације и величину инфаркта миокарда, тако што је спречио трансмиграцију леукоцита и додатно ослобађање цитокина (70). У другој студији показано је да, H_2S донори, Na_2S и $NaHS$ инхибирају адхеренцу леукоцита и инфламацијске процесе, тако што активирају $K-ATP$ канале (148).

Нови модулатор ендогеног водоник сулфида, S-пропаргил-цистеин (SPRC) спречава активацију $NF-\kappa B$, супримира фосфорилацију $ERK1/2$ и продукцију ROS-a у липополисахаридно индукованој инфламацији у ембрионим ћелијама миокарда пацова (H9C2 ћелије) (149). Ова студија је пружила значајне доказе о функцији H_2S као антиинфламацијског агенса јер је у њој наведено да SPRC доводи до овог ефекта путем CSE/H_2S путева оштећујући $I\kappa B\alpha/NF-\kappa B$ сигнализацију и активирајући $PI3K/Akt$ сигнални пут (150).

II

ЦИЉЕВИ

СТУДИЈЕ

2. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ

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

Специфични циљеви били су:

- испитати безбедносни профил ДАТС-а у дози од 40 mg/kg сваки други дан током 3 недеље;
- проучавање способности ДАТС-а да утиче на нивое H_2S и хомоцистеина, када се примени код здравих, односно пацова са дијабетесом или метаболичким синдромом;
- истражити антиоксидациони потенцијал ДАТС-а након три недеље конзумације код здравих, као и пацова са дијабетесом или метаболичким синдромом;
- утврдити кардиопротективна својства ДАТС-а код здравих и пацова са дијабетес мелитусом и метаболичким синдромом;
- испитати ДАТС као прекондиционарајући агенс, тј. способност ДАТС-а да спречи промене у срцу здравих и пацова са дијабетес мелитусом или метаболичким синдромом;
- истражити ефекте ДАТС-а на ублажавање симптома дијабетес мелитуса;
- открити улогу ДАТС-а у лечењу метаболичког синдрома;
- предложити механизме којима ДАТС, након тронедељне *per os* примене, остварује протективне ефекте.

III
МАТЕРИЈАЛ И
МЕТОДЕ

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

У наставку је детаљан опис протокола студије и укратко су описане све методе које се користе у овој тези, за детаљније информације, погледајте цитиране научне радове.

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

Све супстанце које су коришћене у овом истраживању биле су високе чистоће, произвођача *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Немачка.

Ово истраживање се сврстава у хроничну, експерименталну студију, изведену на 96 *Wistar albino* пацова, мушког пола. На почетку студије, сви пацови су били подељени у 3 основне групе: здраве, пацове са дијабетесом и пацове са метаболичким синдромом. Затим, у зависности од третмана, поменуте основне групе су подељене у две подгрупе (нетретиране и третиране), тако да смо разликовали: здраве – КТР и ДАТС; пацове са дијабетесом – ДМ и ДМ+ДАТС; пацове са МетС-ом – МС и МС+ДАТС. Након жртвовања, све ове подгрупе, у зависности од *ex vivo* протокола, су подељене на још две подгрупе (*ex vivo* перфузија миокарда у трајању од 90 минута или *ex vivo* исхемија у трајању од 30 минута, праћена шездесетоминутном реперфузијом):

- КТР – **КТР** и **И/Р**;
- ДАТС – ДАТС и ДАТС+И/Р;
- ДМ – ДМ и **ДМ+И/Р**;
- ДМ+ДАТС – ДМ+ДАТС и ДМ+ДАТС+И/Р;
- МС – **МС** и **МС+И/Р**;
- МС+ДАТС – МС+ДАТС и МС+ДАТС+И/Р.

У свакој од ових горе поменутих група, 6 животиња (срца) је укључено у студију.

3.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ

За потребе истраживања коришћени су *Wistar albino* пацови са Војномедицинске академије у Београду, који су након транспорта смештени у стандардне, контролисане услове влажности ваздуха, температуре ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), осветљености (12/12 часовни циклуса светлост/тама). Седам дана пре истраживања, пацови су били распоређени у кавезе да би имали довољно времена да се прилагоде на нову средину. Од 96 пацова који су на самом почетку били укључени у групу, њих 72 је до краја остало у истраживању. 14 пацова је избачено из студије или због немогућности изазивања болести или због превеликих одступања из групе. На самом крају, у свакој групи био је подједнак број животиња, односно срца (6 по групи).

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

Сви *Wistar albino* пацови који су коришћени у овој студији били су мушког пола, а у тренутку жртвовања били су стари 13 недеља.

Ради лакшег праћења, опис експерименталног протокола ове студије подељен је на три дела: *in vivo* (испитивани ефекти на живим пацовима и биолошким течностима), *ex vivo* (на изолованом срцу пацова) и *in vitro* (на срчаном ткиву).

3.2. *IN VIVO* ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ

Експерименталне процедуре изведене *in vivo* на *Wistar albino* пацовима укључују индукцију Т1ДМ и МетС-а, ДАТС третман и све параметре мерене током хроничног протокола.

Све процедуре, поступци и параметри који су *in vivo* праћени у овом пројекту, хронолошки су приказани на **Схемама 5, 6 и 7** и у наставку поглавља детаљније описани.

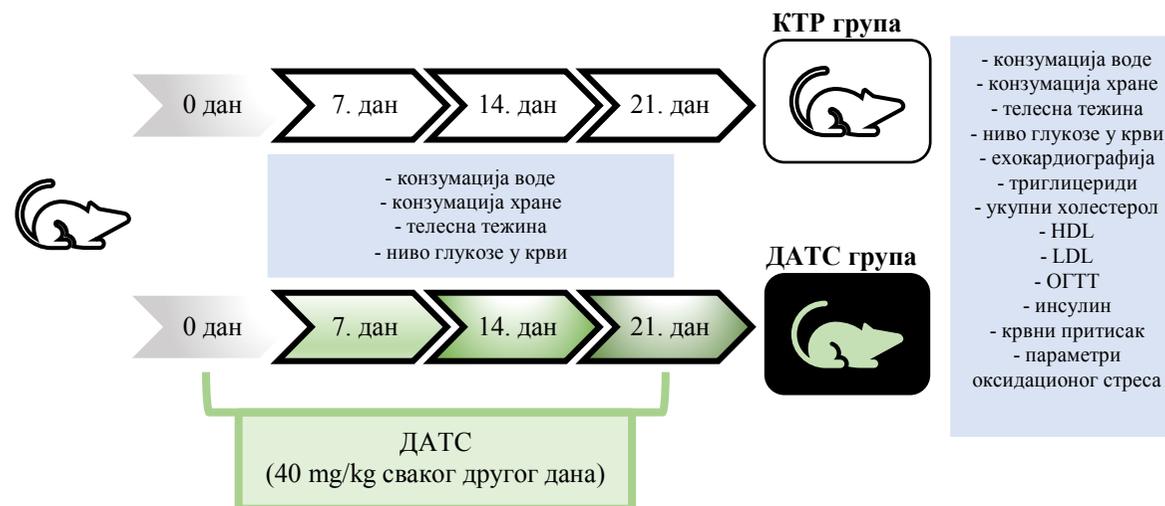


Схема 5. Хронолошки приказане експерименталне процедуре спроведене на здравим пацовима (КТР и ДАТС) – *in vivo* протокол. Зелена боја приказује групу и недеље у којима је ДАТС конзумиран, док су у плавим квадратима приказани параметри који су одређивани током или на крају хроничног протокола. ДАТС, диалил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

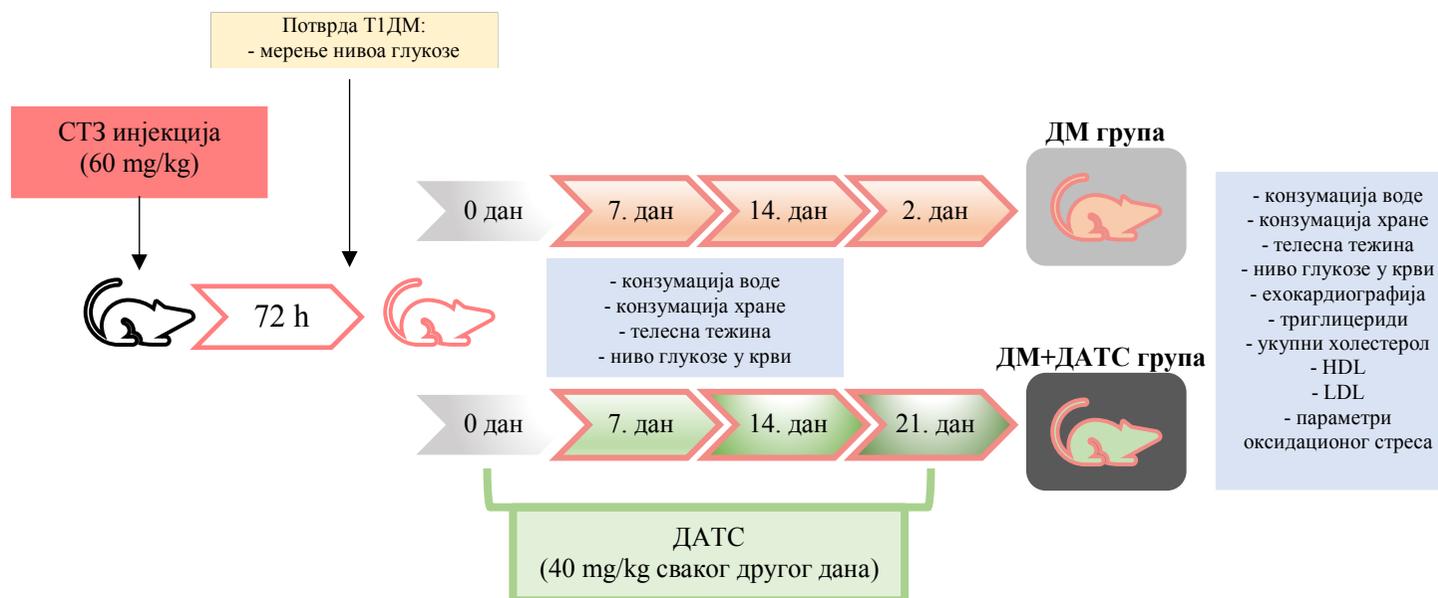


Схема 6. Хронолошки приказане експерименталне процедуре спроведене на пацовима са T1DM (DM и DM+ДАТС) – *in vivo* протокол. Роза боја приказује тренутак и групе којима је инјектован СТЗ и индукован дијабетес. Зелена боја приказује групу и недеље у којима је ДАТС конзумиран, док су у плавим квадратима приказани параметри који су одређивани током или на крају хроничног протокола. ДАТС, диалил трисулфид; Ехо, ехокардиографија; HDL, липопротеин велике густине; LDL, липопротеин мале густине; ОГТТ, тест оралног оптерећења глукозом.

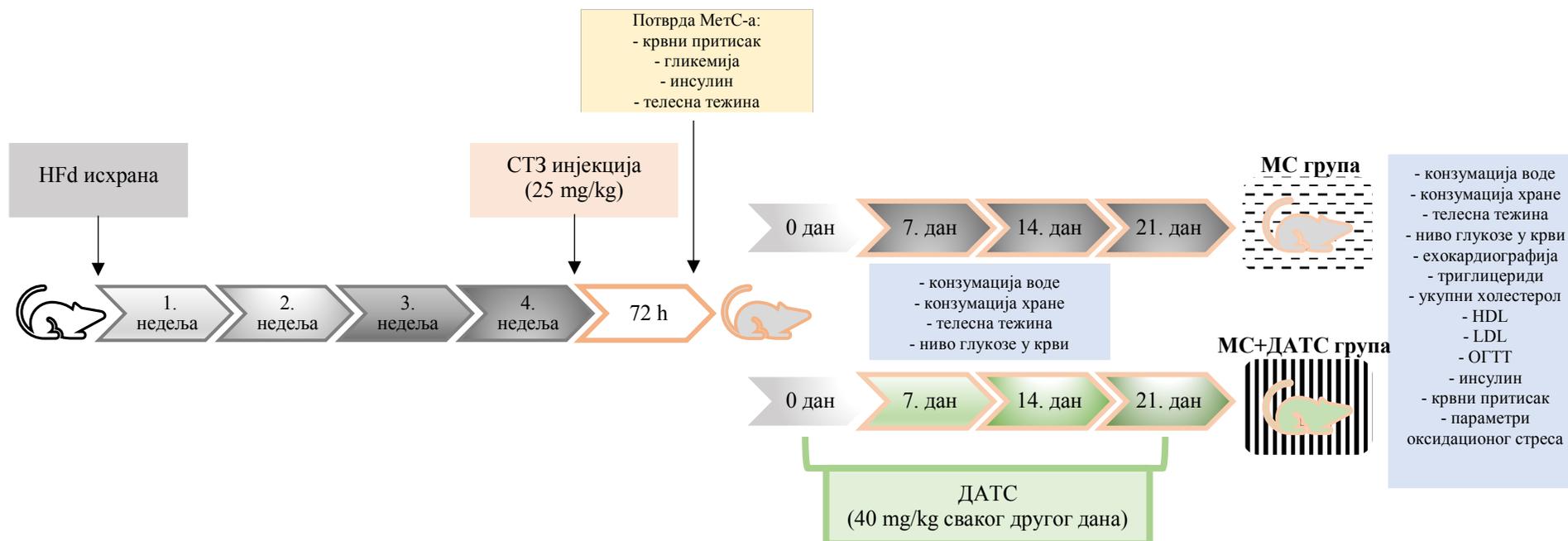


Схема 7. Хронолошки приказане експерименталне процедуре спроведене на пацовима са MetС-ом (MC и MC+ДАТС) – *in vivo* протокол. Сива боја приказује тренутак и групе које су конзумирале HFd, док светло роза боја приказује тренутак и групе којима су дате ниске дозе СТЗ и индуован MetС-ом. Зелена боја приказује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

3.2.1. Стрептозотоцином индукован дијабетес

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

СТЗ (број производа C0130) коришћен у овој студији је купљен од *Sigma-Aldrich Chemie GmbH Eschenstrasse 5, 82024 Taufkirchen*, Немачка. Чуван је на -20°C у тамној бочици, заштићен од светлости да би се избегло исушивање. Имајући у виду да је СТЗ нестабилан у раствору, припремао се свеж раствор у цитратном пуферу непосредно пре употребе.

3.2.1.1. Експериментални модел за изазивање дијабетес мелитуса тип 1

Изазивање дијабетес мелитуса код пацова првенствено зависи од дозе СТЗ. За пацове старости од 6 до 12 недеља, најчешће се користи једна доза интраперитонеално примењеног СТЗ у опсегу од 40 до 70 mg/kg (154). У нашој студији, дијабетес мелитус (Т1ДМ) је индукован код 24 мужјака *Wistar albino* пацова (старости 9 недеља, телесне тежине 200 ± 20 грама). Након 12 часова гладовања, примењена је једна интраперитонеална инјекција стрептозотоцина у дози од 60 mg/kg телесне тежине, који је био претходно растворен у 1 ml 0,05 M раствора цитратног пуфера, при чему је рН раствора износио 4,5 (155).

Након 72 часа од инјекције СТЗ, наште је мерена гликемија. За тестирање нивоа глукозе у крви преносивим мерачем (*Accu-Chek, Roche*), кап крви је узета из латералне репне вене пацова. Они пацови код којих је измерена хипергликемија, односно код којих

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

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

3.2.1.2. Експериментални модел за изазивање метаболичког синдрома

Имајући у виду да већина пацијената са Т2ДМ има инсулинску резистенцију и да постоји све већи број пацијената са метаболичким синдромом, анимални модели са овим карактеристикама су од велике користи за експериментална истраживања. Умерена доза СТЗ уз претходну исхрану базирану на високом садржају масти је једна од најчешће коришћених метода за изазивање МетС-а код пацова. На овај начин се хипергликемија, повезана са хиперинсулинемијом и инсулинском резистенцијом, индукује код животиња (156). У овој студији, МетС је индукован код 24 мужјака *Wistar albino* пацова (старости 6 недеља, телесне тежине 180 ± 20 грама). Најпре су пацови током 4 недеље храњени HFd, након којих је после дванаесточасовног гладовања, примењен СТЗ у једној дози од 25 mg/kg. Три дана (односно 72 h) касније, мерена је гликемија, инсулин и крвни притисак. Пацови који су имали гликемију наште преко 7 mmol/L и инсулин наште изнад 6 mmol/L укључени су у студију, односно у групу пацова са МетС-ом (155).

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

3.2.2. Хронични третман пацова

Да би се опонашао најчешћи и најједноставнији пут примене, ДАТС је пацовима даван *per os* (гаважом), сваки други дан у дози од 40 mg/kg телесне тежине у ДАТС (ДАТС и ДАТС+И/Р), ДМ+ДАТС (ДМ+ДАТС и ДМ+ДАТС+И/Р) и МС+ДАТС (МС+ДАТС и МС+ДАТС+И/Р) групама током 3 недеље (157, 158).

ДАТС (чистоћа > 98%) је купљен од *Sigma-Aldrich Chemie GmbH Eschenstrasse 5, 82024 Taufkirchen*, Немачка. ДАТС је чуван у тамним, оригиналним бочицама, на -20°C, у складу са препорукама произвођача.



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

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

Количина воде и хране коју су пацови конзумирали током дана, мерена је једном недељно и нормализована прерачуната на основу појединачне телесне тежине пацова. Телесна тежина и глукоза у крви наште су мерене сваког понедељка ујутру, пре примене ДАТС-а (основни дан, у даљем тексту означен као 0) и током 3 недеље (означени као 7, 14 и 21), тако да је на крају студије било укупно 4 мерења. Наведене карактеристике животиња праћене су у свим групама.

3.2.4. Мерења након тронедељног третмана ДАТС-ом

3.2.4.1. *In vivo* срчана функција

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

Ехо мониторинг је изведен у свим групама, коришћењем *Hewlett-Packard Sonas 5500*, Андовер, МА, USA (Слика 2), са сондом од 15,0-MHz као што је претходно описано (159, 160). Трансторакални Ехо је спроведен у последњој седмици експерименталног протокола, након тронедељне примене ДАТС-а. Пацови су најпре анестезирани интраперитонеалном инјекцијом комбинације 50 mg/kg кетамина (100 mg/mL; *Ketaset, Fort Dodge, Fort Dodge, IA*) и 10 mg/kg ксилазина (mg/mL; *Anased, Lloyd Laboratories, Shenandoah, IA*). У дводимензионалном режиму, сонда је перпендикуларно постављена јер се на овај начин јасно уочава интервентрикуларни септум и задњи зид леве коморе на нивоу папиларних мишића. Када се нашао најадекватнији положај, направљена је слика из М-режима. На добијеној слици измерене су следеће структурне варијабле: дебљина зида интервентрикуларног септума на крају дијастоле (енгл. *interventricular septal wall thickness at end diastole, IVSd*), унутрашња димензија леве коморе на крају дијастоле (енгл. *left ventricle internal dimension at end diastole, LVIDd*), дебљина задњег зида леве коморе на крају дијастоле (енгл. *left ventricle posterior wall thickness at end diastole, LVPWd*), као и дебљина зида интервентрикуларног септума на крају систоле (енгл. *interventricular septal wall thickness at end systole, IVSs*),



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

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

In vivo срчана функција је мерена након што је протокол завршен, непосредно пред жртвовање пацова. Такође, Ехо мерења су изведена код свих животиња и пре било какве манипулације (на почетку примене ДАТС-а, СТЗ инјекције или HFd) како би били сигурни да све животиње укључене у студију имају кардиодинамске вредности у физиолошком распону.

3.2.4.2. Липидни параметри мерени у серуму пацова

Имајући у виду да је у MetC-у повећање нивоа глукозе у крви често праћено поремећајима вредности липида, у овом истраживању су такође испитивани ефекти ДАТС-а на укупни серумски холестерол, триглицериде, LDL и HDL. Стога су наведени параметри мерени на здравим (КТР и ДАТС) и пацовима са MetC-ом (MC и MC+ДАТС).

Биохемијски параметри попут TC, TG, HDL и LDL су мерени у серуму према упутствима произвођача, на програмираном биохемијском анализатору (*Dimension Xpand, Siemens, IL, USA*), као и помоћу спектрофотометријских метода и комерцијално доступних комплета (*Siemens Healthcare Diagnostics, Frimley, Camberley, Surrey, UK*).

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

Вредности глукозе мерене наше и током ОГТ теста се углавном користе за постављање дијагнозе Т2ДМ или преддијабетеса, тј. повећаног ризика за Т2ДМ. Обично се концентрације глукозе прате током 1-3 сата, док се концентрације инсулина мере наше и у последњем сату ОГТ теста (161).

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

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

3.2.4.4. Мерење крвног притиска и фреквенце срца

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

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

3.2.4.5. Биохемијско одређивање системских прооксидационих и антиоксидационих параметара

Повећан оксидациони стрес повезан је са патогенезом ДМ и МетС-а. Због тога, да би испитивали да ли тронедељна терапија ДАТС-ом утиче на системску редокс хомеостазу, у узорцима крви мерени су нивои прооксиданаса, као и капацитет антиоксидационог система заштите.

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

У узорцима плазме мерени су нивои прооксидационих параметара: индекс пероксидације липида (мерен као TBARS - реактивне супстанце тиобарбитурне киселине, енгл. *thiobarbituric acid reactive substances*), нитрити (NO_2^-), супероксид анјон радикал (O_2^-) и водоник пероксид (H_2O_2), док је у лизату еритроцита одређивана активност ензимског система одбране проценом концентрације каталазе (CAT) и супероксид дисмутазе (SOD), као и активност неензимског антиоксиданса као што је редуковани глутатион (GSH). Сви наведени биохемијски параметри су одређивани спектрофотометријски, помоћу *Shimadzu UV 1800* спектрофотометра (Јапан), у свим експерименталним групама.

3.2.4.5.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS)

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

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

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

ΔA – коначна (финална) апсорбанца

A_s – апсорбанца узорка

A_{bt} – апсорбанца слепе пробе

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

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

3.2.4.5.2. Одређивање нитрита (NO_2^-)

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

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

Да би се одредила концентрација ослобођеног NO_2^- у узорцима, конструисана је калибрациона крива тако што су познате концентрације NaNO_2 додаване у 1 ml *Krebs-Hensenleit*-овог раствора, а апсорбанца је мерена на таласној дужини од 550 nm. Стандардни фактор (F) израчунат је из следеће једначине:

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

Ова једначина је коришћена за сваки стандард (F1-F4), а коришћена је аритметичка средина добијених вредности. Затим је разлика екстинкција узорака и слепе пробе подељена са вредношћу која је добијена за стандарде:

$$nmol NO_2/ml \text{ плазма} = \Delta E (E_s - E_{bt}) / F$$

ΔE – коначна (финална) апсорбанца

E_s – апсорбанца узорка

E_{bt} – апсорбанца слепе пробе

3.2.4.5.3. Одређивање супероксид анјон радикала (O_2^-)

Квантификација супероксид анјон радикала заснива се на реакцији O_2^- са нитро тетразолијумом плавим (енгл. *nitro blue tetrazolium*) при чему настаје нитро формазон плави (енгл. *nitro formazon blue*). Концентрација супероксидног анјон радикала одређивана је у узорцима плазме на следећи начин: у 50 μl плазме, *ex tempore* је додато 950 μl есејне смеше, при чеми је апсорбанца мерена три пута на сваких 60 секунди, уз мешање, на таласној дужини од 550 nm. За слепу пробу, уместо узорка плазме, коришћена је иста количина дестиловане воде (167). Концентрација ослобођеног O_2^- добијена је на основу следећих једначина:

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

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

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

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

ΔE – коначна (финална) апсорбанца

E_s – апсорбанца узорка

E_{bt} – апсорбанца слепе пробе

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

3.2.4.5.4. Одређивање водоник пероксида (H_2O_2)

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

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

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

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

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

F је фактор апсорбанце/nmol H_2O_2

ΔA – коначна (финална) апсорбанца

A_s – апсорбанца узорка

A_{bt} – апсорбанца слепе пробе

3.2.4.5.5. Одређивање активности каталазе (CAT)

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

У нашој студији, активност каталазе је мерена у разблаженим лизираним еритроцитима у којима је удео воде био 1:7, а етанола 0,1:1 (у даљем тексту меша). Затим је у епрувету са 50 μl САТ пуфера, додато 100 μl меше и 1 ml 10 mM H_2O_2 . За слепу пробу коришћена је дестилована вода уместо узорка. Мерење је по узорку спроведено 6 узастопних пута на таласној дужини од 360 nm (170).

3.2.4.5.6. Одређивање активности супероксид дисмутазе (SOD)

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

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

3.2.4.5.7. Одређивање редукованог глутатиона (GSH)

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

За мерење активности GSH у лизату еритроцита, коришћена је спектрофотометријска метода базирана на реакцији оксидације глутатиона са 5,5-дитиобис-6,2-нитробензоевом киселином, методом према *Beutler*-у. У 50 μl лизираних

еритроцита додато је 200 μl 0,1% етилендиаминтетраацетата и 385 μl преципитационог пуфера. После 15 минута инкубације на леду и 10 минута центрифугирања на 4000 rpm, добија се екстракт. У епрувете са 300 μl екстракта додато је 750 μl натријум дифосфата и 100 μl 5,5-дителиобис-6,2-нитробензоеве киселине. Након инкубације у трајању од 10 минута, узорци су мерени на таласној дужини од 412 nm. За слепу пробу уместо узорка, коришћена је дестилована вода. Да би се одредила концентрација GSH у узорцима, конструисана је калибрациона крива помоћу четири стандарда са познатим концентрацијама глутатиона (173).

3.2.4.6. Нивои хомоцистеина у серуму (Hcy)

Укупна концентрација Hcy у серуму мерена је помоћу течне хроматографије високих перформанси (енгл. *high-performance liquid chromatography*, HPLC) са сепарацијом реверзне фазе и флуоресцентне детекције, као што је претходно описано. Укратко, у 100 μl серума додато је 30 μl натријум борохидрида и 5 μl N-октанола. Као стандард је коришћен N-ацетил-цистеин, док је уклањање протеина постигнуто са 100 μl 0,6 M перхлорне киселине (са 1 mM етилендиаминтетраацетатне киселине - ЕДТА). Затим су узорци центрифугирани на 15000 g током 10 минута да би се уклонили протеини. У супернатант је додато 10 μl NaOH и 125 μl борат-ЕДТА пуфера, а потом су узорци са дериватизационим раствором инкубирани сат времена на 60 °C у мраку. Охлађени узорци (40 μl) су убризгани у HPLC колону (мобилна фаза - 0,08 M сирћетна киселина са 2% метанола при брзини протока од 0,8 mL/мин током 12 минута). Флуоресценција је мерена на 390 nm, док је емисија мерена на 470 nm (174, 175).

3.3. *EX VIVO* ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ

Да би се детаљно испитала функција срца, коришћен је *Langendorff*-ов апарат за ретроградну перфузију срца. Све групе (КТР, ДАТС, ДМ, ДМ+ДАТС, МС и МС+ДАТС) које су праћене *in vivo* су разврстане на две подгрупе, у зависности од *ex vivo* протокола. Сходно томе у *ex vivo* протоколу који је подразумевао 90 минута ретроградне перфузије разликовале су се следеће групе: КТР, ДАТС, ДМ, ДМ+ДАТС, МС и МС+ДАТС, док су се у *ex vivo* протоколу који је подразумевао 30 минута исхемије и 60 минута ретроградне реперфузије разликовале: И/Р, ДАТС+И/Р, ДМ+И/Р, ДМ+ДАТС+И/Р, МС+И/Р и МС+ДАТС+И/Р групе. На тај начин, осим што су испитани ефекти ДАТС-а на бројне параметре *in vivo*, испитан је и потенцијал ДАТС-а и као потенцијалног прекондиционарајућег агенса.

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

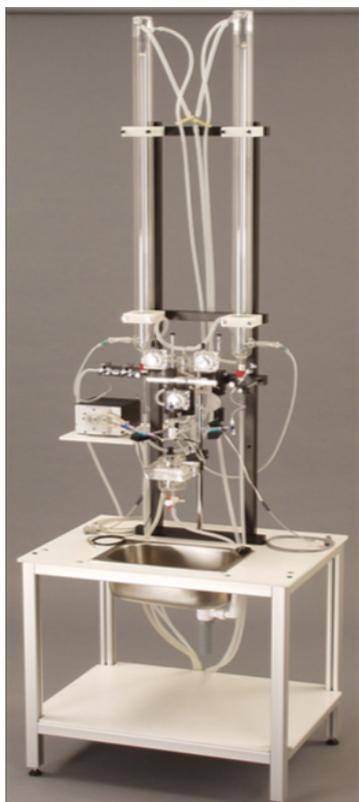
Langendorff-ова методологија перфузије срца преко аорте остала је у основи непромењена до данас. Главни принцип је ретроградна перфузија раствора кроз аорту, супротно физиолошком току. На овај начин, коронарна артеријска васкулатура се пуни преко леве и десне коронарне остије у одговарајућим синусима валсалве. Затим, перфузиони раствор пролази кроз васкуларно корито и даље кроз десну преткомору. Срце се због тога може одржавати без раствора у васкуларним коморама које остају "суве" (176).

Најважније предности *Langendorff*-ове технике су: једноставност припреме, финансијски аспект, поновљивост, способност испитивања акутних ефеката бројних супстанци, широка применљивост на различитим врстама (мишеви, пацови, зечеви, пси, свиње, па чак и људи) и могућност изазивања И/Р повреда. Са друге стране, постоје и ограничења која треба размотрити: ефекти на изолованом срцу нису у потпуности клинички релевантни, иако изоловано срце може несметано да ради током времена (неколико сати), ипак као крајњи исход имамо нефункционални препарат (фреквенца

срца и контрактилна способност се погоршавају од 5 до 10 % на сваких сат времена) (177-179).

Oscar Langendorff је описао перфузију кроз коронарно васкуларно корито под константним притиском, али данас постоји и модификована метода за перфузију кроз коронарно васкуларно корито под константним протоком. Код оба експериментална модела испитују се средње вредности променљивих параметара јер се због специфичности миокарда апсолутне вредности не могу сматрати поузданим. Појам специфичност миокарда односи се пре свега на неуједначено трајање систоле и дијастоле срца, великих варијација у срчаној фреквенци, минималних разлика у температури комплексног физиолошког раствора којим се срце перфундује и други параметри на које истраживачи не могу да утичу. Да би се избегле варијације, сви кардиодинамски параметри се прате најмање 5 минута. У овој студији, за оба протокола, изабран је модел са константним притиском (70 cm H₂O) и варијабилним коронарним протоком.

3.3.1.1. Опис Langendorff-овог апарата



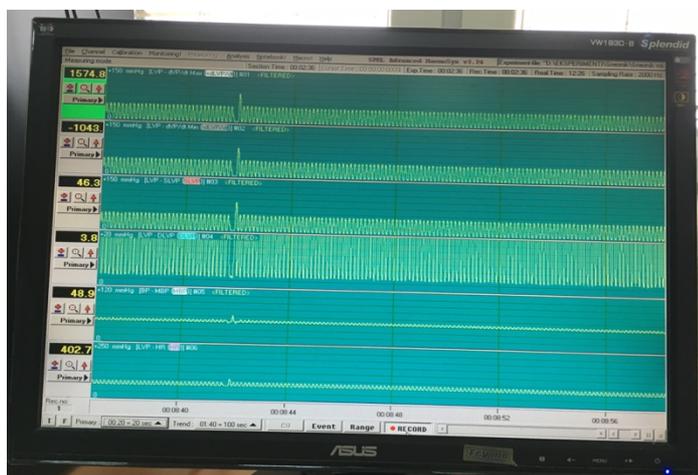
Слика 3. Langendorff-ов апарат

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

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

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

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



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

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

3.3.1.2. Изоловање и препарација срца пацова

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

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

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

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

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

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

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

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

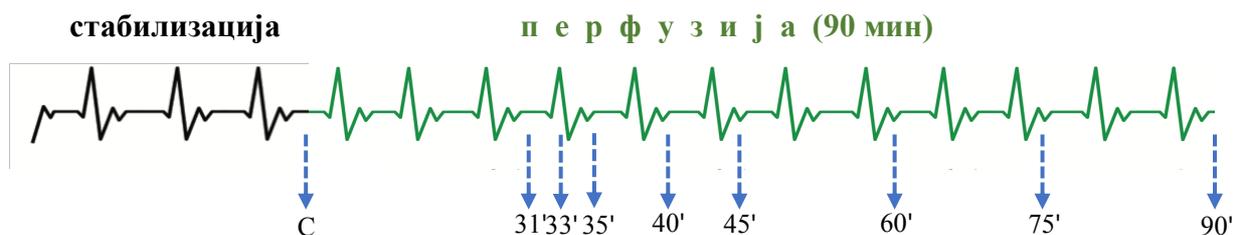


Схема 8. *Ex vivo* протокол: након периода стабилизације (C), срце је праћено 90 минута током ретроградне перфузије.

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

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

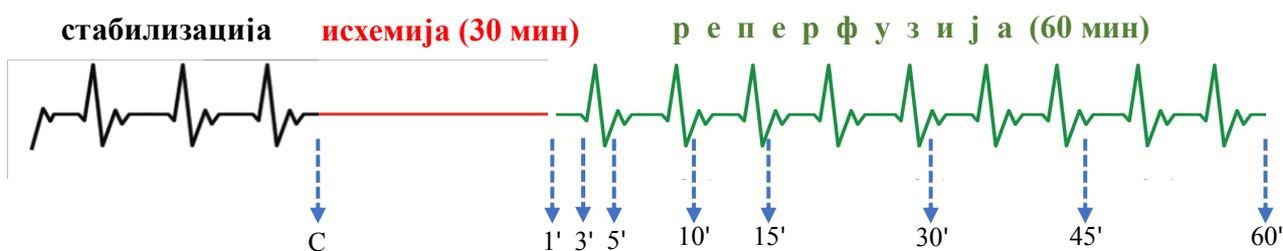


Схема 9. *Ex vivo* протокол: након периода стабилизације (C), изоловано срце је подвргнуто глобалној исхемији у трајању од 30 минута, а потом и реперфузији у трајању од 60 минута.

3.3.4. Маркери оксидационог стреса мерени у коронарном венском ефлуенту

Параметри оксидационог стреса мерени у плазми пацова, су такође мерени и у коронарном венском ефлуенту: TBARS, NO_2^- , O_2^- и H_2O_2 . Прооксидациони параметри мерени у коронарном венском ефлуенту одражавају оксидациони стрес у ендокардијуму леве коморе и коронарном ендотелу. Методологија за одређивање ових параметара у коронарном венском ефлуенту разликује се у само неколико корака, од оне која се примењује за њихово одређивање у плазми, али је принцип исти. У наредним поглављима укратко су описани протоколи за мерење прооксиданаса у ефлуенту.

3.3.4.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS)

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

3.3.4.2. Одређивање нитрита (NO_2^-)

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

3.3.4.3. Одређивање супероксид анјон радикала (O_2^-)

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

3.3.4.4. Одређивање водоник пероксида (H_2O_2)

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

3.3.5. Имунохистохемијска бојења ткива миокарда

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

Све анализе радио је специјалиста за патологију који није знао који узорак којој групи припада, чиме је максимално обезбеђена објективност и избегнут *bias*.

3.3.5.1. Бојење хематоксилин/еозином

Хематоксилин/еозин је једна од најчешће коришћених техника бојења у хистологији, посебно за дијагнозу болести. За бојење хематоксилин/еозином доступни су многобројни протоколи, а у нашем истраживању коришћен је *Mayer*-ов протокол за хематоксилин. Парафинске секције су најпре загреване на 56 °C током 45 минута, а потом ткива рехидратисана у опадајућим концентрацијама етанола. Секције су затим бојене *Mayer*-овим хематоксилином током 10 минута, а потом испиране дестилованом водом (10 минута), па текућом водом (5 минута). Након испирања, секције су бојене еозином. За дехидратацију коришћене су растуће концентрације етанола, након чега су секције ткива потопљене у смешу ксилена и апсолутног алкохола, а затим 2 пута само у ксилолу. На самом крају, секције ткива су премазане канада балзамом и прекривене покровним стаклима. После двадесетчетворочасовног сушења, препарати су анализирани под светлосним микроскопом (*Olympus*, Јапан) (181). Срчана ткива свих група су бојена овом техником.

3.3.5.2. Бојење срчаног тропонина T

Тропонин (Tn) је протеински комплекс, који се састоји од I, C и T тропонина. TnT је одговоран за везивање тропомиозина и калцијума, као и за контрактилност стријатних влакана. Разликују се три изоформе TnT: брза скелетна, спора скелетна и срчана. Срчана (сTnT) изоформа се јавља у два типа сTnT-I и сTnT-II. Заједно са сTnI, сTnT се издваја као значајни дијагностички маркер, али и као биомаркер за процену ризика за акутни коронарни синдром. У нашој студији сTnT је бојен да би се испитао степен оштећења срца након И/Р повреде.

Секције ткива су инкубиране 30 минута у 3% нормалном серуму коња (енгл. *horse normal serum*, NHS), а затим инкубиране 90-120 минута у примарном антителима (сTnT; 200 µg/ml, 1: 200, *Thermo Fisher Scientific, Kalamazoo, MI 49008*). Након уклањања примарног антителима и три испирања PBS-ом, секције су инкубиране антимишјим имуноглобулином-G у трајању од 40 минута. Потом су секције опет испиране, а онда и инкубиране 30 минута у пероксидаза ензиму (*horseradish peroxidase avidin D*). Након

испирања PBS-ом, секције су бојене DAB комплетом, а потом дехидратисане етанолом у растућим концентрацијама, очишћене ксиленом и покривене (182). Само она срца која су била подвргнута исхемији и реперфузији су била подвргнута бојењу сTnT (И/Р, ДАТС+И/Р, ДМ+И/Р, ДМ+ДАТС+И/Р, МС+И/Р и МС+ДАТС+И/Р).

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

Супероксид дисмутаза Cu-Zn позната као SOD-1 је ензим кодиран SOD-1 геном, који се налази на 21. хромозому. Везује Cu и Zn и убраја се у једну од три супероксид дисмутазе која учествује у уклањању слободних радикала у телу. Претпоставља се да се SOD-1 налази на мембрани митохондрија и његови агрегати на мембрани су повезани са Bcl-2. SOD-1 поседује значајна антиапоптотска својства, а подаци из литературе указују да SOD инхибира апоптозу тако што интерагује са Bcl-2 протеинима или са самим митохондријама (184).

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

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

Ендотелна азот монооксид синтаза (eNOS) - NO је ендогени вазодилататорни гас који регулише пречник крвних судова и спречава пролиферацију и апоптозу у зиду крвних судова. У недавним студијама показано је да инсулин активира eNOS фосфорилацију и повећава продукцију NO у ткиву које је било изложено И/Р повреди (187).

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

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

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

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

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

Антиинфламацијски цитокин **IL-10** је пронађен у плазми пацијената са И/Р повредом срца, где највероватније инхибира TNF-α и NO чиме остварује протективне ефекте. Такође, постоје и претпоставке да се IL-10 може користити у терапији различитих форми И/Р повреда. Иако се наслућује да **IL-13** има улогу у И/Р повреди, још увек се не може са сигурношћу рећи да ли промовише протективне, или пак штетне ефекте (195, 196).

Због свега наведеног, у овој студији испитивани су ефекти ДАТС-а на све наведене молекуле.

3.3.6.1. Квантитативна полимеразна ланчана реакција у реалном времену (qPCR)

Укупна РНК из леве коморе ткива миокарда је изолована помоћу TRIzol реагенса (*Invitrogen, Carlsbad, CA*) према упутствима произвођача. Затим је извршена реверзна транскрипција РНК (μg) помоћу комплета за cDNA (*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City, California, USA*). Квантитативна полимеразна ланчана реакција у реалном времену (енгл. *real-time quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) је изведена помоћу *Thermo Scientific Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)* и мРНК специфичних прајмера за:

- маркере оксидационог стреса: SOD-1, SOD-2 и eNOS;
- (анти)апоптотске маркере: Вах, Bcl-2, каспазе-3 и каспазе-9;
- (анти)инфламацијске маркере: NF κ B, TNF α , IL-6, IL-10, IL-13 и IL-17A.

β -актин је коришћен као *housekeeping gene (Invitrogen, Carlsbad, CA)* (**Табела 1**). PCR је рађен у *Mastercycler ep realplex (Eppendorf, Hamburg, Germany)*. Подаци су анализирани и релативна експресија гена је прерачуната према *Livak-у* и *Schmittgen-у* (197).

