

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Slavica S. Mutavdžin Krneta

EFEKTI VITAMINA B6 I FOLNE KISELINE NA
KARDIOVASKULARNI SISTEM PACOVA SA DIJABETES
MELITUSOM INDUKOVANIM STREPTOZOTOCINOM

Doktorska disertacija

Beograd, 2022.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Slavica S. Mutavdžin Krneta

EFFECTS OF VITAMIN B6 AND FOLIC ACID ON THE
CARDIOVASCULAR SYSTEM OF RATS WITH DIABETES
MELLITUS INDUCED BY STREPTOZOTOCIN

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

Mentor doktorske disertacije: Prof. dr Dragan Đurić, redovni profesor na Institutu za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Komentor doktorske disertacije: Prof. dr Milica Labudović Borović, vanredni profesor na Institutu za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

KOMISIJA ZA OCENU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE:

1. Prof. dr Branislav Milovanović, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu
2. Prof. dr Kristina Gopčević, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu
3. Prof. dr Vladimir Jakovljević, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu

Datum odbrane:

Ova doktorska teza je realizovana u:

- *Laboratoriji za kardiovaskularnu fiziologiju Instituta za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“ Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom Prof. dr Dragana Đurića,*
- *Laboratoriji za analitiku biomolekula Instituta za hemiju u medicini „Prof. dr Petar Matavulj“, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom Prof. dr Kristine Gopčević,*
- *Laboratoriji Instituta za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“ Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom Prof. dr Milice Labudović Borović.*

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

Zahvalnica

Zahvaljujem svom mentoru, Prof. dr Draganu Đuriću na nesebičnoj, svesrdnoj i bezrezervnoj podršci, pravilnom usmeravanju, motivaciji, strpljenju, prenesenom znanju, iskustvu i prijateljskim savetima tokom rada na ovoj doktorskoj tezi. Mnogo hvala na svim idejama i sugestijama koje su doprinele kvalitetu našeg istraživanja.

Zahvaljujem i svom komentoru, Prof. dr Milici Labudović Borović na prenesenom znanju iz oblasti histologije, na pomoći oko pripreme, obrade i analize histoloških preparata, kao i na velikoj podršci i prijateljskim savetima tokom izrade doktorske teze.

Veliku zahvalnost izražavam članovima komisije, Prof. dr Branislavu Milovanoviću, Prof. dr Kristini Gopčević i Prof. dr Vladimiru Jakovljeviću, na korisnim i značajnim sugestijama koje su doprinele kvalitetu ove teze.

Mnogo hvala svim članovima Programskog saveta doktorskih studija – smer Fiziološke nauke na korisnim predlozima koje su poboljšale kvalitet istraživanja i teze.

Zahvalnost izražavam i svojim dragim kolegama i prijateljima Doc. dr Mariji Stojanović, Doc. dr Jovani Jakovljević Uzelac, Asist. dr Dušanu Todoroviću, diplomiranom medicinskom tehničaru Jovanu Despotoviću i Dragani Pavlović na nesebičnoj i značajnoj podršci tokom eksperimentalnog rada, kao i na tehničkoj pomoći u toku izvođenja eksperimenata.

Posebnu zahvalnost dugujem svim članovima Instituta za medicinsku fiziologiju na pomoći u eksperimentalnom radu i dobronamernim smernicama.

Hvala mojoj kolegini i prijatelju Asist. dr Biljani Đurić za sve trenutke provedene zajedno od prvog dana našeg zaposlenja na Institutu za medicinsku fiziologiju.

Prof. dr Kristini Gopčević dugujem neizmernu zahvalnost za prijateljske savete, saradnju, česte i korisne konsultacije u oblasti biohemijskih ispitivanja.

Veliko hvala Doc. dr Sanji Stanković, višem naučnom saradniku, na saradnji, podršci i značajnim savetima u toku izrade teze.

Zahvaljujem Doc. dr Jeleni Rakočević i svim članovima tima Instituta za histologiju i embriologiju predvođenim Prof. dr Milicom Labudović Borović na pomoći oko pripreme, obrade i analize histoloških preparata.

Asist. dr Ani Medić, prijatelju i kolegini, veliko hvala za pomoć u oblasti biohemijskih ispitivanja i svu pruženu pomoć i oslonac.

Veliko hvala Prof. dr Helmutu Hajnleu sa Univerziteta u Tibingenu za pruženu podršku tokom izrade doktorske disertacije.

Hvala svim prijateljima koji su me podržavali i verovali u mene.

Posebnu zahvalnost upućujem porodici na svoj ljubavi i bezrezervnoj podršci. Roditeljima sam posebno zahvalna na pomoći i podsticanju koje su pružali meni i sestri od prvih dana našeg školovanja, a sestri zato što mi je oduvek bila uzor i podrška u svakom trenutku. Mnogo hvala mom dedi zato što je uvek verovao u mene. Hvala mojim dragima koji se raduju, iako nisu dočekali ovaj trenutak. Veliko hvala suprugu Jovi što je učinio lakšim, razumeo i podržavao moj rad. Najveće hvala mojoj Ilijani jer je ulepšala pisanje doktorske disertacije.

Najveću zahvalnost za sve izražavam i dugujem dragom Bogu.

Mojoj porodici

EFEKTI VITAMINA B6 I FOLNE KISELINE NA KARDIOVASKULARNI SISTEM PACOVA SA DIJABETES MELITUSOM INDUKOVANIM STREPTOZOTOCINOM

REZIME

Cilj: Istraživanje efekata subhronične primene vitamina B6 (piridoksina) i folne kiseline na kardiometaboličke parametre, parametre oksidativnog stresa, aktivnosti i distribuciju izoformi laktat i malat dehidrogenaze (LDH i MDH), remodelovanje srčanog tkiva procenom relativnih aktivnosti matriksnih metaloproteinaza (MMP) -2 i -9 u tkivu srca pacova, histomorfometrijske parametre srca, aorte i pankreasa i imunohistohemijske promene u tkivu srca i pankreasa kod pacova sa dijabetes melitusom (DM) indukovanim streptozotocinom (STZ).

Materijal i metode: Istraživanje je sprovedeno tokom četiri nedelje. Eksperimentalne životinje su nasumično podeljene u 9 eksperimentalnih grupa (8 do 10 životinja/grupi): C1 (kontrolna grupa, fiziološki rastvor 1 ml/kg telesne mase (t.m.) intraperitonealno (i.p.) jednokratno); C2 (kontrolna grupa, fiziološki rastvor 1 ml/kg t.m. i.p. 28 dana); DM (STZ, 100 mg/kg t.m. u fiziološkom rastvoru i.p. jednokratno); P (piridoksin 7 mg/kg t.m. i.p. 28 dana), DM+P (STZ, 100 mg/kg t.m. i.p. jednokratno i piridoksin 7 mg/kg t.m. i.p. 28 dana); FA (folna kiselina 5 mg/kg t.m. i.p. 28 dana); DM+FA (STZ, 100 mg/kg t.m. i.p. jednokratno i folna kiselina 5 mg/kg t.m. i.p. 28 dana); P+FA (piridoksin 7 mg/kg t.m. i folna kiselina 5 mg/kg t.m. i.p. 28 dana); DM+P+FA (STZ, 100 mg/kg t.m. i.p. jednokratno i piridoksin 7 mg/kg t.m. i folna kiselina 5 mg/kg t.m. i.p. 28 dana). Određivani su različiti kardiometabolički biomarkeri u serumu i plazmi, a u tkivu srca aktivnosti antioksidativnih enzima [superoksid dismutaze (SOD) i katalaze (CAT)], aktivnosti i distribucija izoformi LDH i MDH, relativne aktivnosti MMP-2 i MMP-9. Pored toga, tkivo srca, aorte i pankreasa korišćeno je za analizu histomorfometrijskih parametara. Imunohistohemijska analiza rađena je na tkivu srca (BCL-2, BCL-6, Ki-67, PCNA) i tkivu pankreasa (insulin).

Rezultati: Primena STZ je bila praćena značajnim smanjenjem telesne mase, porastom koncentracije glukoze i smanjenjem nivoa insulina u serumu, kao i povećanjem HOMA-IR, smanjenjem koncentracije troponina T i fibrinogena, povećanjem aktivnosti fon Vilebrandovog faktora, aktivnosti hepatičnih enzima: aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT) i alkalne fosfataze (ALP), kao i α -amilaze (α -AMY), i smanjenjem koncentracije ukupnih proteina i albumina u serumu. Koncentracija uree u serumu je bila povišena, a kreatinina snižena nakon primene STZ. U homogenatu srčanog tkiva pokazano je povećanje SOD, CAT i MDH. Detektovane su četiri LDH izoforme (LDH-1, LDH-2, LDH-3 i LDH-4) i tri MDH izoforme [peroksizomalna (pMDH), mitohondrijalna (mMDH) i citosolna (cMDH)] kod svih eksperimentalnih životinja. Primena STZ je bila praćena smanjenjem aktivnosti LDH-1 i povećanjem aktivnosti LDH-3 i LDH-4, kao i smanjenjem aktivnosti cMDH i povećanjem aktivnosti pMDH. U DM grupi je bila smanjena aktivnost aktivnog oblika MMP-9 (aMMP-9) i povećana aktivnost latentnog oblika MMP-2 (proMMP-2) u poređenju sa C1 grupom, pored toga u DM grupi se uočava i aktivni oblik MMP-2 (aMMP-2). Nakon primene STZ uočeno je smanjenje debljine interventrikularnog septuma (IVS). Primena STZ i DM su smanjili broj Langerhansovih ostrvaca po mm² površine tkiva pankreasa, kao i broj insulin pozitivnih Langerhansovih ostrvaca. Nije bilo BCL-2 i BCL-6 pozitivnih ćelija, ni razlika u pozitivnosti Ki-67, dok je pozitivnost PCNA bila statistički značajno manja u zidu leve i desne komore i IVS pacova sa DM. Primena piridoksina kod pacova sa DM je dovela do smanjenja aktivnosti enzima jetre (AST, ALT i ALP), α -AMY, CAT i MDH. Bila je praćena povećanjem aktivnosti LDH-1 i smanjenjem aktivnosti LDH-3 i LDH-4, smanjenjem pMDH i povećanjem mMDH aktivnosti, kao i povećanjem aktivnosti aMMP-2 i aMMP-9. Primena folne kiseline kod pacova sa DM je značajno smanjila koncentraciju glukoze i aktivnost ALP, povećala je koncentraciju fibrinogena, uree i kreatinina. Dovala je do smanjenja aktivnosti CAT, SOD i MDH. Povećala je aktivnosti LDH-1 i LDH-2 i smanjila aktivnosti LDH-3 i LDH-4, i pMDH. Smanjila je aktivnost proMMP-2 i povećala aktivnost aMMP-9. Udružena primena piridoksina i folne kiseline smanjila je aktivnosti enzima jetre (AST, ALT i ALP), α -

AMY, i povećala koncentracije albumina i kreatinina u serumu, smanjila je aktivnosti CAT i SOD. Povećala je aktivnost LDH-1 i smanjila aktivnosti LDH-3, LDH-4 i pMDH. Smanjila je aktivnost proMMP-2 i povećala aktivnost aMMP-9. Nije bilo uticaja pojedinačne primene piridoksina i folne kiseline na histomorfometrijske i imunohistohemijske parametre srca. Udružena primena piridoksina i folne kiseline je dovela do smanjenja debljine IVS i povećanja pozitivnosti PCNA u levoj komori.

Zaključci: Pojedinačna i udružena primena piridoksina i folne kiseline tokom četiri nedelje kod pacova sa DM ima značajne pozitivne efekte na dijabetesom izmenjene kardiometaboličke biomarkere, parametre oksidativnog stresa, parametre remodelovanja srčanog tkiva, kao i na histomorfometrijske i imunohistohemijske parametre.

Ključne reči: dijabetes melitus, streptozotocin, piridoksin, folna kiselina, biohemijski markeri, oksidativni stres, remodelovanje srčanog tkiva, imunohistohemijski markeri, pacov

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Fiziološke nauke

udk br: _____

EFFECTS OF VITAMIN B6 AND FOLIC ACID ON THE CARDIOVASCULAR SYSTEM OF RATS WITH DIABETES MELLITUS INDUCED BY STREPTOZOTOCIN

ABSTRACT

Objective: Investigation of the effects of subchronic application of vitamin B6 (pyridoxine) and folic acid on cardiometabolic and oxidative stress parameters, activities and distribution of lactate and malate dehydrogenase (LDH and MDH) isoforms, cardiac tissue remodeling by estimating the relative activities of matrix metalloproteinase (MMP) -2 and -9, histomorphometric parameters of the heart, aorta and pancreas, and immunohistochemical changes in heart and pancreatic tissue in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus (DM).

Materials and methods: The study was conducted for four weeks. Experimental animals were divided into 9 experimental groups randomly (8 to 10 animals/group): C1 (control group, saline 1 ml/kg body weight (b.w) intraperitoneally (i.p.) one day); C2 (control group, saline 1 ml/kg b.w. i.p. 28 days); DM (STZ, 100 mg/kg b.w. in saline i.p. one day); P (pyridoxine 7 mg/kg b.w. i.p. 28 days), DM+P (STZ, 100 mg/kg b.w. i.p. one day and pyridoxine 7 mg/kg b.w. i.p. 28 days); FA (folic acid 5 mg/kg b.w. i.p. 28 days); DM+FA (STZ, 100 mg/kg b.w. i.p. one day and folic acid 5 mg/kg b.w. i.p. 28 days); P+FA (pyridoxine 7 mg/kg b.w. i.p. and folic acid 5 mg/kg b.w. i.p. 28 days); DM+P+FA (STZ, 100 mg/kg b.w. i.p. one day and pyridoxine 7 mg/kg b.w. i.p. and folic acid 5 mg/kg b.w. i.p. 28 days). Cardiometabolic biomarkers were determined in serum and plasma, and activities of antioxidant enzymes [superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT)], activities and distribution of LDH and MDH isoforms, relative activities of MMP-2 and MMP-9 were determined in the heart tissue. Tissue of the heart, aorta and pancreas was used for histomorphometric analysis. Immunohistochemical analysis was performed on heart tissue (BCL-2, BCL-6, Ki-67, PCNA) and pancreatic tissue (insulin).

Results: After STZ application the following changes were observed: significant decrease in body weight, increase in glucose concentration and decrease in serum insulin level, as well as increase in HOMA-IR, decrease in troponin T and fibrinogen, increase in von Willebrand factor activity, activity of hepatic enzymes: aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP), as well as α -amylase (α -AMI), and decreased concentration of total proteins and albumin in serum. Serum urea was elevated and creatinine decreased after STZ administration. An increase in SOD, CAT and MDH was shown in the homogenate of cardiac tissue. Four LDH isoforms (LDH-1, LDH-2, LDH-3 and LDH-4) and three MDH isoforms [peroxisomal (pMDH), mitochondrial (mMDH) and cytosolic (cMDH)] were detected in all experimental animals. The application of STZ was followed by a decrease in LDH-1 activity and an increase in LDH-3 and LDH-4 activity, as well as a decrease in cMDH activity and an increase in pMDH activity. In the DM group, the activity of the active form MMP-9 (aMMP-9) was reduced and the activity of the latent form MMP-2 (proMMP-2) was increased in comparison to the C1 group, in addition, the active form MMP-2 (aMMP-2) was observed in the DM group. After the application of STZ, a decrease in the thickness of the interventricular septum (IVS) was observed. The use of STZ and DM reduced the number of islets of Langerhans per mm² of pancreatic tissue surface area, as well as the number of insulin-positive islets of Langerhans. There were no BCL-2 and BCL-6 positive cells and no difference in Ki-67 positivity was detected, while PCNA positivity was statistically significantly lower in left and right ventricular wall and IVS of rats with DM. Administration of pyridoxine in rats with DM resulted in decreased liver enzyme activity (AST, ALT, and ALP), α -AMY, CAT, and MDH. There was an increase in LDH-1 activity and a decrease in LDH-3 and LDH-4 activity, a decrease in pMDH and an increase in mMDH activity, as well as an increase in aMMP-2 and aMMP-9 activity. Folic acid administration in rats with DM significantly reduced the concentration of glucose and ALP activity, increased the concentration of fibrinogen, urea and creatinine. It led to a reduction in the activities of CAT, SOD and MDH. Folic acid increased the activities of LDH-1 and LDH-2 and decreased the activities of LDH-3 and LDH-4, and pMDH. It decreased the activity of

proMMP-2 and increased the activity of aMMP-9. The combined use of pyridoxine and folic acid decreased the activities of liver enzymes (AST, ALT and ALP), α -AMY, and increased serum albumin and creatinine concentrations, reduced CAT and SOD activities. It increased LDH-1 activity and decreased LDH-3, LDH-4 and pMDH activities. It decreased the activity of proMMP-2 and increased the activity of aMMP-9. There was no effect of individual administration of pyridoxine or folic acid on histomorphometric and immunohistochemical parameters of the heart. The combined use of pyridoxine and folic acid led to a decrease in IVS thickness and an increase in left ventricular PCNA positivity.

Conclusions: Single and combined administration of pyridoxine and folic acid in rats with DM during four-week period has significant positive effects on diabetes-altered cardiometabolic biomarkers, oxidative stress parameters, cardiac tissue remodeling, as well as histomorphometric and immunohistochemical parameters.

Key words: diabetes mellitus, streptozotocin, pyridoxine, folic acid, biochemical markers, oxidative stress, cardiac tissue remodeling, immunohistochemical markers, rat

Research area: Medicine

Research field: Physiological sciences

udk no: _____

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Dijabetes melitus	2
1.2. Dijabetes melitus tip 1	3
1.2.1. Epidemiologija dijabetes melitusa tipa 1	3
1.2.2. Dijagnoza dijabetes melitusa tipa 1	4
1.2.3. Patogeneza dijabetes melitusa tipa 1	4
1.2.3.1. Genetski faktori	5
1.2.3.2. Faktori životne sredine	5
1.2.3.3. Imunski faktori.....	5
1.2.3.3.1. Imunska tolerancija.....	5
1.2.3.3.2. Čelijski imunitet.....	6
1.2.3.3.3. Humoralni imunitet.....	6
1.2.4. Komplikacije dijabetes melitusa tipa 1	6
1.2.5. Lečenje i prevencija dijabetes melitusa tipa 1	7
1.2.6. Troškovi lečenja dijabetes melitusa tipa 1	9
1.3. Dijabetična kardiomiopatija	9
1.3.1. Epidemiologija srčane insuficijencije povezane sa dijabetes melitusom.....	10
1.3.2. Faktori rizika za dijabetičku kardiomiopatiju	10
1.3.3. Razvoj dijabetičke kardiomiopatije: od subkliničkih promena do klinički manifestne srčane insuficijencije	10
1.3.3.1. Kardiomiopatija kod dijabetes melitusa tipa 1 i 2	12
1.3.3.2. Remodelovanje i srčana disfunkcija	13
1.3.3.3. Inflamacija miokarda.....	14
1.3.3.4. Srčani oksidativni stres	15
1.3.4. Prevencija nastanka dijabetičke kardiomiopatije	16
1.4. Oksidativni stres	16
1.4.1. Slobodni radikali	16
1.4.2. Antioksidativna zaštita	18
1.4.3. Oksidativni stres i dijabetes melitus.....	19
1.5. Vitamin B6	20
1.5.1. Uloga vitamina B6	22
1.5.2. Vitamin B6 i oksidativni stres.....	22
1.5.3. Nedostatak vitamina B6 i različita oboljenja	22
1.6. Folna kiselina	25
1.6.1. Uloga folne kiseline	26
1.6.2. Folna kiselina i oksidativni stres.....	27
1.6.3. Nedostatak folne kiseline i različita oboljenja	27
1.7. Animalni modeli dijabetes melitusa tipa 1	29
1.7.1. Hemijski indukovani modeli dijabetes melitusa tipa 1	29
1.7.2. Spontani autoimunski modeli dijabetes melitusa tipa 1	31
1.7.3. Genetski indukovani modeli dijabetes melitusa tipa 1.....	31
1.7.4. Virusima izazvani modeli dijabetes melitusa tipa 1.....	31
1.7.5. Hirurški indukovani modeli dijabetes melitusa tipa 1	32
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	33
3. MATERIJAL I METODE	35
3.1. Eksperimentalne životinje	36

3.2.	Ekspperimentalne grupe	36
3.3.	Indukcija dijabetes melitusa tipa 1 kod pacova.....	37
3.4.	Varijable koje se mere u studiji.....	37
3.4.1.	Određivanje biohemijskih parametara u serumu i plazmi	38
3.4.2.	Kardiosomatski indeks	39
3.4.3.	Priprema uzoraka tkiva srca.....	39
3.4.4.	Određivanje parametara u tkivu srca pacova metodom spektrofotometrije	39
3.4.4.1.	Merenje koncentracije proteina metodom po Bradford-u	39
3.4.4.2.	Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima u tkivu srca pacova	39
3.4.4.2.1.	Određivanje aktivnosti katalaze.....	39
3.4.4.2.2.	Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze	39
3.4.4.3.	Indeks lipidne peroksidacije	40
3.4.4.4.	Određivanje aktivnosti laktat dehidrogenaze u tkivu srca pacova.....	40
3.4.4.5.	Određivanje aktivnosti malat dehidrogenaze u tkivu srca pacova.....	40
3.4.5.	Određivanje parametara u tkivu srca pacova metodom elektroforeze	41
3.4.5.1.	Određivanje izoformi laktat dehidrogenaze u tkivu srca pacova.....	41
3.4.5.2.	Određivanje izoformi malat dehidrogenaze u tkivu srca pacova.....	41
3.4.5.3.	Određivanje aktivnosti matriksnih metaloproteinaza -2 i -9 u uzorku tkiva srca.....	41
3.4.5.4.	Denzitometrijsko određivanje aktivnosti enzima na gelovima.....	42
3.4.6.	Procesiranje tkiva – priprema tkiva za analizu svetlosnim mikroskopom.....	42
3.4.6.1.	Histološka i morfometrijska analiza	43
3.4.6.2.	Imunohistohemijska analiza uzoraka tkiva srca i pankreasa	43
3.5.	Hemikalije i potrošni materijal.....	44
3.6.	Statistička analiza	44
4.	REZULTATI	45
4.1.	UTICAJ DIJABETES MELITUSA NA ISPITIVANE PARAMETRE – REZULTATI APLIKACIJE STZ I INDUKCIJE DIJABETES MELITUSA U ODNOSU NA KONTROLNU GRUPU (C1)	46
4.1.1.	Indukcija dijabetes melitusa.....	46
4.1.2.	Telesna masa i kardiosomatski indeks	47
4.1.3.	Biohemijski parametri.....	49
4.1.4.	Aktivnost antioksidativnih enzima u tkivu srca pacova.....	55
4.1.5.	Indeks lipidne peroksidacije u tkivu srca pacova.....	56
4.1.6.	Aktivnost laktat i malat dehidrogenaze u tkivu srca pacova.....	57
4.1.7.	Izoforme laktat i malat dehidrogenaze u tkivu srca pacova.....	58
4.1.8.	Aktivnost matriksnih metaloproteinaza -2 i -9 u tkivu srca pacova	60
4.1.9.	Histološka i morfometrijska analiza uzoraka tkiva srca, aorte i pankreasa i imunohistohemijska analiza uzoraka tkiva pankreasa	61
4.1.10.	Imunohistohemijska analiza uzoraka tkiva srca.....	65
4.2.	UTICAJ PRIMENE VITAMINA B6 NA ISPITIVANE PARAMETRE.....	70
4.2.1.	Telesna masa i kardiosomatski indeks	70
4.2.2.	Biohemijski parametri.....	71
4.2.3.	Aktivnost antioksidativnih enzima u tkivu srca pacova.....	79
4.2.4.	Indeks lipidne peroksidacije u tkivu srca pacova.....	80
4.2.5.	Aktivnost laktat i malat dehidrogenaze u tkivu srca pacova.....	81
4.2.6.	Izoforme laktat i malat dehidrogenaze u tkivu srca pacova.....	81
4.2.7.	Aktivnost matriksnih metaloproteinaza -2 i -9 u tkivu srca pacova	84

4.2.8.	Histološka i morfometrijska analiza uzoraka tkiva srca	85
4.2.9.	Imunohistohemijska analiza uzoraka tkiva srca.....	86
4.3.	UTICAJ PRIMENE FOLNE KISELINE NA ISPITIVANE PARAMETRE.....	94
4.3.1.	Telesna masa i kardiosomatski indeks	94
4.3.2.	Biohemijski parametri.....	95
4.3.3.	Aktivnost antioksidativnih enzima u tkivu srca pacova.....	103
4.3.4.	Indeks lipidne peroksidacije u tkivu srca pacova.....	104
4.3.5.	Aktivnost laktat i malat dehidrogenaze u tkivu srca pacova.....	105
4.3.6.	Izoforme laktat i malat dehidrogenaze u tkivu srca pacova.....	105
4.3.7.	Aktivnost matriksnih metaloproteinaza -2 i -9 u tkivu srca pacova	108
4.3.8.	Histološka i morfometrijska analiza uzoraka tkiva srca	109
4.3.9.	Imunohistohemijska analiza uzoraka tkiva srca.....	110
4.4.	UTICAJ UDRUŽENE PRIMENE VITAMINA B6 I FOLNE KISELINE NA ISPITIVANE PARAMETRE.....	118
4.4.1.	Telesna masa i kardiosomatski indeks	118
4.4.2.	Biohemijski parametri.....	119
4.4.3.	Aktivnost antioksidativnih enzima u tkivu srca pacova.....	127
4.4.4.	Indeks lipidne peroksidacije u tkivu srca pacova.....	128
4.4.5.	Aktivnost laktat i malat dehidrogenaze u tkivu srca pacova.....	129
4.4.6.	Izoforme laktat i malat dehidrogenaze u tkivu srca pacova.....	129
4.4.7.	Aktivnost matriksnih metaloproteinaza -2 i -9 u tkivu srca pacova	132
4.4.8.	Histološka i morfometrijska analiza uzoraka tkiva srca	133
4.4.9.	Imunohistohemijska analiza uzoraka tkiva srca.....	134
5.	DISKUSIJA	143
6.	ZAKLJUČCI.....	157
7.	LITERATURA	161

1. UVOD

1.1. Dijabetes melitus

Dijabetes melitus (DM) je najčešći endokrini poremećaj koji karakteriše hiperglikemija, i koji je praćen brojnim metaboličkim promenama usled smanjene proizvodnje ili sekrecije insulina, smanjenog delovanja insulina ili udružene pojave oba poremećaja (Chaiyasut et al, 2011; Holt et al, 2011). Karakteriše se poremećajima metabolizma ugljenih hidrata, lipida i proteina (Wolff and Dean, 1987). Predstavlja globalni zdravstveni problem. Više od 6 % svetske populacije je pogođeno DM. Trenutni podaci pokazuju da 415 miliona odraslih osoba pati od DM, dok 318 miliona ljudi ima oslabljenu toleranciju na glukozu ili predijabetes (Lau et al, 2016). Smatra se da će 2040. godine prevalencija DM porasti na oko 642 miliona (Cavan et al, 2015). Ovaj broj ne uključuje osobe sa predijabetesom. Prevalenca predijabetesa u svetu raste i očekuje se da će 2030. godine biti veća od 400 miliona (Tabák et al, 2012).

DM se definiše kao nivo glukoze u krvi našte od 7,0 mmol/l (126 mg/dl) i veći, dok se predijabetes ili oštećena tolerancija na glukozu definiše kao nivo glukoze u plazmi našte od 5,6 mmol/l (100 mg/dl) do 6,9 mmol/l (125 mg/dl) (American Diabetes Association, 2010).

Pored hronične hiperglikemije, poremećaji metabolizma ugljenih hidrata, lipida i proteina (Wolff and Dean, 1987) dovode do mnogih komplikacija uključujući i aterosklerotsko oboljenje krvnih sudova. Usled metaboličkih poremećaja dolazi do disfunkcije svih sistema organa, stoga hronične komplikacije DM predstavljaju veliki izazov, ali i trošak u lečenju (Massi-Benedetti, 2002).

Pokazano je da oštećena tolerancija glukoze nije samo preteča dijabetesa, takođe je i individualni faktor rizika za kardiovaskularne bolesti i smrtnost od svih uzroka (Barr et al, 2007). Ako se ne leči, predijabetes bi napredovao do DM i doveo do komplikacija (Tabák et al, 2012). Kako bi se sprečio razvoj i napredovanje DM i njegove komplikacije, potrebno je rano otkrivanje i lečenje predijabetesa, kao i otkrivanje patoloških procesa povezanih sa asimptomatskim ili pretkliničkim stadijumima bolesti. Pojava DM tip 2 (T2DM) može se sprečiti ili odložiti promenom ishrane, uvođenjem umerene fizičke aktivnosti i gubitkom telesne mase (Knowler et al, 2002). Sa sve većim tehnološkim razvojem koji omogućava preciznije istraživanje biohemijskih procesa koji se dešavaju tokom bolesti, uloga biomarkera se povećava. Biomarkeri, poput nivoa glukoze u krvi, glikoliziranog hemoglobina (HbA1c) i nivoa holesterola, mereni su kao deo kliničke procene DM i kardiovaskularnih bolesti dugi niz godina (Maschirow et al, 2015). Progresija dijabetesa nije povezana samo sa promenama ovih biomarkera. Pokazano je i da su inflamatorni markeri, markeri endotelne disfunkcije, oksidativnog stresa i autonomnog nervnog sistema povišeni kod DM (Maschirow et al, 2015; Bloomgarden, 2004). Inflamatorni markeri kao što su C-reaktivni protein (CRP) i interleukini (IL) mogu da predviđaju razvoj T2DM (Pradhan et al, 2001) i rutinski se koriste u medicinskoj praksi za skrining kardiovaskularnih bolesti (Bloomgarden, 2004; Patel et al, 2001). Drugi inflamatorni biomarkeri u vezi sa DM su faktor tumorske nekroze α (TNF α), antioksidanti poput redukovanog glutationa (GSH) i vitamina E (α -tokoferola), proizvodi peroksidacije lipida kao što je malondialdehid (MDA) i izoprostani. Biomarkeri endotelne disfunkcije uključuju 8-hidroksi-2-deoksi-gvanozin (8-OHdG) i homocistein (Hcy) (Maschirow et al, 2015; Bloomgarden, 2004; Mutavdžin and Djuric, 2020).

Pokazano je da povećani oksidativni stres i promene u antioksidativnoj odbrani predstavljaju važan mehanizam u patogenezi DM i razvoju njegovih komplikacija, a posebno ateroskleroze (Samarghandian et al, 2017; Mishra and Singh 2013; Martín-Gallán et al, 2003). Povećana proizvodnja slobodnih radikala i njihova neadekvatna neutralizacija antioksidansima (oksidativni stres) dovodi do oštećenja ćelijskih membrana, zidova krvnih sudova, proteina, lipida i nukleinskih kiselina u ćeliji. U fiziološkim uslovima, aerobne ćelije su razvile sopstveni odbrambeni antioksidativni sistem za kontrolisanje povećanja oksidativnih vrsta. Antioksidativni sistem uključuje neenzimske (glutation,

vitamine A, C i E) i enzimske [superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GSH-Px) i katalaza (CAT)] komponente. U bolestima kao što je DM, ali i koronarna bolest i dislipidemija smanjena je aktivnost antioksidativnih enzima. Stoga neki autori smatraju da upotreba antioksidativnih agenasa može smanjiti negativne posledice DM (Bub et al, 2005; Calla and Lynch 2006; Aviram et al, 1999). Povećani nivo glukoze prati sinteza redukujućih šećera koji mogu reagovati sa lipidima i proteinima i promovisati proizvodnju reaktivnih vrsta kiseonika (eng. *reactive oxygen species* – ROS) (Palmeira et al, 2001; Daniel et al, 2018). Hiperglikemija takođe povećava proizvodnju peroksinitrita i drugih reaktivnih azotnih vrsta (eng. *reactive nitrogen species* – RNS), izaziva oštećenje dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) i proteina, aktivira poli(ADP riboza) polimerazu i stimuliše endotelni stres i ćelijsku smrt (Hoffman, 2014). Oksidativni stres menja ukupni metabolizam (Shanmugam et al, 2009) i može izazvati oštećenje endotelnih ćelija i podstaći razvoj ateroskleroze. Mnoga istraživanja su kod obolelih od DM ispitala povezanost oksidativnog stresa i kardiovaskularnih bolesti preko endotelne disfunkcije i rezultirajućih patoloških promena u zapaljenskom i koagulacionom statusu i proliferaciji ćelija (Dincer et al, 2002; Tracy, 2003; Serdar et al, 2006; Al-Aubaidy and Jelinek 2011). Endotelna disfunkcija nastaje usled povišenog stvaranja ROS i naprednih završnih proizvoda glikacije (eng. *advanced glycation end products* – AGE), kao i povećane peroksidacije lipida u hiperglikemijskim uslovima (Penckofer et al, 2002; Beckman, 2004). Endotelna disfunkcija dovodi do neravnoteže između koagulacije i fibrinolize, aktivacije trombocita, proliferacije vaskularnih glatkih mišićnih ćelija i stimulacije inflamatornih procesa. Shodno tome, stvara se protrombotično okruženje, pa ako se hiperglikemija ne leči, dugoročno će izazvati kardiovaskularna oboljenja (Penckofer et al, 2002; Beckman, 2004).

1.2. Dijabetes melitus tip 1

Dijabetes melitus tip 1 (T1DM) predstavlja oko 10 % slučajeva dijabetesa širom sveta, koji se sa sve većom učestalošću javlja ranije u životu. T1DM je rezultat autoimunskog uništavanja β ćelija endokrinog pankreasa. Kod malog procenta pacijenata sa T1DM (< 10 %) nema dokaza o autoimunosti, pa se patogeneza u tim slučajevima smatra idiopatskom, a DM je klasifikovan kao tip 1B (Atkinson and Maclaren, 1994; Paschou et al, 2014). Istorijski gledano, T1DM se smatrao oboljenjem karakterističnim za decu i adolescenate, ali ovo mišljenje se promenilo u protekloj deceniji, tako da starost na kojoj počinju da se javljaju simptomi više nije ograničavajući faktor (Leslie, 2010). Polidipsija, polifagija i poliurija (klasični trio simptoma povezanih sa početkom bolesti), zajedno sa hiperglikemijom, ostaju dijagnostička obeležja kod dece i adolescenata, a u manjoj meri i kod odraslih. Potreba za doživotnom egzogenom primenom insulina takođe je znak T1DM (Atkinson et al, 2014).

1.2.1. Epidemiologija dijabetes melitusa tipa 1

Iako se može dijagnostikovati u bilo kojoj životnoj dobi, T1DM predstavlja jedno od najčešćih hroničnih oboljenja u detinjstvu (Gale, 2005). Najčešće se javlja između 5. i 7. godine i na početku puberteta (Harjutsalo et al, 2008). Većina autoimunskih poremećaja nesrazmerno više pogađa žene, međutim T1DM je nešto češći kod dečaka i muškaraca (Ostman et al, 2008). Studije su pokazale da incidencija T1DM varira u zavisnosti od sezonskih promena i meseca rođenja. Više slučajeva se dijagnostikuje u jesen i zimu (Moltchanova et al, 2009), a rođenje u proleće povezano je sa većom šansom za razvoj T1DM (Kahn et al, 2009).

Globalno, učestalost i prevalenca T1DM značajno variraju (Maahs et al, 2010). Ovo oboljenje se najčešće javlja u Finskoj (> 60 slučajeva na 100 000 ljudi godišnje) i na Sardiniji (oko 40 slučajeva na 100 000 ljudi godišnje) (Patterson et al, 2009). Nasuprot tome, T1DM je veoma redak u Kini, Indiji i

Venecueli (oko 0,1 slučajeve na 100 000 ljudi godišnje). Primećene su velike varijacije u učestalosti bolesti između susednih oblasti u Evropi i Severnoj Americi. Na primer, incidencija u Estoniji je manja od jedne trećine incidencije u Finskoj (Podar et al, 2001). Učestalost T1DM širom sveta raste poslednjih nekoliko decenija (Dabelea, 2009). U Finskoj, Nemačkoj i Norveškoj, prijavljeno je godišnje povećanje incidencije za 2,4 %, 2,6 % i 3,3 %, redom (Patterson et al, 2009; Thunander et al, 2008; Eehalt et al, 2012). Smatra se da u narednoj deceniji može doći do udvostručenja stope incidence T1DM ako stope incidence nastave da se povećavaju postojećim trendom (Patterson et al, 2009). Povećanje incidence nije se dogodilo jednako u svim starosnim grupama. U Evropi je najznačajniji porast zabeležen kod dece mlađe od 5 godina (DIAMOND Project Group, 2006; Harjutsalo et al, 2008). Mehanizmi koji dovode do različitog povećanja incidence u različitim geografskim oblastima nisu jasni i za sad se jedino mogu pripisati uticajima životne sredine. Poslednjih godina se čini da je genetska predispozicija manji faktor rizika nego što je to bilo u prošlosti (Gillespie et al, 2004; Steck et al, 2011). Smatra se da na razvoj T1DM mogu uticati mnogi faktori životne sredine, kao što su uvođenje posebne ishrane za odojčad i adolescente, vitamin D, i različiti virusi (Atkinson et al, 2014).

1.2.2. Dijagnoza dijabetes melitusa tipa 1

Da bi se postavila dijagnoza DM potrebno je da koncentracija glukoze u krvi naše bude veća od 7 mmol/l (126 mg/dl) ili da uz simptome hiperglikemije bilo koji nivo glukoze u krvi u toku dana bude 11,1 mmol/l (200 mg/dl) ili veći ili da oralni test tolerancije na glukozu bude nefiziološki (American Diabetes Association, 2012). Američko udruženje za dijabetes je 2009. godine izmenilo svoje smernice za dijagnozu dijabetesa tako što je uključilo i merenje koncentracije HbA1C (test koji daje prosečnu koncentraciju glukoze u krvi tokom 3 meseca). Ukoliko je ova vrednost 6,5 % ili viša, postavlja se dijagnoza DM (International Expert Committee, 2009). Često kod odraslih postoji problem u razlikovanju T1DM i T2DM. Smatra se da oko 5–15 % odraslih kojima je dijagnostikovano T2DM zapravo ima T1DM sa autoantitelima na ćelije Langerhansovih ostrvaca (Tuomi, 2005). Ako je to slučaj, može se zaključiti da se možda čak 50 % slučajeva T1DM pogrešno dijagnostikuje kao T2DM, što znači da je broj slučajeva bolesti tipa 1 uveliko potcenjen. Precizna dijagnoza ovog poremećaja ključna je za optimalnu negu i izbegavanje komplikacija, a pravilno zapažanje dijabetičke ketoacidoze je ključno za preživljavanje kod osoba sa T1DM (Usher-Smith et al, 2011).

1.2.3. Patogeneza dijabetes melitusa tipa 1

Većina slučajeva T1DM predstavlja imunski, i to autoimunski poremećaj, što znači da pacijenti često imaju autoantitela ili problem u genima koji kontrolišu imunske odgovore. Međutim, nemaju svi pacijenti sa T1DM ove karakteristike, što dovodi do klasifikacije T1DM na podtip A (autoimunski) (Eisenbarth, 2007) koji ima 70-90 % pacijenata sa T1DM i koji se karakteriše imunskim, samoreagujućim autoantitelima i podtip B (idiopatski), koji koji imaju ostali oboleli od T1DM i čija je specifična patogeneza nejasna (Gianani et al, 2010).

Brojni faktori se mogu naći u osnovi T1DM. Oni se mogu podeliti na genetske faktore, faktore životne sredine i imunske faktore koji uzrokuju uništavanje β ćelija endokrinog pankreasa i dovode do nedostatka insulina. (Paschou et al, 2018).

1.2.3.1. Genetski faktori

T1DM obično je prisutan kod osoba bez porodične anamneze postojanja ove bolesti. Samo 10-15 % obolelih ima srodnika prvog ili drugog stepena sa ovom bolešću. Međutim, doživotni rizik za razvoj T1DM značajno je povećan kod rodbine obolelih, jer oko 6 % dece, 5 % braće i sestara i 50 % monozigotnih blizanaca će razviti bolest u poređenju sa 0,4 % koliko iznosi prevalenca T1DM u opštoj populaciji (Redondo et al, 1999; Beyan et al, 2012). U brojnim studijama i meta-analizama identifikovano je više od 50 lokusa genetskog rizika za T1DM (Størling and Pociot, 2017). Glavni geni koji predisponiraju T1DM nalaze se u regionu glavnog kompleksa histokompatibilnosti (eng. *major histocompatibility complex* – MHC), koji se često naziva humani leukocitni antigen (eng. *human leucocyte antigen* – HLA) i nalaze se na hromozomu 6. Polimorfni aleli HLA kompleksa odgovorni su za 40–50 % genetskog rizika za razvoj T1DM. Za 15 % genetske predispozicije za nastanak T1DM odgovorni su polimorfizmi gena za insulin (*Ins-VNTR*, *IDDM 2*) na hromozomu 11 i gen za antigen-4 povezan sa citotoksičnim T limfocitima (*CTLA-4*) na hromozomu 2. Utvrđeno je da i mnogi drugi različiti genetski lokusi u manjoj meri doprinose genetskoj predispoziciji za nastanak T1DM, kao pojedinačne bolesti ili u kombinaciji sa drugim autoimunskim bolestima (Aly et al, 2006; Størling and Pociot, 2017).

1.2.3.2. Faktori životne sredine

Faktori životne sredine takođe igraju važnu ulogu u patogenezi T1DM. Snažni dokazi za to proizilaze iz studija na monozigotnim blizancima, gde pojava bolesti kod oba brata ili obe sestre varira oko 50 % i nikada ne dostiže 100 % (Redondo et al, 1999; Beyan et al, 2012). Faktori životne sredine uključuju viruse kao što su rubeola, koksaki virus B ili enterovirusi, toksine i hranljive materije poput kravljeg mleka i žitarica. Tačan efekat ovih faktora ostaje nejasan, ali važno ih je identifikovati, jer se ovi faktori mogu modifikovati i verovatno dovesti do prevencije nastanka bolesti ili intervencija u lečenju (Paschou et al, 2018).

1.2.3.3. Imunski faktori

1.2.3.3.1. Imunska tolerancija

Ljudski imunski sistem suočava se sa velikim brojem antigena i njegova svrha je razlikovanje stranih antigena od sopstvenih. Tokom rasta nastaju T limfociti u timusu i B limfociti u koštanoj srži koji mogu biti usmereni ka sopstvenim tkivima, međutim oni se eliminišu na mestu nastanka i taj proces se naziva centralna tolerancija. Ukoliko ti limfociti izmaknu mehanizmima centralne tolerancije i završe na periferiji, prirodno će ući u procese koji ih ili neutrališu ili potiskuju i ti procesi se nazivaju periferna tolerancija. Poremećaji ovih imunskih mehanizama mogu nastati u različitim autoimunskim stanjima (Janeway et al, 2005). Mutacije u genu *AIRE*, ali i negenetski faktori, mogu poremetiti centralnu toleranciju u timusu i dovesti do razvoja T1DM. Zanimljiva je hipoteza o implikaciji virusnih infekcija koje mogu uticati na timus. U eksperimentalnim studijama dokazano je da su epitelne ćelije timusa i timociti postale mete infekcije koksaki virusom B4 i drugim enterovirusima. Zatim je uočeno nekoliko abnormalnosti, uključujući procese sazrevanja i diferencijacije T ćelija (Jaïdane et al, 2012a; Jaïdane et al, 2012b). Poslednjih godina pokazalo se da subpopulacija T regulatornih limfocita (ranije poznata kao supresivni limfociti) igra važnu ulogu u mreži imunskog odgovora, posebno za perifernu toleranciju. Utvrđeno je da pacijenti sa T1DM imaju kvantitativne i kvalitativne deficite T regulatornih limfocita, što

može objasniti povećani imunski odgovor, koji na kraju dovodi do autoimunskog odgovora (Paschou et al, 2018).

1.2.3.3.2. Čelijski imunitet

Do uništenja β ćelija endokrinog pankreasa u T1DM dolazi najverovatnije putem apoptoze, mehanizma poznatog i kao programirana ćelijska smrt, koji uključuje kaskadu aktivacije cistein-asparaginaze, poznate kao kaspaze. Studije na životinjama i eksperimenti *in vitro* podržavaju apoptozu kao glavni tip ćelijske smrti β ćelija, međutim, kod ljudi se mogu javiti i nekroza i nekroptoza. Prema jednoj hipotezi, inflamatorna reakcija sa visokim nivoom proinflamatornih citokina kao što su IL 1, TNF α i interferon- γ indukovana je autoreaktivnim T limfocitima u okolini pankreasnih ostrvaca. Ovi citokini aktiviraju kaskadu kaspaze. Druge teorije sugerišu da se apoptoza indukuje direktno kontaktom autoreaktivnih T limfocita sa β ćelijama kroz perforirani sistem ili interakcijom Fas/Fas liganda. I u ovom slučaju je potreban poremećaj sekrecije citokina (Paschou et al, 2018). Pre početka T1DM, histološki se uočava hronična atrofična upala unutar Langerhansovih ostrvaca, uz učešće T limfocita, makrofaga, B limfocita i dendritičnih ćelija. Ovo stanje se obično razvija tokom mnogo meseci ili godina, kada su pacijenti asimptomatski i euglikemični. Simptomatska hiperglikemija se javlja nakon dugog latentnog perioda, što pokazuje da je potrebno uništiti veliki broj β ćelija pre kliničke manifestacije bolesti (Atkinson and Maclaren, 1994).

1.2.3.3.3. Humoralni imunitet

Oštećeni imunski odgovor podrazumeva i poremećaje humoralnog imuniteta, pri čemu dolazi do proizvodnje autoantitela koja mogu godinama prethoditi kliničkoj manifestaciji T1DM. Glavna autoantitela otkrivena kod pacijenata sa T1DM su ona protiv dekarboksilaze glutaminske kiseline (GAD65), tirozil fosfataze (IA-2), insulina i transportera cinka (ZnT8) (Paschou et al, 2014). Studije na miševima sa ranom prezentacijom ovih autoantitela ukazuju na to da je proinsulin potencijalna primarna meta. Veliki značaj insulina kao autoantigena potvrđuje činjenica da brisanje gena za insulin kod miševa u velikoj meri utiče na napredovanje bolesti, dok njegova primena tokom predijabetičke faze može sprečiti ili odložiti kliničku ekspresiju T1DM (Nakayama et al, 2005; Krishnamurthy et al, 2006). Drugi važan autoantigen je GAD65 enzim, koji je prisutan u β ćelijama, kao i u centralnom nervnom sistemu i testisima. Auto-antitela na GAD65 se nalaze u približno 70 % pacijenata sa T1DM u vreme postavljanja dijagnoze. IA-2 je takođe značajan autoantigen, pri čemu približno 60 % pacijenata sa T1DM ima pozitivna autoantitela na IA-2 u vreme postavljanja dijagnoze. Autoantitela na IA-2 obično se pojavljuju kasnije od autoantitela na insulin i GAD65 i u velikoj meri su povezana sa progresijom bolesti. Nedavno identifikovan autoantigen za T1DM je ZnT8. Čak 60–80 % novootkrivenih pacijenata pokazuje pozitivna ZnT8 autoantitela. Kod dece koja su praćena od rođenja do razvoja T1DM, primećeno je da se ZnT8 autoantitela pojavljuju kasnije od autoantitela na insulin i nestaju vrlo rano nakon kliničke manifestacije bolesti. Jedan od najboljih markera progresije u klinički T1DM je istovremena ekspresija dva ili tri prethodno navedena autoantitela (Paschou et al, 2018).

1.2.4. Komplikacije dijabetes melitusa tipa 1

DM je povezan sa različitim disfunkcijama organa, kao što su retinopatija, bubrežne i kardiovaskularne bolesti, gastrointestinalne smetnje, seksualna disfunkcija i neuropatija (Romeo et al, 2000; Cade, 2008). Komplikacije povezane sa T1DM i T2DM klasifikovane su kao makrovaskularne ili

mikrovaskularne. Kardiovaskularne bolesti postaju sve češća makrovasularna komplikacija kod osoba sa T1DM (Melendez-Ramirez et al, 2010). Ove osobe imaju deset puta veći rizik od kardiovaskularnih događaja kao što su infarkt miokarda, moždani udar, angina pektoris i potreba za revaskularizacijom u koronarnoj bolesti u odnosu na populaciju bez dijabetesa (Orchard et al, 2006). Kardiovaskularna oboljenja su 2-4 puta češća kod dijabetičara i predstavljaju najčešći uzrok mortaliteta u ovoj populaciji. Mortalitet dijabetičara od infarkta miokarda je četiri odnosno sedam puta veći kod muškaraca odnosno žena, u poređenju sa nedijabetičarima (Li and Aronow, 2011). Da bi se sprečio nastanak kardiovaskularnih bolesti, treba primeniti primarnu prevenciju. Međutim, treba uzeti u obzir da je kardiovaskularni rizik već povećan kod ljudi u predijabetičkom stanju ili sa oštećenom tolerancijom glukoze (Tabák et al, 2012). Pokazano je da intenzivna primena insulina smanjuje rizik od kardiovaskularnih događaja za 42 % u poređenju sa konvencionalnim tretmanom (Nathan et al, 2005), kao i da pacijenti sa T1DM imaju manje povoljne ishode od pacijenata bez dijabetesa nakon akutnog koronarnog događaja (Eckel and Eisenbarth, 2012), što se može objasniti nedavnim izveštajem da se nakon infarkta miokarda, kod pacijenata sa T1DM mogu detektovati antitela na srčane proteine, koja se ne nalaze kod pacijenata sa T2DM (Gottumukkala et al, 2012). Rizik od mikrovaskularnih komplikacija, uključujući retinopatiju, nefropatiju i neuropatiju, smanjuje se intenzivnom insulinskom terapijom (Atkinson et al, 2014).

1.2.5. Lečenje i prevencija dijabetes melitusa tipa 1

Otkriće insulina 1921–22. godine bio je najznačajniji terapijski događaj u istoriji T1DM, međutim, egzogena zamena insulina ne obezbeđuje uvek metaboličku regulaciju neophodnu za izbegavanje komplikacija povezanih sa ovim oboljenjem (npr. retinopatija, neuropatija, kardiovaskularne bolesti i hipoglikemija). Kao rezultat toga, za poboljšano lečenje T1DM u mnogim zemljama često se primenjuju analozi insulina i mehaničke tehnologije (npr. insulinske pumpe i kontinuirano praćenje koncentracije glukoze) (Hirsch, 2009). Očekuje se da će se u budućnosti primenjivati terapija koje bliže oponaša fiziološko oslobađanje insulina i koja će poboljšati i kvalitet života i sprečiti dalje komplikacije oboljenja (Atkinson et al, 2014).

Nakon početne dijagnoze i metaboličke stabilizacije, neki pacijenti sa T1DM zadržavaju sposobnost proizvodnje endogenog insulina. Iako je endogena sekrecija obično niska, njeno održavanje je važno jer je povezano sa ređom pojavom retinopatije i sa manje ozbiljnim hipoglikemijama u kasnijim fazama bolesti (Steffes et al, 2003). Stoga je očuvanje sekrecije insulina nakon početka bolesti terapeutski cilj i može uključivati intenzivnu insulinsku terapiju, mehaničke tehnologije ili imunsku intervenciju koja ometa uništavanje β ćelija (Atkinson et al, 2014).

Da bi došlo do što bolje metaboličke optimizacije daje se više dnevnih doza insulina. Sporodelujući insulin se daje za održavanje bazalne koncentracije insulina, a brzodelujući insulini se daju pre svakog obroka. Tokom proteklih decenija, upotreba kontinuiranih potkožnih infuzija za insulin (insulinskih pumpi) značajno se povećala (Pickup, 2012). Studije su pokazale da primena insulinskih pumpi dovodi do niže koncentracije HbA1C više nego primena višestrukih dnevnih injekcija, dok se stopa nastanka hipoglikemija nije razlikovala (Bergenstal et al, 2010; Yeh et al, 2012). Pored poboljšanih insulinskih preparata i sistema za infuzionu primenu insulina, napredak u poboljšanju glikemijske kontrole i smanjenoj hipoglikemiji uključuje merenje HbA1C na licu mesta, samokontrolu izveštaja o glukozi u krvi i kontinuirano praćenje glukoze u realnom vremenu. Pokazano je da praćenje koncentracije glukoze u realnom vremenu skraćuje vreme provedeno u hipoglikemiji i smanjuje koncentraciju HbA1C (Juvenile Diabetes Research Foundation Continuous Glucose Monitoring Study Group, 2008), kao i da smanjuje pojavu noćnih hipoglikemija kod osoba mlađih od 18 godina (Juvenile Diabetes Research

Foundation Continuous Glucose Monitoring Study Group, 2010). Stoga, smatra se da je kontinuirano praćenje koncentracije glukoze najprikladnije za visoko motivisane pacijente sa T1DM koji su voljni da nose uređaj za praćenje, kao i kod onih sa lošom kontrolom glikemije tokom intenzivne insulinske terapije (Ahmet et al, 2011). Insulinske pumpe i kontinuirani merači glukoze ostvaruju značajan napredak u lečenju dijabetesa. Ulažu se naponi da se oni kombinuju sa računarskim algoritmom odnosno integrisanim sistemom zatvorene petlje ili veštačkim pankreasom koji su do sada dali povoljne rezultate (Breton et al, 2012).

Novi analozi insulina, inkretini i drugi hormoni se ispituju zbog njihove sposobnosti da poboljšaju lečenje T1DM. Primeri uključuju insulin degludek analog koji bi mogao poboljšati bazalnu primenu insulina kod pacijenata sa T1DM, jer pruža efikasnu kontrolu glikemije i smanjuje rizik od noćne hipoglikemije (Heller et al, 2012). Primena inkretina GLP-1 bi se takođe mogla pokazati korisnom, a studije su pokazale da je ovaj inkretin smanjio vršnu postprandijalnu glukozu za 45 %, bez obzira na zaostalu funkciju β ćelija (Kielgast et al, 2011). Pokazalo se da hormon pramlintid smanjuje postprandijalnu hiperglikemiju, telesnu masu, potrebnu dozu insulina, i koncentraciju HbA1C (Ryan et al, 2009). Leptin, hormon adipocita, takođe može imati koristi kod terapije T1DM jer ima sposobnost da preokrene kataboličko stanje putem suzbijanja hiperglukagonemije (Oral, 2012). Potencijalni pozitivni efekti koje pružaju novi vidovi terapije deluju optimistično i zbog toga je potrebno sprovesti dugoročne studije koje bi potvrdile njihovu bezbednost (Atkinson et al, 2014).

Skoro tri decenije su prošle od kada su prve imunske terapije, upotrebom ciklosporina, pokušale da preokrenu tok T1DM (Bach and Chatenoud, 2011). Od tada je učinjeno mnogo praktičnog i intelektualnog napretka, uključujući poboljšano metaboličko testiranje, bolje razumevanje patogeneze bolesti i dostupnost imunskih markera (van Belle et al, 2011).

Pošto je T1DM sada predvidljiva bolest, nekoliko velikih ispitivanja istraživalo je metode za sprečavanje ili odlaganje početka bolesti. Studije primarne prevencije, kod pojedinaca sa genetskim rizikom za T1DM, ali bez autoantitela na ćelije Langerhansovih ostrvaca, uglavnom su se fokusirale na promene u ishrani u ranom detinjstvu (Atkinson et al, 2014). Sekundarna prevencija podrazumeva odlaganje početka T1DM. Studije sekundarne prevencije rade se kod pojedinaca sa više autoantitela na ćelije Langerhansovih ostrvaca, ali bez izražene hiperglikemije. U jednom ispitivanju, pojedinci sa najmanje dva autoantitela na ćelije Langerhansovih ostrvaca koji su imali srodnika prvog stepena sa T1DM, primali su oralni insulin (Skyler et al, 2008). Sve u svemu, primena oralnog insulina nije odložila razvoj DM, ali je naknadna analiza pokazala da je kod pojedinaca sa visokim titrom insulinskih autoantitela početak DM odložen čak 5 godina (Skyler et al, 2005). Nije pokazano da drugi agensi koji se koriste za sekundarnu prevenciju, kao što su nikotinamid i intranazalni insulin mogu odložiti ili sprečiti nastanak DM (Gale et al, 2004; Näntö-Salonen et al, 2008). Trenutno ne postoje odobreni agensi koji bi zaustavili autoimunske uništavanje β ćelija nakon dijagnoze T1DM. Rezultati studija ukazuju na to da samo imunosupresija jednog agensa može biti nedovoljna za potpunu kontrolu autoimuskog uništenja β ćelija, ili da su potrebne specifičnije i ciljane terapije (Orban et al, 2011). Možda će biti potrebna i kombinovana terapija koja cilja na nekoliko patogenih puteva i poboljšava održivost β ćelija za očuvanje endogene proizvodnje insulina kod pacijenata sa T1DM. Ispitivanje autologne transplantacije hematopoetskih matičnih ćelija u kombinaciji sa imunosupresivnom terapijom u velikim dozama (tj. citoksanom i timoglobulinom) prijavilo je povećanu proizvodnju C-peptida i nezavisnost od insulina kod većine pacijenata koji su bili na terapiji na početku bolesti (VOLTARELLI et al, 2007). Međutim, efekti ove invazivne terapije su vremenom opadali, sa gubitkom nezavisnosti od insulina kod većine pacijenata nakon 5 godina (COURI et al, 2009).

Protokol za transplantaciju pankreasnih ostrvaca bez upotrebe kortikosteroida za suzbijanje imuniteta razvijen je 2000. godine (SHAPIRO et al, 2000), prvobitno obećavajući rezultati su se pogoršali

tako da je nakon 5 godina samo 10 % pacijenata ostalo nezavisno od egzogenog insulina (Ryan et al, 2005). Zbog toga transplantacija ostrvaca ostaje eksperimentalna procedura, sa stalnim istraživanjima koja se fokusiraju na nove metode koje koriste biomaterijale (npr. inkapsulaciju), imunsku modulaciju, poboljšanu vaskularizaciju i još mnogo toga (Gibly et al, 2011). Mnoga ograničenja za transplantaciju pankreasnih ostrvaca važe i za korišćenje stem ćelija kao surogata koji proizvode insulin. Ostaje nada da će ćelije koje proizvode insulin (matične ćelije, ostrvaca sa kadavera, ksenogena ostrvca itd.) u kombinaciji sa imunozaštitnom barijerom (tj. inkapsulacijom), omogućiti terapijski značajan napredak (Atkinson et al, 2014).

1.2.6. Troškovi lečenja dijabetes melitusa tipa 1

Teško je izračunati fizičke, socijalne i ekonomske troškove T1DM, posebno jer se procene vrše zajedno sa procenama troškova za T2DM. Međutim, dve studije su dale procene troškova posebno za T1DM. Prema njihovim rezultatima u SAD godišnje se za terapiju T1DM potroši 14,4–14,9 milijardi dolara (Dall et al, 2009; Tao et al, 2010). Bez obzira na finansijske troškove, postizanje normoglikemije je važan terapijski cilj za pacijente sa T1DM, posebno da bi se izbegle dalje komplikacije bolesti (Atkinson et al, 2014).

Uprkos napretku u lečenju T1DM, pojedinci u mnogim delovima sveta umiru zbog nedostatka pristupa insulinu (Gale, 2006). Na primer, u Mozambiku je očekivano trajanje života deteta sa novootkrivenim T1DM 7 meseci (Beran et al, 2005). Nejednakosti u dostupnosti tehnologija za smanjenje komplikacija, poboljšanje kvaliteta života i poboljšanje upravljanja dijabetesom (npr. testiranje HbA1C i praćenje glukoze u krvi) takođe izazivaju etičku zabrinutost (Atkinson et al, 2014).

1.3. Dijabetična kardiomiopatija

Dijabetična kardiomiopatija je definisana postojanjem abnormalne strukture miokarda u odsustvu drugih srčanih faktora rizika, poput bolesti koronarnih arterija, hipertenzije i valvularne bolesti, kod osoba sa DM. Prvi put je opisana 1972. godine kada je na patohistološkim preparatima miokarda četiri dijabetičara koji su ispoljili simptome srčane insuficijencije uočeno postojanje promena koje nisu nastale usled hipertenzije, ishemijske bolesti ili alkoholizma (Rubler et al, 1972). Ovo je dodatno potvrđeno u Framingamskoj studiji 1974. koja je pokazala veću učestalost srčane insuficijencije kod žena (5,1 put) i muškaraca (2,4 puta) sa dijabetesom u poređenju sa zdravim osobama nakon prilagođavanja na druge faktore rizika, kao što su starost, koronarna bolest srca i hipertenzija (Kannel et al, 1974). Fondacija američkog koledža za kardiologiju i Američko udruženje za srce (Yancy et al, 2013), kao i Evropsko kardiološko društvo u saradnji sa Evropskim udruženjem za proučavanje dijabetesa (Task Force Members, 2013) su 2013. godine definisali dijabetičnu kardiomiopatiju kao kliničko stanje ventrikularne disfunkcije koja se javlja u odsustvu koronarne bolesti, ateroskleroze i hipertenzije kod pacijenata sa DM. U ranim fazama, dijabetična kardiomiopatija uključuje skriveni subklinički period koji karakterišu strukturne i funkcionalne abnormalnosti, koje podrazumevaju hipertrofiju leve komore (LK), fibrozu, rigidnost i oštećenje ćelijske signalizacije. Uz ove patofiziološke promene javlja se i pridružena subklinička dijasolna disfunkcija, a često evoluiraju do srčane insuficijencije sa normalnom ejakcionom frakcijom ili čak do sistolne disfunkcije praćene srčanom insuficijencijom sa smanjenom ejakcionom frakcijom (Jia et al, 2018). Uprkos eksponencijalnom porastu broja pretkliničkih i kliničkih studija o dijabetičkoj kardiomiopatiji u protekloj deceniji, patogeneza ovog stanja ostaje nejasna. Zbog toga, nije postignut konsenzus u pogledu najefikasnijih preventivnih ili terapijskih pristupa u lečenju dijabetičke kardiomiopatije ili srčane insuficijencije povezane sa DM (Tan et al, 2020).

1.3.1. Epidemiologija srčane insuficijencije povezane sa dijabetes melitusom

Iako je dijabetička kardiomiopatija opisana pre više od 40 godina (Rubler et al, 1972; Kannel et al, 1974), prevalencija ovog stanja kod pacijenata sa DM je i dalje potcenjena (Bouthoorn et al, 2018; Tarquini et al, 2018). Zabeleženo je da je prevalencija srčane disfunkcije kod osoba sa T1DM 14,5 %, dok je kod osoba sa T2DM čak 35,0 % (Konduracka et al, 2013; Bouthoorn et al, 2018). Framingamska studija pokazala je da je učestalost srčane insuficijencije povećana i kod muškaraca i kod žena sa DM u poređenju sa zdravim osobama istog uzrasta, a ova povezanost nije zavisila od gojaznosti, hipertenzije, dislipidemije i koronarne bolesti srca (Kannel et al, 1974). Jedna studija je pokazala da je učestalost srčane insuficijencije veća kod dijabetičara (39 %) u poređenju sa pacijentima bez dijabetesa (23 %) (Aronow and Ahn, 1999). Druge studije su pokazale da postoje razlike u masi i debljini zida LK i povećane dijastolne i sistolne disfunkcije između dijabetičara i zdravih osoba (Devereux et al, 2000; Bertoni et al, 2006). Svako povećanje HbA1c za 1 % povezano je sa povećanjem rizika od srčane insuficijencije za 30 % kod osoba sa T1DM (Lind et al, 2011), odnosno za 8 % kod osoba sa T2DM, nezavisno od drugih faktora rizika, kao što su gojaznost, pušenje, hipertenzija, dislipidemija i koronarna bolest (Stratton et al, 2000). Takođe, pokazano je i da je smanjenje HbA1c za 1 % povezano sa smanjenjem rizika od srčane insuficijencije za 16 % (Stratton et al, 2000), što sugerise da postoji veza između dugotrajne kontrole glikemije i rizika od srčane insuficijencije, kao i da je povećanje glikemije snažan promotor srčane insuficijencije kod pacijenata sa dijabetesom (Jia et al, 2018).

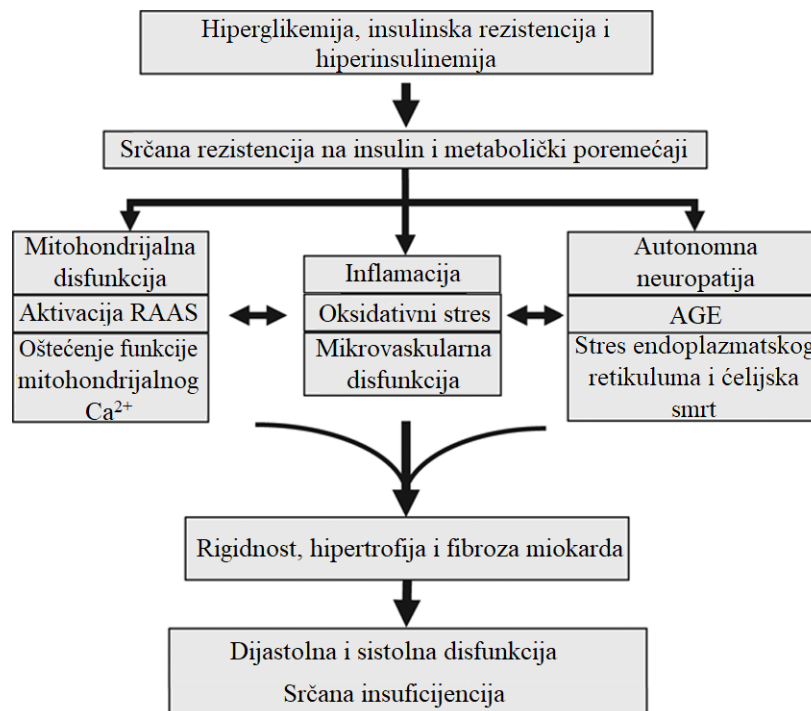
1.3.2. Faktori rizika za dijabetičku kardiomiopatiju

Hiperglikemija, sistemska insulinska rezistencija i oštećena insulinska metabolička signalizacija u srcu glavne su kliničke karakteristike DM i sve su uključene u patogenezu dijabetičke kardiomiopatije (Jia et al, 2016). Pokazano je da postoji linearna korelacija između nivoa glukoze u krvi i dugoročnog mortaliteta od srčane insuficijencije čak i kod pacijenata bez kliničke dijagnoze DM. Međutim, povećan rizik od mortaliteta dobijen je samo kod dijabetičara sa nivoom glukoze većim od 200 mg/dl (Itzhaki et al, 2017).

1.3.3. Razvoj dijabetičke kardiomiopatije: od subkliničkih promena do klinički manifestne srčane insuficijencije

Hiperglikemija i sistemska i srčana rezistencija na insulin su povezane sa razvojem i progresijom srčane disfunkcije i srčane insuficijencije kod osoba sa DM. U patofiziološki proces dijabetičke kardiomiopatije uključeni su mitohondrijalna disfunkcija, oksidativni stres, povećano stvaranje i taloženje AGE, oštećenje funkcije mitohondrijalnog Ca^{2+} , inflamacija, aktivacija sistema renin-angiotenzin-aldosteron (RAAS) i simpatičkog nervnog sistema, srčana autonomna neuropatija, stres endoplazmatskog retikuluma, mikrovaskularna disfunkcija i poremećaji srčanog metabolizma. Iako se čini da dijabetička kardiomiopatija ima opsežan pretklinički tok i da su patofiziološke promene uzrokovane metaboličkim promenama u DM, formalna definicija dijabetičke kardiomiopatije kao posebne kliničke celine ostaje nejasna zbog nedostatka prihvaćenih dijagnostičkih kriterijuma i informacija o subkliničkim kardiovaskularnim bolestima u ranim fazama DM (Jia et al, 2018). Dijabetička kardiomiopatija je obično asimptomatska u ranim fazama svog razvoja. Jedna od najranijih manifestacija je hipertrofija LK i smanjena komplijansa LK, koju karakterišu oštećeno rano dijastolno punjenje, povećano atrijalno punjenje i produžena izovolumetrijska relaksacija. Potom, dolazi do proširenja LK, razvija se sistolna disfunkcija i javlja se simptomatska srčana insuficijencija nakon

razvoja sistolne disfunkcije (Jia et al, 2016). Rigidnost i hipertrofija kardiomiocita, kao i fibroza miokarda, doprinose ovoj srčanoj abnormalnosti (Slika 1, Jia et al, 2018). U kohortnoj studiji sprovedenoj na 5201 osobi muškog i ženskog pola pokazano je da su osobe sa DM imale veću debljinu srčanog septuma i zadnjeg zida leve komore u poređenju sa zdravim ispitanicima i da je to povezano sa narušenom sistolnom ili dijastolnom funkcijom (Lee et al, 1997).



Slika 1. Patofiziološki mehanizmi dijabetičke kardiomiopatije. Hiperglikemija, insulinska rezistencija i hiperinsulinemija izazivaju srčanu rezistenciju na insulin i metaboličke poremećaje koji povećavaju disfunkciju mitohondrija, oksidativni stres, nivo naprednih završnih proizvoda glikacije (*advanced glycation end products* – AGE), oštećenje funkcije mitohondrijalnog Ca^{2+} , upalu, aktivaciju sistema renin-angiotenzin-aldosteron (RAAS), autonomnu neuropatiju, stres endoplazmatskog retikuluma, smrt kardiomiocita, kao i mikrovaskularnu disfunkciju. Ove patofiziološke abnormalnosti promovišu rigidnost, hipertrofiju i fibrozu miokarda, što rezultira prvo dijastolnom disfunkcijom, potom sistolnom disfunkcijom, i na kraju srčanom insuficijencijom (*Ilustracija preuzeta i prevedena iz Jia et al, 2018*).

Postoji veliki broj epidemioloških dokaza koji ukazuju da gojaznost povezana sa povećanim unosom rafiniranih ugljenih hidrata i smanjenom fizičkom aktivnošću, učestvuje u sve većoj prevalenciji DM i pratećih srčanih oboljenja. Promene u načinu života, poput aerobnih vežbi, kontrole telesne mase i prestanka pušenja, efikasni su terapijski pristupi u prevenciji dijabetičke kardiomiopatije. Održiva kontrola glikemije smanjuje prevalenciju dijabetičke kardiomiopatije (Jia et al, 2018). Na primer, normalizacija glikemije uz terapiju insulinom smanjila je hipertrofiju kardiomiocita, sadržaj kolagena i dijastolnu disfunkciju i ograničila napredovanje dijabetičke kardiomiopatije u modelima T1DM kod glodara (Tate et al, 2017). Postoje novi dokazi da neki antidijabetički lekovi mogu imati određene koristi u prevenciji dijabetičke kardiomiopatije. Tako je pokazano da je upotreba metformina bila povezana sa

niskim rizikom od mortaliteta kod osoba sa DM koji su imale srčanu insuficijenciju (Andersson et al, 2010). Inhibitori natrijum-glukoznog kotransportera (SGLT) i agonisti receptora glukagonu sličnog peptida 1 imaju blagotvorne efekte na ishode kardiovaskularnih bolesti kod pacijenata sa T2DM (Jia et al, 2016). Pokazano je da je lečenje antagonistima SGLT2 (empagliflozinom) smanjilo primarne ishode, kao što su nefatalni infarkt miokarda, nefatalni moždani udar i mortalitet povezan sa kardiovaskularnim bolestima, kod 7020 pacijenata sa DM (Zinman et al, 2015). Konačno, lečenje sa 2 agonista receptora glukagonu sličnog peptida 1 dugog delovanja značajno je smanjilo kardiovaskularne događaje i srčanu insuficijenciju kod pacijenata sa DM (Marso et al, 2016a; Marso et al, 2016b). Rezultati sugerišu da ovi antidijabetički lekovi mogu imati ulogu u sprečavanju i lečenju dijabetičke kardiomiopatije i povezanih kardiovaskularnih bolesti kod pacijenata sa T2DM.

Dijabetička kardiomiopatija se može podeliti u dve faze. Prva faza dijabetičke kardiomiopatije klinički je asimptomatska i karakteriše je povećana fibroza i rigidnost srčanog mišića usled čega dolazi do smanjenja ranog dijastolnog punjenja komora i povećanja punjenja i dilatacije pretkomora, kao i do povećanja *end*-dijastolnog pritiska u LK (Westermeyer et al, 2016). U osnovi patoloških faktora su hiperglikemija, sistemska i srčana rezistencija na insulin, povećani nivoi slobodnih masnih kiselina, sistemska i tkivna inflamacija, oksidativni stres i aktivacija RAAS i simpatičkog nervnog sistema (Jia et al, 2016). Smanjena aktivnost Ca^{2+} pumpe na sarkoplazmatskom retikulumu koja dovodi do neefikasne sekvestracije Ca^{2+} se smatra značajnim faktorom koji doprinosi razvoju dijastolne disfunkcije srca (Talukder et al, 2008). Drugu fazu dijabetičke kardiomiopatije karakterišu hipertrofija LK, remodelovanje srca, napredovanje dijastolne disfunkcije srca i posledična pojava srčane insuficijencije sa očuvanom ejectionom frakcijom (Jia et al, 2016). Sa progresijom dijabetičke kardiomiopatije, dijastolna disfunkcija i smanjena srčana komplijansa mogu koegzistirati sa sistolnom disfunkcijom koja dovodi do smanjene ejectione frakcije (Jia et al, 2016). Poremećaji u ekspresiji kontraktilnih i regulatornih proteina odgovorni su za mehaničke promene u srčanoj kontrakciji. Na primer, smanjena osetljivost na Ca^{2+} zajedno sa promenom u teškom lancu srčanog miozina iz V1 u V3 izoformu doprinosi oštećenju srčane sistolne disfunkcije, što predstavlja dugotrajnu komplikaciju DM (Pollack et al, 1986). Fosforilacija troponina takođe doprinosi smanjenju kontraktilnosti miokarda jer su laki lanac miozina-2 i troponin I uključeni u regulaciju kontrakcije kardiomiocita (Malhotra and Sanghi, 1997).

1.3.3.1. Kardiomiopatija kod dijabetes melitusa tipa 1 i 2

Iako se etiologije T1DM i T2DM razlikuju, sistemske metaboličke promene poput hiperglikemije i dislipidemije javljaju se u obe bolesti. Kod pacijenata sa T1DM ili T2DM, u mitohondrijama kardiomiocita dolazi do smanjene oksidacije glukoze posredovane insulinom, bilo zbog odsustva insulina (T1DM) ili zbog insulinske rezistencije (T2DM) (Hölscher et al, 2016; Riehle and Bauersachs, 2018). Nadalje, razvoj rezistencije na insulin i T2DM dovode do povećanog usvajanja slobodnih masnih kiselina od strane kardiomiocita putem translokaze masnih kiselina CD36. Ovaj prekomerni unos masnih kiselina narušava β -oksidaciju masnih kiselina u mitohondrijama, što dovodi do disfunkcije mitohondrija i nakupljanja toksičnih metabolita lipida u srcu kod pacijenata sa T2DM više nego kod pacijenata sa T1DM (Jia et al, 2018). Tipične kliničke karakteristike dijabetičke kardiomiopatije povezane sa T2DM uključuju smanjenu komplijansu ventrikula sa povećanim sistemskim i plućnim venskim pritiskom i zastojem uprkos očuvanoj sistolnoj funkciji (Hölscher et al, 2016). Simptomi sistolne disfunkcije, tipičniji kod pacijenata sa T1DM, uključuju klasične simptome srčane insuficijencije, smanjene sposobnosti vežbanja, kao i pojavu aritmija usled mitohondrijalne disfunkcije (Duncan, 2011), abnormalnog transporta Ca^{2+} (Lebeche et al, 2008) i autonomne neuropatije (Vinik et al, 2018; Goldberger et al, 2019).

Dijabetička kardiomiopatija se u početku manifestuje kao izolovana dijastolna disfunkcija, ali vremenom napreduje do sistolne disfunkcije koju karakterišu poremećaji u različitim metaboličkim i neurohumoralnim putevima. Kod dijabetičke kardiomiopatije povezane sa T2DM, koronarna mikrovaskularna upala i parakrini efekti na kardiomiocite i endotelne ćelije posreduju u koncentričnom remodelovanju i hipertrofiji LK, što povećava rigidnost LK i promovise dijastolnu disfunkciju (Tan et al, 2020). Simptomi srčane insuficijencije sa očuvanom ejakcionom frakcijom kod pacijenata sa T2DM često su rani, ali suptilni i mogu se otkriti upotrebom osetljivih, neinvazivnih mera dijastolne disfunkcije (kao što je Doppler snimanje tkiva) (Brunvand et al, 2016; Hölscher et al, 2016; Brunvand et al, 2017). Nasuprot tome, dijabetičku kardiomiopatiju povezanu sa T1DM karakterise gubitak kardiomiocita, remodelovanje LK i povećano taloženje kolagena u miokardu, što povećava *end*-dijastolni volumen LK i narušava sistolnu funkciju (Raev,1994; Hölscher et al, 2016; Jia et al, 2018). Oštećenje i disfunkcija koronarnih sudova česti su i kod T1DM i kod T2DM. Simptomi srčane insuficijencije sa smanjenom ejakcionom frakcijom javljaju se kasnije u kliničkoj progresiji dijabetičke kardiomiopatije kod osoba sa T2DM nego kod osoba sa T1DM (Tan et al, 2020).

Sličan napredak u razvoju srčane insuficijencije je prikazan i u pretkliničkim studijama na životinjskim modelima T1DM i T2DM (Riehle and Bauersachs, 2018). U proceni odnosa pritiska i zapremine LK u modelima T1DM i T2DM kod pacova, pacovi sa T1DM su imali izraženu sistolnu disfunkciju i odloženu relaksaciju (Radovits et al, 2009; Mátyás et al, 2018). Nasuprot tome, pacovi sa T2DM i hiperinsulinemijom pokazali su izraženiju dijastolnu rigidnost i očuvanu sistolnu funkciju, slično kao i osobe sa T2DM i istovremenu srčanu insuficijenciju sa očuvanom ejakcionom frakcijom (Radovits et al, 2009; Mátyás et al, 2018).

1.3.3.2. Remodelovanje i srčana disfunkcija

Sistemska hiperglikemija, hiperlipidemija i inflamacija povezana sa dijabetesom doprinose razvoju srčane hipertrofije i fibroze, koje povećavaju rigidnost miokarda i rezultiraju dijastolnom i sistolnom disfunkcijom. Pod fiziološkim okolnostima, srčani fibroblasti sintetise male količine kolagena za održavanje homeostaze ekstracelularnog matriksa. Ovaj proces regulišu dva ključna faktora: matriksne metaloproteinaze (MMP) i tkivni inhibitori metaloproteinaza (TIMP) (Mishra et al, 2013; Horn, 2015). Međutim, u uslovima dijabetesa, AGE nastali izlaganjem proteina i lipida visokim nivoima glukoze povezuju proteine ekstracelularnog matriksa, i smanjuju razgradnju ekstracelularnog matriksa MMP i povećavaju rigidnost miokarda, što se zajedno manifestuje kao rana dijastolna disfunkcija (Norton et al, 1996; Berg et al, 1999; van Heerebeek et al, 2008; Choi et al, 2009). AGE takođe mogu promovisati diferencijaciju fibroblasta u miofibroblaste, koji se razmnožavaju i indukuju promene ekstracelularnog matriksa lučenjem profibroznih citokina i matriksnih proteina. Štaviše, izmenjena srčana mehanika dovodi do oslobađanja drugih stimulusa, uključujući transformacioni faktor rasta β (TGF β), faktor tumorske nekroze (TNF), angiotenzin II i različite interleukine, koji aktiviraju profibrotske reakcije u fibroblastima i miofibroblastima (Souders et al, 2009). Aktivacija TGF β u miofibroblastima povećava taloženje strukturnih proteina ekstracelularnog matriksa i matricelularnih makromolekula, što doprinosi smanjenju srčane kontraktilnosti i kasnoj sistolnoj disfunkciji koje se manifestuju kao srčana insuficijencija sa smanjenom ejakcionom frakcijom (van Linthout et al, 2008; van Heerebeek et al, 2008; Mishra et al, 2013; Horn, 2015). Pored srčanih fibroblasta i miofibroblasta, endotelne i epikardne ćelije takođe mogu doprineti razvoju srčane fibroze kroz endotelno-mezenhimski ili epitelno-mezenhimalni prelazak u miofibroblaste (Tan et al, 2020).

U dijabetičkim okruženjima, aktivirane endotelne ćelije doprinose ranoj rigidnosti miokarda i dijastolnoj disfunkciji promovisući razdvajanje endotelne azot monoksid sintaze (NOS) što dovodi do

stvaranja superoksida, vodonik peroksida i peroksinitrita i do smanjenja nivoa NO. Smanjenje signalizacije azot monoksida u endotelnim ćelijama i kardiomiocitima može povećati hipertrofiju i rigidnost kardiomiocita smanjenjem aktivnosti solubilne gvanilat ciklaze (sGC) i cikličnog guanozin monofosfata (cGMP) u miokardu, čime se ukidaju zaštitni efekti proteinske kinaze G (PKG) (Tan et al, 2020).

U kliničkim studijama je pokazano da stepen srčane fibroze, procenjen magnetnom rezonancom srca, korelira sa povećanim mortalitetom i stopom hospitalizacije usled srčane insuficijencije kod pacijenata sa T2DM (Wong et al, 2014). Dijabetička kardiomiopatija kod pacijenata sa T1DM ili T2DM se manifestuje kao hipertrofija LK, intersticijska i perivaskularna fibroza i mikrovaskularne abnormalnosti (Nunoda et al, 1985; Sutherland et al, 1989; Tarquini et al, 2018). Imunohistohemijske studije kod pacijenata sa T2DM otkrile su akumulaciju kolagena tipa I, III i VI u srčanom intersticijumu, ali je samo nivo kolagena tipa III bio značajno veći kod pacijenata sa T2DM nego kod osoba bez dijabetesa (Nunoda et al, 1985; Sutherland et al, 1989; Tan et al, 2020).

1.3.3.3. Inflamacija miokarda

U srcu dijabetičara, citokini, hemokini i egzozomi koje luče inflamatorne ćelije doprinose razvoju hipertrofije kardiomiocita i remodelovanju ekstracelularnog matriksa. Brojni procesi miokarda aktivirani su hiperglikemijom, hiperlipidemijom, povišenim nivoom angiotenzina II i drugim proinflamatornim faktorima čiji se nivo povećava u dijabetičnom okruženju. Zajedno, ovi faktori promovisu akumulaciju i infiltraciju proinflamatornih makrofaga i limfocita u mesto lezije. Ove inflamatorne ćelije luče citokine kao što su TNF, IL-6, IL-1 β , interferon- γ i TGF β koji mogu izazvati ili pogoršati oštećenje srca, što dovodi do daljeg nepovoljnog remodelovanja (Dinh et al, 2009; Masters et al, 2011; Biernacka et al, 2015; Bajpai and Tilley 2018). Miševi sa T1DM indukovanim streptozotocinom (STZ) imaju veću infiltraciju T ćelija u miokard od zdravih miševa što je povezano sa povećanom srčanom fibrozom i disfunkcijom (Lin et al, 2016). Inflamatorni faktori, uključujući TNF i nuklearni faktor- κ B (NF- κ B) i proteinske kinaze, poput c-Jun n-terminalne kinaze (JNK) i fosforilisane p38 mitogen-aktivirane protein kinaze (p38 MAPK), mogu direktno indukovati hipertrofiju kardiomiocita i promovisati srčanu fibrozu (Gordon et al, 2011; Nakamura and Sadoshima, 2018). IL-1 β , IL-6, IL-17 i TNF uključeni su u razvoj brze i reverzibilne kontraktilne disfunkcije koja narušava srčanu kontraktilnost kod miševa (Yu et al, 2003; Skyschally et al, 2007; van Tassel et al, 2013; Zhang et al, 2018a). Ovi efekti su posredovani aktivacijom inducibilne NOS koja dovodi do stvaranja viška NO, i koji u interakciji sa superoksidom formira peroksinitrit, moćni oksidant koji može ometati kuplovanje ekscitacije i kontrakcije kardiomiocita (Prabhu, 2004; Prabhu et al, 2016).

Framingamska studija je prva studija koja je pokazala da pacijenti bez istorije akutnog infarkta miokarda koji imaju veće početne nivoe IL-6 i C reaktivnog proteina u serumu i veću produkciju TNF- α imaju značajno veći dugoročni rizik od razvoja srčane insuficijencije od pacijenata sa nižim nivoima ovih inflamatornih markera (Vasan et al, 2003). Viši cirkulišući nivoi inflamatornih markera kao što su TNF i TGF β koreliraju sa većom masom LK, dijastolnom i sistolnom disfunkcijom kod pacijenata sa hipertenzijom, a ta povezanost je jača kod pacijenata sa hipertenzijom i metaboličkim sindromom nego kod onih bez metaboličkog sindroma (Sciarretta et al, 2007). Sistemska upala je naknadno potvrđena kao nezavisni faktor rizika za srčanu insuficijenciju (Fрати et al, 2017).

1.3.3.4. Srčani oksidativni stres

Oksidativni stres se definiše kao neravnoteža u stvaranju slobodnih radikala i antioksidanata. Oksidativni stres promoviše razvoj i progresiju srčane insulinske rezistencije, dijabetičke kardiomiopatije i srčane insuficijencije (Jia et al, 2018). Povećano stvaranje različitih ROS ili RNS smatra se centralnim mehanizmom za inflamaciju i remodelovanje miokarda koji su povezani sa DM (Cai and Kang, 2001; Wilson et al, 2018). Takođe, ROS i RNS doprinose oksidativnom stresu tokom rane i kasne faze dijabetičke kardiomiopatije (Nishikawa et al, 2000; Cai et al, 2005; Tan et al, 2011). Mitohondrijalne ROS su prirodni nusprodukt metabolizma kiseonika u kompleksima I i III u elektron transportnom lancu. U fiziološkim uslovima, glavni elektrohemijski gradijent protona se koristi za stvaranje adenzin trifosfata (ATP) (Jia et al, 2016). Međutim, hiperglikemija i insulinska rezistencija povećavaju fluks nikotinamid adenin dinukleotida (NAD^+) i flavin adenin dinukleotida u mitohondrijalni elektron transportni lanac, što dovodi do hiperpolarizacije unutrašnje membrane mitohondrija, inhibicije transporta elektrona u kompleksu III i viška proizvodnje ROS (Teshima et al, 2014). U srcu dijabetičara, još jedan izvor povišene proizvodnje ROS ili RNS je aktivacija ćelijske i mitohondrijske nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze, što dovodi do stvaranja superoksida i vodonik peroksida (Cai and Kang, 2001; Giacco and Brownlee, 2010; Wilson et al, 2018). Povećana aktivnost ovog enzima prijavljena je kod gojaznosti uzrokovane prekomernim unosom hrane i sistemske i srčane insulinske rezistencije (Jia et al, 2017). Pokazano je i da povećana aktivnost NADPH oksidaze posredovana RAAS može direktno promovisati srčanu fibrozu aktivacijom signalnog puta profibrotičkog transformacionog faktora rasta $\beta 1/Smad 2/3$ (Lee et al, 2009; Murdoch et al, 2014). Drugi izvori ROS u dijabetičkoj kardiomiopatiji uključuju povećanje ksantin oksidaze i mikrozomalne aktivnosti enzima P-450 i razdvajanje NOS. Povišeni ROS srčanog tkiva ne samo da povećava protok kroz poliolski put, stvaranje AGE, ekspresiju receptora za AGE i njihove aktivirajuće ligande, signalizaciju protein kinaze C i put heksozamina, već takođe inhibira aktivnost endotelne NOS i prostaciklin sintaze, što sve doprinosi razvoju kardiomiopatije (Giacco and Brownlee, 2010).

Defekti u sistemu antioksidativne odbrane dodatno povećavaju oksidativni stres tokom kasnijih faza dijabetičke kardiomiopatije (Nishikawa et al, 2000; Cai et al, 2005; Tan et al, 2011). Unutar ćelije, SOD predstavlja prvu liniju odbrane od ROS, s obzirom na to da ovaj enzim katalizuje dismutaciju superoksidnog radikala u kiseonik ili vodonik peroksid (Fukai and Ushio-Fukai, 2011). SOD ima važnu ulogu u sprečavanju oštećenja srca u uslovima DM. Primena mito-TEMPO-a jedinjenja koji oponaša SOD u poređenju sa tretmanom samo nosačem sprečila je povećanje proizvodnje superoksida izazvano hiperglikemijom, smanjila hipertrofiju miokarda i poboljšala funkciju miokarda kod miševa sa STZ indukovanim T1DM i db/db miševa sa T2DM (Ni et al, 2016). Štaviše, transgenska prekomerna ekspresija mitohondrijalne Mn-SOD u srcu miševa sa dijabetesom poboljšala je mitohondrijalno disanje i sprečila razvoj promena u morfologiji srca i kontraktilnosti izazvanih dijabetesom (Shen et al, 2006). Slično, srčana prekomerna ekspresija CAT, enzima koji katalizuje razgradnju vodonik peroksida na vodu i kiseonik, rezultirala je očuvanjem normalne srčane morfologije i sprečavanjem kontraktilnih defekata u modelima T1DM i T2DM kod miševa (Ye et al, 2004).

Uloga cinka u razvoju dijabetesnih kardiovaskularnih komplikacija procenjena je u kliničkim studijama. Niske koncentracije cinka u serumu pacijenata sa T2DM bile su značajno povezane sa većim rizikom od smrti od koronarne bolesti (Soinio et al, 2007). Štaviše, niske koncentracije cinka u serumu bile su povezane sa smanjenom sposobnošću vežbanja i visokim rizikom od smrti kod pacijenata sa dekompenzovanom srčanom insuficijencijom (Yoshihisa et al, 2018), kao i sa povećanjem nivoa markera srčanog oštećenja (kao što su serumski kreatin kinaza i srčani troponin T) i većom prevalencijom akutnog infarkta miokarda (Huang et al, 2018). Nedostatak cinka i seleno često je povezan sa srčanim

komplikacijama zbog indukcije oksidativnog stresa (Ripa et al, 1998; Frustaci et al, 2012; Cao et al, 2020).

1.3.4. Prevencija nastanka dijabetičke kardiomiopatije

Trenutno ne postoje specifične histološke karakteristike, biohemijski markeri ili kliničke manifestacije za definitivnu dijagnozu dijabetičke kardiomiopatije. Takođe, nema prospektivnih kliničkih ispitivanja koja bi potvrdila da hiperglikemija ili hiperinsulinemija nezavisno povećavaju rizik od razvoja dijabetičke kardiomiopatije u odsustvu drugih faktora rizika, kao što su gojaznost, koronarna bolest srca i hipertenzija. Nedavni naučni dokazi o potencijalnoj upotrebi egzozoma i cirkulišućih iRNA kao biomarkera za otkrivanje dijabetičke kardiomiopatije ističu nove metode za dijagnostiku i prevenciju DM i kardiomiopatije (Jia et al, 2018). Američko udruženje za dijabetes preporučuje skrining pacijenata sa T2DM radi prevencije dijabetičke kardiomiopatije, ali rezultati objavljenog ispitivanja ukazuju da skrining asimptomatskih pacijenata nuklearnim snimanjem ne smanjuje stopu nastanka srčanih oboljenja (Young et al, 2009). Nažalost, čini se da pristup skrininga koji uključuje merenje vrednosti natriuretskog peptida tipa B, ergometriju i ehokardiografsku procenu, nije dovoljno osetljiv za identifikaciju subkliničke kardiomiopatije kod pacijenata sa DM (Fang et al, 2005). Stoga su dalje studije od velikog značaja za razumevanje preciznih mehanizama uključenih u započinjanje i napredovanje dijabetičke kardiomiopatije i za razvoj novih strategija za smanjenje rizika od srčane insuficijencije kod pacijenata sa DM (Jia et al, 2018).

1.4. Oksidativni stres

Kad god je okruženje ćelije izmenjeno infekcijama, bolestima, toksinima ili nutritivnom neravnotežom, mitohondrije odvrćaju tok elektrona od sebe, formirajući ROS i RNS, čime se smanjuje potrošnja kiseonika. Ova „oksidativna zaštita“ deluje kao odbrambeni mehanizam za smanjenje unosa toksičnih patogena ili hemikalija iz okoline u ćeliju, ili za uništavanje ćelije apoptozom i na taj način se sprečava širenje na susedne ćelije (Naviaux, 2012). Stoga se smatra da je formiranje ROS fiziološki odgovor na stres. Izraz „oksidativni stres“ korišćen je za definisanje stanja u kojem ROS i RNS dostižu prekomerne nivoe, bilo prekomernom proizvodnjom ili nedovoljnim uklanjanjem. Budući da su visoko reaktivni molekuli, patološka posledica viška ROS i RNS je oštećenje proteina, lipida i DNK (Johansen et al, 2005). Oksidativni stres uzrokuje da zdrave ćelije izgube svoju funkciju i strukturu. Kada je nivo antioksidanata ograničen, ovo oštećenje ćelija može postati iscrpljujuće i kumulativno (Asmat et al, 2016). S obzirom da slobodni radikali oštećuju makromolekule, njihovo prekomerno prisustvo u ćelijama može dovesti do fiziološke disfunkcije, smrti ćelija i patoloških stanja poput dijabetesa, srčanih oboljenja, reumatoidnog artritisa i karcinoma, kao i starenja organizma (Ceriello, 2006; Halliwell, 1994). Smatra se da slobodni radikali utiču na patogenezu više od 50 bolesti (Asmat et al, 2016).

1.4.1. Slobodni radikali

Slobodni radikali su reaktivne hemijske kratkotrajne vrste koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona. Neophodni su signalizaciju procesa diferencijacije i migracije ćelija. Zbog postojanja nesparenog elektrona mogu dovesti do oksidacije ćelijskih komponenti i molekula i tako izazvati oštećenje ćelija (Bansal and Bilaspuri, 2011). Slobodni radikali se mogu proizvesti u neenzimskim reakcijama organskih jedinjenja sa kiseonikom, kao i u reakcijama iniciranim jonizujućim zračenjem (Pham-Huy et al, 2008). Do nastanka slobodnih radikala može doći i u mitohondrijama u procesu

oksidativne fosforilacije. Aktivacija neutrofila i makrofaga, pušenje duvana, izlaganje različitim hemikalijama i industrijskim otpadnim vodama može povećati produkciju slobodnih radikala (Sen et al, 2010). Neki od slobodnih radikala su ROS, RNS (Droge, 2011) i reaktivne hlorne vrste (RCS) (Freidovich, 1999). ROS i RNS su visoko reaktivni molekuli, koji mogu biti slobodni radikali kao što su superoksid ($\cdot\text{O}_2^-$), hidroksil ($\cdot\text{OH}$), peroksil ($\cdot\text{ROO}$), hidroperoksil ($\cdot\text{HROO}$), azot monoksid ($\cdot\text{NO}$) i azot dioksid ($\cdot\text{NO}_2^-$), ili neradikali kao što su vodonik peroksid (H_2O_2), peroksinitrit (ONOO^-), i alkil peroksinitrit (RONOO) (Lazo-de-la-Vega-Monroy and Fernández-Mejía, 2013).

