



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Жарко Мићовић

**Функционалне, биохемијске и хистолошке промене у
кардиоваскуларном систему пацова у условима акутне и
субхроничне стимулације метионином**

Докторска дисертација

Ментор: др сци. мед. Драган Ђурић, редовни професор

Крагујевац, 2018. године

САДРЖАЈ:

I УВОД.....	1
1.1 МЕТАБОЛИЗАМ СУМПОРОВИТИХ АМИНОКИСЕЛИНА	2
1.1.1 МЕТИОНИНСКИ ЦИКЛУС.....	3
1.1.2 УЛОГА ВИТАМИНА В КОМПЛЕКСА У МЕТАБОЛИЗМУ МЕТИОНИНА И ХОМОЦИСТЕИНА	6
1.1.3 РЕГУЛАТОРНИ МЕХАНИЗМИ МЕТАБОЛИЗМА МЕТИОНИНА	9
1.1.4 МЕТИОНИН, ХОМОЦИСТЕИН И ХИПЕРХОМОЦИСТЕИНЕМИЈА	9
1.1.5 ХОМОЦИСТЕИН КАО УЗРОЧНИК ПАТОЛОШКИХ СТАЊА	13
1.1.6 ПРОТЕКТИВНИ ФАКТОРИ И ТЕРАПИЈСКЕ ОПЦИЈЕ У ХИПЕРХОМОЦИСТЕИНЕМИЈИ.....	17
1.2 ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС	20
1.2.1 СЛОБОДНИ РАДИКАЛИ И ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС	20
1.2.2 СИНГЛЕТ КИСЕОНИК ($^1\text{O}_2$).....	22
1.2.3 СУПЕРОКСИД АНЈОН РАДИКАЛ ($\text{O}_2^{\bullet-}$).....	23
1.2.4 ВОДОНИК ПЕРОКСИД (H_2O_2)	24
1.2.5 АЗОТ МОНОКСИД (NO) И ПЕРОКСИНИТРИТ (ONOO^{\bullet})	25
1.2.6 ЛИПИДНА ПЕРОКСИДАЦИЈА	26
1.2.7 АНТИОКСИДАЦИОНИ ЗАШТИТНИ МЕХАНИЗМИ.....	28
1.2.8 КАРДИОВАСКУЛАРНИ СИСТЕМ, ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС И ХОМОЦИСТЕИН	33
1.3 АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРАЗА И КАРДИОВАСКУЛАРНИ СИСТЕМ.....	36
1.3.1 ОСНОВНЕ ОДЛИКЕ АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРАЗЕ.....	36
1.3.2 АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРАЗА, ХОМОЦИСТЕИН И СРЦЕ.....	37
II ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	39
III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	43
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	44
3.1. МАТЕРИЈАЛ.....	44
3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ	44
3.3. БИОХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ.....	46
3.4. АНАЛИЗА СПЕЦИФИЧНИХ БИОХЕМИЈСКИХ ПАРАМЕТАРА И МАРКЕРА ХЕМОСТАЗЕ	48

3.5. АНАЛИЗА ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА	48
3.6. ХИСТОЛОШКА И МОРФОМЕТРИЈСКА АНАЛИЗА	50
3.7. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА ПОДАТАКА.....	51
IV РЕЗУЛТАТИ	52
4. РЕЗУЛТАТИ.....	53
4.1 ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА АКУТНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ DL-МЕТИОНИНА	53
4.2 ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА СУБХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ DL-МЕТИОНИНА.....	55
4.2.1 ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА СУБХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ DL-МЕТИОНИНА НА ПРОМЕНЕ ТЕЛЕСНЕ МАСЕ ПАЦОВА.....	55
4.2.2 ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА СУБХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ DL-МЕТИОНИНА НА СПЕЦИФИЧНЕ БИОХЕМИЈСКЕ ПАРАМЕТРЕ У СЕРУМУ ПАЦОВА (ХОМОЦИСТЕИН, ФОЛНА КИСЕЛИНА, ВИТАМИНА В ₁₂)	59
4.2.3 ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА СУБХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ DL-МЕТИОНИНА НА СТАНДАРДНЕ БИОХЕМИЈСКЕ ПАРАМЕТРЕ У СЕРУМУ ПАЦОВА	62
4.2.4 ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА СУБХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ DL-МЕТИОНИНА НА МАРКЕРЕ ХЕМОСТАЗЕ (ФИБРИНОГЕН, D-ДИМЕР И VON-WILLEBRAND-ОВ ФАКТОР) У СЕРУМУ ПАЦОВА	84
4.2.5. ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА СУБХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ DL-МЕТИОНИНА НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА У ПЛАЗМИ ПАЦОВА	88
4.3 ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА СУБХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ DL-МЕТИОНИНА НА АКТИВНОСТ АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРАЗЕ У ТКИВУ СРЦА КОД ПАЦОВА	94
4.4 ХИСТОПАТОЛОШКА АНАЛИЗА ЕФЕКТА СУБХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ DL-МЕТИОНИНА	96
4.4.1 ХИСТОПАТОЛОШКА АНАЛИЗА ТКИВА АОРТЕ У ОДНОСУ НА КОНТРОЛНУ ГРУПУ	96
4.4.2 ХИСТОПАТОЛОШКА АНАЛИЗА ТКИВА СРЦА У ОДНОСУ НА КОНТРОЛНУ ГРУПУ	101
V ДИСКУСИЈА.....	109
5.1 ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА АКУТНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ DL-МЕТИОНИНА .	112

5.2 ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА СУБХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ DL-МЕТИОНИНА НА БИОХЕМИЈСКЕ ПАРАМЕТРЕ ПАЦОВА.....	115
5.3 ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА СУБХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ DL-МЕТИОНИНА НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА У ПЛАЗМИ ПАЦОВА И АКТИВНОСТ АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРАЗЕ У ТКИВУ СРЦА ПАЦОВА	123
5.4 ХИСТОПАТОЛОШКА АНАЛИЗА ЕФЕКТА СУБХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ DL-МЕТИОНИНА	129
VI ЗАКЉУЧЦИ.....	131
VII РЕФЕРЕНЦЕ.....	134

I

УВОД

1.1 МЕТАБОЛИЗАМ СУМПОРОВИТИХ АМИНОКИСЕЛИНА

Сумпоровите аминокиселине су оне које у својој структури садрже сумпор, односно, сулфхидрилну групу. Међу сумпоровитим аминокиселинама од примарног значаја су метионин и цистеин, које имају кључну улогу у низу метаболичких процеса. Метионин је есенцијална аминокиселина која се у организму сисара не ствара у довољној количини како би се омогућио физиолошки раст и развој, тако да се ова аминокиселина мора континуирано уносити исхраном. Са друге стране, цистеин је делимично есенцијална аминокиселина имајући у виду да настаје од L-метионина у процесу транссулфурације. Због наведених чињеница процена садржаја метионина и цистеина у намирницама које се уносе се практично користи као процена уноса сумпоровитих аминокиселина исхраном. Резултати све већег броја истраживања указују на круцијалне улоге ових аминокиселина у огромном броју физиолошких процеса, попут одржавања структуре протеина, метаболичких процеса, имунским реакцијама и одржавању оксидо-редукционих процеса у организму (1-4).

Оксидо-редукциони процеси имају примарну улогу у одржавању свеукупне хомеостазе у организму, која подразумева врло фину регулацију и избалансираност у производњи и елиминацији слободних радикала. Реактивне врсте кисоника (енгл. *reactive oxygen species* - ROS), као најчешћи облик слободних радикала, врло лако оксидују биомолекуле (протеине, липиде, ДНК) и изазивају оксидационо оштећење (5). Услед наведених чињеница антиоксидациони потенцијал сумпоровитих аминокиселина привлачи све већу научну пажњу, имајући у виду број патофизиолошких ентитета у чијој патогенези се налази оксидациони стрес (5-7).

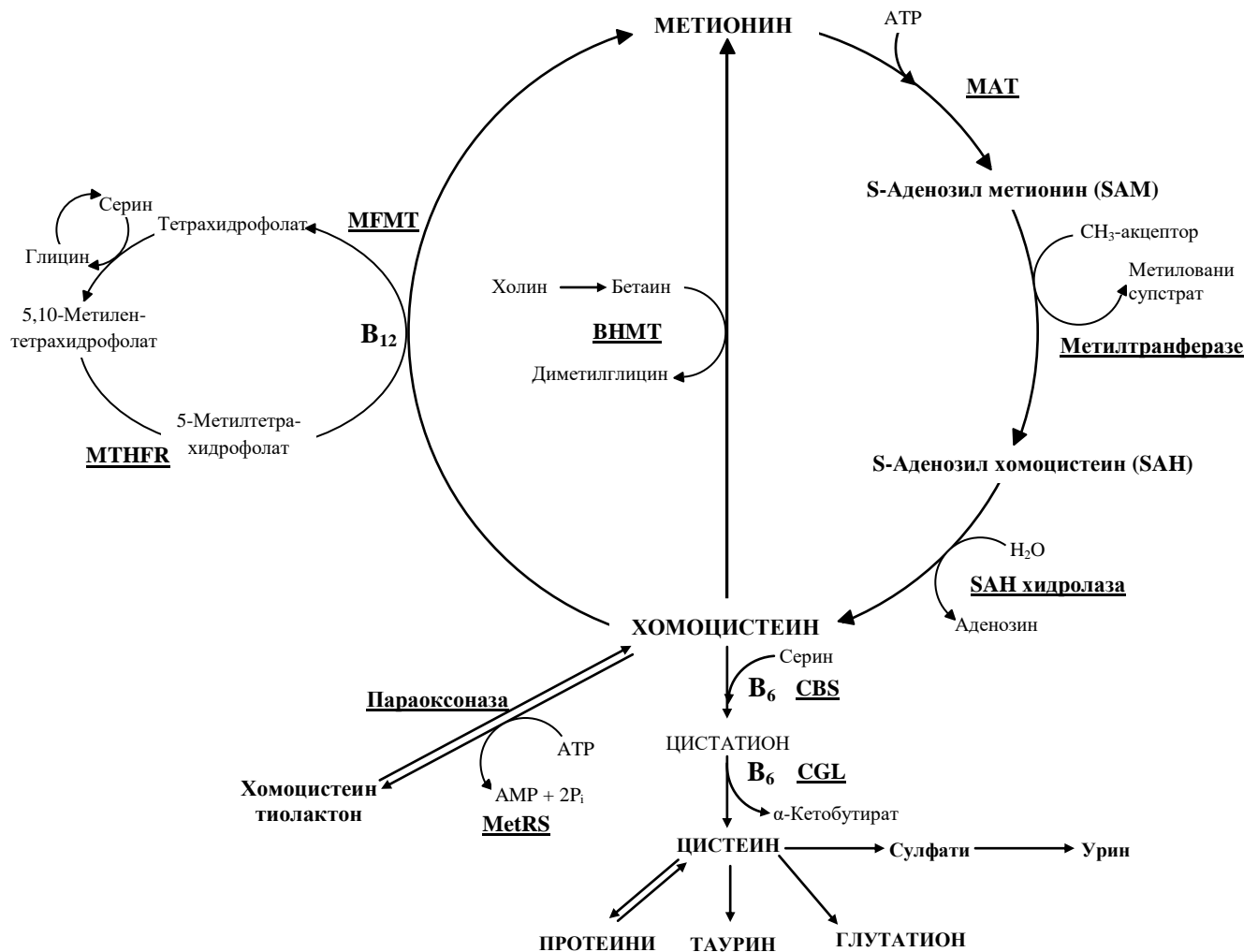
Са друге стране, хомоцистеин (Hcy) је непротеинска аминокиселина која настаје током метаболизма метионина. Хиперхомоцистеинемија (HHcy), односно вредност Hcy изнад 15 $\mu\text{mol/l}$ у плазми, представља потврђен фактор ризика за настајање коронарне, церебралне и периферне атеросклерозе (8-10). Велики број различитих узрока може да учествује у поремећају метаболизма метионина и последичном развоју HHcy.

1.1.1 МЕТИОНИНСКИ ЦИКЛУС

Као што је претходно наведено, метионин је алифатична, есенцијална аминокиселина која садржи сумпор, и истовремено је прекурсор великог броја једињења са различитим улогама у физиолошким и патофизиолошким процесима попут: сукцинил коензима А, Нсу, цистеина, креатина и карнитина. Након варења протеина метионин се апсорбује у танком цреву, при чему се у ткивима гастроинтестиналног тракта метаболише око 20% метионина (11). Остатак се крвотоком преноси до различитих делова организма, и појединачне ћелије га преузимају помоћу Na^+ -зависних и Na^+ -независних транспортера. Када уђе у ћелију, метионин се користи за синтезу протеина или се укључује у метаболички циклус, за чије одвијање је неопходно деловање већег броја кофактора, при чему витамини В комплекса имају кључну улогу (12). Метионин садржи метил групу ($-\text{CH}_3$) која је везана за атом сумпора и која може да се пренесе на велики број различитих једињења, која у том случају бивају метилована а метионин се понаша као донор метил групе. Пре него што донира метил групу она мора бити активирана деловањем аденозин трифосфата (АТР). Под дејством ензима метионин аденозилтрансферазе (МАТ), уз додатак аденозина, из метионина настаје S-аденозил метионин (SAM) (13). Постоји три изоензима МАТ, при чему су МАТИ и МАТIII заступљени у хепатоцитима, а МАТII у екстрахепатичним ткивима. Изоензиме МАТИ и МАТIII инхибира продукт реакције, SAM, док се активност изоензима МАТIII повећава под дејством SAM (14). Последица наведене чињенице је релативно уравнотежена концентрација SAM у екстрахепатичним ткивима. Са друге стране, концентрација SAM у јетри може знатно да варира, имајући у виду да МАТIII изоензим има високу Михаелисову константу и да је SAM позитивни регулатор активности овог облика МАТ. У великом броју трансметилационих реакција, које су катализоване различитим метилтрансферазама, SAM донира своју метил групу при чему настају различити продукти реакција и S-аденозил хомоцистеин (SAH). SAH може да се веже за унутарћелијске протеине, да се деловањем ензима аденозил хомоцистионазе (SAH хидролаза) преведе у Нсу, или да изађе из ћелије, при чему само бубрези имају могућност да активно уклањају SAH из ванћелијске течности. Од кључног значаја је деловање ензима аденозил хомоцистионазе, који одвајањем аденозина претвара SAH у Нсу (15, 16).

Однос између SAM и SAH представља метилациони индекс и рефлектује метилациони потенцијал (15, 16). Реакција којом се SAH претвара у Hcy се одвија у свим ћелијама, при чему ензим аденозил хомоцистионаза користи никотинамид аденин динуклеотид фосфат (NADP) као простетичну групу и бакар. Настали Hcy подлеже ензимским трансформацијама у ћелији у којој је настао или се избације из ћелије, па се крвљу преноси до ћелија јетре или других места у организму. Физиолошке вредности Hcy у плазми вероватно одражавају транспорт Hcy од места његове синтезе до места његове разградње.

У деградацију Hcy насталог из SAH укључена су три ензимска пута, од чега се два одвијају унутар метионинског циклуса, при чему се из Hcy поново ресинтетише метионин и чине реметилациони пут метаболизма Hcy (Слика 1).



Слика 1. Метионински циклус.

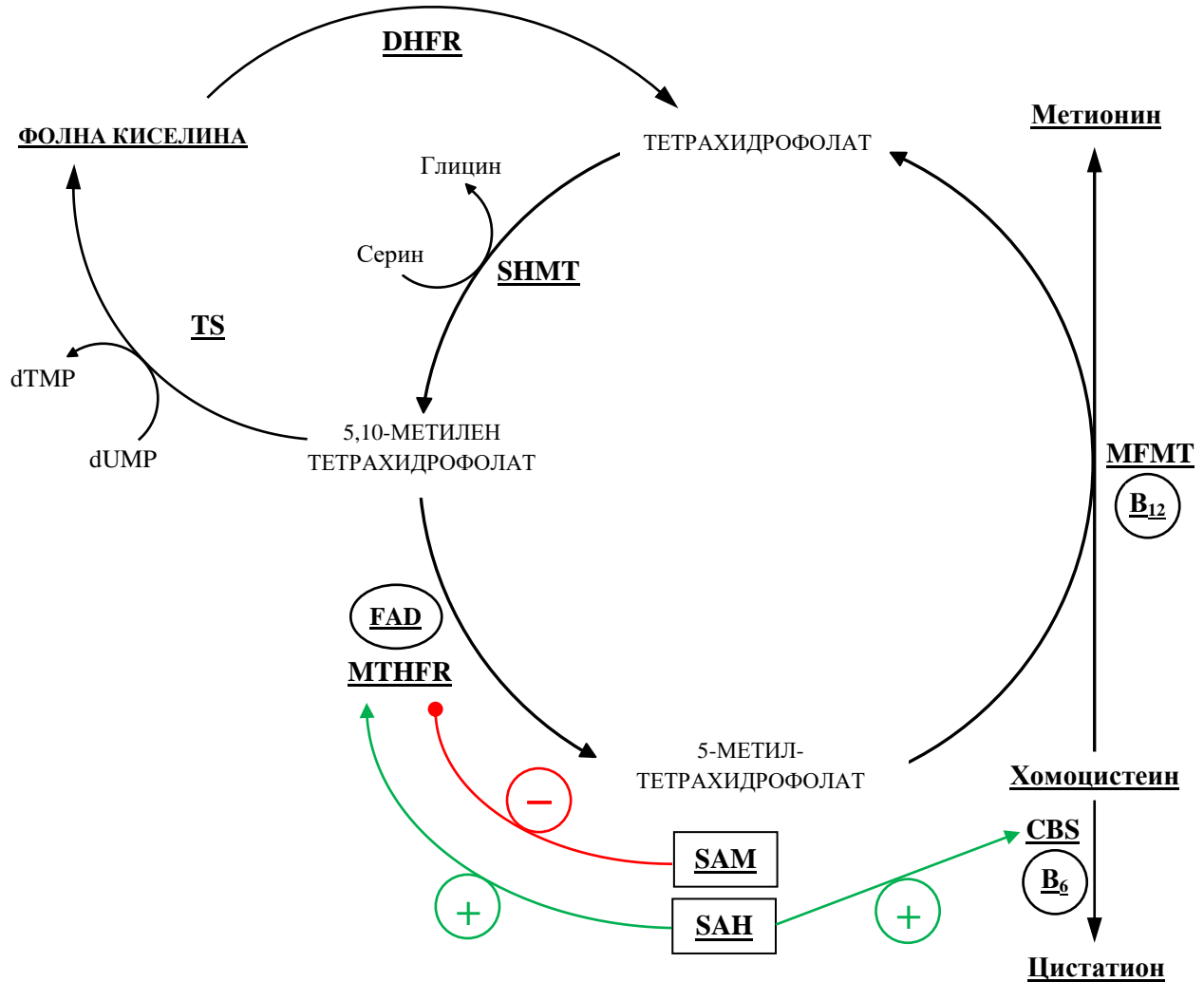
Деловањем ензима метилфолат метилтрансферазе (метионин синтетазе - MFMT) Hсу се додаје метил група и поново настаје метионин (17). Деловање ензима MFMT је повезано са активношћу ензима метилентетрахидрофолат редуктазе (MTHFR), који катализује синтезу метилентетрахидрофолата и који донира метил групу Hсу. Поред фолата (витамин B₉) за деловање ензима MFMT је неопходан и витамин B₁₂ (кобаламин) (17, 18). Због тога ова реакција представља чвориште метаболизма фолата и кобаламина, јер је неопходно континуирано превођење метилтетрахидрофолата у фолат и супротно. Друга хомоцистеин метилаза је бетаин хомоцистеин метилтрансфераза (BHMT), ензим који катализује преношење метил групе са бетаина на Hсу при чему настаје метионин. За разлику од метаболичког пута MFMT који је заступљен у свим ћелијама, BHMT је најзаступљенији у јетри и бубрезима, где постоји највише бетаина (19). Молекул бетаина садржи три хемијски активне метил групе везане за атом азота. Поред уноса исхраном бетаин настаје и иреверзибилном оксидацијом холина деловањем ензима холин дехидрогеназе и бетаин алдехид дехидрогеназе. Давањем метил групе Hсу, бетаин се преводи у диметилглицин (DMG). Овај метаболички пут инхибирају DMG и SAM, а потенцира га бетаин (20, 21). Мала количина DMG се уклања урином, док се највећи део преводи у саркозин и глицин деловањем ензима DMG-дехидрогеназе. DMG-дехидрогеназа је ензим митохондријског матрикса чија је активност условљена флавин аденин динуклеотидом (FAD) и тетраhydrofolatom, чија активност подрзумева пренос једне метил групе тетраhydrofolату при чему се ствара 5,10-метилентетрахидрофолат, а глицин такође улази у фолатни циклус и укључен је у синтезу 5,10-метилентетрахидрофолата (22). Пренос метил групе катализован BHMT не зависи од витамина B₁₂ и фолата, међутим постоји неколико укрштања овог метаболичког пута и фолатног циклуса. Показано је да холин индиректно повећава метилацију Hсу (23). Додатна карактеристика ензима BHMT је да садржи цинк, што је заједничка особина ензима који метилују тиоле (24).

Два претходно наведена метаболичка пута чине трансметилациони метаболички пут Hсу, који је практично у сталној конкуренцији са транссулфурационим метаболичким путем, којим се Hсу иреверзибилно преводи у цистеин. Цистатион β-синтетаза (CBS) је први и ограничавајући ензим у транссулфурационом метаболичком путу, који преводи Hсу у цистатион уз ослобађање водоник сулфида (H₂S). Са друге стране, синтеза цистеина

(или количина цистеина) је лимитирајући фактор за синтезу глутатиона, који је главни унутарћелијски антиоксиданс. Стога, транссулфурациони метаболички пут представља ендогени механизам којим се уклања токсични Hсу, а синтетишу се H₂S и цистеин који имају протективна својства (25, 26). Активност ензима CBS, као и ензима који катализује наредни корак, цистатион γ -лиаза (CGL), зависи од пиридоксал 5'-пирофосфата (PLP) односно витамина B₆ (27). Цистатион γ -лиаза (CGL) или γ -цистионаза, уз присуство PLP, катализује разлагање цистатиона до цистеина и α -кетобутирата. Цистен се даље укључује у синтезу различитих протеина, таурина и глутатиона. Поред 3-меркаптопируват сумпортрансферазе, CBS и CGL су једини ензими који синтетишу H₂S, чије су улоге као гасотрансмитера у фокусу великог броја истраживања (28). Имајући у виду да се у готово свим претходно наведеним метаболичким реакцијама групе које садрже један угљеников атом преносе са различитих донора на акцепторе у литератури се ови метаболички путеви означавају једним именом као „метаболички пут једног угљеника“ – енгл. *One Carbon Metabolism*.

1.1.2 УЛОГА ВИТАМИНА В КОМПЛЕКСА У МЕТАБОЛИЗМУ МЕТИОНИНА И ХОМОЦИСТЕИНА

Више различитих витамина В комплекса имају кључну улогу у метаболичким путевима метионина и Hсу, тако да практично представљају лимитирајући фактор у овим процесима, и у њиховом недостатку настају поремећаји у зависности од ензима чија је функција поремећена. Као што је претходно наведено за деловање ензима MFMT је неопходно постојање довољне количине фолата, као донора метил групе, као и кобаламина, који је кофактор MFMT. 5,10-метилентетрахидрофолат се под дејством FAD зависног ензима метилен тетрахидрофолат редуктазе (MTHFR) преводи у 5-метилтетрахидрофолат, чија се метил група деловањем MFMT преноси на Hсу, при чему поново настаје метионин (Слика 2).



Слика 2. Фолатни циклус.

Губитком метил групе 5-метил-тетрахидрофолат се преводи у тетрахидрофолат, који се деловањем ензима хидросил метил трансферазе (SHMT) преводи у 5,10-метилентетрахидрофолат, уз истовремено претварање једног молекула серина у глицин. Метил група 5-метил-тетрахидрофолата се синтетише *de novo*, односно преноси се са серина. На активност MTHFR утичу SAM и SAH, при чему SAM смањује активност, SAH повећава активност MTHFR. Са друге стране, SAM делује као алостерни активатор ензима CBS, тако што се везује за С-терминални домен овог ензима и повећава његову активност (29).

Метаболичка улога витамина B_{12} је везана за два пута у еукариотским ћелијама, метилкобаламин (MeCbl) је укључен у процес реметилације као кофактор MFMT, док је аденозилкобаламин кофактор ензима метилмалонил коензим А редуктазе у митохондријама. У реакцији у којој MFMT катализује пренос метил групе са 5-метилтетрахидрофолата на Hcy, MeCbl је прелазни акцептор метил групе између фолатног и метионинског циклуса. Услед тога, недостатак витамина B_{12} не узрокује само поремећај реметилације Hcy у метионин и последично накупљање Hcy, већ и смањену конверзију 5-метилтетрахидрофолата у тетраhydroфолат. Због наведене чињенице настаје накупљање 5-метилтетрахидрофолата и смањење количине тетраhydroфолата, који представља редуковани облик фолата неопходан за синтезу ДНК, што је једно од потенцијалних објашњења зашто недостатак витамина B_{12} негативно утиче на репликацију ДНК (17, 30). Парадоксално звучи чињеница да у недостатку витамина B_{12} већу пажњу привлачи накупљање Hcy и последична HHcy у односу на недостатак метионина. Ендогена ресинтеза метионина је реакција од кључног значаја за физиолошко функционисање ћелије, јер је SAM универзални донор метил групе у низу трансметилационих реакција у ћелији (31). Недостатак витамина B_{12} се брзо рефлектује на метаболичке процесе у ћелији, и на количине SAM и SAH, и смањење њиховог међусобног односа, односно метилационог потенцијала.

Као што је претходно наведено, витамин B_6 у облику PLP је неопходан за функционисање ензима CBS и CGL који посредују у транссулфурационим метаболичким реакцијама. CBS је по структури тетрамер који садржи четири потенцијална места за везивање PLP. Истраживања су показала да постоји различит афинитет за везивање сваког од појединачних молекула PLP, а резултати студија у којима је уклоњен PLP из молекула CBS указују на потпуни губитак ензимске активности. Наиме, PLP је неопходан за одржавање секундарне структуре (27, 32). Слично CBS, и CGL је хомотетрамер који се састоји из четири субјединице. Свака од субјединица има једно везивно место за PLP, и када се PLP веже за субјединице оне се међусобно повезују и формирају тетрамерну структуру (33). Резултати више истраживања су показали да недостатак витамина B_6 не мења значајно активност ензима CBS, док се активност ензима CGL значајно смањује (34, 35).

1.1.3 РЕГУЛАТОРНИ МЕХАНИЗМИ МЕТАБОЛИЗМА МЕТИОНИНА

И на основу експерименталних истраживања и истраживања на пацијентима са генетским метаболичким поремећајима који утичу на метаболизам метионина може да се закључи да метаболизам метионина заправо представља циклус који се континуирано понавља, а једина додатна реакција која се дешава ван циклуса је транссулфурациони метаболички пут којим се Нсу усмерава ка синтези цистеина (36). Метаболизам метионина може да се окарактерише кроз два параметра: брзина одвијања реакција у оквиру метионинског циклуса и удео Нсу који подлеже каталитичком деловању CBS и CGL. Наведени концепт подразумева два потенцијална регулаторна места. Расподела метионина између укључивања у синтезу протеина и укључивања у метионински циклус и синтеза SAM је прво регулаторно место. Друго регулаторно место подразумева ензиме чији је супстрат Нсу, а метаболички исход сваке појединачне реакције зависи од активности одговарајућег ензима. Такође, могу да се издвоје и два механизма којима се регулише активност ензима. Први механизам је количина неког ензима у одређеном ткиву, на шта може да утиче велики број фактора попут узраста, пола, начина исхране, употребе лекова или хормона, као и специфичности метаболизма метионина у појединим ткивима. Други механизам зависи од кинетичких својстава сваког појединачног ензима, односно њиховог афинитета према супстрату и одговора на метаболичке ефекторе.

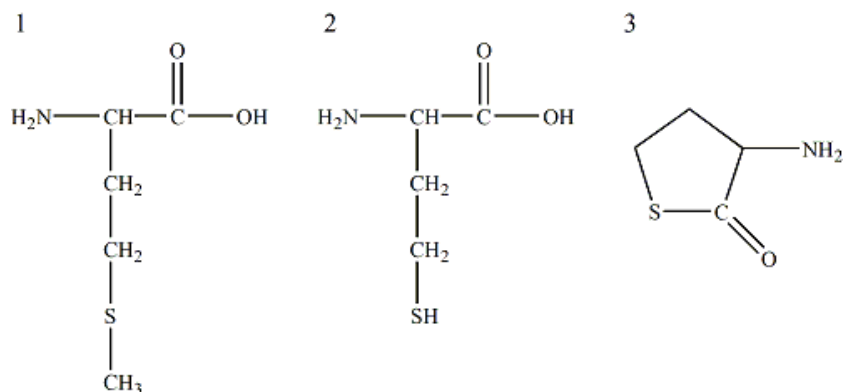
Постоји неколико ткивних специфичности везано за метаболичке путеве метионина: 1) метионински циклус се одвија у свим ткивима у организму, 2) изоензим МАТ са високом Михаелисовом константом (МАТIII) налази се само у хепатоцитима, 3) ВНМТ се налази само у јетри и бубрезима код виших примата и човека (37, 38).

1.1.4 МЕТИОНИН, ХОМОЦИСТЕИН И ХИПЕРХОМОЦИСТЕИНЕМИЈА

Хомоцистеин (Нсу) је први пут изолован 1933. године из камена екстрахованог из мокраћне бешике (39). Исте године у часопису *New England Journal of Medicine* описан је случај дечака који је примљен због интензивне главобоље, повраћања и поспаности, а у клиничкој слици је констатована ментална заосталост и дислокација очних сочива (40). Такође су наведени знаци који су сугерисали мождани удар у виду слабости и патолошких рефлекса на левој страни тела, а описано је и повећање телесне температуре и крвног

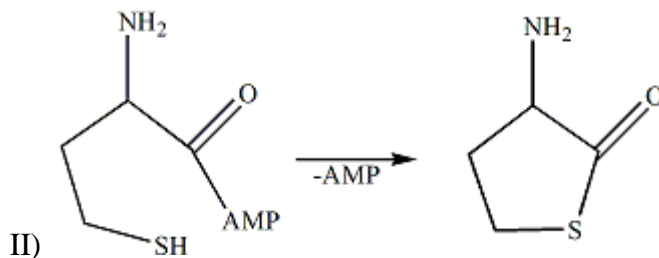
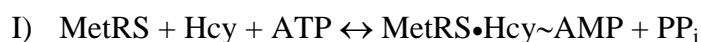
притиска. Након извршене аутопсије описана је атеросклероза каротидних артерија и церебрални инфаркт. Тридесетак година касније је описан случај оболеле девојчице са сличном клиничком сликом, и анализом крви доказане су екстремно високе вредности Нсу. Даљом анализом утврђено је да је девојчица у рођачким везама са случајем описаним 1933. године. Потом је 1969. године патолог са Харварда, *McCully* описао двоје деце са хомоцистеинуријом. Први случај је био дечак старости само два месеца са атеросклеротским променама које би могле да постоје код особа у позним годинама, а лабораторијске анализе су показале веома високе вредности Нсу у крви и урину. Други случај је заправо опис аутопсије девојчице старе осам година која је имала хомоцистеинурију и умрла од možданог удара, а аутопсијски налаз је показао атеросклеротске промене својствене старијим особама (41). На основу наведених чињеница *McCully* је претпоставио да су описане васкуларне промене настале као последица повишених вредности Нсу, што је била основа хомоцистеинске или протеинске хипотезе атеросклерозе (42), која је прихваћена тек неколико година касније када су и други аутори дошли до сличних сазнања.

Поред претходно објашњених метаболичких путева реметилације и транссулфурације, Нсу може да уђе у процес циклизације при чему настаје хомоцистеин тиолактон (Нсу TL), који представља токсични метаболит Нсу који узрокује патолошке промене везане за ННсу. Настајање Нсу TL је практично „погрешна“ реакција у којој ензим метионил-тРНК синтетаза (MetRS) конвертује Нсу у Нсу TL (43, 44). MetRS је један од 20 ензима који су укључени у синтезу протеина, а чија је улога да ковалентно веже метионин за одговарајућу транспортну РНК (45). Наиме, због структурне сличности метионина и Нсу (**Слика 3**), MetRS уместо метионина везује Нсу, али пошто он не може да буде уграђен у полипептидни ланац, „грешка“ се исправља токо што настаје Нсу TL (46).



Слика 3. Хемијске структуре метионина (1), хомоцистеина (2) и хомоцистеин тиолактона (3).

Механизам настајања Нсу TL се одвија у два корака, прво се деловањем АТФ-а активира карбоксилна група Нсу, при чему настаје хомоцистеинил аденилат везан за MetRS (I), а потом бочни ланац Нсу са тиолном групом замењује АМР на карбоксилној групи формирајући цикличну структуру Нсу TL (II).



У физиолошким условима количина створеног Нсу TL је мала због ниских концентрација Нсу у ћелијама. Међутим, у било којим ситуацијама када постоји повећање концентрације Нсу у ћелији, било да постоји поремећај реметилагоног или транссулфурационог метаболичког пута, повећава се и количина насталог хомоцистеин Нсу TL. На пример, у недостатку фолата у фибробластима и ендотелним ћелијама се акумулира Нсу и настаје Нсу TL, који при екстремно високим вредностима Нсу може чинити 60% његовог метаболизма. Настали Нсу TL се метаболише на два начина: 1) хомоцистеинилација протеина везивањем Нсу TL за лизинске (Lys) аминокиселинске

остатке у полипептидним ланцима, или 2) ензимска хидролиза до Нсу деловањем хомоцистеин тиолактоназе, калцијум зависног ензима који је у саставу HDL-а (47, 48).

Нсу TL образује изопептидне везе са аминокиселинским остацима лизина (Lys) унутар пептидних ланаца. Изопептидне везе, за разлику од пептидних веза које се формирају између α -амино групе једне и α -карбоксилне групе друге аминокиселине, настају између *nona*-амино групе једне и α -карбоксилне групе друге аминокиселине или α -амино групе једне и *nona*-карбоксилне групе друге аминокиселине. Оваква хомоцистеинилација протеина изазива поремећај њихове функције или чак губитак функције, што за последицу има ремећење физиолошке функције у којој учествује дати протеин (настајање аутоимунских реакција или прокоагулантних стања). Реакција Нсу TL са протеинима плазме изазива стварање нових протеина који делују антигено и покрећу стварање аутоимунских антитела и инфламаторне реакције (49). Вредности аутоантитела настала реакцијом на N ϵ -Нсу-Lys-протеине позитивно корелирају са вредностима укупног Нсу у плазми (50).

Физиолошке вредности Нсу у плазми крећу се у опсегу од 5 до 15 $\mu\text{mol/l}$. Постоји више класификација ННсу у зависности од вредности Нсу, премда је најчешћа она којом се ННсу класификује као блага до умерена са вредностима Нсу од 15 до 30 $\mu\text{mol/l}$, средња ННсу, када су вредности Нсу од 30 до 100 $\mu\text{mol/l}$, и тешка, када вредности Нсу прелазе 100 $\mu\text{mol/l}$ (51, 52). Нсу се у циркулацији налази у више облика: слободан Нсу (мање од 1%), у облику дисулфида (Нсу-Нсу), мешовитих дисулфида (Нсу-Cys) или везан за протеине. Данас се користи више различитих метода за мерење вредности Нсу, али најчешће се користи течна хроматографија високих перформанси (енгл. *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) (53).

ННсу може да настане као последица већег броја фактора, међутим најчешће се ННсу сврставају у две групе: 1) тешке и ређе ННсу које настају као последица инсуфицијенције неког од кључних ензима у оквиру метионинског циклуса (Слика 1), и 2) средње и умерене ННсу, које се чешће срећу, и које настају као последица деловања фактора средине.

У случају ННсу која настаје као последица генетских дефеката ензими који су најчешће захваћени су МТНFR, MFMT или CBS (54). Најчешћи ензимски поремећај који изазива благо до умерено повећање вредности укупног Нсу је поинт мутација ензима

MTHFR (супституција С заТ на положају 677) у кодирајућем делу гена за МТНFR, чиме се узрокује синтеза термо-лабилног ензима чији се учинак креће око 50% (55). Са друге стране најчешћи генетски узрок тешке ННсу праћене хомоцистинуријом је хомозиготни недостатак ензима CBS, а нешто ређи узроци су хомозиготни недостатак ензима МТНFR или MFMT, као и поремећај функције MFMT услед урођених поремећаја метаболизма витамина В₁₂.

Недовољан нутритивни унос фолата, витамина В₁₂, као и витамина В₆ је у обрнутој корелацији са вредностима укупног Нсу. Такође, више обољења, као што су бубрежна инсуфицијенција, хипотиреоза, карциноми, псоријаза и дијабетес, је повезано са повишеним вредностима Нсу (55). Поједини лекови, дуван, кафа, и повећање серумских вредности креатинина су у позитивној корелацији са вредностима Нсу (55, 56).

1.1.5 ХОМОЦИСТЕИН КАО УЗРОЧНИК ПАТОЛОШКИХ СТАЊА

Резултати великог броја истраживања указују на повезаност између повишених вредности Нсу TL и великог броја патолошких ентитета укључујући, пре свега, кардиоваскуларне болести, атеросклерозу и атеротромбозу, затим неуропатолошких стања попут Алцхајмерове деменције, васкуларне деменције и Паркинсонове болести, различитих облика обољења бубрега, остеопорозе, инсулинске резистенције, карцинома, гастроинтестиналних и ендокриних болести (57-62).

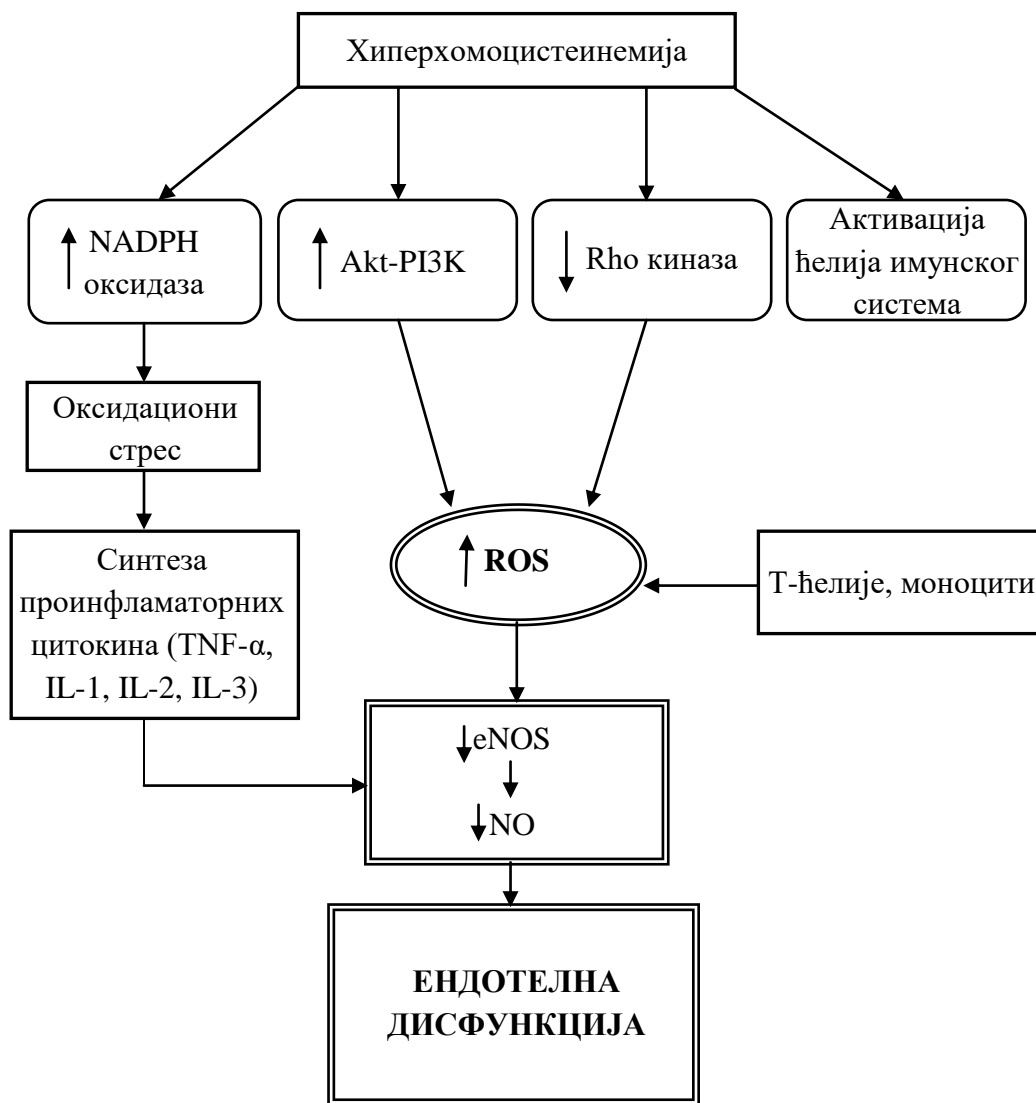
Кардиоваскуларне болести (КВБ) обухватају болести срца и крвних судова и непосредни су узрок у више од 30% смртних исхода широм света (63). КВБ спадају у болести са мултиплим факторима узрока, тако да је тешко издвојити један фактор појединачно, али као што је претходно наведено, хомоцистеин је издвојен као независан фактор ризика за развој КВБ (64). Коронарна болест или болест коронарних крвних судова се односи на сужавање коронарних крвних судова и последично смањење дотока крви у миокард. Тежина коронарне болести срца се класификује на основу Генсини (*Gensini*) скоринг система на коронарну болест једне, две и три артерије (65).

Имајући у виду значај атеросклерозе у погледу морбидитета и морталитета у савременом свету, најинтензивније је испитивана улога ННсу у патогенези атеросклерозе. Показано је да ННсу на више начина посредује у развоју атеросклерозе: 1) индукција оксидационог стреса, 2) поремећај васкуларне реактивности и оштећење ендотела, 3)

повећање вероватноће за руптуру атеросклеротског плака, 4) инфламација и адхезија леукоцита, 5) активација васкуларних глатких мишићних ћелија и њихова пролиферација, 6) активација и диференцијација макрофага. Атеросклероза је најчешћи патолошки процес који се налази у основи КВБ попут коронарне болести и инфаркта миокарда, možданог удара, срчане слабости и периферне васкуларне инсуфицијенције (63). Атеросклероза се дефинише као стално запаљенско оштећење интима артерија са последичним повећањем пропустљивости, накупљањем липида плазме и стварањем плакова, и каснијим фиброзирањем и калцификацијом плакова (66, 67). Резултати више клиничких истраживања јасно указују на повезаност између вредности Нсу у плазми и коронарне болести, атеросклерозе каротидних и периферних артерија (68).