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

Табела 1. Прајмери коришћени у qPCR анализи

	Леви прајмер	Десни прајмер
β-актин	GATCAGCAAGCAGGAGTACGAT	GTAACAGTCCGCTAGAAGCAT
SOD-1	TGAAGAGAGGCATGTTGGAGAC	CACACGATCTTCAATGGACACA
SOD-2	AATCAACAGACCCCAAGCTAGGC	CACAATGTCACTCCTCTCCGAA
eNOS	GAGGGAGTCAGCCTAAATCCTG	ATCAAAGCATAACGAAGAGGGCA
Bcl-2	GCAAAGCACATCCAATAAAAGCG	GTACTTCATCACGATCTCCCGG
Bax	GCTACAGGGTTTCATCCAGGAT	ATGTTGTTGTCCAGTTCATCGC
каспаза-3	GGAAGATCACAGCAAAAAGGAGC	GCAGTAGTCGCCTCTGAAGAAA
каспаза-9	TGTA CTCCAGGGAAGATCGAGA	CGTTGTTGATGATGAGGCAGTG
NF-κB	GTTTGGTTTGAGACATCCCTGC	CTGTCTTATGGCTGAGGTCTGG
TNF-α	GAAAGCATGATCCGAGATGTGG	CAGGAATGAGAAGAGGCTGAGG
IL-6	GATACCACCCACAACAGACCAG	GTGCATCATCGCTGTTCATACA
IL-10	CTTACTGGCTGGAGTGAAGACC	CTGGGAAGTGGGTGCAGTTATT
IL-13	GCAAGTGTCTGAAGCAGCTATG	TCTGTCAGCCTCAAAGAACAGG
IL-17A	GCAAGAGATCCTGGTCCTGAAG	AGGTCTCTGTTTAGGACGCATG

3.4. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА

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

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

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

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

IV

РЕЗУЛТАТИ

4. РЕЗУЛТАТИ

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

4.1. ЕФЕКТИ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА ЗДРАВЕ ПАЦОВЕ

4.1.1. Карактеристике пацова праћене током хроничног протокола

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

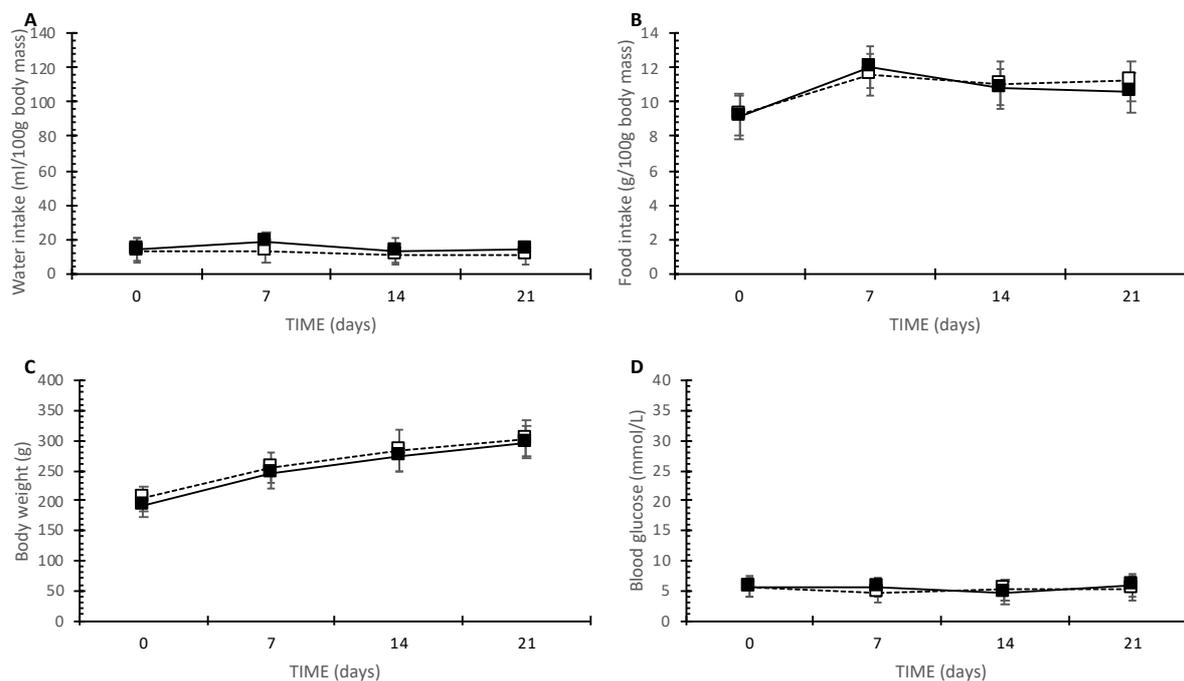


График 1. Ефекти третмана ДАТС-ом на (А) конзумацију воде, (Б) конзумацију хране, (В) телесну тежину и (Г) гликемију наше током тронедељног третмана ДАТС-ом код здравих, нетретираних пацова - КТР (---□---) и здравих, третираних пацова – ДАТС (—■—). 0 – непосредно пре третмана ДАТС-ом; 7 – након 7 дана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

Процент добијен прерачунавањем односа тежине срца и телесне тежине био је сличан у обе испитиване групе здравих пацова (**График 2**).

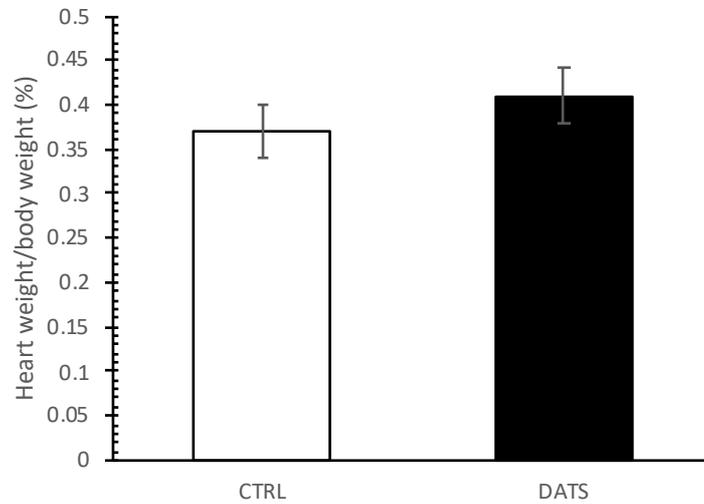
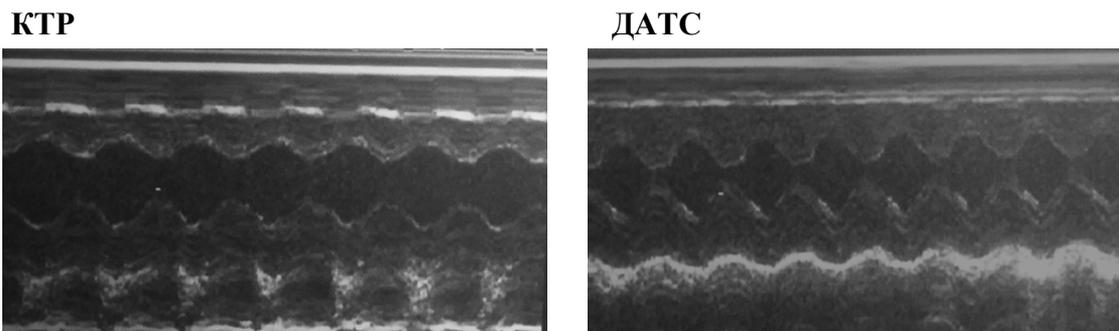


График 2. Ефекти третмана ДАТС-ом на однос тежине срца и телесне тежине пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm СД, $n = 12$, по групи.

4.1.2. Функција миокарда праћена *in vivo*

Тронедељни ДАТС третман је побољшао IVSd и FS код здравих пацова, али није утицао на остале кардиодинамске параметре мерене *in vivo* ехокардиографијом (Слика 5 и Табела 2).



Слика 5. Репрезентативна фотографија ехокардиографије миокарда из М-режима у КТР и ДАТС групама.

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

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

4.1.3. Липидни параметри мерени након хроничног третмана ДАТС-ом

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

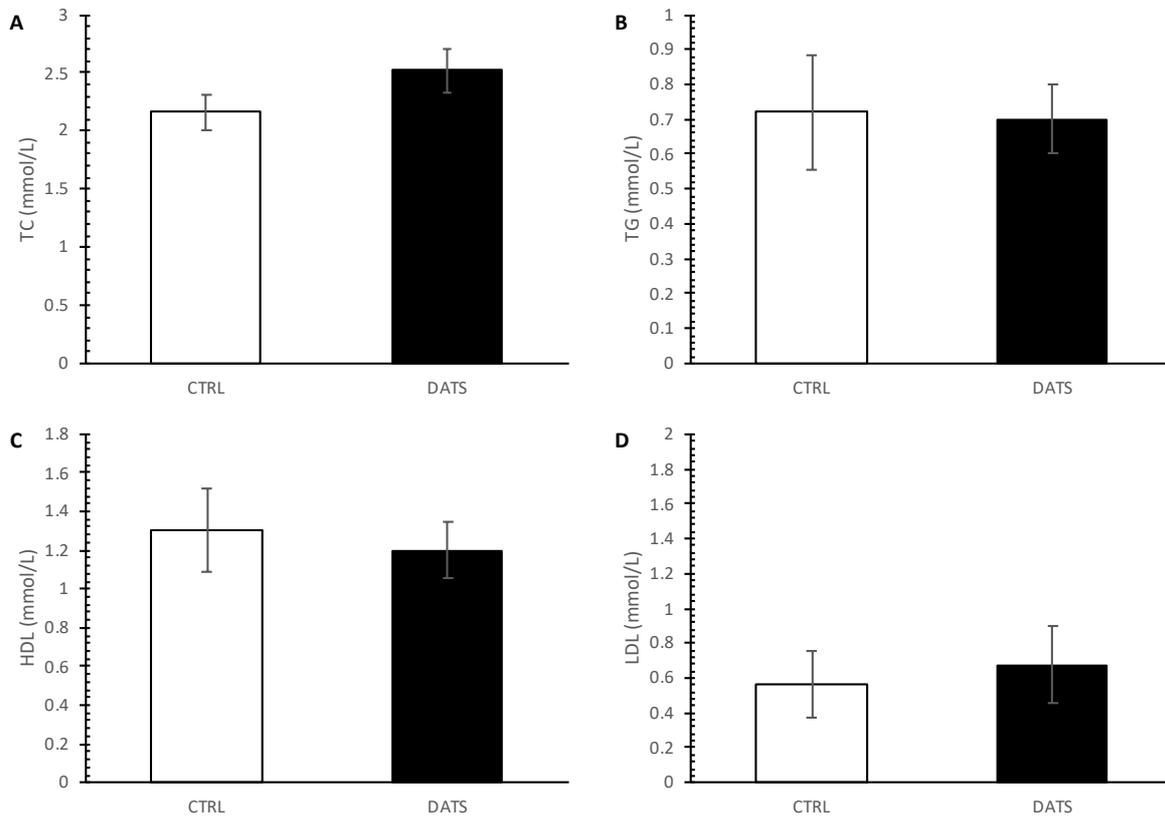


График 3. Ефекти третмана ДАТС-ом на липидне параметре у КТР и ДАТС групама. (А) укупни холестерол – TC, (Б) триглицериди – TG, (В) липопротеин високе густине – HDL и (Г) липопротеин ниске густине – LDL. Вредности су приказане као средња вредност \pm СД, $n = 12$, по групи.

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

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

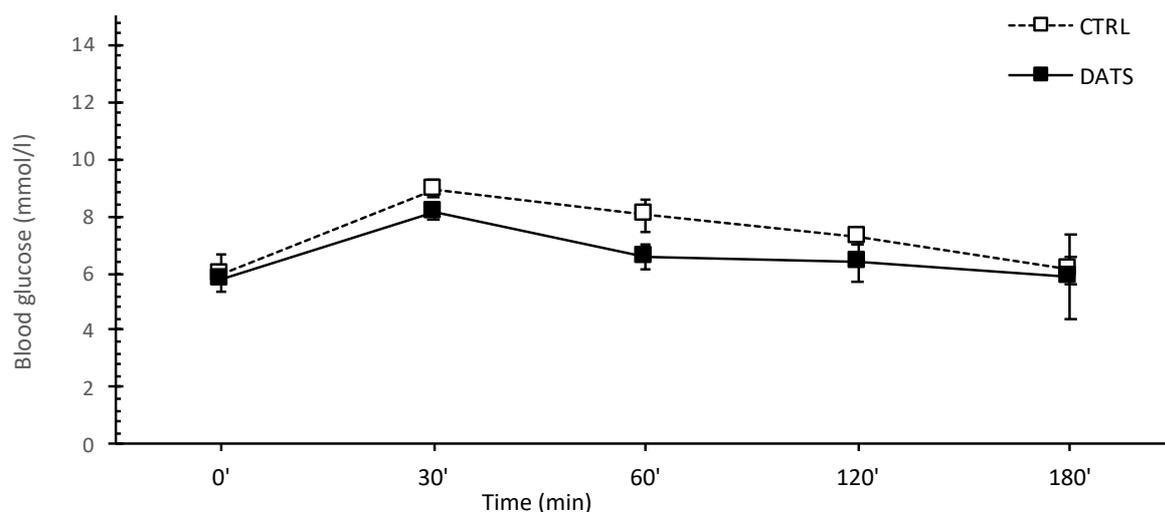


График 4. Ефекти ДАТС третмана код здравих пацова на нивое глукозе током ОГТ теста. Гликемија наште (означена као 0'), инивои глукозе у 30', 60', 120' и 180' након администрације глукозе у дози од 2 g/kg телесне тежине. Вредности су приказане као средња вредност \pm СД, n = 6, по групи.

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

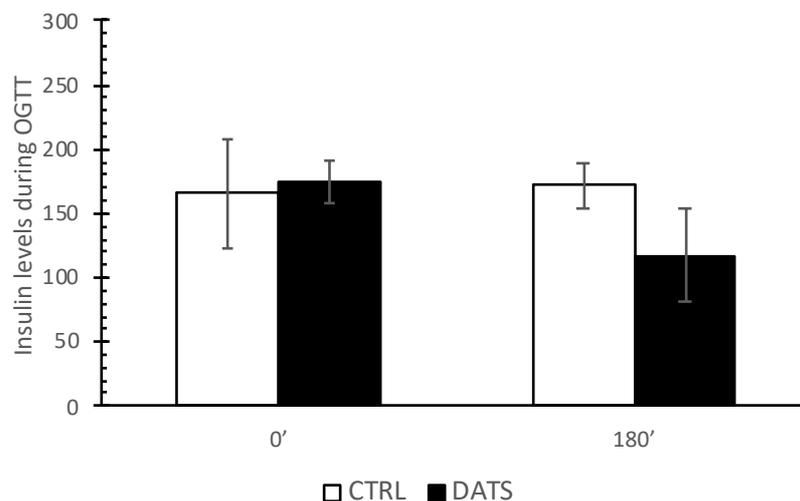


График 5. Ефекти ДАТС третмана код здравих пацова на нивое инсулина непосредно пре (0') и 180' након администрације глукозе у дози од 2 g/kg телесне тежине. Вредности су приказане као средња вредност \pm СД, n = 12, по групи.

4.1.5. Крвни притисак и срчана фреквенца

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

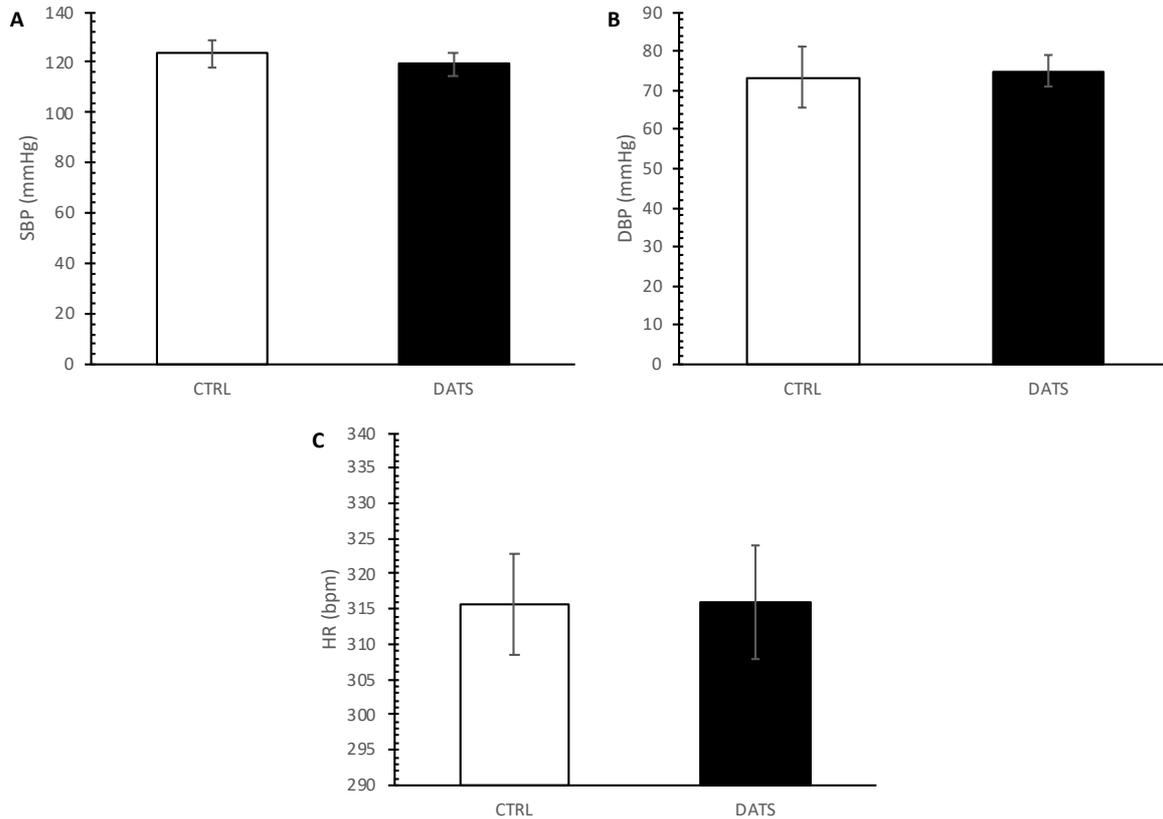


График 6. Ефекти ДАТС третмана код здравих пацова на (А) систолни крвни притисак – СКП, (Б) дијастолни крвни притисак – ДКП и (В) срчану фреквенцу – HR. Вредности су приказане као средња вредност \pm СД, $n = 6$, по групи.

4.1.6. Нивои прооксидационих и антиоксидационих параметара мерени у системској циркулацији

Нивои TBARS-а и O_2^- били су значајно снижени код здравих пацова третираних ДАТС-ом у односу на нетретиране здраве пацове. Са друге стране, ниво NO_2^- био је значајно виши у ДАТС, у односу на КТР групу (График 7).

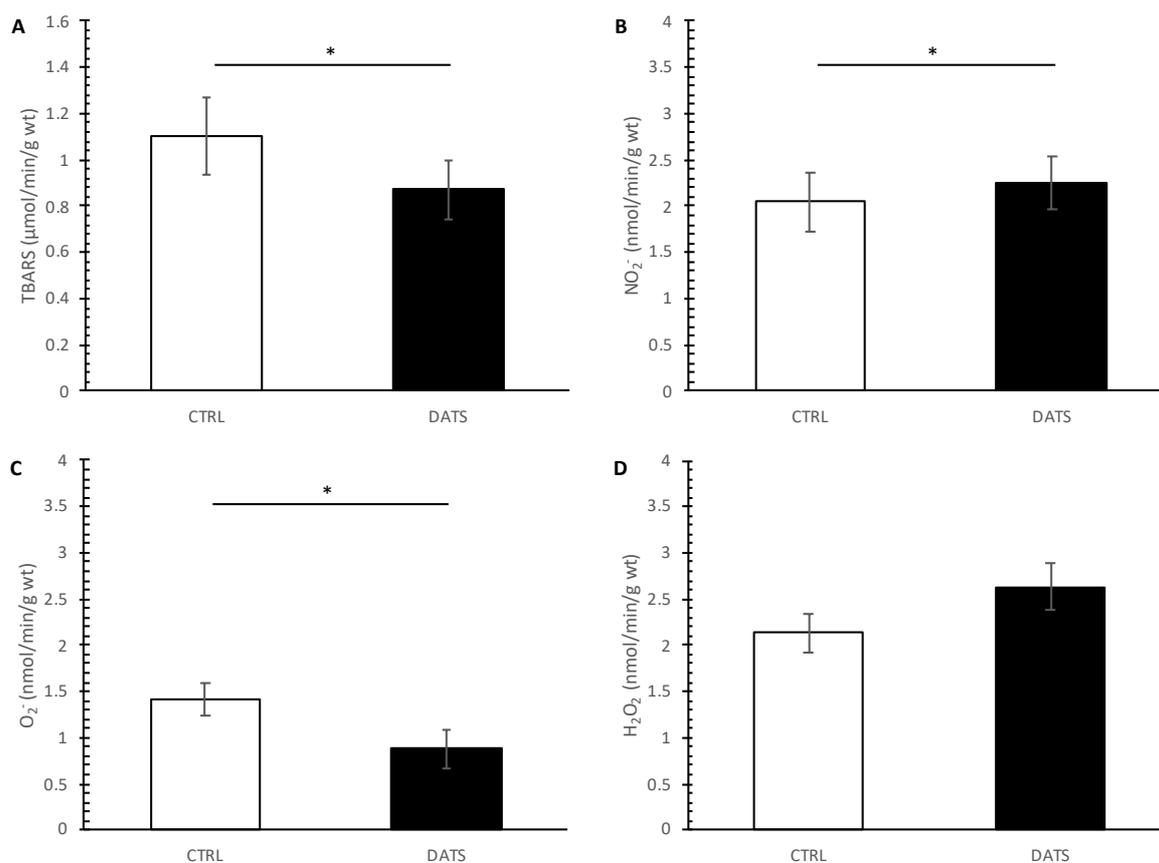


График 7. Ефекти ДАТС третмана код здравих пацова на (А) индекс липидне пероксидације – мерен као TBARS, (Б) нитрити – NO_2^- , (В) супероксид анјон радикал – O_2^- и (Г) водоник пероксид – H_2O_2 . Вредности су приказане као средња вредност \pm СД, n =12, по групи. * P<0,05 ДАТС vs. КТР.

Сви мерени антиоксидациони параметри (CAT, SOD и GSH) били су статистички већи код здравих пацова третираних ДАТС-ом у односу на нетретиране здраве пацове (График 8).

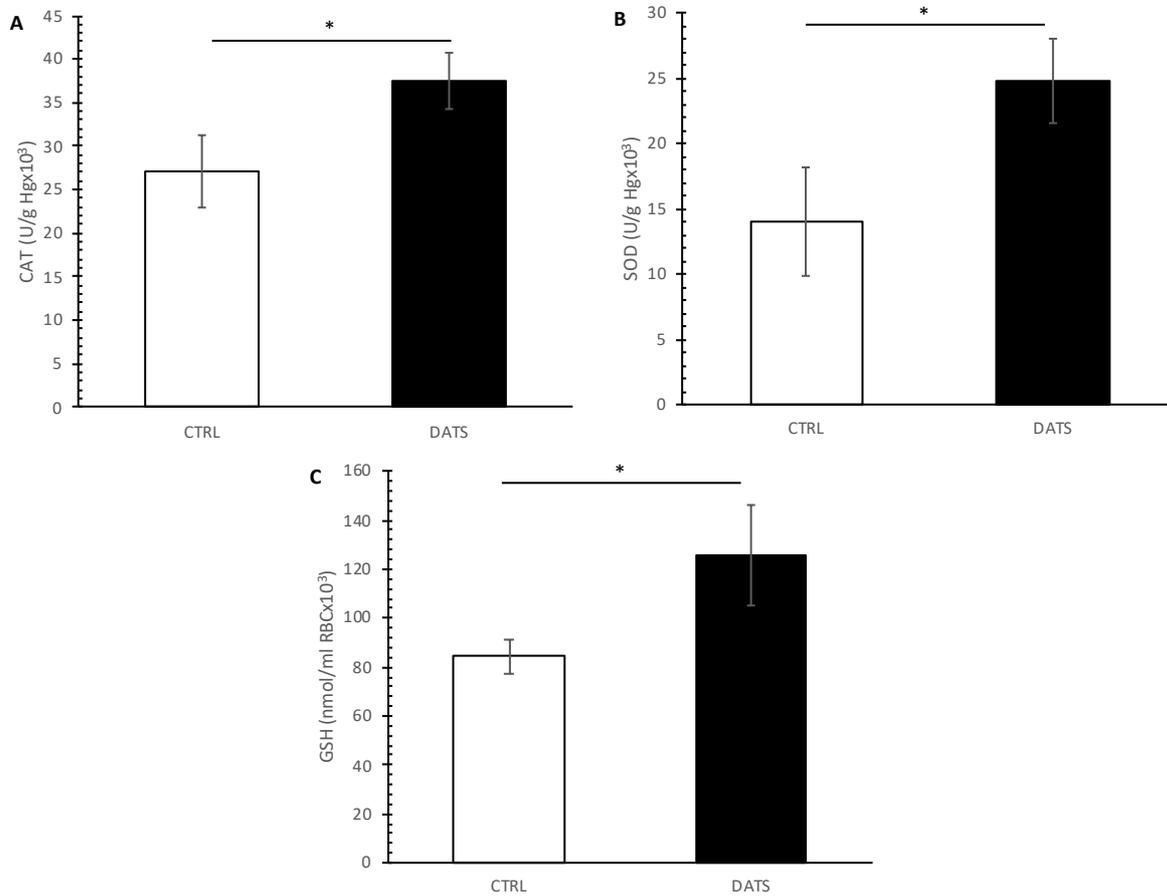


График 8. Ефекти ДАТС третмана код здравих пацова на активност (А) каталазе – CAT, (Б) супероксид дисмутазе – SOD и (В) редукованог глутатиона – GSH. Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n =12, по групи. * P<0,05 ДАТС vs. КТР.

4.1.7. Нивои хомоцистеина

Ниво хомоцистеина у серуму био је сличан код обе групе здравих пацова (КТР и ДАТС) (График 9).

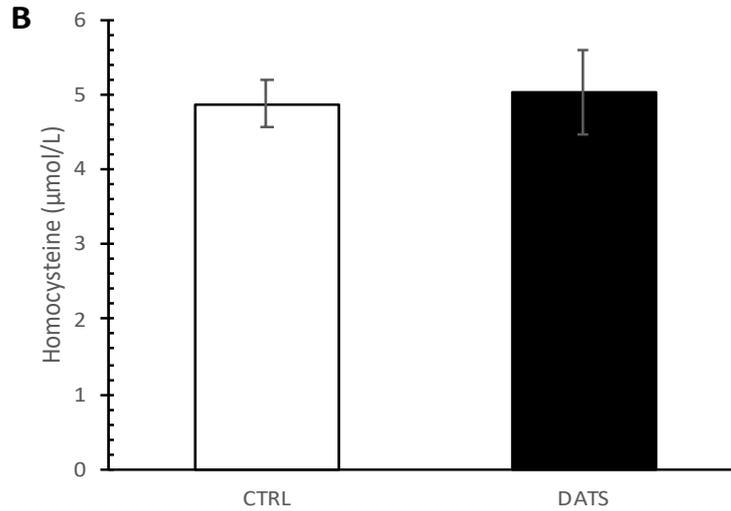


График 9. Ефекти ДАТС третмана код здравих пацова на нивое хомоцистеина у серуму – Нсу. Вредности су приказане као средња вредност \pm СД, $n=12$, по групи. * $P<0,05$ ДАТС vs. КТР.

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

4.1.8.1. Кардиодинамски параметри

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

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

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

Разлике између *ex vivo* праћених кардиодинамских параметара код нетретираних и третираних здравих пацова приказане су на **Графику 10**. Брзине развоја притиска у комори ($dp/dt \max$ и $dp/dt \min$) као и CF били су значајно побољшани у ДАТС групи у односу на КТР групу у периоду стабилизације (С).

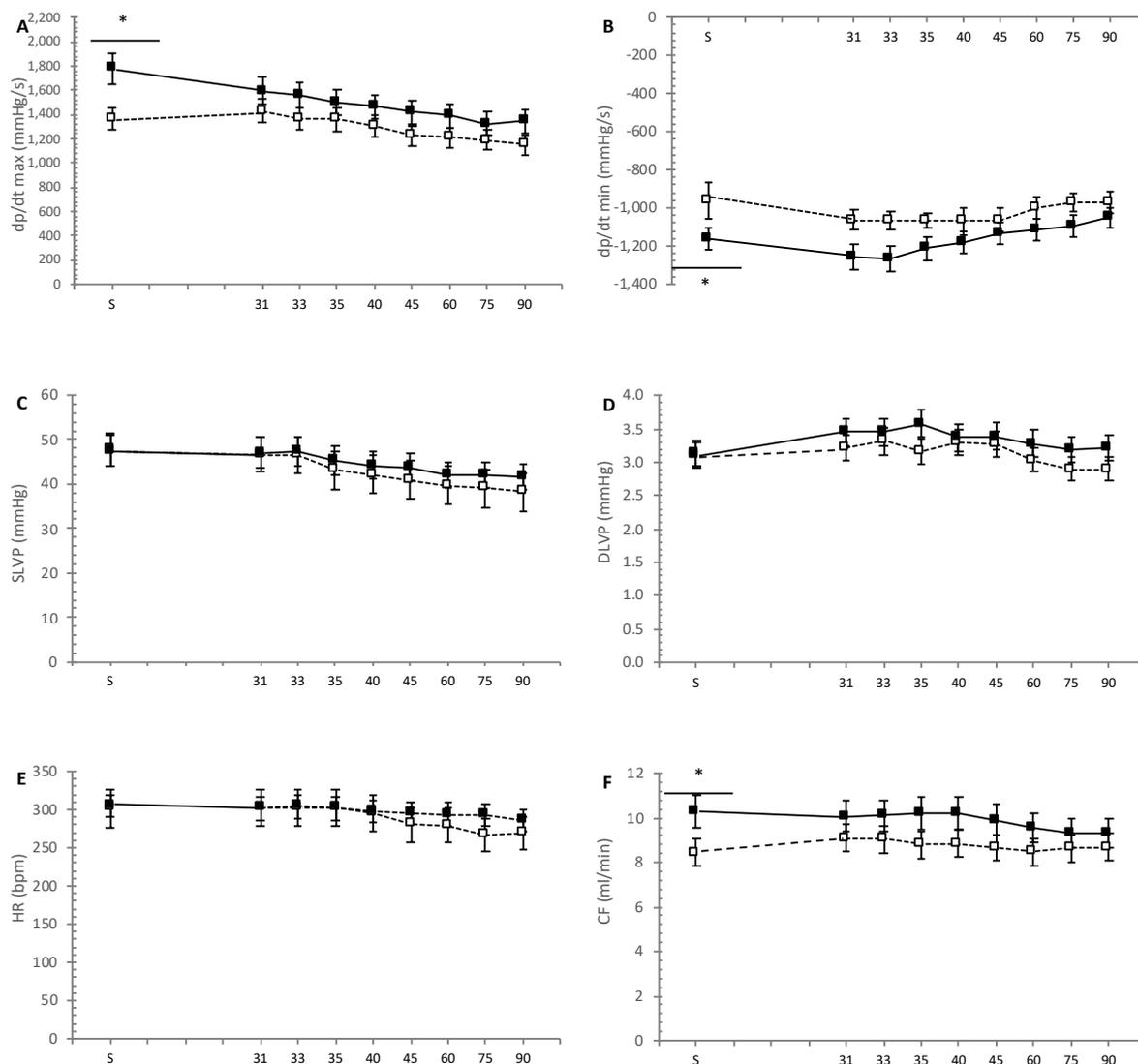


График 10. Ефекти третмана ДАТС-ом на (А) максималну стопу развоја притиска у левој комори – $dp/dt \max$, (Б) минималну стопу развоја притиска у левој комори – $dp/dt \min$, (В) систолни притисак у левој комори – SLVP, (Г) дијастолни притисак у левој комори – DLVP, (Д) фреквенцу срца – HR и (Ђ) коронарни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

4.1.8.2. Прооксидациони маркери мерени у коронарном венском ефлуенту

Током периода перфузије нивои TBARS-а и NO_2^- су се значајно повећали у КТР групи (TBARS - C vs. 31 и C vs. 90, као и NO_2^- - C vs. 31). С друге стране, у ДАТС групи нису уочене значајне разлике у нивоима измерених параметара током периода *ex vivo* перфузије (Табела 4).

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

		TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO_2^- (nmol/ml)	O_2^- (nmol/ml)	H_2O_2 (nmol/ml)
КТР	S	11,39 \pm 2,14	76,49 \pm 8,36	31,14 \pm 5,58	34,47 \pm 4,15
	31	15,50 \pm 1,04 ^a	98,44 \pm 3,95 ^a	40,34 \pm 5,01	31,09 \pm 3,86
	90	19,57 \pm 2,45 ^b	89,14 \pm 10,60	33,59 \pm 7,04	26,25 \pm 5,08
ДАТС	S	12,45 \pm 1,71	104,54 \pm 10,34	18,08 \pm 4,59	18,79 \pm 3,98
	31	13,39 \pm 1,27	109,26 \pm 7,82	19,44 \pm 4,40	24,22 \pm 3,63
	90	15,69 \pm 2,57	115,22 \pm 20,88	16,34 \pm 11,12	19,93 \pm 3,68

Разлике у концентрацијама измерених параметара оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту код здравих нетретираних (КТР) и здравих третираних (ДАТС) пацова приказане су на **Графику 11**. Знатно већи ниво NO_2^- (у С тачки) и мање вредности O_2^- (у тачкама С, 31 и 90) и H_2O_2 (у тачкама С и 31) уочене су у ДАТС групи у поређењу са КТР групом.

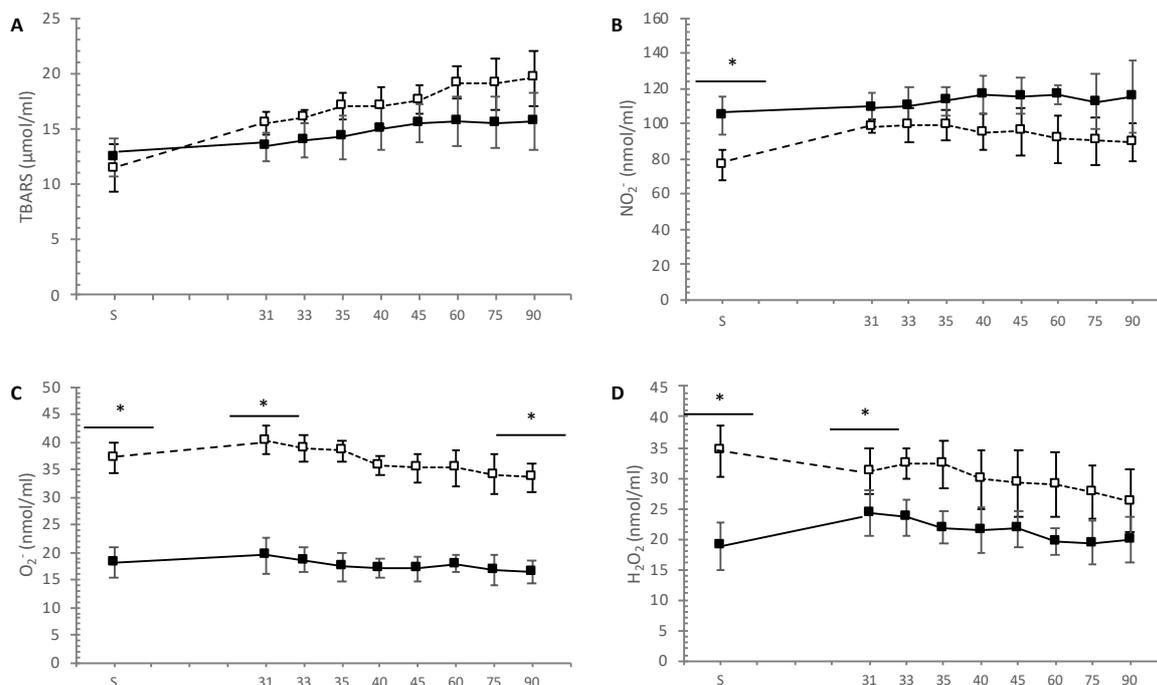
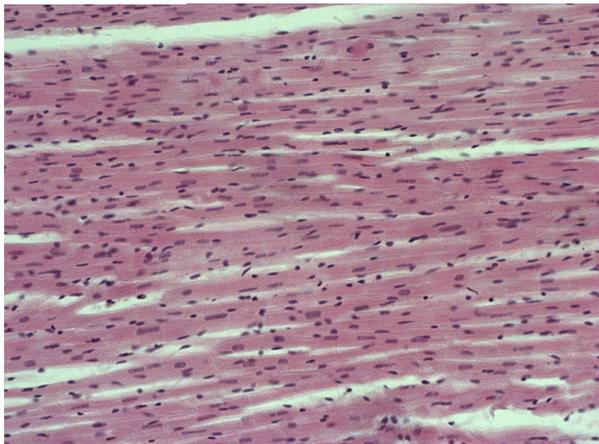


График 11. Ефекти третмана ДАТС-ом на (А) индекс липидне пероксидације – мерен као ТВАРС, (Б) нитрити – NO_2^- , (В) супероксид анјон радикал – O_2^- и (Г) водоник пероксид – H_2O_2 . КТР - здрави, нетретирани пацови (---□---) и ДАТС - здрави, третирани пацови (—■—). Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n = 6, по групи. * P<0,05 vs. КТР.

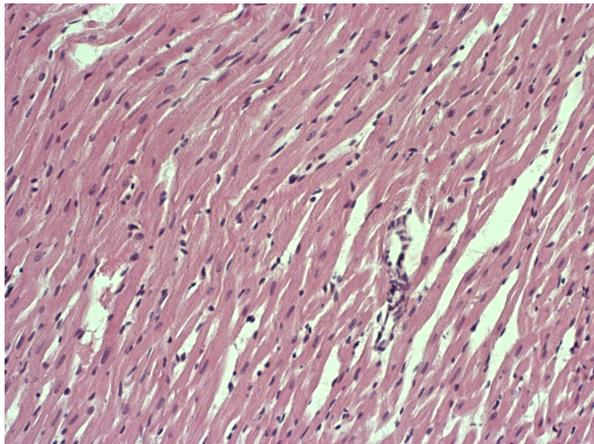
4.1.8.3. Бојење срчаног ткива хематоксилин/еозином

Као што је приказано на **Слици 6**, код обе групе здравих пацова, КТР и ДАТС, срчано ткиво било је уобичајених особина (срчане структуре су сачуване, миофибрили су симетрични, добро организовани са Z линијама у саркомерама).

КТР



ДАТС



Слика 6. Репрезентативни приказ обојеног ткива миокарда хематоксилин/еозин техником, срца која су претходно била подвргнута деведесетоминутној ретроградној перфузији (КТР – здрави, нетретирани пацови и ДАТС – здрави, третирани пацови), увећање 200 х; скала 2 mm.

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

4.1.9.1. Кардиодинамски параметри

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

Табела 5. Кардиодинамски параметри праћени током *ex vivo* индуковане И/Р повреде изолованог срца здравих пацова (здрави, нетретирани пацови – И/Р и здрави третирани пацови – ДАТС+И/Р). Стабилизација – C; 1. минут реперфузије – 1 и 60. минут 1. минут реперфузије – 60. Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n = 6, по групи. ^aP<0,05 C vs. 31; ^bP<0,05 C vs. 90; ^cP<0,05 31 vs. 90.

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

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

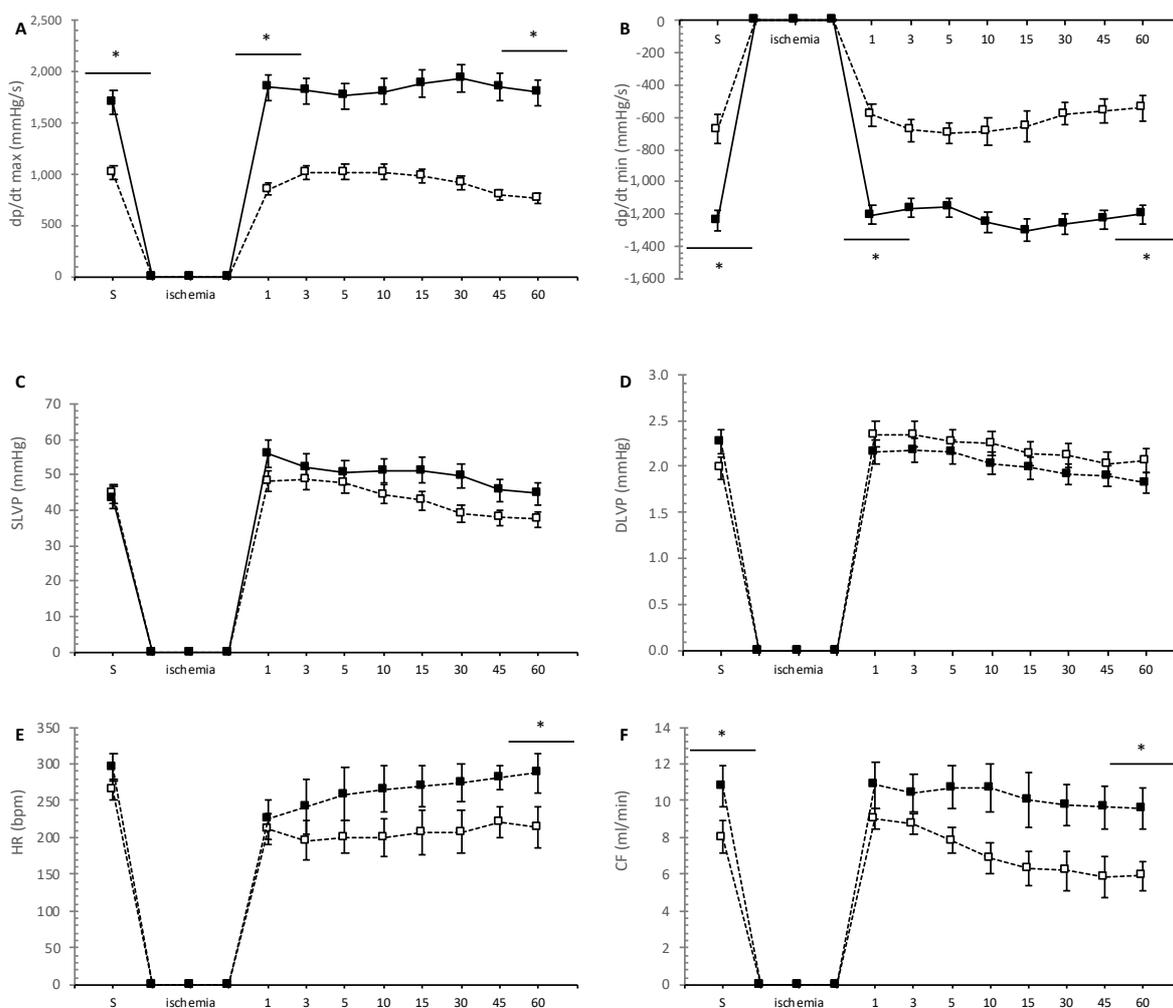


График 12. Ефекти третмана ДАТС-ом на *ex vivo* индуковану И/Р повреду миокарда здравих пацова (А) максимална стопа развоја притиска у левој комори – dp/dt max, (Б) минимална стопа развоја притиска у левој комори – dp/dt min, (В) систолни притисак у левој комори – SLVP, (Г) дијастолни притисак у левој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

4.1.9.2. Прооксидациони параметри мерени у коронарном венском ефлуенту

Нивои TBARS-а (C vs. 1, C vs. 60 и 1 vs. 60) и NO_2^- (S vs. 60 и 1 vs. 60) су се значајно променили у коронарном венском ефлуенту И/Р групе, у периоду реперфузије. С друге стране, O_2^- је значајно повећан у 1. и поново смањен у последњем минуту периода реперфузије (Табела 6).

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

		TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO_2^- (nmol/ml)	O_2^- (nmol/ml)	H_2O_2 (nmol/ml)
И/Р	S	11,71 \pm 2,23	72,89 \pm 7,87	34,57 \pm 6,40	43,07 \pm 8,37
	1	23,68 \pm 2,13 ^a	85,71 \pm 10,51	36,47 \pm 1,34	40,86 \pm 4,68
	60	16,22 \pm 2,24 ^{bc}	50,93 \pm 12,33 ^{bc}	27,12 \pm 4,13	35,23 \pm 8,12
ДАТС+ И/Р	S	17,40 \pm 3,14	134,82 \pm 21,2	15,98 \pm 2,35	27,33 \pm 4,52
	1	17,68 \pm 2,65	120,66 \pm 5,58	21,73 \pm 3,75 ^a	32,84 \pm 3,72
	60	17,53 \pm 0,91	111,29 \pm 20,35	15,97 \pm 1,25 ^c	23,68 \pm 5,40

Ниво ТВАРС-а значајно је повећан у тачки стабилизације и значајно смањен у 1. минути реперфузије у ДАТС+И/Р у поређењу са И/Р групом. С друге стране, нивои NO_2^- били су значајно повећани, док су нивои O_2^- и H_2O_2 били значајно смањени, током *ex vivo* протокола у ДАТС+И/Р у односу на И/Р групу (График 13).

