



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

Наташа Р. Мијаиловић

**Бихевиорални ефекти дуготрајне примене дијететских протокола
са повећаним садржајем метионина и недостатком фолата,
пиридоксина и кобаламина код пацова**

Докторска дисертација

Ментор: др сци. мед. Гвозден Росић, редовни професор

Крагујевац, 2019. године

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>
Име и презиме: Наташа Р. Мијаиловић
Датум и место рођења: 03.11.1978., Приштина, Република Србија
Садашње запослење: Асистент на предмету Основи физичке хемије, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: Бихевиорални ефекти дуготрајне примене дијететских протокола са повећаним садржајем метионина и недостатком фолата, пиридоксина и кобаламина код пацова
Број страница: 222
Број слика: 42
Број библиографских података: 571
Установа и место где је рад израђен: Лабораторија за бихевиорална истраживања, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицина, Физиологија
Ментор: др сци.мед. Гвозден Росић, редовни професор
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 23.02.2017.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-03-713/7, 13.07.2017.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: <ol style="list-style-type: none">1. Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, председник2. Проф. др Драган Миловановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, члан3. Доц. др Владимир Михаиловић, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, члан4. Проф. др Љиљана Шћепановић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, члан5. Проф. др Душан Митровић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, члан
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: <ol style="list-style-type: none">1. Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, председник2. Проф. др Душан Митровић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, члан3. Доц. др Драгица Селаковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, члан4. Доц. др Владимир Михаиловић, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, члан5. Доц. др Јанко Самарцић, доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду, члан
Датум одбране дисертације:

САЖЕТАК

Увод: У овој студији су испитивани бихевиорални ефекти дуготрајне примене дијететских протокола са повећаним садржајем метионина и недостатком фолата, пиридоксина и кобаламина, као и утицај примене статина уз наведене дијететске протоколе код пацова.

Материјал и методе: Студија је спроведена на 72 пацова Wistar albino соја, старости четири недеље, телесне масе 100 ± 15 g, подељених у 9 група, на основу примењених дијететских протокола - стандардна храна, храна са повећаним садржајем метионина, храна са повећаним садржајем метионина и смањеним садржајем фолата, пиридоксина и кобаламина. У одговарајућим групама уз наведене протоколе, аплицирани су статини - аторвастатин (3 mg/kg) или симвастатин (5 mg/kg). Протоколи су трајали 30 дана, након чега су вршени бихевиорални тестови, а након тога су животиње жртвоване у циљу добијања узорака за анализу параметара оксидативног статуса у ткиву хипокампуса.

Резултати: Резултати бихевиоралног испитивања су показали да примењени дијететски протоколи са повећаним садржајем метионина, као и са повећаним садржајем метионина и недостатком витамина В комплекса (B_6 , B_9 , B_{12}) доводе до испољавања анксиогеног и продепресантног ефекта. Истовремена примена статина уз наведене протоколе је ублажавала негативне бихевиоралне ефекте дијететских режима. Параметри за процену оксидативног стреса у хипокампусу су потврђивали оксидативно оштећење узроковано дијететским протоколима, док је симултана примена статина смањивала оксидативно оштећење хипокампалног ткива.

Закључак: Хронична примена дијете са повећаним садржајем метионина, као и са повећаним садржајем метионина уз недостатак витамина В комплекса (B_6 , B_9 , B_{12}) је довела до испољавања анксиогеног и продепресантног ефекта, уз истовремено повећање оксидативног оштећења у ткиву хипокампуса. Истовремена примена статина (аторвастатин и симвастатин) спровођена уз дијететски протокол са повећаним уносом метионина, као и уз додатни недостатак витамина В комплекса, је ублажавала негативне бихевиоралне ефекте изазване дијететским протоколима, уз смањење степена оксидативног оштећења ткива хипокампуса.

Кључне речи: хомоцистеин, аторвастатин, симвастатин, анксиозност, депресија, оксидативни стрес

ABSTRACT

Introduction: The aim of this study was to evaluate behavioral effects of special dietary protocols enriched with methionine and deficient in folate, pyridoxine and cobalamine in rats. The effects of statins, simultaneously applied with special dietary protocols, were also investigated in this study.

Material and methods: The investigation was performed on 72 male Wistar albino rats, 4 weeks old, 100 ± 15 g body weight. They were divided (eight per group) according to the basic dietary protocols: standard chow, methionine-enriched, and methionine-enriched vitamins B (B_6 , B_9 , B_{12}) deficient diet. Each dietary protocol included groups with atorvastatin (3 mg/kg/day) and simvastatin (5 mg/kg/day). Applied dietary protocols lasted for 30 days. Behavioral testing was performed following completion of dietary pretreatment and parameters of oxidative stress were determined in hippocampal tissue samples following decapitation after anesthesia.

Results: The results of behavioral testing showed that methionine-load dietary protocols, as well as methionine-enriched diet with restricted vitamins B intake, induced anxiogenic and prodepressant effects. Simultaneous statins administration attenuated negative behavioral effects of both applied dietary protocols. Parameters for oxidative stress estimation confirmed oxidative damage in rat hippocampus, while simultaneous application of statins attenuated oxidative damage caused by applied dietary protocols.

Conclusion: Chronic dietary interventions enriched with methionine and deficient in folate, pyridoxine and cobalamine induced anxiogenic and prodepressant effects, which were accompanied by increased oxidative stress in rat hippocampus. Simultaneous statins administration with methionine overloading dietary protocols showed beneficial effects by means of attenuation of both negative behavioral effects and oxidative stress parameters in hippocampal tissue.

Key words: homocysteine, atorvastatin, simvastatin, anxiety, depression, oxidative stress

ЗАХВАЛНИЦА

Највећу захвалност у изради докторске дисертације дугујем своме цењеном ментору, професору др Гвоздену Росићу. Хвала за добру вољу, искрену жељу и спремност да цео подухват изведемо до краја. Хвала за стручну и људску помоћ. Хвала за велику подршку и сигурност коју сам осетила од првога дана наше сарадње. Хвала за сваки савет и добронамерну критику. Неизмерно хвала што је веровао у мене.

Велико и посебно хвала дугујем двома изузетним колегиницама, Драгици и Јовани. Хвала за топлу и искрену подршку. Хвала за уложено време и труд. Хвала за колегијално и другарско разумевање.

Посебну захвалност дугујем поштованом професору Владимиру Јаковљевићу на разумевању и великој подршци у читавом пројекту и у свим сегментима његове реализације.

Захваљујем се доц. др Тамари Николић Турнић и њеном ментору, професору Владимиру Живковићу, на великодушној сарадњи и разумевању у научној валидацији тематике коју су на врхунски начин и сами обрађивали.

Посебну захвалност заслужују уважене колеге са катедре за Биохемију Природно-математичког факултета, доц. др Владимир Михаиловић и др Јелена Катанић, због високопрофесионалног односа, помоћи и подршке у делу истраживања који је омогућио сагледавање биохемијске основе и тиме заокружио укупну слику о значају овог истраживања.

Хвала мојој вољеној породици, која ме је разумела, подржавала и бринула заједно са мном, онако како то чине само они који вас највише воле...Хвала моме вољеном тати...потрудићу се да следим његове кораке...

Садржај

1. УВОД	1
1.1. Хомоцистеин	2
1.1.1. Историјат и откриће хомоцистеина.....	2
1.1.2. Метаболизам хомоцистеина.....	4
1.1.2.1. Реметилациони пут (циклус метионин-хомоцистеин-метионин).....	4
1.1.2.2. Трансулфурациони пут	5
1.1.2.3. Метаболизам хомоцистеина у јетри	6
1.1.2.4. Метаболизам хомоцистеина у централном нервном систему.....	8
1.1.3. Хомоцистеинемиа, хиперхомоцистеинемиа, узроци и класификација	9
1.1.4. Хиперхомоцистеинемиа и поремећаји органских система.....	13
1.1.4.1. Хиперхомоцистеинемиа и кардиоваскуларне болести.....	13
1.1.4.2. Хиперхомоцистеинемиа и гастроинтестиналне болести.....	14
1.1.4.3. Хиперхомоцистеинемиа и аутоимуне болести.....	15
1.1.4.4. Хиперхомоцистеинемиа и хронична бубрежна болест	15
1.1.4.5. Хиперхомоцистеинемиа и болести костију	16
1.1.4.6. Хиперхомоцистеинемиа и малигне болести.....	16
1.1.4.7. Хиперхомоцистеинемиа и конгенитални поремећаји.....	17
1.1.4.8. Хиперхомоцистеинемиа и неуролошке болести	17
1.1.4.9. Хиперхомоцистеинемиа и психијатријске болести	18
1.1.5. Хиперхомоцистеинемиа као етиолошки фактор поремећаја у централном нервном систему.....	20
1.1.5.1. Морфолошке и функционалне промене у мозгу повезане са хиперхомоцистеинемиаом	20
1.1.5.2. Механизми неуротоксичности изазване хомоцистеином.....	21
1.2. Оксидативни стрес.....	22
1.2.1. Оксидативни стрес у централном нервном систему.....	24
1.3. Анксиозни поремећаји.....	26
1.3.1. Дефиниција и класификација анксиозних поремећаја	26
1.3.2. Анимални експериментални модели за индукцију анксиозности.....	28
1.3.3. Анимални експериментални модели за процену степена анксиозности	30
1.3.4. Оксидативни стрес у анксиозним поремећајима	32
1.3.4.1. Подаци о повезаности анксиозних поремећаја и оксидативног оштећења из клиничких студија.....	33
1.3.4.2. Повезаност оксидативног стреса и повећање степена анксиозности према резултатима студија на анималним експерименталним моделима	34
1.4. Депресивни поремећаји.....	35
1.4.1. Дефиниција и класификација депресивних поремећаја	35
1.4.2. Анимални експериментални модели за индукцију депресије	37
1.4.3. Анимални експериментални модели за процену степена депресивности	38
1.4.4. Оксидативни стрес у депресивним поремећајима	39
1.4.4.1. Подаци о повезаности депресије и оксидативних оштећења из клиничких студија	39
1.4.4.2. Повезаност оксидативног стреса и депресије према резултатима студија на анималним моделима	40
1.5. Ноцицепција	41
1.5.1. Дефиниција и морфофункционалне основе ноцицепције	41

1.5.2. Ноцицепција и инфламација.....	42
1.5.3. Ноцицепција и NPY.....	44
1.5.4. Ноцицепција и оксидативни стрес.....	45
1.5.5. Анимални модели за процену ноцицепције.....	46
1.5.5.1. Анимални модели за испитивање бола изазваног термичким стимулусима.....	47
1.5.6. Значај анималних модела у претклиничко - бихевиоралним истраживањима.....	48
1.6. Статини.....	51
1.6.1. Механизам дејства и класификација статина.....	52
1.6.2. Терапијске индикације (дозирање и начин примене).....	53
1.6.3. Нежељени ефекти примене статина.....	55
1.6.4. Статини и оксидативни стрес.....	57
1.6.5. Статини и оксидативна оштећења možданог ткива.....	59
2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА.....	61
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	63
3.1. Услови под којима су животиње чуване током трајања експерименталних протокола.....	64
3.2. Експерименталне групе и третман.....	65
3.3. Бихевиорална тестирања.....	67
3.3.1. Тест отвореног поља (ОП тест).....	68
3.3.2. Тест уздигнутог крстатстог лавиринта (УКЛ тест).....	70
3.3.3. Тест качења за реп (ТКР).....	71
3.3.4. Тест вруће плоче (ВП тест).....	73
3.3.5. Снимање и анализа видео записа.....	74
3.4. Одређивање параметара оксидативног стреса у ткиву хипокампуса.....	75
3.4.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (изражен као TBARS) у хипокампусу.....	75
3.4.2. Одређивање активности супероксид-дисмутазе (SOD) у хипокампусу.....	76
3.4.3. Одређивање активности каталазе у ткиву хипокампуса.....	78
3.4.4. Одређивање укупног глутатиона (GSH) у хипокампусу.....	79
3.4.5. Одређивање количине укупних протеина у хомогенату ткива.....	80
3.5. Одређивање серумских концентрација ензима за процену токсичности терапије статинима.....	81
3.5.1. Одређивање серумске концентрације аспартат аминотрансферазе (AST).....	81
3.5.2. Одређивање серумске концентрације аланин аминотрансферазе (ALT).....	82
3.5.3. Одређивање серумске концентрације укупне креатин киназе (СК).....	82
3.5.4. Одређивање серумске концентрације ММ креатин киназе (СК ММ).....	82
3.5.5. Одређивање серумске концентрације МВ креатин киназе (СК МВ).....	82
3.6. Статистичка анализа података.....	83
4. РЕЗУЛТАТИ.....	84
4.1. Бихевиорални тестови.....	85
4.1.1. Тест отвореног поља (ОП) тест.....	85
4.1.1.1. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на вредности укупног пређеног пута (УПП).....	85

4.1.1.2. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на проценат времена кретања (% ВК)...	87
4.1.1.3. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на вредности просечне брзине кретања (ПБК).....	89
4.1.1.4. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на укупно време проведено у централној зони (УВПЦЗ)	91
4.1.1.5. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на укупан број улазака у централну зону (БУЦЗ).....	93
4.1.1.6. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на број усправљања (БУ).....	95
4.1.2. Тест уздигнутог крстастог лавиринта (УКЛ тест)	97
4.1.2.1. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на укупно време проведено у отвореним крацима (УВПОК)	97
4.1.2.2. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на број улазака у отворене краке (БУОК).....	99
4.1.2.3. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на вредности укупног пређеног пута (УПП).....	101
4.1.2.4. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на вредности просечне брзине кретања (ПБК).....	103
4.1.2.5. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на проценат времена кретања (% ВК). 105	
4.1.2.6. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на број усправљања (БУ).....	107
4.1.2.7. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на број нагињања (БН).....	109
4.1.2.8. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на број епизода укупне експлоративне активности (УЕА)	111
4.1.3. Тест качења за реп (ТКР)	113
4.1.3.1. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на време до појаве прве имобилности (ВПИ)	113