Slobodni radikali su važni za aktiviranje različitih signalnih puteva unutar ćelije, kao što su MAPK i kinaza regulisana ekstracelularnim signalom (eng. *extracellular-signal-regulated kinase* – ERK) koji menjaju ekspresiju gena, kao i u koordinaciji sa SOD za iniciranje ćelijske smrti (Cho and Wolkenhauer, 2003). Na primer, RNS koje proizvode neuroni deluju kao neurotransmiteri, a one koje stvaraju makrofagi deluju kao posrednici u imunskom odgovoru. One su takođe odgovorne za adheziju leukocita, trombozu, angiogenezu i vaskularni tonus. ROS su uključene u transkripciju gena, pojedinačnu transdukciju i regulaciju drugih aktivnosti u ćeliji (Fang et al, 2002).

Većina studija u vezi sa DM i njegovim komplikacijama bavila se ulogom superoksida, azot monoksida i peroksinitrita u ovoj bolesti. Superoksid može nastati u reakcijama katalisanim NADPH ili u reakcijama u mitohondrijalnom lancu, dok azot monoksid i peroksinitrit nastaju u putu sinteze azot monoksida (Johansen et al, 2005).

NADP u ćeliji postoji u redukovanom (NADPH) i oksidovanom (NADP^+) obliku. NADPH služi kao donor elektrona za NADPH oksidazu. Ovaj enzim je membranski transportni kompleks elektrona koji pumpa elektrone iz NADPH u citosolu kroz biološke membrane. To je jedini enzim čija je primarna funkcija stvaranje superoksida i/ili vodonik peroksida, koji se koriste uglavnom za sprečavanje prenošenja patogena i za ćelijsku baktericidnu funkciju (Fisher and Zhang, 2006; Drummond et al, 2011). Mitohondrije igraju važnu ulogu u održavanju ćelijskog redoks statusa, i ograničavaju aktivnost NADPH oksidaze. Međutim, kada se prag protonskog potencijala premaši, mitohondrije su značajan izvor ROS-a, koje mogu dodatno stimulisati NADPH oksidazu, stvarajući začarani krug proizvodnje ROS-a (Dikalov, 2011). Kada mitohondrije ne mogu dalje da ekstrahuju kiseonik, nivo kiseonika u ćelijama i tkivima raste, smanjujući tkivnu ekstrakciju kiseonika iz krvi. Ovo dovodi do smanjenja vaskularizacije tkiva, što može biti povezano sa perifernom vaskularnom bolešću, a vremenom i sa hroničnom hipoksijom tkiva i ishemijskom (Naviaux, 2012).

Azot monoksid se proizvodi zahvaljujući enzimu NOS, koji postoji u tri izoforme: neuronska (nNOS ili NOS-I), inducibilna (iNOS ili NOS-II) i endotelna (eNOS ili NOS-III). Ove tri izoforme su zastupljene različito u različitim tkivima, nNOS je eksprimirana u neuronima, iNOS u glatkim mišićima krvnih sudova, hepatocitima, makrofazima i neuroendokrinom tkivu, i eNOS je konstitutivno eksprimirana u endotelnim ćelijama. iNOS i eNOS mogu biti stimulisane redoks stanjem u ćeliji, citokinima, hormonima i hranljivim materijama (Schmidt et al, 1993; Hobbs and Ignarro, 1996). NOS u prisustvu kiseonika i NADPH katalizuje oksidaciju terminalnog gvanidinskog azota na L-argininu, dajući L-citrulin i azot monoksid (Murad, 1999; Djuric et al, 2018).

Jednom proizveden i oslobođen, azot monoksid može slobodno difundovati kroz membrane ili delovati na različite ćelijske mete. Azot monoksid učestvuje kao posrednik u nekoliko fizioloških efekata kao što su vazorelaksacija, aktivacija makrofaga, ekspresija gena i apoptoza. Obično se azot monoksid smatra vaskuloprotektivnim molekulom. Međutim, pošto azot monoksid lako reaguje sa superoksidom, jedan od njegovih višestrukih efekata je i nitrozilacija proteina u tiolnim grupama i stvaranje RNS, poput peroksinitrita. Zbog toga količina superoksida određuje da li azot monoksid deluje kao zaštitni ili štetni molekul (Johansen et al, 2005; McDonald and Murad F, 1996).

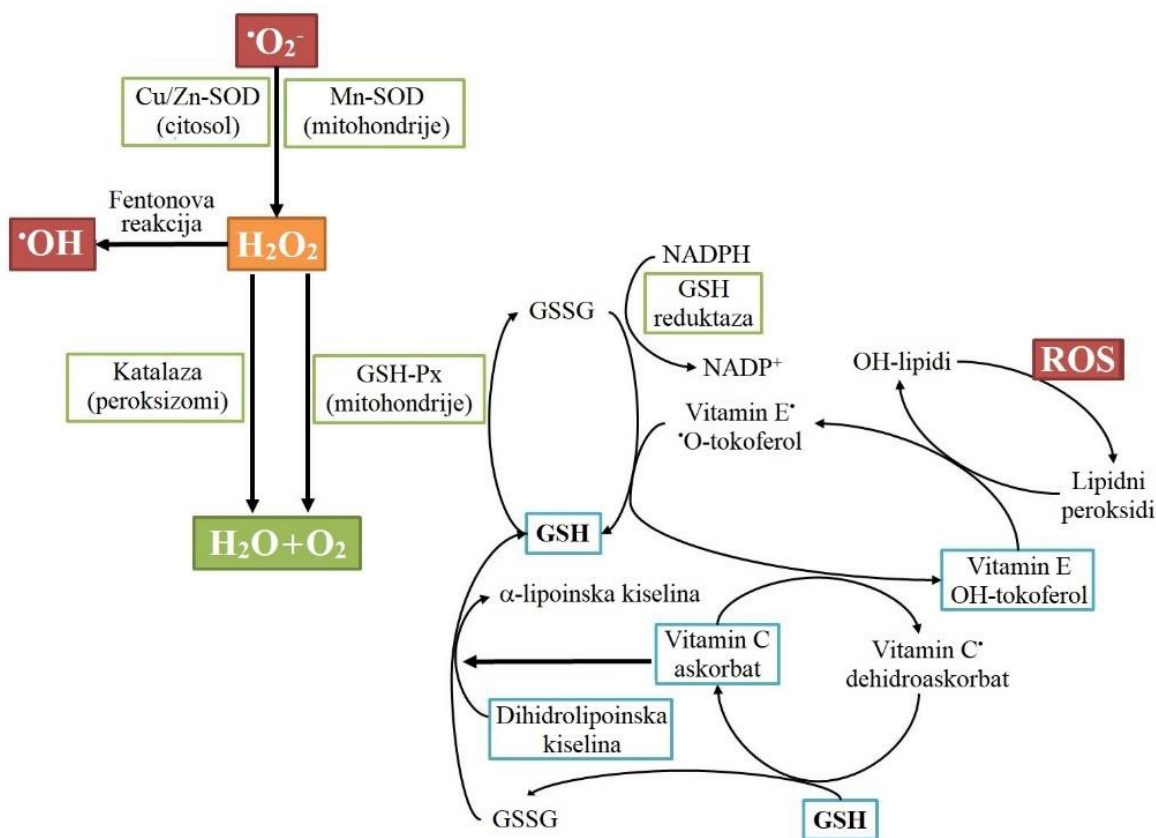
1.4.2. Antioksidativna zaštita

Kako bi se uklonili štetni efekti slobodnih radikala, u organizmu se aktiviraju različiti endogeni i egzogeni mehanizmi koji će neutralisati povišenu količinu slobodnih radikala, zaštititi ćelije i doprineti prevenciji bolesti (Pham-Huy et al, 2008). Termin antioksidans može se koristiti za bilo koju supstancu koja inhibira ili odlaže oksidaciju supstrata. Postoji više endogenih i egzogenih molekula koji igraju ulogu u antioksidativnoj odbrani i mogu se smatrati biomarkerima oksidativnog stresa (Asmat et al, 2016).

Mali deo kiseonika koji se troši za aerobne procese u ćelijama se pretvara u superoksidni anjon (Boveris, 1984), koji se mora ukloniti ili pretvoriti u manje reaktivne i manje štetne molekule. Glavni enzimi koji regulišu ovaj proces su SOD, GSH-Px i CAT (Slika 2). Kada dođe do hiperprodukcije ROS ili hronične hiperglikemije, aktivnost ovih enzima je nedovoljna, što dovodi do većeg stvaranja ROS i RNS i aktivacije puteva oksidativnog stresa.

SOD se smatra prvom linijom odbrane od ROS. Ovaj enzim je prisutan u skoro svim ćelijama i pretvara superoksid u vodonik peroksid. Mitohondrijska i bakterijska SOD sadrže Mn, dok je citosolna SOD dimer koji sadrži Cu i Zn. Kako vodonik peroksid može i dalje reagovati sa drugim ROS, potrebno ga je razgraditi bilo kojim od druga dva antioksidativna enzima, GSH-Px ili CAT (Johansen et al, 2005; Fisher and Zhang, 2006). GSH-Px se nalazi u mitohondrijama. Ona katalizuje razgradnju vodonik peroksida redukcijom, pri čemu se dva molekula GSH oksiduju u glutation disulfid (GSSG). Regeneracija GSH pomoću GSH-reduktaze zahteva NADPH, koji se oksiduje u NADP⁺. Dijabetes izaziva promene u aktivnosti enzima GSH-Px i glutation reduktaze. Svaka promena njihovog nivoa učiniće da ćelije postanu sklone oksidativnom stresu, a samim tim i oštećenju ćelija (Asmat et al, 2016). Sa druge strane, CAT je lokalizovana prvenstveno u peroksizomima, pa detoksikuje vodonik peroksid koji difunduje iz mitohondrija u citosol pretvarajući ga u vodu i molekularni kiseonik (Johansen et al, 2005; Fisher and Zhang, 2006). U slučaju nedostatka CAT, β ćelije pankreasa koje sadrže veliku količinu mitohondrija trpe oksidativni stres zbog stvaranja viška ROS koje dovode do disfunkcije β ćelija i na kraju dijabetesa (Jamieson et al, 1986). Istraživanja pokazuju da je hiperglikemija povećala proizvodnju vodonik peroksida i smanjila ekspresiju gena za CAT (Patel et al, 2013).

Postoje i neenzimski antioksidativni mehanizmi, koji uglavnom pomažu prevođenje GSSG u GSH. Antioksidativni vitamini poput A, C, E i alfa-lipoiinske kiseline učestvuju u tim reakcijama (Lazo-de-la-Vega-Monroy and Fernández-Mejía, 2013). Svaka promena njihovog nivoa je značajan biomarker oksidativnog stresa (Asmat et al, 2016). Ovi neenzimski antioksidativni mehanizmi rade na uklanjanju vodonik peroksida (a time i superoksida) iz ćelije, međutim u prisustvu redukovanih prelaznih metala (Cu, Fe), vodonik peroksid se u Fentonovoj reakciji može transformisati u hidroksil, koji je visoko reaktivan ROS (Johansen et al, 2005; Evans et al, 2002).



Slika 2. Antioksidativna zaštita u organizmu. $\cdot\text{O}_2^-$ – superoksidni anjon; SOD – superoksid dismutaza; H_2O_2 – vodonik peroksid; $\cdot\text{OH}$ – hidroksil; H_2O – voda; O_2 – molekul kiseonika; GSH-Px – glutation peroksidaza; GSSG – glutation disulfid; GSH – glutation; NADPH – redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat; NADP^+ – oksidovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat; ROS – reaktivne kiseonične vrste (Ilustracija preuzeta i prevedena iz Lazo-de-la-Vega-Monroy and Fernández-Mejía, 2013).

1.4.3. Oksidativni stres i dijabetes melitus

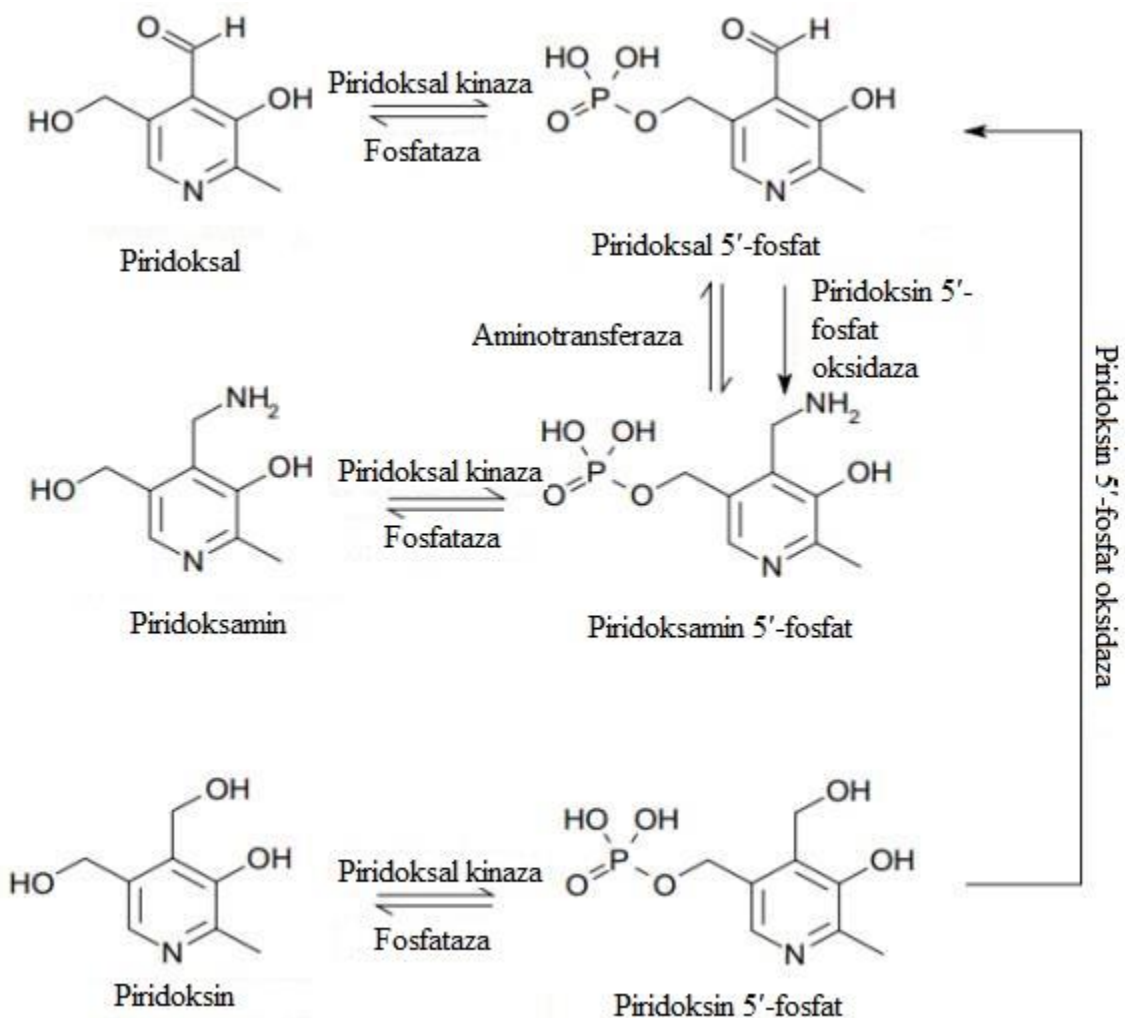
Mnogi dokazi iz eksperimentalnih studija pokazali su povezanost DM i oksidativnog stresa merenjem različitih biomarkera koji uključuju biomarkere oštećenja DNK i proizvode peroksidacije lipida (Ayepola et al, 2014). Hiperglikemija i unos slobodnih masnih kiselina jedni su od uzroka oksidativnog stresa (Evans et al, 2002). Stoga ne može biti iznenađujuće da osobe sa DM imaju povećano stvaranje ROS (Ceriello et al, 2001; Guzik et al, 2002; Rains and Jain, 2011). Objavljeni su dokazi koji podržavaju ulogu oksidativnog stresa u patogenezi T1DM i T2DM. Formiranje slobodnih radikala u šećernoj bolesti neenzimskom glikacijom proteina, oksidacijom glukoze i povećanom peroksidacijom lipida dovodi do oštećenja enzima, ćelijske mehanizacije, a takođe i do povećane rezistencije na insulin usled oksidativnog stresa (Maritim et al, 2003). Povišenje nivoa ROS kod osoba sa DM može biti posledica povećanja njihove proizvodnje ili/i smanjenja njihove razgradnje pomoću CAT, SOD i GSH-Px. Varijacije nivoa ovih enzima čine tkiva podložnim oksidativnom stresu što dovodi do razvoja dijabetičnih komplikacija (Lipinski, 2001). Pokazano je da DM značajno utiče na nivo antioksidativnih enzima, i da dodatno povećava oksidativni stres (Maritim et al, 2003; Rains and Jain, 2011). Oksidativni stres se smatra glavnim učesnikom u patofiziologiji komplikacija DM (Brownlee, 2005), a posebno u

razvoju vaskularnih komplikacija. *In vivo* studije podržavaju ulogu hiperglikemije u stvaranju oksidativnog stresa koji dovodi do endotelne disfunkcije u krvnim sudovima pacijenata sa DM (Ceriello, 2006). Prema epidemiološkim studijama, smrtnost osoba sa DM može se objasniti povećanjem vaskularnih oboljenja (Pham-Huy, 2008). Veruje se da u nastanku i progresiji kasnih dijabetičkih komplikacija slobodni radikali imaju veliku ulogu zbog svoje sposobnosti da oštete lipide, proteine i DNK (Ayepola, 2014). Komplikacije DM izazvane slobodnim radikalima i oksidativnim stresom podrazumevaju koronarnu bolest, neuropatiju, nefropatiju, retinopatiju (Phillips et al, 2004) i moždani udar (Asfandiyarova et al, 2007).

Pokazano je da oksidativni stres utiče i na rezistenciju na insulin i na lučenje insulina (Lazo-de-la-Vega-Monroy and Fernández-Mejía, 2013). ROS i RNS utiču na signalnu kaskadu insulina (Rains and Jain, 2011). Niske doze ROS imaju fiziološku ulogu u signalnom putu insulina. Nakon što insulin stimuliše svoje receptore u adipocitima, dolazi do stvaranja vodonik peroksida putem NADPH oksidaze, koji inhibira katalitičku aktivnost proteinske tirozin fosfataze 1B, povećavajući tako fosforilaciju tirozina (Mahadev et al, 2004). Hiperglikemija i insulinska rezistencija mogu dovesti i do promene mitohondrijalne funkcije i oštećenja delovanja insulina citokinima kao odgovor na metabolički stres (Bloch-Damti and Bashan, 2005; Eriksson, 2007). Povećanje puta heksozamina takođe je povezano sa rezistencijom na insulin. Štaviše, predloženo je da ovaj put deluje kao ćelijski senzor za višak glukoze. Sa te tačke gledišta, insulinska rezistencija može biti zaštitni mehanizam od ulaska viška glukoze (Buse, 2006). β ćelije pankreasa su posebno osetljive na ROS i RNS, jer je njihova prirodna enzimska antioksidativna odbrana niža u poređenju sa drugim tkivima (Tiedge et al, 1997). Glukoza ulazi u β ćelije na insulin nezavistan način, u kojima je neophodna kao izvor energije, ali i kao stimulus za lučenje insulina. Hiperglikemija može izazvati hronični oksidativni stres putem oksidacije glukoze (Robertson et al, 2003), što dovodi do povećane proizvodnje mitohondrijalnog superoksida, što dodatno aktivira odvojeni protein-2 (eng. *uncoupling protein-2* – UCP-2). Ovaj protein smanjuje odnos ATP/ADP kroz curenje protona u β ćeliji, što smanjuje lučenje insulina (Brownlee, 2003). ROS takođe povećavaju aktivnost NF- κ B u β ćelijama, koja potencijalno dovodi do apoptoze β ćelija (Rhodes, 2005), kao i JNK put koji je povezan sa potiskivanjem ekspresije gena za insulin (Kaneto et al, 2005). Kao i kod drugih tipova ćelija, azot monoksid u β ćelijama ima fiziološku ulogu. Azot monoksid može regulisati aktivnost glukokinaze s-nitrozilacijom u β ćeliji, i verovatno povećati lučenje insulina (Rizzo and Piston, 2003). Međutim, višak azot monoksida i RNS mogu izazvati apoptozu aktivacijom kaspaze-3 i smanjenjem nivoa ATP (Tejedo et al, 1999).

1.5. Vitamin B6

Vitamin B6 je esencijalni vitamin rastvorljiv u vodi neophodan za normalan rast i razvoj sisara (Tryfiates, 1980). Sastoji se od grupe od šest hemijski srodnih jedinjenja koja sva sadrže piridinski prsten kao jezgro. Oni se međusobno razlikuju po promenljivoj grupi na poziciji 4' piridina (Slika 3). Piridoksamin sadrži amino metil grupu, piridoksin hidroksil metil grupu, a piridoksal aldehidnu grupu. Ova tri jedinjenja imaju i svoje fosforilovane derivate: piridoksal 5'-fosfat, piridoksin 5'-fosfat, piridoksamin 5'-fosfat koji mogu da imaju ulogu kofaktora, pri čemu je piridoksal 5'-fosfat biološki aktivan oblik vitamina B6 (Parra et al, 2018). Putem hrane u organizam se najčešće unose piridoksal, piridoksin i piridoksamin, zbog prisustva specifične piridoksal kinaze ljudi mogu da ih konvertuju, u aktivne fosfate (Stach et al, 2021). Nakon varenja i apsorpcije, vitamin B6 se u jetri prevodi u biološki aktivni oblik, piridoksal 5'-fosfat, koji se u plazmi prenosi vezan za albumine (Wang and Kuo, 2007). Nakon hidrolize alkalnom fosfatazom, slobodni piridoksal preuzimaju ćelije i ponovo ga fosforilišu (Buss et al, 1980).



Slika 3. Oblici vitamina B6 (Ilustracija preuzeta i prevedena iz Stach et al, 2021).

Mnoge namirnice, kao što su banane, orasi, meso, jaja, sadrže velike količine vitamina B6. Takođe velike količine ovog vitamina nalaze se u krompiru, koji je osnovna namirnica u mnogim zemljama. 100 g krompira sadrži 23-60 % dnevnog preporučenog unosa vitamina B6. Pored toga, vitamin B6 je termo stabilan, pa termička obrada ne utiče na njegov sadržaj. Stoga u zdravoj populaciji na uravnoteženoj ishrani, nedostatak vitamina B6 ne bi trebalo da postoji. Međutim, prijavljeno je da određene starosne grupe (preko 45 godina) imaju značajno niže nivoe piridoksal 5'-fosfata u plazmi i oni mogu imati koristi od ishrane obogaćene vitaminom B6 (Parra et al, 2018).

Preporučeni dnevni unos (eng. *Recommended Dietary Allowance – RDA*) vitamina B6 za muškarce i žene uzrasta 19 do 50 godina je 1,3 mg, za muškarce starije od 50 godina je 1,7 mg, dok je za žene starije od 50 godina 1,5 mg. Potreban dnevni unos se povećava tokom trudnoće (1,9 mg) i laktacije (2,0 mg) (Institute of Medicine, 1998).

1.5.1. Uloga vitamina B6

Vitamin B6 igra važnu ulogu u metabolizmu proteina, lipida, ugljenih hidrata i nukleinskih kiselina (Matxain et al, 2006; Taş et al, 2014; Stach et al, 2021). Aktivni oblik vitamina B6 je piridoksal 5'-fosfat, koji je aminotransferaza i deluje kao koenzim za više od 140 metaboličkih reakcija, kao što su međusobna konverzija aminokiselina, sinteza neurotransmitera, regulacija energetske homeostaze i formiranje hema (Stover and Field, 2015). Predstavlja koenzim glikogen-fosforilaze, enzima koji je neophodan za korišćenje glikogena u jetri i mišićima. Na ovaj način, piridoksal 5'-fosfat aktivno učestvuje u metabolizmu glukoze (Hellmann and Mooney, 2010). Kod pacova sa nedostatkom vitamina B6, pokazano je da su aktivnost glikogen-fosforilaze u gastroknemijskom mišiću i srcu značajno smanjene (Okada et al, 1997). Pored toga, pacovi hranjeni visokim količinama vitamina B6 pokazuju povišenu koncentraciju mišićne fosforilaze (Black et al, 1977). U procesu transformacije aminokiselina piridoksal 5'-fosfat je koenzim u reakcijama transaminacije i dekarboksilacije, kao i u reakcijama katalizovanim sintazama amino kiselina ili racemazama (Stach et al, 2021). Vitamin B6 učestvuje i u metabolizmu sfingozin fosfata, katabolizmu triptofana i delovanju faktora transkripcije NF-κB (Stach et al, 2021). Piridoksal 5'-fosfat reguliše promet triptofana i obezbeđuje sintezu NAD⁺ (Wolf, 1974). Druge fiziološke uloge vitamina B6 uključuju modulaciju interakcije steroidnih receptora (Tully et al, 1994) i regulaciju imunske funkcije. Nedostatak piridoksal 5'-fosfata može uticati na metabolizam sledećih neurotransmitera: dopamina, serotonina (5-hidroksitriptamina), glicina, D-serina, glutamata, gama-aminobuterne kiseline (GABA) i histamina (Clayton, 2006). Najmanje 80 % ukupnog vitamina B6 u organizmu nalazi se u skeletnim mišićima kao piridoksal 5'-fosfat vezan za glikogen-fosforilazu (Suidasari et al, 2016).

1.5.2. Vitamin B6 i oksidativni stres

Nedavno je pokazano da vitamin B6 ima antioksidativno dejstvo, iako nije klasifikovan kao antioksidans (Ohta and Foote, 2002; Higashi-Okai et al, 2006; Matxain et al, 2006). Vitamin B6 pokazuje značajne antioksidativne funkcije uglavnom uklanjanjem superoksidnih radikala (Mahfouz et al, 2009). U jednom istraživanju je dobijeno da vitamin B6 ispoljava pozitivne efekte u modulaciji neutrofilnog infiltrata i oksidativnog stresa u plućima i jetri pacova podvrgnutih modelu polimikrobne sepse (Giustina et al, 2019). Piridoksin ima esencijalnu ulogu u sintezi glutation peroksidaze, pa je moguće da tretman vitaminom B6 ima pozitivan efekat na dostupnost glutation peroksidaze i doprinosi smanjenju oksidativnih oštećenja (Dalto i Matte 2017). I druge studije sugerišu da su aktivnosti vitamina B6 protiv bolesti posredovane smanjenjem oksidativnog stresa i inflamacije (Komatsu et al, 2002; Sakakeeni et al, 2012).

1.5.3. Nedostatak vitamina B6 i različita oboljenja

S obzirom na to da vitamin B6 ima širok spektar funkcija u ljudskom telu, ne iznenađuje da nedostatak ovog vitamina može biti povezan sa rakom, kardiovaskularnim događajima, migrenom, hroničnim bolom, depresijom, kognitivnim i imunskim oštećenjima (Kjeldby et al, 2013).

Vitamin B6 se smatra jedinjenjem koje učestvuje u funkcionisanju celog imunskog sistema zajedno sa vitaminima A, B12, C, D i E, folnom kiselinom i oligoelementima kao što su cink, gvožđe, selen, magnezijum i bakar. Sva ova jedinjenja pospešuju i urođeni i stečeni imunitet. Smatra se da većina stanovništva ima nedostatke ovih supstanci i preporučuje se njihov dodatni unos (Calder et al, 2020).

Vitamin B6 utiče na više antiinflamatornih puteva. Jedan od glavnih puteva je kinureninski put uključen u metabolizam triptofana (Wang et al, 2015). Na ovom putu, piridoksal 5'-fosfat deluje kao kofaktor enzima koji pretvaraju kinurenin u različita jedinjenja, kao što su kinureninska kiselina, antranilna kiselina, ksanturenska kiselina i 3-hidroksiantranilna kiselina. Predloženo je da metaboliti povezani sa kinureninom imaju antiinflamatorne korisne efekte (Wang et al, 2015; Ueland et al, 2016). Prema novijim istraživanjima, vitamin B6 deluje na smanjenje upale u organizmu tako što utiče na aktivnost NLRP3 inflamazoma (Zhang et al, 2016). Kumrungsee i sar. (2020) su u svom istraživanju pokazali da vitamin B6 ima ulogu u ublažavanju simptoma infekcije COVID-19 i posledičnih komplikacija kao što su dijabetes, hipertenzija i srčana oboljenja. Mogući mehanizmi delovanja vitamina B6 su smanjenje upale (blokiranjem citokinske oluje) i oksidativnog stresa, regulacija nivoa Ca^{2+} , povećanje nivoa karnozina (kao kardio protektora) i poboljšanje funkcije imunskog sistema. Vitamin B6 igra ključnu ulogu u proizvodnji T limfocita i interleukina. Nedostatak vitamina B6 dovodi do smanjenja imunskog odgovora, uključujući formiranje serumskih antitela, smanjenu proizvodnju IL-2 i povećanu proizvodnju IL-4 (Qian et al, 2017). Postoji inverzna veza između nivoa vitamina B6 i IL-6 i TNF- α u uslovima hronične upale. Pacijenti koji boluju od COVID-19, koji dodatno imaju jaku upalu, mogu imati nedostatak vitamina B6; slično, kod starijih pacijenata, kao i onih sa T2DM i kardiovaskularnim oboljenjima, primećuju se niži nivoi vitamina B6 (Qian et al, 2017; Kumrungsee et al, 2020).

Većina istraživanja koja su testirala nivo piridoksal 5'-fosfata otkrila su inverznu vezu između nivoa piridoksal 5'-fosfata i pojave DM, takođe, pokazano je da što je bolest više uznapredovala, to je zavisnost veća (Satyanarayana et al, 2011; Nix et al, 2015). Nije sasvim jasno da li sniženi nivoi piridoksal 5'-fosfata doprinose razvoju dijabetesa, ili dijabetes snižava nivo piridoksal 5'-fosfata. Obe ove hipoteze deluju uverljivo (Stach et al, 2021). Pokazano je da konzumiranje glukoze kod zdravih ljudi snižava nivo piridoksal 5'-fosfata (Leklem and Hollenbeck, 1990). Kod novodijagnostikovanih pacijenata sa DM otkrivene su smanjene koncentracije piridoksal 5'-fosfata u poređenju sa zdravim ispitanicima (Ahn et al, 2011). Druga istraživanja su objavila da je dugotrajna istovremena primena folne kiseline, piridoksina i vitamina B12 dovela do smanjenja nivoa Hcy; međutim, nije smanjila rizik od razvoja T2DM kod žena sa visokim rizikom od kardiovaskularnih bolesti (Song et al, 2009). Istraživanja na perfundovanom pankreasu, pokazala su da postoji oštećenje lučenja insulina i glukagona u uslovima nedostatka piridoksina (Toyota et al, 1981). U eksperimentalnoj studiji je pokazano da suplementacija vitaminom B6 smanjuje koncentraciju insulina i insulinsku rezistenciju bez uticaja na nivo glukoze u krvi (Unoki-Kubota et al, 2010). Takođe je pokazano da istovremena primena vitamina B6 i B1 potiskuje glikaciju DNK u leukocitima osoba sa DM, međutim, ovi efekti nisu postignuti kada je vitamin B6 primenjen samostalno (Polizzi et al, 2012).

Visoka koncentracija glukoze podstiče oksidativni stres i stvaranje AGE, i na taj način oštećuje neke organe, uglavnom srce, nerve, oči i bubrege. Nefropatija je najčešće oštećenje bubrega kod osoba sa dijabetesom, koje karakteriše albuminurija (Stach et al, 2021). Jedno istraživanje pokazuje da je suplementacija piridoksal 5'-fosfatom kod pacova sa DM indukovanim STZ dovela do smanjenja albuminurije i sprečila napredovanje nefropatije tako što je inhibirala formiranje AGE. Rezultati ove studije ukazuju da je piridoksal 5'-fosfat obećavajući aktivni oblik vitamina B6 za lečenje poremećaja povezanih sa AGE, kao što je dijabetička nefropatija (Nakamura et al, 2007). U studiji koja je proučavala efekat nivoa vitamina B6 kod pacijenata sa T2DM, sa i bez nefropatije, pokazano je da je T2DM povezan sa smanjenim nivoom vitamina B6 i promenama u njegovom metabolizmu, posebno kod pacijenata sa inicijalnom nefropatijom koja se karakteriše mikroalbuminurijom (Nix et al, 2015). Nivo vitamina B6 je takođe bio niži u grupi osoba sa T2DM sa ili bez retinopatije u poređenju sa zdravim ispitanicima (Satyanarayana et al, 2011). Druga studija pokazuje da iako nivo vitamina B6 nije u potpunosti i jasno povezan sa razvojem T2DM postoje dokazi da nedostatak ovog vitamina stimuliše progresiju

komplikacija DM. Posle 6 meseci testiranja suplementacije vitaminom B6, smanjen je edem mrežnjače i povećana osetljivost na svetlost kod dijabetičara sa neproliferativnom retinopatijom (Smolek et al, 2013).

Piridoksal 5'-fosfat je neophodan koenzim za enzim GAD65, koja se nalazi u pankreasnim ostrvcima i učestvuje u nastanku GABA (Rubí, 2012). GAD65 predstavlja važan autoantigen uključen u patogenezu T1DM (Rorsman, 1995). Autoantitela na GAD65 prethode razvoju T1DM i klinički su markeri T1DM, ali mogu postojati i kod drugih autoimunskih bolesti (Rubí, 2012). Nedostatak piridoksal 5'-fosfata smanjuje nivoe GABA u ostrvcima pankreasa, takođe, prijavljeno je da GABA inhibira autoimunsku upalu (Rubí, 2012; Bhat et al, 2010). Dakle, sniženi nivoi GABA unutar pankreasnih ostrvaca, zbog smanjene sinteze, bi podstakli autoimunost (Rubí, 2012).

Pokazano je da vitamin B6 ima pozitivne efekte na kardiovaskularni sistem (Martinez et al, 2000). Nedostatak vitamina B6 primećen je kod hipertenzije, ateroskleroze i bolesti koronarnih arterija (Shah and Dhalla, 2021). Unos vitamina B6 smanjuje rizik od koronarne bolesti i ateroskleroze, pri čemu se smatra da je antiinflamatorni efekat vitamina B6 barem delimično odgovoran za to (Friso et al, 2004). Pokazano je da su viši nivoi piridoksal 5'-fosfata povezani sa nižim nivoima C-reaktivnog proteina i 8-hidroksi-2'-deoksiguanozina, čije su povećane koncentracije povezane sa povećanim rizikom od srčanih oboljenja (Shen et al, 2010). Piridoksal 5'-fosfat kontroliše procese kao što su regulacija krvnog pritiska (uticaj na RAAS) i zgrušavanje krvi, obezbeđujući integritet endotela i agregaciju trombocita, što sve ima uticaj na ljudsko zdravlje (Stach et al, 2021). Utiče i na sintezu polinezasićenih masnih kiselina, a u uslovima njegovog nedostatka povećava se lipidna peroksidacija i smanjuje se antioksidativna odbrana, pa postoje sugestije da je nedostatak piridoksina povezan sa aterogenezom (Ohta and Foote, 2002; Matxain et al, 2009; Keles et al, 2010). Takođe se navodi da vitamin B6 ispoljava antiishemijski efekat u srcu blokiranjem purinergičkih receptora (Dhalla et al, 2013). Pokazano je da životinje koje su bile na ishrani bez vitamina B6 ispoljavaju aterosklerozu, bolest koronarnih arterija, hipertenziju i povećanu aktivnost simpatikusa (Shah and Dhalla, 2021).

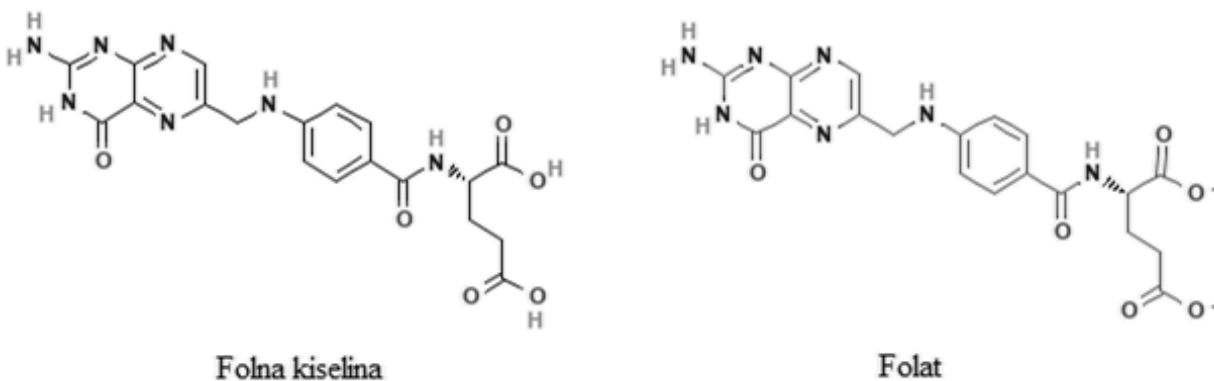
Jedna funkcija vitamina B6 je i njegova uloga u monokarbonskom metaboličkom putu, koji uključuje prenos monokarbonskih grupa (metil grupa) za sintezu i metilaciju DNK. Nedostatak vitamina B6 je povezan sa značajnim oštećenjem monokarbonskog metaboličkog puta kod životinja (Martinez et al, 2000), kao i sa povećanim rizikom od kardiovaskularnih bolesti (Folsom et al, 1998; Robinson et al, 1998; Kumrungsee et al, 2020), za koji se smatra da može biti posledica oštećenja monokarbonskog metaboličkog puta (da Silva et al, 2013). Hcy je važan intermedijer u monokarbonskom metaboličkom putu, predstavlja faktor rizika za kardiovaskularne bolesti i akumulira se u nedostatku vitamina B6 (Hustad et al, 2007; Friso et al, 2004 i Martinez et al, 2000). U preglednom radu Friso i sar. (2012) su pokazali da postoji povezanost između niskog nivoa vitamina B6 u plazmi i većeg rizika od bolesti koronarnih arterija, kao i njene glavne trombotičke komplikacije, infarkta miokarda, kao i da vitamin B6 predstavlja nezavisni faktor rizika za kardiovaskularne bolesti, i da je nedostatak ovog vitamina povezan sa većim rizikom od kardiovaskularnih bolesti, međutim klinička ispitivanja su pokazala neefikasnost suplementacije vitaminom B6 na recidiv vaskularnih događaja. U jednom istraživanju je pokazano da povećane doze vitamina B6 smanjuju rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti kod muškaraca, ali ne i kod žena (Jeon and Park, 2019). Meta-analiza prospektivnih opservacionih studija je pokazala da je veći unos folata i vitamina B6 povezan sa manjim rizikom od koronarne srčane bolesti (Jayedi and Zargar, 2019).

Hronična upala u telu može dovesti do neoplastičnih procesa. Poslednjih godina bilo je mnogo istraživanja o efektima vitamina B6 na upale i hronične upale, uključujući neoplastične procese. Otkriveno je da vitamini B2 (riboflavin), B6 (piridoksin) i B9 (folna kiselina) ispoljavaju antitumorsko delovanje na ćelijama limfoma promonocitne linije (Mikkelsen et al, 2019). Jedna meta-analiza je

pokazala da opservacione studije pokazuju inverznu povezanost većeg unosa i koncentracije vitamina B6 u krvi i pojave karcinoma, bez obzira na to gde se oni javljaju, međutim randomizovana ispitivanja ne podržavaju ove nalaze. Najjača veza se javlja kod karcinoma gastrointestinalnog trakta (Mocellin et al, 2017). Postojeći dokazi podržavaju hipotezu da nedostatak vitamina B6 može da podstakne razvoj i napredovanje karcinoma. U stvari, vitamin B6 zajedno sa drugim nutrijentima kao što su folat, vitamin B12 i metionin učestvuje u monokarbonskom metaboličkom putu (za razmenu grupa sa jednim ugljenikom, kao što su metil i formil grupe) što doprinosi događajima vezanim za karcinogenezu kao što su sinteza, metilacija i popravka DNK. Osim toga, vitamin B6 može uticati na ćelijski ciklus, upalu, angiogenezu, oksidativni stres i hromozomsku stabilnost (Mocellin et al, 2017).

1.6. Folna kiselina

Folat, vitamin B9, je generički termin koji se koristi za jedinjenja koja imaju strukturu i funkcije slične folnoj kiselini. Jedan je od vitamina B-kompleksa, koju čini grupa malih hidrosolubilnih molekula koji deluju kao kofaktori za specifične enzime, omogućavajući im na taj način da sprovode svoje metaboličke funkcije (Stanhewicz and Kenney, 2017). Folat je prirodni vitamin B9 koji se nalazi u hrani, dok je folna kiselina sintetički derivat koji se dodaje hrani ili suplementima (Slika 4). Bioraspoloživost folne kiseline je veća od bioraspoloživosti folata (Bailey et al, 2015). Folna kiselina se u organizmu pretvara u biološki aktivne, potpuno redukovane forme pomoću dihidrofolat reduktaze. Sisarima nedostaju neophodni enzimi za sintezu folata i stoga u potpunosti zavise od ingestije prethodno formiranih folata i/ili suplementacije folnom kiselinom kako bi zadovoljili svoje biološke potrebe (Stanhewicz and Kenney, 2017). Folna kiselina je prisutna u hrani u obliku poliglutamata sa brojnim glutamatnim bočnim lancima povezanim gama karboksi amidnom vezom. Apsorpcija se vrši u tankom crevu nakon što se poliglutamadni bočni lanci hidrolizuju crevnom glutamat karboksipeptidazom II da bi se formirao monoglutamat (Visentin et al, 2014). Hemijski aktivan oblik folata je tetrahidrofolat čija je glavna funkcija da omogući enzimima da prenesu monokarbonske grupe (Scott and Weir, 1998). U enterocitima se tetrahidrofolat konvertuje u 5-metil tetrahidrofolat koji ulazi u cirkulaciju. Konverzija folata u 5-metil tetrahidrofolat je ograničena, međutim, ako se dovoljno folata konzumira oralno, nemetabolizovani folat ulazi u cirkulaciju (Kelly et al, 1997), preuzimaju ga ćelije, a zatim se redukuje u tetrahidrofolat pomoću dihidrofolat reduktaze (Scott and Weir, 1998). Zalihe folata u jetri se procenjuju na 5 do 10 mg (Morgan and Baggott, 2006).



Slika 4. Folna kiselina i folat (Ilustracija preuzeta iz National Center for Biotechnology Information, 2022).

Nedostatak folata je povezan sa niskim socio-ekonomskim statusom i neadekvatnim unosom zelenog lisnatog povrća, neuhranjenošću, promenama mentalnog statusa, uzimanjem lekova, alkoholizmom i genetskim defektima (Barnabé et al, 2015; Green and Miller 1999). Takođe, žene u reproduktivnom dobu, žene hispanoameričkog porekla, osobe sa visokim indeksom telesne mase, celijakijom i nedostatkom vitamina B12 mogu da ispolje nedostatak folata (Riaz, 2014; Green and Miller 1999). Poznato je da nedostatak folata remeti DNK i cikluse metilacije (Laanpere et al, 1999), i može dovesti do mnogih poremećaja kao što su anemija, neurološke abnormalnosti i urođene mane (Barnabé et al, 2015). Pokazano je da su nedostatak vitamina B6 i folata glavni faktori hiperhomocisteinemije (Iqbal, 2006).

U SAD samo 0,1 % ljudi ima nedostatak folata, zahvaljujući programu fortifikacije folnom kiselinom započetom 1998. godine (Odewole et al, 2013). Program fortifikacije folnom kiselinom primenjuje se u više od 75 zemalja u kojima je takođe nedostatak folata redak (Bailey et al, 2015). U većini razvijenih zemalja obavezno je obogaćivanje brašna folnom kiselinom, a većina evropskih zemalja preporučuje suplementaciju folnom kiselinom pre začeca i tokom prva tri meseca trudnoće (Khan and Jialal, 2019).

Folat je prirodno prisutan u mnogim namirnicama, kao što su povrće, posebno tamnozeleno lisnato povrće, pasulj, grašak, voće, orašasti plodovi, mlečni proizvodi, meso, jaja, jetra, morski plodovi i žitarice (Parker, 2014; Mönch et al, 2015). Bioraspoloživost folata u prirodnoj hrani je, međutim, približno 50 % bioraspoloživosti sintetičkog oblika folne kiseline i veoma varira u zavisnosti od konzumirane hrane (Mönch et al, 2015).

Za muškarce i žene starije od 19 godina RDA folata iznosi 400 µg. Potreban dnevni unos se povećava tokom trudnoće i iznosi 600 µg i tokom laktacije kada iznosi 500 µg (Institute of Medicine, 1998).

1.6.1. Uloga folne kiseline

Folat je generički termin za koenzime folne kiseline u telu. Sastoje se od pteridinskog prstena, para-aminobenzojeve kiseline i poliglutamnog bočnog lanca. Folat je neophodan za rast (Strand et al, 2015), sintezu DNK i eritropoezu (Rittner and Bailey, 2005), predstavlja kofaktor u brojnim metaboličkim reakcijama (Riaz, 2014; Boyles et al, 2016) i ima važnu ulogu u procesu metilacije (Bajic et al, 2022). Folat deluje kao koenzim za reakcije transmetilacije, sintezu nukleinskih kiselina, metabolizam Hcy i regeneraciju tetra-hidrobiopterina (BH4) koji je esencijalni kofaktor za NOS (Verhaar, 1998; Djuric et al, 2018; Mutavdžin and Djuric, 2020). Kao koenzim učestvuje u brojnim reakcijama prenosa monokarbonskih grupa, uključujući metilaciju Hcy da bi se formirao metionin, metabolizam serina, glicina i histidina, sintezu purina, formiranje deoksitimidilata iz deoksiuridilata, i sintezu metilkobalamina (Morgan and Baggott, 2006; Bayes et al, 2019). Dakle, nedostatak folata može dovesti do oštećenja kako u sintezi DNK tako i u ciklusu metilacije (Nazki et al, 2014). Važnost folata se ogleda u jednoj od njegovih glavnih funkcija, a to je sinteza nukleotida, sinteza i reparacija DNK i proizvodnja metionina metilacijom Hcy. Dobijeni metionin se zatim pretvara u S-adenozilmetionin ili se može koristiti u sintezi proteina (Chan et al, 2013).

Smatra se da folna kiselina ima mnogo važnih pozitivnih efekata, kao što je smanjenje oksidativnog stresa, poboljšanje funkcije endotela i sprečavanje apoptoze smanjenjem nivoa Hcy u plazmi (Peluso, 2006; Hou et al, 2018). Pokazano je da folna kiselina povećava koronarni protok, povećava oticanje nitrita i smanjuje proizvodnju superoksidnog anjona, ali povećava indeks peroksidacije lipida u izolovanom srcu pacova. N(gama)-nitro-L-arginin metil estar (L-NAME)

poništava efekte folne kiseline, što ukazuje na učešće azot monoksida u mehanizmu efekata folne kiseline (Djuric et al, 2007).

Adekvatna bioraspoloživost folata može doprineti obnavljanju bioraspoloživosti BH4 pomoću nekoliko mehanizama. 5-metil tetrahidrofolat može povećati efikasnost BH4 u dimerizaciji eNOS, što se može pripisati poboljšanom redoks stanju i/ili poboljšanom afinitetu vezivanja BH4 za eNOS (Kaufman, 1991; Antoniadis et al, 2006). 5-metil tetrahidrofolat takođe može povećati *in vivo* proizvodnju BH4 iz dihidrobiopterina (BH2) povećanjem aktivnosti dihidrofolat reduktaze u putu reciklaže biopterina (Crabtree and Channon, 2011; Chalupsky et al, 2015).

1.6.2. Folna kiselina i oksidativni stres

Postoje dokazi da folna kiselina ispoljava i direktne i indirektne antioksidativne efekte, kao što je uklanjanje slobodnih radikala (Joshi et al, 2001), zaštita od oksidativne modifikacije lipoproteina niske gustine (Nakano et al, 2001), i poboljšanje ćelijske antioksidativne odbrane (Durand et al, 1996; Henning et al, 1997). Antioksidativna aktivnost folne kiseline je posredovana višestrukim mehanizmima, uključujući smanjenje koncentracije Hcy u plazmi, što može povećati ukupni antioksidativni kapacitet i smanjiti formiranje ROS (Bahmani et al, 2014). 5-metil tetrahidrofolat smanjuje nivo superoksid radikala proizvedenih rekombinantnim eNOS i ksantin oksidazom *in vitro* (Verhaar et al, 1998) i ukida proizvodnju superoksidnih radikala izazvanu Hcy u kulturama endotelnih ćelija svinja (Doshi et al, 2001). Jedna meta-analiza sugerise da suplementacija folnom kiselinom može značajno poboljšati antioksidativni odbrambeni sistem što se manifestuje povećanjem serumske koncentracije GSH i ukupnog antioksidativnog kapaciteta i smanjenjem serumske koncentracije MDA (Asbaghi et al, 2021a).

1.6.3. Nedostatak folne kiseline i različita oboljenja

Prema definiciji Svetske zdravstvene organizacije, nedostatak folata se zasniva na nivoima Hcy i za serumski folat iznosi < 10 nmol/l, a za folat u eritrocitima < 340 nmol/l (World Health Organization, 2015). Nivoi folata u serumu su pod velikim uticajem ishrane i metabolizma folata. Merenje koncentracije folata u eritrocitima je dobar pokazatelj dugoročnog statusa folata i pokazalo se da dobro korelira sa zalihama folata u tkivima (Malaguarnera et al, 2015; Kim et al, 2001).

Nedostatak folata je povezan sa kliničkim abnormalnostima, kao što su makrocitna anemija, kardiovaskularne bolesti, karcinogeneza, kao i kognitivni pad i defekti neuralne cevi tokom gestacije (Lucock, 2000; Ramos et al, 2005; Zou et al, 2020). Dodatak folata tokom trudnoće dramatično smanjuje rizik od defekta neuralne cevi fetusa i to je razlog da mnoge zemlje, uključujući SAD i Kanadu, obogaćuju hleb, žitarice, brašno i proizvode od žitarica folatima (Parker, 2014), a evropske zemlje preporučuju suplementaciju folnom kiselinom pre začeća i tokom prva tri meseca trudnoće (Khan and Jialal, 2019). Podaci iz literature pokazuju da je veća doza folne kiseline povezana sa većim smanjenjem slučajeva defekta neuralne cevi. Na primer, u Velikoj Britaniji unos folne kiseline od 200 $\mu\text{g}/\text{dan}$ smanjio je rizik od defekta neuralne cevi za 23 %, dok je unos od od 400 $\mu\text{g}/\text{dan}$ smanjilo rizik za 36 % (Wald et al, 2002). Niska bioraspoloživost folata je povezana sa povećanim rizikom od spontanog pobačaja i mrtvorodenosti (Gaskins et al, 2014). Prospektivna studija koja je pratila trudne adolescentkinje u Velikoj Britaniji otkrila je da je loš status folata povezan sa povećanom prevalencom rođenja dece sa malom telesom masom za gestacionu dob (Baker et al, 2009). Sistematski pregledi i meta-analize pokazuju da postoji pozitivna veza između koncentracije folata u eritrocitima i mase beba na rođenju (Van Uiter and Steegers-Theunissen, 2013; Hodgetts et al, 2015). Nizak nivo folata kod trudnih tinejdžerki je povezan

sa poremećenim prometom ćelija trofoblasta placente i transportom aminokiselina, što pokazuje da nizak nivo folata ograničava rast placente i smanjuje transport hranljivih materija do fetusa (Baker et al, 2017).

Eritroblasti zahtevaju folat i vitamin B12 za diferencijaciju i proliferaciju. Nedostatak ovih vitamina inhibira sintezu purina i timidilata, ometa sintezu DNK i uzrokuje apoptozu eritroblasta, što dovodi do anemije zbog neefikasne eritropoeze (Koury and Ponka 2004).

Nedostatak folata je povezan sa hiperhomocisteinemijom (Valdés-Ramos et al, 2015). Učešće folne kiseline u patogenezi T2DM povezano je sa nedostatkom vitamina B12 i posledičnom hiperhomocisteinemijom. Iako nedostatak folne kiseline nije široko rasprostranjen, suplementacija folnom kiselinom je testirana kod ljudi sa DM. Studija slučaja i kontrola pokazala je da je nizak unos folata i vitamina B12 kod pacijenata sa T2DM praćen hiperhomocisteinemijom (Sasaki et al, 2012). Osobe sa T2DM koje su primale tretman folnom kiselinom pokazale su smanjeno oštećenje DNK izraženo kao značajno smanjenje mikronukleusa i smanjen oksidativni stres u poređenju sa osobama sa T2DM bez tretmana folnom kiselinom (Lazalde-Ramos et al, 2012). Štaviše, suplementacija folatom poboljšava kontrolu glikemije. Smanjuje koncentraciju HbA1c, glukoze u krvi našte, insulina u serumu, insulinsku rezistenciju i Hcy kod pacijenata sa T2DM (Gargari et al, 2011). Folna kiselina, piridoksin i vitamin B12 imaju pozitivne efekte na znakove i simptome dijabetičke retinopatije (Smolek et al, 2013). Primena metformina može izazvati nedostatak folata. Primena folne kiseline tokom 8 nedelja kod pacijenata sa T2DM koji su primali terapiju metforminom dovela je do poboljšanja nivoa Hcy, ukupnog antioksidativnog kapaciteta i koncentracije MDA (Aghamohammadi et al, 2011). Suplementacija folnom kiselinom smanjila je koncentraciju Hcy u plazmi i poboljšala kontrolu glikemije, insulinsku rezistenciju i nivo vitamina B12 kod osoba sa T2DM na terapiji metforminom u visokim dozama (Gargari et al, 2011). Pored toga, kod pacijenata sa metaboličkim sindromom, suplementacija folatom smanjuje insulinsku rezistenciju i poboljšava endotelnu disfunkciju (Setola et al, 2004). Prema nekoliko malih randomizovanih kontrolisanih studija, suplementacija folnom kiselinom ima moguće prednosti za smanjenje insulinske rezistencije (Cagnacci et al, 2015; Kurt et al, 2010). S druge strane, neke prethodne studije nisu pokazale nikakvu korist primene folne kiseline kod pacijenata sa T2DM. Na primer, jedna studija je pokazala povećanje koncentracije glukoze izazvano kratkotrajnom dodatkom folne kiseline u malim dozama (Chmurzynska et al, 2013). Pokazano je i da suplementacija folnom kiselinom može značajno smanjiti serumske koncentracije Hcy, međutim nije dovela do značajnih promena u lipidnom i glikemijskom profilu kod osoba sa T2DM (Mangoni et al, 2005). U meta-analizi koja je pratila uticaj folne kiseline na markere za kontrolu glikemije kod odraslih pokazano je da je primena folne kiseline značajno smanjila vrednosti glikemije našte kako kod osoba sa DM, tako i kod nedijabetičara. Poboljšanje glikemije bilo očiglednije nakon većih doza folne kiseline. Takođe, značajno su smanjeni nivo insulina i HOMA-IR, bez ikakvih značajnih promena u koncentraciji HbA1c (Asbaghi et al, 2021b). Pri primeni folne kiseline kod pacova sa DM u dozama 0,4 mg/kg/dan i 1,2 mg/kg/dan pokazano je dozno-zavisno smanjenje apoptoze kardiomiocita, kao i povećanje nivoa antiapoptotičnog proteina Bcl-2 i smanjenje nivoa proapoptotičnih proteina Bax i Fas (Wu et al, 2008). Pokazano je da je nivo folne kiseline bio niži u grupi osoba sa T2DM sa ili bez retinopatije u poređenju sa zdravim ispitanicima (Satyanarayana et al, 2011).

Pokazano je da se nedostatak folne kiseline javlja kod vaskularnih poremećaja, kao i kod urođenih srčanih oboljenja (Shah and Dhalla, 2021). Studije su pokazale da suplementacija folnom kiselinom poboljšava funkciju endotela u perifernoj cirkulaciji (Chambers, 2000; Stanhewicz and Kenney, 2017). Prijavljeno je da i folna kiselina i vitamin B12 odlažu rani početak bolesti koronarnih arterija smanjenjem nivoa Hcy u plazmi (Pancharuniti et al, 1994). Štaviše, folna kiselina i vitamini antioksidansi smanjuju rizik od endotelne disfunkcije kod pacijenata sa koronarnom bolešću (Title et al, 2000; Long et al, 2020). Predloženo je da efekat folata na snižavanje Hcy ima pozitivna dejstva na kardiovaskularni sistem

(Debrececi and Debrececi, 2012; Debrececi and Debrececi, 2014; Mao et al, 2016). Takođe, pokazano je i da folna kiselina dovodi do povećanja koronarne vazodilatacije i blagog sniženja arterijskog pritiska kod obolelih od koronarne bolesti nezavisno od njenog dejstva na sniženje Hcy (Tawakol et al, 2005). U drugoj studiji na izolovanom srcu pacova utvrđeno je da perfundovanje srca folnom kiselinom (100 μ M) značajno povećalo protok kroz koronarne arterije, smanjilo produkciju superoksidnog anjona i dovelo do povećanja indeksa lipidne peroksidacije (Djuric et al, 2007). Nedavne studije, međutim, sugerišu da se uloga folata u poboljšanju vaskularnog zdravlja odigrava putem aktivacije NOS i povećanja sinteze azot monoksida i da ne zavisi od efekta na snižavanje koncentracije Hcy (Pullin et al, 2001; Antoniadis et al, 2009; Chalupsky et al, 2015; Stanhewicz et al, 2015). Slično tome, visoke doze folne kiseline mogu sprečiti disfunkciju NOS izazvanu tolerancijom na nitroglicerol i nitrate (Gori et al, 2001). Pretpostavljeni mehanizmi pomoću kojih suplementacija folnom kiselinom može ublažiti disfunkciju vaskularnog endotela i podstaći sintezu azot monoksida verovatno su posredovani 5-metil tetrahidrofolatom, primarnim cirkulišućim metabolitom folne kiseline (Antoniades et al, 2006; Cagnacci et al, 2015). To uključuje povećanje biodostupnosti esencijalnog NOS kofaktora ili BH4 kroz stabilizaciju BH4 i/ili reciklažu iz BH2, direktnu interakciju sa NOS i direktno uklanjanje reaktivnih vrsta kiseonika, posebno superoksidnih radikala (Stanhewicz and Kenney, 2017). BH4 služi kao esencijalni kofaktor za enzime monoksigenaze koji zahtevaju pteridin i stoga igra ključnu ulogu u dimerizaciji NOS i proizvodnji azot monoksida (Raman et al, 1998). Smanjena bioraspodivnost BH4 doprinosi endotelnoj disfunkciji i studije na ljudima pokazuju da primena egzogenog BH4 poboljšava funkcije krvnih sudova u populacijama koje imaju oštećenje endotela (Stanhewicz and Kenney, 2017). Povišeni oksidativni stres može da smanji dostupnost BH4 direktnom oksidacijom postojećeg BH4 u BH2 i/ili smanjenjem sinteze BH4 (Vásquez-Vivar et al, 1998).

Jednokratna primena folne kiseline značajno smanjuje aktivnost acetilholin esteraze u homogenatima tkiva mozga i srca pacova u poređenju sa kontrolnom grupom (Petrovic et al, 2009). Pored pozitivnih dejstava na kardiovaskularni sistem, folna kiselina primenjena subhronično (tokom 15 dana) u dozama 5 mg/kg i 10 mg/kg pokazuje i antiepileptogeno dejstvo na Hcy tiolakton indukovanu epilepsiju (Rasic-Markovic et al, 2016). Jedan od nedostataka folne kiseline je što u velikim dozama izaziva akutnu bubrežnu insuficijenciju. Kod pacova, folna kiselina u velikim dozama (250 mg/kg) dovodi do pojave kristala folne kiseline u tubulima bubrega i posledične akutne nekroze tubula koja se karakteriše i proliferacijom tubulskih ćelija infiltracijom inflamatornih ćelija i fibrozom u hroničnoj fazi, što odgovara slici bubrežnog oštećenja kod ljudi (Jin et al, 2009). Stoga, da bi se izbegla oštećenja bubrega, prilikom tretmana folnom kiselinom treba voditi računa o primenjenoj dozi.

1.7. Animalni modeli dijabetes melitusa tipa 1

Glavna karakteristika T1DM je autoimunska uništavanje β ćelija pankreasa, što dovodi do nedostatka proizvodnje insulina. Na animalnim modelima, ovaj nedostatak u proizvodnji insulina postiže se različitim mehanizmima. Stoga se animalni modeli T1DM mogu klasifikovati na hemijski indukovane, spontane autoimunske, genetski indukovane, izazvane virusima i hirurški indukovane (King, 2012; Kleinert et al, 2018).

1.7.1. Hemijski indukovani modeli dijabetes melitusa tipa 1

U hemijski indukovanim modelima T1DM, visok procenat endogenih β ćelija je uništen, što smanjuje proizvodnju endogenog insulina, i dovodi do hiperglikemije i gubitka telesne mase. Ovaj način indukcije DM predstavlja jednostavan i ekonomičan model koji se može primeniti ne samo kod glodara

već i kod većih životinja (Dufrane et al, 2006). Dijabetes se obično indukuje 5-7 dana pre početka eksperimenta kako bi se osigurala stabilna hiperglikemija. Dva glavna jedinjenja koja se koriste za izazivanje dijabetesa su STZ i aloksan. Oba leka su citotoksični analozi glukoze koji se zbog svog visokog afiniteta za GLUT2 transporter, prvenstveno vezuju za β ćelije (Kleinert et al, 2018). Glukoza se može takmičiti sa aloksanom i STZ za vezivanje za receptor, pa su stoga životinje natašte podložnije razvoju DM. I aloksan i STZ su relativno nestabilni, pa je idealno da se rastvori naprave neposredno pre injekcije (King, 2012). Pošto je STZ stabilniji i manje toksičan od aloksana njegova primena se češće preporučuje (Kleinert et al, 2018).

STZ (2-deoksi-2 [(metilnitrozamin)karbonil]amino)-D-glukopiranoza) je antibiotik, derivat nitrozouree i antineoplastični lek. Proizvodi ga *Streptomyces achromogenes* i zbog svojih alkilirajućih svojstava izaziva alkilaciju i samim tim fragmentaciju DNK, modifikuje biološke makromolekule i konačno dovodi do nekroze β ćelija, izazivajući insulin zavisni DM. Međutim, iako STZ i aloksan modeli rezultiraju hiperglikemijom i insulinopenijom, ovi modeli nemaju izražene autoimunske karakteristike (Chatzigeorgiou et al, 2009; Lenzen, 2008). STZ se obično primenjuje kao pojedinačna injekcija u visokoj dozi ili kao više injekcija u niskim dozama. Pojedinačna visoka doza koja se primenjuje kod miševa iznosi 100 do 200 mg/kg telesne mase (Srinivasan and Ramarao, 2007; Dekel et al, 2009), a kod pacova 35–65 mg/kg telesne mase (Srinivasan and Ramarao, 2007). STZ se može primenjivati u više niskih doza tokom 5 dana da bi se indukovao insulitis kod miševa (Like and Rossini, 1976; Wang and Gleichmann, 1998) ili pacova (Lukic et al, 1998). Doze se kreću od 20 do 40 mg/kg telesne mase dnevno, u zavisnosti od vrste i soja (King, 2012).

Aloksan (2,4,5,6-tetraoksipirimidin) na dva različita načina dovodi do nastanka insulin zavisnog DM, tako što selektivno inhibira glukozom indukovanu sekreciju insulina i indukuje formiranje ROS. Inhibicija glukozom indukovane sekrecije insulina se postiže specifičnom inhibicijom glukokinaze, glukoznog senzora β ćelija, dok sposobnošću da indukuje formiranje ROS, aloksan dovodi do selektivne nekroze β ćelija (Lenzen, 2008). Doze kod miševa se kreću od 50 do 200 mg/kg telesne mase, a kod pacova od 40 do 200 mg/kg telesne mase, u zavisnosti od soja i načina primene. Ukoliko se aloksan primenjuje i.p. i s.c. potrebna je do tri puta veća doza nego kada se primenjuje intravenski (Szkudelski, 2001). Za indukovanje DM kod zečeva korišćena je doza od 100 mg/kg telesne mase (Wang et al, 2010). Aloksan ima usku dijabetogenu dozu, pa čak i blago predoziranje može izazvati opštu toksičnost, a posebno nefrotoksičnost (Szkudelski, 2001).

Hemijski indukovani model DM je odgovarajući model za testiranje lekova kojima je glavni mehanizam delovanja snižavanje nivoa glukoze u krvi na način nezavisan od β ćelija; na primer za testiranje novih formulacija insulina (Jederstrom et al, 2005; Sheshala et al, 2009), kao i za testiranje transplantacionih terapija (Jansson et al, 1995; Makhlof et al, 2003; Deeds et al, 2011)

Jedan od nedostataka ovog modela DM je to što hemijske supstance koje se koriste mogu biti toksične i za druge organe. Takođe treba napomenuti da su promene u izozimima P450 u jetri, bubrezima, plućima, crevima, testisima i mozgu prijavljene nakon primene STZ ili aloksana, pa to treba uzeti u obzir kada se lekovi testiraju na ovim modelima (Lee et al, 2010).

Pošto i STZ i aloksan mogu da dovedu do uništenja svih β ćelija, istraživači su prvobitno koristili ove lekove da izazovu stabilan model T1DM, međutim pokazano je da primenjeni u malim dozama izazivaju samo delimičan gubitak β ćelija, što više podseća na T2DM. Da bi se izazvao T2DM, odnosno da bi se prešlo iz stanja predijabetičke rezistencije na insulin u očigledan T2DM, najčešće se preporučuje kombinovanje dijeta sa visokim sadržajem masti i naknadne injekcije STZ u maloj dozi (~30 – 40 mg/kg i.p.) (Skovso, 2014).

1.7.2. Spontani autoimunski modeli dijabetes melitusa tipa 1

Najčešće korišćeni autoimunski modeli T1DM su NOD miševi koji spontano razvijaju DM, a ne razvijaju gojaznost (*engl. non-obese diabetic*) i BB pacovi (*engl. Biobreeding*) (Yang and Santamaria, 2006). Pored toga, 2001. godine opisan je model T1DM na pacovu LEW.1AR1/Ztm-iddm (Lenzen et al, 2001).

NOD miševima karakteriše razvoj insulitisa u periodu od oko 3-4. nedelje starosti. U ovoj predijabetičkoj fazi, ostrvca pankreasa su infiltrirana pretežno CD4⁺ i CD8⁺ limfocitima, iako su prisutni i B limfociti i NK ćelije (Yoon and Jun, 2001). Insulitis izaziva uništavanje β ćelija, ali DM se javlja tek kada se izgubi 90 % sekrecije insulina. To se najčešće dešava oko 10-14. nedelje, a nekad dijabetes nastaje tek oko 30. nedelje starosti (King, 2012).

BB pacovi su najčešće proučavani model autoimunskog T1DM na pacovima. Ovi pacovi potiču iz kanadske kolonije pacova soja *Wistar* kod kojih se 1970-ih dogodila spontana hiperglikemija i ketoacidoza. Pogođene životinje su bile osnivači dve kolonije koje su kasnije korišćene za osnivanje svih ostalih kolonija BB pacova (Mordes et al, 2004). Većina, oko 90 % BB pacova obično razvije DM između 8. i 16. nedelje starosti i imaju sličnu incidenciju kod mužjaka i ženki. Fenotip dijabetesa je prilično težak, a pacovima je potrebna insulinska terapija za preživljavanje. Iako životinje imaju insulitis sa prisustvom T ćelija, B ćelija, makrofaga i NK ćelija, životinje su limfopenične sa ozbiljnim smanjenjem CD4⁺ T ćelija i skoro odsustvom CD8⁺ T ćelija (King, 2012).

Model T1DM na pacovu LEW.1AR1/Ztm-iddm nastao je spontano u koloniji *Lewis* pacova sa definisanim MHC haplotipom (LEW.1AR1). Kod ovih pacova prvo je javlja insulitis, a DM se razvija oko 8-9. nedelje starosti (King, 2012). Prvobitno je incidencija dijabetesa bila približno 20 % (Lenzen et al, 2001); međutim, daljim inbridingom pacova sa DM, incidencija se povećala na oko 60 %, bez postojanja razlika u incidenci između polova (Jorns et al, 2005).

1.7.3. Genetski indukovani modeli dijabetes melitusa tipa 1

Ins2^{Akita} miševi predstavljaju genetski indukovani model T1DM. Oni se karakterišu spontanom autozomno dominantnom mutacijom na hromozomu 7 koja je prvi put otkrivena u koloniji C57BL/6N miševa u Akiti, Japan (Yoshioka et al, 1997). Ova mutacija dovodi do promena u savijanju proteina, što dovodi do stresa endoplazmatskog retikuluma i apoptoze β ćelija pankreasa. Zbog visokog ranog mortaliteta kod homozigotnih mutanata, mutacija se najčešće proučava kod heterozigota. Pokazano je da je DM jače izražen i da je gubitak β ćelija veći kod heterozigotnih mužjaka nego kod ženki. Kako mutirani miševi stare, masa β ćelija se smanjuje istovremeno sa smanjenim sadržajem insulina u plazmi i pankreasu (Leiter and Schile, 2013).

1.7.4. Virusima izazvani modeli dijabetes melitusa tipa 1

Zbog posebnih uslova potrebnih za rad sa patogenim virusima i dostupnosti brojnih nevirusnih modela T1DM, modeli dijabetesa izazvanog virusima nisu često korišćeni (Leiter and Schile, 2013). Postoji nekoliko modela T1DM koji koriste viruse da iniciraju uništavanje β ćelija koje može nastati ili usled direktne infekcije β ćelije ili usled iniciranja autoimunskog odgovora na β ćelije (Jun and Yoon, 2003). Virusi koji se koriste za izazivanje dijabetesa na životinjskim modelima uključuju koksaki B virus, virus encefalomiokarditisa i virus Kilham pacova (King, 2012).

1.7.5. Hirurški indukovani modeli dijabetes melitusa tipa 1

Oštećenje pankreasa može se postići hirurškim uklanjanjem delova ili celog pankreasa (pankreatektomija) kako bi se smanjila ili potpuno prekinula proizvodnja endogenog insulina (Bonner-Weir et al, 1983). Ovaj model se uglavnom može koristiti na većim životinjama kao što su svinje, psi i primati (King, 2012). Prednost ove metode je nedostatak toksičnih neželjenih efekata na drugim organima u poređenju sa primenom dijabetogenih lekova. S obzirom na to da je potrebna specijalizovana obuka i hirurška oprema za izvođenje pankreatektomije, kao i da postoje efekti gubitka egzokrinih digestivnih enzima pankreasa i drugih endokrinih hormona ostrvaca, pankreatektomija se ne primenjuje često (Kleinert et al, 2018). Međutim, pankreatektomija kod svinja praćena autotransplantacijom izolovanih ostrvaca (Emamallee et al, 2009) predstavlja prilično precizan model autotransplantacije ostrvaca kod ljudi (Matsumoto, 2011).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su bili da se:

- 1) U grupi zdravih eksperimentalnih životinja (kontrolna grupa) i u grupi životinja tretiranih STZ (DM grupa) ispita nivo glukoze i insulina u serumu i izračuna homeostazni model za procenu insulinske rezistencije (HOMA-IR) radi potvrde animalnog modela DM, kao i da se ispituju strukturne karakteristike srca (određivanjem histomorfoloških promena u srcu – debljina zida leve komore (LK), zida desne komore (DK), i interventrikularnog septuma (IVS), i transferzalni prečnik kardiomiocita (KM) na nivou jedra u zidu LK), aorte (debljina intime medije, broj elastičnih lamina i prosečno rastojanje između elastičnih lamina) i pankreasa (broj Langerhansovih ostrvaca po mm² površine tkiva pankreasa, dijametar i površina Langerhansovih ostrvaca, broj ćelija u Langerhansovim ostrvcima i broj ćelija po mm² površine Langerhansovih ostrvaca); kao i da se imunohistohemijskim bojenjem tkiva pankreasa na insulin potvrdi eksperimentalni model DM.
- 2) Ispita uticaj DM i primene piridoksina i folne kiseline, pojedinačno i udruženo, kako kod zdravih, tako i kod pacova sa DM na koncentraciju glukoze, homocisteina (Hcy), uree, kreatinina, ukupnih proteina i albumina, parametare lipidnog profila [ukupni holesterol (TC), holesterol lipoproteina niske gustine (LDL-C), holesterol lipoproteina visoke gustine (HDL-C), trigliceridi (TG), aterosklerotski indeks (AI) i aterogenetski indeks seruma (AIS)], aktivnosti aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT), α -amilaze (α -AMY), alkalne fosfataze (ALP) i laktat dehidrogenaze (LDH), koncentraciju srčanog troponina T (hs cTnT), fibrinogena i aktivnost fon Vilebrandovog faktora (*von Willebrand factor* – vWF).
- 3) Ispita uticaj DM i primene piridoksina i folne kiseline, pojedinačno i udruženo, kako kod zdravih, tako i kod pacova sa DM na parametre oksidativnog stresa u tkivu srca pacova (enzimi: CAT i SOD, i indeks lipidne peroksidacije – koncentracija MDA).
- 4) Ispita uticaj DM i primene piridoksina i folne kiseline, pojedinačno i udruženo, kako kod zdravih, tako i kod pacova sa DM na aktivnosti LDH i malat dehidrogenaze (MDH) i distribuciju i relativne aktivnosti njihovih izoformi u tkivu srca pacova.
- 5) Ispita uticaj DM i primene piridoksina i folne kiseline, pojedinačno i udruženo, kako kod zdravih, tako i kod pacova sa DM na remodelovanje srčanog tkiva procenom relativnih aktivnosti MMP-2 i MMP-9 u tkivu srca pacova.
- 6) Ispita uticaj DM i primene piridoksina i folne kiseline, pojedinačno i udruženo, kako kod zdravih, tako i kod pacova sa DM na strukturne karakteristike srca određivanjem histomorfoloških promena u srcu (debljina zida LK i DK, i debljina IVS, kao i transferzalni prečnik KM na nivou jedra u zidu LK), i na imunohistohemijsku ekspresiju pokazatelja proliferativne aktivnosti [Ki-67 i PCNA (nuklearni antigen za proliferaciju ćelija – eng. *proliferating cell nuclear antigen*)] i apoptotske aktivnosti (BCL-2 i BCL-6) u KM.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

U eksperimentima su korišćeni mužjaci pacova soja Wistar albino. Eksperimentalne životinje su nabavljene iz akreditovanog Vivarijuma Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Na početku eksperimenta bile su starosti 25-30 dana i telesne mase oko 160 g. Pacovi su čuvani u parovima u pleksiglas-transparentnim kavezima pod konstantnim ambijentalnim uslovima (temperatura 21 ± 2 °C; vlažnost vazduha 55 ± 5 %; ciklus svetlo-tama na 12 h sa početkom svetlog perioda u 07:30 h). Dno kaveza je bilo obloženo šuškom, a hrana i voda su bili dostupni *ad libitum*. Period adaptacije je trajao 5 dana. Istraživanje je odobrila Etička komisija za dobrobit eksperimentalnih životinja, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, Uprava za veterinu, Republika Srbija (rešenje broj: 323-07-01339/2017-05/04). Svi eksperimentalni postupci izvedeni su u skladu sa propisanim zakonom (EU direktiva za zaštitu kičmenjaka koji se koriste u eksperimentalne i druge naučne svrhe 86/609/EES) i etičkim principima.

3.2. Eksperimentalne grupe

Sve eksperimentalne životinje (ukupno 78) podeljene su u 9 grupa (sa 8 ili 10 životinja u svakoj pojedinačnoj grupi).

1. grupa (C1, n = 8) je predstavljala kontrolnu grupu koja je dobila samo jednokratni tretman fiziološkim rastvorom (0,9 % NaCl, 1 ml/kg telesne mase, i.p.).
2. grupa (C2, n = 10) je, takođe, predstavljala kontrolnu grupu koja je dobila fiziološki rastvor svakodnevno tokom 28 dana (0,9 % NaCl, 1 ml/kg telesne mase, i.p.). Grupa C2 je uvedena da bi se ispitalo da li svakodnevne i.p. injekcije koje se primenjuju u ovoj grupi mogu uticati na testirane parametre.
3. grupa (DM, n = 8) je bila grupa eksperimentalnih životinja sa indukovanim DM primenom jedne doze streptozotocina (STZ, 100 mg/kg telesne mase u fiziološkom rastvoru, i.p.).
4. grupa (P, n = 8) bila je grupa zdravih eksperimentalnih životinja tretiranih piridoksinom (7 mg/kg telesne mase u fiziološkom rastvoru, i.p.) tokom 28 uzastopnih dana.
5. grupa (DM+P, n = 8) je bila grupa eksperimentalnih životinja sa indukovanim DM, i tretmanom piridoksinom. U ovoj grupi eksperimentalne životinje su prvo bile tretirane STZ (100 mg/kg telesne mase u fiziološkom rastvoru, i.p., u jednoj dozi), a od četvrtog dana nakon tretmana STZ, tokom sledećih 28 uzastopnih dana, imale su tretman piridoksinom (7 mg/kg telesne mase u fiziološkom rastvoru, i.p.).
6. grupa (FA, n = 10) bila je grupa zdravih eksperimentalnih životinja tretiranih folnom kiselinom (5 mg/kg telesne mase u fiziološkom rastvoru, i.p.) tokom 28 uzastopnih dana.
7. grupa (DM+FA, n = 10) je bila grupa eksperimentalnih životinja sa indukovanim DM, i tretmanom folnom kiselinom. U ovoj grupi eksperimentalne životinje su prvo bile tretirane STZ (100 mg/kg telesne mase u fiziološkom rastvoru, i.p., u jednoj dozi), a od četvrtog dana nakon tretmana STZ, tokom sledećih 28 uzastopnih dana, imale su tretman folnom kiselinom (5 mg/kg telesne mase u fiziološkom rastvoru, i.p.).
8. grupa (P+FA, n = 8) bila je grupa zdravih eksperimentalnih životinja tretiranih piridoksinom (7 mg/kg telesne mase u fiziološkom rastvoru, i.p.) i folnom kiselinom (5 mg/kg telesne mase u fiziološkom rastvoru, i.p.) tokom 28 uzastopnih dana
9. grupa (DM+P+FA, n = 8) bila je grupa eksperimentalnih životinja sa indukovanim DM, i tretmanom piridoksinom i folnom kiselinom. U ovoj grupi eksperimentalne životinje su prvo

bile tretirane STZ (100 mg/kg telesne mase u fiziološkom rastvoru, i.p., u jednoj dozi), a od četvrtog dana nakon tretmana STZ, tokom sledećih 28 uzastopnih dana, imale su tretman piridoksinom (7 mg/kg telesne mase u fiziološkom rastvoru, i.p.) i folnom kiselinom (5 mg/kg telesne mase u fiziološkom rastvoru, i.p.).

Osnovne potrebe pacova za folnom kiselinom podrazumevaju unos od 2 mg/kg folne kiseline (National Research Council Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, 1995). Ako ishrana sadrži 8 mg/kg folne kiseline, ona obezbeđuje umerenu suplementaciju folnom kiselinom i odgovara unosu od 1-6 mg/dan folne kiseline kod ljudi. Ove doze odgovaraju preporučenim dozama koje se mogu konzumirati kod ljudi (Partearroyo et al, 2016). Prema ovim preporukama i našem dosadašnjem iskustvu, koristili smo dozu od 5 mg/kg dnevno folne kiseline. Za pacove preporučeni dnevni unos vitamina B6 je 6 do 7 mg/kg (Reeves et al, 1993; National Research Council Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, 1995, Suidasari et al, 2017). Međutim, pokazano je da je unos od 1 mg/kg minimalni nivo vitamina B6 neophodan da se spreči depresija rasta izazvana nedostatkom vitamina B6 (Coburn, 1994). U našoj studiji cilj je bio ispitati da li, pored unosa vitamina B6 standardnom hranom, dopunska primena piridoksina u dnevnoj preporučenoj dozi (7 mg/kg) može imati pozitivne efekte kako kod zdravih tako i kod pacova sa DM.

3.3. Indukcija dijabetes melitusa tipa 1 kod pacova

DM je kod eksperimentalnih životinja indukovano i.p. injekcijom sveže pripremljenog STZ (100 mg/kg telesne mase) (Abd Allah and Gomaa, 2015), rastvorenog u fiziološkom rastvoru (0,9 % NaCl, 1 ml/kg telesne mase) (Dias et al, 2010; Mochizuki et al, 2010; Ahmadi et al, 2013; Alikhani et al, 2015; Darbandi et al, 2018). Češće se za rastvaranje STZ koristi citratni pufer nego fiziološki rastvor (Wu et al, 2008; Shanmugam et al, 2009; Diao et al, 2014; Daniel et al, 2018; Gimenes et al, 2018). Međutim, da bi se izbegao efekat citratnog pufera na ispitivane parametre, u ovom istraživanju je za rastvaranje STZ korišćen fiziološki rastvor, ali je zbog toga primenjena veća doza STZ. Odgovarajuća doza STZ prethodno je određena na osnovu odnosa doza-odgovor pri primeni različitih doza STZ (od 40 do 150 mg/kg) i nivoa glukoze u krvi. 72 h nakon primene STZ, DM je potvrđen merenjem nivoa glukoze u krvi kod životinja koje tokom prethodnih 8 sati nisu uzimale hranu. Vrednosti glukoze veće od 12,2 mmol/l smatrane su pozitivnim za DM (Gimenes et al, 2018).

3.4. Varijable koje se mere u studiji

Sve životinje su bile pod stalnim praćenjem, a telesna masa i nivo glukoze u krvi mereni su na početku, nedeljno i na kraju eksperimentalnog perioda. Posle četiri nedelje tretmana, životinje su eutanazirane giljotinom za pacove i uzeta je krv za analize. Metodom iskrvarenja krv je sakupljena u odgovarajuće vakutajne, sa antikoagulansom (natrijum citrat) za dobijanje plazme ili bez antikoagulansa za dobijanje seruma. Uzorci krvi ostavljeni su na sobnoj temperaturi tokom 15 min, a zatim centrifugirani [15 min na 3000 obrtaja (1000 g)]. Dobijena plazma i serum korišćeni su za analize. Pre žrtvovanja, životinje su gladovale preko noći kako bi se izbegle promene u biohemijskim parametrima u krvi indukovane uzimanjem hrane. Nakon uzimanja krvi, hirurškim putem su izolovani srce, aorta i pankreas pacova. Srca su isprana fiziološkim rastvorom i izmerena je njihova masa. Nakon ovog postupka, za potrebe biohemijskih ispitivanja (merenje aktivnosti enzima u tkivu srca) tkivo srca je homogenizovano i centrifugirano, i nadtalog je zamrznuto do analize. Za histološku analizu tkivo srca,

aorte i pankrasa pacova je odloženo u rastvor formalina. Ovi uzorci su čuvani na sobnoj temperaturi do analize.

3.4.1. Određivanje biohemijskih parametara u serumu i plazmi

Nivo glukoze u krvi dobijene iz repne vene pacova koji tokom prethodnih 8 sati nisu dobijali hranu meren je *Accu-Chek* analizatorom (Roche Diagnostics, Indijanapolis, SAD) jednom nedeljno. Hcy u serumu meren je kompetitivnim imuno-testom primenom direktne hemiluminescentne tehnologije na *ADVIA Centaur XP system*-u (Siemens Healthcare Diagnostics, Njujork, SAD). Glukoza, urea, kreatinin, parametri lipidnog profila (TC, HDL-C, TG), nivo ukupnih proteina, albumina, AST, ALT, ALP, α -AMY i LDH u serumu izmereni su pomoću komercijalnih kompleta za spektrofotometriju (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Njuark, SAD) na automatskom analizatoru (Dimension Xpand, Siemens, SAD). Nivo LDL-C procenjen je primenom jednačine po Friedvaldu. Nivoi mokraćne kiseline u serumu određeni su spektrofotometrijski pomoću komercijalnih kompleta (Siemens Healthcare Diagnostics Ltd., Frimli, Kemberli, Velika Britanija) na automatskom biohemijskom analizatoru (Dimension Xpand, Siemens, SAD). Nivoi hs cTnT mereni su visoko osetljivim testom koristeći Roche Cobas e601 automatizovani analizator (Roche Diagnostics, Manhajm, Nemačka). Koncentracija fibrinogena u citratnoj plazmi određena je modifikovanim Klausovim testom (Siemens Healthineers, Erlangen, Nemačka), a aktivnost vWF u citratnoj plazmi određena je čestično pojačanim testom INNOVANCE® VVF Ac, pomoću BCS XP analizatora (Siemens Healthineers, Erlangen, Nemačka).

Da bi se potvrdio razvoj DM, meren je nivo insulina u serumu i izračunat je HOMA-IR u C1 i DM grupama. Nivo insulina u serumu određen je pomoću automatskog brojača (PerkinElmer GammaVIZARD 1470, Automatic Gamma Counter, Boston, SAD), RIA metodom, koristeći standarde za insulin pacova. Referentna vrednost insulina merena našte bila je 12,06–48,26 mU/l (Tepavčević et al, 2014). Insulinska rezistencija je procenjena pomoću HOMA-IR koji se računa pomoću formule (Matthews et al, 1985):

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{insulin [mU/l]} * \text{glukoza [mU/l]}}{22,5}$$

Takođe, izračunati su AI i AIS kao markeri aterogenosti i povećanog rizika od ishemijske bolesti (Nasri et al, 2018).

$$\text{AI} = \frac{\text{LDL-C [mmol/l]}}{\text{LDL-C [mmol/l]}}$$

$$\text{AIS} = \log \left(\frac{\text{TG [mmol/l]}}{\text{HDL-C [mmol/l]}} \right)$$

3.4.2. Kardiosomatski indeks

Nakon izolovanja srca su isprana fiziološkim rastvorom (0,9 % NaCl) i osušena filter papirom, a nakon toga je izmerena masa srca za računanje kardiosomatskog indeksa (KSI) koji je određen kao odnos mase srca izražen u mg i telesne mase pacova izražen u g (Wang et al, 2018).

3.4.3. Priprema uzoraka tkiva srca

Tkivo srca (100 mg) je tretirano sa 1 ml pufera za liziranje (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 250 mM saharoze; 1 % Triton X-100; uz dodatak inhibitora proteaza: 1mM fenilmetilsulfonil fluorida (PMSF) i 1 µg/ml leupeptina (Rouet-Benzineb et al, 1999) i homogenizovano na ledu korišćenjem električnog homogenizera (Witeg Labortechnik GmbH, Verthajm, Nemačka). Potom je homogenat centrifugiran na 10000 rpm (11200 g) na 4 °C, 10 min. Izdvojeni supernatant (nadtalog) predstavlja ukupni ćelijski lizat koji je zamrznut na -20 °C do vršenja analiza. Na ovaj način su izolovani proteini iz tkiva srca. Ukupna koncentracija proteina merena je metodom po *Bradford*-u (Bradford, 1976).

3.4.4. Određivanje parametara u tkivu srca pacova metodom spektrofotometrije

Svi parametri mereni su korišćenjem spektrofotometra UV-2600 (Shimadzu, Kjoto, Japan).

3.4.4.1. Merenje koncentracije proteina metodom po *Bradford*-u

U 0,2 ml lizata tkiva srca pacova dodato je 1 ml Bradfordovog reagensa (Sigma-Aldrich, Darmštat, Nemačka). Nakon 15 minuta merena je apsorbance na 595 nm. Slepa proba je umesto lizata tkiva sadržala istu zapreminu dejonizovane vode. Sadržaj proteina je određen na osnovu izmerene apsorbance iz standardne krive dobijene na osnovu rastvora goveđeg serumskog albumina čije su koncentracije poznate i pomoću jednačine: $A = a \times c + b$ (A – apsorbance rastvora, c – koncentracija rastvora, a – nagib prave, b – odsečak na y osi) (Bradford, 1976).

3.4.4.2. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima u tkivu srca pacova

3.4.4.2.1. Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost CAT u uzorcima lizata tkiva srca merena je spektrofotometrijski po metodi Beers and Sizer (1952). U reakcionu smešu koja je sadržala 1,0 ml 0,18 % vodenog rastvora H_2O_2 koji je pripremljen rastvaranjem u fosfatnom puferu (0,05 mM, pH 7,0) dodato je 2 ml fosfatnog pufera (0,05 mM, pH 7,0) i 200 µl lizata tkiva srca. Merena je promena apsorbance usled razlaganja H_2O_2 u toku prvog minuta reakcije na $\lambda = 240$ nm. Jedinica enzimske aktivnosti (U) je ona količina enzima koja katalizuje razgradnju 1 µmol H_2O_2 do O_2 i H_2O u minuti, u zadatim uslovima. Specifična aktivnost enzima je izražena kao jedinica enzimske aktivnosti po miligramu proteina homogenata srčanog tkiva (U/mg proteina).

3.4.4.2.2. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnost SOD određena je adrenalinskom metodom, spektrofotometrijski na $\lambda = 480$ nm (Misra and Fridovich, 1972). Ova metoda se zasniva na mogućnosti SOD da inhibira spontanu autooksidaciju

adrenalina u adrenohrom u baznoj sredini (pH 10,2). Reakciona smeša se sastojala od: 1,8 ml Tris-HCl pufera (50 mM, pH 10,2), 0,1 ml adrenalina (0,18 g/L u 0,1 M HCl) i 0,1 ml homogenata srčanog tkiva. Jedna jedinica aktivnosti SOD definisana je kao ona aktivnost koja je izazvala 50 % inhibiciju autooksidacije adrenalina na 26 °C. Specifična aktivnost enzima je izražena kao jedinica enzimske aktivnosti po miligramu proteina homogenata srčanog tkiva (U/mg proteina).

3.4.4.3. Indeks lipidne peroksidacije

Indeks lipidne peroksidacije je određen merenjem koncentracije MDA u homogenatu tkiva srca primenom TBARS metode (Ohkawa et al, 1979; Draper and Hadley, 1990). Homogenatima tkiva srca dodat je 10 % rastvor natrijum dodecil sulfata (SDS) u odnosu 1:1, a potom bojeni reagens koji sadrži tiobarbiturnu kiselinu (7 mM) rastvorenu u 20 % vodenom rastvoru sirćetne kiseline, a kojoj je dodata jednaka zapremina vodenog rastvora NaOH (1 M). Smeša je inkubirana 30 min na 100°C, zatim je reakcija zaustavljena prebacivanjem uzoraka na led. Nakon 10 min inkubacije na ledu uzorci su centrifugirani na 4000 rpm tokom 5 minuta, kako bi se precipitirao talog denaturisanih proteina. Bistri supernatant je prebačen u epruvete, a potom je očitana apsorbance na $\lambda = 532$ nm. Koncentracija MDA u tkivnom homogenatu dobijena je korišćenjem Lamber-Berovog zakona, kao količnik apsorbance i molarnog ekstinkcionog koeficijenta hromogenog proizvoda ($\epsilon = 1,56 * 10^5 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) i izražena u jedinicama $\mu\text{mol MDA po mg proteina tkivnog homogenata}$.

3.4.4.4. Određivanje aktivnosti laktat dehidrogenaze u tkivu srca pacova

Aktivnost LDH određena je u lizatima tkiva srca spektrofotometrijski merenjem smanjenja apsorbance na $\lambda = 340$ nm u toku oksidacije NADH. Inkubaciona smeša je sadržala: 2,90 ml fosfatnog pufera u dejonizovanoj vodi (0,1 M, pH 7,0), 0,1 ml natrijum piruvata u dejonizovanoj vodi (23 mM), 0,05 ml NADH u dejonizovanoj vodi (14 mM) i 0,01 ml lizata tkiva srca. Smanjenje apsorbance na 25 °C praćeno je u prva 2 min reakcije. Jedna jedinica (1 U) LDH aktivnosti katalizuje transformaciju 1 $\mu\text{mol NADH}$ u minuti u uslovima testa (Hollaar and van der Laarse, 1979; Radenkovic et al, 2013). Specifična aktivnost enzima je izražena kao jedinica enzimske aktivnosti po miligramu proteina homogenata srčanog tkiva (U/mg proteina).

3.4.4.5. Određivanje aktivnosti malat dehidrogenaze u tkivu srca pacova

Aktivnost MDH-a određena je spektrofotometrijski metodom koju su postavili Frieden i Fernandez-Sousa (1975), merenjem smanjenja apsorbance na $\lambda = 340$ nm u toku oksidacije NADH. Inkubaciona smeša je sadržala: 2,90 ml fosfatnog pufera u dejonizovanoj vodi (0,1 M, pH 7,5), 0,1 ml oksalacetata (15 mM) u fosfatnom puferu (0,1 M, pH 7,5), 0,05 ml NADH u dejonizovanoj vodi (14 mM) i 0,01 ml lizata tkiva srca. Smanjenje apsorbance na 25 °C praćeno je u prva 2 min reakcije. Jedna jedinica (1 U) MDH aktivnosti katalizuje transformaciju 1 $\mu\text{mol NADH}$ u minuti u uslovima testa. Specifična aktivnost enzima je izražena kao jedinica enzimske aktivnosti po miligramu proteina homogenata srčanog tkiva (U/mg proteina).