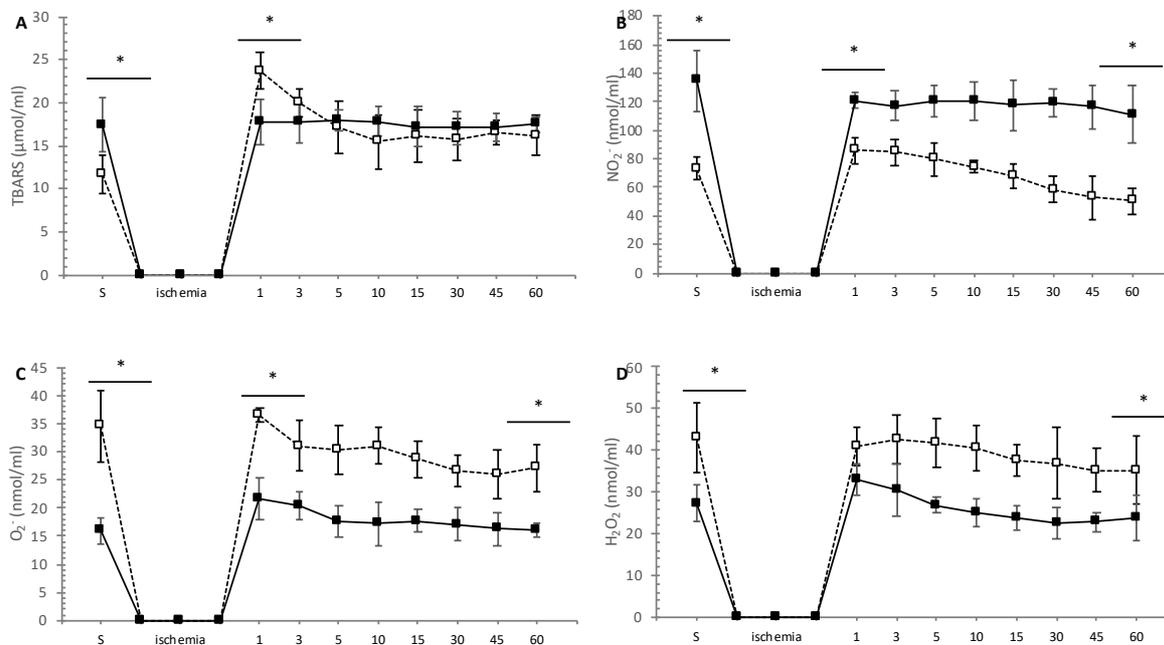
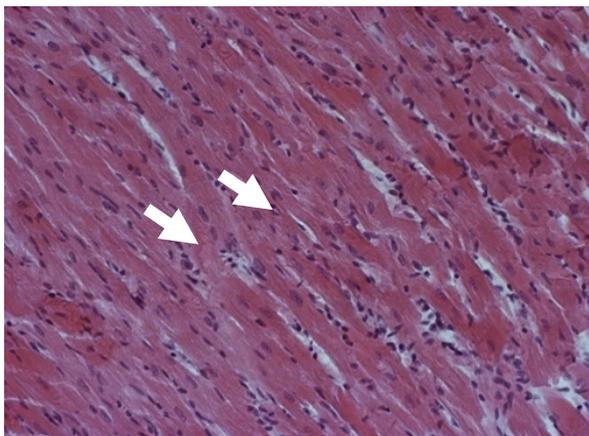
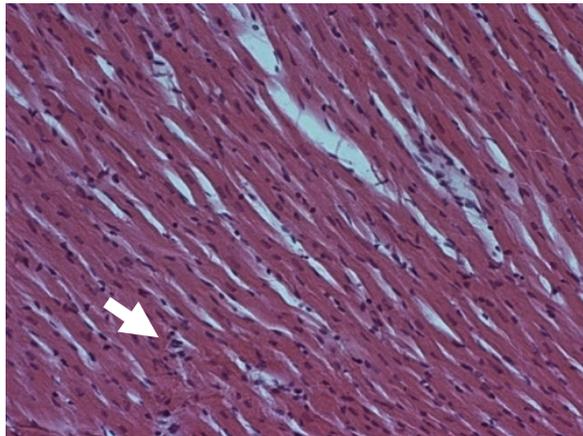


График 13. Ефекти третмана ДАТС-ом на *ex vivo* индуковану И/Р повреду миокарда здравих пацова (А) индекс липидне пероксидације – мерен као ТВАРС, (Б) нитрити – NO_2^- , (В) супероксид ањон радикал – O_2^- и (Г) водоник пероксид – H_2O_2 . И/Р - здрави, нетретирани пацови (---□---) и ДАТС+И/Р - здрави, третирани пацови (—■—). Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n = 6, по групи. * P<0,05 ДАТС+И/Р vs. И/Р.

4.1.9.3. Бојење срчаног ткива хематоксилин/еозином

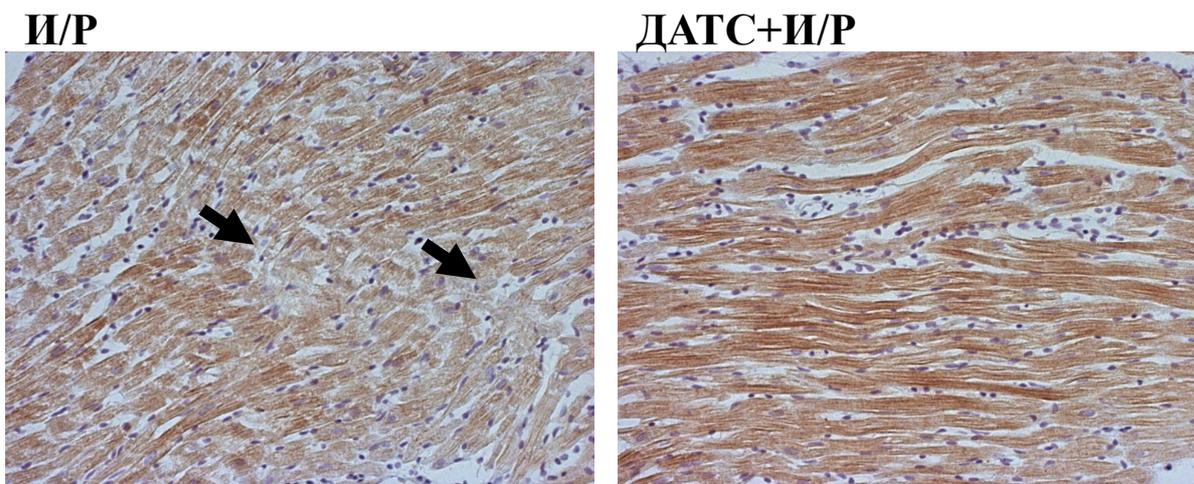
Као што је приказано на **Слици 7** у И/Р групи јасно се могу уочити неправилно распоређена мишићна влакна, интерстицијални едем и оштећене мишићне мембране. Иако су све ове хистопатолошке промене такође присутне и у ДАТС+И/Р групи, може се приметити да је њихов степен значајно нижи.

И/Р**ДАТС+И/Р**

Слика 7. Репрезентативни приказ обојеног ткива миокарда хематоксилин/еозин техником, срца која су претходно била подвргнута И/Р повреди (И/Р – здрави, нетретирани пацови и ДАТС+И/Р – здрави, третирани пацови), увећање 200 х; скала 2 mm.

4.1.9.4. Бојење тропонина Т у ткиву миокарда

Као што је приказано на **Слици 8** у И/Р групи се може приметити да је ткиво позитивно (браон) обојено, али да постоје површине где се уочава губитак браон боје, док је у ДАТС+И/Р групи губитак браон боје сведен на минимум.



Слика 8. Репрезентативни приказ обојеног сТпТ у ткиву срца пацова која су претходно била подвргнута *ex vivo* изазваној И/Р повреди (И/Р – здрави, нетретирани пацови и ДАТС+И/Р – здрави, третирани пацови), увећање 200 x; скала 2 mm.

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

Релативна експресија SOD-2 и eNOS гена била је значајно повећана у ДАТС+И/Р групи у поређењу са И/Р групом, док је релативна експресија SOD-1 гена била скоро слична у обе испитиване групе (График 14).

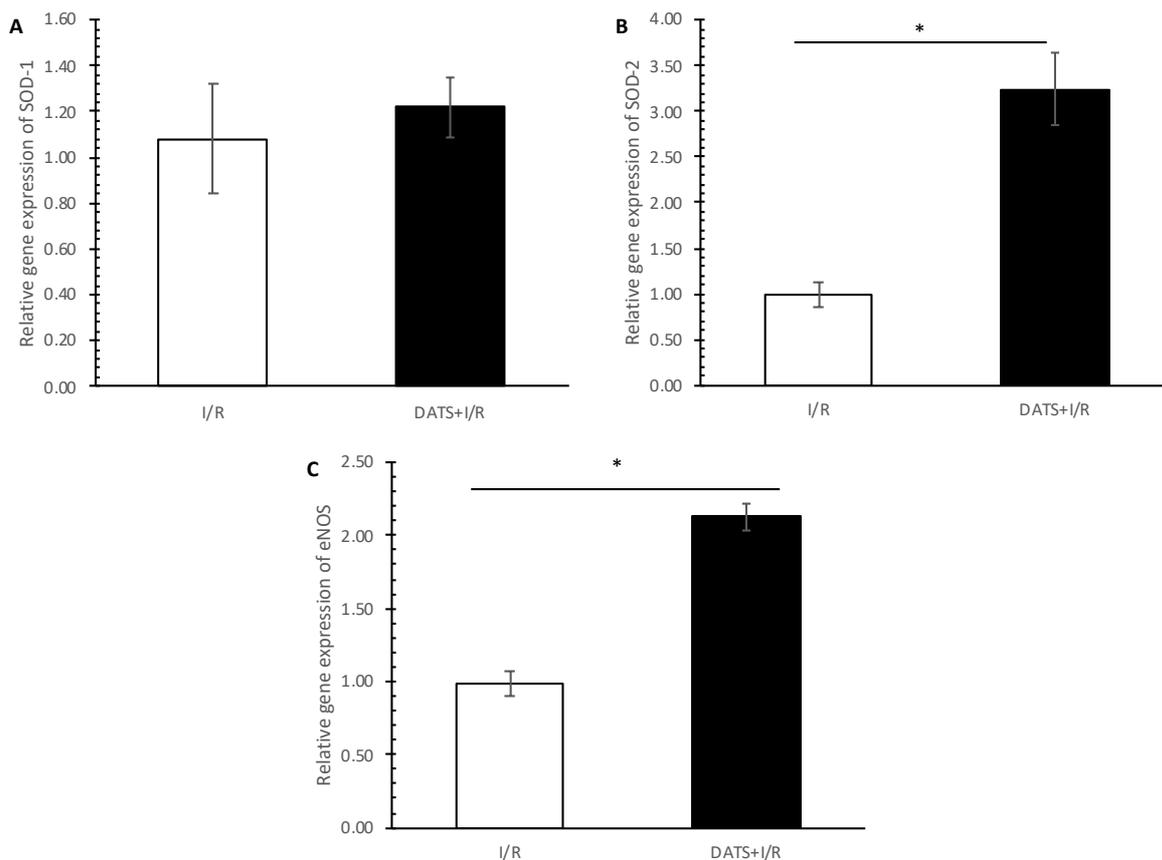


График 14. Ефекти ДАТС третмана на релативну експресију антиоксидационих гена (А) супероксид дисумтаза 1 – SOD-1, (Б) супероксид дисумтаза 2 – SOD-2, (В) ендотелна азот моноксид синтаза – eNOS, у левој комори здравих пацова након *ex vivo* изазване И/Р повреде. И/Р - здрави, нетретирани пацови и ДАТС+И/Р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

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

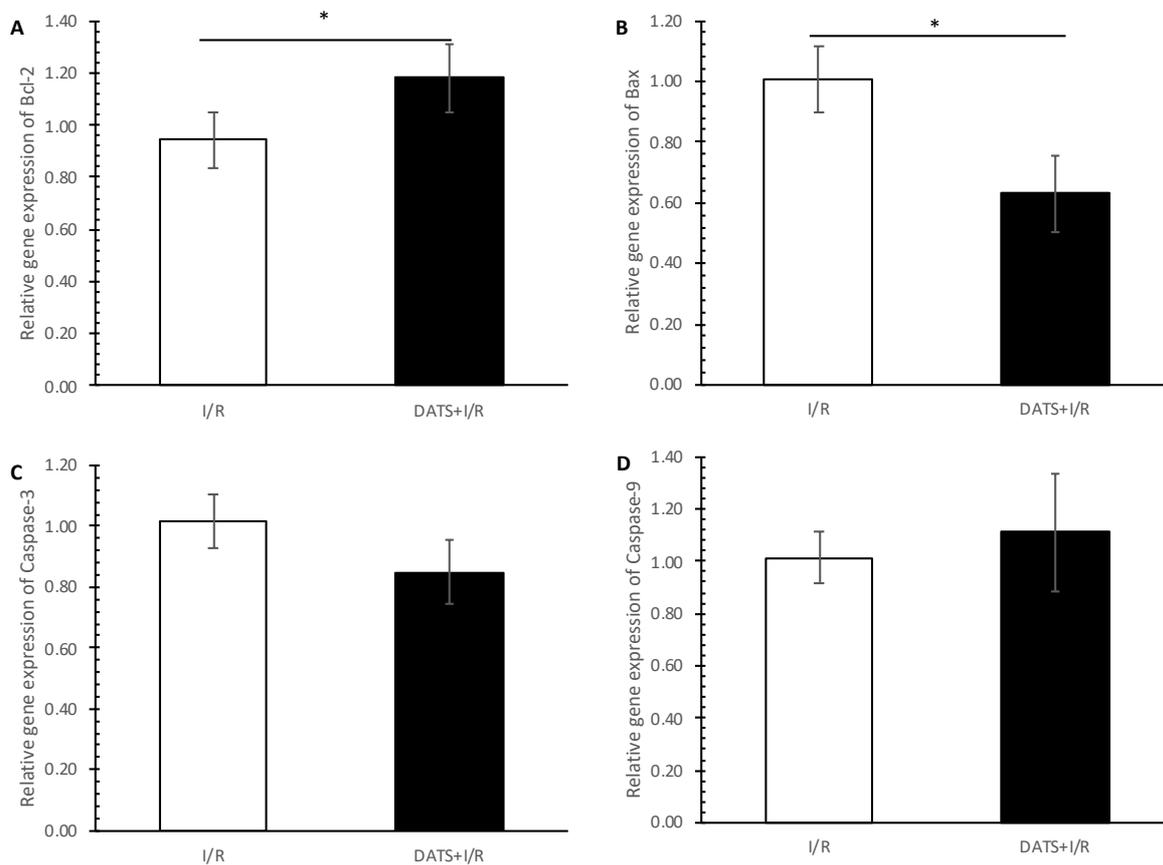


График 15. Ефекти ДАТС третмана на релативну експресију (анти)апоптотских гена (А) Bcl-2, (Б) Вах, (В) каспаза-3 и (Г) каспаза-9, у левој комори здравих пацова након *ex vivo* изазване И/Р повреде. И/Р - здрави, нетретирани пацови и ДАТС+И/Р - здрави, третирани пацови. Вредности су приказане као средња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

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

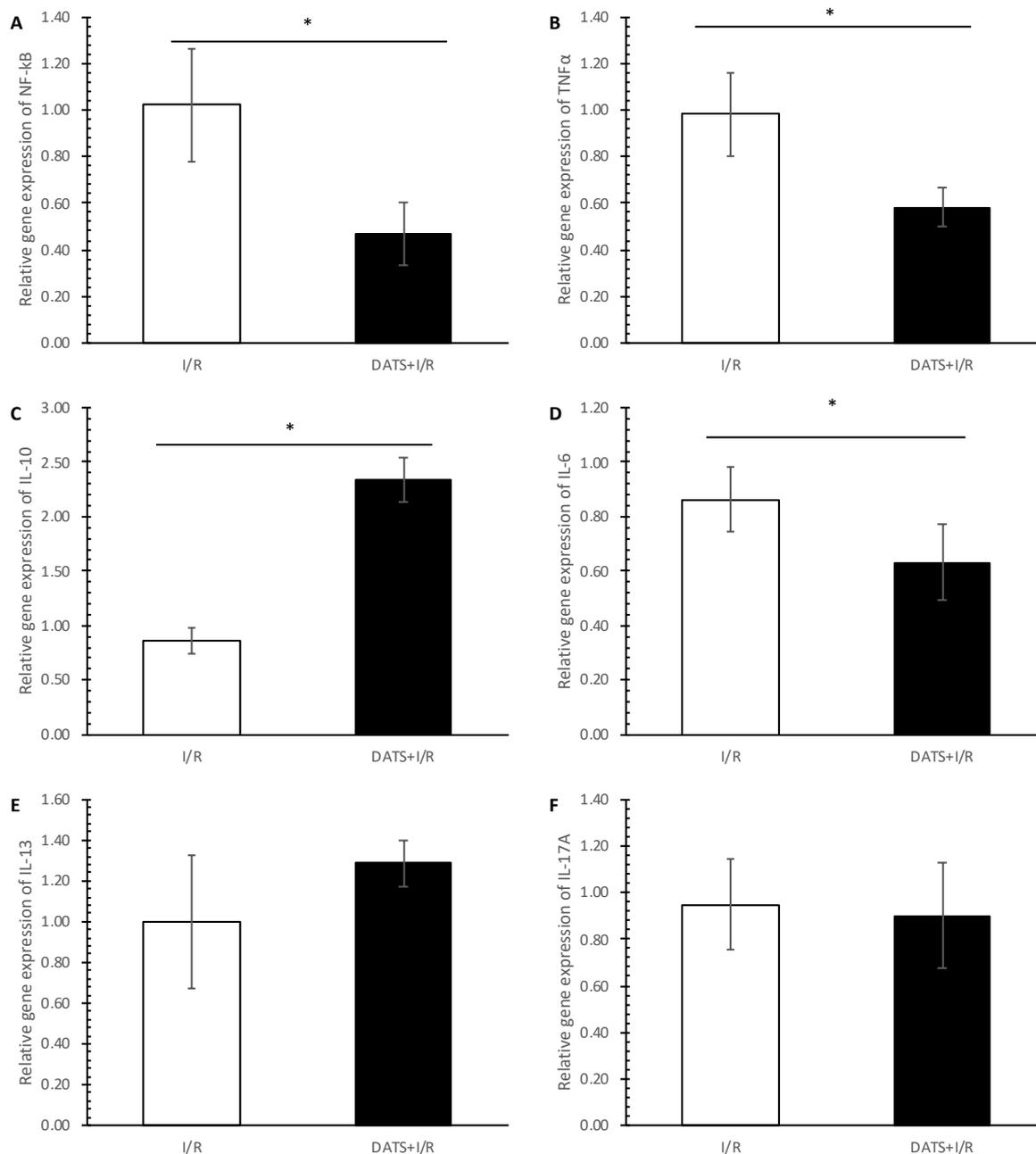


График 16. Ефекти ДАТС третмана на релативну експресију (анти)инфламацијских гена (А) NF- κ B, (Б) TNF- α , (В) IL-10, (Г) IL-6, (Д) IL-13 и (Ђ) IL-17A у левој комори здравих пацова након *ex vivo* изазване И/Р повреде. И/Р - здрави, нетретирани пацови и ДАТС+И/Р - здрави, третирани пацови. Вредности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

4.2. ЕФЕКТИ ТРЕТМАНА ДАТС-ОМ НА ПАЦОВЕ СА ДИЈАБЕТЕСОМ

4.2.1. Карактеристике пацова праћене током хроничног протокола

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

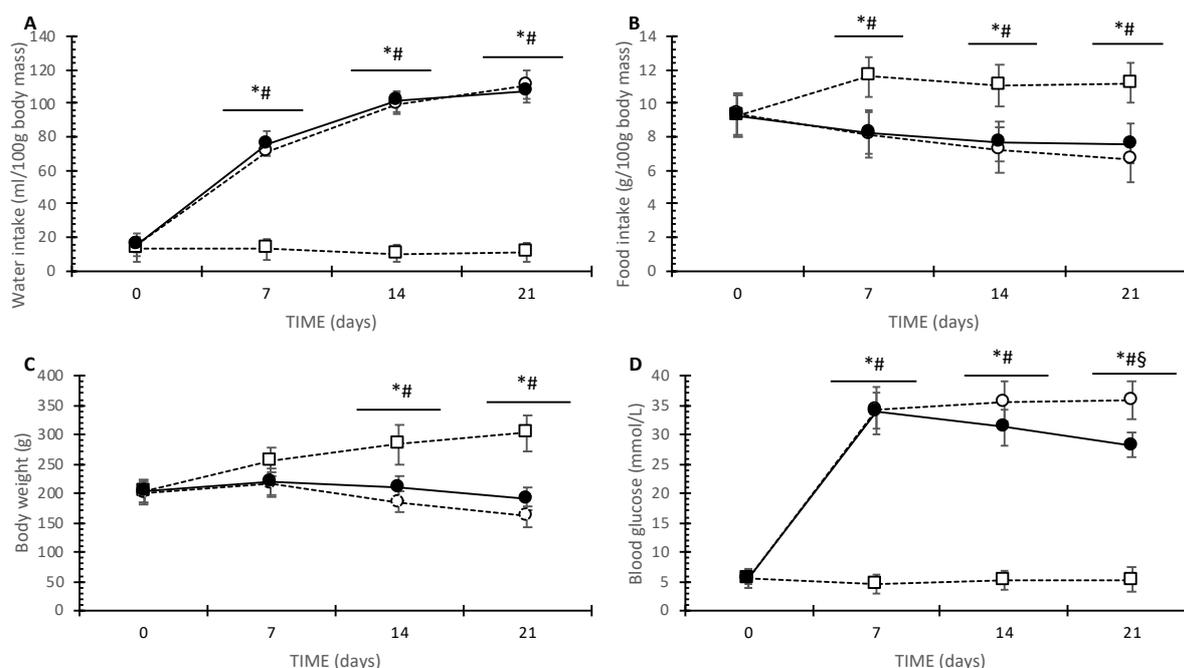


График 17. Ефекти третмана ДАТС-ом на (А) конзумацију воде, (Б) конзумацију хране, (В) телесну тежину и (Г) гликемију наше током тронедељног третмана ДАТС-ом код здравих нетретираних пацова - КТР (---□---), нетретираних пацова са дијабетесом - ДМ (---○---) и третираних пацова са дијабетесом - ДМ+ДАТС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

Значајно снижење односа тежина срца/телесна тежина примећено је у ДМ+ДАТС у односу на ДМ групу (**График 18**).

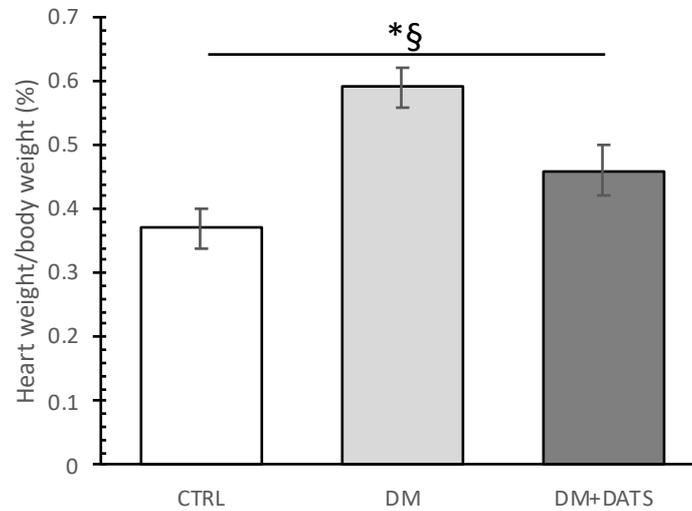
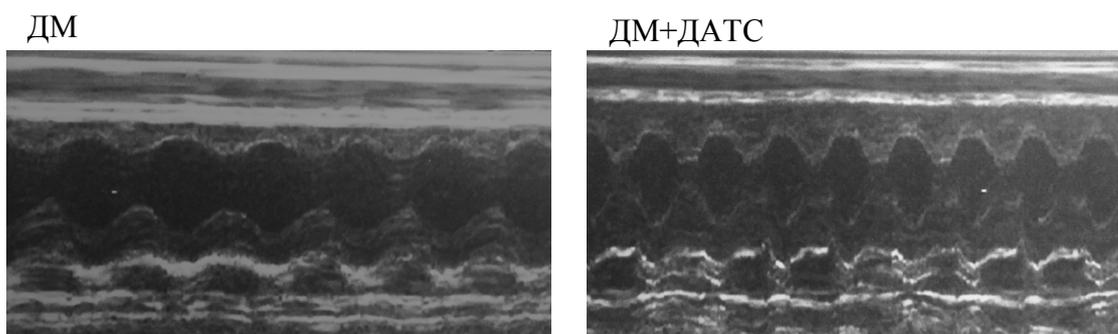


График 18. Ефекти третмана ДАТС-ом на однос тежине срца и телесне тежине пацова са дијабетесом. Вредности су приказане као средња вредност \pm СД, $n = 12$, по групи. * $P < 0,05$ КТР vs. ДМ, § $P < 0,05$ ДМ vs. ДМ+ДАТС.

4.2.2. Функција миокарда праћена *in vivo*

У ДМ групи LVPW био је значајно повећан на крају систоле и дијастоле, док је FS био значајно смањен у односу на КТР групу. Код ДМ+ДАТС групе IVSd био је значајно смањен, док је LVPWd био значајно повећан у односу на КТР и ДМ групу. Поред тога, ДАТС је побољшао LVPWs (у поређењу са КТР) и FS (у поређењу са ДМ) (Слика 10 и Табела 7).



Слика 10. Репрезентативна фотографија ехокардиографије миокарда из М-режима у ДМ и ДМ+ДАТС групама.

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

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

4.2.3. Липидни параметри мерени након хроничног третмана ДАТС-ом

LDL је био значајно повећан у ДМ и ДМ+ДАТС групама у поређењу са КТР, док су нивои ТС, TG и HDL били скоро исти у испитиваним групама (**График 19**).

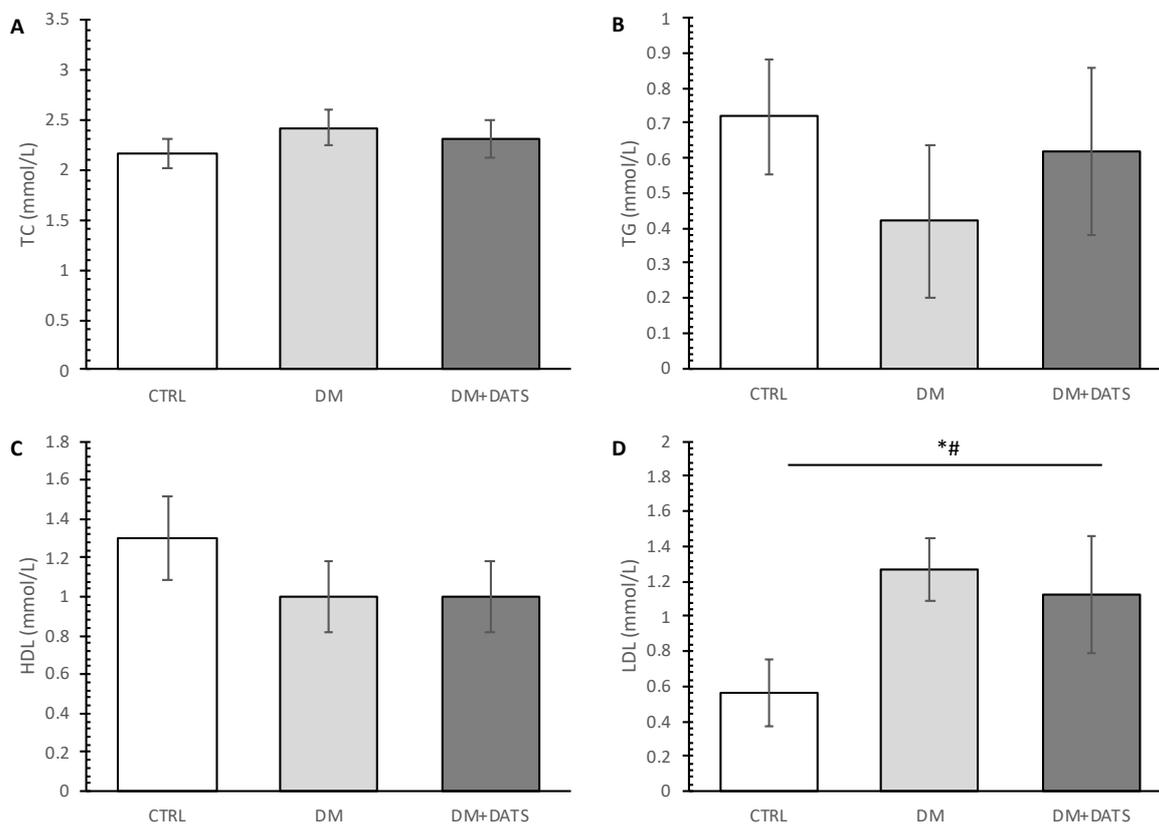


График 19. Ефекти третмана ДАТС-ом на липидне параметре код нетретираних, здравих пацова (КТР), нетретираних пацова са дијабетесом (ДМ) и третиранх пацова са дијабетесом (ДМ+ДАТС). (А) укупни холестерол – ТС, (Б) триглицериди – TG, (В) липопротеин високе густине – HDL и (Г) липопротеин ниске густине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

4.2.4. Нивои прооксидационих и антиоксидационих параметара мерени у системској циркулацији

Нивои NO_2^- били су значајно смањени у ДМ у поређењу са КТР и ДМ+ДАТС. Са друге стране, ниво O_2^- је био значајно већи у ДМ у односу на КТР и ДМ+ДАТС групе, као и у ДМ+ДАТС у односу на КТР групу (График 20).

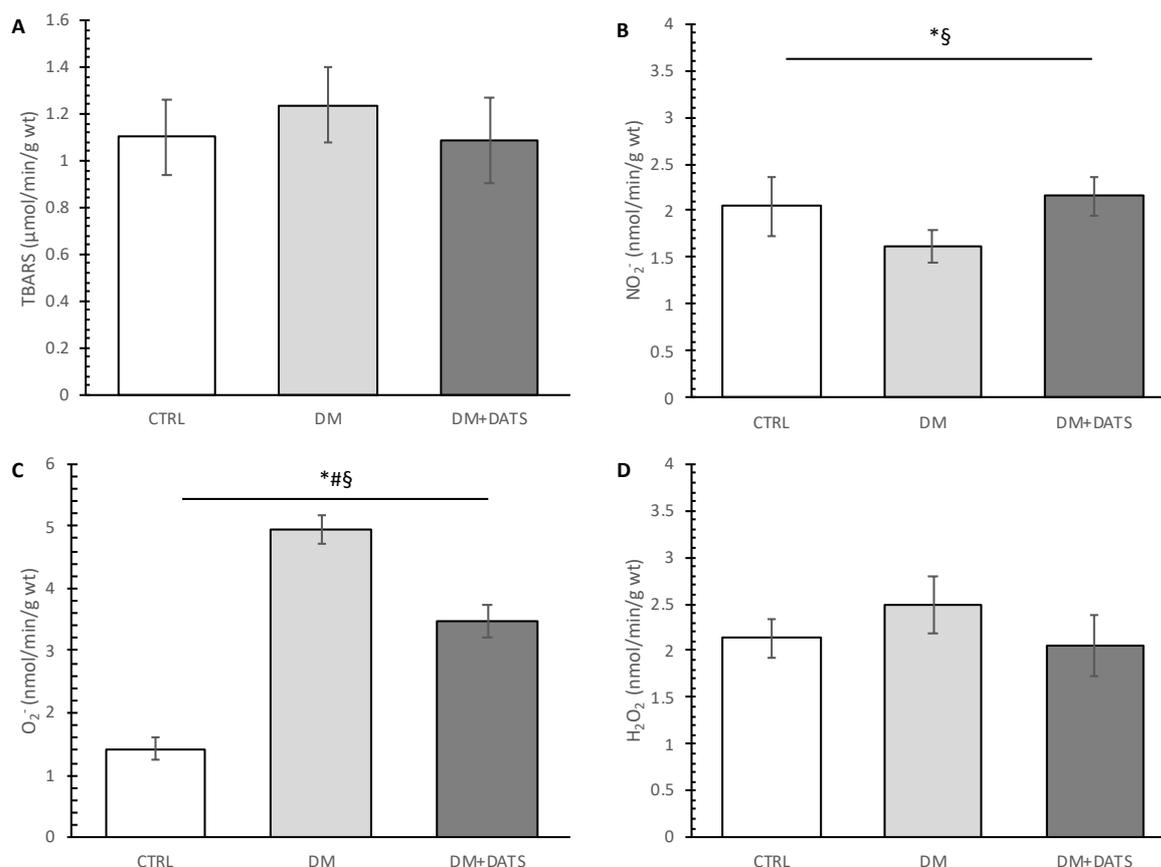


График 20. Ефекти ДАТС третмана код пацова са дијабетесом (А) индекс липидне пероксидације – мерен као ТВАРС, (Б) нитрити – NO_2^- , (В) супероксид анион радикал – O_2^- и (Д) водоник пероксид – H_2O_2 . Вредности су приказане као средња вредност \pm СД, $n=12$, по групи. * $P<0,05$ КТР vs. ДМ, # $P<0,05$ КТР vs. ДМ+ДАТС, § $P<0,05$ ДМ vs. ДМ+ДАТС.

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

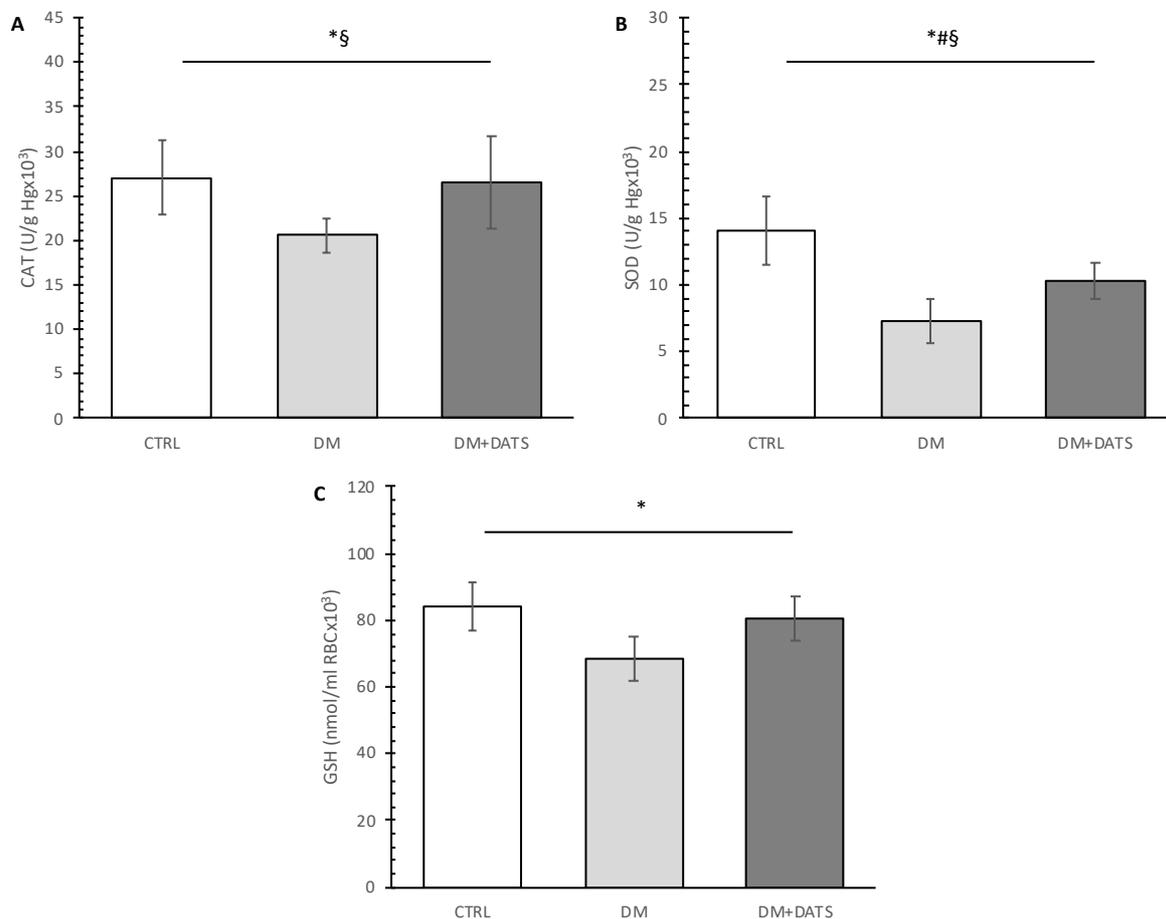


График 21. Ефекти ДАТС третмана код пацова са дијабетесом на активност (А) каталазе – CAT, (Б) супероксид дисмутазе – SOD и (В) редукованог глутатиона – GSH. Вредности су приказане као средња вредност \pm СД, n =12, по групи. * P<0,05 КТР vs. ДМ, # P<0,05 КТР vs. ДМ+ДАТС, § P<0,05 ДМ vs. ДМ+ДАТС.

4.2.5. Нивои хомоцистеина

Ниво хомоцистеина био је значајно повећан у ДМ групи у поређењу са КТР и ДМ+ДАТС групама (**График 22**).

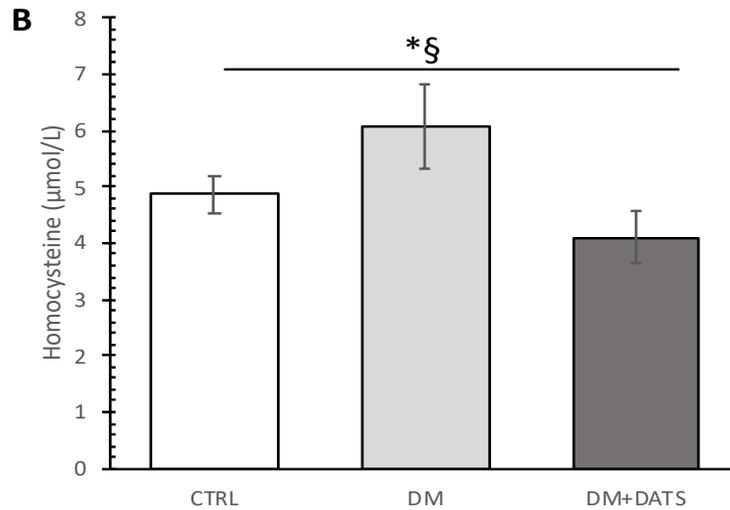


График 22. Ефекти ДАТС третмана код пацова са дијабетесом на нивое хомоцистеина у серуму – Нсу. Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n =12, по групи. *P<0,05 КТР vs. ДМ, # P<0,05 КТР vs. ДМ+ДАТС, § P<0,05 ДМ vs. ДМ+ДАТС.

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

4.2.6.1. Кардиодинамски параметри

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

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

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

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

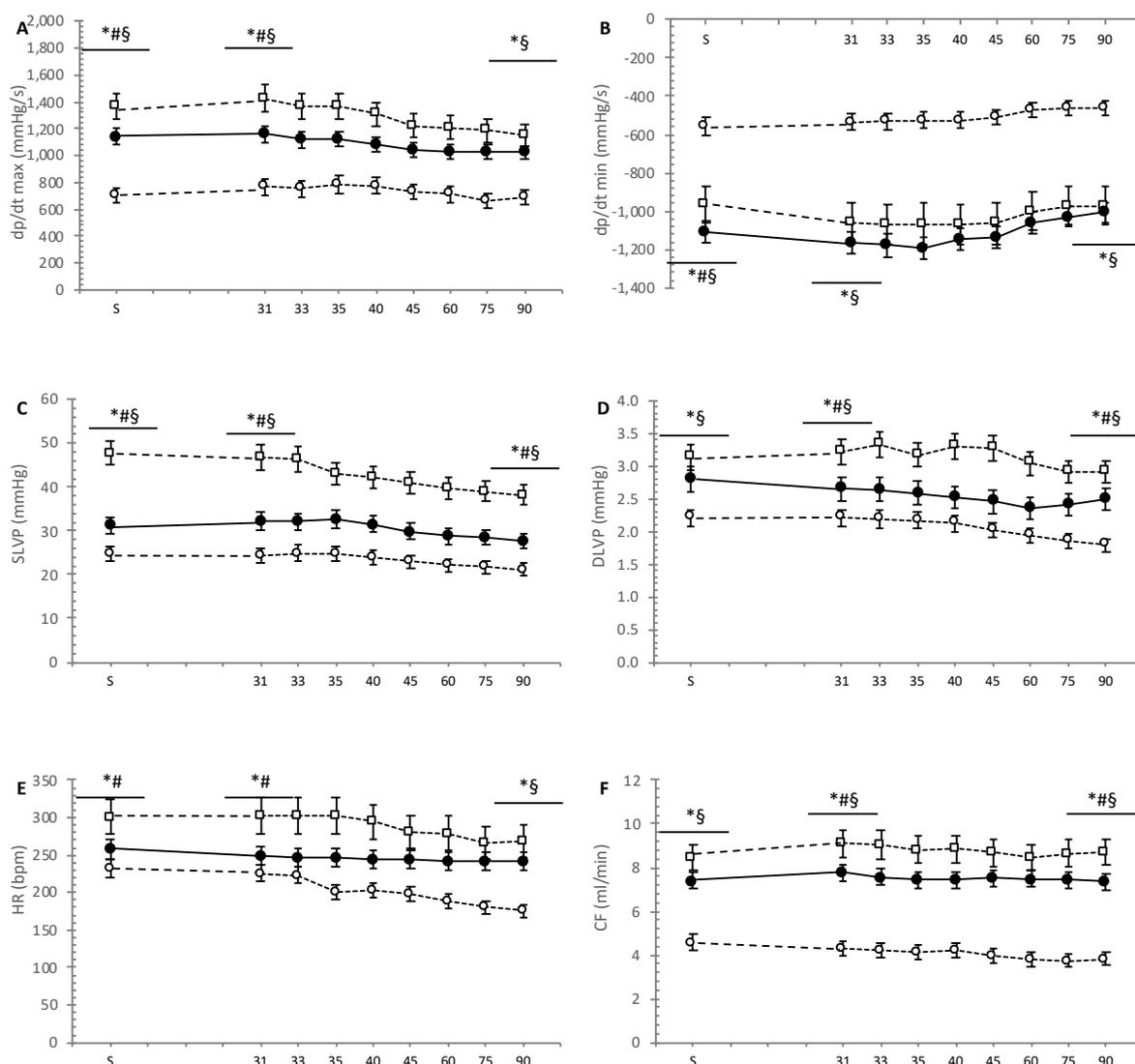


График 23. Ефекти третмана ДАТС-ом на (А) максималну стопу развоја притиска у левој комори – $dp/dt \max$, (Б) минималну стопу развоја притиска у левој комори – $dp/dt \min$, (В) систолни притисак у левој комори – SLVP, (Г) дијастолни притисак у левој комори – DLVP, (Д) фреквенцу срца – HR и (Е) коронарни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

4.2.6.2. Прооксидациони маркери мерени у коронарном венском ефлуенту

У ДМ групи, ниво TBARS-а је значајно повећан у 31. минуту перфузије у односу на период стабилизације (Табела 9).