4.1.3.2. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на број епизода имобилности (БЕИ) ...	115
4.1.3.3. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на укупно трајање имобилности (УТИ)	117
4.1.3.4. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на просечно трајање епизоде имобилности (ПТЕИ)	119
4.1.4. Тест вруће плоче	120
4.1.4.1. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на време до реакције (ВР) у ВП тесту .	120
4.2. Промене оксидативног статуса у ткиву хипокампуса узроковане примењеним дијететским протоколима и применом статина	122
4.2.1. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на индекс липидне пероксидације (изражен као TBARS) у ткиву хипокампуса	122
4.2.2. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на активност супероксид-дисмутазе (SOD) у хипокампусу	124
4.2.3. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на активност каталазе (CAT) у хипокампусу	126
4.2.4. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на укупни глутатион (GSH) у хипокампусу	128
4.3. Анализа међусобне повезаности параметара бихевиоралних тестова и параметара оксидативног статуса.....	129
4.3.1. Анализа међусобне повезаности параметара бихевиоралних индикатора за процену степена анксиозности и оксидативног статуса.....	129
4.3.1.1. Анализа међусобне повезаности укупног времена проведеног у централној зони у ОП тесту и параметара оксидативног статуса	129
4.3.1.2. Анализа међусобне повезаности укупног времена проведеног у отвореним крацима у УКЛ тесту и параметара оксидативног статуса.....	131
4.4. Промене серумских концентрација ензима за процену токсичности терапије статинима	134
4.4.1. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на вредности серумских концентрација аспаргат аминотрансферазе (AST)	134

4.4.2. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на вредности серумских концентрација аланин аминотрансферазе (ALT).....	135
4.4.3. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на вредности серумских концентрација укупне креатин киназе (СК укупни)	136
4.4.4. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на вредности серумских концентрација ММ креатин киназе (СК ММ).....	137
4.4.5. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на вредности серумских концентрација МВ креатин киназе (СК МВ)	138
5. ДИСКУСИЈА.....	139
5.1. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на промене степена анксиозности.....	144
5.2. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на промене степена депресивности.....	159
5.3. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В ₆ , В ₉ , В ₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на ноцицепцију	166
6. ЗАКЉУЧЦИ	167
7. ЛИТЕРАТУРА.....	171
СКРАЋЕНИЦЕ.....	219

1. УВОД

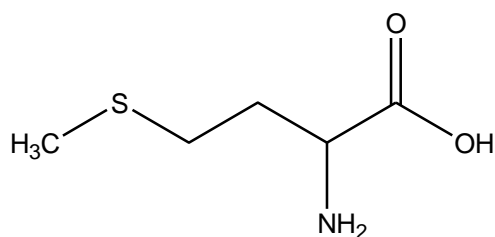
1.1. Хомоцистеин

1.1.1. Историјат и откриће хомоцистеина

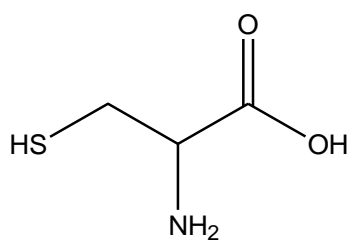
Хомоцистеин (Hcy) је тиолна, непротеиногена аминокиселина која настаје као битан интермедијер у процесу метаболизма есенцијалне аминокиселине метионина (Met). Хемијска структура хомоцистеина је откривена давне 1932. године. Тим научника са универзитета Илиној, које су предводили *Butz* и *du Vigneaud*, је загревањем аминокиселине метионина у концентрованој сумпорној киселини успео да изолује супстанцу која је по својим хемијским особинама била врло слична цистеину (1). Анализирајући хемијску структуру новодобијеног једињења, ови научници су дошли до закључка да су синтетисали 2-амино-4-сулфанил-бутанску киселину и ово једињење назвали хомоцистеин, због изразите сличности у структури са цистеином. Разлика која постоји у хемијској грађи ова два једињења је један метиленски мост више (-CH₂-) који се налази у молекулу хомоцистеина.

Након открића хемијске структуре хомоцистеина, уследиле су деценије бројних истраживања које су донеле знатно јаснију слику о сложенем метаболизму метионина, као и о месту и улози хомоцистеина у овим процесима. Наиме, хомоцистеин је идентификован као важан метаболит који у људском организму искључиво настаје из аминокиселине метионина. Веза хомоцистеина са патолошким стањима први пут је уочена тек три деценије након његовог открића, тачније, 1962. године, када су лекари *Carson* и *Neill* открили високе концентрације хомоцистеина у урину деце оболеле од менталне ретардације (2). Ово стање су назвали хомоцистинурија, а даљим истраживањима је откривено да у основи овог поремећаја лежи метаболичка абнормалност проузрокована дефицитом ензима који блокирају метаболизам хомоцистеина. Две године касније, настављајући своја истраживања, *Gibson*, *Carson* и *Neill* су открили код пацијената са хомоцистинуријом абнормалности коронарних крвних судова и артеријску тромбозу (3). *Kilmer McCully* је, потом, 1969. године уочио штетне ефекте хомоцистеина на зидове крвних судова. Заправо, код два пацијента са тешким хиперхомоцистеинемјама, које су настале као последица различитих урођених грешака у метаболизму метионина, открио је сличне васкуларне лезије (4). С обзиром да је тешка хиперхомоцистеинемја била једина заједничка метаболичка абнормалност код ових пацијената, то га је и навело да постави „хомоцистеинску теорију”, у којој је указао на токсични утицај хомоцистеина и његових метаболита на

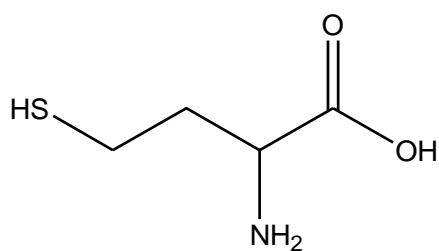
зидове крвних судова. Хомоцистеин је од тог тренутка побудио пажњу научне јавности и у годинама које су уследиле, у бројним студијама, потврђено је да чак и умерени пораст нивоа хомоцистеина представља независни фактор ризика за кардиоваскуларне (5, 6, 7) и цереброваскуларне болести (8, 9). Значај хомоцистеина у патогенези ових болести огледа се и у називу који му је додељен - „холестерол 21. века”.



Метионин (Met)



Цистеин (Cys)



Хомоцистеин (Hcy)

Слика 1.1. Хемијске структуре метионина, цистеина и хомоцистеина

Новија истраживања су, међутим, указала на изузетно јаку везу између повишених нивоа хомоцистеина и великог броја различитих болести попут неуролошких и психијатријских болести (10, 11), остеопорозе (12), хроничне бубрежне болести (13), гастроинтестиналних поремећаја (14, 15), карцинома (16, 17), као и различитих конгениталних дефеката (18).

1.1.2. Метаболизам хомоцистеина

Хомоцистеин је са хемијског аспекта аминокиселина, међутим, у биохемијском смислу он то заправо и није, јер не учествује у синтези протеина. Наиме, хомоцистеин је битан интермедијер у метаболизму есенцијалне аминокиселине метионина, која заправо представља једини извор хомоцистеина у људском организму. Све ћелије у човековом организму имају способност метаболисања метионина и синтезе хомоцистеина. Стварање хомоцистеина је изузетно сложен, ткивно специфичан, биохемијски процес у чијој регулацији учествују многобројни ензими, као и витамини који имају улогу кофактора неопходних у овим реакцијама.

1.1.2.1. Реметилациони пут (циклус метионин-хомоцистеин-метионин)

Први корак у метаболизму метионина подразумева његову активацију у SAM (S-аденозил метионин) под дејством ензима метионин-аденозил-трансферазе (MAT) у присуству АТР-а (аденозин трифосфата). SAM је универзални дозор метил групе (-CH₃) у многобројним интрацелуларним реакцијама. Метил група из SAM-а, преноси се великом броју једињења акцептора од којих, преузимањем метил групе, настају многобројна једињења као што су креатин, фосфатидилхолин, карнитин, неуротрансмитери, фосфолипиди, протеини, нуклеинске киселине, полиамини (19). Поред тога, SAM учествује и у епигенетским модулацијама, као што су регулација DNK метилације (нуклеарне и митохондријалне), ремоделовање хроматина, пост-транслациона модификација хистона (20, 21). Све ове реакције називају се трансметилационим реакцијама и каталишу их ензими метилтрансферазе (MT).

Даљим током, из SAM настаје S-аденозил хомоцистеин (SAH), који представља производ свих SAM-зависних трансметилационих реакција. SAH врло брзо подлеже даљој хидролизи под дејством ензима SAH-хидролазе, при чему настају Hcy и аденозин. Овај корак води порасту концентрације хомоцистеина у случају повећаног уноса метионина (22). Уколико дође до пораста концентрације хомоцистеина, под дејством реверзног ензима SAH-хидролазе, Hcy прелази у SAH. Повећане концентрације SAH имају снажан негативан ефекат на већину метилтрансфераза у ћелијама, зато што се SAH понаша као снажан алостерички инхибитор ових ензима (23). Интрацелуларни однос SAM/SAH показује такозвани индекс трансметилационог

потенцијала. Дисрегулација у метилационом статусу (као што је хипометилација) услед смањене синтезе SAM спада у централне механизме којима се објашњава негативан утицај хиперхомоцистеинемije на васкуларне и неуродегенеративне болести, где заправо постоји поремећај у синтези неуротрансмитера и протеина одговорних за структурни интегритет мозга (24, 25).

Под нормалним физиолошким условима, приближно 50% хомоцистеина насталог процесом деметилације метионина, служи као супстрат за поновну синтезу метионина, односно за процес такозване реметилације (19). Постоје два различита пута којима се хомоцистеин преводи у метионин и тиме затвара метилациони циклус. Један од путева, који је присутан у свим ћелијама људског организма, зависи од присуства фолата и витамина B₁₂ (цијанокобаламина). Фолат у облику коензима N-5-метил-тетрахидрофолата (THF) може да преда метил групу хомоцистеину у реакцији коју катализује ензим метионин-синтаза (MS), при чему је као кофактор у овој реакцији неопходан витамин B₁₂. Статус фолата и витамина B₁₂ има битну улогу у регулацији унутарћелијског нивоа хомоцистеина, а последично и нивоа хомоцистеина у циркулацији. N-5,10-метилен-тетрахидрофолат-редуктаза (MTHFR) катализује синтезу N-5-метил-тетрахидрофолата из N-5,10-метилен-тетрахидрофолата у присуству NADPH (26).

Други начин којим се хомоцистеин реметилује у метионин, потпуно је независан од такозваног „one carbon” метаболизма и користи бетаин, који настаје оксидацијом холина, као дозор метил групе. Под дејством ензима бетаин-хомоцистеин-S-метил трансферазе (BHMT), бетаин предаје метил групу хомоцистеину и при томе прелази у диметилглицин. BHMT-зависна реметилација је ткивно специфична и одвија се искључиво у јетри, бубрегу, панкреасу, танком цреву и сочиву (27). Регулација и/или експресија BHMT утиче у великој мери на концентрацију хомоцистеина у плазми и поремећај у овој регулацији може имати за последицу врло различите клиничке манифестације.

1.1.2.2. Трансулфурациони пут

Део хомоцистеина, који не уђе у процес поновне синтезе метионина, подлеже иреверзибилној разградњи. Овај пут даљег катаболизма хомоцистеина, који води његовој елиминацији из организма, назива се трансулфурациони пут. Први корак у

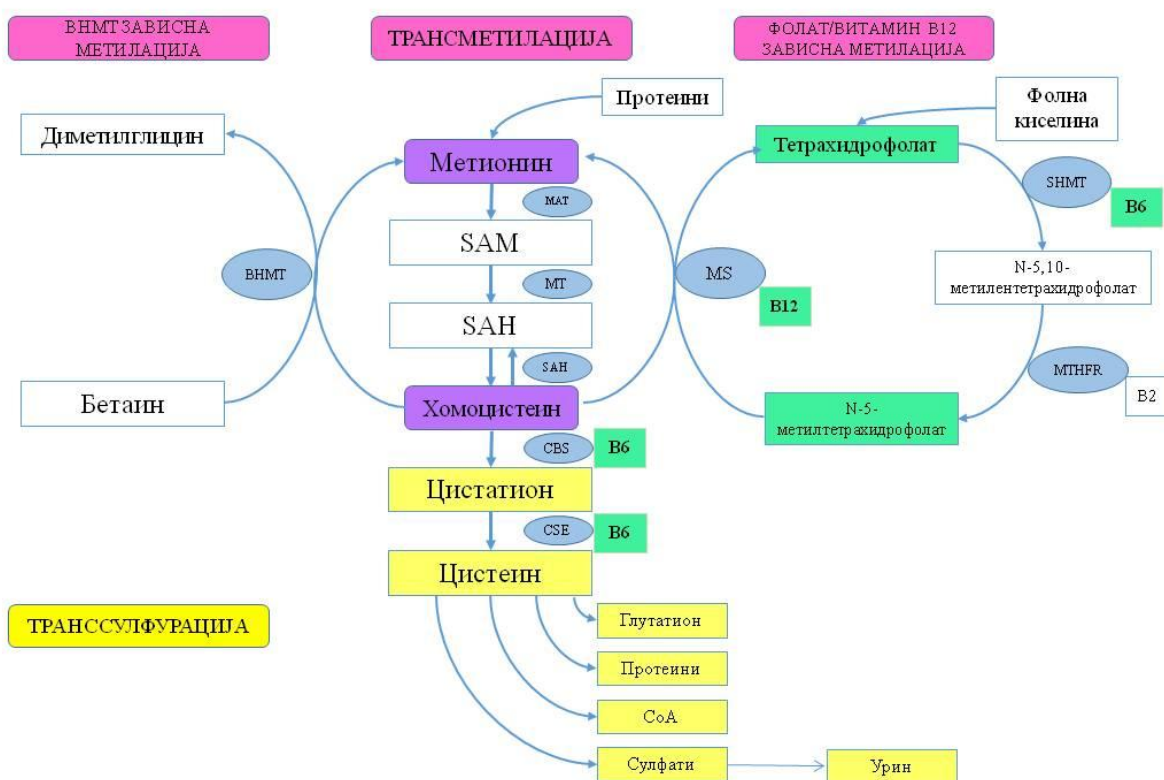
овом процесу је спајање хомоцистеина и серина (Ser) и последична синтеза цистатиона. Овај корак каталише ензим цистатион- β -синтаза (CBS). Цистатион даље подлеже хидролизи и доводи до стварања цистеина (Cys) и α -кетобутирата. Ензим који каталише овај процес је цистатионин- γ -лиаза (CSE). Оба ова ензима захтевају присуство витамина B₆ (пиридоксина) као кључног кофактора (28). Цистеин се даље трансформише у бројне молекуле који садрже сумпор, као што су глутатион (GSH), таурин, сулфати и водоник сулфид (H₂S), док се α -кетобутират под дејством процеса декарбоксилације преводи у пропионил-СоА, који се даље конвертује у сукцинил-СоА, један од интермедијера у Кребсовом циклусу (29). Транссулфурациони пут је одговоран за катаболизам метионина и пренос атома сумпора са метионина на серин, водећи настанку цистеина. Цистеин, заједно са глицином и глутаматом, гради трипептид глутатион (GSH), снажан антиоксиданс који смањује реактивне кисеоничне врсте, штитећи на тај начин ћелију од оксидативног стреса. Друга изузетно важна улога ензима транссулфурационог пута (CBS, CSE) огледа се у стварању водоник-сулфида (H₂S) из катализе хомоцистеина и цистеина. Водоник-сулфид је трећи гасотрансмитер који настаје у различитим ћелијама и ткивима организма. Водоник-сулфид, сам или заједно са друга два важна гасотрансмитера, азот моноксидом (NO) и угљен моноксидом (CO), регулише бројне физиолошке процесе (30). Оштећење транссулфурационог пута је повезано са хомоцистинуријом, аутизмом, цирозом, имуном дисфункцијом и панкреатитисом (31, 32).