Једна од кључних карика која повезује Нсу и атеросклерозу је оксидациони стрес и улога оксидованог LDL-а (енгл. *Low-Density Lipoprotein*). Наиме, холестерол у циркулацији је везан за протеине, чиме се формирају различити липопротеини. У јетри се прво синтетишу липопротеини врло мале густине - VLDL (енгл. *Very Low-Density Lipoprotein*), који постепено предају триглицериде периферним ткивима, при чему се део VLDL-а метаболише у LDL, а на крају до липопротеина велике густине - HDL (енгл. *High-Density Lipoprotein*). Иако и LDL и HDL имају есенцијалне улоге у транспорту холестерола, имају дијаметрално различите улоге у патогенези атеросклерозе, при чему LDL индукује атеросклерозу, а HDL има протективно дејство. Макрофаги су развили више различитих механизма којима се спречава претерано накупљање LDL-а, попут смањења броја рецептора за LDL, међутим оксидовани LDL (OxLDL) превазилази ове заштитне механизме, услед чега долази до брзог накупљања OxLDL-а и трансформације макрофага у пенасте ћелије, које чине патоанатомски супстрат атеросклеротских плакова (69). OxLDL настаје када је LDL-а изложен оксидационим производима ендотелних ћелија, макрофага и васкуларних глатких мишићних ћелија у субендотелном простору. Међутим, више различитих фактора изазива повећање количине OxLDL-а, између осталих Нсу, али тачни механизми ове повезаности нису сасвим познати (69). Повећање оксидационог стреса под дејством Нсу, попут повећања активности индуцибилне форме азот-моноксид синтазе (iNOS) и мијелопероксидазе, чиме се индиректно повећава количина OxLDL-а. Са друге стране, показано је да суплементација витаминима В

комплекса и последично смањење вредности Hсу истовремено смањује и количину OxLDL-a (70).



Слика 4. Хомоцистеин и ендотелна дисфункција.

Поремећај равнотеже између фосфорилације и дефосфорилације липида и протеин киназа узрокованих хомоцистеином ремете однос између L-аргинина и азот-моноксид синтазе (NOS), чиме се индукује ендотелна дисфункција. Hсу, такође, ремети ћелијске и молекулске механизме који су у основи ендотелне функције. Ендотелна NOS (eNOS) има примарну улогу у синтези азот-моноксида (NO) који је круцијални чинилац у одржавању хомеостазе у васкуларном систему, ремоделовању крвних судова и ангиогенези. Више

сложених унутарћелијских механизма учествује у физиолошкој регулацији функције eNOS, док Hсу у великој мери ремети ову равнотежу, пре свега повећањем продукције слободних радикала и индукцијом оксидационог стреса. Hсу такође ремети метаболички пут протеин киназа В (Akt)-фосфатидилинозитол 3-киназа (PI3K)-eNOS (Akt-PI3K-eNOS) (71). Rho киназа је још једна киназа која спада у породицу серин-треонин киназа, попут претходно поменутог Akt, чија активност може значајно да се промени под дејством Hсу, па тако представља једно од кључних мета за индукцију ендотелне дисфункције током HHсу (72). Hсу изазива аутооксидацију NADPH оксидазе и последичну активацију, што за последицу има значајно повећање продукције слободних радикала и индукцију оксидационог стреса (73). Патогенетски механизми којима Hсу индукује ендотелну дисфункцију су сумирани на **Слици 4**.

Макрофаги су ћелије имунског система које имају кључну улогу у запаљенским реакцијама организма, тако да је постојање макрофага у атеросклеротским лезијама уобичајено. Позната је чињеница да моноцити из циркулације мигрирају, адхерирају за ендотелне ћелије, провлаче се између њих и прелазе у субендотелни простор. На значај макрофага и њиховог преузимања липида у патогенези атеросклерозе указују резултати истраживања у којима искључивање гена за адхезивне молекуле макрофага (M-CSF и P селектин) спречава настајање атеросклерозе у експерименталним моделима дислипидемије (74, 75). Недавно је утврђено да постоје најмање две субпопулације макрофага, M1 и M2. M1 макрофаги се обележавају као „класично активирајући“ макрофаги и делују проинфламаторно, а M2 макрофаги се обележавају као „алтернативно активирајући“ додатно се деле на три подтипа: а) M2a који има профибротичка својства, б) M2b подтип има улогу у регулацији имунског одговора, и в) M2c подтип који има интиинфламаторна својства (76). HHсу је потенцијално један од главних узрока дисфункције макрофага, а како су макрофаги кључни у резолуцији запаљенске реакције, њихова дисфункција има за последицу некрозу и већу склерозу. У складу са наведеном чињеницом показано је да HHсу поред тога што повећава концентрацију проинфламаторних цитокина (TNF- α , IL-1), повећава и акумулацију моноцита у васкуларном зиду и њихову диференцијацију, што за последицу има убрзавање атеросклерозе. Резултати који показују да антиоксиданси бар делимично поништавају ове ефекте HHсу наводе на закључак да оксидациони стрес индукован Hсу има централно

место и у поремећају функције макрофага (77). Макрофаги су ћелије које синтетишу водоник-сулфид (H_2S), један од гасних трансмитера који има већи број протективних функција, док H_2S смањује продукцију H_2S (78). Поред продукције инфламаторних цитокина и формирања пенастих ћелија макрофаги продукују матриксне металопроотеиназе (ММР) током атерогенезе, а H_2S утиче на активност неколико ММР. H_2S активира ММР-2, а индукује и поспешује продукцију ММР-9 посредством MAPK/ERK сигналног пута, при чему су и ММР-2 и ММР-9 укључене у патогенезу КВБ (79, 80). Резултати већег броја истраживања указују на повезаност пре свега ММР-9 са артеријском хипертензијом, нестабилном ангином пекторис и акутним инфарктом миокарда (81, 82). Такође, пластичност макрофага (прелазак М1 у М2 и обрнуто) је од кључног значаја у ограничавању прогресије атеросклеротског плака и излазак макрофага из лезије у одговарајуће време. У случају H_2S пластичност макрофага се ремети у корист проинфламаторних М1 макрофага, чиме се фаворизује запаљенска реакција и промовише ширење атеросклеротске лезије (83).

H_2S је такође повезана са повећањем ризика за настајање венске тромбозе имајући у виду чињеницу да H_2S промовише адхезију тромбоцита за ендотелне ћелије, а такође повећава продукцију протромботичких фактора попут β -тромбоглобулина, ткивног активатора плазминогена и фактора VIIc (51, 84).

1.1.6 ПРОТЕКТИВНИ ФАКТОРИ И ТЕРАПИЈСКЕ ОПЦИЈЕ У ХИПЕРХОМОЦИСТЕИНЕМИЈИ

У претходном тексту је већ наведено да HDL има антиатерогена својства, имајући у виду да HDL везује холестерол у периферним ткивима, смањује синтезу LDL-а а самим тим и OxLDL-а. Антиатерогена својства HDL-а су, међутим, махом везана за ензим параоксоназу (PON) која је везана за HDL и испољава већи број протективних функција. Код људи постоје три PON ензима: PON1, PON2 и PON3, који деле око 65% сличности у полипептидној структури (85). PON су Ca^{2+} -зависне естеразе, при чему се PON1 углавном секретује у ванћелијски простор, а PON2 и PON3 су доминантно унутарћелијски протеини. Можда најочигледнија и најзначајнија протективна функција PON1 је спречавање оксидативне модификације LDL-а (настајање OxLDL-а) а самим тим и атеросклеротских лезија (86). Протективни ефекти PON-а су везани и за функцију

макрофага, при чему макрофаги екпримирају PON2 и PON3, а није показана експресија PON1. Упркос тома, на ћелијској мембрани макрофага постоје рецептори за PON1 на, тако да се PON1 на тај начин уноси у унутрашњост ћелије (87, 88). PON1 смањује диференцијацију моноцита у макрофаге, највероватније испољавањем снажног антиоксидационог дејства, а такође смањује инфламаторни одговор макрофага тако што се везује за SR-BI рецепторе за OxLDL (89). Постоји више претпостављених механизма којима PON1 постиже антиоксидациона својства. У макрофагима PON1 смањује активност NADPH оксидазе, а у екстрацелуларном простору инхибира мијелопероксидазу чиме се смањује оксидациони стрес. Што се тиче метаболизма Hcy, PON1 хидролизује Hcy TL и враћа га у Hcy. Имајући у виду да HHcy инхибира дејство PON1, управо током HHcy постоји знатно већа могућност за настајање поларизације макрофага и њиховог усмеравања ка M1 проинфламаторном облику, настајању пенастих ћелија и поспешивању инфламације.

Као терапијско оруђе за лечење HHcy употребљивани су различити агенси. Највише испитивани терапијски приступ је суплементација витаминима В комплекса, пре свега фолном киселином, витамином B₁₂, као и витамином B₆, било понаособ било комбинованом применом. Постоје различити закључци везано за суплементацију витаминима, од навода њиховог протективног дејства до констатација да њихова примена нема никакве протективне ефекте у случају HHcy (90, 91). Фолат и витамин B₁₂ су неопходни кофактори за одвијање реметилационих процеса, а витамин B₆ је кофактор за ензиме CBS и CGL у реакцијама транссулфурације (**Слика 1**). Суплементивну терапију витаминима би евентуално требало размотрити као једноставан начин превенције настајања компликација HHcy.

Поред метил тетрахидрофолата и холин је донор метил групе, који се трансформише у бетаин, потом донира метил групу Hcy који се реметилује у метионин, при чему настаје диметил глицин (**Слика 1**). Као што је претходно наведено овај метаболички пут је под контролом ензима ВНМТ и одвија се у јетри и бубрезима. Због наведених чињеница циљ неколико истраживања је био испитивање ефеката суплементације холином и бетаином, при чему су показани позитивни ефекти ове суплементације на вредности Hcy (92-94). Наведене чињенице указују на могућности

суплементације бетаином и холином у циљу снижавања вредности Нсу, независно од суплементације витаминима В комплекса.

У истраживању на пацовима је показано да небиволол, селективни блокатор β_1 рецептора, у великој мери редукује серумске вредности Нсу, чиме се отвара још један терапијски прозор (95).

У складу са чињеницом да већина нежељених ефеката Нсу произилази из индукције оксидационог стреса, логична је примена антиоксиданаса у спречавању нежељених ефеката ННсу. Глутатион је најзначајнији ендогени антиоксиданс, по структури трипептид (γ -глутамил-цистеинил-глицин) који има кључну улогу у континуираном одржавању редокс равнотеже у ћелији и спречавању оксидационог оштећења. Поред глутатиона, широко употребљиван антиоксиданс је N-ацетилцистеин, који се у последње време најчешће користи у терапији хроничне опструктивне болести плућа. Резултати више истраживања показују протективну улогу N-ацетилцистеина у случајевима ННсу (96).

Имајући у виду да Нсу стимулише ензим HMG-CoA (3-хидрокси-3-метил-глутарил-CoA) редуктазу, повећавајући синтезу холестерола, што има директно проатерогено дејство, оправдана је употреба инхибитора овог ензима (статици) у терапији ННсу. Показано је да симвастатин и аторвастатин испољавају протективно и антиоксидативно дејство у експерименталном моделу ННсу (97).

Унапређивање терапијских могућности за лечење ННсу представља примат имајући у виду број патолошких ентитета повезаних са овим поремећајем, као и величину популације коју захватају, самим тим и њихов социомедицински значај.

1.2 ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС

Данас се о слободним радикалима и антиоксидансима углавном говори у светлу употребе антиоксиданаса у циљу спречавања развоја различитих болести, међутим продукција слободних радикала и антиоксидациони системи перзистирају током читавог живота. Нису сви слободни радикали нужно „лоши“, нити су сви антиоксиданси увек „добри“, односно током живота се тежи успостављању равнотеже између продукције слободних радикала и њихове елиминације антиоксидационим системима у циљу омогућавања њиховог пожељног биолошког деловања и спречавања оштећења.

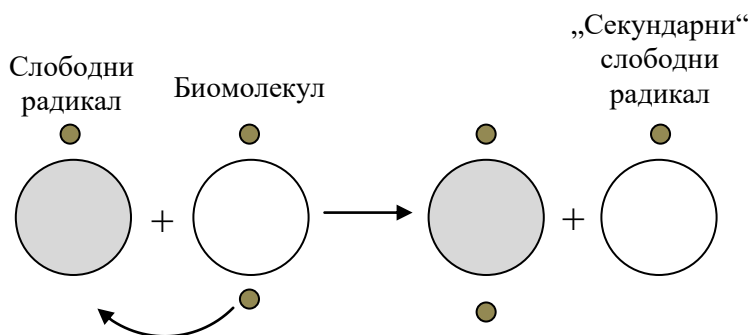
Оксидациони стрес настаје услед поремећаја у редокс равнотежи при чему је продукција прооксидационих молекула, пре свега реактивних врста кисеоника (енгл. *Reactive Oxygen Species* - ROS) и азот монооксида (NO), већа од њихове елиминације. Иако су ROS и NO физиолошки чиници метаболичких процеса, њихова прекомерна продукција може бити главни чинилац патогенезе великог броја обољења.

1.2.1 СЛОБОДНИ РАДИКАЛИ И ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС

Реактивна врста је појам којим се означавају и слободни радикали и нерадикалска једињења, попут водоник пероксида (H_2O_2) и пероксинитрита ($ONOO^-$). Наиме, и H_2O_2 и $ONOO^-$, немају неспарене електроне у последњој орбитали, али се понашају слично слободним радикалима и учествују у оксидо-редукционим процесима у организму. Међутим, слободни радикали ипак представљају главни облик слободних врста, а у зависности од атома који је у активном центру, реактивне врсте се деле у неколико група: слободне врсте кисеоника (ROS), реактивне врсте азота (*reactive nitrogen species* - RNS), реактивне врсте угљеника (*reactive carbon species* - RCS) и реактивне врсте сумпора (*reactive sulfur species* - RSS) (Табела 1).

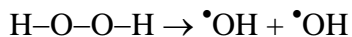
Слободни радикали су молекули, атоми или јони који имају неспарен електрон, и услед тежње да спаре такве електроне понашају се као оксиданси, што представља основу њихове реактивности (Слика 5). У реакцијама са слободним радикалима биомолекули бивају оксидовани, односно одузима им се један електрон из последње орбитале, због чега они постају „секундарни“ слободни радикали, који делују на наредни биомолекул и

одузимају му електрон, и на тај начин настаје просторно и временско ширење оксидационог стреса, уз последично оштећење ћелија и ткива.



Слика 5. Схематски приказ деловања слободних радикала.

Најједноставнији пример слободног радикала је атом водоника, пошто има само један електрон он не може бити спарен. Слободни радикали настају на више начина: додавањем једног електрона нерадикалским једињењима, кидањем ковалентне везе када по један електрон остаје на атомима који су образовали ковалентну везу (хомолитичка фисија) (98). Пример хомолитичке фисије је, на пример, кидање везе између атома кисеоника у молекулу H_2O_2 , при чему настају два хидроксил радикала:



Постоји велики број врста слободних радикала, међутим свакако су слободни радикали кисеоника најзначајнији, имајући у виду да је молекул кисеоника заправо слободни радикал јер садржи два неспарена електрона (због тога би требало да се пише као $\cdot\text{O}_2$) (99). Поменуто два електрона у молекулу кисеоника имају исти спин, због чега је то најстабилнији облик у коме кисеоник постоји у ваздуху, међутим и поред тога, термодинамички гледано, кисеоник је снажан оксидујући агенс. Наведена чињеница практично значи да уколико би O_2 оксидовао неки други молекул или атом морао би да преузме два електрона истог спина, а супротног у односу на кисеоник. Пошто у природи нема молекула или атома који би задовољио овај критеријум, кисеоник је у стању да прихвати један по један електрон у споријим реакцијама са нерадикалским облицима (98).

Табела 1. Реактивне врсте.

	СЛОБОДНИ РАДИКАЛИ	НЕРАДИКАЛСКИ ОБЛИЦИ
ROS	Супероксид анјон радикал – $O_2^{\bullet -}$ Хидроксил радикал – $\bullet OH$ Пероксил радикал – ROO^{\bullet} Алкоксил радикал – RO^{\bullet} Хидропероксил радикал – $\bullet OOH$	Водоник пероксид – H_2O_2 Хипохлорна киселина – $HOCl$ Озон – O_3 Синглет кисеоник – 1O_2
RNS	Азот монооксид радикал – NO^{\bullet} Азот диоксид радикал – NO_2^{\bullet}	Азот диоксид анјон – NO_2^- Азот триоксид – N_2O_3 Нитронијум јон – NO_2^+ Пероксинитрит – $ONOO^-$ Алкил пероксинитрит – $ROONO$ Нитроксил анјон – NO^- Нитрозил катјон – NO^+ Нитрил хлорид – NO_2Cl
RCS	Алкил радикал – R^{\bullet} Алкоксил радикал – RO^{\bullet} Пероксил радикал – ROO^{\bullet}	
RSS	Тиол радикал – RS^{\bullet} Глутатиол радикал – GS^{\bullet} Диглутатион-дисулфид анјон радикал – $GSSG^{\bullet}$	

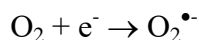
1.2.2 СИНГЛЕТ КИСЕОНИК (1O_2)

Реактивнији облик молекулског кисеоника је синглет кисеоник (1O_2), који настаје додавањем енергије молекулском кисонику и која је довољна да реорганизује електроне у последњој орбитали. Постоје два облика 1O_2 , $^1\Sigma g^+$ и $^1\Delta g$, при чему $^1\Sigma g^+$ облик има два неспарена електрона супротних спинова, док $^1\Delta g$ није реактивна врста јер у последњој орбитали има два спарена електрона. У биолошким системима $^1\Sigma g^+$ облик 1O_2 врло брзо прелази у $^1\Delta g$, међутим постоје стања када могу да настану оштећења ћелијских структура пре него што настане стабилно $^1\Delta g$ стање. Код биљака 1O_2 настаје у хлоропластима током излагања сунчевој светлости, а код људи настаје у кожи и мрежњачи, такође током излагања сунчевој светлости. Наиме ултраљубичасти зраци сунчеве светлости предају довољно енергије молекулском кисеонику да га преведу у 1O_2 (100). Фотосензитизери, материје које се уносе исхраном (на пример, псоралени из целера или флуорохинолони),

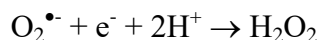
могу да потенцирају превођење молекулског кисеоника у па $^1\text{O}_2$ тако да упркос брзом превођењу $^1\Sigma_g^+$ у $^1\Delta_g$ облик ипак настане оштећење ткива (101, 102).

1.2.3 СУПЕРОКСИД АНЈОН РАДИКАЛ ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

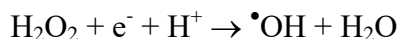
Уколико се молекулском кисеонику, који садржи два неспарена електрона, дода један електрон, настаје супероксид анјон радикал ($\text{O}_2^{\bullet-}$), који је упркос свом називу („супер“), ипак мање радикал у односу на молекулски кисеоник (103).



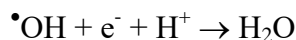
Додавањем још једног електрона, настаје пероксидни јон, који уз два атома водоника даје водоник пероксид.



Везивање другог електрона слаби везу између кисоникових атома, а додавање трећег електрона у потпуности раскида ову везу, причему настаје хидроксил радикал и молекул воде.



Додавање још једног, четвртог електрона резултује наградњом још једног молекула воде.



Око 95% унетог кисеоника се у митохондријама редукује до воде деловањем ензима цитохром оксидазе (104). Цитохром оксидаза преузима по један електрон од редукованих цитохром *c* молекула (Fe^{2+}), оксидујући их у феро облик, а електроне предаје кисеонику при чему настаје вода према претходно наведеним реакцијама. Цитохром *c* је сложен комплекс који се састоји од више протеина, пре свега због потребе да катализује више различитих реакција истовремено, а такође и због чињенице да мора да задржи више токсичних облика слободних радикала како не би дошли у окружење где могу да изазову оштећење.

Синтеза $\text{O}_2^{\bullet-}$ није нужно увек повезана са патолошким стањима, штавише постоје ситуације када је повећана синтеза $\text{O}_2^{\bullet-}$ изузетно пожељна, као што је случај у активираним макрофагима (105). Код особа са грануломатозним обољењима, где постоји урођени поремећај синтезе $\text{O}_2^{\bullet-}$ у фагоцитима, постоји повећан ризик за настајање бактеријских и гљивичних инфекција, које су углавном примарни узрок смрти код ових

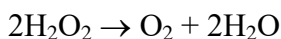
особа и која врло често nastupa пре десете године старости (106). У фагоцитима се синтеза $O_2^{\bullet-}$ одвија деловањем ензима NADPH оксидазе, мембранског ензима који катализује редукцију молекуларног кисеоника уз потрошњу једног NADPH (107).



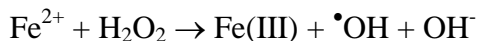
1.2.4 ВОДОНИК ПЕРОКСИД (H_2O_2)

Као што је претходно наведено, додавањем два електрона молекуларном кисеонику настаје пероксидни јон (O_2^{2-}) који се при физиолошким рН вредностима врло брзо протонује при чему настаје водоник пероксид (H_2O_2). H_2O_2 има врло важну улогу као сигнални молекул, чији значај није мањи од Ca^{2+} или АТР. Брзо дифундује кроз ћелије и ткива и непосредно иницира непосредне ћелијске ефекте попут промене облика ћелије, диференцијације или активације имунских ћелија (108, 109).

H_2O_2 настаје као производ великог броја реакција у којима се врши трансфер једног или два електрона. Главни ензимски „произвођачи“ H_2O_2 су NADPH оксидазе и респираторни ланац митохондрија, као и већи број других оксидаза (више од 30 ензима у ћелији продукује H_2O_2) (110, 111). Разградања насталог H_2O_2 се одвија деловањем више ензима, пре свега каталаза, пероксидаза и пероксиредоксина. Реакције које катализују каталазе и пероксидазе су реакције дисмутације у којима се из H_2O_2 добија молекуларни кисеоник и вода (112).



Водоник пероксид користе као супстрат поједини ензими, попут мијелопероксидаза, у продукцији знатно токсичније реактивне врсте, хидроксил радикала ($\bullet OH$).

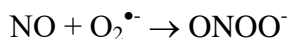


Претходно наведена реакција се назива Фентонова реакција, према аутору који је први описао 1876. године. Фентонова реакција се одвија у биолошким системима *in vivo*, али у изузетно контролисаним условима, јер је доступност и Fe^{2+} и H_2O_2 у физиолошком стању врло ограничена (99).

1.2.5 АЗОТ МОНОКСИД (NO) И ПЕРОКСИНИТРИТ (ONOO⁻)

Азот моноксид (NO) има кључну улогу у регулацији низа физиолошких процеса, пре свега везано за кардиоваскуларни систем. NO, претходно назван „ендотелни фактор релаксације“ (енгл. *Endothelial Derived Relaxing Factor* - EDRF), континуирано синтетише ензим азот моноксид синтаза (NOS), која постоји у три изоформе, ендотелна (eNOS), неурална (nNOS) и индуцибилна (iNOS), при чему су прва два изоензима конститутивни и Ca²⁺ зависни. NO продукован у ендотелним ћелијама из L-аргинина и кисеоника, при чему настају NO и L-цитрулин, има кључну улогу у регулацији васкуларне реактивности (113, 114). NO је снажан вазодилататор са низом протективних својстава, попут инхибиције агрегације тромбоцита, супресије адхезије леукоцита и моноцита за ендотелне ћелије, инхибиције пролиферације глатких васкуларних мишићних ћелија и спречавања васкуларне инфламације (115). Нисходни ефекти NO су делимично повезани са његовим везивањем за солубилну гуанилил циклазу и индукцијом синтезе цикличног гуанозин монофосфата (сGMP) и активације сGMP-зависних протеин киназа (116). NO такође делује и путем више механизма који нису повезани са сGMP.

Као што је претходно наведено eNOS и nNOS су калцијум-зависни ензими са ниском стопом продукције NO, међутим то није случај са iNOS која није Ca²⁺ зависна, већ је индукују цитокини у имунским реакцијама. Такође, у одређеним ситуацијама eNOS продукује знатну количину O₂^{•-} уместо NO. У стањима када је повишена продукција NO и O₂^{•-} врло често се образује врло реактивна врста, пероксинитрит (ONOO⁻).



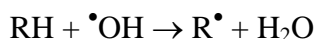
За разлику од NO и O₂^{•-} чија токсичност није толико велика, пре свега захваљујући заштитним антиоксидационим механизмима којима се неутралишу, ONOO⁻ је снажан оксиданс који реагује са готово свим биолошким молекулима (липиди, протеини, ДНК). ONOO⁻ изазива нитрозацију липида и протеина, што је практично примарни механизам оштећења ћелија. Што се тиче оштећења протеина, ONOO⁻ може да узрокује нитрозацију тиола и амина, као и нитрацију тирозина и триптофана, тако да се одређивање нитротирозина врло често користи као мера нитрозативног оштећења. Оштећења изазвана ONOO⁻ су углавном иреверзибилна и следствено узрокују смрт ћелије. Такође, ONOO⁻ делује на функцију митохондрија, што за последицу има индукцију апоптозе или некрозе.

Редукцију пероксинитрита катализују пероксидазе укључујући хем/гвожђе, цистеин или селеноцистеин, као каталитички центар (117-119).

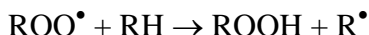
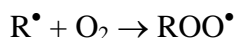
1.2.6 ЛИПИДНА ПЕРОКСИДАЦИЈА

Липидна пероксидација (ЛП) је најпознатији ланац реакција слободних радикала, у којима се врши оксидација липида, пре свега незасићених масних киселина, као и других врста липида, при чему се награђују пероксиди ових једињења. Липидна пероксидација настаје услед „напада“ слободног радикала, хидроксил радикала ($\bullet\text{OH}$), чија синтеза се одвија у складу са претходно описаном Фентоновом реакцијом. Као и све реакције слободних радикала и ЛП може да се подели у више фаза (120):

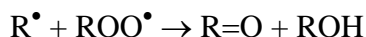
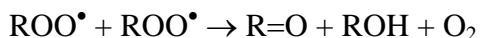
- 1) **Иницијација** – У овој фази слободни радикал реагује са масном киселином при чему настаје алкил радикал – радикал масних киселина. Најчешћи иницијатори ЛП су $\bullet\text{OH}$, пероксил радикал, алкокцил радикал или алкил радикал, као и озон, сумпор диоксид или азот диоксид.



- 2) **Пропагација** – Нестабилни радикали масних киселина реагују са молекулским кисеоником, при чему настају пероксиди. Настали пероксиди су такође нестабилни, реагују са другим молекулима масних киселина при чему настају други радикали масних киселина. На овај начин се реакције ЛП шири, пропагира.



- 3) **Терминација** – При високим концентрацијама слободних радикала настају њихове међусобне реакције, чиме се процес ЛП завршава.



Мембрански фосфолипиди и триглицериди су примарне мете за деловање слободних радикала и настајање липидних радикала. Неензимско уклањање слободних радикала током фазе терминације (*Hock cleavage*) има за последицу стварање групе алдехида различите дужине угљеничних ланаца, као и фосфолипида и триглицерида са скраћеним

угљеничним ланцима, чиме се драстично утиче на пропустљивост мембрана (121). Свеукупно гледано, последице ЛП су двоструке: стварање α, β полинезасићених липидних алдехида и последичне промене организације и структуре ћелијске мембране (122).

Производња α, β полинезасићених липидних алдехида зависи од врста $\omega 3$ и $\omega 6$ полинезасићених масних киселина (енгл. *Polyunsaturated Fatty Acids* - PUFA) на које делује $\bullet\text{OH}$, па тако најчешће настају 4-хидрокси нонеал, 4-хидрокси хексенал, малондиалдехид и акролеин. Велики број истраживања указује на повезаност између ЛП и старења и обољења. Као што је наведено у претходном тексту, ЛП мења пропустљивост и флуидност ћелијских мембрана, што за последицу има промену активности ензимских комплекса који су везани за мембрану. Резултати недавно спроведених истраживања указују на чињеницу да је бифосфатидил глицерол фосфолипид (кардиолипин), који се налази на унутрашњој митохондријској мембрани, изузетно осетљив на ЛП, при чему настају различити хидроперокси. Кардиолипин, који за разлику од осталих фосфолипида, садржи три молекула глицерола и четири ланца масних киселина, има кључну улогу у одржавању структуре криста митохондрија и стабилизацији митохондријских транспортних комплекса (123, 124). Наведене промене резултују у променама садржаја АТФ у ћелији, што последично утиче на све транспортне системе у ћелији. Све наведене промене битно ремете и мењају свеукупну функцију ћелије и посебно су важне у регулацији унутрашњег апоптозошког пута.

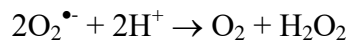
Оксидовани фосфолипиди имају улоге у развоју великог броја различитих хроничних болести, јер настали алдехиди имају цитотоксична, мутагена и канцерогена својства. Као последица ЛП настају и деривати арахидонске киселине, еикосаноиди укључујући леукотријене, простагландине и тромбоксан, који имају кључну улогу у регулацији имунских и инфламаторних функција (125). Међутим, поред наведених штетних ефеката производа ЛП, на основу резултата појединих истраживања може да се наслуте и њихова евентуална протективна својства попут активације антиоксидационих гена и инхибиција инфламаторних путева (126).

1.2.7 АНТИОКСИДАЦИОНИ ЗАШТИТНИ МЕХАНИЗМИ

Улога антиоксиданаса је неутрализација слободних радикала и спречавање оксидационих реакција. Постоји више различитих подела антиоксиданаса, међутим најчешће се деле на: 1) ензимске антиоксидансе, где се убрајају супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион пероксидаза (GPx) и глутатион редуктаза, које су део глутатионског антиоксидационог система, и тиоредоксински систем (Trx), 2) хидрофилне антиоксидансе као што су урати, аскорбинска киселина, глутатион и флавоноиди, и 3) липофилне антиоксидансе, попут каротеноида и токоферола (127). Такође, антиоксиданси могу да се поделе и на оне који се синтетишу ендогено, где спадају антиоксидациони ензими и глутатион, и егзогене антиоксидансе који се уносе исхраном попут каротеноида, флавоноида, витамина и минерала.

1.2.7.1 Супероксид дисмутаза (SOD)

Супероксид дисмутаза (SOD) катализује разлагање супероксид анјон радикала ($O_2^{\bullet-}$) до молекулског кисеоника и H_2O_2 .



И поред чињенице да је и некатализована реакција дисмутације јако брза, SOD је убрзава око 10000 пута, због чега су вредности $O_2^{\bullet-}$ у ткивима знатно ниже него што би биле да изостане дејство SOD. У еукариотским ћелијама постоје два облика SOD: 1) SOD која садржи бакар (Cu^{2+}) и цинк (Zn^{2+}), при чему је Cu^{2+} редукциони центар, а Zn^{2+} структурни елемент, и 2) SOD која садржи Mn^{2+} , који има улогу редукционог центра. Постоји и изоензим SOD који садржи Fe^{2+} , али овај изоензим се налази само код прокариотских ћелија. Cu^{2+}/Zn^{2+} SOD се налази у цитоплазми, а Mn^{2+} SOD се налази у митохондријама. Активност Cu^{2+}/Zn^{2+} SOD се не мења под дејством оксидационог стреса, док је Mn^{2+} SOD индуцибилна форма чија се активност повећава у условима повећане продукције слободних радикала. Ген за Cu^{2+}/Zn^{2+} SOD се налази на хромозому 4p15.1–15.3, док се ген за Mn^{2+} SOD налази на хромозому 6q25 (128).

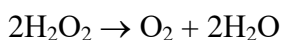
Значај Cu^{2+}/Zn^{2+} SOD се огледа у чињеници да особе код којих постоји мутација гена за овај изоензим развијају амиотрофичку латералну склерозу, фатално неуролошко обољење моторних неурона (129). Код оболелих од амиотрофичке латералне склерозе

развија се дегенерација моторних неурона у церебралном кортексу и кичменој мождини због чега наступа прогредирајућа мишићна слабост, која се најчешће фатално завршава услед пнеумоније индуковане инсуфицијенцијом респираторних мишића. Са друге стране, показано је да супституција валина аланином у молекулу Mn^{2+} SOD повећава њену активност у митохондријама чиме се знатно смањује ризик за настајање коронарне болести срца и акутног инфаркта миокарда (130). Супротно томе, особе које су имале варијанту Mn^{2+} SOD која садржи валин су имале већи ризик за настајање коронарне болести срца и акутног инфаркта миокарда (131).

Наведено је постојење и ванћелијског облика SOD (EC-SOD), који је важан за матрикс и екстрацелуларне протеогликане. Ген за EC-SOD се налази на хромозому 21q22.11., а студије су показале да се активност овог ензима смањује са старењем, такође да је активност EC-SOD смањена код особа са хипертензијом, вазоспастичном ангином, анеуризмом торакалне аорте и калцификованом стенозом аорте. Такође, серумске вредности SOD су биле значајно ниже код особа оболелих од дијабетеса тип 2 (132).

1.2.7.2 Каталаза (CAT)

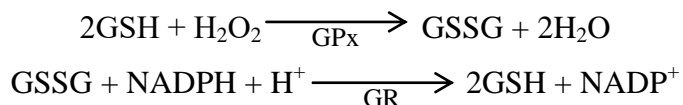
H_2O_2 који настаје дисмутацијом $O_2^{\bullet-}$ или деловањем других оксидаза разлаже се деловањем два ензимска ситема: каталазом (CAT) или глутатион-зависним антиоксидационим системом. Молекул CAT је по структури тетрамер који се састоји из четири идентичне субјединице. Сматрало се да се CAT активира само при високим концентрацијама H_2O_2 , што у принципу није тачно, јер молекул CAT садржи везивно место за NADPH, и када је NADPH везан активност CAT је приближна активности глутатионског система. Претходно наведена чињеница практично значи да CAT разложи око 50% H_2O_2 у ћелији до кисеоника и воде (133).



Ген за CAT се налази на хромозому 11p13, а показано је да недостатак CAT доприноси настајању дијабетеса тип 2 (134). У стањима оксидационог стреса настаје модификација цистеина у цистеинску киселину, што узрокује тирозил нитрацију CAT и последично смањење њене активности. Такође показано је да на активност CAT може да утиче старост, физичка активност и велики број хемијских једињења.

1.2.7.3 Глутатионски антиоксидациони систем

Синтеза глутатиона је блиско повезана са претходно описаним метаболизмом метионина и хомоцистеина. Наиме, током трансулфурационог циклуса се из Нсу синтетише цистеин, што представља један од ограничавајућих корака у синтези глутатиона (Слика 1). Деловањем ензима γ -глутамилцистеин синтетазе од цистеина и глутамата награђује се γ -глутамилцистеин (135). У наредном кораку, под ензимским деловањем глутатион синтетазе на карбокси-терминални крај γ -глутамилцистеина додаје се глицин, при чему настаје глутатион (GSH), један од главних ендогених антиоксиданаса. Поред глутатиона, глутатионски антиоксидациони систем садржи и два ензима, глутатион пероксидазу (GPx) и глутатион редуктазу (GR), а током функционисања система глутатион се трансформише из редукованог у оксидовани облик и обрнуто.



Као и други ензими који катализују интерконверзију сулфхидрилних група и дисулфида, GR садржи флавин аденин динуклеотид (FAD) као кофактор. Што се тиче GPx, практично постоји група филогенетски сличних ензима, која се састоји из три еволутивне подгрупе: GPx1/GPx2, GPx3/GPx5/GPx6 и GPx4/GPx7/GPx8 (136). GPx при разградњи H_2O_2 користи GSH као редукујући кофактор, а поред H_2O_2 GPx могу да катализују и разградњу ONOO^- . Различите изоформе GPx испољавају антиоксидациона својства у различитим деловима ћелије, па се тако GPx1 налази искључиво у цитоплазми и митохондријама, GPx2 у цитоплазми и једру, GPx3 у плазми, док је GPx4 везана за мембране и штити их од липидне пероксидације (137). GPx1 је убиквитарни ензим чији недостатак се доводи у везу са ендотелном дисфункцијом, срчаном слабошћу, поремећајем структуре васкуларног зида и миокарда (138). Оно што је карактеристично за све изоензиме GPx је да садрже селен, односно аминокиселину селеноцистеин, која се уграђује у полипептидни ланац помоћу специфичне тРНК, која се првобитно синтетише као тРНК за серин, али након низа измена трансформише се у тРНК за селеноцистеин. Аминокиселина селеноцистеин је кодирана триплетом нуклотида UGA, који је један од такозваних стоп кодона, али у случају GPx кодира селеноцистеин (139). Антиоксидациона својства селена се заснивају управо на његовом уграђивању у GPx. Недовољан унос

селена се манифестује кардиомиопатијом, која је делимично изазвана оксидационим оштећењем услед поремећене функције GPx, али такође и других ензима које садрже селен. Интересантна је чињеница да HNSу узрокује васкуларни оксидациони стрес и атеротромбозу супримирањем активности GPx1, чији ген се налази на хромозому 3p21.3 (140). Поред чињенице да је атеросклероза мултифакторска болест, поремећај активности GPx3, као главног ванћелијског облика GPx, представља један од круцијалних фактора за настанак атеросклерозе. Важна улога GPx3 се огледа у хомеостази синтезе NO од стране ендотелних ћелија и тромбоцита. Недостатак GPx3 се повезује са смањењем доступности NO и хиперактивношћу тромбоцита, чиме се знатно повећава ризик за настајање тромбозе (141). Показано је и да на активност GPx3 утиче антиоксидациони одговор који индукује PPAR (енгл. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*), чиме се сугерише улога овог селеноензима у регулацији ванћелијског оксидационог стреса који има улогу патогенези инсулинске резистенције, и последично дијабетеса тип 2.

Повећана експресија GPx4 смањује оксидацију фосфолипида, количину хидропероксида холестерола и проинфламаторних липидних пероксида који настају деловањем ензима липидне пероксидазе и циклооксигеназе (142, 143).

1.2.7.4 Антиоксидациони систем тиоредоксина

Тиоредоксин (Trx) антиоксидациони систем је ендогени антиоксидациони систем од кључног значаја за регулацију телесне редокс хомеостазе, а састоји се од NADPH, тиоредоксин редуктазе (TrxR) и Trx. Наиме, TrxR користи NADPH, редукује оксидовани Trx, који потом користе други ензими као кофактор реакцијама размене дитиол-дисулфида, и ово је један од кључних механизма који су укључени у одржавање редукованог стања у ћелији, пре свега очувањем цистеинских група у редукованом стању (144). Trx антиоксидациони систем има улогу у репарацији оксидационог оштећења ДНК и протеина редуковањем ензима рибонуклеотид редуктазе и метионин сулфоксид редуктазе. TrxR су димерни ензими који садрже FAD и који катализују NADPH-зависну редуkcију дисулфида у активном месту оксидованог Trx (Trx-S₂), при чему настаје редуковани Trx са две тиолне групе (Trx-(SH)₂).

Код сисара постоје три изоензима TrxR: TrxR1, махом заступљена у цитоплазми и једру, која редукује у Trx1, TrxR2 која се налази у митохондријама и која редукује Trx2, и тиоредоксин-глутатион редуктаза (TrxR3), специфична за тестисе.

Резултати истраживања су показали да су TrxR1 и TrxR2 ензими који одржавају хомеостазу ћелије у физиолошким условима, не само у стању стреса, тако да је делеција било ког од ова два ензима интраутерино летална (145-147). Повећање уноса селена индукује повећање експресије гена за TrxR1 и TrxR2, док је у недостатку селена TrxR2 отпорнији на разградњу. Међутим, није селен једини регулатор експресије и активности TrxR, већ могу да делују и други фактори, попут оксидационог стреса и фактора раста. Пошто ROS делују као брзи секундарни гласници, такође је брза и модулаторна улога Trx/TrxR система. На пример, показано је да Trx/TrxR систем изазива активацију Ras протеина, малих G протеина, у кардиомиоцитима оксидацијом тиолних група Ras протеина (148).

Показано је да већи број патолошких стања утиче на Trx/TrxR систем, тако да постоји могућност да деловање на овај систем буде један од терапијских приступа. Један од примера је и HIV инфекција. Наиме, код Т лимфоцита инфицираних HIV смањена је експресија TrxR1 (149). Са друге стране, код агресивних карцинома, меланома, тиреоидних карцинома, карцинома дојке, простате и колоне постоји прекомерна експресија Trx1 и TrxR1, имајући у виду да тумори опстају у стресогеном окружењу и ослањају се на Trx/TrxR систем као заштиту од промене редокс сигнализације (150, 151).

1.2.7.5 Антиоксиданси мале молекулске масе

Више молекула са малом молекулском масом испољавају антиоксидациона својства, попут каротеноида, билирубина и мокраћне киселине. У назначајније се свакако убрајају два витамина, аскорбинска киселина (витамин С) и α -токоферол (витамин Е). Аскорбинска киселина је хидросолубилно једињење које реагује са слободним радикалима које настају у воденом окружењу при чему настаје нешкодљиво једињење аскорбат семиквинон (152). Настали молекул семиквинона се разлаже реакцијом дисмутације у којој од два молекула семиквинона настаје један молекул аскорбата и дехидроаскорбата.

Дехидроаскорбат се потом редукује до аскорбата деловањем ензима дехидроаскорбат редуктазе (153).

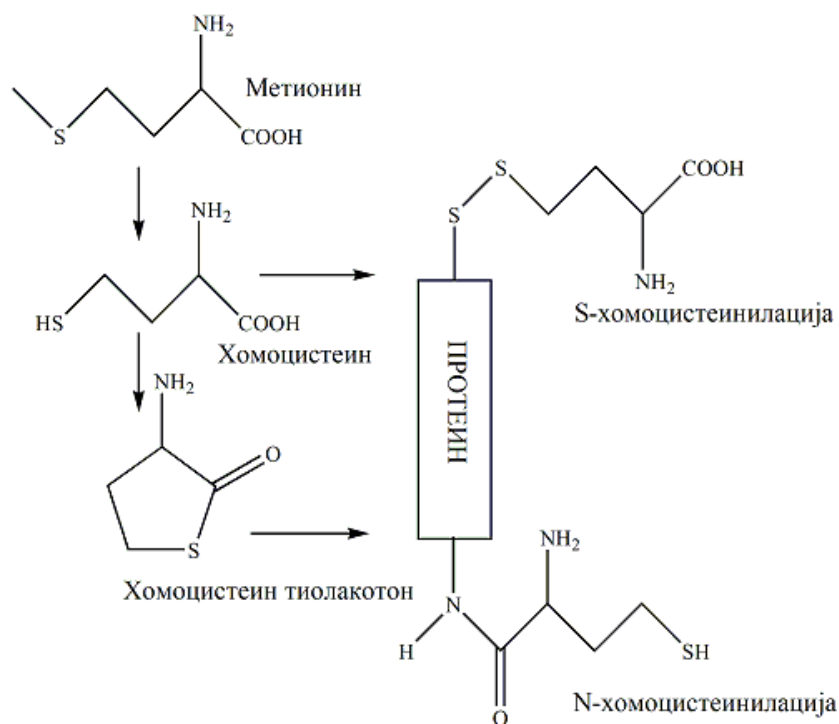
α -токоферол је липофилно једињење које представља главни антиоксиданс ћелијских мембрана. Реагује са слободним радикалима при чему настаје стабилно једињење токоферол-семиквинон, које се поново редукује деловањем аскорбинске киселине (154).