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

		TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO_2^- (nmol/ml)	O_2^- (nmol/ml)	H_2O_2 (nmol/ml)
ДМ	S	16,13 \pm 0,89	77,95 \pm 8,85	24,93 \pm 2,65	44,47 \pm 4,15
	31	20,27 \pm 1,09 ^a	87,03 \pm 8,71	24,25 \pm 3,09	43,31 \pm 4,54
	90	19,94 \pm 1,62	85,42 \pm 14,13	21,82 \pm 1,67	37,06 \pm 3,35
ДМ + ДАТС	S	14,10 \pm 1,92	104,63 \pm 6,50	13,18 \pm 2,12	28,79 \pm 3,98
	31	14,34 \pm 1,77	103,44 \pm 3,50	15,95 \pm 1,64	30,10 \pm 2,17
	90	14,66 \pm 2,59	101,44 \pm 11,00	16,92 \pm 3,33	28,12 \pm 2,33

Разлике између нивоа мерених параметара оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту код здравих нетретираних (КТР), нетретираних пацова са дијабетесом (ДМ) и третираних пацова са дијабетесом (ДМ+ДАТС) приказане су на **Графику 24**. Значајно већи ниво TBARS-а био је забележен у ДМ групи у односу на КТР (у тачкама С и 31) и ДМ+ДАТС (у тачкама 31 и 90) групе. У ДМ+ДАТС групи највећи ниво NO_2^- забележен је у стабилизацији. Код дијабетеса нивои O_2^- и H_2O_2 били су значајно повећани, а третман ДАТС-ом је значајно смањио нивое ова два прооксиданса.

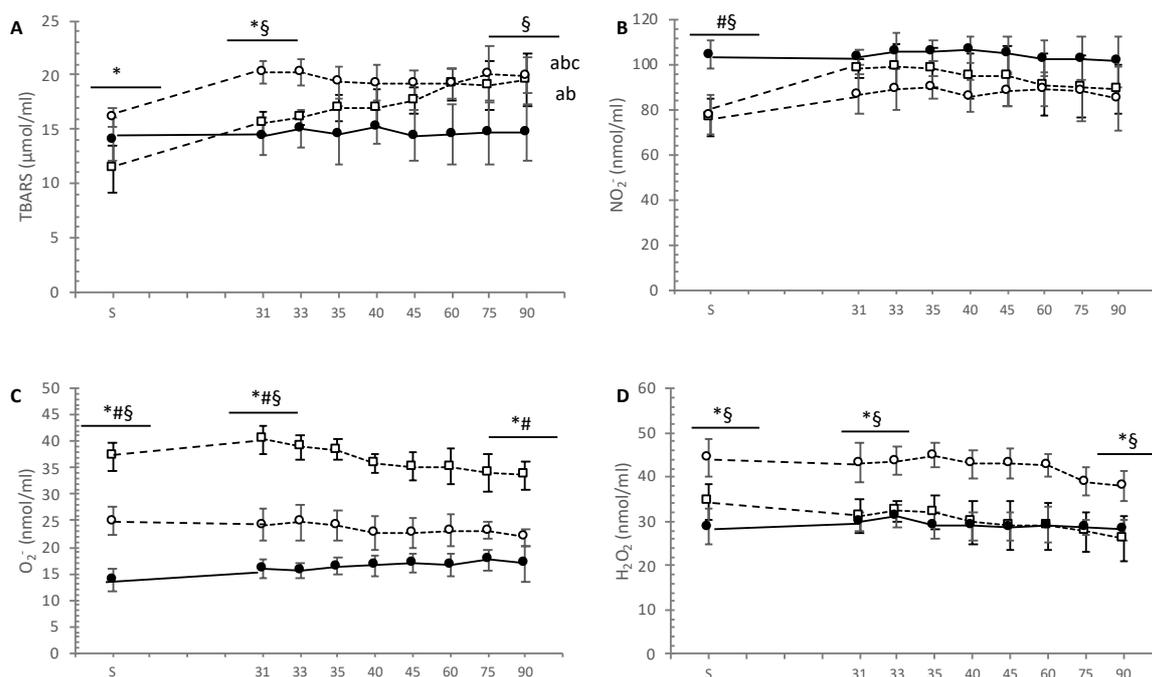
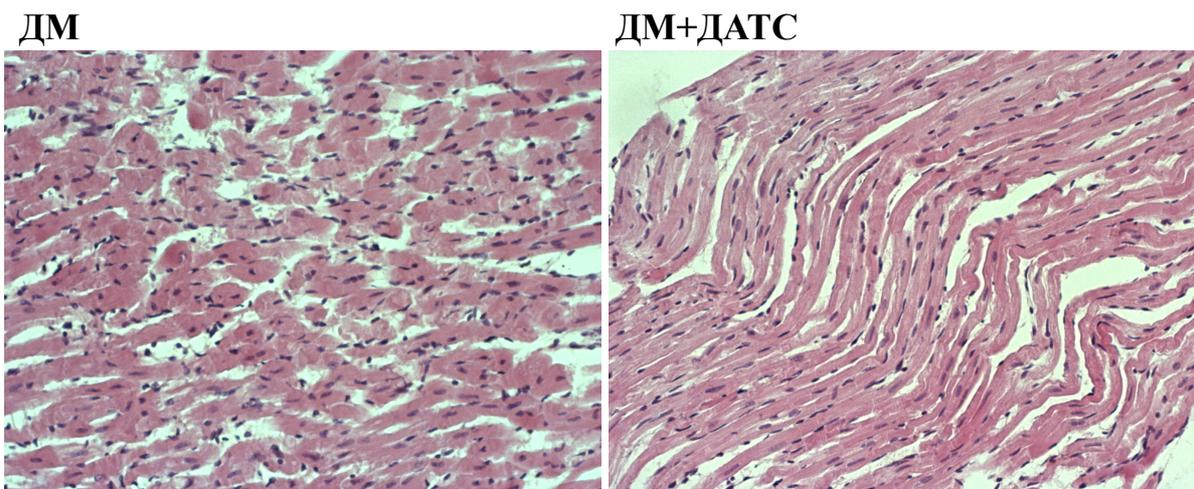


График 24. Ефекти третмана ДАТС-ом на (А) индекс липидне пероксидације – мерен као TBARS, (Б) нитрити – NO_2^- , (В) супероксид анјон радикал – O_2^- и (Г) водоник пероксид – H_2O_2 . Здрави, нетретирани пацови - КТР (---□---), нетретирани пацови са дијабетесом - ДМ (---○---) и третирани пацови са дијабетесом - ДМ+ДАТС (—●—). Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n = 6, по групи. * P<0,05 КТР vs. ДМ, # P<0,05 КТР vs. ДМ+ДАТС, § P<0,05 ДМ vs. ДМ+ДАТС.

4.2.6.3. Бојење срчаног ткива хематоксилин/еозином

Као што се може и уочити на **Слици 11**, код ДМ+ДАТС групе има мање озбиљних хистолошких промена у срчаном ткиву у поређењу са ДМ групом. У групи ДМ пронађени су измењени срчани миофибрили, саркомере, као и перинуклеарна вакуолизација.



Слика 11. Репрезентативни приказ обојеног ткива миокарда хематоксилин/еозин техником, срца која су претходно била подвргнута деведесетоминутној ретроградној перфузији (ДМ – нетретирани пацови са дијабетесом и ДМ+ДАТС – третирани пацови са дијабетесом), увећање 200 х; скала 2 mm.

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

4.2.7.1. Кардиодинамски параметри

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

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

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

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

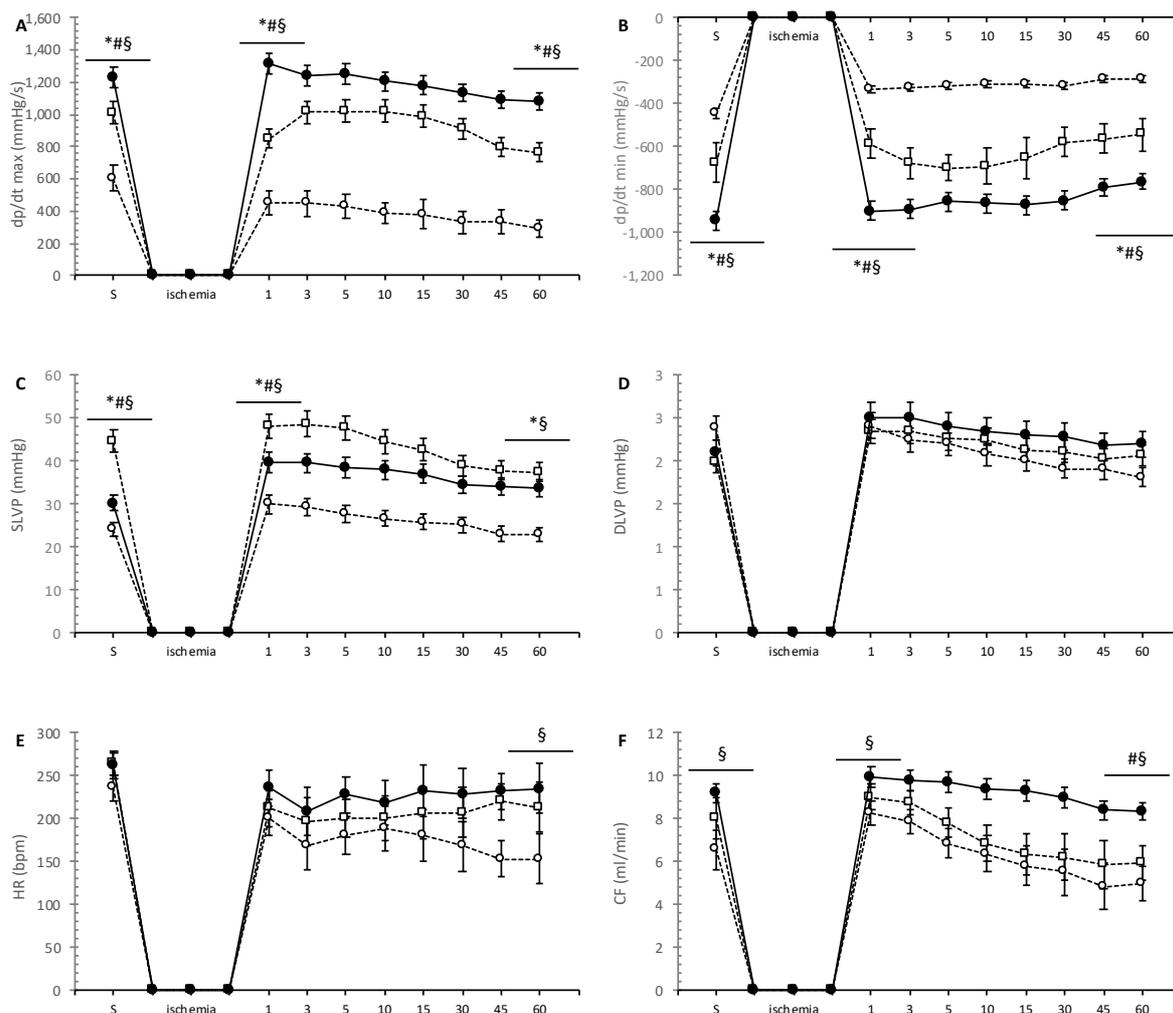


График 25. Ефекти третмана ДАТС-ом на *ex vivo* индуковану И/Р повреду миокарда пацова (А) максимална стопа развоја притиска у левој комори – dp/dt max, (Б) минимална стопа развоја притиска у левој комори – dp/dt min, (В) систолни притисак у левој комори – SLVP, (Г) дијастолни притисак у левој комори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

4.2.7.2. Прооксидациони параметри мерени у коронарном венском ефлуенту

Нивои NO_2^- и H_2O_2 били су значајно виши у 1. минути реперфузије у поређењу са С, али је до краја реперфузије ниво NO_2^- поново смањен на ниво сличан оном у тачки стабилизације (Табела 11).

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

		TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO_2^- (nmol/ml)	O_2^- (nmol/ml)	H_2O_2 (nmol/ml)
ДМ + И/Р	S	16,46 \pm 0,93	62,19 \pm 11,03	44,93 \pm 2,65	31,77 \pm 4,84
	1	18,96 \pm 2,58	67,64 \pm 13,29	49,42 \pm 4,67	30,13 \pm 3,32
	60	14,30 \pm 2,31	63,95 \pm 11,47	40,47 \pm 4,75	32,60 \pm 5,68
ДМ + ДАТС + И/Р	S	9,63 \pm 2,04	75,10 \pm 6,50	12,69 \pm 2,38	17,01 \pm 1,86
	1	13,51 \pm 1,55	118,66 \pm 3,50 ^a	16,78 \pm 3,45	26,48 \pm 2,17 ^a
	60	11,07 \pm 2,05	97,96 \pm 11,00 ^b	18,52 \pm 4,39	17,45 \pm 4,39

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

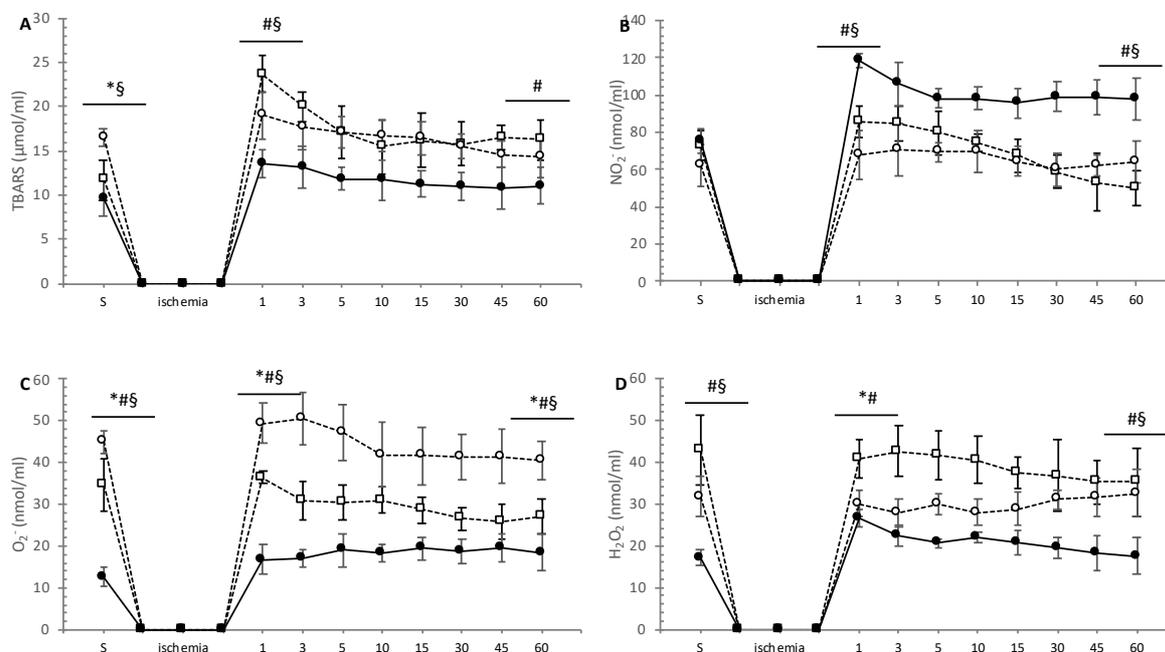
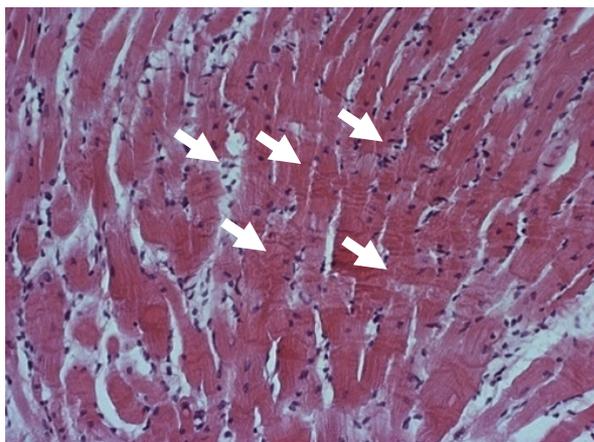


График 26. Ефекти третмана ДАТС-ом на *ex vivo* индуквану И/Р повреду изолованог срца пацова (А) индекс липидне пероксидације – мерен као TBARS, (Б) нитрити – NO_2^- , (В) супероксид анјон радикал – O_2^- и (Г) водоник пероксид – H_2O_2 . Здрви, нетретирани пацови - И/Р (---□---), нетретирани пацови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

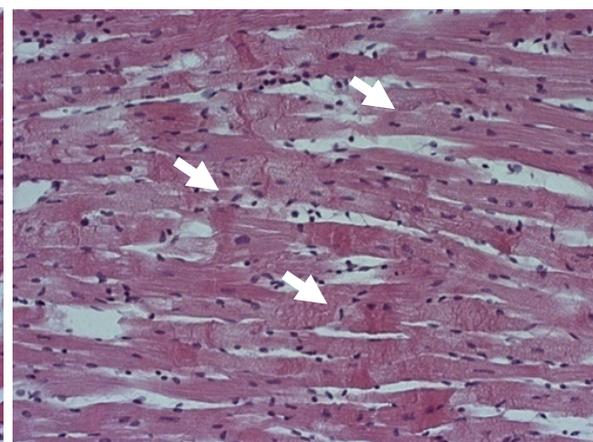
4.2.7.3. Бојење срчаног ткива хематоксилин/еозином

Као што је приказано на **Слици 12** у ДМ+И/Р групи јасно се уочава дегенерација миокарда са неуређеним миофибрилама, интерстицијални едем, оштећење мишићне мембране и некроза. Третман ДАТС-ом нормализовао је све промене, што се највише уочава код миофибрила и миофиламената.

ДМ+И/Р



ДМ+ДАТС+И/Р

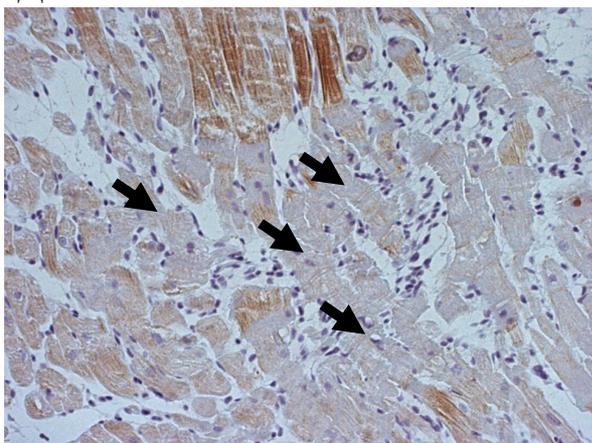


Слика 12. Репрезентативни приказ обојеног ткива миокарда хематоксилин/еозин техником, срца која су претходно била подвргнута И/Р повреди (ДМ+И/Р – нетретирани пацови са дијабетесом и ДМ+ДАТС+И/Р – третирани пацови са дијабетесом), увећање 200 х; скала 2 mm.

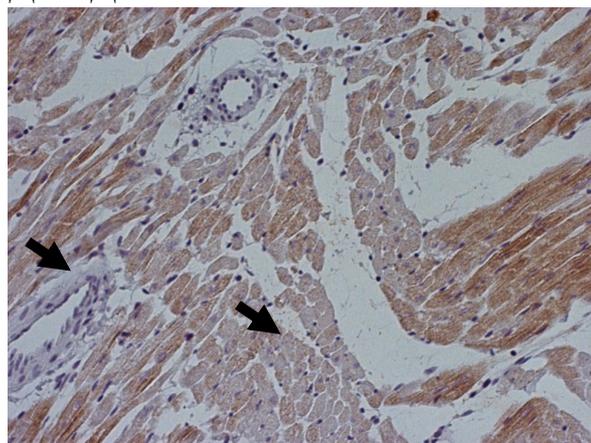
4.2.7.4. Бојење тропонина Т у ткиву миокарда

Као што је приказано на **Слици 13**, у ДМ+И/Р групи, уочава се врло мало позитивног (смеђег) обојења уз јасан губитак у бојењу сТnТ. Са друге стране, смањење обојења уз неколико позитивних (браонкастих) површина пронађено је у ДМ+ДАТС+И/Р групи.

ДМ+И/Р



ДМ+ДАТС+И/Р



Слика 13. Репрезентативни приказ обојеног сТnТ у ткиву срца пацова која су претходно била подвргнута *ex vivo* изазваној И/Р повреди (ДМ+И/Р – нетретирани пацови са дијабетесом и ДМ+ДАТС+И/Р – третирани пацови са дијабетесом), увећање 200 х; скала 2 mm.

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

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

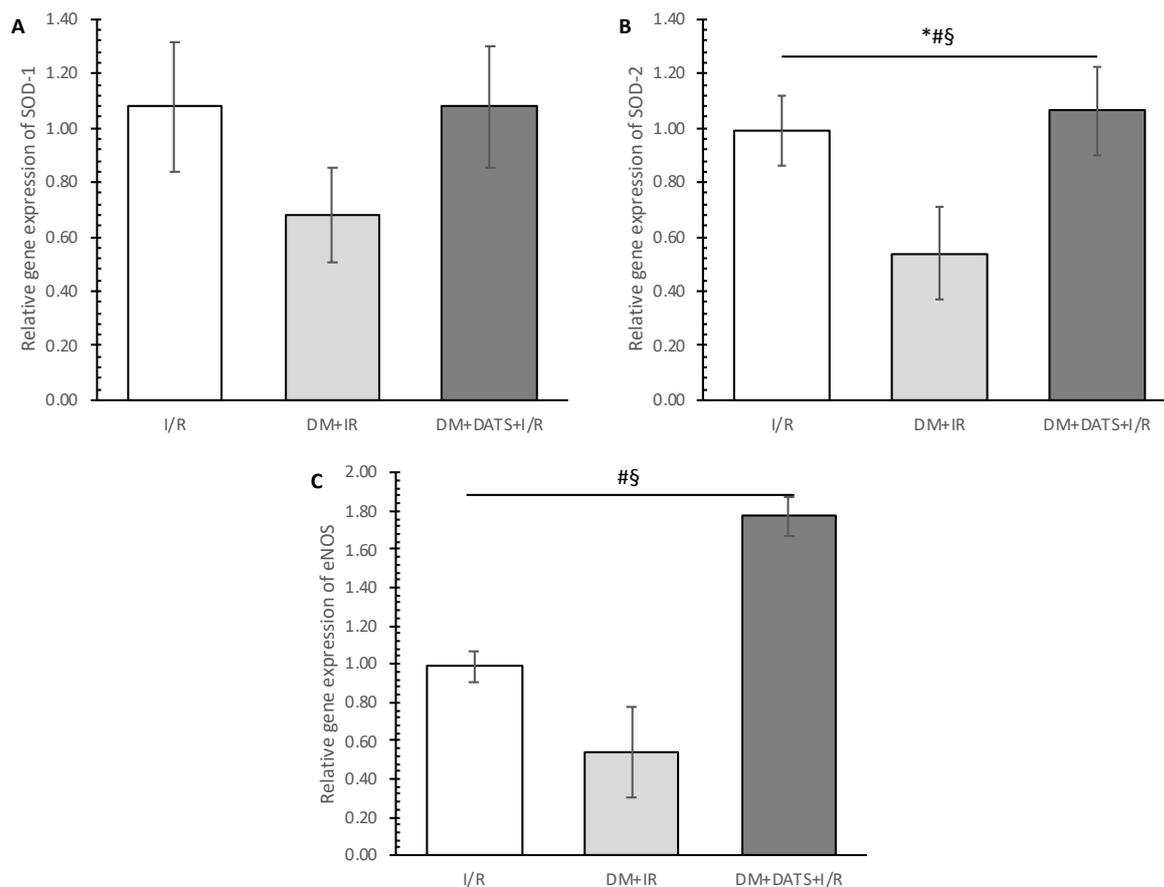


График 27. Ефекти ДАТС третмана на релативну експресију антиоксидационих гена (А) супероксид дисумтаза 1 – SOD-1, (Б) супероксид дисумтаза 2 – SOD-2, (В) ендотелна азот моноксид синтаза – eNOS, у левој комори пацова са дијабетесом након *ex vivo* изазване И/Р повреде. И/Р - здрави, нетретирани пацови,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

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

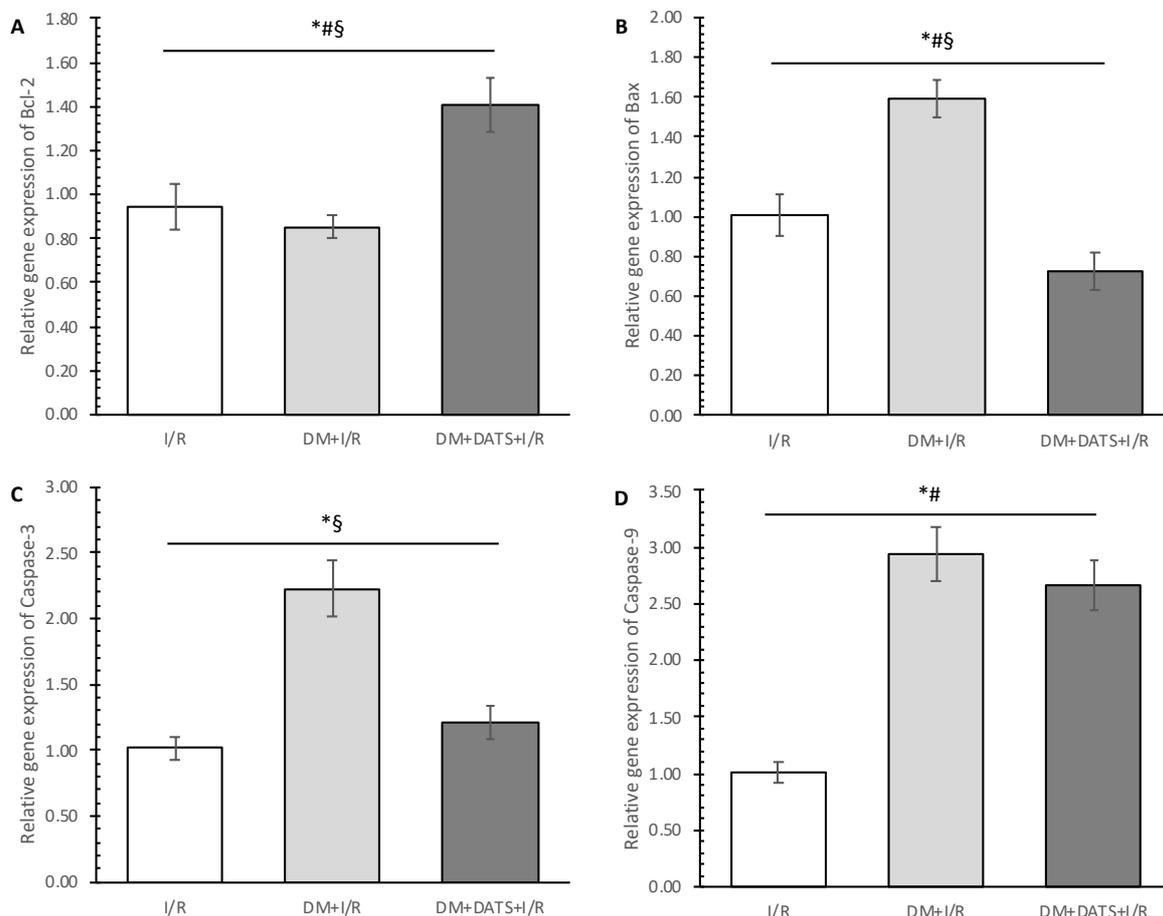


График 28. Ефекти ДАТС третмана на релативну експресију (анти)апоптотских гена (А) Bcl-2, (Б) Вах, (В) каспаза-3 и (Г) каспаза-9, у левој комори пацова са дијабетесом након *ex vivo* изазване И/Р повреде. И/Р - здрави, нетретирани пацови, ДМ+И/Р - нетретирани пацови са дијабетесом и ДМ+ДАТС+И/Р - третирани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

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

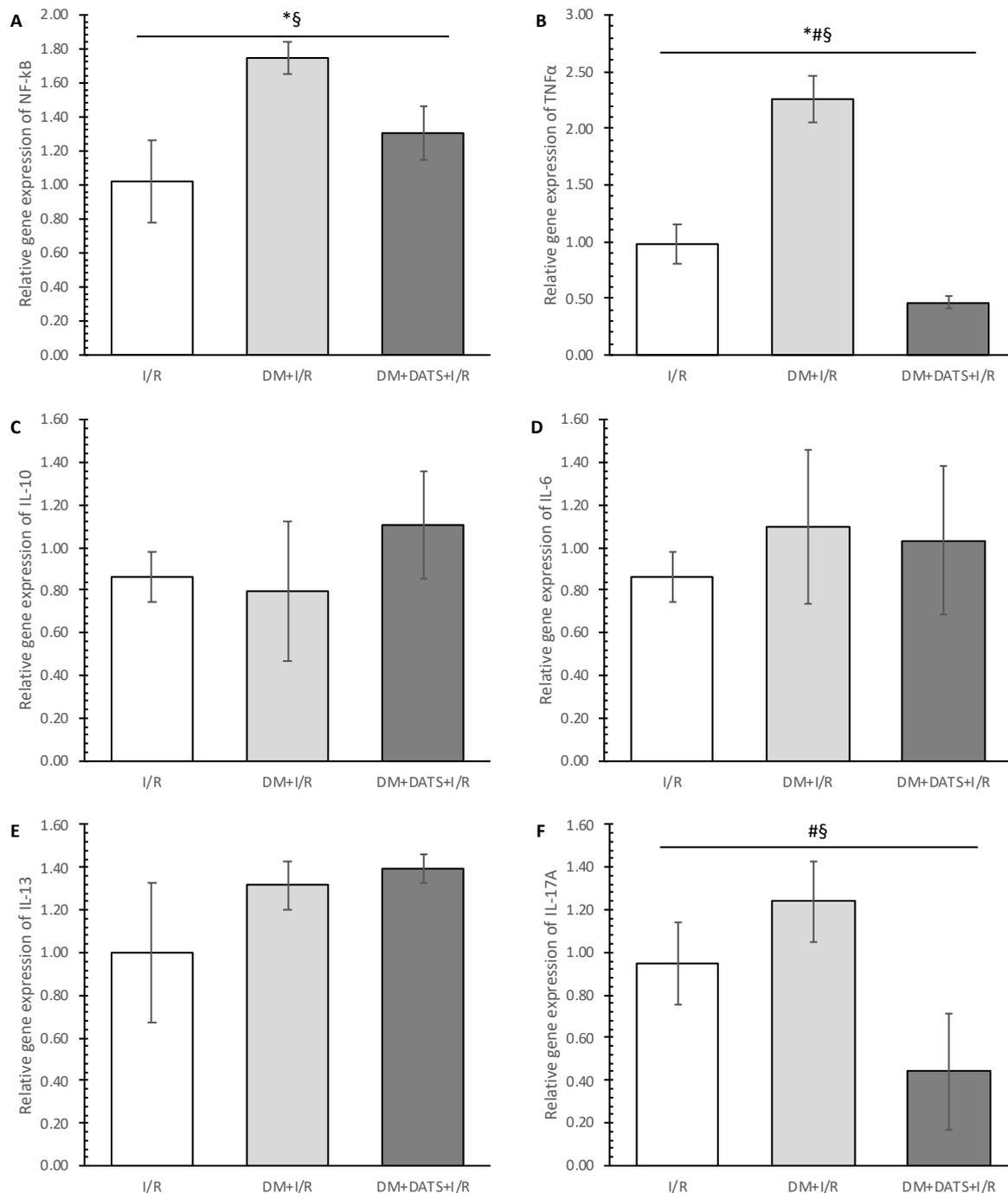


График 29. Ефекти ДАТС третмана на релативну експресију (анти)инфламацијских гена (А) NF-κB, (Б) TNF-α, (В) IL-10, (Г) IL-6, (Д) IL-13 и (Љ) IL-17A у левој комори пацова са дијабетесом након *ex vivo* изазване И/Р повреде. И/Р - здрави, нетретирани пацови, ДМ+И/Р - нетретирани пацови са дијабетесом и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

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

4.3.1. Карактеристике пацова праћене током хроничног протокола

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

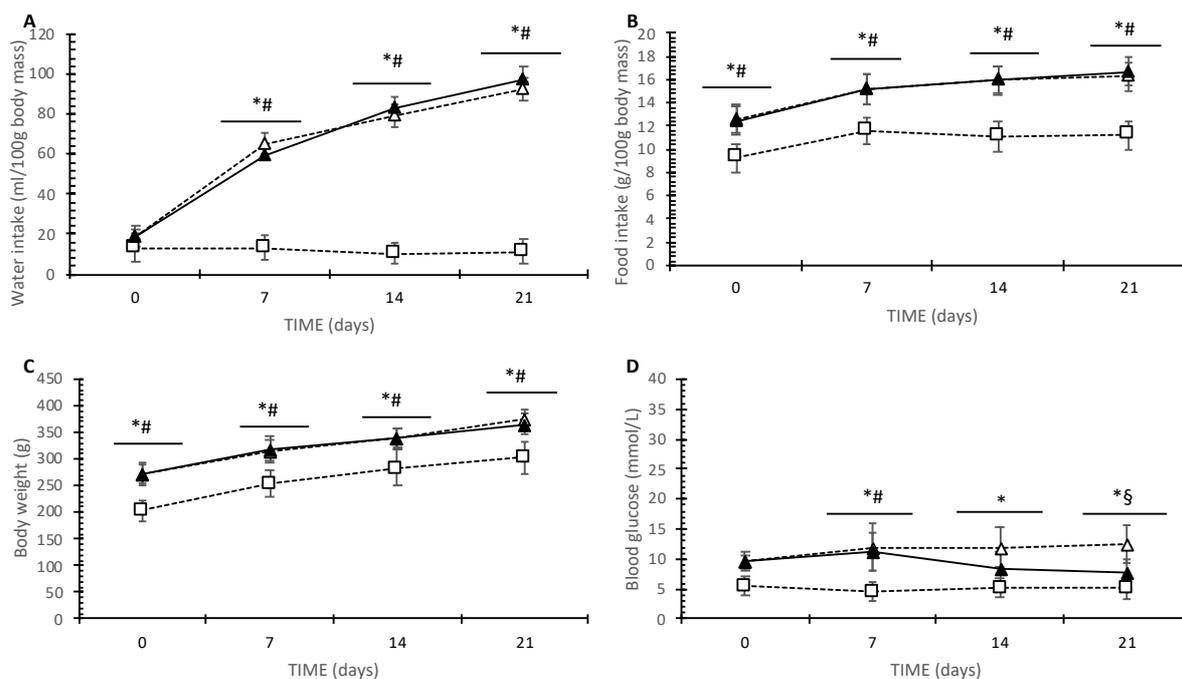


График 30. Ефекти третмана ДАТС-ом на (А) конзумацију воде, (Б) конзумацију хране, (В) телесну тежину и (Г) гликемију наше, током тронедељног третмана ДАТС-ом код здравих нетретираних пацова - КТР (---□---), нетретираних пацова са МетС - МС (---△---) и третираних пацова са МетС – МС+ДАТС (—▲—). 0 – непосредно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

Значајан пораст односа тежине срца/телесна тежина, примећен је у МС групи у односу на КТР групу (**График 31**).

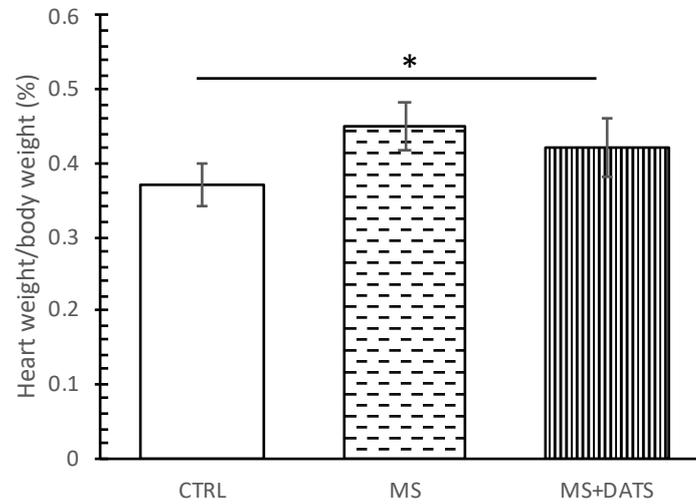
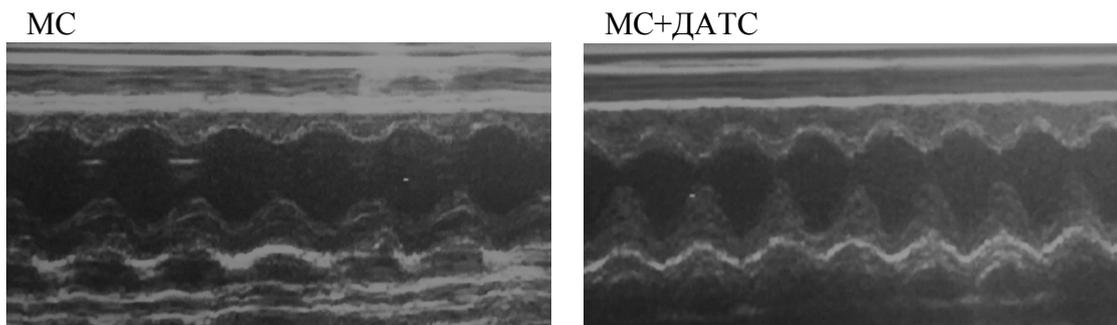


График 31. Ефекти третмана ДАТС-ом на однос тежине срца и телесне тежине пацова са МетС-ом. Вредности су приказане као средња вредност \pm СД, $n = 12$, по групи. * $P < 0,05$ КТР vs. МС.

4.3.2. Функција миокарда праћена *in vivo*

МетС је значајно променио функцију миокарда, што се јасно учавља кроз смањење IVS на крају дијастоле и систоле, као и смањење FS и повећање LVIDd. Међутим, код пацова који су током три недеље били третирани ДАТС-ом, све наведене промене су биле спречене (Слика 15, Табела 12).



Слика 15. Репрезентативна фотографија ехокардиографије миокарда из М-режима у MC и MC+ДАТС групама.