1.1.2.3. Метаболизам хомоцистеина у јетри

Иако се процес SAM-зависне трансметилације одвија у свим ткивима човековог организма, присуство ензима који учествују у целокупном процесу метаболизма метил-група и хомоцистеина је ткивно специфично. Наиме, комплетан скуп ензима који учествују у регулацији метаболизма хомоцистеина, присутан је само у јетри и бубрезима.

Управо из ових разлога, јетра има кључну улогу, не само у снабдевању других органа метил-групама, већ и у регулацији нивоа хомоцистеина у циркулацији. Највећи део SAM настаје у јетри, где се, заправо, метаболише преко 50% унетог метионина. У човековом организму постоји велики број метил-трансфераза, али су PEMT (фосфатидил етаноламин-N-метил-трансфераза), која је одговорна за синтезу

фосфатидилхолина и GAMT (гванидин ацетат-N-метил-трансфераза), која је одговорна за синтезу креатина, главни ензими одговорни за продукцију хомоцистеина, и то углавном у јетри. Чак 85% свих SAM-зависних трансметилационих реакција каталишу управо ове две метил-трансферазе (33, 34). Показано је да PEMT има главну улогу у преносу метил-група које потичу од SAM и да има важну улогу у стварању хомоцистеина (23, 35). Још један ензим који има важну улогу у SAM-трансметилационим реакцијама и самим тим, такође, учествује у стварању хомоцистеина је GNMT (глицин N-метил-трансфераза). GNMT је цитосолни протеин који је одговоран за метилацију глицина и стварање саркозина. Овај ензим, такође, има регулаторну улогу. У јетри, GNMT регулише однос SAM/SAH са циљем оптимизације трансметилационих реакција (29).



Слика 1.2. Метаболизам хомоцистеина и улога витамина В комплекса. SAM-S-аденозил метионин, SAH-аденозил хомоцистеин, MAT- метионин-аденозил-трансфераза, MT-метил-трансфераза, SAHase-S-аденозил хомоцистеинска хидролаза, CBS - цистатион-β-синтаза, CSE - цистатионин-γ-лиаза, MS- метионин-синтаза, SHMT-серин хидрокси метил трансфераза, MTHFR- метилен-тетрахидрофолат-редуктаза, BHMT-бетаин-хомоцистеин-S-метил трансфераза

1.1.2.4. Метаболизам хомоцистеина у централном нервном систему

Метаболизам хомоцистеина у мозгу се знатно разликује од његовог метаболизма у осталим ткивима. Процес реметилације хомоцистеина представља важан извор метил група у мозгу (36). Бројне трансметилационе реакције које се одигравају у мозгу, укључују синтезу и деградацију неуротрансмитера, мембранских фосфолипида, контролисану DNK метилацију, метилацију O-биогених амина и мијелинског базичног протеина, као и синтезу фосфатидилхолина (37). Међутим, реметилациони пут у мозгу је ограничен само на фолат/витамин B12-зависни пут. С обзиром да у možданом ткиву нема ензима ВНМТ, пут реметилације који користи бетаин као извор метил групе, није присутан у мозгу (38, 39). Када је реч о транссулфурационом путу у мозгу, може се рећи да је и овај пут ограничен, тачније некомплетан. Мозак поседује CBS, ензим који каталише реакцију спајања хомоцистеина и серина и води настанку цистатиона (40). Међутим, подаци који се односе на активност цистатионин- γ -лиазе (цистатионазе) нису конзистентни (40, 41, 42). Неколико студија је показало да овај ензим поседује различиту регионалну активност у мозгу (41, 42). Наиме, у астроглијалној култури је показано да може доћи до синтезе глутатиона из цистеина и цистатиона (43), али хомоцистеин и метионин не могу да прођу транссулфурациони пут и доведу до синтезе глутатиона (43). У начелу, тренутно доступни подаци указују да транссулфурациони пут, као катаболички пут у метаболизму хомоцистеина, није присутан у мозгу, као и да нема улогу у настанку цистеина, као ни у последичној синтези глутатиона у мозгу (36, 43, 44).

Управо ова ограниченост метаболичких путева одговорних за хомеостазу хомоцистеина, чини možдано ткиво знатно осетљивијим на промене нивоа хомоцистеина. Из ових разлога, централни нервни систем, услед пораста нивоа хомоцистеина, бива оштећен како цереброваскуларним променама, тако и поремећајима možданог паренхима.

Транспорт хомоцистеина у мозгу још увек није у потпуности разјашњен. Студије на анималним моделима су показале да Нсу, осим процесом прости дифузије, може бити транспортован путем специфичног сатурабилног рецептора (45, 46, 47). Хумане неуронске ћелије су способне за продукцију Нсу у нормалним физиолошким условима (48). Повећана продукција хомоцистеина је потврђена у неуронским ћелијама инкубираним у медијуму са дефицијенцијом фолата (48). Ови резултати указују да хомоцистеин може да се ствара унутар самог мозга, међутим, регионалне варијације

још увек нису довољно испитане. Додатно, показано је да хомоцистеин компромитује интегритет крвно-мождане баријере у моделу индуковане хиперхомоцистеинемije код мишева (49). Тренутно доступни подаци указују да се хомоцистеин из плазме у мождано ткиво, и обрнуто, убацује путем специфичних, би-дирекционих ћелијских транспортера (45).

Концентрације хомоцистеина у мозгу и цереброспиналној течности (ЦСТ) су повишене у неким неуролошким болестима (50-54). Пораст нивоа хомоцистеина у цереброспиналној течности корелира са порастом његовог нивоа у серуму. Међутим, показано је да су концентрације хомоцистеина 20-100 пута веће у серуму у односу на концентрације у цереброспиналној течности. Третман супстанцама које смањују ниво фолата (метотрексат), значајно смањује и SAM, и при томе повећава ниво Hcy у ЦСТ (55). Изразити пораст нивоа хомоцистеина у цереброспиналној течности уочен је код урођеног дефекта ензима CBS, који је праћен и изразитим порастом нивоа хомоцистеина у серуму (55). Лечење бетаином пацијената са хомоцистинуријом значајно је редуковало концентрације хомоцистеина у плазми и у ЦСТ (55). Овакви подаци наводе на закључак да хомоцистеин може проћи крвно-мождану баријеру у оба правца.

1.1.3. Хомоцистеинемija, хиперхомоцистеинемija, узроци и класификација

Хомоцистеин у плазми може бити присутан у неколико форми: слободни хомоцистеин, хомоцистеин везан за протеине (преко S- или N-атома), оксидовани хомоцистеин, Hcy тиолактон. У нормалним физиолошким условима мање од 1% укупног хомоцистеина (tHcy) је присутно у слободној редукованој форми у плазми. Око 10-20% укупног хомоцистеина је присутно у различитим оксидованим формама као што су Hcy-Cys или Hcy-димери. Већина укупног хомоцистеина у плазми (80-90%) везана је преко S- или N-атома за γ -глобулине или серумске албумине. Укупни хомоцистеин у плазми (tHcy) чине слободни хомоцистеин, Hcy везан за протеине, хомоцистин, као и Hcy везан за цистеин дисулфидним везама (56). Вредност укупног хомоцистеина (tHcy) у плазми се може користити као индикатор за процену ризика за настанак кардиоваскуларних поремећаја, као и за евалуацију прогресије можданог удара. Такође, укупни хомоцистеин може бити од користи и за скрининг урођених грешака у метаболизму метионина, и као допунски тест за процену дефицијенције витамина B₁₂ (57). Методе које се користе за одређивање нивоа хомоцистеина у

различитим биолошким узорцима могу се поделити на хроматографске методе, ензимске есеје и комбиноване есеје (ензимске реакције праћене имуноесејима). Концентрација укупног хомоцистеина се може, такође, одредити капиларном електрофорезом са одговарајућим системом за детекцију (58).

Нормални ниво хомоцистеина код људи креће се у опсегу 5-10 $\mu\text{mol/l}$. У нормалним физиолошким условима, плазма концентрације хомоцистеина не прелазе 15 $\mu\text{mol/l}$ (59). Повишен ниво хомоцистеина у плазми назива се хиперхомоцистеинемиа (hHcy). У зависности од нивоа укупног хомоцистеина у плазми, хиперхомоцистеинемиа се класификује као: блага (16-30 $\mu\text{mol/l}$), умерена (31-100 $\mu\text{mol/l}$) и тешка ($>100\mu\text{mol/l}$). Нарушавање равнотеже између трансметилационих и транссулфурационих процеса води порасту нивоа хомоцистеина. До пораста нивоа хомоцистеина доводе ендогени (урођени) фактори (полиморфизми гена одговорних за синтезу кључних ензима у метаболизму Hcy, као што су MTHFR, CBS, MS) и/или егзогени (стечени) фактори, попут смањеног уноса фолата, витамина B₆ и/или B₁₂, као и повећани унос протеина који садрже Met и Cys, хроничне болести, употреба одређених лекова, животне навике (60) (Слика 1.3.).

Најчешћа генетска абнормалност у метаболизму метионина је везана за ензим MTHFR. У хуманој популацији постоји преко 20 различитих генских полиморфизама овог ензима. Најчешћи полиморфизам који се среће код људи је супституција на нуклеотиду 677 (C677T), и то термолабилна форма, при чему се активност овог ензима смањује за 50% (61). У популацији западних земаља, 9-17% популације су хомозиготи за овај измењени ген, док су 30-41% хетерозиготи (61-64). Улога MTHFR C677T полиморфизма као фактора ризика за настанак кардиоваскуларних болести и исхемијског удара је потврђена у многобројним студијама. Поред овог полиморфизма, за још два проучавана полиморфизма, A1298C и G1793A, показано је да су повезани са туморогенезом код мушкараца (65). Када је реч о дефекту гена одговорног за синтезу CBS, хомозиготни дефекти су јако ретки и узрок су тешког метаболичког поремећаја који се назива хомоцистинурија. Овај тежак аутозомно-рецесивни поремећај је уједно и први откривени поремећај метаболизма хомоцистеина који је доведен у везу са неким патолошким стањем, тачније кардиоваскуларним обољењима (2). Хомозиготни дефекти CBS гена су праћени менталном ретардацијом, епилептичним нападима, тешким аномалијама крвних судова, као и изразито тешком хиперхомоцистеинемијом ($>500\ \mu\text{M}$). Хетерозиготне мутације се срећу код једне од 300 особа, и воде настанку

умерене хиперхомоцистеинемije (62). Дефицијенција MS ензима повезана је са ретким cb1E и cb1G фенотиповима, који резултирају хиперхомоцистеинемijом, хомоцистинуријом и смањеним целуларним метионином (66).

Стечени (егзогени) узроци hHcy обухватају: нутритивне дефицијенције кључних кофактора у метаболизму хомоцистеина (витамин B₆, B₁₂ и фолат), повећани унос протеина које садрже метионин и цистеин, хроничне болести (бубрежна слабост и хипотиреоидизам), старење, употребу лекова који утичу на метаболизам фолата, витамина B₆ и B₁₂, као и факторе везане за стил и начин живота као што су конзумирање цигарета и алкохола, физичка неактивност, лоша исхрана (60).

Дијететски нутритијенси утичу на снабдевање метил групама и регулишу биохемијске путеве метилационих процеса. Суплементација храном природно богатом фолатима, фолном киселином и N-5-метил THF, доводи до смањења концентрације хомоцистеина (67). Ефикасност N-5-метил THF поређена је са фолном киселином, при чему су студије показале различите резултате. *Fohr* и сарадници су показали да је суплементација фолном киселином ефикаснија у снижавању tHcy код жена него са N-5-метил THF (68), док су *Venn* и сарадници показали да су ниске дозе N-5-метил THF подједнако ефикасне у редукцији укупног хомоцистеина у плазми (69). Ниво хомоцистеина додатно расте са годинама, услед дефицијенције витамина B₁₂, што је са једне стране резултат његове смањене апсорпције из хране, а другим делом резултат пада бубрежне функције.