Један од молекула који поседује посебна антиоксидативна својства је таурин, аминокиселина која садржи сумпор. Таурин реагује са слободним радикалима који се ослобађају из фагоцита током атака на патогене (хипохлораста киселина), међутим ови слободни радикали због велике реактивности могу у великој мери да оштете и друге структуре. У овим реакцијама настају једињања чија реактивност је знатно нижа, услед чега су практично безопасна (155).

1.2.8 КАРДИОВАСКУЛАРНИ СИСТЕМ, ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС И ХОМОЦИСТЕИН

Као што је претходно наведено, повишене вредности Нсу представљају ризик за настајање великог броја обољења и патолошких стања, при чему је најбоље испитан утицај Нсу на кардиоваскуларни систем (156, 157). Токсичност Нсу се, пре свега, заснива на хомоцистеинилацији протеина и последичној модификацији њихове структуре и функције. Хомоцистеинилација је посттранслациона модификација протеина која је директно сразмерна концентрацији Нсу. Постоје два облика хомоцистеинилације (**Слика 6**), S-хомоцистеинилација, када се молекул Нсу тиолном групом везује за другу тиолну групу из цистеина у молекулу протеина при чему настаје дисулфидни мост између молекула Нсу и протеина, и N-хомоцистеинилација, када се молекул Нсу TL веже аминокиселине лизина из полипептидног ланца. На овај начин мења се функција великог броја протеина попут албумина, хемоглобина, имуноглобулина, LDL, HDL, трансферина, фибриногена, као и Na^+ , K^+ -АТФ-азе (47, 158, 159). N-хомоцистеинилација мења функцију протеина додавањем нових слободних тиолних група, као и инактивацијом слободних аминокиселина група, мењајући свеукупни редокс потенцијал протеина што је праћено повећањем оксидационог стреса (160). Патолошке последице N-

хомоцистеинилације подразумевају цитотоксичност, која је индукована кроз стрес ендоплазматског ретикулума, убрзану разградњу протеина, инактивацију ензима и продукцију амилоида. Такође, показано је да N-хомоцистеинилиновани протеини могу да делују као неоантигени, фаворизујући имунски одговор који заузима централно место у патогенези атеросклерозе, атеротромбозе и последично, можданог удара и инфаркта миокарда (161).



Слика 6. Хомоцистеинилација протеина.

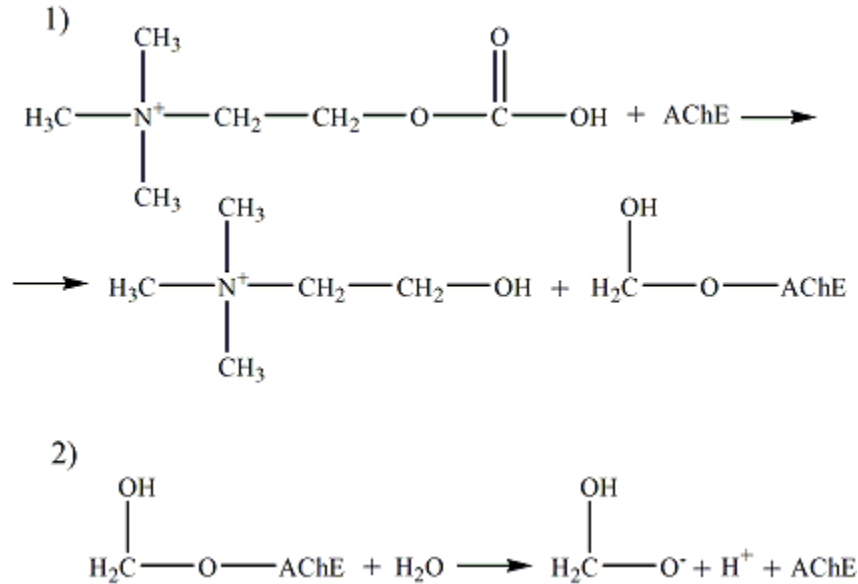
Једна од првих хипотеза везано за токсичност Нсу сугерисала је штетно дејство H_2O_2 који настаје у редокс реакцијама укључујући тиолну групу Нсу. Оксидациони стрес настаје оксидацијом слободних тиолних група Нсу које формирају дисулфидне мостове са различитим протеинима, пре свега са албуминима, другим нискомолекулским тиолима плазме или другим молекулима Нсу. Индукцијом оксидационог стреса, Нсу ствара велики број других слободних радикала, попут хидроксил радикала, који везују електроне из других молекула, липида, протеина, нуклеинских киселина, чиме се изазива ендотелна дисфункција и оштећење васкуларног зида, а крајњи резултат је атеросклероза и атеротромбоза. Аутооксидацијом метаболита Нсу накопља се H_2O_2 , чиме се ствара снажно прооксидационо окружење. За сада је предложено неколико потенцијалних механизма којима Нсу индукује оксидациони стрес: 1) аутооксидација Нсу, 2) инхибиција

антиоксидационих ензима у ћелији, 3) уклањање екстрацелуларне SOD са површине ендотела, 4) активација NADPH оксидаза, и 5) повећано стварање $O_2^{\bullet-}$ од стране NOS (162, 163).

Као што је наведено у претходном тексту, Hcy је препознат као независни фактор ризика за настајање кардиоваскуларних болести (КВБ). Процењује се да свако повећање вредности Hcy за 2,5 μmol изнад граничне вредности (15 $\mu\text{mol/l}$) повећава ризик за настајање КВБ за 10% (164). Штавише показано је да повећање вредности Hcy изнад 20 $\mu\text{mol/l}$ деветостуко повећава ризик од настајања инфаркта миокарда и možданог удара у односу на вредности Hcy испод 9 $\mu\text{mol/l}$ (165). И поред свега, кључно питање које се тиче HHcy и патогенезе КВБ је да ли је HHcy директни и непосредни узрочник КВБ, ризик за оштећење или је HHcy маркер који рефлектује поремећаје метаболизма који за последицу имају КВБ. Постоји позитивна корелација између инфаркта миокарда, због чега је Hcy окарактерисан као холестерол 21-вог века. И поред наведених чињеница, резултати клиничких студија које су се бавиле ефектима суплементације витаминима В комплекса на смањење вредности Hcy и снижење ризика на настајање КВБ су врло често међусобно супротстављени и опречни, тако да не постоји заједнички став или препорука о суплементацији витаминима В комплекса у популацијама са повећаним ризиком за КВБ (166-169). У ендотелу коронарних артерија, Hcy смањује функцију тетрахидробиоптерина, који је изузетно битан у вазодилатацији у којој посредује NO. Такође, изгледа да утицај HHcy на метаболизам фолата, који учествује у одржавању равнотеже у продукцији NO, интензивнији у односу на индукцију оксидационог стреса, што говори у прилог чињеници, да Hcy није само изазивач ендотелне дисфункције, већ и биомаркер постојећег оштећења (170). Постоји могућност да Hcy учествује у патогенези артеријске хипертензије јер је показано да Hcy изазива задебљање зидова артерија код прехипертензивних пацијената, а са друге стране однос SAM/SAH може да се користи као врло прецизан дијагностички маркер атеросклерозе (84, 171, 172).

1.3 АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРАЗА И КАРДИОВАСКУЛАРНИ СИСТЕМ

Ацетилхолинестераза (AChE) је ензим који катализује хидролизу ацетилхолина до холина и ацетата (Слика 7).



Слика 7. Дејство ацетилхолинестеразе.

1.3.1 ОСНОВНЕ ОДЛИКЕ АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРАЗЕ

Неуромишићна спојница кичмењака састоји се из три дела: 1) пресинаптички завршетак моторног неурона, 2) постсинаптичка мембрана мишићне ћелије, 3) синаптичка пукотина и околне глија ћелије. Из пресинаптичког завршетка се ослобађа ацетилхолин (ACh), који се везује за одговарајуће никотинске рецепторе на синаптичкој мембрани омогућавајући трансмисију сигнала са нервног влакна на мишићну ћелију. Дејство ACh у синаптичкој пукотини се брзо окончава деловањем AChE (173).

Код кичмењака постоје две врсте холинестераза, AChE и бутилхолинестераза, дејство AChE је претходно описано, док је улога бутилхолинестеразе још увек предмет истраживања. Постоје три различита облика AChE која потичу од истог гена, али посттранслационом обрадом иРНК (енгл. *splicing*) сваки од ових облика има различит

карбокси-терминални крај. Изоформе AChE се обележавају као: AChE-T (*tail*), која је истовремено најзаступљенија и главна форма заступљена у мозгу и мишићима, док су AChE-H (*hydrophobic*) и AChE-R (*readthrough*) варијанте мање заступљене (173).

Сви облици AChE, секреторни или везани за мембране, су гликопротеини који се синтетишу у гранулираном ендоплазматском ретикулуму а потом подлежу гликозилацији, при чему се додају три или четири олигосахарида на аспарагинске аминокиселинске остатке (174). Молекули AChE затим подлежу процесима набирања, склапања и контроле „квалитета“ пре него буду упућени у Голџијев апарат где се врши додатна обрада и паковање у везикуле којима се транспортују до одговарајућег места у ћелији.

1.3.2 АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРАЗА, ХОМОЦИСТЕИН И СРЦЕ

Активност AChE се углавном везује за патолошка стања централног нервног система, пре свега за Алцхајмерову деменцију и друге облике деменције. Једна од најочљивијих карактеристика Алцхајмерове болести је губитак холинергичких маркера. Резултати појединих истраживања указују да у оквиру патогенезе Алцхајмерове болести постоји губитак појединих изоформи AChE услед чега настају промене у односу изоформи AChE заступљених у мозгу. Постоји позитивна корелација између експресије амилоида β , концентрације AChE и неадекватно гликозилираних AChE код пацијената са Алцхајмеровом болешћу (175, 176). У сенилним плаковима, карактеристичним променама везаним за Алцхајмерову болест, постоји колокализација амилоида β и AChE, при чему AChE промовише накупљање амилоида β и стварање депозита (176). Такође је примећено да код особа са HHCу постоји повећан ризик за настајање Алцхајмерове деменције, као и да вредности HHCу корелирају са експресијом амилоида β (177). Показано је да HHCу индукована хиперметионинском исхраном модулира активност AChE у мозгу експерименталних животиња, док је са друге стране примена инхибитора AChE узроковала побољшање код експерименталних животиња са Алцхајмеровом болешћу (178).

Постоји ограничен број истраживања која се директно баве испитивањем функције и улоге AChE у функцији миокарда и васкуларног система. Познато је да миокард садржи AChE, и на основу истраживања на срцима експерименталних животиња показано је да је AChE дистрибуирана у преткоморама и у коморама (179, 180). Такође, применом донепезила, инхибитора AChE, спречен је настанак хипертензије код спонтано-

хипертензивних пацова (181). Истовремена примена донезапила и лосартана превенирала је прогресију срчане инсуфицијенције и повећала дугорочно преживљавање на експерименталном моделу хроничне срчане инсуфицијенције (182). Имајући у виду све претходно наведене чињенице, значај кардиоваскуларних обољења као социомедицинског проблема данашњице, заступљености хиперхомоцистеинемије у популацији и значаја хомоцистеина као фактора ризика за настанак кардиоваскуларних болести, као и међусобне повезаности хомоцистеина и ацетилхолинестеразе у патогенези обољења других органа, од великог интереса је испитивање њиховог патогенетског утицаја у развоју кардиоваскуларних болести.

II

ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Општи циљ:

Циљ ове студије би био да испита функционалне, биохемијске и хистолошке промене у кардиоваскуларном систему пацова у условима акутне и субхроничне стимулације метионином.

Специфични циљеви:

1. Испитивање ефеката акутне стимулације метионином (акутна хиперметионинемија индукована интраперитонеалном апликацијом метионина) на параметре оксидативног стреса у плазми код пацова (ензими: каталаза-CAT, глутатион пероксидаза-GPx, супероксид дисмутаза-SOD, и индекс липидне пероксидације-малондиалдехид - MDA).
2. Испитивање ефеката акутне стимулације метионином (акутна хиперметионинемија индукована интраперитонеалном апликацијом метионина) на активност ензима ацетилхолинестеразе у ткиву срца пацова.
3. Испитивање ефеката субхроничне стимулације метионином (субхронична хиперметионинемија индукована интраперитонеалном апликацијом метионина у току 3 недеље): а. на промене телесне масе пацова, б. биохемијске параметре у серуму пацова (хомоцистеин, фолна киселина, витамина В₁₂, глукоза, уреа, креатинин, мокраћна киселина, капацитет за везивање гвожђа, гвожђе, укупни протеини, албумин, укупни холестерол, LDL, HDL, триглицериди, електролити, трансаминазе, алкална фосфатаза, гама-глутамил трансфераза, амилаза, CRP), ц. хемостатске параметре у плазми пацова (фибриногена, Д-димер и вон Вилебранд фактор), д. постојање хистоморфолошких промена у срцу и аорти пацова, е. на параметре оксидативног стреса у плазми код пацова (ензими: каталаза-CAT, глутатион пероксидаза-GPx, супероксид дисмутаза-SOD, и индекс липидне пероксидације-малондиалдехид - MDA) на активност ензима ацетилхолинестеразе у ткиву срца пацова.

4. Испитивање ефеката истовремене субхроничне примене метионина са L-цистеином (индуковано интраперитонеалном апликацијом супстанци у току 3 недеље): а. на промене телесне масе пацова, б. биохемијске параметре у серуму пацова (хомоцистеин, фолна киселина, витамин В₁₂, глукоза, уреа, креатинин, мокраћна киселина, капацитет за везивање гвожђа, гвожђе, укупни протеини, албумин, укупни холестерол, LDL, HDL, триглицериди, електролити, трансминазе, алкална фосфатаза, гама-глутамил трансфераза, амилаза, CRP), ц. хемостатске параметре у плазми пацова (фибриногена, Д-димер и вон Вилебранд фактор), д. постојање хистоморфолошких промена у срцу и аорти пацова.
5. Испитивање ефеката истовремене субхроничне примене метионина са N-ацетил-L-цистеином (индуковано интраперитонеалном апликацијом супстанци у току 3 недеље): а. на промене телесне масе пацова, б. биохемијске параметре у серуму пацова (хомоцистеин, фолна киселина, витамин В₁₂, глукоза, уреа, креатинин, мокраћна киселина, капацитет за везивање гвожђа, гвожђе, укупни протеини, албумин, укупни холестерол, LDL, HDL, триглицериди, електролити, трансминазе, алкална фосфатаза, гама-глутамил трансфераза, амилаза, CRP), ц. хемостатске параметре у плазми пацова (фибриногена, Д-димер и вон Вилебранд фактор), д. постојање хистоморфолошких промена у срцу и аорти пацова.

III

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. МАТЕРИЈАЛ

У овој експерименталној студији употребљене су супстанце и аналитички стандарди високе чистоће произвођача Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Немачка.

3.1.1. DL-метионин, L-цистеин и N-ацетил-L-цистеин

DL-метионин >97% ($^{13}\text{CH}_3\text{S}^{13}\text{CH}_2^{13}\text{CH}_2^{13}\text{CH}^{15}\text{NH}_2^{13}\text{CO}_2\text{H}$; MW=155,17; каталошки број производа 608106-100MG), L-цистеин >97% ($\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$; MW=121,16; каталошки број производа 168149-2.5G) и N-ацетил-L-цистеин >99% ($\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NHCOCH}_3)\text{CO}_2\text{H}$; MW=116,19; каталошки број производа A7250-5G) од произвођача Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Немачка.

3.1.2. Супстанце и реагенси за одређивање биохемијских и параметара хемостазе и оксидационог статуса

За аналитичко одређивање параметара оксидационог статуса, коришћени су комерцијални реагенси *pro analysis* квалитета произвођача Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Немачка. За детерминацију малонилдиладехида (MDA): 2-тиобарбитурна киселина (ТВА, $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$), Mr 144.15; натријум хидроксид (NaOH) Mr 40.00. За рутинске биохемијске анализе: пикринска киселина, раствор NaOH, стандард креатинина, HCl и трихлорсирћетна киселина (ТСА).

3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ

Све експерименталне процедуре су се спроводиле у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију Медицинског факултета у Београду. При експерименталном раду су поштоване одредбе прописаних аката (*EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC*) и принципа етичности. Експериментални протокол је одобрен у оквиру пројекта ОИ175043 Министарства просвете и науке Републике Србије (којим руководи Проф. др Драган Ђурић) и који се заједнички спроводи на Медицинском факултету у

Београду и Факултету медицинских наука у Крагујевцу, као и дозвола Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Медицинског факултета у Београду, Универзитета у Београду. Спроведена студија је по дизајну експериментална студија на материјалу анималног порекла *in vitro*.

3.2.1 Анимални модел

У истраживању са акутном и субхроничном апликацијом DL-метионина коришћени су мужјаци пацова соја *Wistar albino* (n=48), почетне телесне масе око 160 g и старости 15-20 дана на почетку експеримента (виваријум Војномедицинске академије у Београду). Пацови су се чували појединачно у плексиглас-транспарентним кавезима са дном обложеним шушком, са храном и водом доступном *ad libitum* и константним амбијенталним условима (температура 21 ± 2 °C; влажност 55 ± 5 %; циклус светло-тама на 12 часова са почетком светлог периода у 8:00 часова).

3.2.2. Протокол истраживања

Истраживање је спроведено акутно и субакутно. Акутна серија експеримента подразумевала је једнократну примену DL-метионина, док је субхронична серија експеримента подразумевала период субхроничне апликације DL-метионина, L-цистеина и/или N-ацетил-L-цистеина, самостално или у комбинацији у трајању од 3 недеље, при чему су животиње биле подељене у одговарајуће групе са по 8 животиња у појединачним групама (укупно 48 животиња).

У акутној серији експеримента, животиње су биле подељене у две групе:

1. контролну групу (0,9% NaCl 0,1-0,2 ml/дан) (n=8) и
2. групу стимулисану DL-метионином (0,8 mmol/kg/tt/дан) (n=8) (MET група), којима се интраперитонеално администриро DL-метионин једнократно.

У субакутној серији експеримента, животиње су биле подељене у четири групе, којима се администрирала супстанца према следећој схеми:

1. контролна група (0,9% NaCl 0,1-0,2 ml/дан) (n=8) (183);

2. DL-метионин (0,8 mmol/kg/tt/дан) (n=10) (МЕТ група);
3. DL-метионин (0,8 mmol/kg/tt/дан) + L-цистеин (7 mg/kg/tt/дан) (n=8) (L-цис+DL-мет група);
4. DL-метионин (0,8 mmol/kg/tt/дан) + N-ацетил-L-цистеин (50 mg/kg/tt/дан) (n=8) (NAC+ DL-мет група).

Пре почетка, али и током истраживачког периода, све животиње су биле под сталним мониторингом при чему се недељно пратила телесна маса сваке животиње. Након завршеног акутног (после 60 минута) или субхроничног третмана (22.-ог дана) одговарајућим супстанцама, животиње су жртвоване гиљотином за пацове, при чему су се узимали узорци крви и ткива срца. Метода подразумева искрвављење животиње кроз стаклени левак у одговарајуће вакутајнере (напомена: због опсежне механичке трауме познато је да се применом ове методе очекују нешто више вредности одређених биохемијских параметара). Након прикупљања узорци крви су 15 мин били на собној температури, а затим центрифугирани (15 мин на 3000 обртаја), и потом анализирани (плазма или серум).

3.3. БИОХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ

3.3.1. Одређивање концентрације глукозе

Мерење глукозе се заснива на рутинској методи одређивања концентрације глукозе из пуне крви апаратом Accu-Chek Performa (Roche., Germany) након дванаесточасовног периода гладовања пацова.

3.3.2. Одређивање концентрације урее и креатинина

Одређивање концентрације креатинина у серуму се заснива на методи по Jaffe-у (186). Креатинин са пикринском киселином у алкалној средини даје обојену реакцију, коју ствара таутомер креатинин-пикрата. По развоју боје на колориметру читава се абсорбанца на таласној дужини од 490 nm. Концентрација креатинина се израчунава формулом: $\text{конц. креатинина} = (\text{Est/Eur}) \times 0,2 \times 50 \times 10$.

Одређивање концентрације урее у серуму се заснива на методи по Berteloth-у (187). Уреа се у присуству уреазе разлаже на амонијак, угљен диоксид и воду. Амонијак у базној

средини реагује са фенолом и хипохлоритом при чему настаје индофенол плаве боје, а као катализатор се користи натријум нитропрусид. Очитавање абсорбанце се врши помоћу зеленог филтера на таласној дужини од 540 nm.

3.3.3. Одређивање концентрације укупног билирубина, аспартат и аланин аминотрансферазе (AST и ALT), алкална фосфатаза (ALP), амилазе (Аму), гама-глутарил трансферазе (γ GT), протеина, албумина и гвожђа

Одређивање укупне концентрације билирубина у серуму спроведено је спектрофотометријском методом. Метода се заснива на реакцији са диазо-реагенсом. Концентрације ензима јетре (AST, ALT, ALP, Аму, γ GT) су се одређивале колориметријским и другим методама. Биосинтетска функција јетре се одређивала мерењем концентрације протеина и албумина у серуму спектрофотометријским методама (188, 189).

3.3.4. Одређивање укупног холестерола, HDL-холестерола и триглицерида

Дванаест сати пре узимања крви животињама је ускраћена храна, јер би узимање хране непосредно пре узимања крви значајно променила резултате, јер се након оброка значајно повећава концентрација триглицерида. Након центрифугирања крви на 3000 – 4000 обртаја/минути током 10 минута, издваја се серум. У серуму смо мерили концентрацију укупног холестерола, триглицерида, липопротеине високе густине (HDL - High Density Lipoproteins) који су подељени према саставу тј, густини после ултрацентрифугирања (190).

Холестерол се одређује фотометријском стандардном методом, у којој је реагенс за холестерол холестерол-оксидаза која реагује са хромогеном и даје промену боје у интензитету који је пропорционалан концентрацији холестерола. Триглицериди и остали липотротеини се такође одређују класичном фотометријском методом (190).

3.3.5. Одређивање натријума, калијума, хлора и калцијума

Одређивање биохемијских параметара у серуму спроведено је индиректном потенциометријском методом (натријум, калијум и хлор) (191).

3.4. АНАЛИЗА СПЕЦИФИЧНИХ БИОХЕМИЈСКИХ ПАРАМЕТАРА И МАРКЕРА ХЕМОСТАЗЕ

3.4.1. Одређивање C-реактивног протеина, фибриногена, D-димера и Von-Villebrandov-ог фактора

C-реактивни протеин (CRP) је одређиван имунотурбидиметријском методом (PETIA), комерцијалним китовима (Siemens Healthcare Diagnostics Ltd., Frimley, Camberley UK) на аутоматском анализатору (Dimension Xpand, Siemens, Germany) (192).

Фибриноген смо одређивали методом која се заснива на реакцији са амонијум-сулфатом, који у присуству сулфата и приодређеној вредности рН коагулише у виду ситних агрегата који праве замућење па се одређују турбидиметријски (192).

Као разградни продукт фибрина, одреживали смо D димер и то методом латекс аглутинације која даје макроскопски видљиве комплексе (193).

3.4.2. Одређивање хомоцистеина, фолне киселине и витамина B₁₂

Крв за одређивање хомоцистеина (3 – 4 ml) је сакупљана у епрувете без додатка антикоагуланса, у току жртвовања животиња, након чега је центрифугирана како би се издвојио серум. Након центрифугирања и сепаратисања, замрзавани су узорци на -20°C унутар једног сата од издвајања серума.

У узорцима смо одређивали и вредности хомоцистеина методом електрохемолуминисценције (ECL-electrochemoluminescence immunoassay system, ADVIA Centaur XP System, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Germany), при чему је опсег референтних вредности $H_{cy} < 15 \mu\text{mol/l}$. Претходно наведеном методом и апаратом одређивали смо и витамин B₁₂ и фолну киселину.

3.5. АНАЛИЗА ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА

3.5.1. Одређивање продуката липидне пероксидације (малондиалдехид, MDA)

Садржај MDA у плазми се одређује употребом тиобарбитуратног есеја (194). У 500 μl узорка се додаје 500 μl 25% HCl и 500 μl 1% тиобарбитурне киселине у 50 mM NaOH. Смеша се загрева 10 минута у кључалом воденом купатилу, а затим охлади до собне температуре. Затим се 3 ml n-бутанола придодаје за екстракцију и промеша на вортексу у

трајању од 30 секунди. Да би се успешно одвојиле фазе узорци се центрифугирају (10 минута на $2000\times g$). Садржај малондиалдехида се одређује спектрофотометријски мерењем апсорбанце органске фазе (горњи слој) на 532 nm. Слепе пробе садржи 50 mM NaOH уместо тиобарбитурне киселине, и припремају се за сваки узорак појединачно. Вредности садржаја малондиалдехида се изражавају као nmol MDA/ml плазме, а одређују се на бази измерене вредности апсорбанце и моларног апсорпционог коефицијента формираног комплекса малондиалдехида и тиобарбитурне киселине.

Сви параметри оксидативног стреса анализирају се спектрофотометријски (*UV/VIS UV-2601, Rayleigh, Mainland, China*). Све неопходне супстанце су набављене од компаније Sigma Chemical Co. (USA), и коришћене су *pro analysis* квалитета.

3.5.2. Одређивање активности каталазе (CAT)

Активност каталазе се одређује есејом који прати разградњу H_2O_2 (195). 50 μ L суспензије плазме се додаје у стаклене (кварчне) епрувете на собној температури, које садрже 2,975 ml 50 mM раствора фосфатног пуфера у 0,4 mM EDTA. Ензимска реакција започиње додавањем 30 μ L 3% H_2O_2 . Редукција апсорбанце настаје као резултат разградње ензима H_2O_2 (регистровањем на 240 nm током 3-5 минута). Активност каталазе се изражава као U/ml плазме. Јединица (U) ензимске активности се дефинише као 1 μ L утрошеног H_2O_2 /мин.

3.5.3. Одређивање активности глутатион пероксидазе (GPx)

Процедура за мерење активности GPx почиње припремом реакционе смеше, која се састоји од: 8,9 ml фосфатног пуфера, pH 7 (50 mM NaH_2PO_4 + 0,40 mM EDTA), 50 μ l 200 mM редукованог глутатиона, 1 mg β -NADPH и 100 μ l 100 units/ml глутатион редуктазе из пекарског квасца (*Sacharomyces cerevisiae*). 3 ml реакционе смеше и 0,3 ml узорка плазме се додају у кварцну стаклену кивету на собној температури. Кивета се ставља у спектрофотометар, а затим се започиње ензимска реакција додатком 50 μ l 0,042% H_2O_2 ($A_{240} = 0,52-0,56$). Пад апсорбанце ($\lambda = 340$ nm) у интервалима од по 15 секунди за време 4-5 минута се региструје, све до престанка промене. GPx активност се изражава као ΔA /мин/ml плазме (197).

3.5.4. Одређивање активности супероксидне дисмутазе (SOD)

Активност супероксидне дисмутазе (SOD) се одређује према методи *Misra* и *Fridovich* (197). 10-30 μ l суспензије плазме се додаје у 3 ml 0,5 M EDTA-натријум карбонатног пуфера (pH 10,2). Ензимска реакција започиње додатком 100 μ l адреналина (30 mM у 0,1 M HCl). SOD активност се мери на таласној дужини од 480 nm током 4 минута. Јединица (У) SOD се дефинише као количина ензима која инхибира брзину оксидације адреналина за 50%. Ензимска активност се изражава као U/ml плазме.

3.5.5. Анализа активности ензима ацетилхолинестеразе у ткиву срца (AchE)

Специфична активност ацетилхолинестеразе (AchE) у ткивном хомогенату срца се одређивала *in vitro* спектрофотометријски методом по Ellman-у (198). Метода се базира на реакцији промене боје (5, 5-дитио-бис-2-нитробензојеве киселине) са продуктом хидролизе тиохолинског супстрата, ацетилхолин јодид тиохолина, да би се наградило једињење 5-тио-2-нитро-бензоат, жуте боје, чији интензитет је пропорционалан специфичној активности AchE.

3.6. ХИСТОЛОШКА И МОРФОМЕТРИЈСКА АНАЛИЗА

За морфолошку, морфометријску и имунохистохемијску анализу је коришћено ткиво аорте и срца. Ткиво десцендентне торакалне аорте дужине 3 cm, је подељено на сегменте дужине 1 cm. Срце је било оријентисано и исечено на попречне резове дебљине 3 mm. Ткиво је било фиксирано имерзионим поступком у 4% неутрално пуферисаном формалдехиду у току најмање 24 часа. Потом је било дехидратисано алкохолима растућих концентрација, просветљавано у ксилолу и калупљено у Парапласту апаратом за калупљење (*Tissue Tech II Tissue Embedding Center*). Сваки калуп је потом пажљиво нивелисан и сечен до појаве целе дебљине зида крвног суда или срца. Калупи ткива су серијски сечени микротомом (*Leica Reinhart Austria i Leica SM 2000 R*) на исечке дебљине 5 μ m.

Исечци аорте су бојени селективним методама за бојење еластичних влакана: Weigert van Giesonovim бојењем са резорцин фуксином, Voerhoff van Giesonovim бојењем

и бојењем по Pinkusu са киселим орцеином. Наведена бојења омогућавају процену атеросклерозе и морфометријску анализу којом се потврђује облик ремоделовања аорте.

Исечци срца су бојени следећим техникама: хематоксилином и еозином, РТАН методом, Massonovim трихромним бојењем, Heidehain Mallory Azan бојењем, Mallory бојењем за колагена влакна и Van Giesonovom методом за бојење колагених влакана, као и методом за селективно бојење ретикулинских влакана. Наведена бојења омогућила су морфолошку анализу промена на срцу, пре свега структуру екстрацелуларног матрикса, као и морфометријску анализу и утврђивање трансверзалног пречника кардиомиоцита.

Парафински калупи ткива претходно припремљени за морфолошку и морфометријску анализу биће коришћени за имунохистохемијска бојења. За анализу се користио светлосни микроскоп Olympus BX41 са Olympus C5060-ADU “wide zoom” камером. Морфометријски параметри су одређивани на три исечка на узајамном растојању од најмање 100 μm .

3.7. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА ПОДАТАКА

Статистичка обрада експерименталних података је спроведена на следећи начин:

- 1) За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, користила се: фреквенција, проценти, узорачка средња вредност, узорачка медијана, узорачка стандардна девијација, ранг и 95% интервали поверења.
- 2) За испитивање нормалности расподеле употребљени су тестови *Kolmogorov Smirnov* и *Shapiro Wilk*, и графици: хистограм и *normal QQ plot*.
- 3) За тестирање разлика између параметара користио се *Mann-Whitney* тест, Фишеров тест апсолутне вероватноће, једнофакторска или двофакторска анализа варијансе (*ANOVA*). Приликом тестирања разлика између параметара, употребавао се непараметријски аналог једнофакторске анализе варијансе, *Kruskal-Wallis H* тест, са нивоом значајности од 0,05.
- 4) Статистичка обрада података је рађена у статистичком пакету *SPSS 22.0 for Windows*.

IV

РЕЗУЛТАТИ

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1 ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА АКУТНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ DL-МЕТИОНИНА

4.1.1 Испитивање ефекта акутне администрације DL-метионина на параметре оксидативног стреса у плазми пацова

Акутна хиперметионинемија је индукована интраперитонеалном апликацијом DL-метионина у дози од 0,8 mmol/kg/тм једнократно. Поређењем група, Студентовим Т-тестом добијена је високо статистички значајна разлика у вредностима САТ (U/хемоглобина), САТ (U/mL плазме) и GPx (U/mL плазме). Више вредности наведених параметара измерене су у групи животиња изложеној акутној стимулацији метионином него у контролној групи. У вредностима осталих параметара, MDA-а и SOD-а, није било статистички значајне разлике приликом статистичког анализирања података (Табела 1).

Табела 1. Поређење параметара оксидативног стреса у плазми пацова у групи изложеној акутној стимулацији метиониним и контролној групи

Параметар	Групе		
	Контролна ($\bar{x} \pm SE$)	Метионин ($\bar{x} \pm SE$)	Значајност разлике
MDA (nmol/mL)	4,87±0,43	4,77±0,80	0,873
CAT (U)	2,39±0,23	3,91±0,38	0,008
CAT (U/mL)	47,85±4,78	78,37±7,79	0,008
GPx (U/mL)	3,21±0,33	5,23±0,510	0,008
SOD (U/mL)	24,01±0,84	23,47±0,77	0,873

4.1.2 Испитивање ефеката акутне администрације DL-метионина на активност ацетилхолинестеразе у ткиву срца и мозга пацова

Акутна хиперметионинемија је индукована интраперитонеалном апликацијом DL-метионина у дози од 0,8 mmol/kg/тм/дан. Студентовим Т-тестом није добијена статистички значајна разлика у активности АСhЕ ($\Delta A/\text{min}/\text{mg}$) у ткивима срца и мозга у групи животиња изложеној акутној стимулацији метионином у односу на контролну групу пацова (Табела 2).

Табела 2. Поређење активности ацетилхолинестеразе у ткиву срца и мозга пацова у групи изложеној акутној стимулацији DL- метиониним и контролној групи

Параметар	групе		
	Контролна ($\bar{x} \pm \text{SE}$)	Метионин ($\bar{x} \pm \text{SE}$)	Значајност разлике
АСhЕ $\Delta A/\text{min}/\text{mg}$ ткива (срце)	0,049 \pm 0,002	0,043 \pm 0,001	0,075
АсhЕ $\Delta A/\text{min}/\text{mg}$ ткива (мозак)	0,97 \pm 0,13	1,01 \pm 0,21	0,337

4.2 ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА СУБХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ DL-МЕТИОНИНА

4.2.1 ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА СУБХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ DL-МЕТИОНИНА НА ПРОМЕНЕ ТЕЛЕСНЕ МАСЕ ПАЦОВА

Субхронична хиперметионинемија је индукована интраперитонеалном апликацијом 0,8 mmol/kg/тм/дан DL-метионина у току 3 недеље. У анализи утицаја метионина на телесну масу пацова формирали смо двофакторски модел анализе варијансе за поновљена мерења, фактор мерење имао је 5 градација: 1 - пре почетка експеримента, 2 - први дан апликације, 3 - седам дана након почетка апликације, 4 - четрнаест дана након почетка апликације и 5 - 21 дан након почетка апликације; фактор група имао је 4 градације: 1 – Контролна, 2 – DL-метионин, 3 – L- цистеин + DL- метионин и 4 – N-ацетил L-цистеин + DL-метионин. Добијена је високо статистички значајна разлика по фактору мерење ($F = 2,311$; $p < 0,001$), по фактору група ($F = 7,919$; $p = 0,001$) и у интеракцији оба фактора ($F = 7,640$; $p < 0,001$). Из табела бр. 3-5 и може се приметити да је у свим групама дошло до повећања телесне масе у времену док у мерењу пре почетка експеримента није било статистички значајне разлике у телесној маси пацова између група. Исти резултат је био и првог дана апликације, седам дана и четрнаест дана након почетка апликације телесна маса пацова у контролној групи била је мања него у осталим групама. Двадесетједан дан након почетка апликације није било статистички значајне разлике у телесној маси између група (Табела 3).

Табела 3. Поређење телесне масе пацова у испитиваним групама

Мерење	Група	\bar{x}	SD	n
пре почетка	Контролна	158,75	5,18	8
	DL- метионин	167,00	2,27	8
	L-цистеин + DL- метионин	167,13	17,96	8
	N-ацетил-L-цистеин + DL- метионин	158,88	7,59	8
	Укупно	162,94	10,52	32
1. дан	Контролна	218,63	14,98	8
	DL- метионин	237,13	7,32	8
	L-цистеин + DL- метионин	237,38	22,87	8
	N-ацетил-L-цистеин + DL- метионин	220,88	6,10	8
	Укупно	228,50	16,40	32
7. дана	Контролна	252,13	4,29	8
	DL- метионин	304,25	12,77	8
	L-цистеин + DL- метионин	304,00	27,53	8
	N-ацетил-L-цистеин + DL- метионин	289,13	8,74	8
	Укупно	287,37	26,38	32
14. дана	Контролна	313,50	10,57	8
	DL- метионин	367,13	23,04	8
	L-цистеин + DL- метионин	361,00	31,65	8
	N-ацетил-L-цистеин + DL- метионин	339,13	10,49	8
	Укупно	345,19	29,21	32
21. дан	Контролна	378,00	17,12	8
	DL- метионин	405,25	32,17	8
	L-цистеин + DL- метионин	399,50	36,97	8
	N-ацетил-L-цистеин + DL- метионин	371,87	9,33	8
	Укупно	388,66	28,84	32

Табела 4. Тестирање међугрупних разлика Сидаковим тестом

Мерење	(I) Група	(J) Група	Просечна разлика (I-J)	p
1	Контролна	DL-метионин	-8,250	0,520
		L-цистеин + DL-метионин	-8,375	0,503
		N-ацетил-L-цистеин + DL-метионин	-,125	1,000
	DL-метионин	L-цистеин + DL-метионин	-,125	1,000
		N-ацетил-L-цистеин + DL-метионин	8,125	0,537
	L-цистеин + DL-метионин	N-ацетил-L-цистеин + DL-метионин	8,250	0,520
2	Контролна	DL-метионин	-18,500	0,094
		L-цистеин + DL-метионин	-18,750	0,087
		N-ацетил-L-цистеин + DL-метионин	-2,250	1,000
	DL-метионин	L-цистеин + DL-метионин	-0,250	1,000
		N-ацетил-L-цистеин + DL-метионин	16,250	0,181
	L-цистеин + DL-метионин	N-ацетил-L-цистеин + DL-метионин	16,500	0,169
3	Контролна	DL-метионин	-52,125	0,000
		L-цистеин + DL-метионин	-51,875	0,000
		N-ацетил-L-цистеин + DL-метионин	-37,000	0,000
	DL-метионин	L-цистеин + DL-метионин	0,250	1,000
		N-ацетил-L-цистеин + DL-метионин	15,125	0,345
	L-цистеин + DL-метионин	N-ацетил-L-цистеин + DL-метионин	14,875	0,363
4	Контролна	DL-метионин	-53,625	< 0,001
		L-цистеин + DL-метионин	-47,500	0,001
		N-ацетил-L-цистеин + DL-метионин	-25,625	0,119
	DL-метионин	L-цистеин + DL-метионин	6,125	0,993
		N-ацетил-L-цистеин + DL-метионин	28,000	0,072
	L-цистеин + DL-метионин	N-ацетил-L-цистеин + DL-метионин	21,875	,246
5	Контролна	DL-метионин	-27,250	,256
		L-цистеин + DL-метионин	-21,500	,517
		N-ацетил-L-цистеин + DL-метионин	6,125	,998
	DL-метионин	L-цистеин + DL-метионин	5,750	,999
		N-ацетил-L-цистеин + DL-метионин	33,375	,099
	L-цистеин + DL-метионин	N-ацетил-L-цистеин + DL-метионин	27,625	,243

Табела 5. Тестирање разлика телесне масе пацова унутар група Сидаковим тестом

Група	(I) Мерење	(J)Мерење	Просечна Разлика (I-J)	p	
Контролна	1	2	-59,875	< 0,001	
		3	-93,375	< 0,001	
		4	-154,750	< 0,001	
		5	-219,250	< 0,001	
	2	3	-33,500	< 0,001	
		4	-94,875	< 0,001	
		5	-159,375	< 0,001	
	3	4	-61,375	< 0,001	
		5	-125,875	< 0,001	
	4	5	-64,500	< 0,001	
	DL-метионин	1	2	-70,125	< 0,001
			3	-137,250	< 0,001
4			-200,125	< 0,001	
5			-238,250	< 0,001	
2		3	-67,125	< 0,001	
		4	-130,000	< 0,001	
		5	-168,125	< 0,001	
3		4	-62,875	< 0,001	
		5	-101,000	< 0,001	
4		5	-38,125	< 0,001	
L-цистеин +DL-метионин		1	2	-70,250	< 0,001
			3	-136,875	< 0,001
	4		-193,875	< 0,001	
	5		-232,375	< 0,001	
	2	3	-66,625	< 0,001	
		4	-123,625	< 0,001	
		5	-162,125	< 0,001	
	3	4	-57,000	< 0,001	
		5	-95,500	< 0,001	
	4	5	-38,500	< 0,001	
	N-ацетил-L-цистеин + DL-метионин	1	2	-62,000	< 0,001
			3	-130,250	< 0,001
4			-180,250	< 0,001	
5			-213,000	< 0,001	
2		3	-68,250	< 0,001	
		4	-118,250	< 0,001	
		5	-151,000	< 0,001	
3		4	-50,000	< 0,001	
		5	-82,750	< 0,001	
4		5	-32,750	< 0,001	

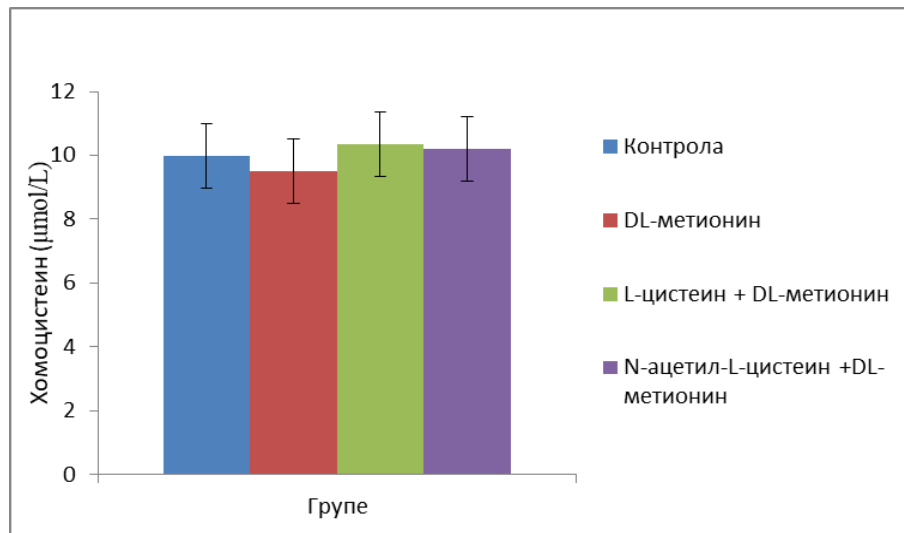
4.2.2 ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА СУБХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ DL-МЕТИОНИНА НА СПЕЦИФИЧНЕ БИОХЕМИЈСКЕ ПАРАМЕТРЕ У СЕРУМУ ПАЦОВА (ХОМОЦИСТЕИН, ФОЛНА КИСЕЛИНА, ВИТАМИНА В₁₂)

Након субхроничне администрације DL-метионина, у серуму пацова мерили смо концентрацију хомоцистеина, фолата и витамина В₁₂ у свим групама. У Табели 6 су приказане средње вредности испитиваних параметара, а на Графиконима број 3, 4 и 5 су приказане средње вредности за сваки посматрани параметар одвојено, док у Табели 7 су приказане статистичке значајности разлика између група за сваки од поменутих параметара. Примећена је статистички значајна разлика у концентрацији фолата и витамина В₁₂ (Графикони бр. 2 и 3), док концентрације хомоцистеина се нису значајно разликовале између испитиваних група (Графикон бр. 1). Концентрација фолата је била значајно нижа у групи N-ацетил-L-цистеин у односу на контролну групу ($p=0,039$), док је концентрација витамина В₁₂ значајно нижа у свим експерименталним групама у односу на контролну групу (Табела 7).