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

	КТР	MC	MC+ДАТС
IVSd (cm)	0,163 \pm 0,02	0,128 \pm 0,032*	0,159 \pm 0,034§
LVIDd (cm)	0,638 \pm 0,05	0,623 \pm 0,073	0,619 \pm 0,032
LVPWd (cm)	0,204 \pm 0,05	0,220 \pm 0,009	0,203 \pm 0,037
IVSs (cm)	0,301 \pm 0,03	0,233 \pm 0,047*	0,322 \pm 0,048§
LVIDs (cm)	0,267 \pm 0,08	0,324 \pm 0,010*	0,218 \pm 0,032§
LVPWs (cm)	0,322 \pm 0,05	0,316 \pm 0,006	0,342 \pm 0,103
FS (%)	58,55 \pm 4,13	48,975 \pm 4,321*	66,300 \pm 4,751§

4.3.3. Липидни параметри мерени након хроничног третмана ДАТС-ом

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

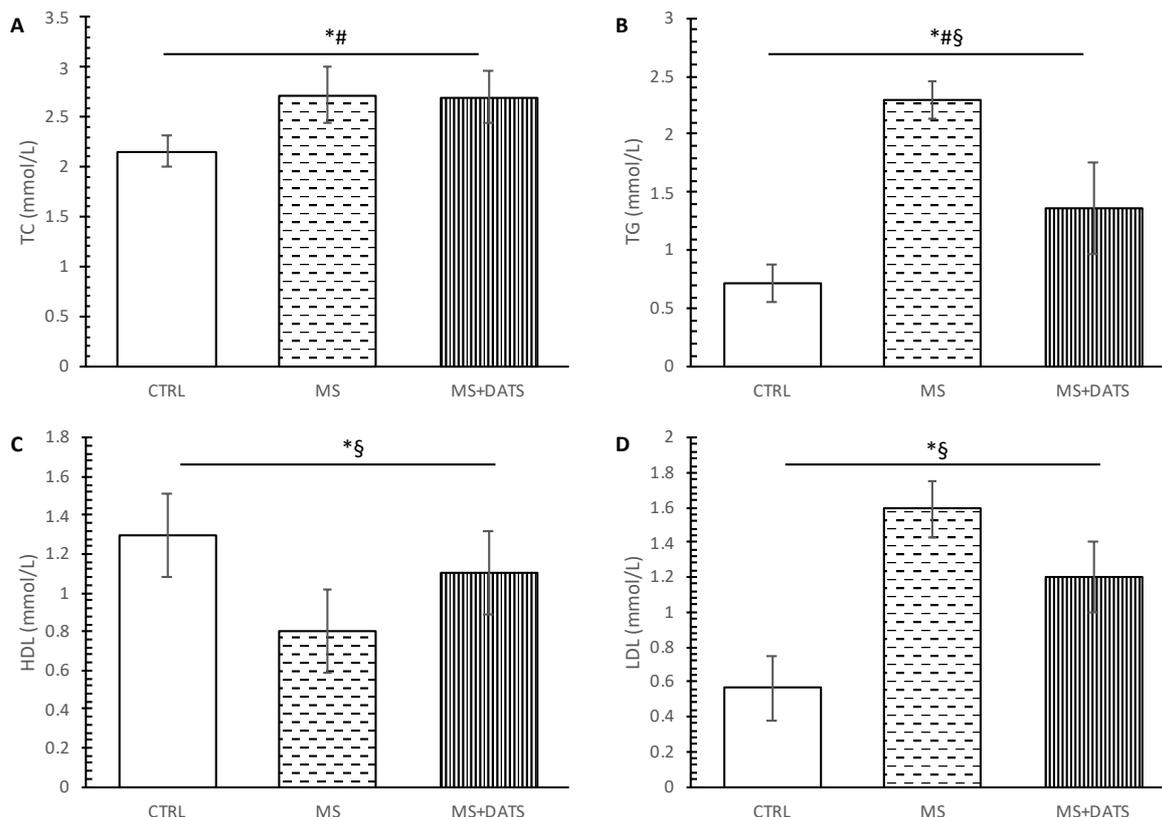


График 32. Ефекти третмана ДАТС-ом на липидне параметре код здравих, нетретираних пацова (KTP), нетретираних пацова са дијабетесом (DM) и третираних пацова са дијабетесом (DM+ДАТС). (А) укупни холестерол – TC, (Б) триглицериди – TG, (В) липопротеин високе густине – HDL и (Г) липопротеин ниске густине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

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

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

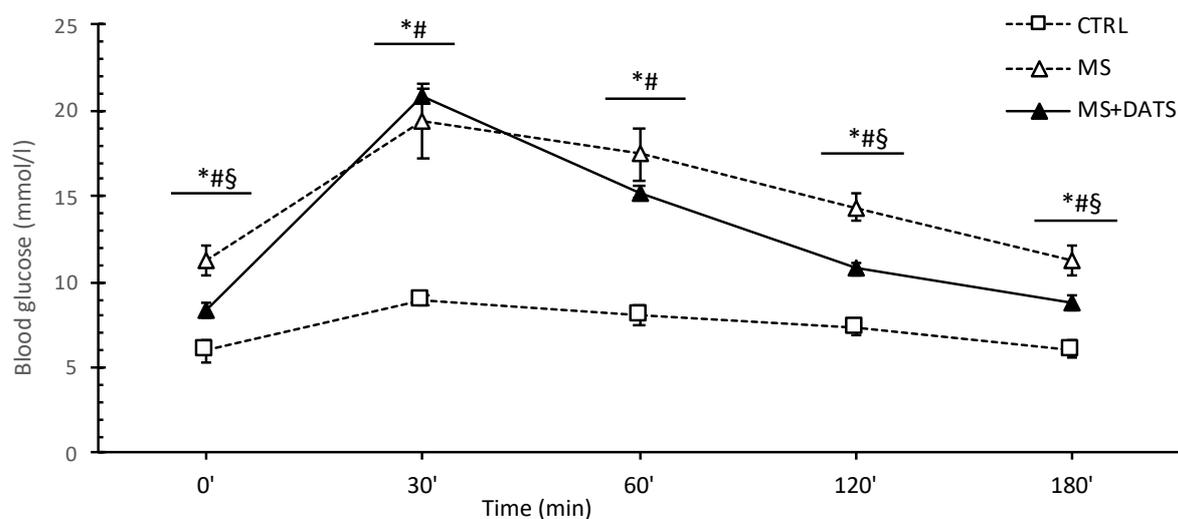


График 33. Ефекти ДАТС третмана на нивое глукозе током ОГТ теста код пацова са МетС-ом. Гликемија наше (означена као 0'), инивои глукозе у 30', 60', 120' и 180' након администрације глукозе у дози од 2 g/kg телесне тежине. Вредности су приказане као средња вредност \pm СД, n = 6, по групи. * P<0,05 КТР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

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

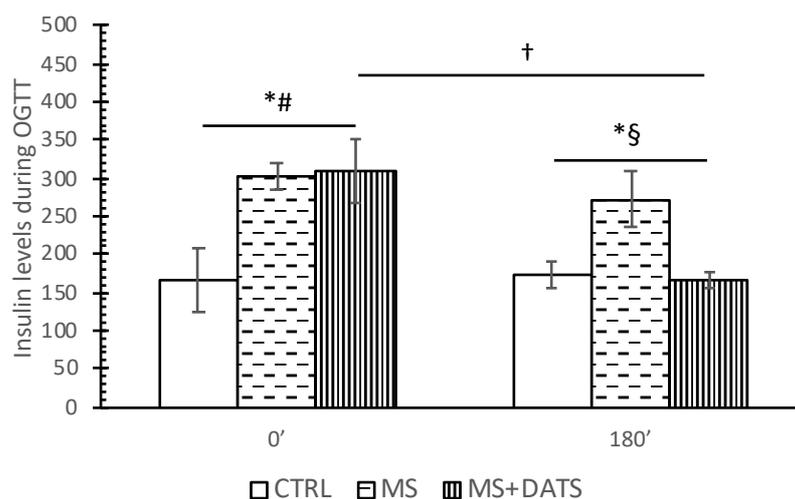


График 34. Ефекти ДАТС третмана код пацова са МетС-ом на нивое инсулина непосредно пре (0') и 180' након администрације глукозе у дози од 2 g/kg телесне тежине. Вредности су приказане као средња вредност \pm СД, n = 12, по групи. * P<0,05 КТР vs. МС, # P<0,05 КТР vs. МС+ДАТС, § P<0,05 МС vs. МС+ДАТС,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

4.3.5. Крвни притисак и срчана фреквенца

Крвни притисак и фреквенца срца су били значајно повећани код пацова са МетС-ом у поређењу са КТР групом, док је третман ДАТС-ом у трајању од 3 недеље значајно смањио само дијастолни крвни притисак (**График 35**).

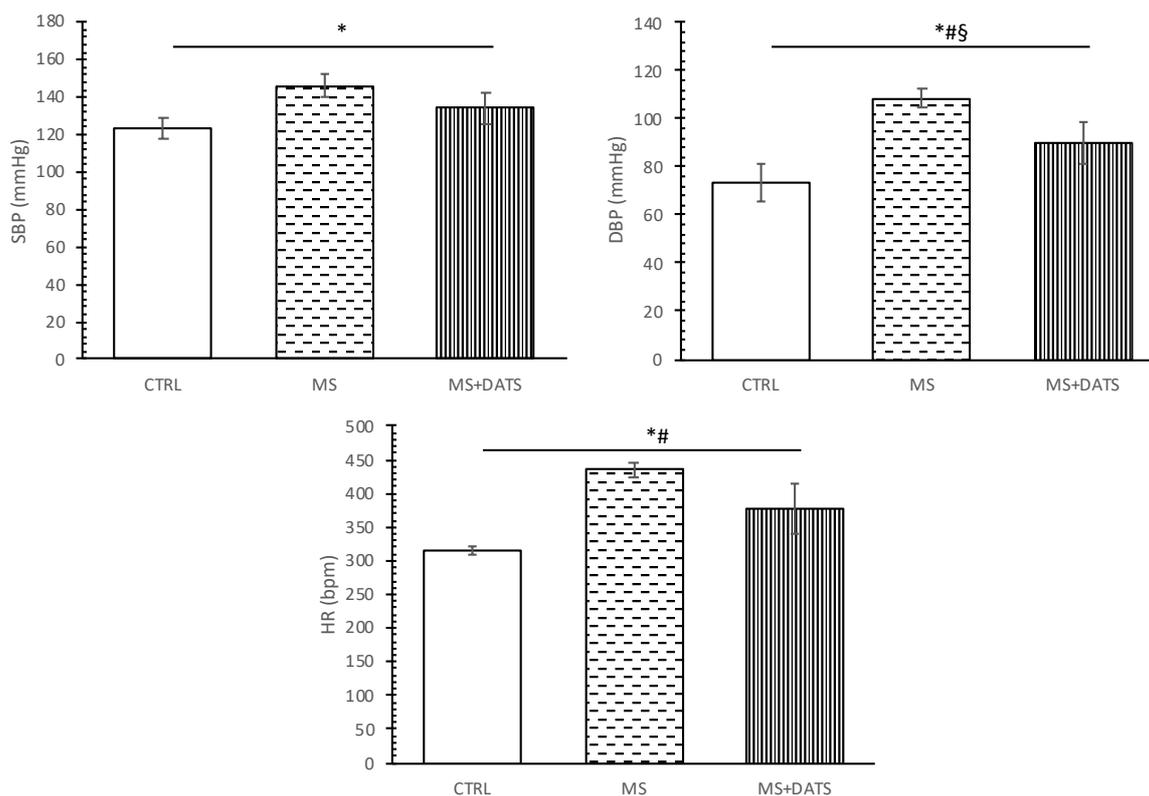


График 35. Ефекти ДАТС третмана код пацова са МетС-ом (А) систолни крвни притисак – СКП, (Б) дијастолни крвни притисак – ДКП и (В) срчану фреквенцу – HR. Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n = 6, по групи. * P<0,05 КТР vs. МС, # P<0,05 КТР vs. МС+ДАТС, § P<0,05 МС vs. МС+ДАТС.

4.3.6. Нивои прооксидационих и антиоксидационих параметара у системској циркулацији

Ниво TBARS-а био је значајно смањен, док је ниво NO_2^- био значајно повећан код пацова са МетС-ом који су били третиран ДАТС-ом у поређењу са пацовима из КТР и МС групама. Поред тога, ниво O_2^- био је значајно повећан у МС групи у поређењу са КТР и МС+ДАТС (График 36).

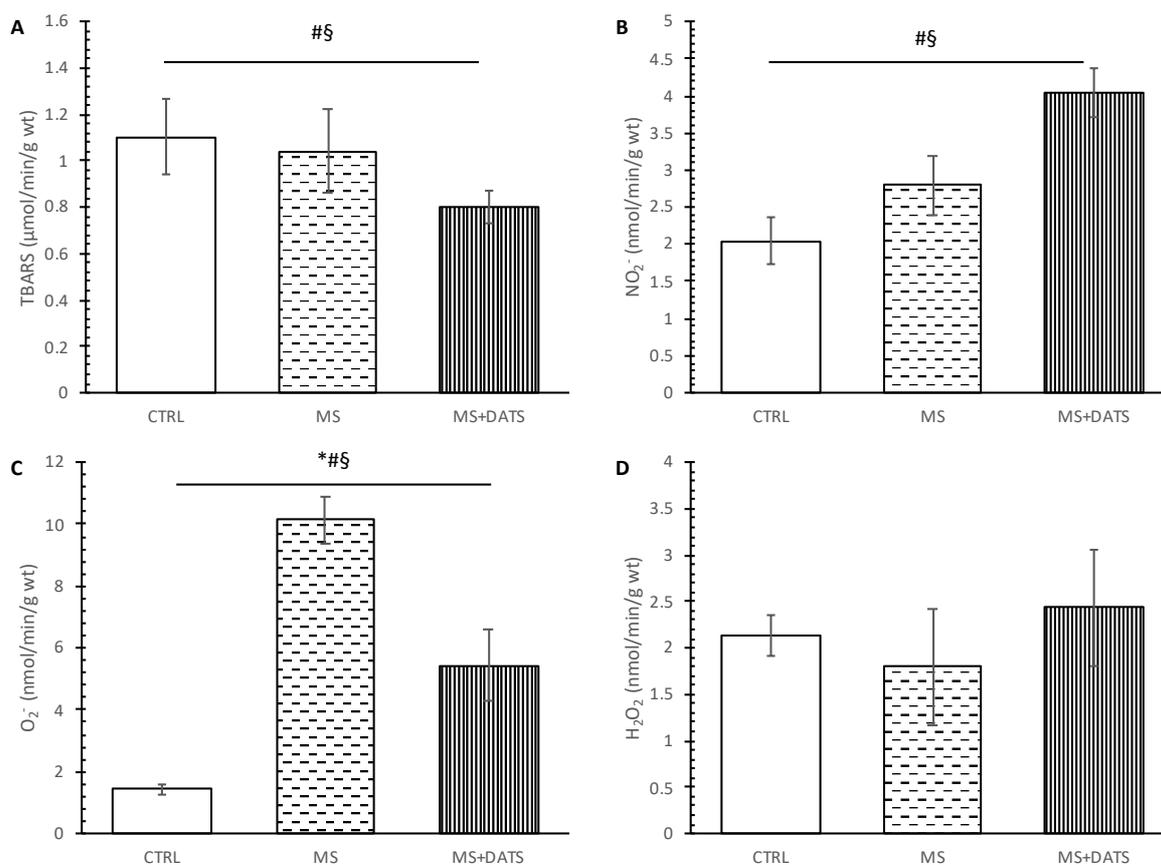


График 36. Ефекти ДАТС третмана код пацова са МетС-ом (А) индекс липидне пероксидације – мерен као TBARS, (Б) нитрити – NO_2^- , (В) супероксид анјон радикал – O_2^- и (Г) водоник пероксид – H_2O_2 . Вредности су приказане као средња вредност \pm СД, $n=12$, по групи. * $P<0,05$ КТР vs. МС, # $P<0,05$ КТР vs. МС+ДАТС, § $P<0,05$ МС vs. МС+ДАТС.

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

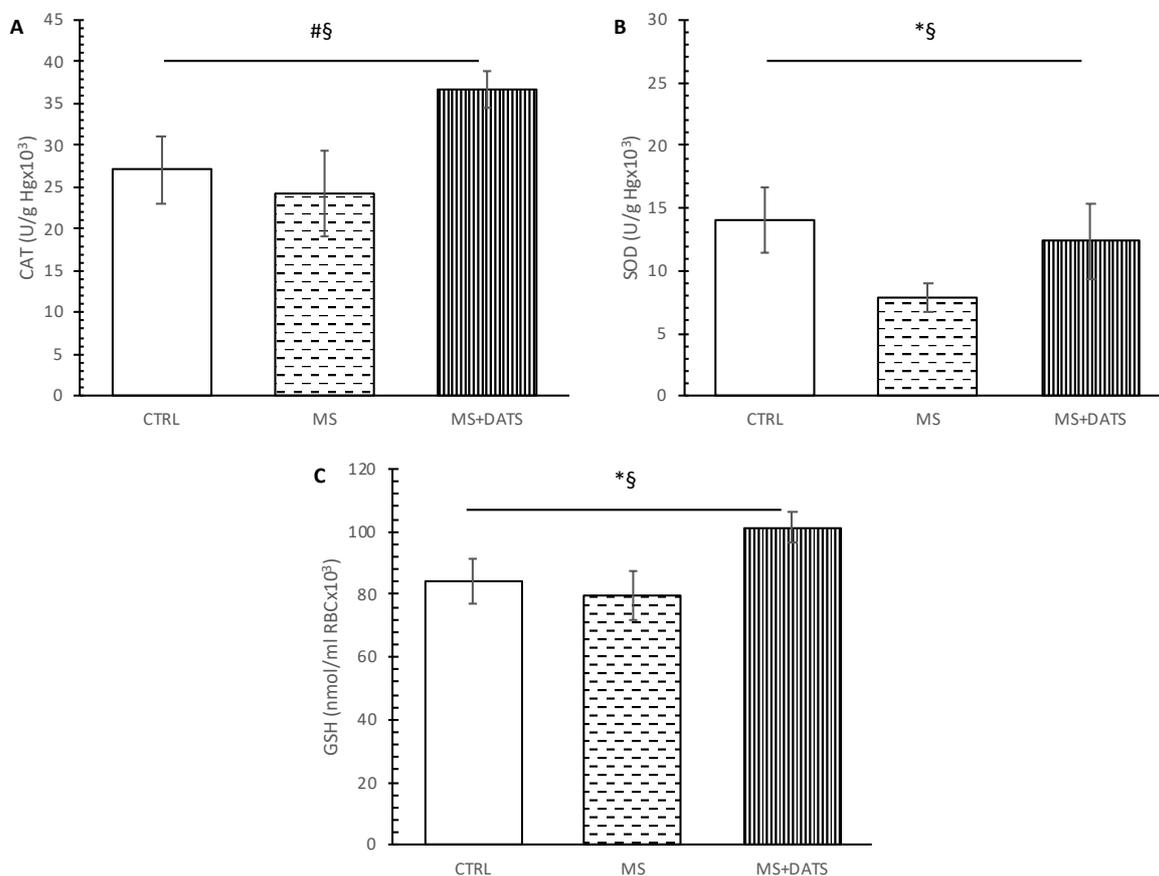


График 37. Ефекти ДАТС третмана код пацова са МетС-ом на активност (А) каталазе – CAT, (Б) супероксид дисмутазе – SOD и (В) редукованог глутатиона – GSH. Вредности су приказане као средња вредност \pm СД, n =12, по групи. * P<0,05 КТР vs. МС, # P<0,05 КТР vs. МС+ДАТС, § P<0,05 МС vs. МС+ДАТС.

4.3.7. Нивои хомоцистеина

Ниво хомоцистеина био је значајно повећан у МС групи у поређењу са КТР и МС+ДАТС групама (**График 38**).

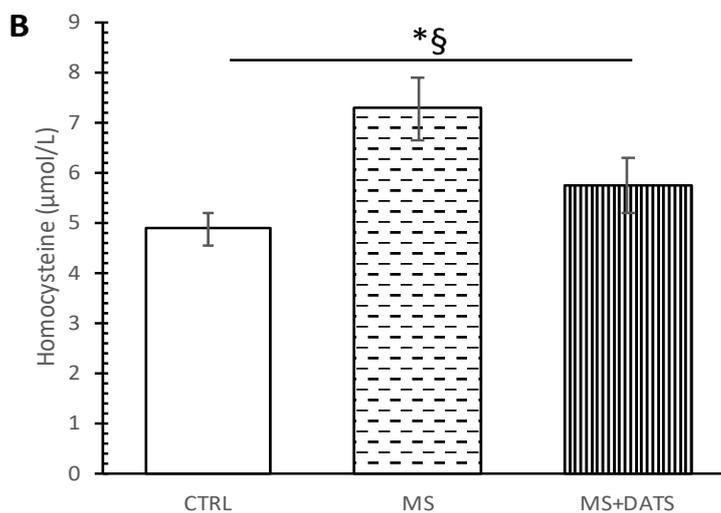


График 38. Ефекти ДАТС третмана код пацова са МетС-ом на нивое хомоцистеина у серуму – Нсу. Вредности су приказане као средња вредност \pm СД, $n=12$, по групи. * $P<0,05$ КТР vs. МС, # $P<0,05$ КТР vs. МС+ДАТС, § $P<0,05$ МС vs. МС+ДАТС.

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

4.3.8.1. Кардиодинамски параметри

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

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

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

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

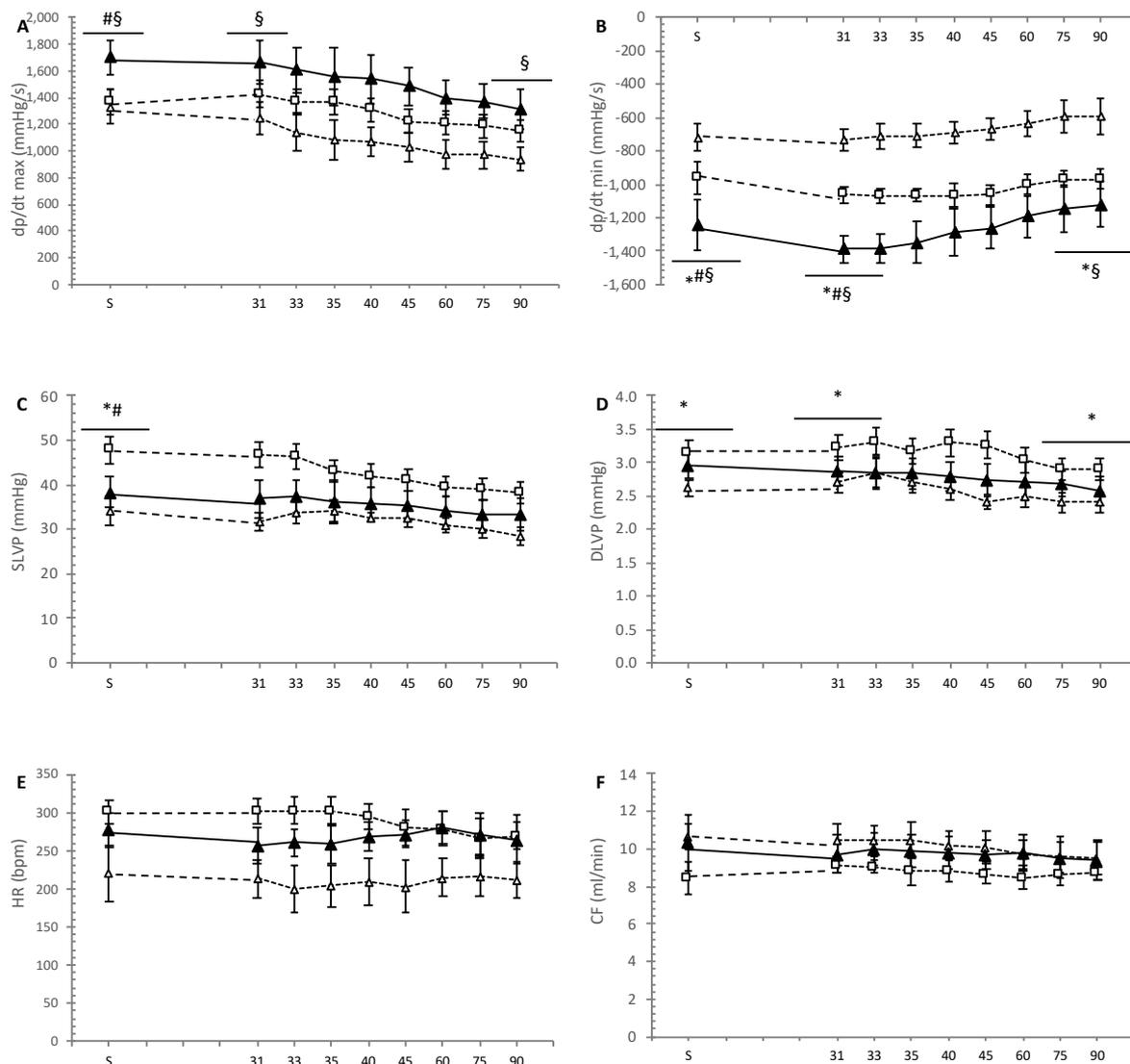


График 39. Ефекти третмана ДАТС-ом на (А) максималну стопу развоја притиска у левој комори – $dp/dt \text{ max}$, (Б) минималну стопу развоја притиска у левој комори – $dp/dt \text{ min}$, (В) систолни притисак у левој комори – SLVP, (Г) дијастолни притисак у левој комори – DLVP, (Д) фреквенцу срца –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

4.3.8.2. Прооксидациони параметри мерени у коронарном венском ефлуенту

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

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

		TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO₂⁻ (nmol/ml)	O₂⁻ (nmol/ml)	H₂O₂ (nmol/ml)
МС	S	18,15 \pm 2,04	115,58 \pm 6,09	39,82 \pm 5,42	40,72 \pm 3,92
	31	18,50 \pm 1,86	109,33 \pm 7,38	44,00 \pm 5,35	39,67 \pm 3,68
	90	21,47 \pm 1,52	98,73 \pm 15,69	37,62 \pm 3,76	36,14 \pm 2,93
МС + ДАТС	S	16,01 \pm 2,00	124,43 \pm 11,80	27,46 \pm 5,95	28,79 \pm 3,98
	31	15,32 \pm 1,20	129,81 \pm 15,77	29,99 \pm 5,32	30,10 \pm 2,23
	90	15,92 \pm 2,54	124,46 \pm 7,81	31,35 \pm 4,68	28,12 \pm 2,33

Разлике између нивоа праћених параметара оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту код здравих нетретираних (КТР), нетретираних пацова са МетС-ом (МС) и третираних пацова са МетС-ом (МС+ДАТС) приказане су на **Графику 40**. Значајно виши нивои ТВАРС и H_2O_2 примећени су у МС групи у поређењу са КТР групом. Ниво O_2^- био је значајно смањен, док је ниво NO_2^- био значајно повећан у МС+ДАТС групи.

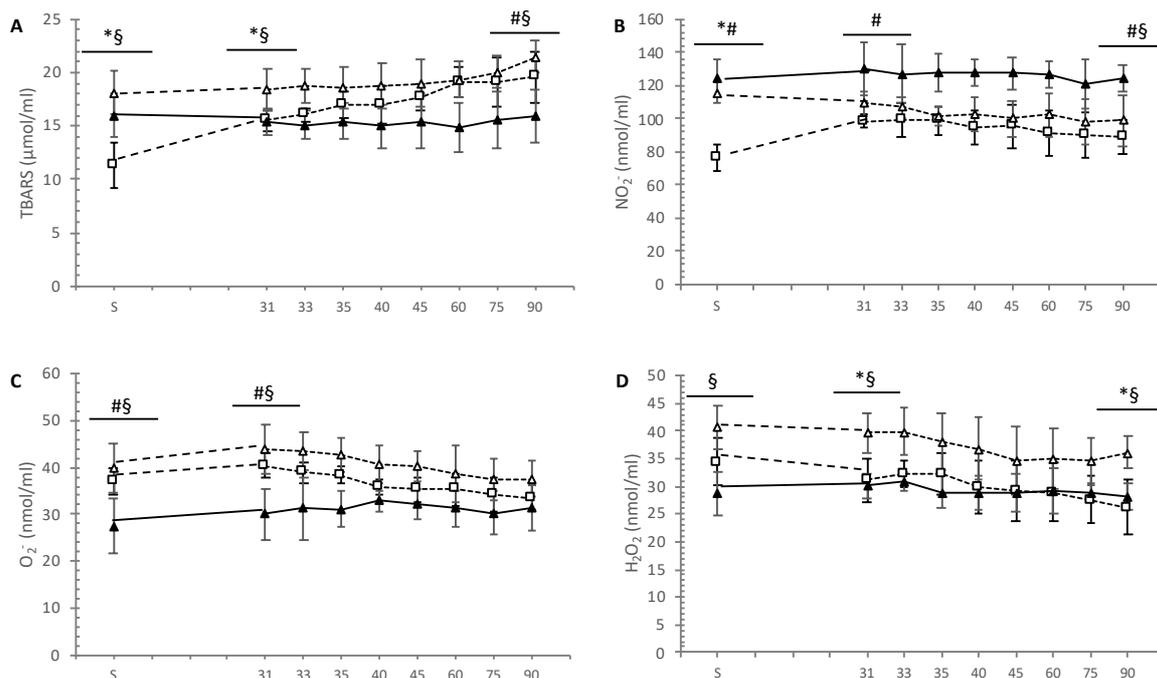
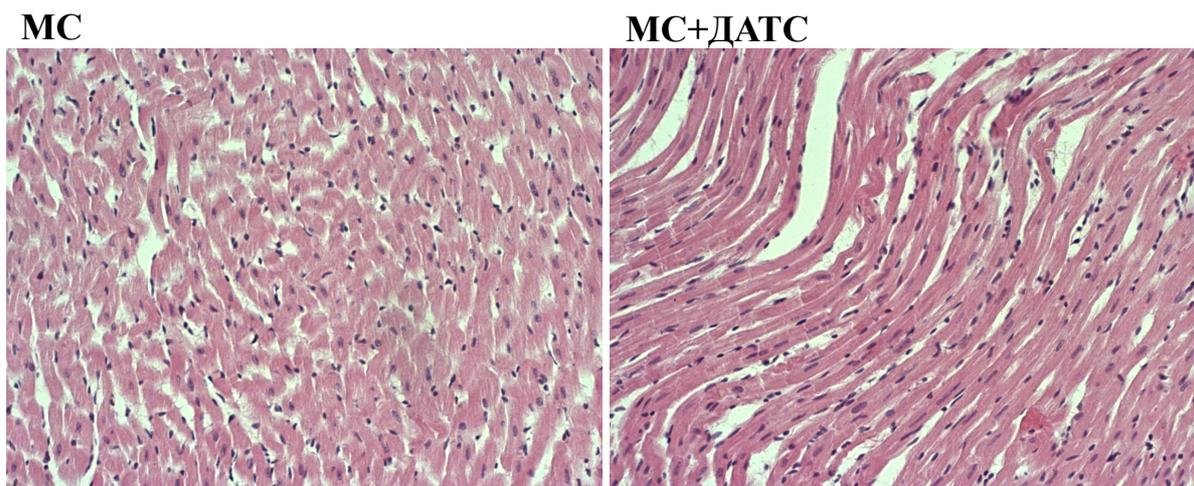


График 40. Ефекти третмана ДАТС-ом на (А) индекс липидне пероксидације – мерен као ТВАРС, (Б) нитрити – NO_2^- , (В) супероксид анјон радикал – O_2^- и (Г) водоник пероксид – H_2O_2 . Здрави, нетретирани пацови - КТР (---□---), нетретирани пацови са МетС-ом - МС (---△---) и третирани пацови са МетС-ом - МС+ДАТС (—▲—). Вредности су приказане као средња вредност ± СД, n = 6, по групи. * P<0,05 КТР vs. ДМ, # P<0,05 КТР vs. ДМ+ДАТС, § P<0,05 ДМ vs. ДМ+ДАТС.

4.3.8.3. Бојење срчаног ткива хематоксилин/еозином

Као што је приказано на **Слици 16**, на ткивима срца, пацова из МС групе може се уочити да су некротична мишићна влакна, неорганизована и без јасно дефинисаних граница. Третман ДАТС-ом код пацова са МетС-ом, умањио је губитак миокардијалних влакана и миокардну хипертрофију.



Слика 16. Репрезентативни приказ обојеног ткива миокарда хематоксилин/еозин техником, срца која су претходно била подвргнута деведесетоминутној ретроградној перфузији (МС – нетретирани пацови са МетС-ом и МС+ДАТС – третирани пацови са МетС-ом), увећање 200 х; скала 2 mm.

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

4.3.9.1. Кардиодинамски параметри

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

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

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

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

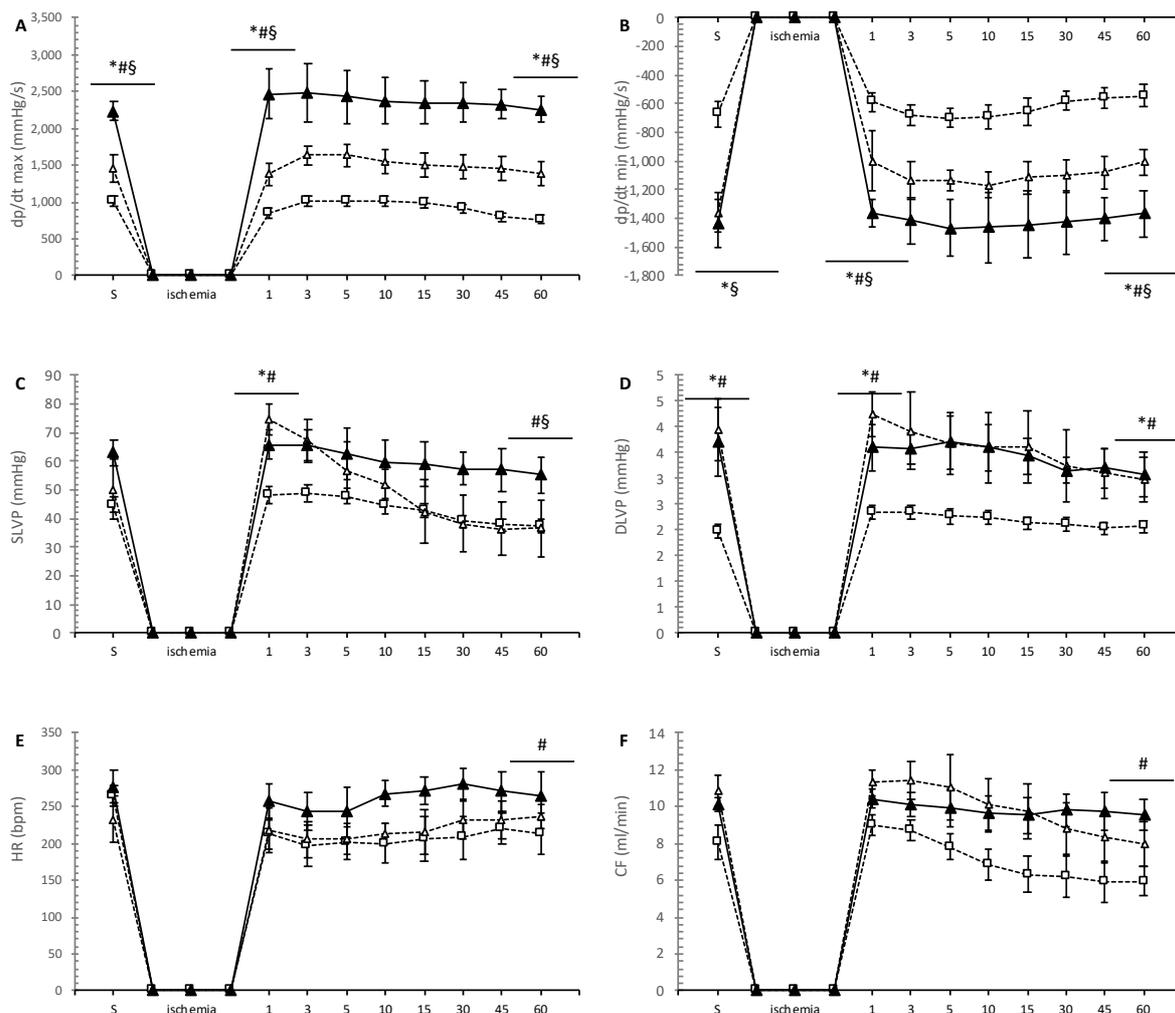


График 41. Ефекти третмана ДАТС-ом на *ex vivo* индуковану И/Р повреду миокарда пацова (А) максимална стопа развоја притиска у левој комори – $dp/dt \max$, (Б) минимална стопа развоја притиска у левој комори – $dp/dt \min$, (В) систолни притисак у левој комори – SLVP, (Г) дијастолни притисак у левој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

4.3.9.2. Прооксидациони параметри мерени у коронарном венском ефлуенту

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

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

		TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO₂⁻ (nmol/ml)	O₂⁻ (nmol/ml)	H₂O₂ (nmol/ml)
МС+ И/Р	S	22,33 ± 1,45	83,32 ± 11,74	44,15 ± 5,10	31,96 ± 4,69
	1	26,16 ± 3,25	80,07 ± 2,50	43,50 ± 5,07	35,02 ± 3,34
	60	23,19 ± 3,45	66,53 ± 16,71	36,12 ± 5,88	26,35 ± 4,63
МС+ ДАТС+ И/Р	S	8,29 ± 1,54	126,24 ± 12,13	22,11 ± 5,93	18,61 ± 6,25
	1	9,10 ± 1,71	138,24 ± 14,92	22,32 ± 2,06	28,63 ± 1,79
	60	7,94 ± 1,32	123,06 ± 7,84	19,73 ± 6,86	23,40 ± 5,48

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

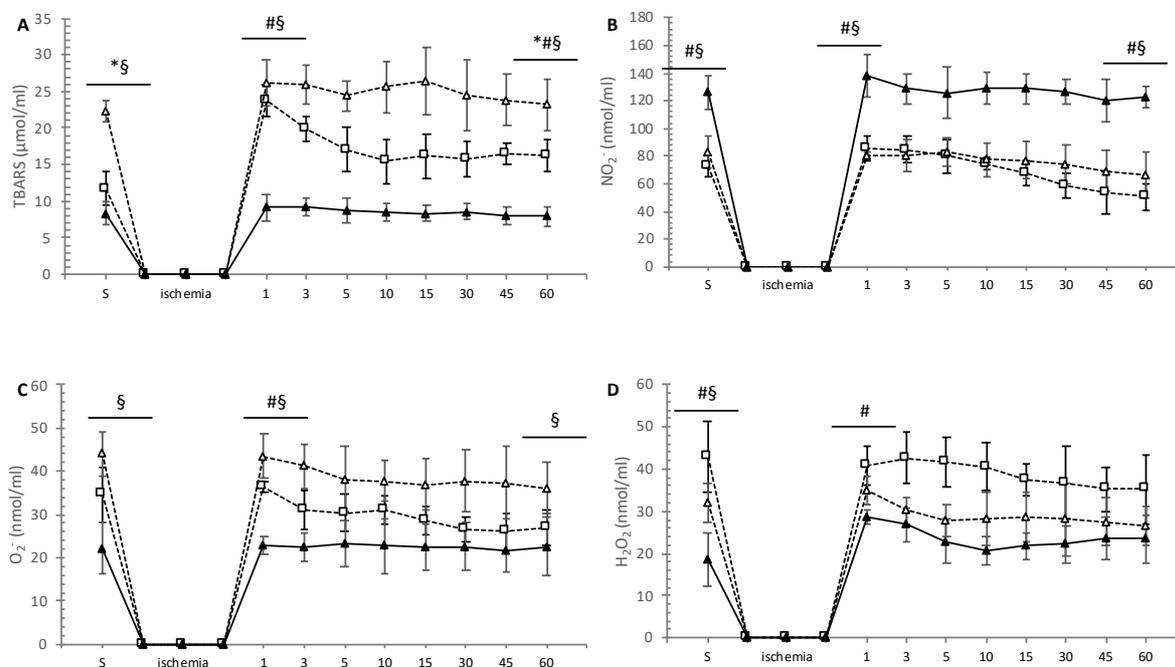
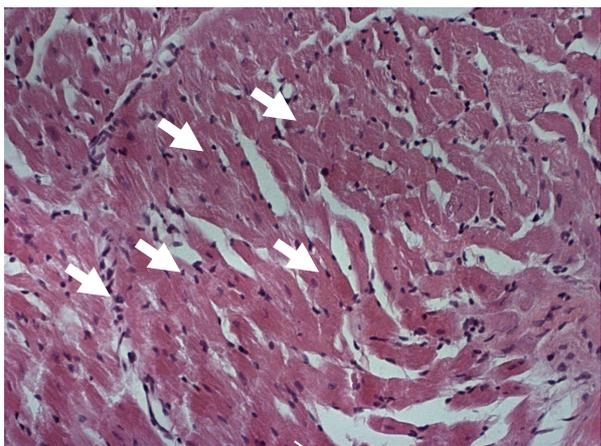


График 42. Ефекти третмана ДАТС-ом на *ex vivo* индуковану И/Р повреду изолованог срца пацова (А) индекс липидне пероксидације – мерен као ТВАРС, (Б) нитрити – NO_2^- , (В) супероксид анјон радикал – O_2^- и (Г) водоник пероксид – H_2O_2 . Здрви, нетретирани пацови - И/Р (---□---), нетретирани пацови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

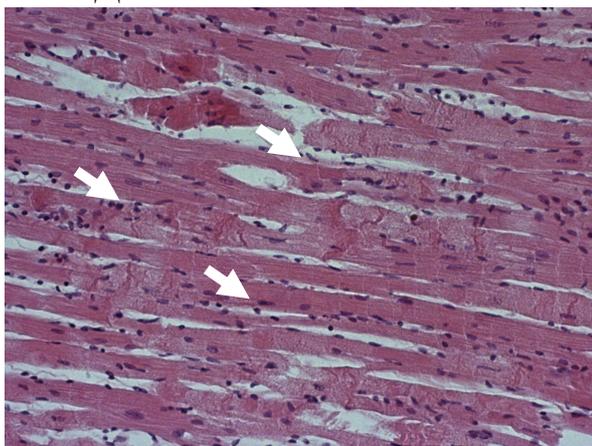
4.3.9.3. Бојење срчаног ткива хематоксилин/еозином

Као што је приказано на **Слици 17** у МС+И/Р групи, уочава се едем, отицање ћелија и широка зона захваћена некрозом ткива уз одвајање мишићних влакана. У групи пацова који су третирани ДАТС-ом присутан је знатно блажи едем и смањена површина захваћена некрозом.

МС+И/Р



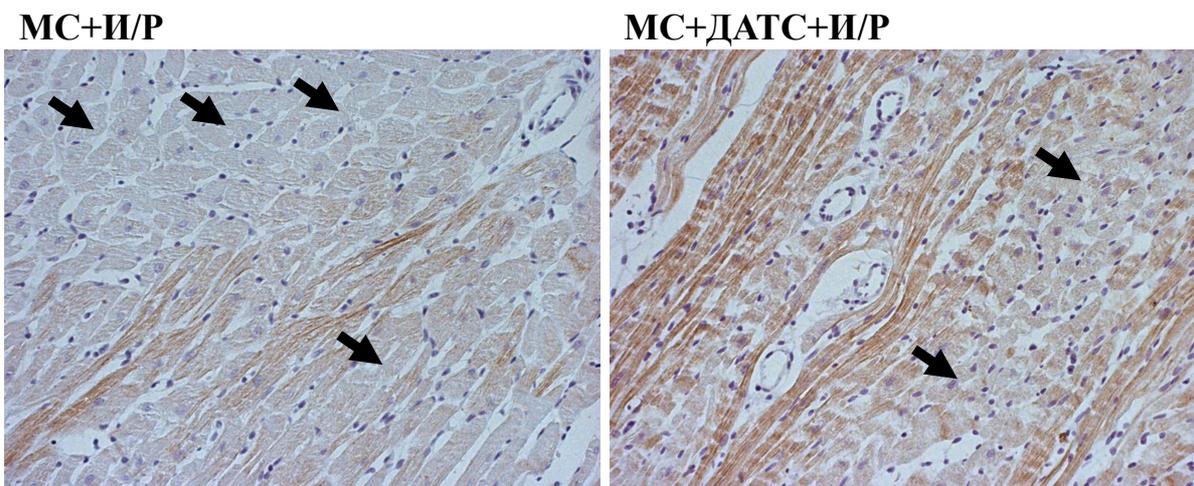
МС+ДАТС+И/Р



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

4.3.9.4. Бојење тропонина Т у ткиву миокарда

Као што је приказано на **Слици 18** у МС+И/Р групи, уочава се јасан губитак бојења сТnТ уз врло мало позитивног (смеђег) бојење, док се нешто више смеђе боје уочава у МС+ДАТС+И/Р групи.



Слика 18. Репрезентативни приказ обојеног сТnТ у ткиву срца пацова која су претходно била подвргнута *ex vivo* изазваној И/Р повреди (МС+И/Р – нетретирани пацови са МетС-ом и МС+ДАТС+И/Р – третирани пацови са МетС-ом), увећање 200 х; скала 2 mm.