Слика 1.3. – Приказ узрока хиперхомоцистеинемија

Генетски фактори
МТНFR дефицијенција (хомозиготна термолабилна С677Т мутација) (10%)
МТНFR дефект (хомозиготна термостабилна мутација) (ретко)
CBS дефицијенција (хетерозиготи) (0,5-1,5%)
CBS дефект (хомоцистинурија-хомозиготи) (ретко)
Функционална дефицијенција метионин синтазе
Нутритивни фактори
Дефицијенција фолата
Дефицијенција витамина В ₁₂
Дефицијенција витамина В ₆
Повећан унос протеина богатих метионином
Системски поремећаји
Бубрежна болест
Малигне болести
Хипотироидизам
Псоријаза
Diabetes mellitus
Акутна фаза možданог удара или инфаркта миокарда
Физиолошки фактори
Старост
Мушки пол
Менопауза
Раса
Лекови
Антиконвулзиви (фенитоин, карбамазепин)
Орални контрацептиви
Метотрексат
Триметоприм
Сулфасалазин
Антилипидемици
Начин живота
Конзумирање цигарета
Конзумирање алкохола
Физичка неактивност
Дијета

1.1.4. Хиперхомоцистеинемија и поремећаји органских система

Прва открића која се односе на испитивање улоге хомоцистеина као фактора ризика за одређена патолошка стања, потврђена су код кардиоваскуларних и цереброваскуларних болести. Многобројним истраживањима је потврђено да чак и блажи пораст нивоа хомоцистеина представљају потпуно независан и изолован фактор ризика за настанак ових болести. Међутим, велики број студија на анималним моделима, као и клиничких и епидемиолошких студија, потврдио је да је дисбаланс у метаболизму хомоцистеина повезан са патогenezом болести различитих система органа.

1.1.4.1. Хиперхомоцистеинемија и кардиоваскуларне болести

Хомоцистеин је препознат као независан фактор ризика за КВБ (кардиоваскуларне болести) (4, 70). Процењено је да је пораст нивоа укупног хомоцистеина у плазми за 2,5 μ М повезан са 10% већим ризиком од настанка КВБ (71). Додатно, показано је да је пораст нивоа хомоцистеина изнад 20 μ М повезан са деветоструким порастом ризика од инфаркта миокарда, као и са последичним порастом ризика од možданог удара, у поређењу са концентрацијама испод 9 μ М (8). Дилема која је и даље присутна је да ли hНсу има директни, каузални утицај на васкуларне болести, или је, заправо, биомаркер који рефлектује друге метаболичке промене које испољавају нежељене ефекте на васкуларну функцију. Хиперхомоцистеинемија и учесталост инфаркта миокарда су у позитивној корелацији (72), због чега и не чуди назив додељен овој аминокиселини „холестерол 21. века”. Мета-анализа од преко 80 студија о утицају метаболизма фолата на КВБ потврдила је повезаност између hНсу и кардиоваскуларних поремећаја, укључујући оштећења крвних судова, атеросклерозу и тромбозу (73). Са друге стране, показано је да повишени нивои хомоцистеина нису повезани са укупним ризиком за настанак КВБ, као и да могу, али не морају бити повезани са морталитетом од КВБ (74). Требало би напоменути да студије које су испитивале утицај суплементације витаминима В групе на снижење концентрације хомоцистеина нису показале ефикасност која се очекивала (76). Међутим, из студија на анималним моделима је сасвим јасно да генетски или исхраном индукована хиперхомоцистеинемија доводи до васкуларних оштећења (76-79). Хетерозиготни мишеви са дефицитом CBS, MS и MTHFR имају повишене нивое хомоцистеина,

васкуларну дисфункцију, као и неуролошке поремећаје. Претходно наведени налази су потврђени и у клиничким студијама, код особа са хетерозиготним МТНFR С677Т полиморфизмом, код којих је присутна смањена активност овог ензима, хиперхомоцистеинемија, као и повећани ризик од васкуларних болести (80, 81). Новија истраживања су показала да се однос SAM/SAH може користити као биомаркер и може представљати сензитивни индикатор у клиничкој дијагнози атерсклерозе (82). Клиничка студија на хипертензивним пацијентима је показала да су хомоцистеин, дебљина тунике интима и медије код каротидних артерија, као и ниво С-реактивног протеина значајно повишени, док су укупни антиоксидативни статус и ендотелијалне прогениторске ћелије значајно смањени (83).

1.1.4.2. Хиперхомоцистеинемија и гастроинтестиналне болести

Хиперхомоцистеинемија доприноси инфламаторним променама у гастроинтестиналном тракту, резултујући повишеним нивоима матриксне металопроотеиназе-9, реактивних кисеоничних врста и супероксида (84). Додатно, хиперхомоцистеинемија проузрокована С677Т МТНFR полиморфизмом је повезана са тромбозом мезентеричних вена и цревном инфаркцијом (85). Повишени нивои хомоцистеина су уочени у различитим гастроинтестиналним поремећајима, укључујући констипацију, инфламаторну болест црева, Кронову болест, као и колоректални карцином (86-89). Показано је да се код *Cbs^{+/-}* мишева брзо развија констипација, као и повишен ниво супероксид врста, што указује да хиперхомоцистеинемија може узроковати гастроинтестинални дистрес (86). Одређени лекови, који утичу на метаболизам метил група, испољавају нежељене ефекте у виду желудачних болова и лошег варења. То је показано код примене изотретиноина, деривата ретиноида, који се користи у терапији акни, који испољава нежељена дејства у виду тешких цревних тегоба, вероватно услед значајног пораста концентрације хомоцистеина, који се среће код ових пацијената (90, 91). Међутим, повишене концентрације хомоцистеина код пацијената са запаљенским болестима црева, могу бити последица саме болести, с обзиром да је гастроинтестинални тракт одговоран за метаболизам сумпорастих аминокиселина (88)

1.1.4.3. Хиперхомоцистеинемија и аутоимуне болести

Бројне аутоимуне болести карактерише аберантни метаболизам метил група и дисбаланс хомоцистеина. Код људи, оба типа дијабетеса, тип 1 и тип 2, праћена су хипохомоцистеинемијом, која уз прогресију бубрежне инсуфицијенције, прелази у хиперхомоцистеинемију (92, 93, 94). У студијама на анималним моделима хемијски индукованог типа 1 дијабетеса и генетски индукованог типа 2 дијабетеса, почетна фаза хипохомоцистеинемије је резултат повећане реметилације и катаболизма хомоцистеина индукцијом ВНМТ и CBS (95-100). Ово не чуди, с обзиром да је показано да повећана експресија хепатичне и реналне CBS код трансгених мишева доводи до значајног снижења концентрације циркулишућег хомоцистеина (101). Ове алтерације хомоцистеина у типу 1 дијабетеса су специфичне за ову патологију, с обзиром да примена инсулина умањује све метаболичке аномалије (100, 102, 103). Дијабетес, такође, карактерише индукција специфичних метилтрансфераза, пре свега GNMT и PEMT, што резултира у појачаном стварању хомоцистеина (97, 98, 102). Међутим, истовремена индукција ензима ВНМТ и CBS, доводи до реметилације и транссулфурације, са циљем спречавања нагомилавања хомоцистеина у ћелијама, и последично у циркулацији. Појачана транссулфурација је утврђена код људи са нефропатијом код дијабетеса типа 2 (104).

1.1.4.4. Хиперхомоцистеинемија и хронична бубрежна болест

Пацијенти са хроничном бубрежном болешћу (ХББ) имају значајно већи ризик од настанка КВБ. На основу мета-анализе коју су спровели *Matsushita* и сарадници, утврђено је да кардиоваскуларни ризик расте када брзина гломеруларне филтрације падне испод 75 ml/min (105). Половина ових пацијената умире од КВБ пре него што дође у терминални стадијум бубрежне болести. Тако да се ХББ може сматрати еквивалентном коронарној срчаној болести (106). Особе које болују од тешког урођеног метаболичког поремећаја који је проузрокован мутацијом гена за CBS, развијају hHcy тешког степена (>500 μ mol/l), која је праћена хомоцистинуријом (107). Ова hHcy представља фактор ризика за кардиоваскуларне болести. Код многих пацијената који су на дијализи врши се суплементација фолатима у циљу њихове надокнаде. Међутим, показано је да суплементација фолатима не смањује интрацелуларну концентрацију хомоцистеина, већ да виши нивои фолата могу чак и

пореметити физиолошку регулацију интрацелуларног „one-carbon” метаболизма (108). Један од разлога којим се објашњава неефективност третмана фолатима код пацијената оболелих од ХББ може бити нисходна регулација експресије рецептора за фолат (13).

1.1.4.5. Хиперхомоцистеинемија и болести костију

Хомоцистеин може пореметити нормалну активност остеокласта. *In vitro*, култивација ћелија костне сржи у медијуму обогашеном хомоцистеином је показала да hNcy доводи до усходне регулације у формирању остеокласта и да, са друге стране, супримира апоптозу у овим ћелијама, услед повећане продукције реактивних кисеоничних врста. Код пацијената са hNcy, повећана активност остеокласта води повећаној ресорпцији костију, што за последицу има повећање ризика од настанка фрактура и смањења густине костију (109). Поред овога, повишени нивои хомоцистеина активирају каспаза-зависну апоптозу у стромалним ћелијама хумане костне сржи, реметећи на тај начин обновљање костију (110). Потврђено је да hNcy код пацова доводи до акумулације хомоцистеина углавном у екстрацелуларном матриксу колагена (65%). Нагомилавање хомоцистеина повезано је са фенотипом такозваних „сунђерастих” костију и одговара степену смањења снаге костију (111).

1.1.4.6. Хиперхомоцистеинемија и малигне болести

За малигне ћелије је карактеристична велика брзина раста због чега се захтеви за метионином повећавају, услед повећаних процеса синтезе протеина и трансметилације. Нормалне ћелије могу да подмире своје потребе за метионином из процеса трансметилације. Малигне ћелије у органима као што су плућа, бубрези, дојка, колон и мокраћна бешика су метионин-зависне, зато што не могу да конвертују хомоцистеин у метионин, што води акумулацији хомоцистеина. У студијама је показано да пацијенти који болују од акутне лимфобластне леукемије, колоректалних, оваријалних и панкреасних карцинома, као и сквамозелуларних карцинома имају повишене нивое укупног хомоцистеина (112, 113, 114). Смањење нивоа интрацелуларног SAM може да измени метилацију цитозина у CpG острвима DNK, што резултира у репресији тумор супресор гена, активацији протоонкогенезе, као и као

и индукцији малигне трансформације (115). Повишени нивои SAH доводе до пораста нивоа Hcy, све док се Hcy не конвертује у Cys транссулфурационим путем. У неким студијама је показано да, код пацијената који болују од карцинома, постоје повишени нивои хомоцистеина, док је цистеин присутан у нормалним концентрацијама (113, 114). *Naushad* и сарадници су анализирали епигенетске промене које утичу на прогресију карцинома, при чему су показали да hHcy и генске варијансе у „one carbon” метаболизму имају врло снажан утицај на два круцијална гена, RASSF1 и BRCA1, директно утичући на прогресију карцинома дојке, објашњавајући феномен „метионин-зависног фенотипа” у карциному дојке (116).

1.1.4.7. Хиперхомоцистеинемија и конгенитални поремећаји

Ефекти хиперхомоцистеинемије на развој хуманог фетуса још увек нису потпуно утврђени. Претпоставља се да поремећај метилационих процеса у току ембриогенезе, када се врши репрограмирање метилације DNK, може имати кључну улогу у етиологији малформација код новорођенчади. Показано је да hHcy присутна код мајке, мутација појединих гена одговорних за синтезу ензима у метилационом циклусу, као и ниски нивои метионина, такође, могу бити повезани са повећаном инциденцом конгениталних поремећаја. Ови дефекти укључују *Down*-ов синдром, урођене срчане мане и дефекте неуралне тубе (18).

1.1.4.8. Хиперхомоцистеинемија и неуролошке болести

Област која је придобила велику пажњу научне јавности последњих година је испитивање везе између хомоцистеина и различитих неуролошких болести, пре свега неуродегенеративних. Када је реч о неуродегенеративним поремећајима, показано је да 10% до 30% пацијената са Паркинсоновом болешћу има hHcy (117). Наиме, метаболизам L-DOPA-е, која се користи у терапији ових болести, захтева SAM, значајно смањујући снабдевање метил групама и при томе доводи до пораста нивоа хомоцистеина (118). Повишени нивои хомоцистеина повезани су са деменцијом, депресијом, као и дискинезијом код ових пацијената. Међутим, одређивање концентрације хомоцистеина није довољно за прогнозу тока ових болести (119). Као што је већ напоменуто, hHcy умањује минералну густину костију, која се често среће код оболелих од Паркинсонове болести (120). Хомоцистеин, такође, компликује

прогресију Алцхајмерове болести. У студији која је обухватила преко 1200 жена, показано је да су високе концентрације хомоцистеина у плазми независни фактор ризика за каснији развој деменције и Алцхајмерове болести (121). Код пацијената који већ болују од Алцхајмерове болести, показано је да постоји позитивна корелација између брзине смањења когнитивних функција и концентрације хомоцистеина (122). Пацијенти са умереним степеном Алцхајмерове болести и повишеним нивоима хомоцистеина, имају врло често и тежак депресивни поремећај (123). Показано је да дисфункција ензима укључених у фолат-метионин пут, углавном МТНFR полиморфизми, и то С677Т и А1298С, могу имати веома важну улогу у настанку аутизма (124, 125). Мета анализа коју су спровели *Rai* и сарадници, истакла је улогу С677Т полиморфизма МТНFR у настанку аутизма (126).