3.4.5. Određivanje parametara u tkivu srca pacova metodom elektroforeze

3.4.5.1. Određivanje izoformi laktat dehidrogenaze u tkivu srca pacova

Određivanje LDH izoformi vršeno je metodom direktne elektroforetske zimografije prema Cunningham i sar. (1965). Nativna poliakrilamid gel elektroforeza se izvodila na prethodno pripremljenom 7,5 % nativnom poliakrilamidnom gelu. Na gel je naneto 5 μ l pripremljenog uzorka. Uzorak se priprema tako što se u odnosu 1:1 pomešaju homogenat srčanog tkiva i pufer za tretiranje koji sadrži Tris-Cl (2,5 ml, 0,5 M, pH 6,8), glicerol (2 ml), bromfenol plavo (2 mg) i destilovanu vodu do ukupne zapremine 10 ml. Nakon nanošenja uzoraka na gel, elektroforetsko razdvajanje je vršeno na 4 °C i pri konstantnoj jačini električne struje od 50 mA. Nakon oko 90 min kada su uzorci dospeli do dna gela, elektroforeza je prekinuta. Po završetku elektroforetskog razdvajanja gelovi su ispirani u dejonizovanoj vodi, a zatim inkubirani u rastvoru koji sadrži: Li-laktat (0,2 g), NAD⁺ (0,015 g), fenazin metosulfat (PMS, 0,5 mg) i boju tetrazolijum nitro plavo (eng. *nitro blue tetrasolium*, NBT, 0,01 g) u TRIS-Gly puferu (20 ml, 0,1 M, pH 8,3). Nakon inkubacije od 30 min u odsustvu svetlosti izoenzimi su se pojavili na gelu kao tamno plave trake. Trake nastaju kao rezultat bojenja formazanom koji nastaje nakon redukcije boje NBT u prisustvu prenosioca elektrona PMS na koenzim NAD⁺. Gelovi su čuvani u 0,01 M sirćetnoj kiselini u mraku na 4 °C. Aktivnost pojedinačnih izoenzima je semikvantitativno procenjena u odnosu na ukupnu aktivnost LDH i izražena u procentima (relativna aktivnost).

3.4.5.2. Određivanje izoformi malat dehidrogenaze u tkivu srca pacova

Distribucija MDH izoformi određena je direktnom elektroforetskom zimografijom, prema metodi Yoshimura i sar. (1970). Nativna poliakrilamid gel elektroforeza se izvodila na prethodno pripremljenom 7,5 % nativnom poliakrilamidnom gelu. Na gel je naneto 5 μ l pripremljenog uzorka. Uzorak se priprema tako što se u odnosu 1:1 pomešaju homogenat srčanog tkiva i pufer za tretiranje koji sadrži Tris-Cl (2,5 ml, 0,5 M, pH 6,8), glicerol (2 ml), bromfenol plavo (2 mg) i destilovanu vodu do ukupne zapremine 10 ml. Nakon nanošenja uzoraka na gel, elektroforetsko razdvajanje je vršeno na 4 °C i pri konstantnoj jačini električne struje od 50 mA. Nakon oko 90 min kada su uzorci dospeli do dna gela, elektroforeza je prekinuta. Po završetku elektroforetskog razdvajanja gelovi su ispirani u dejonizovanoj vodi, a zatim inkubirani 10 min u mraku na 37 °C u 20 ml rastvora koji sadrži: fosfatni pufer (10 ml, 0,2 M, pH 7,1) i rastvor natrijum-maleata (10 ml, 0,01 M, pH 6,9) u koji su dodati NAD⁺ (0,015 g), NBT (0,01 g) i PMS (0,5 mg). Nakon inkubiranja u puferu, gelovi su inkubirani još 10 min u dejonizovanoj vodi, u odsustvu svetlosti. Izoenzimi se pojavljuju kao tamno plave trake. Gelovi su čuvani u 0,01 M sirćetnoj kiselini u mraku na 4 °C. Aktivnost pojedinačnih izoenzima je semikvantitativno procenjena u odnosu na ukupnu aktivnost MDH i izražena u procentima (relativna aktivnost).

3.4.5.3. Određivanje aktivnosti matriksnih metaloproteinaza -2 i -9 u uzorku tkiva srca

Prisustvo i enzimska aktivnost MMP-aza u homogenatima tkiva srca pacova određena je metodom zimografije na poliakrilamidnim gelovima u kojima je kopolimerizovan želatin (Vartio and Baumann, 1989; Makowski and Ramsby, 1996; La Rocca et al, 2004; Gopcevic et al, 2017).

Želatin zimografija predstavlja jednostavnu i visoko osetljivu metodu, za detekciju želatinaza (MMP-9 i MMP-2) i procenu njihove aktivnosti u različitim biološkim uzorcima. Metoda se zasniva na sposobnosti želatinaza da razlažu želatin (denaturisani kolagen). U homogenatima tkiva srca razdvajanje proteina vršeno je natrijum-dodecil sulfat poliakrilamidnom elektroforezom (eng. *sodium dodecyl*

sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) u gelu koji je sadržao kopolimerizovan supstrat za proteaze – želatin (0,1 %), po metodi Kleiner i Stetler-Stevenson (1994). Nakon razdvajanja u gelu proteaze su renaturisale i hidrolizovale supstrat u gelu. Prisustvo i aktivnost MMP-aza u uzorku je određivana na osnovu smanjenja intenziteta boje razloženog želatina na mestima aktivnosti MMP (Vartio and Baumann, 1989; Makowski and Ramsby, 1996; La Rocca et al, 2004; Gopcevic et al, 2017). Da bi se pripremili uzorci koji se nanose na gel, homogenati srčanog tkiva u kojima je prethodno određen sadržaj proteina su razblaženi 10 puta u rastvoru saharoze (200 g/L) i inkubirani 40 min na 37 °C. U ovako aktivirane uzorke je dodat pufer za tretiranje uzoraka u odnosu 1:1. Pufer za tretiranje sadrži Tris-HCl (2,5 ml, 0,5 M, pH 6,8), 10 % SDS (4 ml), glicerol (2 ml), bromfenol plavo (2 mg) i destilovanu vodu do ukupne zapremine 10 ml. Pripremljeni uzorci su naneti na gel za elektroforezu (20 µl po bunarčiću). Nakon nanošenja uzoraka na gel, izvedena je elektroforeza na 4 °C i pri konstantnoj jačini električne struje od 50 mA i naponu od 150 V. Kada su uzorci dospeli do dna gela, nakon oko 90 min od početka elektroforeze, elektroforeza je prekinuta. Nakon elektroforetskog razdvajanja proteina gel je ispiran uz mešanje tokom 45 min u rastvoru Triton X-100 (0,25 g/l) da bi se uklonio SDS iz gela. Zatim je gel ispiran dva puta na 4 °C u trajanju od 20 min u dejonzovanoj vodi da bi odstranio Triton X-100. Nakon toga gel je inkubiran uz mešanje tokom 24 h u puferu za enzimski test koji sadrži: glicin (0,1 M), Tris-HCl (50 mM), CaCl₂ (5 mM), ZnCl₂ (1 µM) i NaCl (0,5 M), pri pH 8,3, na 37 °C u vodenom kupatilu (Lab-ThermKuhner Shaker, Kuhner, Switzerland), uz mešanje od 50 obrtaja u minuti. Potom, gelovi su bojani tokom 3 sata 0,05 % (w/v) CBB G-250 (eng. *comassie brilliant blue R-250*) bojom koncentracije 0,05 % (w/v) u smeši metanol: sirćetna kiselina: voda (2,5:1:6,5) i obezbojeni u 4 % metanolu sa 8 % sirćetne kiseline. Za bolju senzitivnost gelovi su dalje obezbojavani u rastvoru 1 % Triton X-100 (1-2 h). Pojava svetlih zona na tamnoj pozadini gela koji je obojen CBB G-250 bojom ukazivala je na mesta aktivnosti zelatinaza.

3.4.5.4. Denzitometrijsko određivanje aktivnosti enzima na gelovima

Nakon zimografija, gelovi su skenirani za denzitometrijsku analizu kako bi se utvrdila relativna aktivnosti LDH i MDH izoformi i želatinaza (MMP-2 i -9). Debljina i intenzitet traka ispitivanog proteina kvantifikovani su kao aktivnosti enzima korišćenjem ImageJ softverskog paketa (*ImageJ 1.48v software, National Institutes of Health, Bethesda, SAD*). Denzitometrijski podaci su normalizovani na 1 µg ukupnih proteina srčanog tkiva.

3.4.6. Procesiranje tkiva – priprema tkiva za analizu svetlosnim mikroskopom

Za morfološku i morfometrijsku analizu korišćeno je tkivo srca, aorte i pankreasa, a za imunohistohemijsku analizu korišćeno je tkivo srca. Srce je orijentisano i isečeno na poprečne rezove debljine 3 mm. Tkivo descendentne torakalne aorte, podeljeno je na segmente dužine 1 cm. Tkivo je fiksirano imerzionim postupkom u 4 % neutralno puferisanom formaldehidu u toku najmanje 24 h. Potom je dehidratirano alkoholima rastućih koncentracija, prosvetljavano u ksilolu u tkivnom procesoru (Leica TP 1020 Automatic Tissue Processor) i kalupljeno u parafinu aparatom za kalupljenje (Tissue Tech II Tissue Embedding Center, Hatfield, SAD). Svaki kalup je potom pažljivo nivelisan i sečen do pojave cele debljine zida srca. Kalupi tkiva su serijski sečeni rotacionim mikrotomom (Leica RM2235, *Leica, Beč, Austrija*) na isečke debljine 3 µm. Potom su isečki bojani hematoxilinom i eozin/floksinom (HE).

3.4.6.1. Histološka i morfometrijska analiza

HE bojenje omogućava morfološku analizu promena na srcu, pre svega strukturu ekstracelularnog matriksa, kao i morfometrijsku analizu. Morfometrijska analiza je podrazumevala više merenja debljine srčanog zida od endokarda do epikarda (10 merenja po srcu) LK, DK i IVS i utvrđivanje transverzalnog prečnika KM na nivou jedra. Isečci aorte i pankreasa iz kontrolne grupe (C1) i grupe DM bojani su HE bojenjem radi procene promena nastalih u njihovoj strukturi. Na isečcima aorte mereni su debljina intime medije, broj elastičnih lamina i prosečno rastojanje između elastičnih lamina. Prosečno rastojanje između elastičnih lamina određeno je kao količnik debljine tunike medije i broja elastičnih lamina. Na isečcima pankreasa određeni su broj Langerhansovih ostrvaca po mm^2 površine tkiva pankreasa, dijametar i površina Langerhansovih ostrvaca, broj ćelija u Langerhansovim ostrvcima, kao i broj ćelija po mm^2 površine Langerhansovih ostrvaca. Broj Langerhansovih ostrvaca po mm^2 površine tkiva pankreasa određen kao količnik broja Langerhansovih ostrvaca i površine tkiva pankreasa izražene u mm^2 , dok je broj ćelija po mm^2 površine određen je kao količnik broja ćelija u Langerhansovim ostrvcima i površine Langerhansovih ostrvaca izražene u mm^2 . Posmatrano je i da li dolazi do promena u strukturi Langerhansovih ostrvaca i infiltrata leukocitima. Svi preparati su analizirani pomoću Olympus BX 41 mikroskopa (Tokio, Japan) sa Olympus C5060-ADU "wide zoom" kamerom (Tokio, Japan) i softverskog paketa *Leica LAS*. Za morfometrijsku analizu fotomikrografija korišćen je ImageJ softverski paket (*ImageJ 1.48v software, National Institutes of Health, Bethesda, SAD*). Sve vrednosti su izražene u mikrometrima (μm).

3.4.6.2. Imunohistohemijska analiza uzoraka tkiva srca i pankreasa

Kalupi tkiva srca i pankreasa sečeni su serijski u isečke debljine 4 mikrometra. Tkivo srca je bojeno imunohistohemijskom metodom na sledeći panel markera: BCL-2, BCL-6, Ki-67 i PCNA, dok je tkivo pankreasa bojeno na insulin. Deparafinisani isečci su tretirani visokom temperaturom u puferu odgovarajuće pH vrednosti radi demaskiranja antigena (engl. *heat induced epitope retrieval – HIER*): citratni pufer pH = 6 u mikrotalasnoj rerni 21°C pri maksimalnoj snazi (800W) ili Tris-EDTA pufer pH = 9. Primenjena su sledeća antitela u odgovarajućem razblaženju: BCL-2 (Abcam, ab194583, 1:50), BCL-6 (Abcam, ab272859, 1:50), Ki-67 Clone SP6 (Thermo Scientific Lab Vision RM-9106-S0; 1:200), PCNA Clone PC10 (Thermo Scientific Lab Vision MS-106-P0, 1:200) i insulin (Abcam, ab63820, 1:100). Imunohistohemijske reakcije su razvijene primenom sekundarnih antitela u okviru polimerskog kompleksa u sastavu komercijalnog kita Thermo Scientific Lab Vision Quanto HRP DAB TL-125-QHD i vizualizovane primenom hromogena diaminobenzidin (DAB). Isečci su kontrastirani Majerovim hematoksilinom (Biognost, HEMML-OT-1L). Imunohistohemijske reakcije su kontrolisane sistemom eksternih i internih pozitivnih i negativnih tkivnih kontrola i kontrola reagenasa. Imunohistohemijska analiza je obuhvatala analizu apoptotske aktivnosti u svim eksperimentalnim grupama evaluacijom BCL-2 i BCL-6 imunoreaktivnosti i analizu proliferativne aktivnosti KM u svim eksperimentalnim grupama evaluacijom Ki-67 i PCNA imunoreaktivnosti. Rezultati su analizirani na 100 prebrojanih KM izražavanjem broja imunoreaktivnih ćelija u procentima. Svi preparati su analizirani pomoću Olympus BX 41 mikroskopa (Tokio, Japan) sa Olympus C5060-ADU kamerom širokog zuma (Tokio, Japan) i softverskog paketa *Leica LAS*. Za morfometrijsku analizu fotomikrografija korišćen je ImageJ softverski paket (*ImageJ 1.48v software, National Institutes of Health, Bethesda, SAD*).

3.5. Hemikalije i potrošni materijal

Hemikalije koje su korišćene u eksperimentalnoj fazi istraživanja za kvantifikaciju biohemijskih parametara su nabavljene od Sigma-Aldrich Corporation (Sent Luis, SAD). Za izazivanje DM korišćen je STZ (Sigma-Aldrich Corporation, Sent Luis, SAD), a za tretman pacova piridoksin (Sigma-Aldrich Corporation, Sent Luis, SAD) i folna kiselina (Sigma-Aldrich Corporation, Sent Luis, SAD). Antitela za imunohistohemijska merenja BCL-2, BCL-6 i insulin nabavljena su od Abcam (Kembriđ, Velika Britanija), a Ki-67 i PCNA od Thermo Scientific Lab Vision (Fremont, SAD). Potrošni laboratorijski materijal je nabavljen od Eppendorf (Hamburg, Nemačka).

3.6. Statistička analiza

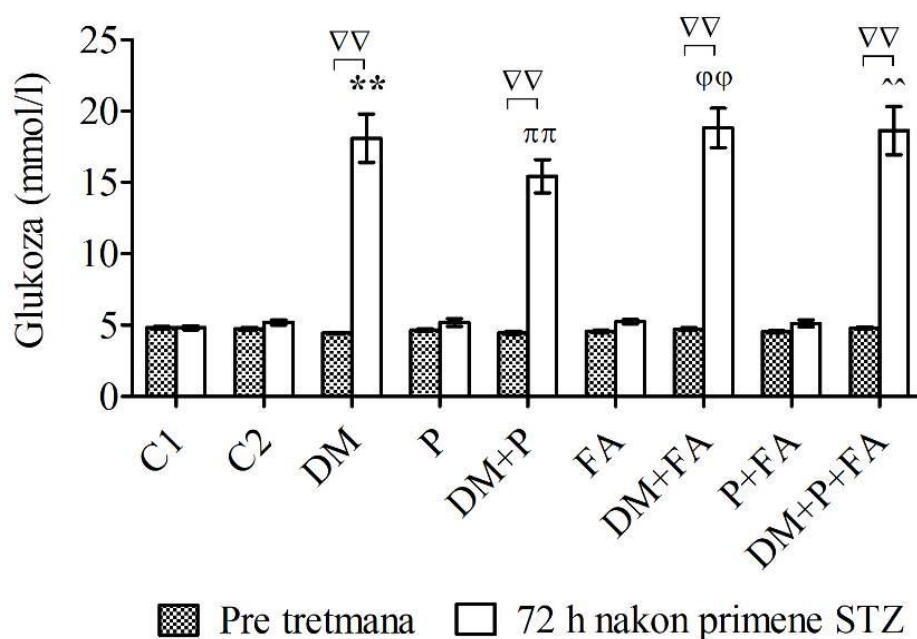
Za poređenje prosečnih vrednosti parametarskih obeležja između grupa korišćena je analiza varijanse (ANOVA) sa *post hoc* analizom (*Tukey test*), kao i neparametarska varijanta testa po *Kruskal-Wallis-u*, praćena *Mann-Whitney* testom u zavisnosti od raspodele podataka. Svi dobijeni rezultati prikazani su tabelarno ili grafički. Vrednost $p < 0,05$ se smatrala statistički značajnom.

4. REZULTATI

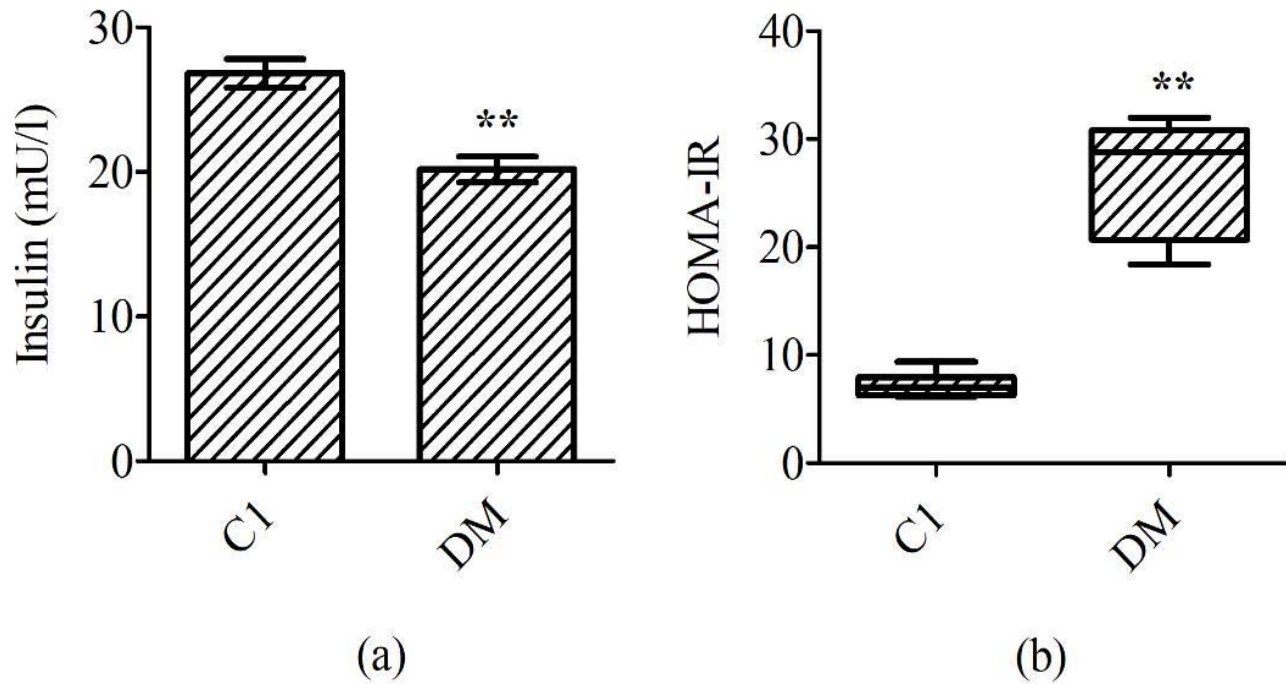
4.1. UTICAJ DIJABETES MELITUSA NA ISPITIVANE PARAMETRE – REZULTATI APLIKACIJE STZ I INDUKCIJE DIJABETES MELITUSA U ODNOSU NA KONTROLNU GRUPU (C1)

4.1.1. Indukcija dijabetes melitusa

Sve eksperimentalne životinje su preživele tokom trajanja istraživanja. Nije bilo statističke razlike u nivou glukoze između grupa pre tretmana STZ ($p = 0,094$). 72 h nakon primene STZ kod svih tretiranih životinja dobijen je povišen nivo glukoze u krvi (DM = $18,1 \pm 1,7$ mmol/l, DM+P = $15,43 \pm 1,16$ mmol/l, DM+FA = $18,82 \pm 1,38$ mmol/l i DM+P+FA = $18,64 \pm 1,68$ mmol/l; Grafikon 1). Kako bi se dodatno potvrdio razvoj dijabetesa, nivo insulina u serumu i HOMA-IR određeni su u C1 grupi i DM grupi nakon žrtvovanja eksperimentalnih životinja. U DM grupi, nivo insulina je bio značajno niži ($p < 0,001$), a HOMA-IR je bio značajno viši ($p < 0,001$) od nivoa u C1 grupi (Grafikon 2).



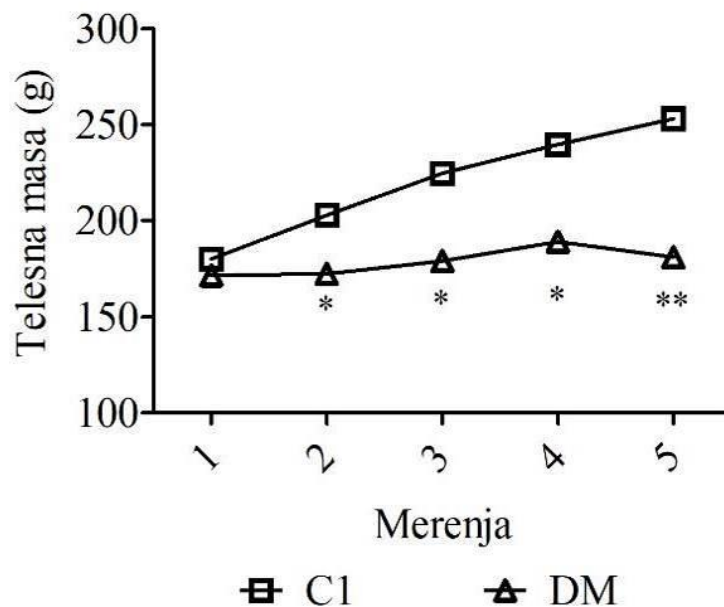
Grafikon 1. Koncentracija glukoze u krvi eksperimentalnih životinja pre tretmana i 72 h nakon primene streptozotocina. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana; FA – svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; P+FA – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, $\pi\pi$ $p < 0,01$ u poređenju sa P grupom, $\phi\phi$ $p < 0,01$ u poređenju sa FA grupom, ^^ $p < 0,01$ u poređenju sa P+FA grupom, $\nabla\nabla$ $p < 0,01$ poređenjem vrednosti pre i 72 h nakon tretmana streptozotocinom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom i T test za vezane uzorke.



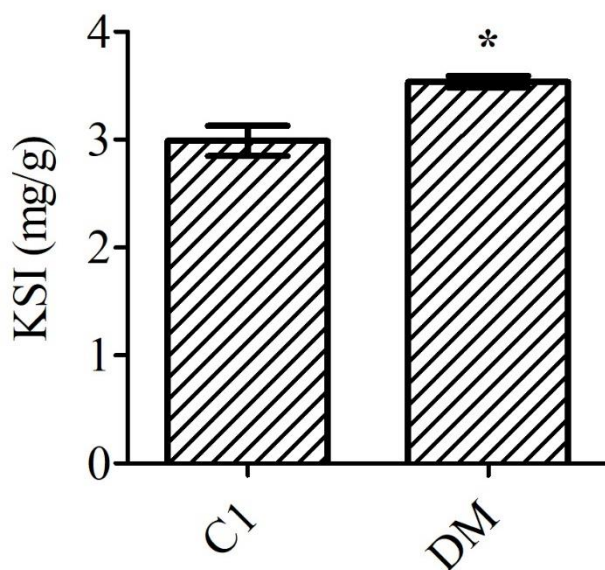
Grafikon 2. Uticaj dijabetes melitusa na vrednosti (a) insulina u serumu i (b) HOMA-IR na kraju eksperimentalnog perioda. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg). ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom – (a) T test za nevezane uzorke i (b) *Mann-Whitney* test.

4.1.2. Telesna masa i kardiosomatski indeks

Kod pacova sa DM uočava se značajno smanjenje napredovanja u telesnoj masi pacova. Na kraju eksperimentalnog perioda telesna masa u grupi DM je bila za oko 30 % manja nego telesna masa u C1 grupi ($p = 0,001$, Grafikon 3). U DM grupi, KSI je bio povećan za 18,39 % u poređenju sa vrednostima dobijenim u C1 grupi ($p = 0,047$, Grafikon 4).



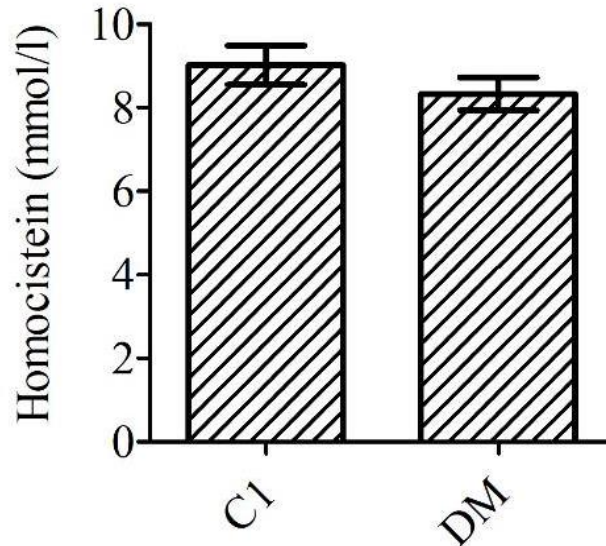
Grafikon 3. Uticaj dijabetes melitusa na telesnu masu pacova tokom 4 nedelje. Merenja su vršena (1) na početku eksperimentalnog perioda, (2) prve nedelje, (3) druge nedelje, (4) treće nedelje i (5) četvrte nedelje. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg). * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom – T test za nevezane uzorke.



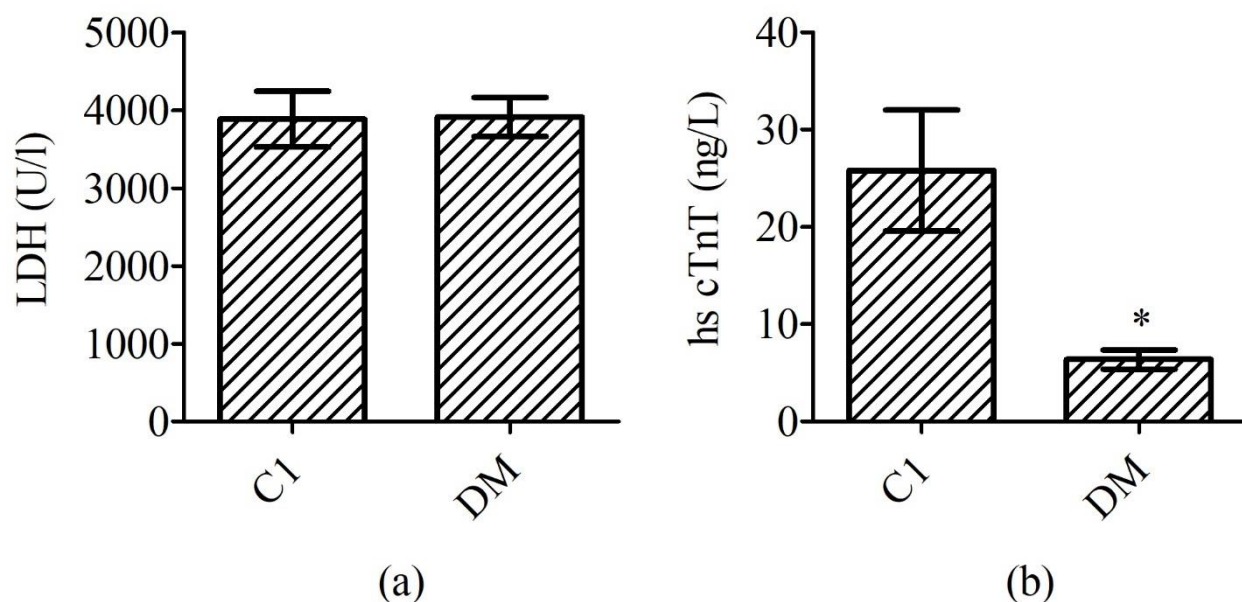
Grafikon 4. Uticaj dijabetes melitusa na kardiosomatski indeks (KSI) pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg). * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom – T test za nevezane uzorke.

4.1.3. Biohemijski parametri

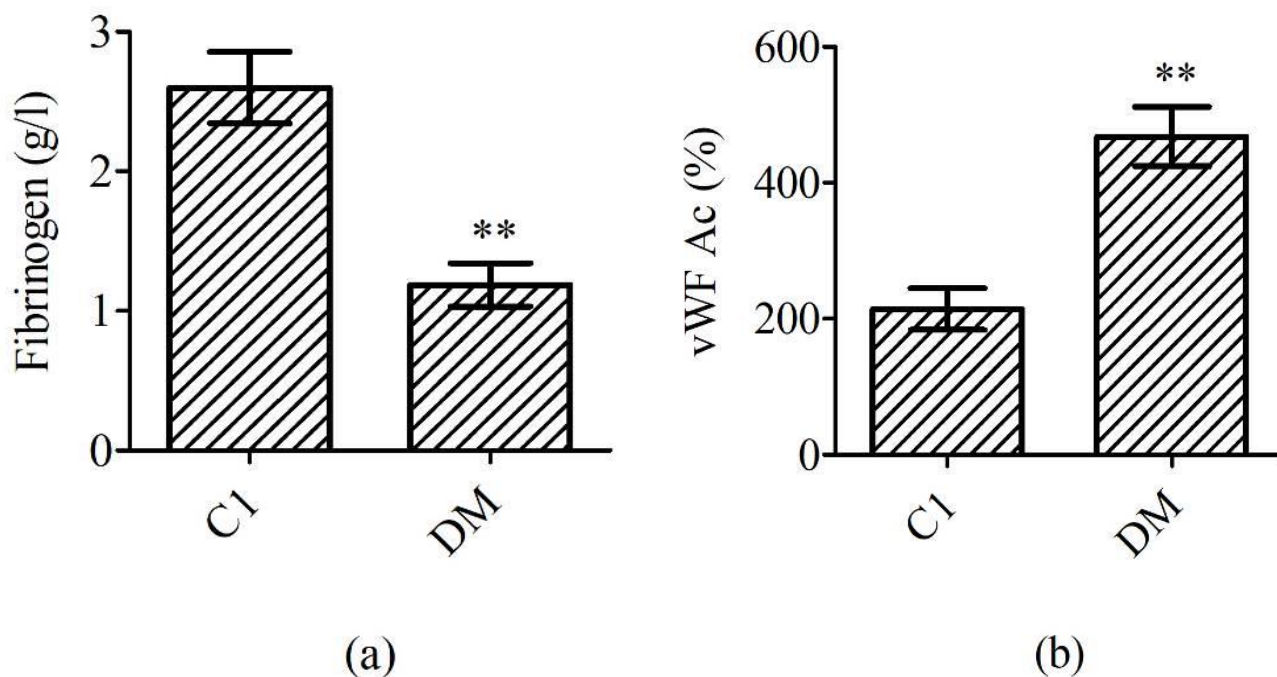
Razlike između C1 i DM grupa nisu postojale pri poređenju nivoa homocisteina ($p = 0,998$, Grafikon 5), kao ni parametra oštećenja srčanog tkiva u serumu, LDH ($p = 1,0$, Grafikon 6 a), dok je drugi parametar oštećenja srčanog tkiva, hs cTnT bio značajno niži kod pacova sa DM ($p = 0,013$, Grafikon 6 b). Parametri hemostaze su se značajno razlikovali između grupa (Grafikon 7 a i b). Fibrinogen je bio smanjen za preko 50 % (C1 = $2,6 \pm 0,26$ g/l, DM = $1,16 \pm 0,15$ g/l, $p < 0,001$), dok je vWF bio povećan u DM grupi za preko 100 % (C1 = $214,3 \pm 30,4$ %, DM = $467,9 \pm 43,6$ %, $p < 0,001$).



Grafikon 5. Uticaj dijabetes melitusa na koncentraciju homocisteina u serumu pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg). $p > 0,05$ – T test za nevezane uzorke.

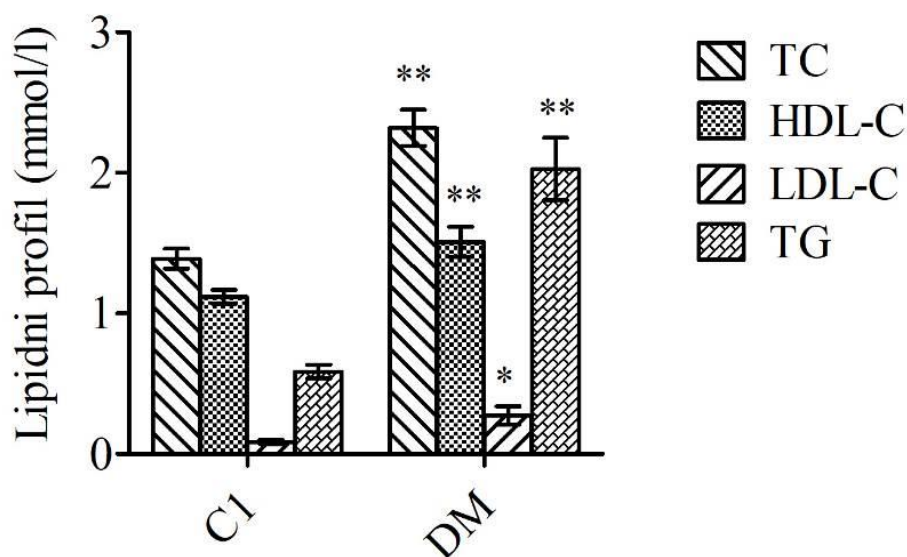


Grafikon 6. Uticaj dijabetesa melitusa na (a) aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH) i (b) koncentraciju srčanog troponina T (hs cTnT) u serumu pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg). p > 0,05 – T test za nevezane uzorke.

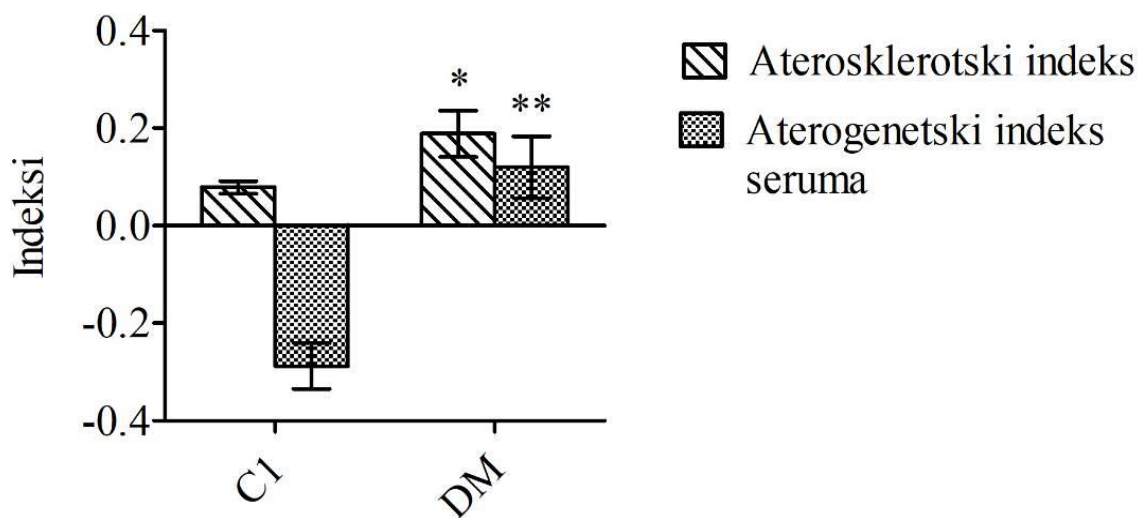


Grafikon 7. Uticaj dijabetesa melitusa na (a) koncentraciju fibrinogena i (b) aktivnost fon Vilebrandovog faktora (vWF) u serumu pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg). ** p < 0,01 u poređenju sa C1 grupom – T test za nevezane uzorke.

Nivoi TC, HDL-C, LDL-C i TG u serumu su bili značajno povećani u DM grupi ($p < 0,001$, $p = 0,005$, $p = 0,012$ i $p < 0,001$, redom, Grafikon 8a). Takođe, pokazatelji aterosklerotskog rizika, AI i AIS su bili povećani u DM grupi ($p = 0,042$ i $p < 0,001$, redom, Grafikon 8b).



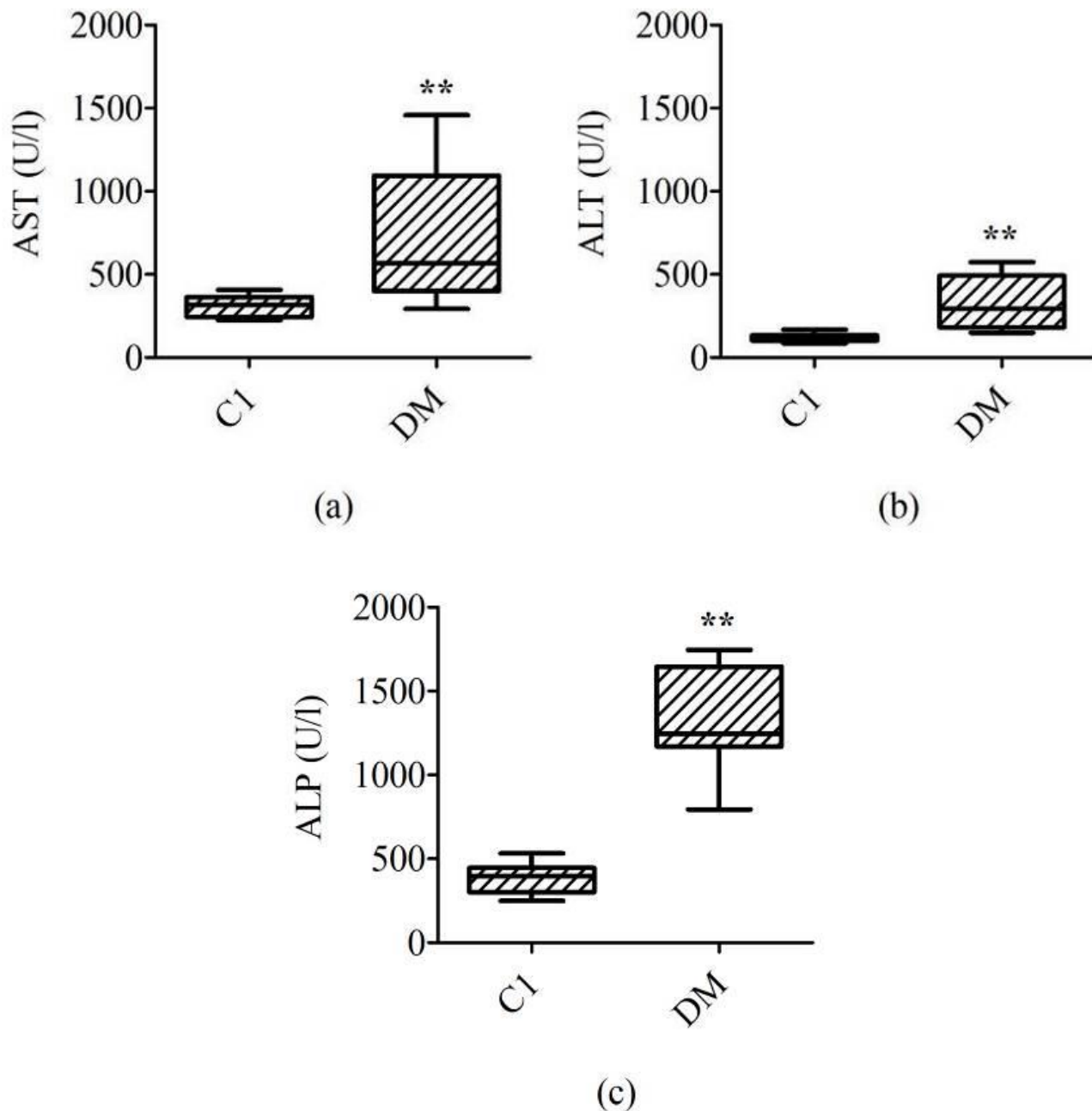
(a)



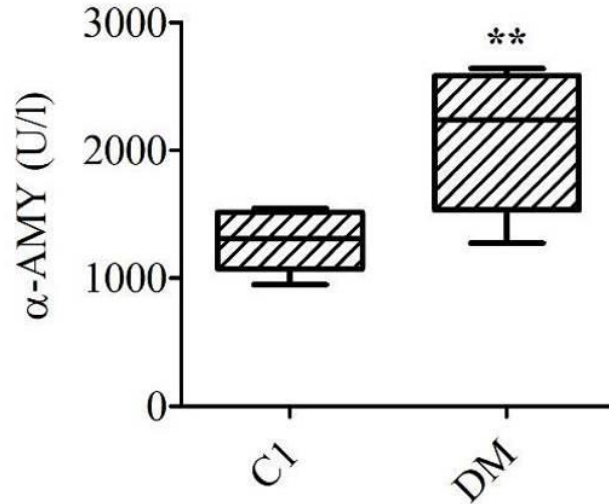
(b)

Grafikon 8. Uticaj dijabetes melitusa na (a) lipidni profil i (b) indekse pokazatelje aterosklerotskog rizika u serumu pacova. TC – ukupan holesterol; HDL-C – holesterol lipoproteina visoke gustine; LDL-C – holesterol lipoproteina niske gustine; TG – trigliceridi; C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg). * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom – T test za nezavise uzorke.

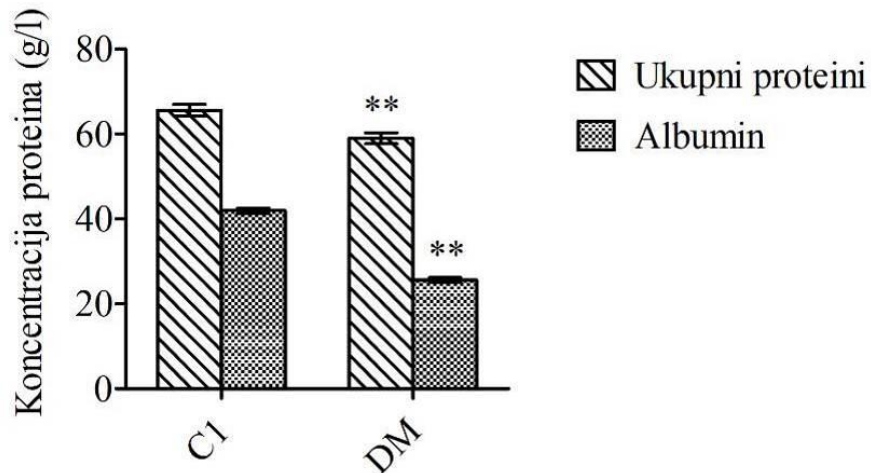
Merenjem aktivnosti enzima jetre u serumu uočava se povećanje aktivnosti AST, ALT i ALP kod pacova sa DM ($p = 0,006$, $p = 0,001$, $p = 0,001$, redom, Grafikon 9). Aktivnost α -AMY je bila značajno povećana u grupi pacova sa DM ($p = 0,006$, Grafikon 10). Postojanje DM je smanjilo za oko 10 % koncentraciju ukupnih proteina ($p = 0,006$), i za oko 39 % koncentraciju albumina u serumu ($p < 0,001$) u poređenju sa kontrolnom grupom (Grafikon 11).



Grafikon 9. Uticaj dijabetes melitusa na aktivnost (a) aspartat aminotransferaze (AST), (b) alanin aminotransferaze (ALT) i (c) alkalne fosfataze (ALP) u serumu pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg). ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom – *Mann-Whitney* test.

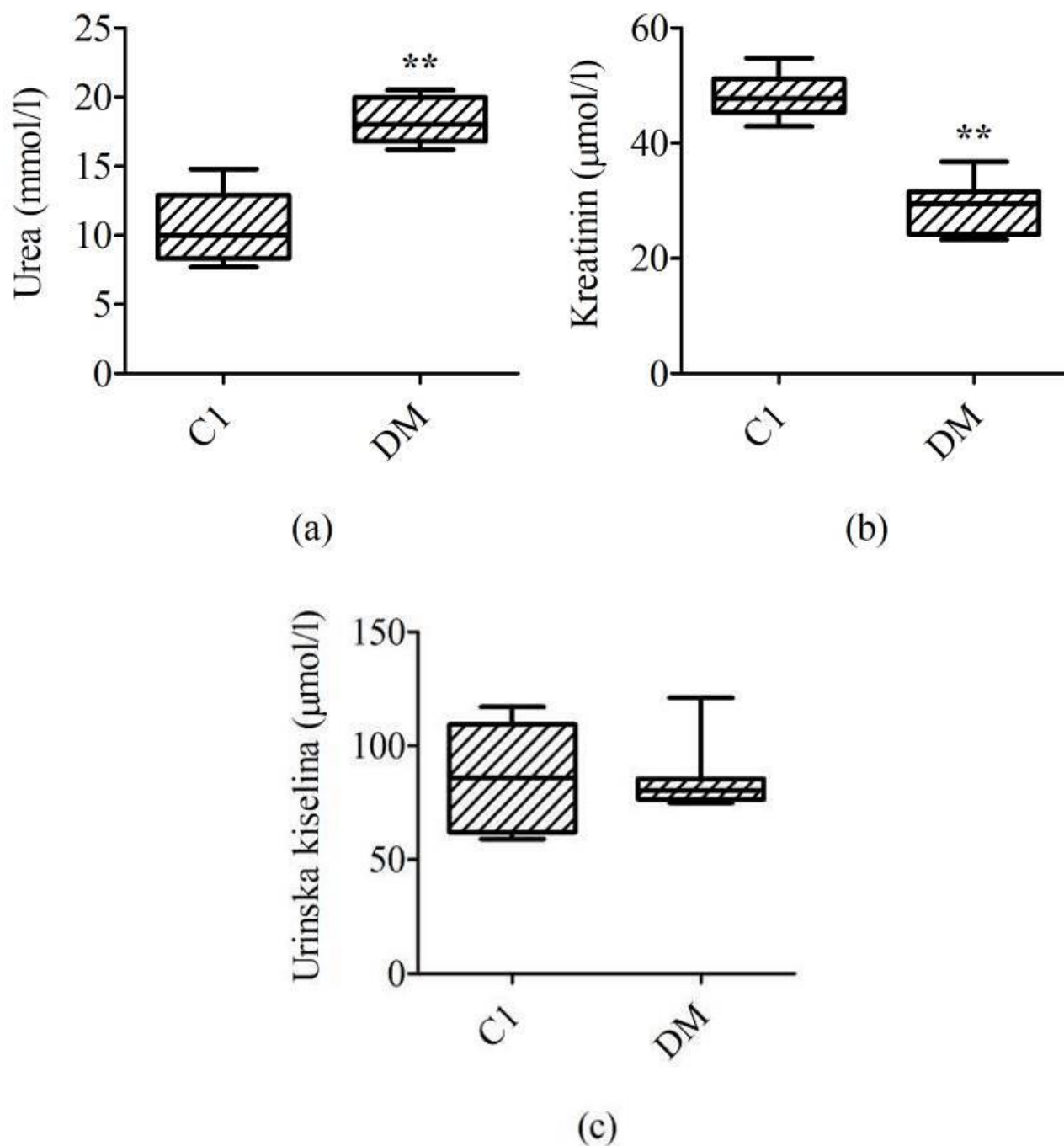


Grafikon 10. Uticaj dijabetes melitusa na aktivnost α -amilaze (α -AMY) u serumu pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg). ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom – *Mann-Whitney* test.



Grafikon 11. Uticaj dijabetes melitusa na koncentraciju ukupnih proteina i albumina u serumu pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg). ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom – T test za nevezane uzorke.

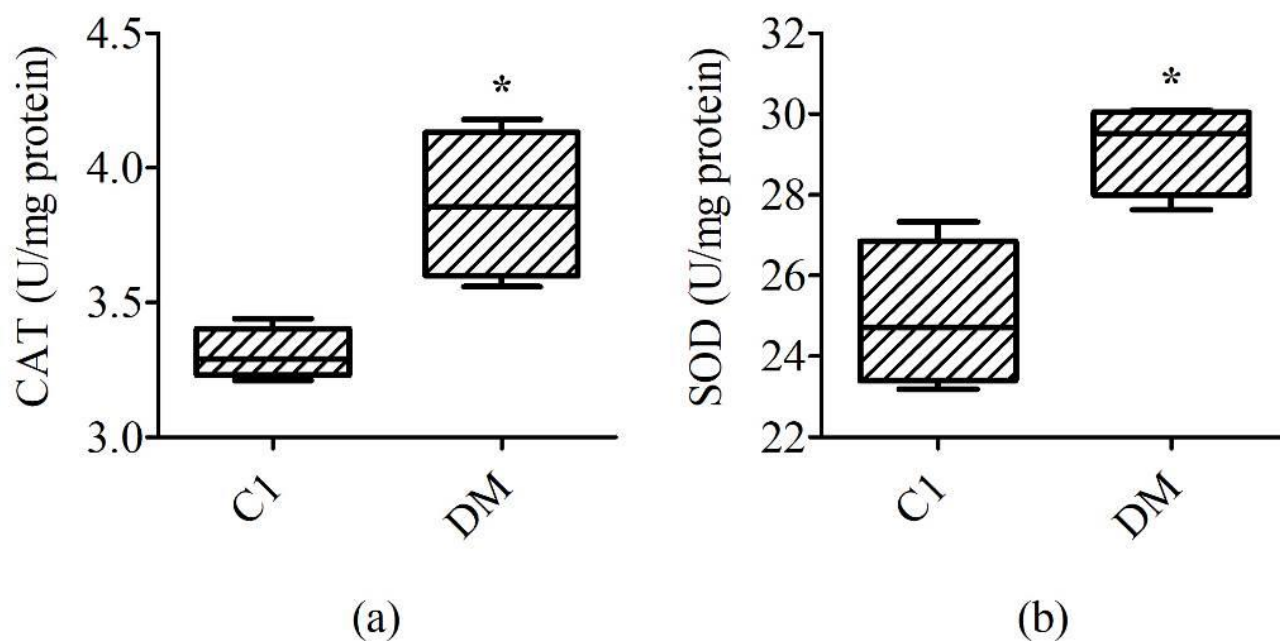
Parametri bubrežne funkcije, koncentracija uree i kreatinina u serumu, pokazali su razlike među ispitivanim grupama (Grafikon 12 a i b). Urea je bila značajno povišena u grupi pacova sa DM ($p = 0,001$), dok je u istoj grupi kreatinin bio snižen ($p = 0,001$). Poređenjem koncentracije mokraćne (urinske) kiseline u serumu, nisu dobijene razlike između grupa ($p = 0,058$, Grafikon 12 c).



Grafikon 12. Uticaj dijabetes melitusa na koncentraciju (a) uree, (b) kreatinina i (c) urinske kiseline u serumu pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg). ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom – *Mann-Whitney* test.

4.1.4. Aktivnost antioksidativnih enzima u tkivu srca pacova

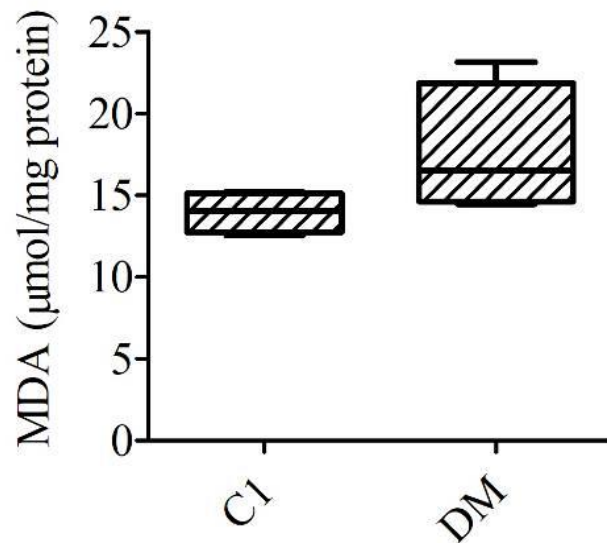
Aktivnost oba merena antioksidativna enzima bila je značajno povišena u grupi pacova sa DM (Grafikon 13 a i b). Aktivnost CAT je sa 3,29 (3,21-3,44) U/mg proteina koliko je iznosila u C1 grupi porasla za 17 % i u DM grupi je iznosila 3,85 (3,56-4,18) U/mg proteina ($p = 0,021$). Slično, aktivnost SOD je u grupi DM (29,51 (27,63-30,09) U/mg proteina) porasla za 19 % u poređenju sa vrednostima u grupi C1 (24,71 (23,19-27,33) U/mg proteina, $p = 0,021$).



Grafikon 13. Uticaj dijabetes melitusa na aktivnost (a) katalaze (CAT) i (b) superoksid dismutaze (SOD) u tkivu srca pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg). * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom – *Mann-Whitney* test.

4.1.5. Indeks lipidne peroksidacije u tkivu srca pacova

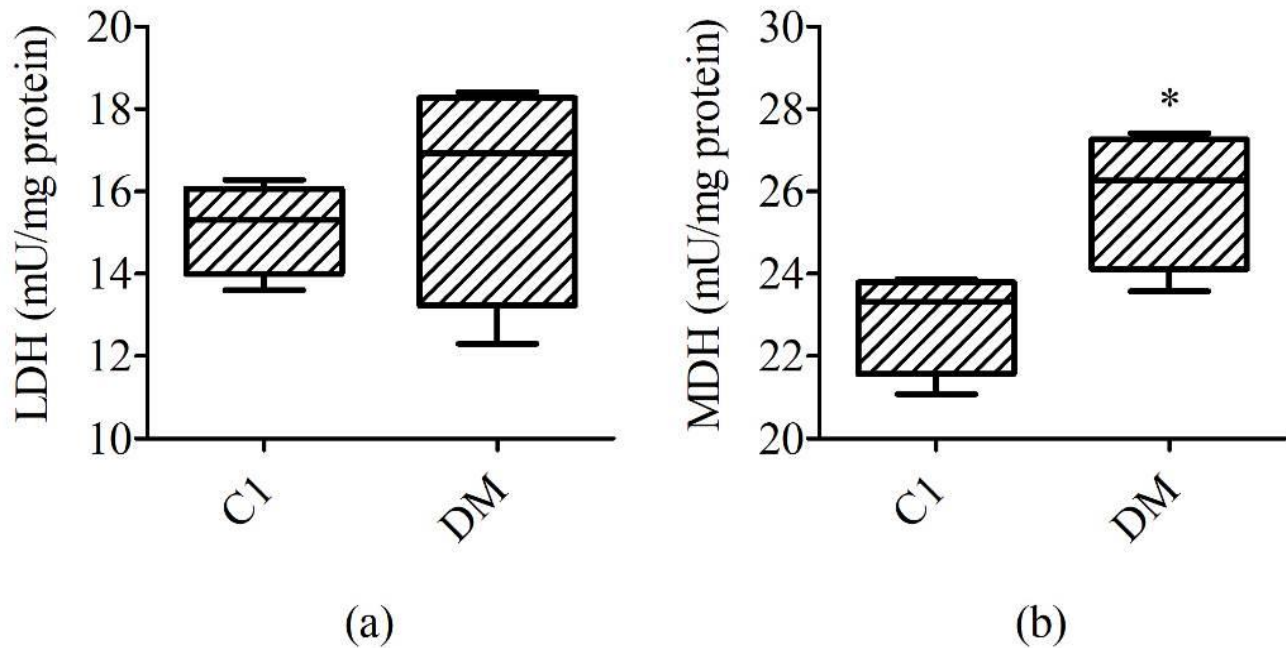
Indeks lipidne peroksidacije je određen merenjem koncentracije MDA u homogenatu tkiva srca. Poređenjem dobijenih vrednosti nisu pokazane razlike u koncentraciji MDA između C1 i DM grupe ($p = 0,149$, Grafikon 14).



Grafikon 14. Uticaj dijabetes melitusa na koncentraciju malondialdehida (MDA) u tkivu srca pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg). $p > 0,05$ – *Mann-Whitney* test.

4.1.6. Aktivnost laktat i malat dehidrogenaze u tkivu srca pacova

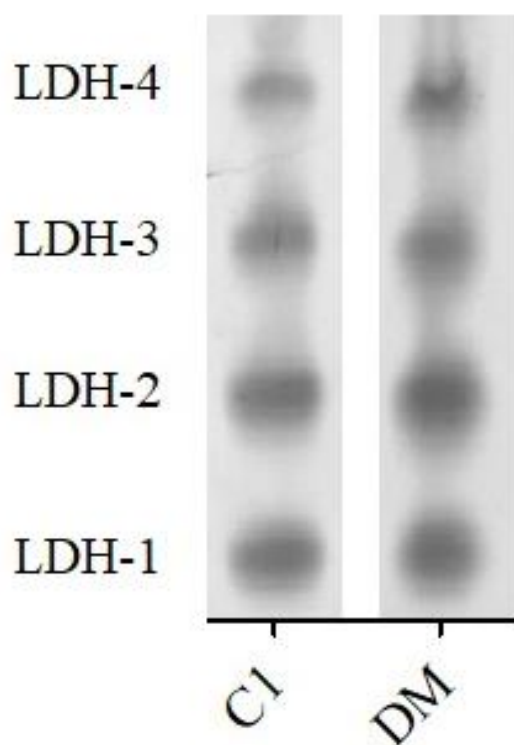
Aktivnost LDH u srčanom tkivu pacova nije se značajno razlikovala u C1 (15,31 (13,6-16,28) mU/mg proteina) i DM grupi (26,27 (23,58-27,41) mU/mg proteina) ($p = 0,386$, Grafikon 15 a). Međutim, aktivnost MDH u tkivu srca pacova je značajno bila povećana u DM grupi u poređenju sa C1 grupom (26,27 (23,58-27,41) mU/mg proteina, 23,31 (21,08-23,57) mU/mg proteina, redom, $p = 0,043$, Grafikon 15 b).



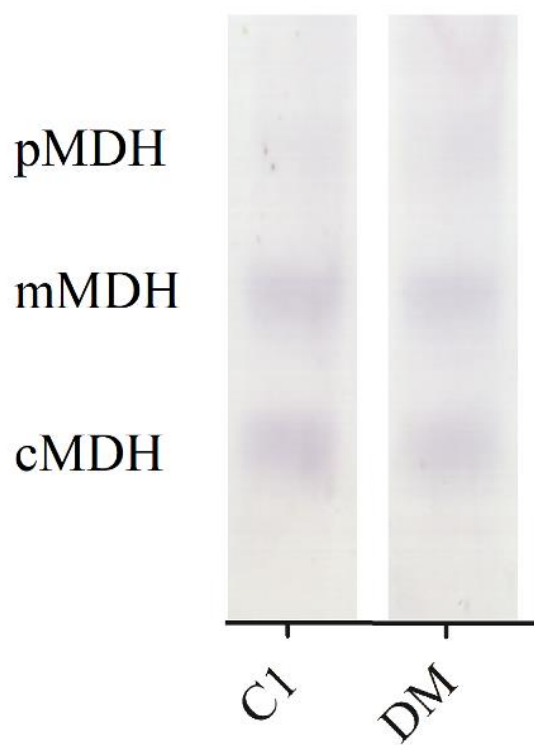
Grafikon 15. Uticaj dijabetes melitusa na aktivnost (a) laktat dehidrogenaze (LDH) i (b) malat dehidrogenaze (MDH) u tkivu srca pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg). * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom – *Mann-Whitney* test.

4.1.7. Izoforme laktat i malat dehidrogenaze u tkivu srca pacova

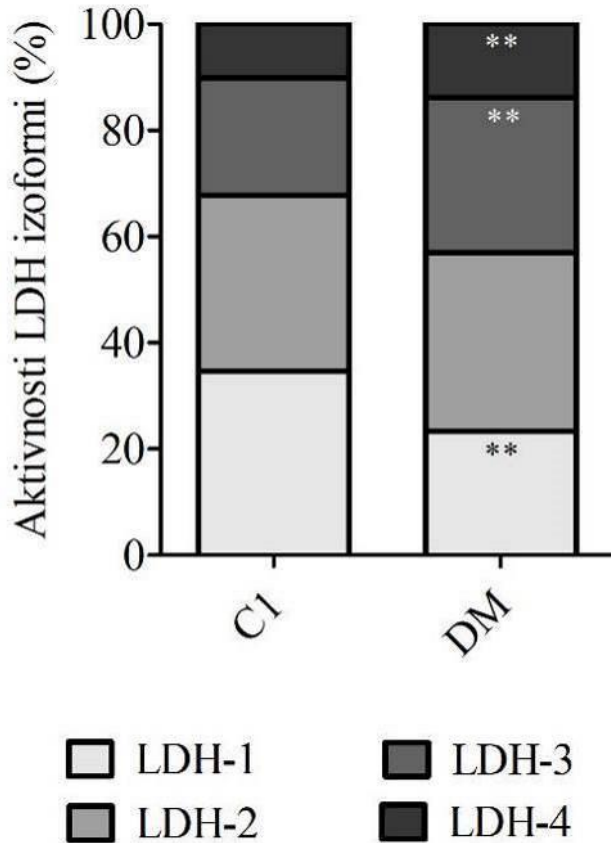
U tkivu srca svih testiranih eksperimentalnih životinja detektovane su četiri LDH izoforme (LDH-1, LDH-2, LDH-3 i LDH-4) i tri MDH izoforme (mitohondrijalna – mMDH), citosolna – cMDH i peroksizomalna – pMDH) (Slika 5 i 6). U obe grupe LDH-4 je imala najmanju zastupljenost. Međutim, postojale su razlike u relativnim aktivnostima među grupama (Grafikon 16). U DM grupi se jasno primećuje smanjenje aktivnosti LDH-1 ($23,26 \pm 0,71$ %) i povećanje aktivnosti LDH-3 ($29,19 \pm 0,68$ %) i LDH-4 ($13,91 \pm 0,55$ %) u poređenju sa kontrolnom grupom ($34,63 \pm 1,03$ %, $22,14 \pm 0,46$ %, $10,13 \pm 0,18$ %, redom, $p < 0,001$ za sve tri izoforme). Takođe, relativna aktivnost izoformi MDH se značajno razlikovala među grupama (Grafikon 17). U DM grupi, relativna aktivnost pMDH ($19,76 \pm 0,40$ %) je bila povećana ($p < 0,001$), a relativna aktivnost cMDH ($41,84 \pm 1,05$ %) smanjena ($p = 0,017$) u poređenju sa vrednostima dobijenim u kontrolnoj grupi ($10,77 \pm 0,24$ %, $47,26 \pm 1,08$ %, redom).



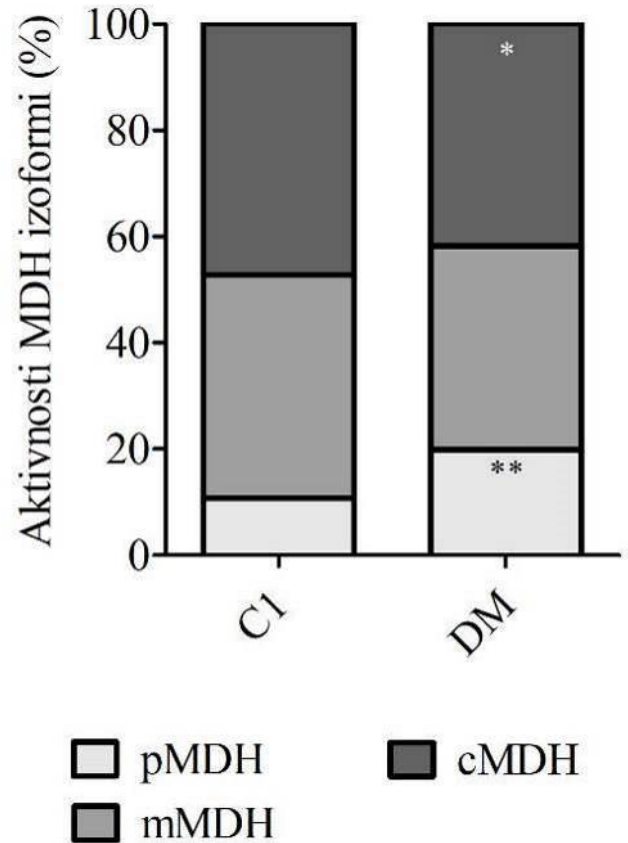
Slika 5. Reprezentativni zimogrami aktivnosti izoformi laktat dehidrogenaze (LDH-1, LDH-2, LDH-3 i LDH-4) detektovanih u srčanom tkivu pacova nativnom poliakrilamid gele lektroforezom. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg).



Slika 6. Reprezentativni zimogrami aktivnosti izoformi malat dehidrogenaze (MDH) detektovanih u srčanom tkivu pacova nativnom poliakrilamid gel elektroforezom. pMDH – peroksizomalna MDH; mMDH – mitohondrijalna MDH; cMDH – citosolna MDH; C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg).



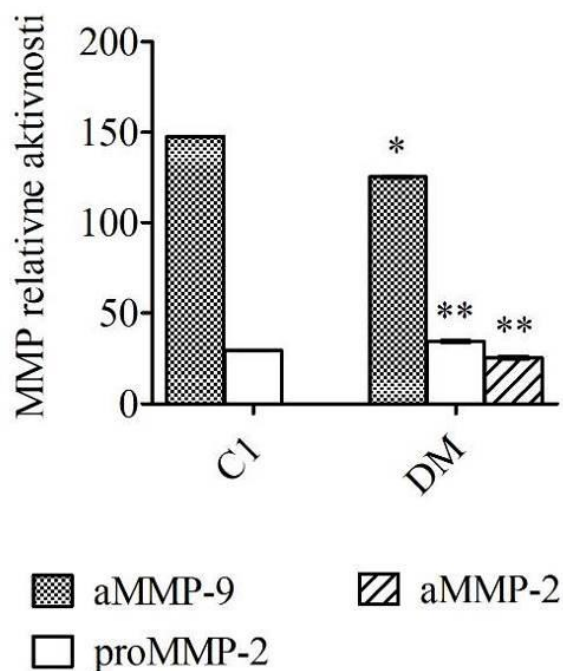
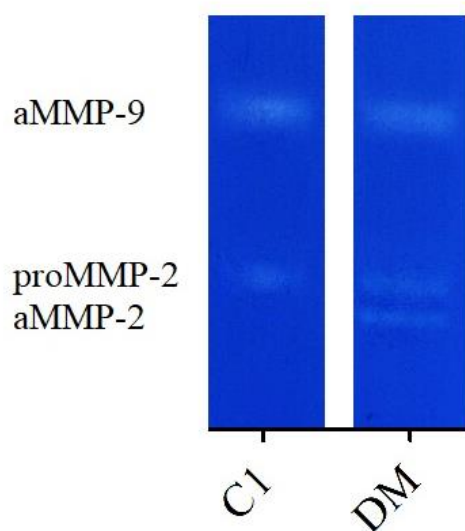
Grafikon 16. Uticaj dijabetes melitusa na relativne aktivnosti izoformi laktat dehidrogenaze (LDH) u srčanom tkivu pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg). ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom – T test za nevezane uzorke.



Grafikon 17. Uticaj dijabetes melitusa na relativne aktivnosti izoformi malat dehidrogenaze (MDH) u srčanom tkivu pacova. pMDH – peroksizomalna MDH; mMDH – mitohondrijalna MDH; cMDH – citosolna MDH; C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg). * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom – T test za nevezane uzorke.

4.1.8. Aktivnost matriksnih metaloproteinaza -2 i -9 u tkivu srca pacova

Na Slici 7 mogu se videti reprezentativni zimogrami aktivnosti MMP-2 i MMP-9 koji su detektovani u srčanom tkivu SDS-PAGE zimografijom. Latentni oblik MMP-2 (proMMP-2 na 72 kDa) se može uočiti u obe testirane grupe, dok je aktivni oblik MMP-2 (aMMP-2 na 64 kDa) detektovan samo u DM grupi. Relativna aktivnost proMMP-2 bila je za 17 % veća u DM grupi, nego u kontrolnoj grupi ($p < 0,001$). Aktivni oblik MMP-9 (aMMP-9 na 83 kDa) detektovan je u obe testirane grupe, sa postojanjem značajne razlike u aktivnosti aMMP-9 između grupa. U DM grupi, aktivnost aMMP-9 bila je za 15 % niža nego u kontrolnoj grupi ($p = 0,02$, Grafikon 18).

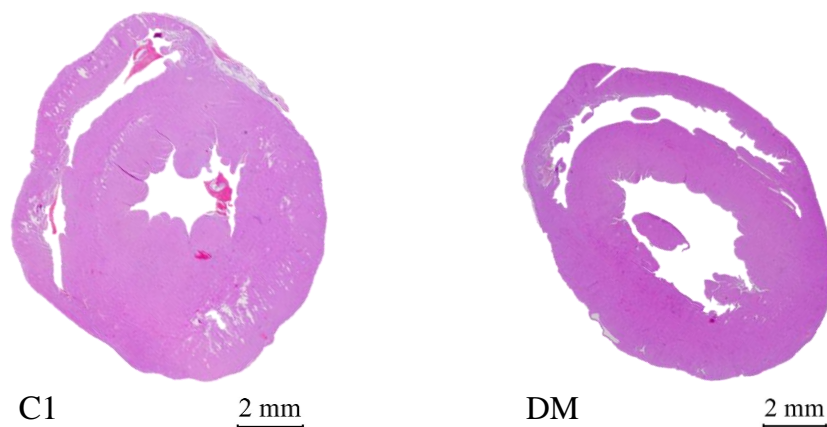


Slika 7. Reprezentativni zimogrami aktivnosti matriksnih proteinaza (MMP) -2 i -9 detektovanih u srčanom tkivu pacova natrijum-dodecil sulfat poliakrilamidnom elektroforezom (eng. *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE). C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg).

Grafikon 18. Uticaj dijabetes melitusa na relativne aktivnosti matriksnih metaloproteinaza (MMP) -2 i -9 u srčanom tkivu pacova. aMMP-9 – aktivni oblik MMP-9; proMMP-2 – latentni oblik MMP-2; aMMP-2 – aktivni oblik MMP-2; C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg). * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom – T test za nevezane uzorke.

4.1.9. Histološka i morfometrijska analiza uzoraka tkiva srca, aorte i pankreasa i imunohistochemijska analiza uzoraka tkiva pankreasa

Vlakna miokarda bila su pravilno raspoređena, a KM su se odlikovali fiziološkom morfologijom u obe testirane grupe (Slika 8). Među grupama nije uočena statistički značajna razlika poređenjem debljine zida LK ($p > 0,05$), kao ni DK ($p > 0,05$). Međutim debljina IVS je bila značajno manja u grupi DM (2117,6 (2033,3-2409,6) μm) u poređenju sa kontrolnom grupom (2528,7 (2137,8-3264,7) μm , $p = 0,021$). Poređenjem transverzalnog prečnika KM leve komore nisu dobijene statistički značajne razlike ($p > 0,05$, Tabela 1).



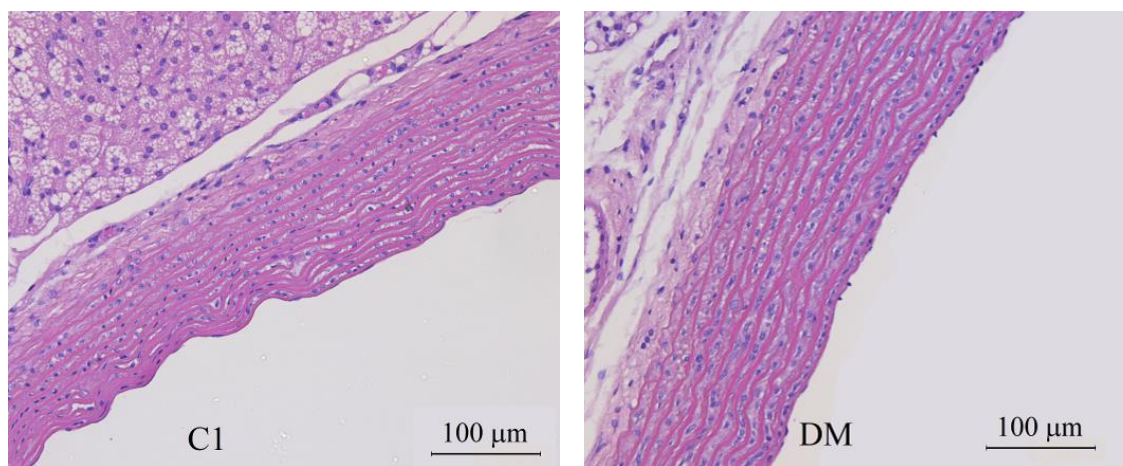
Slika 8. Poprečni presek srca pacova (hematoksilin/eozin bojenje, uvećanje 50 puta). C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg).

Tabela 1. Uticaj dijabetes melitusa na histomorfometrijske parametre srca pacova.

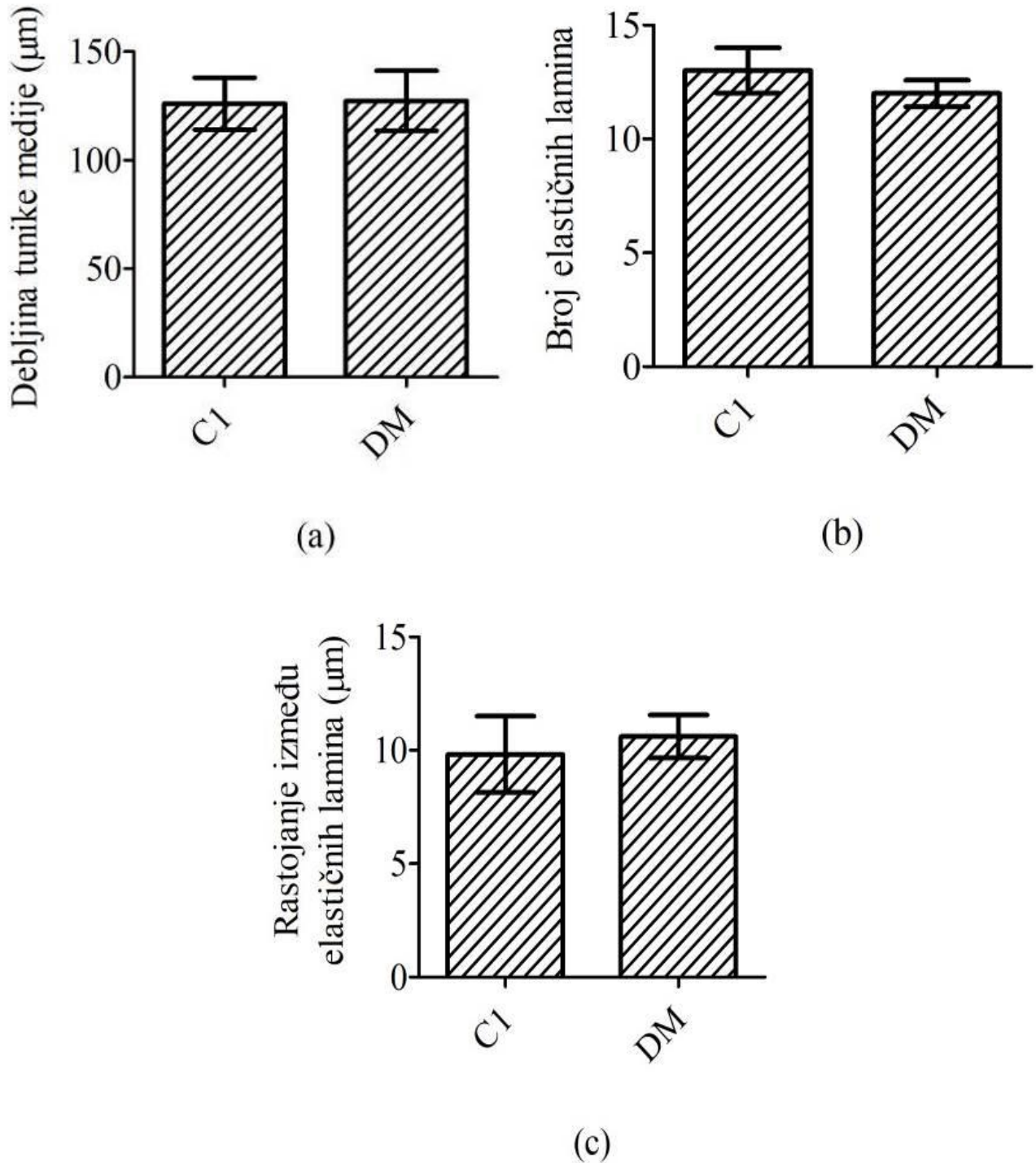
Parametri	Grupe [medijana (najmanja-najveća vrednost)]		
	C1	DM	p vrednost
Debljina zida LK (μm)	2528,7 (2137,8-3264,7)	2117,6 (2033,3-2409,6)	0,149
Debljina zida DK (μm)	878,9 (648,3-994,7)	765,3 (478,1-848,9)	0,083
Debljina IVS (μm)	2429,5 (2113,5-2782,5)	1875,8 (1666,6-2047,9)	0,021
Transverzalni prečnik KM (μm)	22,2 (20,8-23,1)	21,1 (20,4-22,0)	0,083

LK –leva komora; DK –desna komora; IVS –interventrikularni septum; KM – kardiomiocit; C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg). *Mann-Whitney* test.

Poređenjem morfologije aorte nisu dobijene statistički značajne razlike između grupa (Slika 9, Grafikon 19). DM nije uticao na debljinu tunike medije, broj elastičnih lamina, kao ni na prosečno rastojanje između elastičnih lamina ($p = 0,413$, $p = 0,950$, $p = 0,685$, redom). Na isečcima pankreasa dobijeno je statistički značajno manje Langerhansovih ostrvaca po jedinici površine tkiva pankreasa kod pacova tretiranih STZ (0,81 (0-2,87) po mm^2 tkiva pankreasa) u poređenju sa vrednostima dobijenim u C1 grupi (0,29 (0-0,91) po mm^2 tkiva pankreasa, $p < 0,001$), međutim nisu dobijene razlike u dijametru i površini Langerhansovih ostrvaca, broju ćelija u Langerhansovim ostrvcima, kao ni u broju ćelija po mm^2 površine tkiva ostrvca (Tabela 2, Slika 10 a). U pojedinim Langerhansovim ostrvcima u grupi DM uočava se postojanje infiltrata leukocitima. Nakon imunohistohemijskog bojenja na insulin u grupi C1 uočava se veliki broj Langerhansovih ostrvaca prebojenih intenzivno smeđom bojom, dok se u grupi DM mogu uočiti samo pojedina smeđe prebojena Langerhansova ostrvca (Slika 10 b).



Slika 9. Poprečni presek aorte pacova (hematoksilin/eozin bojenje, uvećanje 200 puta). C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg).

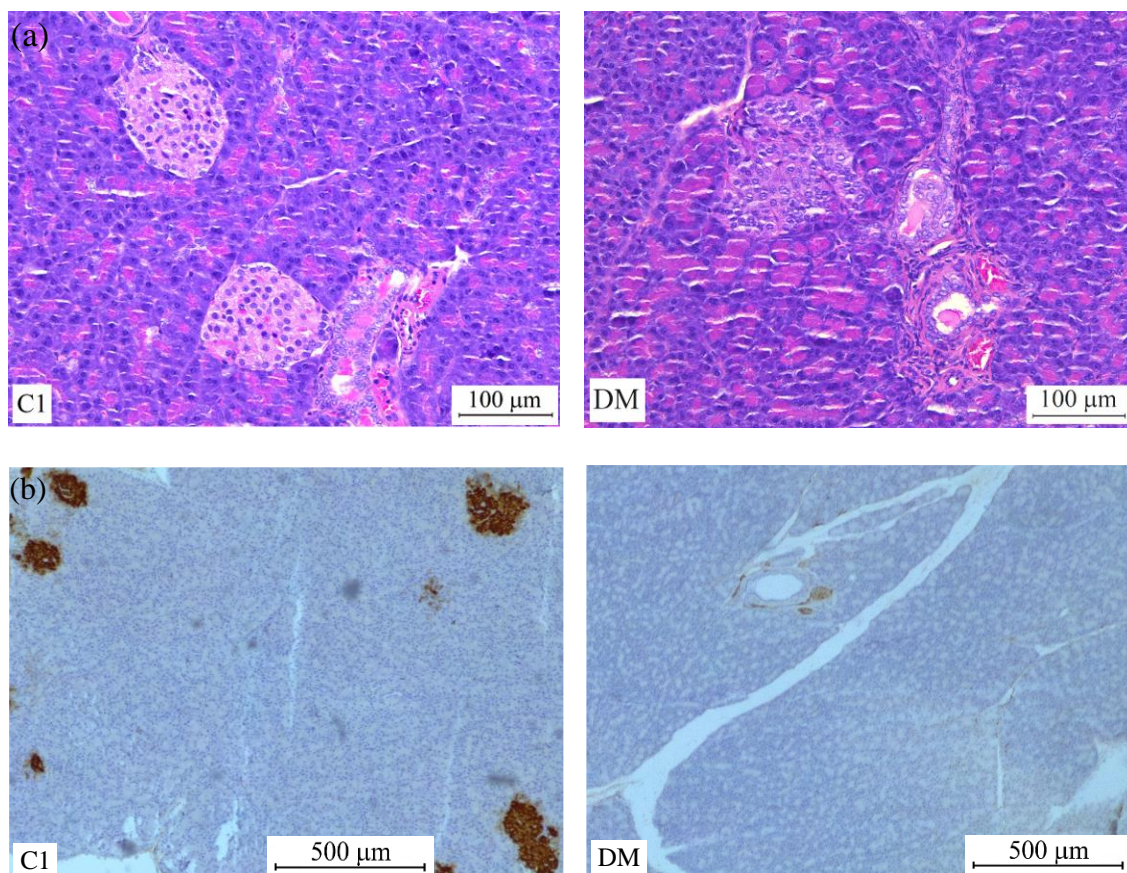


Grafikon 19. Uticaj dijabetesa melitusa na histomorfometrijske parametre aorte pacova: (a) debljinu tunike medije, (b) broj elastičnih lamina i (c) rastojanje između elastičnih lamina. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg). $p > 0,05$ – T test za nevezane uzorke.

Tabela 2 Uticaj dijabetes melitusa na histomorfometrijske parametre pankreasa pacova.

Parametri	Grupe [medijana (najmanja-najveća vrednost)]		
	C1	DM	p vrednost
Broj Langerhansovih ostrvaca po mm² pankreasnog tkiva	0,81 (0,69-2,87)	0,29 (0,13-0,91)	0,009
Dijametar Langerhansovih ostrvaca (μm)	85,52 (31,72-306,65)	102,57 (44,96-206,03)	0,437
Površina Langerhansovih ostrvaca (μm²)	5702,5 (789-60556)	9777 (1926-33665)	0,229
Broj ćelija u Langerhansovom ostrvcu	43,5 (7-406)	65 (16-234)	0,201
Broj ćelija po mm² Langerhansovog ostrvca	7643,5 (4614,4-15755,3)	7507,0 (4662,6-11160,7)	0,861

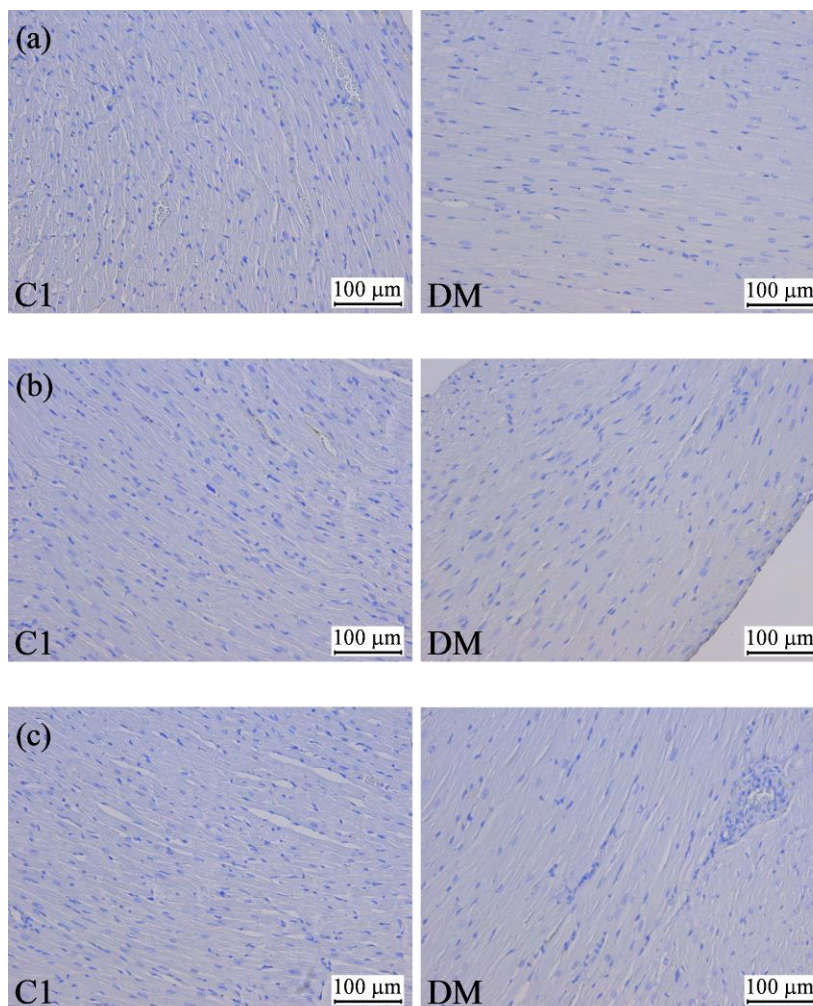
C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg). *Mann-Whitney* test.



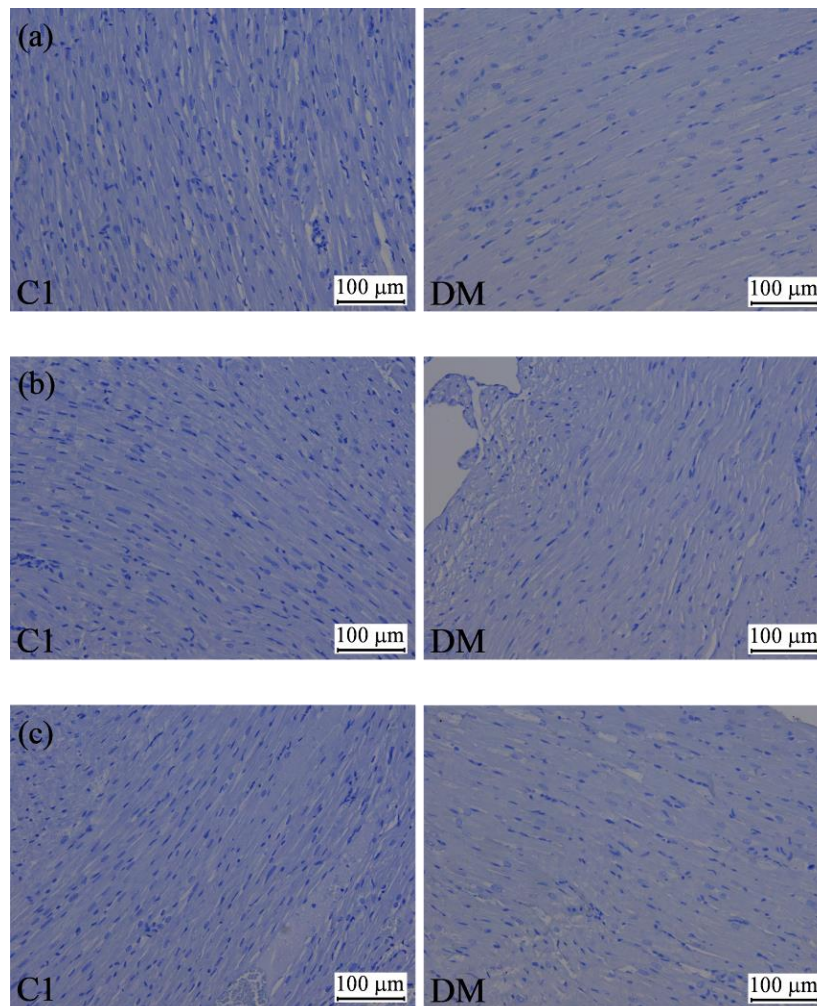
Slika 10. Poprečni presek pankreasa pacova (a) hematoksilin/eozin bojenje, uvećanje 200 puta, (b) imunohistohemijsko bojenje na insulin, uvećanje 50 puta. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg).

4.1.10. Imunohistohemijska analiza uzoraka tkiva srca

Pozitivnost BCL-2 i BCL-6 nije uočena ni u jednoj ćeliji reprezentativnih uzoraka srčanog tkiva (Slika 11 i 12). Pozitivnost Ki-67 je uočena u pojedinim ćelijama srčanog tkiva bez postojanja statistički značajne razlike između grupe DM i C1 (Tabela 3, Slika 13). Pozitivnost PCNA je bila statistički značajno manja u zidu LK, DK i IVS u grupi pacova sa DM nego u kontrolnoj grupi (Tabela 3, Slika 14).



Slika 11. Uticaj dijabetes melitusa na imunohistohemijsku ekspresiju BCL-2 u (a) levoj komori, (b) desnoj komori i (c) interventrikularnom septumu srca pacova. Na preparatima se mogu videti BCL-2 negativna jedra kardiomiocita prebojena plavo (uvećanje 200 puta). C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg).

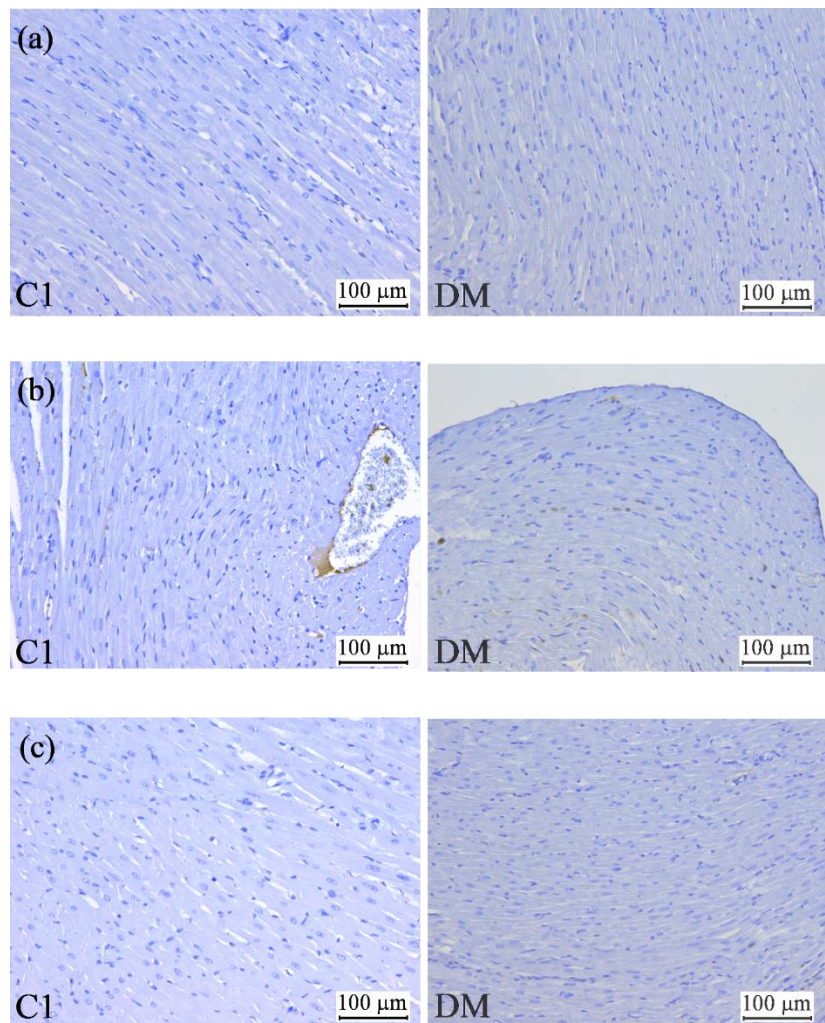


Slika 12. Uticaj dijabetes melitusa na imunohistohemijsku ekspresiju BCL-6 u (a) levoj komori, (b) desnoj komori i (c) interventrikularnom septumu srca pacova. Na preparatima se mogu videti BCL-6 negativna jedra kardiomiocita prebojena plavo (uvećanje 200 puta). C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg).

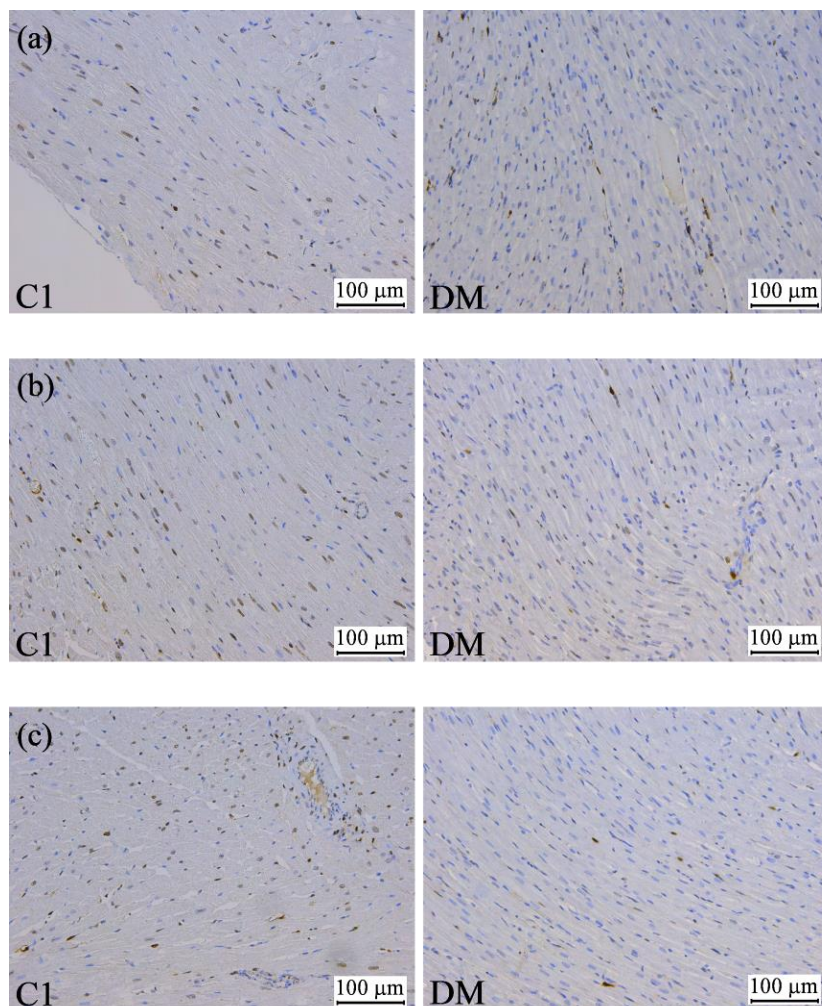
Tabela 3. Uticaj dijabetes melitusa na imunohistohemijske parametre srca pacova.