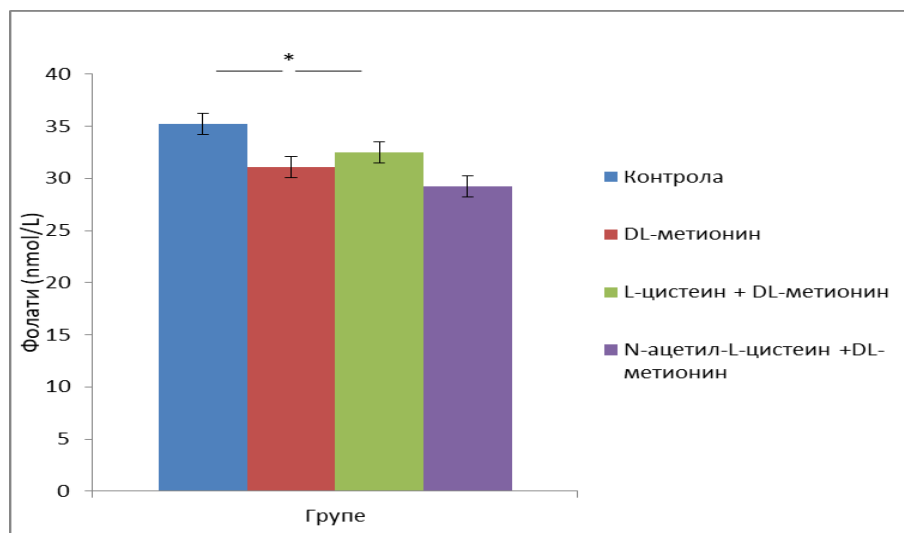
Табела 6. Просечне вредности хомоцистеина, фолата и витамина В₁₂ у испитивним групама

Групе	Параметри		
	Хомоцистеин (μmol/L)	Фолати (μg/L)	Витамин В ₁₂ (ng/L)
Контрола	9,98±0,65	35,25±2,04	882,00±32,00
DL-Мет	9,51±0,59	32,11±2,13	742,50±25,70
L-Цис + DL-Мет	10,35±0,93	31,52±1,35	740,12±11,80
НАС + DL-Мет	10,21±0,71	29,23±1,48	756,62±43,84

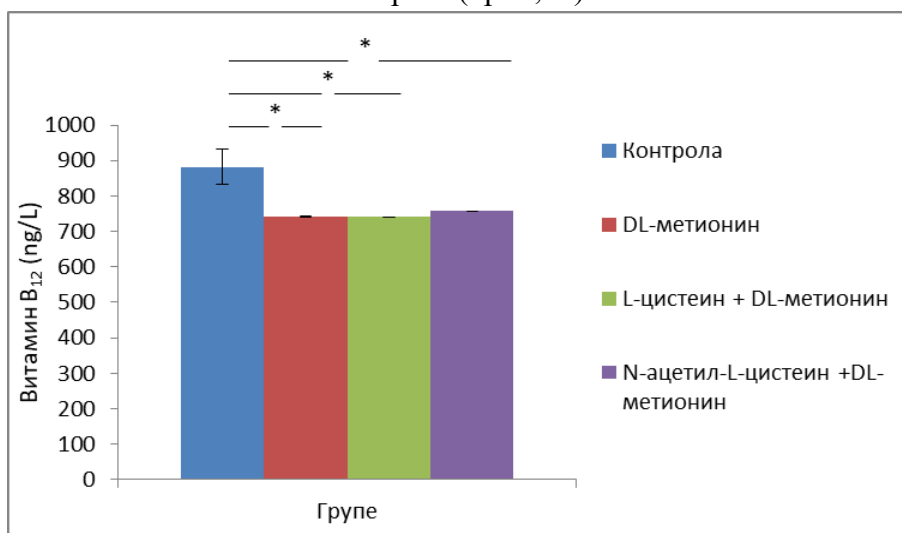
Графикон бр. 1. Просечне вредности хомоцистеина ($\mu\text{mol/L}$) у испитиваним групама.



Графикон бр. 2. Просечне вредности фолата (nmol/L) у испитиваним групама. Знак звездеце (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса ($*p < 0,05$).



Графикон бр. 3. Просечне вредности витамина В₁₂ у испитиваним групама. Знак звездице (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (*p<0,05).



Табела 7. Значајност разлике вредности хомоцистеина, фолата и витамина В₁₂ између испитиваних група. Значајност разлике, између група, приказаних параметара установили смо применом Студентовог т-теста

Групе	Параметри		
	Хомоцистеин (μmol/L)	Фолати (μg/L)	Витамин В ₁₂ (ng/L)
Контрола вс. DL-Мет	0,549	0,573	0,009
Контрола вс. L-Цис + DL-Мет	0,741	0,265	0,001
Контрола вс. NAC + DL-Мет	0,741	0,039	0,032
L-Цис + DL-Мет вс. NAC + DL-Мет	0,477	0,424	0,594
DL-Мет вс. NAC+ DL-Мет	0,477	0,110	0,859
L-Цис+ DL-Мет вс. NAC + DL-Мет	0,905	0,267	0,719

4.2.3 ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА СУБХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ DL-МЕТИОНИНА НА СТАНДАРДНЕ БИОХЕМИЈСКЕ ПАРАМЕТРЕ У СЕРУМУ ПАЦОВА

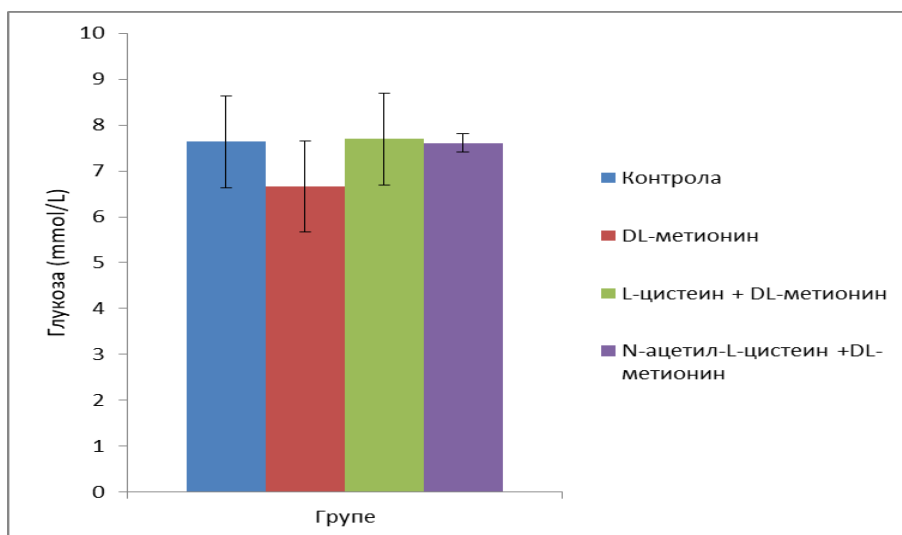
Након тронедељне администрације метионина, у серуму пацова контролне и експерименталних група мерили смо концентрације стандардних биохемијских параметара као што су глюкоза, уреа, креатинин, мокраћна киселина, укупни билирубин и протеини, албумин, укупни холестерол, HDL, триглицериди, јонограм (натријум (Na⁺), калијум (K⁺), хлор (Cl⁻), калцијум (Ca²⁺)), гвожђе (Fe), аспартат и аланин аминотрансфера (AST и ALT), алкална фосгатаза (ALP), гама-глутарил трансфераза (γ GT), амилаза (Al) и С-реактивни протеин (CRP). У Табели 8 су приказане средње вредности глюкозе, урее, креатинина, мокраћне киселине, укупног билирубина, укупних протеина и албумина у односу на групу пацова. На Графиконима бр. 4-10 је представљен упоредни приказ средњих вредности испитиваног параметра у односу на групу.

Табела 8. Просечне вредности биохемијских параметара (глюкозе, урее, креатинина, мокраћне киселине, укупног билирубина, укупних протеина и албумина) 21 дан након апликације (n=48)

Параметри	Групе			
	Контрола	DL-мет	L-цис + DL-мет	НАС + DL-мет
Глукоза (mmol/L)	7,64 ± 0,12	6,66 ± 0,87	7,70 ± 0,21	7,61 ± 0,10
Уреа (mmol/L)	8,80 ± 0,64	6,24 ± 1,19	6,98 ± 0,28	7,60 ± 0,31
Креатинин (mg/dl)	38,19 ± 1,25	29,71 ± 1,57	30,13 ± 1,19	32,25 ± 2,46
Мокраћна киселина (umol/L)	87,88 ± 4,37	47,50 ± 1,61	60,25 ± 4,09	59,75 ± 2,39
Укупни билирубин (umol/L)	1,89 ± 0,09	2,50 ± 0,20	2,30 ± 0,21	2,14 ± 0,28
Укупни протеини (g/L)	63,63 ± 0,63	61,80 ± 0,57	66,50 ± 0,85	63,13 ± 0,77
Албумини (g/L)	13,56 ± 0,94	13,00 ± 0,30	13,13 ± 0,44	12,25 ± 0,37

Из Табела 8 и 9 и Графикана 4 може се запазити да није било статистички значајне разлике између испитиваних група, али су вредности глукозе у групи третираној са метионином, мање него у осталим групама.

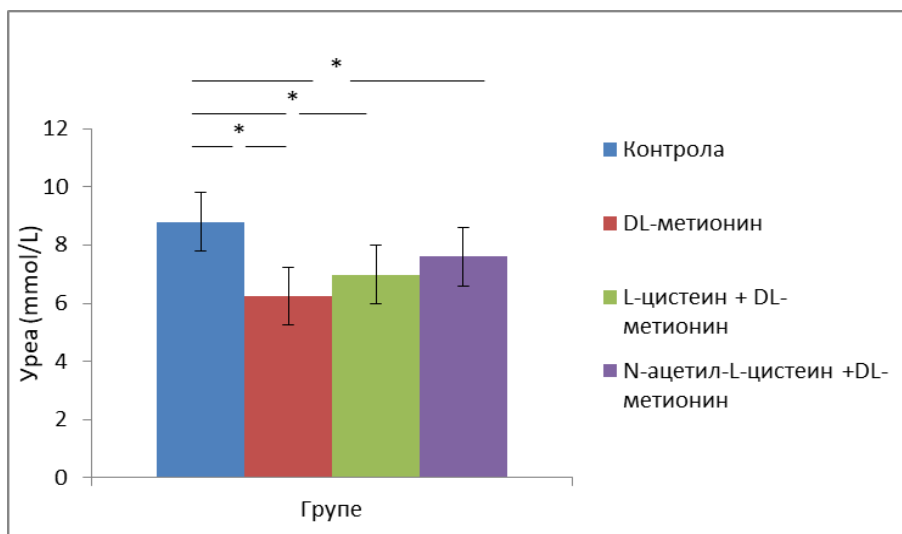
Графикон бр. 4. Просечне вредности глукозе (mmol/L) у испитиваним групама. Знак звездеце (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



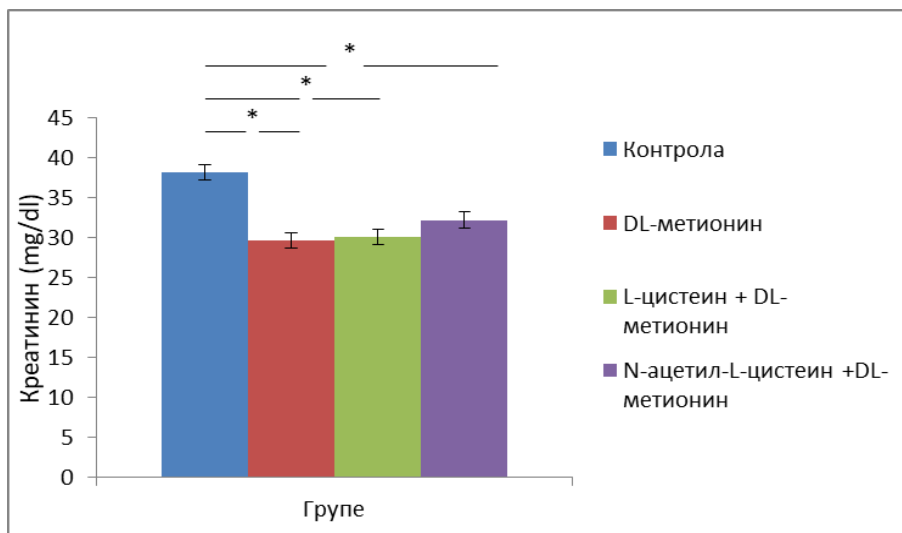
Концентрације урее су статистички значајно веће у контролној групи него у остале три групе, али није било статистички значајне разлике између испитиваних експерименталних група (Табела 8 и Табела 9; Графикон бр. 5).

На Графикону бр. 6 су приказане средње вредности концентрације креатинина у свим групама. Вредности креатинина су статистички значајно више у контролној групи него у остале три групе, док статистички значајне разлике није било између експерименталних група (Табела 8 и Табела 9).

Графикон бр. 5. Просечне вредности уреје (mmol/L) у испитиваним групама. Знак звездице (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



Графикон бр. 6. Просечне вредности креатинина у испитиваним групама. Знак звездице (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



На Графикону бр. 7 су приказане просечне вредности концентрације мокраћне киселине у свим групама. Статистичком анализом, утврђене су значајно више вредности овог параметра у контролној групи у односу на остале испитиване групе, док је најнижа

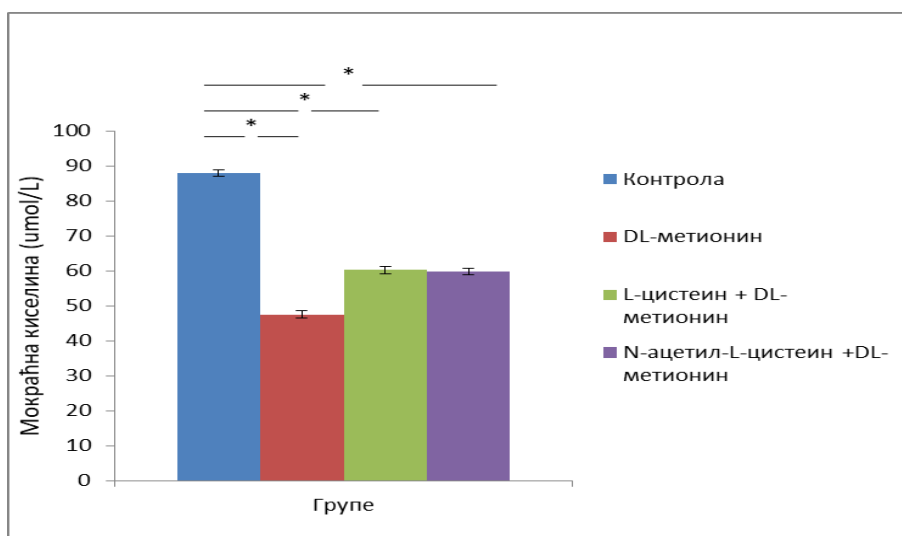
вредност овог параметра била у DL-метионин у односу на L-цистеин+DL-метионин и NAC+DL-метионин групе (Табела 9).

На Графикону бр. 8 су приказане просечне вредности концентрације билирубина у свим групама. Статистичком анализом, утврђене су значајно ниже вредности овог параметра у контролној групи у односу на остале испитиване групе, док није било статистички значајне разлике у вредности овог параметра у експерименталним групама (Табела 9).

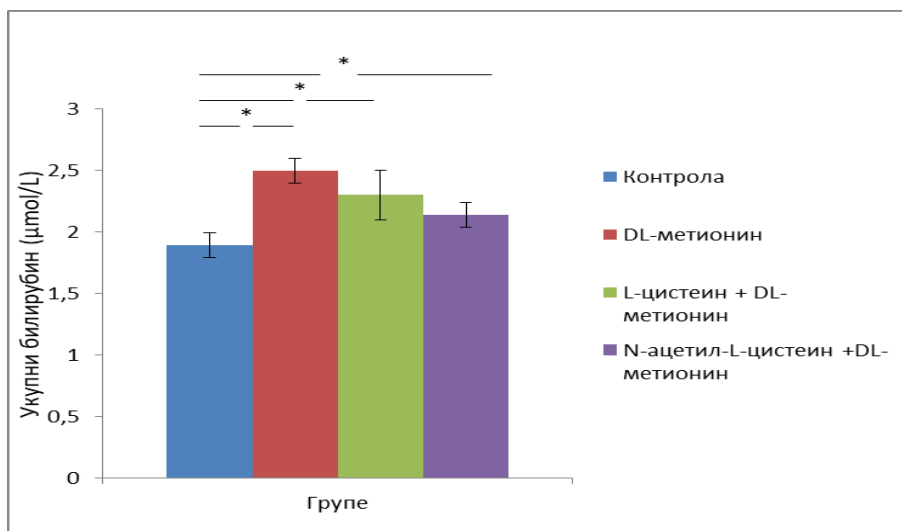
На Графикону бр. 9 су приказане просечне вредности концентрације укупних протеина у свим групама. Статистичком анализом, утврђено је да су најниже вредности биле у метионинској групи, у односу на L- цистеин+DL-метионин али и контролну групу. Статистички значајно више вредности су примећене у L- цистеин+DL-метионин групи у односу на остале групе (Табела 9).

На Графикону бр. 10 су приказане просечне вредности концентрације албумина у свим групама. Статистичком анализом, утврђено је да су најниже вредности биле у експерименталним групама међу којима није утврђена статистички значајна разлика. У односу на контролну групу пацова, доказано је постојање статистички значајно виших вредности овог параметра у односу на остале групе (Табела 9).

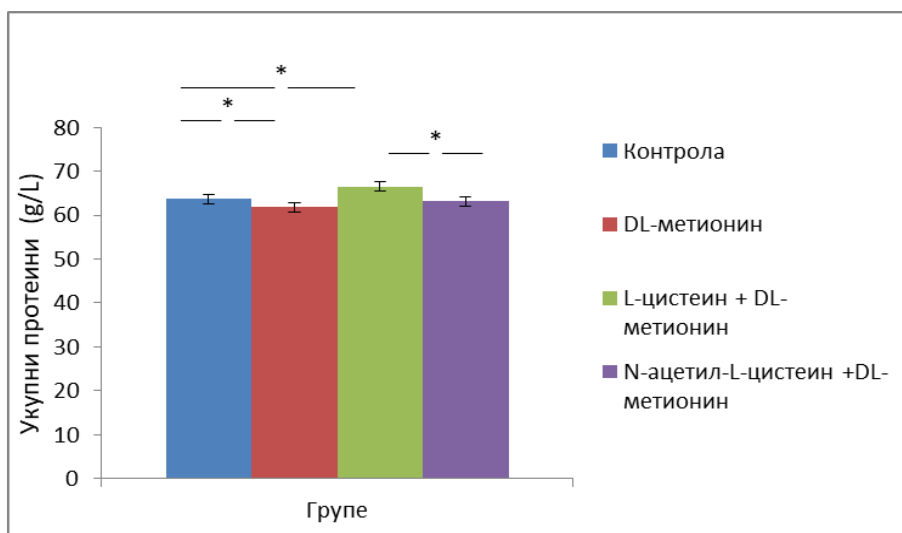
Графикон бр. 7. Просечне вредности мокраћне киселине у испитиваним групама. Знак звезде (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



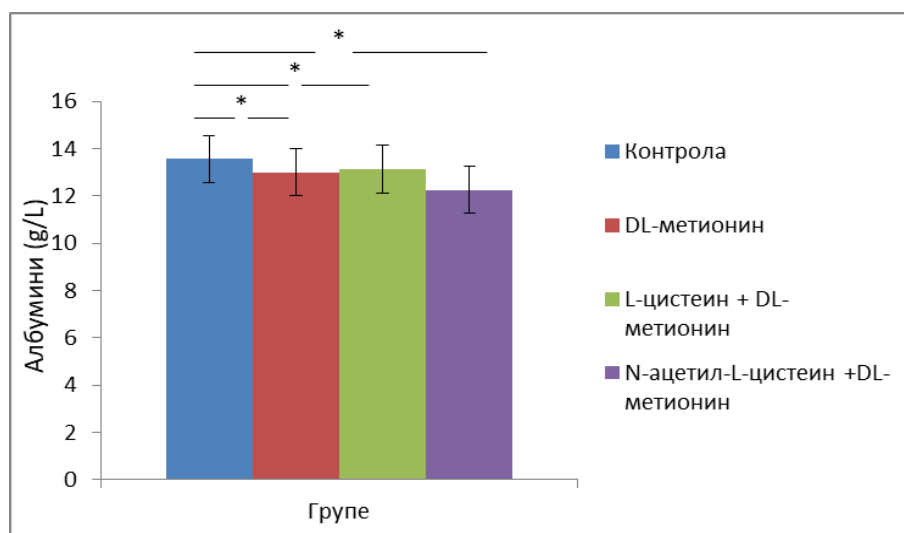
Графикон бр. 8. Просечне вредности билирубина у испитиваним групама. Знак звездице (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



Графикон бр. 9. Просечне вредности укупних протеина у испитиваним групама. Знак звездице (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



Графикон бр. 10. Просечне вредности албумина у испитиваним групама. Знак звездице (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



Табела 9. Приказ статистичких значајности биохемијских параметара (глукозе, урее, креатинина, мокраћне киселине, укупног билирубина, укупних протеина и албумина) поређењем група

Поређење	Gly	Ure	Cr	UA	uBil	uPr	Al
Контрола <i>вс.</i> L-Мет	0,232	0,008	0,003	0,000	0,014	0,038	0,008
Контрола <i>вс.</i> L-Цис + L-Мет	0,538	0,001	0,000	0,001	0,021	0,016	0,036
Контрола <i>вс.</i> NAC + L-Мет	0,951	0,012	0,031	0,001	0,110	0,756	0,003
L-Мет <i>вс.</i> L-Цис + L-Мет	0,228	0,386	0,861	0,010	0,261	0,003	0,781
L-Мет <i>вс.</i> NAC + L-Мет	0,334	0,962	0,450	0,003	0,166	0,138	0,136
L-Цис + L-Мет <i>вс.</i> NAC + L-Мет	0,526	0,226	0,598	0,793	0,708	0,011	0,145

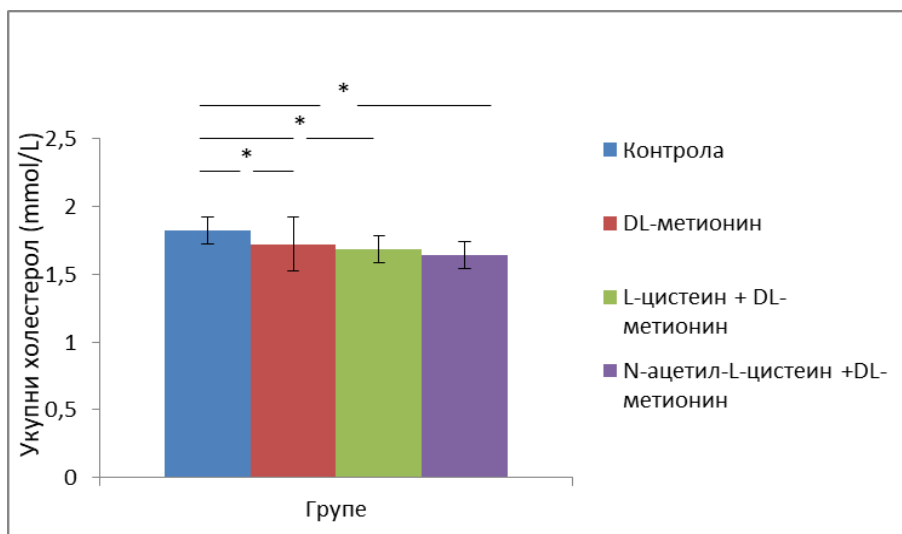
У Табели 10 су приказане средње вредности укупног холестерола, HDL-холестерола, триглицерида, натријума, калијума, хлора и калцијума у односу на групу пацова. На Графиконима бр. 11- 17 је представљен упоредни приказ средњих вредности испитиваног параметра у односу на групу.

Табела 10. Просечне вредности биохемијских параметара (укупног холестерола, HDL-холестерола, триглицерида, натријума, калијума, хлора и калцијума) 21 дан након апликације ($n=48$)

Параметри	Групе			
	Контрола	DL-мет	L-цис + DL-мет	NAC + DL-мет
Укупни холестерол (mmol/L)	1,82 ± 0,03	1,72 ± 0,07	1,68 ± 0,05	1,64 ± 0,03
HDL (mmol/L)	1,59 ± 0,10	1,47 ± 0,04	1,63 ± 0,05	1,47 ± 0,03
Триглицериди (mmol/L)	0,71 ± 0,07	0,93 ± 0,05	1,05 ± 0,09	1,13 ± 0,11
Na ⁺ (mmol/L)	141,5 ± 0,29	145,60 ± 0,45	143,63 ± 0,63	143,00 ± 0,73
K ⁺ (mmol/L)	8,11 ± 0,16	6,76 ± 0,11	7,05 ± 0,22	7,54 ± 0,35
Cl ⁻ (mmol/L)	104,6 ± 0,24	104,70 ± 0,50	104,50 ± 0,27	105,25 ± 0,45
Ca ⁺⁺ (mmol/L)	2,30 ± 0,12	2,06 ± 0,25	2,35 ± 0,02	2,47 ± 0,03

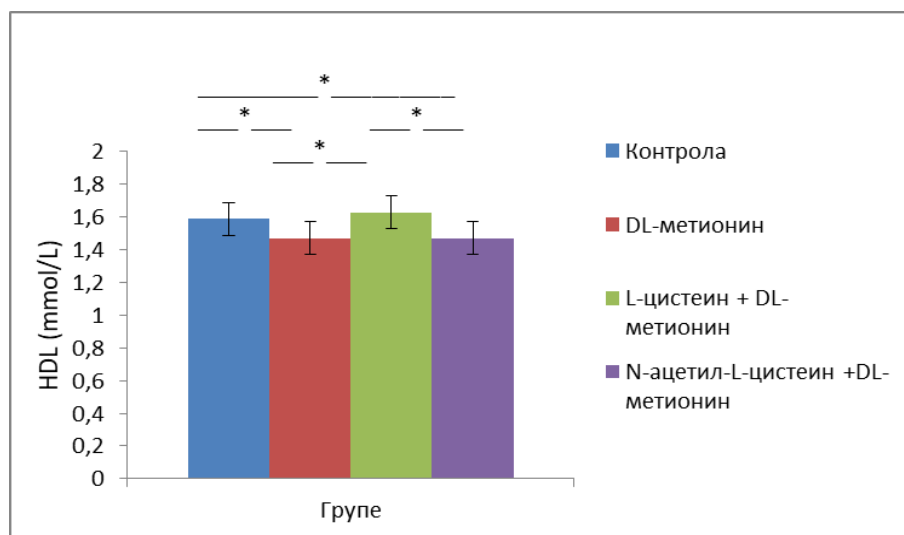
На Графикону бр. 11 приказане су просечне вредности укупног холестерола у свим групама. Примећена је статистички значајна разлика у вредности овог параметра у експерименталним групама у односу на контролну групу, при чему је присутна статистички значајно виша вредност укупно холестерола у контролној групи у односу на остале групе, док значајна разлика између експерименталних група не постоји. Резултати указују на улогу метионина у смањењу укупног холестерола у серуму, нарочито у ко-администрацији са N-ацетил-L- цистеином (Табела 11).

Графикон бр. 11. Просечне вредности укупног холестерола у испитиваним групама. Знак звездице (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



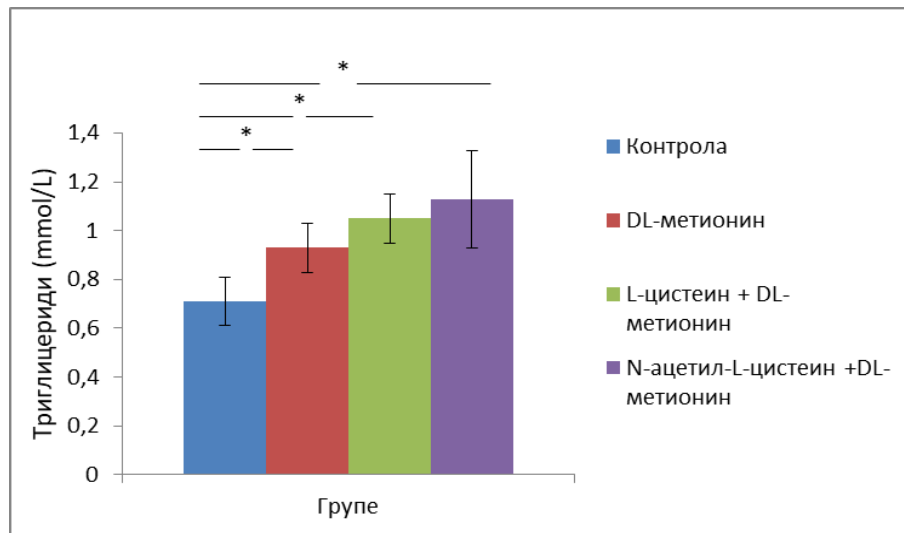
На Графикону бр. 12 приказане су просечне вредности HDL- холестерола у свим групама. Утврђена је статистички значајна разлика у вредности овог параметра у контролној групи у односу на DL-метионин и L-цистеин+NAC групу, и статистички значајно виша вредност овог параметра у L-цистеин+DL-метионин групи у односу на DL-метионин и L-цистеин+NAC групу (Табела 11).

Графикон бр. 12. Просечне вредности HDL- холестерола у испитиваним групама. Знак звездице (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



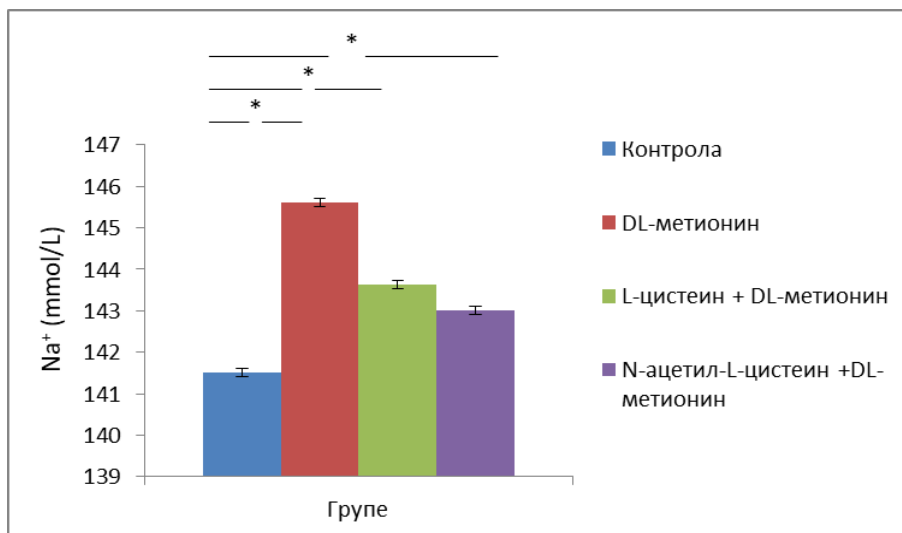
На Графикону бр. 13 приказане су просечне вредности триглицерида у свим групама. Утврђене су статистички значајно ниже вредности овог параметра у контролној групи у односу на експерименталне групе, док међусобних разлика у експерименталним групама није било (Табела 11).

Графикон бр. 13. Просечне вредности триглицерида у испитиваним групама. Знак звездице (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



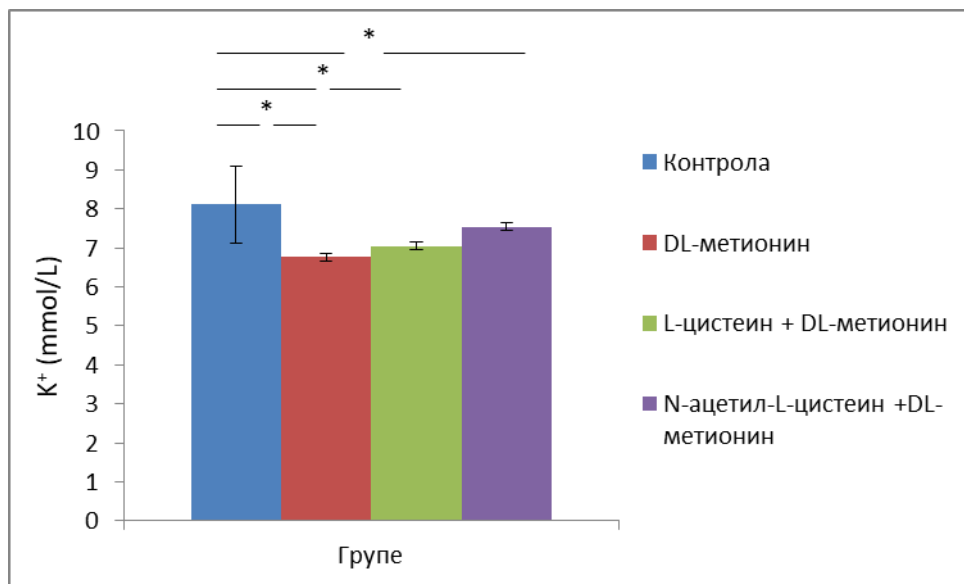
На Графикону бр. 14 приказане су просечне вредности натријума у свим групама. Утврђене су статистички значајно ниже вредности овог параметра у контролној групи у односу на експерименталне групе, док међусобних разлика у експерименталним групама није било. Доминантно повишене вредности концентрације натријума утврђене су у метионинској групи (Табела 11).

Графикон бр. 14. Просечне вредности натријума у испитиваним групама. Знак звезде (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



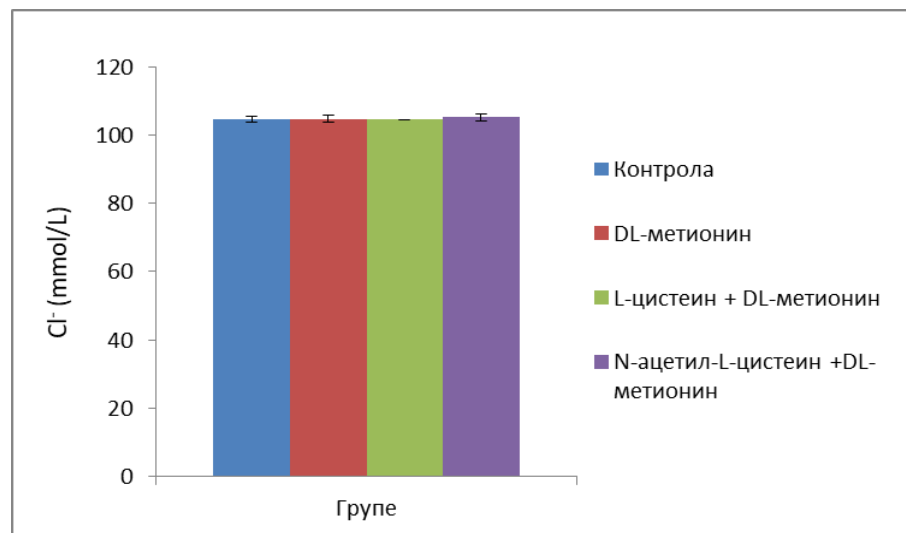
На Графикону бр. 15 приказане су просечне вредности калијума у свим групама. Утврђене су статистички значајно више вредности овог параметра у контролној групи у односу на експерименталне групе, док међусобних разлика у експерименталним групама није било (Табела 11).

Графикон бр. 15. Просечне вредности калијума у испитиваним групама. Знак звездице (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



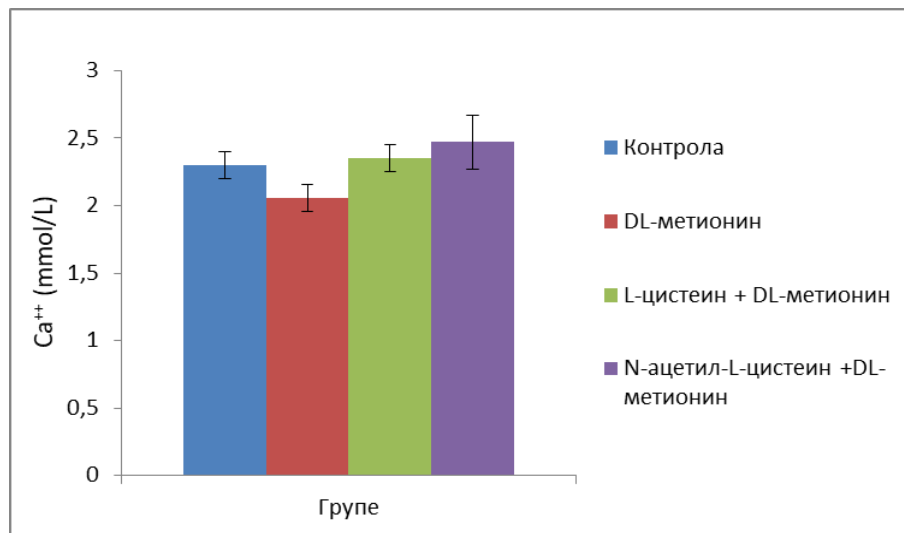
На Графикону бр. 16 приказане су просечне вредности хлора у свим групама. Поређењем група, нису утврђене статистички значајне разлике у вредности овог параметра (Табела 11).

Графикон бр. 16. Просечне вредности хлора у испитиваним групама. Знак звездице (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



На Графикону бр. 17 приказане су просечне вредности калцијума у свим групама. Поређењем група, нису утврђене статистички значајне разлике у вредности овог параметра (Табела 11).

Графикон бр. 17. Просечне вредности калцијума у испитиваним групама. Знак звездице (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



Табела 11. Приказ статистичких значајности биохемијских параметара (укупног холестерола, HDL-холестерола, триглицерида, натријума, калијума, хлора и калцијума) поређењем група

Поређење	CHOL	HDL	TRg	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	Ca ⁺⁺
Контрола <i>вс.</i> L-Мет	0,179	0,008	0,015	0,000	0,000	0,828	0,854
Контрола <i>вс.</i> L-Цис + L-Мет	0,020	0,500	0,007	0,008	0,003	0,649	0,602
Контрола <i>вс.</i> NAC + L-Мет	0,002	0,009	0,008	0,108	0,118	0,183	0,358
L-Мет <i>вс.</i> L-Цис + L-Мет	0,824	0,045	0,424	0,024	0,181	0,708	0,229
L-Мет <i>вс.</i> NAC + L-Мет	0,563	0,563	0,131	0,009	0,090	0,465	0,230
L-Цис + L-Мет <i>вс.</i> NAC + L-Мет	0,563	0,031	0,753	0,520	0,493	0,154	0,055

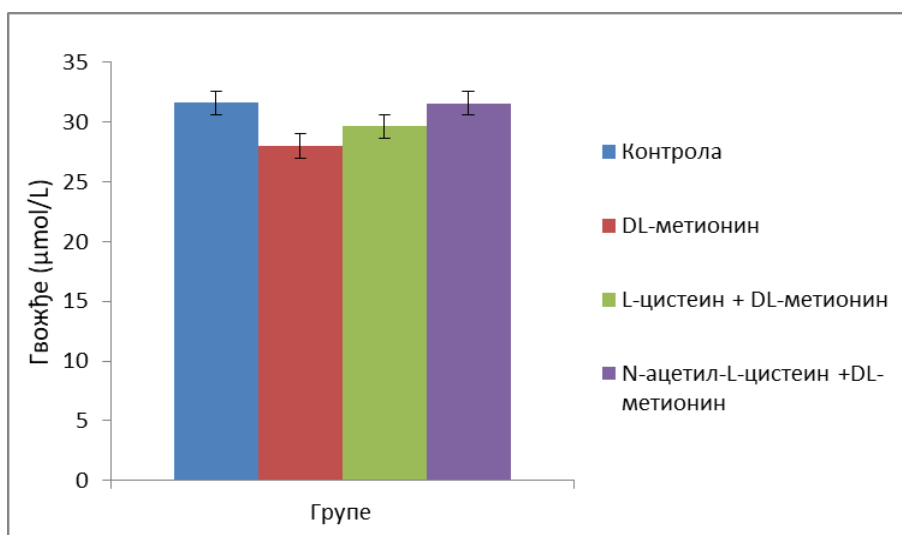
На Табели 12 су приказане средње вредности укупног гвожђа, аспартат и аланин аминокотрансферазе, гама-глутарил трансферазе, алкалне фосфатазе, амилазе и С-реактивног протеина у односу на групу пацова. На Графиконима бр. 18-24 је представљен упоредни приказ средњих вредности испитиваног параметра у односу на групу.