1.1.4.9. Хиперхомоцистеинемија и психијатријске болести

Посебно интересовање у науци последњих година влада за разјашњавањем везе између хиперхомоцистеинемije и различитих психијатријских поремећаја. Анксиозност и депресија представљају изузетно честе поремећаје у хуманој популацији, са великим утицајем на јавно здравље (127, 128). Иако је могућа улога нутритивних фактора у патогенези психијатријских поремећаја већ дуже време предмет истраживања (129, 130), испитивање улоге хомоцистеина у настанку ових поремећаја је новијег датума. С обзиром на важну улогу појединих витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) у одржавању хомеостазе хомоцистеина, као и улогу метилационих процеса неопходних за нормално функционисање нервног система, бројне клиничке студије су спроведене са циљем детаљнијег испитивања улоге ових фактора у настанку депресије и анксиозности. У овим студијама је потврђено да је смањен ниво фолата присутан код особа оболелих од депресије (131-136), да је повезан са тежим (137-139) и дужим депресивним епизодама (140), слабијим одговором на терапију антидепресивима (139-143) као и да до побољшања одговора на терапију долази након суплементације фолном киселином (144-147). Када је реч о утицају витамина В₁₂ на депресију, у студији спроведеној на женама без мерљивих знакова деменције старијим од 65 година, показано је да је метаболички значајна дефицијенција витамина В₁₂ присутна код 17% благо депресивних жена и код 27% тешко депресивних жена (148). Ова студија није потврдила везу између сниженог нивоа фолата и хиперхомоцистеинемije на депресију. У студији пресека спроведеној

на средовечним мушкарцима (46-64 године) показано је да је tHcy повезана са већим ризиком од настанка депресије (149). У Ротердамској студији која је обухватила 112 особа оболелих од депресије, смањен ниво витамина B₁₂, као и hHcy су били повезани са повећаним ризиком од настанка депресије (150). Ови подаци су у супротности са резултатима студије која није утврдила везу између tHcy и депресије у великој америчкој кохортној студији непосредно пре примене фолата (151). Међутим, особе које имају дијагнозу великог депресивног поремећаја имају значајно нижи ниво фолата у односу на особе које не болују од депресије (151). У студији која је обухватила пацијенте са тешком депресијом, више од половине пацијената је имало повишен ниво хомоцистеина (152).

Најважнији метаболички поремећај који се среће у афективним поремећајима јесте измењени метаболизам моноамина (серотонина, допамина, адреналина). С обзиром на улогу коју фолати имају у одржавању метилационог статуса, поремећаји у процесима метилације се могу налазити у основи поремећаја расположења (153). Метаболизам фолата, SAM и моноамина повезан је преко биоптеринског пута (133). Пацијенти који имају значајно повишен ниво укупног хомоцистеина, имају снижен ниво фолата, SAM и моноаминских метаболита у церебро-спиналној течности. С обзиром на улогу коју пиридоксал 5-фосфат има у триптофан-серотонин путу, дефицијенција витамина B₆ може, такође, бити повезана са депресијом (154).

За SAM је у истраживањима већ потврђено да има антидепресивне ефекте (155). SAM се показао подједнако ефикасним као и трициклични антидепресиви, посебно у лечењу ендогених депресија (156). Поред тога, показано је да SAM доводи до побољшања расположења брже него и сами антидепресиви. Фолна киселина и SAM се врло често користе као комплементарни третмани у лечењу депресија (155, 157, 158). Дефицијенција фолата, такође, може бити последица лоше исхране код пацијената са поремећајима расположења. Без обзира да ли је дефицијенција фолата у депресији примарног или секундарног типа, примена фолата значајно побољшава опоравак менталног стања (147). На основу тренутних података, оралне дозе фолне киселине (0.8-2.0 mg дневно) и витамина B₁₂ (1 mg дневно) се препоручују у терапији депресија (159, 160).

1.1.5. Хиперхомоцистеинемија као етиолошки фактор поремећаја у централном нервном систему

1.1.5.1. Морфолошке и функционалне промене у мозгу повезане са хиперхомоцистеинемијом

Повишен ниво концентрације тНсу повећава ризик од микро- и макроваскуларних болести и на тај начин изазива смањење когнитивних функција. hНсу и други повезани метаболички поремећаји доводе до структурних промена у мозгу. „Тихи” мождани инфаркти и лезије беле масе се врло често уочавају на NMR записима старијих особа и повезани су са повећаним ризиком од можданог удара и деменције. Неколико студија пресека је документовало позитивну везу између тНсу и хиперинтензитета беле масе и атрофије мозга (161). Позитивна веза између тНсу и микроангиопатија видљивих на магнетним снимцима је потврђена у већини студија (161, 162). Такође, позитивна веза између тНсу и хиперинтензитета беле масе уочена је код особа оболелих од Алцхајмерове болести (163) и код особа са болешћу малих крвних судова мозга (164). Ова веза се може приписати ендотелној дисфункцији проузрокованој hНсу, ексцитотоксичним и апоптотским механизмима, као и утицају hНсу на интегритет мијелина. Веза између тНсу и атрофије мозга је уочена у Ротердамској студији која је обухватила 1077 старијих особа без мерљивих знакова деменције (165). У другој студији, која је обухватила млађе субјекте (60-64 године), ова веза није потврђена (166). Ово се може повезати са чињеницом да други фактори повезани са старењем, попут оксидативног стреса, додатно утичу на оштећења мозга услед hНсу.

Патолошке ефекте на мождано ткиво hНсу остварује оштећењем крвно-мождане баријере (49). Ово је у складу са резултатима студије која је потврдила побољшање пермеабилности крвно-мождане баријере након примене витамина В₆, В₉ и В₁₂ (167). Третман витаминима В групе (В₆ и В₉) доводи до снижења тНсу и побољшања показатеља цереброваскуларних и церебралних оштећења (168), сугеришући да терапијске интервенције витаминима В комплекса показују протективно дејство које се манифестује побољшањем цереброваскуларних функција.

1.1.5.2. Механизми неуротоксичности изазване хомоцистеином

Један од првих предложених механизма којим се покушао објаснити механизам неуротоксичности изазване хомоцистеином је оксидативни стрес. Оksидативни стрес под утицајем хомоцистеина настаје као последица присуства слободних тиол (-SH) група којима се Нсу, преко дисулфидних мостова, везује за плазма протеине (углавном албумине), за друге нискомолекуларне плазма тиоле, или пак, за друге молекуле хомоцистеина (169). Повећана продукција ROS проузрокована хиперхомоцистеинемijом доводи до последичне оксидације липида, протеина и нуклеинских киселина (170) и може водити ендотелној дисфункцији и оштећењу зидова крвног суда, које су праћене активацијом тромбоцита и формирањем тромба (9). Акумулација оксидисаних биомолекула мења биолошку функцију многих ћелијских путева. Хомоцистеин се понаша као снажно оксидационо средство -SH (тиол) група при чему долази до стварања ROS, попут супероксид анјон радикала и водоник пероксида. Механизми којима хомоцистеин изазива оксидативни стрес су: (а) инхибиција активности ћелијских ензима антиоксидативне заштите, (б) аутооксидација хомоцистеина, (в) NOS-зависно стварање супероксид анјона одвајањем ендотелијалне NOS (eNOS), (г) одвајање екстрацелуларне супероксид дисмутазе са површине ендотела и (д) активација NADPH оксидаза. ROS и оксидативни стрес доводе до формирања нитротирозина, индикатора NO и супероксид радикал реакције, резултујући формирањем изузетно снажног оксиданса пероксинитрита. Пероксинитрит води нитрацији тирозина који доводи до измена у функцији протеина и изазива ћелијску дисфункцију (171).

Хомоцистеин је изразито токсичан за неуронске ћелије *in vitro* (172, 173, 174). Студије на анималним моделима су показале да CBS *knock out* мишеви (Cbs^{-/-} или Cbs^{-/+}) имају тешка неуролошка оштећења и да развијају изузетно тешку хиперхомоцистеинемiju, чак 2-50 пута већу у односу на *wild type* мишеве (37, 49, 175). Ове животиње показују измене у смислу смањења пластичности неурона, тешке менталне ретардације и скраћења животног века (176). Код животиња са повећаним концентрацијама хомоцистеина долази до његовог нагомилавања у мозгу (177), при чему се уочавају превремено ограничење раста, као и неуралне и когнитивне дисфункције (177, 178) праћене поремећајем енергетског метаболизма у мозгу (179).

Хомоцистеин је ендогени агониста глутаматних рецептора који се везује за NMDA и non-NMDA подтипове рецептора, активирајући групу I метаботропних глутаматних рецептора (180, 181). Присуство хомоцистеина, као ексцитаторне аминокиселине, у супрафизиолошким концентрацијама, повећава глутаматергичку неуротрансмисију која доводи до неуротоксичности и ексцитотоксичности (182). Хомоцистеин индукује активацију јонотропних (182) и групе I и III метаботропних глутаматских рецептора (180, 181). Поред тога, метаболички производ хомоцистеина - хомоцистеинска киселина, је изузетно снажан неуротоксин који делује као агониста глутаматских рецептора (184). Делујући као снажан агониста NMDA рецептора, Нсу доводи до инфлуksа јона калцијума и ексцитотоксичности. Хомоцистеин не само да директно индукује неуротоксичност, већ може и да потенцира глутаматом изазвану неуротоксичност. Наиме, иницијални инфлуks калцијума кроз NMDA рецепторе, стимулише ослобађање глутамата који активира метаботропне глутаматске рецепторе и доводи до секундарног инфлуksа јона калцијума и последичне ексцитотоксичности (185). Осим тога, активација ових рецептора хомоцистеином доводи до активације протеин киназе и повећане продукције инозитол трифосфата, што повећава осетљивост ендоплазматског ретикулума на интрацелуларни Ca^{2+} (186). Треба истаћи да токсични ефекти хомоцистеина захватају и микроглију (187).

1.2. Оксидативни стрес

Стварање енергије у ћелији (у облику АТФ-а) процесом митохондријалне оксидативне фосфорилације је неопходно за нормално функционисање ћелија. Кисеоник, који је неопходан за одвијање ових процеса код аеробних организама, поседује високи редокс потенцијал, при чему служи као акцептор електрона у процесима стварања енергије, и то кроз низ оксидо-редукционих реакција. Уколико не дође до потпуне редукције кисеоника, долази до стварања нуспродуката који се називају слободни радикали (188). Слободни радикали су високо реактивни атоми или групе атома са неспареним електронима, и уколико нису адекватно неутралисани, могу довести до општећења ћелије. Процес редукције кисеоника у воду доводи до стварања реактивних кисеоничних врста (ROS), од којих су код човека најчешће заступљени водоник пероксид (H_2O_2), супероксид радикал (O_2^-) и хидроксил радикал (OH^\cdot). Супероксид радикал настаје приликом ауто-оксидације хемоглобина и није изразито реактиван, али се може катализом конвертовати под дејством супероксид дисмутазе

(SOD) у H_2O_2 , који се даље разграђује и води настанку високо реактивног хидроксил радикала у присуству гвожђа (189). Поред ових кисеоничних врста, такође, долази до стварања реактивних азотних врста (енгл. RNS-reactive nitrogen species), које укључују азот моноксид (NO), азот диоксид (NO_2), азот триоксид (N_2O_3) и пероксинитрит. Азот моноксид је слободни радикал који настаје као продукт реакција под дејством NO синтазе. Пероксинитрит настаје као продукт реакције азот монооксида са супероксидом. Азот моноксид је релативно нереактиван, са изузетком реакција са пептидима и протеинима, који садрже сулфхидрилну групу (такозване реакције нитрозилације) (190). Са друге стране, пероксинитрит је знатно реактивнија азотна врста, која нитрује протеине на одређеним тирозинским резидуама, реметећи на тај наћин структуру и функцију ових протеина (191).

Уопштено, сваки абнормални пораст нивоа супстанци које изазивају оксидативна оштећења ћелије (такозваних про-оксиданаса), бива умањен антиоксидативним одговором. Наиме, током еволуције, у ћелији су се развили механизми антиоксидативне заштите који имају улогу у одбрани ћелије од потенцијалних штетних ефеката ROS и RNS. Ови механизми укључују ензимске анти-оксидансе (супероксид дисмутазу, каталазу, глутатион пероксидазу и тиоредоксине) и неензимске антиоксидансе (глутатион, витамин Е, витамин С, билирубин, коензим Q10). Глутатион је главни непротеински антиоксиданс у ћелији и однос између његове редуковане и оксидоване форме (GSH/GSSG) је показатељ ћелијског редокс статуса (192).

У нормалним физиолошким условима, када је редокс статус ћелије уравнотежен, ROS имају улогу у нормалном функционисању ћелије штитећи је од инфекција (193, 194), имају улогу секундарних гласника и учествују у регулацији функције срчаних и васкуларних ћелија (194, 195). ROS су укључене у интрацелуларну регулацију концентрације калцијума, протеинску фосфорилацију и/или дефосфорилацију. Повећано стварање ROS може имати штетне ефекте (196) и може пореметити одржавање нормалног статуса аденинских и пиридинских нуклеотида, који утичу на активност DNK, изазивају мутацију и модификују генску експресију (197). Протеинска оксидација под утицајем ROS може водити губитку сулфхидрилних група и модификацији аминокиселина које чине протеине нефункционалним (198) и доводе до оксидативних оштећења липида дејством на мембрану ћелије (199). Јасно се може закључити да су ROS и RNS, присутне у ниским концентрацијама, укључене у нормални одговор на инфекцију или повреду (196), док у високим концентрацијама

модификују ћелијске макромолекуле (протеине, ДНК, липиде) и доводе до промена у функционисању ћелије, резултујући апоптозом или некрозом (200, 201).