Parametri	Grupe [medijana (najmanja-najveća vrednost)]		p vrednost
	C1	DM	
Ki-67+ (LK)	0 (0-0)	0 (0-0)	1,000
Ki-67+ (DK)	0 (0-0)	0 (0-2)	0,317
Ki-67+ (IVS)	0 (0-0)	0 (0-1)	0,317
PCNA+ (LK)	4 (3-7)	2 (1-3)	0,048
PCNA+ (DK)	6 (5-7)	2,5 (1-4)	0,034
PCNA+ (IVS)	4 (4-5)	1,5 (0-3)	0,032

LK –leva komora; DK –desna komora; IVS –interventrikularni septum; C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg). *Mann-Whitney* test.



Slika 13. Uticaj dijabetes melitusa na imunohistohemijsku ekspresiju Ki-67 u (a) levoj komori, (b) desnoj komori i (c) interventrikularnom septumu srca pacova. Na preparatima se mogu videti Ki-67 pozitivna jedra kardiomiocita prebojena smeđe i Ki-67 negativna jedra kardiomiocita prebojena plavo (uvećanje 200 puta). C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg).

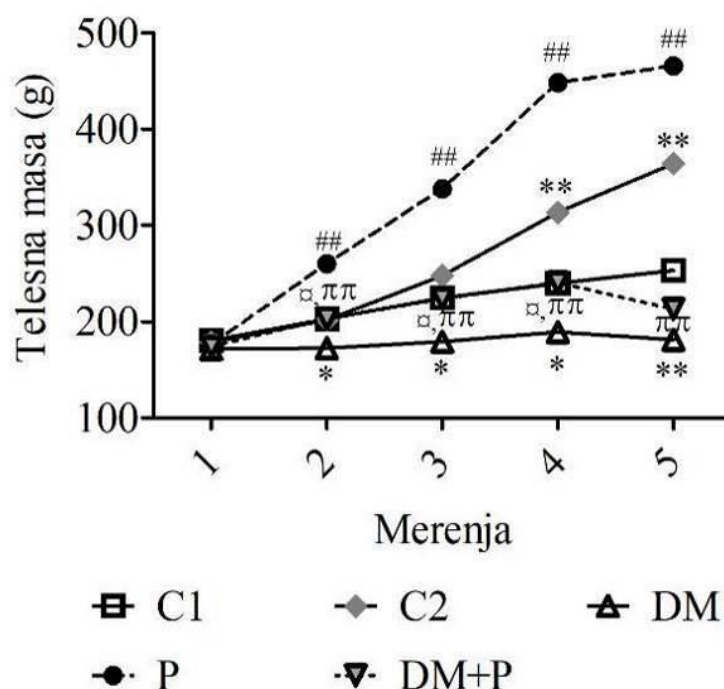


Slika 14. Uticaj dijabetesa melitusa na imunohistohemijsku ekspresiju PCNA u (a) levoj komori, (b) desnoj komori i (c) interventrikularnom septumu srca pacova. Na preparatima se mogu videti PCNA pozitivna jedra kardiomiocita prebojena smeđe i PCNA negativna jedra kardiomiocita prebojena plavo (uvećanje 200 puta). C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg).

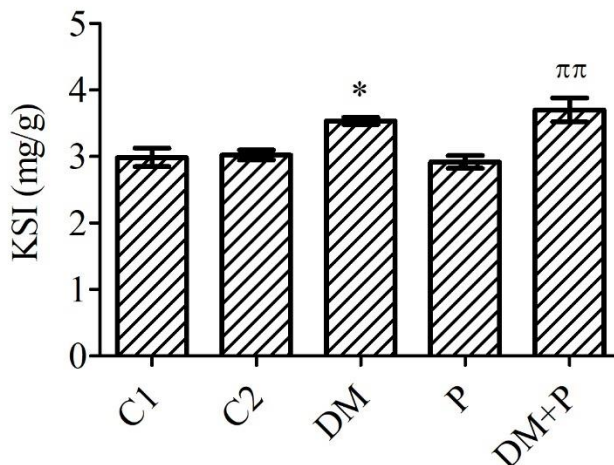
4.2. UTICAJ PRIMENE VITAMINA B6 NA ISPITIVANE PARAMETRE

4.2.1. Telesna masa i kardiosomatski indeks

Na početku eksperimentalnog perioda nisu postojale razlike u telesnoj masi između testiranih grupa. Tokom perioda od četiri nedelje uočava se sporije napredovanje u masi, kako pacova sa DM bez tretmana, tako i onih koji su pored DM imali tretman piridoksinom (Grafikon 20). Telesna masa pacova u ove dve grupe se nije značajno razlikovala na kraju eksperimentalnog perioda ($p = 0,564$). Primena piridoksina kod zdravih pacova, dovela je do značajnog porasta u telesnoj masi. Posle 4 nedelje tretmana prosečna telesna masa u grupi P ($465,5 \pm 6,3$ g) bila je za oko 30 % veća nego u grupi C2 ($364 \pm 8,3$ g, $p < 0,001$) i za više od dva puta veća nego u grupi DM+P ($213,25 \pm 10,6$ g, $p < 0,001$). Postojanje DM kod netretiranih i pacova tretiranih piridoksinom dovelo je do značajnog povećanja KSI, bez značajnih razlika između ove dve grupe ($p = 0,991$) (Grafikon 21). U grupi DM+P KSI je bio za oko 27 % veći od vrednosti dobijenih u grupi P ($p = 0,001$).



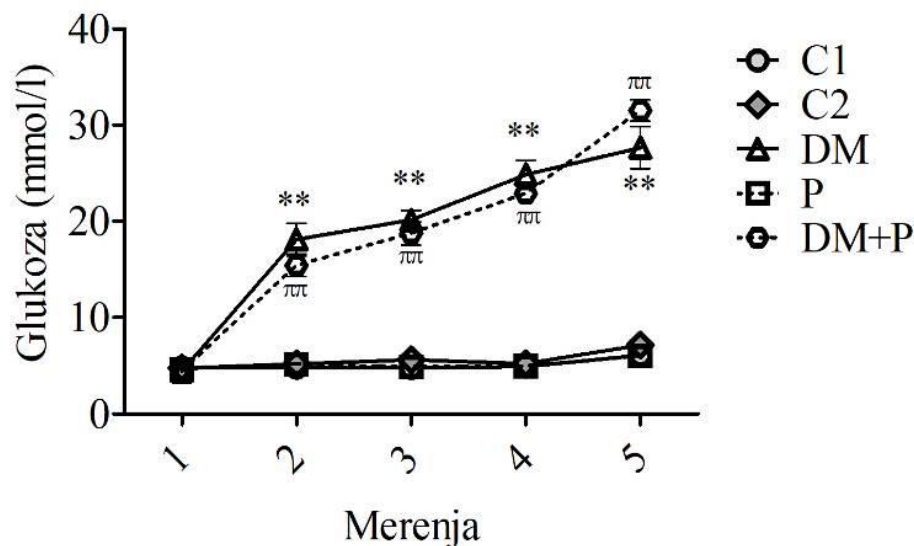
Grafikon 20. Uticaj dijabetes melitusa i primene piridoksina na telesnu masu pacova tokom 4 nedelje. Merenja su vršena (1) na početku eksperimentalnog perioda, (2) prve nedelje, (3) druge nedelje, (4) treće nedelje i (5) četvrte nedelje. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, $^{\pi}$ $p < 0,05$ u poređenju sa DM grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa C2 grupom, $^{\pi\pi}$ $p < 0,01$ u poređenju sa P grupom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom.



Grafikon 21. Uticaj dijabetes melitusa i primene piridoksina na kardiosomatski indeks (KSI) pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, $\pi\pi$ $p < 0,01$ u poređenju sa P grupom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom.

4.2.2. Biohemijski parametri

Povišen nivo glukoze u krvi pronađen je 72 sata nakon primene STZ kod svih tretiranih životinja. Tokom perioda praćenja od 4 nedelje nivo glukoze je bio u porastu kako u DM tako i u DM+P grupi bez postojanja statistički značajnih razlika između ove dve grupe (Grafikon 22). Primena piridoksina kod zdravih pacova nije uticala na vrednosti glikemije. Na kraju eksperimentalnog perioda, nivo glukoze u grupi DM+P ($31,5 \pm 1,1$ mmol/l) nije se značajno razlikovao od vrednosti izmerenih u DM grupi ($27,7 \pm 2,2$ mmol/l, $p = 0,382$), međutim bio je značajno povišen u poređenju sa P grupom ($6,0 \pm 0,1$ mmol/l, $p < 0,001$).



Grafikon 22. Uticaj dijabetes melitusa i primene piridoksina na koncentraciju glukoze u krvi pacova tokom 4 nedelje. Merenja su vršena (1) na početku eksperimentalnog perioda, (2) 72 h nakon primene STZ (3) druge nedelje, (4) treće nedelje i (5) četvrte nedelje. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana. ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, $\pi\pi$ $p < 0,01$ u poređenju sa P grupom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom.

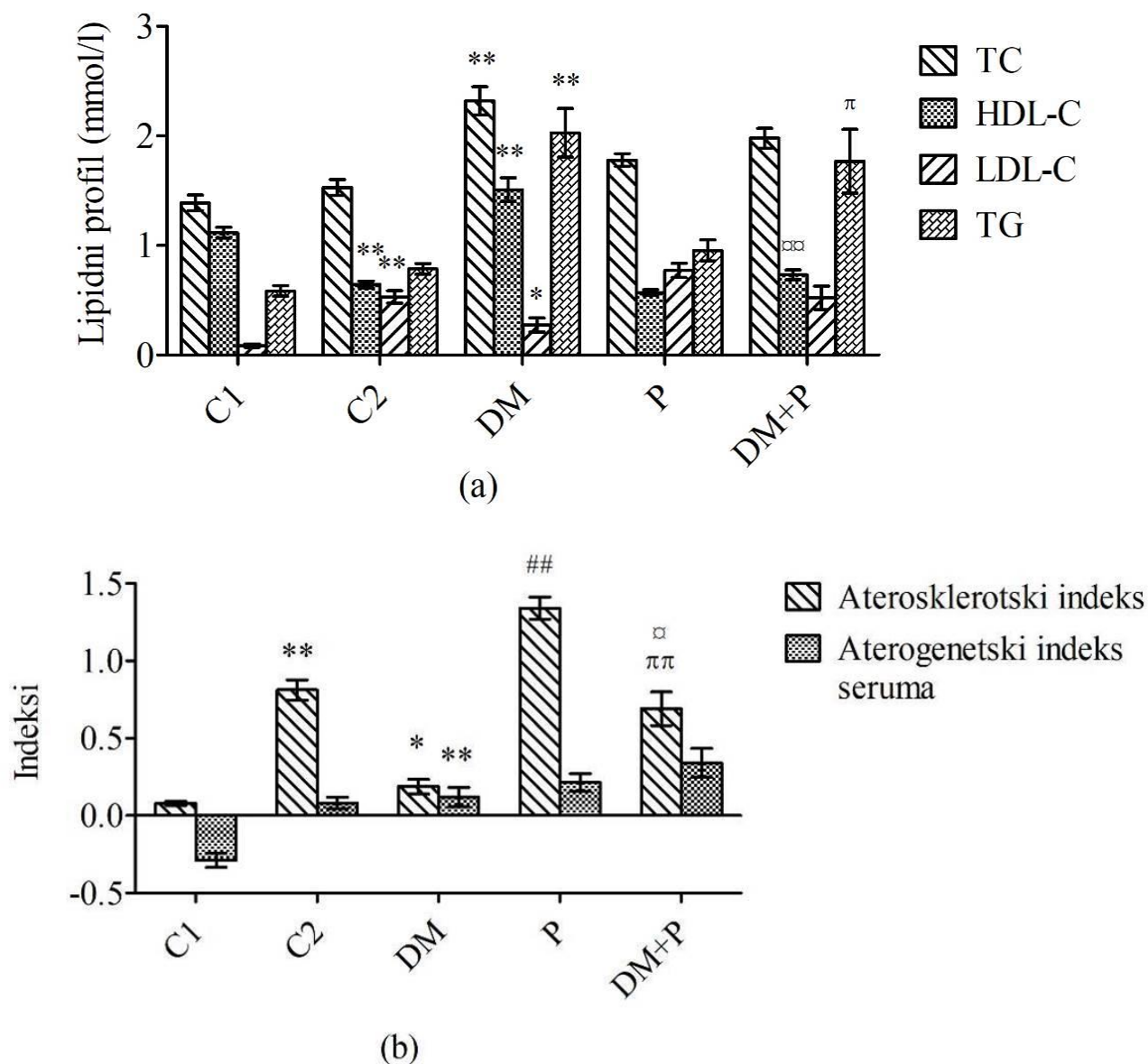
U Tabeli 4 prikazan je uticaj primene piridoksina na vrednosti pojedinih biohemijskih parametara u serumu i plazmi eksperimentalnih životinja. Primena piridoksina kod pacova sa DM dovela je do značajnog sniženja nivoa Hcy u poređenju sa P grupom ($p < 0,001$). U grupi DM+P uočavaju se više vrednosti LDH u poređenju sa P grupom ($p = 0,042$). Primena piridoksina nije uticala na vrednosti LDH u serumu zdravih pacova, kao ni na vrednosti hs cTnT u serumu zdravih i pacova sa DM. Parametri hemostaze su se značajno razlikovali između grupa. Primena piridoksina nije dovela do povećanja smanjene koncentracije fibrinogena u plazmi pacova nastale usled DM (DM+P u poređenju sa DM grupom – $p = 0,176$), takođe, ni kod zdravih pacova nisu uočene promene u koncentraciji fibrinogena nakon primene piridoksina (P u poređenju sa C2 grupom – $p = 0,498$). U DM+P grupi uočava se povećana vrednost vWF u poređenju sa P grupom ($p = 0,001$).

Tabela 4. Uticaj dijabetes melitusa i primene piridoksina na vrednosti pojedinih biohemijskih parametara u serumu i plazmi eksperimentalnih životinja

Parametri	Grupe (srednja vrednost \pm SEM)				
	C1	C2	DM	P	DM+P
Hcy (mmol/l)	9,0 \pm 0,5	10,4 \pm 0,6	8,3 \pm 0,4	11,1 \pm 0,4	5,3 \pm 0,3 $\pi\pi$
LDH (U/l)	3887,1 \pm 358,5	4438,4 \pm 331,7	3913,6 \pm 249,3	3291,9 \pm 169,3	4977,1 \pm 449,1 π
hs cTnT (ng/L)	25,8 \pm 6,2	23,1 \pm 2,4	6,4 \pm 1,0 *	24,1 \pm 8,0	19,6 \pm 7,1
Fibrinogen (g/l)	2,6 \pm 0,3	2,2 \pm 0,1	1,2 \pm 0,2 **	1,7 \pm 0,1	1,9 \pm 0,3
vWF Ac (%)	214,3 \pm 30,4	99,4 \pm 4,3	467,9 \pm 43,6**	196,7 \pm 11,4	376,6 \pm 38,5 $\pi\pi$

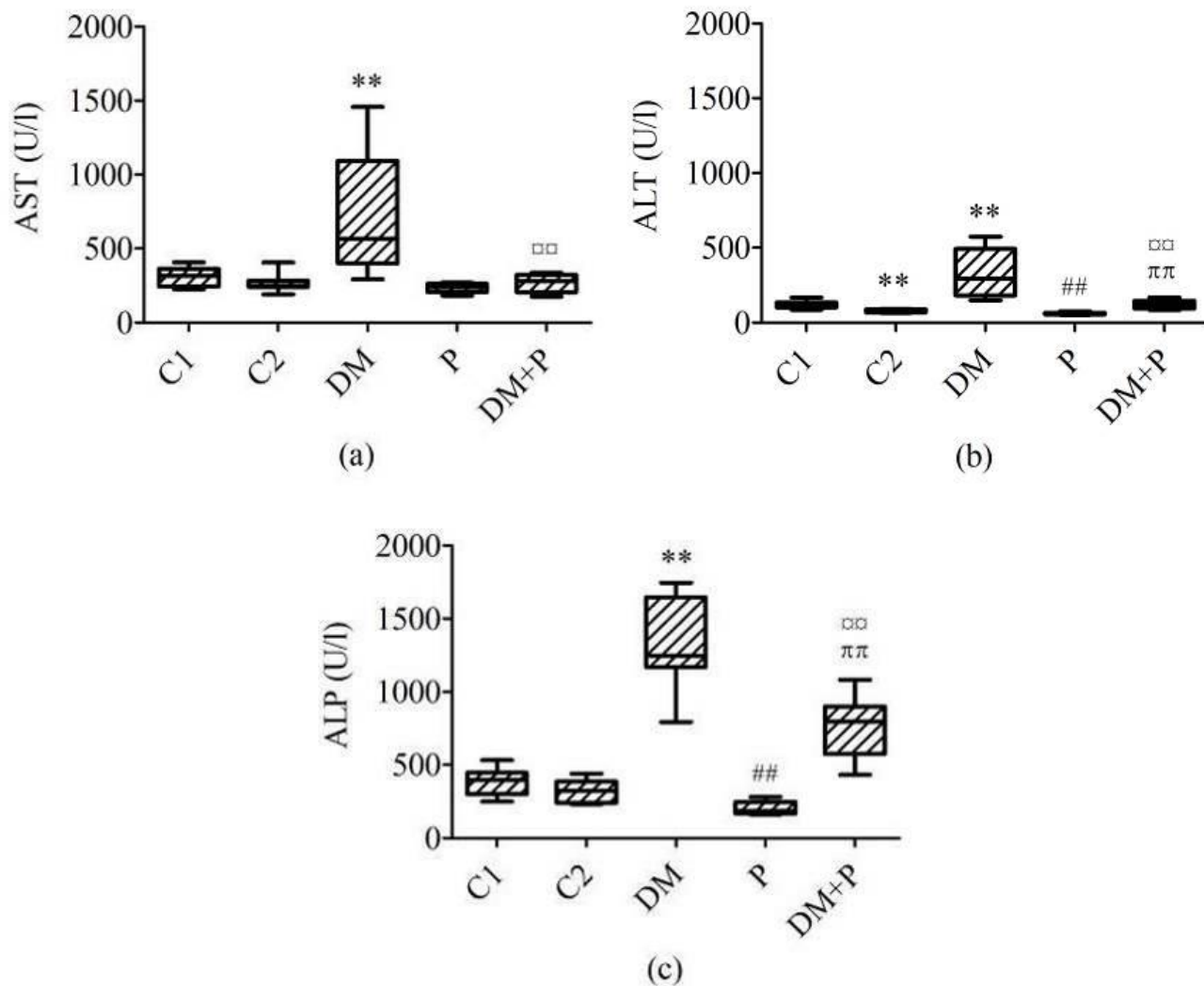
Hcy – homocistein; LDH – laktat dehidrogenaza; hs cTnT – srčani troponin T; vWF – fon Vilebrand faktor; Ac (%) – procenat fiziološke vrednosti; SEM – standardna greška; C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, π $p < 0,05$ u poređenju sa P grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, $\pi\pi$ $p < 0,01$ u poređenju sa P grupom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom.

Upoređivanjem parametara lipidnog profila (TC, HDL-C, LDL-C i TG) uočene su statistički značajne razlike (Grafikon 23 a). DM je doveo do povećanja svih praćenih parametara u poređenju sa C1 grupom. Primena piridoksina nije uticala na ove parametre kod zdravih pacova, dok se kod pacova sa DM tretiranim piridoksinom uočava da nema razlike u TC i LDL-C u poređenju sa P grupom ($p = 0,852, 0,297$, redom). Međutim do značajnog smanjenja HDL-C dovela je primena piridoksina u DM+P grupi u poređenju sa DM grupom ($p < 0,001$). TG je bio značajno povišen u grupi DM+P u poređenju sa P grupom ($p = 0,037$) i bez postojanja razlike između DM+P i DM grupa ($p = 0,978$). Iznenadujuće, primena piridoksina je povećala AI, kako kod zdravih, tako i kod pacova sa DM, a nije uticala na vrednosti AIS (Grafikon 23 b).

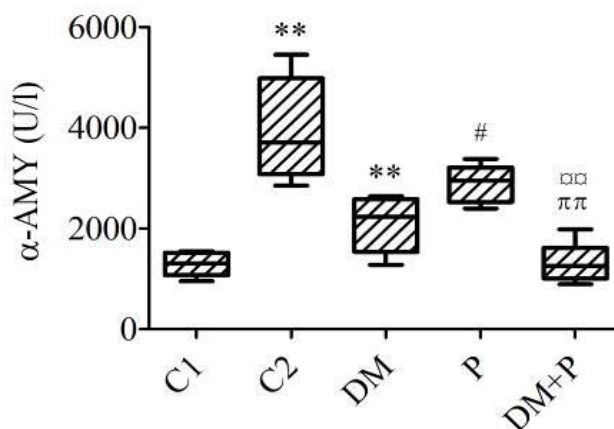


Grafikon 23. Uticaj dijabetesa melitusa i primene piridoksina na (a) lipidni profil i (b) indekse pokazatelje aterosklerotskog rizika u serumu pacova. TC – ukupan holesterol; HDL-C – holesterol lipoproteina visoke gustine; LDL-C – holesterol lipoproteina niske gustine; TG – trigliceridi; C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, ^π $p < 0,05$ u poređenju sa DM grupom, ^{ππ} $p < 0,05$ u poređenju sa P grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, ^{##} $p < 0,01$ u poređenju sa C2 grupom, ^{πππ} $p < 0,01$ u poređenju sa DM grupom, ^{πππ} $p < 0,01$ u poređenju sa P grupom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom.

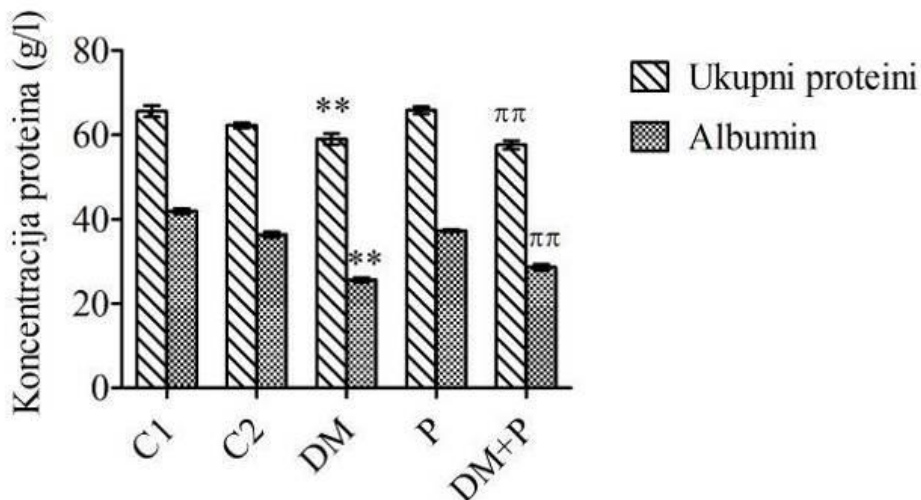
Na Grafikonu 24 prikazana je aktivnost hepatičnih enzima u serumu. Tretman piridoksinom je smanjio vrednosti AST u serumu pacova sa DM u poređenju sa DM grupom za oko 50 % ($p = 0,003$) i doveo ga do vrednosti koje se nisu razlikovale od vrednosti dobijenih u P grupi ($p = 0,294$). Poređenjem vrednosti u P i C2 grupi nisu dobijene statistički značajne razlike ($p = 0,23$). Piridoksin je doveo do smanjenja ALT aktivnosti kod zdravih pacova u poređenju sa C2 grupom ($p = 0,002$). Slične efekte uočavamo i pri poređenju aktivnosti ALT između DM+P (116,5 (84-167) U/l) i DM grupe (294,5 (149-1574) U/l, ($p = 0,002$), međutim iako je tretman piridoksinom smanjio povećane vrednosti ALT izazvane postojanjem DM, u grupi DM+P se uočava porast aktivnosti u poređenju sa aktivnošću u grupi P (60 (52-74) U/l, $p = 0,001$). Poređenjem vrednosti ALP uočavamo sličnu dinamiku promena aktivnosti kao i za ALT. Piridoksin je doveo do smanjenja ALP aktivnosti kod zdravih pacova u poređenju sa C2 grupom ($p = 0,004$). Pri poređenju aktivnosti ALP između DM+P i DM grupe postoji statistički značajno smanjenje aktivnosti u grupi tretiranoj piridoksinom ($p = 0,003$), međutim u grupi DM+P se uočava porast aktivnosti u poređenju sa aktivnošću u grupi P ($p = 0,001$). Primena piridoksina kod pacova sa DM značajno je smanjila aktivnost α -AMY u poređenju sa DM ($p = 0,009$) i P grupom ($p = 0,001$, Grafikon 25). Primena piridoksina nije značajno uticala na prethodno smanjene koncentracije ukupnih proteina i albumina kod pacova sa DM (Grafikon 26). Rezultati pokazuju da nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji ukupnih proteina i albumina pri poređenju vrednosti u DM+P i DM grupi ($p = 0,996$, $p = 0,08$, redom), ali i da je njihova vrednost bila smanjena u DM+P u poređenju sa P grupom ($p < 0,001$ za oba parametra).



Grafikon 24. Uticaj dijabetes melitusa i primene piridoksina na aktivnost (a) aspartat aminotransferaze (AST), (b) alanin aminotransferaze (ALT) i (c) alkalne fosfataze (ALP) u serumu pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana. ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa C2 grupom, ππ $p < 0,01$ u poređenju sa DM grupom, πππ $p < 0,01$ u poređenju sa P grupom – *Kruskal-Wallis* test praćen *Mann-Whitney* testom.

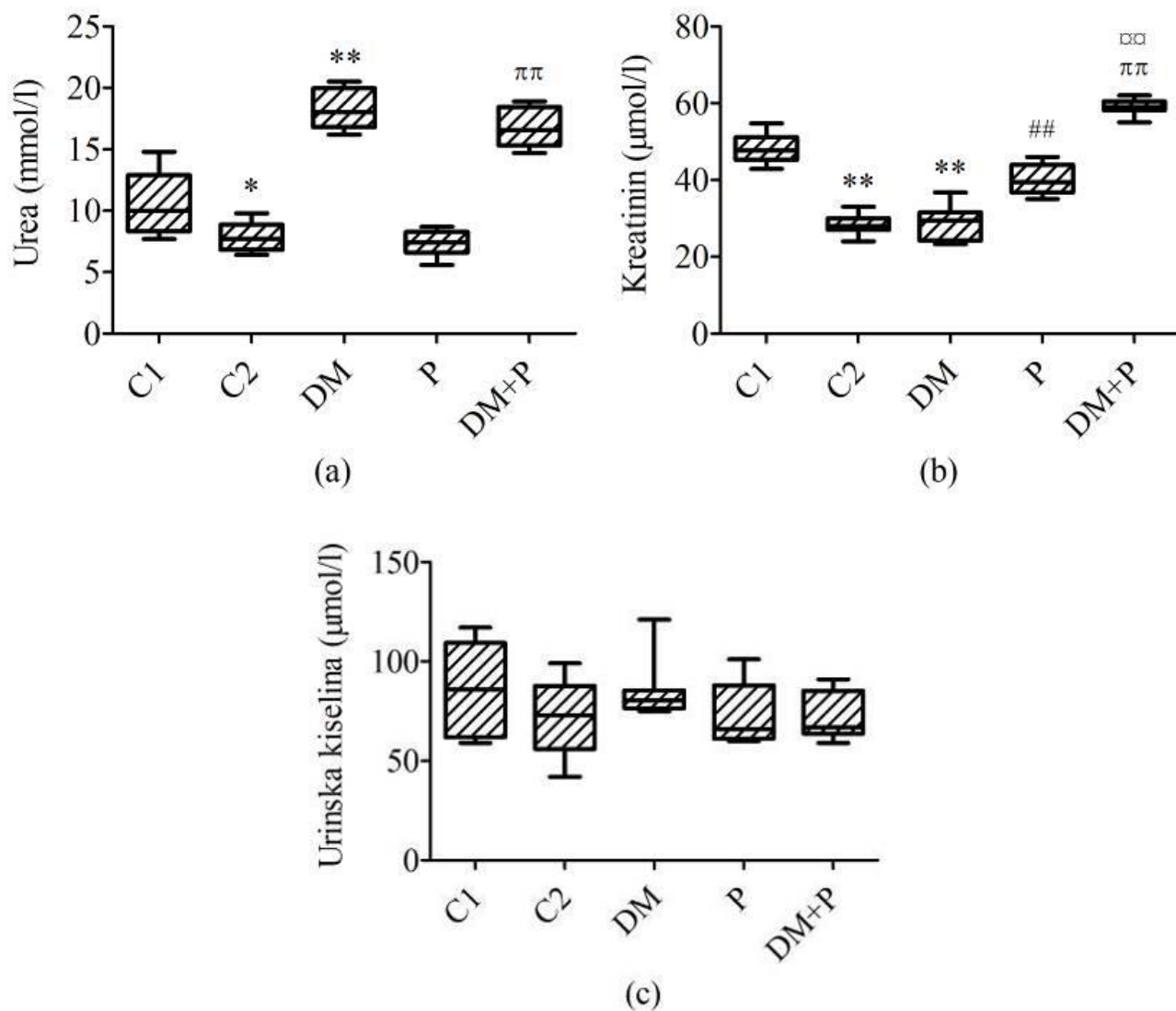


Grafikon 25. Uticaj dijabetes melitusa i primene piridoksina na aktivnost α -amilaze (α -AMY) u serumu pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana. # $p < 0,05$ u poređenju sa C2 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, $\pi\pi$ $p < 0,01$ u poređenju sa DM grupom, $\pi\pi$ $p < 0,01$ u poređenju sa P grupom – *Kruskal-Wallis* test praćen *Mann-Whitney* testom.



Grafikon 26. Uticaj dijabetes melitusa i primene piridoksina na koncentraciju ukupnih proteina i albumina u serumu pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana. ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, $\pi\pi$ $p < 0,01$ u poređenju sa P grupom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom.

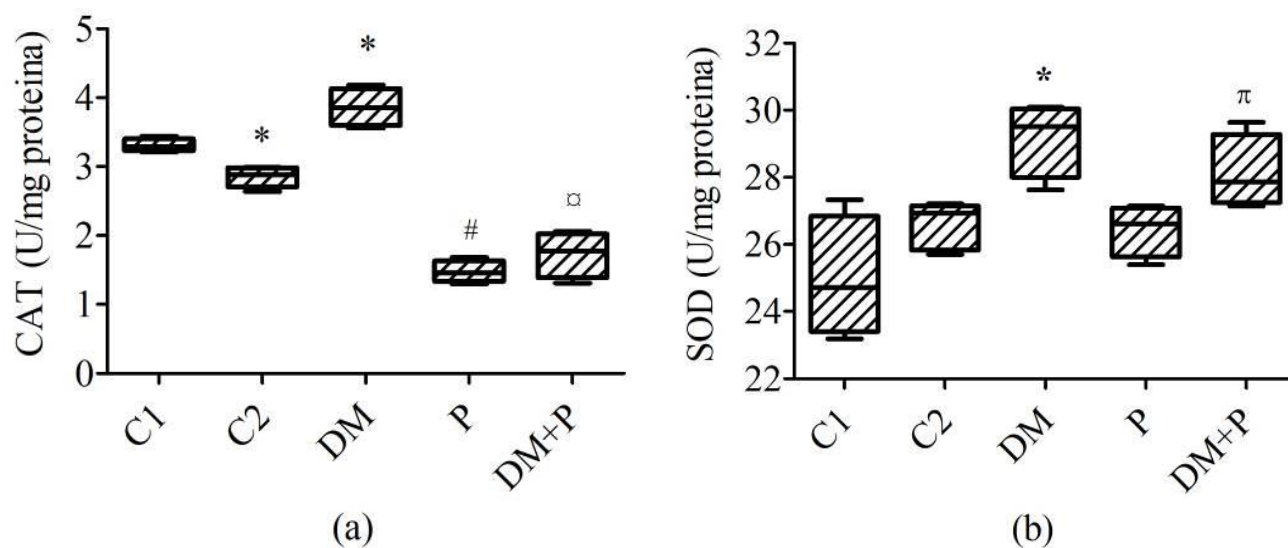
Parametri bubrežne funkcije, koncentracija uree i kreatinina u serumu, pokazali su razlike među ispitivanim grupama (Grafikon 27 a i b). Tretman piridoksinom nije uticao na koncentraciju uree ni kod zdravih ni kod pacova sa DM. Statistički značajna razlika se uočava između DM+P i P grupe ($p = 0,001$). Za razliku od uree, kreatinin je bio povećan pri poređenju vrednosti u P i C2 grupi ($p < 0,001$) i pri poređenju vrednosti u DM+P i DM ($p = 0,001$), kao i DM+P i P grupi ($p = 0,001$). Poređenjem koncentracije urinske kiseline u serumu, nisu dobijene razlike između grupa (Grafikon 27 c).



Grafikon 27. Uticaj dijabetes melitusa i primene piridoksina na koncentraciju (a) uree, (b) kreatinina i (c) urinske kiseline u serumu pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, ### $p < 0,01$ u poređenju sa C2 grupom, ππ $p < 0,01$ u poređenju sa DM grupom, ππ $p < 0,01$ u poređenju sa P grupom – Kruskal-Wallis test praćen Mann-Whitney testom.

4.2.3. Aktivnost antioksidativnih enzima u tkivu srca pacova

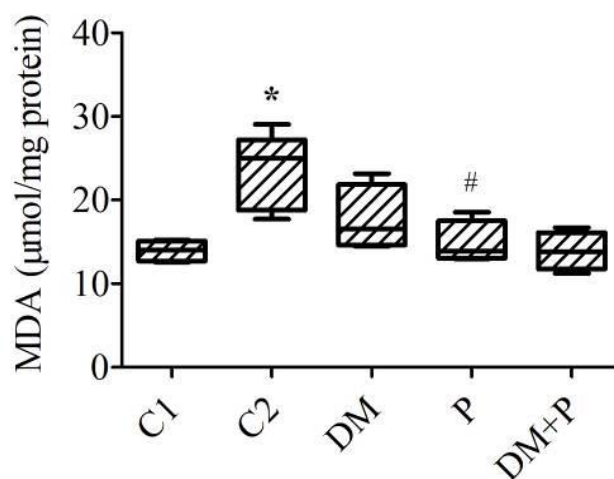
Davanje piridoksina praćeno je smanjenjem aktivnosti CAT za oko 50 %, kako kod zdravih ($p = 0,014$, pri poređenju vrednosti u P i C2 grupi), tako i kod pacova sa indukovanim DM ($p = 0,021$, pri poređenju vrednosti u DM+P i DM grupi, Grafikon 28a). Za razliku od efekata na aktivnost CAT, primena piridoksina nije uticala na vrednosti SOD ($p = 0,624$, pri poređenju vrednosti u P i C2 grupi i $p = 0,149$, pri poređenju vrednosti u DM+P i DM grupi, Grafikon 28b)



Grafikon 28. Uticaj dijabetes melitusa i primene piridoksina na aktivnost (a) katalaze (CAT) i (b) superoksid dismutaze (SOD) u tkivu srca pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, # $p < 0,05$ u poređenju sa C2 grupom, $^{\pi}$ $p < 0,05$ u poređenju sa DM grupom, $^{\pi}$ $p < 0,05$ u poređenju sa P grupom – *Kruskal-Wallis* test praćen *Mann-Whitney* testom.

4.2.4. Indeks lipidne peroksidacije u tkivu srca pacova

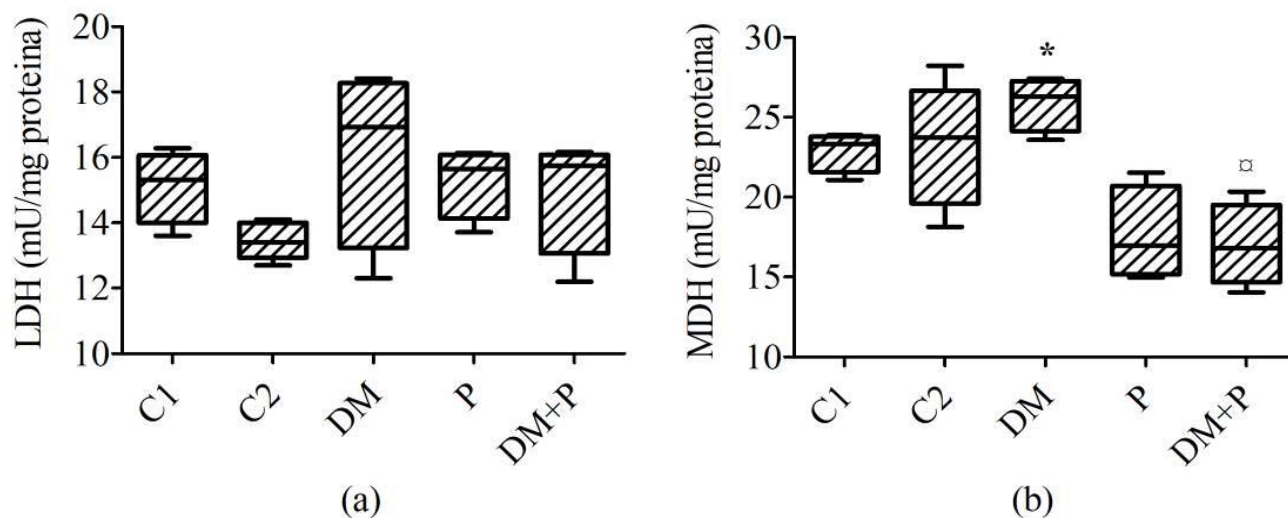
Koncentracija MDA bila je značajno povišena u grupi C2 u poređenju sa grupom C1 ($p = 0,014$). Primena piridoksina nije uticala na vrednost MDA kod pacova sa DM, ali je značajno smanjila ovu vrednost kod zdravih pacova u grupi P u poređenju sa vrednošću u grupi C2 ($p = 0,027$, Grafikon 29).



Grafikon 29. Uticaj dijabetes melitusa i primene piridoksina na koncentraciju malondialdehida (MDA) u tkivu srca pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, # $p < 0,05$ u poređenju sa C2 grupom – *Kruskal-Wallis* test praćen *Mann-Whitney* testom.

4.2.5. Aktivnost laktat i malat dehidrogenaze u tkivu srca pacova

Aktivnost LDH u srčanom tkivu pacova nije se značajno razlikovala među testiranim grupama ($p > 0,05$, Grafikon 30 a), međutim postojale su razlike u aktivnosti MDH u srčanom tkivu pacova ($p < 0,05$). Tretman piridoksinom u grupi DM+P je smanjio aktivnost ovog enzima za oko 37 % u odnosu na vrednosti u grupi DM ($p = 0,021$, Grafikon 30 b).

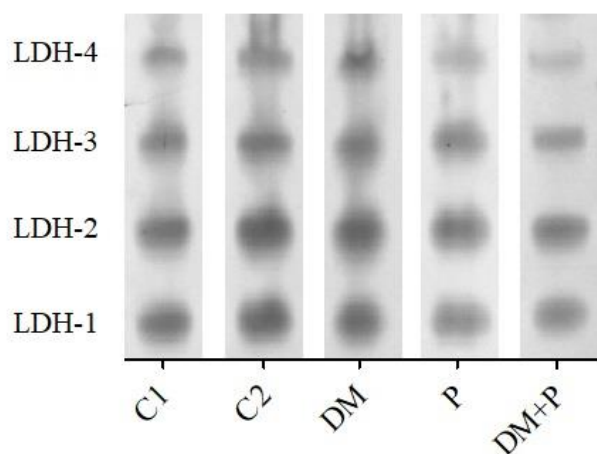


Grafikon 30. Uticaj dijabetesa i primene piridoksina na aktivnost (a) laktat dehidrogenaze (LDH) i (b) malat dehidrogenaze (MDH) u tkivu srca pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, □ $p < 0,05$ u poređenju sa DM grupom – *Kruskal-Wallis* test praćen *Mann-Whitney* testom.

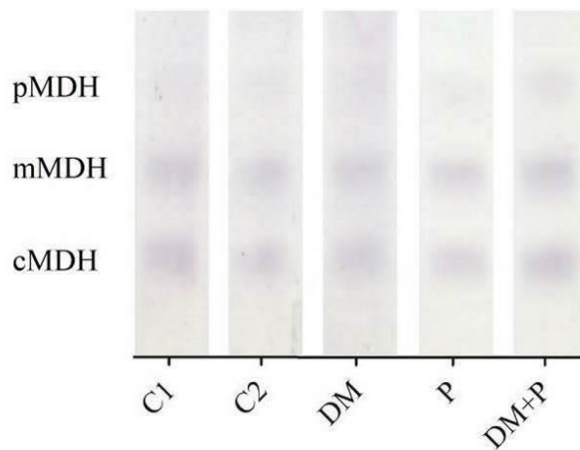
4.2.6. Izoforme laktat i malat dehidrogenaze u tkivu srca pacova

U tkivu srca svih testiranih eksperimentalnih životinja su detektovane četiri LDH izoforme (LDH-1, LDH-2, LDH-3 i LDH-4) i tri MDH izoforme (pMDH, mMDH i cMDH, Slika 15 i 16). U svim grupama LDH-4 izoforma je imala najmanju zastupljenost (Grafikon 31). Relativna aktivnost LDH-2 izoforme se nije razlikovala među grupama. Poređenjem P i C2 grupe, statistički značajna razlika dobijena je za relativnu aktivnost LDH-3 ($p = 0,002$) i LDH-4 ($p = 0,037$). Primena piridoksina je dovela do povećanja relativne aktivnosti LDH-3 i LDH-4 kod zdravih pacova u grupi P ($25,04 \pm 0,45$ %, $10,54 \pm 0,20$ %, redom) u poređenju sa grupom C2 ($22,16 \pm 0,36$ %, $9,27 \pm 0,28$ %, redom). Kod pacova sa DM primena piridoksina je povećala ($31,19 \pm 0,97$ %) prethodno smanjenu relativnu aktivnost LDH-1 u DM grupi ($23,26 \pm 0,71$ %, $p < 0,001$). Aktivnost LDH-3 je bila značajno smanjena u grupi DM+P ($22,05 \pm 0,44$ %) u poređenju sa prethodno povećanom vrednošću u DM grupi ($29,19 \pm 0,68$ %, $p < 0,001$). Takođe, primena piridoksina je smanjila aktivnost LDH-4 u grupi DM+P ($10,74 \pm 0,19$ %) u poređenju sa prethodno povećanom vrednošću u DM grupi ($13,91 \pm 0,55$ %, $p < 0,001$). Relativna aktivnost izoformi MDH se značajno razlikovala među grupama (Grafikon 32). Poređenjem P i C2 grupe,

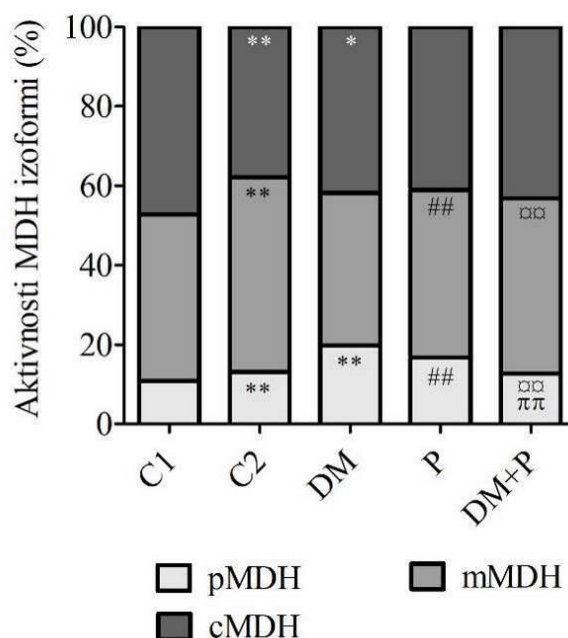
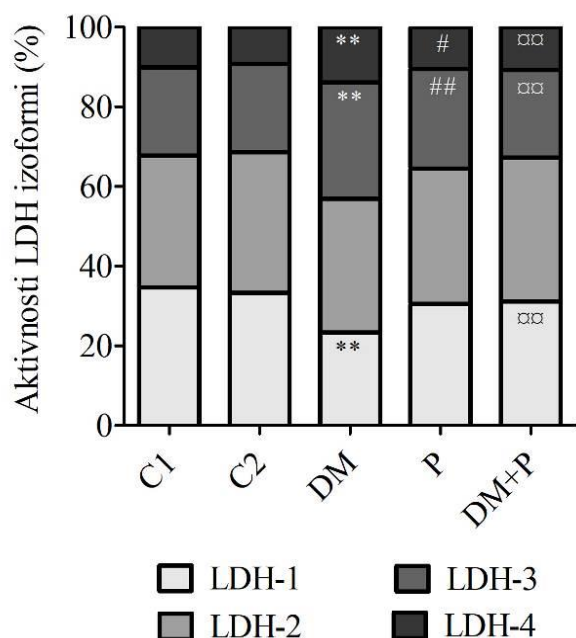
statistički značajna razlika dobijena je za relativnu aktivnost pMDH ($p < 0,001$) i mMDH ($p < 0,001$). Primena piridoksina je dovela do povećanja relativne aktivnosti pMDH ($16,68 \pm 0,18 \%$) i do smanjenja relativne aktivnosti mMDH ($42,30 \pm 1,22 \%$) kod zdravih pacova u grupi P u poređenju sa grupom C2 ($13,07 \pm 0,24 \%$, $49,00 \pm 0,63 \%$, redom). Kod pacova sa DM primena piridoksina je dovela do smanjenja relativne aktivnosti pMDH ($12,71 \pm 0,34 \%$) u poređenju sa DM ($19,76 \pm 0,40 \%$, $p < 0,001$) i P grupom ($16,68 \pm 0,18 \%$, $p < 0,001$). Primena piridoksina je dovela do povećanja relativne aktivnosti mMDH u grupi DM+P ($44,11 \pm 0,83 \%$) u poređenju sa DM grupom ($38,41 \pm 0,67 \%$, $p = 0,001$).



Slika 15. Reprezentativni zimogrami aktivnosti izoformi laktat dehidrogenaze (LDH-1, LDH-2, LDH-3 i LDH-4) detektovanih u srčanom tkivu pacova nativnom poliakrilamid gel elektroforezom. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana.



Slika 16. Reprezentativni zimogrami aktivnosti izoformi malat dehidrogenaze (MDH) detektovanih u srčanom tkivu pacova nativnom poliakrilamid gel elektroforezom. pMDH – peroksisomalna MDH; mMDH – mitohondrijalna MDH; cMDH – citosolna MDH; C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana.

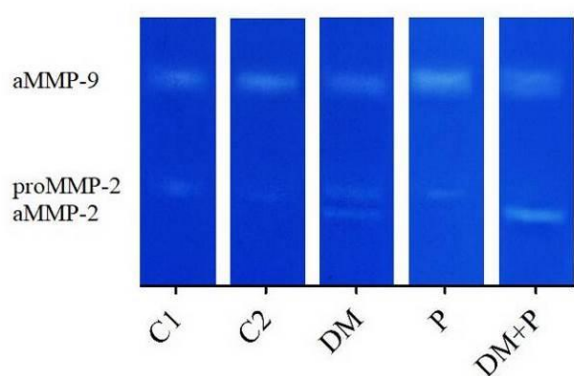


Grafikon 31. Uticaj dijabetes melitusa i primene piridoksina na relativne aktivnosti izoformi laktat dehidrogenaze (LDH) u srčanom tkivu pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana. # $p < 0,05$ u poređenju sa C2 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa C2 grupom, □□ $p < 0,01$ u poređenju sa DM grupom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom.

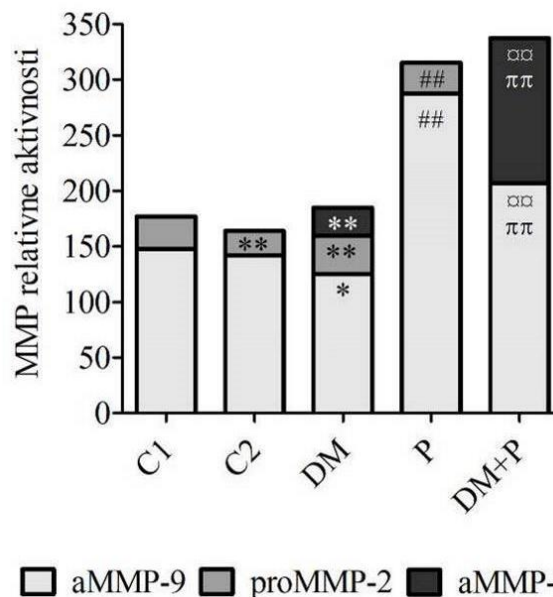
Grafikon 32. Uticaj dijabetes melitusa i primene piridoksina na relativne aktivnosti izoformi malat dehidrogenaze (MDH) u srčanom tkivu pacova. pMDH – peroksizomalna MDH; mMDH – mitohondrijalna MDH; cMDH – citosolna MDH; C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa C2 grupom, □□ $p < 0,01$ u poređenju sa DM grupom, ππ $p < 0,01$ u poređenju sa P grupom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom.

4.2.7. Aktivnost matriksnih metaloproteinaza -2 i -9 u tkivu srca pacova

Na Slici 17 mogu se videti reprezentativni zimogrami aktivnosti MMP-2 i MMP-9 koji su detektovani u srčanom tkivu SDS-PAGE zimografijom. Latentni oblik MMP-2 (proMMP-2 na 72 kDa) se može uočiti u svim testiranim grupama osim u DM+P grupi, dok je aktivni oblik MMP-2 (aMMP-2 na 64 kDa) detektovan samo u DM i DM+P grupi. Relativna aktivnost proMMP-2 bila je za 26 % veća u P grupi, nego u C2 grupi ($p < 0,001$). Relativna aktivnost aMMP-2 bila je za 416 % veća u DM+P nego u DM grupi ($p < 0,001$). Aktivni oblik MMP-9 (aMMP-9 na 83 kDa) detektovan je u svim testiranim grupama. Relativna aktivnost aMMP-9 bila je za 102 % veća u P grupi, nego u C2 grupi ($p < 0,001$). U DM+P grupi uočeno je povećanje aktivnosti aMMP-9 za 65 % u poređenju sa DM grupom ($p < 0,001$) i smanjenje aktivnosti aMMP-9 za 28 % u poređenju sa P grupom ($p < 0,001$, Grafikon 33).



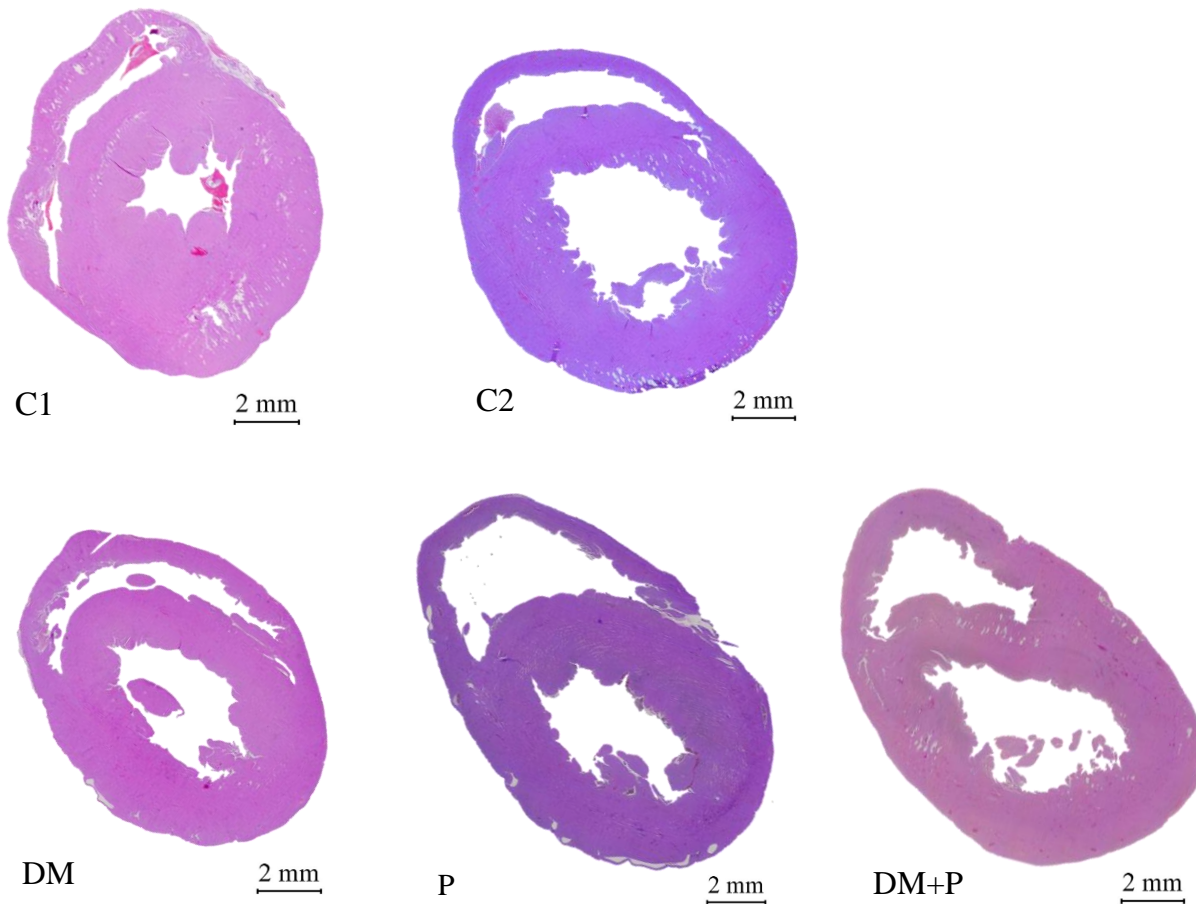
Slika 17. Reprezentativni zimogrami aktivnosti matriksnih proteinaza (MMP) -2 i -9 detektovanih u srčanom tkivu pacova natrijum-dodecil sulfat poliakrilamidnom elektroforezom (eng. *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE*). C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana.



Grafikon 33. Uticaj dijabetes melitusa i primene piridoksina na relativne aktivnosti matriksnih metaloproteinaza (MMP) -2 i -9 u srčanom tkivu pacova. aMMP-9 – aktivni oblik MMP-9; proMMP-2 – latentni oblik MMP-2; aMMP-2 – aktivni oblik MMP-2; C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, ### $p < 0,01$ u poređenju sa C2 grupom, ^{xxx} $p < 0,01$ u poređenju sa DM grupom, ^{ππ} $p < 0,01$ u poređenju sa P grupom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom.

4.2.8. Histološka i morfometrijska analiza uzoraka tkiva srca

Vlakna miokarda bila su pravilno raspoređena, a KM su se odlikovali fiziološkom morfologijom u svim testiranim grupama (Slika 18). U P grupi se uočava značajno povećanje debljine zida LK (2515,8 (2440,0-3262,7) μm) i debljine IVS (2635,4 (2594,2-3330,7) μm) u poređenju sa kontrolnom C2 grupom (2242,6 (1810,0-2290,6) μm , $p = 0,014$, 2014,5 (1709,5-2394,5) μm , $p = 0,014$, redom). U DM+P grupi debljina zida LK (2055,6 (1654,0-2432,6) μm) i IVS (1781,4 (1703,0-1987,2) μm) su bile znatno manje nego u P grupi (2515,8 (2440,0-3262,7) μm , $p = 0,021$, 2635,4 (2594,2-3330,7) μm , $p = 0,021$, redom). Preostala dva testirana parametra, debljina zida DK i transversalni prečnik KM se nisu razlikovala među grupama (Tabela 5).



Slika 18. Poprečni presek srca pacova (hematoksilin/eozin bojenje, uvećanje 50 puta). C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana.

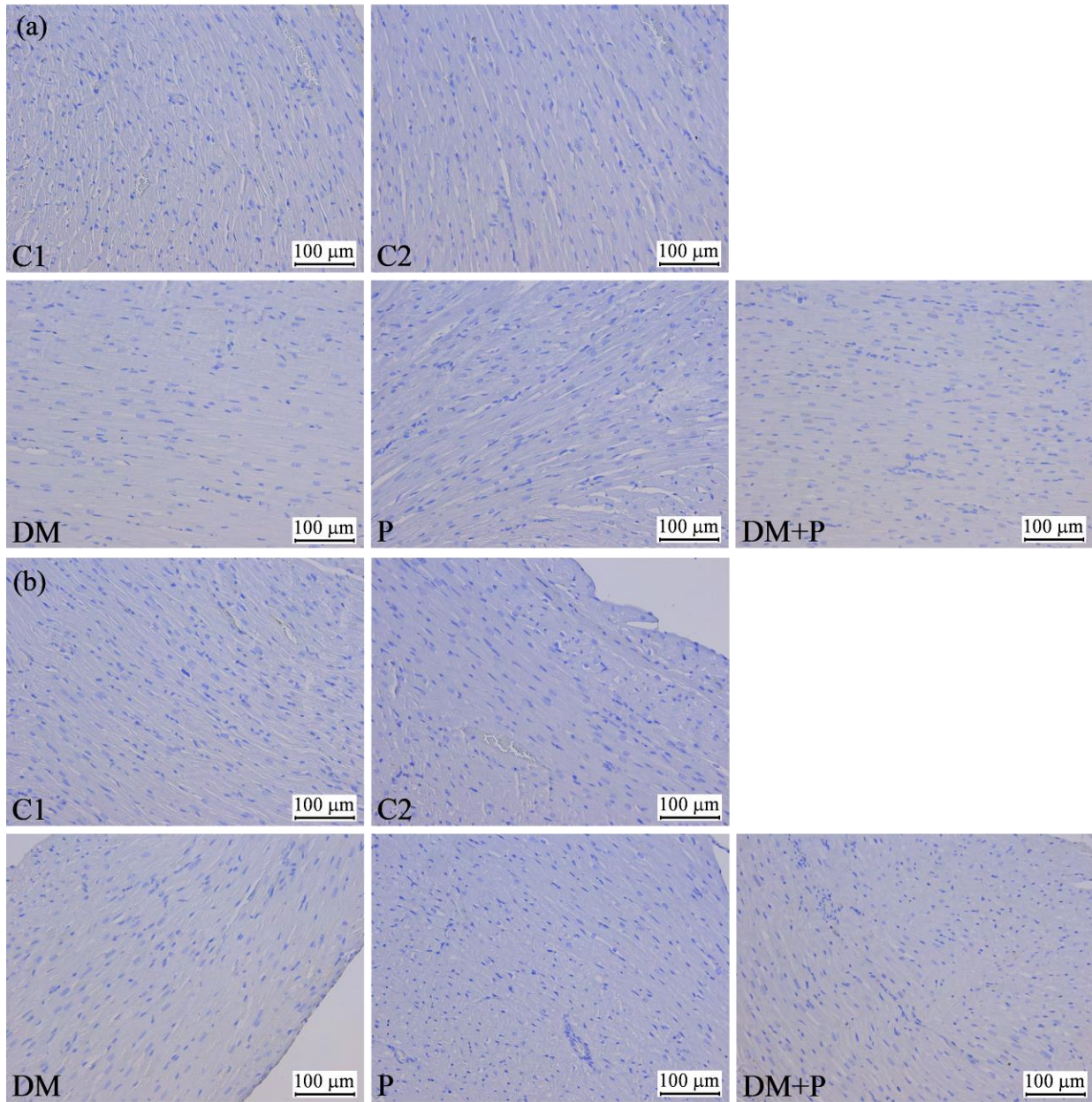
Tabela 5. Uticaj dijabetes melitusa i primene piridoksina na histomorfometrijske parametre srca pacova.

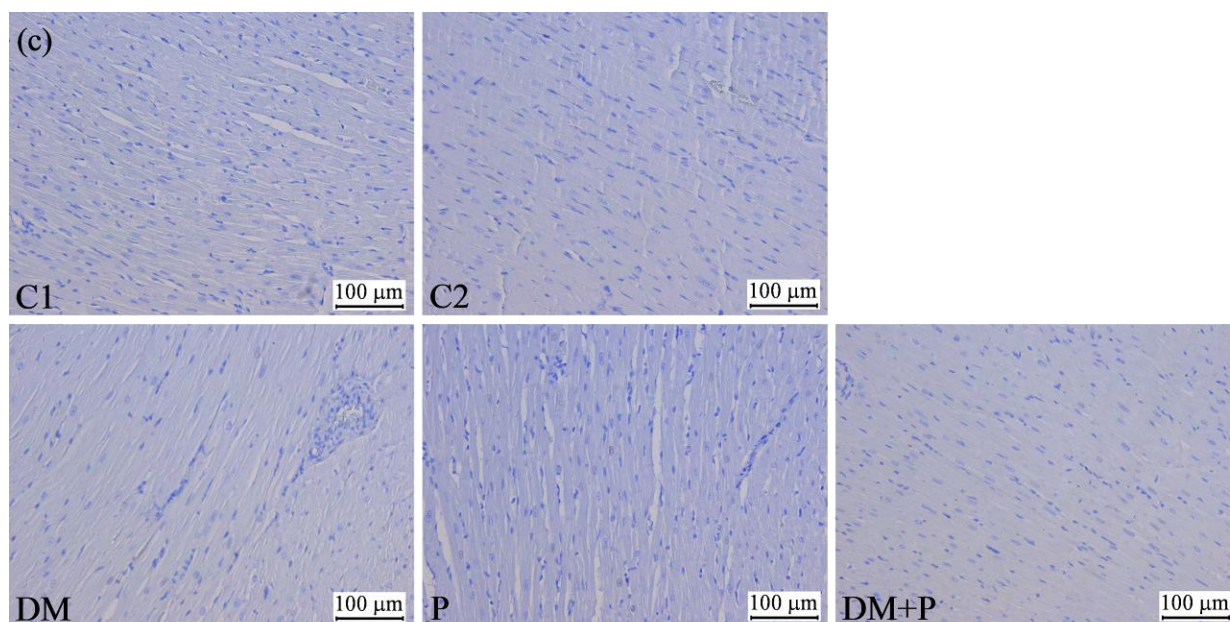
Parametri	Grupe [medijana (najmanja-najveća vrednost)]				
	C1	C2	DM	P	DM+P
Debljina zida LK (µm)	2528,7 (2137,8-3264,7)	2242,6 (1810,0-2290,6)	2117,6 (2033,3-2409,6)	2515,8 (2440,0-3262,7) #	2055,6 (1654,0-2432,6) π
Debljina zida DK (µm)	878,9 (648,3-994,7)	821,8 (712,9-963,4)	765,3 (478,1-848,9)	1049,3 (877,1-1208,7)	779,7 (561,7-1219,0)
Debljina IVS (µm)	2429,5 (2113,5-2782,5)	2014,5 (1709,5-2394,5)	1875,8 (1666,6-2047,9) *	2635,4 (2594,2-3330,7) #	1781,4 (1703,0-1987,2) π
Transverzalni prečnik KM (µm)	22,2 (20,8-23,1)	20,7 (19,5-21,6)	21,1 (20,4-22,0)	21,7 (19,6-23,8)	22,8 (21,2-24,8)

LK – leva komora; DK – desna komora; IVS – interventrikularni septum; KM – kardiomiocit; C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, # $p < 0,05$ u poređenju sa C2 grupom, π $p < 0,05$ u poređenju sa P grupom – *Kruskal-Wallis test* praćen *Mann-Whitney testom*.

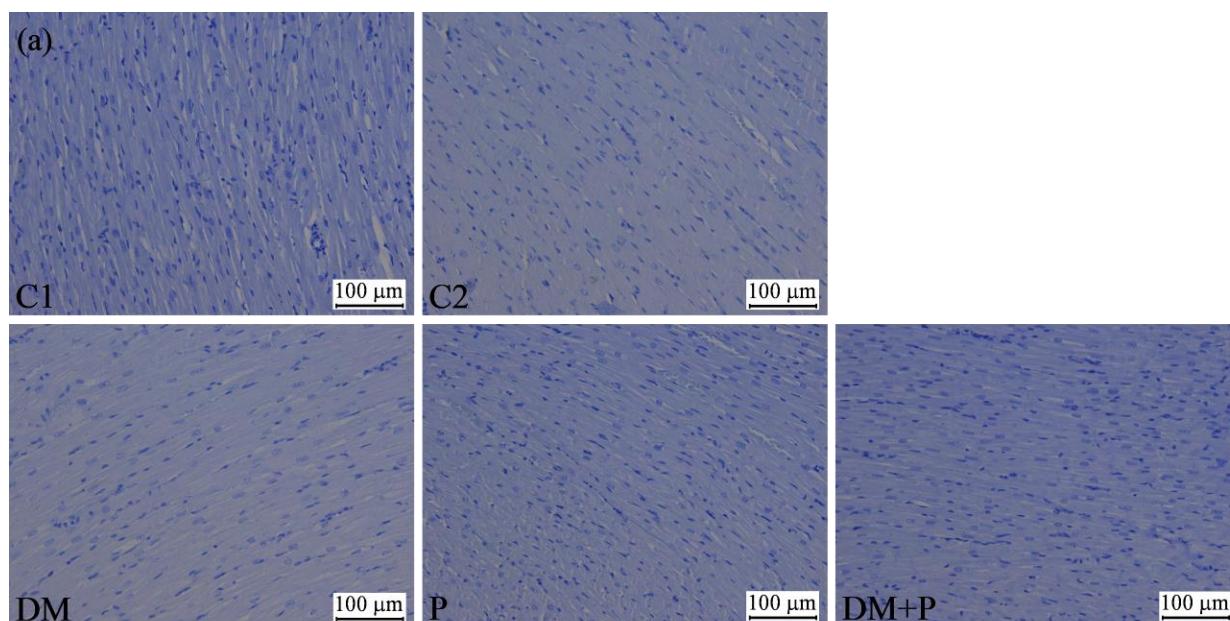
4.2.9. Imunohistohemijska analiza uzoraka tkiva srca

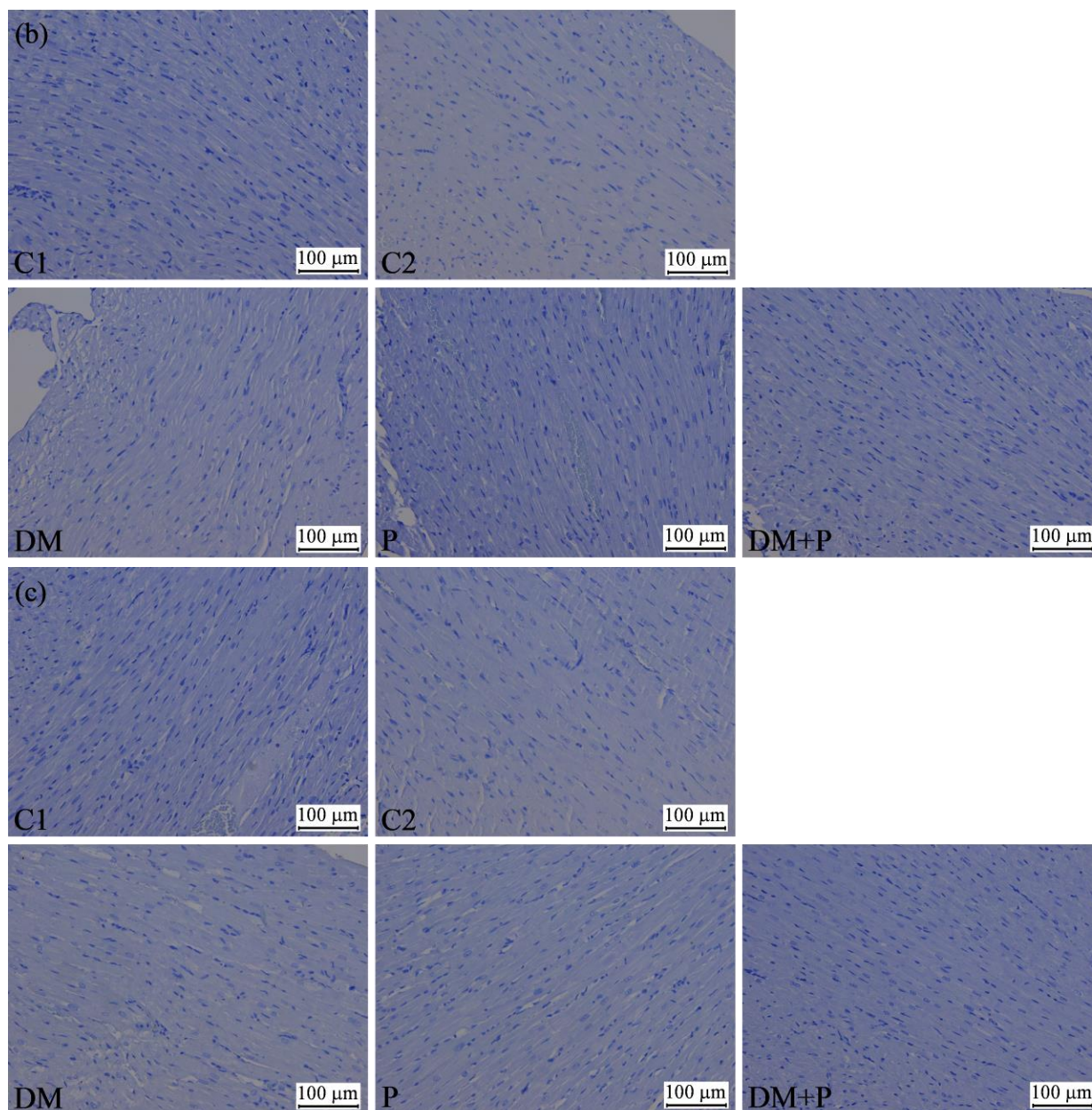
Pozitivnost BCL-2 i BCL-6 nije uočena ni u jednoj ćeliji reprezentativnih uzoraka srčanog tkiva (Slika 19 i 20). Pozitivnost Ki-67 je uočena u pojedinim ćelijama srčanog tkiva bez postojanja statistički značajne razlike između testiranih grupa (Tabela 6, Slika 21). Procenat PCNA pozitivnih KM je prikazan u Tabeli 6. Primena piridoksina nije uticala na pozitivnost PCNA u LK, DK i IVS ni kod zdravih, ni kod pacova sa DM (Slika 22). Jedino se razlika u pozitivnosti PCNA uočava u IVS poređenjem DM+P i P grupe ($p = 0,027$).





Slika 19. Uticaj dijabetesa melitusa i primene piridoksina na imunohistohemiju ekspresiju BCL-2 u (a) levoj komori, (b) desnoj komori i (c) interventrikularnom septumu srca pacova. Na preparatima se mogu videti BCL-2 negativna jedra kardiomiocita prebojena plavo (uvećanje 200 puta). C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana.



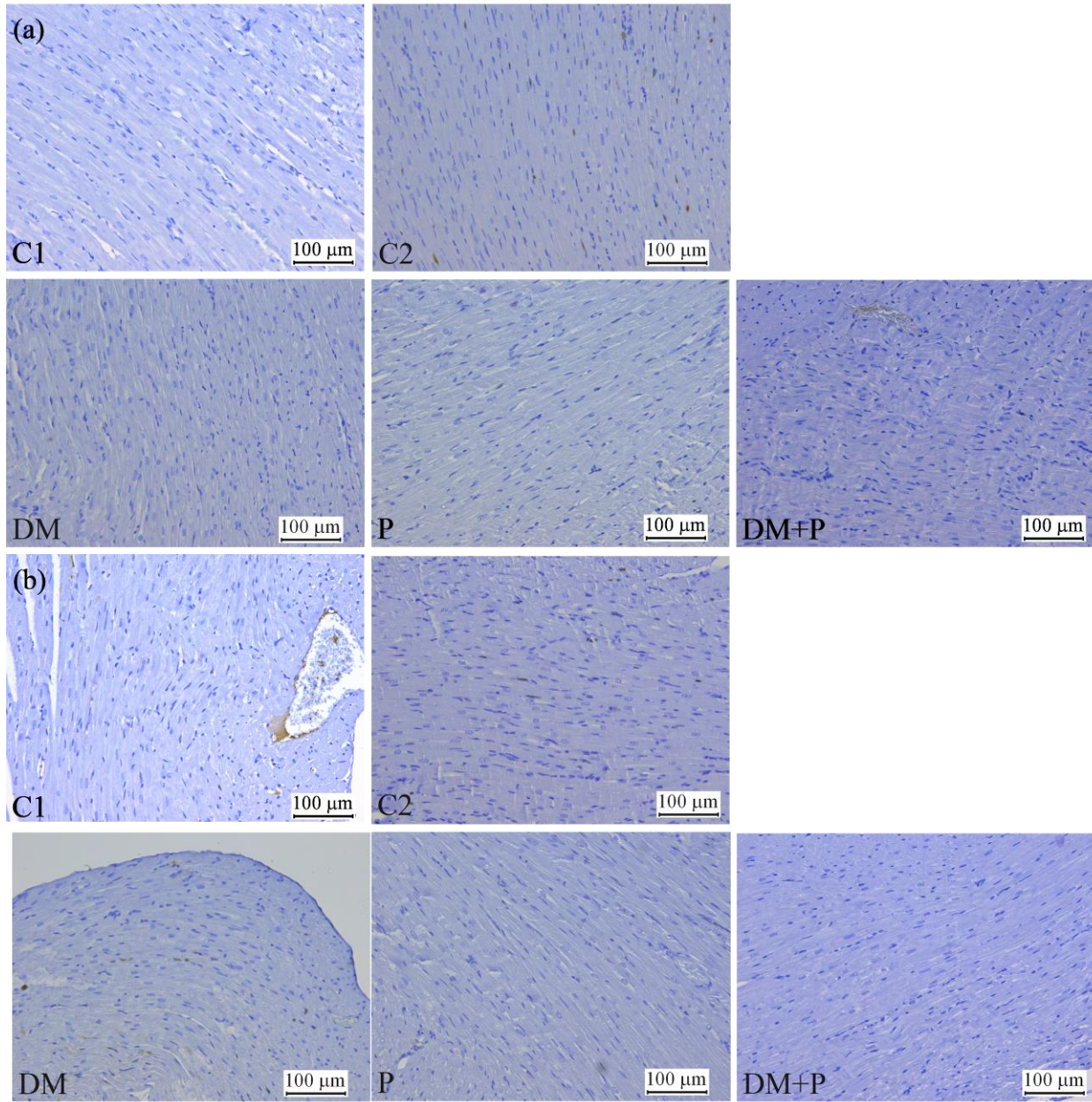


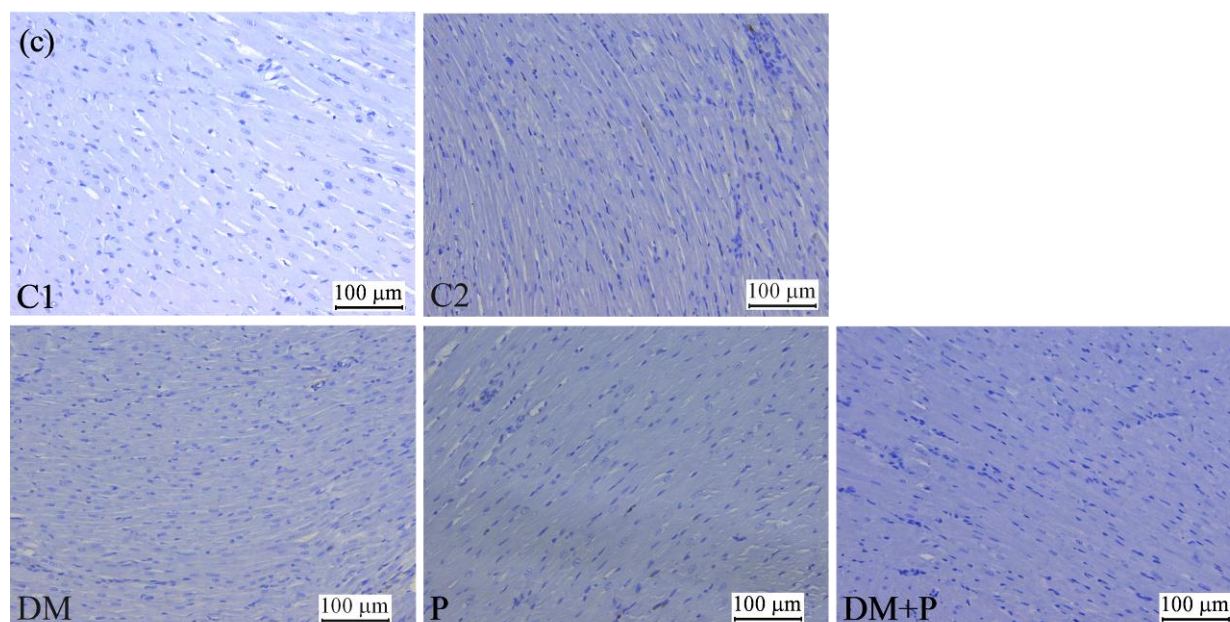
Slika 20. Uticaj dijabetes melitusa i primene piridoksina na imunohistohemijsku ekspresiju BCL-6 u (a) levoj komori, (b) desnoj komori i (c) interventrikularnom septumu srca pacova. Na preparatima se mogu videti BCL-6 negativna jedra KM prebojena plavo (uvećanje 200 puta). C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana.

Tabela 6. Uticaj dijabetes melitusa i primene piridoksina na imunohistohemijske parametre srca pacova.

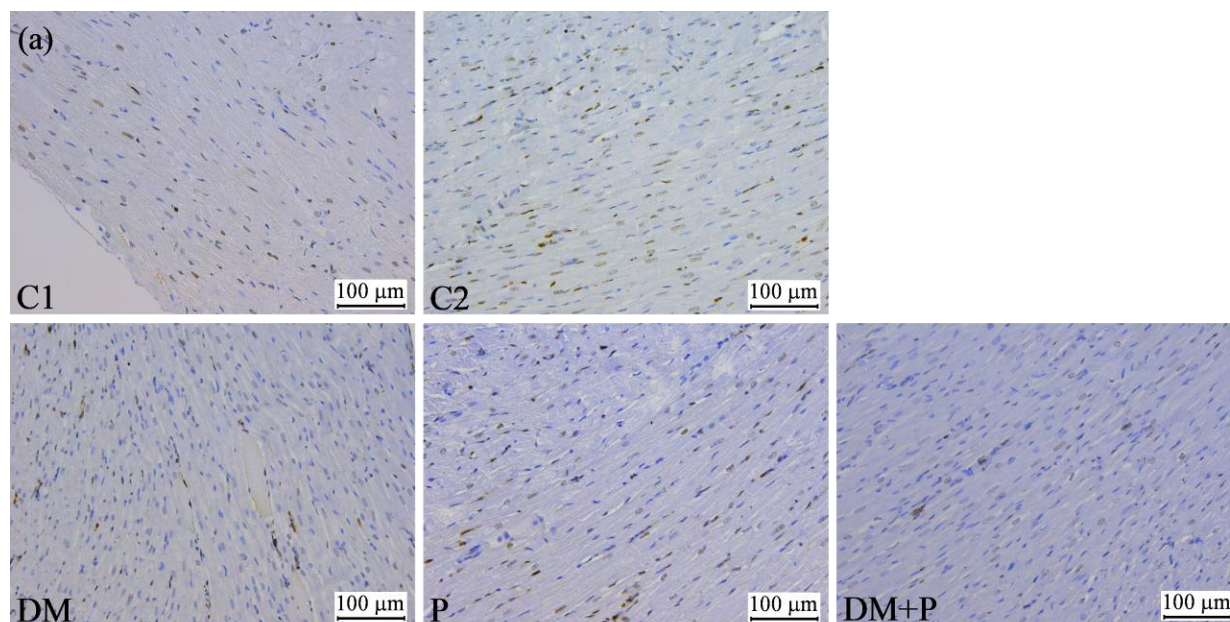
Parametri	Grupe [medijana (najmanja-najveća vrednost)]				
	C1	C2	DM	P	DM+P
Ki-67+ LK (%)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Ki-67+ DK (%)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-0)
Ki-67+ IVS (%)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-0)
PCNA+ LK (%)	4 (3-7)	5,5 (3-7)	2 (1-3) *	4 (2-8)	3,5 (2-5)
PCNA+ DK (%)	6 (5-7)	4,5 (4-6)	2,5 (1-4) *	5 (4-8)	3,5 (3-6)
PCNA+ IVS (%)	4 (4-5)	6,5 (3-8)	1,5 (0-3) *	4 (3-5)	2 (1-3) ^π

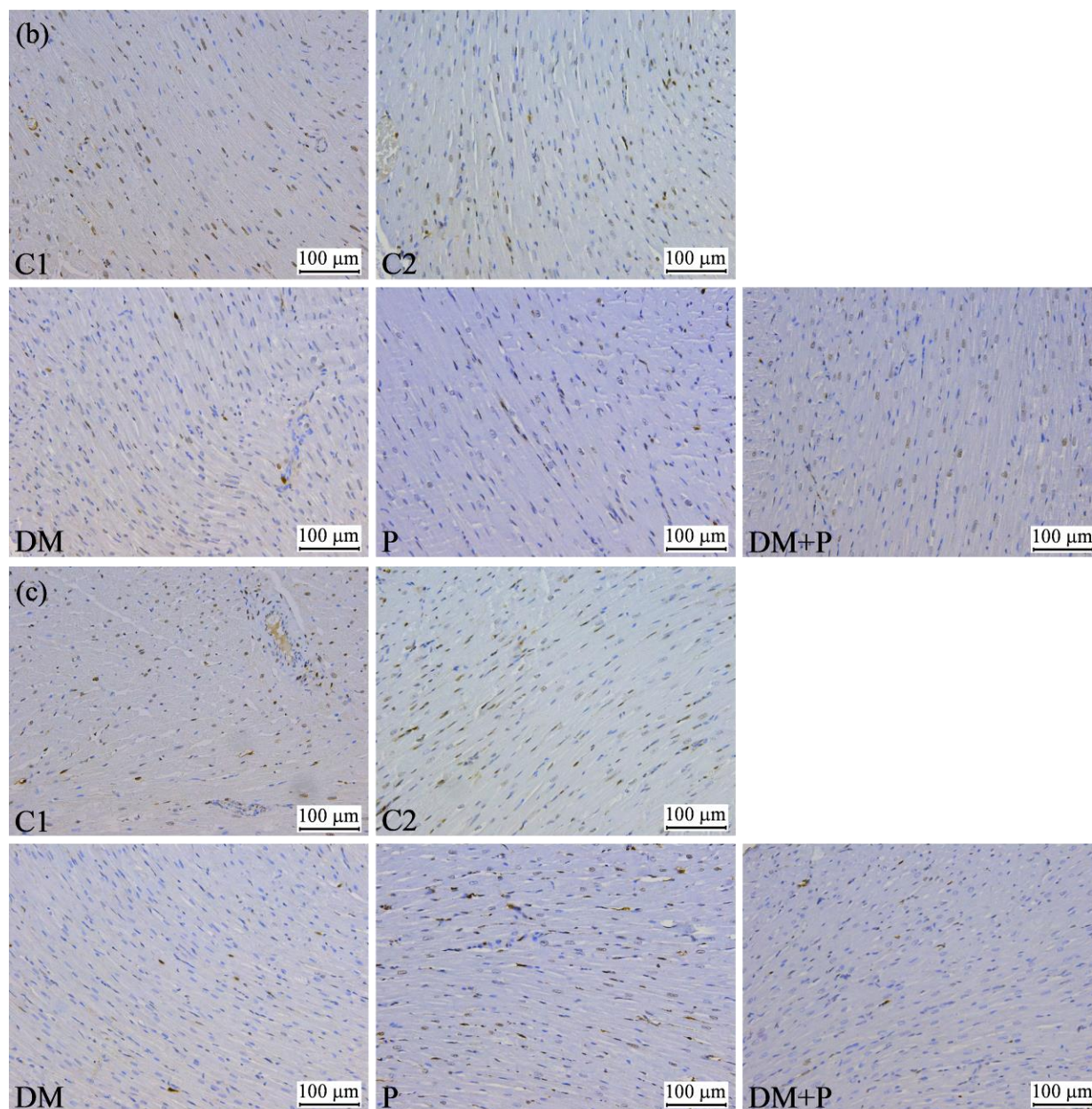
LK – leva komora; DK – desna komora; IVS – interventrikularni septum; C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, ^π $p < 0,05$ u poređenju sa P grupom – *Kruskal-Wallis* test praćen *Mann-Whitney* testom.





Slika 21. Uticaj dijabetes melitusa i primene piridoksina na imunohistohemiju Ki-67 u (a) levoj komori, (b) desnoj komori i (c) interventrikularnom septumu srca pacova. Na preparatima se mogu videti Ki-67 pozitivna jedra kardiomiocita prebojena smeđe i Ki-67 negativna jedra kardiomiocita prebojena plavo (uvećanje 200 puta). C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana.



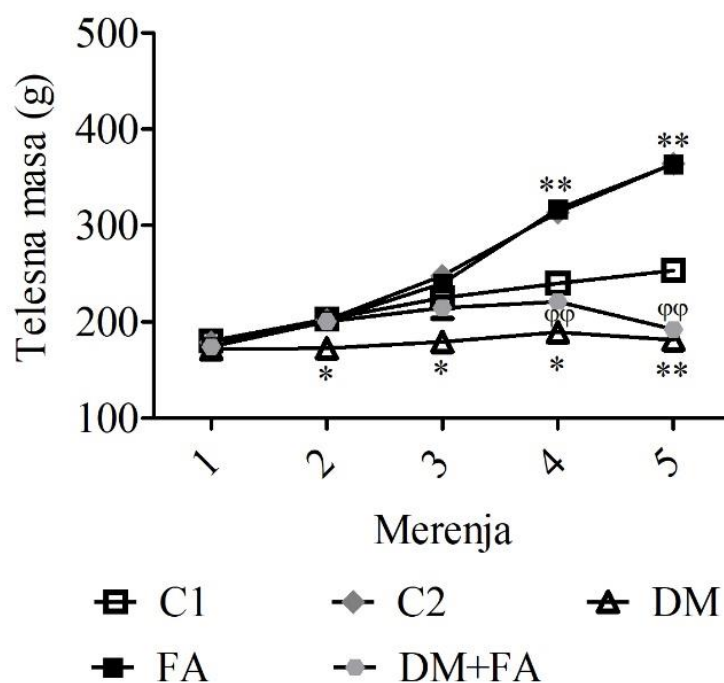


Slika 22. Uticaj dijabetes melitusa i primene piridoksina na imunohistohemijsku ekspresiju PCNA u (a) levoj komori, (b) desnoj komori i (c) interventrikularnom septumu srca pacova. Na preparatima se mogu videti PCNA pozitivna jedra kardiomiocita prebojena smeđe i PCNA negativna jedra kardiomiocita prebojena plavo (uvećanje 200 puta). C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) tokom 28 dana.

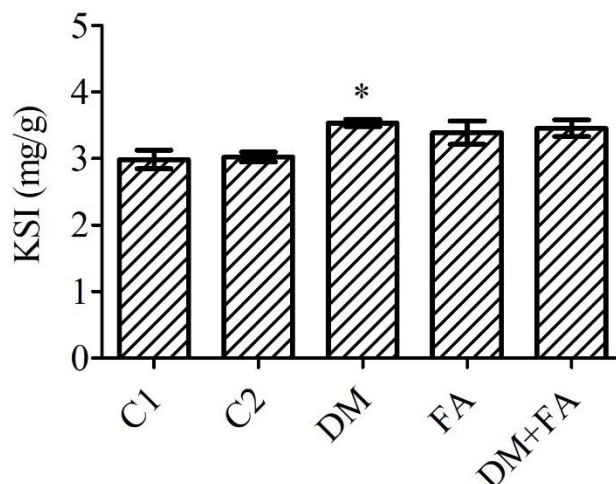
4.3. UTICAJ PRIMENE FOLNE KISELINE NA ISPITIVANE PARAMETRE

4.3.1. Telesna masa i kardiosomatski indeks

Na početku eksperimentalnog perioda nisu postojale razlike u telesnoj masi između testiranih grupa. Tokom perioda od četiri nedelje uočava se sporije napredovanje u masi, kako pacova sa DM bez tretmana, tako i onih koji su pored DM imali tretman folnom kiselinom (Grafikon 34). Telesna masa pacova u ove dve grupe se nije značajno razlikovala na kraju eksperimentalnog perioda ($p = 0,998$). Primena folne kiseline kod zdravih pacova, nije dovela je do značajnog porasta u telesnoj masi u poređenju sa C2 grupom ($p = 1,0$). Međutim, poređenjem telesnih masa u DM+FA i FA grupi, uočava se da je postojanje dijabetesa uticalno na smanjenje telesne mase. Posle 4 nedelje tretmana prosečna telesna masa u grupi DM+FA ($192,3 \pm 9,3$ g) bila je za 47 % manja nego u grupi FA ($363,8 \pm 7,6$ g, $p < 0,001$). Primena folne kiseline nije uticala na vrednost KSI ni kod zdravih ni kod pacova sa DM (Grafikon 35).



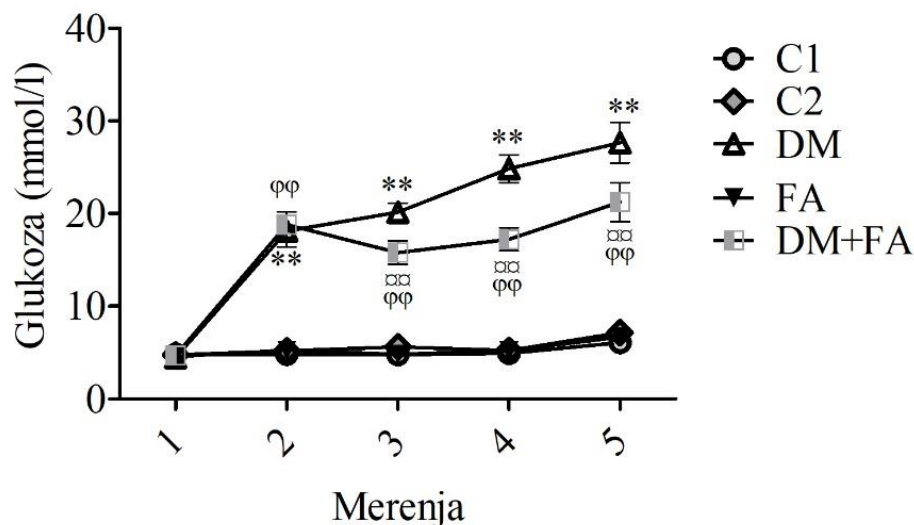
Grafikon 34. Uticaj dijabetes melitusa i primene folne kiseline na telesnu masu pacova tokom 4 nedelje. Merenja su vršena (1) na početku eksperimentalnog perioda, (2) prve nedelje, (3) druge nedelje, (4) treće nedelje i (5) četvrte nedelje. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); FA – svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, ^{pp} $p < 0,01$ u poređenju sa FA grupom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom.



Grafikon 35. Uticaj dijabetes melitusa i primene folne kiseline na kardiosomatski indeks (KSI) pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); FA – svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom.

4.3.2. Biohemijski parametri

Osim u grupi DM, povišen nivo glukoze u krvi pronađen je 72 sata nakon primene STZ i kod svih tretiranih životinja iz grupe DM+FA bez postojanja statistički značajne razlike između ove dve grupe ($p = 1,0$). Tokom perioda praćenja od 4 nedelje uočava se da primena folne kiseline kod pacova sa DM dovodi do smanjenja koncentracije glukoze kod pacova sa DM. Na kraju eksperimentalnog perioda, nivo glukoze u grupi DM+FA ($21,2 \pm 2,1$ mmol/l) bio je za 23,5 % niži od vrednosti izmerenih u DM grupi ($27,7 \pm 2,2$ mmol/l, $p = 0,005$), međutim i dalje je bio značajno povišen u poređenju sa FA grupom ($6,7 \pm 0,1$ mmol/l, $p < 0,001$). Primena folne kiseline kod zdravih pacova nije uticala na vrednosti glikemije (Grafikon 36).



Grafikon 36. Uticaj dijabetes melitusa i primene folne kiseline na koncentraciju glukoze u krvi pacova tokom 4 nedelje. Merenja su vršena (1) na početku eksperimentalnog perioda, (2) 72 h nakon primene STZ (3) druge nedelje, (4) treće nedelje i (5) četvrte nedelje. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); FA – svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, $\phi\phi$ $p < 0,01$ u poređenju sa DM grupom, $\phi\phi$ $p < 0,01$ u poređenju sa FA grupom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom.