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

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

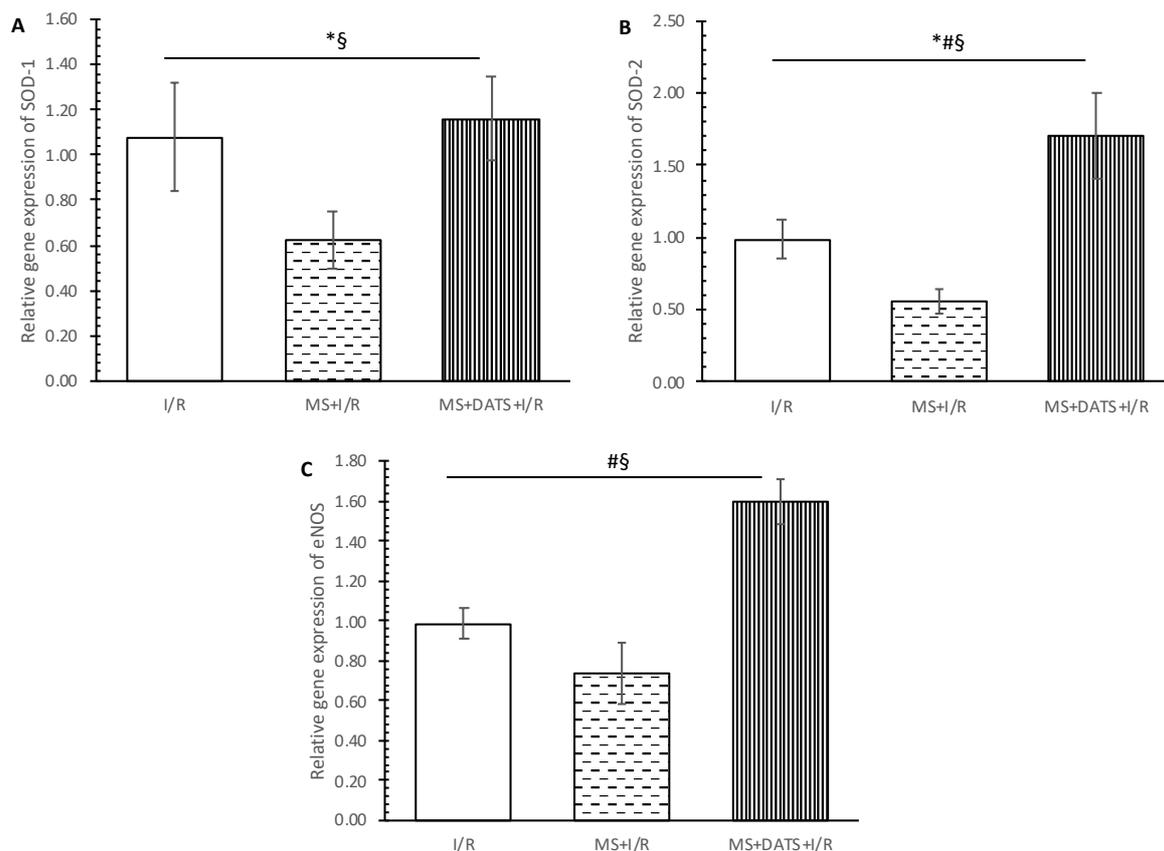


График 43. Ефекти ДАТС третмана на релативну експресију антиоксидационих гена (А) супероксид дисумтаза 1 – SOD-1, (Б) супероксид дисумтаза 2 – SOD-2, (В) ендотелна азот моноксид синтаза – eNOS, у левој комори пацова са МетС-ом након *ex vivo* изазване И/Р повреде. И/Р - здрави, нетретирани пацови, МС+И/Р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

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

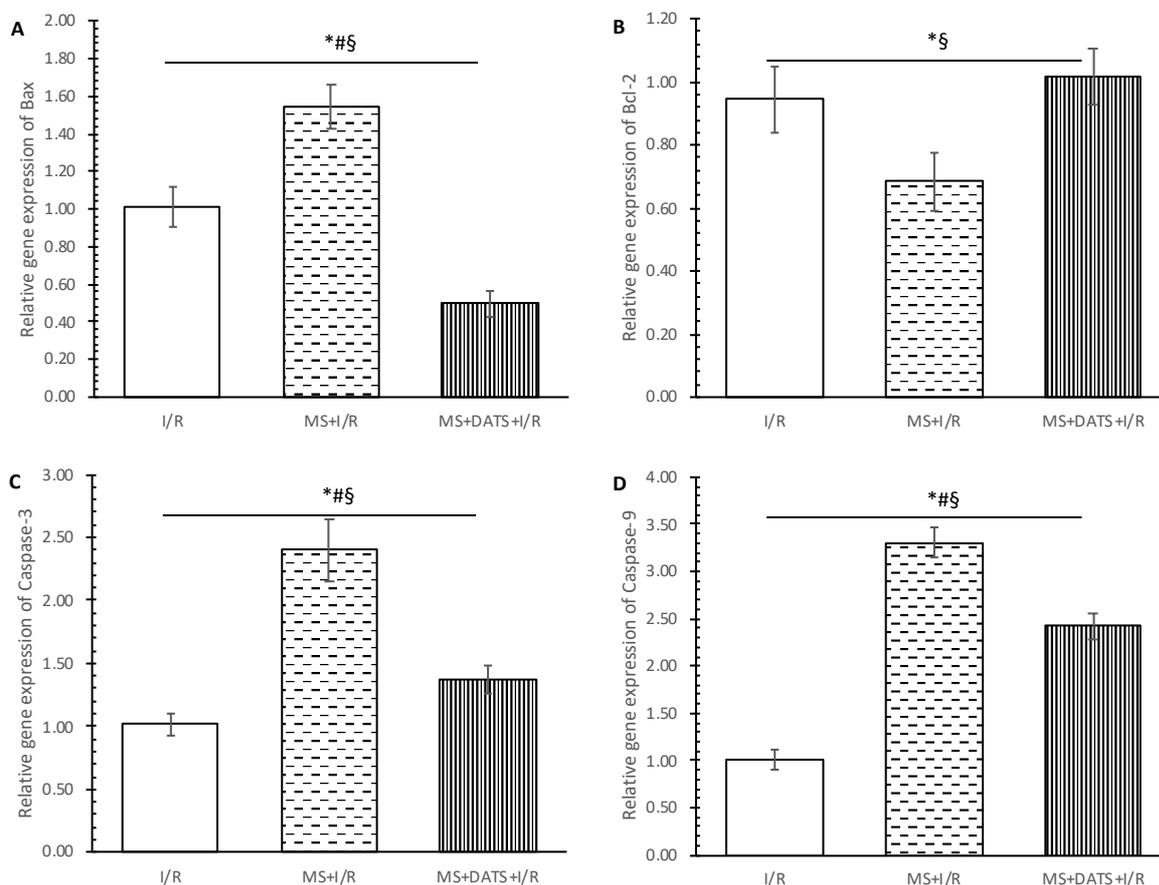


График 44. Ефекти ДАТС третмана на релативну експресију (анти)апоптотских гена (А) Bcl-2, (Б) Вах, (В) каспаза-3 и (Г) каспаза-9, у левој комори пацова са МетС-ом након *ex vivo* изазване И/Р повреде. И/Р - здрави, нетретирани пацови, МС+И/Р - нетретирани пацови са МетС-ом и МС+ДАТС+И/Р - третирани пацови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

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

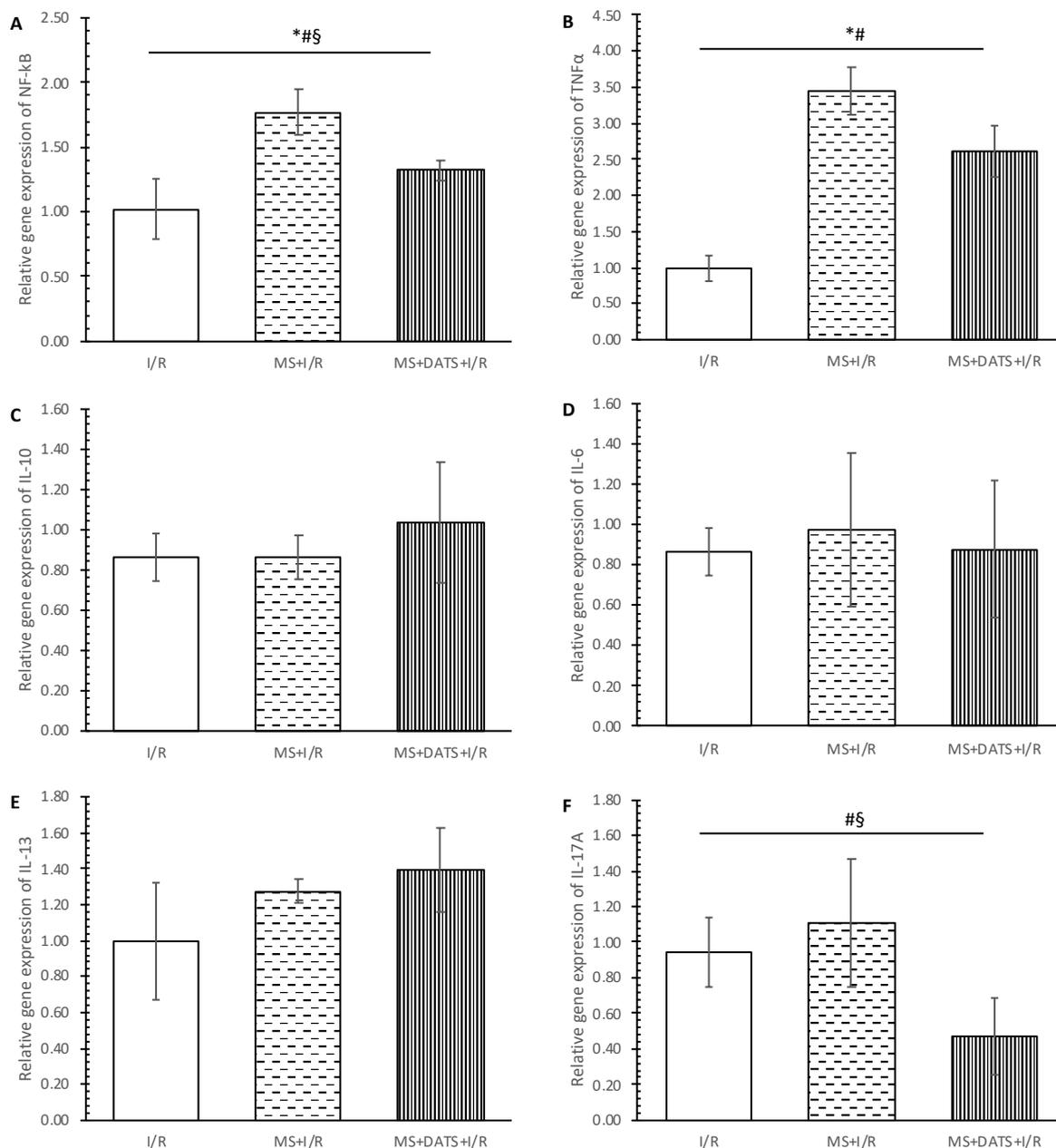


График 45. Ефекти ДАТС третмана на релативну експресију (анти)инфламацијских гена (А) NF-κB, (Б) TNF-α, (В) IL-10, (Г) IL-6, (Д) IL-13 и (Ђ) IL-17A у левој комори пацова са MetC-ом након *ex vivo* изазване И/Р повреде. И/Р - здрави, нетретирани пацови, MS+И/Р - нетретирани пацови са MetC-ом и MS+ДАТС+И/Р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

V

ДИСКУСИЈА

5. ДИСКУСИЈА

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

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

Најпре су код здравих пацова третираних ДАТС-ом примећени позитивни функционални ефекти на срцу, који су потом и потврђени мерењем антиоксидационих, антиинфламацијских и антиапоптотских параметера. Осим тога, показано је и да ДАТС не утиче на ниво липида, глукозе ни инсулина код здравих пацова. На основу опажених резултата и литературних података који указују да H_2S утиче на функцију и повреду бета ћелија панкреаса, која је у основи патогенезе дијабетеса тип 1, били смо заинтересовани

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

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

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

5.1. ЕФЕКТИ ДИАЛИЛ ТРИСУЛФИДА НА ЗДРАВЕ ПАЦОВЕ

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

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

Алитридијум (лат. *Allitridium*, у чијем саставу је процентуално најзаступљенији ДАТС) је још пре скоро 30 година у студији спроведеној у Кини описан као изузетно безбедан агенс (198). Са друге стране, алицин је описан као главни иритант у сировом белом луку, док су хидрофобне супстанце (међу којима је и ДАТС) изоловане из алицина токсичније од хидрофилних једињења (199). Током протеклих деценија, многе студије на животињама и људима су проучавале безбедност белог лука и његових деривата. У студијама које су испитивале ефекте сировог белог лука код људи, 15 g током 3,5 недеље или 10 g током 8 недеља, нису забележени никакви нежељени ефекти (200, 201). Иако америчка агенција за храну и лекове сматра да је бели лук безбедан (енгл. *generally regarded as safe*, GRAS), као и са свим биолошки активним супстанцама, постоје одређене мере предострожности које се морају поштовати да би се смањио ризик од нежељених ефеката. Приликом конзумирања белог лука, мора се водити рачуна о лековима који се користе (због могућих интеракција), као и количини конзумираног белог лука. Такође, значајно је напоменути да се његова употреба не препоручује пацијентима који су на терапији инхибиторима протеаза или на антикоагулатној

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

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

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

Након тронедељног третмана ДАТС-ом, мерени хомоцистеина у серуму здравих пацова. Серумски ниво хомоцистеина није се променио у групи пацова третираних ДАТС-ом (**График 9**).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

У овом делу студије, испитивани су ефекти ДАТС-а на миокард. У ту сврху, након тронедељне употребе ДАТС-а, најпре је *in vivo* мерена срчана функција помоћу ултразвука. Добијени резултати показују да ДАТС има улогу у очувању срчане функције јер је побољшао IVSd и FS код здравих пацова (Слика 5, Табела 2). Главна предност ДАТС-а је значајно повећање FS што доводи до побољшања систолне функције и контрактилности миокарда код здравих пацова. Све добијене вредности су у складу са претходно наведеним базалним ехокардиографским вредностима за одрасле мужјаке пацова (216). Иако се зна да ДАТС индукује вазодилатацију (217), након 3 недеље конзумације код здравих пацова, крвни притисак и срчана фреквенца су били непромењени (Фигура 11). Другим речима, хронична употреба ДАТС-а не утиче на крвни притисак и срчану фреквенцу код нормотензивних пацова.

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

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

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

Имајући у виду све до сада наведене резултате и да је у обе групе срчано ткиво било нормалне морфологије (**Слика 6**), као и да се однос између масе срца и телесне тежине није разликовао између група (**График 2**), може се закључити да ДАТС није кардиотоксичан и да позитивно утиче на миокард и читав срчани циклус. Такође, ови резултати подржавају ранији закључак да је ДАТС сигуран и нетоксичан агенс.

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

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

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

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

Наши резултати показују да су кардиодинамски параметри у И/Р групи значајно смањени током периода реперфузије у поређењу са вредностима пре исхемије. Уочена су смањена инотропна и луситропна својства, као и депресија срчане функције, коронарног протока и срчане фреквенце у И/Р групи. Насупрот томе, у групи пацова који су били подвргнути хроничној примени ДАТС-а, кардиодинамски параметри имали су мање флукуација током периода реперфузије (**Табела 5**). Такође, наши резултати показују да су 3 недеље прекондиционирања ДАТС-ом биле довољне да се уоче позитивни ефекти на контрактилну функцију, инотропно и луситропно својство и да у периоду реперфузије дође до опоравка систолне функције и коронарног протока (**График 12**).

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

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

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

Анализом хистолошких препарата ткива миокарда, утврђено је да *ex vivo* индукована И/Р повреда мења структуру срца, што се делимично може спречити ДАТС третманом (**Слика 7**). У групама пацова који су третирани ДАТС-ом (ДАТС+И/Р), примећен је смањен едем, као и умањено оштећење мишићне мембране, језгра и попречних мишићних влакана миокарда. Као последица повећане продукције слободних радикала, вакуолизација ћелија је у већој мери присутна у И/Р групи. Морфолошки резултати, срчаног ткива су у сагласности са претходно разматраним кардиодинамским и оксидационим параметрима, али за разоткривање некрозе миокарда у *post-mortem* срчаном прегледу осетљивије и специфичније је бојење срца тропонином. Некроза миокарда се може дијагностификовати одређивањем нивоа cTnT и cTnI. У неколико експерименталних студија на различитим моделима инфаркта миокарда показано је да је повећање cTnT у серуму у корелацији са величином инфаркта (182, 224). Такође, у експерименталној студији на псима, примећено је да се нивои тропонина у серуму повећавају паралелно са губитком тропонина у исхемијском ткиву миокарда (225). Већи губитак срчаног тропонина уочен је у нетретираној у поређењу са групом пацова третираних ДАТС-ом (И/Р vs. ДАТС+И/Р) (**Слика 8**).

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

SOD је металоензим који катализује дисмутацију супероксид анјон радикала у кисеоник и водоник пероксид, а поред GSH-Px штити ћелије од оксидационих повреда.

Ови ензими истовремено обезбеђују систем одбране за преживљавање аеробних организама. Резултати ове студије су показали да је након И/Р повреде експресија гена за SOD-2 значајно повећана у групи пацова третираних ДАТС-ом у поређењу са нетретираном групом. С друге стране, релативна експресија гена за SOD-1 била је слична у обе испитиване групе (**График 14**). Ови резултати указују да би прекондиционирање ДАТС-ом могло ублажити повреду миокарда изазвану И/Р, највероватније кроз повећање антиоксидационог капацитета миокарда. Уједно, ово може бити јасан показатељ антиоксидационог профила ДАТС-а у срчаном ткиву, јер SOD-2 чини више од 70% активности SOD у срцу и преко 90% активности у срчаним миоцитима. Осим тога, NOS са три изоформе, као што су nNOS, eNOS и iNOS, катализује формирање NO (226). У ранијим студијама показано је да ДАТС штити ендотелне ћелије и повећава експресију eNOS, као и биолошку расположивост азот монооксида након коронарне повреде (209). Такође, наши резултати су показали да је eNOS значајно повећан код пацова третираних ДАТС-ом (**График 14**). eNOS утиче на повећање нивоа NO, што је такође у складу са претходно дискутованим резултатима у плазми и коронарном венском ефлуенту. Према томе, eNOS вероватно повећава биорасположивост NO и индукује вазодилатацију у ДАТС+И/Р групи. *Premodore* и сарадници су показали да након примене ДАТС може, више од 30 минута да утиче на активирање eNOS и чак 2 сата након примене да повећава метаболите азот монооксида (221). Такође, примећено је да H₂S активира eNOS и повећава биолошку расположивост NO кроз механизам зависан од Akt (208, 227).

Током И/Р повреде некроза миокарда одговорна је за смрт ћелија. Међутим и апоптоза делимично доприноси укупној ћелијској смрти миоцита током периода реперфузије и представља главно упориште оштећења ткива након И/Р повреде (228, 229). У неколико студија је сугерисано да регулација појединих антиапоптотских фактора укључујући Bcl-2 ген и регулацију проапоптотских гена као што је Вах игра важну улогу у ”спашавању” исхемијског ткива (230, 231). На основу резултата наше студије, може се рећи да је ДАТС, барем делимично, регулатор апоптозе. У нашем истраживању, релативна генска експресија Bcl-2 (антиапоптотски параметар) је повећана, док је Вах (проапоптотски параметар) смањена код здравих пацова који су били третиран ДАТС-ом, али је експресија обе каспазе -3 и -9 била иста у И/Р и ДАТС+И/Р групама (**График 15**). Ови резултати су у сагласности са резултатима

добијеним имунохистохемијским бојењем. Показано је да Bcl-2 регулише стварање ROS-а (посебно супероксид анјон радикала) јер смањује ћелијску смрт изазвану прооксидационим агенсима (232). Антиапоптотска улога Bcl-2 је добро позната у миокарду. Потврђено је да Bcl-2 штити миокард од апоптозе индуковане И/Р повредом (233, 234), а да исхемијско прекондиционирање смањује апоптозу тако што тако мења експресију Bcl-2, Вах и/или смањује њихов однос (235, 236).

Током исхемије и реперфузије, новонастале реактивне врсте које учествују у повреди миокарда, активирају редокс осетљиви транскрипциони фактор NF-κB и активирају експресију различитих интерлеукина (нпр. 1β, 6), TNF-α и других инфламацијских медијатора (237). Такође, TNF-α и IL-1β, уједно индукују и активацију NF-κB (237, 238). У многобројним студијама потврђено је да исхемија праћена реперфузијом активира каскаду догађаја који укључују и активацију NF-κB и производњу инфламацијских цитокина (239, 240). На основу резултата ове студије, примећено је да ДАТС третман доводи до смањења релативне експресије гена за NF-κB, TNF-α и IL-6, и повећане експресије гена за IL-10, али да не доводи до разлика у релативној експресији гена за IL-13 и IL-17A (**График 16**). Смањење TNF-α и IL-6 услед терапије ДАТС-ом је у складу са побољшаном функцијом миокарда и антиоксидационом активношћу. *Sodha* и његове колеге су показали да су TNF-α, IL-6 и IL-9 значајно смањени код експерименталних свиња које су третиране сулфидом 10 минута пре акутне оклузије која је трајала 60 минута, као и током реперфузије која је трајала такође 60 минута (70). Антиинфламацијски ефекти H₂S и његових донора су доказани у студијама на срцу али и другим органима (241, 242).

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

Досадашње студије су у корелацији са нашим резултатима, тако да њихови резултати иду у прилог томе да H₂S и његови донори, примењени пре, током или након периода реперфузије, обезбеђују значајну заштиту миокарда. H₂S и његови донори ограничавају величину инфаркта, додатно побољшавајући глобалну и регионалну функцију леве коморе, побољшавајући коронарну микроваскуларну функцију и

ограничавајући инфламацијски одговор на И/Р повреду у различитим моделима инфаркта миокарда (69, 147, 243, 244).

5.2. ЕФЕКТИ ДИАЛИЛ ТРИСУЛФИДА НА ПАЦОВЕ СА ДИЈАБЕТЕСОМ ТИП 1

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

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

Третман пацова са дијабетесом ДАТС-ом (40 mg/kg *per os*, сваки други дан током три недеље) није утицао на физичке симптоме као што су губитак тежине, полидипсија и хипергликемија, док су нивои глукозе наше код дијабетичних пацова били значајно смањени (**График 17**). Механизми укључени у потенцијал ДАТС-а да смањи хипергликемију још увек нису у потпуности разјашњени. Међутим, директно или индиректно повећање секреције инсулина из β -ћелија панкреаса или ослобађање везаног инсулина, свакако су укључени у механизам којим ДАТС остварује антидијабетски ефекат (246). У складу са нашим резултатима, неколико студија је показало хипогликемијско својство белог лука, приписујући тај ефекат углавном једињењима типа алицина као што је ДАТС (247, 248).

Као што је раније споменуто, H₂S утиче на функцију и посредује у повреди β -ћелија панкреаса, која је у патогенези Т1ДМ (13, 249). Иако прецизна функционална

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

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

Једна од највећих непознаница и контроверзи око H_2S односи се на мерење (квантификацију) његових концентрација у биолошким системима, јер они у многоме зависе од метода које су употребљене приликом детерминације, типа ткива, али и многих других фактора (107). Механизми одговорни за ову инхибицију слични су онима који су укључени у антидијабетске ефекте ДАТС-а који су разматрани у претходном поглављу.

Код експерименталних модела дијабетеса, нивои H_2S у циркулацији су или смањени или имају тенденцију смањења (98, 109). Добро је познато да H_2S игра неколико заштитних улога у кардиоваскуларном систему, утичући на ангиогенезу, вазодилатацију, инхибицију леукоцитне адхезије и процесе смрти ћелија (20). Код ендотелне дисфункције узроковане хипергликемијом, ензими који производе H_2S (CBS и/или CSE) могу, али и не морају бити повишени у различитим моделима дијабетеса и

то најчешће зависи од тежине болести и природе самог експерименталног модела (98, 109). Парадокс са непромењеним или повећаним нивоима H_2S у ткивима и нижим нивоима H_2S у циркулацији највероватније настаје јер ендотелне ћелије у стању хипергликемије ”конзумирају” више H_2S услед повећаног стварања ROS-а (109), које је уочено и у нашем истраживању. Ова повећана потрошња H_2S може се смањити тако што се ћелије третирају антиоксидансима или агенсима за одвајање митохондрија (енгл. *mitochondrial uncoupling agents*). Другим речима, повећана продукција митохондријалних ROS-а је узрок релативног недостатка H_2S у ендотелним ћелијама у хипергликемији (107).

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

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

Резултати појединих студија сведоче о томе да дијабетес може да узрокује оксидациони стрес кроз неколико механизма: аутооксидацију глукозе, формирање споредних продуката гликације и стимулацију полиола. Још један од могућих механизма је повећање слободних масних киселина и лептина који могу допринети и генерацији ROS-а (254). Системско повећање ROS-а и RNS-а, као и смањење ензимске

и неензимске антиоксидационе одбране ћелија, кључни су догађаји у развоју компликација у дијабетесу (255). Због тога су и у нашој студији, мерени нивои прооксидационих и антиоксидационих параметара у плазми и лизату еритроцита. Како је и очекивано, у ДМ групи уочена је повећана продукција O_2^- и смањена активност свих измерених антиоксидационих параметара у односу на КТР групу (**Графици 20 и 21**). Уочено смањење активности SOD погодује повећању концентрације O_2^- . O_2^- као изузетно реактиван радикал може да реагује са NO и формира цитотоксични кисеонични радикал познат као пероксинитрит ($ONOO^-$). Инактивација NO са O_2^- може довести до вазоконстрикције, повећања крвног притиска и смањења гломеруларне филтрације (256).

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

Услед хроничне хипергликемије долази до повећане концентрације реактивних кисеоничних врста и смањене ензимске и неензимске системске оксидационе заштите. Благотворни ефекти ДАТС-а су повезани са антиоксидационим капацитетом овог једињења. Главни састојци белог лука различито утичу на GSH у црвеним крвним зрнацима, али сви повећавају ниво интрацелуларног GSH, који генерално зависи од цистеина повећањем локалне концентрације Nrf2 у једру. Антиоксидациони потенцијал зависи од броја сумпорних атома, па се стога ДАТС, са своја три атома сумпора, издваја као најснажнији и најпотентнији, а за њим следе ДАДС и ДАС, са два, односно једим атомом сумпора (257). Третман ДАТС-ом може изазвати кардиопротективне ефекте тако што се супротставља оксидационом стресу који је изазван хипергликемијом, уз посредовање H_2S и супримира оксидациони стрес који је стимулисан c-JN-терминалним киназама (енгл. *c-Jun N-terminal kinases*, JNKs) и NF-κB сигнализацијом паралелно са активирањем Nrf2 пута чиме се повећава експресија гена многих антиоксидационих параметара (258, 259).

Међутим, за разлику од наше студије, у неколико студија нису откривени хипогликемијски ефекти код дијабетичних животиња третираних H_2S . Опречни резултати су вероватно последица испитивања различитих H_2S донора који су се

користили у студијама (108, 260). Такође, у неколико студија је показано да замена H₂S фармаколошком суплементацијом или аденовирусном прекомерном експресијом CSE, смањује производњу ROS у митохондријима и штити ћелије од хипергликемијског оштећења (109). На основу наших резултата, може се претпоставити да ДАТС вероватно изазива смањење прооксидационих параметара унутар ендотелних ћелија при чему се физиолошка функција митохондрија одржава.

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

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

Наше истраживање указује на статистички значајно повећање односа телесне тежине/масе срца, LVPWd и LVPWs, као и смањење FS што резултира срчаном кардиомиопатијом коју карактерише хипертрофија у ДМ групи пацова. Међутим, код дијабетичних пацова третираних ДАТС-ом примећена је побољшана дијастолна и систолна функција срца која се јасно уочава на основу вредности IVSd, LVPWd, LVPWs, FS, као и смањеним развојем срчане хипертрофије (**Слика 10, Табела 7, График 18**). Поред тога, главна предност ДАТС-а је значајно повећање FS што доводи до побољшања систолне функције и контракције миокарда код пацова са дијабетесом.

Код пацова којима је СТЗ индукован дијабетес, примећена је систолна и дијастолна дисфункција. Као што је раније наведено, смањена *ex vivo* контракција и релаксација (која се огледа кроз вредности dp/dt max и dp/dt min параметара) се може уочити након 15 дана, као и након 12 недеља од инјекције стрептозотоцина (261, 262). У нашој студији, срчана функција у ДМ групи значајно слаби током деведесетоминутне перфузије, што се посебно може приметити и кроз смањење вредности параметара dp/dt min, SLVP и HR. С друге стране, у групи третираној ДАТС-ом (ДМ+ДАТС), вредности кардиодинамских параметара биле су скоро константне и без значајног смањења током перфузије. Другим речима, функционална карактеристика срца, праћена кроз

кардиодинамске параметре, очувана је код ДАТС третираних пацовима са дијабетесом (Табела 8 и График 23). Наши резултати указују да ДАТС значајно побољшава индекс контрактилности и обезбеђује довољну контрактилну резерву која може да смањи штетне ефекте дијабетеса на функцију миокарда.

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

Сви ови резултати заједно показују да повећање ROS-а (у коронарном венском ефлуенту и плазми) уз смањење антиоксидационих параметара могу бити укључени у низ догађаја који на самом крају доводе до стрептозотоцином индукованог дијабетеса (и дијабетесне кардиомиопатије), а да су протективни ефекти ДАТС-а највероватније повезани са његовом способношћу да спречи оксидационе промене. Сличне закључке извели су и Guan и сарадници који су показали да H_2S штити хумане ендотелне ћелије изоловане из пупка (енгл. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVEC) од апоптозе изазване глукозом (264). Такође, примећено је да изоловани крвни судови инкубирани у повишеној глукози се могу заштитити од повреда, ако се изложе повећаној концентрацији H_2S (фармаколошком суплементацијом или прекомерном експресијом са CSE-ом). У сличном моделу СЗТ-ом индукованог дијабетеса, показано је да мини пумпе које ослобађају H_2S , повећавају његове нивое у плазми и побољшавају *ex vivo* релаксацију торакалне аорте (108).

У хистопатолошким студијама показано је да код дијабетичних срца постоји масивнија некроза са фрагментацијама влакана срчаног мишића у поређењу са срцима пацова без дијабетеса (265). У нашој студији добијени су слични резултати (Слика 11). Са друге стране, у ДМ+ДАТС групи уочавају се мање промене на хистопатолошким

препаратима у односу на нетретирану групу дијабетичних пацова (ДМ). Такође, на моделу дијабетесне кардиомиопатије, H₂S, апликован интраперитонеално или орално, смањио је степен фиброзе и генерално очувао структуру срца (266).

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

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

Имајући у виду да дијабетесна кардиомиопатија настаје као резултат примарне болести и да доводи до структурних и функционалних абнормалности миокарда, а последично и до срчане инсуфицијенције (267), посебна пажња је посвећена потенцијалној улози ДАТС-а у моделу прекондиционирања срца код пацова са дијабетесом.

Наши резултати јасно показују да је присутна дисфункција миокарда у ДМ срцима који су били подвргнути И/Р повреди. Депресија срчане функције и компромитоване инотропне и луситропне особине срца, као и поремећени CF и HR, очигледнији су у ДМ+И/Р у односу на И/Р групу (**График 25** и **Табела 10**). У складу са претходним *in vivo* и *ex vivo* студијама (59), резултати наше студије су јасно показали да ДАТС значајно смањује И/Р повреду код пацова са дијабетесом и побољшава опоравак срца од исхемије. У групи пацова третираних ДАТС-ом повећана је апсолутна вредност срчане контрактилне силе, SLVP и CF током стабилизације, док је након 60 минута реперфузије, осим наведених параметара, значајно повећана и фреквенца (HR) срца. Контрактилна способност и CF су били скоро константни и нису се мењали током

периода реперфузије код пацова са дијабетесом третираних ДАТС-ом (ДМ+И/Р+ДАТС). Инхибирање активације p38 митогеном активираних протеин киназа (енгл. *p38 mitogen-activated protein kinases*, p38МАРК) и екстрацелуларних сигнално-регулисаних киназа 1/2 (енгл. *extracellular signal-regulated kinase*, ERK) као и спречавање оксидационог стреса у Н₂С₂ ћелијама су могући механизми који су одговорни за кардиопротективне ефекате ДАТС-а (268).

Неколико истраживачких група је у својим истраживањима показало да Н₂С може узроковати кардиопротекцију различитим механизмима, али је кључно очување функције митохондрија, смањење оксидационог стреса, смањење инфламације у миокарду и побољшање ангиогенезе (78, 147). У нашем истраживању параметри оксидационог стреса мерени су и у коронарном венском ефлуенту, пре и након тридесетоминутне исхемије током периода реперфузије. Мерењем прооксиданаса у коронарном венском ефлуенту, уочен је значајно виши ниво TBARS, O₂⁻ и H₂O₂ код свих пацова са дијабетесом, при чему је ДАТС третман довео до смањења наведених параметара. Поред тога, у групи пацова третираних ДАТС-ом уочено је и повећање NO₂⁻ нивоа у коронарном венском ефлуенту, што је вероватно резултирало повећањем коронарног протока (**Табела 11** и **График 26**). Што се тиче компоненти антиоксидационог система заштите, релативна генска експресија антиоксидационих маркера одређивана је у левој комори. У складу са претходно наведеним резултатима, у нашој студији, присутна је повећана релативна експресија гена за eNOS код дијабетичних пацова третираних ДАТС-ом (**График 27**). Активација eNOS повећава ниво NO истовремено са смањењем нивоа реактивних врста кисеоника, што може бити једно од могућих објашњења за очувани коронарни вазодилаторни одговор у групи у којој су пацови били подвргнути ДАТС третману. У више наврата је показано да ДАТС повећава релативну експресију гена за eNOS, спречава eNOS од оштећења које изазива оксидовани липопротеин ниске густине, штити ендотелне ћелије и повећава биорасположивост NO након коронарне повреде (209).

Иницирање и развој кардиоваскуларних компликација у дијабетесу, приписују се не само хипергликемији и повећању ROS/RNS већ и повећању активности апоптотских маркера. С тим у вези, желели смо дубље да продремо у механизме кардиопротекције ДАТС-а током И/Р повреде. У неколико студија је сугерисано да регулација појединих антиапоптотских фактора укључујући Bcl-2 ген, као и регулација проапоптотских гена

као што је Вах игра важну улогу у протекцији исхемијског ткива (230). Високе концентрације глукозе доводе до значајног повећања ROS који фаворизују генерисање дихидроникотинамид аденин динуклеотид фосфата (енгл. *dihydronicotinamide-adenine dinucleotide phosphate*, NADPH) оксидазе и индукују апоптозу у кардиомиоцитима активирањем сигналног пута JNK/NF-κB (258). Унос ДАТС-а код пацова са дијабетесом (ДМ+ДАТС+И/Р) повећао је релативну експресију Bcl-2 гена и смањио експресију Вах и гена за каспазу-3. Иако је релативна експресија гена за каспазу-9 повећана у левој комори дијабетичних пацова, третман ДАТС-ом није значајно утицао на његову релативну експресију (**График 28**). Наши резултати су у складу са резултатима који показују да су мишеви третирани H₂S показали смањену активацију каспазе-3 и смањен број позитивних миоцита обележених ТУНЕЛ есејом (147). У *in vivo* моделима где су испитивани ефекти прекондиционарања H₂S, примећено је повећање антиапоптотских (Bcl-2 и Bcl-xL) и неактивираних проапоптотских (Bad) протеина. Такође, повећана је експресија протеина топлотног шока (енгл. *heat shock proteins*, HSP) 70 и 90 који могу спречити апоптозу (255, 269). Додатно, прекондиционарање H₂S промовише антиапоптотске сигналне путеве променом експресије p38, ERK 1/2 и фосфоинозитид-3-киназа (енгл. *phosphoinositide-3-kinase*, PI3K) (270).

Добро је познато да TNF-α, TNF-β и различити интерлеукини, као што су 2, 4, 5, 6, 13 имају доминантну имунорегулаторну улогу у патогенези Т1ДМ (271). Међутим, постоје контрадикторне информације у вези са нивоима и производњом цитокина у кардиоваскуларним компликацијама изазваних дијабетесом. У нашем истраживању, значајно је повећана релативна експресија гена NF-κB и TNF-α у ДМ+И/Р групи у односу на И/Р групу (**График 29**). Једно од могућих објашњења је да услед инфаркта миокарда долази до активације инфламацијских ћелија. Инфламација у миокарду је праћена и повећаном експресијом адхезионих ћелијских молекула ICAM-1 (интрацелуларни) и VCAM-1 (васкуларни) (273). Ове ћелије заједно са кардиомиоцитима, IL, TNF-α и другим, директно и индиректно, доводе до кардиодепресивних ефеката, укључујући смањену срчану функцију и апоптозу које настају путем интрацелуларне серин-треонин киназе Akt (274). Наши резултати указују да релативна експресија NF-κB, TNF-α и IL-17A гена је значајно смањена код дијабетичких пацова третираних ДАТС-ом у односу на њихову експресију код нетретираних пацова (**График 29**). Због свега наведеног, може се претпоставити да

хроничан унос ДАТС-а може да ублажи инфламацију која је индукована И/Р повредом миокарда.

Бојење хематоксилин/еозином пружа бољи увид у патохистолошке и морфолошке промене, као што су едеми, дегенеративне промене, некроза и инфламација. Према нашим резултатима, ове промене су очигледније у ДМ групи, док је ДАТС значајно смањио промене у структури миокарда којима је индукована И/Р повреда (**Слика 12**). Очување морфологије миокарда помаже да се очува физиолошка функција срца, што се одразило и на кардиодинамске параметре, чије су вредности биле у физиолошком опсегу. Са друге стране, код нетретираних пацова са дијабетесом запажено је значајно смањење вредности кардиоваскуларних параметара услед ослабљеног срчаног мишића који настаје као последица некрозе и губитка гликогена. Смањење броја откуцаја срца може бити последица смањене активности пејсмејкер ћелија које се јављају код дијабетесног миокарда (275). Поред тога, резултати *Huang* и коаутора су показали да је пречник лумена леве коморе повећан у групама пацова са ДМ, а да се смањио на приближно нормалне вредности након третмана ДАТС-ом, ДАТС-ом или уљем белог лука (255). Као што је раније наведено, осетљивије и специфичније за откривање некрозе миокарда у постморталном прегледу је имунохистокемијско бојење сТnТ. Већи губитак срчаног тропонина примећен је у групи која није третирана него у групи која је третирана ДАТС-ом (ДМ+И/Р vs. ДМ+ДАТС+И/Р) (**Слика 13**). Поред тога, код ДМ примећено је и последично хистолошко и/или функционално, неповратно оштећење ткива миокарда. У корелацији са нашим резултатима, бројна истраживања су показала да ДАТС третман доводи до смањења серумских нивоа СК-МВ, сТnТ и сТnI и побољшања стопе преживљавања након реперфузије (221, 276, 277). Према нашим сазнањима, сва претходна истраживања су биохемијски испитала ефекте ДАТС-а на ниво тропонина, а ни једно од њих није посматрало ткиво микроскопски да би се уочио образац губитка сТnТ код оштећеног миокарда.

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

5.3. ЕФЕКТИ ДИАЛИЛ ТРИСУЛФИДА НА ПАЦОВЕ СА МЕТАБОЛИЧКИМ СИНДРОМОМ

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

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

Да би се тестирали нови и ефикаснији лекови, неопходни су клинички релевантни експериментални модели за МетС. У нашој студији МетС је индукован код пацова *Wistar albino* соја. Коришћени модел подразумевао је да животиње буду на исхрани са високим садржајем масти (HFd) током 4 недеље да би се индуковала хиперинсулинемија, инсулинска резистенција и интолеранција на глукозу. Након овог периода, животињама је дата инјекција стрептозотоцина, која је имала за циљ да доведе до смањења броја бета ћелија у панкреасу. На основу података из литературе, комбинација ове две методе (HFd и СТЗ) је одлична за анимални модел МетС-а јер имитира патологију овог синдрома и Т2ДМ код људи (279, 280). Осим тога, исхрана са високим садржајем масти је веома заступљена у целом свету, што такође потврђује чињеницу да је овај модел добар избор и веома близак клиничком моделу (279).

У нашој студији примећено је да су пацови са МетС-ом конзумирали више воде и хране, као и да су имали значајно већу телесну тежину у односу на здраве пацове (**График 30**). Промене у телесној тежини, вероватно су допринеле повишеним нивоима глукозе, укупног холестерола, триглицерида, LDL-а и смањеним нивоима HDL-а код пацова са МетС-ом у поређењу са здравим пацовима (**Графици 30 и 31**). Такође, примећено је да су пацови са МетС-ом имали значајно веће вредности СКП, ДКП, HR,

као и да су имали хиперсекрецију инсулина током ОГТ теста (**Графици 33, 34 и 35**). Уједно, наведени резултати указују да је 4 недеље исхране са високим садржајем масти, у комбинацији са СТЗ инјекцијом одличан модел за индукцију МетС код *Wistar albino* пацова и да се због тога овај модел може користити за испитивање нових третмана. Сви наведени параметри могу довести до КВБ као што су ендотелна дисфункција, атеросклероза и различита обољења миокарда (281). Због тога је веома важно пронаћи и проучити агенсе који би побољшали симптоме МетС-а.

Ефекти ДАТС су испитивани током и након тронедељног третмана код пацова са МетС-ом. Иако није утицао на телесну тежину пацова, многи други параметри, попут липидног и гликемијског профила, били су значајно побољшани код пацова који су били подвргнути ДАТС третману. Такође, своја корисна својства ДАТС је показао и кроз смањење TG и LDL-а као и повећања HDL-а код пацова којима је овај агенс даван *per os* током три недеље. Као што је више пута споменуто, на основу сазнања аутора, ова студија је једина која испитује ефекте ДАТС код пацова са МетС-ом. Међутим, наши резултати су у сагласности са резултатима студијама у којима су испитивани различити екстракти белог лука, где је исто примећен побољшан липидни профил (282-284). Механизам одговоран за протективна својства белог лука и ДАТС-а подразумева директну или индиректну инхибицију синтезе ендогеног холестерола и/или промене липопротеинских фракција које могу да утичу на холестерол (285). У претходним студијама доказано је да услед конзумирања белог лука може доћи до инхибиције у синтези масних киселина у јетри и то углавном смањењем активности кључних ензима, а тиме и смањењем акумулације липида у јетри и TG у плазми (286). Такође, примећено је да бели лук има способност да смањи нивое холестерола, при чему уз повећање унете количине белог лука, овај ефекат је израженији (287). Показано је и да суплементација екстрактима белог лука услед инхибиције 3-хидрокси-3-метил-глутарил-СоА (HMG-CoA) спречава повећање нивоа липида у серуму, плазми и различитим ткивима (288). Насупрот овоме, у недавно спроведеној студији на људима, третман ферментисаним белим луком (енгл. *aged garlic*) није довео до побољшања липидног профила код пацијената са Т2ДМ. Резултати њиховог истраживања сугеришу да ефикасност екстракта ферментисаног белог лука може да се разликује у зависности од особина екстракта и степена обољења (289). У скороје објављеној студији показано је да NaHS доводи до активације АМПК пута и одложеног одговора аутофага, што доприноси

смањењу нивоа серумског TG код мишева који су били храњени HFd. NaHS повећавајући нивое H₂S, омогућава улазак аутофага у јетру, док AMPK активацијом блокира mTOR пут и инхибира активацију аутофага (290). ДАТС као донор H₂S, највероватније истим или сличним механизмима, може да утиче на ниво триглицерида, односно да доведе до њиховог смањења.