Уопштено, сваки абнормални пораст нивоа супстанци које изазивају оксидативна оштећења ћелије (такозваних про-оксиданаса), бива умањен антиоксидативним одговором. Наиме, током еволуције, у ћелији су се развили механизми антиоксидативне заштите који имају улогу у одбрани ћелије од потенцијалних штетних ефеката ROS и RNS. Ови механизми укључују ензимске анти-оксидансе, попут супероксид дисмутазе - SOD, каталазе - CAT, глутатион пероксидазе - GPx, глутатион редуктазе - GSR и тиоредоксине. Супероксид дисмутаза се сматра првом линијом одбране против ROS и катализује дисмутацију супероксид анјон радикала до водоник пероксида (202). Водоник пероксид даље бива редукован до воде и елементарног кисеоника под дејством каталазе или глутатион пероксидазе (203). Поред детоксификације водоник пероксида, глутатион пероксидаза редукује липидне и нелипидне хидропероксиде на рачун редукованог глутатиона (GSH), који бива оксидован, при чему се формира глутатион дисулфид (GSSH). Глутатион спада у такозване неензимске антиоксидансе, заједно са витамином Е, витамином С, билирубином, коензимом Q10. Глутатион је главни непротеински антиоксиданс у ћелији и однос између његове редуковане и оксидоване форме (GSH/GSSG) је показатељ ћелијског редокс статуса (192). Може се поново створити под дејством глутатион редуктазе уз помоћ никотинамид аденозин динуклеотид фосфата (NADPH) (192).

Оксидативни стрес наступа када повећана продукција слободних радикала надвлада ћелијске антиоксидативне механизме заштите. С обзиром да су слободни радикали високо реактивни и нестабилни молекули и да поседују различити оксидативни потенцијал, оштећења могу варирати од структурних до апоптозе и ћелијске некрозе, у зависности од степена и тежине оксидативног стреса. Под утицајем слободних радикала могу наступити оштећења ћелијских протеина, липида, угљених хидрата и нуклеинских киселина (188).

1.2.1. Оксидативни стрес у централном нервном систему

Мождано ткиво представља орган који је изразито осетљив на оксидативна оштећења и поседује знатно слабију антиоксидативну заштиту у поређењу са другим

органима људског организма. За нормално функционисање можданог ткива неопходне су велике количине кисеоника. Људски мозак користи чак 20% од укупног кисеоника који је организму неопходан, иако чини тек 2% укупне телесне масе. Управо је метаболизам кисеоника, који је изузетно битан за нормално функционисање можданог ткива, главни извор слободних радикала (189). Поред тога, један од главних извора слободних радикала у мозгу су управо катехоламини, неуротрансмитери који се ослобађају у анксиозним и депресивним поремећајима (204). Мождано ткиво има доминантно липидни састав, при чему ови липиди представљају идеалан супстрат за пероксидацију, која резултира поремећајем мембранске проводљивости, оштећењем мембранских протеина које води инактивацији рецептора, ензима и јонских канала (194). Мозак обилује јонима редокс активних метала (гвожђе и бакар), који имају важну улогу у редокс реакцијама (194). Неурони представљају пост-митотске ћелије са релативно ограниченом способношћу обнављања у току живота организма. Као последица свих промена насталих услед оксидативног дисбаланса, може доћи до поремећаја неуротрансмисије, неуронске функције и целокупне мождане активности, што, у крајњем, може резултовати неуронском смрћу (205). Оксидативне модификације макромолекула заправо представљају иницијални догађај који узрокује неуронска оштећења. Неурони у мозгу различито реагују на оксидативни стрес. Док већина неурона у мозгу добро толерише оксидативни стрес, неурони одређених делова мозга, попут неурона у хипокампусу, су посебно осетљиви на оксидативни стрес (206). Сам термин „оксидативни стрес” је последица дугогодишњег става у науци да су реактивне врсте искључиво штетне. Међутим, овај став је прилично измењен након истраживања у којима је потврђено да у нормалним физиолошким условима и када су присутни у нормалним концентрацијама, слободни радикали имају важну улогу у функционисању ћелије. Најновији подаци упућују на закључак да су ове супстанце есенцијалне компоненте сигналних механизма од којих зависи одговор неурона на факторе који се формирају током развоја (ендогени фактори), као и на дејство фактора из окружења (егзогени фактори) (207). У ЦНС-у, ROS и RNS представљају секундарне гласнике у многим физиолошким процесима. Неурони могу детектовати, преносити и претварати ROS/RNS сигнале у одговарајуће интрацелуларне одговоре, укључујући синаптички пластицитет (208). Процеси сигналне трансдукције захтевају мрежу редокс-сензитивних метаболичких и сигналних путева. Ови путеви и процеси редокс-осетљиве сигналне трансдукције садрже редокс сензитивне протеине који подлежу

реверзибилној оксидацији и редукцији, при чему се на овај начин модулише њихова функција на основу хелијског редокс статуса (209).

Двојност ROS/RNS као сигналних и стрес молекула је потврђена у ефектима ових реактивних врста на синаптички пластицитет. У високим концентрацијама, ROS и RNS, попут водоник пероксида и хидроксил радикала, умањују дуготрајну потенцијацију (енг. *LTP - long-term potentiation*) и синаптичку неуротрансмисију (210). Ово може бити делом и последица инхибиције N-метил-D-аспартатних рецептора (NMDA) под дејством ROS/RNS, кроз појачану оксидацију екстрацелуларних редокс-сензитивних места на овим рецепторима (211). Са друге стране, при нижим (физиолошким) концентрацијама, ROS (попут супероксида и водоник пероксида) показују корисне ефекте кроз појачавање дуготрајне потенцијације и синаптичке неуротрансмисије (212).

1.3. Анксиозни поремећаји

1.3.1. Дефиниција и класификација анксиозних поремећаја

Анксиозност се описује као непријатан осећај страха, нелагодности, стрепње и бриге, који је праћен симптомима аутономног система као што су: убрзани рад срца, убрзано дисање, подрхтавање, главобоља, стезање у грудима, презнојавање, мучнине, нелагодност у стомаку, немир који онемогућава дуже стајање или седење на истом месту (213). Нормално, уобичајени степен анксиозности, који се јавља у новим, непознатим или стресним ситуацијама, се сматра за механизам адаптације и има за циљ да припреми организам на предстојећу опасност. Међутим, уколико анксиозност постане перзистентна, интензивна и ирационална (када није ситуационо условљена, као што је то случај код регуларног степена анксиозности) и почне да ремети нормално, свакодневно функционисање особе, постаје патолошка категорија која се може манифестовати у виду различитих анксиозних поремећаја. Анксиозни поремећаји спадају у најчешће менталне поремећаје у општој популацији, при чему је преваленца анксиозних поремећаја код жена два пута већа него код мушкараца (214). Показано је да је чак једна трећина хумане популације у свом животу доживела неки вид анксиозног поремећаја (215). Иако изузетно заступљени, ови поремећаји остају врло често препознати и, самим тим, нелечени. Постоји неколико врста анксиозних

поремећаја у које спадају: панични поремећај (PD - panic disorder) са или без агорафобије, посттрауматски стрес поремећај (PTSD - post-traumatic stress disorder), опсесивно-компулзивни поремећај (OCD - obsessive compulsive disorder) и генерализовани анксиозни поремећај (GAD - generalised anxiety disorder) (215). У највећем броју случајева (80-90%) анксиозни поремећаји се јављају пре 35. године старости. Међутим, постоје значајне разлике у односу на почетак јављања појединих анксиозних поремећаја. Социјална фобија се најчешће јавља у детињству или раној адолесценцији (пре 20. године). Генерализовани анксиозни поремећај и панични поремећај се јављају у току касне адолесценције и одраслом добу, док се опсесивно-компулзивни поремећај јавља најчешће између 15. и 39. године живота. Период јављања посттрауматског стрес поремећаја везан је за период када се појавила траума (216).

Различити стресни догађаји (трауме из детињства, смрт блиске особе, хронични стрес) сматрају се главним фактором ризика за настанак анксиозних поремећаја. Показано је да узајамно дејство генетских и развојних фактора, као и фактора средине, у великој мери доприноси патогенези анксиозних поремећаја. Када је реч о неурохемијској основи анксиозности, може се рећи да је анксиозност условљена интеракцијом бројних неуротрансмитера и неуропептида. Поред већ добро познате моноаминске хипотезе, којом је објашњена улога дисфункције серотонергичког, допаминергичког и норадренергичког система у генези анксиозних и депресивних поремећаја (217), показано је да у модулацији анксиозности, такође, учествују и холинергички (218), GABA-ергички (219), глутаматергички систем (220). Поред тога, мождани неуропептиди, попут CRF-а (енгл. *Corticotropin releasing factor*) (221), BDNF (енгл. *Brain derived neurotrophic factor*) (222), PACAP (енгл. *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) (223) имају важну улогу у модулацији анксиозности. С обзиром на дупло већу учесталост код особа женског пола, улога естрогена у настанку анксиозних поремећаја је, такође, потврђена у бројним истраживањима (224). Један од новијих механизма којим се, барем делимично, покушава објаснити патогенеза ових поремећаја је и оксидативни стрес (204). Узимајући у обзир посебну склоност можданог ткива ка оксидативним оштећењима, не чуди чињеница да је оксидативни стрес, као потенцијални патогенетски механизам, доведен у везу са настанком различитих психијатријских поремећаја, укључујући и анксиозност.

1.3.2. Анимални експериментални модели за индукцију анксиозности

С обзиром да је потврђено да су различите стресне ситуације, којима је човек изложен у току свог живота, главни фактор ризика за настанак анксиозних поремећаја, анимални експериментални модели су управо базирани на примени различитих стресора у циљу изазивања анксиозности код животиња. Главна карактеристика ових модела је да се животиња различитим манипулацијама излаже одређеном стресору или, пак, већем броју различитих стресора, у краћем или дужем временском интервалу, са циљем изазивања одређених промена физиолошких и бихевиоралних параметара које, заправо, рефлектују повећану анксиозност код животиње. Стресови којима се животиња излаже у строго контролисаним, експерименталним условима, имају за циљ oponашање различитих врста стресова којима је човек изложен у реалном животу, а који се сматрају одговорним за генезу анксиозних поремећаја.

Модели за изазивање стреса подразумевају примену различитих психолошких и физичких стресора. Врло често коришћени модели су такозвани „развојни модели” у којима се животиња у пренаталном или раном постнаталном периоду излаже различитим факторима применом којих се формирају непријатна искуства, што може довести до развоја анксиозности (225). Пренатални стрес подразумева излагање мајке у последњој недељи гестације, два до три пута дневно, неком стресу (foot-shock стрес, принудна имобилизација), што доводи до повећане анксиозности код потомака (226). Постнатални стрес се индукује прераним одвајањем потомака од мајке (модел неонаталне изолације), другог дана по рођењу, пребацивањем у други кавез који се налази у одвојеној просторији, и то у трајању од неколико минута до једног сата. Након тога, потомци се враћају код мајке. Ова процедура сепарације се понавља у трајању од неколико дана до неколико недеља (227). Овај модел се користи за изазивање анксиозности која је повезана са стресним искуствима из раног периода живота. Промене у циркадијалном ритму испољавају велики утицај на психолошку и физиолошку хомеостазу појединца (228). Неочекиване промене циклуса дан/ноћ доводе код глодара до интензивног стрес-одговора (229). Ова процедура се изводи тако што се кавез у којој бораве животиње осветљава у току ноћног периода (19:00 – 7:00), док се кавези остављају без светла у току дана (7:00 – 19:00). Овај метод се користи за изазивање краткотрајних стрес-одговора, међутим, понављано излагање може водити адаптацији. Свакодневна изложеност људи буци у савременом животу, довела је до стварања модела којима се анксиозност код животиње изазива управо излагањем

непријатним звучним сензацијама (230). Овим протоколима животиња се излаже буци, акутно или хронично, четири сата дневно, у трајању од 15 дана. Велике промене у телесној температури, такође, представљају стрес за организам, који доводи до активације терморегулационог центра и последичне активације хипоталамо-хипофизно-адrenalне осовине (енгл. *HPA-hypothalamus-pituitary-adrenal axis*) (231). Смањење телесне температуре се постиже урањањем животиње у хладну воду (15-18°C, у трајању од 15 до 30 минута) или постављањем кавеза у хладну, изоловану просторију (4°C, у трајању од 15 до 30 минута). Ова процедура се може применити у акутним или хроничним протоколима (7-14 дана) (232). Протоколи у којима се животиња доводи у стање принудне имобилизације, представљају најчешће коришћене процедуре за изазивање анксиозности, као и промена биохемијских и физиолошких параметара код животиња (233). Животиња се доводи у принудни имобилизациони положај стављањем у цилиндричну или полу-цилиндричну цев са отворима за вентилацију у трајању од 120 до 180 минута (234). Имобилизациони стрес протокол подразумева везивање горњих и доњих екстремитета животиње адхезивним тракама у трајању од 120 минута (235), при чему се и покрети главе ограничавају постављањем металног обруча око врата животиње. Ови протоколи, такође, могу бити акутни или хронични (7-21 дан). Тестови имобилизације доводе животињу у безизлазну ситуацију која изазива тежак психички и ментални стрес са ниским степеном адаптације (236). С обзиром да су глодари изузетно осетљиви на ову врсту стреса, стрес изазван електро-шоковима (0,5-2 mA) представља, такође, један од често коришћених модела (237). Наиме, животиња се електричној струји излаже преко шапа, током кретања по металној подлози која је повезана са извором струје. Истраживањима је потврђено да овакав облик стреса изазива код животиње бихевиоралне и неурохемијске промене које рефлектују стање анксиозности и депресије код људи. За разлику од других стресора, попут повећања или снижења телесне температуре, промене циркадијалног ритма, излагања извору буке, на које се животиња временом адаптира, овај вид стреса код животиња не доводи до адаптације. Поред ових протокола, врло често се за индукцију анксиозности, као и депресије, примењују различити хронични модели благог (CMS - Chronic mild stress) и непредвидивог (CUMS - Chronic unpredictable mild stress) стреса (238, 239), који представљају комбинацију, као и наизменично свакодневно смењивање различитих врста стресова, са циљем изазивања хроничне анксиозности. С обзиром на непредвидиво смењивање различитих стресова у CUMS моделу је онемогућен процес адаптације на стресове, који се иначе може јавити код примене других модела.