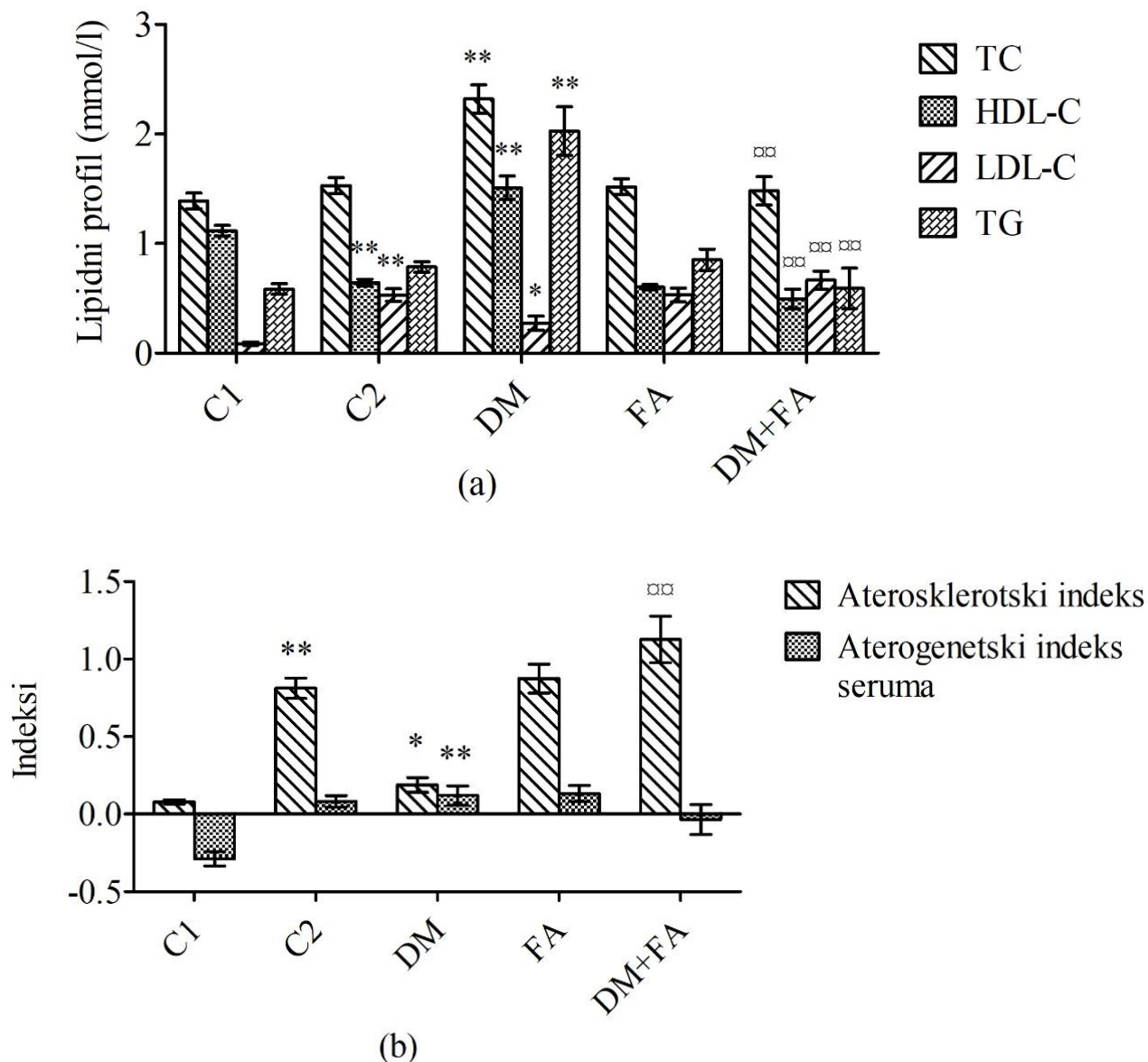
U Tabeli 7 prikazan je uticaj primene folne kiseline na vrednosti pojedinih biohemijskih parametara u serumu i plazmi eksperimentalnih životinja. Primena folne kiseline kod pacova sa DM dovela je do značajnog sniženja nivoa Hcy u poređenju sa FA grupom ($p < 0,001$). Primena folne kiseline nije uticala na vrednosti LDH i hs cTnT, kako u serumu zdravih pacova, tako ni u serumu pacova sa DM ($p > 0,05$). Primena folne kiseline nije uticala na vrednost fibrinogena kod zdravih pacova u grupi FA u poređenju sa kontrolnom C2 grupom ($p = 1,0$), ali je u DM+FA grupi značajno povećala prethodno smanjenu vrednost fibrinogena u DM grupi ($p = 0,018$). U DM+FA grupi uočava se povećana vrednost vWF u poređenju sa FA grupom ($p < 0,001$).

Tabela 7. Uticaj dijabetes melitusa i primene folne kiseline na vrednosti pojedinih biohemijskih parametara u serumu i plazmi eksperimentalnih životinja

Parametri	Grupe (srednja vrednost \pm SEM)				
	C1	C2	DM	FA	DM+FA
Hcy (mmol/l)	9,0 \pm 0,5	10,4 \pm 0,6	8,3 \pm 0,4	12,9 \pm 0,8	5,6 \pm 0,4 ^{ⓈⓈ}
LDH (U/l)	3887,1 \pm 358,5	4438,4 \pm 331,7	3913,6 \pm 249,3	3490,5 \pm 429,2	4212,5 \pm 357,1
hs cTnT (ng/L)	25,8 \pm 6,2	23,1 \pm 2,4	6,4 \pm 1,0 *	34,7 \pm 10,0	27,6 \pm 8,0
Fibrinogen (g/l)	2,6 \pm 0,3	2,2 \pm 0,1	1,2 \pm 0,2 **	2,2 \pm 0,1	2,1 \pm 0,1 [Ⓢ]
vWF Ac (%)	214,3 \pm 30,4	99,4 \pm 4,3	467,9 \pm 43,6 **	46,1 \pm 16,3	379,5 \pm 34,9 ^{ⓈⓈ}

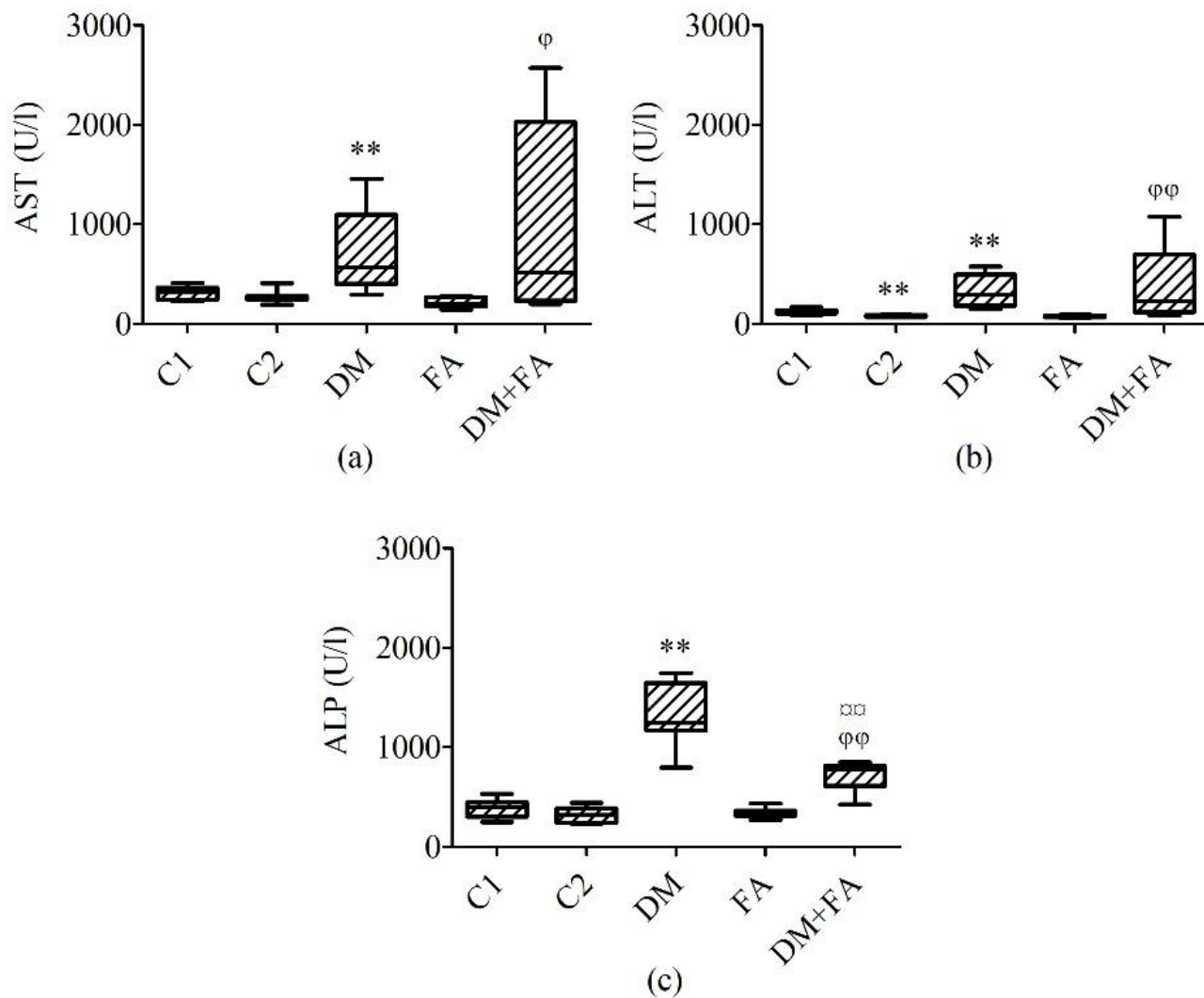
Hcy – homocistein; LDH – laktat dehidrogenaza; hs cTnT – srčani troponin T; vWF – fon Vilebrand faktor; Ac (%) – procenat fiziološke vrednosti; C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); FA – svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, [Ⓢ] $p < 0,05$ u poređenju sa DM grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, ^{ⓈⓈ} $p < 0,01$ u poređenju sa FA grupom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom.

Primena folne kiseline nije uticala na parametre lipidnog profila kod zdravih pacova (Grafikon 37 a). Kod pacova sa DM tretiranim folnom kiselinom uočava se da nema razlike u svim ovim parametrima u poređenju sa FA grupom. Poređenjem DM+FA i DM grupe dobija se značajno smanjenje TC, HDL-C i TG ($p < 0,001$ za sva tri parametra) i povećanje LDL-C ($p = 0,005$). Tretman folnom kiselinom je povećao AI kod pacova sa DM, a nije uticao na vrednosti AIS, niti je imao uticaj na ove parametre kod zdravih pacova (Grafikon 37 b).

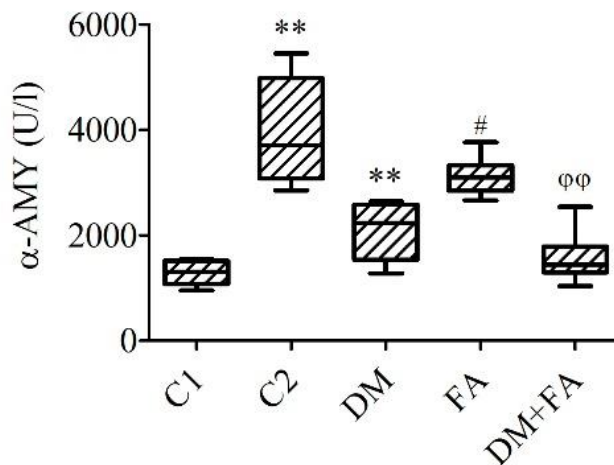


Grafikon 37. Uticaj dijabetesa melitusa i primene folne kiseline na (a) lipidni profil i (b) indekse pokazatelje aterosklerotskog rizika u serumu pacova. TC – ukupan holesterol; HDL-C – holesterol lipoproteina visoke gustine; LDL-C – holesterol lipoproteina niske gustine; TG – trigliceridi; C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); FA – svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, $\square\square$ $p < 0,01$ u poređenju sa DM grupom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom.

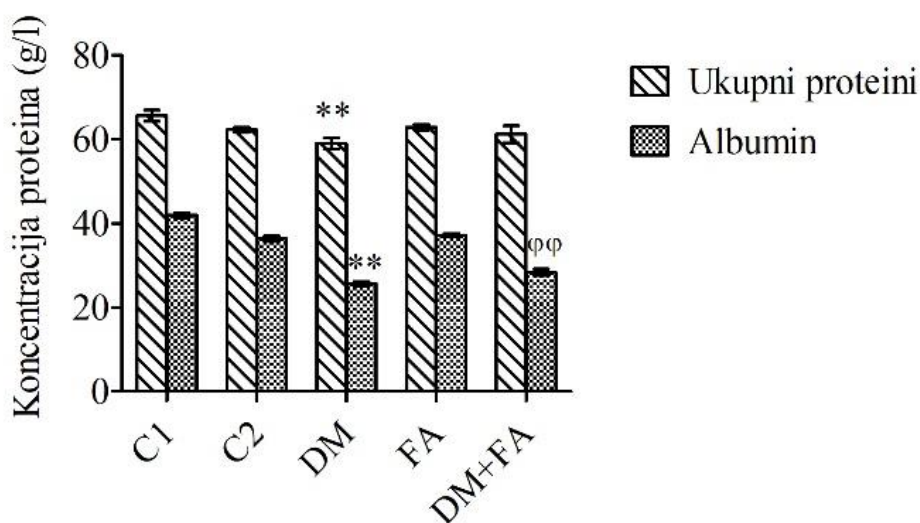
Na Grafikonu 38 prikazana je aktivnost hepatičnih enzima u serumu. Tretman folnom kiselinom nije uticao na vrednosti AST ni kod zdravih (FA u poređenju sa C2 grupom – $p = 0,112$), ni kod pacova obolelih od DM (DM+FA u poređenju sa DM grupom – $p = 0,657$). Statistički značajna razlika postojala je pri poređenju DM+FA i FA grupa ($p = 0,01$). Takođe, primena folne kiseline nije uticala na vrednosti ALT ni kod zdravih (FA u poređenju sa C2 grupom – $p = 0,426$), ni kod pacova obolelih od DM (DM+FA u poređenju sa DM grupom – $p = 0,594$). Statistički značajna razlika postojala je pri poređenju DM+FA i FA grupa ($p < 0,001$). Primena folne kiseline je značajno uticala na aktivnost ALP kod pacova sa DM. Pri poređenju aktivnosti ALP između DM+FA i DM grupe postoji statistički značajno smanjenje aktivnosti u grupi tretiranoj folnom kiselinom ($p = 0,001$), međutim u grupi DM +FA se uočava porast aktivnosti u poređenju sa aktivnošću u grupi FA ($p < 0,001$). Primena folne kiseline kod pacova sa DM nije uticala na aktivnost α -AMY u poređenju sa DM grupom ($p = 0,051$). Aktivnost ovog enzima u DM+FA grupi bila je značajno manja u poređenju sa vrednostima u FA grupi ($p < 0,001$, Grafikon 39). Primena folne kiseline nije značajno uticala na prethodno smanjene koncentracije ukupnih proteina i albumina kod pacova sa DM (Grafikon 40). Rezultati pokazuju da nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji ukupnih proteina i albumina pri poređenju vrednosti u DM+FA i DM grupi ($p = 0,904$, $p = 0,097$, redom), takođe nije bilo razlike u koncentraciji ukupnih proteina između DM+FA i FA grupa ($p = 0,968$), jedino je vrednost albumina bila smanjena u DM+FA u poređenju sa FA grupom ($p < 0,001$).



Grafikon 38. Uticaj dijabetes melitusa i primene folne kiseline na aktivnost (a) aspartat aminotransferaze (AST), (b) alanin aminotransferaze (ALT) i (c) alkalne fosfataze (ALP) u serumu pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); FA – svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. ϕ $p < 0,05$ u poređenju sa FA grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, $\phi\phi$ $p < 0,01$ u poređenju sa DM grupom, $\phi\phi$ $p < 0,01$ u poređenju sa FA grupom – *Kruskal-Wallis* test praćen *Mann-Whitney* testom.

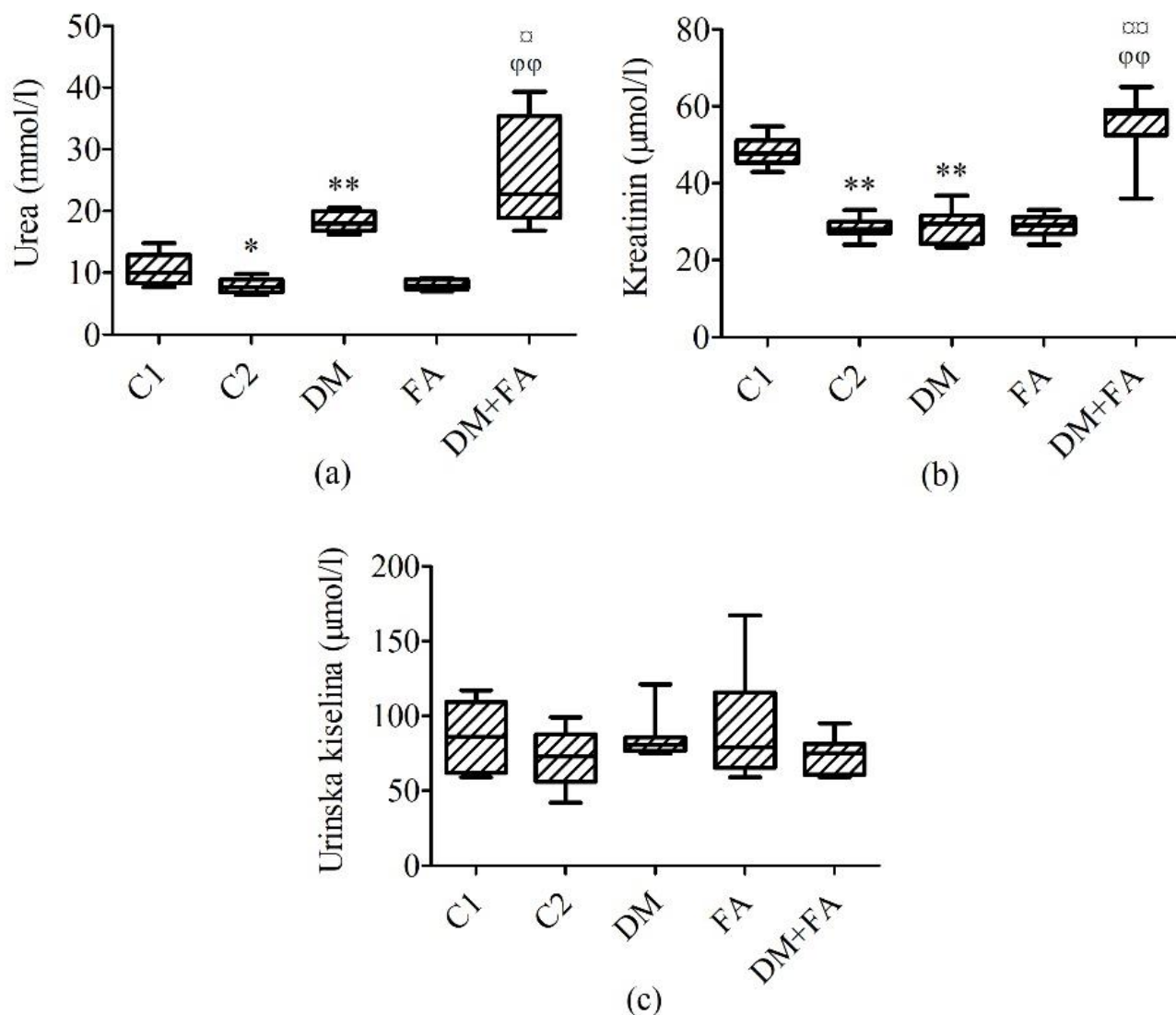


Grafikon 39. Uticaj dijabetes melitusa i primene folne kiseline na aktivnost α -amilaze (α -AMY) u serumu pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); FA – svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. # $p < 0,05$ u poređenju sa C2 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, φφ $p < 0,01$ u poređenju sa FA grupom – *Kruskal-Wallis* test praćen *Mann-Whitney* testom.



Grafikon 40. Uticaj dijabetes melitusa i primene folne kiseline na koncentraciju ukupnih proteina i albumina u serumu pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); FA – svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, φφ $p < 0,01$ u poređenju sa FA grupom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom.

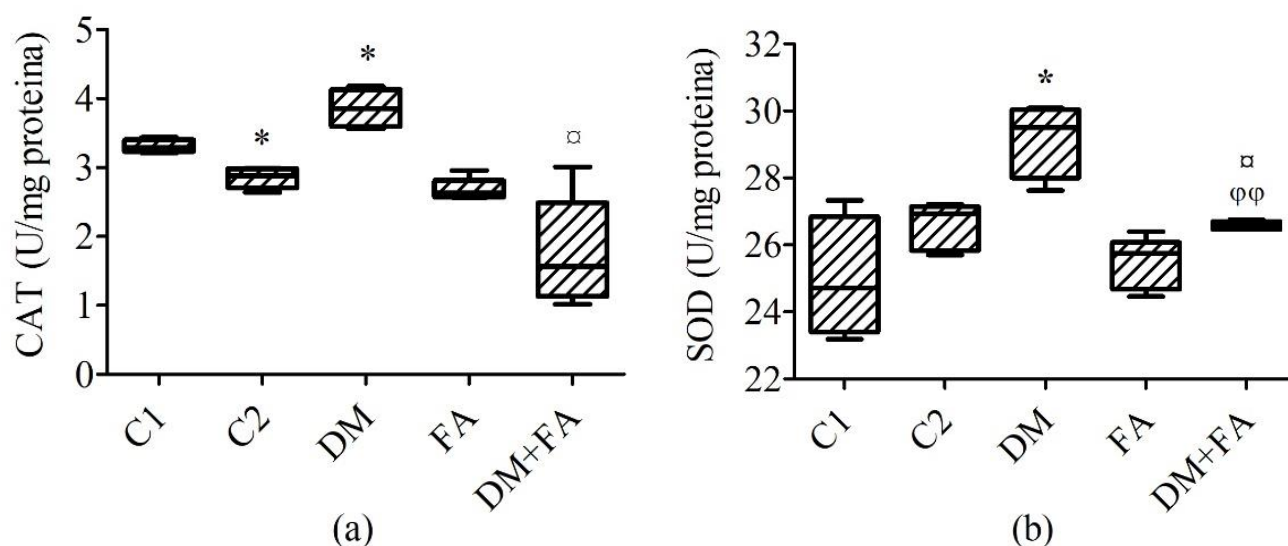
Parametri bubrežne funkcije, koncentracija uree i kreatinina u serumu, pokazali su razlike među ispitivanim grupama (Grafikon 41 a i b). Primena folne kiseline je dodatno povećala već povišene vrednosti uree u DM grupi uz postojanje statistički značajne razlike između DM+FA i DM grupa ($p = 0,026$), kao i DM+FA i FA grupa ($p < 0,001$). Kod zdravih pacova folna kiselina nije uticala na vrednosti uree u serumu. Kreatinin je bio značajno povišen u DM+FA grupi u poređenju sa DM i FA grupama ($p = 0,001$, $p < 0,001$, redom). Poređenjem koncentracije mokraćne (urinske) kiseline u serumu, nisu dobijene razlike između grupa (Grafikon 41 c).



Grafikon 41. Uticaj dijabetes melitusa i primene folne kiseline na koncentraciju (a) uree, (b) kreatinina i (c) urinske kiseline u serumu pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); FA – svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, [†] $p < 0,05$ u poređenju sa DM grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, [‡] $p < 0,01$ u poređenju sa DM grupom, [Ⓜ] $p < 0,01$ u poređenju sa FA grupom – *Kruskal-Wallis* test praćen *Mann-Whitney* testom.

4.3.3. Aktivnost antioksidativnih enzima u tkivu srca pacova

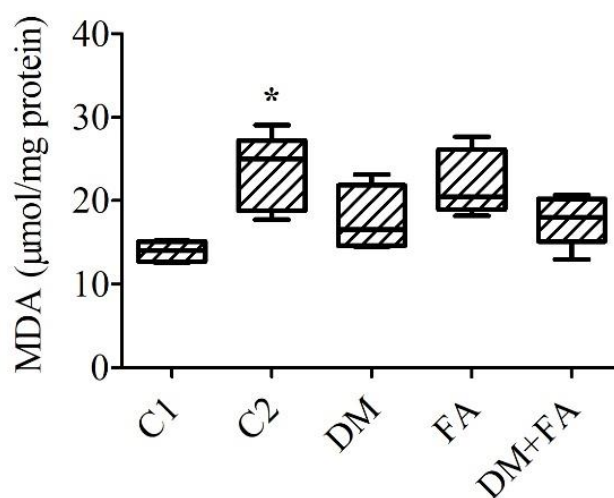
Primena folne kiseline nije uticala na aktivnost CAT kod zdravih pacova, ali je kod pacova sa indukovanim DM bila praćena smanjenjem prethodno povećane aktivnosti CAT za oko 60 % ($p = 0,014$, pri poređenju vrednosti u DM+FA i DM grupi, Grafikon 42 a). Nisu postojale statistički značajne razlike pri poređenju aktivnosti CAT u DM+FA i FA grupi ($p = 0,117$). Slično, folna kiselina nije uticala na aktivnost SOD kod zdravih pacova, ali je kod pacova sa DM dovela do smanjenja prethodno povećane aktivnosti za oko 10 % ($p = 0,014$, pri poređenju vrednosti u DM+FA i DM grupi, Grafikon 42 b). Aktivnost SOD u grupi DM+FA bila je veća u poređenju sa aktivnošću u grupi FA ($p = 0,009$).



Grafikon 42. Uticaj dijabetes melitusa i primene folne kiseline na aktivnost (a) katalaze (CAT) i (b) superoksid dismutaze (SOD) u tkivu srca pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); FA – svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, # $p < 0,05$ u poređenju sa C2 grupom, □ $p < 0,05$ u poređenju sa DM grupom, φφ $p < 0,01$ u poređenju sa FA grupom – *Kruskal-Wallis* test praćen *Mann-Whitney* testom.

4.3.4. Indeks lipidne peroksidacije u tkivu srca pacova

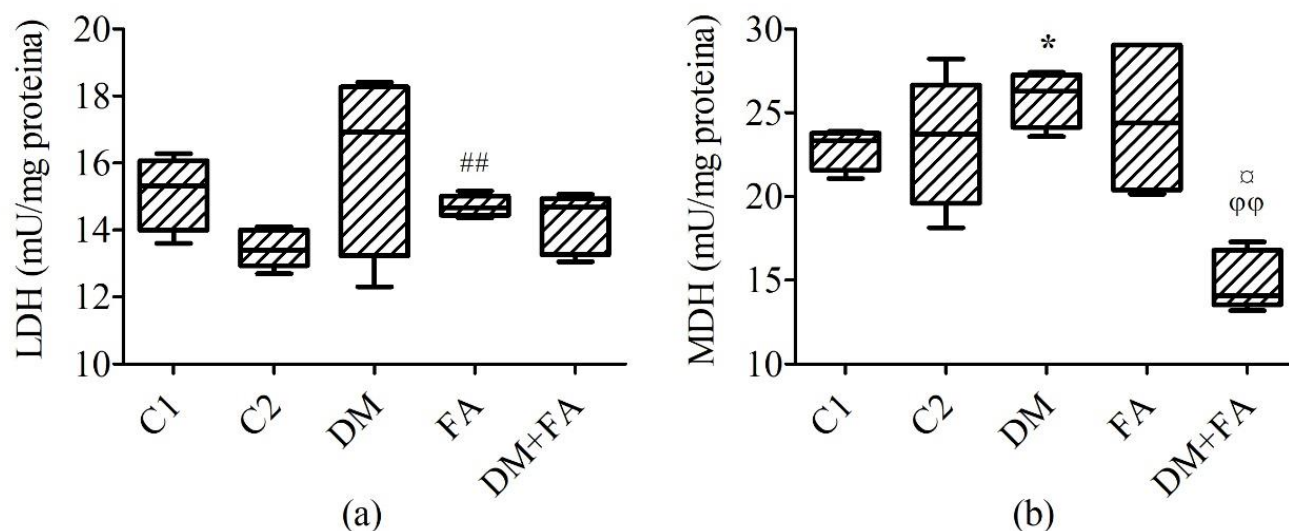
Primena folne kiseline nije uticala na vrednost MDA ni kod zdravih, niti kod pacova sa DM ($p = 0,602$, $p = 0,905$, redom, Grafikon 43).



Grafikon 43. Uticaj dijabetes melitusa i primene folne kiseline na koncentraciju malondialdehida (MDA) u tkivu srca pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); FA – svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom – *Kruskal-Wallis* test praćen *Mann-Whitney* testom.

4.3.5. Aktivnost laktat i malat dehidrogenaze u tkivu srca pacova

Aktivnost LDH u srčanom tkivu pacova bila je značajno povećana u FA u poređenju sa C2 grupom ($p = 0,009$), poređenjem ostalih grupa nisu dobijene razlike (Grafikon 44 a). Primena folne kiseline nije uticala na vrednosti MDH kod zdravih pacova, ali se u grupi DM+FA uočava značajno smanjenje aktivnosti MDH (14,07 (13,19-17,3) mU/mg proteina) u poređenju sa DM (26,28 (23,58-27,41), $p = 0,014$) i FA grupom (24,37 (20,14-29,06) mU/mg proteina, $p = 0,009$, Grafikon 44 b).

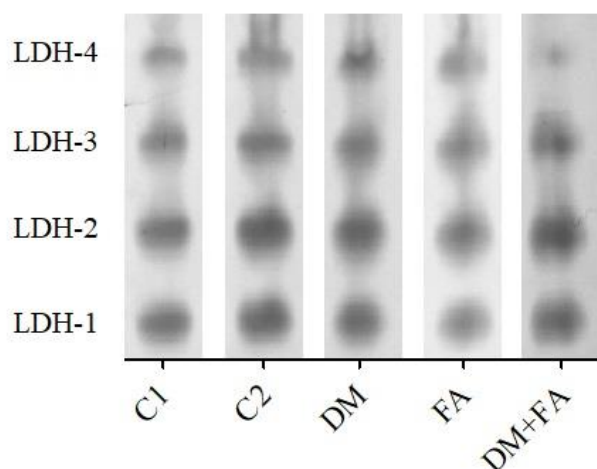


Grafikon 43. Uticaj dijabetes melitusa i primene folne kiseline na aktivnost (a) laktat dehidrogenaze (LDH) i (b) malat dehidrogenaze (MDH) u tkivu srca pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); FA – svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, # $p < 0,05$ u poređenju sa DM grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa C2 grupom, φφ $p < 0,01$ u poređenju sa FA grupom – Kruskal-Wallis test praćen Mann-Whitney testom.

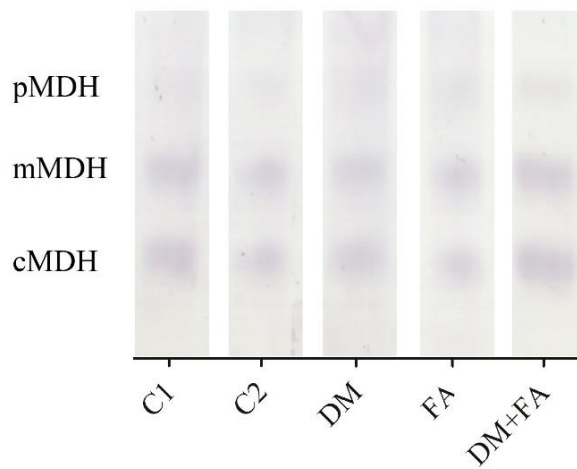
4.3.6. Izoforme laktat i malat dehidrogenaze u tkivu srca pacova

U tkivu srca svih testiranih eksperimentalnih životinja četiri LDH izoforme (LDH-1, LDH-2, LDH-3 i LDH-4) i tri MDH izoforme (pMDH, mMDH i cMDH) su detektovane (Slika 23 i 24). U svim grupama LDH-4 izoforma je imala najmanju zastupljenost (Grafikon 44). Kod zdravih pacova, poređenjem FA i C2 grupe, statistički značajna razlika dobijena je za relativnu aktivnost LDH-1 ($p < 0,001$), LDH-3 ($p = 0,023$) i LDH-4 ($p < 0,001$). Primena folne kiseline je dovela do smanjenja relativne aktivnosti LDH-1 i do povećanja relativne aktivnosti LDH-3 i LDH-4 kod zdravih pacova u grupi FA ($27,01 \pm 0,68$ %, $24,32 \pm 0,35$ %, $16,22 \pm 0,22$ %, redom) u poređenju sa grupom C2 ($33,22 \pm 0,81$ %, $22,16 \pm 0,36$ %, $9,27 \pm 0,28$ %, redom). Primena folne kiseline je značajno ublažila promene u relativnim aktivnostima LDH izoformi izazvanim DM. Aktivnosti LDH-1 i LDH-2 u DM+FA grupi ($32,08 \pm 0,80$ %,

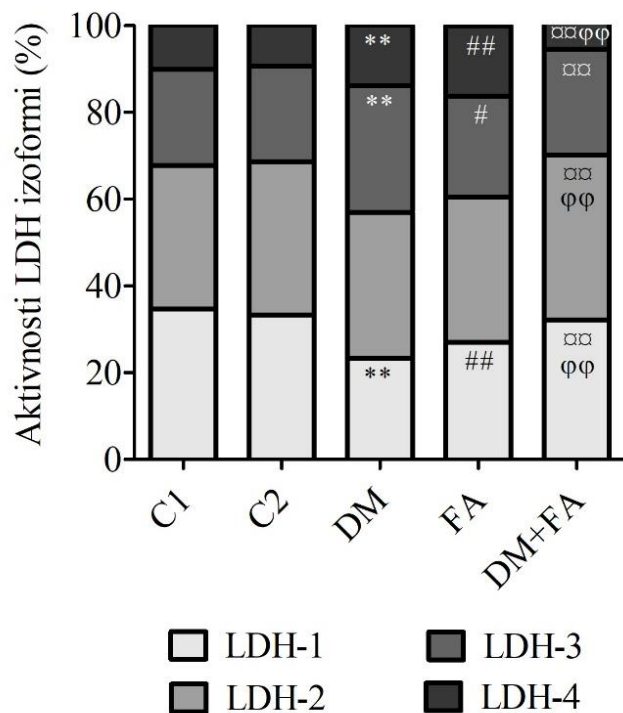
38,06 ± 0,69 %, redom) bile su značajno više nego u DM (23,26 ± 0,71 %, $p < 0,001$, 33,64 ± 0,69 %, $p = 0,002$, redom) i FA grupi (27,01 ± 0,68 %, $p = 0,004$, 32,45 ± 0,56 %, $p < 0,001$, redom). Aktivnost LDH-3 u DM+FA grupi (23,96 ± 0,38 %) bila je značajno niža nego u DM grupi (29,19 ± 0,68 %, $p < 0,001$), dok je aktivnost LDH-4 u DM+FA grupi (5,90 ± 0,14 %) bila značajno niža nego u DM (13,91 ± 0,55 %, $p < 0,001$) i FA grupi (16,22 ± 0,22 %, $p < 0,001$). Takođe, relativna aktivnost izoformi MDH se značajno razlikovala među grupama (Grafikon 45). Poređenjem FA i C2 grupe, statistički značajna razlika dobijena je za relativnu aktivnost pMDH ($p < 0,001$) i mMDH ($p = 0,029$). Primena folne kiseline je dovela do povećanja relativne aktivnosti pMDH (17,59 ± 0,33 %) i do smanjenja relativne aktivnosti mMDH (45,33 ± 0,65 %) kod zdravih pacova u grupi FA u poređenju sa grupom C2 (13,07 ± 0,24 %, 49,00 ± 0,63 %, redom). Kod pacova sa DM primena folne kiseline je dovela do smanjenja relativne aktivnosti pMDH (12,76 ± 0,29 %) u poređenju sa DM (19,76 ± 0,40 %, $p < 0,001$) i FA grupom (17,58 ± 0,33 %, $p < 0,001$), kao i do smanjenja aktivnosti mMDH u grupi DM+FA (41,32 ± 0,67 %) u odnosu na vrednosti u FA grupi (45,33 ± 0,65 %, $p = 0,014$). Relativna aktivnost cMDH u grupi DM+FA (45,92 ± 0,88 %) bila je povećana u poređenju sa FA grupom (37,08 ± 0,78 %, $p < 0,001$).



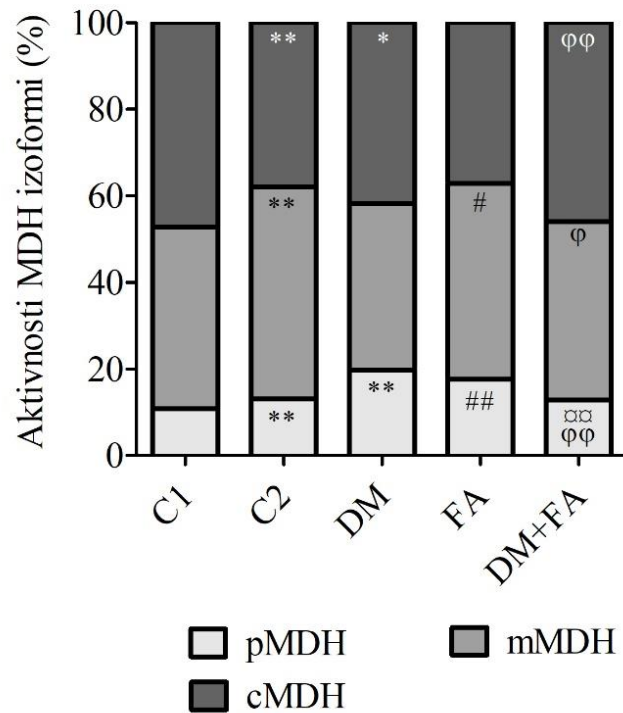
Slika 23. Reprezentativni zimogrami aktivnosti izoformi laktat dehidrogenaze (LDH-1, LDH-2, LDH-3 i LDH-4) detektovanih u srčanom tkivu pacova nativnom poliakrilamid gel elektroforezom. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); FA – svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana.



Slika 24. Reprezentativni zimogrami aktivnosti izoformi malat dehidrogenaze (MDH) detektovanih u srčanom tkivu pacova nativnom poliakrilamid gel elektroforezom. pMDH – peroksizomalna MDH; mMDH – mitohondrijalna MDH; cMDH – citosolna MDH; C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); FA – svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana.



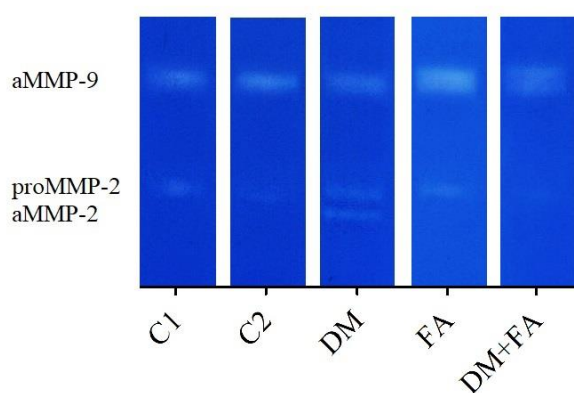
Grafikon 44. Uticaj dijabetes melitusa i primene folne kiseine na relativne aktivnosti izoformi laktat dehidrogenaze (LDH) u srčanom tkivu pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); FA – svakodnevna i.p. primena folne kiseine (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena folne kiseine (5 mg/kg) tokom 28 dana. # $p < 0,05$ u poređenju sa C2 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa C2 grupom, φφ $p < 0,01$ u poređenju sa DM grupom, φφ $p < 0,01$ u poređenju sa FA grupom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom.



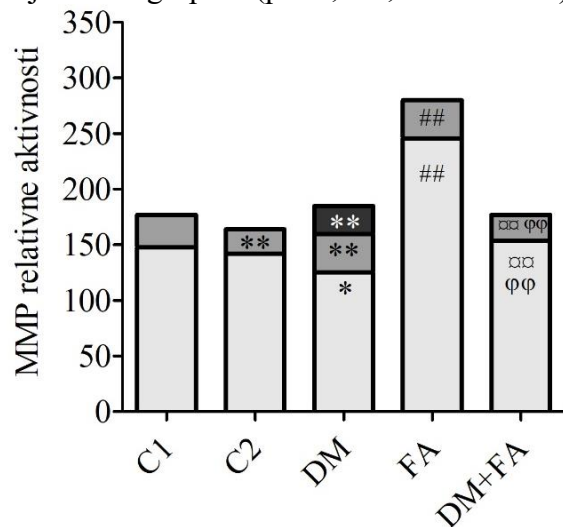
Grafikon 45. Uticaj dijabetes melitusa i primene folne kiseine na relativne aktivnosti izoformi malat dehidrogenaze (MDH) u srčanom tkivu pacova. pMDH – peroksizomalna MDH; mMDH – mitohondrijalna MDH; cMDH – citosolna MDH; C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); FA – svakodnevna i.p. primena folne kiseine (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena folne kiseine (5 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, # $p < 0,05$ u poređenju sa C2 grupom, φ $p < 0,05$ u poređenju sa FA grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa C2 grupom, φφ $p < 0,01$ u poređenju sa DM grupom, φφ $p < 0,01$ u poređenju sa FA grupom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom.

4.3.7. Aktivnost matriksnih metaloproteinaza -2 i -9 u tkivu srca pacova

Na Slici 25 mogu se videti reprezentativni zimogrami aktivnosti MMP-2 i MMP-9 koji su detektovani u srčanom tkivu SDS-PAGE zimografijom. Latentni oblik MMP-2 (proMMP-2 na 72 kDa) se može uočiti u svim testiranim grupama, a aktivni oblik MMP-2 (aMMP-2 na 64 kDa) samo u DM grupi. Relativna aktivnost proMMP-2 bila je za 56 % veća u FA, nego u C2 grupi ($p < 0,001$). U DM+FA grupi aktivnost ovog enzima je bila manja za 31 % nego u DM grupi ($p < 0,001$), takođe, za 31 % je aktivnost ovog enzima bila manja nego u FA grupi ($p < 0,001$). Aktivni oblik MMP-9 (aMMP-9 na 83 kDa) detektovan je u svim grupama. Relativna aktivnost aMMP-9 bila je za 73 % veća u FA grupi, nego u C2 grupi ($p < 0,001$). U DM+FA grupi uočeno je povećanje aktivnosti aMMP-9 za 22 % u poređenju sa DM grupom ($p = 0,001$) i smanjenje za 38 % u poređenju sa FA grupom ($p < 0,001$, Grafikon 46).



Slika 25. Reprezentativni zimogrami aktivnosti matriksnih proteinaza (MMP) -2 i -9 detektovanih u srčanom tkivu pacova natrijum-dodecil sulfat poliakrilamidnom elektroforezom (eng. *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE*). C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); FA – svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana.

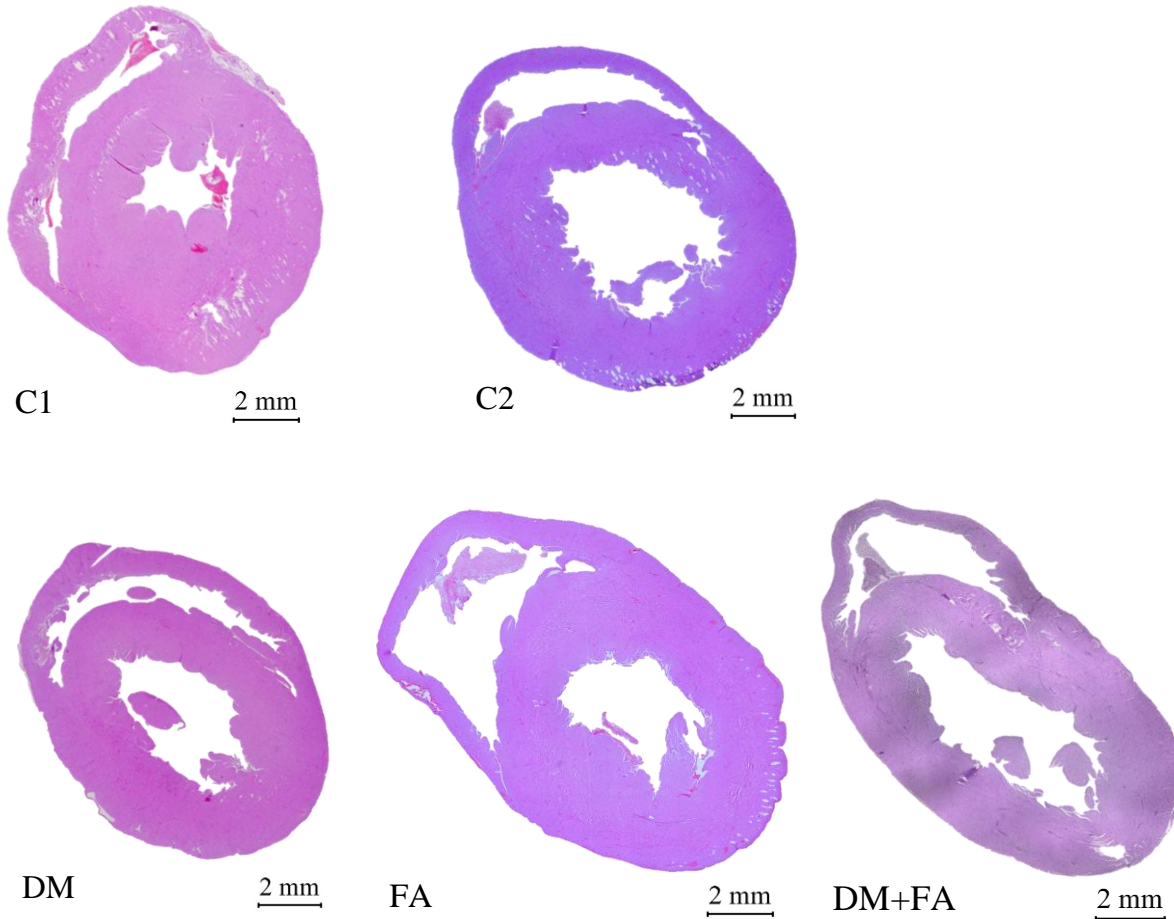


□ aMMP-9 ■ proMMP-2 ■ aMMP-2

Grafikon 46. Uticaj dijabetes melitusa i primene folne kiseline na relativne aktivnosti matriksnih metaloproteinaza (MMP) -2 i -9 u srčanom tkivu pacova. aMMP-9 – aktivni oblik MMP-9; proMMP-2 – latentni oblik MMP-2; aMMP-2 – aktivni oblik MMP-2; C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); FA – svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, ### $p < 0,01$ u poređenju sa C2 grupom, ^{DM} $p < 0,01$ u poređenju sa DM grupom, ^{FA} $p < 0,01$ u poređenju sa FA grupom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom.

4.3.8. Histološka i morfometrijska analiza uzoraka tkiva srca

Vlakna miokarda bila su pravilno raspoređena, a KM su se odlikovali fiziološkom morfologijom u svim testiranim grupama (Slika 26). Primena folne kiseline nije uticala na vrednosti histomorfometrijskih parametara kod zdravih pacova. U DM+FA grupi debljina IVS (1737,3 (1238,6-1825,6) μm) je bila znatno manja nego u FA grupi (2178,2 (2038,0-2400,7) μm , $p = 0,009$, Tabela 8), a ostali testirani parametri se nisu razlikovali među grupama.



Slika 26. Poprečni presek srca pacova (hematoksilin/eozin bojenje, uvećanje 50 puta). C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); FA – svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana.

Tabela 8. Uticaj dijabetes melitusa i primene folne kiseline na histomorfometrijske parametre srca pacova.

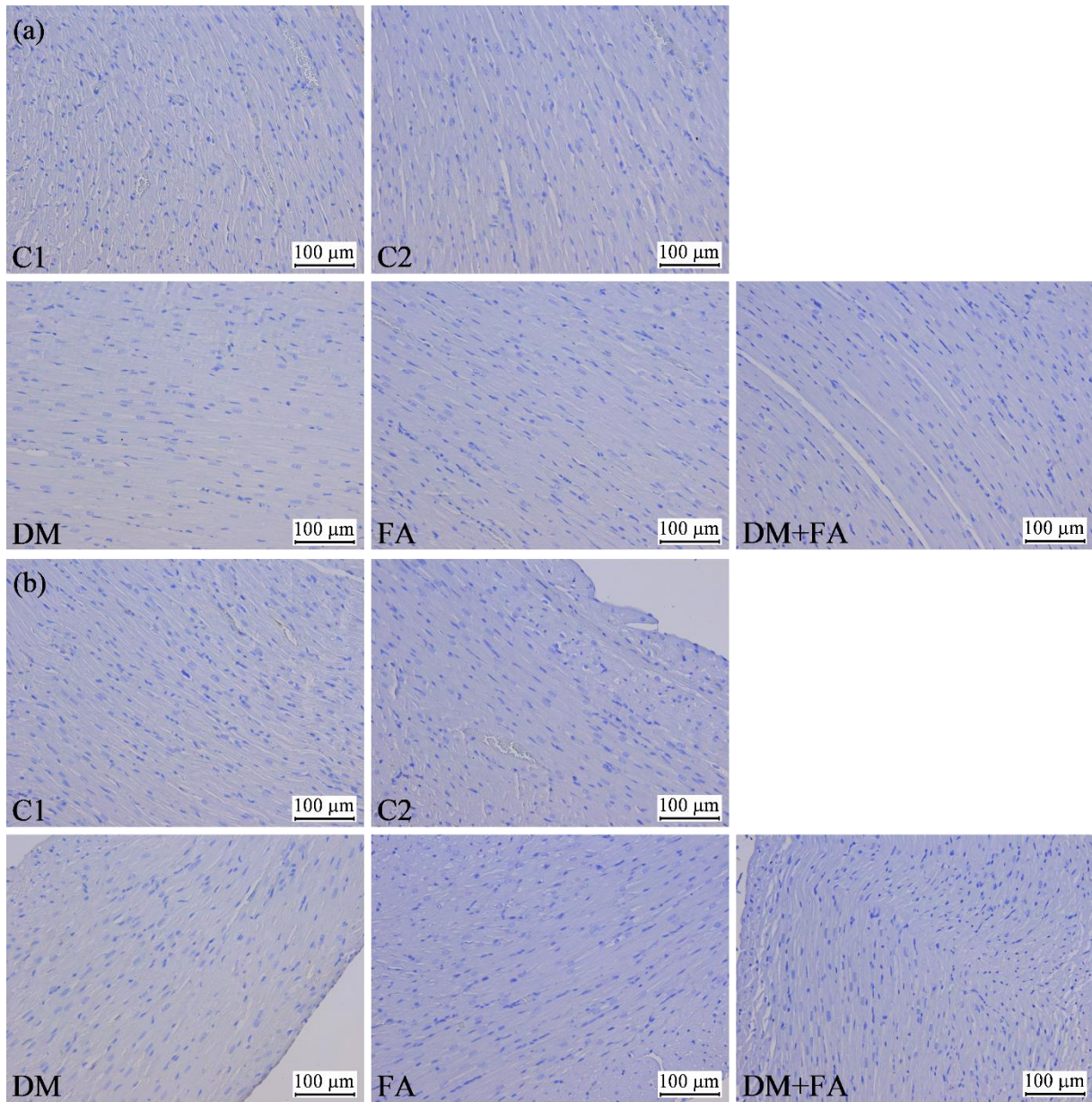
Parametri	Grupe [medijana (najmanja-najveća vrednost)]				
	C1	C2	DM	FA	DM+FA
Debljina zida LK (µm)	2528,7 (2137,8-3264,7)	2242,6 (1810,0-2290,6)	2117,6 (2033,3-2409,6)	2238,2 (1994,7-2718,2)	1900,6 (1814,7-2793,8)
Debljina zida DK (µm)	878,9 (648,3-994,7)	821,8 (712,9-963,4)	765,3 (478,1-848,9)	788,8 (698,1-243,9)	627,2 (484,7-751,3)
Debljina IVS (µm)	2429,5 (2113,5-2782,5)	2014,5 (1709,5-2394,5)	1875,8 (1666,6-2047,9) *	2178,2 (2038,0-2400,7)	1737,3 (1238,6-1825,6) ^{φφ}
Transverzalni prečnik KM (µm)	22,2 (20,8-23,1)	20,7 (19,5-21,6)	21,1 (20,4-22,0)	22,7(19,2-23,4)	22,8(19,0-24,7)

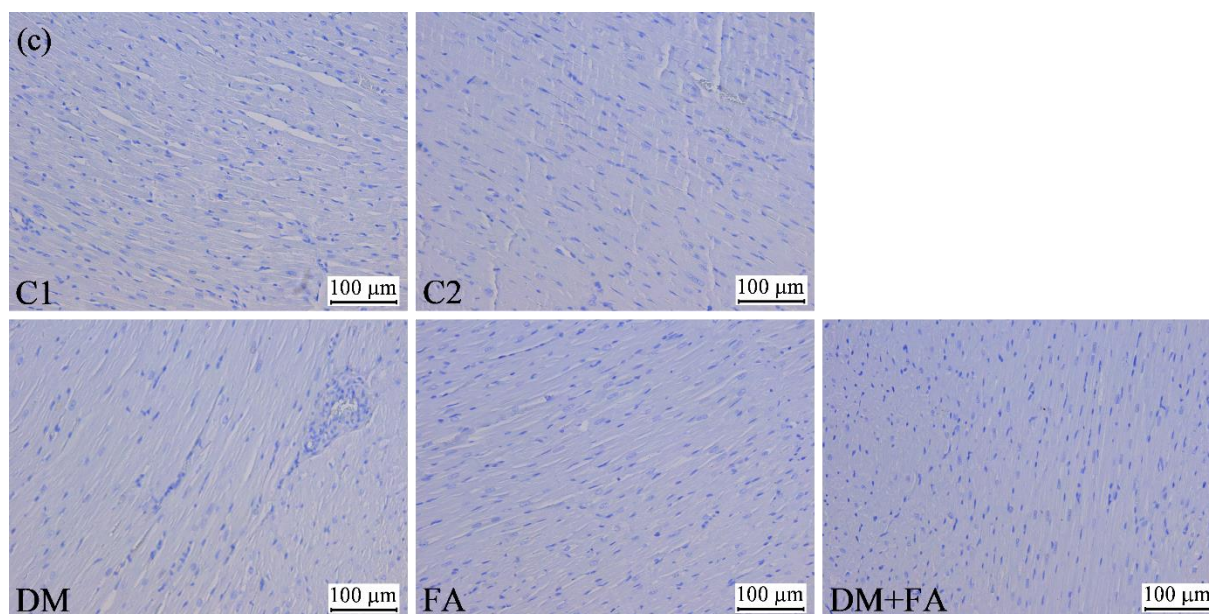
LK – leva komora; DK – desna komora; IVS – interventrikularni septum; KM – kardiomiocit; C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); FA – svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, ^{φφ} $p < 0,01$ u poređenju sa FA grupom – *Kruskal-Wallis* test praćen *Mann-Whitney* testom.

4.3.9. Imunohistohemijska analiza uzoraka tkiva srca

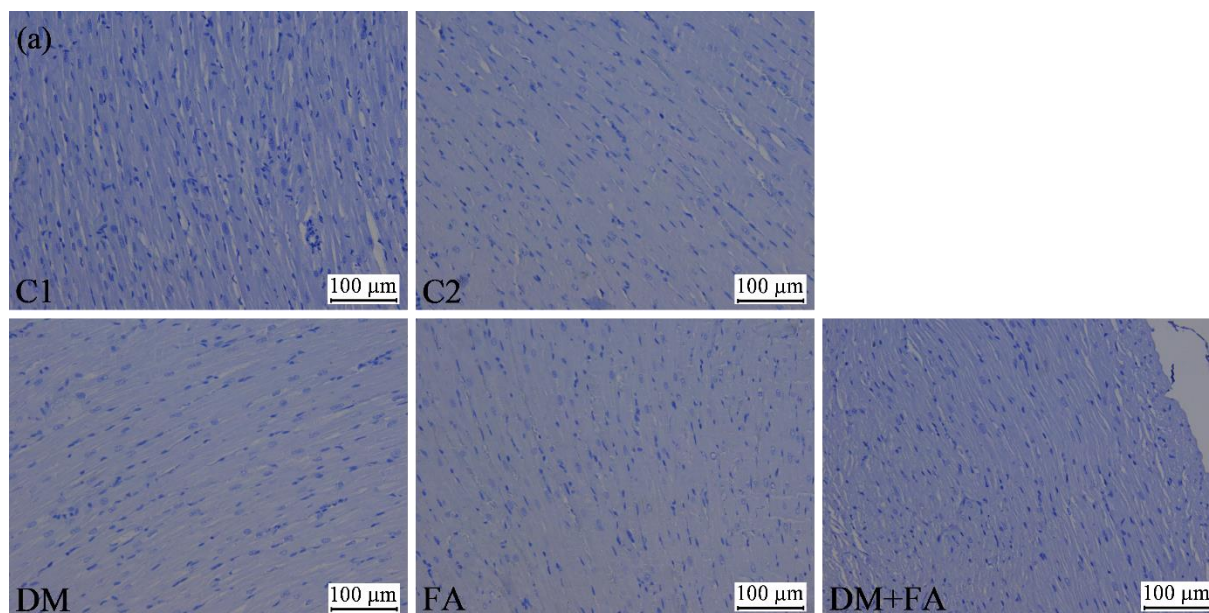
Pozitivnost BCL-2 i BCL-6 nije uočena ni u jednoj ćeliji reprezentativnih uzoraka srčanog tkiva (Slika 27 i 28). Pozitivnost Ki-67 je uočena u pojedinim ćelijama srčanog tkiva (Tabela 9, Slika 29). Statistički značajna razlika dobijena je poređenjem procenta Ki-67 pozitivnih KM u DM+FA i FA grupi ($p = 0,046$). Procenat PCNA pozitivnih KM je prikazan u Tabeli 9. Primena folne kiseline nije uticala na pozitivnost PCNA u LK, DK i IVS ni kod zdravih, ni kod pacova sa DM (Slika 30).

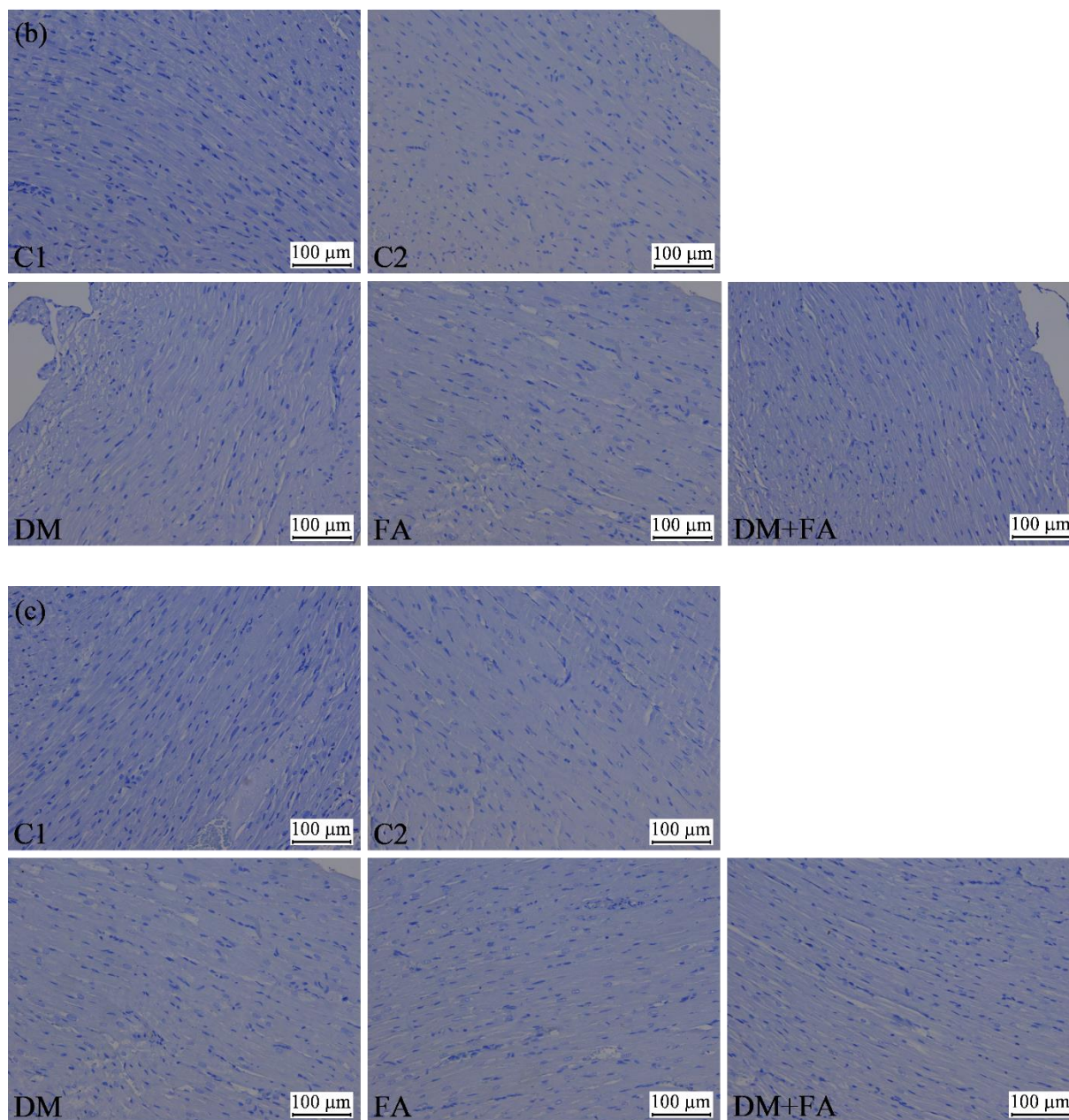
4. REZULTATI





Slika 27. Uticaj dijabetes melitusa i primene folne kiseline na imunohistohemijску ekspresiju BCL-2 u (a) levoj komori, (b) desnoj komori i (c) interventrikularnom septumu srca pacova. Na preparatima se mogu videti BCL-2 negativna jezdra kardiomiocita prebojena plavo (uvećanje 200 puta). C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); FA – svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana.



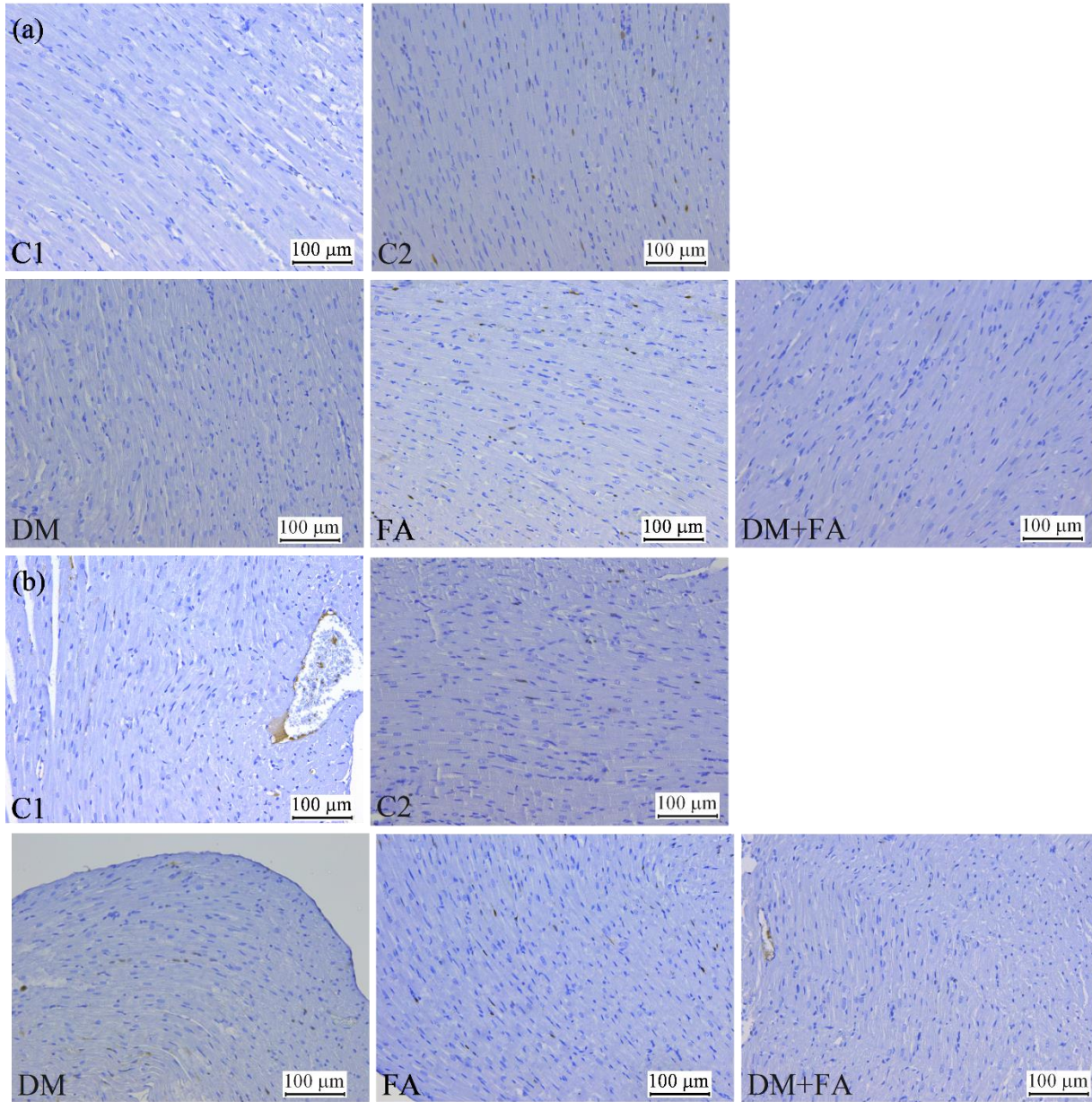


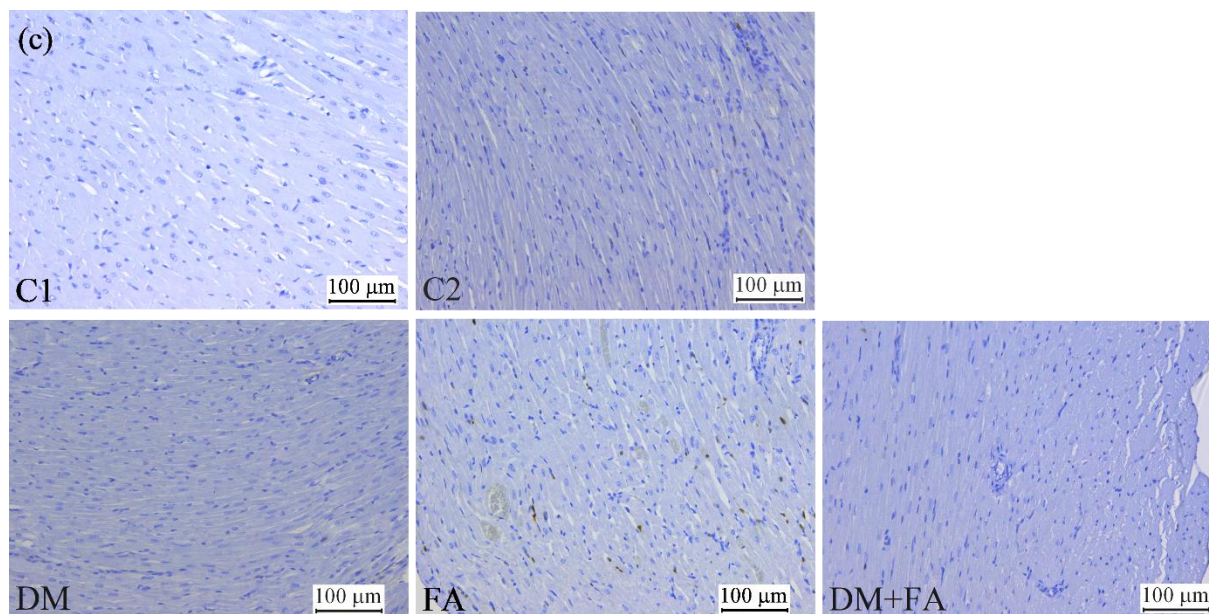
Slika 28. Uticaj dijabetes melitusa i primene folne kiseline na imunohistohemiju ekspresiju BCL-6 u (a) levoj komori, (b) desnoj komori i (c) interventrikularnom septumu srca pacova. Na preparatima se mogu videti BCL-6 negativna jedra kardiomiocita prebojena plavo (uvećanje 200 puta). C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); FA – svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana.

Tabela 9. Uticaj dijabetes melitusa i primene folne kiseline na imunohistohemijske parametre srca pacova.

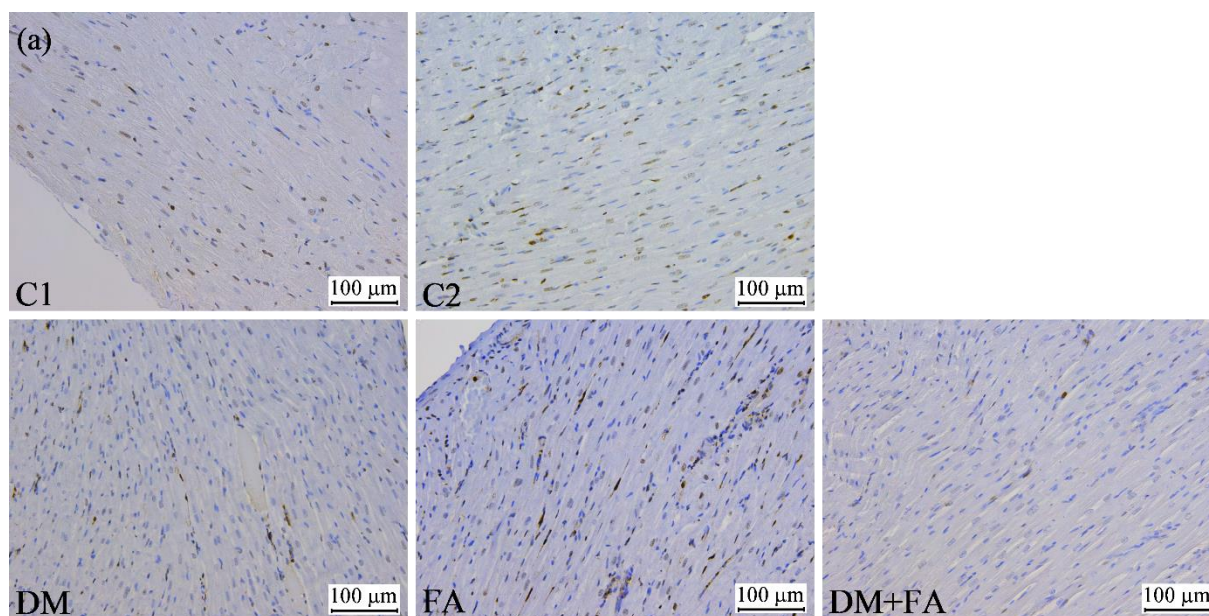
Parametri	Grupe [medijana (najmanja-najveća vrednost)]				
	C1	C2	DM	FA	DM+FA
Ki-67+ LK (%)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-0)
Ki-67+ DK (%)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-2)	1,5 (0-2)	0 (0-0) ^φ
Ki-67+ IVS (%)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0,5 (0-1)	0 (0-0)
PCNA+ LK (%)	4 (3-7)	5,5 (3-7)	2 (1-3) *	6 (5-7)	3 (1-4)
PCNA+ DK (%)	6 (5-7)	4,5 (4-6)	2,5 (1-4) *	3,5 (1-6)	4,5 (4-5)
PCNA+ IVS (%)	4 (4-5)	6,5 (3-8)	1,5 (0-3) *	4 (2-6)	3,5 (1-6)

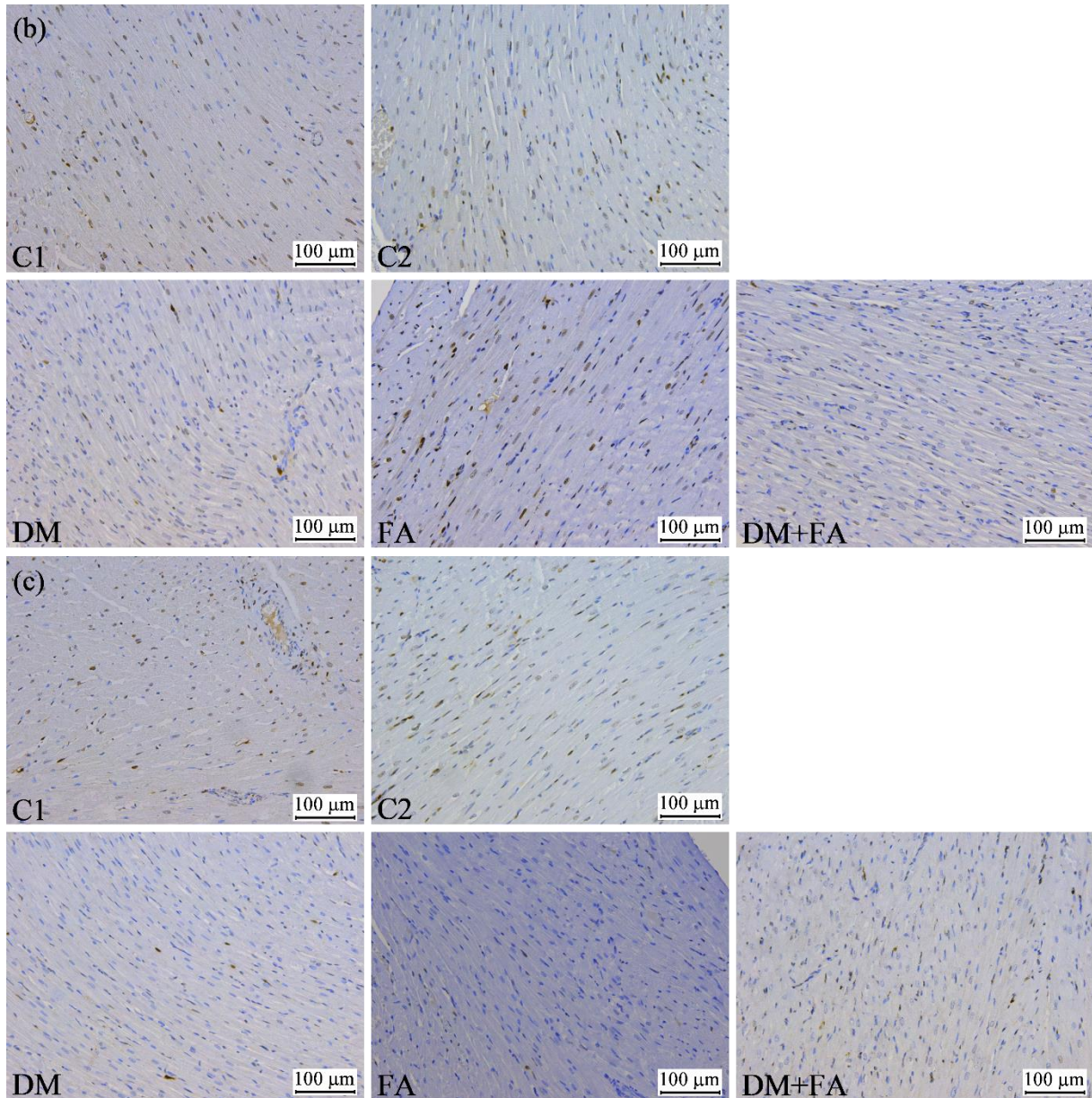
LK – leva komora; DK – desna komora; IVS – interventrikularni septum; C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); FA – svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, ^φ $p < 0,05$ u poređenju sa FA grupom – *Kruskal-Wallis* test praćen *Mann-Whitney* testom.





Slika 29. Uticaj dijabetesa melitusa i primene folne kiseline na imunohistohemiju ekspresiju Ki-67 u (a) levoj komori, (b) desnoj komori i (c) interventrikularnom septumu srca pacova. Na preparatima se mogu videti Ki-67 pozitivna jedra kardiomiocita prebojena smeđe i Ki-67 negativna jedra kardiomiocita prebojena plavo (uvećanje 200 puta). C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); FA – svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana.



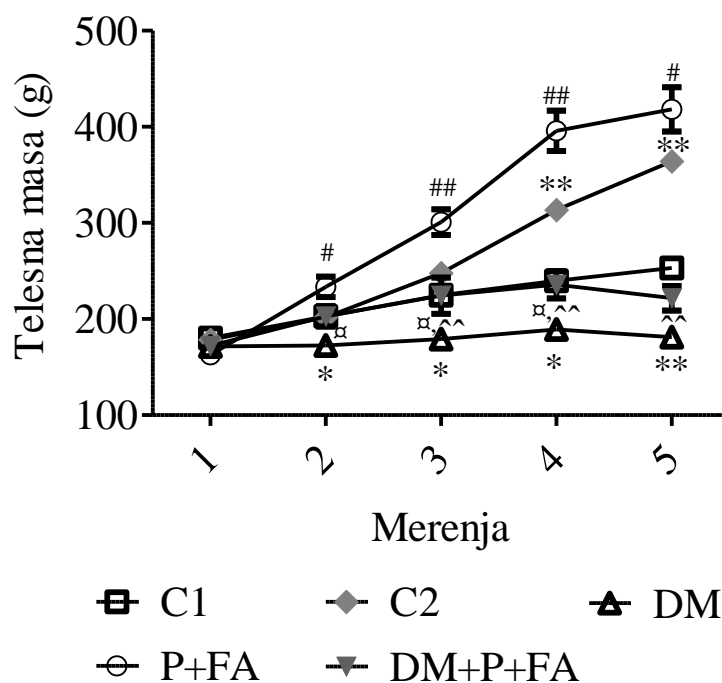


Slika 30. Uticaj dijabetes melitusa i primene folne kiseline na imunohistohemiju ekspresiju PCNA u (a) levoj komori, (b) desnoj komori i (c) interventrikularnom septumu srca pacova. Na preparatima se mogu videti PCNA pozitivna jedra kardiomiocita prebojena smeđe i PCNA negativna jedra kardiomiocita prebojena plavo (uvećanje 200 puta). C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); FA – svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana.

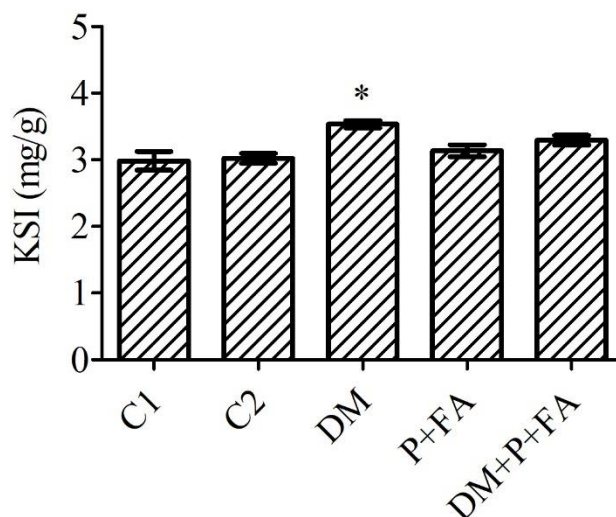
4.4. UTICAJ UDRUŽENE PRIMENE VITAMINA B6 I FOLNE KISELINE NA ISPITIVANE PARAMETRE

4.4.1. Telesna masa i kardiosomatski indeks

Na početku eksperimentalnog perioda nisu postojale razlike u telesnoj masi između testiranih grupa. Tokom perioda od četiri nedelje uočava se sporije napredovanje u masi, kako pacova sa DM bez tretmana, tako i onih koji su pored DM imali tretman folnom kiselinom (Grafikon 47). Telesna masa pacova u ove dve grupe se nije značajno razlikovala na kraju eksperimentalnog perioda ($p = 0,251$). Primena piridoksina i folne kiseline kod zdravih pacova, dovela je do značajnog porasta u telesnoj masi. Posle 4 nedelje tretmana prosečna telesna masa u grupi P+FA ($418,25 \pm 23,1$ g) bila je za skoro 15 % veća nego u grupi C2 ($364 \pm 8,3$ g, $p = 0,021$) i za 88 % veća nego u grupi DM+P+FA ($221,75 \pm 12,8$ g, $p < 0,001$). Primena piridoksina i folne kiseline nije uticala na vrednost KSI ni kod zdravih ni kod pacova sa DM (Grafikon 48).



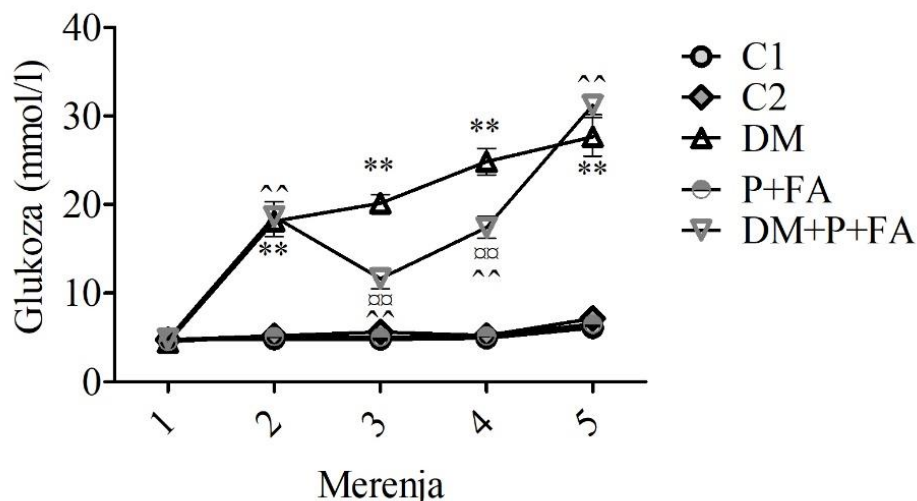
Grafikon 47. Uticaj dijabetes melitusa i udružene primene piridoksina i folne kiseline na telesnu masu pacova tokom 4 nedelje. Merenja su vršena (1) na početku eksperimentalnog perioda, (2) prve nedelje, (3) druge nedelje, (4) treće nedelje i (5) četvrte nedelje. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P+FA – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, # $p < 0,05$ u poređenju sa C2 grupom, $^{\square}$ $p < 0,05$ u poređenju sa DM grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, $^{##}$ $p < 0,01$ u poređenju sa C2 grupom, $^{\wedge}$ $p < 0,01$ u poređenju sa P+FA grupom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom.



Grafikon 48. Uticaj dijabetes melitusa i udružene primene piridoksina i folne kiseline na kardiosomatski indeks (KSI) pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P+FA – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom.

4.4.2. Biohemijski parametri

Povišen nivo glukoze u krvi pronađen je 72 sata nakon primene STZ kod svih tretiranih životinja. Tokom perioda praćenja od 4 nedelje nivo glukoze je bio u porastu kako u DM tako i u DM+P grupi bez postojanja statistički značajnih razlika između ove dve grupe (Grafikon 49). Istovremena primena piridoksina i folne kiseline kod zdravih pacova nije uticala na vrednosti glikemije. Na kraju eksperimentalnog perioda, nivo glukoze u grupi DM+P+FA ($31,2 \pm 1,1$ mmol/l) nije se značajno razlikovao od vrednosti izmerenih u DM grupi ($27,7 \pm 2,2$ mmol/l, $p = 0,503$), međutim bio je značajno povišen u poređenju sa P+FA grupom ($6,5 \pm 0,1$ mmol/l, $p < 0,001$).



Grafikon 49. Uticaj dijabetes melitusa i udružene primene piridoksina i folne kiseline na koncentraciju glukoze u kvi pacova tokom 4 nedelje. Merenja su vršena (1) na početku eksperimentalnog perioda, (2) 72 h nakon primene STZ (3) druge nedelje, (4) treće nedelje i (5) četvrte nedelje. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P+FA – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, ^{^^} $p < 0,01$ u poređenju sa DM grupom, ^{^^^} $p < 0,01$ u poređenju sa P+FA grupom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom.

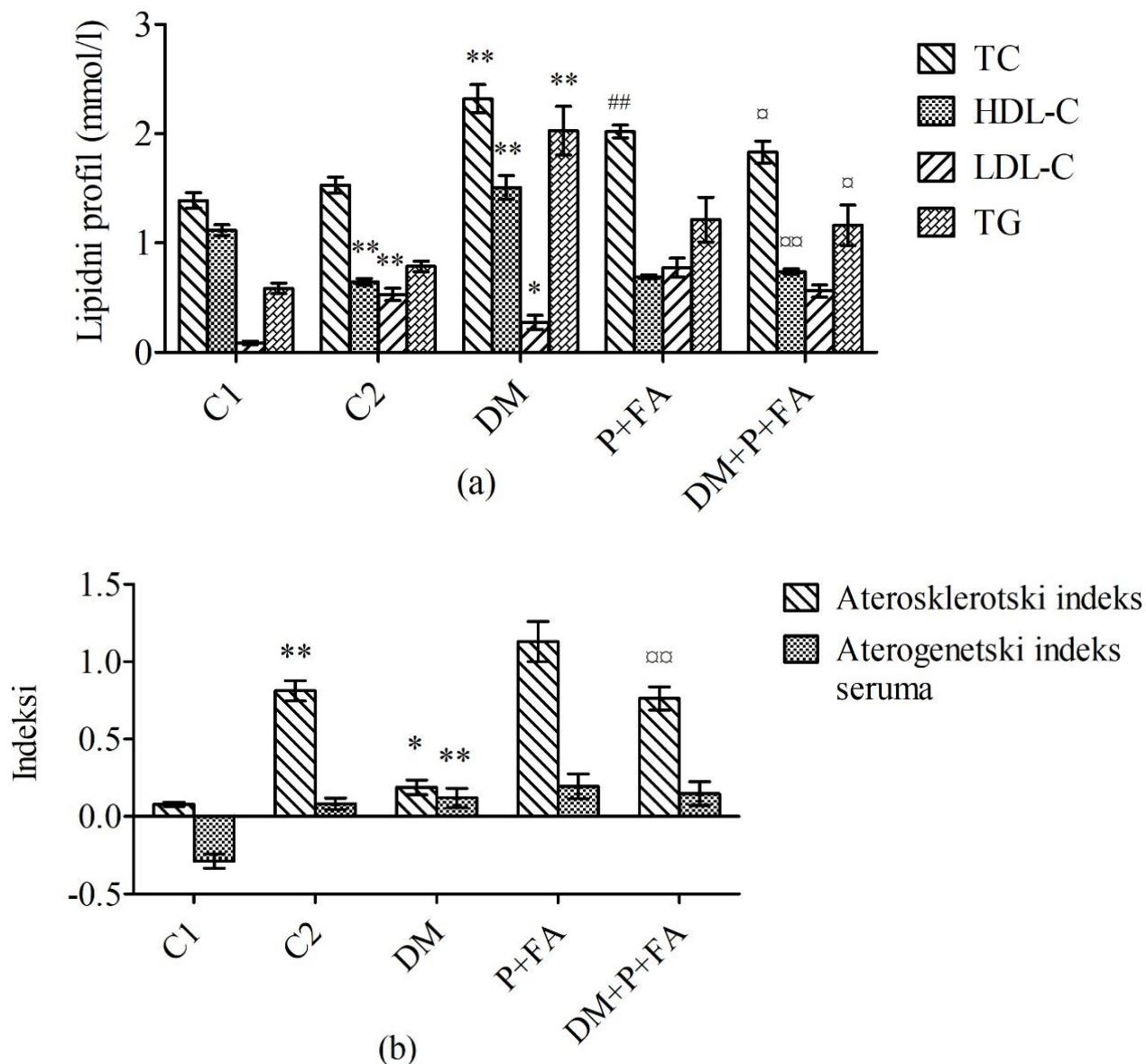
U Tabeli 10 prikazan je uticaj primene piridoksina i folne kiseline na vrednosti pojedinih biohemijskih parametara u serumu i plazmi eksperimentalnih životinja. Primena ova dva vitamina nije značajno uticala na vrednosti Hcy ($p > 0,05$). Primena piridoksina i folne kiseline dovela je do smanjenja aktivnosti LDH u serumu pacova iz grupe P+FA u poređenju sa C2 grupom ($p = 0,048$), međutim nije uticala na vrednosti LDH u serumu pacova sa DM. Poređenjem koncentracije hs cTnT uočava se da kod zdravih pacova udružena primena piridoksina i folne kiseline nije uticala na ovaj parametar, dok je kod pacova sa DM koncentracija hs cTnT bila značajno viša nego kod pacova sa DM ($p = 0,043$). Primena piridoksina i folne kiseline nije dovela do povećanja smanjene koncentracije fibrinogena u plazmi pacova nastale usled DM (DM+P+FA u poređenju sa DM grupom – $p = 0,455$), takođe, ni kod zdravih pacova nisu uočene promene u koncentraciji fibrinogena nakon primene piridoksina i folne kiseline (P+FA u poređenju sa C2 grupom – $p = 0,772$). U DM+P+FA grupi uočava se povećana vrednost vWF u poređenju sa P+FA grupom ($p = 0,001$).

Tabela 10. Uticaj dijabetes melitusa i udružene primene piridoksina i folne kiseline na vrednosti pojedinih biohemijskih parametara u serumu i plazmi eksperimentalnih životinja

Parametri	Grupe (srednja vrednost ± SEM)				
	C1	C2	DM	P+FA	DM+P+FA
Hcy (mmol/l)	9,0 ± 0,5	10,4 ± 0,6	8,3 ± 0,4	7,7 ± 1,0	6,7 ± 0,8
LDH (U/l)	3887,1 ± 358,5	4438,4 ± 331,7	3913,6 ± 249,3	2861,9 ± 168,6 [#]	2874,8 ± 429,4
hs cTnT (ng/L)	25,8 ± 6,2	23,1 ± 2,4	6,4 ± 1,0 [*]	33,0 ± 6,2	32,8 ± 10,3 [¤]
Fibrinogen (g/l)	2,6 ± 0,3	2,2 ± 0,1	1,2 ± 0,2 ^{**}	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,2
vWF Ac (%)	214,3 ± 30,4	99,4 ± 4,3	467,9 ± 43,6 ^{**}	192,1 ± 8,6	377,7 ± 36,0 ^{^^}

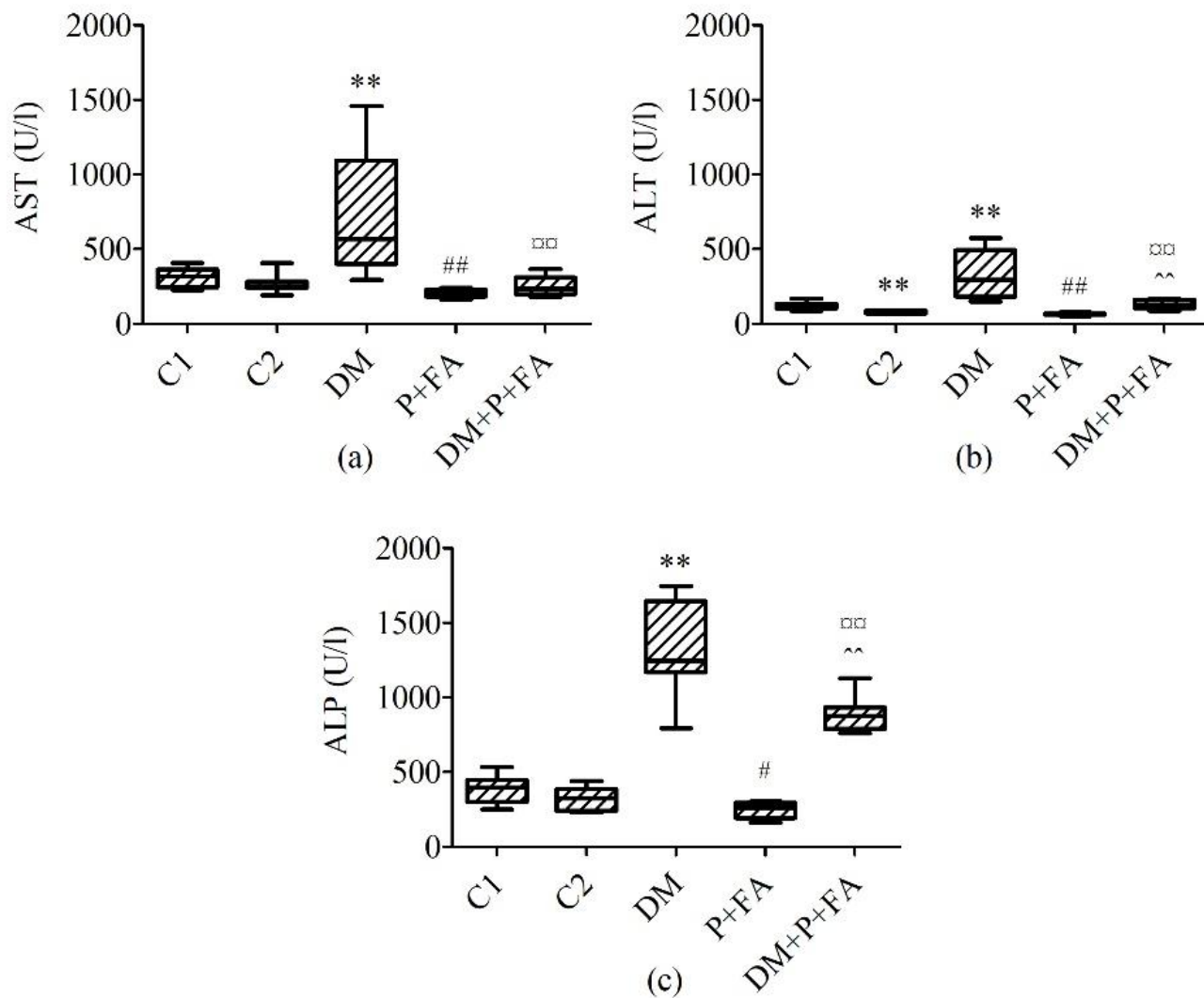
Hcy – homocistein; LDH – laktat dehidrogenaza; hs cTnT – srčani troponin T; vWF – fon Vilebrand faktor; Ac (%) – procenat fiziološke vrednosti; C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P+FA – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. * p < 0,05 u poređenju sa C1 grupom, [#] p < 0,05 u poređenju sa C2 grupom, [¤] p < 0,05 u poređenju sa DM grupom, ^{**} p < 0,01 u poređenju sa C1 grupom, ^{^^} p < 0,01 u poređenju sa P+FA grupom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom.

Udružen tretman piridoksinom i folnom kiselinom je kod zdravih pacova doveo do povećanja TC (p = 0,009), dok na ostale parametre lipidnog profila nije uticao (Grafikon 50 a). Kod pacova sa DM tretiranim piridoksinom i folnom kiselinom nisu postojale razlike u ovim parametrima u poređenju sa P+FA grupom. Poređenjem DM+P+FA i DM grupe dobija se značajno smanjenje TC, HDL-C i TG (p = 0,016, p < 0,001, p = 0,02, redom), dok se LDL-C nije razlikovao između ove dve grupe (p = 0,147). Udružena primena piridoksina i folne kiseline je povećala AI kod pacova sa DM, a nije uticala na vrednosti AIS, niti je imala uticaj na ove parametre kod zdravih pacova (Grafikon 50 b).

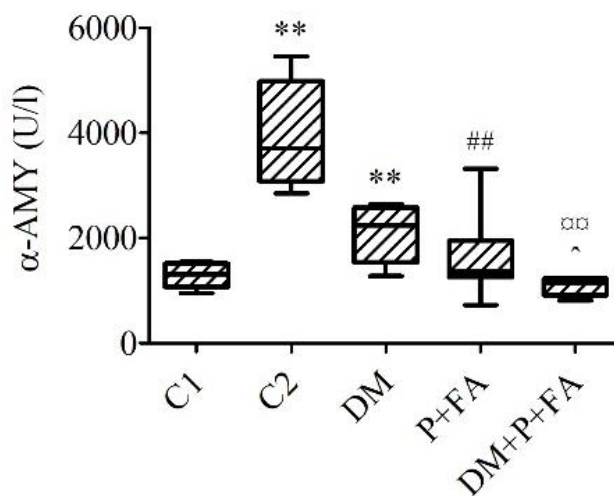


Grafikon 50. Uticaj dijabetesa melitusa i udružene primene piridoksina i folne kiseline na (a) lipidni profil i (b) indekse pokazatelje aterosklerotskog rizika u serumu pacova. TC – ukupan holesterol; HDL-C – holesterol lipoproteina visoke gustine; LDL-C – holesterol lipoproteina niske gustine; TG – trigliceridi; C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P+FA – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, [□] $p < 0,05$ u poređenju sa DM grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, ^{##} $p < 0,01$ u poređenju sa C2 grupom, ^{□□} $p < 0,01$ u poređenju sa DM grupom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom.