Табела 12. Просечне вредности биохемијских параметара (гвожђа, аспартат и аланин аминотрансфераза, гама-глутарил трансферазе, алкалне фосфатазе, амилазе и С-реактивног протеина) 21 дан након апликације ($n=48$)

Параметри	Групе			
	Контрола	DL-мет	L-цис + DL-мет	NAC + DL-мет
Гвожђе ($\mu\text{mol/L}$)	31,60 \pm 1,79	28,02 \pm 1,77	29,65 \pm 1,89	31,59 \pm 2,96
AST (IU/L)	255,4 \pm 13,6	202,20 \pm 9,50	251,13 \pm 18,9	241,25 \pm 19,11
ALT (IU/L)	73,94 \pm 8,20	55,40 \pm 2,07	66,50 \pm 3,76	67,25 \pm 4,70
ALP (IU/L)	285,5 \pm 12,5	253,60 \pm 13,14	277,38 \pm 14,7	298,50 \pm 12,64
γ GT (IU/L)	6,00 \pm 0,35	6,00 \pm 0,15	5,63 \pm 0,18	5,50 \pm 0,19
Амилаза (IU/L)	926,8 \pm 77,3	1169,2 \pm 48,9	1228,9 \pm 50,1	1275,2 \pm 40,02
CRP (mg/L)	0,20 \pm 0,03	0,80 \pm 0,12	0,90 \pm 0,13	0,90 \pm 0,09

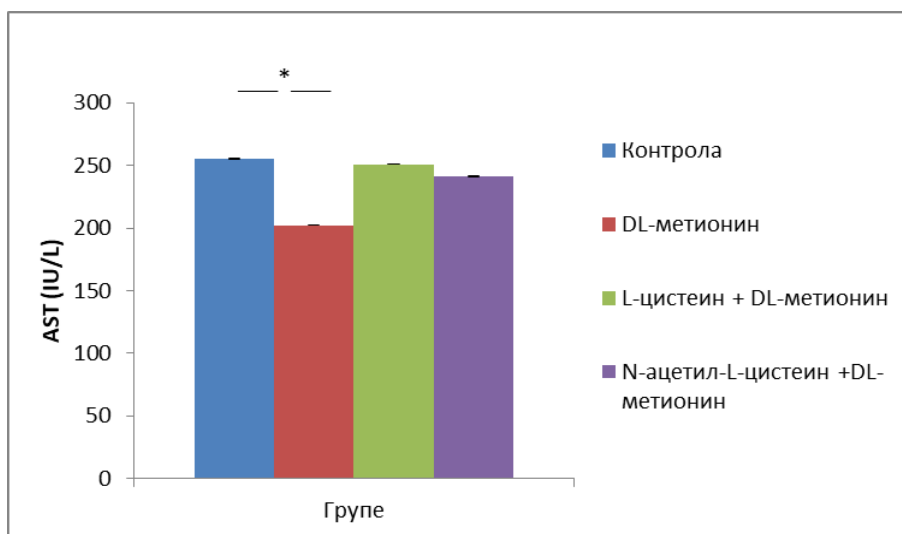
На Графикону бр. 18 приказане су просечне вредности концентрације гвожђа у свим групама. Поређењем група, нису утврђене статистички значајне разлике у вредности овог параметра (Табела 13).

Графикон бр. 18. Просечне вредности гвожђа у испитиваним групама. Знак звездице (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p<0,05$).



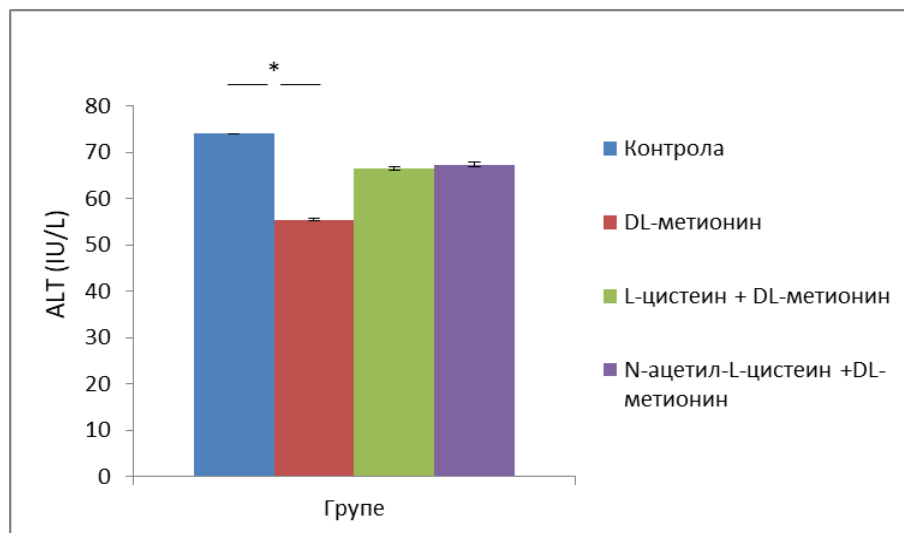
На Графикону бр. 19 приказане су просечне вредности концентрације AST-а у свим групама. Поређењем група, утврђене су статистички значајне разлике у вредности овог параметра контролној групи у односу на DL-метионин групу (Табела 13).

Графикон бр. 19. Просечне вредности AST-а у испитиваним групама. Знак звезде (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



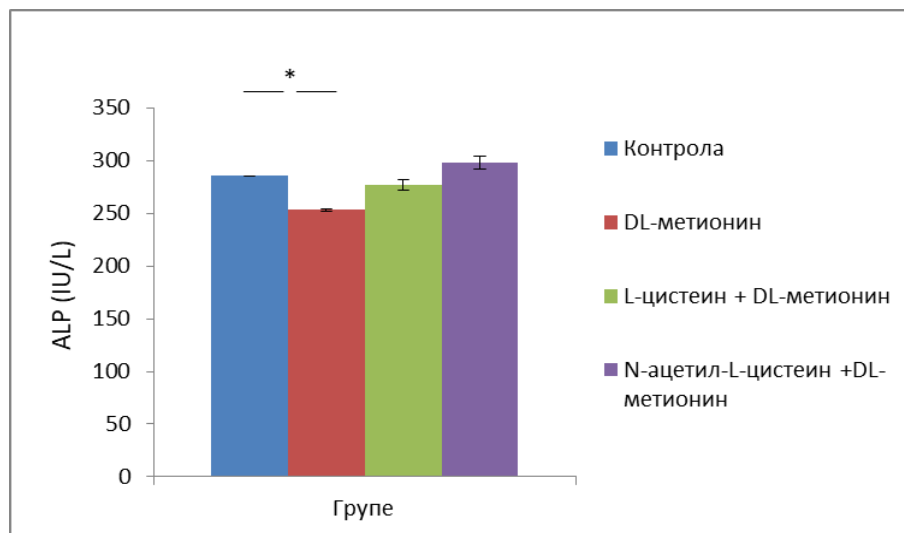
На Графикону бр. 20 приказане су просечне вредности концентрације ALT-а у свим групама. Поређењем група, утврђене су статистички значајне разлике у вредности овог параметра контролној групи у односу на DL-метионин групу у којој су примећене најниже вредности овог параметра (Табела 13).

Графикон бр. 20. Просечне вредности ALT-а у испитиваним групама. Знак звездице (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



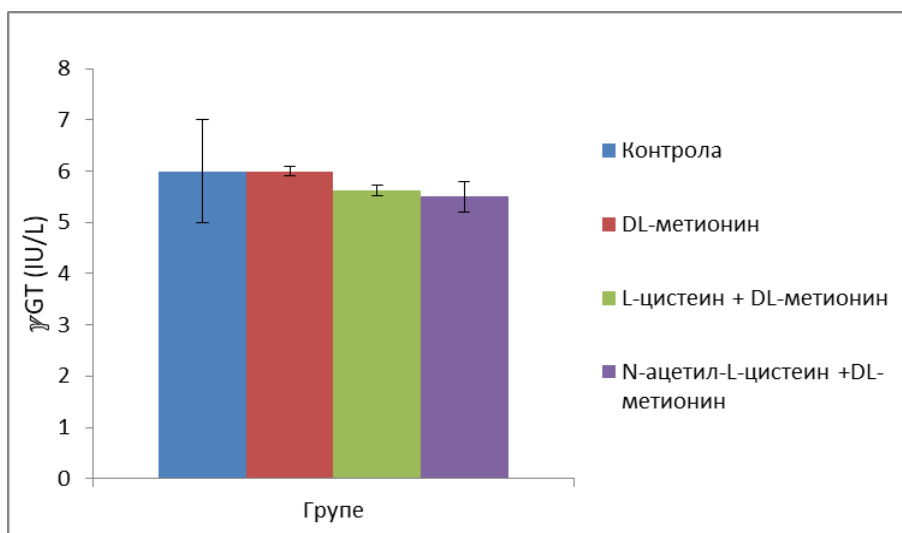
На Графикону бр. 21 приказане су просечне вредности концентрације ALP-а у свим групама. Поређењем група, утврђене су статистички значајне разлике у вредности овог параметра контролној групи у односу на DL-метионин групу у којој су примећене најниже вредности овог параметра (Табела 13).

Графикон бр. 21. Просечне вредности ALP-а у испитиваним групама. Знак звездице (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



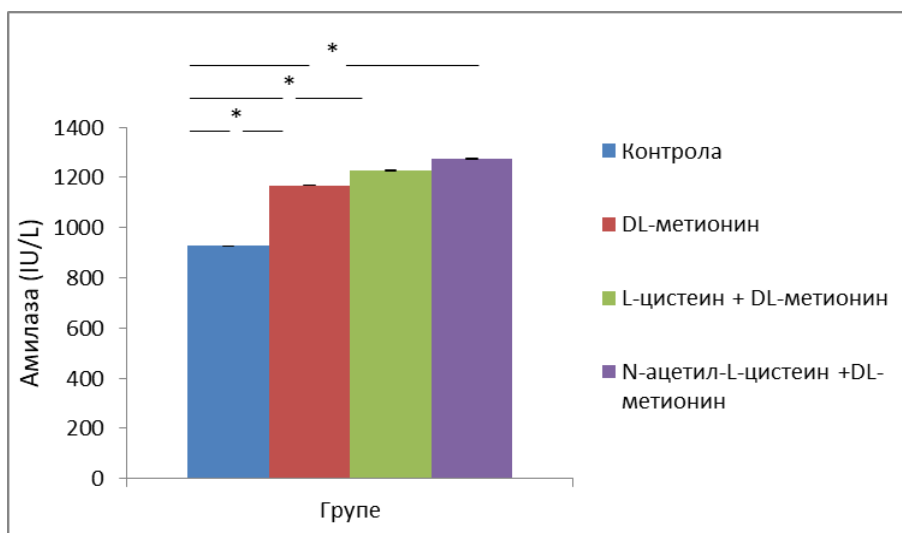
На Графикону бр. 22 приказане су просечне вредности концентрације γ GT-а у свим групама. Поређењем група, нису утврђене статистички значајне разлике у вредности овог параметра, али се запажају више вредности овог параметра у контролној групи и у DL-метионин групи (Табела 13).

Графикон бр. 22. Просечне вредности γ GT--а у испитиваним групама. Знак звездице (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



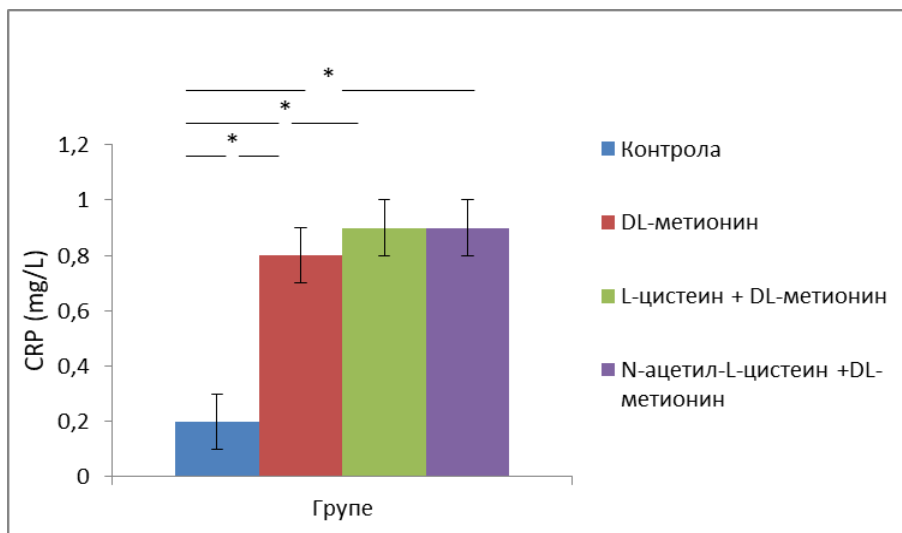
На Графикону бр. 23 приказане су просечне вредности концентрације амилазе у свим групама. Поређењем група, утврђене су статистички значајно ниже вредности овог параметра у контролној групи у односу на остале групе, али се експерименталне групе статистички значајно не разликују у вредностима овог параметра (Табела 13).

Графикон бр. 23. Просечне вредности амилазе у испитиваним групама. Знак звездице (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



На Графикону бр. 24 приказане су просечне вредности концентрације С-реактивног протеина у свим групама. Поређењем група, утврђене су статистички значајне ниже вредности овог параметра у контролној групи у односу на остале групе, али се експерименталне групе статистички значајно не разликују у вредностима овог параметра (Табела 13).

Графикон бр. 24. Просечне вредности С-реактивног протеина у испитиваним групама. Знак звездице (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



Табела 13. Приказ статистичких значајности биохемијских параметара (гвожђа, аспартат и аланин аминотрансфераза, гама-глутарил трансферазе, алкалне фосфатазе, амилазе и С-реактивног протеина) поређењем група

Поређење	Fe	AST	ALT	AP	γGT	Амилаза	CRP
Контрола <i>вс.</i> L-Мет	0,329	0,029	0,051	0,126	0,255	0,055	0,001
Контрола <i>вс.</i> L-Цис + L-Мет	0,501	1,000	0,854	0,854	0,639	0,017	0,000
Контрола <i>вс.</i> NAC + L-Мет	0,903	0,520	0,927	0,297	0,322	0,011	0,000
L-Мет <i>вс.</i> L-Цис + L-Мет	0,756	0,051	0,045	0,197	0,126	0,302	0,809
L-Мет <i>вс.</i> NAC + L- Мет	0,398	0,168	0,056	0,021	0,053	0,071	0,557
L-Цис + L-Мет <i>вс.</i> NAC + L-Мет	0,431	0,529	0,958	0,345	0,626	0,462	0,874

4.2.4 ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА СУБХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ DL-МЕТИОНИНА НА МАРКЕРЕ ХЕМОСТАЗЕ (ФИБРИНОГЕН, D-ДИМЕР И VON-WILLEBRAND-ОВ ФАКТОР) У СЕРУМУ ПАЦОВА

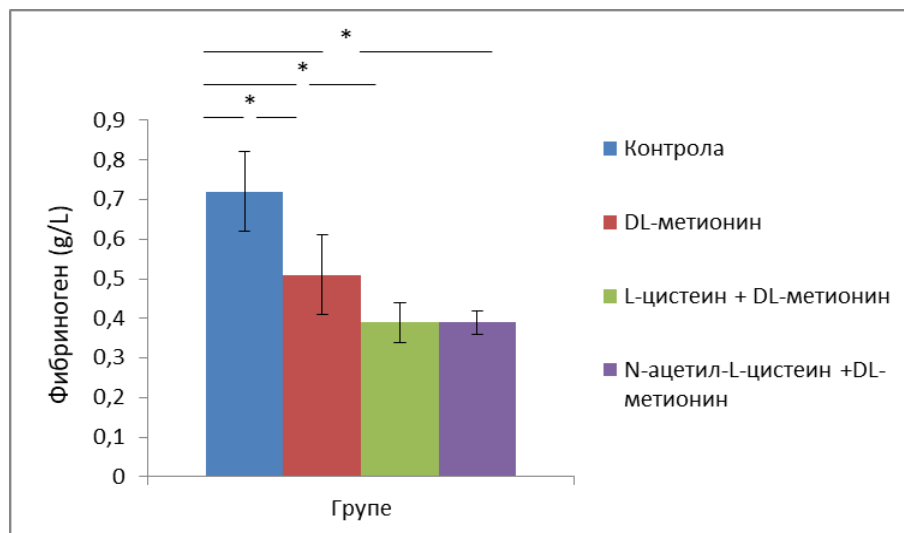
У другом делу истраживања, испитивали смо утицај сунхроничне администрације метионина, самостално или у комбинацији са L-цистеином и/или N-ацетил-L-цистеином на маркере хемостазе крви, као што су фибриноген, D-димер и Von-Willebrand-ов фактор.

Табела 14. Просечне вредности параметара хемостазе фибриногена, D-димера и Von-Willebrand-овог фактора у испитивним групама 21 дан након апликације

Група/Параметри	фибриноген (g/L)	D-димер (mg/L)	vWF (mg/ml)
Контрола	0,72±0,10	0,21±0,02	14,45±5,61
DL-метионин	0,51±0,08	0,20±0,03	9,54±0,39
L-цистеин + DL-метионин	0,39±0,00	0,53±0,09	9,78±1,43
N-ацетил-L-цистеин + DL-метионин	0,39±0,00	0,19±0,03	11,26±1,48

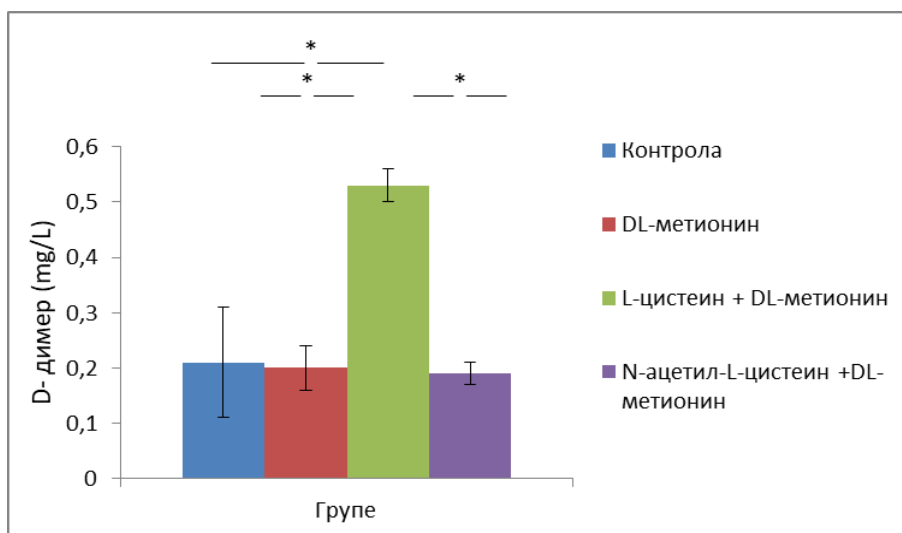
На Графикону бр. 25 приказане су просечне вредности концентрације фибриногена у свим групама. Поређењем група, утврђене су статистички значајно ниже вредности овог параметра у контролној групи у односу на остале групе, али се експерименталне групе статистички значајно не разликују у вредностима овог параметра (Табела 15).

Графикон бр. 25. Просечне вредности фибриногена у испитиваним групама. Знак звездице (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



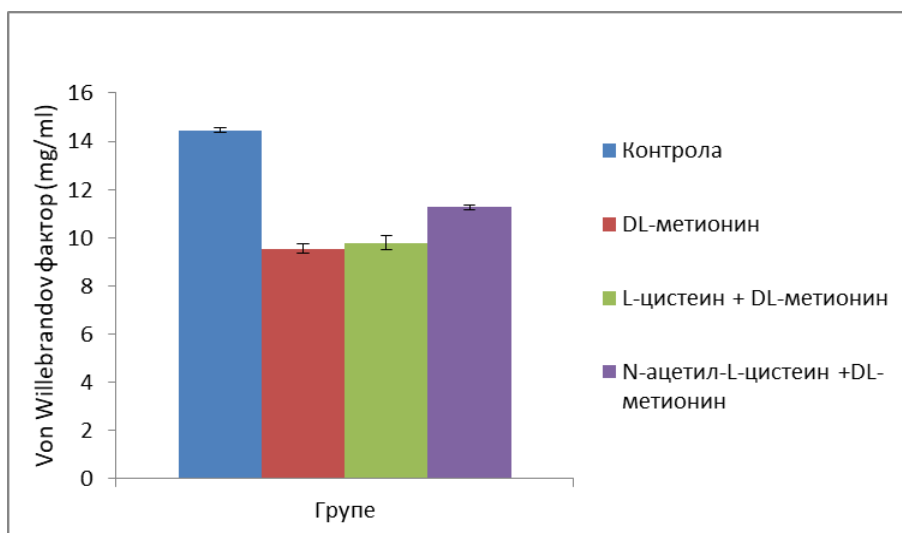
На Графикону бр. 26 приказане су средње вредности концентрације D-димера у свим групама. Поређењем група, утврђене су статистички значајно више вредности овог параметра у L-цистеин+DL-метионин групи у односу на остале групе (Табела 15).

Графикон бр. 26. Просечне вредности D-димера у испитиваним групама. Знак звезде (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



На Графикону бр. 27 приказане су средње вредности концентрације vWF-а у свим групама. Поређењем група, нису утврђене статистички значајне разлике, али се запажа благо више вредности овог параметра у контролној групи у односу на остале групе (Табела 15).

Графикон бр. 27. Просечне вредности vWF-а у испитиваним групама. Знак звездице (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



Табела 15. Значајност разлике вредности фибриногена, D-димера и Von- Willebrandov-ог фактора између испитиваних група

Група/Параметри	фибриноген (g/L)	D-димер (mg/L)	vWF (mg/ml)
Контрола <i>вс.</i> DL-метионин	0,162	0,385	0,512
Контрола <i>вс.</i> L-цистеин+DL-метионин	0,033	0,000	0,826
Контрола <i>вс.</i> NAC+DL-метионин	0,033	0,378	0,447
L-цистеин+DL-метионин <i>вс.</i> NAC+DL-метионин	0,193	0,001	0,051
DL-метионин <i>вс.</i> NAC+DL метионин	0,193	0,903	0,626
L-цистеин+DL-метионин <i>вс.</i> NAC+DL-метионин	1,000	0,002	0,281

4.2.5. ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА СУБХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ DL-МЕТИОНИНА НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА У ПЛАЗМИ ПАЦОВА

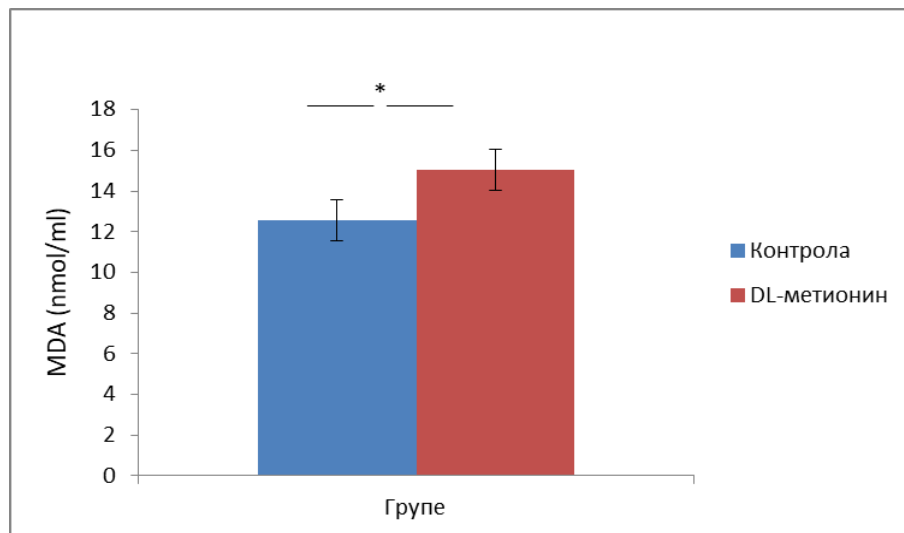
У следећем делу истраживања, испитивали смо утицај субхроничне администрације DL-метионина на маркере оксидативног стреса и антиоксидативног система заштите, малонилдиалдехид, каталаза, глутатион пероксидазе и супероксид дисмутазе. У Табели 16 приказане су средње вредности маркера оксидативног стреса и антиоксидативне заштите.

Табела 16. Поређење параметара оксидативног стреса у плазми пацова у групи изложеној субхроничној стимулацији метиониним и контролној групи

Параметар	групе	
	Контролна ($\bar{x} \pm SE$)	Метионин ($\bar{x} \pm SE$)
MDA (nmol/mL)	12.56±1.38	15.03±1.39
CAT (U)	6.61±0.51	8.17±1.06
CAT (U/mL)	132.22±10.37	163.53±21.23
GPx (U/mL)	8.81±0.69	10.90±1.41
SOD (U/mL)	30.09±0.82	29.92±0.44

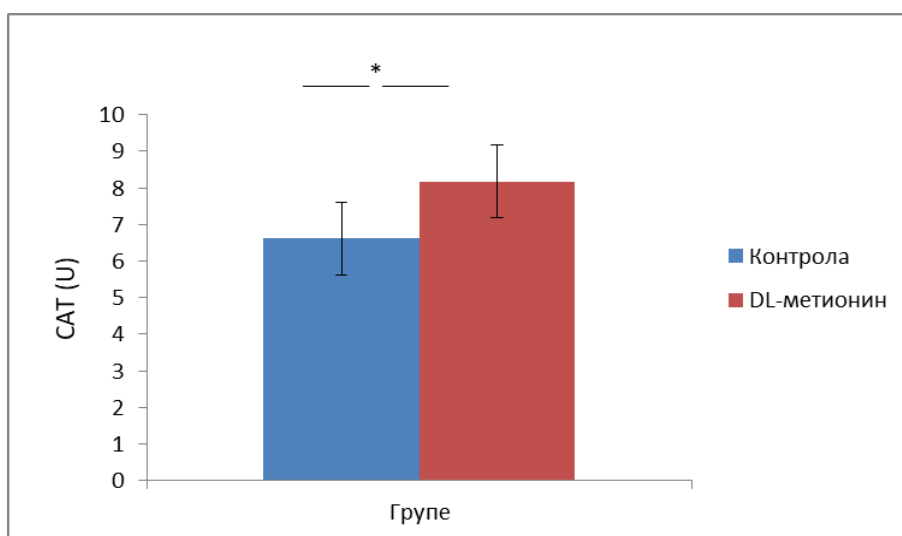
На Графикону бр. 28 приказане су средње вредности концентрације MDA-а у контролној и метионин-групи. Поређењем група, утврђена је статистички значајна разлика између ових група, са значајно вишим вредностима овог параметра у метионин групи.

Графикон бр. 28. Просечне вредности MDA-а у контролној и метионин-групи. Знак звезде (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



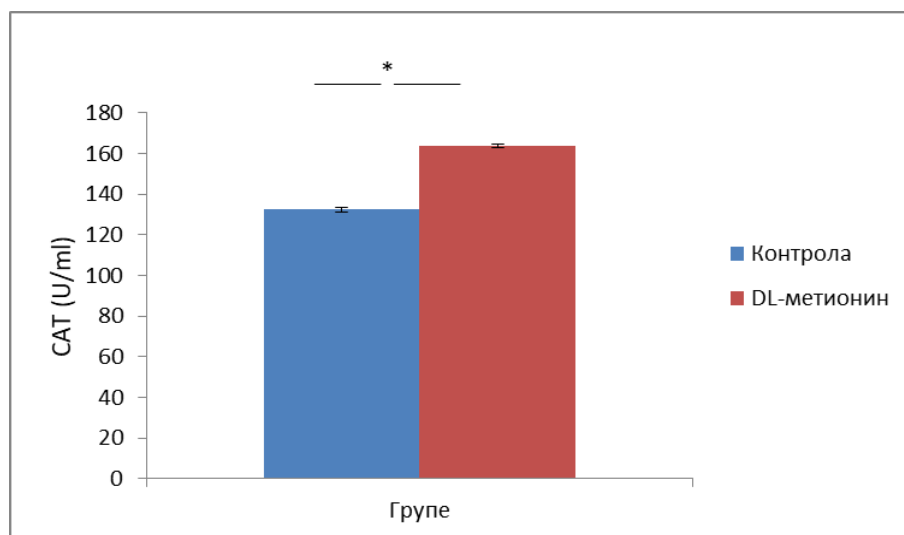
На Графикону бр. 29 приказане су средње вредности концентрације САТ у контролној и метионин-групи. Поређењем група, утврђена је статистички значајна разлика између ових група, са значајно вишим вредностима овог параметра у метионин групи.

Графикон бр. 29. Просечне вредности САТ у контролној и метионин-групи. Знак звездице (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



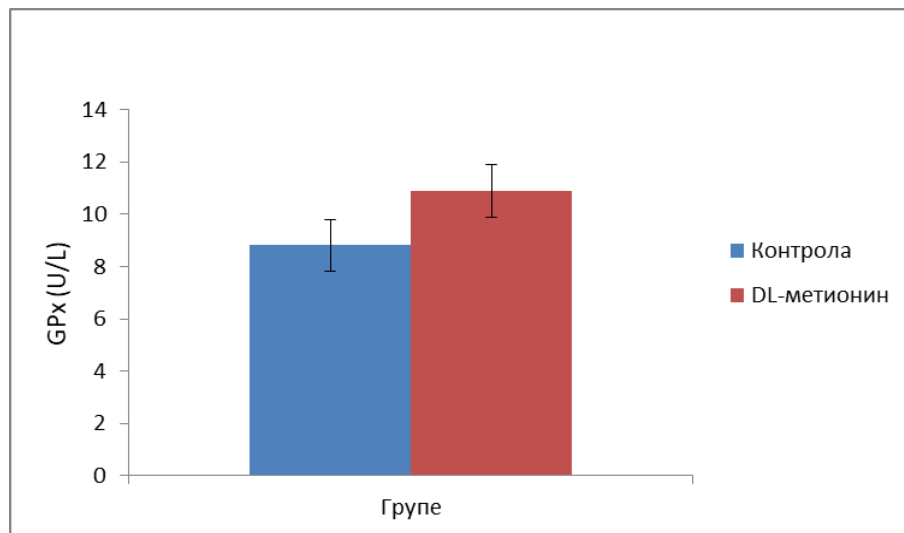
На Графикону бр. 30 приказане су средње вредности концентрације САТ из ткива срца у контролној и метионин-групи. Поређењем група, утврђена је статистички значајна разлика између ових група, са значајно вишим вредностима овог параметра у метионин групи.

Графикон бр. 30. Просечне вредности САТ из ткива срца у контролној и метионин-групи. Знак звездице (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



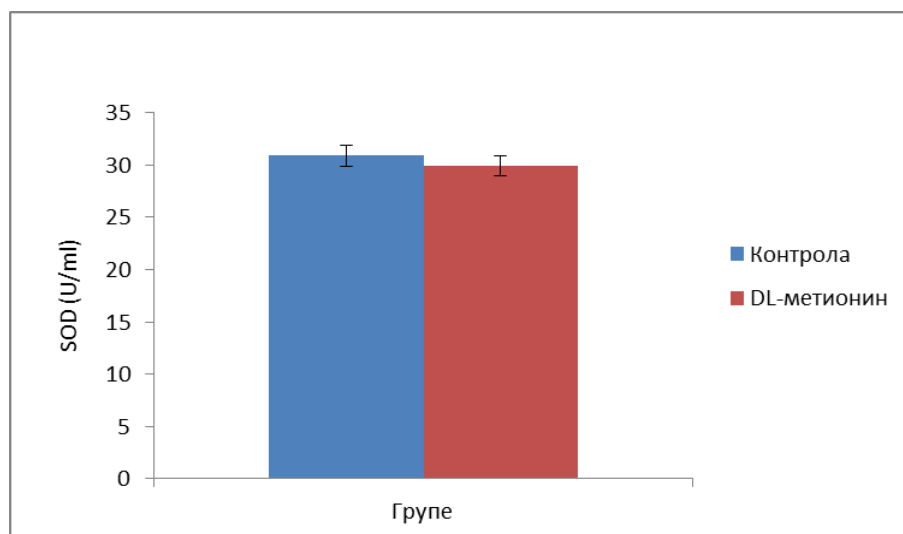
На Графикону бр. 31 приказане су средње вредности концентрације GPx у контролној и метионин-групи. Поређењем група, није утврђена статистички значајна разлика између ових група.

Графикон бр. 31. Просечне вредности GPx у контролној и метионин-групи. Знак звезде (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



На Графикону бр. 32 приказане су средње вредности концентрације SOD-а у контролној и метионин-групи. Поређењем група, није утврђена статистички значајна разлика између ових група.

Графикон бр. 32. Просечне вредности SOD-а у контролној и метионин-групи. Знак звезде (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



4.3 ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА СУБХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ DL-МЕТИОНИНА НА АКТИВНОСТ АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРАЗЕ У ТКИВУ СРЦА КОД ПАЦОВА

Субхронична администрација довела је до статистички значајне разлике у активности ацетилхолинестеразе у ткиву срца (Табела 17).

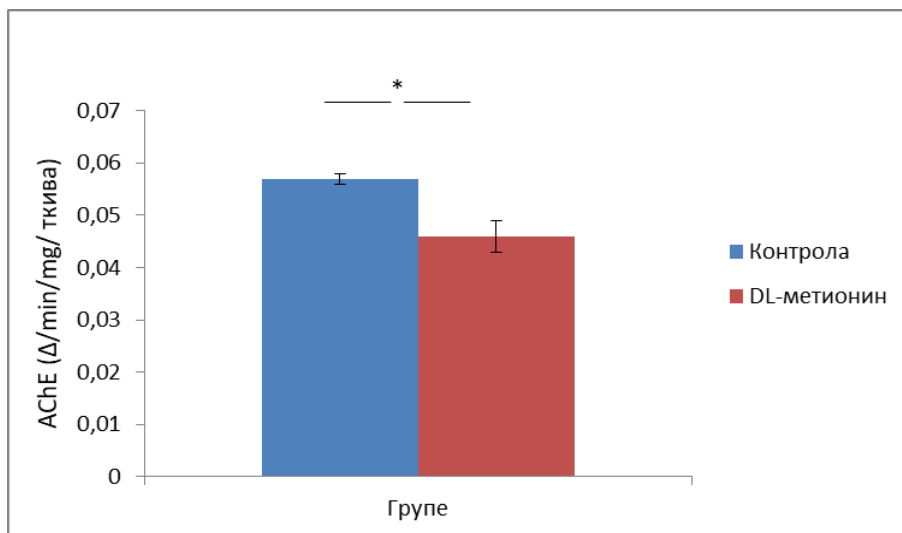
Табела 17. Поређење параметара оксидативног стреса у ткиву срца пацова у групи изложеној субхроничној стимулацији метиониним и контролној групи

Параметар	Групе	
	Контролна ($\bar{x} \pm SE$)	Метионин ($\bar{x} \pm SE$)
AChE $\Delta A/min/mg$ ткива (срце)	0.057 \pm 0.002	0.046 \pm 0.004*

* $p < 0,05$

На Графикону бр. 33 приказане су средње вредности активности ацетилхолинестеразе у ткиву срца у контролној и метионин-групи. Поређењем група, утврђена је статистички значајна разлика између ових група, при чему је активност овог ензима значајно снижена у метионин групи.

Графикон бр. 33. Просечне вредности активности ацетилхолинестеразе у ткиву срца у контролној и метионин-групи. Знак звездице (*) означава статистичку значајну разлику у испитиваном параметру између група од интереса (* $p < 0,05$).



4.4 ХИСТОПАТОЛОШКА АНАЛИЗА ЕФЕКТА СУБХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ DL-МЕТИОНИНА

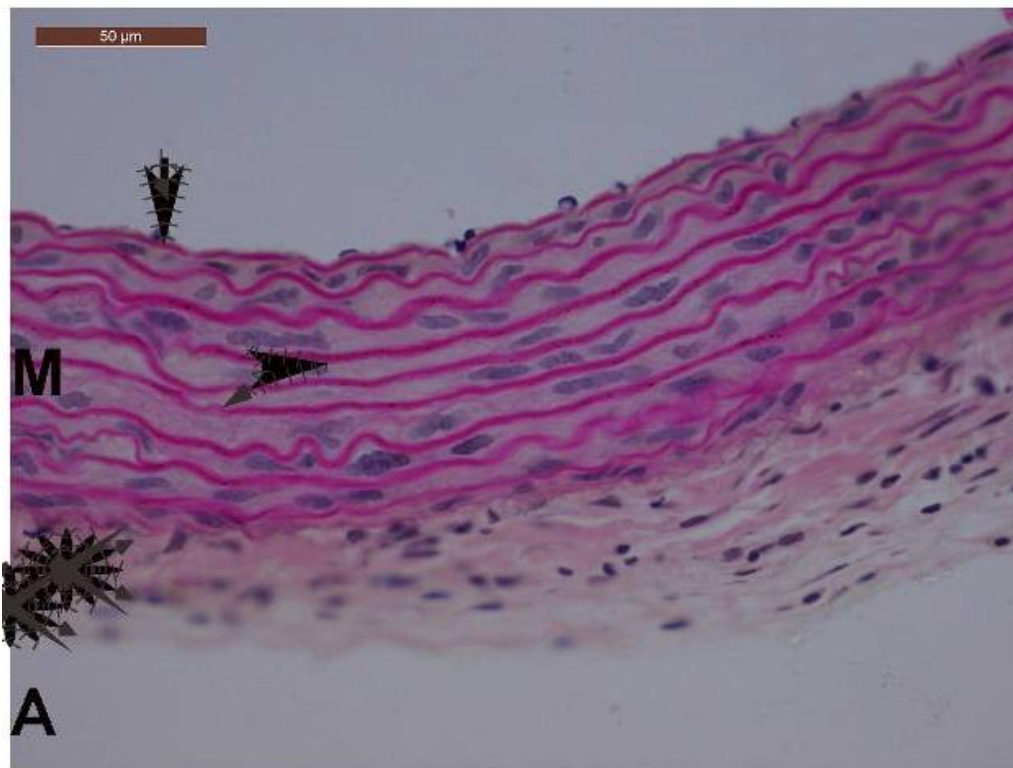
После тронедељне интраперитонеалне апликације метионина исечци ткива аорте и срца су бојени одговарајућим техникама, а потом су анализирани хистолошки параметри у четири групе:

- i. *Група К* - Контролна група (0,9% NaCl 1 мл/дан);
- ii. *Група М* – DL-метионин (0,8 mmol/kg/тм/дан);
- iii. *Група Ц* – DL-метионин (0,8 mmol/kg/тм/дан) + L-цистеин (7 mg/kg/тм/дан);
- iv. *Група Н* – DL-метионин (0,8 mmol/kg/тм/дан) + N-ацетил-L-цистеин (50 mg/kg/тм/дан).

4.4.1 ХИСТОПАТОЛОШКА АНАЛИЗА ТКИВА АОРТЕ У ОДНОСУ НА КОНТРОЛНУ ГРУПУ

Контролна група (Група К)

Десцендентна торакална и абдоминална аорта контролне групе су правилне, трослојне грађе. Разликују се *tunica intima*, *tunica media* и *tunica adventitia* (Слика 1.-А). *Tunica intima* је састављена од ендотела и субендотелног везивног ткива. Ендотел је правилне, очуване грађе, без уочљивих оштећења (Слика 1.-А). Субендотелно везивно ткиво је веома мале дебљине, без хиперплазије интимае и атеросклерозе. *Tunica media* састоји се од јасно дефинисаних еластичних ламела (ламина, мембрана) и глатких мишићних ћелија. Еластичне мембране су очуваног континуитета (Слика 1.-А), а интерламинарни простори су правилни са спирално оријентисаним глатким мишићним ћелијама. *Tunica adventitia* је релативно танка, правилне грађе. Састоји се од растреситог везивног ткива које се без јасне границе наставља периадвентицијалним мрким или белим масним ткивом. У саставу адвентицијалног омотача налазе се фибробласти, миофибробласти, макрофаги и колагена влакна.

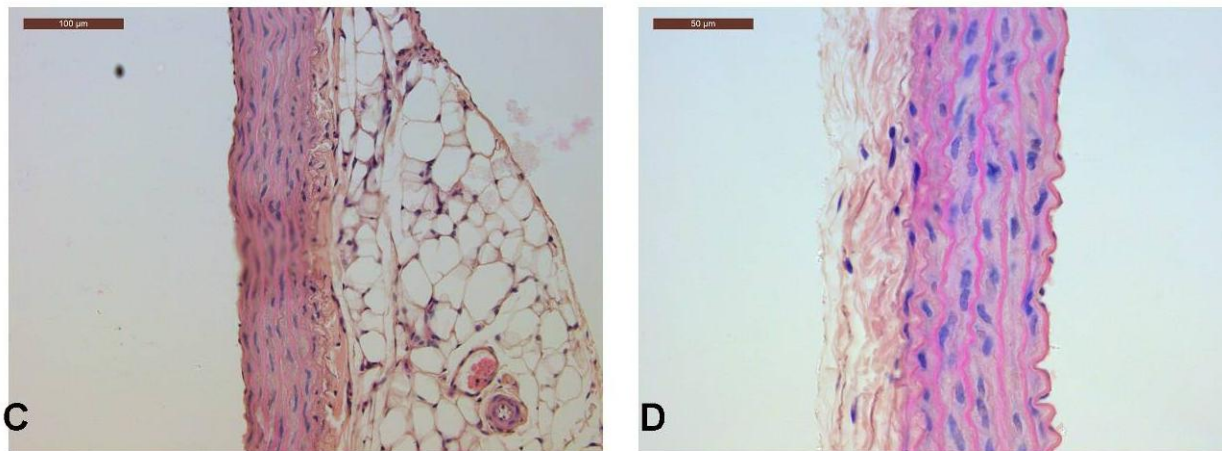


Слика 1. Ткиво аорте. Група К (бојење хематоксилином и еозином, оригинално увеличање 400х, скале бар=50µм): очуван ендотел (стрелица), танко субендотелно везивно ткиво; еластичне ламине очуваног континуитета (глава стрелице); туница медиа правилне грађе (М); tunica adventitia – растресито везивно ткиво (звездица).

Метионин група (Група М)

Десцендентна торакална и абдоминална аорта контролне групе су правилне, трослојне грађе. Разликују се *tunica intima*, *tunica media* и *tunica adventitia* (Слика 2.- Ц и Д). *Tunica intima* је састављена од ендотела и субендотелног везивног ткива. Ендотел је правилне, очуване грађе, без уочљивих оштећења (Слика 2.- Д). Субендотелно везивно ткиво је веома мале дебљине, без хиперплазије интимае и атеросклерозе. *Tunica media* састоји се од јасно дефинисаних еластичних ламела (ламина, мембране) и глатких мишићних ћелија. Еластичне мембране су очуваног континуитета (Слика 2.- Ц и Д), а интерламинарни простори су правилни са спирално оријентисаним глатким мишићним ћелијама. *Tunica adventitia* је релативно танка, правилне грађе. Састоји се од растреситог

везивног ткива које се без јасне границе наставља периадвентицијалним мрким или белим масним ткивом (Слика 2- Ц). У периадвентицијалном масном ткиву уочавају се мали крвни судови типа артериола, без промена (Слика 2.- Ц).