1.3.3. Анимални експериментални модели за процену степена анксиозности

Анксиозност, изазвана у строго контролисаним, експерименталним условима, након излагања животиње мање или више природним, потенцијално анксиогеним ситуацијама, манифестује се различитим физиолошким и бихевиоралним одговорима животиње. Ови одговори, заправо, представљају варијабле које се могу измерити различитим тестовима за процену степена анксиозности. Тренутно постоји око 30 различитих процедура односно тестова (са бројним варијацијама) којима је могуће измерити анксиозност (240). Једна од најопштијих подела ових тестова је подела на тестове са или без условљавања. Тестовима без условљавања се процењује одговор животиње кроз спонтане и природне реакције (не подразумевају претходни тренинг животиње) и не укључују излагање болу или било каквој нелагодности (241), за разлику од тестова са условљавањем, у којима се мери одговор животиње на одређени стресни или врло често болни стимулус (електро-шок), и при том, укључују и аспект емоционалне меморије (241).

Тестови без условљавања обухватају експлоративне тестове, тестове интеракције (понашање по принципу „прилазак-избегавање” у тестовима социјалне интеракције), тестове акутног одговора на стресни стимулус (гласни звуци, јако светло), као и тестове који се базирају на одбрамбеном одговору животиње (fear/defense тестови). Најчешће примењивани тестови за процену степена анксиозности се базирају на процени експлоративног понашања животиње. Унутрашњи конфликт, који постоји између урођене тежње животиње да истражује и испитује нове, непознате просторе (са циљем проналажења хране или сигурног скровишта) са једне стране, и урођеног страха од непознатих, отворених и осветљених простора, са друге стране, у великој мери одређује њено понашање и кретање. На основу ових образаца понашања и локомоторне активности животиње, може се проценити степен анксиозности. Најчешће примењивани тестови из ове групе су тест отвореног поља, тест уздигнутог крстастог лавиринта и тест „кутија светло/тама” (light /dark box test).

Тест отвореног поља (ОП тест) је стандардизовани тест који служи за процену експлорације новог и непознатог окружења, као и укупне локомоторне активности животиње (242). Истовремено, овај тест представља иницијални скрининг тест у добијању информација о присуству стања сличних анксиозности код глодара (243). ОП тест се спроводи у лавиринту који чини арена која може бити различитог облика (најчешће квадратног) и која је виртуелно подељена на централни и периферни део.

Животиња се поставља у централни део арене и потом се, током петоминутног трајања теста, прати њено понашање и кретање у арени. Регистравање понашања животиње се може изводити непосредним посматрањем и/или помоћу видео камере, након чега се приступа обради података. Резултати ОП теста омогућавају процену степена анксиозности на основу вредности директних показатеља (укупно време проведено у централној зони и број улазака у централну зону), као и на основу вредности индиректних показатеља степена анксиозности. Индиректни показатељи степена анксиозности су промене у локомоторној активности животиње, које се изражавају у виду укупног пређеног пута, просечне брзине кретања, као и процента времена кретања током тестирања. Смањење вредности свих наведених параметара указује на повећани степен анксиозности код животиње (244). Истовремено, смањење експлоративне активности, односно смањење интересовања за истраживањем новог и непознатог простора, које се изражава преко броја усправљања на задње ноге, може, такође, бити један од индиректних знакова повећане анксиозности (244). Поред ОП теста, тест уздигнутог крстастог лавиринта (УКЛ тест) је један од најчешће коришћених тестова за процену степена анксиозности код глодара (245). Уједно, овај тест прошао је најдетаљније валидације од свих тестова који се користе за процену степена анксиозности код глодара. Конструкција лавиринта је нешто другачија од конструкције арене у тесту отвореног поља, чиме је омогућено знатно прецизније тестирање и добијање информација о емоционалном статусу животиње. Тест се изводи на платформи уздигнутој од нивоа пода (најчешће 100 cm), што додатно појачава и урођени страх од висине који постоји код глодара. Платформа се састоји из 2 отворена и 2 затворена крака, међусобно постављена под правим углом. Тест се започиње постављањем животиње у централни део лавиринта, главом окренутом према отвореном краку, при чему јој се на овај начин омогућава да сама одабере да ли ће проводити време у отвореним (незаштићеним, непознатим) деловима лавиринта или у затвореним (заштићеним, сигурним) деловима лавиринта. Приликом тестирања у УКЛ код животиње се јавља конфликт „прилазак-избегавање” који корелира са физиолошким маркерима стреса (246). Директни показатељи повећаног степена анксиозности у УКЛ тесту су смањено време проведено у отвореним крацима лавиринта, као и смањен број улазака у отворене краке. Поред тога, укупни пређени пут, просечна брзина кретања, као и проценат времена кретања животиње током тестирања, се могу, као и у ОП тесту, сматрати индиректним параметрима за процену степена анксиозности. Смањење вредности ових параметара рефлектује повећани

степен анксиозности код животиње. Експлоративна активност у УКЛ тесту, која се изражава преко броја уздицања на задње ноге, број нагињања преко ивице отворених делова лавиринта, као и укупне експлоративне активности (247), служи, такође, као индиректан показатељ анксиозности код животиња. Тест „кутија светло/тама” (light /dark box test) се базира на урођеној аверзији глодара према јако осветљеним просторима (248). Апарат се састоји од малог, тамног (безбедног) одељка и великог, осветљеног (небезбедног) одељка, који међусобно могу бити повезани тунелом. Животиња природно више времена проводи у тамном, „сигурном” простору. Смањен број улазака у осветљени део, као и смањено време које животиња проводи у овом делу, сматрају се одразом повећаног степена анксиозности (249).

Тестови са условљавањем могу бити базирани на присуству конфликта или без конфликта. Један од најчешће коришћених тестова је Vogel conflict test (250). У овом тесту, након депривације воде, животињи се допушта да приђе боци са водом под строго контролисаним условима. Након одређеног броја гутљаја, преко језика се пропушта електрична струја. Што више воде животиња попије, примајући електрошокове, сматра се да је мање анксиозна. Овим тестом се процењује анксиозност, која се, заправо, развија уколико се непријатном стимулусу мора прићи, уместо да се стимулус избегава. Процедуре условљавања страхом проучавају понашање животиње када се она истовремено изложи неком неутралном стимулусу (попут излагања светлу или звуку) и непријатном стимулусу (попут електро-шокова). Поновно излагање неутралном стимулусу испољиће се карактеристичним бихевиоралним одговором („freezing or startle response”), који ће се појавити и без присуства непријатног стимулуса (251).

1.3.4. Оксидативни стрес у анксиозним поремећајима

Један од новијих механизма којим се, барем делимично, покушава објаснити патогенеза анксиозних поремећаја је и оксидативни стрес (204). Узимајући у обзир посебну склоност можданог ткива ка оксидативним оштећењима, не чуди чињеница да је оксидативни стрес, као потенцијални патогенетски механизам, доведен у везу са настанком ових поремећаја. Веза између анксиозних поремећаја и оксидативног стреса је предмет научних истраживања новијег датума. Актуелност ове теме је потврђена

результатима бројних студија спроведених у оквиру клиничких истраживања, као и на анималним експерименталним моделима.

1.3.4.1. Подаци о повезаности анксиозних поремећаја и оксидативног оштећења из клиничких студија

Резултати клиничких студија које испитују везу између оксидативног стреса и анксиозних поремећаја су знатно оскуднији у односу на студије које се баве оксидативним стресом као патолошким супстратом у другим психијатријским поремећајима. Одређене клиничке студије су потврдиле пораст липидне пероксидације код пацијената са социјалном фобијом (252), паничним поремећајем (253), као и опсесивно компулзивним поремећајем (254, 255). Међутим, MDA (малондиалдехид) нивои код пацијената који болују од пост-трауматског стрес поремећаја нису показали промене у вредностима овог маркера (256). Повишени нивои ензима антиоксидативне заштите, попут SOD, уочени су код пацијената који болују од социјалне фобије (252), паничног поремећаја (253) и опсесивно-компулзивног поремећаја (254, 255). Такође, пораст активности глутатион пероксидазе је уочен код пацијената са социјалном фобијом (252), опсесивно-компулзивним поремећајем (255) и паничним поремећајем (253), док је пораст активности CAT уочен код пацијената који болују од социјалне фобије (252). Супротно овим резултатима, активност каталазе и глутатион пероксидазе су биле смањене код пацијената са опсесивно-компулзивним поремећајем (254), што може бити повезано са повећаним стварањем реактивних кисеоничних врста. Показано је да није било промена активности SOD, CAT, GPx, у посттрауматском стрес поремећају (256). На основу резултата ових студија се може закључити да у току анксиозних поремећаја долази до поремећаја оксидативног статуса, који се огледа у порасту вредности маркера липидног оштећења, као и у порасту активности ензима антиоксидативне заштите.

1.3.4.2. Повезаност оксидативног стреса и повећање степена анксиозности према резултатима студија на анималним експерименталним моделима

Иако подаци из литературе потврђују да веза између оксидативног стреса и анксиозности постоји, њена каузалност још увек није јасно дефинисана. Управо из ових разлога, студије на анималним моделима су од изузетног значаја у расветљавању потенцијално постојеће узрочно-последичне везе између оксидативног стреса и појаве анксиозних поремећаја. Већина студија на анималним моделима се базира на изазивању оксидативног стреса директним и индиректним методама. Директне методе подразумевају индукцију оксидативног стреса различитим генетским манипулацијама са последичним формирањем анксиозних фенотипова, док индиректне методе подразумевају веома различите начине за изазивање оксидативних оштећења (попут измена у уносу одређених витамина, примене различитих дијететских протокола).

Hovatta и сарадници су утврдили блиску везу између механизма антиоксидативне заштите и анксиогених фенотипова код шест инбредних сојева мишева (257). Они су, заправо, открили да је експресија гена одговорних за синтезу глутатион редуктазе 1 и ензима глиоксолазе 1 у мозгу, високо повезана са анксиозним фенотиповима (257). Додатно су открили да је активност ових ензима највиша код најанксиознијих мишева, док је најнижа код најмање анксиозних мишева. Ови аутори су први указали на везу између метаболичких путева оксидативних оштећења и анксиозности. Друга група истраживача је показала да је анксиозност код мишева праћена изразитим порастом нивоа ROS у неуронским и глијалним ћелијама церебелума и хипокампуса, као и у неуронима церебралног кортекса, и у моноцитима, гранулоцитима и лимфоцитима (258, 259, 260). Директни ефекти оксидативног стреса на анксиогено понашање код мишева потврђени су у студији у којој је примењен снажним прооксиданс, L-бутионин-(S,R)-сулфоксимином (BSO), при чему је дошло до снижења вредности GSH, анксиогеног понашања код животиња, као и до смањења биомаркера антиоксидативне заштите (261, 262). Индиректни докази о вези између оксидативног стреса и анксиогеног понашања код животиња, добијени су у студијама са суплементацијом витамина А (263) и дефицијенцијом витамина Е (264). Дефицијенција витамина Е изазвала је значајни пораст маркера оксидативног оштећења у мозгу мишева, као и анксиогено понашање. Суплементација витамином А изазвала је анксиогено понашање код животиња, индуковала оксидативни стрес, довела до пораста липидне и

протеинске пероксидације у хипокампусу одраслих пацова (263). *Souza* и сарадници су показали да је исхрана дијетом обогаћеном сахарозом довела до развоја гојазног фенотипа, повећала протеинску оксидацију у фронталном кортексу, и изазвала анксиогено понашање код животиња (265). Поред тога, у процесу старења, који је повезан са оксидативним стресом, потврђене су анксиогене промене у понашању животиња (266, 267).

1.4. Депресивни поремећаји

1.4.1. Дефиниција и класификација депресивних поремећаја

Депресија је тежак, потенцијално смртоносни, психијатријски поремећај од кога у свету болују милиони људи. Депресија се може јавити у било ком периоду живота, како у детињству, тако и у позној старости. Као један од најчешћих психијатријских поремећаја у 21. веку, представља изузетно озбиљан проблем, не само у фармакотерапијском, већ и у социоекономском смислу. Преваленца јављања депресије код жена је два пута већа (268). Депресија се клинички манифестује великим бројем симптома, у које спадају: лоше расположење, осећај туге и безнађа, анхедонија, поремећај у апетиту и телесној тежини, осећај умора и губитак енергије. Поред ових, присутни су и други симптоми, као што су психомоторна агитација и/или успореност, поремећаји сна, стално присутан осећај кривице, низак ниво самопоуздања, суицидалне тенденције, као и различити аутономни и гастроинтестинални поремећаји. Депресија представља изузетно комплексан феномен, са бројним подтипovima и изузетно сложенom етиопатогенезом (269). Клиничка слика се може јављати у форми са прогресивним током или са наизменичним фазама егзацербација и ремисија. Разлике у испољавању симптоматологије могу варирати од благих знакова до испољавања изузетно тешких симптома који прате прогресију болести (270). Депресивни поремећаји могу бити праћени психотичним манифестацијама, и могу се јављати уз друге психичке и соматске поремећаје. Депресивни поремећаји су сврстани у две основне групе - униполарни и биполарни поремећаји. У униполарне поремећаје спадају: велики депресивни поремећај (major depression), рекурентни (повратни) велики депресивни поремећај (recurrent major depression), велики депресивни поремећај са психотичним симптомима (psychotic depression), дистимија (dysthymia) и

постпартална депресија (postpartum depression). Биполарни депресивни поремећаји су биполарни поремећај (тип I и II) и циклотимија (cyclothimia) (269).