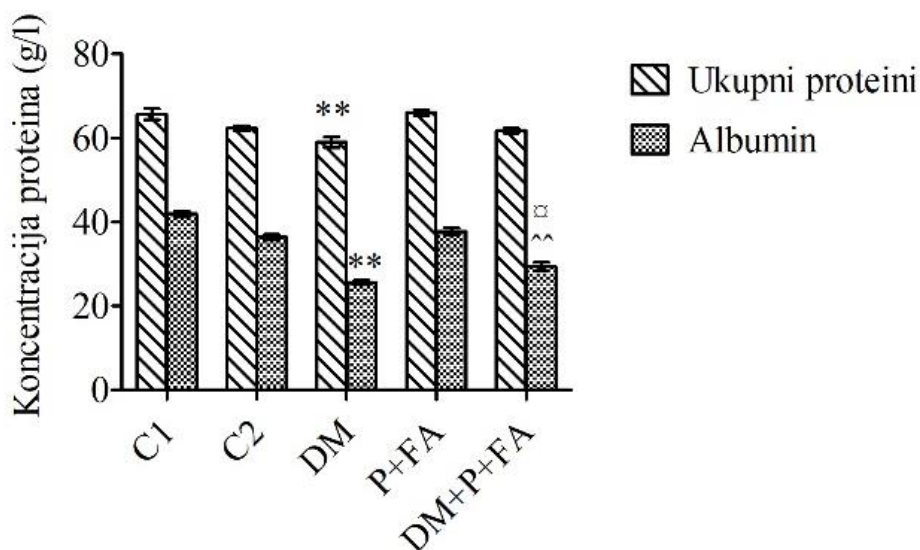
Na Grafikonu 51 prikazana je aktivnost hepatičnih enzima u serumu. Udružen tretman piridoksinom i folnom kiselinom je smanjio vrednosti AST u serumu pacova sa DM u poređenju sa DM grupom za oko 58 % ($p = 0,002$) i doveo ga do vrednosti koje se nisu razlikovale od vrednosti dobijenih u P+FA grupi ($p = 0,074$). Takođe, ovaj tretman je doveo i do smanjenja aktivnosti AST u grupi P+FA u poređenju sa C2 grupom ($p = 0,002$). Primena piridoksina i folne kiseline je dovela do smanjenja ALT aktivnosti kod zdravih pacova u poređenju sa C2 grupom ($p = 0,002$). Slične efekte uočavamo i pri poređenju aktivnosti ALT između DM+P+FA i DM grupe ($p = 0,002$), međutim iako je tretman vitaminima smanjio povećane vrednosti ALT izazvane postojanjem DM, u grupi DM+P+FA se uočava porast aktivnosti u poređenju sa aktivnošću u grupi P+FA ($p = 0,001$). Poređenjem vrednosti ALP uočavamo sličnu dinamiku promena aktivnosti kao i za ALT. Piridoksin i folna kiselina su doveli do smanjenja ALP aktivnosti kod zdravih pacova u poređenju sa C2 grupom ($p = 0,004$). Pri poređenju aktivnosti ALP između DM+P+FA i DM grupe postoji statistički značajno smanjenje aktivnosti u grupi tretiranoj piridoksinom i folnom kiselinom ($p = 0,003$), međutim u grupi DM+P+FA se uočava porast aktivnosti u poređenju sa aktivnošću u grupi P+FA ($p = 0,001$). Primena piridoksina i folne kiseline kod pacova sa DM značajno je smanjila aktivnost α -AMY u poređenju sa DM ($p = 0,0019$) i P+FA grupom ($p = 0,012$, Grafikon 52). Primena piridoksina i folne kiseline nije značajno uticala na prethodno smanjenu koncentraciju ukupnih proteina kod pacova sa DM (Grafikon 53). Rezultati pokazuju da nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji ukupnih proteina pri poređenju vrednosti u DM+P+FA i DM grupi ($p = 0,787$), kao ni pri poređenju vrednosti u DM+P+FA i P+FA grupi ($p = 0,244$). Međutim, posmatranjem koncentracije albumina uočavamo pozitivan efekat udružene primene vitamina. Koncentracija albumina u grupi DM+P+FA je bila veća u poređenju sa DM grupom ($p = 0,01$) i manja u poređenju sa P+FA grupom ($p < 0,001$).



Grafikon 51. Uticaj dijabetes melitusa i udružene primene piridoksina i folne kiseline na aktivnost (a) aspartat aminotransferaze (AST), (b) alanin aminotransferaze (ALT) i (c) alkalne fosfataze (ALP) u serumu pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P+FA – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. # $p < 0,05$ u poređenju sa C2 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa C2 grupom, ^^ $p < 0,01$ u poređenju sa DM grupom, ^ $p < 0,01$ u poređenju sa P+FA grupom – *Kruskal-Wallis* test praćen *Mann-Whitney* testom.

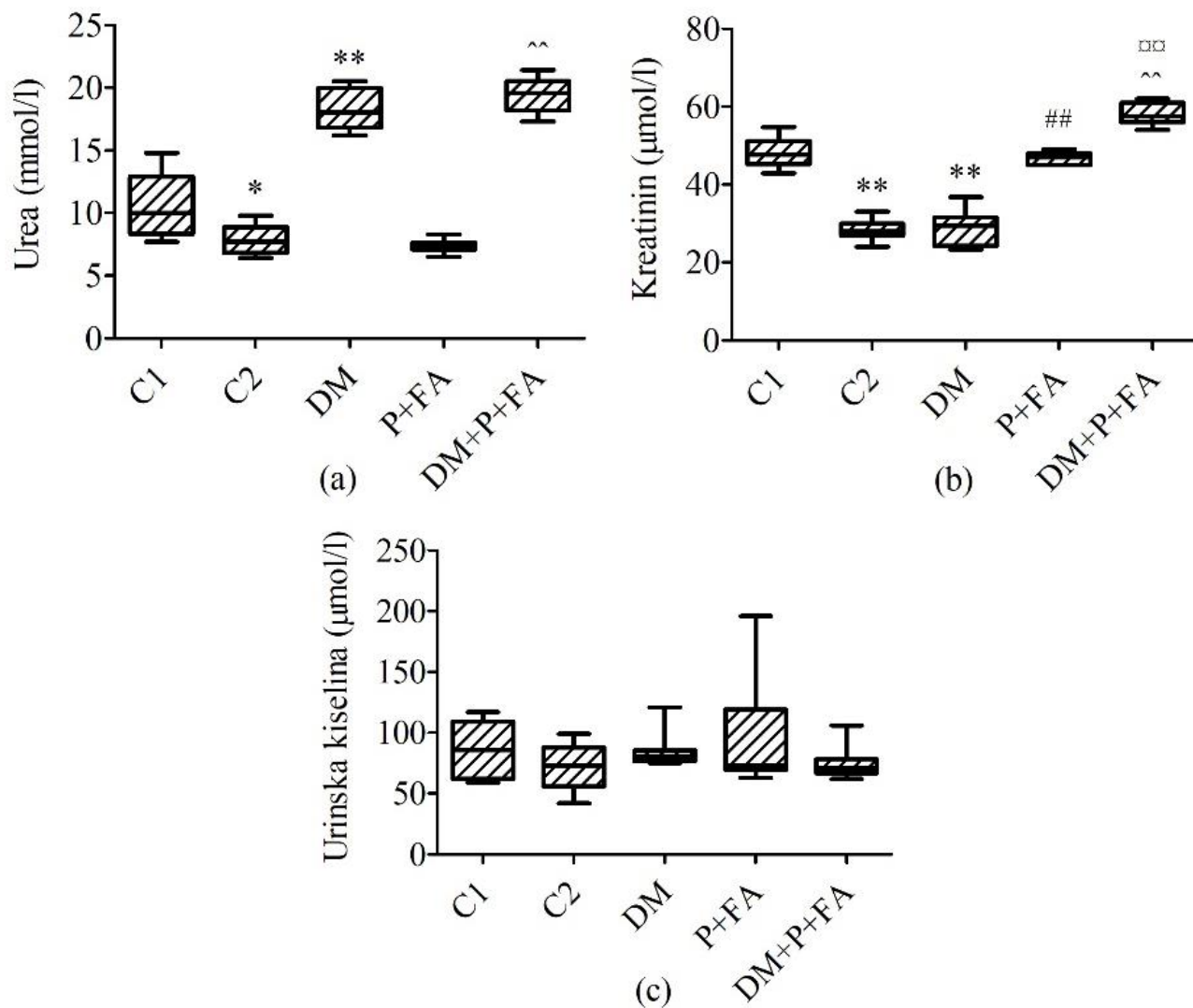


Grafikon 52. Uticaj dijabetes melitusa i udružene primene piridoksina i folne kiseline na aktivnost α -amilaze (α -AMY) u serumu pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P+FA – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. ^ p < 0,05 u poređenju sa P+FA grupom, ** p < 0,01 u poređenju sa C1 grupom, ## p < 0,01 u poređenju sa C2 grupom, ^^ p < 0,01 u poređenju sa DM grupom – *Kruskal-Wallis* test praćen *Mann-Whitney* testom.



Grafikon 53. Uticaj dijabetes melitusa i udružene primene piridoksina i folne kiseline na koncentraciju ukupnih proteina i albumina u serumu pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P+FA – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. ^ p < 0,05 u poređenju sa DM grupom, ** p < 0,01 u poređenju sa C1 grupom, ^^ p < 0,01 u poređenju sa P+FA grupom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom.

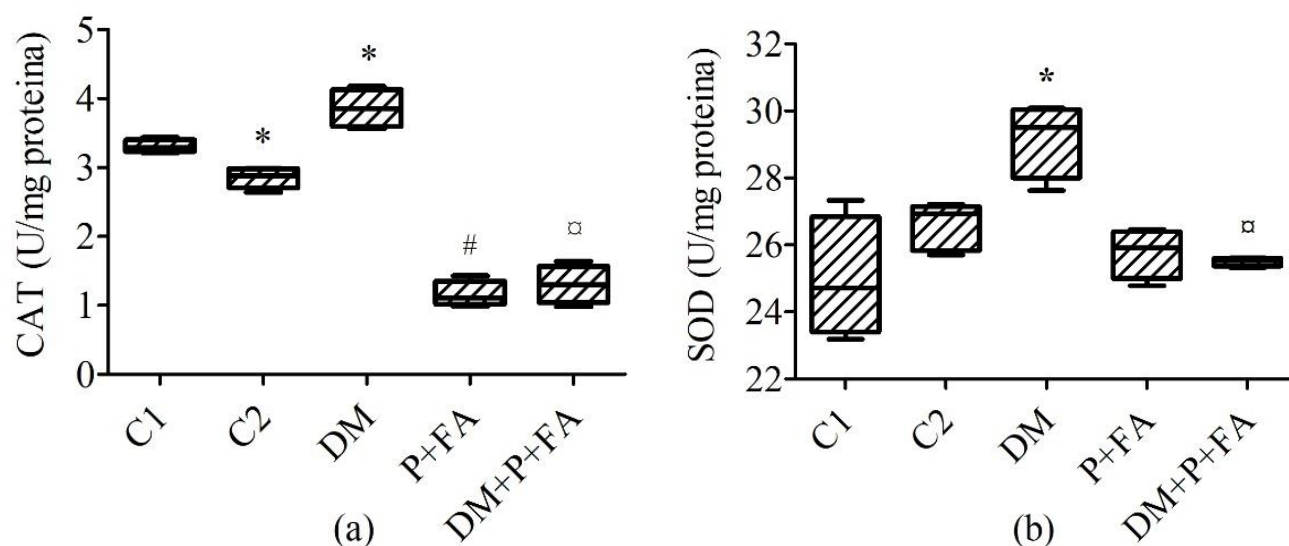
Parametri bubrežne funkcije, koncentracija uree i kreatinina u serumu, pokazali su razlike među ispitivanim grupama (Grafikon 54 a i b). Udružena primena piridoksina i folne kiseline nije uticala na koncentraciju uree ni kod zdravih ni kod pacova sa DM. Statistički značajna razlika u koncentraciji uree se uočava između DM+P+FA i P+FA grupa ($p = 0,001$). Za razliku od uree, kreatinin je bio povećan pri poređenju vrednosti u P+FA i C2 grupi ($p < 0,001$) i pri poređenju vrednosti u DM+P+FA i DM ($p = 0,001$), kao i DM+P+FA i P+FA grupi ($p = 0,001$). Poređenjem koncentracije mokraćne (urinske) kiseline u serumu, nisu dobijene razlike između grupa (Grafikon 54 c).



Grafikon 54. Uticaj dijabetes melitusa i udružene primene piridoksina i folne kiseline na koncentraciju (a) uree, (b) kreatinina i (c) urinske kiseline u serumu pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P+FA – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, ### $p < 0,01$ u poređenju sa C2 grupom, ^^ $p < 0,01$ u poređenju sa DM grupom, ^^ $p < 0,01$ u poređenju sa P+FA grupom – *Kruskal-Wallis* test praćen *Mann-Whitney* testom.

4.4.3. Aktivnost antioksidativnih enzima u tkivu srca pacova

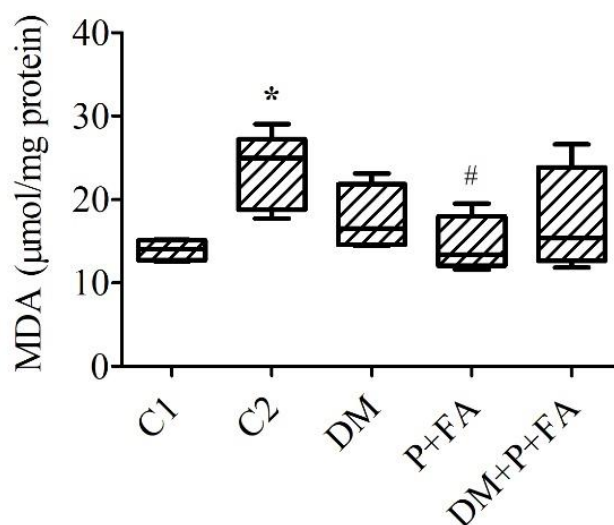
Primena piridoksina i folne kiseline je za preko 60 % smanjila aktivnost CAT kod zdravih pacova ($p = 0,014$, pri poređenju vrednosti u P+FA i C2 grupi) i za preko 65 % kod pacova sa indukovanim DM ($p = 0,021$, pri poređenju vrednosti u DM+P+FA i DM grupi, Grafikon 55 a). Nisu postojale statistički značajne razlike pri poređenju aktivnosti CAT u DM+P+FA i P+FA grupi ($p = 0,564$). Piridoksin i folna kiselina nisu uticali na aktivnost SOD kod zdravih pacova, ali su kod pacova sa DM doveli do smanjenja prethodno povećane aktivnosti za oko 15 % ($p = 0,021$, pri poređenju vrednosti u DM+P+FA i DM grupi, Grafikon 55 b). Aktivnost SOD u grupi DM+P+FA se nije razlikovala od aktivnosti u P+FA grupi ($p = 0,309$).



Grafikon 55. Uticaj dijabetes melitusa i udružene primene piridoksina i folne kiseline na aktivnost (a) katalaze (CAT) i (b) superoksid dismutaze (SOD) u tkivu srca pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P+FA – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, # $p < 0,05$ u poređenju sa C2 grupom, α $p < 0,05$ u poređenju sa DM grupom – *Kruskal-Wallis* test praćen *Mann-Whitney* testom.

4.4.4. Indeks lipidne peroksidacije u tkivu srca pacova

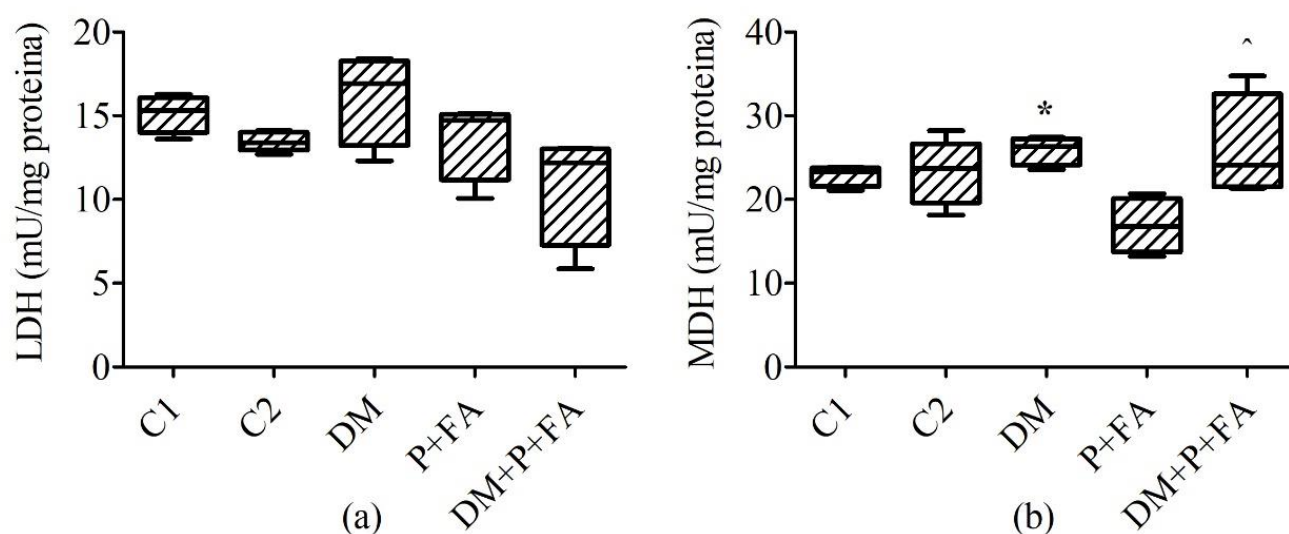
Primena piridoksina i folne kiseline nije uticala na vrednost MDA kod pacova sa DM, ali je značajno smanjila ovu vrednost kod zdravih pacova u grupi P+FA u poređenju sa vrednošću u grupi C2 ($p = 0,027$, Grafikon 56).



Grafikon 56. Uticaj dijabetes melitusa i udružene primene piridoksina i folne kiseline na koncentraciju malondialdehida (MDA) u tkivu srca pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P+FA – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, # $p < 0,05$ u poređenju sa C2 grupom – *Kruskal-Wallis* test praćen *Mann-Whitney* testom.

4.4.5. Aktivnost laktat i malat dehidrogenaze u tkivu srca pacova

Aktivnost LDH u srčanom tkivu pacova nije se značajno razlikovala među testiranim grupama ($p > 0,05$, Grafikon 57 a), međutim postojale su razlike u aktivnosti MDH u srčanom tkivu pacova ($p < 0,05$). U grupi DM+P+FA uočava se značajno povećanje aktivnosti ovog enzima (24,11 (21,36-34,74) mU/mg proteina) u odnosu na vrednosti u grupi P+FA (16,81 (13,22-20,67) U/mg proteina, $p = 0,021$, Grafikon 57 b).

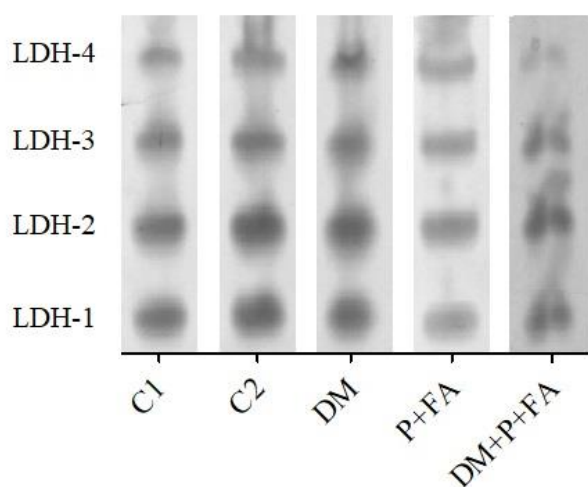


Grafikon 57. Uticaj dijabetes melitusa i udružene primene piridoksina i folne kiseline na aktivnost (a) laktat dehidrogenaze (LDH) i (b) malat dehidrogenaze (MDH) u tkivu srca pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P+FA – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, ^ $p < 0,05$ u poređenju sa P+FA grupom – *Kruskal-Wallis* test praćen *Mann-Whitney* testom.

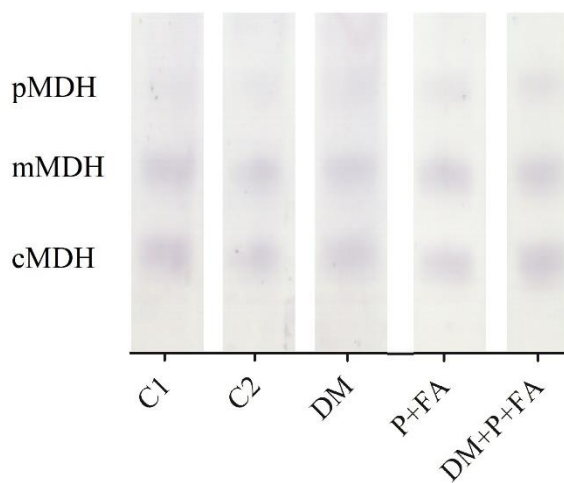
4.4.6. Izoforme laktat i malat dehidrogenaze u tkivu srca pacova

U tkivu srca svih testiranih eksperimentalnih životinja četiri LDH izoforme (LDH-1, LDH-2, LDH-3 i LDH-4) i tri MDH izoforme (pMDH, mMDH i cMDH) su detektovane (Slika 31 i 32). U svim grupama LDH-4 izoforma je imala najmanju zastupljenost (Grafikon 58). Relativna aktivnost LDH-2 izoforme se nije razlikovala među grupama. Udružena primena piridoksina i folne kiseline je dovela do povećanja relativne aktivnosti LDH-4 kod zdravih pacova u grupi P+FA ($15,06 \pm 0,25$ %) u poređenju sa grupom C2 ($9,27 \pm 0,28$ %, $p < 0,001$). Udruženi tretman piridoksinom i folnom kiselinom je značajno ublažio promene u relativnim aktivnostima LDH izoformi izazvanim DM. Aktivnost LDH-1 u DM+P+FA grupi ($35,21 \pm 1,05$ %) bila je značajno viša nego u DM ($23,26 \pm 0,71$ %, $p < 0,001$) i P+FA grupi ($29,39 \pm 0,92$ %, $p = 0,003$). Aktivnost LDH-3 u DM+P+FA grupi ($22,87 \pm 0,48$ %) bila je značajno niža nego u DM grupi ($29,19 \pm 0,68$ %, $p < 0,001$), dok je aktivnost LDH-4 u DM+P+FA grupi ($8,67 \pm 0,15$ %)

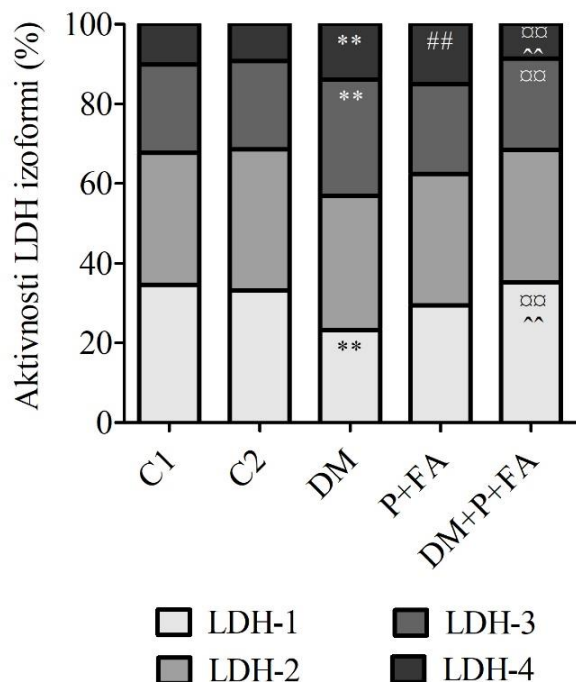
bila značajno niža nego u DM ($13,91 \pm 0,55$ %, $p < 0,001$) i P+FA grupi ($15,05 \pm 0,25$ %, $p < 0,001$). Takođe, relativna aktivnost izoformi MDH se značajno razlikovala među grupama (Grafikon 59). Udružena primena piridoksina i folne kiseline je dovela do povećanja relativne aktivnosti pMDH ($16,00 \pm 0,39$ %) kod zdravih pacova u grupi P+FA u poređenju sa grupom C2 ($13,07 \pm 0,24$ %, $p < 0,001$). Kod pacova sa DM primena piridoksina i folne kiseline je dovela do smanjenja relativne aktivnosti pMDH ($17,08 \pm 0,54$ %) u poređenju sa DM grupom ($19,76 \pm 0,40$ %, $p < 0,001$). Uočeno je smanjenje aktivnosti mMDH u grupi DM+P+FA ($38,88 \pm 0,76$ %) u odnosu na vrednosti u P+FA grupi ($47,02 \pm 0,78$ %, $p < 0,001$) i povećanje relativne aktivnosti cMDH u grupi DM+P+FA ($44,04 \pm 1,11$ %) u poređenju sa P+FA grupom ($36,98 \pm 0,99$ %, $p = 0,001$).



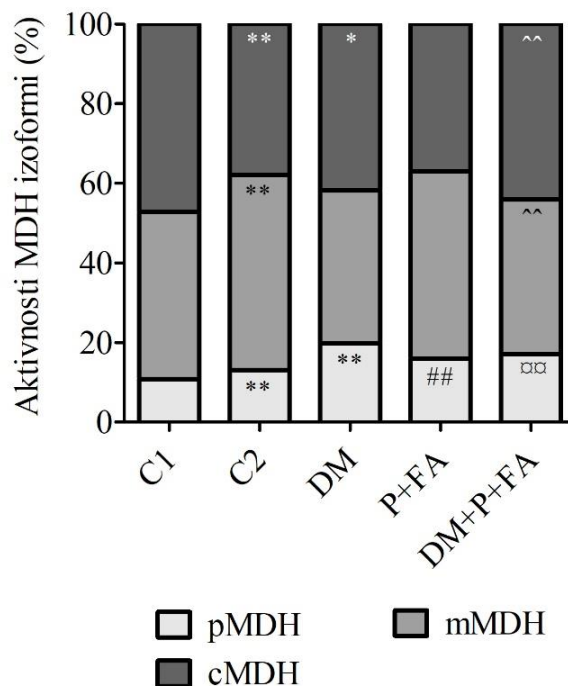
Slika 31. Reprezentativni zimogrami aktivnosti izoformi laktat dehidrogenaze (LDH-1, LDH-2, LDH-3 i LDH-4) detektovanih u srčanom tkivu pacova nativnom poliakrilamid gel elektroforezom. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P+FA – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana.



Slika 32. Reprezentativni zimogrami aktivnosti izoformi malat dehidrogenaze (MDH) detektovanih u srčanom tkivu pacova nativnom poliakrilamid gel elektroforezom. pMDH – peroksizomalna MDH; mMDH – mitohondrijalna MDH; cMDH – citosolna MDH; C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P+FA – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana.



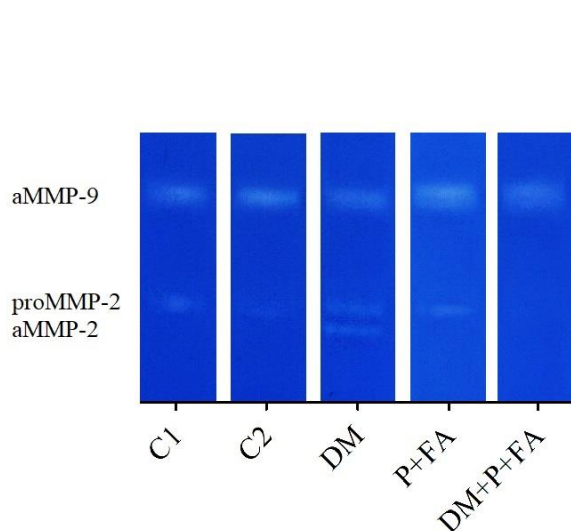
Grafikon 58. Uticaj dijabetes melitusa i udružene primene piridoksina i folne kiseine na relativne aktivnosti izoformi laktat dehidrogenaze (LDH) u srčanom tkivu pacova. C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P+FA – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseine (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseine (5 mg/kg) tokom 28 dana. ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa C2 grupom, ~ $p < 0,01$ u poređenju sa DM grupom, ^ $p < 0,01$ u poređenju sa P+FA grupom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom.



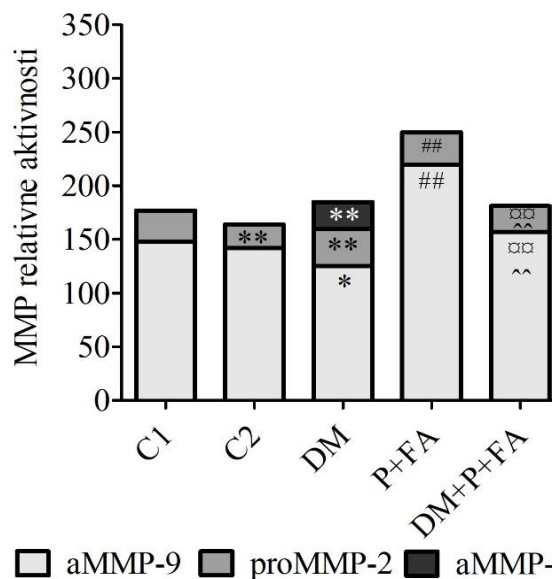
Grafikon 59. Uticaj dijabetes melitusa i udružene primene piridoksina i folne kiseine na relativne aktivnosti izoformi malat dehidrogenaze (MDH) u srčanom tkivu pacova. pMDH – peroksizomalna MDH; mMDH – mitohondrijalna MDH; cMDH – citosolna MDH; C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P+FA – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseine (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseine (5 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa C2 grupom, ~ $p < 0,01$ u poređenju sa DM grupom, ^ $p < 0,01$ u poređenju sa P+FA grupom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom.

4.4.7. Aktivnost matriksnih metaloproteinaza -2 i -9 u tkivu srca pacova

Na Slici 33 mogu se videti reprezentativni zimogrami aktivnosti MMP-2 i MMP-9 koji su detektovani u srčanom tkivu SDS-PAGE zimografijom. Latentni oblik MMP-2 (proMMP-2 na 72 kDa) se može uočiti u svim testiranim grupama, dok je aktivni oblik MMP-2 (aMMP-2 na 64 kDa) detektovan samo u DM grupi. Relativna aktivnost proMMP-2 bila je za 37 % veća u P+FA grupi, nego u C2 grupi ($p < 0,001$). U DM+P+FA grupi aktivnost ovog enzima je bila manja za 30 % nego u DM grupi ($p < 0,001$), i za 20 % nego u P+FA grupi ($p < 0,001$). Aktivni oblik MMP-9 (aMMP-9 na 83 kDa) detektovan je u svim testiranim grupama. Relativna aktivnost aMMP-9 bila je za 55 % veća u P+FA grupi, nego u C2 grupi ($p < 0,001$). U DM+P+FA grupi uočeno je povećanje aktivnosti aMMP-9 za 25 % u poređenju sa DM grupom ($p < 0,001$) i smanjenje za 29 % u poređenju sa P+FA grupom ($p < 0,001$, Grafikon 60).



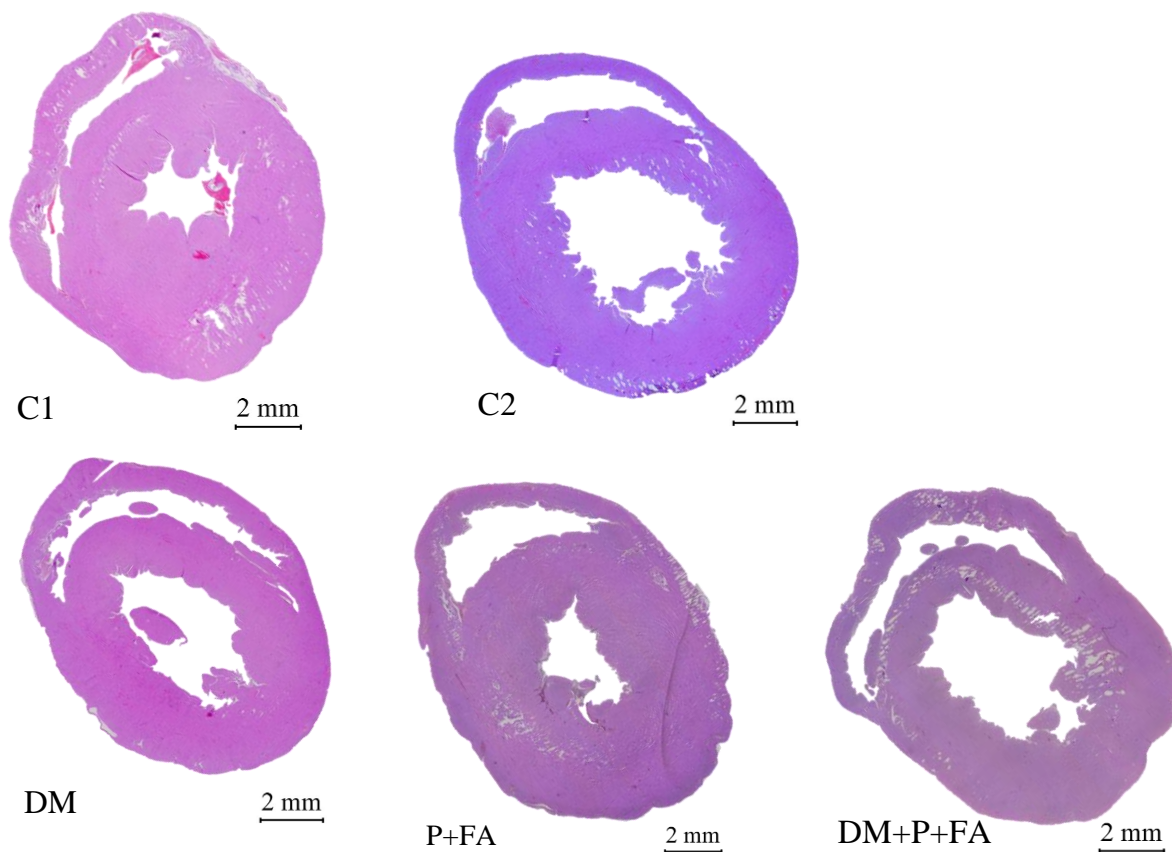
Slika 33. Reprezentativni zimogrami aktivnosti matriksnih proteinaza (MMP) -2 i -9 detektovanih u srčanom tkivu pacova natrijum-dodecil sulfat poliakrilamidnom elektroforezom (eng. *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE). C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P+FA – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana.



Grafikon 60. Uticaj dijabetes melitusa i udružene primene piridoksina i folne kiseline na relativne aktivnosti matriksnih metaloproteinaza (MMP) -2 i -9 u srčanom tkivu pacova. aMMP-9 – aktivni oblik MMP-9; proMMP-2 – latentni oblik MMP-2; aMMP-2 – aktivni oblik MMP-2; C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P+FA – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa C1 grupom, ### $p < 0,01$ u poređenju sa C2 grupom, ^{xxx} $p < 0,01$ u poređenju sa DM grupom, ^{^^} $p < 0,01$ u poređenju sa P+FA grupom – *one-way ANOVA* sa *Tukey posthoc* testom.

4.4.8. Histološka i morfometrijska analiza uzoraka tkiva srca

Vlakna miokarda bila su pravilno raspoređena, a KM su se odlikovali fiziološkom morfologijom u svim testiranim grupama (Slika 34). U P+FA grupi se uočava značajno povećanje debljine zida LK (3317,7 (3051,1-3788,7) μm) u poređenju sa kontrolnom C2 grupom (2242,6 (1810,0-2290,6) μm , $p = 0,014$). Takođe, u grupi P+FA je bio povećan transverzalni prečnik KM (25,2 (23,4-26,5) μm) u odnosu na vrednosti dobijene u C2 grupi (20,7 (19,5-21,6) μm , $p = 0,014$). U DM+P+FA grupi debljina zida LK (2332,5 (1895,8-2467,8) μm) je bila znatno manja nego u P+FA grupi (3317,7 (3051,1-3788,7) μm , $p = 0,021$), dok je debljina IVS (1557,1 (1453,1-1687,9) μm) bila znatno manja nego u DM (1875,8 (1666,6-2047,9) μm , $p = 0,041$) i P+FA grupi (2561,6 (2227,5-2910,5) μm , $p = 0,021$). Preostali testirani parametar, debljina zida DK se nije razlikovala među grupama (Tabela 11).



Slika 34. Poprečni presek srca pacova (hematoksilin/eozin bojenje, uvećanje 50 puta). C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P+FA – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana.

Tabela 11. Uticaj dijabetes melitusa i udružene primene piridoksina i folne kiseline na histomorfometrijske parametre srca pacova.

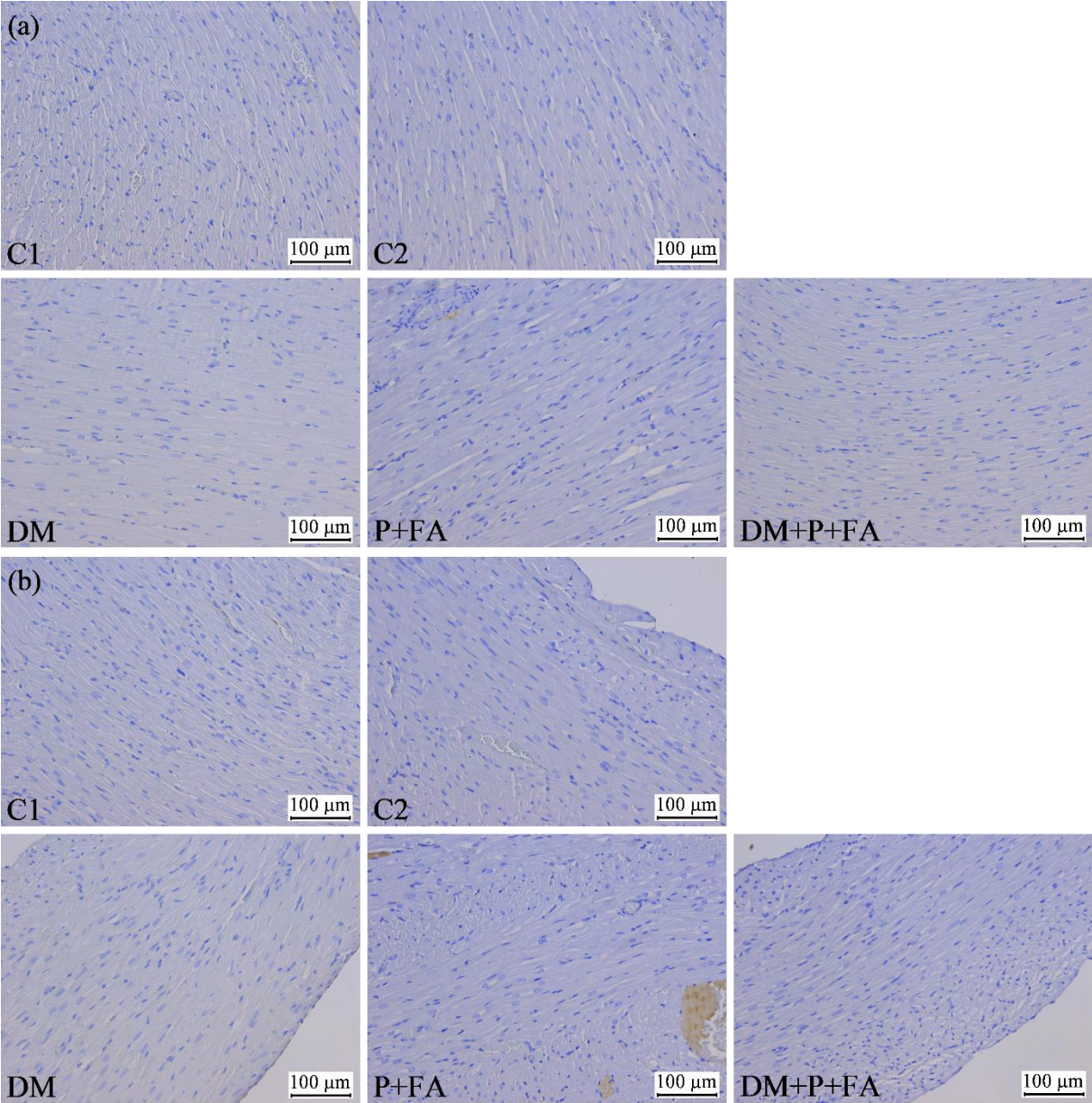
Parametri	Grupe [medijana (najmanja-najveća vrednost)]				
	C1	C2	DM	P+FA	DM+P+FA
Debljina zida LK (µm)	2528,7 (2137,8-3264,7)	2242,6 (1810,0-2290,6)	2117,6 (2033,3-2409,6)	3317,7 (3051,1-3788,7) [#]	2332,5 (1895,8-2467,8) [^]
Debljina zida DK (µm)	878,9 (648,3-994,7)	821,8 (712,9-963,4)	765,3 (478,1-848,9)	920,3 (836,5-982,7)	881,4 (530,6-1312,3)
Debljina IVS (µm)	2429,5 (2113,5-2782,5)	2014,5 (1709,5-2394,5)	1875,8 (1666,6-2047,9) [*]	2561,6 (2227,5-2910,5)	1557,1 (1453,1-1687,9) [^]
Transverzalni prečnik KM (µm)	22,2 (20,8-23,1)	20,7 (19,5-21,6)	21,1 (20,4-22,0)	25,2 (23,4-26,5) [#]	23,3(21,5-24,0)

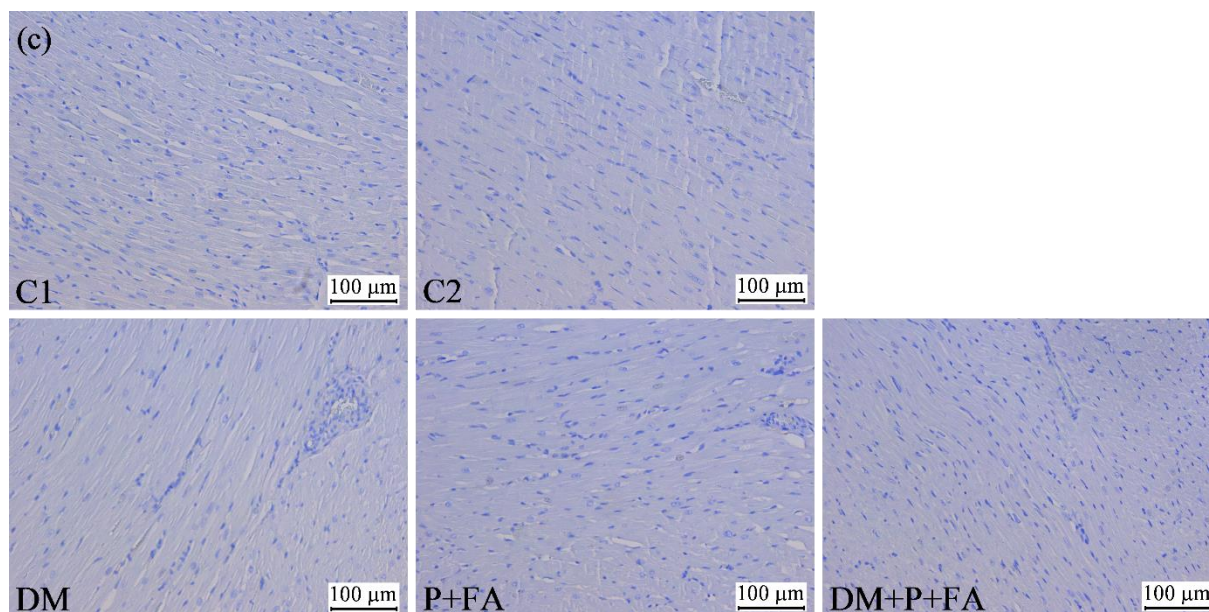
LK – leva komora; DK – desna komora; IVS – interventrikularni septum; KM – kardiomiocit; C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P+FA – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, [#] $p < 0,05$ u poređenju sa C2 grupom, [^] $p < 0,05$ u poređenju sa DM grupom, [^] $p < 0,05$ u poređenju sa P+FA grupom – *Kruskal-Wallis* test praćen *Mann-Whitney* testom.

4.4.9. Imunohistohemijska analiza uzoraka tkiva srca

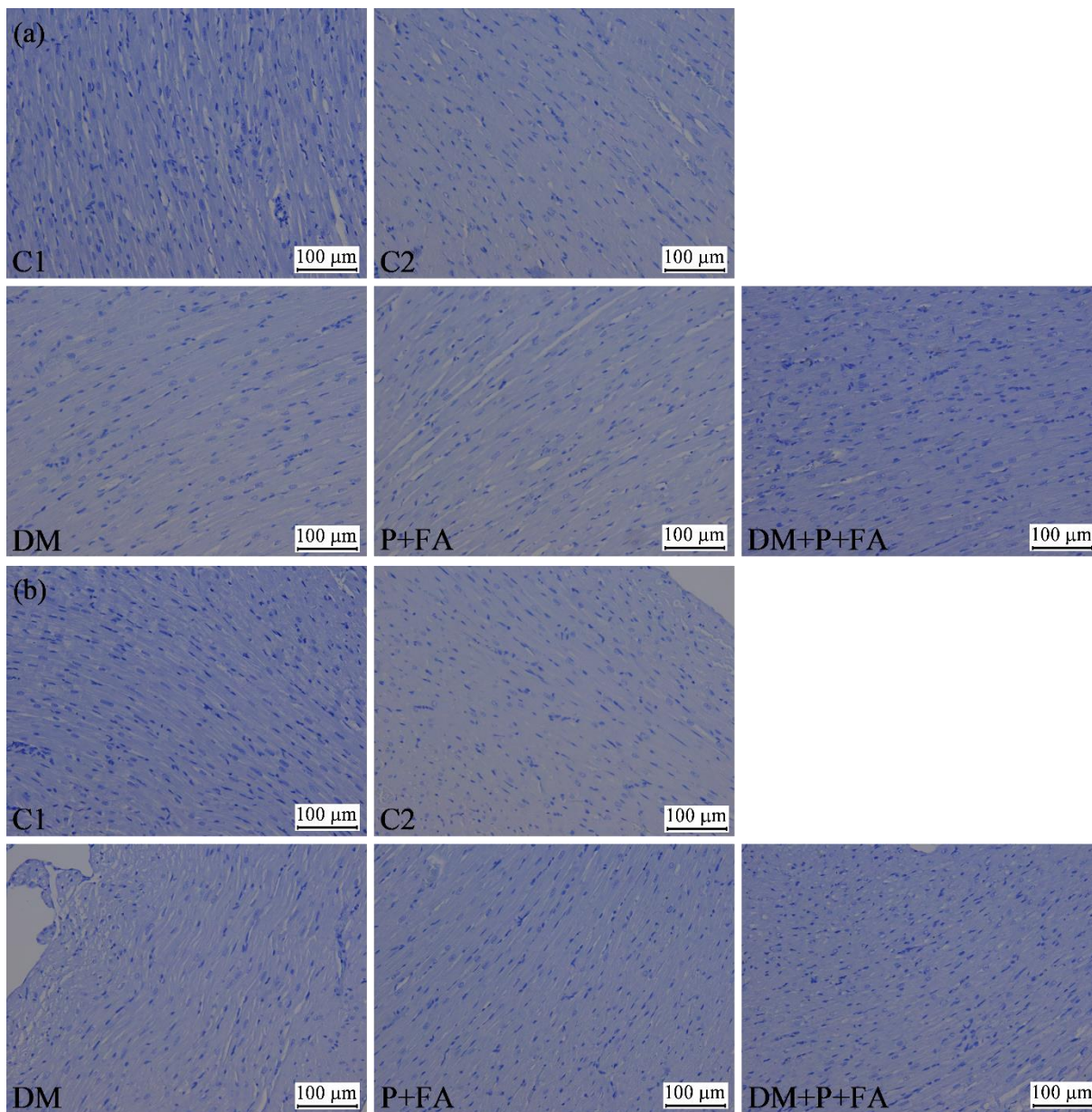
Pozitivnost BCL-2 i BCL-6 nije uočena ni u jednoj ćeliji reprezentativnih uzoraka srčanog tkiva (Slika 35 i 36). Pozitivnost Ki-67 je uočena u pojedinim ćelijama srčanog tkiva bez postojanja statistički značajne razlike između testiranih grupa (Tabela 12, Slika 37). Procenat PCNA pozitivnih KM je prikazan u Tabeli 12. Primena piridoksina i folne kiseline nije uticala na pozitivnost PCNA u LK kod zdravih pacova, ali je značajno povećala PCNA pozitivnost u LK pacova sa DM. U DK i IVS ni kod zdravih, ni kod pacova sa DM primena ovih vitamina nije uticala na pozitivnost PCNA (Slika 38).

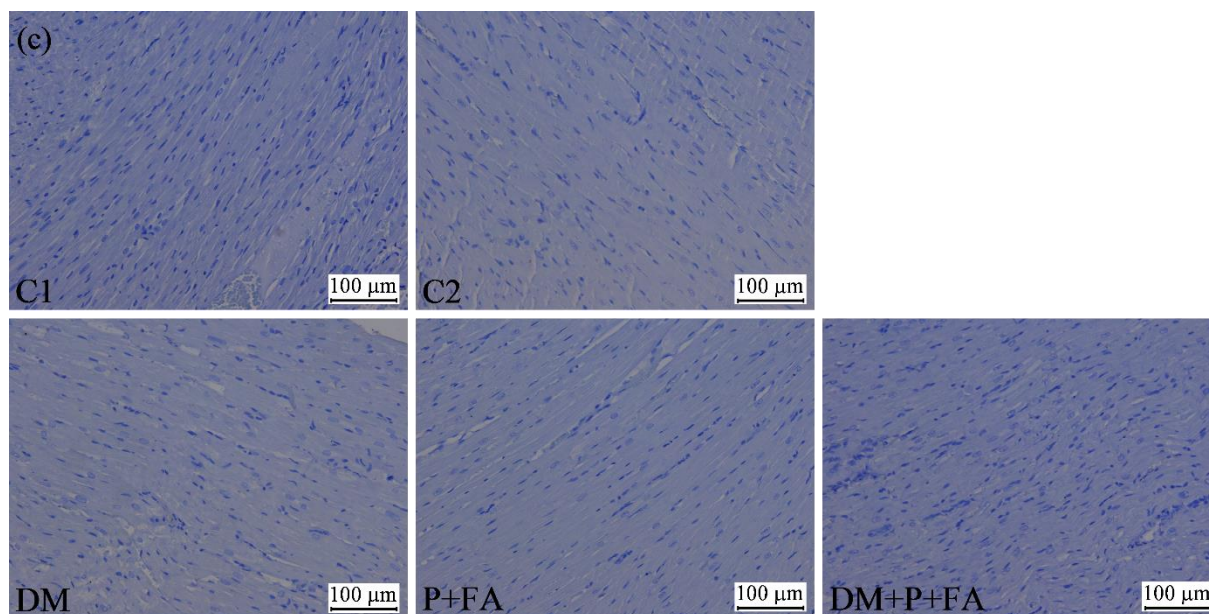
4. REZULTATI





Slika 35. Uticaj dijabetes melitusa i primene piridoksina na imunohistohemijску ekspresiju BCL-2 u (a) levoj komori, (b) desnoj komori i (c) interventrikularnom septumu srca pacova. Na preparatima se mogu videti BCL-2 negativna jedra kardiomiocita prebojena plavo (uvećanje 200 puta). C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P+FA – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana.



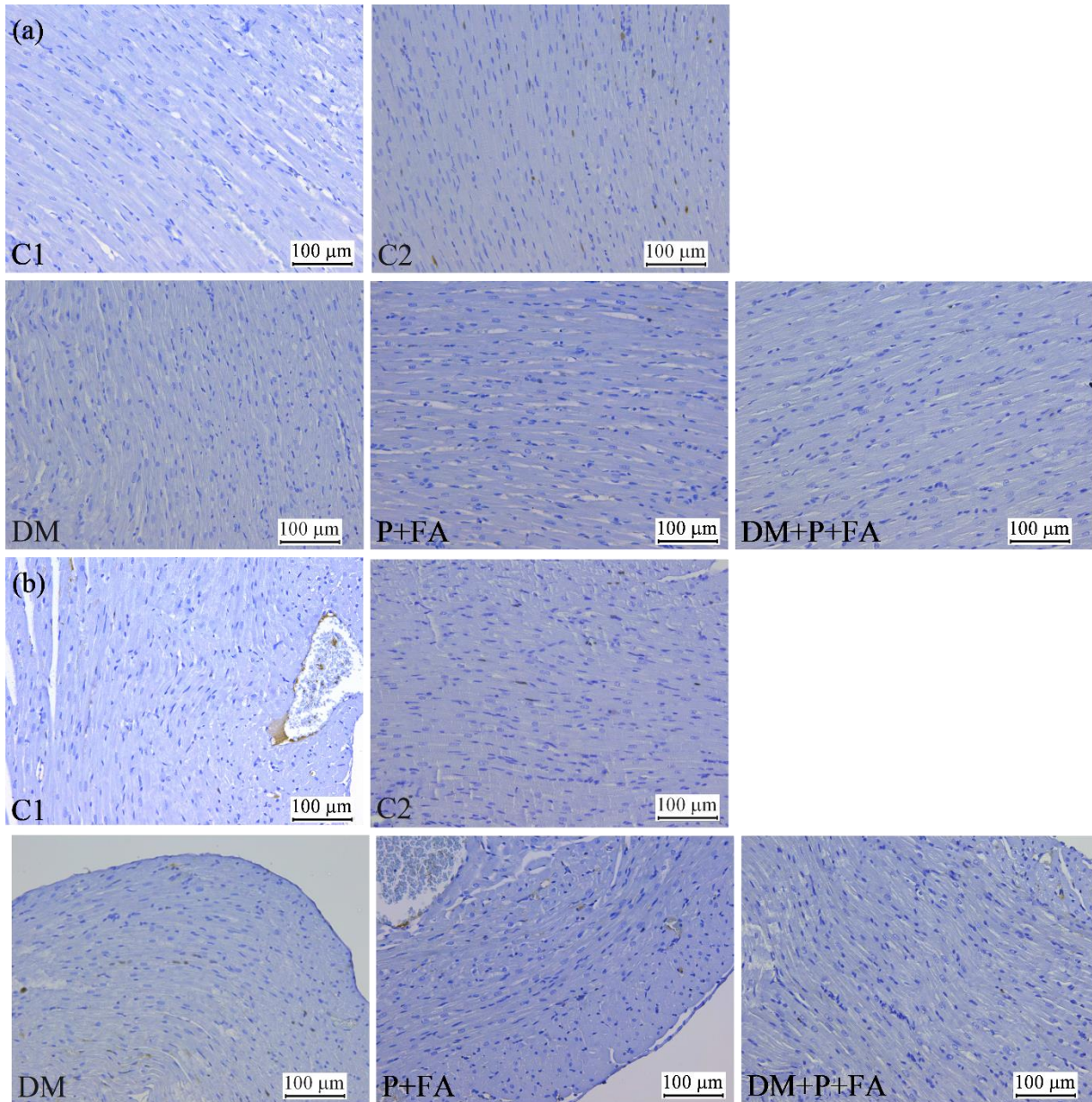


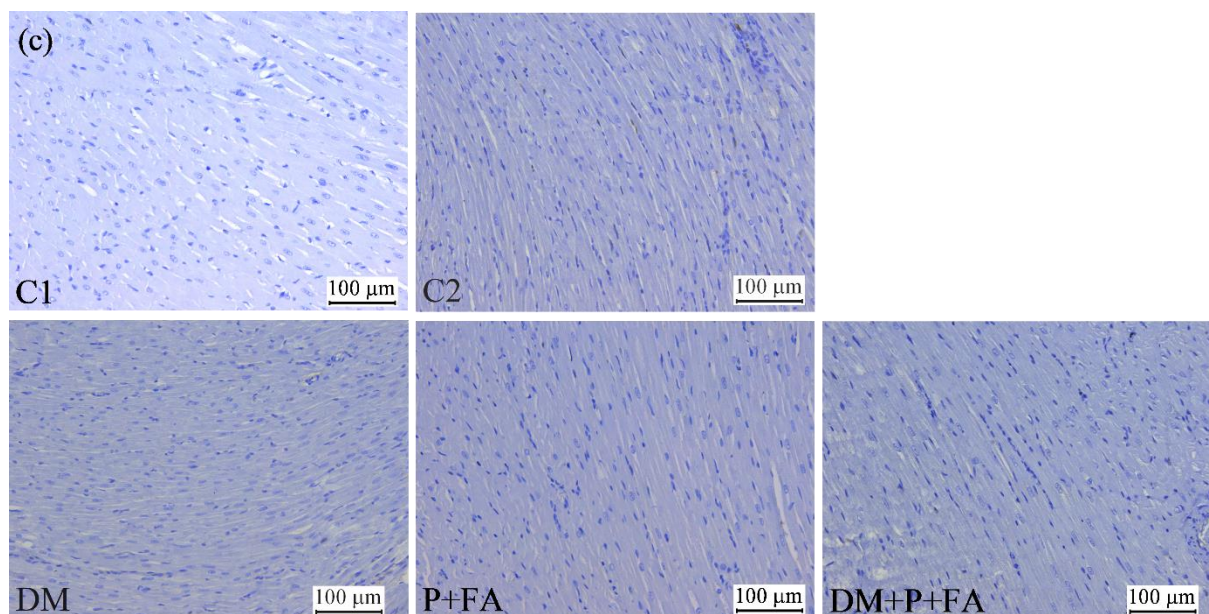
Slika 36. Uticaj dijabetesa melitusa i primene piridoksina na imunohistohemiju BCL-6 u (a) levoj komori, (b) desnoj komori i (c) interventrikularnom septumu srca pacova. Na preparatima se mogu videti BCL-6 negativna jezra kardiomiocita prebojena plavo (uvećanje 200 puta). C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P+FA – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana.

Tabela 12. Uticaj dijabetes melitusa i udružene primene piridoksina i folne kiseline na imunohistohemijske parametre srca pacova.

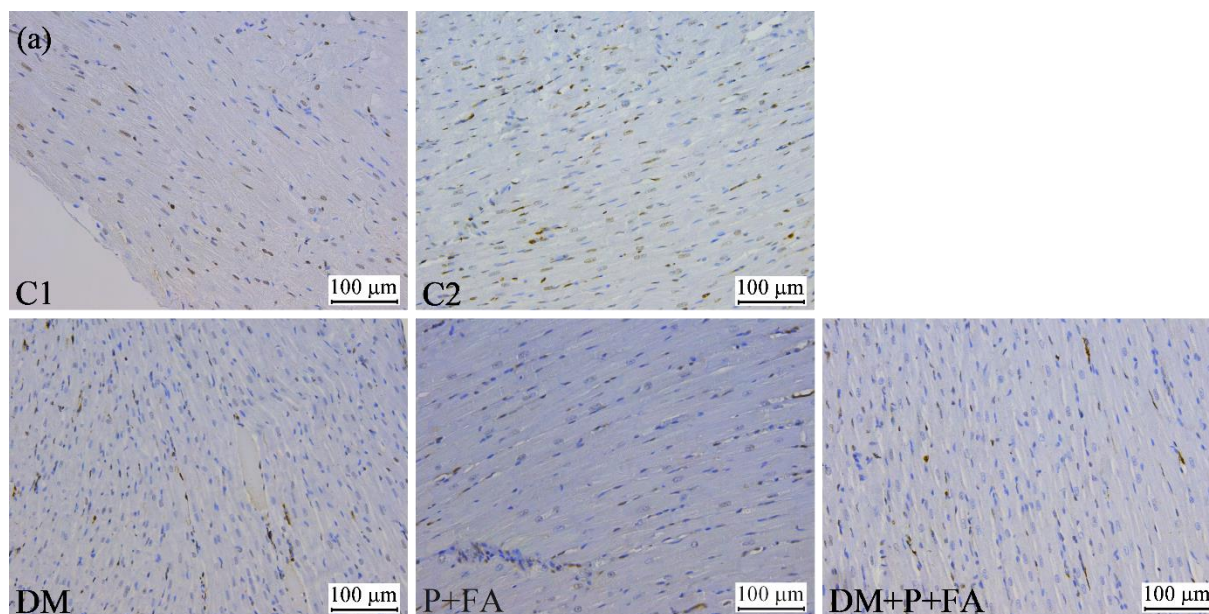
Parametri	Grupe [medijana (najmanja-najveća vrednost)]				
	C1	C2	DM	P+FA	DM+P+FA
Ki-67+ LK (%)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Ki-67+ DK (%)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-0)
Ki-67+ IVS (%)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
PCNA+ LK (%)	4 (3-7)	5,5 (3-7)	2 (1-3) *	6,5 (4-8)	4 (3-5) ^α
PCNA+ DK (%)	6 (5-7)	4,5 (4-6)	2,5 (1-4) *	5,5 (1-10)	4 (3-4)
PCNA+ IVS (%)	4 (4-5)	6,5 (3-8)	1,5 (0-3) *	3,5 (1-6)	2 (7-5)

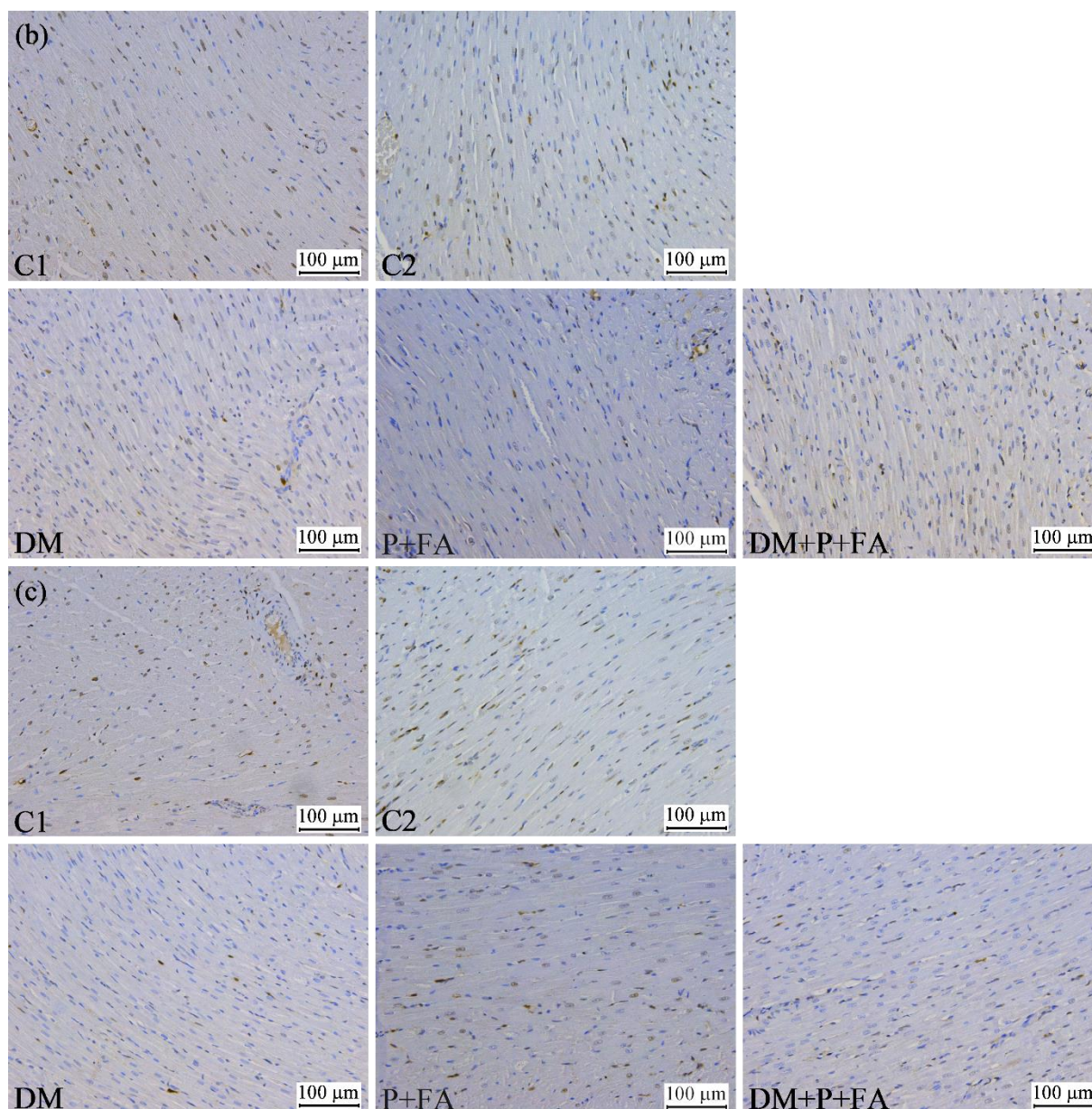
LK – leva komora; DK – desna komora; IVS – interventrikularni septum; C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P+FA – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa C1 grupom, ^α $p < 0,05$ u poređenju sa DM grupom – *Kruskal-Wallis* test praćen *Mann-Whitney* testom.





Slika 37. Uticaj dijabetes melitusa i udružene primene piridoksina i folne kiseline na imunohistohemiju Ki-67 u (a) levoj komori, (b) desnoj komori i (c) interventrikularnom septumu srca pacova. Na preparatima se mogu videti Ki-67 pozitivna jedra kardiomiocita prebojena smeđe i Ki-67 negativna jedra kardiomiocita prebojena plavo (uvećanje 200 puta). C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P+FA – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana.





Slika 38. Uticaj dijabetes melitusa i udružene primene piridoksina i folne kiseline na imunohistohemijску ekspresiju PCNA u (a) levoj komori, (b) desnoj komori i (c) interventrikularnom septumu srca pacova. Na preparatima se mogu videti PCNA pozitivna jedra kardiomiocita prebojena smeđe i PCNA negativna jedra kardiomiocita prebojena plavo (uvećanje 200 puta). C1 – jednokratna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg); C2 – svakodnevna i.p. primena fiziološkog rastvora (1 ml/kg) tokom 28 dana; DM – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg); P+FA – svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana; DM+P+FA – jednokratna i.p. primena streptozotocina (100 mg/kg) i svakodnevna i.p. primena piridoksina (7 mg/kg) i folne kiseline (5 mg/kg) tokom 28 dana.

5. DISKUSIJA

Pokazano je da DM u jednomesečnom periodu dovodi do različitih oštećenja organa i povećava oksidativni stres (Strother et al, 2001). Oksidativni stres i promene u antioksidativnoj odbrani smatraju se važnim mehanizmom u patogenezi DM i njegovih komplikacija (Samarghandian et al, 2017; Daniel et al, 2018). Oksidativni stres modifikuje metabolizam proteina, lipida i ugljenih hidrata (Shanmugam et al, 2009) i može da izazove disfunkciju endotelnih ćelija i razvoj ateroskleroze. Smatra se da je oksidativno oštećenje glavni mehanizam endotelne disfunkcije kod T1DM (Arden and Sivaprasad, 2011; Folli et al, 2011), pa se preporučuje primena supstanci koje će smanjiti oksidativni stres. Stoga je u ovoj studiji ispitivan uticaj četvoronedeljne i.p. pojedinačne i udružene primene piridoksina i folne kiseline na kardiometaboličke biomarkere, parametre oksidativnog stresa, parametre remodelovanja srčanog tkiva, kao i na histomorfometrijske parametre srca, aorte i pankreasa i imunohistohemijske promene srčanog tkiva kod pacova sa DM koji je indukovao primenom STZ. Deo rezultata ovog istraživanja opisan je u našim publikovanim radovima, međutim zbog poređenja različitog broja grupa, pet (Mutavdžin et al, 2019a), odnosno četiri (Mutavdžin et al, 2019b), postoje male razlike u vrednostima statističke značajnosti.

Eksperimentalni DM se može indukovati na različite načine, kao što su hemijski, spontani autoimunski, genetski i virusni (King, 2012). Hemijski izazvan dijabetes je jednostavan i relativno jeftin model razvoja dijabetesa kod glodara. U ovim modelima T1DM, visok procenat endogenih β ćelija je uništen, i posledično, postoji mala proizvodnja endogenog insulina, što dovodi do hiperglikemije. STZ i aloksan su najčešće korišćena jedinjenja za hemijsko izazivanje DM. DM se obično indukuje nekoliko dana pre početka eksperimenta da bi se obezbedila stabilna hiperglikemija (King, 2012). Da bi se potvrdilo da STZ (100 mg/kg) izaziva DM, u ovoj studiji meren je nivo insulina i izračunat HOMA-IR indeks u grupama C1 i DM. Indukcija DM i povećana insulinska rezistencija kod ispitivanih životinja potvrđena je povećanjem nivoa glukoze i HOMA-IR, kao i sniženim nivoom insulina u grupi DM. Promene HOMA-IR i biohemijskih markera ukazuju na postojanje metaboličkog sindroma pored hiperglikemije u grupi DM. U našim eksperimentima, sve životinje tretirane STZ su imale povišen nivo glukoze 72 h nakon primene STZ. Sve eksperimentalne životinje su preživele eksperimentalni period koji je trajao 28 dana. Na kraju eksperimentalnog perioda u grupama tretiranim STZ postojao je povišen nivo glukoze u serumu. Primena piridoksina, kao i udružena primena piridoksina i folne kiseline nisu uticale na nivo glukoze ni kod zdravih, ni kod pacova sa DM. Primena folne kiseline kod zdravih pacova nije uticala na vrednosti glukoze, dok je kod pacova sa DM značajno smanjila hiperglikemiju (međutim, vrednosti nivoa glukoze su i dalje bile veće od 12,2 mmol/l).

Jedna od karakteristika T1DM je smanjenje telesne mase (Gimenes et al, 2015; Savi et al, 2017). Kao što se i očekivalo kod T1DM, pacovi tretirani STZ su imali manju telesnu masu u poređenju sa kontrolnom grupom. Primena piridoksina je dovela do povećanja telesne mase kod zdravih pacova, međutim kod pacova sa DM nije uticala na telesnu masu. Primena folne kiseline nije uticala na telesnu masu ni zdravih, ni pacova sa DM. Piridoksin i folna kiselina primenjeni zajedno doveli su do povećanja telesne mase kod zdravih pacova, međutim kod pacova sa DM nisu uticali na telesnu masu. Slično, Kalicki i sar. (2019) su pokazali da suplementacija vitaminom B6 dovodi do značajnog povećanja telesne mase kod pacova. Vitamini B1 i B6 su potrebni za sintezu masti iz ugljenih hidrata i proteina (Zhou and Zhou, 2014), pa se sa povećanjem unosa ovih vitamina može očekivati i porast telesne mase.

Oksidativni stres i zapaljenje koji postoje kod dijabetesa promovišu hipertrofiju srca i hipertrofiju kardiomiocita koji predstavljaju i jedan od znakova dijabetičke kardiomiopatije (Boudina and Abel, 2010, Vulešević et al, 2016). U ovom radu, srčana hipertrofija je potvrđena kod pacova sa DM dobijanjem većih vrednosti KSI. Povećani KSI u grupi sa DM ukazivao je na to da smanjenje mase srca nije pratilo značajno smanjenje telesne mase. Drugi autori su takođe utvrdili srčanu hipertrofiju procenom KSI i dobili slične rezultate (Al-Rasheed et al, 2017; Wang et al, 2018). Primena piridoksina

i folne kiseline pojedinačno i udruženo nije uticala na vrednost KSI ni kod zdravih ni kod pacova sa DM. U grupi DM+P uočava se veća vrednost KSI u odnosu na P grupu.

Iako je pokazana hipertrofija srca koja ukazuje na dijabetičku kardiomiopatiju, između DM i C1 grupa nije postojala razlika u serumskim vrednostima LDH koji predstavlja enzimski indikator oštećenja kardiomiocita. Povećana koncentracija LDH u serumu se javlja kod oštećenja kardiomiocita (Goyal and Patel, 2011). U našem istraživanju, nivo LDH u serumu se nije razlikovao između DM i C1 grupa, a nivo hs cTnT je bio manji kod pacova sa DM, što ukazuje da nije bilo oštećenja kardiomiocita; takođe, histološka analiza srčanog tkiva nije pokazala znake nekroze. Naprotiv, drugi autori su u svojim istraživanjima dobili povećan LDH (Wang et al, 2018) i troponin I (Al-Rasheed et al, 2018) u serumu, ali su u ovim istraživanja periodu praćenja trajali duže (8 nedelja). Ovo može ukazivati na to da je odsustvo promene serumskog LDH i smanjena koncentracija hs cTnT posledica kratkog vremena izloženosti DM. Slično kao i za KSI, u grupi DM+P uočavaju se više vrednosti LDH u poređenju sa P grupom. Primena folne kiseline nije uticala na vrednosti LDH, kako u serumu zdravih pacova, tako ni u serumu pacova sa DM, dok je udružena primena piridoksina i folne kiseline dovela je do smanjenja aktivnosti LDH u serumu kod zdravih pacova.

Upoređujući parametre lipidnog profila, statistički značajno povećanje je uočeno u grupi DM. Svi ispitivani parametri bili su povećani u DM grupi u odnosu na C1 grupu. I druge studije su pokazale da je u uslovima DM došlo do povećanja nivoa TC, LDL-C i TG, dok je HDL-C bio smanjen (Taş et al, 2014; Ebaid et al, 2020). Primena piridoksina nije uticala na ove parametre kod zdravih pacova, dok se kod pacova sa DM tretiranih piridoksinom uočava značajno smanjenje HDL-C u poređenju sa DM grupom. TG su bili značajno povišeni u grupi DM+P u poređenju sa P grupom. Tretman folnom kiselinom pacova sa DM povećao je nivo LDL-C, a smanjio TC, HDL-C i TG. Udruženi tretman piridoksinom i folnom kiselinom kod pacova sa DM nije uticao na vrednost LDL-C, a smanjio je vrednosti TC, HDL-C i TG.

Drugi autori su izvestili da vitamin B6 u dozi 4 mg/kg primenjen u pijaćoj vodi povećava vrednosti HDL-C kod pacova sa dijabetesom (Taş et al, 2014). U jednoj studiji je pokazano da piridoksin primenjen preko oralne sonde u dozi 20 mg/kg dovodi do povećanja HDL-C i smanjenja TC i TG, međutim kada je piridoksin primenjen u manjoj dozi (10 mg/kg) nije imao efekte na parametre lipidnog profila (Abdullah et al, 2019). Ebaid i sar. (2020) su testirali efekat primene folne kiseline kod pacova sa DM. Slično našim rezultatima i oni su dobili da je primena folne kiseline smanjila vrednosti TC i TG, međutim nasuprot našim rezultatima dobili su smanjenje LDL-C, a povećanje vrednosti HDL-C. Takođe, smanjen nivo HDL-C i povećani nivoi LDL-C primećeni su u C2 grupi u poređenju sa C1 grupom. U poređenju sa C1 grupom, eksperimentalne životinje C2 grupe su bile izložene svakodnevnom stresu zbog i.p. primene fiziološkog rastvora i fizičkog sputavanja tokom primene i.p. injekcija. Pokazalo se da obuzdavanje životinja dovodi do povećanja parametara stresa i da utiče na lipidni profil snižavanjem nivoa HDL-C i povećanjem nivoa LDL-C (Stuart and Robinson, 2015; Ahn et al 2016), kao što je dobijeno i u našoj studiji. Slično, svakodnevno fizičko sputavanje tokom i.p. primene piridoksina i folne kiseline može biti faktor promene parametara lipidnog profila u grupama DM+P i DM+FA.

Glavni uzrok morbiditeta i često preranog mortaliteta kod osoba sa T1DM su kardiovaskularne bolesti usled ubrzane ateroskleroze (Jenkins et al, 2019). Aterogenetski indeks plazme korelira sa veličinom čestica lipoproteina i može se koristiti kao marker za aterogenost plazme (Dobiášová and Frohlich, 2001). Pokazano je da bi aterogenetski indeks plazme mogao biti snažan prognostički marker za procenu rizika od kardiovaskularnih događaja kod pacijenata sa T2DM (Fu et al, 2021). Promene pokazatelja aterosklerotskog rizika, AI i AIS, zavise od promena lipidnog statusa. AIS i AI su bili povećani u DM grupi. Primena piridoksina i folne kiseline pojedinačno i udruženo povećala je vrednost AI kod pacova sa DM, a nije uticala na vrednost AIS ni kod zdravih, ni kod pacova sa DM. Ovi vitamini nisu uticali na vrednost AI kod zdravih pacova, osim što je primena piridoksina povećala AI.

Poznato je da se endotelna disfunkcija javlja kod pacijenata sa DM i da ima važnu ulogu u nastanku ateroskleroze (Umadevi et al, 2016). Kod oštećenja i disfunkcije endotela dolazi do povećanja nivoa endotelih markera u plazmi, kao što je vWF (Umadevi et al, 2016). vWF je endotelni marker koji igra važnu ulogu u hemostazi u fiziološkim uslovima. Međutim, pošto vWF luče skoro samo endotelne ćelije, u patološkim uslovima, nivo vWF u plazmi se može koristiti kao biomarker oštećenja i disfunkcije endotela (Frankel et al, 2008; Meigs, 2010; Mutavdžin et al, 2019b). Naša studija pokazuje da je vWF bio značajno povećan u DM grupi, kao i da primena piridoksina i folne kiseline, kako pojedinačno, tako i zajedno nije uticala na vrednosti vWF ni kod zdravih ni kod pacova sa DM. Fibrinogen, koji predstavlja hemostatski faktor i jedan od produkata jetre, značajno je smanjen u grupi DM. Ovo ukazuje na moguće oštećenje sintetske funkcije jetre u stanju dijabetesa (Chayarop et al, 2017). Primena piridoksina, kao i udružena primena piridoksina i folne kiseline nisu dovele do povećanja smanjene koncentracije fibrinogena u plazmi pacova nastale usled DM, takođe, ni kod zdravih pacova nisu uočene promene u koncentraciji fibrinogena. Primena folne kiseline nije uticala na vrednost fibrinogena kod zdravih pacova, ali je kod pacova sa DM sprečila smanjenje koncentracije fibrinogena. Rezultati slični našima dobijeni su u studiji koja je ispitivala osobe sa aterosklerotskom bolešću. Udružena primena vitamina B6 i folne kiseline tokom dve godine nije uticala na vrednost vWF (Vermeulen et al, 2003). I druge eksperimentalne studije rađene na pacovima pokazuju da primena folne kiseline, kao i vitamina B6 i folne kiseline nije uticala na vrednosti vWF zdravih pacova (Jakovljević Uzelac et al, 2020a; Jakovljević Uzelac et al, 2020b). Prethodne studije su pokazale povećan nivo vWF kod pacijenata sa T2DM ili insulinskom rezistencijom (Frankel et al, 2008; Umadevi et al, 2016), kao i njegovu povezanost sa većim rizikom od kardiovaskularnih bolesti (Frankel et al, 2008). Značajno povećanje vrednosti vWF dobijeno je i kod pacova sa DM indukovanim STZ (Lopes et al, 2007). Constans i sar. (1999) su pokazali da udružena primena folne kiseline i vitamina B6 tokom 3 meseca nije uticala na vrednost vWF. Jedna studija je ispitivala uticaj primene folne kiseline (0,8 mg/dan u trajanju od jedne godine) na hemostatske parametre kod starijih osoba i pokazala da nije došlo do promena u vrednostima vWF i fibrinogena (Klerk et al, 2005). Nasuprot tome, drugo istraživanje pokazuje da folna kiselina (0,4 mg/dan) primenjena tokom 3 meseca značajno snižava vrednost vWF kod osoba sa povećanim aterosklerotskim rizikom (Mierzecki et al, 2012). Drugi autori su pokazali da kod starijih osoba sa vaskularnim oboljenjima zajednička primena folne kiseline i vitamina B12, samo vitamina B6 i samo vitamina B2 nije uticala ni na vrednosti vWF, ni fibrinogena (Stott et al, 2005).

Pošto se DM definiše kao metabolički poremećaj, kod pacijenata sa ovom bolešću očekuju se promene u funkciji jetre, glavnog metaboličkog organa. Jedna od dugoročnih komplikacija DM i vaskulopatije je i hepatopatija (Reid, 2006). Nivoi ALP, AST i ALT u serumu predstavljaju parametre koji se lako mogu odrediti kako bi se procenila funkcija jetre (Degirmenci et al, 2002). Serumske aktivnosti sva tri enzima kod pacova sa DM bile su povišene u odnosu na kontrolnu grupu. Povećanje aktivnosti ovih enzima u serumu je znak aktivnog oštećenja jetre (de Gouveia et al, 2017) i uobičajen znak različitih bolesti jetre (Arkkila et al, 2001). ALP se oslobađa u cirkulaciju i njen nivo će se povećati nakon oštećenja ćelije pošto se nalazi u citoplazmi (Sallie et al, 1991). Aminotransferaze se oslobađaju u cirkulaciju kada postoji ćelijska povreda koja uključuje i povredu mitohondrija (Kumar Rajagopal et al, 2003). Pokazano je da je povećana aktivnost aminotransferaza češća među osobama sa DM nego u opštoj populaciji (Arkkila et al, 2001). Drugi autori su takođe dobili značajno povećane nivoe AST, ALT i ALP u serumu kod pacova sa DM, što može biti posledica hepatocelularnog oštećenja izazvanog STZ indukovanim dijabetesom u eksperimentalnim slučajevima (Zafar et al, 2009; Saeed et al, 2008; Latifi et al, 2019). Chayarop i sar. (2017) su pokazali značajno povećan ALP u serumu kod pacova sa DM što ukazuje na oštećenje jetre, dok se transaminaze nisu razlikovale od zdravih kontrola. Primena piridoksina kod zdravih pacova je smanjila aktivnost ALT i ALP, dok je kod pacova sa DM smanjila aktivnost sva

tri testirana enzima, AST, ALT i ALP. Primena folne kiseline nije uticala na aktivnosti ni jednog od testiranih enzima kod zdravih pacova, a kod pacova sa DM indukovala je značajno smanjenje aktivnosti ALP, dok nije imala uticaja na aktivnosti AST i ALT u poređenju sa DM grupom. Zajednička primena piridoksina i folne kiseline značajno je smanjila aktivnosti sva tri enzima i kod zdravih i kod pacova obolelih od DM. S obzirom da ovi vitamini smanjuju aktivnost hepatičnih enzima, može se reći da imaju značajno hepatoprotektivno dejstvo u uslovima DM, a i kod zdravih pacova. U jednom istraživanju se navodi da je suplementacija folnom kiselinom kod pacova koji su bili na ishrani sa visokim sadržajem metionina efikasno ublažila oštećenje jetre što je pokazano smanjenjem aktivnosti AST i ALT. U istoj studiji je naglašeno da primena vitamina B6 zajedno sa folnom kiselinom dovodi do smanjenja vrednosti AST i ALT (Woo et al, 2006).

Ova studija pokazuje da je nivo ukupnih proteina i albumina bio značajno niži u grupi DM u poređenju sa kontrolnom grupom. Slično, i Chayarop i sar. (2017) su pokazali da pored niskog albumina, postoji smanjenje ukupnih proteina u serumu kod pacova sa DM. Drugi autori su dobili smanjenu koncentraciju albumina u serumu (Xue et al, 2017), dok u drugoj studiji nije bilo razlika u vrednosti ukupnih proteina i albumina između pacova sa DM i zdravih pacova (Kuga et al, 2018). Smanjena koncentracija proteina, a posebno albumina koga sintetišu hepatociti može nastati kao posledica oštećenja jetre, povećanog katabolizma proteina ili povećanog gubitka proteina urinom (Chayarop et al, 2017). U našem istraživanju primena piridoksina i folne kiseline, pojedinačno i udruženo nije uticala na koncentraciju proteina i albumina u serumu zdravih pacova. I druga studija pokazuje da udružena primena vitamina B6 i folne kiseline nije uticala na vrednosti ova dva parametra kod zdravih pacova (Jakovljević Uzelac et al, 2020a). Primena piridoksina i folne kiseline pojedinačno i zajedno nije značajno uticala na prethodno smanjene koncentracije ukupnih proteina kod pacova sa DM. Takođe ni pojedinačna primena ovih vitamina nije uticala na vrednost albumina kod pacova sa DM, ali je udružena primena piridoksina i vitamina B6 povećala koncentraciju albumina u serumu pacova sa DM. Chang i sar. (2007) su pokazali da primena folne kiseline, vitamina B1, B2, B6, B12 i kalcijum pantotenata kod pacijenata na hemodijalizi značajno povećava koncentraciju albumina u serumu. Prethodni rezultati naše studije koji se odnose na parametre funkcije jetre ukazuju na zaštitne efekte piridoksina i folne kiseline protiv oštećenja jetre za koja je pokazano da su povezana sa hiperglikemijom (Chayarop et al, 2017).

Značajan digestivni enzim je α -AMY pankreasa. Amilaze su enzimi koji katalizuju hidrolizu složenih molekula ugljenih hidrata na manje komponente (Tundis et al, 2010). Aktivnost serumske α -AMY može biti povećana kod akutnog pankreatitisa, ali i kod drugih intraabdominalnih inflamatornih stanja, bolesti pljuvačnih žlezda, kao i kod smanjenog klirensa zbog oštećenja bubrega (Matull et al, 2006). Aktivnost α -AMY u serumu bila je značajno povećana u DM grupi. Kod osoba sa T2DM povećanje aktivnosti ovog enzima dobili su i drugi autori (Farhood et al, 2014; Abdelsalam, 2015), međutim u drugim studijama se uočava smanjenje aktivnosti α -AMY (Ewadh et al, 2014; Jain et al, 2014; Ata et al, 2015). Primena vitamina, piridoksina i folne kiseline, kako pojedinačno, tako i udruženo značajno je smanjila aktivnost α -AMY i kod zdravih i kod pacova sa DM. Utvrđeno je da folna kiselina vezuje α -AMY nekovalentnim vezama i one formiraju komplekse. Nakon molekularnog modeliranja pokazano je da se folna kiselina vezuje za primarni džep za vezivanje supstrata i zauzima aktivno mesto α -AMY što dovodi do inhibicije enzima. Formiranje ovih kompleksa dovodi do smanjenja enzimske aktivnosti α -AMY (Shi et al, 2017).

Jedna od najčešćih i najozbiljnijih mikrovaskularnih komplikacija DM je dijabetička nefropatija (Sun et al, 2018) i ona je vodeći uzrok krajnjeg stadijuma bubrežne bolesti (Pop-Busui et al, 2010). U životinjskim modelima dijabetičke nefropatije, disfunkcija NOS doprinosi povećanju oksidativnog stresa (Sato et al, 2005). *In vitro* studije su pokazale da aktivni oblik folne kiseline, 5-metiltetrahidrofolat, poboljšava funkciju NOS obnavljanjem nivoa BH4, važnog kofaktora NOS (Stroes et al, 2000).

Pokazano je da folna kiselina direktno poboljšava bioraspoloživost BH4 i NO istovremeno smanjujući proizvodnju oksidansa u endotelnim ćelijama, kako *in vitro* tako i *in vivo*. Ovi efekti su posredovani povećanjem ekspresije i aktivnosti dihidrofolat reduktaze (Gao et al, 2009). U dvostruko slepom, randomizovanom, unakrsnom ispitivanju, pacijenti sa T2DM, albuminurijom i početnom dijabetičkom nefropatijom lečeni su folnom kiselinom (5 mg/dan) tokom perioda od 4 nedelje. Međutim, lečenje visokim dozama folne kiseline nije poboljšalo funkciju endotela bubrega i nije uspelo da smanji albuminuriju kod ljudi sa dijabetičkom nefropatijom (Schneider et al, 2014).

Dijabetičku nefropatiju prati povišeni nivo kreatinina i uree u serumu (Tripathi et al, 2017), pa se ovi parametri obično koriste za određivanje funkcije bubrega (Gowda et al, 2010). Bubrezi takođe igraju važnu ulogu u regulaciji nivoa mokraćne kiseline u krvi. Mokraćna kiselina se u najvećoj meri izlučuje preko bubrega, a manje preko creva. Ako telo proizvodi previše mokraćne kiseline ili je mehanizam izlučivanja oštećen, koncentracija mokraćne kiseline će se povećati (Xiong et al, 2019). Naši rezultati su pokazali da je koncentracija uree bila povišena, koncentracija kreatinina snižena, dok se koncentracija mokraćne kiseline nije razlikovala između DM i C1 grupe. Drugi istraživači su pokazali povećanje nivoa uree i kreatinina u serumu kod životinja sa DM (Saeed et al, 2008; Chayarop et al, 2017; de Gouveia et al, 2017; Xue et al, 2017; Latifi et al, 2019). Međutim, s obzirom na to da nivo kreatinina u serumu indirektno odražava masu mišića kada je očuvana funkcija bubrega (Kashima et al, 2021), smanjenje nivoa kreatinina kod pacova sa DM može biti posledica smanjenja telesne mase. Primena vitamina, pojedinačno i udruženo nije uticala na koncentraciju mokraćne kiseline ni kod zdravih, ni kod pacova sa DM. Primena piridoksina, kao i udružena primena piridoksina i folne kiseline, nije uticala na vrednost uree ni kod zdravih, niti kod pacova sa DM, međutim dovela je do povećanja vrednosti kreatinina i kod zdravih i kod pacova sa DM. Pošto je došlo samo do promena u koncentraciji kreatinina, bez uticaja na koncentraciju uree, ovaj rezultat se može povezati sa povećanjem telesne mase kod pacova koji su imali tretman piridoksinom. Primena folne kiseline nije uticala na vrednosti uree i kreatinina kod zdravih pacova, ali je kod pacova sa DM dovela do povećanja vrednosti oba parametra. Ovi rezultati mogu ukazivati na moguće nefrotoksične efekte folne kiseline u uslovima DM. Studija Jin i sar. (2009) je pokazala da folna kiselina primenjena u visokim dozama (250 mg/kg, i.p. jednokratno) izaziva akutnu bubrežnu insuficijenciju. Značajno povećanje nivoa kreatinina i uree i smanjena bubrežna funkcija pronađeni su kod potomaka pacova sa DM, kao i kontrola koji su primali folnu kiselinu (250 mg/kg, i.p. jednokratno) (Corrêa et al, 2015). Zatajenje bubrega uzrokovano folnom kiselinom može biti izazvano taloženjem kristala folne kiseline, koji blokiraju tubule, ili direktnom toksičnošću za tubularne epitelne ćelije (Gupta et al, 2012). Kod pacova kristali folne kiseline primenjene u visokim dozama (250 mg/kg) blokiraju bubrežne tubule i izazivaju njihovu posledičnu akutnu nekrozu, koju karakteriše proliferacija tubularnih ćelija, infiltracija inflamatornih ćelija i fibroza (Jin et al, 2009). Zbog toga, da bi se izbeglo oštećenje bubrega, tokom lečenja folnom kiselinom treba voditi računa o primenjenoj dozi i pratiti renalnu funkciju. Dobijeni rezultati našeg istraživanja ukazuju na moguće oštećenje bubrega izazvano terapijom folnom kiselinom, iako je ona primenjena u 50 puta manjim dozama nego u prethodnim studijama, ali je tretman trajao duže (28 dana). Pokazano je da Hcy na patološkom nivou može izazvati povredu bubrega (Zhang et al, 2004; Hwang et al, 2008). Mehanizmi kojima hiperhomocisteinemija utiče na bubrege nisu u potpunosti identifikovani. Smatra se da je hiperhomocisteinemija nezavisan faktor rizika u progresiji bubrežne bolesti i u razvoju kardiovaskularnih komplikacija. Hwang i sar. (2011) su pokazali da hiperhomocisteinemija indukuje stvaranje superoksidnog anjona posredovanog NADPH oksidazom u bubrežima što dovodi do oksidativnog stresa i da suplementacija folnom kiselinom (primenjenom *per os*) može antagonizovati aktivaciju NADPH oksidaze kroz inhibiciju ekspresije NOX4 i p22phox i smanjiti oksidativni stres bubrega kod pacova sa hiperhomocisteinemijom.

Rezultati ove studije pokazuju da kod pacova sa DM u poređenju sa grupom C1 nije došlo do značajnih promena u koncentraciji Hcy. Neke studije su prijavile povišen, a neke snižen nivo Hcy kod osoba sa DM u poređenju sa onima bez DM, pokazujući potencijalnu ulogu Hcy u razvoju vaskularnih poremećaja kod dijabetičara (Schalinske, 2003; Shaikh et al, 2012). Značajno smanjenje vrednosti Hcy u serumu dobijeno je i kod pacova sa DM indukovanim STZ (Lopes et al, 2007). Shaikh i sar. (2012) su pokazali da je 58 % dijabetičara imalo povišen nivo Hcy. Jedna meta-analiza je utvrdila da su nivoi Hcy viši kod pacijenata sa T1DM i komplikacijama, kao što su retinopatija ili nefropatija, i da nisu bili povišeni kod pacijenata sa T1DM bez ikakvih komplikacija (Feng et al, 2015). U našoj studiji, jedino se kod pacova u grupama DM+P i DM+FA uočava sniženje vrednosti Hcy u poređenju sa vrednostima u grupama P i FA, redom, dok u grupi DM+P+FA nije došlo do promena u koncentraciji Hcy. Drugi autori su pokazali da folna kiselina ima pozitivne efekte smanjenjem nivoa homocisteina. Ovi efekti smanjuju oksidativni stres, poboljšavaju funkciju endotela i sprečavaju apoptozu (Hou et al, 2018; Wald et al, 2006). Hou i sar. (2018) su dobili niže nivoe Hcy kod pacova sa DM tretiranih folnom kiselinom; takođe kod pacijenata sa DM i hiperhomocisteinijom tretman folnom kiselinom je snizio nivo Hcy u plazmi i poboljšao endotelnu funkciju (Hayden and Tyagi 2004; Title et al, 2006). Pokazano je da se povećan nivo Hcy javlja u nedostatku vitamina kofaktora: folata, vitamina B12 i vitamina B6 koji su neophodni za metabolizam Hcy (Shaikh et al, 2012; Lim et al, 2012; Brazionis et al, 2008; Simó-Servat et al, 2016). Takođe, dugotrajna istovremena primena folne kiseline, piridoksina i vitamina B12 dovela je do smanjenja nivoa Hcy međutim, nije smanjila rizik od razvoja T2DM kod žena sa visokim rizikom od kardiovaskularnih bolesti (Song et al, 2009).