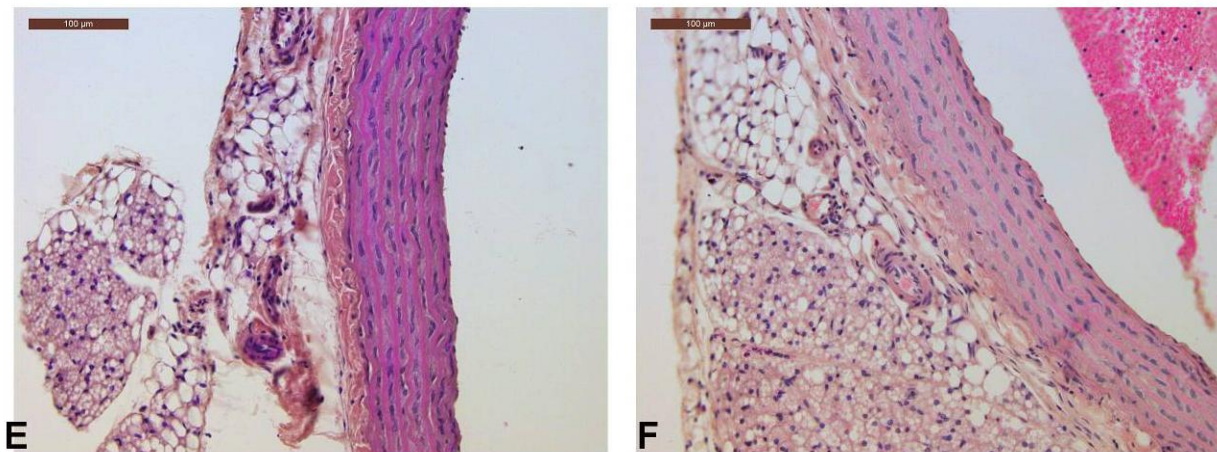


Слика 2. Ткиво аорте. Група М (бојење хематоксилином и еозином, оригинално увеличање 200х, скале бар=100µм): танко субендотелно везивно ткиво, *tunica intima* без хиперплазије интима или атеросклерозе; *tunica intima* правилне грађе; *tunica adventitia* која се без јасне границе наставља у бело масно ткиво. Д- (бојење хематоксилином и еозином, оригинално увеличање 400х, сцале бар=50µм): очуван ендотел, еластичне ламине очуваног континуитета.

Метионин+L-цистеин група (Група Ц)

Десцедентна торакална и абдоминална аорта контролне групе су правилне, трослојне грађе. Разликују се *tunica intima*, *tunica media* и *tunica adventitia* (Слика 3.- Е и Ф). *Tunica intima* је састављена од ендотела и субендотелног везивног ткива. Ендотел је правилне, очуване грађе, без уочљивих оштећења (Слика 3.- Ф). Субендотелно везивно ткиво је веома мале дебљине, без хиперплазије интима и атеросклерозе. *Tunica media* састоји се од јасно дефинисаних еластичних ламела (ламина, мембране) и глатких мишићних ћелија. Еластичне мембране су очуваног континуитета (Слика 3.- Е и Ф), а интерламинарни простори су правилни са спирално оријентисаним глатким мишићним ћелијама. *Tunica adventitia* је релативно танка, правилне грађе. Састоји се од растреситог

везивног ткива које се без јасне границе наставља периадвентицијалним мрким или белим масним ткивом. Мали крвни судови периадвентицијалног масног ткива су без патолошких промена (Слика 3.- Е и Ф).

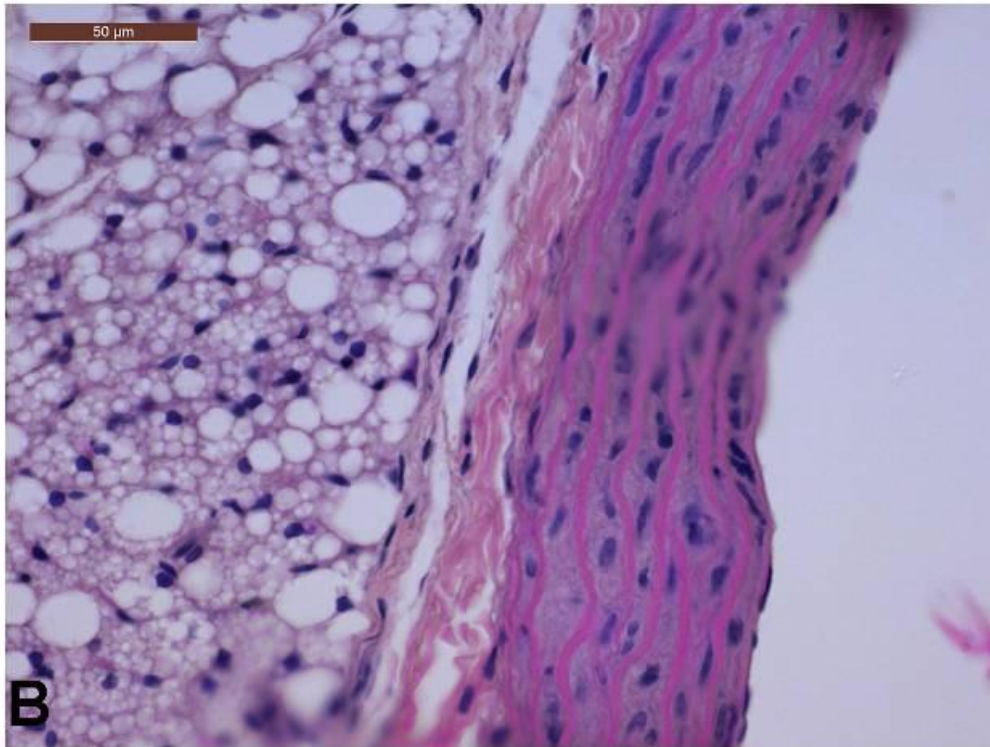


Слика 3. Ткиво аорте. Група Ц. Е- (бојење хематоксилином и еозином, оригинално увећање 200х, скале бар=100µм): очуван ендотел, танко субендотелно везивно ткиво; еластичне ламине очуваног континуитета; туница медиа правилне грађе; туница адвентитија која се без јасне границе наставља у мрко масно ткиво. Ф- (бојење хематоксилином и еозином, оригинално увећање 200х, скале бар=100µм): очуван ендотел, танко субендотелно везивно ткиво; еластичне ламине очуваног континуитета; туница медиа правилне грађе; туница адвентитија која се без јасне границе наставља у мрко масно ткиво.

Метионин+N-ацетил-L-цистеин група (Група Н)

Десцедентна торакална и абдоминална аорта групе Н су правилне, трослојне грађе. Разликују се *tunica intima*, *tunica media* и *tunica adventitia* (Слика 4.- Б). *Tunica intima* је састављена од ендотела и субендотелног везивног ткива. Ендотел је правилне, очуване грађе, без уочљивих оштећења (Слика 4.- Б). Субендотелно везивно ткиво је веома мале дебљине, без хиперплазије интимае и атеросклерозе. *Tunica media* састоји се од јасно дефинисаних еластичних ламела (ламина, мембрана) и глатких мишићних ћелија. Еластичне мембране су очуваног континуитета (Слика 4.- Б), а интерламинарни простори су правилни са спирално оријентисаним глатким мишићним

ћелијама. *Tunica adventitia* је релативно танка, правилне грађе. Састоји се од растреситог везивног ткива које се без јасне границе наставља периадвентицијалним мрким или белим масним ткивом.

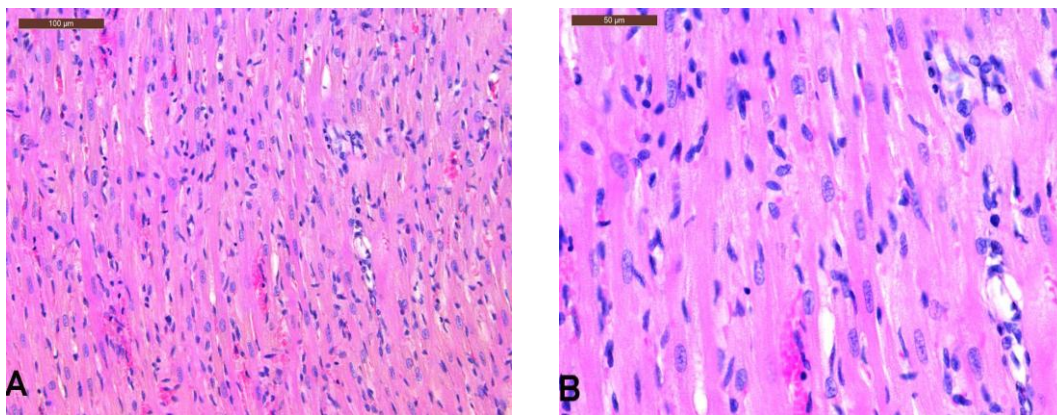


Слика 4. Ткиво аорте. Група Н. Б- (бојење хематоксилином и еозином, оригинално увећаче 400х, скале бар=50 μ м): очуван ендотел, танко субендотелно везивно ткиво; еластичне ламине очуваног континуитета; *tunica media* правилне грађе; *tunica adventitia* која се без јасне границе наставља у мрко масно ткиво.

4.4.2 ХИСТОПАТОЛОШКА АНАЛИЗА ТКИВА СРЦА У ОДНОСУ НА КОНТРОЛНУ ГРУПУ

Контролна група (Група К)

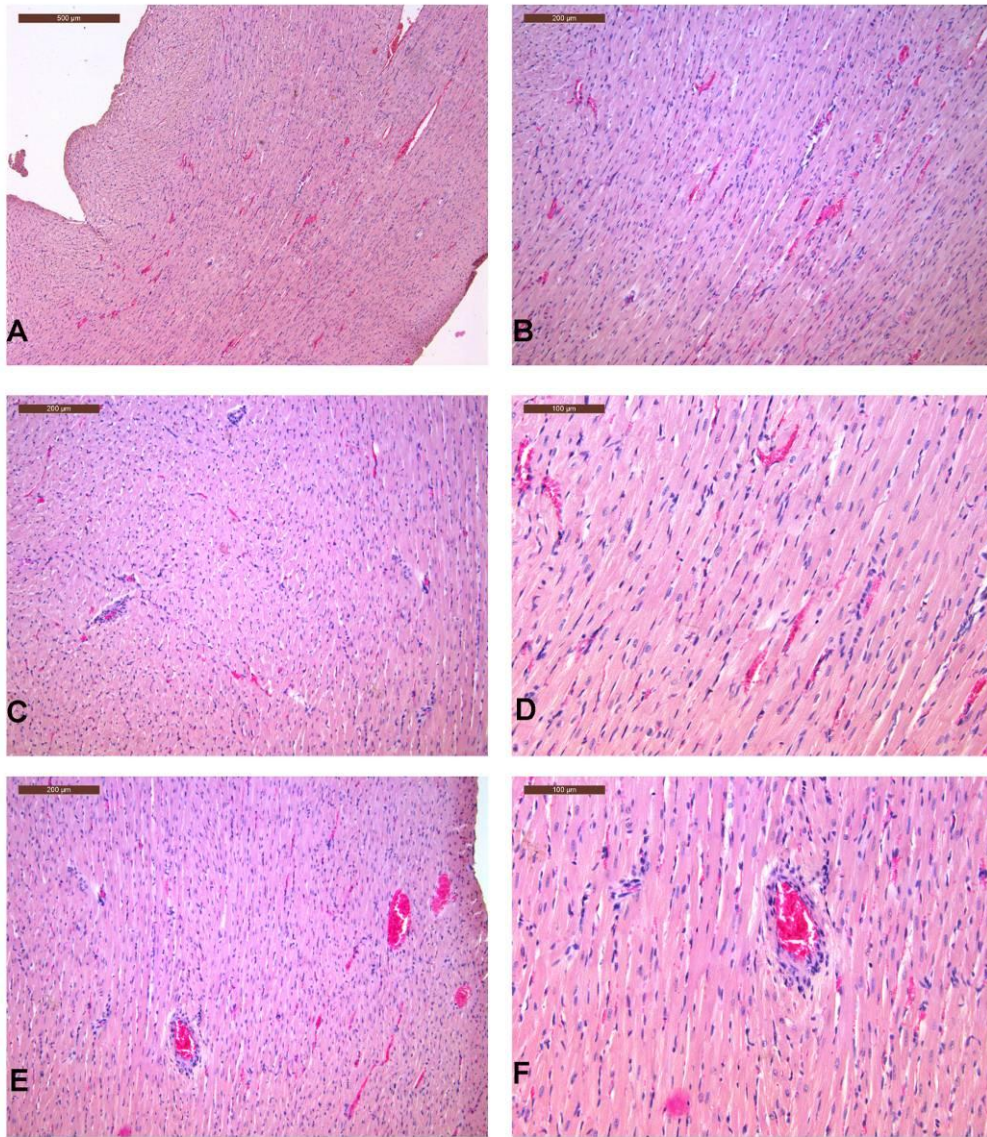
Срце експерименталних животиња контролне групе је правилне хистолошке грађе. Разликују се ендокард, миокард и епикард. Ендокард је састављен од ендотела и субендотелног везивног ткива. Ендотел је правилне, очуване грађе, без уочљивих оштећења. Субендотелно везивно ткиво је слабо развијено. Миокард се састоји од спирално оријентисаних срчаних мишићних ћелија. Попречна испруганост је очувана. Једра су централно постављена. Ћелије су разгранате на крајевима и повезане интеркалатним дисковима (Слика 4.- А и Б). Интрамурални огранци коронарних артерија су без промена. Епикард је правилне грађе. Састоји се од растреситог везивног ткива и слоја мезотела.



Слика 5. Група К. (бојење хематоксилином и еозином, (А) оригинално увеличање 200х, скале бар=100μм; (Б) оригинално увеличање 400х, скале бар=50μм): миокард правилне организације; спирално оријентисане, разгранате, срчане мишићне ћелије повезане интеркалатним дисковима. Попречна испруганост је очувана. Једра су централно постављена.

Метионин група (Група М)

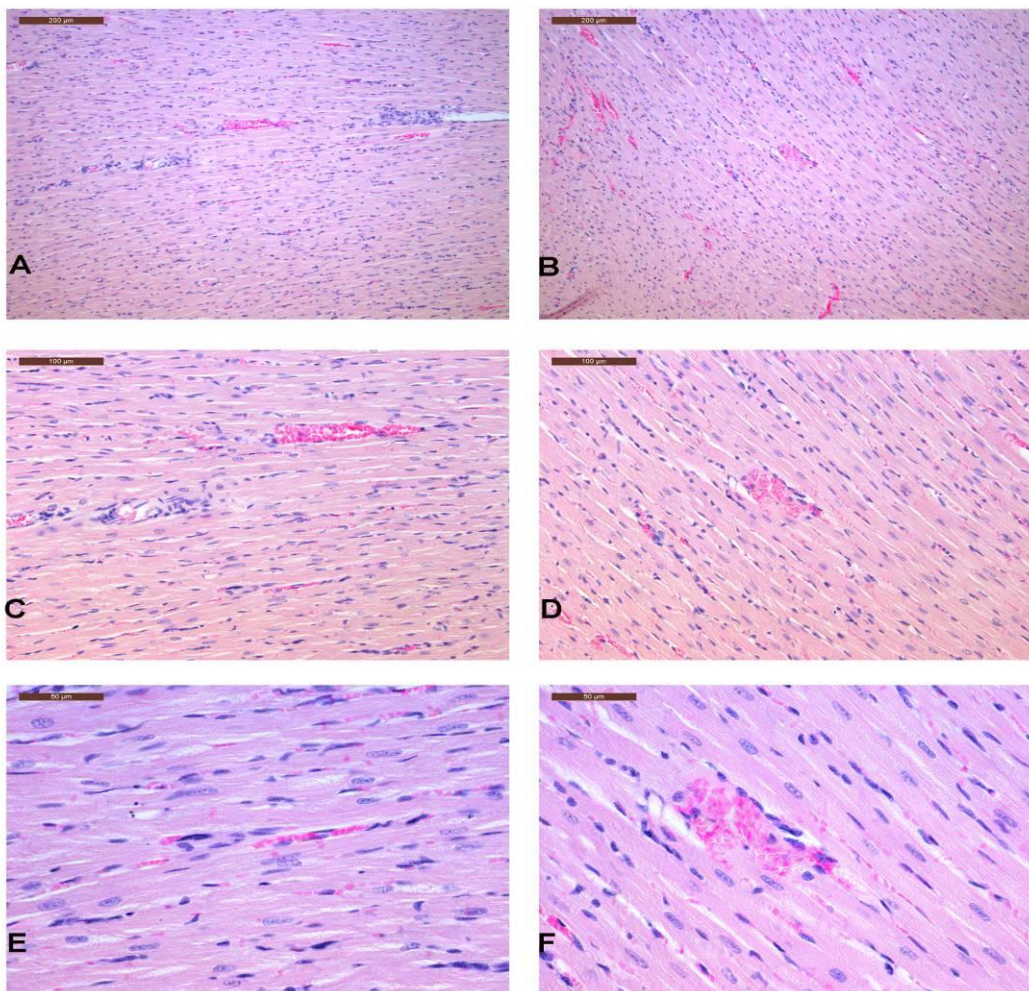
Срце експерименталних животиња групе М је правилне хистолошке грађе. Разликују се ендокард, миокард и епикард. Ендокард је састављен од ендотела и субендотелног везивног ткива. Ендотел је правилне, очуване грађе, без уочљивих оштећења. Субендотелно везивно ткиво је слабо развијено. Миокард се састоји од спирално оријентисаних срчаних мишићних ћелија. Попречна испруганост је очувана. Једра су централно постављена. Ћелије су разгранате на крајевима и повезане интеркалатним дисковима (Слика 6. А-Ф). У овој групи уочене су следеће промене: пасивна хиперемичка зида леве коморе (Слика 6. А-Ф); интрамурални огранци коронарних артерија су без промена. Нема интерстицијалне фиброзе. Нема некрозе. Нема постинфарктних ожиљних промена. Нема интерстицијалног едема. Епикард је правилне грађе. Састоји се од растреситог везивног ткива и слоја мезотела.



Слика 6. Ткиво срца. Група М. (бојење хематоксилином и еозином, (А) оригинално увељичање 50х, скале бар=500µм; (Б, Ц и Е) оригинално увељичање 100х, скале бар=200µм; (Д и Ф) оригинално увељичање 200х, скале бар=100µм): миокард правилне организације; спирално оријентисане, разгранате, срчане мишићне ћелије повезане интеркалатним дисковима. Попречна испруганост је очувана. Једра су централно постављена. Пасивна хиперимија зида леве коморе (А - Е). Интрамурални огранци коронарних артерија су без промена (Е и Ф).

Метионин+ L-цистеин група (Група Ц)

Срце експерименталних животиња групе Ц је правилне хистолошке грађе. Разликују се ендокард, миокард и епикард. Ендокард је састављен од ендотела и субендотелног везивног ткива. Ендотел је правилне, очуване грађе, без уочљивих оштећења. Субендотелно везивно ткиво је слабо развијено. Миокард се састоји од спирално оријентисаних срчаних мишићних ћелија. Попречна испруганост је очувана. Једра су централно постављена. Ћелије су разгранате на крајевима и повезане интеркалатним дисковима (Слика 7. А-Ф). У овој групи уочене су следеће промене: пасивна хиперемичка зида леве коморе (Слика 7. А-Ф); и фокална екстравазација еритроцита (Слика 7. -Ф). Интрамурални огранци коронарних артерија су без промена. Нема интерстицијалне фиброзе. Нема некрозе. Нема постинфарктних ожиљних промена. Нема интерстицијалног едема. Епикард је правилне грађе. Састоји се од растреситог везивног ткива и слоја мезотела.

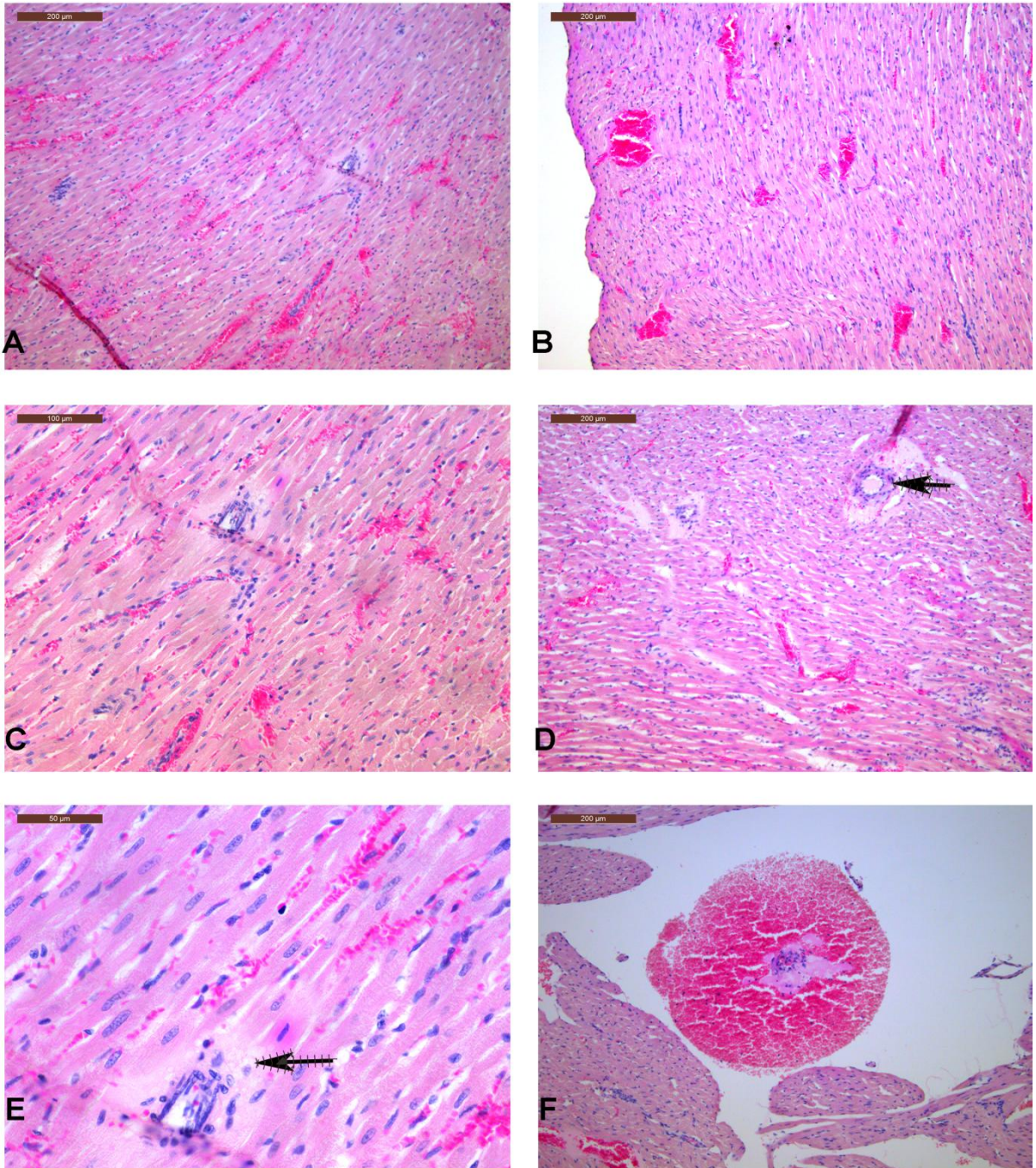


Слика 7. Ткиво срца. Група Ц. (бојење хематоксилином и еозином, (А и Б) оригинално увељичање 100х, скале бар=200µм; (Ц и Д) оригинално увељичање 200х, скале бар=100µм; (Е и Ф) оригинално увељичање 400х, скале бар=50µм): миокард правилне организације; спирално оријентисане, разгранате, срчане мишићне ћелије повезане интеркалатним дисковима. Попречна испруганост је очувана. Једра су централно постављена. Пасивна хиперимија зида леве коморе (А - Ф). Фокална екстравазација еритроцита (Ц – Ф).

Метионин+N-ацетил-L-цистеин група (Група Н)

Срце експерименталних животиња групе Н је правилне хистолошке грађе. Разликују се ендокард, миокард и епикард. Ендокард је састављен од ендотела и субендотелног везивног ткива. Ендотел је правилне, очуване грађе, без уочљивих оштећења. Субендотелно везивно ткиво је слабо развијено. Миокард се састоји од спирално оријентисаних срчаних мишићних ћелија. Попречна испруганост је очувана.

Једра су централно постављена. Ћелије су разгранате на крајевима и повезане интеркалатним дисковима (Слика 8. А-Ф). У овој групи уочене су следеће промене: пасивна хиперемија зида леве коморе, најизраженија у исечцима са ознаком Н5 (Слика 8.-А и Б); пасивна хиперемија зида десне коморе, најизраженија у исечцима са ознаком Н1; лак периваскуларни едем, најизраженији у исечцима са ознаком Н5 (Слика 8. -Д и Е); лак интрацелуларни едем и вакуолизација појединих кардиомиоцита (Н5) (Слика 8. -Е); екстравазација еритроцита (Слика 8. А-Е); и свежи тромб у десној комори – исечци Н5 (Слика 8. -Ф). Интрамурални огранци коронарних артерија су без промена. Нема интерстицијалне фиброзе. Нема некрозе. Нема постинфарктних ожилних промена. Нема интерстицијалног едема. Епикард је правилне грађе. Састоји се од растреситог везивног ткива и слоја мезотела.



Слика 8. Ткиво срца. Група Н. (бојење хематоксилином и еозином, (А, Б, Д и Ф) оригинално увељачање 100х, скале бар=200μм; (Ц) оригинално увељачање 200х, скале бар=100μм; (Е) оригинално увељачање 400х, скале бар=50μм): миокард правилне организације; спирално оријентисане, разгранате, срчане мишићне ћелије повезане интеркалатним дисковима. Попречна испруганост је очувана. Једра су централно постављена. Пасивна хиперемија зида леве коморе (А и Б); лак периваскуларни едем -

стрелица (Д и Е); лак интрацелуларни едем и вакуолизација појединих кардиомиоцита - стрелица (Е); екстравазација еритроцита (Е); свежи тромб у десној комори (Ф). Интрамурални огранци коронарних артерија су без промена (Д и Е).

V

ДИСКУСИЈА

Главни циљ истраживања је био да испита акутне и субхроничне ефекте аминокиселине метионина (самостално или у комбинацији са L-цистеином или N-ацетил-L-цистеином) на различите функционалне, биохемијске и хистолошке параметре кардиоваскуларног система код пацова. Овај циљ је произашао из претходних сазнања да повећана концентрација метионина путем свог метаболизма изазива акумулацију хомоцистеина што све заједно негативно утиче на кардиоваскулрну хомеостазу и повезује се са настанком кардиоваскуларних болести (199, 200). Најновији литературни подаци показују да хиперметионинемија и/или хиперхомоцистеинемиа имају важну улогу у појави ендотелне дисфункције и атерогенезе (199-201). Претпостављени механизам ових негативних ефеката најчешће укључује генерисање слободних кисеоничних и азотних врста и тиме повећани оксидациони стрес. Оксидациона оштећења ендотелних ћелија и кардиомиоцита се системски манифестују кроз промене у различитим функционалним, биохемијским и морфолошким маркерима у крви и ткивима (200-202).

Поред тога, уочено је да појачани унос метионина корелира са хематолошким променама као што су пораст концентрације метхемоглобина или оштећење мембране еритроцита коју изазивају хемолитичку анемију (203). Такође је показано да метионин испољава директна штетна дејства на ткива као што су срце (204), мозак (205) и јетра (206). Мада ови механизми нису до краја расветљени, вероватно подразумевају стимулисање оксидационог стреса (207).

Сумпоровите аминокиселине су први пут откривене давне 1848. године у лабораторији чувеног немачког хемичара Јустуса фон Либига који се сматра оснивачем органске хемије (Justus Freiherr von Liebig, 1803-1873) (208). Најпре је откривена топлотна нестабилност протеина у јаким алкалним растворима, који ослобађају H_2S и NH_3 . Потом су 1902. године идентификоване две аминокиселине које садрже сумпор међу којима је једна одмах правилно означена као цистеин. Назив друге аминокиселине је уврђен готово три деценије касније када су Barger и Coyne 1928. године утврдили њену хемијску формулу као γ -метилтиол- α -аминобутерна киселина и предложили име метионин (208).

Метионин је есенцијална аминокиселина и постоји у два изомера (L- и D-метионин) од којих L-облик преовладава у природи. Оба облика могу се метаболисати

помоћу DL-рацемазе, која је важна за примену хемијски синтетизованог DL-метионин рацемата као додатка у прехранбеној индустрији (208).

Путем реакција трансметилације метионин донира метил групе, преноси их на одређени акцептор, чиме учествује у продукцији бројних једињења значајних за наш организам: адреналина, креатина, ансерина, саркозина, бетаина, карнитина, холина, полиамина итд. Метил група метионина је везана за сумпор, која се лако преноси на неки други молекул. Реакције трансметилације почињу најпре везивањем метионина за АТФ, при чему се аденозин везује за метионин и настаје S-аденозил-метионин (SAM) или активни метионин. Ова реакција је катализована ензимом S-аденозин-метионин трансферазом. Када је метионин у активном облику врло ефикасно преноси метил групу на amino или хидроксилну групу другог једињења (209). Када се метил група одвоји од S-аденозил-метионина настаје S-аденозил хомоцистеин. Хидролизом S-аденозил-хомоцистеина се добијају хомоцистеин и аденозин. Овако формиран хомоцистеин се сједињује са серином градећи цистатион, уз дејство ензима цистатион синтетазе. Цистатион се деловањем цистатионазе разграђује на цистеин и хомосерин. Зато метионин представља прекурсор и других тиоаминских аминокиселина: хомоцистеина, цистеина и цистина (209). Са патофизиолошког аспекта управо је хомоцистеин, најважнији метаболит метионина и дејства метионина на наш организам, поготово у стању његових повишених концентрација, те су се ефекти метионина посматрали пре свега кроз призму пораста вредности хомоцистеина, али не и директни ефекти метионина.

5.1 ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА АКУТНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ DL-МЕТИОНИНА

У акутној серији експеримената је испитиван утицај акутног оптерећења DL-метионином који је апликован једнократно у дози од 0,8 mmol/kg/тм. На овај начин смо желели да утврдимо акутне ефекте ове есенцијалне аминокиселине на параметре оксидативног стреса у плазми пацова и на активност ензима ацетилхолинестеразе у ткиву срца и мозга пацова.

Резултати које смо добили су показали да акутна стимулација DL-метионином изазива повећану активност ензима каталазе (CAT) и глутатион пероксидазе (GPx) док су вредности MDA и SOD остале непромењене (Табела 1). Ови налази индикују да акутна апликација метионина снажно мобилише прву ензимску линију заштите од оксидационих оштећења (CAT и GPx). На тај начин, изгледа да је акутни одговор антиоксидационог ензимског система заштите на метионин појачана активација CAT и GPx. Очигледно да је за промене активности SOD вероватно био потребан дужи период експозиције овом аминокиселином. Поред тога, порастом активности CAT и GPx се може објаснити и одсуство пораста липидне пероксидације (MDA) након акутне хиперметионинемije.

Повезаност метаболизма метионина и параметара оксидативног стреса је доказана у многим истраживањима. Ипак још увек постоје непознанице и контроверзе у којој дози и дужини експозиције метионин може потенцирати или супримирати оксидациони стрес. (210). Најновија студија из 2018. године је сугерисала да третман D-метионином у дози од (300 mg/kg) током три недеље може узроковати пораст активности антиоксидационог заштитног система код пацова и тиме ублажити нефротоксични ефекат цисплатине (211).

Ранији подаци показују да рестрикција уноса метионина путем хране такође може да интерферира са про- и анти-оксидативном молекулима редокс система пацова. Наиме, Madineni и каоутори су испитивали ефекте уноса или рестрикције уноса метионина код пацова на оксидационе и антиоксидационе параметре код пацова током шест месеци. Аутори су закључили да шестомесечни прекид конзумирања ове аминокиселине изазива смањење вредности про-оксидационих молекула у крви и јетри независно од функције антиоксидационих ензима (GPx) код којих је забележена снижена активност (212).

Претходно истраживање Azada и сарадника је указала да и краћа администрација метионина у трајању од 3,5 дана у дози од 400 mg/kg може да спречи оксидациона оштећења тубула бубрега пацова. Механизам овог протективног ефекта метионина је подразумевао снижење митохондријалне продукције супероксид анјон радикала (213).

Као што може да се уочи из компарације са претходним студијама, већина података о утицају метионина на оксидациони стрес су везана за хронична стања и дужу администрацију ове аминокиселине док о дејствима метионина у условима његовог акутног пораста готово да нема података. Поред тога, приметно је да је концентрација примењеног метионина у свим овим студијама висока, што битно утиче на добијене налазе. У том смислу резултати овог дела нашег истраживања могу да буду од значаја, нарочито са аспекта упоређивања са ефектима субхроничне апликације метионина.

У другом делу акутне фазе истраживања имали смо за задатак да истражимо ефекте стимулације DL-метионином на активност ензима ацетилхолинестеразе (AChE) у ткиву срца и мозга пацова. Резултати које смо добили показују да акутно оптерећење метионином не изазива промењену активност овог ензима у оба испитивана ткива (Табела 2).

AChE се углавном налазе у неуромишићној спојници и холинергичким синапсама у мозгу где имају превасходну сврху завршавања синаптичке неуротрансмисије. У току неуротрансмисије ACh се ослобађа у синаптичку пукотину и везује за холинергичке рецепторе на постсинаптичкој мембрани преносећи сигнал из неурона. AChE која се налази на постсинаптичкој мембрани завршава трансмисију сигнала разграђујући (хидролизирајући) ACh. AChE има два активна места-ањонско и естарско. При интеракцији ACh и AChE долази до хидролизе ACh, ацетиловања естарског места AChE и ослобађање холина. Ацетилована AChE затим реагује с водом, ствара се сирћетна киселина и слободна AChE. Тако ослобођени холин се поново преузима од стране пресинаптичког нерва и користи са поновну синтезу ацетилхолина комбиновањем са ацетил-CoA уз помоћ ензима холин ацетилтрансферазе (214).

Поред AChE, холинестеразама припада и бутирилхолинестераза (неспецифична холинестераза, BChE). Разлика између ацетилхолинестеразе и бутирилхолинестеразе установљена је на основу њиховог различитог афинитета према појединим естрима холина. Брзина којом ацетилхолинестераза разлаже естре холина опада са продужењем

угљоводоничног ланца: ацетилхолин, пропионилхолин, бутирилхолин, док код бутирилхолинестеразе брзина хидролизе опада обрнутим редом. Такође, за разлику од бутирилхолинестеразе, ацетилхолинестераза разлаже ацетил- β -метилхолин, али не и бензоилхолин. Насупрот ацетилхолинестеразе, јасна физиолошка функција бутирилхолинестеразе још увек није позната. Међутим, познато је из клиничке праксе да код генетски узрокованог или стеченог дефицита бутирилхолинестеразе, примена деполаризујућег мишићног релаксанта суксаметонијума доводи до пролонгиране, по живот опасне, нервно-мишићне парализе (215, 216).

Ацетилхолинестераза постоји у неколико изоформи (AChET, AChER и AChEH), без обзира што је код сисара продукт само једног гена, захваљујући различитим посттранслационим модификацијама и удруживању са структурним протеинима. Поред каталитичке улоге везане за ацетилхолин, показано је да овај ензим може имати и друге неензимске функције, укључујући трофичке утицаје, ефекте на ћелијску пролиферацију и диференцијацију, као и одговор на различите стимулусе, укључујући стрес. С обзиром да је ацетилхолинестераза одговорна за хидролизу ацетилхолина у холинергичким синапсама, дејство ацетилхолина у синаптичким пукотинама зависи од активности овог ензима (217).

Интеракција метионина и ацетилхолинестераза је повезана са чињеницом да поред холина и метионин може да буде прекурсор за синтезу ацетилхолина (20). Ипак повезаност метионина и овог ензима је до сада мало позната, слабо изучавана и готово искључиво је везана за мождано ткиво. У недавно спроведеној студији Vučević и сарадници су испитивали утицај депривације метионина на активност ацетилхолинестеразе у јетри и различитим регионима мозга пацова (хипокампус, хипоталамис, кортекс) (218). Након шестонедељног праћења и третмана аутори су показали да у условима метионинског дефицијента долази до пораста активности ацетилхолинестеразе и јетри и можданим регионима мишева (218).

У другој раније спроведеној студији Hrnčić и коаутори су имали за циљ да утврде утицај метионина на мождану активност ацетилхолинестеразе у мозгу пацова након 4 недеље третмана. Аутори су закључили да хронично оптерећење метиониом изазива смањење активности овог ензима у кортексу пацова (178).

На основу свих ових сазнања се закључује да метионин може активно да учествује у контроли и модификацији холинергичке активности у различитим ткивима нарочито у мозданом. У светлу ових налаза, резултати наше студије указују да акутно примењени метионин није имао временског и концентрационог потенцијала да промени активност ацетилхолинестеразе у оба испитивана органа и тиме утиче на холинергичку функцију у њима.

5.2 ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА СУБХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ DL-МЕТИОНИНА НА БИОХЕМИЈСКЕ ПАРАМЕТРЕ ПАЦОВА

Први циљ субхроничне серије експеримената је био да испита утицај субхроничне администрације DL-метионином у трајању од 3 недеље, самостално или у комбинацији са L-цистеином или N-ацетил-L-цистеином, на различите биохемијске показатеље пацова.

Путем ко-апликације са неком од поменутих сумповитих аминокиселина имали смо намеру да утврдимо какав ефекат има њихово удружено дејство (синергистички или антагонистички ефекат) у условима њиховог заједничког оптерећења код пацова.

N-ацетил-L-цистеин (NAC) је аминотиолна киселина која представља синтетички производ L-цистеина, а значајан је прекурсор за синтезу глутатиона (219). Досадашња истраживања показују протективно, антиинфламаторно и антиоксидационо дејство NAC на експериментално изазван колитис код пацова (220). N-ацетил-L-цистеин може да утиче на неколико сигналних путева, укључујући апоптозу, ангиогенезу, раст ћелија, редокс регулисану генску експресију и инфламаторни одговор (221). Поред тога, протективна својства NAC-а су забележена и у истраживањима на људима када је показано да суплементација овим једињењем унапређује оксидациони статус пацијената након абдоминалних хируршких интервенција (222). На овај начин се може увидети да употреба NAC-а може бити и од клиничког значаја.

NAC настаје ацетиловањем L-цистеина која је ћелијама важан као прекурсор у синтези глутатиона (223). NAC може да буде значајан извор сулфхидрилних (-SH) група током култивације ћелија, али је битан и као ацетилувани прекурсор редукованог глутатиона и као агенс који директно неутралише ROS и слободне радикале азота (224).

Као антиоксиданс NAC делује директно и/или повећањем интрацелуларне концентрације редукованог глутатиона, посебно у хепатичном ткиву. Примена NAC-а је описана корисном у многим хроничним клиничким стањима, као што је инфламаторна болест црева, опструктивна плућна болест и друге плућне болести, системска склероза, цистична фиброза, синдром хумане имунодефицијенције, септични шок, дијабетес и болести јетре (225). Потврда антиоксидативног потенцијала NAC-а је утврђена и у моделу хроничног оштећења јетре код пацова (199).

Са друге стране, током свог метаболичког пута метионин трансметилацијом гради цистеин и цистин (219). Тако настали цистеин поседује значајну биолошку активност и значај будући да садржи реактивну тиолну групу. Као и друга тиолна једињења цистеин улази у оксидо-редукционе реакције и остварује антиоксидациона својства (219). У литератури је доказано да цистеин може имати заштитне утицаје у анималном моделу улкуса желуца пацова (226).

L-цистеин, као и NAC, неутралише ефекат метионина усмерен ка редукцији настанка гојазности. Један од потенцијалних механизма овог дејства L-цистеина може да буде активација ензима стеароил-коензим А десатуразе (227). Осим тога, L-цистеин као и остала једињења која садрже цистеинску групу учествују у контроли лучења инсулина и одржавању физиолошког опсега глукозе у крви, путем редукције гликооксидације (227). У једној од најранијих студија која се бавила овом проблематиком је истраживан утицај високих концентрација DL-метионина и L-цистеина на функцију и морфологију јетре пацова и уочено је да преоптерећење сумпоровитим аминокиселинама у кратком временском периоду узрокује атрофију и оштећење јетре (228).

Пре биохемијских налаза на овом месту ћемо се осврнути на резултате који се односе на телесну масу пацова. Телесна маса пацова је измерена пре почетка апликације DL-метионина, а потом праћена првог, седмог, четрнаестог и двадесетпрвог дана након почетка третмана. Одговарајућом анализом резултата смо уочили да су све групе третиране метионином имале већу масу током свих временских тачака мерења да би се на крају експерименталног периода изједначиле са контролном групом (Табеле 3-5). Ови налази показују да прираст телесне масе услед администрације метионина постоји током прве три недеље и након тога се губи. Поред тога, додатак друге две сумпоровите аминокиселина (L-цистеин или N-ацетилцистеин) није утицао на промене у телесној маси.

У недавно спроведеној студији је између осталог проучаван утицај тронедељног оралног уноса D-метионина (300 mg/kg телесне масе) на пораст телесне масе код пацова који су услед примене цисплатине били анорексични (211). Показано је да ова форма метионина има позитиван анти-анорексични ефекат и повећава телесну масу ових пацова (211). Разлика у резултатима наше и поменуте студије су последица самог дизајна, будући да је наша студија спроведена на здравим животињама, док је доза и облик метионина такође био различит.

Као што је поменуто, допунски задатак овог дела студије је био да испита утицај субхроничног метионинског оптерећења самостално или у комбинацији са поменутим сумпоровитим аминокиселинама на специфичне биохемијске параметре у серуму пацова (вредности хомоцистеина, фолне киселине и витамина B12). Анализом резултата је уочено да се вредности хомоцистеина нису разликовале између група, што показује да доза примењеног метионина као и дужина експозиције није била довољна да метаболизам обе аминокиселине усмери у правцу акумулације хомоцистеина. У нашој претходној студији смо показали да су пацови третирани са исхраном обогаћеном метионином (са или без дефицита у витаминима B комплекса) током 4 недеље повећали ниво хомоцистеина посебно у условима дефицита комплекса витамина B (229). Такође, неке студије спроведене на људима истичу да стимулација метионином не мора увек да буде повезана са повећањем концентрације хомоцистеина и да се ово повећање може јавити у само 33% случајева (230).

Поред тога, снижење концентрације витамина B₁₂ може да корелира са вредностима хомоцистеина, будући да је овај витамин могао да буде потрошен за метаболисање хомоцистеина у метионинском циклусу (209), услед чега је реметилација метионина била очувана и вредности хомоцистеина се нису значајније повећавале.

Поред специфичних биохемијских маркера, након тронедељне администрације метионина, у серуму пацова су одређиване концентрације рутинских биохемијских показатеља као што су глукоза, уреа, креатинин, мокраћна киселина, укупни билирубин и протеини, албумин, укупни холестерол, HDL, триглицериди, јонограм (натријум (Na⁺), калијум (K⁺), хлор (Cl⁻), калцијум (Ca²⁺), гвожђе (Fe), аспартат и аланин аминотрансфера (AST и ALT), алкална фосфатаза (ALP), гама-глутарил трансфераза (γGT), амилаза (Al) и C-реактивни протеин (CRP).