Бели лук може да смањи нивое глукозе уз смањену резистенцију на инсулин и повећану инсулинску осетљивост код метаболичког синдрома (291, 292). Као што се и очекивало, слични резултати су добијени у нашој студији након увођења ДАТС третмана код пацова са MetC-ом. Након ОГТТ примећена је боља толеранција глукозе у групи пацова храњених ДАТС-ом (МС+ДАТС) (**Графици 33 и 34**). У неколико научноистраживачких радова, наводи се да су заправо сумпорна једињења, изолована из белог лука, као што су ДАТС и други (ДАДС, ДАС, аллиин, алицин, ајоене), због слободне -SH групе коју имају у структури, одговорни за хипогликемијски ефекат белог лука (293-295). Такође, бели лук може да утиче на смањење нивоа глукозе у крви тако што спречава или смањењује апсорпцију глукозе из гастроинтестиналног тракта (296). Занимљиво је да бели лук може изазвати регенеративне и/или заштитне ефекте и повећати величину панкреасних бета ћелија код пацова код којих је стрептозотоцином индукован дијабетес (297). У студији објављеној пре више од 5 година, наводи се да уље белог лука може да смањи дегенерацију бета ћелија панкреаса и ниво антитела који повређују Лангерхансова острвца код пацова са дијабетесом (298). Повећањем нивоа H₂S уништавају се липидни хидропероксиди у оксидованом LDL-у чиме се смањује његов атерогени потенцијал (129). Ово такође може бити једно од могућих објашњења за хиполипидемијске ефекте изазване ДАТС третманом.

Висок крвни притисак се издваја као веома битан симптом MetC-а. Хронична примена ДАТС-а код пацова са MetC-ом значајно је смањила ДКП и срчану фреквенцу (МС+ДАТС vs. МС) (**График 35**). У прилог овим резултатима говоре и студије које су се бавиле испитивањем ефеката белог лука. У њима је показано да бели лук има способност да снизи КП, што може бити последица повећане производње H₂S (299, 300). Механизам који је одговоран за овај антихипертензивни, односно хипотензивни ефекат белог лука, највероватније је сличан ефектима простагландина, који утиче на смањење периферне васкуларне резистенције (301). Такође, постоје чврсти докази који потврђују

да једињењења која се налазе у белом луку могу *in vitro* инхибирати ангиотензин-конвертујући ензим (302).

Повећани нивои NO и смањени нивои H₂S су примећени у серуму пацијената или експерименталних животиња са дијабетесом. Хронична употреба белог лука код MetC-а ”нормализује”, односно враћа нивое NO и H₂S на физиолошке вредности. Имајући у виду да оба гасотрансмитера доводе до ендотелијум зависне или K⁺-АТФ зависне вазодилатације (98, 303), нормализација њихових нивоа у метаболичком синдрому, може да допринесе хипотензивном ефекту ДАТС-а. У нашој студији такође је показано да ДАТС повећава продукцију NO, углавном тако што повећава eNOS (**График 43**). Овај ефекат се огледа и кроз повећане вредности нитрита у коронарном венском ефлуенту и плазми.

У претходно објављеним студијама показано је да бели лук, екстракти белог лука и једињења изолована из белог лука имају корисне ефекте у лечењу поремећаја који су повезани са MetC-ом, међутим већина студија се бавила његовим ефектима на хипертензију и дијабетес. На основу наших и доступних резултата у литератури, ДАТС се као природни суплемент може користити за третман различитих патофизиолошких абнормалности MetC-а.

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

У појединим студијама хомоцистеин је описан као независни фактор ризика, док је у другима дефинисан само као маркер ризика. Без обзира на ове контроверзе, са сигурношћу се зна да Hcy и HHcy могу да допринесу настанку КВБ (304, 305). У овој студији покушали смо да откријемо како третман ДАТС-ом утиче на Hcy и HHcy, код пацова са MetC-ом. Као што је приказано на **Графику 38**, HHcy је присутна код пацова са MetC-ом, док ДАТС третман значајно смањује забележено повећање Hcy. С обзиром да је у неколико студија показано да је HHcy присутан у MetC-у, односно да је повезана са дијабетесом који није зависан од инсулина, наши резултати су у потпуности

очекивани. ННсу која је присутна у МетС-у, због вишеструких штетних ефеката, доприноси убрзаној атеросклерози. Наиме, аутооксидација Нсу, као и формирање мешовитих дисулфида, доприноси додатној и повећаној продукцији ROS-а које даље доводе до многобројних оштећења (306) (ефекти ДАТС-а на ROS у МетС-у ће бити више дискутовани у наредном поглављу). Бројни докази указују на то да Нсу индукује повреду у васкулатури првенствено јер доприноси дисфункцији ДНК, пролиферацији глатких мишићних влакана и промовисању инфламације. Резултати наше студије директно показују да ДАТС има протективне ефекте на кардиоваскуларни систем, јер смањује ННсу за коју се зна да изазива бројне штетне ефекте (305, 306). Механизми помоћу којих ДАТС остварује позитивне ефекте на ННсу укључују промене у различитим процесима унутарћелијске сигнализације и производњу H_2S , али су детаљи и даље непознати.

У овој студији, такође су праћени нивои H_2S након тронедељног третмана ДАТС-ом, а резултати су у складу са резултатима Нсу (**График 38**). ДАТС ослобађа H_2S у хомогенату срца и може помоћи у одржавању његових концентрација на физиолошки ниским нивоима, током дужег временског периода. ДАТС заправо преко тиол-дисулфидне размене са GSH у хемијским и биолошким системима, хуманим еритроцитима или аорти пацова омогућава да дође до брзог ослобађања H_2S (64, 221).

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

Током хроничних болести, услед неравнотеже у антиоксидационом систему долази до поремећаја у производњи реактивних кисеоничних и азотних врста, што доводи до дисфункције у ендотелу. Све већи број доказа добијених у клиничким и анималним студијама указује на то да оксидациони стрес игра централну улогу у патогенези и компликацијама МетС-а (307). Претходно је објављено да повишени оксидациони стрес у ендотелу пацијената са метаболичким синдромом доприноси развоју хипертензије, хипергликемије, хипертриглицеридемије и пратећих кардиоваскуларних обољења. Услед оксидације глукозе у комбинацији са губитком ендогених антиоксиданаса, долази до повећане продукције слободних радикала који

даље утичу на оштећења органела у ћелијама, као и на развој инсулинске резистенције (308). Добро је познато да суплементација антиоксидансима може ублажити МетС и компликације које настају. У неколико студија бели лук је издвојен као значајан антиоксидациони нутријент који у себи садржи веома моћне антиоксидационе супстанце (309). Стога је један од циљева ове студије био да испита ефекте ДАТС-а на редокс статус пацова са МетС-ом.

Након тронедељног третмана ДАТС-ом мерени су параметри оксидационог стреса у плазми односно лизираним еритроцитима пацова. Резултати ове студије показују да ДАТС може утицати на снижење прооксидационих, односно повећање антиоксидационих параметара (**Графици 36 и 37**). Добијени резултати су у корелацији са претходно објављеним радовима у којима се наводи да бели лук, његово уље и екстракти показују сличне особине (309-312). Показано је да ферментисан бели лук (енгл. *aged black garlic*) примењен *in vitro* у дози од 20-100 mg/mL, може значајно да повећа SOD активност (309) и смањи липидне пероксиде у јетри чак и више од свежег белог лука (284). Поред тога, резултати наше студије показују да је ДАТС ефикасан у смањењу нивоа TBARS и O_2^- у плазми пацова са МетС-ом. Да би спречиле оштећења изазвана ROS-ма, ћелије су развиле антиоксидациони систем одбране. Сматра се да ДАТС, највероватније преко овог система одбране остварује своје антиоксидационе и заштитне ефекте. Као што је приказано на **Графику 37**, нивои свих праћених антиоксидационих параметара били су значајно већи код пацова са МетС-ом третираних ДАТС-ом. У МетС-у, смањени нивои GSH, који највероватније настају као последица због смањења GSH прекурсора аминокиселина (цистеин, глутамат, глицин), су директни индикатори оксидационог стреса. У нашем моделу, пацови са МетС-ом су имали смањену активност GSH, али је третман ДАТС-ом ове вредности вратио на физиолошке (сличне онима који су забележени код здравих пацова) (313). ДАТС, вероватно као регулатор H_2S , зависно од концентрације, утиче на повећање нивоа метилглиоксала у ћелијама васкуларних глатких мишића. Метилглиоксал је добро познат индуктор оксидационог стреса који у хипергликемији настаје као метаболит глукозе. Такође, метилглиоксал се у већим концентрацијама производи и у КВБ попут хипертензије, хиперлипидемије, хиперинсулинемије и метаболичког синдрома у целини (314-316). Постоје чврсти докази који потврђују да екстракти белог лука који у себи садрже високе концентрације тиосулфината, утичу на повећање активности NAD(P)H оксидазе (317).

Такође, у више научноистраживачких студија је показано да хипергликемија повећава продукцију ROS-а, изазива JNK зависну активацију NF-κB, при чему долази до апоптозе ћелија. Третман ДАТС-ом, првенствено спречавајући да дође до повећане продукције ROS-а, може утицати на смањење апоптозе кардиомиоцита, тако што инхибира JNK/NF-κB сигнални пут (258).

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

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

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

Након хроничног третмана ДАТС-ом, пацови су били подвргнути ехокардиографском прегледу. У групи пацова са МетС-ом, који су третирани ДАТС-ом (МС+ДАТС) забележено је значајно повећање IVSd, IVSs, FS и смањење LVIDs у односу на групу нетретираних пацова са МетС-ом (**Табела 12** и **Слика 15**). Повећање FS у комбинацији са смањењем системског КП, код пацова из МС+ДАТС групе, указује на побољшану систолну и контрактилну функцију миокарда. Такође, да би се детаљније проучили ефекти ДАТС-а на кардиодинамске параметре, изоловаловано срце пацова је постављено на *Langendorff*-ов апарат. Током деведесетоминутне *ex vivo* ретроградне перфузије, праћене су промене кардиодинамских параметара, али и продукција пооксидационих параметара у коронарном венском ефлуенту. Примена ДАТС-а током

три недеље код пацова са МетС-ом, побољшала је кардиоваскуларну функцију миокарда што се јасно види првенствено кроз срчану контрактилну функцију (процењену преко $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ параметара) и смањење нивое прооксидационих параметара (TBARS, O_2^- и H_2O_2) у коронарном венском ефлуенту (Табеле 13 и 14, Графици 39 и 40). Такође, и за алицин је показано да уклањања реактивне врсте, попут OH^- , O_2^- и H_2O_2 (319). Уклањање реактивних азотних и кисеоничних врста је и једна од карактеристика ДАТС-а преко којих највероватније испољава антиоксидационе ефекте.

Код пацова са МетС-ом, морфологија срца је значајно измењена, па се на срчаном ткиву може уочити некроза, конгестија у крвним судовима, као и неорганизована мишићна влакна без јасних граница. Ипак, као што је приказано на Слици 16, третман ДАТС-ом значајно је нормализовао ове промене код пацова са МетС (МС+ДАТС група). Позитивни ефекти ДАТС-а се манифестују кроз мањи степен губитка миокардијалних влакана, као и мањом хипертрофијом миокарда.

Претходно је описано да третман екстрактом који се добија од ферментисаног белог лука смањује констрикцију и доприноси релаксацији васкуларних крвних судова, као и да побољшава реактивност артерија у аорти код пацова са МетС-ом. Сматра се да су за наведене протективне ефекте најодговорнији S-алил цистеин који се може изоловати из овог екстракта. S-алил цистеин највероватније повећава нивое NO и омогућава вазодилатацију, кроз стимулацију eNOS (320). Резултати нашег истраживања показују да и ДАТС утиче на повећање нивоа NO_2^- у срцу који могу бити посредовани NO који настаје услед повећане активности eNOS у срцу. Наиме, ДАТС може стимулирати H_2S да активира eNOS и повећа доступност NO у организму (42). Такође, у нашој студији је показано да третман ДАТС-ом утиче на значајно смањење атерогеног индекса који је важан индикатор ризика за коронарне болести срца. ДАТС постиже овај ефекат тако што смањује TG, LDL, TC, прооксидационе параметре и повећава HDL и антиоксидационе параметре.

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

Имајући у виду да је исхемија миокарда најозбиљнија последица неадекватно третираних кардиоваскуларних болести (163), у нашој студији посебна пажња је посвећена испитивању ефеката ДАТС третмана на *ex vivo* индуковану И/Р повреду код пацова са MetC-ом. У примењеном моделу, примећено је да пацови са MetC-ом имају значајно смањене вредности SLVP, DLVP и CF током периода реперфузије. Са друге стране, код пацова са MetC-ом који су током три недеље били третирани ДАТС-ом, вредности ових параметара су биле готово константне током тридесетоминутне реперфузије (Табела 15, График 41). Као последица акумулације ендогених метаболита (ROS, калцијум, тромбин, фактор активирања тромбоцита) у срцу током И/Р, на нивоу ћелија и органа настаје низ комплексних реакција које изазивају аритмије, морфолошке промене ткива миокарда и друге штетне ефекте. Блокада ендогене синтезе H₂S, може да промени електрофизиологију ћелија (посебно на нивоу јонских канала) и да допринесе настанку аритмија (321). У нашој студији јасно се уочава кардиопротективни ефект ДАТС-а на *ex vivo* индукованој И/Р повреди миокарда јер су праћени кардиодинамски параметри код срца пацова који су третирани ДАТС-ом, били без значајних флукуација током периода реперфузије. Механизми који су укључени у кардиопротекцију ДАТС-а вероватно су исти као код здравих или пацова са дијабетесом и подразумевају отварање K-АТП канала, активацију РКС (322), уклањање ROS-а (323) који заједно утичу на спречавање уласка Ca²⁺ у ћелије и скраћење акционог потенцијала (321). Битно је напоменути да централну улогу у кардиопротекцији, ДАТС постиже отварањем K-АТП канала и активацијом РКС. Иако је улога K-АТП канала у смањењу и спречавању последица које настају услед И/Р повреде показана у више различитих анималних и хуманих модела, још увек није познато који подтип K-АТП канала је најзаслужнији за ове ефекте (324).

Механизми одговорни за *ex vivo* индуковану И/Р повреду миокарда укључују многе реактивне процесе, као што су оксидациони стрес, инфламација, апоптоза и други. Ове биолошке реакције стимулишу једна другу и изазивају бројне промене како у

анатомији, тако и у функцији миокарда (321-324). Резултати ове студије потврђују да хронични ДАТС третман пружа заштиту од И/Р повреде у срцу. Наиме, побољшање кардиодинамских параметара праћено је антиоксидационим, антиинфламацијским и антиапоптотским ефектима код пацова са МетС-ом који су третирани ДАТС-ом. Наши резултати су показали да ДАТС третман инхибира продукцију ROS-а у коронарном венском ефлуенту и повећава ниво релативне експресије гена за поједине антиоксидационе параметре у левој комори срца пацова са МетС-ом. Као што је приказано на **Графику 42** и у **Табели 16**, третман ДАТС-ом значајно је смањило нивое TBARS, O_2^- и H_2O_2 у периоду стабилизације, као и током читавог периода реперфузије. Ови резултати су били прилично очекивани, јер ДАТС може да индукује продукцију H_2S који је добро познат као активатор ендogene антиоксидационе одбране и инхибитор бројних прооксидационих параметара. *Calvert* и његови сарадници су у својој студији дали детаљније објашњење наводећи да се ови ефекти првенствено постижу преко Nrf2 зависног пута (78). У корелацији са овим наводима и у нашој студији је показано да третман ДАТС-ом повећава релативну експресију гена за SOD-1 и SOD-2 левој комори миокарда (**График 43**). Уз то, јако је битна чињеница да повећање SOD директно утиче на смањење кардиомиопатије, док егзогени и ендогени H_2S доприноси снажним цитопротективним ефектима у различитим моделима срчане инсуфицијенције (258).

Прекомерна продукција ROS-а уз смањење антиоксидационих параметара, промену морфологије миокарда, стимулацију бројних инфламацијских и апоптотских маркера може допринети развоју патолошких процеса који су повезани са ендотелном дисфункцијом карактеристичном за срца која су била изложена И/Р повреди. У нашем истраживању, ДАТС третман је утицао на смањење едема и инфламацију (**Слика 17**), али и на смањење површине захваћене некрозом (**Слика 18**) у срчаном ткиву пацова са МетС-ом. Имајући на уму резултате који су добијени у нашој студији, може се рећи да ДАТС има потенцијал да сачува како функцију, тако и структуру миокарда које је било изложено исхемији и реперфузији. У претходно објављеним студијама наводи се да услед дуготрајне конзумације воденог екстракта белог лука долази до смањења системског оксидационог стреса и да се спречавају промене које настају у васкуларној структури артерија бубрега. Слични резултати примећени су у случају ДАТС-а. Наиме, код пацова са МетС-ом који су били третирани ДАТС-ом, примећени су значајно нижи нивои оксидационих, инфламацијских и апоптотских параметара. Испитујући ефекте

ДАТС-а на релативну експресију гена за неколико (анти)инфламацијских параметара у левој комори, примећена је значајно смањена експресију гена за NF-κB и IL-17A (**График 45**). У литератури већ постоје чврсти докази који иду у прилог томе да бели лук и једињења изолована из белог лука инхибирају експресију ћелијских адхезионих молекула тако што регулишу интраћелијске путеве трансдукције попут AP-1 и JNK или NF-κB (258). Прекондиционирање NaHS спречава деградацију и транслокацију NF-κB и доприноси очувању срца и бубрега. Према литературним подацима, још увек се са сигурношћу не може тврдити да ли H₂S поседује анти или проинфламацијска својства (69, 327), док се на основу резултата наше студије може се рећи да ДАТС поседује антиинфламацијске ефекте.

Инфламација са повишеним имунокомпетентним ћелијама у срчаном ткиву игра кључну улогу у патофизиологији кардиомиопатије и обично је праћена са неколико регулаторних гена који посредују сигнаlima за апоптозу. Међу њима, Bcl-2 фамилија се издваја као најзначајнија. У левој комори срца пацова са MetC-ом, који су били подвргнути И/Р повреди, релативне експресије гена за Вах, каспазу-3 и каспазу-9 су биле значајно повећане, док је експресија гена за Bcl-2 била значајно смањена у поређењу са групом здравих пацова подвргнутих И/Р. С друге стране, хронични третман ДАТС-ом значајно је смањивао релативну експресију гена за Вах и обе испитиване каспазе, док је релативна експресија гена за Bcl-2 била повећана (**График 44**). Утврђени антиапоптотски ефекти ДАТС-а, највероватније настају као последица повећаног нивоа H₂S и његове способности да фосфорилише неколико протеина, као што су ERK, PI3K и Akt који могу да утичу на преживљавање ћелија (78).

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

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

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

Иако су кардиопротективни ефекти ДАТС третмана забележени у свим испитиваним групама, ехо мониторингом је утврђено да су они израженији у МС+ДАТС у односу на ДМ+ДАТС групу (**Табеле 3, 8 и 13**). Са друге стране, ДАТС третман је смањио однос масе срца и тежине тела, само код пацова са ДМ (**Графици 2, 18 и 31**). Такође, приликом *ex vivo* испитивања, примећено је да ДАТС третман доприноси побољшању притиска у левој комори само код пацова са ДМ (**Графици 10, 23 и 39**), док су параметри оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту били слични код свих испитиваних група.

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

Што се тиче ефеката ДАТС-а на И/Р повреду, битно је напоменути да код већине испитиваних параметара постоје апсолутна поклапања између група па је тако побољшана контрактилна способност код пацова храњених ДАТС-ом примећена и код здравих али и код пацова са МетС-ом и ДМ (**Графици 12, 25 и 41**). ДАТС третман је

утицао на повећање релативне експресије гена за SOD-1 и каспазау-9 само код пацова са MetC-ом (**Графици 43 и 44**), док су позитивни ефекти на релативну експресију гена за (анти)инфламацијске параметре били израженији у ДМ+ДАТС групи (**График 29**).

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

5.5. БУДУЋА ИСТРАЖИВАЊА

Иако су протективни ефекти H₂S познати годинама, многи аспекти у његовом заштитном механизму су и даље нејасни. За проучавање биолошких ефеката H₂S и опонашање његове ендогеног продукције, најчешће се користе H₂S донори. Резултати који су у овој студији представљени и дискутовани могу подстаћи и друга истраживања посвећена испитивању ефеката ДАТС-а у различитим моделима. Такође, било би од великог значаја испитати ефекте ДАТС-а у превенцији ДМ и MetC-а, као и ефекте ДАТС третмана на *in vivo* индуковану И/Р повреду миокарда. Имајући у обзир резултате наше и претходно објављених студија, ДАТС би могао бити значајан кандидат као суплемент у третману ДМ и MetC-а, али су неопходна даља истраживања која би објаснила све механизме одговорне за наведене протективне ефекте.

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

VI

ЗАКЉУЧЦИ

6. ЗАКЉУЧЦИ

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

- Пратећи унос воде и хране, телесну тежину, биохемијске и липидне параметре, као и функцију миокарда, закључено је да је ДАТС (40 mg/kg, сваког другог дана током три недеље) безбедан за употребу и да се добро толерише и подноси.
- ДАТС третман код пацова са дијабетесом и пацова са MetC-ом допринео је снижењу нивоа хомоцистеина и враћању његових вредности на физиолошке. Смањењем нивоа хомоцистеина у серуму, ДАТС директно смањује и ризик од кардиоваскуларних обољења, али и степен оштећења других органа.
- ДАТС третман је допринео значајном повећању ензимских и неензимских антиоксидационих параметара у лизату еритроцита паралелно са смањењем прооксидационих параметара у плазми и коронарном венском ефлуенту, што указује да су ефекти на редокс статус један од важних механизма који учествују у протективним ефектима ДАТС-а.
- Тронедељни третман ДАТС-ом довео је до снажних кардиопротективних ефеката и спречио оштећења функције и структуре миокарда који настају као последица кардиометаболичких обољења.
- ДАТС је веома ефикасан као прекондиционарајући агенс, који доводи до очувања функције миокарда како код здравих, тако и код пацова са дијабетесом, односно метаболичким синдромом.
- Значајним снижењем хипергликемије код пацова са дијабетесом, ДАТС има снажан потенцијал да побољша прогнозу дијабетеса.
- ДАТС третман је допринео корисним васкуларним и метаболичким ефектима и ублажио симптоме метаболичког синдрома, а уз то је и смањио атерогени индекс који је важан индикатор ризика за коронарне болести срца.
- Наведене протективне улоге ДАТС остварује преко антиоксидационих, антиинфламацијских и антиапоптотских ефеката.

VII

РЕФЕРЕНЦЕ

7. РЕФЕРЕНЦЕ

1. Meister A, Fraser PE, Tice SV. Enzymatic desulfuration of β -mercaptopyruvate to pyruvate. *J Biol Chem.* 1954;206:561–575.
2. Beauchamp R, Bus JS, Popp JA, Boreiko CJ, Andjelkovich DA, Leber P. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *CRC Crit Rev Toxicol.* 1984;13:25–97.
3. Cavallini D, Mondovi B, De Marco C, Scioscia-Santoro A. The mechanism of desulphhydration of cysteine. *Enzymologia.* 1962;24:253–266.
4. Goodwin LR, Francom D, Dieken FP, Taylor JD, Warenycia MW, Reiffenstein RJ, Dowling G. Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: postmortem studies and two case reports. *J Anal Toxicol.* 1989;13:105–109.
5. Warenycia MW, Goodwin LR, Benishin CG, Reiffenstein RJ, Grancom DM, Taylor JD, Dieken FP. Acute hydrogen sulfide poisoning. Demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels. *Biochem Pharmacol.* 1989;38:973–981.
6. Wang R. The gasotransmitter role of hydrogen sulfide. *Antioxid Redox Signal* 2003;5:493–501.
7. Wang R. Two's company, three's a crowd – can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J* 2002;16:1792–1798.
8. Wang R. Gasotransmitter: growing pains and joys. *Trends Biochem Sci.* 2014;39:227–232.
9. Searcy DG, Lee SH. Sulfur reduction by human erythrocytes. *J Exp Zool.* 1998;282:310–322.
10. Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y, Nagahara N, Kimura H. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. *J Biochem.* 2009;146:623–626.
11. Yusuf M, Huat BTK, Hsu A, Whiteman M, Bhatia M, Moore PK. Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with enhanced tissue hydrogen sulfide biosynthesis. *Biochemical and biophysical research communications.* 2005;333:1146–1152.
12. Xu S, Liu Z, Liu P. Targeting hydrogen sulfide as a promising therapeutic strategy for atherosclerosis. *International journal of cardiology.* 2014;172:313–317.
13. Kimura H. The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. *Nitric oxide.* 2014;41:4–10.
14. Singh S, Padovani D, Leslie T, Chiku RA, Banerjee R. Relative contributions of cystathionine beta-synthase and gammacystathionase to H₂ S biogenesis via alternative trans-sulfuration reactions. *J. Biol. Chem.* 2009;284:22457–22466.
15. Tanizawa K. Production of H₂S by 3-mercaptopyruvate sulphurtransferase. *J. Biochem.* 2011;149:357–359.
16. Zhao Z, Liu X, Shi S, Li H, Gao F, Zhong X, Wang Y. Exogenous hydrogen sulfide protects from endothelial cell damage, platelet activation, and neutrophils extracellular traps formation in hyperhomocysteinemia rats. *Experimental cell research.* 2018;370:434–443.
17. Rong-na L, Xiang-jun Z, Yu-han C, Ling-qiao L, Gang H. Interaction between hydrogen sulfide and nitric oxide on cardiac protection in rats with metabolic syndrome. *Zhongguo yi xue ke xue yuan xue bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae.* 2011;33:25–32.
18. Li L, Rose P, Moore PK. Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2011;51:169–187.

19. Caliendo G, Cirino G, Santagada V, Wallace JL. Synthesis and biological effects of hydrogen sulfide (H₂S): development of H₂S-releasing drugs as pharmaceuticals. *J. Med. Chem.* 2010;53:6275–6286.
20. Levitt MD, Abdel-Rehim MS, Furne J. Free and acid-labile hydrogen sulfide concentrations in mouse tissues: anomalously high free hydrogen sulfide in aortic tissue. *Antioxid. Redox Signal.* 2011;15:373–378.
21. Insko MA, Deckwerth TL, Hill P, Toombs CF, Szabo C. Detection of exhaled hydrogen sulphide gas in rats exposed to intravenous sodium sulphide. *Br. J. Pharmacol.* 2009;157:944–951.
22. Huang CW, Moore PK. H₂S synthesizing enzymes: biochemistry and molecular aspects. In *Chemistry, biochemistry and pharmacology of hydrogen sulfide* Springer, Cham. 2015; pp. 3–25.
23. Zhao Y, Pacheco A, Xian M. Medicinal chemistry: insights into the development of novel H₂S donors. In *Chemistry, Biochemistry and Pharmacology of Hydrogen Sulfide*. 2015; pp. 365–388.
24. Zhao Y, Wang H, Xian M. Cysteine-activated hydrogen sulfide (H₂S) donors. *Journal of the American Chemical Society.* 2010;133:15–17.
25. Whiteman M, Li L, Rose P, Tan CH, Parkinson DB, Moore PK. The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. *Antioxidants & redox signaling.* 2010;12:1147–1154.
26. DeLeon ER, Stoy GF, Olson KR. Passive loss of hydrogen sulfide in biological experiments. *Anal Biochem.* 2012;421:203–207.
27. Nagy P, Palinkas Z, Nagy A, Budai B, Toth I, Vasas A. Chemical aspects of hydrogen sulfide measurements in physiological samples. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840:876–891.
28. Li L, Whiteman M, Guan YY, et al. Characterization of a Novel, Water-Soluble Hydrogen Sulfide-Releasing Molecule (GYY4137) Circulation. 2018;117:2351–2360.
29. Lee ZW, Zhou J, Chen CS, et al. The Slow-Releasing Hydrogen Sulfide Donor, GYY4137, Exhibits Novel Anti-Cancer Effects In Vitro and In Vivo. *PLoS One.* 2011;6:e21077.
30. Moore PK, Whiteman M. *Chemistry, biochemistry and pharmacology of hydrogen sulfide.* Springer; 2015. pp. 344–354.
31. Wu J, Li Y, He C, Kang J, Ye J, Xiao Z, et al. Novel H₂S Releasing Nanofibrous Coating for In Vivo Dermal Wound Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8:27474–27481.
32. Hammers MD, Singh L, Montoya LA, Moghaddam AD, Pluth MD. Synthesis of Amino-ADT Provides Access to Hydrolytically Stable Amide-Coupled Hydrogen Sulfide Releasing Drug Targets. *Synlett.* 2016;27:1349–1353.
33. Powell CR, Dillon KM, Matson JB. A review of hydrogen sulfide (H₂S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications. *Biochemical pharmacology.* 2018;149:110–123.
34. Xiao Z, Bonnard T, Shakouri-Motlagh A, Wylie RAL, Collins J, White J, et al. Triggered and Tunable Hydrogen Sulfide Release from Photogenerated Thiobenzaldehydes. *Chem Eur J.* 2017;23:11294–11300.
35. Fukushima N, Ieda N, Sasakura K, Nagano T, Hanaoka K, Suzuki T, et al. Synthesis of a photocontrollable hydrogen sulfide donor using ketoprofenate photocages. *Chem Commun.* 2014;50:587–589.

36. Shukla P, Khodade VS, SharathChandra M, Chauhan P, Mishra S, Siddaramappa S, et al. "On demand" redox buffering by H₂S contributes to antibiotic resistance revealed by a bacteria-specific H₂S donor. *Chemical Science*. 2017;8:4967–4972.
37. Li Z, Organ CL, Zheng Y, Wang B, Lefler DJ. Abstract 17903: Novel Esterase-Activated Hydrogen Sulfide Donors Attenuate Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation*. 2016;134:A17903–A17903.
38. Zheng Y, Yu B, Ji K, Pan Z, Chittavong V, Wang B. Esterase-Sensitive Prodrugs with Tunable Release Rates and Direct Generation of Hydrogen Sulfide. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016;55:4514–4518.
39. Pluth MD, Bailey TS, Hammers MD, Hartle MD, Henthorn HA, Steiger AK. Natural Products Containing Hydrogen Sulfide Releasing Moieties. *Synlett*. 2015;26:2633–2643.
40. Rose P, Whiteman M, Moore PK, Zhu YZ. Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents. *Nat Prod Rep*. 2005;22:351.
41. Zeng Y, Li Y, Yang J, Pu X, Du J, et al. Therapeutic role of functional components in *Alliums* for preventive chronic disease in human being. *hindawi.com* [Internet]. 2015.
42. Bradley JM, Organ CL, Lefler DJ. Garlic-Derived Organic Polysulfides and Myocardial Protection. *J Nutr*. 2016;146:403S–409S.
43. Karwi QG, Bice JS, Baxter GF. Pre- and postconditioning the heart with hydrogen sulfide (H₂S) against ischemia/reperfusion injury in vivo: a systematic review and meta-analysis. *Basic Res Cardiol*. 2018;113:1–21.
44. Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y. Intake of Garlic and Its Bioactive Components. *J Nutr*. 2001;131:955S–962S.
45. Kamel A, Saleh M. Recent Studies on the Chemistry and Biological Activities of the Organosulfur Compounds of Garlic (*Allium sativum*). *Stud Nat Prod Chem*. 2000;23:455–85.
46. Iciek M, Kowalczyk-Pachel D, Bilska-Wilkosz A, Kwiecień I, Górny M, Włodek L. S-sulfhydration as a cellular redox regulation. *Biosci Rep*. 2015;36(2).
47. Bayan L, Koulivand PH, Gorji A. Garlic: a review of potential therapeutic effects. *Avicenna J Phytomed*. 2014;4:1–14.
48. Cai YR, Hu CH. Computational Study of H₂S Release in Reactions of Diallyl Polysulfides with Thiols. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2017;121:6359–6366.
49. Miles EW, Kraus JP. Cystathionine β-Synthase: Structure, Function, Regulation, and Location of Homocystinuria-causing Mutations. *J Biol Chem*. 2004;279:29871–29874.
50. Wen SY, Tsai CY, Pai PY, Chen YW, Yang YC, Aneja R, et al. Diallyl trisulfide suppresses doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis by inhibiting MAPK/NF-κB signaling through attenuation of ROS generation. *Environ Toxicol*. 2018;33:93–103.
51. Tisserand R, Young R. Constituent profiles [Internet]. 2nd ed. *Essential Oil Safety*. Robert Tisserand and Rodney Young. 2014;483–647.
52. Available on: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/67042577>, last time visited: May, 2019.
53. Sun X, Guo T, He J, Zhao M, Yan M, Cui F, et al. Determination of the concentration of diallyl trisulfide in rat whole blood using gas chromatography with electron-capture detection and identification of its major metabolite with gas chromatography mass spectrometry. *Yakugaku Zasshi*. 2006;126:521–527.

54. Rosen RT, Hiserodt RD, Fukuda EK, Reginald J, Zhou Z, Lech J, et al. Recent Advances on the Nutritional Effects Associated with the Use of Garlic as a Supplement Determination of Allicin , S -Allylcysteine and Volatile Metabolites of Garlic in Breath , Plasma or Simulated Gastric Fluids. 2001;1:968–971.
55. Suarez F, Springfield J, Furne J, Levitt M. Differentiation of mouth versus gut as site of origin of odoriferous breath gases after garlic ingestion. *Am J Physiol Liver Physiol.* 1999;276:G425–30.
56. Egen-Schwind C, Eckard R, Kemper FH. Metabolism of garlic constituents in the isolated perfused rat liver. *Planta Med.* 1992;58:301–305.
57. Fukao T, Hosono T, Misawa S, Seki T, Ariga T. The effects of allyl sulfides on the induction of phase II detoxification enzymes and liver injury by carbon tetrachloride. *Food Chem Toxicol.* 2004;42:743–749.
58. Munday R, Munday CM. Relative activities of organosulfur compounds derived from onions and garlic in increasing tissue activities of quinone reductase and glutathione transferase in rat tissues. *Nutr Cancer.* 2001;40:205–210.
59. Wu CC, Sheen LY, Chen HW, Kuo WW, Tsai SJ, Lii CK. Differential effects of garlic oil and its three major organosulfur components on the hepatic detoxification system in rats. *J Agric Food Chem.* 2002;50:378–383.
60. Kennett EC, Kuchel PW. Redox Reactions and Electron Transfer Across the Red Cell Membrane. *IUBMB Life.* 2003;55:375–385.
61. Benavides GA, Squadrito GL, Mills RW, et al. Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *Natl Acad Sci.* 2007;104:17977-17982.
62. Miron T, Rabinkov A, Mirelman D, Wilchek M, Weiner L. The mode of action of allicin: Its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2000;1463:20–30.
63. Rabinkov A, Miron T, Konstantinovski L, Wilchek M, Mirelman D, Weiner L. The mode of action of allicin: Trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 1998;1379:233–244.
64. Liang D, Wu H, Wong MW, Huang D. Diallyl Trisulfide Is a Fast H₂S Donor, but Diallyl Disulfide Is a Slow One: The Reaction Pathways and Intermediates of Glutathione with Polysulfides. *Org Lett.* 2015;17:4196–4199.
65. Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Leal J, Luengo-Fernandez R, et al. European cardiovascular disease statistics 2017. European Heart Network: Brussels, Belgium, 2017.
66. Piche ME, Poirier P, Lemieux I, Despres JP. Overview of epidemiology and contribution of obesity and body fat distribution to cardiovascular disease: an update. *Progress in cardiovascular diseases.* 2018;61:103–113.
67. Slater T, Abshire M, Davidson P. Assessment of breathlessness: A critical dimension of identifying cardiovascular disease. *Australian Nursing and Midwifery Journal.* 2018;25:36.
68. Sabino JPI, Soriano RN, Santos BM, Donatti AF, Fernandez RR, da Silva GS, Branco LG. Central administration of aminooxyacetate, an inhibitor of H₂S production, affects thermoregulatory but not cardiovascular and ventilatory responses to hypercapnia in spontaneously hypertensive rats. *Respiratory physiology & neurobiology.* 2019;263:38–46.

69. Sivarajah A, McDonald MC, Thiemermann C. The production of hydrogen sulfide limits myocardial ischemia and reperfusion injury and contributes to the cardioprotective effects of preconditioning with endotoxin, but not ischemia in the rat. *Shock*. 2006;26:154–161.
70. Sodha NR, Clements RT, Feng J, et al. Hydrogen sulfide therapy attenuates the inflammatory response in a porcine model of myocardial ischemia/reperfusion injury. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2009;138:977–984.
71. Kimura Y, Goto Y, Kimura H. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxidants Redox Signaling*. 2010;12:1–13.
72. Heusch G, Libby P, Gersh B, et al. Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *The Lancet*. 2014;383:1933–1943.
73. Andreadou I, Iliodromitis EK, Rassaf T, Schulz R, Papapetropoulos A, Ferdinandy P. The role of gasotransmitters NO, H₂S and CO in myocardial ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning and remote conditioning. *British Journal of Pharmacology*. 2015;172:1587–1606.
74. Lee GJ, Kim SK, Kang SW, et al. Real time measurement of myocardial oxygen dynamics during cardiac ischemia-reperfusion of rats. *Analyst*. 2012;137:5312–5319.
75. Hausenloy DJ, Yellon DM. The therapeutic potential of ischemic conditioning: an update. *Nature Reviews Cardiology*. 2011;8:619–629.
76. Yong QC, Lee SW, Foo CS, et al. Endogenous hydrogen sulphide mediates the cardioprotection induced by ischemic postconditioning. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 2008;295:H1330–H1340.
77. Hu Y, Chen X, Pan TT, et al. Cardioprotection induced by hydrogen sulfide preconditioning involves activation of ERK and PI3K/Akt pathways. *Pflugers Archiv*. 2008;455:607–616.
78. Calvert JW, Jha S, Gundewar S, et al. Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling. *Circulation Research*. 2009;105:365–374.
79. Zhang H, Zhi L, Moochhala SM, Moore PK, Bhatia M. Endogenous hydrogen sulfide regulates leukocyte trafficking in cecal ligation and puncture-induced sepsis. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007;82:894–905.
80. Sivarajah A, Collino M, Yasin M, et al. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R. *Shock*. 2009;31:267–274.
81. Gao Y, Yao X, Zhang Y et al. The protective role of hydrogen sulfide in myocardial ischemia-reperfusion-induced injury in diabetic rats. *International Journal of Cardiology*. 2011;152:177–183.
82. Sun WH, Liu F, Chen Y, Zhu, YC. Hydrogen sulfide decreases the levels of ROS by inhibiting mitochondrial complex IV and increasing SOD activities in cardiomyocytes under ischemia/reperfusion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012;421:164–169.
83. Bliksoen M, Kaljusto ML, Vaage J, Stenslokken KO. Effects of hydrogen sulphide on ischaemia-reperfusion injury and ischaemic preconditioning in the isolated, perfused rat heart. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*. 2008;34:344–349.

84. Hu LF, Pan TT, Neo KL, Yong QC, Bian JS. Cyclooxygenase-2 mediates the delayed cardioprotection induced by hydrogen sulfide preconditioning in isolated rat cardiomyocytes. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 2008;455:971–978.
85. Zhang WJ, Shi ZX, Wang BB, Cui YJ, Guo JZ, Li B. Allitridum mimics effect of ischemic preconditioning by activation of protein kinase C. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2011;22:132–136.
86. Osipov RM, Robich MP, Feng J, et al. Effect of hydrogen sulfide in a porcine model of myocardial ischemia-reperfusion: comparison of different administration regimens and characterization of the cellular mechanisms of protection. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2009;54:287–297.
87. Bibli SI, Andreadou I, Chatzianastasiou A, Tzimas C, Sanoudou D, Kranias E, et al. Cardioprotection by H₂S engages a cGMP-dependent protein kinase G/phospholamban pathway. *Cardiovasc. Res*. 2015;106:432–442.
88. Joshi SR, Parikh RM, Das AK. Insulin-history, biochemistry, physiology and pharmacology. *Journal-Association of Physicians of India*. 2007;55:19.
89. Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress—a concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2016;24:547–553.
90. Kangralkar VA, Patil SD, Bandivadekar RM. Oxidative stress and diabetes: a review. *International Journal of Pharmaceutical Applications*. 2010;1:38–45.
91. American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes—2018. *Diabetes care*. 2018;41:S13–S27.
92. Sun Y, Tian Z, Liu N, Zhang L, Gao Z, Sun X, et al. Exogenous H₂S switches cardiac energy substrate metabolism by regulating SIRT3 expression in db/db mice. *J. Mol. Med*. 2018;96:281–299.
93. Newton CA, Raskin P. Diabetic ketoacidosis in type 1 and type 2 diabetes mellitus: clinical and biochemical differences. *Arch Intern Med*. 2004;164:1925–1931.
94. Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, et al. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. *Diabetes*. 2017;66:241–255.
95. Yusuf M, Kwong Huat BT, Hsu A, Whiteman M, Bhatia M, Moore PK. Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with enhanced tissue hydrogen sulfide biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;333:1146–1152.
96. Yang G, Tang G, Zhang L, Wu L, Wang R. The pathogenic role of cystathionine γ -lyase/hydrogen sulfide in streptozotocin-induced diabetes in mice. *Am J Pathol*. 2011;179:869–879.
97. Brancaleone V, Roviezzo F, Vellecco V, De Gruttola L, Bucci M, Cirino G. Biosynthesis of H₂S is impaired in non-obese diabetic (NOD) mice. *Br J Pharmacol*. 2008;155:673–680.
98. Jain SK, Bull R, Rains JL, Bass PF, Levine SN, Reddy S, McVie R, Bocchini JA. Low levels of hydrogen sulfide in the blood of diabetes patients and streptozotocin-treated rats causes vascular inflammation? *Antioxid Redox Signal* 2010;12:1333–1337.
99. Yakubova A, Thorrez L, Svetlichnyy D, Zwarts L, Vulsteke V, Laenen G, et al. ACE-inhibition induces a cardioprotective transcriptional response in the metabolic syndrome heart. *Scientific reports*. 2018;8:16169.

100. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al; American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005;112:2735–2752.
101. Ballestri S, Zona S, Targher G, Romagnoli D, Baldelli E, Nascimbeni F, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with an almost twofold increased risk of incident type 2 diabetes and metabolic syndrome. Evidence from a systematic review and meta-analysis. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2016;31:936–944.
102. Okamoto M, Yamaoka M, Takei M, Ando T, Taniguchi S, Ishii I, Tohya K, Ishizaki T, Niki I, Kimura T. Endogenous hydrogen sulfide protects pancreatic beta-cells from a high-fat diet-induced glucotoxicity and prevents the development of type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;442:227–233.
103. Yang W, Yang G, Jia X, Wu L, Wang R. Activation of KATP channels by H₂S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. *J. Physiol*. 2005;569:519–531.
104. Tang G, Zhang L, Yang G, Wu L, Wang R. Hydrogen sulfide-induced inhibition of L-type Ca²⁺ channels and insulin secretion in mouse pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 2013;56:533–541.
105. Feng X, Chen Y, Zhao J, Tang C, Jiang Z, Geng B. Hydrogen sulfide from adipose tissue is a novel insulin resistance regulator. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2009;380:153–159.
106. Wu L, Yang W, Jia X, Yang G, Duridanova D, Cao K, Wang R. Pancreatic islet overproduction of H₂S and suppressed insulin release in Zucker diabetic rats. *Lab. Invest*. 2009;89:59–67.
107. Szabo C. Roles of hydrogen sulfide in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxid. Redox. Signal*. 2012;17:68–80.
108. Durante W. Hydrogen sulfide therapy in diabetes-accelerated atherosclerosis: A whiff of success. *Diabetes*. 2016;65:2832–2834.
109. Suzuki K, Sagara M, Aoki C, Tanaka S, Aso Y. Clinical implication of plasma hydrogen sulfide levels in Japanese patients with type 2 diabetes. *Intern. Med*. 2017;56:17–21.
110. Whiteman M, Gooding KM, Whatmore JL, Ball CI, Mawson D, Skinner K, Tooke JE, Shore AC. Adiposity is a major determinant of plasma levels of the novel vasodilator hydrogen sulphide. *Diabetologia*. 2010;53:1722–1726.
111. Pichette J, Fynn-Sackey N, Gagnon J. Hydrogen sulfide and sulfate prebiotic stimulates the secretion of GLP-1 and improves glycemia in male mice. *Endocrinology*. 2017;158:3416–3425.
112. Chatzianastasiou A, Bibli SI, Andreadou I, Efentakis P, Kaludercic N, Wood ME, et al. Cardioprotection by H₂S donors: nitric oxide-dependent and-independent mechanisms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2016;358:431–440.
113. Bibli SI, Szabo C, Chatzianastasiou A, Luck B, Zukunft S, Fleming I, Papapetropoulos A. Hydrogen sulfide preserves eNOS function by inhibiting PYK2: implications for cardiomyocyte survival and cardioprotection. *Molecular Pharmacology*. 2017;117. DOI: <https://doi.org/10.1124/mol.117.109645>
114. Andreadou I, Iliodromitis EK, Rassaf T, Schulz R, Papapetropoulos A, Ferdinandy P. The role of gasotransmitters NO, H₂S and CO in myocardial ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning and remote conditioning. *British journal of pharmacology*. 2015;172:1587–1606.

115. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*. 2017;86:715-748.
116. Choudhury FK, Rivero RM, Blumwald E, Mittler R. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*. 2017;90:856867.
117. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2016;1863:2977-2992.
118. Brown DI, Griendling KK. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. *Circulation research*. 2015;116:531-549.
119. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and biophysical research communications*. 2017;482:419-425.
120. Kagan VE. *Lipid peroxidation in biomembranes*. CRC press, Boca Raton, FL, 1988.
121. Islam MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurological research*. 2017;39:73-82.
122. Griendling KK, Touyz RM, Zweier JL, Dikalov S, Chilian W, Chen YR, et al. Measurement of reactive oxygen species, reactive nitrogen species, and redox-dependent signaling in the cardiovascular system: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation research*. 2016;119:e39-e75.
123. Dębowska K, Smulik-Izydorczyk R, Pięta J, Adamus J, Michalski R, Sikora A. Oxidation of the selected probes for detection of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) in aqueous solutions of nitric oxide donors. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018;120:S78.
124. Daiber A, Di Lisa F, Oelze M, Kröller-Schön S, Steven S, Schulz E, Münzel T. Crosstalk of mitochondria with NADPH oxidase via reactive oxygen and nitrogen species signalling and its role for vascular function. *British Journal of Pharmacology*. 2017;174:1670-1689.
125. Robaczewska J, Kedziora-Kornatowska K, Kozakiewicz M, Zary-Sikorska E, Pawluk H, Pawliszak W, Kedziora J. Role of glutathione metabolism and glutathione-related antioxidant defense systems in hypertension. *J Physiol Pharmacol*. 2016;67:331-337.
126. Husain K, Hernandez W, Ansari RA, Ferder L. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. *World journal of biological chemistry*. 2015;6:209.
127. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical chemistry*. 1995;41:1819-1828.
128. Taysi S, Polat F, Gul M, Sari RA, Bakan E. Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology international*. 2002;21:200-204.
129. Muellner MK, Schreier SM, Laggner H, Hermann M, Esterbauer H, Exner M, Gmeiner BM, Kapiotis S. Hydrogen sulfide destroys lipid hydroperoxides in oxidized LDL. *Biochem J*. 2009;420:277-281.
130. Searcy DG, Whitehead JP, Maroney MJ. Interaction of Cu,Zn superoxide dismutase with hydrogen sulfide. *Arch Biochem Biophys*. 1995;318:251-263.
131. Carballal S, Trujillo M, Cuevasanta E, Bartsaghi S, Moller MN, Folkes LK, Garcia-Bereguian MA, Gutierrez-Merino C, Wardman P, Denicola A, Radi R, Alvarez B. Reactivity of hydrogen

- sulfide with peroxynitrite and other oxidants of biological interest. *Free Radic Biol Med.* 2011;50:196–205.
132. Calvert JW, Coetzee WA, Lefer DJ. Novel insights into hydrogen sulfide-mediated cytoprotection. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2010;12:1203–1217.
133. Hasnan J, Yusof MI, Damitri TD, Faridah AR, Adenan AS, Norbaini TH. Relationship between apoptotic markers (Bax and Bcl-2) and biochemical markers in type 2 diabetes mellitus. *Singapore Med J.* 2010;51:50–55.
134. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* 1998;281:1322–1326.
135. Takemura G, Kanoh M, Minatoguchi S, Fujiwara H. Cardiomyocyte apoptosis in the failing heart—a critical review from definition and classification of cell death. *Int J Cardiol.* 2013;167:2373–2386.
136. Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med.* 1999;107:489–506.
137. Zhou X, Lu X. Hydrogen sulfide inhibits high-glucose-induced apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes. *Experimental Biology and Medicine.* 2013;238:370–374.
138. Sodha NR, Clements RT, Feng J, et al. The effects of therapeutic sulfide on myocardial apoptosis in response to ischemia-reperfusion injury. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery.* 2008;33:906–913.
139. Yao LL, Huang XW, Wang YG, Cao YX, Zhang CC, Zhu YC. Hydrogen sulfide protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis by preventing GSK-3 β -dependent opening of mPTP. *American Journal of Physiology—Heart and Circulatory Physiology.* 2010;298:H1310–H1319.
140. Pomerantz BJ, Reznikov LL, Harken AH, Dinarello CA. Inhibition of caspase 1 reduces human myocardial ischemic dysfunction via inhibition of IL-18 and IL-1 beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2001;98:2871–2876.
141. Hennein HA, Ebba H, Rodriguez JL, et al. Relationship of the proinflammatory cytokines to myocardial ischemia and dysfunction after uncomplicated coronary revascularization. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.* 1994;108:626–635.
142. Shen Y, Shen Z, Luo S, Guo W, Zhu YZ. The cardioprotective effects of hydrogen sulfide in heart diseases: from molecular mechanisms to therapeutic potential. *Oxidative medicine and cellular longevity.* 2015; <https://doi.org/10.1155/2015/925167>.
143. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest.* 2000;118:503–508.
144. Li L, Hsu A, Moore PK. Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation – a tale of three gases! *Pharmacol. Ther.* 2009;123:386–400.
145. Whiteman M, Winyard PG. Hydrogen sulfide and inflammation: the good, the bad, the ugly and the promising. *Expert Review of Clinical Pharmacology.* 2011;4:13–32.
146. Chiku T, Padovani D, Zhu W, Singh S, Vitvitsky V, Banerjee R. H₂S biogenesis by human cystathionine γ -lyase leads to the novel sulfur metabolites lanthionine and homolanthionine and is responsive to the grade of hyperhomocysteinemia. *J. Biol. Chem.* 2009;284:11601–11612.

147. Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, et al. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104:15560–15565.
148. Zanardo RCO, Brancaleone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *The FASEB Journal*. 2006;20:2118–2120.
149. Wu WJ, Jia WW, Liu XH, Pan LL, Zhang QY, Yang D, Shen XY, Liu L, Zhu YZ. S-propargyl-cysteine attenuates inflammatory response in rheumatoid arthritis by modulating the Nrf2-ARE signaling pathway. *Redox Biol*. 2016;10:157–167.
150. Pan LL, Liu XH, Gong QH, Zhu YZ. S-Propargyl-cysteine (SPRC) attenuated lipopolysaccharide-induced inflammatory response in H9c2 cells involved in a hydrogen sulfide-dependent mechanism. *Amino Acids*. 2011;41:205–215.
151. Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chemother. Rep*. 1963;29:91.
152. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: Relationship of dose to metabolic response. *J. Clin. Invest*. 1969;48:2129–2139.
153. Kolb H. Mouse models of insulin dependent diabetes: Low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Metab. Rev*. 1987;3:751–778.
154. Furman BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current protocols in pharmacology*. 2015;70:5–47.
155. Brondum E, Nilsson H, Aalkjaer C. Functional abnormalities in isolated arteries from Goto-Kakizaki and streptozotocin-treated diabetic rat models. *Horm. Metab. Res*. 2005;37:56–60.
156. Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, Claypool MD, Pinkett JG, Gadbois TM, Reaven GM. A new rat model of type 2 diabetes: The fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism*. 2000;49:1390–1394
157. Yu L, Li S, Tang X, et al. Diallyl trisulfide ameliorates myocardial ischemia–reperfusion injury by reducing oxidative stress and endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in type 1 diabetic rats: role of SIRT1 Activation. *Apoptosis*. 2017;22:942–954.
158. Liu CT, Hse H, Lii CK, Chen PS, Sheen LY. Effects of garlic oil and diallyl trisulfide on glycemic control in diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 2005;516:165–173.
159. Brown L, Fenning A, Chan V, Loch D, Wilson K, Anderson B, Burstow D. Echocardiographic assessment of cardiac structure and function in rats. *Heart, lung and Circulation*. 2002;11:167–173.
160. Oliveira-Junior SA, Martinez PF, Fan WYC, et al. Association between echocardiographic structural parameters and body weight in Wistar rats. *Oncotarget*. 2017;8:26100–26105.
161. Hulman A, Vistisen D, Glumer C, Bergman M, Witte DR, Færch K. Glucose patterns during an oral glucose tolerance test and associations with future diabetes, cardiovascular disease and all-cause mortality rate. *Diabetologia*. 2018;61:101–107.
162. Leng SH, Lu FE, Xu LJ. Therapeutic effects of berberine in impaired glucose tolerance rats and its influence on insulin secretion. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2014;25:496–502.
163. Grundy SM. Metabolic syndrome update. *Trends in cardiovascular medicine*. 2016;26:364–373.

164. Rivera L, Moron R, Zarzuelo A, Galisteo M. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochemical pharmacology*. 2009;77:1053–1063.
165. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95:351–358.
166. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, et al. Analysis of nitrate, nitrite and [15 N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982;126:131–138.
167. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA, eds. *Handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton, CRC Press. 1995;123–132.
168. Akhgari M, Abdollahi M, Kebryaezadeh A, Hosseini R, Sabzevari O. Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. *Human & experimental toxicology*. 2003;22:205–211.
169. Luck H. Catalase. In *Methods of enzymatic analysis* Academic Press. 1965; pp. 885-894.
170. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 1984;105:121–126
171. Beutler E. Superoxide dismutase. In: Beutler E, eds. *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*. Philadelphia, Grune & Stratton:PA. 1984;83–85.
172. D'Agnillo F, Chang TM. Polyhemoglobin-superoxide dismutase-catalase as a blood substitute with antioxidant properties. *Nature biotechnology*. 1998;16:667.
173. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood. Glutathione. *J Lab Clin Med*. 1963;61:882–888.
174. Salloum FN, Chau VQ, Hoke NN, Abbate A, Varma A, Ockaili RA, Kukreja RC. Phosphodiesterase-5 inhibitor, tadalafil, protects against myocardial ischemia/reperfusion through protein-kinase G-dependent generation of hydrogen sulfide. *Circulation*. 2009;120:S31–S36.
175. Meng B, Gao W, Wei J, Yang J, Wu J, Pu L, Guo C. Quercetin reduces serum homocysteine level in rats fed a methionine-enriched diet. *Nutrition*. 2013;29:661–666.
176. Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2011;50:940–950.
177. Sutherland FJ, Hearse DJ. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacological Research*. 2000;41:613–627.
178. Kadipasaoglu KA, Bennink GW, Conger JL, Birovljev S, Sartori M, Clubb Jr, FJ, Frazier OH. An ex vivo model for the reperfusion of explanted human hearts. *Texas heart institute journal*. 1993;20:33.
179. Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 1897;66:355–400.
180. Minhaz U, Koide S, Shohtsu A, Fujishima M, Nakazawa H. Perfusion delay causes unintentional ischemic preconditioning in isolated heart preparation. *Basic research in cardiology*. 1995;90:418–423.
181. Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. 4th ed. Bloxham, UK: Scion. 2008;

182. Fishbein MC, Wang T, Matijasevic M, Hong L, Apple FS. Myocardial tissue troponins T and I. An immunohistochemical study in experimental models of myocardial ischemia. *Cardiovasc Pathol.* 2003;12:65–71.
183. Qin F, Liu YX, Zhao HW, Huang X, Ren P, Zhu ZY. Chinese medicinal formula Guan-Xin-Er-Hao protects the heart against oxidative stress induced by acute ischemic myocardial injury in rats. *Phytomedicine.* 2009;16:215–221.
184. Liem DA, Honda HM, Zhang J, Woo D, Ping P. Past and present course of cardioprotection against ischemia-reperfusion injury. *Journal of Applied Physiology.* 2007;103:2129–2136.
185. Maslov LN, Naryzhnaia NV, Podoksenov IuK, Prokudina ES, Gorbunov AS, Zhang I, Pei ZhM. Reactive oxygen species are triggers and mediators of an increase in cardiac tolerance to impact of ischemia-reperfusion. 2015;101:3–24.
186. Sea K, Sohn SH, Durazo A, et al. Insights into the role of the unusual disulfide bond in copper-zinc superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry.* 2015;290:2405–2418.
187. Gao F, Gao E, Yue TL, Ohlstein EH, Lopez BL, Christopher TA, Ma XL. Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Circulation.* 2002;105:1497–1502.
188. Gruunenfelder J, Miniati DN, Murata S, Falk V, Hoyt EG, Kown M, et al. Upregulation of Bcl-2 through caspase-3 inhibition ameliorates ischemia/reperfusion injury in rat cardiac allografts. *Circulation.* 2001;104:I–202.
189. Kirsch DG, Doseff A, Chau BN, et al. Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c. *J Biol Chem.* 1999;274:21155–21161.
190. Ohigashi T, Ueno M, Nonaka S, et al. Tyrosine kinase inhibitors reduce bcl-2 expression and induce apoptosis in androgen-dependent cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;278:C66–C72.
191. Ziypak T, Halici Z, Alkan E, Akpinar E, Polat B, Adanur S, et al. Renoprotective effect of aliskiren on renal ischemia/reperfusion injury in rats: electron microscopy and molecular study. *Ren. Fail.* 2015;37:343–354.
192. Meng X, Ao L, Meldrum DR, et al. TNF-alpha and myocardial depression in endotoxemic rats: temporal discordance of an obligatory relationship. *Am J Physiol.* 1998;275:R502–R508.
193. Gwechenberger M, Mendoza LH, Youker KA, Frangogiannis NG, Smith CW, Michael LH, Entman ML. Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation.* 1999;99:546–551.
194. Liao YH, Xia N, Zhou SF, Tang TT, Yan XX, Lv BJ, Yuan J. Interleukin-17A contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating cardiomyocyte apoptosis and neutrophil infiltration. *Journal of the American College of Cardiology.* 2012;59:420–429.
195. Cai ZP, Parajuli N, Zheng X, Becker L. Remote ischemic preconditioning confers late protection against myocardial ischemia-reperfusion injury in mice by upregulating interleukin-10. *Basic research in cardiology.* 2012;107:277.
196. Yang Z, Zingarelli B, Szabo C. Crucial role of endogenous interleukin-10 production in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation.* 2000;101:1019–1026.
197. Ke Z, Gao A, Xu P, Wang J, Ji L, Yang J. Preconditioning with PEP-1-SOD1 fusion protein attenuates ischemia/reperfusion-induced ventricular arrhythmia in isolated rat hearts. *Exp Ther Med.* 2015;10:352–356.

198. Davis SR. An overview of the antifungal properties of allicin and its breakdown products—the possibility of a safe and effective antifungal prophylactic. *Mycoses*. 2005;48:95–100.
199. Imada O. Toxicity aspects of garlic. In: *First World Congress on the Health Significance of Garlic and Garlic Constituents*. Nutr. Intl. Irvine. 1999;pp 47.
200. Sucur M. Effect of garlic on serum lipids and lipoproteins in patients suffering from hyperlipoproteinemia. *Diabetol Croat*. 1980;9:323–38.
201. Gadkari JV, Joshi VD. Effect of ingestion of raw garlic on serum cholesterol level, clotting time and fibrinolytic activity in normal subjects. *J Postgrad Med*. 1991;37:128–31.
202. Sunter W. Warfarin and garlic. *Pharm J* 1991;246:72.
203. Laroche M, Choudhri S, Gallicano K, Foster B. Severe gastrointestinal toxicity with concomitant ingestion of ritonavir and garlic. In: *Program and Abstracts of the Canadian Association for HIV Research Seventh Annual Canadian Conference on HIV/AIDS, Quebec City, Quebec, Canada, April 30–May 3, 1998* (abstract 471P).
204. Hoshino T, Kashimoto N, Kasuga S. Effects of garlic preparations on the gastrointestinal mucosa. *J. Nutr*. 2001;131:109S–1113S.
205. Jappe U, Bonnekoh B, Hausen BM, Gollnick H. Garlic-related dermatoses: case report and review of the literature. *Am J Contact Dermat* 1999;10:37–39.
206. Anibarro B, Fontela JL, De La Hoz F. Occupational asthma induced by garlic dust. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:734–738.
207. Sen U, Mishra PK, Tyagi N, Tyagi SC. Homocysteine to hydrogen sulfide or hypertension. *Cell biochemistry and biophysics*. 2010;57:49–58.
208. Predmore BL, Julian D, Cardounel AJ. Hydrogen sulfide increases nitric oxide production from endothelial cells by an Akt-dependent mechanism. *Front Physiol*. 2011;2:104.
209. Nie XM, Zhou YJ, Xie Y, Li YF, Yang Q, Zhou ZM. Effect of stent coated with diallyl trisulfide on endothelial structure and function after coronary injury: experiment with dogs. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2006;86:1125–1128.
210. Amagase H. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *The Journal of nutrition*. 2006;136:716S-725S.
211. Banerjee SK, Mukherjee PK, Maulik SK. Garlic as an antioxidant: the good, the bad and the ugly. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 2003;17:97–106.
212. Agarwal KC. Therapeutic actions of garlic constituents. *Medicinal research reviews*. 1996;16:111–124.
213. Chen L, Hong JY, Hussin AH, Cheng WF, Yang CS. Decrease of hepatic catalase level by treatment with diallyl sulfide and garlic homogenates in rats and mice. *J. Biochem. Mol. Toxicol*. 1999;13:127–134.
214. Shaik IH, George JM, Thekkumkara TJ, Mehvar R. Protective effects of diallyl sulfide, a garlic constituent, on the warm hepatic ischemia–reperfusion injury in a rat model. *Pharmaceutical research*. 2008;25:2231.
215. Wu CC, Sheen LY, Chen HW, Tsai SJ, Lii CK. Effects of organosulfur compounds from garlic oil on the antioxidation system in rat liver and red blood cells. *Food and chemical toxicology*. 2001;39:563–569.

-
216. Watson LE, Sheth M, Denyer RF, Dostal DE. Baseline echocardiographic values for adult male rats. *Journal of the American Society of Echocardiography*. 2004;17:161–167.
 217. Mitidieri E, Tramontano T, Gurgone D, et al. Mercaptopyruvate acts as endogenous vasodilator independently of 3-mercaptopruvate sulfurtransferase activity. *Nitric Oxide*. 2018;75:53–59.
 218. Hausenloy DJ, Yellon DM. Ischaemic conditioning and reperfusion injury. *Nature Reviews Cardiology*. 2016;13:193.
 219. Spannbauer A, Traxler D, Lukovic D, Zlabinger K, Winkler J, Gugerell A, et al. Effect of Ischemic Preconditioning and Postconditioning on Exosome-Rich Fraction microRNA Levels, in Relation with Electrophysiological Parameters and Ventricular Arrhythmia in Experimental Closed-Chest Reperfused Myocardial Infarction. *Int J Mol Sci*. 2019;20.
 220. Ma L, Zhu J, Gao Q, Rebecchi MJ, Wang Q, Liu L. Restoring Pharmacologic Preconditioning in the Aging Heart: Role of Mitophagy/Autophagy. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017;72:489–498.
 221. Predmore BL, Kondo K, Bhushan S, Zlatopolsky MA, King AL, Aragon JP, et al. The polysulfide diallyl trisulfide protects the ischemic myocardium by preservation of endogenous hydrogen sulfide and increasing nitric oxide bioavailability. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2012;302:H2410–H2418.
 222. Zhang WJ, Shi ZX, Wang BB, Cui YJ, Guo JZ, Li B. Allitridum mimics effect of ischemic preconditioning by activation of protein kinase C. *Acta Pharmacol Sin*. 2001;22:132–136.
 223. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Ischemia/Reperfusion, *Compr. Physiol*. 2016;7:113–170.
 224. O'Brien PJ, Dameron GW, Beck ML, Kang YJ, Erickson BK, Di Battista TH, Miller KE, Jackson KN, Mittelstadt S. Cardiac troponin T is a sensitive specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. *Lab Anim Sci*. 177;47:5.
 225. Ricchiuti V, Sharkey SW, Murakami MM, Voss EM, Apple FS. Cardiac troponin I and T alterations in dog hearts with myocardial infarction: correlation with infarct size. *Am J Clin Pathol*. 225;110:241–247.
 226. fang Jin H, Wang Y, bao Wang X, Sun Y, shu Tang C, bao Du J. Sulfur dioxide preconditioning increases antioxidative capacity in rat with myocardial ischemia reperfusion (I/R) injury. *Nitric Oxide*. 2013;32:56–61.
 227. Cai WJ, Wang MJ, Moore PK, Jin HM, Yao T, Zhu YC. The novel proangiogenic effect of hydrogen sulfide is dependent on Akt phosphorylation. *Cardiovasc Res*. 2007;76:29–40.
 228. Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, et al. Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc Res*. 2000;45:651–60.
 229. Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest*. 1996;74:86–107.
 230. Zhou X, An G, Lu X. Hydrogen sulfide attenuates the development of diabetic cardiomyopathy. *Clin Sci*. 2015;128:325–335.
 231. Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation*. 1998;97:276–281.
 232. Bogdanov MB, Ferrante RJ, Mueller G, Ramos LE, Martinou JC, Beal MF . Oxidative stress is attenuated in mice overexpressing BCL-2. *Neurosci Lett*. 1999;262:33–36.
-

233. Brocheriou V, Hagege AA, Oubenaissa A, et al. Cardiac functional improvement by a human Bcl-2 transgene in a mouse model of ischemia/reperfusion injury. *J Gene Med.* 2000;2:326–333.
234. Chen ZY, Chua CC, Ho YS, Hamdy RC, Chua BHL. Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *Am J Physiol.* 2001;280:H2313–2320.
235. Nakamura M, Wang NP, Zhao ZQ, et al. Preconditioning decreases Bax expression, PMN accumulation and apoptosis in reperfused rat heart. *Cardiovasc Res.* 2000;45:661–670.
236. Maulik N, Engelman RM, Rousou JA, et al. Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating anti-death gene Bcl-2. *Circulation.* 1999;100:II369–375.
237. Bowie A, O'Neill LAJ. Oxidative stress and nuclear factor- κ B activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol.* 2000;59:13–23.
238. Bonizzi G, Piette J, Merville M-P, et al. Cell type-specific role for reactive oxygen species in nuclear factor- κ B activation by Interleukin-1. *Biochem Pharmacol.* 2000;59:7–11.
239. Chandrasekar B, Smith JB, Freeman GL. Ischemia-reperfusion of rat myocardium activates nuclear factor- κ B and induces neutrophil infiltration via lipopolysaccharide-induced CXC chemokine. *Circulation.* 2001;103:2296–2302.
240. Chandrasekar B, Streitman JE, Colston JT, Freeman GL. Inhibition of nuclear factor κ B attenuates proinflammatory cytokine and inducible nitric-oxide synthase expression in postischemic myocardium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease.* 1998;1406:91–106.
241. Whiteman M, Armstrong JS, Chu SH, Jia-Ling S, Wong BS, Cheung NS, et al. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'? *J Neurochem.* 2004;90:765–8.
242. Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, Rizzo G, Mencarelli A, Orlandi S, et al. Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. *Gastroenterology.* 2005;129:1210–1224.
243. Zhu YZ, Wang ZJ, Ho P, Loke YY, Zhu YC, Huang SH, et al. Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats. *J Appl Physiol.* 2007;102:261–268.
244. Johansen D, Ytrehus K, Baxter GF. Exogenous hydrogen sulfide (H₂S) protects against regional myocardial ischemia-reperfusion injury—Evidence for a role of K ATP channels. *Basic Res Cardiol.* 2006;101:53–60.
245. Shiomi T, Tsutsui H, Ikeuchi M, et al. Streptozotocin-induced hyperglycemia exacerbates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiol.* 2003;42:165–172.
246. Londhe VP. Role of garlic (*Allium sativum*) in various diseases—an overview. *J Pharm Res.* 2011;4:129–134.
247. Eidi A, Eidi M, Esmaeili E. Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine.* 2006;13:624–629.
248. Chang MLW, Johnson MA. Effect of garlic on carbohydrate metabolism and lipid synthesis in rats. *J Nutr.* 1980;110:931–936.

249. Kaneko Y, Kimura Y, Kimura H, Niki I. L-cysteine inhibits insulin release from the pancreatic beta-cell: possible involvement of metabolic production of hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter. *Diabetes*. 2006;55:1391–1397.
250. Ali MY, Whiteman M, Low CM, and Moore PK. Hydrogen sulphide reduces insulin secretion from HIT-T15 cells by a KATP channel-dependent pathway. *J Endocrinol*. 2007;195:105–112.
251. Tang G, Wu L, Liang W, Wang R. Direct stimulation of KATP channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*. 2005;68:1757–1764.
252. Schalinske KL. Interrelationship between diabetes and homocysteine metabolism: hormonal regulation of cystathionine betasynthase. *Nutr. Rev*. 2003;61:136–138.
253. Azad MAK, Huang P, Liu G, Ren W, Teklebrh T, Yan W, et al. Hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease in animal model. *Amino acids*. 2018;50:3–9.
254. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2013;383:69–82.
255. Huang YT, Yao CH, Way CL, Lee KW, Tsai CY, Ou HC, Kuo WW. Diallyl trisulfide and diallyl disulfide ameliorate cardiac dysfunction by suppressing apoptotic and enhancing survival pathways in experimental diabetic rats. *J App Physiol*. 2012;114:402–410.
256. Rivas-Cabanero L, Rodriguez-Lopez AM, Martinez-Salgado C, Saura M, Lamas S, Lopez-Nova JM. Gentamicin treatment increases mesangial cell nitric oxide production. *Experimental nephrology*. 1997;5:23–30.
257. Chen YL, Chen Q, Cheng YF, Jin HH, Kong DS, Zhang F, Wu L, Shao JJ, Zheng SZ. Diallyl trisulfide attenuates ethanol-induced hepatic steatosis by inhibiting oxidative stress and apoptosis. *Biomed. Pharmacother*. 2016;79:35–43.
258. Kuo WW, Wang WJ, Tsai CY, Way CL, Hsu HH, Chen LM. Diallyl trisulfide (DATS) suppresses high glucose-induced cardiomyocyte apoptosis by inhibiting JNK/NFκB signaling via attenuating ROS generation. *Int J Cardiol*. 2013;168:270–280.
259. Polhemus D, Kondo K, Bhushan S, Bir SC, Kevil CG, Murohara T, Lefer DJ, Calvert JW. Hydrogen sulfide attenuates cardiac dysfunction following heart failure via induction of angiogenesis. *Circ Heart Fail*. 2013;6:1077–1086.
260. Yuan P, Xue H, Zhou L, Qu L, Li C, Wang Z, Ni J, Yu C, Yao T, Huang Y, Wang R, and Lu L. Rescue of mesangial cells from high glucose-induced over-proliferation and extracellular matrix secretion by hydrogen sulfide. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26:2119–2126.
261. Borges GR, de Oliveira M, Salgado HC, Fazan Jr R. Myocardial performance in conscious streptozotocin diabetic rats. *Cardiovascular Diabetology*. 2006;5:26.
262. Sun D, Shen M, Li J et al. Cardioprotective effects of tanshinone IIA pretreatment via kinin B2 receptor-Akt-GSK-3β dependent pathway in experimental diabetic cardiomyopathy. *Cardiovascular Diabetology*. 2011;10:4.
263. Moussa S. Oxidative stress in diabetes mellitus. *Romanian Journal of Biophysics*. 2008;18:225–236.
264. Guan Q, Zhang Y, Yu C, Liu Y, Gao L, Zhao J. Hydrogen sulfide protects against high glucose-induced apoptosis in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011;152:177–183.

-
265. Badole SL, Chaudhari SM, Jangam GB, Kandhare AD, Bodhankar SL. Cardioprotective activity of *Pongamia pinnata* in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *BioMed research international*. 2015;dx.doi.org/10.1155/2015/403291.
 266. El-Sewedy MM, Sadik NA, Shaker OG. Role of sulfurous mineral water and sodium hydrosulfide as potent inhibitors of fibrosis in the heart of diabetic rats. *Arch Biochem Biophys*. 2011;506:48–57.
 267. Xu W, Wu W, Chen J, Guo R, Lin J, Liao X, Feng J. Exogenous hydrogen sulfide protects H9c2 cardiac cells against high glucose-induced injury by inhibiting the activities of the p38MAPK and ERK1/2 pathways. *Int J Mol Med*. 2013;32:917–925.
 268. Wei WB, Hu X, Zhuang XD, Liao LZ, Li WD. GYY4137, a novel hydrogen sulfide-releasing molecule, likely protects against high glucose-induced cytotoxicity by activation of the AMPK/mTOR signal pathway in H9c2 cells. *Mol Cell Biochem*. 2014;389:249–256.
 269. Yang Z, Yang C, Xiao L, Liao X, Lan A, Wang X, Guo R, Chen P, Hu C, Feng J. Novel insights into the role of HSP90 in cytoprotection of H₂S against chemical hypoxia-induced injury in H9c2 cardiac myocytes. *Int J Mol Med*. 2011;28:397–403.
 270. Luan HF, Zhao ZB, Zhao QH, Zhu P, Xiu MY, Ji Y. Hydrogen sulfide postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia and reperfusion injury mediated by the JAK2/STAT3 survival pathway. *Braz J Med Biol Res*. 2012;45:898–905.
 271. Devaraj S, Glaser N, Griffen S, Wang-Polagruto J, Miguelino E, Jialal I. Increased monocytic activity and biomarkers of inflammation in patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2006;55:774–779.
 272. Westermann D, Van Linthout S, Dhayat S, Dhayat N, Escher F, Bücker-Gärtner C. Cardioprotective and anti-inflammatory effects of interleukin converting enzyme inhibition in experimental diabetic cardiomyopathy. *Diabetes*. 2007;56:1834–1841.
 273. Tschope C, Walther T, Escher F, Spillmann F, Du J, Altmann C, et al. Transgenic activation of the kallikrein-kinin system inhibits intramyocardial inflammation, endothelial dysfunction, and oxidative stress in experimental diabetic cardiomyopathy. *FASEB J* 2005;19:2057–2059.
 274. Shiraishi I, Melendez J, Ahn Y, Skavdahl M, Murphy E, Welch S, et al. Nuclear targeting of Akt enhances kinase activity and survival of cardiomyocytes. *Circ Res*. 2004;94:884–891.
 275. Saponaro F, Sonaglioni A, Rossi A, Montefusco L, Lombardo M, Adda G, Arosio M. Improved diastolic function in type 2 diabetes after a six month liraglutide treatment. *Diabetes research and clinical practice*. 2016;118:21–28.
 276. Sun X, Wang W, Dai J, Jin S, Huang J, Guo C, Wang C, Pang L, Wang Y. A Long-Term and Slow-Releasing Hydrogen Sulfide Donor Protects against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Sci Rep*. 2017;7:3541.
 277. Khatua TN, Adela R, Banerjee SK. Garlic and cardioprotection: insights into the molecular mechanisms. *Can J Physiol Pharmacol*. 2013;91:448–458.
 278. McCracken E, Monaghan M, Sreenivasan S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clinics in dermatology*. 2018;36:14–20.
 279. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008;51:216–226.
-

-
280. Skovso S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *Journal of diabetes investigation*. 2014;5:349-358.
281. Choi CU, Seo HS, Lee EM, Shin SY, Choi UJ, Na JO, Lim HE, Kim JW, Kim EJ, Rha SWea. Statins do not decrease small, dense low-density lipoprotein. *Tex Heart Inst J*. 2010;37:421-428.
282. Perez-Torres I, Torres-Narvaez JC, Pedraza-Chaverri J, Rubio-Ruiz ME, Diaz-Diaz E, Del Valle-Mondragon L, Martinez-Memije R, Varela Lopez E, Guarner-Lans V. Effect of the Aged Garlic Extract on Cardiovascular Function in Metabolic Syndrome Rats. *Molecules*. 2016;21:1425.
283. Ha AW, Ying T, Kim WK. The effects of black garlic (*Allium sativum*) extracts on lipid metabolism in rats fed a high fat diet. *Nutr. Res. Pract*. 2015;9:30-36.
284. Lee YM, Gweon OC, Seo YJ, Im J, Kang MJ, Kim MJ, Kim JI. Antioxidant effect of garlic and aged black garlic in animal model of type 2 diabetes mellitus. *Nutr. Res. Pract*. 2009;3:156-161.
285. Aouadi R, Aouidet' A, Elkadhi A, Rayana CB, Jaafoura' H, Tritar B, Nagati K. Effect of fresh garlic (*Allium sativum*) on lipid metabolism in male rats. *Nutr Res*. 2000;20:273-280.
286. Thomson M, Al-Qattan KK, Bordia T. including garlic in the diet may help lower blood glucose, cholesterol and triglycerides. *J. Nutr*. 2006;136:800-802.
287. Ali M, Al-Qattan KK, Al-Enezi F, Khanafer RMA, Mustafa T. Effect of allicin from garlic powder on serum lipids and blood pressure in rats fed with a high cholesterol diet. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2000;62:253-259.
288. Shrivastava A, Chaturvedi U, Sonkar R, Saxena JK, Khanna AK, Bhatia G. Antidyslipidemic, antiatherogenic and antioxidant activity of *Allium sativum* in Charles Foster rats. *Int J Curr Pharm Rev Res (IJCPR)*. 2011;2:110-119.
289. Atkin M, Laight D, Cummings MH. The effects of garlic extract upon endothelial function, vascular inflammation, oxidative stress and insulin resistance in adults with type 2 diabetes at high cardiovascular risk. A pilot double blind randomized placebo controlled trial. *J. Diabetes Complic*. 2016;30:723-727.
290. Sun L, Zhang S, Yu C, Pan Z, Liu Y, Zhao J, et al. Hydrogen sulfide reduces serum triglyceride by activating liver autophagy via the AMPK-mTOR pathway. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2015;309:E925-E935.
291. Thomson M, Al-Amin ZM, Al-Qattan KK, Shaban LH, Ali M. Anti-diabetic and hypolipidaemic properties of garlic (*Allium sativum*) in streptozotocin- induced diabetic rats. *Int J Diabetes Metabol*. 2007;15:108-115.
292. Padiya R, Banerjee SK. Garlic as an anti-diabetic agent: recent progress and patent reviews. *Recent Pat Food Nutr Agric*. 2013;5:105-127.
293. Tripathi P, Gupta PP, Lal VK. Effect of Co-administration of *Allium sativum* extract and metformin on blood glucose of Streptozotocin induced diabetic rats. *J Intercult Ethnopharmacol*. 2013;2:81-84.
294. Kasuga S, Ushijima M, Morihara N. Effect of aged garlic extract (AGE) on hyperglycemia induced by immobilization stress in mice. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 1999:191-197.
295. Orekhov AN, Grunwald J. Effects of garlic on atherosclerosis. *Nutrition*. 1997;13:656-663.
296. Belemkar S, Dhameliya K, Pata MK. Comparative study of garlic species (*Allium sativum* and *Allium porrum*) on glucose uptake in diabetic rats. *Ind J Clin Biochem*. 2013;8:80-85.
-

-
297. Albajali AA, Nagi AH, Shahzad M, Ullah MI, Hussain S. Effect of *Allium sativa* L. on pancreatic β . cells in comparison to *Nigella sativa* L. in streptozotocin induced diabetic rats. *J Med Plants Res.* 2011;5:5779–5784.
 298. Osman M, Adnan A, Bakar NS, Alashkham F. Allicin has significant effect on autoimmune anti-islet cell antibodies in type 1 diabetic rats. *Pol J Pathol.* 2012;63:248–254.
 299. Foushee DB, Ruffin J, Baanerjee U. Garlic as a natural agent for the treatment of hypertension: A preliminary report. *Cytobios.* 1982;34:145–152.
 300. Reinhart KM, Coleman CI, Teevan C, Vachhani P, White CM. Effects of garlic on blood pressure in patients with and without systolic hypertension: A meta-analysis. *Ann. Pharmacother.* 2008;42:1766–1771.
 301. Rashid A, Khan HH. The mechanism of hypotensive effect of garlic extract. *J. Pak. Med. Assoc.* 1985;35:357–362.
 302. Sendl A, Elbl G, Steinke B, Redl K, Breu W, Wagner H. Comparative pharmacological investigations of *Allium ursinum* and *Allium sativum*. *Planta Med.* 1993;58:1–7.
 303. Asdaq SM, Inamdar MN. Potential of garlic and its active constituent, S-allyl cysteine, as antihypertensive and cardioprotective in presence of captopril. *Phytomedicine.* 2010;17:1016–1026.
 304. Guillard JC, Favier A, Potier de Courcy G, Galan P, Hercberg S. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor or a simple marker of vascular disease? 1. Basic data. *Pathol Biol (Paris).* 2003;51:101–110.
 305. Guillard JC, Favier A, Potier de Courcy G, Galan P, Hercberg S. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor or a simple marker of vascular disease? 2. Epidemiological data. *Pathol Biol (Paris).* 2003;51:111–112.
 306. Hayden MR, Tyagi SC. Homocysteine and reactive oxygen species in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atheroscleropathy: the pleiotropic effects of folate supplementation. *Nutrition journal.* 2004;3:4.
 307. Ceriello A. Oxidative stress and diabetes-associated complications. *Endocr Pract.* 2006;12:60–62.
 308. Kaneto H, Nakatani Y, Kawamori D, Miyatsuka T, Matsuoka TA, Matsuhisa M, Yamasaki Y. Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and c-Jun N-terminal kinase in pancreatic β -cell dysfunction and insulin resistance. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37:1595–1608.
 309. Jang EK, Seo JH, Lee SP. Physiological activity and antioxidative effects of aged black garlic (*Allium sativum* L.) extract. *Korean Society of Food Science and Technology.* 2008;40:443–448.
 310. Kang YH, Park YK, Lee GD. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean Society of Food Science and Technology.* 1996;28:232–239.
 311. Shin CH, Ihm J. Effects of S-allylcysteine on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Korean Society of Endocrinology.* 2008;23:129–136.
 312. Ahmad MS, Pischetsrieder M, Ahmed A. Aged garlic extract and S-allyl cysteine prevent formation of advanced glycation endproducts. *Eur J Pharmacol.* 2007;561:32–38.
 313. Qu Z, Mossine VV, Cui J, Sun GY, Gu Z. Protective effects of AGE and its components on neuroinflammation and neurodegeneration. *NeuroMol. Med.* 2016;18:474–482.
-

314. Dhar A, Desai K, Kazachmov M, Yu P, Wu L. Methylglyoxal production in vascular smooth muscle cells from different metabolic precursors. *Metabolism*. 2008;57:1211–1220.
315. Desai KM, Wu L. Free radical generation by methylglyoxal in tissues. *Drug Metabol. Drug Interact.* 2008;23:151–173.
316. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 2004;114:1752–1761.
317. Vazquez-Prieto MA, González RE, Renna NF, Galmarini CR, Miatello RM. Aqueous garlic extracts prevent oxidative stress and vascular remodeling in an experimental model of metabolic syndrome. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010;58:6630–6635.
318. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsén B, Lahti K, Nisseń M, Taskinen MR, Groop L. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2001;24:683–689.
319. Rybka J, Kupczyk D, Kędziora-Kornatowska K, Motyl J, Czuczejko J, Szewczyk-Golec K, Kozakiewicz M, Pawluk H, Carvalho LA, Kędziora J. Glutathione-related antioxidant defense system in elderly patients treated for hypertension. *Cardiovasc. Toxicol.* 2011;11:1–9.
320. Ried K, Travica N, Sali A. The effect of aged garlic extract on blood pressure and other cardiovascular risk factors in uncontrolled hypertensives: The AGE at Heart trial. *Integr. Blood Press. Control.* 2016;9:9–21.
321. Bian JS, Yong QC, Pan TT, Feng ZN, Ali MY, Zhou S, Moore PK. Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2006;316:670–678.
322. Eisen A, Fisman EZ, Rubenfire M, Freimark D, McKechnie R, Tenenbaum A, Motro M, Adler Y. Ischemic preconditioning: nearly two decades of research: a comprehensive review. *Atherosclerosis*. 2004;172:201–210.
323. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J.* 2001;20:6008–6016.
324. Geng B, Chang L, Pan C, Qi Y, Zhao J, Pang Y, Du J, Tang C. Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:756–763.
325. Gross GJ, Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res.* 1992;70:223–233.
326. Desai KM, Chang T, Untereiner A, Wu L. Hydrogen sulfide and the metabolic syndrome. *Expert review of clinical pharmacology*. 2011;4:63–73.
327. Tripatara P, Patel NS, Collino M, Gallicchio M, Kieswich J, Castiglia S, Benetti E, Stewart KN, Brown PA, Yaqoob MM, Fantozzi R, Thiernemann C. Generation of endogenous hydrogen sulfide by cystathionine gamma-lyase limits renal ischemia/reperfusion injury and dysfunction. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2008;88:1038–1048.
328. Shukla Y, Kalra N. Cancer chemoprevention with garlic and its constituents. *Cancer Lett.* 2007;247:167–181.