Nedavno je pokazano da su povećani oksidativni stres i promene antioksidativnog kapaciteta važan mehanizam u patogenezi DM i njegovih komplikacija (Samarghandian et al, 2017). Oksidativni stres može uticati na endogeni antioksidativni sistem koji uključuje antioksidativne enzime: GSH-Px, SOD i CAT (Gimenes et al, 2018). Produžena hiperglikemija je praćena proizvodnjom redukujućih šećera. Ovi šećeri mogu reagovati sa lipidima i proteinima i povećati proizvodnju ROS, što posledično, povećava oksidativni stres (Palmeira et al, 2001; Daniel et al, 2018). Takođe, povišen nivo glukoze povećava proizvodnju RNS, kao što je peroksinitrit. On izaziva oštećenje proteina i DNK, aktivira poliADP riboznu polimerazu i promoviše endotelni stres i smrt ćelija (Hoffman, 2014). Dokazano je da oksidativni stres menja metabolizam proteina, lipida i ugljenih hidrata (Shanmugam et al, 2009) i može izazvati disfunkciju endotelnih ćelija i razvoj ateroskleroze. Iz tog razloga, smatra se da je upravo oksidativni stres glavni akter u razvoju dijabetičkih komplikacija kao što su vaskularni, neuronski, oftalmološki i bubrežni poremećaji (Daniel et al, 2018). Da bi se sprečilo oštećenje pojačanim oksidativnim stresom, neophodna je ravnoteža ROS i antioksidanata; stoga se različiti suplementi antioksidanata mogu koristiti za sprečavanje posledica oksidativnog stresa (Peluso, 2006).

Pošto se povećani oksidativni stres i promene antioksidativnog kapaciteta smatraju važnim mehanizmom u patogenezi DM i njenih komplikacija (Samarghandian et al, 2017), ispitivanje oksidativnog stresa u DM je od izuzetnog značaja (Mutavdzin et al, 2019a). Intenzitet generisanja ROS modulira odgovor na oksidativni stres. Pokazano je da niske koncentracije ROS stimulišu antioksidativnu odbranu i povećavaju aktivnost antioksidativnih enzima, dok visoke koncentracije inhibiraju enzimsku aktivnost što će dovesti do daljeg oštećenja ćelija (Radak et al, 2005). U ovom istraživanju, aktivnosti antioksidativnih enzima, CAT i SOD, su bile povećane u srčanom tkivu pacova sa DM. Slične rezultate dobili su i drugi autori (Strother et al, 2001; Rosa et al, 2016). Međutim, neki istraživači su pokazali smanjene aktivnosti CAT i SOD (Al-Rasheed et al, 2017; Gimenes et al, 2018; Wang et al, 2018). Aktivnosti enzima su u našoj studiji praćene nakon četiri nedelje, dok je u većini studija koje su pokazale smanjenu aktivnost antioksidativnih enzima period praćenja bio duži. Povećane aktivnosti CAT i SOD koje su dobili Strother i sar. (2001) su u skladu sa našim rezultatima, a u njihovom istraživanju

eksperimentalni period je bio sličnog trajanja kao i naš (trideset dana). Ovi enzimi imaju zaštitnu ulogu protiv oštećenja izazvanih kiseoničnim slobodnim radikalima, pa se povećanje njihove aktivnosti može shvatiti kao adaptivni odgovor na povećani oksidativni stres (Patlolla et al, 2009). Pošto aktivnosti antioksidativnih enzima zavise od koncentracije ROS (Radak et al, 2005), mogući uzrok naših rezultata je taj što je u periodu od četiri nedelje proizvodnja ROS usled DM bila samo neznatno povećana i to je stimulisalo povećanje aktivnosti CAT i SOD. U ovom istraživanju su pokazani pozitivni efekti pojedinačne i udružene primene piridoksina i folne kiseline na antioksidativne enzime. Piridoksin je smanjio aktivnost CAT i kod zdravih i kod pacova sa DM. Međutim, nije imao uticaj na aktivnost SOD. Primena folne kiseline je blagotvorno delovala na pacove sa DM jer je smanjila vrednosti aktivnosti oba antioksidativna enzima, CAT i SOD, dok kod zdravih pacova nije uticala na njihove aktivnosti, što je u saglasnosti sa našom prethodno objavljenom studijom (Mutavdžin et al, 2019a). Udružena primena piridoksina i folne kiseline je značajno smanjila aktivnost CAT kod zdravih pacova, kao i kod pacova sa indukovanim DM. Takođe smanjila je i aktivnost SOD kod pacova sa DM, ali nije uticala na SOD aktivnost kod zdravih pacova. Slični rezultati dobijeni su i u drugim studijama gde je pokazano da primena folne kiseline (Jakovljevic Uzelac et al, 2020b), kao i vitamina B6 i folne kiseline zajedno nije uticala na aktivnost SOD kod zdravih pacova (Jakovljevic Uzelac et al, 2020a). Pokazano je da vitamin B6 ima antioksidativne efekte, iako nije klasifikovan kao antioksidans (Cabrini et al, 1998; Ohta and Foote 2002; Matxain et al, 2006). Utiče na sintezu polinezasićenih masnih kiselina, a u uslovima njegovog nedostatka se povećava lipidna peroksidacija i smanjuje antioksidativna odbrana, pa postoje sugestije da je nedostatak piridoksina povezan sa aterogenezom (Ohta i Foote 2002; Matxain et al, 2009; Keles et al, 2010). U ovom istraživanju, iako je tretman piridoksinom smanjio aktivnost CAT, nije uticao na aktivnost SOD. SOD katalizuje prevođenje superoksidnog anjona u vodonik peroksid. Dobijeni vodonik peroksid je supstrat za CAT (Patlolla et al, 2009). Primena piridoksina je dovela do smanjenja aktivnosti CAT. Ovo se može povezati sa činjenicom da piridoksin uklanja vodonik peroksid i tako otklanja supstrat za CAT. Piridoksin spada u vitamine B grupe rastvorljive u vodi i ima važnu ulogu u metabolizmu proteina, masti i ugljenih hidrata (Matkain et al, 2006; Taş et al, 2014). Vitamin B6 direktno reaguje sa peroksi radikalima, uklanja radikale i inhibira peroksidaciju lipida (Ehrenshaft et al, 1999; Bilski et al, 2000; Ohta and Foote 2002; Kannan and Jain 2004; Keles et al, 2010), ali hemijski mehanizam nije u potpunosti poznat (Kannan and Jain 2004). Uopšteno, ROS se mogu ukloniti funkcionalnim grupama kao što su hidroksilna i aminska grupa (Noguchi et al, 1998). Vitamin B6 se sastoji od piridinskog prstena sa hidroksilnom i aminskom grupom. Stoga je moguće da antioksidativni potencijal vitamina B6 proizilazi iz prisustva ove dve grupe u njegovoj strukturi (Kannan and Jain, 2004). Svakako, pozitivni antioksidativni efekti piridoksina se pokazuju u srčanom tkivu.

Folna kiselina ima važnu ulogu u smanjenju oksidativnog stresa, poboljšanju funkcije endotela i sprečavanju apoptoze smanjenjem nivoa Hcy u plazmi (Wald et al, 2006; Hou et al, 2018). Kod pacijenata sa DM i hiperhomocisteinemijom, pokazano je da folna kiselina snižava nivo Hcy u plazmi i poboljšava funkciju endotela (Hayden and Tyagi, 2004; Title et al, 2006). Postoje i efekti folne kiseline koji su nezavisni od Hcy, kao što su sprečavanje razdvajanja dimera eNOS, očuvanje BH4 i inhibicija formiranja superoksida (Antoniades et al, 2006; Clarke et al, 2006; Moat et al, 2006). Takođe, nezavisno od nivoa Hcy, folna kiselina dovodi do povećanja koronarne vazodilatacije i do blagog smanjenja arterijskog krvnog pritiska kod pacijenata sa koronarnom bolešću (Tawakol et al, 2005). Rezultati našeg istraživanja pokazuju da je folna kiselina smanjila aktivnosti CAT i SOD. Kako folna kiselina ima antioksidativno dejstvo, očekuje se da njena primena smanjuje proizvodnju ROS i posledično smanjuje aktivnosti ovih enzima. Dokazano je da folna kiselina može da smanji proizvodnju superoksidnih radikala koju katalizuje NOS (Stanhewicz and Kenney, 2017). Ovom enzimu je potrebno prisustvo kofaktora BH4 i supstrata L-arginina za optimalnu funkciju i proizvodnju NO. Kada postoji ograničena

dostupnost kofaktora ili supstrata ili u uslovima povišenog oksidativnog stresa, NOS može da se destabilizuje i dedimerizuje i počinje da proizvodi superoksidne radikale umesto NO (Förstermann, 2006). Pretpostavlja se da su pozitivni efekti folne kiseline posredovani njenim primarnim cirkulišućim metabolitom, 5-metil tetrahidrofolatom koji povećava bioraspoloživost BH4. 5-metil tetrahidrofolat deluje direktno tako što stupa u interakciju sa NOS i uklanja ROS, posebno superoksidne radikale, a indirektno povećanjem dostupnosti BH4, 5-metil tetrahidrofolat stimuliše sintezu NO i sprečava proizvodnju superoksida (Stanhewicz and Kenney, 2017). Na osnovu prethodnog istraživanja možemo zaključiti da smanjenje aktivnosti CAT i SOD u srčanom tkivu pacova sa DM i tretmanom piridoksinom i folnom kiselinom može biti posledica smanjene proizvodnje ili povećanog uklanjanja ROS usled dejstva ovih vitamina. Prema tome, tretman piridoksinom i folnom kiselinom može imati pozitivne efekte na oporavak funkcije miokarda u uslovima DM.

MDA je degradativni proizvod peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina u ćelijskoj membrani. Povišena koncentracija MDA u serumu je indikacija indukovane peroksidacije lipida i oksidativnog stresa (Gwarzo et al, 2014). Rezultati naše studije pokazuju da se DM i C1 grupa nisu razlikovale u koncentraciji MDA u homogenatu tkiva srca. Međutim, Gwarzo i sar. (2014) su pokazali da kod pacova sa indukovanim DM dolazi do povećanja koncentracije MDA u plazmi. I drugi autori su pokazali da kod pacova sa DM dolazi do povećanja koncentracije MDA u plazmi, tkivu srca, skeletnih mišića, jetre i bubrega (Taş et al, 2014). Koncentracija MDA bila je značajno povišena u grupi C2. Porast MDA u grupi C2 je moguće pripisati svakodnevnom stresu zbog i.p. primene fiziološkog rastvora i fizičkog sputavanja pacova tokom primene i.p. injekcija. U jednom nedavnom istraživanju je pokazano da fizičko sputavanje životinja u trajanju od dva sata u toku dana dovodi do povećanja stresa i koncentracije MDA u tkivu jetre (Aziz et al, 2018). I drugo istraživanje u kome su pacovi bili fizički sputavani dva sata dnevno tokom 60 dana pokazuje znatno povećane koncentraciji MDA, kako u tkivu srca gde su dobijene više nego četiri puta veće vrednosti, tako i u drugim tkivima (Nayanatara et al, 2012). U našem istraživanju fizičko sputavanje je trajalo znatno kraće, samo tokom primene i.p. fiziološkog rastvora, pa su i vrednosti MDA bile samo 1,8 puta veće u grupi C2 u poređenju sa grupom C1. Primena vitamina nije uticala na vrednosti MDA kod pacova sa DM. Kod zdravih pacova se uočavaju niže vrednosti MDA nakon primene piridoksina i udružene primene piridoksina i folne kiseline, dok primena samo folne kiseline nije uticala na koncentraciju MDA. Pored povećanja koncentracije MDA u plazmi, tkivu srca i drugim tkivima kod pacova sa DM, Taş i sar. (2014) su pokazali da vitamin B6 dovodi do smanjenja koncentracije MDA i kod pacova sa DM i kod zdravih pacova.

Dijabetes melitus (DM) je definisan kao grupa poremećaja koje karakteriše ne samo hiperglikemija već i izmenjeno delovanje ili lučenje insulina, izmenjen metabolizam proteina, ugljenih hidrata i lipida i povećan rizik od vaskularnih komplikacija. Insulinska rezistencija i hiperglikemija dovode do dislipidemije koja je faktor rizika za vaskularne bolesti kao što su ateroskleroza i koronarna arterijska bolest (Chaiyasut et al, 2011). Promene u metabolizmu izazivaju oštećenja različitih tkiva i organa (Diao et al, 2014). Mehanizmi promena u metabolizmu i sintezi energije nisu potpuno jasni, ali je poznato da mogu dovesti do dijabetičke kardiomiopatije i oštećenja srčane funkcije (Zhao et al, 2018). Promene metabolizma se mogu ispitati detekcijom izoformi LDH i procenom njihovih aktivnosti. LDH katalizuje oksidaciju laktata u piruvat kada postoje visoke koncentracije laktata i reverznu reakciju redukcije piruvata u laktat koja se javlja u slučaju nedostatka kiseonika u ćeliji (Kopperschläger and Kirchberger, 1996). Postoji pet izoformi LDH (LDH1-LDH5). Njihove aktivnosti ukazuju na prevagu aerobnog ili anaerobnog metabolizma u određenom tkivu, jer je pokazano da izoforma LDH1 ima povećanu aktivnost u aerobnim uslovima, dok je LDH5 aktivnija u anaerobnim uslovima (Granchi et al, 2010). Osim promena u aktivnosti, u aerobnim uslovima se sintetiše više LDH1 i LDH2, dok u uslovima hipoksije postoji tendencija proizvodnje LDH4 i LDH5 (Bittar et al, 1996; Granchi et al, 2010). LDH je

heterotetramer koji se sastoji od M i H podjedinica. U svakoj od izoformi LDH postoji različit odnos podjedinica koji određuje afinitet prema laktatu i piruvatu i ulogu izoforme u direktnim ili reverznim reakcijama (Lossos et al, 1999). LDH1 i LDH2 imaju veći afinitet prema laktatu, a aktivniji su u tkivima koja su dobro snabdevena kiseonikom. LDH3 ima isti afinitet i za piruvat i za laktat. Poslednje dve izoforme dominiraju u tkivima gde preovlađuje glikoliza i postoje hipoksični uslovi (Ostapiv et al, 2015).

LDH, AST i kreatin kinaza su enzimi srčanih markera koji pružaju informacije o oštećenju kardiomiocita. Smanjenje njihovih aktivnosti u miokardu je znak oštećenja ćelija usled postojanja lipidnih peroksida. Određivanje aktivnosti ovih enzima u srcu i/ili u serumu je važno za procenu oštećenja ćelija (Saleem et al, 2013). U našem istraživanju nije bilo razlike u ukupnoj aktivnosti LDH u homogenatu srčanog tkiva između DM i C1 grupe. Upoređivanjem izoformi LDH, otkrili smo da je u grupi DM smanjena relativna aktivnost LDH1, dok su relativna aktivnost LDH3 i LDH4 povećane. Smanjena aktivnost LDH1 može ukazivati na smanjeno stvaranje piruvata (Ostapiv et al, 2015) i nedovoljno snabdevanje kiseonikom. Takođe, povećanje aktivnosti LDH4 može ukazivati na hipoksično stanje u telu (Ostapiv et al, 2015). Prema činjenicama navedenim u prethodnoj studiji, naši rezultati verovatno ukazuju na to da nije bilo dovoljno snabdevanja kiseonikom i stoga je u tkivu srca pacova sa DM došlo do prelaska na anaerobni metabolizam. Kod zdravih pacova primena folne kiseline je povećala, a preostala dva tretmana nisu uticala na ukupnu aktivnost LDH. Poređenjem aktivnosti izoformi kod zdravih pacova uočava se da je piridoksin povećao aktivnost LDH3 i LDH4, folna kiselina smanjila LDH1 i povećala LDH3 i LDH4 aktivnosti, dok je udružena primena piridoksina i folne kiseline povećala aktivnost LDH4. Kod pacova sa DM piridoksin i folna kiselina primenjeni pojedinačno i udruženo značajno su povećali aktivnost LDH1, a smanjili aktivnost LDH3 i LDH4. Pored toga folna kiselina je dovela i do povećanja aktivnosti LDH2. Primena vitamina kod pacova sa DM pokazala je pozitivne efekte, jer ukazuje da je došlo do vraćanja na aerobni metabolizam u tkivu srca pacova.

LDH je uključen u glikolizu, direktno redukcijom piruvata i indirektno sintezom NAD^+ (Granchi et al, 2010; Mansouri et al, 2017). Kontrolna tačka glikolize je oksidacija gliceraldehid 3-fosfata u 1,3-bisfosfoglicerat. Ova reakcija zahteva dostupnost kofaktora NAD^+ . Ćelije mogu da obezbede NAD^+ preko aktivnosti LDH koja pretvara piruvat u laktat uz istovremenu regeneraciju NAD^+ (Mansouri et al, 2017). Citosolna izoforma MDH je još jedan enzim koji može povećati proizvodnju NAD^+ (Israël and Schwartz, 2011; DeBerardinis et al, 2008a). MDH katalizuje redukciju oksaloacetata u malat u prisustvu NADH (Mansouri et al, 2017). Kao proizvodi ove reakcije nastaju malat i NAD^+ koji učestvuju u regulaciji glikolize. Dobijeni NAD^+ se koristi kao kofaktor za glikolizu (Murray et al, 2009), dok se malat transformiše u piruvat aktivnošću malat dekarboksilaze, a generisani piruvat postaje LDH supstrat i ponovo učestvuje u sintezi NAD^+ i posledično podstiče glikolizu (Deberardinis et al, 2008b). Kao rezultat toga, MDH direktno kroz proizvodnju NAD^+ i indirektno kroz proizvodnju malata podržava glikolizu (Mansouri et al, 2017). MDH je enzim sa važnim metaboličkim funkcijama (Rony et al, 2017). Katalizuje pretvaranje malata u oksaloacetat, i obrnuto. MDH ima važnu ulogu u ciklusu limunske kiseline i smatra se enzimskim markerom za ovaj ciklus (Pronobesh et al, 2008; Xavier et al, 2012). Direktno je uključena u metabolizam glukoze (Seema et al, 1996; Xavier et al, 2012). Ovaj enzim ima dve glavne izoforme, mMDH i cMDH, ali se može detektovati i treća, pMDH, izoforma (Popov et al, 2001). Aktivnost mMDH daje informacije o opštem metaboličkom statusu, dok cMDH odražava energetske metaboličkim u citoplazmi (Xavier et al, 2012; Arai et al, 2003). Aktivnost MDH je koristan parametar za procenu metaboličkih uslova i u mitohondrijama i u citoplazmi. Pošto DM dovodi do metaboličkih poremećaja, može se očekivati i promena ukupne aktivnosti MDH i distribucije njegovih izoformi. Ukupna aktivnost MDH bila je povećana u grupi DM. Povećanje aktivnosti MDH se očekuje tokom glukoneogeneze (Tejpal et al, 2017) koja se javlja u dijabetičkom stanju (Hatting et al, 2018). U grupi DM dobijena je povećana aktivnost pMDH, dok je cMDH imala nižu aktivnost. Drugi autori su pokazali promene u

različitim aktivnostima peroksizomalnih enzima usled DM, ali nisu testirali aktivnost MDH (Turecký et al, 2014). Rezultati ove studije pokazuju da je pored povećane aktivnosti pMDH povećana i aktivnost CAT koja je jedan od peroksizomalnih enzima. U stanju DM peroksizomalna aktivacija može biti posledica povećanog snabdevanja masnim kiselinama i povećanog oksidativnog stresa (Turecký et al, 2014), što je u skladu sa našim rezultatima. Kod zdravih pacova primena piridoksina i folne kiseline pojedinačno je povećala aktivnost pMDH i smanjila aktivnost mMDH, dok udružena primena ova dva vitamina dovela samo do povećanja aktivnosti pMDH. Pozitivni efekti primene vitamina kod pacova sa DM ogledaju se u smanjenju aktivnosti pMDH. Kod pacova sa DM primena piridoksina je dovela do smanjenja aktivnosti pMDH i povećanja mMDH, dok je primena folne kiseline i udružena primena piridoksina i folne kiseline izazvala je smanjenje aktivnosti pMDH i povećanje cMDH. Nema objavljenih studija o uticaju piridoksina i folne kiseline na aktivnost MDH u srčanom tkivu. Naši rezultati pokazuju da primena piridoksina povećava aktivnost mMDH kod pacova sa DM iako kod pacova sa DM bez tretmana vitaminima aktivnost ovog izoenzima nije bila smanjena. Druge studije su pokazale smanjenu aktivnost mMDH kod pacova sa DM što pokazuje da postoji oštećenje mitohondrija (Billimoria et al, 2006; Aloud et al, 2018; Ebeneasan and Jainu, 2018). Pokazalo se da hiperprodukcija ROS na nivou mitohondrijalnog transportnog lanca povećava oksidativni stres i apoptozu endotelnih ćelija u hiperglikemijskim uslovima (Piconi et al, 2006) i da su ROS uključene u oštećenje mitohondrija i smanjenje aktivnosti enzima ciklusa limunske kiseline (Aloud et al, 2018).

DM takođe prate kardiovaskularne komplikacije i remodelovanje srca koje može dovesti do srčane insuficijencije. Dijabetička kardiomiopatija se definiše kao disfunkcija leve komore, sa fibrozom, upalom, oksidativnim stresom i metaboličkim poremećajem kod pacijenata sa dijabetesom bez koronarne arterijske bolesti, hipertenzije ili drugih potencijalnih etioloških stanja (Ernande and Derumeaux, 2012; Min et al, 2018; Varma et al, 2018). Patogenetski mehanizmi dijabetičke kardiomiopatije su različiti, ali obično uključuju metaboličke poremećaje, insulinsku rezistenciju, mikrovaskularnu bolest, aktivaciju RAAS i oksidativni stres (Pappachan et al, 2013; Min et al, 2018). Njene glavne morfološke karakteristike su srčana hipertrofija i remodelovanje koje su povezane sa fibrozom miokarda (Min et al, 2018). Smatra se da MMP imaju važnu ulogu u degradaciji ekstracelularnih proteina i remodelovanju miokarda (Ichihara et al, 2006). MMP su deo porodice proteolitičkih enzima koja se sastoji od više od 20 članova. Mogu se podeliti na intersticijalne kolagenaze (MMP-1 i -13), želatinaze (MMP-2 i -9) i enzime povezane sa membranom (membranski tip 1-MMP) (Visse and Nagase 2003). Aktivacija ovih enzima je pronađena kod srčane insuficijencije kod ljudi i praćena promenama strukture ekstracelularnog matriksa (Thomas et al, 1998; Ichihara et al, 2006). MMP imaju važnu ulogu kao fiziološki regulatori ekstracelularnog matriksa (Zhang et al, 2018b). Promena aktivnosti i značajno povećana ekspresija MMP-2 i MMP-9 povezane su sa početkom akutnog infarkta miokarda (Squire et al, 2004; Zhang et al, 2018b). Ranije studije srčane insuficijencije na životinjskim modelima su pokazale značajnu aktivaciju MMP-2 (Bergman et al, 2007). Postoji mali broj radova sa različitim rezultatima koji opisuju aktivnosti MMP u srčanom tkivu pacova ili miševa sa DM (Mutavdzin et al, 2019b). Neki autori su pokazali povećanu aktivnost i MMP-2 i MMP-9 (Rodriguez et al, 2006; Bhatt and Veeranjanyulu, 2012; Min et al, 2018), dok su drugi pokazali smanjenu MMP-2 i povećanu MMP-9 aktivnost ili koncentraciju proteina (Westermann et al, 2007; Silva et al, 2017). Naši rezultati pokazuju da se aktivnost proMMP-2 može detektovati u svim ispitivanim grupama, osim DM+P, dok je aktivnost aMMP-2 detektovana samo u DM i DM+P grupama. Relativna aktivnost proMMP-2 bila je veća u DM nego u C1 grupi. Pojedinačni i udruženi tretman piridoksinom i folnom kiselinom je doveo do povećanja aktivnosti proMMP-2 kod zdravih pacova, dok je kod pacova sa DM primena folne kiseline i udružena primena piridoksina i folne kiseline dovela do značajnog smanjenja aktivnosti proMMP-2. Primena piridoksina kod pacova sa DM je dovela do značajnog povećanja aktivnosti aMMP-2 u poređenju sa DM grupom, dok se aktivnost

proMMP-2 u grupi pacova sa DM tretiranim piridoksinom nije detektovala. Relativna aktivnost aMMP-9 je detektovana u svim ispitivanim grupama. U DM grupi, aktivnost aMMP-9 bila je niža nego u kontrolnoj grupi. Primena vitamina, pojedinačno i udruženo, je značajno povećala aktivnost aMMP-9 kako kod zdravih, tako i kod pacova sa DM. Promene aktivnosti i ekspresije MMP mogu biti povezane sa povećanim oksidativnim stresom kod dijabetesa (Akat et al, 2018). Kayama i sar. (2015) su pokazali da oksidativni stres pogoršava angiogenezu i povećava razvoj fibroze, najviše zbog modifikacija aktivnosti i/ili ekspresije MMP. U studijama je pokazano da su povećana vaskularna aktivnost MMP-2 i nivo TGF- β glavni akteri u taloženju kolagena i drugim proliferativnim i profibrotičkim promenama povezanim sa vaskularnim remodelovanjem usled hipertenzije (Ceron et al, 2010, Ceron et al, 2013; Martins-Oliveira et al, 2013). U stvari, MMP-2 aktivira TGF- β , koji u interakciji sa svojim receptorima promovise klasične profibrotičke puteve koji dovode do povećane sinteze kolagena i drugih komponenti ekstracelularnog matriksa (Leask i Abraham, 2004; Wang et al, 2006). Vaskularne komplikacije predstavljaju glavni uzrok morbiditeta i mortaliteta kod osoba sa DM. Efekti dijabetesa na vaskulaturu počinju endotelnom disfunkcijom i dovode do promena u strukturi velikih i malih krvnih sudova što se naziva vaskularno remodelovanje. Vaskularno remodelovanje karakterise se promenama u strukturi i funkciji svih slojeva arterijskog zida. Vaskularno remodelovanje uzrokuje endotelnu disfunkciju, povećano formiranje ekstracelularnog matriksa, proliferaciju vaskularnih ćelija glatkih mišića i kalcifikaciju što dovodi do smanjene vaskularne komplijanse i perfuzije, i promovise aterosklerozu (Vallurupalli and Mehta, 2017). Prethodni podaci kao i povećana aktivnost proMMP-2 i aktivacija aMMP-2 mogu da ukazuju da pored remodelovanja srčanog tkiva, postoji i vaskularno remodelovanje kod pacova sa DM indukovanim STZ. Prijavljeno je da MMP-9 ima važnu ulogu u neovaskularizaciji jer dovodi do degradacije proteina u bazalnoj lamini krvnih sudova i oslobađa biološki aktivni oblik vaskularnog endotelnog faktora rasta (Yabluchanskiy et al, 2013; Bergers et al, 2000). Smanjena aktivnost aMMP9 može indikovati da u srčanom tkivu pacova sa DM ne dolazi do neovaskularizacije. Pokazano je da je folna kiselina uključena u angiogenezu. Ona pokazuje pro-angiogeni potencijal koji je dokazan povećanom gustinom krvnih sudova i grananjem u horioalantoičnoj membrani pileta. Kulture tretirane folnom kiselinom pokazale su spontanu angiogenezu koja se manifestovala kao povećanje broja novih kapilara, njihove gustine i grananja krvnih sudova (Davis et al, 2018). Cilj terapijske angiogeneze je promovisanje neovaskularizacije u ishemijskim tkivima uticajem na angiogene faktore rasta kao što su vaskularni endotelni faktor rasta i eritropoetin (Chu and Wang, 2012). Tretman folnom kiselinom dovodi do povišenih nivoa vaskularnog endotelnog faktora rasta i eritropoetina koji mogu doprineti poboljšanoj angiogenezi. Smatra se da suplementacija folnom kiselinom pojačava angiogenezu, smanjuje apoptozu i povećava ekspresiju gena za vaskularni endotelni faktor rasta A (Zabihi et al, 2007). Pošto primena folne kiseline stimuliše angiogenezu, to može biti razlog povećane aktivnosti MMP-9 u grupama tretiranim folnom kiselinom.

Iako se kod DM očekuje vaskularno remodelovanje, poređenjem morfologije aorte nisu dobijene statistički značajne razlike između grupa. To ukazuje da DM tokom 4 nedelje nije uticao na strukturu najvećeg krvnog suda. Debljina tunike medije, broj elastičnih lamina i rastojanje između elastičnih lamina nisu se razlikovali između DM i C1 grupe. Salum i sar. (2012) dobili su slične rezultate, oni su pokazali da i 10 nedelja nakon indukcije DM ne dolazi do promena u debljini tunike medije aorte pacova. Nasuprot tome u drugoj studiji došlo je do povećanja debljine tunike medije pacova 12 nedelja nakon indukcije DM (Tang et al, 2016). Epidemiološke i eksperimentalne studije su pokazale negativnu povezanost DM i formiranja i ekspanzije aneurizmi torakalne i abdominalne aorte (Raffort et al, 2018). Jedna meta-analiza pokazuje da je DM povezan sa manjim rizikom od disekcije aorte (Li et al, 2021).

Kod DM se mogu očekivati promene u morfologiji pankreasa. U ovoj studiji dobijen je značajno manji broj Langerhansovih ostrvaca po jedinici površine kod pacova tretiranih STZ u poređenju sa

kontrolnom grupom, što ukazuje da je primena STZ dovela do značajnog oštećenja Langerhansovih ostrvaca. Međutim, nisu dobijene razlike između ostalih praćenih parametara, kao što su dijametar i površina Langerhansovih ostrvaca, broj ćelija u Langerhansovim ostrvcima i broj ćelija po mm² površine tkiva ostrvca. Takođe, u pojedinim Langerhansovim ostrvcima u grupi DM se uočava postojanje infiltrata leukocitima. Skoro sve publikacije o ljudima sa T1DM pokazuju da oko pojedinih Langerhansovih ostrvaca postoji svega nekoliko T ćelija, kao i da se ne uočava agresivna infiltracija T ćelija i uništavanje β ćelija (Seiron et al, 2019). Slično našim rezultatima, Seiron i sar. (2019) su pokazali da kod osoba sa DM dolazi do smanjenja broja Langerhansovih ostrvaca, kao i da se srednja veličina Langerhansovih ostrvaca nije razlikovala kod osoba sa DM i zdravih ispitanika. Takođe, pokazali su i da se ukupan broj ćelija u Langerhansovim ostrvcima nije razlikovao. U njihovom istraživanju vršena je i procena fenotipa ćelija u ostrvcima i pokazano je da kod osoba sa DM postoji povećan broj α ćelija, dok je broj β ćelija bio smanjen. Ovim rezultatima odgovaraju i rezultati našeg istraživanja pošto je nakon imunohistohemijskog bojenja na insulin u grupi DM uočen značajno manji broj insulin pozitivnih Langerhansovih ostrvaca. Ovi rezultati pokazuju da pored biohemijske postoji i morfološka i imunohistohemijska potvrda eksperimentalnog modela DM.

Iako smo u DM grupi pokazali hipertrofiju srca određivanjem KSI, na histološkim merenjima nije bilo razlika u debljini zida LK i DK, a debljina IVS je bila manja kod pacova sa DM u poređenju sa C1 grupom. Transverzalni prečnik kardiomiocita se nije razlikovao između DM i C1 grupe. Histološka i morfometrijska analiza uzoraka tkiva srca pokazuje da su u svim testiranim grupama vlakna miokarda bila pravilno raspoređena, a kardiomiociti su se odlikovali fiziološkom morfologijom. Kod zdravih pacova primena piridoksina uzrokovala je značajno povećanje debljine zida LK i IVS, primena piridoksina i folne kiseline dovela je do povećanja debljine zida LK i transverzalnog prečnika KM, dok primena samo folne kiseline nije uticala na vrednosti histomorfometrijskih parametara. Kod pacova sa DM nije bilo značajnog uticaja primene vitamina na histomorfometrijske parametre, jedino je udružena primena piridoksina i folne kiseline smanjila debljinu IVS u poređenju sa vrednostima dobijenim u grupi DM. U jednoj studiji 30 dana nakon indukcije dijabetesa, mereno ehokardiografski, dobijena je smanjena debljina IVS i LV (Wichi et al, 2007). Njihovi rezultati su ukazivali na smanjenje mase LV zbog DM. U studiji sprovedenoj na osobama sa DM, pokazana je veća debljina IVS i zadnjeg zida leve komore u poređenju sa zdravim osobama, kao i da je to povezano sa narušenom sistolnom ili dijastolnom funkcijom (Lee et al, 1997). Slično našim rezultatima, i drugi autori su pokazali da kod pacova sa DM ne dolazi do smanjenja transverzalnog prečnika KM (Gimenes et al, 2018). Nasuprot tome, jedna studija je pokazala da dolazi do smanjenja prečnika KM, i debljine zida LK kod pacova sa DM (Nemoto et al, 2006). Za razliku od toga, Rabadiya i sar. (2018) dobili su povećan prečnik KM i povećanu debljinu zida LK.

Najčešći metod za određivanje proliferativne aktivnosti ćelija je primena imunohistohemijskih tehnika (Bologna-Molina et al, 2013). U ovoj studiji da bi se utvrdilo da li je došlo do promena u apoptotskoj ili proliferativnoj aktivnosti kardiomiocita urađena su imunohistohemijska bojenja preparata na BCL-2, BCL-6, Ki-67 i PCNA. BCL-2 je antiapoptotski protein za koji se smatra da inhibira apoptozu očuvanjem integriteta mitohondrijalne membrane, kao i da se vezuje i inaktivira pro-apoptotičke proteine (Tzifi et al, 2012). Osim BCL-2, smatra se da BCL-6 ima važnu antiapoptotsku ulogu u različitim ćelijama (Kurosu et al, 2003). Međutim, u ovoj studiji pozitivnost BCL-2 i BCL-6 nije uočena ni u jednoj ćeliji uzoraka srčanog tkiva. Drugi autori su pokazali da pri primeni folne kiseline kod pacova sa DM dolazi do povećanja nivoa antiapoptotičnog proteina BCL-2 (Wu et al, 2008). U ovom istraživanju pozitivnost Ki-67 je uočena samo u pojedinim ćelijama srčanog tkiva. Izazivanje DM, kao ni primena vitamina kod zdravih i pacova sa DM nisu uticali na aktivnost Ki-67. Smanjena pozitivnost PCNA uočava se kod pacova sa DM u zidu LK, DK i IVS. Pojedinačna i udružena primena piridoksina i folne kiseline nisu uticale na pozitivnost PCNA u LK, DK i IVS ni kod zdravih, ni kod pacova sa DM. Jedino

je kod pacova sa DM udružena primena piridoksina i folne kiseline dovela do povećanja pozitivnosti PCNA u LK. Ki-67 antigen (Ki-67) je klasičan marker ćelijske proliferacije koji se široko primenjuje u dijagnostici, istraživanju i otkrivanju lekova. Ki-67 antigen je prvobitno definisan monoklonskim antitelom Ki-67, čiji naziv potiče od grada porekla (Kil) i broja originalnog klona na ploči sa 96 bunarčića (Gerdes et al, 1983). Monoklonsko antitelo Ki-67 prvi put su opisali Gerdes i sar. (1983) koji su predložili da se ono može koristiti kao marker za proliferaciju ćelija. Drugi autori ga nazivaju markerom ćelijskog ciklusa. (Yuasa et al, 2004). Ki-67 antigen se prvenstveno ekspresira tokom kasne G1 faze, ekspresija mu se povećava tokom S i G2 faze, perzistira tokom profaze i metafaze, a smanjuje se u anafazi i telofazi, dok ćelije u G0 fazi ne ekspresiraju Ki-67. Zbog svog odsustva u G0 fazi široko se koristi kao tumorski marker i ima prognostičku vrednost za mnoge vrste malignih tumora (Ihmann et al, 2004; Bologna-Molina et al, 2013). S obzirom na to da se Ki-67 ekspresira u svim aktivnim fazama ćelijskog ciklusa, njegova ekspresija ukazuje na to da Ki-67 može biti marker proliferacije, ali da njegova ekspresija ne mora uvek biti znak dupliranja ćelija (Novoyatleva et al, 2010; Tamamori-Adachi et al, 2008). PCNA je nuklearni nehistski protein koji je neophodan za sintezu DNK i pomoćni je protein za DNK polimerazu alfa. Povišen je tokom G1/S faze ćelijskog ciklusa. Ćelije u fazi mirovanja, kao i stare ćelije imaju veoma nizak nivo PCNA iRNK (Kelman, 1997). Ekspresija PCNA se može koristiti kao marker ćelijske proliferacije jer ćelije ostaju duže vreme u G1/S fazi kada se razmnožavaju. Štaviše, ovaj protein ima suštinsku ulogu u metabolizmu nukleinskih kiselina jer učestvuje u replikaciji i popravci DNK (de Oliveira et al, 2008). Osim tokom ćelijske proliferacije, povećanje nivoa PCNA može biti izazvano faktorima rasta ili kao rezultat oštećenja DNK (de Oliveira et al, 2008, Mighell, 1995). PCNA se koristi kao marker ćelijske proliferacije, a Ki-67 se smatra klasičnim markerom ćelijske proliferacije i patolozi ga rutinski koriste. Sprovedeno je nekoliko studija za procenu proliferacije ćelija korišćenjem PCNA i Ki-67 u tumorima različitog porekla. U poređenju sa PCNA, pokazalo se da je Ki-67 osetljiviji i specifičniji u različitim analiziranim tumorima (Mateoiu et al, 2011; Oka et al, 2011; Salehinejad et al, 2011). Istraživanja su pokazala da je skoro 85 % kardiomiocita odraslih pacova zaustavljeno u G0/G1 fazi (Li et al, 1998). U našem istraživanju je dobijen veći procenat PCNA pozitivnih kardiomiocita u poređenju sa procentom Ki-67 pozitivnih kardiomiocita. Takođe, i druga istraživanja rađena na tumorskim tkivima su pokazala da nije postojala korelacija između Ki-67 i PCNA pozitivnih ćelija, kao i da je procentat PCNA pozitivnih ćelija bio značajno veći od procenta Ki-67 pozitivnih ćelija (Rosa et al, 1992). Tačna funkcija Ki-67 antigena nije poznata, smatra se da ima važnu ulogu u regulaciji ćelijske proliferacije, možda delujući kao tajmerni molekul, ali neke studije sugerišu da nije od suštinskog značaja za proliferaciju ćelija (Rosa et al, 1992). Verheijen i sar. (1989) su dobili da su Ki-67 negativne ćelije bile u ćelijskom ciklusu što je pokazano protočnom citometrijom. Ekspresija PCNA je regulisana i na transkripcionom i na post-transkripcionom nivou, posebno promenama u stabilnosti iRNK. Smatra se da faktori rasta mogu indukovati stabilnost PCNA iRNA i posledično ekspresiju PCNA, koja nije nužno povezana sa sintezom DNK (Chang et al, 1990; Ottavio et al, 1990). Ovo bi mogao biti jedan od faktora koji dovodi do višeg procenta PCNA pozitivnih ćelija u odnosu na procenat Ki-67 pozitivnih ćelija.

DM i dalje predstavlja globalni javnozdravstveni problem sa sve većom incidencom i prevalencijom (Danaei et al, 2011), koji karakterišu višestruka oštećenja organa i komplikacije. Zbog toga je, pored konvencionalnog medicinskog lečenja, od velikog značaja upotreba suplemenata, kako bi se sprečile ili smanjile komplikacije DM. Dobijeni rezultati ovog istraživanja su pokazali da je T1DM doveo do brojnih promena u kardiometaboličkim biomarkerima, parametrima oksidativnog stresa, parametrima remodelovanja srčanog tkiva, kao i u histomorfometrijskim i imunohistohemijskim parametrima srčanog i pankreasnog tkiva u periodu od samo četiri nedelje, i da postoje pozitivni efekti pojedinačne i udružene primene piridoksina i folne kiseline kod pacova sa DM. Tačni mehanizmi dejstava ovih vitamina nisu poznati i potrebna su dalja istraživanja da bi se oni utvrdili.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

- 1) Nakon primene STZ i indukcije DM u odnosu na kontrolnu grupu (C1)
 - Primena STZ je bila praćena značajnim porastom koncentracije glukoze i smanjenjem nivoa insulina u serumu, kao i povećanjem HOMA-IR
 - Pokazano je smanjenje telesne mase i povećanje KSI
 - Primena STZ nije uticala na koncentraciju Hcy i aktivnost LDH, smanjila je koncentraciju hs cTnT i fibrinogena, a povećala aktivnost vWF
 - STZ je povećao nivoe svih parametara lipidnog profila, TC, HDL-C, LDL-C i TG u serumu, kao i pokazatelja aterosklerotskog rizika, AIS i AI
 - Pokazano je povećanje aktivnosti hepatičnih enzima (AST, ALT i ALP), kao i α -AMY, i smanjenje koncentracije ukupnih proteina i albumina u serumu
 - Koncentracija uree u serumu je bila povišena, kreatinina snižena, a urinske kiseline nepromenjena nakon primene STZ
 - U homogenatu srčanog tkiva pokazano je povećanje oba merena antioksidativna enzima (SOD i CAT), dok se koncentracija MDA nije razlikovala u DM i C1 grupi
 - U homogenatu srčanog tkiva nije bilo razlika u aktivnosti LDH, a aktivnost MDH je bila povećana
 - U tkivu srca svih eksperimentalnih životinja detektovane su četiri LDH izoforme (LDH-1, LDH-2, LDH-3 i LDH-4) i tri MDH izoforme (pMDH, mMDH i cMDH)
 - Primena STZ je bila praćena smanjenjem aktivnosti LDH-1 i povećanjem aktivnosti LDH-3 i LDH-4, kao i smanjenjem aktivnosti cMDH i povećanjem aktivnosti pMDH
 - U homogenatu srčanog tkiva proMMP-2 bila je uočena i u C1 i DM grupi, dok je aMMP-2 bila uočena samo u DM grupi, aMMP-9 je postojala i u C1 i DM grupi. Primena STZ je bila praćena povećanjem relativne aktivnosti proMMP-2 i smanjenjem aktivnosti aMMP-9
 - Nakon primene STZ uočeno je smanjenje debljine IVS, dok uticaja na ostale histomorfometrijske parametre srca nije bilo
 - Primena STZ i DM nisu uticali na debljinu tunike medije, broj elastičnih lamina, kao ni na prosečno rastojanje između elastičnih lamina aorte
 - Primena STZ i DM su smanjili broj Langerhansovih ostrvaca po mm² površine tkiva pankreasa, a nisu uticali na dijametar i površinu Langerhansovih ostrvaca, broj ćelija u Langerhansovim ostrvcima, kao ni na broj ćelija po mm² površine tkiva Lagerhansovih ostrvaca pankreasa. Nakon imunohistohemijskog bojenja na insulin u grupi DM uočen je značajno manji broj insulin pozitivnih Langerhansovih ostrvaca
 - Nakon primene STZ pozitivnost BCL-2 i BCL-6 nije uočena ni u jednoj ćeliji, pozitivnost Ki-67 je uočena u pojedinim ćelijama srčanog tkiva bez postojanja statistički značajne razlike između grupa DM i C1, dok je pozitivnost PCNA je bila statistički značajno manja u zidu LK, DK i IVS u grupi pacova sa DM u poređenju sa C1 grupom

- 2) Nakon primene piridoksina (vitamina B6) kod STZ indukovnog DM
 - Primena piridoksina nije uticala na koncentraciju glukoze u serumu
 - Tretman piridoksinom nije uticao na telesnu masu i KSI kod pacova sa DM
 - Piridoksin nije uticao na koncentraciju Hcy, aktivnost LDH, koncentraciju hs cTnT i fibrinogena, kao ni na aktivnost vWF

- Uočeno je smanjenje koncentracije HDL-C i povećanje AI, a na ostale parametre lipidnog profila TC, LDL-C, TG, kao i na AIS nije bilo uticaja
- Pokazano je smanjenje aktivnosti enzima jetre (AST, ALT i ALP), kao i α -AMY, međutim nije bilo uticaja na koncentraciju ukupnih proteina i albumina u serumu
- Nije bilo uticaja na koncentraciju uree i urinske kiseline, a koncentracija kreatinina u serumu je bila povišena
- U homogenatu srčanog tkiva pokazano je da je primena piridoksina kod pacova sa DM dovela do smanjenja aktivnosti CAT i nije uticala na aktivnost SOD, kao ni na koncentraciju MDA
- U homogenatu srčanog tkiva nije bilo razlika u aktivnosti LDH, a došlo je do smanjenja aktivnosti MDH
- Primena piridoksina je bila praćena povećanjem aktivnosti LDH-1 i smanjenjem aktivnosti LDH-3 i LDH-4, kao i smanjenjem pMDH i povećanjem mMDH aktivnosti
- U homogenatu srčanog tkiva u DM+P grupi je pored aMMP9 postojao aMMP-2 oblik, dok proMMP-2 oblik nije bio uočen. Primena piridoksina kod pacova sa DM je povećala aktivnost aMMP-2 i aMMP-9
- Kod pacova sa DM nije bilo uticaja primene piridoksina na histomorfometrijske parametre srca
- Nakon primene piridoksina pozitivnost BCL-2, BCL-6 i Ki-67 nije uočena ni u jednoj ćeliji. Primena piridoksina nije uticala na pozitivnost PCNA u LK, DK i IVS

3) Nakon primene folne kiseline kod STZ indukovano DM

- Primena folne kiseline je značajno smanjila koncentraciju glukoze u serumu
- Tretman folnom kiselinom nije uticao na telesnu masu i KSI kod pacova sa DM
- Uočeno je povećanje koncentracije fibrinogena, dok uticaja na Hcy, LDH, hs cTnT i vWF nije bilo
- Primena folne kiseline je smanjila koncentraciju TC, HDL-C i TG, i povećala koncentraciju LDL-C i AI, a nije uticala na AIS
- Pokazano je smanjenje aktivnosti ALP, međutim nije bilo uticaja na aktivnosti AST, ALT i α -AMY, kao i na koncentraciju ukupnih proteina i albumina u serumu
- Primena folne kiseline je povećala koncentraciju uree i kreatinina u serumu, ali nije uticala na koncentraciju urinske kiseline
- U homogenatu srčanog tkiva pokazano je da je primena folne kiseline kod pacova sa DM dovela do smanjenja aktivnosti oba antioksidativna enzima (CAT i SOD), a nije bilo uticaja na koncentraciju MDA
- U homogenatu srčanog tkiva nije bilo razlika u aktivnosti LDH, a došlo je do smanjenja aktivnosti MDH
- Primena folne kiseline je bila praćena povećanjem aktivnosti LDH-1 i LDH-2 i smanjenjem aktivnosti LDH-3 i LDH-4, kao i smanjenjem pMDH
- U homogenatu srčanog tkiva u DM+FA grupi uočene su proMMP-2 i aMMP-9. Primena folne kiseline kod pacova sa DM je smanjila aktivnost proMMP-2 i povećala aktivnost aMMP-9
- Kod pacova sa DM nije bilo uticaja primene folne kiseline na histomorfometrijske parametre srca
- Nakon primene folne kiseline pozitivnost BCL-2, BCL-6 i Ki-67 nije uočena ni u jednoj ćeliji. Primena folne kiseline nije uticala na pozitivnost PCNA u LK, DK i IVS

- 4) Nakon udružene primene piridoksina (vitamina B6) i folne kiseline kod STZ indukovanog DM
- Udružena primena piridoksina i folne kiseline nije uticala na koncentraciju glukoze u serumu
 - Tretman piridoksinom i folnom kiselinom nije uticao na telesnu masu i KSI kod pacova sa DM
 - Uočeno je povećanje hs cTnT, dok uticaja na Hcy, LDH, fibrinogen i vWF nije bilo
 - Udruženi tretman piridoksinom i folnom kiselinom je smanjio TC, HDL-C i TG, povećao AI, a na HDL-C i AIS nije uticao
 - Pokazano je smanjenje aktivnosti enzima jetre (AST, ALT i ALP), α -AMY, i povećanje koncentracije albumina, međutim nije bilo uticaja na koncentraciju ukupnih proteina u serumu
 - Udružena primena piridoksina i folne kiseline nije uticala na koncentraciju uree i urinske kiseline, ali je povećala koncentraciju kreatinina u serumu
 - U homogenatu srčanog tkiva pokazano je da je udružena primena piridoksina i folne kiseline kod pacova sa DM dovela do smanjenja aktivnosti oba antioksidativna enzima (CAT i SOD), a nije bilo uticaja na koncentraciju MDA
 - U homogenatu srčanog tkiva nije bilo uticaja na ukupne aktivnosti LDH i MDH
 - Primena piridoksina i folne kiseline je bila praćena povećanjem aktivnosti LDH-1 i smanjenjem aktivnosti LDH-3 i LDH-4, kao i smanjenjem pMDH
 - U homogenatu srčanog tkiva u DM+FA grupi uočene su proMMP-2 i aMMP-9. Primena piridoksina i folne kiseline kod pacova sa DM je smanjila aktivnost proMMP-2 i povećala aktivnost aMMP-9
 - Kod pacova sa DM primena piridoksina i folne kiseline je dovela do smanjenja IVS, dok na ostale histomorfometrijske parametre srca nije bilo uticaja
 - Nakon udružene primene piridoksina i folne kiseline pozitivnost BCL-2, BCL-6 i Ki-67 nije uočena ni u jednoj ćeliji. Primena piridoksina i folne kiseline je značajno povećala pozitivnost PCNA u LK, a u DK i IVS nije uticala na pozitivnost PCNA

7. LITERATURA

- Abd Allah ES, Gomaa AM (2015). Effects of curcumin and captopril on the functions of kidney and nerve in streptozotocin-induced diabetic rats: Role of angiotensin converting enzyme 1. *Appl Physiol Nutr Metab* 40(10):1061-7.
- Abdelsalam KEA (2015). Lipoprotein lipase, amylase and triglyceride alteration: Lean diabetic and obese (nondiabetic) patients. *IJSBAR* 23(2): 95-103.
- Abdullah KM, Abul Qais F, Hasan H, Naseem I (2019). Anti-diabetic study of vitamin B6 on hyperglycaemia induced protein carbonylation, DNA damage and ROS production in alloxan induced diabetic rats. *Toxicol Res (Camb)* 8(4):568-79.
- Aghamohammadi V, Gargari BP, Aliasgharzadeh A (2011). Effect of folic acid supplementation on homocysteine, serum total antioxidant capacity, and malondialdehyde in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr* 30(3):210-5.
- Ahmadi R, Pishghadam S, Mollaamine F, Zand Monfared MR (2013). Comparing the effects of ginger and glibenclamide on dihydroxybenzoic metabolites produced in STZ-induced diabetic rats. *Int J Endocrinol Metab* 11(4):e10266.
- Ahmet A, Dagenais S, Barrowman NJ, Collins CJ, Lawson ML (2011). Prevalence of nocturnal hypoglycemia in pediatric type 1 diabetes: a pilot study using continuous glucose monitoring. *J Pediatr* 159:297-302.
- Ahn HJ, Min KW, Cho YO (2011). Assessment of vitamin B(6) status in Korean patients with newly diagnosed type 2 diabetes. *Nutr Res Pract* 5(1):34-9.
- Ahn T, Bae C-S, Yun C-H (2016). Acute stress-induced changes in hormone and lipid levels in mouse plasma. *Vet Med (Praha)* 61(2):57-64.
- Akat F, Fişıcılar H, Durak A, Tuncay E, Dursun AD, Topal Çelikkın F, Sabuncuoğlu B, Turan B, Baştuğ M (2018). Intermittent hypoxia induces beneficial cardiovascular remodeling in left ventricular function of type 1 diabetic rat. *Anatol J Cardiol* 19(4):259-66.
- Al-Aubaidy HA, Jelinek HF (2011). Oxidative DNA damage: antioxidant response in postprandial hyperglycaemia in type 2 diabetes mellitus. *Br J Diabetes Vasc Dis* 11:87-91.
- Alikhani V, Keshavarzi Z, Hadjzadeh M, Al R, Karimi S (2015). The effect of melatonin on gastric parameters following diabetes induction in male rats. *Acta Endocrinol (Buchar)* 11(2):155-61.
- Aloud AA, Veeramani C, Govindasamy C, Alsaif MA, Al-Numair KS (2018). Galangin, a natural flavonoid reduces mitochondrial oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Redox Rep* 23(1):29-34.
- Al-Rasheed NM, Al-Rasheed NM, Hasan IH, Al-Amin MA, Al-Ajmi HN, Mohamad RA, Mahmoud AM (2017). Simvastatin ameliorates diabetic cardiomyopathy by attenuating oxidative stress and inflammation in rats. *Oxid Med Cell Longev* 2017:1092015.
- Aly TA, Ide A, Jahromi MM, Barker JM, Fernando MS, Babu SR, Yu L, Miao D, Erlich HA, Fain PR, Barriga KJ, Norris JM, Rewers MJ, Eisenbarth GS (2006). Extreme genetic risk for type 1A diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(38):14074-9.
- American Diabetes Association (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 33(Suppl 1): S62-S69.
- American Diabetes Association (2012). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 35(suppl 1):64-71.
- Andersson C, Olesen JB, Hansen PR, Weeke P, Norgaard ML, Jorgensen CH, Lange T, Abildstrom SZ, Schramm TK, Vaag A, Kober L, Torp-Pedersen C, Gislason GH (2010). Metformin treatment is associated with a low risk of mortality in diabetic patients with heart failure: a retrospective nationwide cohort study. *Diabetologia* 53:2546-53.

- Antoniades C, Shirodaria C, Leeson P, Baarholm OA, Van-Assche T, Cunnington C, Pillai R, Ratnatunga C, Tousoulis D, Stefanadis C, Refsum H, Channon KM (2009). MTHFR 677 C>T polymorphism reveals functional importance for 5-methyltetrahydrofolate, not homocysteine, in regulation of vascular redox state and endothelial function in human atherosclerosis. *Circulation* 119(18):2507-15.
- Antoniades C, Shirodaria C, Warrick N, Cai S, de Bono J, Lee J, Leeson P, Neubauer S, Ratnatunga C, Pillai R, Refsum H, Channon KM (2006). 5-methyltetrahydrofolate rapidly improves endothelial function and decreases superoxide production in human vessels: Effects on vascular tetrahydrobiopterin availability and endothelial nitric oxide synthase coupling. *Circulation* 114(11):1193-201.
- Arai T, Nakamura M, Magori E, Fukuda H, Sako T (2003). Decrease in malate dehydrogenase activities in peripheral leucocytes of type 1 diabetic dogs. *Res Vet Sci* 74(2):183-5.
- Arden GB, Sivaprasad S (2011). Hypoxia and oxidative stress in the causation of diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev* 7:291-304.
- Arkkila PE, Koskinen PJ, Kantola IM, Rönnemaa T, Seppänen E, Viikari JS (2001). Diabetic complications are associated with liver enzyme activities in people with type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 52(2):113-8.
- Aronow WS, Ahn C (1999). Incidence of heart failure in 2,737 older persons with and without diabetes mellitus. *Chest* 115:867-8.
- Asbaghi O, Ashtary-Larky D, Bagheri R, Moosavian SP, Olyaei HP, Nazarian B, Rezaei Kelishadi M, Wong A, Candow DG, Dutheil F, Suzuki K, Alavi Naeini A (2021b). Folic acid supplementation improves glycemic control for diabetes prevention and management: a systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrients* 13(7):2355.
- Asbaghi O, Ghanavati M, Ashtary-Larky D, Bagheri R, Rezaei Kelishadi M, Nazarian B, Nordvall M, Wong A, Dutheil F, Suzuki K, Alavi Naeini A (2021a). Effects of folic acid supplementation on oxidative stress markers: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Antioxidants (Basel)* 10(6):871.
- Asfandiyarova N, Kolcheva N, Ryazantsev I, Ryazantsev V (2006). Risk factors for stroke in type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res* 3(1):57-60.
- Asmat U, Abad K, Ismail K (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress-a concise review. *Saudi Pharm J* 24(5):547-53.
- Ata N, Dal K, Kucukazman M, Yeniova AÖ, Karakaya S, Unsal O, Dagdeviren M, Akin KO, Baser S, Beyan E, Ertugrul DT (2015). The effect of glycemic control on CEA, CA 19-9, amylase and lipase levels. *Open Med(Wars)* 10: 8-13.
- Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW (2014). Type 1 diabetes. *Lancet* 383(9911):69-82.
- Atkinson MA, Maclaren NK (1994). The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 331(21):1428-36.
- Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Erogul J, Sorenson R, Bisgaier CL, Newton RS, La Du B (1999). Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 26(7-8):892-904.
- Ayepola OR, Brooks NL, Oguntibeju OO (2014). Oxidative stress and diabetic complications: the role of antioxidant vitamins and flavonoids. In: Oguntibeju O, editor. *Antioxidant-antidiabetic agents and human health*. London: IntechOpen; p, 25-58.
- Aziz NM, Ragy MM, Ahmed SM (2018). Somatostatin analogue, Octreotide, improves restraint stress-induced liver injury by ameliorating oxidative stress, inflammatory response, and activation of hepatic stellate cells. *Cell Stress Chaperones* 23(6):1237-45.

- Bach JF, Chatenoud L (2011). A historical view from thirty eventful years of immunotherapy in autoimmune diabetes. *Semin Immunol* 23:174-81.
- Bahmani F, Karamali M, Shakeri H, Asemi Z (2014). The effects of folate supplementation on inflammatory factors and biomarkers of oxidative stress in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Clin Endocrinol (Oxf)* 81(4):582-7.
- Bailey RL, West Jr. KP, Black RE (2015). The epidemiology of global micronutrient deficiencies. *Ann Nutr Metab* 66(Suppl. 2):22-33.
- Bajic Z, Sobot T, Skrbic R, Stojiljkovic MP, Ponorac N, Matavulj A, Djuric DM (2022). Homocysteine, vitamins B6 and folic acid in experimental models of myocardial infarction and heart failure-How strong is that link? *Biomolecules* 12(4):536.
- Bajpai A, Tilley DG (2018). The role of leukocytes in diabetic cardiomyopathy. *Front Physiol* 9:1547.
- Baker BC, Mackie FL, Lean SC, Greenwood SL, Heazell AEP, Forbes K, Jones RL (2017). Placental dysfunction is associated with altered microRNA expression in pregnant women with low folate status. *Mol Nutr Food Res* 61(8):1600646.
- Baker PN, Wheeler SJ, Sanders TA, Thomas JE, Hutchinson CJ, Clarke K, Berry JL, Jones RL, Seed PT, Poston L (2009). A prospective study of micronutrient status in adolescent pregnancy. *Am J Clin Nutr* 89(4):1114-24.
- Bansal AK, Bilaspuri GS (2010). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int* 2010:686137.
- Barnabé A, Aléssio ACM, Bittar LF (2015). Folate, vitamin B12 and homocysteine status in the post-folic acid fortification era in different subgroups of the Brazilian population attended to at a public health care center. *Nutr J* 14:19.
- Barr EL, Zimmet PZ, Welborn TA, Jolley D, Magliano DJ, Dunstan DW, Cameron AJ, Dwyer T, Taylor HR, Tonkin AM, Wong TY, McNeil J, Shaw JE (2007). Risk of cardiovascular and all-cause mortality in individuals with diabetes mellitus, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance. *Circulation* 116:151-7.
- Bayes J, Agrawal N, Schloss J (2019). The bioavailability of various oral forms of folate supplementation in healthy populations and animal models: a systematic review. *J Altern Complement Med* 25(2):169-180.
- Beckman JA (2004). Endothelial dysfunction. In: Stern SPMDM, editor. *Diabetes and cardiovascular disease integrating science and clinical medicine*, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 239-50.
- Beers RF Jr, Sizer IW (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 195(1):133-60.
- Beran D, Yudkin JS, de Courten M (2005). Access to care for patients with insulin-requiring diabetes in developing countries: Case studies of Mozambique and Zambia. *Diabetes Care* 28:2136-40.
- Berg TJ, Snorgaard O, Faber J, Torjesen PA, Hildebrandt P, Mehlsen J, Hanssen KF (1999). Serum levels of advanced glycation end products are associated with left ventricular diastolic function in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 22(7):1186-90.
- Bergenstal RM, Tamborlane WV, Ahmann A, Buse JB, Dailey G, Davis SN, Joyce C, Peoples T, Perkins BA, Welsh JB, Willi SM, Wood MA; STAR 3 Study Group (2010). Effectiveness of sensor-augmented insulin-pump therapy in type 1 diabetes. *N Engl J Med* 363:311-20.
- Bergers G, Brekken R, McMahan G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2(10):737-44.

- Bergman MR, Teerlink JR, Mahimkar R, Li L, Zhu BQ, Nguyen A, Dahi S, Karliner JS, Lovett DH (2007). Cardiac matrix metalloproteinase-2 expression independently induces marked ventricular remodeling and systolic dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292(4):H1847-60.
- Bertoni AG, Goff DC, Jr, D'Agostino RB, Jr, Liu K, Hundley WG, Lima JA, Polak JF, Saad MF, Szklo M, Tracy RP, Siscovick DS (2006). Diabetic cardiomyopathy and subclinical cardiovascular disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) *Diabetes Care* 29:588-94.
- Beyan H, Riese H, Hawa MI, Beretta G, Davidson HW, Hutton JC, Burger H, Schlosser M, Snieder H, Boehm BO, Leslie RD (2012). Glycotoxin and autoantibodies are additive environmentally determined predictors of type 1 diabetes: a twin and population study. *Diabetes* 61(5):1192-8.
- Bhat R, Axtell R, Mitra A, Miranda M, Lock C, Tsien RW, Steinman L (2010). Inhibitory role for GABA in autoimmune inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:2580-5
- Bhatt LK, Veeranjanyulu A (2012). A therapeutic approach to treat cardiovascular dysfunction of diabetes. *Exp Toxicol Pathol* 64(7-8):847-53.
- Biernacka A, Cavalera M, Wang J, Russo I, Shinde A, Kong P, Gonzalez-Quesada C, Rai V, Dobaczewski M, Lee DW, Wang XF, Frangogiannis NG (2015). Smad3 signaling promotes fibrosis while preserving cardiac and aortic geometry in obese diabetic mice. *Circ Heart Fail* 8(4):788-98.
- Billimoria FR, Katyare SS, Patel SP (2006). Insulin status differentially affects energy transduction in cardiac mitochondria from male and female rats. *Diabetes Obes Metab* 8(1):67-74.
- Bilski P, Li MY, Ehrenshaft M, Daub ME, Chignell CF (2000). Vitamin B6 (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants. *Photochem Photobiol* 71(2):129-34.
- Bittar PG, Charnay Y, Pellerin L, Bouras C, Magistretti PJ (1996). Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 16(6):1079-89.
- Black AL, Guirard BM and Snell EE (1977) Increased muscle phosphorylase in rats fed high levels of vitamin B6. *J Nutr* 107:1962-8.
- Bloch-Damti A, Bashan N (2005). Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 7(11-12):1553-67.
- Bloomgarden ZT (2004). Consequences of diabetes. *Diabetes Care* 27:1825-31.
- Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Molina-Frechero N, Mori-Estevez AD, Sánchez-Acuña G (2013). Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 18(2):e174-9.
- Bonner-Weir S, Trent DF, Weir GC (1983). Partial pancreatectomy in the rat and subsequent defect in glucose-induced insulin release. *J Clin Invest* 71:1544-53.
- Boudina S, Abel ED (2010). Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. *Rev Endocr Metab Disord* 11(1):31-9.
- Bouthoorn S, Valstar GB, Gohar A, den Ruijter HM, Reitsma HB, Hoes AW, Rutten FH (2018). The prevalence of left ventricular diastolic dysfunction and heart failure with preserved ejection fraction in men and women with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diab Vasc Dis Res* 15(6):477-93.
- Boveris A (1984). Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol* 105:429-35.
- Boyles AL, Yetley EA, Thayer KA, Coates PM (2016). Safe use of high intakes of folic acid: research challenges and paths forward. *Nutr Rev* 74(7):469-74.

- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
- Brazionis L, Rowley K Sr, Itsiopoulos C, Harper CA, O'Dea K (2008). Homocysteine and diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 31(1):50-6.
- Breton M, Farret A, Bruttomesso D, Anderson S, Magni L, Patek S, Dalla Man C, Place J, Demartini S, Del Favero S, Toffanin C, Hughes-Karvetski C, Dassau E, Zisser H, Doyle FJ 3rd, De Nicolao G, Avogaro A, Cobelli C, Renard E, Kovatchev B; International Artificial Pancreas Study Group. (2012). Fully integrated artificial pancreas in type 1 diabetes: Modular closed-loop glucose control maintains near normoglycemia. *Diabetes* 61:2230-37.
- Brownlee M (2003). A radical explanation for glucose-induced beta cell dysfunction. *J Clin Invest* 112(12):1788-90.
- Brownlee M (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54(6):1615-25.
- Brunvand L, Fugelseth D, Stensaeth KH, Dahl-Jørgensen K, Margeirsdottir HD (2016). Early reduced myocardial diastolic function in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus a population-based study. *BMC Cardiovasc Disord* 16:103.
- Brunvand L, Heier M, Brunborg C, Hanssen KF, Fugelseth D, Stensaeth KH, Dahl-Jørgensen K, Margeirsdottir HD (2017). Advanced glycation end products in children with type 1 diabetes and early reduced diastolic heart function. *BMC Cardiovasc Disord* 17(1):133.
- Bub A, Barth SW, Watzl B, Briviba K, Rechkemmer G (2005). Paraoxonase 1 Q192R (PON1-192) polymorphism is associated with reduced lipid peroxidation in healthy young men on a low carotenoid diet supplemented with tomato juice. *Br J Nutr* 93(3): 291-7.
- Buse MG (2006). Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290(1):E1-E8.
- Buss DD, Hamm MW, Mehansho H (1980). Transport and metabolism of pyridoxine in the perfused small intestine and the hind limb of the rat. *J Nutr* 110:1655-63.
- Cabrini L, Bergami R, Fiorentini D, Marchetti M, Landi L, Tolomelli B (1998). Vitamin B6 deficiency affects antioxidant defences in rat liver and heart. *Biochem Mol Biol Int* 46(4):689-97.
- Cade WT (2008). Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. *Phys Ther* 88:1322-1335.
- Cagnacci A, Cannoletta M, Xholli A, Piacenti I, Palma F, Palmieri B (2015). Folate administration decreases oxidative status and blood pressure in postmenopausal women. *Eur J Nutr* 54(3):429-35.
- Cai L, Kang YJ (2001). Oxidative stress and diabetic cardiomyopathy: a brief review. *Cardiovasc Toxicol* 1(3):181-93.
- Cai L, Wang J, Li Y, Sun X, Wang L, Zhou Z, Kang YJ (2005). Inhibition of superoxide generation and associated nitrosative damage is involved in metallothionein prevention of diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 54(6):1829-37.
- Calder PC, Carr AC, Gombart AF, Eggersdorfer M (2020). Optimal nutritional status for a well-functioning immune system is an important factor to protect against viral infections. *Nutrients* 12(4):1181.
- Calla MS, Lynch SM (2006). Vitamin C preserves the cardioprotective paraoxonase activity of high-density lipoprotein during oxidant stress. *Arch Biochem Biophys* 452(2): 129-37.
- Cao JW, Duan SY, Zhang HX, Chen Y, Guo M (2020). Zinc deficiency promoted fibrosis via ROS and TIMP/MMPs in the myocardium of mice. *Biol Trace Elem Res* 196(1):145-152.

- Cavan D, da Rocha Fernandes J, Makaroff L, Ogurtsova K, Webber S, editors (2015). IDF diabetes atlas. 7th ed. www.diabetesatlas.org.
- Ceriello A (2006). Oxidative stress and diabetes-associated complications. *Endocr Pract* 12 Suppl 1:60-2.
- Ceriello A, Mercuri F, Quagliari L, Assaloni R, Motz E, Tonutti L, Taboga C (2001). Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. *Diabetologia* 44(7):834-8.
- Ceron CS, Castro MM, Rizzi E, Montenegro MF, Fontana V, Salgado MC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE (2010). Spironolactone and hydrochlorothiazide exert antioxidant effects and reduce vascular matrix metalloproteinase-2 activity and expression in a model of renovascular hypertension. *Br J Pharmacol* 160:77-87.
- Ceron CS, Rizzi E, Guimaraes DA, Martins-Oliveira A, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. (2013) Nebivolol attenuates prooxidant and profibrotic mechanisms involving TGF-beta and MMPs, and decreases vascular remodeling in renovascular hypertension. *Free Radic Biol Med* 65:47-56.
- Chaiyasut C, Kusirisin W, Lailerd N, Lertrakarnnon P, Suttajit M, Srichairatanakool S (2011). Effects of phenolic compounds of fermented Thai indigenous plants on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011:749307.
- Chalupsky K, Kračun D, Kanchev I, Bertram K, Görlach A (2015). Folic acid promotes recycling of tetrahydrobiopterin and protects against hypoxia-induced pulmonary hypertension by recoupling endothelial nitric oxide synthase. *Antioxid Redox Signal* 23(14):1076-91.
- Chambers JC (2000). Improved vascular endothelial function after oral B vitamins: an effect mediated through reduced concentrations of free plasma homocysteine. *Circulation* 102:2479-83
- Chan YM, Bailey R, O'Connor DL (2013). Folate. *Adv Nutr* 4(1):123-5.
- Chang CD, Ottavio L, Travali S, Lipson KE, Baserga R (1990). Transcriptional and posttranscriptional regulation of the proliferating cell nuclear antigen gene. *Mol Cell Biol* 10(7):3289-96.
- Chang TY, Chou KJ, Tseng CF, Chung HM, Fang HC, Hung YM, Wu MJ, Tzeng HM, Lind CC, Lu KC (2007). Effects of folic acid and vitamin B complex on serum C-reactive protein and albumin levels in stable hemodialysis patients. *Curr Med Res Opin* 23(8):1879-86.
- Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, Kamper E (2009). The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo* 23(2):245-58.
- Chayarop K, Peungvicha P, Temsiririrkkul R, Wongkrajang Y, Chuakul W, Rojsanga P (2017). Hypoglycaemic activity of Mathurameha, a Thai traditional herbal formula aqueous extract, and its effect on biochemical profiles of streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *BMC Complement Altern Med* 17(1):343.
- Cheng CH, Lin PT, Liaw YP (2008). Plasma pyridoxal 5'-phosphate and high-sensitivity C reactive protein are independently associated with an increased risk of coronary artery disease. *Nutrition* 24:239-44.
- Chmurzynska A, Malinowska AM, Twardowska-Rajewska J, Gawecki J (2013). Elderly women: homocysteine reduction by short-term folic acid supplementation resulting in increased glucose concentrations and affecting lipid metabolism (C677T MTHFR polymorphism). *Nutrition* 29(6):841-4.
- Cho KH, Wolkenhauer O (2003). Analysis and modelling of signal transduction pathways in systems biology. *Biochem Soc Trans* 31(Pt 6):1503-9.
- Choi SY, Chang HJ, Choi SI, Kim KI, Cho YS, Youn TJ, Chung WY, Chae IH, Choi DJ, Kim HS, Kim CH, Oh BH, Kim MH (2009). Long-term exercise training attenuates age-related diastolic dysfunction: association of myocardial collagen cross-linking. *J Korean Med Sci* 24(1):32-9.

- Chu H, Wang Y (2012). Therapeutic angiogenesis: Controlled delivery of angiogenic factors. *Ther Deliv* 3(6):693-714.
- Clarke ZL, Moat SJ, Miller AL, Randall MD, Lewis MJ, Lang D (2006). Differential effects of low and high dose folic acid on endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocysteinaemia. *Eur J Pharmacol* 551(1-3):92-7.
- Clayton PT (2006). B6-responsive disorders: a model of vitamin dependency. *J Inherit Metab Dis* 29:317-26.
- Coburn SP (1994). A critical review of minimal vitamin B6 requirements for growth in various species with a proposed method of calculation. *Vitam Horm* 48:259-300.
- Combs GF Jr (1992). *The vitamins: Fundamental aspects in nutrition and health*. San Diego, CA: Academic.
- Constans J, Blann AD, Resplandy F, Parrot F, Renard M, Seigneur M, Guérin V, Boisseau M, Conri C (1999). Three months supplementation of hyperhomocysteinaemic patients with folic acid and vitamin B6 improves biological markers of endothelial dysfunction. *Br J Haematol* 107(4):776-8.
- Corrêa RR, Pucci KR, Rocha LP, Pereira Júnior CD, Helmo FR, Machado JR, Rocha LB, Rodrigues AR, Glória MA, Guimarães CS, Câmara NO, Reis MA (2015). Acute kidney injury and progression of renal failure after fetal programming in the offspring of diabetic rats. *Pediatr Res* 77(3):440-6.
- Couri CE, Oliveira MC, Stracieri AB, Moraes DA, Pieroni F, Barros GM, Madeira MI, Malmegrim KC, Foss-Freitas MC, Simões BP, Martinez EZ, Foss MC, Burt RK, Voltarelli JC (2009). C-peptide levels and insulin independence following autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA* 301:1573-9.
- Crabtree MJ, Channon KM (2011). Synthesis and recycling of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Nitric Oxide* 25:81-88.
- Cunningham VR, Phillips J, Field EJ (1965). Lactic dehydrogenase isoenzymes in normal and pathological spinal fluids. *J Clin Pathol* 18(6):765-70.
- da Silva VR, Rios-Avila L, Lamers Y, Ralat MA, Midttun Ø, Quinlivan EP, Garrett TJ, Coats B, Shankar MN, Percival SS, Chi YY, Muller KE, Ueland PM, Stacpoole PW, Gregory JF 3rd (2013). Metabolite profile analysis reveals functional effects of 28-day vitamin B-6 restriction on one-carbon metabolism and tryptophan catabolic pathways in healthy men and women. *J Nutr* 143(11):1719-27.
- Dabelea D (2009). The accelerating epidemic of childhood diabetes. *Lancet* 373:1999-2000.
- Dall TM, Mann SE, Zhang Y, Quick WW, Seifert RF, Martin J, Huang EA, Zhang S (2009). Distinguishing the economic costs associated with type 1 and type 2 diabetes. *Popul Health Manag* 12:103-10.
- Dalto DB, Matte J-J (2017). Pyridoxine (vitamin B(6) and the glutathione peroxidase system; a link between one-carbon metabolism and antioxidation. *Nutrients* 9(3).
- Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, Lin JK, Farzadfar F, Khang YH, Stevens GA, Rao M, Ali MK, Riley LM, Robinson CA, Ezzati M; Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Blood Glucose) (2011). National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: Systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet* 378(9785):31-40.
- Daniel OO, Adeoye AO, Ojowu J, Olorunsogo OO (2018). Inhibition of liver mitochondrial membrane permeability transition pore opening by quercetin and vitamin E in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun* 504(2):460-9.

- Darbandi N, Ramezani M, Noori M (2018). Mespilus germanica flavonoids attenuate cognitive dysfunction in the streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *Indian J Pharm Sci* 80(4):668-75.
- Davis CK, Nampoothiri SS, Rajanikant GK (2018). Folic acid exerts post-ischemic neuroprotection in vitro through HIF-1 α stabilization. *Mol Neurobiol* 55(11):8328-45.
- de Gouveia NM, Rodrigues WF, de Sousa RMF, Calábria LK, Mundim AV, Miguel CB, Oliveira CJF, Lazo-Chica JE, de Oliveira A, Lago JHG, Dos Santos VB, do Lago CL, Espindola FS (2017). Phytochemical characterization of the *Vochysia rufa* (Vochysiaceae) extract and its effects on oxidative stress in the pancreata of streptozotocin-induced diabetic rats. *PLoS One* 12(10):e0184807.
- de Oliveira MG, Lauxen-Ida S, Chaves AC, Rados PV, Sant'AnaFilho M (2008). Immunohistochemical analysis of the patterns of p53 and PCNA expression in odontogenic cystic lesions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 13:E275-80.
- DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB (2008a). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7(1):11-20.
- Deberardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB (2008b). Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev* 18(1):54-61.
- Debreceni B, Debreceni L (2012). Why do homocysteine-lowering B vitamin and antioxidant E vitamin supplementations appear to be ineffective in the prevention of cardiovascular diseases? *Cardiovasc Ther* 30(4):227-33.
- Debreceni B, Debreceni L (2014). The role of homocysteine-lowering B-vitamins in the primary prevention of cardiovascular disease. *Cardiovasc Ther* 32(3):130-8.
- Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS, Gastineau DA, Hiddinga HJ, Jahangir A, Eberhardt NL, Kudva YC (2011). Single dose streptozotocin-induced diabetes: Considerations for study design in islet transplantation models. *Lab Anim* 45:131-40.
- Degirmenci I, Kalender S, Ustuner MC, Kalender Y, Gunes HV, Unal N, Basaran A (2002). The effects of acarbose and *Rumex patientia* on liver ultrastructure in streptozotocin-induced diabetic (type II) rats. *Drugs Exp Clin Res* 28(6):229-34.
- Dekel Y, Glucksam Y, Elron-Gross I, Margalit R (2009). Insights into modeling streptozotocin-induced diabetes in ICR mice. *Lab Anim (NY)* 38:55-60.
- Dempsey WB, Christensen HN (1962). The specific binding of pyridoxal 5'-phosphate to bovine plasma albumin. *J Biol Chem* 237:13-20.
- Devereux RB, Roman MJ, Paranicas M, O'Grady MJ, Lee ET, Welty TK, Fabsitz RR, Robbins D, Rhoades ER, Howard BV (2000). Impact of diabetes on cardiac structure and function: the strong heart study. *Circulation* 101:2271-6.
- Dhalla NS, Takeda S, Elimban V (2013). Mechanisms of the beneficial effects of vitamin B6 and pyridoxal 5'-phosphate on cardiac performance in ischemic heart disease. *Clin Chem Lab Med* 51:535-43.
- DIAMOND Project Group (2006). Incidence and trends of childhood type 1 diabetes worldwide 1990-1999. *Diabet Med* 23:857-66.
- Diao C, Zhao L, Guan M, Zheng Y, Chen M, Yang Y, Lin L, Chen W, Gao H (2014). Systemic and characteristic metabolites in the serum of streptozotocin-induced diabetic rats at different stages as revealed by a (1)H-NMR based metabolomic approach. *Mol Biosyst* 10(3):686-93.
- Dias T, Mota-Filipe H, Liu B, Jones P, Houghton PJ, Paulo A (2010). Recovery of oral glucose tolerance by Wistar rats after treatment with *Coreopsis tinctoria* infusion. *Phytother Res* 24(5):699-705.

- Dikalov S (2011). Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med* 51(7):1289-301.
- Dincer Y, Akcay T, Alademir Z, Ilkova H (2002). Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 51:1360-12.
- Dinh W, Füh R, Nickl W, Krahn T, Ellinghaus P, Scheffold T, Bansemir L, Bufe A, Barroso MC, Lankisch M (2009). Elevated plasma levels of TNF-alpha and interleukin-6 in patients with diastolic dysfunction and glucose metabolism disorders. *Cardiovasc Diabetol* 8:58.
- Djuric D, Jakovljevic V, Zivkovic V, Srejovic I (2018). Homocysteine and homocysteine-related compounds: an overview of the roles in the pathology of the cardiovascular and nervous systems. *Can J Physiol Pharmacol* 96(10):991-1003.
- Djuric D, Vusanovic A, Jakovljevic V (2007). The effects of folic acid and nitric oxide synthase inhibition on coronary flow and oxidative stress markers in isolated rat heart. *Mol Cell Biochem* 300:177-83.
- Dobiášová M, Frohlich J (2001). The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index: Correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoB-lipoprotein-depleted plasma (FER(HDL)). *Clin Biochem* 34(7):583-8.
- Doshi SN, McDowell IF, Moat SJ, Lang D, Newcombe RG, Kredan MB, Lewis MJ, Goodfellow J (2001). Folate improves endothelial function in coronary artery disease: an effect mediated by reduction of intracellular superoxide? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(7):1196-202.
- Draper H, Hadley M (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 186:421-31
- Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG (2011). Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 10(6):453-71.
- Dufrane D, van Steenberghe M, Guiot Y, Goebbels RM, Saliez A, Gianello P (2006). Streptozotocin-induced diabetes in large animals (pigs/primates): role of GLUT2 transporter and beta-cell plasticity. *Transplantation* 81:36-45.
- Duncan JG (2011). Mitochondrial dysfunction in diabetic cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta* 1813(7):1351-9.
- Durand P, Prost M, Blache D (1996). Pro-thrombotic effects of a folic acid deficient diet in rat platelets and macrophages related to elevated homocysteine and decreased n-3 polyunsaturated fatty acids. *Atherosclerosis* 121(2):231-43.
- Ebaid H, Bashandy SAE, Abdel-Mageed AM, Al-Tamimi J, Hassan I, Alhazza IM (2020). Folic acid and melatonin mitigate diabetic nephropathy in rats via inhibition of oxidative stress. *Nutr Metab (Lond)* 17:6.
- Ebeneasan P, Jainu M (2018). Combined therapy with insulin and vildagliptin causes cardiac dysfunction in diabetic rats. *Indian J Pharm Sci* 80(3):575-80.
- Eckel RH, Eisenbarth GS (2012). Autoimmune diabetes inflames the heart. *Sci Transl Med* 4:138fs18.
- Ehehalt S, Dietz K, Willasch AM, Neu A (2012). Prediction model for the incidence and prevalence of type 1 diabetes in childhood and adolescence: evidence for a cohort-dependent increase within the next two decades in Germany. *Pediatr Diabetes* 13:15-20.
- Ehrenshaft M, Bilski P, Li MY, Chignell CF, Daub ME (1999). A highly conserved sequence is a novel gene involved in de novo vitamin B6 biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(16):9374-8.
- Eisenbarth GS (2007). Update in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2403-7.
- Emamaullee JA, Merani S, Toso C, Kin T, Al-Saif F, Truong W, Pawlick R, Davis J, Edgar R, Lock J, Bonner-Weir S, Knudsen LB, Shapiro AM (2009). Porcine marginal mass islet autografts resist

- metabolic failure over time and are enhanced by early treatment with liraglutide. *Endocrinology* 150(5):2145-52.
- Eriksson JW (2007). Metabolic stress in insulin's target cells leads to ROS accumulation - a hypothetical common pathway causing insulin resistance. *FEBS Lett* 581(19):3734-42.
- Ernande L, Derumeaux G (2012). Diabetic cardiomyopathy: myth or reality? *Arch Cardiovasc Dis* 105(4):218-25.
- Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM (2002). Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23(5):599-622.
- Ewadh MJ, Juda TM, Ali ZA, Ewadh MM (2014). Evaluation of amylase activity in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J of Biosci* 2(5): 171-4.
- Fang YZ, Yang S, Wu G (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18(10):872-9.
- Fang ZY, Schull-Meade R, Leano R, Mottram PM, Prins JB, Marwick TH (2005). Screening for heart disease in diabetic subjects. *Am Heart J* 149:349-54.
- Farhood HB, Al-salih RMH, Radhi MN (2014). Clinical studies to evaluate pancreatic functions in the patients of type 2 diabetes mellitus. *IJIAS* 7(1): 413-20.
- Feng Y, Shan MQ, Bo L, Zhang XY, Hu J (2015). Association of homocysteine with type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 8(8):12529-38.
- Fisher AB, Zhang G (2006). NADPH and NADPH Oxidase. In: Laurent GJ, Shapiro SD. editors *Encyclopedia of respiratory medicine*. Amsterdam: Elsevier. p. 77-83.
- Folli F, Corradi D, Fanti P, Davalli A, Paez A, Giaccari A, Perego C, Muscogiuri G (2011). The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus micro- and macrovascular complications: avenues for a mechanistic-based therapeutic approach. *Curr Diabetes Rev* 7(5):313-24.
- Folsom AR, Nieto FJ, McGovern PG, Tsai MY, Malinow MR, Eckfeldt JH, Hess DL, Davis CE (1998). Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphisms, and B vitamins: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation* 98:204-210.
- Förstermann U (2006). Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: Uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. *Biol Chem* 387(12):1521-33.
- Frankel DS, Meigs JB, Massaro JM, Wilson PW, O'Donnell CJ, D'Agostino RB, Tofler GH (2008). Von Willebrand factor, type 2 diabetes mellitus, and risk of cardiovascular disease: the Framingham offspring study. *Circulation* 118(24):2533-9.
- Frati G, Schirone L, Chimenti I, Yee D, Biondi-Zoccai G, Volpe M, Sciarretta S (2017). An overview of the inflammatory signalling mechanisms in the myocardium underlying the development of diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 113(4):378-88.
- Fridovich I (1999). Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci* 893:13-8.
- Frieden C, Fernandez-Sousa J (1975). Kinetic studies on pig heart cytoplasmic malate dehydrogenase. *J Biol Chem* 250(6):2106-13.
- Friso S, Girelli D, Martinelli N, Olivieri O, Lotto V, Bozzini C, Pizzolo F, Faccini G, Beltrame F, Corrocher R (2004). Low plasma vitamin B6 concentrations and modulation of coronary artery disease risk. *Am J Clin Nutr* 79:992-8.
- Friso S, Lotto V, Corrocher R, Choi SW (2012). Vitamin B6 and cardiovascular disease. *Subcell Biochem* 56:265-90.

- Frustaci A, Sabbioni E, Fortaner S, Farina M, del Torchio R, Tafani M, Morgante E, Ciriolo MR, Russo MA, Chimenti C (2012). Selenium- and zinc-deficient cardiomyopathy in human intestinal malabsorption: preliminary results of selenium/zinc infusion. *Eur J Heart Fail* 14(2):202-10.
- Fu L, Zhou Y, Sun J, Zhu Z, Xing Z, Zhou S, Wang Y, Tai S (2021). Atherogenic index of plasma is associated with major adverse cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* 20(1):201.
- Fukai T, Ushio-Fukai M (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal* 15(6):1583-606.
- Gale EA (2005). Type 1 diabetes in the young: the harvest of sorrow goes on. *Diabetologia* 48:1435-38.
- Gale EA (2006). Dying of diabetes. *Lancet* 368:1626-8.
- Gale EA, Bingley PJ, Emmett CL, Collier T; European nicotinamide diabetes intervention trial (ENDIT) group (2004). European nicotinamide diabetes intervention trial (ENDIT): a randomised controlled trial of intervention before the onset of type 1 diabetes. *Lancet* 363:925-31.
- Gao L, Chalupsky K, Stefani E, Cai H (2009). Mechanistic insights into folic acid-dependent vascular protection: dihydrofolate reductase (DHFR)-mediated reduction in oxidant stress in endothelial cells and angiotensin II-infused mice: a novel HPLC-based fluorescent assay for DHFR activity. *J Mol Cell Cardiol* 47(6):752-60.
- Gargari BP, Aghamohammadi V, Aliasgharzadeh A (2011). Effect of folic acid supplementation on biochemical indices in overweight and obese men with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 94(1):33-8.
- Gaskins AJ, Rich-Edwards JW, Hauser R, Williams PL, Gillman MW, Ginsburg ES, Missmer SA, Chavarro JE (2014). Maternal prepregnancy folate intake and risk of spontaneous abortion and stillbirth. *Obstet Gynecol* 124(1):23-31.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31:13-20.
- Giacco F, Brownlee M (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 107:1058-70.
- Gianani R, Campbell-Thompson M, Sarkar SA, Wasserfall C, Pugliese A, Solis JM, Kent SC, Hering BJ, West E, Steck A, Bonner-Weir S, Atkinson MA, Coppieters K, von Herrath M, Eisenbarth GS (2010). Dimorphic histopathology of long-standing childhood-onset diabetes. *Diabetologia* 53:690-8.
- Gibly RF, Graham JG, Luo X, Lowe WL, Jr, Hering BJ, Shea LD (2011). Advancing islet transplantation: from engraftment to the immune response. *Diabetologia* 54:2494-505.
- Gillespie KM, Bain SC, Barnett AH, Bingley PJ, Christie MR, Gill GV, Gale EA (2004). The rising incidence of childhood type 1 diabetes and reduced contribution of high-risk HLA haplotypes. *Lancet* 364:1699-700.
- Gimenes C, Gimenes R, Rosa CM, Xavier NP, Campos DH, Fernandes AA, Cezar MD, Guirado GN, Cicogna AC, Takamoto AH, Okoshi MP, Okoshi K (2015). Low intensity physical exercise attenuates cardiac remodeling and myocardial oxidative stress and dysfunction in diabetic rats. *J Diabetes Res* 2015:457848.
- Gimenes R, Gimenes C, Rosa CM, Xavier NP, Campos DHS, Fernandes AAH, Cezar MDM, Guirado GN, Pagan LU, Chaer ID, Fernandes DC, Laurindo FR, Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K (2018). Influence of apocynin on cardiac remodeling in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* 17(1):15.
- Giustina AD, Danielski LG, Novochadlo MM, Goldim MPS, Joaquim L, Metzker KLL, Carli RJ, Denicol T, Cidreira T, Vieira T, Petronilho F (2019). Vitamin B6 reduces oxidative stress in lungs and liver in experimental sepsis. *An Acad Bras Cienc* 91(4):e20190434.

- Goldberger JJ, Arora R, Buckley U, Shivkumar K (2019). Autonomic nervous system dysfunction: JACC focus seminar. *J Am Coll Cardiol* 73(10):1189-1206.
- Gopcevic K, Rovcanin B, Kekic D, Krivokapic Z, Dragutinovic V (2017). Matrix metalloproteinase2 and -9, lactate and malate dehydrogenase and lipid peroxides in sera of patients with colorectal carcinoma. *Folia Biologica* 63:190-6
- Gordon JW, Shaw JA, Kirshenbaum LA (2011). Multiple facets of NF- κ B in the heart: to be or not to NF- κ B. *Circ Res* 108(9):1122-32.
- Gori T, Burstein JM, Ahmed S, Miner SE, Al-Hesayen A, Kelly S, Parker JD (2001). Folic acid prevents nitroglycerin-induced nitric oxide synthase dysfunction and nitrate tolerance: a human in vivo study. *Circulation* 104(10):1119-23.
- Gottmukkala RV, Lv H, Cornivelli L, Wagers AJ, Kwong RY, Bronson R, Stewart GC, Schulze PC, Chutkow W, Wolpert HA, Lee RT, Lipes MA (2012). Myocardial infarction triggers chronic cardiac autoimmunity in type 1 diabetes. *Sci Transl Med* 4:138ra80.
- Gowda S, Desai PB, Kulkarni SS, Hull VV, Math AA, Vernekar SN (2010). Markers of renal function tests. *N Am J Med Sci* 2(4):170-3.
- Goyal RK, Patel SS (2011). Cardioprotective effects of gallic acid in diabetes-induced myocardial dysfunction in rats. *Pharmacognosy Res* 3(4):239-45.
- Granchi C, Bertini S, Macchia M, Minutolo F (2010). Inhibitors of lactate dehydrogenase isoforms and their therapeutic potentials. *Curr Med Chem* 17(7):672-97.
- Green R, Miller JW (1999). Folate deficiency beyond megaloblastic anemia: hyperhomocysteinemia and other manifestations of dysfunctional folate status. *Semin Hematol* 36(1):47-64.
- Gupta A, Puri V, Sharma R, Puri S (2012). Folic acid induces acute renal failure (ARF) by enhancing renal prooxidant state. *Exp Toxicol Pathol* 64(3):225-32.
- Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM (2002). Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 105(14):1656-62.
- Gwarzo MY, Ahmadu JH, Ahmad MB, Dikko AU (2014). Serum glucose and malondialdehyde levels in alloxan induced diabetic rats supplemented with methanolic extract of *Tacazzea apiculata*. *Int J Biomed Sci* 10(4):236-42.
- Halliwell B (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344:721-4.
- Harjutsalo V, Sjoberg L, Tuomilehto J (2008). Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. *Lancet* 371:1777-82.
- Hatting M, Tavares CDJ, Sharabi K, Rines AK, Puigserver P (2018). Insulin regulation of gluconeogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1411(1):21-35.
- Hayden MR, Tyagi SC (2004). Homocysteine and reactive oxygen species in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atheroscleropathy: the pleiotropic effects of folate supplementation. *Nutr J* 3:4.
- Heller S, Buse J, Fisher M, Garg S, Marre M, Merker L, Renard E, Russell-Jones D, Philotheou A, Francisco AM, Pei H, Bode B; BEGIN Basal-Bolus Type 1 Trial Investigators (2012). Insulin degludec, an ultra-longacting basal insulin, versus insulin glargine in basal-bolus treatment with mealtime insulin aspart in type 1 diabetes (BEGIN Basal-Bolus Type 1): a phase 3, randomised, open-label, treat-to-target non-inferiority trial. *Lancet* 379:1489-97.
- Hellmann H, Mooney S (2010). Vitamin B6: a molecule for human health? *Molecules* 15(1):442-59.
- Henning SM, Swendseid ME, Ivandic BT, Liao F (1997). Vitamins C, E and A and heme oxygenase in rats fed methyl/folate-deficient diets. *Free Radic Biol Med* 23(6):936-42.

- Higashi-Okai K, Nagino H, Yamada K, Okai Y (2006). Antioxidant and prooxidant activities of B group vitamins in lipid peroxidation. *J UOEH* 28(4):359-68.
- Hirsch IB (2009). Clinical review: realistic expectations and practical use of continuous glucose monitoring for the endocrinologist. *J Clin Endocrinol Metab* 94:2232-8.
- Hobbs AJ, Ignarro LJ (1996). Nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system. *Methods Enzymol* 269:134-48.
- Hodgetts VA, Morris RK, Francis A, Gardosi J, Ismail KM (2015). Effectiveness of folic acid supplementation in pregnancy on reducing the risk of small-for-gestational age neonates: a population study, systematic review and meta-analysis. *BJOG* 122(4):478-90.
- Hoffman R (2014). Vascular endothelial dysfunction and nutritional compounds in early type 1 diabetes. *Curr Diabetes Rev* 10(3):201-7.
- Hollaar L, Van der Laarse A (1979). Interference of the measurement of lactate dehydrogenase (LDH) activity in human serum and plasma by LDH from blood cells. *Clin Chim Acta* 99(2):135-42.
- Hölscher ME, Bode C, Bugger H (2016). Diabetic cardiomyopathy: Does the Type of diabetes matter? *Int J Mol Sci* 17(12):2136.
- Holt RI, Cockram C, Flyvbjerg A, Goldstein BJ, editors (2011). *Textbook of diabetes*, Vol. 3. 4th ed. New York, John Wiley & Sons.
- Horn MA (2015). Cardiac physiology of aging: Extracellular considerations. *Compr Physiol* 5(3):1069-121.
- Hou J, Yan G, Liu B, Zhu B, Qiao Y, Wang D, Li R, Luo E, Tang C (2018). The protective effects of enalapril maleate and folic acid tablets against contrast-induced nephropathy in diabetic rats. *Biomed Res Int* 2018:4609750.
- Huang L, Teng T, Zhao J, Bian B, Yao W, Yu X, Wang Z, Xu Z, Sun Y (2018). The relationship between serum zinc levels, cardiac markers and the risk of acute myocardial infarction by zinc quartiles. *Heart Lung Circ* 27(1):66-72.
- Hustad S, Midttun Ø, Schneede J, Vollset SE, Grotmol T, Ueland PM (2007). The methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T polymorphism as a modulator of a B vitamin network with major effects on homocysteine metabolism. *Am J Hum Genet* 80:846-55.
- Hwang SY, Siow YL, Au-Yeung KK, House J, O K (2011). Folic acid supplementation inhibits NADPH oxidase-mediated superoxide anion production in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 300(1):F189-98.
- Hwang SY, Woo CW, Au-Yeung KK, Siow YL, Zhu TY, O K (2008). Homocysteine stimulates monocyte chemoattractant protein-1 expression in the kidney via nuclear factor-kappaB activation. *Am J Physiol Renal Physiol* 294(1):F236-44.
- Ichihara S, Noda A, Nagata K, Obata K, Xu J, Ichihara G, Oikawa S, Kawanishi S, Yamada Y, Yokota M (2006). Pravastatin increases survival and suppresses an increase in myocardial matrix metalloproteinase activity in a rat model of heart failure. *Cardiovasc Res* 69(3):726-35.
- Ihmann T, Liu J, Schwabe W, Häusler P, Behnke D, Bruch HP (2004). High-level mRNA quantification of proliferation marker pKi-67 is correlated with favorable prognosis in colorectal carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 130:749-56.
- Institute of Medicine (1998). *Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline*. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/6015>.
- International Expert Committee (2009). International expert committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 32:1327-34.