Одређивањем читавог спектра стандардних биохемијских анализа желели смо да испитамо системски одговор пацова на субхронични третман метионином, као и могућу улогу друге две сумпоровите аминокиселине у оствареним ефектима. Подаци о утицају метионина и/или хомоцистеина на поменуте показатеље су у доступној литератури веома оскудни и неусаглашени.

Наши резултати су показали да након субхроничног третмана метионином није било разлика у вредности гликемије, као ни у случају комбиноване примене са неком од две испитиване сумпоровите аминокиселине (Табеле 8 и 9). За разлику од овог резултата, наша претходна студија је указала да акутна хиперхомоцистеинемија може бити повезана са повећањем вредности глукозе пацова (231). У другим истраживањима је закључено да хиперхомоцистеинемија такође може да изазове повећање индекса инсулинске резистенције код пацова (232). Поред тога је показано да двонедељни третман пацова са DL-хомоцистеином узрокује снижење церебралне експресије GLUT-1, што је за последицу имало оштећење церебралних крвних судова (233). Са аспекта сазнања ових студија, и с обзиром да након апликације метионина вредности хомоцистеина у садашњем истраживању нису биле повишене, резултат који смо добили може бити очекиван.

Са друге стране вредности урее, креатинина и мокраћне киселине су биле ниже након апликације метионина (Табеле 8 и 9). Бубрези представљају важне органе у метаболизму свих аминокиселина, а тиме и метионина односно хомоцистеина. У нашој претходној студији смо показали да акутна хиперхомоцистеинемија не изазива промене вредности урее, креатинина и мокраћне киселине (231), иако је у другим истраживањима забележено да дуготрајно повишене вредности хомоцистеина узрокују бубрежну фиброзу и ремоделовање бубрежног матрикса (234).

Утицај метионина или хомоцистеина на липидни статус је мало познат, поготово у експерименталним условима. У нашем претходном истраживању је забележен пораст вредности HDL и LDL фракције холестерола након акутне апликације токсичног хомоцистеин тиолактона (231), што је у корелацији са садашњим налазима у смислу пораста вредности триглицерида (Табела 10). Други аутори су сугерисали да је хронична примена веће дозе хомоцистеин тиолактона током тридесет дана (1g/kg телесне масе) била повезана са повећањем вредности и триглицерида и холестерола (235). Међусобни утицај метионина или хомоцистеина и липидних молекула је такође слабо проучаван. Ипак, један

од понуђених механизма путем кога поменути тиолна једињења могу да мењају липидни статус подразумева индукцију оксидационог стреса ендоплазматског ретикулума од стране хомоцистеина (236). На овај начин настаје активација стерол регулишких елемената-везујућих протеина (енгл. *sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs)*) што у крајњем има за последицу повећану експресију гена одговорних за биосинтезу холестерола и триглицерида (236).

Ефекти метионина или хомоцистеина на електролитни баланс појединих јона је нешто испитиванији. Ово се нарочито односи на утицај метионина на функцију натријум/калијум измењивачке пумпе. У једном од ранијих истраживања је испитана повезаност гестационе хиперметионинемije на активност натријум/калијум АТФ-азе у мозгу пацова (237). Бременитим женкама Wistar albino пацова је два пута дневно апликован метионин током гестационог периода (21 дан) у дози од 1,34-2,68 $\mu\text{mol/g}$ телесне масе. Након жртвовања женки и новорођених пацова је забележена нижа могућна активност натријум/калијум, али магнезијум АТФ-азне пумпе (237).

Претпостављени механизам којим метионин утиче на рад ових пумпи је највероватније посредован повећаном продукцијом слободних радикала (238). Поред тога, сматра се да метионин смањује митохондријалну продукцију АТФ-а, чиме додатно ремети енергетику рада поменутих пумпи. Ова сазнања зато индикују да метионин може да утиче на јонски транспорт ћелије и тиме мења концентрациони градијент јона, а тиме и ексцитабилна својства ћелија. Садашња студија је показала да су вредности два најважнија екстра- и интра-ћелијска катјона након субхроничног третмана метионином различита тј. вредности натријума су биле више, а калијума ниже (Табеле 10 и 11), што може да буде последица оштећења функције натријум/калијум пумпе.

Са друге стране, постоје индикације да метионин и хомоцистеин могу да утичу и на морфо-функционалне промене јетре. Оваква повезаност се објашњава чињеницом да јетра поседује највећи катаболички капацитет за метионин и тиме и за хомоцистеин, док повишене вредности оба тиолна једињења могу да изазову појаву оксидационог и нитрозативног стреса у хепатоцитима (239). Резултати претходне студије су показали да хронични третман метионином током осам недеља (100 mg/kg) може да изазове дисфункцију хепатоцита пацова (199). Потенцијални механизам овог негативног дејства метионина је повећана продукција реактивних кисеоничних врста (199).

За разлику од ових налаза, резултати наше студије показују да субхронични третман метионином може бити повезан са снижењем вредности показатеља јетрине функције (AST, ALT и ALP) (Табела 12). Интересантно је да самостална администрација метионина изазива најевидентнију редукцију јетриних ензима у односу на комбиновану примену са L-цистеином или N-ацетилцистеином. Изгледа да удружено дејство тиолних аминокиселина због метаболичких функција хепатоцита више оптерећује ове ћелије. На основу ових сазнања може се закључити да у примењеној дози и дужини аплицирања метионин остварује хепатопротективан ефекат. Очигледно да дејства овог тиолног једињења на хепатоците зависе од примењене дозе и дужине експозиције.

Последњи биохемијски параметар који је одређиван у нашој студији је маркер акутне фазе инфламације, C реактивни протеин. Утицај метионина и/или хомоцистеина на генерисање C реактивног протеина је последњих деценија интензивно проучаван. Литературни подаци показују да хомоцистеин може да стимулише повећану продукцију C реактивног протеина васкуларних глатких мишића, чиме доприноси инфламацији ендотела и последичној атерогенези (240). Наши резултати указују да је субхронично оптерећење метионином повезано са повећаном продукцијом C реактивног протеина, при чему додатно оптерећење сумпоровитим аминокиселинама (L-цистеином или N-ацетилцистеином) није битније утицало на постигнуте вредности (Табела 12).

Поред поменутих биохемијских маркера, у нашој студији је испитиван и утицај субхроничне апликације метионина на параметре хемостазе (фибриногена, D-димер и Von-Willebrandov фактор) у серуму пацова. Дејство хомоцистеина или метионина на хемостазни систем је оправдана с обзиром да су оба тиолна једињења изузетно реактивна на ниову ендотела, поготово у стањима његовог оштећења и дисфункције (241). Јаком и коаутори су запазили да администрација L-метионина леукемичним мишевима спречава хиперфибринолитичку активност (241). Наши претходни налази указују да акутна хиперхомоцистеинемија може бити повезана са сниженом концентрацијом фибриногена (231), што је у корелацији са садашњим резултатима будући да је након субхроничне примене метионина забележена нижа вредност фибриногена. Као и ранијим случајевима коапликација L-цистеином или N-ацетилцистеином није значајније променила остварене ефекте.

Повезаност метаболизма метионина и једињења која из њега произилазе и различитих компоненти хемостазног система је још увек недовољно јасна. На моделима ендотелних ћелија хумане умбиликалне вене и говеђе аорте је показано да након третмана хомоцистеина долази до повећане активности фактора V коагулације. Сматра се да хомоцистеин може да стимулише ендотелни активатор фактора V и започне коагулацију и независно од присуства тромбина (242). Хомоцистеин остварује своја про-коагулантна својства и инхибицијом физиолошких антикоагулацијских процеса. Третман аортних ендотелних ћелија свиње хомоцистеином редукује експресију гликозоаминогликана сличних хепарину на површини ових ћелија чиме их чини подесним за везивање тромбоцита (243). Ова сазнања су потврдиле и клиничке студије које су забележиле повезаност високог нивоа хомоцистеина и редуковане функције антитромбина III (244).

Истраживања на ћелијским културама су забележила да инкубација ендотелних ћелија хомоцистеином доводи до дозно-зависног смањења активности активатора ткивног плазминогена (245). Познато је да липопротеин А омета фибринолизу компетитивном инхибицијом са плазминогеном према фибрину. Хомоцистеин индукује везивање липопротеина А за фибрин и тако редукује активацију плазминогена (246).

Хомоцистеин такође може да делује и на екто ADP-азу, ензим који има улогу у разградњи АТР-а, једног од главних медијатора активације тромбоцита. У студијама на ћелијским културама је показано да хомоцистеин инхибира активност поменутог ензима чиме потенцира везивање тромбоцита за ендотел (247). Још један од штетних ефеката хомоцистеина се огледа у инхибицији продукције простаглицина (који имају снажна антиагрегациона и антиинфламаторна својства), али само при изразито високим концентрацијама (248).

Директни ефекти хомоцистеина на тромбоците су још увек нејасни и неусаглашени. Иако су прва истраживања на људима и павијанима показала да хомоцистеин може да поремети кинетику тромбоцита (249), касније студије нису добиле такве резултате (250). McDonald и коаутори су пронашли повећану адхезивност тромбоцита код хомоцистеуричних пацијената (251), док *in vitro* истраживања нису забележила значајну разлику између ових пацијената и контролне групе (252). Ипак, да хомоцистеин чешће испољава про-коагулациона својства, показују *in vitro* студије у

којима је хомоцистеин довео до пораста синтезе тромбоксана A₂, про-тромбогеног молекула и најснажнијег вазоконстриктора у организму (253).

Познато је да оксидација метионина успорава брзину активације протеина C од стране тромбомодулин-тромбинског комплекса, потенцира се активност фактора који активирају тромбин и изазивају стварање тромбоцитног чепа (254). Осим тога, метионин може да модификује активност и Von-Willebrandov-ог фактора као још једног важног прокоагулантног молекула.

Peruteli и сарадници су 2005. године извели студију на здравим и женама са тромбозама у којој су испитивали утицај оралног оптерећења метионином на концентрацију и активност Von-Willebrandov-ог фактора (255). Закључено је да унос метионина код жена са тромбозом изазива пораст вредности хомоцистеина који улази у интеракције са фрагментима Von-Willebrandov-ог фактора и тиме снижава концентрацију овог молекула (255). У нашој студији смо уочили да су вредности Von-Willebrandov-ог фактора након апликације метионина биле ниже, али не значајно у односу на контролне услове, што може бити последица одсуства хиперхомоцистеинемije (Табеле 14 и 15).

5.3 ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА СУБХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ DL-МЕТИОНИНА НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА У ПЛАЗМИ ПАЦОВА И АКТИВНОСТ АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРАЗЕ У ТКИВУ СРЦА ПАЦОВА

Други циљ субхроничне серије експеримената је био да испита утицај тронедељне апликације метионина самостално или удружено са поменутиим сумпоровитим аминокиселинама на показатеље оксидационог стреса пацова и активност срчане ацетилхолинестеразе пацова. Разумевање интеракције метионина и хомоцистеина са једне и реактивних кисеоничних врста са друге стране може бити од великог значаја у разумевању дејстава ових тиолних једињења на ендотел и кардиоваскуларни систем уопште.

Као што је поменуто раније, осим MDA маркера липидне пероксидације ћелијских мембрана у нашој студији смо утврђивали активност ћелијских ензимских компоненти антиоксидационе заштите (SOD, CAT) и GPx). Унутарћелијска концентрација ROS зависи од управо од активности ових ензима и глутатион редуктазе (GSH).

Сматра се да су сви ови ензими веома важни за неутрализацију оксидационих оштећења свих ћелија које живе под аеробним условима. Супероксид дисмутаза (SOD) су широко распрострањени чиниоци система антиоксидативне одбране, које су McCord и Fridovich дефинисали као протеине који катализују вишак супероксид анјон радикала у водоник-пероксид, те на тај начин штите редокс сензитивне ћелијске макромолекуле од оштећења (256).

До сада су на нивоу ћелија сисара идентификоване три изоформе овог ензима: бакар, цинк-супероксид-дисмутаза (Cu,Zn-SOD), манган-супероксид-дисмутаза (Mn-SOD) и екстрацелуларна супероксиддисмутаза (EcSOD) (257). Mn-SOD изоформа је једина неопходна за опстанак аеробних организама, што је потврђено коришћењем Mn-SOD-"нокаут" мишева, за које је показано да угину убрзо након рођења са израженим поремећајима на нивоу нервног система и срца (258). Занимљиви су резултати Shi и сардника из 2013. године, који су показали да дугоживеће мишеве у односу на обичне лабораторијске мишеве одликује повећање активности Cu,Zn-SOD и CAT док су млади, као и мање оксидационо оштећење ћелијских макромолекула у старости.

Каталаза и пероксидаза преводе насцентни водоник-пероксид у воду (у случају каталазе кисеоник и воду). Крајњи резултат деловања свих поменутих ензимских компоненти система антиоксидационе заштите је уклањање две врсте радикала и њихова конверзија у воду (259). Schriener и сарадници (260) су показали да мишеви са повећаном експресијом каталазе имају животно век дужи за 20%, као и смањено оштећење митохондрија.

Метионин и хомоцистеин се сматрају веома реактивним тиолним молекулима, што им омогућава да између осталог, врло лако могу да се оксидују, продукују ROS (238, 261) и на тај начин директно оштете васкуларни ендотел (262). Склоности тиола да својом аутооксидацијом дају кисеонична једињења је доказана у ранијим истраживањима (262). Аутооксидација хомоцистеина у присуству металних јона омогућава транспорт два електрона на молекул кисеоника. Настали супероксид и тиол радикал су интермедијери у овој оксидоредукцији, са крајњим производом, водоник-пероксидом. Директно токсично дејство супероксид анјон радикала, се огледа у његовој склоност ка оксидацији липопотеина мале густине (LDL), односно утицају на повећано преузимање LDL честица, што је главни предуслов за настанак пенастих (*foam*) ћелија (263).

У зависности од природе оксидационих врста, метионин се може подвргнути двоелектронској оксидацији када гради метионин сулфоксид или једноелектронској оксидацији када формира катјоне метионинског радикала (264). Оба механизма реакције произилазе из каталитичке подршке суседних група, која стабилизују центре за реаговање са електронима. У *in vivo* условима, метионин сулфоксид се може редуковати под дејством метионин сулфоксид редуктазе (Msr), што указује на то да неки остаци метионин сулфоксида могу бити транзитно укључени само у деактивацију протеина путем реактивних врста кисеоника (264). Други остаци метионин сулфоксида могу да се акумулирају, у зависности од доступности метионин сулфоксид редуктазе. Осим тога, у патолошким стањима и током процеса биолошког старења нивои метионин сулфоксида могу се повећати као резултат мањег обима активности Msr-a и/или потребних кофактора (264).

Ендотелна цитотоксичност метионина и хомоцистеина може бити супримирана дејством NO-а, кога производи ендотел. Хомоцистеин и NO интерагују под физиолошким условима, дајући S-нитрозохомоцистеин (265). Оба једињења и S-нитрозоцистеин, имају

значајна вазодилататорна и антиагрегацијска својства. Показано је да директно, тренутно, дејство хомоцистеина нема ефекта на агрегациона својства тромбоцита, али ако је инкубација продужена, агрегациони процес се убрзава. Разлог ове појаве је вероватно у постепеном пражњењу пула NO-а. Уколико процес оштећења ендотела узме маха, на располагању је све мањи број ендотелних ћелија које могу да продукују NO, а то омогућава да цитотоксични ефекат хомоцистеина у функцији времена све више долази до изражаја (265).

Занимљиво је да је цистеин у плазми присутан у далеко већим концентрацијама од хомоцистеина (и такође је способан за аутооксидацију), али још увек непознатим механизмима не изазива оштећења ендотелних ћелија и није уврштен међу нове факторе ризика за развој КВБ (266). Са друге стране, тиолна група омогућава хомоцистеину да се понаша као антиоксиданс, што су и показале неке студије (267). Поред тога, транс-сулфурациони пут метаболизма хомоцистеина игра кључну улогу у одржавању интрацелуларних депоа глутатиона, што је од фундаменталног значаја у функционисању антиоксидационог ендогеног заштитиног система (268).

Оксидациони стрес који индукује хомоцистеин не мора да потенцира атерогенезу искључиво путем аутооксидације. Бројне *in vivo* студије, користећи васкуларна ткива, сугеришу да хиперхомоцистеинемиа доводи до поремећаја васкуларне релаксације, стварањем O_2^- (269). O_2^- потом реагује са ендотелним NO, резултирајући у формирању ONOO-, што у крајњем, поред целуларних оштећења, ремети адекватну вазодилатацију (270). O_2^- и ONOO⁻ оштећујући ћелијске мембране, узрокују формирање липидних пероксида, и у случају ONOO⁻, синтезу протеина, путем нитрације тирозина и последичним стварањем 3-нитротирозина. Хомоцистеин може такође умањити и антиоксидациони потенцијал ендотелних ћелија. Недавна истраживања су показала да ендотелне ћелије третиране хомоцистеином имају оштећену експресију хем-оксигеназе 1 (HO 1) и глутатион пероксидазе (GPx), што битно редукује њихов антиоксидациони капацитет (271).

Још један од потенцијалних оксидационих механизма путем кога хомоцистеин нарушава грађу и функцију ендотела, подразумева оксидациони стрес или оксидационо оштећење ендоплазматског ретикулима (ER). Претходне студије су известиле да повећани интраћелијски нивои хомоцистеина доводе до активације сигналног пута који стимулише

производњу ER `стресних` гена (GRP78, GRP94, Hsp, и RTP), чиме индукује оштећење ER (270).

Хомоцистеин, али и цистеин, може изазвати губитак адхезионих способности ћелија чиме убрзава процес апоптозе. Сматра се да раздвајање (губитак адхезије) ендотелних ћелија под утицајем хомоцистеина, може настати индукцијом TDAG51 фамилије гена, што је недавно доказано на АпоЕ-"нокаут" мишевима код којих је стимулација експресије ове фамилије гена изазвала атеросклеротске промене на терену хиперхомоцистеиније (272).

Резултати садашње студије су показали да субхронична стимулација метионином изазива повећан степен липидне пероксидације, који је праћен снажним одговором каталазе из крви и ткива миокарда (Табела 16). Очигледно је да за разлику од акутне апликације метионина, дужа експозиција овој аминокиселини повећава липидна оштећења ћелијских мембрана, која су праћена компензаторно појачаном активношћу једног дела ензимског антиоксидационог система заштите. Поред тога, резултате системског редокс статуса је пратила и вредност каталазе у ткиву миокарда пацова, што може бити одраз локалног одговора на субхроничну апликацију метионина.

На основу ових налаза можемо увидети да тронедељни третман метионином може бити повезан и са системским, као и локалним променама у активности ензимских компоненти антиоксидационог одбрамбеног система. Такође, одсуство разлике у вредностима SOD и GPx може бити последица исцрпљености активности ових ензима након субхроничне апликације метионина.

Као што смо поменули раније, у нашој недавној такође смо испитивали ефекат метионина на маркере оксидационог стреса пацова изложених специјалној метионинској храни са или без дефицита витамина В комплекса у трајању од четири недеље (229). Уочено је да унос метионина поготово у условима недостатка витамина В комплекса изазива повећано ослобађање супероксид анјон радикала, које је праћено појачаном липидном пероксидацијом и умањеном активношћу антиоксидационог система заштите (229).

У нешто раније спроведеној студији утврдили смо да акутна хиперхомоцистеинија стимулише појачану активност ензима антиоксидационе заштите

(SOD, CAT, GPx) (231), што је у сагласности са резултатима акутне серије експеримената садашњег истраживања.

Иностранци аутори су такође забележили прооксидациони потенцијал метионина у различитим ткивима. Тако је истраживачка група на челу са Schweinberger-ом више пута нотирала појачану продукцију слободних радикала у јетри и мозгу пацова након уноса метионина (237, 238).

Узевши у обзир сазнања садашње и поменутих студија можемо да закључимо да метионин може да утиче на елементе редокс система нашег организма и ензимским компонентама антиоксидационе заштите, што објашњава неке од његових штетних ефеката на различите органске системе.

Са друге стране, поред испитивања утицаја субхроничне апликације метионина на оксидациони стрес, наредни задатак нам је био да утврдимо ефекте ове аминокиселине на активност ацетилхолинестеразе у ткиву миокарда пацова.

За разлику од možданог ткива, присуство и улога ацетилхолинестеразе у срцу сисара је много мање изучавана и позната. Експерименталне хистохемијске и биохемијске студије су утврдиле присуство ацетилхолинестеразе у ткиву срца сисара. Ове студије су откриле да је концентрација АСhЕ већа у преткоморама у односу на коморе што може бити важно у вагусној контроли спроводног система срца (273). Са друге стране присуство ацетилхолинестеразе у вентрикулумима потврђује негативан инотропни ефекат холинергичког нервног система. Концентрација овог ензима у ткиву срца сисара је нарочито велика у региону СА чвора десне преткоморе и базе десне коморе. Осим тога, заступљеност АСhЕ у десној преткомори је много већа него у левој. Оваква локализација ацетилхолинестеразе је у корелацији са негативним хронотропним и дромотропним утицајем вагуса.

Већина сазнања о утицају хиперхомоцистеинемije на активност холинестераза је добијена на основу малобројних *in vitro* студија које су проучавале ову проблематику у ткиву мозга. У *in vitro* условима је показано да хиперхомоцистеинемija изазива смањену активност ацетилхолинестеразе (274). Сугерисано је да је добијена инхибиција ацетилхолинестеразе посредована оксидационим стресом (275).

Друго истраживање је показало да метионин нема ефекта, док хомоцистеин инхибира активност бутирлихолинестеразе (276). Остварена инхибиција је била по типу

компетитивне инхибиције. *In vivo* и *in vitro* студијом, Scherer и сарадници су указали да акутна хиперхомоцистеинемија инхибира активност холинестераза у серуму људи и пацова (277). Резултати домаћих аутора су сугерисали да акутна апликација хомоцистеин тиолактона у дози од 5,5 mmol/kg изазива значајно смањење активности ацетилхолинестеразе у хомогенату ткива срца, без статистички значајних ефеката на активност овог ензима у крви пацова (278). Тиме је назначена улога метаболита хомоцистеина, тј. хомоцистеин тиолактона, као медијатора ових ефеката.

Резултати садашњег истраживања су показали да је за разлику од акутне, субхронична стимулација метионином била повезана са нижом активношћу срчане ацетилхолинестеразе. Налази из оба дела истраживања зато индикују да дужина изложености може бити један од фактора који одређују ефекте ове аминокиселине на активност поменутог ензима. На овај начин субхронична експозиција метионину може да мења холинергичку контролу срчане функције, односно да редукцијом разградње ацетилхолина потенцира снажнији и дуготрајнији негативни холинергички ефекат на срце пацова. Ова сазнања су у корелацији са претходно поменутом студијом у којој је након третмана пацова храном обогаћеном метионином током три недеље забележено снижење активности ацетилхолинестеразе у свим структурама мозга пацова (178).

На основу свих ових сазнања можемо уочити да метионин у довољној концентрацији и при довољном временском периоду експозиције може да утиче на функцију ацетилхолинестеразе у различитим ткивима, што потврђује његов системски ефекат.

5.4 ХИСТОПАТОЛОШКА АНАЛИЗА ЕФЕКТА СУБХРОНИЧНЕ АДМИНИСТРАЦИЈЕ DL-МЕТИОНИНА

Упоредо са осталим анализама након субхроничне серије експеримената прикупљени су исечци ткива аорте (десцендентна торакална и абдоминална аорта) и срца како би се добијени резултати посматрали са морфолошког аспекта.

Резултати које смо добили су показали да тронедељни третман DL-метионином (самостално или у комбинацији са неком од испитиваних аминокиселина) није био повезан са хистолошким променама десцендентне торакалне и абдоминалне аорте (Слике 1-4). Са друге стране, субхронични ефекти метионина на ткиву срца су се огледали у постојању пасивне хиперемije зида леве коморе, док је заједничка апликација DL-метионина са L-цистеином уз пасивну хиперемiju изазвала и екстравазацију еритроцита. Најобимније промене су забележене у случају комбинације DL-метионина и N-ацетил-L-цистеина када је поред пасивне хиперемije зида обе коморе уочена појава лаког периваскуларног и интрацелуларног едема уз вакуолизацију појединих кардиомиоцита и присуство тромба у десној комори (Слике 5-8)

Литературни подаци који се односе на хистолошке промене кардиоваскуларног система изазване метионином и/или хомоцистеином су протеклих година интензивније проучаване, али са још увек неусаглашеним сазнањима.

У недавно објављеној студији је испитиван утицај метионинске исхране на морфолошке промене срчаног мишића CBS дефицијентних мишева. Забележено је да хронично оптерећење метионином изазива ремоделовање васкуларних и матриксних структура срца путем усходне регулације матриксних металопроотеиназа 3 и 9 (MMP3 и MMP9) и акумулације колагена (279).

Orgeron и сарадници су истраживали ефекте метионинске рестрикције током периода од дванаест недеља на морфолошке и функционалне карактеристике аполипопротеин Е дефицијентних мишева (280). Аутори су након завршеног експерименталног периода показали да су мишеви на рестрикцији уноса метионина имали мању масу срца и виши однос маса срца/маса тела (280). Упркос овим променама нису примећене разлике у хистолошкој грађи срчаних структура, као и функцији срца, док је

забележена усходна регулација метаболичких сигналних путева кардиомиоцита који обухватају протеин киназу Pkca α 1 и глукозни транспортер Glut 4 (280).

Приметно је да је највећи број студија које су проучавале хистопатолошке аспекте утицаја метионина и хомоцистеина на срце и крвне судове биле спровођене на мишевима, док су истраживања на другим врстама укључујући куниће и пацове ређе.

Једна од ретких студија која је спроведена на кунићима је показала да након дванаест недеља комбинованог третмана метионином и холестеролом долази до изражене појаве интерстицијалне и периваскуларне фиброзе срца кунића (281). На овај начин је истакнуто да се негативни ефекти метионина лакше остварују у условима присуства додатних фактора ризика као што је холестерол.

Друго истраживање на кунићима се бавило утврђивањем утицаја високих доза метионина (исхрана са 1,2%/кг тт метионина) на хистопатолошке одлике јетре, срца и бубрега (87). Период исхране овом специјалном храном је трајао три месеца, а узорци поменутих органа су сакупљани након првог, другог и трећег месеца односно на крају студије. Почевши од другог месеца уноса метионина примећен је едем кардиомиоцита и инфилтрација моноцита који су били средњег степена тежине (282).

Са друге стране, недавно спроведена студија на пацовима је испитивала утицај оралне администрације L-метионина у трајању од двадесетосам дана на хистолошке промене срца и торакалне аорте. Показано је да је унос ове форме метионина изазвао већи дијаметар аорте и дебљину аортне еластичне ламине (283).

На основу резултата наше студије можемо да увидимо да примена обе сумпоровите аминокиселине није спречила почетне хистолошке промене ткива срца изазване DL-метионином, већ је била повезана са израженијим патолошким променама. Механизми ових ефеката су још увек непознати и њихово расветљавање може бити одлична идејна основа за будућа истраживања.

VI

ЗАКЉУЧЦИ

5. ЗАКЉУЧЦИ

На основу свега изложеног у овој студији можемо извести следеће закључке:

1. Акутна апликација DL-метионина код пацова снажно мобилише већи део интраћелијске ензимске компоненте заштите од оксидационих оштећења (CAT и GPx). На тај начин, акутни одговор антиоксидационог ензимског система заштите на метионин се огледа у појачаној активности CAT и GPx.
2. Акутно примењени метионин није променио активност ацетилхолинестеразе у ткиву срца и мозга пацова, што указује да краткотрајно оптерећење овом аминокиселином не утиче на холинергичку функцију у овим ткивима.
3. Субхронична примена DL-метионина се повезује са различитим променама већине испитиваних биохемијских параметара у крви пацова, што сугерише да ова тиолна аминокиселина поседује мултиорганске и системске ефекте на организам сисара.
4. Друге две испитиване сумпоровите аминокиселине (L-цистеин и N-ацетил-L-цистеин) нису битније мењале постигнуте ефекте метионина на биохемијске параметре у крви пацова. Овај резултат индикује да је утицај метионина на организам већи и значајнији од других тиолних аминокиселина поготово у случају његовог субхроничног уноса.
5. За разлику од акутне апликације метионина, субхронична експозиција овој аминокиселини повећава липидна оштећења ћелијских мембрана, која су праћена компензаторно појачаном активношћу једног дела ензимског антиоксидационог система заштите.
6. Резултате системског редокс статуса је пратила и вредност каталазе у ткиву миокарда пацова, што може бити одраз локалног одговора на субхроничну апликацију метионина.
7. На основу ових налаза можемо увидети да тронедељни третман DL-метионином може бити повезан и са системским, као и са локалним променама у активности ензимских компоненти антиоксидационог одбрамбеног система.

8. Субхронична стимулација DL-метионином је била повезана са нижом активношћу срчане ацетилхолинестеразе. Ови налази сугеришу да субхронична експозиција метионину може да мења холинергичку контролу срчане функције односно да редукцијом разградње ацетилхолина потенцира снажнији и дуготрајнији негативни холинергички ефекат на срце пацова.
9. Почетне хистолошке промене ткива срца изазване DL-метионином су биле још израженије приликом његове коапикације са L-цистеином и поготово N-ацетил-L-цистеином. Механизми ових ефеката су још увек непознати и њихово расветљавање може бити одлична идејна основа за будућа истраживања.

VII

РЕФЕРЕНЦЕ

1. Lim JM, Kim G, Levine RL. Methionine in Proteins: It's Not Just for Protein Initiation Anymore. *Neurochem Res.* 2018; doi: 10.1007/s11064-017-2460-0.
2. Kumar A, Palfrey HA, Pathak R, Kadowitz PJ, Gettys TW, Murthy SN. The metabolism and significance of homocysteine in nutrition and health. *Nutr Metab (Lond).* 2017; 14: 78.
3. Martínez Y, Li X, Liu G, Bin P, Yan W, Más D, Valdivié M, Hu CA, Ren W, Yin Y. The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases. *Amino Acids.* 2017; 49(12): 2091-2098.
4. Bin P, Huang R, Zhou X. Oxidation Resistance of the Sulfur Amino Acids: Methionine and Cysteine. *Biomed Res Int.* 2017; 2017: 9584932.
5. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015; 97: 55-74.
6. Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2017; 38(7): 592-607.
7. Islam MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res.* 2017; 39(1): 73-82.
8. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol.* 1969; 56(1): 111-28.
9. McCully KS, Wilson RB. Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis.* 1975; 22(2): 215-27.
10. McCully KS. Chemical pathology of homocysteine. I. Atherogenesis. *Ann Clin Lab Sci.* 1993; 23(6): 477-93.
11. Mastrototaro L, Sponder G, Saremi B, Aschenbach JR. Gastrointestinal methionine shuttle: Priority handling of precious goods. *IUBMB Life.* 2016; 68(12): 924-934.
12. Martinov MV, Vitvitsky VM, Banerjee R, Ataulakhanov FI. The logic of the hepatic methionine metabolic cycle. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1804(1): 89-96.
13. Finkelstein JD. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. *Semin Thromb Hemost.* 2000; 26(3): 219-25.
14. Gil B, Casado M, Pajares MA, Boscá L, Mato JM, Martín-Sanz P, Alvarez L. Differential expression pattern of S-adenosylmethionine synthetase isoenzymes during rat liver development. *Hepatology.* 1996; 24(4): 876-81.
15. Schalinske KL, Smazal AL. Homocysteine imbalance: a pathological metabolic marker. *Adv Nutr.* 2012; 3(6): 755-62.
16. Williams KT, Schalinske KL. Homocysteine metabolism and its relation to health and disease. *Biofactors.* 2010; 36(1): 19-24.
17. Guéant JL, Caillerez-Fofou M, Battaglia-Hsu S, Alberto JM, Freund JN, Dulluc I, Adjalla C, Maury F, Merle C, Nicolas JP, Namour F, Daval JL. Molecular and cellular

- effects of vitamin B12 in brain, myocardium and liver through its role as co-factor of methionine synthase. *Biochimie*. 2013; 95(5): 1033-40.
18. Grabowski M, Banasiuk R, Węgrzyn A, Kędzierska B, Lica J, Banecka-Majkutewicz Z, Banecki B. Role of heat-shock proteins and cobalamine in maintaining methionine synthase activity. *Acta Biochim Pol*. 2012; 59(4): 489-93.
 19. Obeid R. The metabolic burden of methyl donor deficiency with focus on the betaine homocysteine methyltransferase pathway. *Nutrients*. 2013; 5(9): 3481-95.
 20. Finkelstein JD, Martin JJ, Harris BJ, Kyle WE. Regulation of hepatic betaine-homocysteine methyltransferase by dietary betaine. *J Nutr*. 1983; 113(3): 519-21.
 21. Ahn CW, Jun DS, Na JD, Choi YJ, Kim YC. Alleviation of hepatic fat accumulation by betaine involves reduction of homocysteine via up-regulation of betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT). *Biochem Biophys Res Commun*. 2016; 477(3): 440-7.
 22. Augustin P, Hromic A, Pavkov-Keller T, Gruber K, Macheroux P. Structure and biochemical properties of recombinant human dimethylglycine dehydrogenase and comparison to the disease-related H109R variant. *FEBS J*. 2016; 283(19): 3587-3603.
 23. Kitagawa E, Yamamoto T, Fujishita M, Ota Y, Yamamoto K, Nakagawa T, Hayakawa T. Choline and betaine ameliorate liver lipid accumulation induced by vitamin B(6) deficiency in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2017; 81(2): 316-322.
 24. Szegedi SS, Castro CC, Koutmos M, Garrow TA. Betaine-homocysteine S-methyltransferase-2 is an S-methylmethionine-homocysteine methyltransferase. *J Biol Chem*. 2008; 283(14): 8939-45.
 25. Beard RS Jr, Bearden SE. Vascular complications of cystathionine β -synthase deficiency: future directions for homocysteine-to-hydrogen sulfide research. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 300(1): H13-26.
 26. Renga B. Hydrogen sulfide generation in mammals: the molecular biology of cystathionine- β - synthase (CBS) and cystathionine- γ -lyase (CSE). *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2011; 10(2): 85-91.
 27. Gregory JF, DeRatt BN, Rios-Avila L, Ralat M, Stacpoole PW. Vitamin B6 nutritional status and cellular availability of pyridoxal 5'-phosphate govern the function of the transsulfuration pathway's canonical reactions and hydrogen sulfide production via side reactions. *Biochimie*. 2016; 126: 21-6.
 28. Pushpakumar S, Kundu S, Sen U. Endothelial dysfunction: the link between homocysteine and hydrogen sulfide. *Curr Med Chem*. 2014; 21(32): 3662-72.
 29. Joseph J, Loscalzo J. Methoxistasis: integrating the roles of homocysteine and folic acid in cardiovascular pathobiology. *Nutrients*. 2013; 5(8): 3235-56.
 30. Papatheodorou L, Weiss N. Vascular oxidant stress and inflammation in hyperhomocysteinemia. *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9(11): 1941-58.
 31. Anderson OS, Sant KE, Dolinoy DC. Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *J Nutr Biochem*. 2012; 23(8): 853-9.

32. Kery V, Poneleit L, Meyer JD, Manning MC, Kraus JP. Binding of pyridoxal 5'-phosphate to the heme protein human cystathionine beta-synthase. *Biochemistry*. 1999; 38(9): 2716-24.
33. Taoka S, West M, Banerjee R. Characterization of the heme and pyridoxal phosphate cofactors of human cystathionine beta-synthase reveals nonequivalent active sites. *Biochemistry*. 1999; 38(22): 7406.
34. Martinez M, Cuskelly GJ, Williamson J, Toth JP, Gregory JF 3rd. Vitamin B-6 deficiency in rats reduces hepatic serine hydroxymethyltransferase and cystathionine beta-synthase activities and rates of in vivo protein turnover, homocysteine remethylation and transsulfuration. *J Nutr*. 2000; 130(5): 1115-23.
35. Lima CP, Davis SR, Mackey AD, Scheer JB, Williamson J, Gregory JF 3rd. Vitamin B-6 deficiency suppresses the hepatic transsulfuration pathway but increases glutathione concentration in rats fed AIN-76A or AIN-93G diets. *J Nutr*. 2006; 136(8): 2141-7.
36. Finkelstein JD, Mudd SH. Trans-sulfuration in mammals. The methionine-sparing effect of cystine. *J Biol Chem*. 1967; 242(5): 873-80.
37. McKeever MP, Weir DG, Molloy A, Scott JM. Betaine-homocysteine methyltransferase: organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat. *Clin Sci (Lond)*. 1991; 81(4): 551-6.
38. Delgado-Reyes CV, Wallig MA, Garrow TA. Immunohistochemical detection of betaine-homocysteine S-methyltransferase in human, pig, and rat liver and kidney. *Arch Biochem Biophys*. 2001; 393(1): 184-6.
39. Bing FC. Vincent du Vigneaud (1901-1978): a biographical sketch. *J Nutr*. 1982; 112(8): 1463-73.
40. Case 19471 - Marked Cerebral Symptoms Following a Limp of Three Months' Duration. *N Engl J Med*. 1933; 209:1063-1066.
41. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol*. 1969; 56(1): 111-28.
42. McCully KS, Ragsdale BD. Production of arteriosclerosis by homocysteinemia. *Am J Pathol*. 1970; 61(1): 1-11.
43. Jakubowski H. Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. *J Biol Chem*. 1997; 272(3): 1935-42.
44. Jakubowski H, Goldman E. Synthesis of homocysteine thiolactone by methionyl-tRNA synthetase in cultured mammalian cells. *FEBS Lett*. 1993; 317(3): 237-40.
45. Deniziak MA, Barciszewski J. Methionyl-tRNA synthetase. *Acta Biochim Pol*. 2001; 48(2): 337-50.
46. Jakubowski H. Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cell Mol Life Sci*. 2004; 61(4): 470-87.
47. Jakubowski H. Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *FASEB J*. 1999; 13(15): 2277-83.

48. Jakubowski H. Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation. *J Biol Chem.* 2000; 275(6): 3957-62.
49. Jakubowski H, Głowacki R. Chemical biology of homocysteine thiolactone and related metabolites. *Adv Clin Chem.* 2011; 55: 81-103.
50. Undas A, Perła J, Lacinski M, Trzeciak W, Kaźmierski R, Jakubowski H. Autoantibodies against N-homocysteinylated proteins in humans: implications for atherosclerosis. *Stroke.* 2004; 35(6): 1299-304.
51. Eldibany MM, Caprini JA. Hyperhomocysteinemia and thrombosis: an overview. *Arch Pathol Lab Med.* 2007; 131(6): 872-84.
52. Hoțoleanu C, Chouky E. Hyperhomocysteinemia and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in a patient with coronary artery disease and repetitive miscarriages. *Rom J Intern Med.* 2012; 50(4): 313-6.
53. Deáková Z, Ďuračková Z, Armstrong DW, Lehotay J. Two-dimensional high performance liquid chromatography for determination of homocysteine, methionine and cysteine enantiomers in human serum. *J Chromatogr A.* 2015; 1408: 118-24.
54. Currò M, Gugliandolo A, Gangemi C, Risitano R, Ientile R, Caccamo D. Toxic effects of mildly elevated homocysteine concentrations in neuronal-like cells. *Neurochem Res.* 2014; 39(8): 1485-95.
55. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet.* 1999; 354(9176): 407-13.
56. Faeh D, Chiolero A, Paccaud F. Homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: should we (still) worry about? *Swiss Med Wkly.* 2006; 136(47-48): 745-56.
57. Chernyavskiy I, Veeranki S, Sen U, Tyagi SC. Atherogenesis: hyperhomocysteinemia interactions with LDL, macrophage function, paraoxonase 1, and exercise. *Ann N Y Acad Sci.* 2016; 1363: 138-54.
58. Farina N, Jernerén F, Turner C, Hart K, Tabet N. Homocysteine concentrations in the cognitive progression of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol.* 2017; 99: 146-150.
59. Licking N, Murchison C, Cholerton B, Zabetian CP, Hu SC, Montine TJ, Peterson-Hiller AL, Chung KA, Edwards K, Leverenz JB, Quinn JF. Homocysteine and cognitive function in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2017; 44: 1-5.
60. Milovanovic P, Hrcic D, Radotic K, Stankovic M, Mutavdzic D, Djonic D, Rasic-Markovic A, Djuric D, Stanojlovic O, Djuric M. Moderate hyperhomocysteinemia induced by short-term dietary methionine overload alters bone microarchitecture and collagen features during growth. *Life Sci.* 2017; 191: 9-16.
61. Long Y, Nie J. Homocysteine in Renal Injury. *Kidney Dis (Basel).* 2016; 2(2): 80-7.
62. Zhang D, Wen X, Wu W, Guo Y, Cui W. Elevated homocysteine level and folate deficiency associated with increased overall risk of carcinogenesis: meta-analysis of 83 case-control studies involving 35,758 individuals. *PLoS One.* 2015; 10(5): e0123423.

63. Mangge H, Becker K, Fuchs D, Gostner JM. Antioxidants, inflammation and cardiovascular disease. *World J Cardiol.* 2014; 6(6): 462-77.
64. Pang X, Liu J, Zhao J, Mao J, Zhang X, Feng L, Han C, Li M, Wang S, Wu D. Homocysteine induces the expression of C-reactive protein via NMDAr-ROS-MAPK-NF- κ B signal pathway in rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 2014; 236(1): 73-81.
65. Neeland IJ, Patel RS, Eshtehardi P, Dhawan S, McDaniel MC, Rab ST, Vaccarino V, Zafari AM, Samady H, Quyyumi AA. Coronary angiographic scoring systems: an evaluation of their equivalence and validity. *Am Heart J.* 2012; 164(4): 547-552.e1.
66. Shah P, Bajaj S, Virk H, Bikkina M, Shamooin F. Rapid Progression of Coronary Atherosclerosis: A Review. *Thrombosis.* 2015; 2015: 634983.
67. Schaffer A, Verdoia M, Casetti E, Marino P, Suryapranata H, De Luca G; Novara Atherosclerosis Study Group (NAS). Relationship between homocysteine and coronary artery disease. Results from a large prospective cohort study. *Thromb Res.* 2014; 134(2): 288-93.
68. Chen L, Wang B, Wang J, Ban Q, Wu H, Song Y, Zhang J, Cao J, Zhou Z, Liu L, Cao T, Gao L, Guo H, Zhang T, Tang G, Huang X, Zhang Y, Li J, Huo Y, Cheng X, Zang T, Xu X, Zhang H, Qin X. Association between serum total homocysteine and arterial stiffness in adults: a community-based study. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2018; doi: 10.1111/jch.13246.
69. Yoshida H, Kisugi R. Mechanisms of LDL oxidation. *Clinica Chimica Acta.* 2010; 411: 1875- 1882.
70. Hofmann MA, Lalla E, Lu Y, Gleason MR, Wolf BM, Tanji N, Ferran LJ Jr, Kohl B, Rao V, Kisiel W, Stern DM, Schmidt AM. Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *J Clin Invest.* 2001; 107(6): 675-83.
71. Liu S, Sun Z, Chu P, Li H, Ahsan A, Zhou Z, Zhang Z, Sun B, Wu J, Xi Y, Han G, Lin Y, Peng J, Tang Z. EGCG protects against homocysteine-induced human umbilical vein endothelial cells apoptosis by modulating mitochondrial-dependent apoptotic signaling and PI3K/Akt/eNOS signaling pathways. *Apoptosis.* 2017; 22(5): 672-680.
72. Shah DI, Singh M. Involvement of Rho-kinase in experimental vascular endothelial dysfunction. *Mol Cell Biochem.* 2006; 283(1-2): 191-9.
73. Sydow K, Schwedhelm E, Arakawa N, Bode-Böger SM, Tsikas D, Hornig B, Frölich JC, Böger RH. ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia: effects of L-arginine and B vitamins. *Cardiovasc Res.* 2003; 57(1): 244-52.
74. Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med.* 2000; 191(1): 189-94.

75. Smith JD, Dansky HM, Breslow JL. Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 947: 247-52; discussion 252-3.
76. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27: 451-83.
77. Zhang D, Fang P, Jiang X, Nelson J, Moore JK, Kruger WD, Berretta RM, Houser SR, Yang X, Wang H. Severe hyperhomocysteinemia promotes bone marrow-derived and resident inflammatory monocyte differentiation and atherosclerosis in LDLr/CBS-deficient mice. *Circ Res.* 2012; 111(1): 37-49.
78. Sen U, Mishra PK, Tyagi N, Tyagi SC. Homocysteine to hydrogen sulfide or hypertension. *Cell Biochem Biophys.* 2010; 57(2-3): 49-58.
79. Bescond A, Augier T, Chareyre C, Garçon D, Hornebeck W, Charpiot P. Influence of homocysteine on matrix metalloproteinase-2: activation and activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 263(2): 498-503.
80. Lee SJ, Lee YS, Seo KW, Bae JU, Kim GH, Park SY, Kim CD. Homocysteine enhances MMP-9 production in murine macrophages via ERK and Akt signaling pathways. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012; 260(1): 89-94.
81. Narayanan N, Pushpakumar SB, Givvimani S, Kundu S, Metreveli N, James D, Bratcher AP, Tyagi SC. Epigenetic regulation of aortic remodeling in hyperhomocysteinemia. *FASEB J.* 2014; 28(8): 3411-22.
82. Saedi M, Vaisi-Raygani A, Khaghani S, Shariftabrizi A, Rezaie M, Pasalar P, Rahimi Z, Pourmotabbed T. Matrix metalloproteinase-9 functional promoter polymorphism 1562C>T increased risk of early-onset coronary artery disease. *Mol Biol Rep.* 2012; 39(1): 555-62.
83. Winchester LJ, Veeranki S, Givvimani S, Tyagi SC. Homocysteine elicits an M1 phenotype in murine macrophages through an EMMPRIN-mediated pathway. *Can J Physiol Pharmacol.* 2015; 93(7): 577-84.
84. Zhang S, Bai YY, Luo LM, Xiao WK, Wu HM, Ye P. Association between serum homocysteine and arterial stiffness in elderly: a community-based study. *J Geriatr Cardiol.* 2014; 11(1): 32-8.
85. Reddy, ST. Paraoxonases. In: Wang, H.; Patterson, C., editors. *Atherosclerosis : risks, mechanisms and therapies.* Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc; 2015. p. 251-263.
86. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Miller E, Castellani LW, Subbanagounder G, Cheroutre H, Faull KF, Berliner JA, Witztum JL, Lusis AJ. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem.* 2000; 275(23): 17527-35.
87. Rosenblat M, Draganov D, Watson CE, Bisgaier CL, La Du BN, Aviram M. Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23(3): 468-74.

88. Efrat M, Aviram M. Macrophage paraoxonase 1 (PON1) binding sites. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 376(1): 105-10.
89. Rosenblat M, Volkova N, Ward J, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) inhibits monocyte-to-macrophage differentiation. *Atherosclerosis.* 2011; 219(1): 49-56.
90. Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M, McQueen MJ, Probstfield J, Fodor G, Held C, Genest J Jr; Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med.* 2006; 354(15): 1567-77.
91. Schnyder G, Roffi M, Flammer Y, Pin R, Hess OM. Effect of homocysteine-lowering therapy with folic acid, vitamin B12, and vitamin B6 on clinical outcome after percutaneous coronary intervention: the Swiss Heart study: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2002; 288(8): 973-9.
92. Steenge GR, Verhoef P, Katan MB. Betaine supplementation lowers plasma homocysteine in healthy men and women. *J Nutr.* 2003; 133(5): 1291-5.
93. Cho E, Zeisel SH, Jacques P, Selhub J, Dougherty L, Colditz GA, Willett WC. Dietary choline and betaine assessed by food-frequency questionnaire in relation to plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring Study. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83(4): 905-11.
94. Olthof MR, van Vliet T, Boelsma E, Verhoef P. Low dose betaine supplementation leads to immediate and long term lowering of plasma homocysteine in healthy men and women. *J Nutr.* 2003; 133(12): 4135-8.
95. Akgullu C, Huyut MA, Boyacioglu M, Guleş O, Eryilmaz U, Hekim T, Dogan E, Zencir C, Güngör H. Nebivolol to attenuate the effects of hyper-homocysteinaemia in rats. *Atherosclerosis.* 2015; 240(1): 33-9.
96. Aydın AF, Kondakçı G, Hatipoğlu S, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M. N-Acetylcysteine supplementation decreased brain lipid and protein oxidations produced by experimental homocysteine thiolactone exposure: Relevance to neurodegeneration. *Pathophysiology.* 2018. pii: S0928-4680(17)30148-7.
97. Nikolic T, Zivkovic V, Srejavic I, Stojic I, Jeremic N, Jeremic J, Radonjic K, Stankovic S, Obrenovic R, Djuric D, Jakovljevic V. Effects of atorvastatin and simvastatin on oxidative stress in diet-induced hyperhomocysteinemia in Wistar albino rats: a comparative study. *Mol Cell Biochem.* 2018; 437(1-2): 109-118.
98. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006; 141(2): 312-22.
99. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 1984; 219(1): 1-14.
100. Smith LL. Oxygen, oxysterols, ouabain, and ozone: a cautionary tale. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37(3): 318-24.

101. Situm M, Bulat V, Majcen K, Dzapo A, Jezovita J. Benefits of controlled ultraviolet radiation in the treatment of dermatological diseases. *Coll Antropol.* 2014; 38(4): 1249-53.
102. Brem R, Guven M, Karran P. Oxidatively-generated damage to DNA and proteins mediated by photosensitized UVA. *Free Radic Biol Med.* 2017; 107: 101-109.
103. Babior BM. Superoxide: a two-edged sword. *Braz J Med Biol Res.* 1997; 30(2): 141-55.
104. Lanciano P, Khalfaoui-Hassani B, Selamoglu N, Ghelli A, Rugolo M, Daldal F. Molecular mechanisms of superoxide production by complex III: a bacterial versus human mitochondrial comparative case study. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1827(11-12): 1332-9.
105. Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest.* 1973; 52(3): 741-4.
106. Buvelot H, Posfay-Barbe KM, Linder P, Schrenzel J, Krause KH. *Staphylococcus aureus*, phagocyte NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. *FEMS Microbiol Rev.* 2017; 41(2): 139-157.
107. Liu X, Wu XP, Zhu XL, Li T, Liu Y. IRG1 increases MHC class I level in macrophages through STAT-TAP1 axis depending on NADPH oxidase mediated reactive oxygen species. *Int Immunopharmacol.* 2017; 48: 76-83.
108. van der Vliet A, Janssen-Heininger YM. Hydrogen peroxide as a damage signal in tissue injury and inflammation: murderer, mediator, or messenger? *J Cell Biochem.* 2014; 115(3): 427-35.
109. Jones DP, Sies H. The Redox Code. *Antioxid Redox Signal.* 2015; 23(9): 734-46.
110. Lassègue B, San Martín A, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res.* 2012; 110(10): 1364-90.
111. Brand MD. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radic Biol Med.* 2016; 100: 14-31.
112. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* 2017; 11: 613-619.
113. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987; 327(6122): 524-6.
114. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988; 333(6174): 664-6.
115. Lloyd-Jones DM, Bloch KD. The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annu Rev Med.* 1996; 47: 365-75.
116. Denninger JW, Marletta MA. Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta.* 1999 May 5;1411(2-3):334-50.

117. Benhar M. Roles of mammalian glutathione peroxidase and thioredoxin reductase enzymes in the cellular response to nitrosative stress. *Free Radic Biol Med.* 2018. pii: S0891-5849(18)30038-8.
118. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007; 87(1): 315-424.
119. Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2007; 6(8): 662-80.
120. Dąbrowska N, Wiczkowski A. Analytics of oxidative stress markers in the early diagnosis of oxygen DNA damage. *Adv Clin Exp Med.* 2017; 26(1): 155-166.
121. Zhong H, Yin H. Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: focusing on mitochondria. *Redox Biol.* 2015; 4: 193-9.
122. Hauck AK, Bernlohr DA. Oxidative stress and lipotoxicity. *J Lipid Res.* 2016; 57(11): 1976-1986.
123. Mileykovskaya E, Dowhan W. Cardiolipin-dependent formation of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Chem Phys Lipids.* 2014; 179: 42-8.
124. Paradies G, Paradies V, De Benedictis V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1837(4): 408-17.
125. Ademowo OS, Dias HKI, Burton DGA, Griffiths HR. Lipid (per) oxidation in mitochondria: an emerging target in the ageing process? *Biogerontology.* 2017; 18(6): 859-879.
126. Mauerhofer C, Philippova M, Oskolkova OV, Bochkov VN. Hormetic and anti-inflammatory properties of oxidized phospholipids. *Mol Aspects Med.* 2016; 49: 78-90.
127. Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MN. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Control Release.* 2006; 113(3): 189-207.
128. Leopold JA, Loscalzo J. Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med.* 2009; 47(12): 1673-706.
129. Bowerman M, Murray LM, Scamps F, Schneider BL, Kothary R, Raoul C. Pathogenic commonalities between spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis: Converging roads to therapeutic development. *Eur J Med Genet.* 2017. pii: S1769-7212(17)30674-2.
130. Fujimoto H, Taguchi J, Imai Y, Ayabe S, Hashimoto H, Kobayashi H, Ogasawara K, Aizawa T, Yamakado M, Nagai R, Ohno M. Manganese superoxide dismutase polymorphism affects the oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis of macrophages and coronary artery disease. *Eur Heart J.* 2008; 29(10): 1267-74.
131. Kakko S, Päivänsalo M, Koistinen P, Kesäniemi YA, Kinnula VL, Savolainen MJ. The signal sequence polymorphism of the MnSOD gene is associated with the degree of carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2003; 168(1): 147-52.

132. Doddigarla Z, Parwez I, Ahmad J. Correlation of serum chromium, zinc, magnesium and SOD levels with HbA1c in type 2 diabetes: A cross sectional analysis. *Diabetes Metab Syndr.* 2016; 10(1 Suppl 1): S126-9.
133. Gaetani GF, Ferraris AM, Rolfo M, Mangerini R, Arena S, Kirkman HN. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood.* 1996; 87(4): 1595-9.
134. Kodydková J, Vávrová L, Kocík M, Žák A. Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia Biol (Praha).* 2014; 60(4): 153-67.
135. Franklin CC, Backos DS, Mohar I, White CC, Forman HJ, Kavanagh TJ. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol Aspects Med.* 2009; 30(1-2): 86-98.
136. Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *FEBS J.* 2008; 275(15): 3959-70.
137. Reeves MA, Hoffmann PR. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66(15): 2457-78.
138. Prabhakar R, Morokuma K, Musaev DG. Peroxynitrite reductase activity of selenoprotein glutathione peroxidase: a computational study. *Biochemistry.* 2006; 45(22): 6967-77.
139. Chambers I and Harrison PR. A new puzzle in selenoprotein biosynthesis: selenocysteine seems to be encoded by the stop codon, UGA. *Trends in Biochemical Sciences.* 1987; 12: 255-256
140. Durmaz A, Dikmen N. Homocysteine effects on cellular glutathione peroxidase (GPx-1) activity under in vitro conditions. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2007; 22(6): 733-8.
141. Freedman JE, Loscalzo J, Benoit SE, Valeri CR, Barnard MR, Michelson AD. Decreased platelet inhibition by nitric oxide in two brothers with a history of arterial thrombosis. *J Clin Invest.* 1996; 97(4): 979-87.
142. Seiler A, Schneider M, Förster H, Roth S, Wirth EK, Culmsee C, Plesnila N, Kremmer E, Rådmark O, Wurst W, Bornkamm GW, Schweizer U, Conrad M. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell Metab.* 2008; 8(3): 237-48.
143. Banerjee M, Vats P. Reactive metabolites and antioxidant gene polymorphisms in Type 2 diabetes mellitus. *Redox Biol.* 2014; 2: 170-7.
144. Gilbert HF. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1990; 63: 69-172.
145. Crosley LK, Méplan C, Nicol F, Rundlöf AK, Arnér ES, Hesketh JE, Arthur JR. Differential regulation of expression of cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductase in rat liver and kidney. *Arch Biochem Biophys.* 2007; 459(2): 178-88.
146. Jakupoglu C, Przemeck GK, Schneider M, Moreno SG, Mayr N, Hatzopoulos AK, de Angelis MH, Wurst W, Bornkamm GW, Brielmeier M, Conrad M. Cytoplasmic

- thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(5): 1980-8.
147. Conrad M, Jakupoglu C, Moreno SG, Lippl S, Banjac A, Schneider M, Beck H, Hatzopoulos AK, Just U, Sinowatz F, Schmahl W, Chien KR, Wurst W, Bornkamm GW, Brielmeier M. Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(21): 9414-23.
 148. Kuster GM, Siwik DA, Pimentel DR, Colucci WS. Role of reversible, thioredoxin-sensitive oxidative protein modifications in cardiac myocytes. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8(11-12): 2153-9.
 149. Gladyshev VN, Stadtman TC, Hatfield DL, Jeang KT. Levels of major selenoproteins in T cells decrease during HIV infection and low molecular mass selenium compounds increase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(3): 835-9.
 150. Lincoln DT, Ali Emadi EM, Tonissen KF, Clarke FM. The thioredoxin-thioredoxin reductase system: over-expression in human cancer. *Anticancer Res.* 2003; 23(3B): 2425-33.
 151. Yoo MH, Xu XM, Carlson BA, Gladyshev VN, Hatfield DL. Thioredoxin reductase 1 deficiency reverses tumor phenotype and tumorigenicity of lung carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2006; 281(19): 13005-8.
 152. Moretti M, Fraga DB, Rodrigues ALS. Preventive and therapeutic potential of ascorbic acid in neurodegenerative diseases. *CNS Neurosci Ther.* 2017; 23(12): 921-929.
 153. Stankova L, Bigley R, Wyss SR, Aebi H. Catalase and dehydroascorbate reductase in human polymorphonuclear leukocytes (PMN): possible functional relationship. *Experientia.* 1979; 35(7): 852-3.
 154. Mukai K, Kohno Y, Ishizu K. Kinetic study of the reaction between vitamin E radical and alkyl hydroperoxides in solution. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988; 155(2): 1046-50.
 155. Shimada K, Jong CJ, Takahashi K, Schaffer SW. Role of ROS Production and Turnover in the Antioxidant Activity of Taurine. *Adv Exp Med Biol.* 2015; 803: 581-96.
 156. Mitrovic V, Djuric D, Petkovic D, Hamm C. Evaluation of plasma total homocysteine in patients with angiographically confirmed coronary atherosclerosis: possible impact on therapy and prognosis. *Perfusion Verlag.* 2002; 15: 10-19.
 157. Djuric DM. Editorial: Sulfur-Containing Amino Acids in Cardiovascular and Neural Physiology, Pathophysiology and Pharmacology: An Overview and Update. *Curr Med Chem.* 2018; 25(3): 322-323.
 158. Rasić-Marković A, Stanojlović O, Hrncić D, Krstić D, Colović M, Susić V, Radosavljević T, Djuric D. The activity of erythrocyte and brain Na⁺/K⁺ and Mg²⁺-ATPases in rats subjected to acute homocysteine and homocysteine thiolactone administration. *Mol Cell Biochem.* 2009; 327(1-2): 39-45.

159. Jakubowski H. The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease. *J Physiol Pharmacol.* 2008; 59 Suppl 9: 155-67.
160. Petras M, Tatarkova Z, Kovalska M, Mokra D, Dobrota D, Lehotsky J, Drgova A. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for the neuronal system disorders. *J Physiol Pharmacol.* 2014; 65(1): 15-23.
161. Sharma GS, Kumar T, Dar TA, Singh LR. Protein N-homocysteinylation: From cellular toxicity to neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1850(11): 2239-45.
162. Lehotsky J, Petras M, Kovalska M, Tothova B, Drgova A, Kaplan P. Mechanism involved in the ischemic tolerance in brain: effect of the homocysteine. *Cell Mol Neurobiol.* 2015; 35(1): 7-15.
163. Škovierová H, Vidomanová E, Mahmood S, Sopková J, Drgová A, Červeňová T, Halašová E, Lehotský J. The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine Metabolism Imbalance on Human Health. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(10). pii: E1733.
164. Williams KT, Schalinske KL. Homocysteine metabolism and its relation to health and disease. *Biofactors.* 2010; 36(1): 19-24.
165. Manolescu BN, Oprea E, Farcasanu IC, Berteanu M, Cercasov C. Homocysteine and vitamin therapy in stroke prevention and treatment: a review. *Acta Biochim Pol.* 2010; 57(4): 467-77.
166. Li Y, Huang T, Zheng Y, Muka T, Troup J, Hu FB. Folic Acid Supplementation and the Risk of Cardiovascular Diseases: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Am Heart Assoc.* 2016; 5(8). pii: e003768.
167. Mazza A, Cicero AF, Ramazzina E, Lenti S, Schiavon L, Casiglia E, Gussoni G. Nutraceutical approaches to homocysteine lowering in hypertensive subjects at low cardiovascular risk: a multicenter, randomized clinical trial. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2016; 30(3): 921-927.
168. van Dijk SC, Enneman AW, Swart KM, van Wijngaarden JP, Ham AC, de Jonge R, Blom HJ, Feskens EJ, Geleijnse JM, van Schoor NM, Dhonukshe-Rutten RA, de Jongh RT, Lips P, de Groot LC, Uitterlinden AG, van den Meiracker TH, Mattace-Raso FU, van der Velde N, Smulders YM. Effect of vitamin B12 and folic acid supplementation on biomarkers of endothelial function and inflammation among elderly individuals with hyperhomocysteinemia. *Vasc Med.* 2016; 21(2): 91-8.
169. Zeng R, Xu CH, Xu YN, Wang YL, Wang M. The effect of folate fortification on folic acid-based homocysteine-lowering intervention and stroke risk: a meta-analysis. *Public Health Nutr.* 2015; 18(8): 1514-21.
170. Antoniadou C, Shirodaria C, Leeson P, Baarholm OA, Van-Assche T, Cunnington C, Pillai R, Ratnatunga C, Tousoulis D, Stefanadis C, Refsum H, Channon KM. 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.* 2009; 119(18): 2507-15.

171. Kim BJ, Seo M, Huh JK, Kwon CH, Kim JT, Sung KC, Kim BS, Kang JH. Associations of plasma homocysteine levels with arterial stiffness in prehypertensive individuals. *Clin Exp Hypertens*. 2011; 33(6): 411-7.
172. Zhang H, Liu Z, Ma S, Zhang H, Kong F, He Y, Yang X, Wang Y, Xu H, Yang A, Tian J, Zhang M, Cao J, Jiang Y, Guo X. Ratio of S-adenosylmethionine to S-adenosylhomocysteine as a sensitive indicator of atherosclerosis. *Mol Med Rep*. 2016; 14(1): 289-300.
173. Campanari ML, García-Ayllón MS, Ciura S, Sáez-Valero J, Kabashi E. Neuromuscular Junction Impairment in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Reassessing the Role of Acetylcholinesterase. *Front Mol Neurosci*. 2016; 9: 160.
174. Rotundo RL. Biogenesis of acetylcholinesterase molecular forms in muscle. Evidence for a rapidly turning over, catalytically inactive precursor pool. *J Biol Chem*. 1988; 263(36): 19398-406.
175. Kračmarová A, Drtinová L, Pohanka M. Possibility of Acetylcholinesterase Overexpression in Alzheimer Disease Patients after Therapy with Acetylcholinesterase Inhibitors. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2015; 58(2): 37-42.
176. Talesa VN. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev*. 2001; 122(16): 1961-9.
177. Religa D, Winblad B. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease based on new molecular mechanisms. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2003; 63(4): 393-6.
178. Hrnčić D, Rašić-Marković A, Stojković T, Velimirović M, Puškaš N, Obrenović R, Macut D, Sušić V, Jakovljević V, Djuric D, Petronijević N, Stanojlović O. Hyperhomocysteinemia induced by methionine dietary nutritional overload modulates acetylcholinesterase activity in the rat brain. *Mol Cell Biochem*. 2014; 396(1-2): 99-105.
179. Skau KA. Mammalian acetylcholinesterase molecular forms. *Comp Biochem Physiol C*. 1986; 83(2): 225-7.
180. Pauziene N, Alaburda P, Rysevaite-Kyguoliene K, Pauza AG, Inokaitis H, Masaityte A, Rudokaite G, Saburkina I, Plisiene J, Pauza DH. Innervation of the rabbit cardiac ventricles. *J Anat*. 2016; 228(1): 26-46.
181. Lataro RM, Silva CA, Tefé-Silva C, Prado CM, Salgado HC. Acetylcholinesterase Inhibition Attenuates the Development of Hypertension and Inflammation in Spontaneously Hypertensive Rats. *Am J Hypertens*. 2015; 28(10): 1201-8.
182. Li M, Zheng C, Kawada T, Inagaki M, Uemura K, Sugimachi M. Adding the acetylcholinesterase inhibitor, donepezil, to losartan treatment markedly improves long-term survival in rats with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2014; 16(10): 1056-65.
183. Liapi C, Zarros A, Theocharis S, Al-Humadi H, Anifantaki F, Gkrouzman E et al. The neuroprotective role of L-cysteine towards the effects of short-term exposure to lanthanum on the adult rat brain antioxidant status and the activities of acetylcholinesterase, (Na⁺,K⁺)- and Mg²⁺-ATPase. *Biometals*. 2009 ;22(2):329-35.

184. Akbulut S, Elbe H, Eris C, Dogan Z, Toprak G, Otan E et al. Cytoprotective effects of amifostine, ascorbic acid and N-acetylcysteine against methotrexate-induced hepatotoxicity in rats. *World J Gastroenterol*. 2014;20(29):10158-65.
185. Beutler E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods (third ed.). Grune Startton, New York, p.133., 1984.
186. Toora BD, Rajagopal G. Measurement of creatinine by Jaffe's reaction--determination of concentration of sodium hydroxide required for maximum color development in standard, urine and protein free filtrate of serum. *Indian J Exp Biol*. 2002;40(3):352-4.
187. Bergquist LM, Searcy RL. Application of the berthelot reaction for rapid detection of urea hydrolysis by proteus strains. *Journal of Bacteriology*. 1963;85(4):954-955.
188. Mashige F, Tanaka N, Maki A, Kamei S, Yamanaka M. Direct spectrophotometry of total bile acids in serum. *Clinical Chemistry*. 1981; 27(8):1352-1356;
189. Gella FJ, Olivella T, Cruz Pastor M, Arenas J, Moreno R, Durban R, Gomez JA. A simple procedure for the routine determination of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase with pyridoxal phosphate. *Clin Chim Acta*. 1985;153(3):241-7.
190. Dong J, Guo H, Yang R, et al. Serum LDL- and HDL-cholesterol determined by ultracentrifugation and HPLC. *Journal of Lipid Research*. 2011;52(2):383-388.
191. Murphy VA. Method for determination of sodium, potassium, calcium, magnesium, chloride, and phosphate in the rat choroid plexus by flame atomic absorption and visible spectroscopy. *Anal Biochem*. 1987;161(1):144-51.
192. Varcoe S.J. Clinical biochemistry – techniques and instrumentation – a practical course, World Scientific, p.119., 2001.
193. Thrall M-A, Baker CD, Duane Lassen E. Veterinary hematology and clinical chemistry, Wiley-Blackwell, p. 27., 2004.
194. Aruoma OI, Halliwell B, Laughton MJ, Quinlan GJ, Gutteridge JMC. The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron (II)- iron (III) complex. *Biochemical Journal*. 1989; 258:617–620.
195. Wendel A. Enzymatic basis of detoxication. New York: Academic Press, p.333., 1980.
196. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1972; 247(10):3170–3175.
197. Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature protocols*. 2010; 5(1):51-66.
198. Ellman GI, Courtney KD, Andres Vj, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961;7:88–95.
199. Mendes RH, Mostarda C, Candido GO, Moraes-Silva IC, D'Almeida V, Belló-Klein A, Irigoyen MC, Rigatto K. Moderate hyperhomocysteinemia provokes dysfunction of cardiovascular autonomic system and liver oxidative stress in rats. *Auton Neurosci*. 2014;180:43-7.

200. Aissa AF, Amaral CLD, Venancio VP, Machado CDS, Hernandez LC, Santos PWDS, Curi R, Bianchi MLP, Antunes LMG. Methionine-supplemented diet affects the expression of cardiovascular disease-related genes and increases inflammatory cytokines in mice heart and liver. *J Toxicol Environ Health A*. 2017;80(19-21):1116-1128.
201. Ables GP, Ouattara A, Hampton TG, Cooke D, Perodin F, Augie I, Orentreich DS. Dietary methionine restriction in mice elicits an adaptive cardiovascular response to hyperhomocysteinemia. *Sci Rep*. 2015;5:8886.
202. Korai M, Kitazato KT, Tada Y, Miyamoto T, Shimada K, Matsushita N, Kanematsu Y, Satomi J, Hashimoto T, Nagahiro S. Hyperhomocysteinemia induced by excessive methionine intake promotes rupture of cerebral aneurysms in ovariectomized rats. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):165.
203. Benevenga NJ, Steele RD. Adverse effects of excessive consumption of amino acids. *Ann Rev Nutr*. 1984; 4: 157.
204. Devi S, Kennedy RH, Joseph L, Shekhawat NS, Melchert RB, Joseph J. Effect of long-term hyperhomocysteinemia on myocardial structure and function in hypertensive rats. *Cardiovasc Pathol*. 2006; 15:75–82.
205. Baydas G, Reiter RJ, Akbulut M, Tuzcu M, Tamer S. Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome c translocation and caspase-3 activation and by regulating pro- and anti-apoptotic protein levels. *Neuroscience*. 2005; 135: 879–886.
206. Woo CW, Prathapasinghe GA, Siow YL. Hyperhomocysteinemia induces liver injury in rat: Protective effect of folic acid supplementation. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1762(7): 656-665.
207. Zhou J, Werstuck GH, Lhotak S, De Koning ABL, Sood SK, Hossain GS. Association of multiple cellular stress pathway with accelerated atherosclerosis in hyperhomocysteinemic apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2004; 110: 207–213.
208. Gomes J, Kumar D. Production of L-methionine by submerged fermentation: A review. *Enzyme and Microbial Technology* 2005; 37(1):3-18.
209. The metabolism and significance of homocysteine in nutrition and health. Kumar A, Palfrey HA, Pathak R, Kadowitz PJ, Gettys TW, Murthy SN. *Nutr Metab (Lond)*. 2017; 14: 78.
210. De S, Chavez-Calvillo G, Wahlsten M, Mäkinen K. Disruption of the methionine cycle and reduced cellular glutathione levels underlie potex-potyvirus synergism in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Pathol*. 2018 Jan 24. doi: 10.1111/mpp.12661
211. Lin MT, Ko JL, Liu TC, Chao PT, Ou CC. Protective Effect of D-Methionine on Body Weight Loss, Anorexia, and Nephrotoxicity in Cisplatin-Induced Chronic Toxicity in Rats. *Integr Cancer Ther*. 2018 Feb 1:1534735417753543. doi:10.1177/1534735417753543

212. Maddineni S, Nichenametla S, Sinha R, Wilson RP, Richie JP Jr. Methionine restriction affects oxidative stress and glutathione-related redox pathways in the rat. *Exp Biol Med* (Maywood). 2013 Apr;238(4):392-9.
213. Azad MAK, Sivanesan S, Wang J, Chen K, Nation RL, Thompson PE, Roberts KD, Velkov T, Li J. Methionine Ameliorates Polymyxin-Induced Nephrotoxicity by Attenuating Cellular Oxidative Stress. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;62(1)
214. Tripathi A. Acetylcholinesterase: A Versatile Enzyme of Nervous System. *Annals of Neuroscience* 2008; 15 (4).
215. Barton L, Parker K, Blumenthal D, Buxton I, Goodman and Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics, The McGraw Hill Companies, New York, 2008
216. Katzung B, Masters S, Trevor A, Basic and clinical pharmacology, 12th Edition, The McGraw Hill Companies, New York, 2012.
217. Prado MA, Reis RA, Prado VF, de Mello MC, Gomez MV, de Mello FG. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochem Int*. 2002;41(5):291-9.
218. Vučević DB, Cerović IB, Mladenović DR, Vesković MN, Stevanović I, Jorgačević BZ, Ješić Vukićević R, Radosavljević TS. Methionine-choline deprivation alters liver and brain acetylcholinesterase activity in C57BL6 mice. *Gen Physiol Biophys*. 2016 Jul;35(3):363-70.
219. Brosnan JT, Brosnan ME. The Sulfur-Containing Amino Acids: An overview. *J Nutr*. 2006;136:1636-1640.
220. Uraz S, Tahan G, Aytakin H, Tahan V. N-acetylcysteine expresses powerful anti inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic acid-induced colitis in rats. *Scand J Clin Lab Invest*. 2013;73(1):61-66.
221. Arakawa M, Ito Y. N-acetylcysteine and neurodegenerative diseases. *Basic and clinical pharmacology. Cerebellum*. 2007;6:308–314.
222. Kuyumcu A, Akyol A, Buyuktuncer Z, Ozmen MM, Besler HT. Improved oxidative status in major abdominal surgery patients after N-acetyl cystein supplementation. *Nutr J*. 2015;14:4-8.
223. Kelly GS. Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev*, 1998; 3: 114-127.
224. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of Nacetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci*, 2003; 60:6-20.
225. Kerksick C, Willoughby D. The antioxidant role of glutathione and N-acetylcysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *J. Int. Soc. Sports Nutr*. 2005, 9, 38–44.
226. Al Moutaery M, Al Rayes H, Al Swailam R, Elfaki I, Khan HA, Arshaduddin M, Tariq M. Protective effect of a cysteine prodrug and antioxidant, L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate, against ethanol-induced gastric lesions in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2012 Mar;64(3):233-7.

227. Manna P, Das J, Sil PC. Role of sulfur containing amino acids as an adjuvant therapy in the prevention of diabetes and its associated complications. *Curr Diabetes Rev.* 2013;9(3):237-48.
228. Thor H, Moldéus P, Orrenius S. Metabolic activation and hepatotoxicity. Effect of cysteine, N-acetylcysteine, and methionine on glutathione biosynthesis and bromobenzene toxicity in isolated rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys.* 1979;192(2):405-13
229. Nikolic T, Zivkovic V, Srejovic I, Stojic I, Jeremic N, Jeremic J, et al. Effects of atorvastatin and simvastatin on oxidative stress in diet-induced hyperhomocysteinemia in Wistar albino rats: a comparative study. *Mol Cell Biochem* 2018; 437(1-2): 109–18.
230. van der Griend R, Haas FJ, Duran M, Biesma DH, Meuwissen OJ, Banga JD. Methionine loading test is necessary for detection of hyperhomocysteinemia. *J Lab Clin Med.* 1998;132(1):67–72.
231. Kornjača D, Živković V, Krstić D, Čolović M, Đurić M, Stanković S, Mutavdžin S, Jakovljević V, Đurić D. The effects of acute hyperhomocysteinemia induced by DL-homocysteine or DL-homocysteine thiolactone on serum biochemical parameters, plasma antioxidant enzyme and cardiac acetylcholinesterase activities in the rat. *Arch Biol Sci* 2017, OnLine-First (00):41-41. DOI: 10.2298/ABS170731041K.
232. Golbahar J, Aminzadeh MA, Kassab SE, Omrani GR. Hyperhomocysteinemia induces insulin resistance in male Sprague-Dawley rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;76(1):1–5.
233. Lee H, Kim JM, Kim HJ, Lee I, Chang N. Folic acid supplementation can reduce the endothelial damage in rat brain microvasculature due to hyperhomocysteinemia. *J Nutr.* 2005;135(3):544–8.
234. Pushpakumar S, Kundu S, Narayanan N, Sen U. DNA hypermethylation in hyperhomocysteinemia contributes to abnormal extracellular matrix metabolism in the kidney. *FASEB J.* 2015;29(11):4713–25.
235. de Andrade CR, Tirapelli CR, Haddad R, Eberlin MN, Ramalho LN, Iyomasa MM, Uyemura SA, de Oliveira AM. Hyperhomocysteinemia induced by feeding rats diets rich in DL-homocysteine thiolactone promotes alterations on carotid reactivity independent of arterial structure. *Vascul Pharmacol.* 2009;51(4):291–8.
236. Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY, Zhou J, Maeda N, Krisans SK, Malinow MR, Austin RC. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J Clin Invest.* 2001;107(10):1263–73.
237. Schweinberger BM, Schwieder L, Scherer E, Sitta A, Vargas CR, Wyse AT. Development of an animal model for gestational hypermethioninemia in rat and its effect on brain Na⁺,K⁺-ATPase/Mg²⁺-ATPase activity and oxidative status of the offspring. *Metab Brain Dis.* 2014 Mar;29(1):153-60.

238. Schweinberger BM, Wyse AT. Mechanistic basis of hypermethioninemia. *Amino Acids*. 2016 Nov;48(11):2479-2489.
239. Yamada H, Akahoshi N, Kamata S, Hagiya Y, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Takano N, Mori M, Ishizaki Y, Izumi T, Kumagai Y, Kasahara T, Suematsu M, Ishii M. Methionine excess in diet induces acute lethal hepatitis in mice lacking cystathionine γ -lyase, an animal model of cystathioninuria. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(9):1716–26.
240. Pang X, Liu J, Zhao J, Mao J, Zhang X, Feng L, Han C, Li M, Wang S, Wu D. Homocysteine induces the expression of C-reactive protein via NMDAR-ROS-MAPK-NF- κ B signal pathway in rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2014 Sep;236(1):73-81
241. Jácomo RH, Santana-Lemos BA, Lima AS, Assis PA, Lange AP, Figueiredo-Pontes LL, Oliveira LO, Bassi SC, Benício MT, Baggio MS, Garcia AB, Falcão RP, Rego EM. Methionine-induced hyperhomocysteinemia reverts fibrinolytic pathway activation in a murine model of acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2012 Jul 5;120(1):207-13.
242. Rodgers GM, Kane WH. Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. *J Clin Invest* 1986; 77: 1909–16.
243. Nishinaga M, Ozawa T, Shimada K. Homocysteine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Clin Invest* 1993; 92: 1381–6.
244. Palareti G, Salardi S, Piazzzi S et al. Blood coagulation changes in homocystinuria: effects of pyridoxine and other specific therapy. *J Pediatr* 1986; 109: 1001–6.
245. Hajjar KA. Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor. *J Clin Invest* 1993; 91: 2873–9.
246. Harpel PC, Chang VT, Borth W. Homocysteine and other sulfhydryl compounds enhance the binding of lipoprotein(a) to fibrin: a potential biochemical link between thrombosis, atherogenesis, and sulfhydryl compound metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10193–7.
247. Harpel PC, Zhang X, Borth W. Homocysteine and hemostasis: pathogenic mechanisms predisposing to thrombosis. *J Nutr* 1996; 126 (4 Suppl): 1285S–9S.
248. Panganamala RV, Karpen CW, Merola AJ. Peroxide mediated effects of homocysteine on arterial prostacyclin synthesis. *Prostaglandins Leukotrienes & Medicine* 1986; 22: 349–56.
249. Harker LA, Ross R, Slichter SJ, Scott CR. Homocysteininduced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest* 1976; 58: 731–41.
250. Hill-Zobel RL, Pyeritz RE, Scheffel U et al. Kinetics and distribution of ¹¹¹Indium-labeled platelets in patients with homocystinuria. *N Engl J Med* 1982; 307: 781–6.
251. McDonald L, Bray C, Field C, Love F, Davies B. Homocystinuria, thrombosis and the blood platelets. *Lancet* 1964; i:745–6.

252. Di Minno G, Davi G, Margaglione M et al. Abnormally high thromboxane biosynthesis in homozygous homocystinuria. Evidence for platelet involvement and probucol-sensitive mechanism. *J Clin Invest* 1993; 92: 1400–6.
253. Graeber JE, Slott JH, Ulane RE, Schulman JD, Stuart MJ. Effect of homocysteine and homocystine on platelet and vascular arachidonic acid metabolism. *Pediatr Res* 1982; 16: 490–3.
254. Stites WE, Froude JW 2nd. Does the oxidation of methionine in thrombomodulin contribute to the hypercoagulable state of smokers and diabetics? *Med Hypotheses*. 2007;68(4):811-21.
255. Perutelli P, Amato S, Minniti G, Bottini F, Calevo MG, Cerone R, Molinari AC. von Willebrand factor multimer composition is modified following oral methionine load in women with thrombosis, but not in healthy women. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2005;16(4):267-73.
256. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem*, 1969; 244:6049-6055.
257. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*, 2002; 33:337-349.
258. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J Jr, Dionne L, Lu N, Huang S, Matzuk MM. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996; 93:9782-9787.
259. Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc*, 2010; 5:51-66.
260. Schriener SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Van Remmen H, Wallace DC, Rabinovitch PS. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science*, 2005; 308:1909-1911.
261. Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to copper catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J. Clin. Invest.* 1986; 77: 1370–1376.
262. Faraci FM and Lentz SR. Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction. *Stroke* 2004; 35: 345–347.
263. Ungvari Z, Csiszar A, Edwards JG, Kaminski PM, Wolin MS, Kaley G and Koller A. Increased superoxide production in coronary arteries in hyperhomocysteinemia: role of tumor necrosis factor-alpha, NAD(P)H oxidase, and inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23: 418–424.
264. Schöneich C. Methionine oxidation by reactive oxygen species: reaction mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1703(2):111-9.
265. Israelsson B, Brattstrom LE, Hultberg BL. Homocysteine and myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1988; 71: 227–33.

266. Jacobsen DW. Hyperhomocysteinemia and oxidative stress: time for a reality check? *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20: 1182–1184.
267. Zappacosta B, Mordente A, Persichilli S, Minucci A, Carlino P, Martorana GE, Giardina B and De Sole P. Is homocysteine a pro-oxidant? *Free Rad. Res.* 2001; 35: 499–505.
268. Vitvitsky V, Mosharov E, Tritt M, Ataulakhanov F and Banerjee R. Redox regulation of homocysteine-dependent glutathione synthesis. *Redox Rep.* 2003; 8: 57–63.
269. Duan J, Murohara T, Ikeda H, Sasaki K, Shintani S, Akita T, Shimada T and Imaizumi T. Hyperhomocysteinemia impairs angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20: 2579–2585.
270. Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, et al. Homocysteine induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and fatty acid biosynthetic pathways. *J. Clin. Invest.* 2001; 107: 1263–1273.
271. Outinen PA, Sood SK, Pfeifer SI, Pamidi S, Podor TJ, Li J, Weitz JI and Austin RC. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood* 1999; 94: 959–967.
272. Hossain GS, van Thienen JV, et al. TDAG51 is induced by homocysteine, promotes detachment-mediated programmed cell death, and contributes to the development of atherosclerosis in hyperhomocysteinemia. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 30317–30327.
273. Hancock JC, Hoover DB, Hougland MW. Distribution of muscarinic receptors and acetylcholinesterase in the rat heart. *Auton Nerv Syst J*, 1987; 19: 59-66.
274. Schulpis K, Kalimeris K, Bakogiannis C, Tsakiris T, Tsakiris S. The effect of in vitro homocystinuria on the suckling rat hippocampal acetylcholinesterase. *Metab Brain Dis* 2006; 21(1):21-28.
275. Stefanello FM, Zugno AI, Wannmacher CM, Wajner M, Wyse AT. Homocysteine inhibits butyrylcholinesterase activity in rat serum. *Metab Brain Dis.* 2003;18(3):187-94.
276. Scherer EB, da Cunha AA, Kolling J, da Cunha MJ, Schmitz F, Sitta A, Lima DD, Delwing D, Vargas CR, Wyse AT. Development of an animal model for chronic mild hyperhomocysteinemia and its response to oxidative damage. *Int J Dev Neurosci.* 2011;29(7):693-9.
277. Petrović M, Fufanović I, Elezović I, Čolović M, Krstić D, Jakovljević V, Đurić D. Efekti homocistein tiolaktona na aktivnost acetilholinesteraze u mozgu, krvi i srcu pacova. *Serb J Exp Clin Res.* 2010; 11(1):19-22.
278. Zivkovic V, Jakovljevic V, Pechanova O, Srejovic I, Joksimovic J, Selakovic D, Barudzic N, Djuric DM. Effects of DL-homocysteine thiolactone on cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers in the isolated rat heart: the role of different gasotransmitters. *Biomed Res Int.* 2013;2013:318471.
279. Chaturvedi P, Kamat PK, Kalani A, Familtseva A, Tyagi SC. High Methionine Diet Poses Cardiac Threat: A Molecular Insight. *J Cell Physiol.* 2016;231(7):1554-61.

280. Ables GP, Ouattara A, Hampton TG, Cooke D, Perodin F, Augie I, Orentreich DS. Dietary methionine restriction in mice elicits an adaptive cardiovascular response to hyperhomocysteinemia. *Sci Rep.* 2015;5:8886.
281. Zulli A, Hare DL, Buxton BF, Black MJ. The combination of high dietary methionine plus cholesterol induces myocardial fibrosis in rabbits. *Atherosclerosis.* 2006;185(2):278-81.
282. Taravati A, Asri S, SafiS, Madani R, Mortazav P. Histopathology and biochemical assessment of excess high dose of methionine on liver, heart and kidney tissues in rabbit. *Ann Biol Res* 2013;(2):167-173.
283. Boyacioglu M, Sekkin S, Kum C, Korkmaz D, Kiral F, Yalinkilinc HS, Ak MO, Akar F. The protective effects of vitamin C on the DNA damage, antioxidant defenses and aorta histopathology in chronic hyperhomocysteinemia induced rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2014;66(9-10):407-13.