- Iqbal MP (2006). Hyperhomocysteinemia and coronary artery disease in Pakistan. *J Pak Med Assoc* 56:282-5.
- Israël M, Schwartz L (2011). The metabolic advantage of tumor cells. *Mol Cancer* 10:70.
- Itzhaki Ben Zadok O, Kornowski R, Goldenberg I, Klempfner R, Toledano Y, Biton Y, Fisman EZ, Tenenbaum A, Golovchiner G, Kadmon E, Omelchenko A, Gal TB, Barsheshet A (2017). Admission blood glucose and 10-year mortality among patients with or without pre-existing diabetes mellitus hospitalized with heart failure. *Cardiovasc Diabetol* 16:102.
- Jäidane H, Caloone D, Lobert PE, Sane F, Dardenne O, Naquet P, Gharbi J, Aouni M, Geenen V, Hober D (2012b). Persistent infection of thymic epithelial cells with coxsackievirus B4 results in decreased expression of type 2 insulin-like growth factor. *J Virol* 86(20):11151-62.
- Jäidane H, Sané F, Hiar R, Goffard A, Gharbi J, Geenen V, Hober D (2012a). Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: enterovirus, thymus and type 1 diabetes pathogenesis. *Clin Exp Immunol* 168(1):39-46.
- Jain R, Jain PK, Mangukiya K (2014). Study of serum amylase in the patients of type 2 diabetes mellitus. *IJSN* 5(3): 553-6.
- Jakovljevic Uzelac J, Djukic T, Mutavdzin S, Stankovic S, Labudovic Borovic M, Rakocevic J, Milic N, Savic Radojevic A, Vasic M, Japundzic Zigon N, Simic T, Djuric D (2020a). The influence of subchronic co-application of vitamins B6 and folic acid on cardiac oxidative stress and biochemical markers in monocrotaline-induced heart failure in male Wistar albino rats. *Can J Physiol Pharmacol* 98(2):93-102.
- Jakovljevic Uzelac J, Djukic T, Radic T, Mutavdzin S, Stankovic S, Rakocevic JK, Labudovic Borovic M, Milic N, Simic T, Savic-Radojevic A, Djuric D (2020b). Folic acid affects cardiometabolic, oxidative stress, and immunohistochemical parameters in monocrotaline-induced rat heart failure. *Can J Physiol Pharmacol* 98(10):708-16.
- Jamieson D, Chance B, Cadenas E, Boveris A (1986). The relation of free radical production to hyperoxia. *Annu Rev Physiol* 48:703-19.
- Janeway CA, Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ (2005). *Immunobiology*. 6th ed. London, UK: Garland Science.
- Jansson L, Eizirik DL, Pipeleers DG, Borg LA, Hellerstrom C, Andersson A (1995). Impairment of glucose-induced insulin secretion in human pancreatic islets transplanted to diabetic nude mice. *J Clin Invest* 96:721-6.
- Jayedi A, Zargar MS (2019). Intake of vitamin B6, folate, and vitamin B12 and risk of coronary heart disease: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Crit Rev Food Sci Nutr* 59(16):2697-707.
- Jederstrom G, Grasjo J, Nordin A, Sjöholm I, Andersson A (2005). Blood glucose-lowering activity of a hyaluronan-insulin complex after oral administration to rats with diabetes. *Diabetes Technol Ther* 7:948-57.
- Jenkins A, Januszewski A, O'Neal D (2019). The early detection of atherosclerosis in type 1 diabetes: why, how and what to do about it. *Cardiovasc Endocrinol Metab* 8(1):14-27.
- Jeon J, Park K (2019). Dietary vitamin B6 intake associated with a decreased risk of cardiovascular disease: A prospective cohort study. *Nutrients* 11(7):1484.
- Jia G, DeMarco VG, Sowers JR (2016). Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat Rev Endocrinol* 12:144-53.
- Jia G, Habibi J, Aroor AR, Hill MA, DeMarco VG, Lee LE, Ma L, Barron BJ, Whaley-Connell A, Sowers JR (2017). Enhanced endothelium epithelial sodium channel signaling prompts left ventricular diastolic dysfunction in obese female mice. *Metabolism* 78:69-79.

- Jia G, Hill MA, Sowers JR (2018). Diabetic cardiomyopathy: An update of mechanisms contributing to this clinical entity. *Circ Res* 122(4):624-38.
- Jin QR, Shim WS, Choi MK, Tian GY, Song IS, Yang SG, Kim DD, Chung SJ, Shim CK (2009). Decreased urinary secretion of belotecan in folic acid-induced acute renal failure rats due to down-regulation of Oat1 and Bcrp. *Xenobiotica* 39(10):711-21.
- Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol* 4:5.
- Jorns A, Gunther A, Hedrich HJ, Wedekind D, Tiedge M, Lenzen S (2005). Immune cell infiltration, cytokine expression, and beta-cell apoptosis during the development of type 1 diabetes in the spontaneously diabetic LEW.1AR1/Ztm-iddm rat. *Diabetes* 54:2041-52.
- Joshi R, Adhikari S, Patro BS, Chattopadhyay S, Mukherjee T (2001). Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 30(12):1390-9.
- Jun HS, Yoon JW (2003). A new look at viruses in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 19:8-31.
- Juvenile Diabetes Research Foundation Continuous Glucose Monitoring Study Group; Tamborlane WV, Beck RW, Bode BW, Buckingham B, Chase HP, Clemons R, Fiallo-Scharer R, Fox LA, Gilliam LK, Hirsch IB, Huang ES, Kollman C, Kowalski AJ, Laffel L, Lawrence JM, Lee J, Mauras N, O'Grady M, Ruedy KJ, Tansey M, Tsalikian E, Weinzimer S, Wilson DM, Wolpert H, Wysocki T, Xing D. (2008). Continuous glucose monitoring and intensive treatment of type 1 diabetes. *N Engl J Med* 359:1464-76.
- Juvenile Diabetes Research Foundation Continuous Glucose Monitoring Study Group (2010). Prolonged nocturnal hypoglycemia is common during 12 months of continuous glucose monitoring in children and adults with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 33:1004-8.
- Kahn HS, Morgan TM, Case LD, Dabelea D, Mayer-Davis EJ, Lawrence JM, Marcovina SM, Imperatore G (2009). Association of type 1 diabetes with month of birth among US youth: the SEARCH for Diabetes in Youth study. *Diabetes Care* 32:2010-5.
- Kalicki B, Lewicka A, Jęderka K, Leśniak M, Marszałkowska-Jakubik J, Lewicki S (2019). Vitamin B6 improves blood parameters in rats fed a protein-deficient diet and subjected to moderate, long-term exercise. *Cent Eur J Immunol* 44(1):23-32.
- Kaneto H, Matsuoka TA, Nakatani Y, Kawamori D, Matsuhisa M, Yamasaki Y (2005). Oxidative stress and the JNK pathway in diabetes. *Curr Diabetes Rev* 1(1):65-72.
- Kannan K, Jain SK (2004). Effect of vitamin B6 on oxygen radicals, mitochondrial membrane potential, and lipid peroxidation in H₂O₂-treated U937 monocytes. *Free Radic Biol Med* 36(4):423-8.
- Kannel WB, Hjortland M, Castelli WP (1974). Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. *Am J Cardiol* 34:29-34.
- Kashima S, Inoue K, Matsumoto M (2021). Low creatinine levels in diabetes mellitus among older individuals: the Yupart Medical Checkup Center Study. *Sci Rep* 11(1):15167.
- Kaufman S (1991). Some metabolic relationships between biopterin and folate: implications for the "methyl trap hypothesis". *Neurochem Res* 16:1031-6.
- Kayama Y, Raaz U, Jagger A, Adam M, Schellinger IN, Sakamoto M, Suzuki H, Toyama K, Spin JM, Tsao PS (2015). Diabetic cardiovascular disease induced by oxidative stress. *Int J Mol Sci* 16(10):25234-63.
- Kazarinoff MN, McCormick DB (1973). N-(5'-phospho-4'-pyridoxyl) amines as substrates for pyridoxine (pyridoxamine) 5'-phosphate oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 52:440-46.
- Keles M, Al B, Gumustekin K, Demircan B, Ozbey I, Akyuz M, Yilmaz A, Demir E, Uyanik A, Ziypak T, Taysi S (2010). Antioxidative status and lipid peroxidation in kidney tissue of rats fed with vitamin B(6)-deficient diet. *Ren Fail* 32(5):618-22.

- Kelly P, McPartlin J, Goggins M, Weir DG, Scott JM (1997). Unmetabolized folic acid in serum: acute studies in subjects consuming fortified food and supplements. *Am J Clin Nutr* 65(6):1790-5.
- Kelman Z (1997). PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* 14:629-40.
- Khan KM, Jialal I (2019). Folic Acid (Folate) Deficiency. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Kielgast U, Holst JJ, Madsbad S (2011). Antidiabetic actions of endogenous and exogenous GLP-1 in type 1 diabetic patients with and without residual beta-cell function. *Diabetes* 60:1599-607.
- Kim YI, Fawaz K, Knox T, Lee YM, Norton R, Libby E, Mason JB (2001). Colonic mucosal concentrations of folate are accurately predicted by blood measurements of folate status among individuals ingesting physiologic quantities of folate. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10(6):715-9.
- King AJ. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol.* 2012 Jun;166(3):877-94.
- Kjeldby IK, Fosnes GS, Ligaarden SC, Farup PG (2013). Vitamin B6 deficiency and diseases in elderly people--a study in nursing homes. *BMC Geriatr* 13:13.
- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG (1994). Quantitative zymography detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 218(2): 325-9.
- Kleinert M, Clemmensen C, Hofmann SM, Moore MC, Renner S, Woods SC, Huypens P, Beckers J, de Angelis MH, Schürmann A, Bakhti M, Klingenspor M, Heiman M, Cherrington AD, Ristow M, Lickert H, Wolf E, Havel PJ, Müller TD, Tschöp MH (2018). Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 14(3):140-62.
- Klerk M, Durga J, Schouten EG, Kluft C, Kok FJ, Verhoef P (2005). No effect of folic acid supplementation in the course of 1 year on haemostasis markers and C-reactive protein in older adults. *Thromb Haemost* 94(1):96-100.
- Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM; Diabetes Prevention Program Research Group (2002). Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346:393-403.
- Komatsu S, Watanabe H, Oka T, Tsuge H, Kat N (2002). Dietary vitamin B6 suppresses colon tumorigenesis, 8- hydroxyguanosine, 4-hydroxynonenal, and inducible nitric oxide synthase protein in azoxymethane-treated mice. *J Nutr Sci Vitaminol* 48:65-8.
- Konduracka E, Cieslik G, Galicka-Latala D, Rostoff P, Pietrucha A, Latacz P, Gajos G, Malecki MT, Nessler J (2013). Myocardial dysfunction and chronic heart failure in patients with long-lasting type 1 diabetes: a 7-year prospective cohort study. *Acta Diabetol* 50(4):597-606.
- Kopperschläger G, Kirchberger J (1996). Methods for the separation of lactate dehydrogenases and clinical significance of the enzyme. *J Chromatogr B Biomed Appl* 684(1-2):25-49.
- Koury MJ, Ponka P (2004). New insights into erythropoiesis: The roles of folate, vitamin B12, and iron. *Ann Rev Nutr* 24(1):105-31
- Krishnamurthy B, Dudek NL, McKenzie MD, Purcell AW, Brooks AG, Gellert S, Colman PG, Harrison LC, Lew AM, Thomas HE, Kay TW (2006). Responses against islet antigens in NOD mice are prevented by tolerance to proinsulin but not IGRP. *J Clin Invest* 116(12):3258-65.
- Kuga GK, Gaspar RC, Muñoz VR, Nakandakari SCBR, Breda L, Sandoval BM, Caetano FH, Leme JACA, Pauli JR, Gomes RJ (2018). Physical training reverses changes in hepatic mitochondrial diameter of Alloxan-induced diabetic rats. *Einstein (Sao Paulo)* 16(3):eAO4353.
- Kumar Rajagopal S, Manickam P, Periyasamy V, Namasivayam N (2003). Activity of *Cassia auriculata* leaf extract in rats with alcoholic liver injury. *J Nutr Biochem* 14(8):452-8.
- Kumrungsee T, Zhang P, Chartkul M, Yanaka N, Kato N (2020). Potential role of vitamin B6 in ameliorating the severity of COVID-19 and its complications. *Front Nutr* 7:562051.

- Kurosu T, Fukuda T, Miki T, Miura O (2003). BCL-6 overexpression prevents increase in reactive oxygen species and inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic reagents in B-cell lymphoma cells. *Oncogene* 22(29):4459-68.
- Kurt R, Yilmaz Y, Ermis F, Kalayoglu Besisik S, Polat N, Elitok A, Oflaz H, Karan MA (2010). Folic acid and vitamin B12 supplementation improves coronary flow reserve in elderly subjects with vitamin B12 deficiency. *Arch Med Res* 41(5):369-72.
- La Rocca G, Pucci-Minafra I, Marrazzo A, Taormina P, Minafra S (2004). Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast sera. *Br J Cancer* 90:1414-21.
- Laanpere M, Altmäe S, Stavreus-Evers A, Nilsson TK, Yngve A, Salumets A (1999). Folate-mediated one-carbon metabolism and its effect on female fertility and pregnancy viability. *Nutr Rev* 68(2):99-113.
- Latifi E, Mohammadpour AA, H BF, Nourani H (2019). Antidiabetic and antihyperlipidemic effects of ethanolic *Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin extract in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Biomed Pharmacother* 110:197-202.
- Lau DCW (2016). Diabetes in the elderly: a silent global tsunami. *Can J Diabetes* 40(1)2-3.
- Lazalde-Ramos BP, Zamora-Perez AL, Sosa-Macías M, Guerrero-Velázquez C, Zúñiga-González GM (2012). DNA and oxidative damages decrease after ingestion of folic acid in patients with type 2 diabetes. *Arch Med Res* 43(6):476-81.
- Lazo-de-la-Vega-Monroy M-L, Fernández-Mejía C (2013). Oxidative stress in diabetes mellitus and the role of vitamins with antioxidant actions. In: Morales-González JA, editor. *Oxidative stress and chronic degenerative diseases - a role for antioxidants*. London: IntechOpen; p, 209-32.
- Leask A, Abraham DJ (2004). TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J* 18: 816-27.
- Lebeche D, Davidoff AJ, Hajjar RJ (2008). Interplay between impaired calcium regulation and insulin signaling abnormalities in diabetic cardiomyopathy. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 5(11):715-24.
- Lee JH, Yang SH, Oh JM, Lee MG (2010). Pharmacokinetics of drugs in rats with diabetes mellitus induced by alloxan or streptozocin: comparison with those in patients with type I diabetes mellitus. *J Pharm Pharmacol* 62:1-23
- Lee M, Gardin JM, Lynch JC, Smith VE, Tracy RP, Savage PJ, Szklo M, Ward BJ (1997). Diabetes mellitus and echocardiographic left ventricular function in free-living elderly men and women: The Cardiovascular Health Study. *Am Heart J* 133:36-43.
- Lee SJ, Kang JG, Ryu OH, Kim CS, Ihm SH, Choi MG, Yoo HJ, Kim DS, Kim TW (2009). Effects of alpha-lipoic acid on transforming growth factor beta1-p38 mitogen-activated protein kinase-fibronectin pathway in diabetic nephropathy. *Metabolism* 58:616-23.
- Leiter EH, Schile A (2013). Genetic and pharmacologic models for type 1 diabetes. *Curr Protoc Mouse Biol* 3(1):9-19.
- Leklem JE, Hollenbeck CB (1990). Acute ingestion of glucose decreases plasma pyridoxal 5'-phosphate and total vitamin B-6 concentration. *Am J Clin Nutr* 51(5):832-6.
- Lenzen S (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51(2):216-26.
- Lenzen S, Tiedge M, Elsner M, Lortz S, Weiss H, Jörns A, Klöppel G, Wedekind D, Prokop CM, Hedrich HJ (2001). The LEW.1AR1/Ztm-iddm rat: a new model of spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 44(9):1189-96.
- Leslie RD (2010). Predicting adult-onset autoimmune diabetes: clarity from complexity. *Diabetes* 59:330-1.

- Li JM, Poolman RA, Brooks G (1998). Role of G1 phase cyclins and cyclin-dependent kinases during cardiomyocyte hypertrophic growth in rats. *Am J Physiol* 275(3):H814-22.
- Li S, Zhang L, Zhu G, Feng R, Zhou J, Jing Z (2021). Diabetes mellitus lowers the risk of aortic dissection: a systematic review and meta-analysis. *Ann Vasc Surg* 74:209-19.
- Li YW, Aronow WS (2011). Diabetes mellitus and cardiovascular disease. *J Clin Exp Heart* 2:2.
- Like AA, Rossini AA (1976). Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* 193:415-7
- Lim CP, Loo AV, Khaw KW, Sthaneshwar P, Khang TF, Hassan M, Subrayan V (2012). Plasma, aqueous and vitreous homocysteine levels in proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 96(5):704-7.
- Lin Y, Tang Y, Wang F (2016). The protective effect of hif-1 α in T lymphocytes on cardiac damage in diabetic mice. *Ann Clin Lab Sci* 46(1):32-43.
- Lind M, Bounias I, Olsson M, Gudbjornsdottir S, Svensson AM, Rosengren A (2011). Glycaemic control and incidence of heart failure in 20,985 patients with type 1 diabetes: an observational study. *Lancet* 378:140-6.
- Lipinski B (2001). Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 15(4):203-10.
- Long P, Liu X, Li J, He S, Chen H, Yuan Y, Qiu G, Yu K, Liu K, Jiang J, Yang H, Xu C, Zhang X, He M, Guo H, Liang L, Hu FB, Wu T, Pan A (2020). Circulating folate concentrations and risk of coronary artery disease: a prospective cohort study in Chinese adults and a Mendelian randomization analysis. *Am J Clin Nutr* 111(3):635-43.
- Lopes RD, Neves LB, D'Almeida V, Conceição GM, Gabriel A Jr (2007). Total plasmatic homocysteine and von Willebrand factor in experimental diabetes mellitus. *Arq Bras Cardiol* 88(4):424-9.
- Lossos IS, Intrator O, Berkman N, Breuer R (1999). Lactate dehydrogenase isoenzyme analysis for the diagnosis of pleural effusion in haemato-oncological patients. *Respir Med* 93(5):338-41.
- Lucock M (2000). Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol Genet Metab* 71:121-38.
- Lukic ML, Stosic-Grujicic S, Shahin A (1998). Effector mechanisms in low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Dev Immunol* 6:119-28.
- Maahs DM, West NA, Lawrence JM, Mayer-Davis EJ (2010). Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 39:481-97.
- Mahadev K, Motoshima H, Wu X, Ruddy JM, Arnold RS, Cheng G, Lambeth JD, Goldstein BJ (2004). The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. *Mol Cell Biol* 24(5):1844-54.
- Mahfouz MM, Zhou SQ, Kummerow FA (2009). Vitamin B6 compounds are capable of reducing the superoxide radical and lipid peroxide levels induced by H₂O₂ in vascular endothelial cells in culture. *Int J Vitam Nutr Res* 79 (4): 218-29.
- Makhlouf L, Duvivier-Kali VF, Bonner-Weir S, Dieperink H, Weir GC, Sayegh MH (2003). Importance of hyperglycemia on the primary function of allogeneic islet transplants. *Transplantation* 76:657-64.
- Makowski GS, Ramsby ML (1996). Calibrating gelatin zymograms with human gelatinase standards. *Anal Biochem* 236:353-6.
- Malaguarnera G, Gagliano C, Salomone S, Giordano M, Bucolo C, Pappalardo A, Drago F, Caraci F, Avitabile T, Motta M (2015). Folate status in type 2 diabetic patients with and without retinopathy. *Clin Ophthalmol* 9:1437-42.

- Malhotra A, Sanghi V (1997). Regulation of contractile proteins in diabetic heart. *Cardiovasc Res* 34:34-40.
- Mangoni AA, Sherwood RA, Asonganyi B, Swift CG, Thomas S, Jackson SH (2005). Short-term oral folic acid supplementation enhances endothelial function in patients with type 2 diabetes. *Am J Hypertens* 18(2 Pt 1):220-6.
- Mansouri S, Shahriari A, Kalantar H, Moini Zanjani T, Haghi Karamallah M (2017). Role of malate dehydrogenase in facilitating lactate dehydrogenase to support the glycolysis pathway in tumors. *Biomed Rep* 6(4):463-467.
- Mao X, Xing X, Xu R, Gong Q, He Y, Li S, Wang H, Liu C, Ding X, Na R, Liu Z, Qu Y (2016). Folic acid and vitamins D and B12 correlate with homocysteine in chinese patients with type-2 diabetes mellitus, hypertension, or cardiovascular disease. *Medicine (Baltimore)* 95(6):e2652.
- Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 17(1):24-38.
- Marso SP, Bain SC, Consoli A, Eliaschewitz FG, Jodar E, Leiter LA, Lingvay I, Rosenstock J, Seufert J, Warren ML, Woo V, Hansen O, Holst AG, Pettersson J, Vilsbøll T; SUSTAIN-6 Investigators (2016b). Semaglutide and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 375:1834-44.
- Marso SP, Daniels GH, Brown-Frandsen K, Kristensen P, Mann JF, Nauck MA, Nissen SE, Pocock S, Poulter NR, Ravn LS, Steinberg WM, Stockner M, Zinman B, Bergenstal RM, Buse JB; LEADER Steering Committee; LEADER Trial Investigators (2016a). Liraglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 375:311-22.
- Martinez M, Cuskelly GJ, Williamson J, Toth JP, Gregory JF 3rd (2000). Vitamin B-6 deficiency in rats reduces hepatic serine hydroxymethyltransferase and cystathionine beta-synthase activities and rates of in vivo protein turnover, homocysteine remethylation and transsulfuration. *J Nutr* 130:1115-23.
- Martín-Gallán P, Carrascosa A, Gussinyé M, Domínguez C (2003). Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radic Biol Med* 34(12):1563-74.
- Martins-Oliveira A, Castro MM, Oliveira DM, Rizzi E, Ceron CS, Guimaraes D, Reis RI, Costa-Neto CM, Casarini DE, Ribeiro AA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE (2013). Contrasting effects of aliskiren versus losartan on hypertensive vascular remodeling. *Int J Cardiol* 167:1199-205.
- Maschirow L, Khalaf K, Al-Aubaidy HA, Jelinek HF (2015). Inflammation, coagulation, endothelial dysfunction and oxidative stress in prediabetes-biomarkers as a possible tool for early disease detection for rural screening. *Clin Biochem* 48(9):581-5.
- Massi-Benedetti M; CODE-2 Advisory Board (2002). The cost of diabetes type II in Europe: the CODE-2 study. *Diabetologia* 45(7):S1-4.
- Masters SL, Latz E, O'Neill LA (2011). The inflammasome in atherosclerosis and type 2 diabetes. *Sci Transl Med* 3(81):81ps17.
- Mateoiu C, Pirici A, Bogdan F (2011). Immunohistochemical nuclear staining for p53, PCNA, Ki-67 and BCL-2 in different histologic variants of basal cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol* 52:315-9.
- Matsumoto S (2011). Autologous islet cell transplantation to prevent surgical diabetes. *J Diabetes* 3:328-36.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28(7):412-9.

- Matull WR, Pereira SP, O'Donohue JW (2006). Biochemical markers of acute pancreatitis. *J Clin Pathol* 59(4):340-344.
- Matxain JM, Padro D, Ristilä M, Strid A, Eriksson LA (2009). Evidence of high *OH radical quenching efficiency by vitamin B6. *J Phys Chem B* 113(29):9629-32.
- Matxain JM, Ristilä M, Strid A, Eriksson LA (2006). Theoretical study of the antioxidant properties of pyridoxine. *J Phys Chem A* 110(48):13068-72.
- Mátyás C, Kovács A, Németh BT, Oláh A, Braun S, Tokodi M, Barta BA, Benke K, Ruppert M, Lakatos BK, Merkely B, Radovits T (2018). Comparison of speckle-tracking echocardiography with invasive hemodynamics for the detection of characteristic cardiac dysfunction in type-1 and type-2 diabetic rat models. *Cardiovasc Diabetol* 17(1):13.
- McDonald LJ, Murad F (1996). Nitric oxide and cyclic GMP signaling. *Proc Soc Exp Biol Med* 211(1):1-6.
- Meigs JB (2010). Epidemiology of type 2 diabetes and cardiovascular disease: translation from population to prevention: the Kelly West award lecture 2009. *Diabetes Care* 33(8):1865-71.
- Melendez-Ramirez LY, Richards RJ, Cefalu WT (2010). Complications of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 39:625-40.
- Middleton HM III (1977). Uptake of pyridoxine-HCl by the rat jejunal mucosa in vitro. *J Nutr* 107:126-31.
- Mierzecki A, Kłoda K, Jastrzębska M, Chełstowski K, Honczarenko K, Kozłowska-Wojciechowska M, Naruszewicz M (2012). Is there an effect of folic acid supplementation on the coagulation factors and C-reactive protein concentrations in subjects with atherosclerosis risk factors? *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 66:696-701.
- Mighell A (1995). PCNA and p53. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 31B:403-4.
- Mikkelsen K, Prakash MD, Kuol N, Nurgali K, Stojanovska L, Apostolopoulos V (2019). Anti-tumor effects of vitamin B2, B6 and B9 in promonocytic lymphoma cells. *Int J Mol Sci* 20(15):3763.
- Min JJ, Shin BS, Lee JH, Jeon Y, Ryu DK, Kim S, Shin YH (2018). Effects of pravastatin on type 1 diabetic rat heart with or without blood glycemetic control. *J Diabetes Res* 2018:1067853.
- Mishra N, Singh N (2013). Blood viscosity, lipid profile, and lipid peroxidation in type-1 diabetic patients with good and poor glycemetic control. *N Am J Med Sci* 5(9):562-6.
- Mishra PK, Givvimani S, Chavali V, Tyagi SC (2013). Cardiac matrix: a clue for future therapy. *Biochim Biophys Acta* 1832(12):2271-6.
- Misra HP, Fridovich I (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247(10):3170-5.
- Moat SJ, Madhavan A, Taylor SY, Payne N, Allen RH, Stabler SP, Goodfellow J, McDowell IF, Lewis MJ, Lang D (2006). High- but not low-dose folic acid improves endothelial function in coronary artery disease. *Eur J Clin Invest* 36(12):850-9.
- Mocellin S, Briarava M, Pilati P (2017). Vitamin B6 and cancer risk: A field synopsis and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 109(3):1-9.
- Mochizuki K, Shimada M, Tanaka Y, Fukaya N, Goda T (2010). Reduced expression of β 2 integrin genes in rat peripheral leukocytes by inhibiting postprandial hyperglycemia. *Biosci Biotechnol Biochem* 74(12):2470-4.
- Moltchanova EV, Schreier N, Lammi N, Karvonen M (2009). Seasonal variation of diagnosis of type 1 diabetes mellitus in children worldwide. *Diabet Med* 26:673-8.
- Mönch S, Netzel M, Netzel G, Ott U, Frank T, Rychlik M (2015). Folate bioavailability from foods rich in folates assessed in a short term human study using stable isotope dilution assays. *Food Funct* 6(1):242-8.

- Mordes JP, Bortell R, Blankenhorn EP, Rossini AA, Greiner DL (2004). Rat models of type 1 diabetes: Genetics, environment, and autoimmunity. *ILAR J* 45:278-91.
- Morgan SL, Baggott JE (2006). Anemias. In: Heimbürger DC, Ard JD, editors. *Handbook of clinical nutrition*. 4th ed. St. Louis: Mosby. p. 523-40.
- Murad F (1999). Cellular signaling with nitric oxide and cyclic GMP. *Braz J Med Biol Res* 32(11):1317-27.
- Murdoch CE, Chaubey S, Zeng L, Yu B, Ivetic A, Walker SJ, Vanhoutte D, Heymans S, Grieve DJ, Cave AC, Brewer AC, Zhang M, Shah AM (2014). Endothelial NADPH oxidase-2 promotes interstitial cardiac fibrosis and diastolic dysfunction through proinflammatory effects and endothelial-mesenchymal transition. *Journal of the American College of Cardiology* 63:2734-41.
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (2003). *Harper's illustrated biochemistry*. 26th ed. New York: McGraw-Hill.
- Mutavdžin S, Gopcevic K, Stankovic S, Jakovljevic Uzelac J, Labudovic Borovic M, Djuric D (2019a). The effects of folic acid administration on cardiac oxidative stress and cardiovascular biomarkers in diabetic rats. *Oxid Med Cell Longev* 2019:1342549.
- Mutavdžin S, Gopcevic K, Stankovic S, Jakovljevic Uzelac J, Labudovic Borovic M, Djuric D (2019b). The effect of folic acid administration on cardiac tissue matrix metalloproteinase activity and hepatorenal biomarkers in diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol* 97(9):893-901.
- Mutavdžin SS, Djuric DM (2020). Homocysteine and related B vitamins in pre-diabetes and diabetes mellitus. In: Tappia PS, Bhullar SK, Dhalla NS, editors. *Biochemistry of cardiovascular dysfunction in obesity*. Springer International Publishing, Cham. p. 329-51.
- Nakamura M, Sadoshima J (2018). Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol* 15(7):387-407.
- Nakamura S, Li H, Adijiang A, Pischetsrieder M, Niwa T (2007). Pyridoxal phosphate prevents progression of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 22(8):2165-74.
- Nakano E, Higgins JA, Powers HJ (2001). Folate protects against oxidative modification of human LDL. *Br J Nutr* 86:637-9.
- Nakayama M, Abiru N, Moriyama H, Babaya N, Liu E, Miao D, Yu L, Wegmann DR, Hutton JC, Elliott JF, Eisenbarth GS (2005). Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature* 435(7039):220-3.
- Näntö-Salonen K, Kupila A, Simell S, Siljander H, Salonsaari T, Hekkala A, Korhonen S, Erkkola R, Sipilä JI, Haavisto L, Siltala M, Tuominen J, Hakalax J, Hyöty H, Ilonen J, Veijola R, Simell T, Knip M, Simell O (2008). Nasal insulin to prevent type 1 diabetes in children with HLA genotypes and autoantibodies conferring increased risk of disease: a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 372:1746-55.
- Nasri R, Abdelhedi O, Jemil I, Ben Amor I, Elfeki A, Gargouri J, Boualga A, Karra-Chaabouni M, Nasri M (2018). Preventive effect of goby fish protein hydrolysates on hyperlipidemia and cardiovascular disease in Wistar rats fed a high-fat/fructose diet. *RSC Advances* 8(17):9383-93.
- Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, Raskin P, Zinman B; Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study Research Group (2005). Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med* 353:2643-53.
- National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem compound summary for CID 135398658, Folic acid. Preuzeto 16. januara 2022 sa <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Folic-acid>.

- National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem compound summary for CID 135761165, Folate(2-). Preuzeto 16. januara 2022 sa https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Folate_2.
- National Research Council (US) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition (1995). Nutrient requirements of laboratory animals. 4th rev ed. Washington, DC: National Academies Press
- Naviaux RK (2012). Oxidative shielding or oxidative stress? *J Pharmacol Exp Ther* 342(3):608-18.
- Nayanatara AK, Tripathi Y, Nagaraja HS, Jeganathan PS, Ramaswamy C, Ganaraja B, Pai SR, Kamath A (2012). Effect of chronic immobilization stress on some selected physiological, biochemical and lipid parameters in Wistar albino rats. *Res J Pharm Biol Chem Sci* 3(1):34-42
- Nazki FH, Sameer AS, Ganaie BA (2014). Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene* 533(1):11-20.
- Nemoto O, Kawaguchi M, Yaoita H, Miyake K, Maehara K, Maruyama Y (2006). Left ventricular dysfunction and remodeling in streptozotocin-induced diabetic rats. *Circ J* 70(3):327-34.
- Ni R, Cao T, Xiong S, Ma J, Fan GC, Laceyfield JC, Lu Y, Le Tissier S, Peng T (2016). Therapeutic inhibition of mitochondrial reactive oxygen species with mito-TEMPO reduces diabetic cardiomyopathy. *Free Radic Biol Med* 90:12-23.
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404(6779):787-90.
- Nix WA, Zirwes R, Bangert V, Kaiser RP, Schilling M, Hostalek U, Obeid R (2015). Vitamin B status in patients with type 2 diabetes mellitus with and without incipient nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract* 107(1):157-65.
- Noguchi N, Okimoto Y, Cynshi O, Kodama T, Niki E (1998). Inhibition of oxidative modification of low density lipoprotein by novel antioxidant BO-653 prepared by theoretical design. In: Paker L, Ong ASH, editors. *Biological oxidants and antioxidants*. Champaign:AOCs Press; p. 139 - 52.
- Norton GR, Candy G, Woodiwiss AJ (1996). Aminoguanidine prevents the decreased myocardial compliance produced by streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. *Circulation* 93(10):1905-12.
- Novoyatleva T, Diehl F, van Amerongen MJ, Patra C, Ferrazzi F, Bellazzi R, Engel FB (2010). TWEAK is a positive regulator of cardiomyocyte proliferation. *Cardiovasc Res* 85: 681-90.
- Nunoda S, Genda A, Sugihara N, Nakayama A, Mizuno S, Takeda R (1985). Quantitative approach to the histopathology of the biopsied right ventricular myocardium in patients with diabetes mellitus. *Heart Vessels* 1(1):43-7.
- Odewole OA, Williamson RS, Zakai NA (2013). Near-elimination of folate-deficiency anemia by mandatory folic acid fortification in older US adults: reasons for geographic and racial differences in stroke study 2003-2007. *Am J Clin Nutr* 98(4):1042-7.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.
- Ohta BK, Foote CS (2002). Characterization of endoperoxide and hydroperoxide intermediates in the reaction of pyridoxine with singlet oxygen. *J Am Chem Soc* 124(41):12064-5.
- Oka S, Uramoto H, Shimokawa H, Iwanami T, Tanaka F (2011). The expression of Ki-67, but not proliferating cell nuclear antigen, predicts poor disease free survival in patients with adenocarcinoma of the lung. *Anticancer Res* 31:4277-82.
- Okada M, Ishikawa K, Watanabe K (1997). Effect of vitamin B6 deficiency on glycogen metabolism in the skeletal muscle, heart, and liver of rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 37:349-57.
- Oral EA (2012). Leptin for type 1 diabetes: coming onto stage to be (or not?) *Pediatr Diabetes* 13:68-73.

- Orban T, Bundy B, Becker DJ, DiMeglio LA, Gitelman SE, Goland R, Gottlieb PA, Greenbaum CJ, Marks JB, Monzavi R, Moran A, Raskin P, Rodriguez H, Russell WE, Schatz D, Wherrett D, Wilson DM, Krischer JP, Skyler JS; Type 1 Diabetes TrialNet Abatacept Study Group (2011). Co-stimulation modulation with abatacept in patients with recent-onset type 1 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 378:412-19.
- Orchard TJ, Costacou T, Kretowski A, Nesto RW (2006). Type 1 diabetes and coronary artery disease. *Diabetes Care* 29:2528-38.
- Ostapiv RD, Humenyuk SL, Manko VV (2015). Activity and isozyme content of lactate dehydrogenase under long-term oral taurine administration to rats. *Ukr Biochem J* 87(4):54-62.
- Ostman J, Lönnberg G, Arnqvist HJ, Blohmé G, Bolinder J, Ekblom Schnell A, Eriksson JW, Gudbjörnsdóttir S, Sundkvist G, Nyström L (2008). Gender differences and temporal variation in the incidence of type 1 diabetes: Results of 8012 cases in the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden 1983-2002. *J Intern Med* 263:386-94.
- Ottavio L, Chang CD, Rizzo MG, Travali S, Casadevall C, Baserga R (1990). Importance of introns in the growth regulation of mRNA levels of the proliferating cell nuclear antigen gene. *Mol Cell Biol* 10(1):303-9.
- Palmeira CM, Santos D L, Seica R, Moreno A, Santos M (2001). Enhanced mitochondrial testicular antioxidant capacity in Goto-Kakizaki diabetic rats: role of coenzyme Q. *Am J Physiol Cell Physiol* 281(3):C1023-C1028.
- Pancharuniti N, Lewis CA, Sauberlich HE, Perkins LL, Go RC, Alvarez JO, Macaluso M, Acton RT, Copeland RB, Cousins AL, Gore TB, Cornwell PE, Roseman JM (1994). Plasma homocyst(e)ine, folate, and vitamin B-12 concentrations and risk for early-onset coronary artery disease. *Am J Clin Nutr* 59(4):940-8.
- Pappachan JM, Varughese GI, Sriraman R, Arunagirinathan G (2013). Diabetic cardiomyopathy: Pathophysiology, diagnostic evaluation and management. *World J Diabetes* 4(5):177-89.
- Parker L (2014). The impact of the environment on cancer genomics. In: Dellaire G, Berman JN, Arceci RJ, editors. *Cancer genomics*. Massachusetts:Academic Press. p. 449-65.
- Parra M, Stahl S, Hellmann H (2018). Vitamin B6 and its role in cell metabolism and physiology. *Cells* 7(7):84.
- Partearroyo T, Pérez-Miguelsanz J, Peña-Melián Á, Maestro-de Las-Casas C, Úbeda N, Varela-Moreiras G (2016). Low and high dietary folic acid levels perturb postnatal cerebellar morphology in growing rats. *Br J Nutr* 115(11):1967-77.
- Paschou SA, Papadopoulou-Marketou N, Chrousos GP, Kanaka-Gantenbein C (2018). On type 1 diabetes mellitus pathogenesis. *Endocr Connect* 7(1):R38-R46.
- Paschou SA, Petsiou A, Chatzianni K, Tsatsoulis A, Papadopoulos GK (2014). Type 1 diabetes as an autoimmune disease: the evidence. *Diabetologia* 57 1500-1.
- Patel H, Chen J, Das KC, Kavdia M (2013). Hyperglycemia induces differential change in oxidative stress at gene expression and functional levels in HUVEC and HMVEC. *Cardiovasc Diabetol* 12:142.
- Patel VB, Robbins MA, Topol EJ (2001). C-reactive protein: a “golden marker” for inflammation and coronary artery disease. *Cleve Clin J Med* 68:521-4.
- Patlolla AK, Barnes C, Yedjou C, Velma VR, Tchounwou PB (2009). Oxidative stress, DNA damage, and antioxidant enzyme activity induced by hexavalent chromium in Sprague-Dawley rats. *Environ Toxicol* 24(1):66-73.

- Patterson CC, Dahlquist GG, Gyürüs E, Green A, Soltész G; EURODIAB Study Group (2009). Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet* 373:2027-33.
- Peluso MR (2006). Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase, and modulate lipid homeostasis in adipose tissue and liver. *Exp Biol Med (Maywood)* 231(8):1287-99.
- Penckofer S, Schwertz D, Florczak K (2002). Oxidative stress and cardiovascular disease in type 2 diabetes: the role of antioxidants and pro-oxidants. *J Cardiovasc Nurs* 16:68-85.
- Petrovic M, Zivkovic S, Velinovic M, Colović M, Krstic M, Djuric D (2009). Folic acid effects on the acetyl cholinesterase activities in different tissues of a rat. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research* 10(3): 85-88.
- Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci* 4(2):89-96.
- Phillips M, Cataneo RN, Cheema T, Greenberg J (2004). Increased breath biomarkers of oxidative stress in diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 344(1-2):189-94.
- Pickup JC (2012). Insulin-pump therapy for type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 366:1616-24.
- Piconi L, Quagliario L, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, Zuodar G, Ceriello A (2006). Constant and intermittent high glucose enhances endothelial cell apoptosis through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes Metab Res Rev* 22(3):198-203.
- Podar T, Solntsev A, Karvonen M, Padaiga Z, Brigis G, Urbonaite B, Viik-Kajander M, Reunanen A, Tuomilehto J (2001). Increasing incidence of childhood-onset type I diabetes in 3 Baltic countries and Finland 1983-1998. *Diabetologia* 44(suppl 3):17-20.
- Polizzi FC, Andican G, Çetin E, Civelek S, Yumuk V, Burçak G (2012). Increased DNA-glycation in type 2 diabetic patients: the effect of thiamine and pyridoxine therapy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 120(6):329-34.
- Pollack PS, Malhotra A, Fein FS, Scheuer J (1986). Effects of diabetes on cardiac contractile proteins in rabbits and reversal with insulin. *Am J Physiol* 251:H448-54.
- Pop-Busui R, Roberts L, Pennathur S, Kretzler M, Brosius FC, Feldman EL (2010). The management of diabetic neuropathy in CKD. *Am J Kidney Dis* 55(2):365-85.
- Popov VN, Volvenkin SV, Kosmatykh TA, Suad A, Schnarrenberger C, Eprintcev AT (2001). Induction of a peroxisomal malate dehydrogenase isoform in liver of starved rats. *Biochemistry (Mosc)* 66(5):496-501.
- Prabhu SD (2004). Cytokine-induced modulation of cardiac function. *Circ Res* 95(12):1140-53.
- Prabhu SD, Frangogiannis NG (2016). The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res* 119(1):91-112.
- Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM (2001). C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 286:327-34.
- Pronobesh C, Dagagi AV, Pallab C, Kumar WA (2008). Protective role of the calcium channel blocker amlodipine against mitochondrial injury in ischemia and reperfusion injury of rat liver. *Acta Pharm* 58(4):421-8.
- Pullin CH, Ashfield-Watt PA, Burr ML, Clark ZE, Lewis MJ, Moat SJ, Newcombe RG, Powers HJ, Whiting JM, McDowell IF (2001). Optimization of dietary folate or low-dose folic acid supplements lower homocysteine but do not enhance endothelial function in healthy adults, irrespective of the methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) genotype. *J Am Coll Cardiol* 38(7):1799-805.
- Qian B, Shen S, Zhang J, Jing P (2017). Effects of vitamin B6 deficiency on the composition and functional potential of T cell populations. *J Immunol Res* 2017:2197975.

- Rabadiya S, Bhadada S, Dudhrejiya A, Vaishnav D, Patel B (2018). Magnesium valproate ameliorates type 1 diabetes and cardiomyopathy in diabetic rats through estrogen receptors. *Biomed Pharmacother* 97:919-927.
- Radak Z, Chung HY, Goto S (2005). Exercise and hormesis: oxidative stress-related adaptation for successful aging. *Biogerontology* 6(1):71-5.
- Radenkovic S, Milosevic Z, Konjevic G, Karadzic K, Rovcanin B, Buta M, Gopcevic K, Jurisic V (2013). Lactate dehydrogenase, catalase, and superoxide dismutase in tumor tissue of breast cancer patients in respect to mammographic findings. *Cell Biochem Biophys* 66(2):287-95.
- Radovits T, Korkmaz S, Loganathan S, Barnucz E, Bömicke T, Arif R, Karck M, Szabó G (2009). Comparative investigation of the left ventricular pressure-volume relationship in rat models of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297(1):H125-33.
- Raev DC (1994). Which left ventricular function is impaired earlier in the evolution of diabetic cardiomyopathy? An echocardiographic study of young type I diabetic patients. *Diabetes Care* 17(7):633-9.
- Raffort J, Lareyre F, Clément M, Hassen-Khodja R, Chinetti G, Mallat Z (2018). Diabetes and aortic aneurysm: current state of the art. *Cardiovasc Res* 114(13):1702-13.
- Rains JL, Jain SK (2011). Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med* 50(5):567-75.
- Raman CS, Li H, Martásek P, Král V, Masters BS, Poulos TL (1998). Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell* 95(7):939-50.
- Ramos MI, Allen LH, Mungas DM, Jagust WJ, Haan MN, Green R, Miller JW (2005). Low folate status is associated with impaired cognitive function and dementia in the Sacramento Area Latino Study on aging. *Am J Clin Nutr* 82(6):1346-52.
- Rasic-Markovic A, Hrcic D, Krstic D, Colovic M, Djuric E, Rankov-Petrovic B, Susic V, Stanojlovic O, Djuric D (2016). The effect of subchronic supplementation with folic acid and l-arginine on homocysteine-induced seizures. *Can J Physiol Pharmacol* 94(10):1083-9.
- Redondo MJ, Rewers M, Yu L, Garg S, Pilcher CC, Elliott RB, Eisenbarth GS (1999). Genetic determination of islet cell autoimmunity in monozygotic twin, dizygotic twin, and non-twin siblings of patients with type 1 diabetes: prospective twin study. *BMJ* 318(7185):698-702.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123(11):1939-51.
- Reid AE (2006). Non-alcoholic fatty liver disease. In: Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ, editors. *Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology/diagnosis/management*. 8th ed. St. Louis: Saunders. p. 1772-99.
- Rhodes CJ (2005). Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* 307(5708):380-4.
- Riaz S (2014). Evaluation and analysis of human folate levels in Pakistani diabetic population. *Int J Sci Eng Res* 5(12):1572-6.
- Riehle C, Bauersachs J (2018). Of mice and men: models and mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* 114(1):2.
- Ripa S, Ripa R, Giustiniani S (1998). Are failed cardiomyopathies a zinc-deficit related disease? A study on Zn and Cu in patients with chronic failed dilated and hypertrophic cardiomyopathies. *Minerva Med* 89(11-12):397-403.
- Rittner D, Bailey RA (2005). *Encyclopedia of chemistry (Science encyclopedia)*.

- Rizzo MA, Piston DW (2003). Regulation of beta cell glucokinase by S-nitrosylation and association with nitric oxide synthase. *J Cell Biol* 161(2):243-8.
- Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H (2003). Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* 52(3):581-7.
- Robinson K, Arheart K, Refsum H, Brattström L, Boers G, Ueland P, Rubba P, Palma-Reis R, Meleady R, Daly L, Witteman J, Graham I (1998). Low circulating folate and vitamin B6 concentrations: risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease. *Circulation* 97:437-443.
- Rodriguez WE, Joshua IG, Falcone JC, Tyagi SC (2006). Pioglitazone prevents cardiac remodeling in high-fat, high-calorie-induced Type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(1):H81-7.
- Romeo JH, Seftel AD, Madhun ZT, Aron DC (2000). Sexual function in men with diabetes type 2: association with glycemic control. *J Urol* 163:788-91.
- Rony KA, Ajith TA, Kuttikadan TA, Blaze R, Janardhanan KK (2017). Phellinus rimosus improves mitochondrial energy status and attenuates nephrotoxicity in diabetic rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 28(5):455-61.
- Rorsman F, Husebye ES, Winqvist O, Bjork E, Karlsson FA, Kampe O (1995). Aromatic L-amino-acid decarboxylase, a pyridoxal phosphate-dependent enzyme, is a beta-cell autoantigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8626-9
- Rosa CM, Gimenes R, Campos DH, Guirado GN, Gimenes C, Fernandes AA, Cicogna AC, Queiroz RM, Falcão-Pires I, Miranda-Silva D, Rodrigues P, Laurindo FR, Fernandes DC, Correa CR, Okoshi MP, Okoshi K (2016). Apocynin influence on oxidative stress and cardiac remodeling of spontaneously hypertensive rats with diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* 15(1):126.
- Rosa JC, Mendes R, Filipe MI, Morris RW (1992). Measurement of cell proliferation in gastric carcinoma: comparative analysis of Ki-67 and proliferative cell nuclear antigen (PCNA). *Histochem J* 24(2):93-101.
- Rouet-Benzineb P, Buhler JM, Dreyfus P, Delcourt A, Dorent R, Perennec J, Crozatier B, Harf A, Lafuma C (1999). Altered balance between matrix gelatinases (MMP-2 and MMP-9) and their tissue inhibitors in human dilated cardiomyopathy: potential role of MMP-9 in myosin-heavy chain degradation. *Eur J Heart Fail* (4):337-52.
- Rubí B. (2012). Pyridoxal 5'-phosphate (PLP) deficiency might contribute to the onset of type I diabetes. *Med Hypotheses* 78(1):179-82.
- Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Branwood AW, Grishman A (1972). New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol* 30(6):595-602.
- Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, Lakey JR, Shapiro AM (2005). Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 54:2060-9.
- Ryan G, Briscoe TA, Jobe L (2009). Review of pramlintide as adjunctive therapy in treatment of type 1 and type 2 diabetes. *Drug Des Devel Ther* 2:203-14.
- Saeed MK, Deng Y, Dai R (2008). Attenuation of biochemical parameters in streptozotocin-induced diabetic rats by oral administration of extracts and fractions of *Cephalotaxus sinensis*. *J Clin Biochem Nutr* 42(1):21-8.
- Sakakeeny L, Roubenoff R, Obin M (2012). Plasma pyridoxal-5'-phosphate is inversely associated with systemic markers of inflammation in a population of U.S. adults. *J Nutr* 142:1280-5.
- Saleem MT, Chetty MC, Kavimani S (2013). Putative antioxidant property of sesame oil in an oxidative stress model of myocardial injury. *J Cardiovasc Dis Res* 4(3):177-81.

- Salehinejad J, Zare-Mahmoodabadi R, Saghafi S, Jafarian AH, Ghazi N, Rajaei AR (2011). Immunohistochemical detection of p53 and PCNA in ameloblastoma and adenomatoidodontogenic tumor. *J Oral Sci* 53:213-7.
- Sallie R, Tredger JM, Williams R (1991). Drugs and the liver. Part 1: Testing liver function. *Biopharm Drug Dispos* 12(4):251-9.
- Salum E, Kampus P, Zilmer M, Eha J, Butlin M, Avolio AP, Põdramägi T, Arend A, Aunapuu M, Kals J (2012). Effect of vitamin D on aortic remodeling in streptozotocin-induced diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 11:58.
- Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Farkhondeh T (2017). Catechin treatment ameliorates diabetes and its complications in streptozotocin-induced diabetic rats. *Dose-Response* 15(1):1559325817691158.
- Sasaki Y, Sone H, Kamiyama S, Shimizu M, Shirakawa H, Kagawa Y, Komaia M, Furukawa Y (2012). Administration of biotin prevents the development of insulin resistance in the skeletal muscles of Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Food Funct* 3(4):414-9.
- Satoh M, Fujimoto S, Haruna Y, Arakawa S, Horike H, Komai N, Sasaki T, Tsujioka K, Makino H, Kashihara N (2005). NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 288(6):F1144-52.
- Satyanarayana A, Balakrishna N, Pitla S, Reddy PY, Mudili S, Lopamudra P, Suryanarayana P, Viswanath K, Ayyagari R, Reddy GB (2011). Status of B-vitamins and homocysteine in diabetic retinopathy: association with vitamin-B12 deficiency and hyperhomocysteinemia. *PLoS One* 6(11):e26747.
- Savi M, Bocchi L, Mena P, Dall'Asta M, Crozier A, Brighenti F, Stilli D, Del Rio D (2017). In vivo administration of urolithin A and B prevents the occurrence of cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol* 16(1):80.
- Schalinske KL (2003). Interrelationship between diabetes and homocysteine metabolism: Hormonal regulation of cystathionine beta-synthase. *Nutr Rev* 61(4):136-8.
- Schmidt HH, Lohmann SM, Walter U (1993). The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1178(2):153-75.
- Schneider MP, Schneider A, Jumar A, Kistner I, Ott C, Schmieder RE (2014). Effects of folic acid on renal endothelial function in patients with diabetic nephropathy: results from a randomized trial. *Clin Sci (Lond)* 127(7):499-505.
- Sciarretta S, Ferrucci A, Ciavarella GM, De Paolis P, Venturelli V, Tocci G, De Biase L, Rubattu S, Volpe M (2007). Markers of inflammation and fibrosis are related to cardiovascular damage in hypertensive patients with metabolic syndrome. *Am J Hypertens* 20(7):784-91.
- Scott JM, Weir DG (1998). Folic acid, homocysteine and one-carbon metabolism: a review of the essential biochemistry. *J Cardiovasc Risk* 5:223-7.
- Seema PV, Sudha B, Padayatti PS, Abraham A, Raghu KG, Paulose CS (1996). Kinetic studies of purified malate dehydrogenase in liver of streptozotocin-diabetic rats and the effect of leaf extract of *Aegle marmelose* (L.) Correa ex Roxb. *Indian J Exp Biol* 34(6):600-2.
- Seiron P, Wiberg A, Kuric E, Krogvold L, Jahnsen FL, Dahl-Jørgensen K, Skog O, Korsgren O (2019). Characterisation of the endocrine pancreas in type 1 diabetes: islet size is maintained but islet number is markedly reduced. *J Pathol Clin Res* 5(4):248-255.
- Sen S, Chakraborty R, Sridhar, Reddy YSR, Biplab D (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytochemicals: current status and future prospect. *Int. J. Pharm. Sci Rev Res* 3(1):91-100.

- Serdar Z, Aslan K, Dirican M, Sarandol E, Yesilbursa D, Serdar A (2006). Lipid and protein oxidation and antioxidant status in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Clin Biochem* 39:794-803.
- Setola E, Monti LD, Galluccio E, Pallosi A, Fragasso G, Paroni R, Magni F, Sandoli EP, Lucotti P, Costa S, Fermo I, Galli-Kienle M, Origgi A, Margonato A, Piatti P (2004). Insulin resistance and endothelial function are improved after folate and vitamin B12 therapy in patients with metabolic syndrome: relationship between homocysteine levels and hyperinsulinemia. *Eur J Endocrinol* 151(4):483-9.
- Shah AK, Dhalla NS (2021). Effectiveness of some vitamins in the prevention of cardiovascular disease: a narrative review. *Front Physiol* 12:729255.
- Shaikh MK, Devrajani BR, Shaikh A, Ali Shah SZ, Shaikh S, Singh D (2012). Plasma homocysteine level in patients with diabetes mellitus. *World App Sc J* 16(9):1269-73.
- Shanmugam KR, Ramakrishana C, Mallikarjuna K, Reddy KS (2009). The impact of ginger on kidney carbohydrate metabolic profiles in STZ induced diabetic rats. *Asian J Exp Sci* 23(1):127-34.
- Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV (2000). Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343:230-8.
- Shen J, Lai CQ, Mattei J, Ordovas JM, Tucker KL (2010). Association of vitamin B-6 status with inflammation, oxidative stress, and chronic inflammatory conditions: the Boston Puerto Rican Health Study. *Am J Clin Nutr* 91:337-42.
- Shen X, Zheng S, Metreveli NS, Epstein PN (2006). Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 55(3):798-805.
- Sheshala R, Peh KK, Darwis Y (2009). Preparation, characterization, and in vivo evaluation of insulin-loaded PLA-PEG microspheres for controlled parenteral drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 35:1364-74.
- Shi W, Wang Y, Zhang H, Liu Z, Fei Z (2017). Probing deep into the binding mechanisms of folic acid with α -amylase, pepsin and trypsin: An experimental and computational study. *Food Chem* 226:128-134.
- Silva FS, Bortolin RH, Araújo DN, Marques DES, Lima JPMS, Rezende AA, Vieira WHB, Silva NB, Medeiros KCP, Ackermann PW, Abreu BJ, Dias FAL (2017). Exercise training ameliorates matrix metalloproteinases 2 and 9 messenger RNA expression and mitigates adverse left ventricular remodeling in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovasc Pathol* 29:37-44.
- Simó-Servat O, Simó R, Hernández C (2016). Circulating biomarkers of diabetic retinopathy: An overview based on physiopathology. *J Diabetes Res* 2016:5263798.
- Skovso S (2014). Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *J Diabetes Investig* 5:349-58.
- Skyler JS, Krischer JP, Wolfsdorf J, Cowie C, Palmer JP, Greenbaum C, Cuthbertson D, Rafkin-Mervis LE, Chase HP, Leschek E (2005). Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The diabetes prevention trial – type 1. *Diabetes Care* 28:1068-76.
- Skyler JS; Type 1 Diabetes TrialNet Study Group (2008). Update on worldwide efforts to prevent type 1 diabetes. *Ann NY Acad Sci* 1150:190-6.
- Skyschally A, Gres P, Hoffmann S, Haude M, Erbel R, Schulz R, Heusch G (2007). Bidirectional role of tumor necrosis factor-alpha in coronary microembolization: progressive contractile dysfunction versus delayed protection against infarction. *Circ Res* 100(1):140-6.
- Smolek MK, Notaroberto NF, Jaramillo AG, Pradillo LR (2013). Intervention with vitamins in patients with nonproliferative diabetic retinopathy: a pilot study. *Clin Ophthalmol* 7:1451-8.

- Soinio M, Marniemi J, Laakso M, Pyörälä K, Lehto S, Rönnemaa T (2007). Serum zinc level and coronary heart disease events in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 30(3):523-8.
- Song Y, Cook NR, Albert CM, Van Denburgh M, Manson JE (2009). Effect of homocysteine-lowering treatment with folic acid and B vitamins on risk of type 2 diabetes in women: a randomized, controlled trial. *Diabetes* 58(8):1921-8.
- Souders CA, Bowers SL, Baudino TA (2009). Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res* 105(12):1164-76.
- Squire IB, Evans J, Ng LL, Loftus IM, Thompson MM (2004). Plasma MMP-9 and MMP-2 following acute myocardial infarction in man: correlation with echocardiographic and neurohumoral parameters of left ventricular dysfunction. *J Card Fail* 10(4):328-33.
- Srinivasan K, Ramarao P (2007). Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J Med Res* 125:451-72
- Stach K, Stach W, Augoff K (2021). Vitamin B6 in health and disease. *Nutrients* 13(9):3229.
- Stanhewicz AE, Alexander LM, Kenney WL (2015). Folic acid supplementation improves microvascular function in older adults through nitric oxide-dependent mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 129(2):159-67.
- Stanhewicz AE, Kenney WL (2017). Role of folic acid in nitric oxide bioavailability and vascular endothelial function. *Nutr Rev* 75(1):61-70.
- Steck AK, Armstrong TK, Babu SR, Eisenbarth GS (2011). Stepwise or linear decrease in penetrance of type 1 diabetes with lower-risk HLA genotypes over the past 40 years. *Diabetes* 60:1045-9.
- Steffes MW, Sibley S, Jackson M, Thomas W (2003). Beta-cell function and the development of diabetes-related complications in the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care* 26:832-6.
- Størling J, Pociot F (2017). Type 1 diabetes candidate genes linked to pancreatic islet cell inflammation and beta-cell apoptosis. *Genes (Basel)* 8(2):72.
- Stott DJ, MacIntosh G, Lowe GD, Rumley A, McMahan AD, Langhorne P, Tait RC, O'Reilly DS, Spilg EG, MacDonald JB, MacFarlane PW, Westendorp RG (2005). Randomized controlled trial of homocysteine-lowering vitamin treatment in elderly patients with vascular disease. *Am J Clin Nutr* 82(6):1320-6.
- Stover PJ, Field MS (2015). Vitamin B-6. *Adv Nutr* 6(1):132-3.
- Strand TA, Taneja S, Kumar T (2015). Vitamin B-12, folic acid, and growth in 6- to 30- month-old children: a randomized controlled trial. *Pediatrics* 135(4):e918-26.
- Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, Hadden D, Turner RC, Holman RR (2000). Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* 321:405-12.
- Stroes ES, van Faassen EE, Yo M, Martasek P, Boer P, Govers R, Rabelink TJ (2000). Folic acid reverts dysfunction of endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res* 86(11):1129-34.
- Strother RM, Thomas TG, Otsyula M, Sanders RA, Watkins JB 3rd (2001). Characterization of oxidative stress in various tissues of diabetic and galactose-fed rats. *Int J Exp Diabetes Res* 2(3):211-6.
- Stuart SA, Robinson ES (2015). Reducing the stress of drug administration: implications for the 3Rs. *Sci Rep* 5:14288.
- Suidasari S, Stautemas J, Urugami S, Yanaka N, Derave W, Kato N (2016). Carnosine content in skeletal muscle is dependent on vitamin B6 status in rats. *Front Nutr* 2:39.
- Suidasari S, Urugami S, Yanaka N, Kato N (2017). Dietary vitamin B6 modulates the gene expression of myokines, Nrf2-related factors, myogenin and HSP60 in the skeletal muscle of rats. *Exp Ther Med* 14(4):3239-46.

- Sun M, Bu W, Li Y, Zhu J, Zhao J, Zhang P, Gu L, Zhang W, Fang Z (2019). Danzhi Jiangtang Capsule ameliorates kidney injury via inhibition of the JAK-STAT signaling pathway and increased antioxidant capacity in STZ-induced diabetic nephropathy rats. *Biosci Trends* 12(6):595-604.
- Sutherland CG, Fisher BM, Frier BM, Dargie HJ, More IA, Lindop GB (1989). Endomyocardial biopsy pathology in insulin-dependent diabetic patients with abnormal ventricular function. *Histopathology* 14(6):593-602.
- Szkudelski T (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50:537-46.
- Tabák AG, Herder C, Rathmann W, Brunner EJ, Kivimäki M (2012). Prediabetes: A high-risk state for diabetes development. *Lancet* 379:2279-90.
- Talukder MA, Kalyanasundaram A, Zuo L, Velayutham M, Nishijima Y, Periasamy M, Zweier JL (2008). Is reduced SERCA2a expression detrimental or beneficial to postischemic cardiac function and injury? Evidence from heterozygous SERCA2a knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*
- Tamamori-Adachi M, Takagi H, Hashimoto K, Goto K, Hidaka T, Koshimizu U, Yamada K, Goto I, Maejima Y, Isobe M, Nakayama KI, Inomata N, Kitajima S (2008). Cardiomyocyte proliferation and protection against post-myocardial infarction heart failure by cyclin D1 and Skp2 ubiquitin ligase. *Cardiovasc Res* 80(2):181-90.
- Tan Y, Ichikawa T, Li J, Si Q, Yang H, Chen X, Goldblatt CS, Meyer CJ, Li X, Cai L, Cui T (2011). Diabetic downregulation of Nrf2 activity via ERK contributes to oxidative stress-induced insulin resistance in cardiac cells *in vitro* and *in vivo*. *Diabetes* 60(2):625-33.
- Tan Y, Zhang Z, Zheng C, Wintergerst KA, Keller BB, Cai L (2020). Mechanisms of diabetic cardiomyopathy and potential therapeutic strategies: preclinical and clinical evidence. *Nat Rev Cardiol* 17(9):585-607.
- Tang ST, Su H, Zhang Q, Tang HQ, Wang CJ, Zhou Q, Wei W, Zhu HQ, Wang Y (2016). Sitagliptin inhibits endothelin-1 expression in the aortic endothelium of rats with streptozotocin-induced diabetes by suppressing the nuclear factor- κ B/I κ B α system through the activation of AMP-activated protein kinase. *Int J Mol Med* 37(6):1558-66.
- Tao B, Pietropaolo M, Atkinson M, Schatz D, Taylor D (2010). Estimating the cost of type 1 diabetes in the US: a propensity score matching method. *PLoS One* 5:e11501.
- Tarquini R, Pala L, Brancati S, Vannini G, De Cosmo S, Mazzocchi G, Rotella CM (2018). Clinical approach to diabetic cardiomyopathy: A review of human studies. *Curr Med Chem* 25(13):1510-24.
- Taş S, Sarandöl E, Dirican M (2014). Vitamin B6 supplementation improves oxidative stress and enhances serum paraoxonase/arylesterase activities in streptozotocin-induced diabetic rats. *ScientificWorld Journal* 2014: 351598.
- Task Force Members; Ryden L, Grant PJ, Anker SD, Berne C, Cosentino F, Danchin N, Deaton C, Escaned J, Hammes HP, Huikuri H, Marre M, Marx N, Mellbin L, Ostergren J, Patrono C, Seferovic P, Uva MS, Taskinen MR, Tendera M, Tuomilehto J, Valensi P, Zamorano JL, Zamorano JL, Achenbach S, Baumgartner H, Bax JJ, Bueno H, Dean V, Deaton C, Erol C, Fagard R, Ferrari R, Hasdai D, Hoes AW, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, Lancellotti P, Linhart A, Nihoyannopoulos P, Piepoli MF, Ponikowski P, Sirnes PA, Tamargo JL, Tendera M, Torbicki A, Wijns W, Windecker S, Document R, De Backer G, Sirnes PA, Ezquerra EA, Avogaro A, Badimon L, Baranova E, Baumgartner H, Betteridge J, Ceriello A, Fagard R, Funck-Brentano C, Gulba DC, Hasdai D, Hoes AW, Kjekshus JK, Knuuti J, Kolh P, Lev E, Mueller C, Neyses L, Nilsson PM, Perk J, Ponikowski P, Reiner Z, Sattar N, Schachinger V, Scheen A, Schirmer H,

- Stromberg A, Sudzhaeva S, Tamargo JL, Viigimaa M, Vlachopoulos C, Xuereb RG (2013). Guidelines ESCCfP. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J* 34:3035-87.
- Tate M, Deo M, Cao AH, Hood SG, Huynh K, Kiriazis H, Du XJ, Julius TL, Figtree GA, Dusting GJ, Kaye DM, Ritchie RH (2017). Insulin replacement limits progression of diabetic cardiomyopathy in the low-dose streptozotocin-induced diabetic rat. *Diab Vasc Dis Res* 14:423-33.
- Tawakol A, Migrino RQ, Aziz KS, Waitkowska J, Holmvang G, Alpert NM, Muller JE, Fischman AJ, Gewirtz H (2005). High-dose folic acid acutely improves coronary vasodilator function in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 45(10):1580-4.
- Tejedo J, Bernabé JC, Ramírez R, Sobrino F, Bedoya FJ (1999). NO induces a cGMP-independent release of cytochrome c from mitochondria which precedes caspase 3 activation in insulin producing RINm5F cells. *FEBS Lett* 459(2):238-43.
- Tejpal CS, Chatterjee NS, Elavarasan K, Lekshmi RGK, Anandan e R, Asha KK, Ganesan B, Mathew S (2017). Thiamine and pyridoxine loaded vanillic acid grafted chitosan modulates lactate and malate dehydrogenase in albino rats. *Fishery Technology* 54:197-201.
- Tepavčević S, Vojnović Milutinović D, Macut D, Žakula Z, Nikolić M, Božić-Antić I, Romić S, Bjekić-Macut J, Matić G, Korićanac G (2014). Dihydrotestosterone deteriorates cardiac insulin signaling and glucose transport in the rat model of polycystic ovary syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol* 141:71-6.
- Teshima Y, Takahashi N, Nishio S, Saito S, Kondo H, Fukui A, Aoki K, Yufu K, Nakagawa M, Saikawa T (2014). Production of reactive oxygen species in the diabetic heart. Roles of mitochondria and NADPH oxidase. *Circ J* 78:300-6.
- Thomas CV, Coker ML, Zellner JL, Handy JR, Crumbley AJ 3rd, Spinale FG (1998). Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation* 97(17):1708-15.
- Thunander M, Petersson C, Jonzon K, Fornander J, Ossiansson B, Torn C, Edvardsson S, Landin-Olsson M (2008). Incidence of type 1 and type 2 diabetes in adults and children in Kronoberg, Sweden. *Diabetes Res Clin Pract* 82:247-55.
- Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S (1997). Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46(11):1733-42.
- Title LM, Cummings PM, Giddens K, Genest JJ Jr, Nassar BA (2000). Effect of folic acid and antioxidant vitamins on endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 36(3):758-65.
- Title LM, Ur E, Giddens K, McQueen MJ, Nassar BA (2006). Folic acid improves endothelial dysfunction in type 2 diabetes--an effect independent of homocysteine-lowering. *Vasc Med* 11(2):101-9.
- Toyota T, Kai Y, Kakizaki M, Ohtsuka H, Shibata Y, Goto Y (1981). The endocrine pancreas in pyridoxine deficient rats. *Tohoku J Exp Med* 134(3):331-6.
- Tracy RP (2003). Thrombin, inflammation, and cardiovascular disease: an epidemiologic perspective. *Chest* 124:49S-57S.
- Tripathi YB, Shukla R, Pandey N, Pandey V, Kumar M (2017). An extract of *Pueraria tuberosa* tubers attenuates diabetic nephropathy by upregulating matrix metalloproteinase-9 expression in the kidney of diabetic rats. *J Diabetes* 9(2):123-132.

- Tryfiates GP (1980). Vitamin B6 metabolism and role in growth. Westport, CT: Food and Nutrition Press.
- Tully DB, Allgood VE, Cidlowski JA (1994). Modulation of steroid receptor-mediated gene expression by vitamin B6. *FASEB J* 8:343-9.
- Tundis R, Loizzo MR, Menichini F (2010). Natural products as alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. *Mini Rev Med Chem* 10(4):315-31.
- Tuomi T (2005). Type 1 and type 2 diabetes: What do they have in common? *Diabetes* 54(suppl 2):40-5.
- Turecký L, Kupčová V, Uhlíková E, Mojto V (2014). Peroxisomal enzymes in the liver of rats with experimental diabetes mellitus type 2. *Physiol Res* 63(Suppl 4):S585-91.
- Tzifi F, Economopoulou C, Gourgiotis D, Ardavanis A, Papageorgiou S, Scorilas A (2012). The role of BCL2 family of apoptosis regulator proteins in acute and chronic leukemias. *Adv Hematol* 2012:524308.
- Ueland PM, McCann A, Midttun Ø, Ulvik A (2017). Inflammation, vitamin B6 and related pathways. *Mol Aspects Med* 53:10-27.
- Umadevi B, Roopkala MS, Silvia WDCR, Kumar KMP (2016). Role of von Willebrand factor in type 2 diabetes mellitus patients. *J Evolution Med Dent Sci* 5(81):6075-9.
- Unoki-Kubota H, Yamagishi S, Takeuchi M, Bujo H, Saito Y (2010). Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation end product (AGE) formation ameliorates insulin resistance in obese, type 2 diabetic mice. *Protein Pept Lett* 17(9):1177-81.
- Usher-Smith JA, Thompson MJ, Sharp SJ, Walter FM (2011). Factors associated with the presence of diabetic ketoacidosis at diagnosis of diabetes in children and young adults: a systematic review. *BMJ* 343:4092.
- Valdés-Ramos R, Guadarrama-López AL, Martínez-Carrillo BE, Benítez-Arciniega AD (2015). Vitamins and type 2 diabetes mellitus. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 15(1): 54-63.
- Vallurupalli S, Mehta JL (2017). Vascular remodeling in diabetes mellitus. In: Kartha C, Ramachandran S, Pillai R, editors. *Mechanisms of vascular defects in diabetes mellitus. Advances in Biochemistry in Health and Disease*, vol 17. Cham:Springer.
- van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG (2011). Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev* 91:79-118.
- van Heerebeek L, Hamdani N, Handoko ML, Falcao-Pires I, Musters RJ, Kupreishvili K, Ijsselmuiden AJ, Schalkwijk CG, Bronzwaer JG, Diamant M, Borbély A, van der Velden J, Stienen GJ, Laarman GJ, Niessen HW, Paulus WJ (2008). Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation* 117(1):43-51.
- van Linthout S, Seeland U, Riad A, Eckhardt O, Hohl M, Dhayat N, Richter U, Fischer JW, Böhm M, Pauschinger M, Schultheiss HP, Tschöpe C. Reduced MMP-2 activity contributes to cardiac fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol*. 2008 Jul;103(4):319-27.
- van Tassell BW, Seropian IM, Toldo S, Mezzaroma E, Abbate A (2013). Interleukin-1 β induces a reversible cardiomyopathy in the mouse. *Inflamm Res* 62(7):637-40.
- van Uitert EM, Steegers-Theunissen RP (2013). Influence of maternal folate status on human fetal growth parameters. *Mol Nutr Food Res* 57(4):582-95.
- Varma U, Koutsifeli P, Benson VL, Mellor KM, Delbridge LMD (2018). Molecular mechanisms of cardiac pathology in diabetes - Experimental insights. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1864(5 Pt B):1949-59.

- Vartio T, Baumann M (1989). Human gelatinase/type IV procollagenase is a regular plasma component. *FEBS Lett* 255:285-9.
- Vasan RS, Sullivan LM, Roubenoff R, Dinarello CA, Harris T, Benjamin EJ, Sawyer DB, Levy D, Wilson PW, D'Agostino RB; Framingham Heart Study (2003). Inflammatory markers and risk of heart failure in elderly subjects without prior myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Circulation* 107(11):1486-91.
- Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martásek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA Jr (1998). Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(16):9220-5.
- Verhaar MC (1998). 5-methyltetrahydrofolate, the active form of folic acid, restores endothelial function in familial hypercholesterolemia. *Circulation* 97:237-41.
- Verhaar MC, Wever RM, Kastelein JJ, van Dam T, Koomans HA, Rabelink TJ (1998). 5-methyltetrahydrofolate, the active form of folic acid, restores endothelial function in familial hypercholesterolemia. *Circulation* 97(3):237-41.
- Verheijen R, Kuijpers HJ, van Driel R, Beck JL, van Dierendonck JH, Brakenhoff GJ, Ramaekers FC (1989). Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sci* 92 (Pt 4):531-40.
- Vermeulen EG, Rauwerda JA, van den Berg M, de Jong SC, Schalkwijk C, Twisk JW, Stehouwer CD (2003). Homocysteine-lowering treatment with folic acid plus vitamin B6 lowers urinary albumin excretion but not plasma markers of endothelial function or C-reactive protein: further analysis of secondary end-points of a randomized clinical trial. *Eur J Clin Invest* 33(3):209-15.
- Vinik AI, Casellini C, Parson HK, Colberg SR, Nevoret ML (2018). Cardiac autonomic neuropathy in diabetes: A predictor of cardiometabolic events. *Front Neurosci* 12:591.
- Visentin M, Diop-Bove N, Zhao R, Goldman ID (2014). The intestinal absorption of folates. *Annu Rev Physiol* 76:251-274.
- Visse R, Nagase H (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92(8):827-39.
- Voltarelli JC, Couri CE, Stracieri AB, Oliveira MC, Moraes DA, Pieroni F, Coutinho M, Malmegrim KC, Foss-Freitas MC, Simões BP, Foss MC, Squiers E, Burt RK (2007). Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA* 297:1568-76.
- Vulesevic B, McNeill B, Giacco F, Maeda K, Blackburn NJ, Brownlee M, Milne RW, Suuronen EJ (2016). Methylglyoxal-induced endothelial cell loss and inflammation contribute to the development of diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 65(6):1699-713.
- Wald DS, Wald NJ, Morris JK, Law M (2006). Folic acid, homocysteine, and cardiovascular disease: judging causality in the face of inconclusive trial evidence. *BMJ* 333(7578):1114-7.
- Wald NJ, Law MR, Morris JK, Wald DS (2001). Quantifying the effect of folic acid. *Lancet* 358(9298):2069-73.
- Wang H-S, Kuo M-F (2007). Vitamin B6 related epilepsy during childhood. *Chang Gung Med J* 30(5):396-401.
- Wang J, Wan R, Mo Y, Zhang Q, Sherwood LC, Chien S (2010). Creating a long-term diabetic rabbit model. *Exp Diabetes Res* 2010:289614.
- Wang M, Zhao D, Spinetti G, Zhang J, Jiang LQ, Pintus G, Monticone R, Lakatta EG (2006). Matrix metalloproteinase 2 activation of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and TGF-beta1-type II receptor signaling within the aged arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1503-9.

- Wang Q, Liu D, Song P, Zou MH (2015). Tryptophan-kynurenine pathway is dysregulated in inflammation, and immune activation. *Front Biosci (Landmark Ed)* 20:1116-43.
- Wang XT, Gong Y, Zhou B, Yang JJ, Cheng Y, Zhao JG, Qi MY (2018). Ursolic acid ameliorates oxidative stress, inflammation and fibrosis in diabetic cardiomyopathy rats. *Biomed Pharmacother* 97:1461-7.
- Wang Z, Gleichmann H (1998). GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes* 47:50-6
- Westermann D, Rutschow S, Jäger S, Linderer A, Anker S, Riad A, Unger T, Schultheiss HP, Pauschinger M, Tschöpe C (2007). Contributions of inflammation and cardiac matrix metalloproteinase activity to cardiac failure in diabetic cardiomyopathy: the role of angiotensin type 1 receptor antagonism. *Diabetes* 56(3):641-6.
- Westermeier F, Riquelme JA, Pavez M, Garrido V, Diaz A, Verdejo HE, Castro PF, Garcia L, Lavandero S (2016). New molecular insights of insulin in diabetic cardiomyopathy. *Front Physiol* 7:125.
- Wichi R, Malfitano C, Rosa K, De Souza SB, Salemi V, Mostarda C, De Angelis K, Irigoyen MC (2007). Noninvasive and invasive evaluation of cardiac dysfunction in experimental diabetes in rodents. *Cardiovasc Diabetol* 6:14.
- Wilson AJ, Gill EK, Abudalo RA, Edgar KS, Watson CJ, Grieve DJ (2018). Reactive oxygen species signalling in the diabetic heart: emerging prospect for therapeutic targeting. *Heart* 104(4):293-9.
- Wolf H (1974). Studies on tryptophan metabolism in man: the effects of hormones and vitamin B6 on urinary excretion of metabolites of the kynurenine pathway. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 33:11-87
- Wolff SP, Dean RT (1987). Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J* 245(1):243-50.
- Wong TC, Piehler KM, Kang IA, Kadakkal A, Kellman P, Schwartzman DS, Mulukutla SR, Simon MA, Shroff SG, Kuller LH, Schelbert EB (2014). Myocardial extracellular volume fraction quantified by cardiovascular magnetic resonance is increased in diabetes and associated with mortality and incident heart failure admission. *Eur Heart J* 35(10):657-64.
- Woo CW, Prathapasinghe GA, Siow YL, O K (2006). Hyperhomocysteinemia induces liver injury in rat: Protective effect of folic acid supplementation. *Biochim Biophys Acta* 1762(7):656-65.
- World Health Organization (2015). Serum and red blood cell folate concentrations for assessing folate status in populations. World Health Organization; Geneva, Switzerland.
- Wu TG, Li WH, Lin ZQ, Wang LX (2008). Effects of folic acid on cardiac myocyte apoptosis in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Cardiovasc Drugs Ther* 22(4):299-304.
- Xavier S, Sadanandan J, George N, Paulose CS (2012). β_2 -adrenoceptor and insulin receptor expression in the skeletal muscle of streptozotocin induced diabetic rats: antagonism by vitamin D₃ and curcumin. *Eur J Pharmacol* 687(1-3):14-20.
- Xiong Q, Liu J, Xu Y (2019). Effects of uric acid on diabetes mellitus and its chronic complications. *Int J Endocrinol* 2019:9691345.
- Xue L, Feng X, Wang C, Zhang X, Sun W, Yu K (2017). Benazepril hydrochloride improves diabetic nephropathy and decreases proteinuria by decreasing ANGPTL-4 expression. *BMC Nephrol* 18(1):307.
- Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML (2013). Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology (Bethesda)* 28(6):391-403.
- Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE Jr, Drazner MH, Fonarow GC, Geraci SA, Horwich T, Januzzi JL, Johnson MR, Kasper EK, Levy WC, Masoudi FA, McBride PE, McMurray JJ, Mitchell JE, Peterson PN, Riegel B, Sam F, Stevenson LW, Tang WH, Tsai EJ, Wilkoff BL;

- American College of Cardiology Foundation; American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (2013). 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 62(16):e147-239.
- Yang Y, Santamaria P (2006). Lessons on autoimmune diabetes from animal models. *Clin Sci (Lond)*;110:627-39.
- Ye G, Metreveli NS, Donthi RV, Xia S, Xu M, Carlson EC, Epstein PN (2004). Catalase protects cardiomyocyte function in models of type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes* 53(5):1336-43.
- Yeh HC, Brown TT, Maruthur N, Ranasinghe P, Berger Z, Suh YD, Wilson LM, Haberl EB, Brick J, Bass EB, Golden SH (2012). Comparative effectiveness and safety of methods of insulin delivery and glucose monitoring for diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 157:336-47.
- Yoon JW, Jun HS (2001). Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci* 928:200-11.
- Yoshihisa A, Abe S, Kiko T, Kimishima Y, Sato Y, Watanabe S, Kanno Y, Miyata-Tatsumi M, Misaka T, Sato T, Suzuki S, Oikawa M, Kobayashi A, Yamaki T, Kunii H, Nakazato K, Ishida T, Takeishi Y (2018). Association of serum zinc level with prognosis in patients with heart failure. *J Card Fail* 24(6):375-83.
- Yoshimura Y, Kawano T, Kuroi M, Morishita M, Mori M, Kawakatsu K (1970). Zymographic demonstration of lactate and malate dehydrogenases isoenzymes in the rodent salivary glands. *Histochemie* 22(4):337-46.
- Yoshioka M, Kayo T, Ikeda T, Koizumi A (1997). A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. *Diabetes* 46(5):887-94.
- Young LH, Wackers FJ, Chyun DA, Davey JA, Barrett EJ, Taillefer R, Heller GV, Iskandrian AE, Wittlin SD, Filipchuk N, Ratner RE, Inzucchi SE; DIAD Investigators (2009). Cardiac outcomes after screening for asymptomatic coronary artery disease in patients with type 2 diabetes: the DIAD study: a randomized controlled trial. *JAMA* 301:1547-55.
- Yu X, Kennedy RH, Liu SJ (2003). JAK2/STAT3, not ERK1/2, mediates interleukin-6-induced activation of inducible nitric-oxide synthase and decrease in contractility of adult ventricular myocytes. *J Biol Chem* 278(18):16304-9.
- Yuasa S, Fukuda K, Tomita Y, Fujita J, Ieda M, Tahara S, Itabashi Y, Yagi T, Kawaguchi H, Hisaka Y, Ogawa S (2004). Cardiomyocytes undergo cell division following myocardial infarction is a spatially and temporally restricted event in rats. *Mol Cell Biochem* 259(1-2):177-81.
- Zabihi S, Eriksson UJ, Wentzel P (2007). Folic acid supplementation affects ROS scavenging enzymes, enhances Vegf-A, and diminishes apoptotic state in yolk sacs of embryos of diabetic rats. *Reprod Toxicol* 23(4):486-98.
- Zafar M, Naqvi SN, Ahmed M, Kaimkhani ZA (2009). Altered liver morphology and enzymes in streptozotocin induced diabetic rats. *Int J Morphol* 27(3): 719-725.
- Zhang F, Siow YL, O K (2004). Hyperhomocysteinemia activates NF-kappaB and inducible nitric oxide synthase in the kidney. *Kidney Int* 65(4):1327-38.
- Zhang P, Tsuchiya K, Kinoshita T, Kushiya H, Suidasari S, Hatakeyama M, Imura H, Kato N, Suda T (2016). Vitamin B6 prevents IL-1 β protein production by inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *J Biol Chem* 291(47):24517-27.

- Zhang SX, Zhuang LL, Liu J, Jing YY, Sun J, Gong L, Liu XY (2018b). The role of Parkin protein in cardiac function and ventricular remodeling in myocardial infarction rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 22(15):5004-13.
- Zhang Y, Zhang YY, Li TT, Wang J, Jiang Y, Zhao Y, Jin XX, Xue GL, Yang Y, Zhang XF, Sun YY, Zhang ZR, Gao X, Du ZM, Lu YJ, Yang BF, Pan ZW (2018a). Ablation of interleukin-17 alleviated cardiac interstitial fibrosis and improved cardiac function via inhibiting long non-coding RNA-AK081284 in diabetic mice. *J Mol Cell Cardiol* 115:64-72.
- Zhao L, Dong M, Xu C, Zheng H, Wei T, Liu K, Yan Z, Gao H (2018). Identification of energy metabolism changes in diabetic cardiomyopathy rats using a metabonomic approach. *Cell Physiol Biochem* 48(3):934-946.
- Zhou SS, Zhou Y (2014). Excess vitamin intake: An unrecognized risk factor for obesity. *World J Diabetes* 5(1):1-13.
- Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, Mattheus M, Devins T, Johansen OE, Woerle HJ, Broedl UC, Inzucchi SE; EMPA-REG OUTCOME Investigators (2015). Empagliflozin, Cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 373:2117-28.
- Zou R, El Marroun H, Cecil C, Jaddoe VWV, Hillegers M, Tiemeier H, White T (2021). Maternal folate levels during pregnancy and offspring brain development in late childhood. *Clin Nutr* 40(5):3391-400.

SPISAK SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU

α -AMY – α -amilaza
8-OHdG – 8-hidroksi-2-deoksi-gvanozin
AGE – napredni završni proizvodi glikacije (eng. *advanced glycation end products*)
AI – aterosklerotski indeks
AIS – aterogenetski indeks seruma
ALP – alkalna fosfataza
ALT – alanin aminotransferaza
aMMP-2 – aktivni oblik matriksne metaloproteinaze-2
aMMP-9 – aktivni oblik matriksne metaloproteinaze-9
AST – aspartat aminotransferaza
ATP – adenozin trifosfata
b.w. – body weight
BH2 – dihidrobiopterin
BH4 – tetra-hidrobiopterin
CAT – katalaza
CBB G-250 – plava boja (eng. *comassie brilliant blue R-250*)
cGMP – ciklični guanozin monofosfat GMP
cMDH – citosolna malat dehidrogenaza
CRP – C-reaktivni protein
DAB – diaminobenzidin
DK – desna komora
DM – dijabetes melitus
DNK – dezoksiribonukleinska kiselina
ERK – kinaza regulisana ekstracelularnim signalom (eng. *extracellular-signal-regulated kinase*)
GABA – gama-aminobuterna kiselina
GAD65 – dekarboksilaza glutaminske kiseline
GSH – redukovani glutation
GSH-Px – glutation peroksidaza
GSSG – glutation disulfid
HbA1c – glikolizirani hemoglobin
Hcy – homocistein
HDL-C – holesterol lipoproteina visoke gustine
HE – hematoksilin i eozin/floksin
HIER – tretman visokom temperaturom u puferu odgovarajuće pH vrednosti radi demaskiranja antigena (eng. *heat induced epitope retrieval*)
HLA – humani leukocitni antigen (eng. *human leucocyte antigen*)
HOMA-IR – homeostazni model za procenu insulinske rezistencije
hs cTnT – srčani troponin T
i.p. – intraperitonealno
IA-2 – tirozil fosfataza,
IL – interleukini
IVS – interventrikularni septum
JNK – c-Jun n-terminalna kinaza
KM – kardiomiocit
KSI – kardiosomatski indeks

LDH – laktat dehidrogenaza
LDL-C – holesterol lipoproteina niske gustine
LK – leva komora
L-NAME – N(gama)-nitro-L-arginin metil estar
MDA – malondialdehid (indeks lipidne peroksidacije)
MDH – malat dehidrogenaza
MHC – glavni kompleks histokompatibilnosti (eng. *major histocompatibility complex*)
mMDH – mitohondrijalna malat dehidrogenaza
MMP – matriksne metaloproteinaze
NAD⁺ – nikotinamid adenin dinukleotid
NBT – boja tetrazolijum nitro plavo (eng. *nitro blue tetrasolium*)
NF-κB – nuklearni faktor-κB
NOS – azot monoksid sintaza
p38 MAPK – fosforilisana p38 mitogen-aktivirana protein kinaza
PCNA – nuklearni antigen za proliferaciju ćelija (eng. *proliferating cell nuclear antigen*)
PKG – proteinska kinaza G
pMDH – peroksizomalna malat dehidrogenaza
PMS – fenazin metosulfat
PMSF – fenilmetilsulfonil fluorid
proMMP-2 – latentni oblik matriksne metaloproteinaze-2
RAAS – renin-angiotenzin-aldosteron sistem
RDA – preporučeni dnevni unos (eng. *Recommended Dietary Allowance*)
RNS – reaktivne azotne vrste (eng. *reactive nitrogen species*)
ROS – reaktivne vrsta kiseonika (eng. *reactive oxygen species*)
SDS – natrijum dodecil sulfat
SDS-PAGE – natrijum-dodecil sulfat poliakrilamidna elektroforeza (eng. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*)
sGC – solubilna gvanilat ciklaza
SGLT – natrijum-glukočni kotransporter
SOD – superoksid dismutaza
STZ – streptozotocin
t.m. – telesna masa
T1DM – dijabetes melitus tip 1
T2DM – dijabetes melitus tip 2
TBB – pufer za tretiranje
TC – ukupni holesterol
TG – trigliceridi
TGFβ – transformacioni faktor rasta β
TIMP – tkivni inhibitori metaloproteinaza
TNF – faktor tumorske nekroze
TNFα – faktor tumorske nekroze α
UCP-2 – odvojeni protein-2 (eng. *uncoupling protein-2*)
vWF – fon Vilebrandov faktor (*von Willebrand factor*)
ZnT8 – transporter cinka

Biografija autora

Dr Slavica Mutavdžin Krneta (devojačko Mutavdžin) rođena je 19.12.1988. godine u Pančevu. Kao dobitnik Vukove diplome i đak generacije završila je osnovnu školu „Jovan Jovanović Zmaj“ u Pančevu, a potom i Gimnaziju „Uroš Predić“ u Pančevu, takođe kao dobitnik Vukove diplome. Integrisane akademske studije na Medicinskom fakultetu u Beogradu upisala je 2007, a završila je 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,81. Na stručnom usavršavanju bila je 2011. godine u Univerzitetnoj bolnici u Bratislavi (Slovačka) i 2012. godine na Teksaškom institutu za srce u Hjustonu (SAD).

Bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (2008-2010), Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka (2010-2012), Dositeja Fonda za mlade talente Republike Srbije (2012-2013), Zadužbine Studenica (2012-2014), Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije izuzetno nadarenim studentima (2013-mart 2014), Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije studentima doktorskih akademskih studija (april – jun 2014). Dobila je nagradu Zadužbine Nikole Spasića najboljem studentu Medicinskog fakulteta (2008), pohvalnice i nagrade Medicinskog fakulteta najboljem studentu (2008-2011), pohvalnicu studentu šeste godine, dobitniku stipendije iz Fonda „Prof. dr Živojin Sudarov“ za postignut uspeh u toku studija na Medicinskom fakultetu (2012), kao i zahvalnicu studentskog parlamenta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu za posvećenost u radu sa studentima (2018). Od 2012. godine član je Mense Srbije.

Na Medicinskom fakultetu u Beogradu 2016. godine završila je specijalističke akademske studije, smer: Klinička farmakologija i terapija i 2019. godine master akademske studije, smer: Fizička aktivnost, zdravlje i terapija vežbanjem. Dr Mutavdžin Krneta je 2013. godine upisala doktorske akademske studije na Medicinskom fakultetu u Beogradu, smer: Fiziološke nauke. Tema doktorske disertacije „Efekti vitamina B6 i folne kiseline na kardiovaskularni sistem pacova sa dijabetes melitusom indukovanim streptozotocinom“ odobrena je 2018. godine na Veću naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu, za mentora je imenovan Prof. dr Dragan Đurić, a za komentora Prof. dr Milica Labudović Borović.

Zaposlena je na Katedri za medicinsku fiziologiju, u zvanju saradnik u nastavi od 2014, a u zvanju asistent od 2016. godine. Član je Laboratorije za kardiovaskularnu fiziologiju Instituta za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“ u kojoj se aktivno bavi naučno istraživačkim radom od 2016. godine. Od 2018. godine član je projekta „Efekti homocisteina i homocisteinu srodnih supstanci na kardiovaskularni sistem: uloga gasnih transmitera NO, H₂S i CO“ broj projekta: OI 175043, pod rukovodstvom Prof. dr Dragana Đurića. Dr Mutavdžin Krneta je autor i koautor 86 radova i publikacija od kojih je 15 štampano *in extenso* u časopisima sa JCR liste. Učesnik je većeg broja naučnih skupova u zemlji i inostranstvu. Za naučnoistraživački rad predstavljen na “The 6th Meeting of the European Section and the 7th Meeting of the North American Section of the International Academy of Cardiovascular Sciences (IACS)” 2019. godine u Vrnjačkoj Banji dobila je nagradu za najbolji poster. Upisala je zdravstvenu specijalizaciju iz interne medicine 2018. godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора СЛАВИЦА МУТАВЦИН КРНЕТА

Број индекса FN-02/13

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ЕФЕКТИ ВИТАМИНА Б6 И ФОЛНЕ КИСЕЛИНЕ НА
КАРДИОВАСКУЛАРНИ СИСТЕМ ПАЦОВА СА ДИЈАБЕТЕС
МЕЛИТУСОМ ИНДУКОВАНИМ СТРЕПТОЗОТОЦИНОМ

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

Потпис аутора

У Београду, 10.06.2022.

Slavica Mutavcin Krnetan

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора СЛАВИЦА МУТАВИЋИЋ КРНЕТА

Број индекса FN-02/13

Студијски програм ФИЗИОЛОШКЕ НАУКЕ

Наслов рада ЕФЕКТИ ВИТАМИНА Б6 И ФОЛНЕ КИСЕЛИНЕ НА КАРДИОВАСКУЛАРНИ СИСТЕМ ПАЦОВА СА ДИАБЕТЕС МЕЛИТУСOM И ИНДУКОВАНИМ СТРЕПТОЗОЦИДОМ

Ментор ПРОФ. ДР ДРАГАН БУРИЋ

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

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

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

Потпис аутора

у Београду, 10.06.2022.

Slavica Mutavdzin Krceta

образац изјаве о коришћењу

Изјава о коришћењу

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

ЕФЕКТИ ВИТАМИНА B6 И ФОЛНЕ КИСЕЛИНЕ НА КАРДИОВАСКУЛАРНИ СИСТЕМ ПАЦИЈЕНА СА ДИЈАБЕТЕС МЕЛИТУСОМ ИНДУКОВАНИМ СТРЕПОЗОТОЦИНОМ

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 10.06.2022.

Plavica Jovanović Kizmeta