Настанак депресије се везује, пре свега, за различите врсте стресова, који имају кључну улогу у настанку депресије (271). Врло важна је и улога генетског фактора у настанку депресије, као и бројних фактора средине (272). Иако сви ови фактори заједно доприносе настанку депресије, сам патогенетски механизам још увек није у потпуности разјашњен. Прва, уједно и најпознатија, хипотеза генезе депресије постављена је пре више од пола века (273). Ова, већ добро позната, „моноаминска хипотеза” истакла је улогу функционалне дефицијенције моноаминских неуротрансмитера у мозгу, попут норепинефрина (NE), 5-хидрокси триптамина (5-НТ), и/или допамина (DA) у настанку депресивних поремећаја. Узимајући у обзир порекло норадренергичких, серотонергичких и допаминергичких неурона у мозгу, као и њихове пројекције у различите делове мозга, може се закључити да је моноаминергички систем одговоран за многе бихевиоралне манифестације, као што су расположење, будност, мотивација, умор, као и психомоторна агитација или успореност. Поремећаји у функцијама моноаминергичког система, са последичним бихевиоралним манифестацијама, могу настати услед измена у синтези, складиштењу, и/или ослобађању ових неуротрансмитера, као и услед поремећаја сензитивности њихових рецептора и/или функција субцелуларних гласника (274).

У генезу депресије укључени су и поремећаји ендокриног система. Наиме, у бројним студијама је показано да су код депресивних пацијената измењени нивои кортизола (275), хормона раста (276), тироидних хормона (277), естрогена и прогестерона (278), као и дисфункција НРА осовине (279). Директни механизми, којима хормонски дисбаланси утичу на појаву депресије, нису још увек разјашњени.

Истраживања новијег датума указала су на важну улогу имунског система у настанку депресије (280). Код пацијената оболелих од депресије показано је да долази до оштећења ћелијске имунске функције и до повећане активност лимфоцита и НК (natural killers) ћелија (280). Улога имунског система се огледа у чињеници да цитокини утичу на различите функције ЦНС-а, које су поремећене у депресивним стањима, као што су спавање, конзумирање хране, когниција, температура и неуроендокрина регулација (281). Неуротрофни фактори раста, BDNF (енгл. *brain derived neurotrophic factor*) и неуротрофин-3, представљају факторе раста који имају

важну улогу у адаптацији и пластичности мозга. Ови фактори имају улогу у расту, развоју, као и функционисању 5-НТ неурона у мозгу одраслих особа (282). Код особа оболелих од депресије присутна је одсуство адекватних адаптивних одговора на стрес и друге непријатне стимулусе, при чему је показано да су код ових пацијената значајно смањени нивои ових фактора раста (283).

1.4.2. Анимални експериментални модели за индукцију депресије

Упркос изузетно високој преваленци, као и значајном утицају на здравље људи, патогенеза депресије још увек није у потпуности разјашњена. Употребом анималних модела могу се утврдити молекулске и биохемијске промене, као и веза између генетских фактора и фактора средине, који воде настанку депресије, што значајно помаже бољем увиду у патогенезу овог обољења. Изразита хетерогеност фактора који утичу на настанак и развој депресије, имала је за последицу стварање различитих анималних модела за индукцију депресије. Имајући у виду да стрес представља главни фактор ризика за настанак депресије, најчешће коришћени анимални модели се заснивају управо на изазивању депресије различитим стресогеним факторима.

Хронични благи стрес (CMS) је најчешће коришћени модел за изазивање депресије. Првобитни модел који су креирали *Katz* и сарадници (284), а потом додатно развио *Willner* (285), подразумевао је тронедељно излагање животиње електричним шокovima, урањање у хладну воду, имобилизацију, замену циклуса дан/ноћ, као и примену различитих других стресора (284). Ови стресори доводили су до пораста нивоа кортикостероида у плазми, као и смањења реакције у *sucrose preference* тесту (286) што указује на развијање анхедоније, која представља један од главних симптома депресије. Нешто касније, дошло је до модификације ове методе, превасходно из етичких разлога. Модел хроничног благог стреса који се данас примењује у индукцији депресије како на пацовима (287), тако и на мишевима (288), подразумева континуирано излагање ових животиња нешто блажим стресорима, као што су периоди депривације хране и воде, стављање плашта преко кавеза, замена животиња у кавезу, промена циркадијалног ритма, примена непријатних звукова, постављање кавеза у топлу (37°C) или хладну (4°C) просторију. Ово су хронични модели у којима се животиња излаже стресовима у трајању од две до пет недеља. Постоји неколико

варијација овог модела, попут хроничног благог непредвидивог стреса (CUMS) и хроничног варијабилног стреса (CVS), код којих су процедуралне разлике минималне (238, 239). Након неколико дана излагања овим протоколима, код животиња долази до повећане осетљивости НРА осовине, као и смањеног одговора на пријатне стимулусе (289). Поред анхедоније, овим моделима изазивају се и други симптоми депресије, попут смањења агресивности, сексуалне функције, експлоративног понашања, као и смањења локомоторне активности. Ови модели симулирају стресове којима су људи изложени у свакодневном животу. Поузданост ових модела за индукцију депресивности се огледа и у чињеници да бихевиорални ефекти изазвани овим моделима добро реагују на антидепресантну терапију (290). Поред ових модела, депресија се може изазвати моделима социјалне изолације (неонатална и адултна изолација), различитим генетским и геномским моделима, развојним моделима (третман неонатуса антидепресантима, различити пренатални/неонатални стресови), као и моделима повреде (олфакторна булбектомија) (291).

1.4.3. Анимални експериментални модели за процену степена депресивности

Два основна теста која се користе за претклиничку процену степена депресивности, као и за процену степена депресивности у оквиру различитих претретмана у зависности од дизајна експерименталне студије, су тест качења о реп (Tail suspension test) (292) и тест форсираног пливања (Forced swim test, Порсолтов тест) (293). Главни принцип ових тестова заснива се на изазивању „бихевиоралног очаја” код животиње (294). Наиме, животиња се под строго контролисаним, експерименталним условима доводи у безизлазну ситуацију. Након борбе и покушаја избављења из ове непријатне ситуације, животиња одустаје од даљих покушаја, што се манифестује преласком у фазу имобилности, при чему се, заправо, карактеристике имобилности користе као мера степена депресивности код животиње. Тест качења о реп (Tail suspension test) се изводи тако што се животиња доведе у непријатну ситуацију безболним качењем репа о конструкцију апарата на коме се изводи тестирање, при чему је окренута главом на доле (292). У самом почетку, животиња се бори и покушава да се избави из ове непријатне ситуације исправљањем и пењањем уз реп да би се вратила у нормалан положај. Након извесног времена, животиња показује знаке одустајања, престаје да се бори и улази у периоде имобилности, односно почиње пасивно да виси без икаквих уочљивих покрета (295). Ови периоди имобилности се

могу квантитативно изразити и на основу њихових вредности се врши процена степена депресивности. Укупно време имобилности, током шестоминутног трајања теста, се сматра најважнијим параметром за процену степена депресивности код животиња. Поред овог, време до појаве прве имобилности, као и број епизода имобилности се користе за процену степена депресивности. Тест форсираног пливања је сличан овом тесту, са разликом што се спроводи у воденој средини (293). Изводи се тако што се животиња (пацов или миш) убаци у стаклени цилиндар испуњен водом, који је довољне дубине да животиња не може дотаћи дно. Потом се прати понашање животиње у одређеном временском периоду. Животиња почиње да се бори и труди да се избави из непријатне ситуације тако што покушава да исплива пењући се уз зидове цилиндра. Након извесног времена безуспешне борбе, животиња одустаје. Ово одустајање манифестује се тиме што животиња улази у фазу имобилности, односно почиње да плута (294). Уколико животиња брзо по почетку извођења теста одустане од борбе и уколико су периоди плутања дужи, то указује да је степен депресивности израженији. Укупно време имобилности током шестоминутног трајања теста се сматра најважнијим параметром за процену степена депресивности код животиња.

1.4.4. Оксидативни стрес у депресивним поремећајима

Упркос многобројним претклиничким и клиничким студијама, патофизиологија депресије још увек није у потпуности разјашњена. Имајући у виду, већ описану, појачану осетљивост мозданог ткива на оксидативни стрес, не чуди и настанак нове хипотезе по којој је оксидативни стрес потенцијални механизам настанка депресије. Хипотеза да је „оксидативни стрес – нови стрес” (296), нашла је потврду у многобројним клиничким студијама, које су показале промене оксидативног статуса код особа оболелих од различитих депресивних поремећаја.

1.4.4.1. Подаци о повезаности депресије и оксидативних оштећења из клиничких студија

Maes и сарадници су показали да депресију карактерише значајан пад антиоксидативног статуса, што се огледа у смањеним нивоима антиоксиданаса, попут триптофана, тирозина, албумина, цинка (297). Поред тога, открили су значајно смањење концентрације витамина Е код депресивних пацијената у поређењу са

контролама. Показано је да је код депресивних жена значајно снижен ниво глутатиона у крви (298). Коензим Q10 је изузетно снажан антиоксиданс који повећава отпорност митохондрија на штетно дејство ROS и RNS (299). Показано је да велику депресију карактеришу значајно ниже серумске концентрације коензима Q10 у поређењу са контролама. С обзиром да коензим Q10 има снажне антиоксидативне и антиинфламаторне ефекте, синдром сниженог CoQ10 у депресији води смањеној антиоксидативној заштити против реактивних врста, и последично већем стварању проинфламаторних цитокина, попут TNF α , што може додатно повећати оштећења (300). Смањене концентрације у крви витамина Е и С, цинка, глутатиона, коензима Q10 доприносе смањењу укупног антиоксидативног капацитета (TAC – total antioxidant capacity) (301). Снижени TAC, као маркер оксидативног оштећења, показао је негативну корелацију са степеном тежине депресије (302). Поред тога, показано је да је код депресивних особа присутан пораст ROS, који се манифестује повишеним нивоима пероксида, као и порастом активности ксантин оксидазе (XO). Резултати који се односе на оксидативна оштећења липида изражена преко специфичних маркера (MDA, TBARS, 8-изо-простагландини, 4-хидроксиноненал) су врло конзистентни и показују пораст вредности у различитим депресивним стањима (303). Оштећења протеина, као и DNK молекула, поремећај у активности езима антиоксидативне заштите, врло јасно говоре у прилог хипотези да у различитим депресивним стањима долази до оксидативних оштећења.

1.4.4.2. Повезаност оксидативног стреса и депресије према резултатима студија на анималним моделима

Закључци који се намећу из клиничких студија, потврђени су и у многобројним студијама на анималним моделима. У депресији индукованој на моделу хроничног благог стреса је дошло до смањења укупног глутатиона у мозгу пацова (304), као и у моделу стреса индукованог принудном имобилизацијом (305). Код пацова Wistar albino соја, депресија изазвана на моделу CMS-а, праћена је смањеном активношћу GPx (306, 307). У још једном моделу за изазивање депресије, олфакторној булбектомији, показана је смањена активност GPx (308). Модел хроничног непредвидивог благог стреса индуковао је смањење TAC, укупног глутатиона, као и смањење активности SOD и CAT (309). У CMS моделу, такође, је дошло до смањења активности SOD у префронталном кортексу, хипокампусу и стријатуму пацова, док је код истих

животиња, уочен пораст активности САТ у кортексу, хипокампусу, церебелуму и стријатуму (310, 311). Поред тога, код ових истих животиња, регистрован је пораст липидне пероксидације у церебелуму и стријатуму. *De Souza* и сарадници су показали да у моделу стреса индукованог принудном имобилизацијом и пливањем долази до повећања нивоа TBARS (305). Такође, у CUMS моделу је дошло до пораста нивоа MDA у јетри (309). У експериментално индукованој депресији дошло је до оштећења протеина у префронталном кортексу, хипокампусу и стријатуму (310). Резултати студија на анималним моделима, код којих је депресија изазвана различитим врстама стресова, дошло је до снижења нивоа антиоксиданаса и оксидативног оштећења липида и протеина, што је у складу са резултатима многобројних клиничких студија.

1.5. Ноцицепција

1.5.1. Дефиниција и морфофункционалне основе ноцицепције

Нервни систем има способност детекције, обраде и преноса широког распона термалних и механичких стимулуса, као и ендогених и егзогених хемијских стимулуса. Специјализовани периферни сензорни неурони, такозвани ноцицептори, одговорни су за детекцију ових стимулуса, њихово превођење у електричне сигнале, као и пренос у више моздане центре. Активација функционално различитих популација кутаних ноцицептора, као и обрада информација које преносе, омогућавају детекцију широког дијапазона квалитета бола (пробадајућег, боцкајућег, жарећег, грчевитог) (312).

Бол, као један од модалитета соматских сензација, се дефинише као „комплексни скуп непријатних сензорних, емоционалних и когнитивних доживљаја изазваних оштећењима ткива и манифестованих одређеним аутономним, психолошким и бихевиоралним реакцијама” (313). У нормалним условима, ноцицепција и перцепција бола су изазвани токсичним молекулима и инфламаторним медијаторима, као и механичким и температурним стимулусима, довољно великим да могу да доведу до оштећења ткива, што указује да поседују биофизичке и молекуларне карактеристике које им омогућавају да селективно детектују и реагују само на потенцијално штетне стимулусе. Међутим, за разлику од релативно објективне природе других чула (вида, слуха, мириса, укуса), осећај бола је индивидуалан и изразито субјективан (314). Осим

тога, претварање ноцицептивних сензација у перцепцију бола може бити измењено стресом, хроничитетом или антиципацијом (315).

Кутани ноцицептори су изразито хетерогена група неурона смештена у периферним сензорним ганглијама локализованим изван ЦНС-а, тачније у ганглијама дорзалних коренова кичмене мождине који имају улогу у преносу информација о деловању екстероцептивних (штетних) стимулуса са коже ка одговарајућим деловима централног нервног система. Ноцицептори стварају акционе потенцијале, који се преносе по принципу све или ништа, само када су адекватно стимулирани. Активација ноцицептора представља само први корак који може довести до перцепције бола. Наиме, да би настао осећај бола, неопходно је да периферне информације стигну до виших центара. На перцепцију бола могу утицати фреквенца акционих потенцијала у примарним аферентним влакнима, временска и просторна сумација пре- и постсинаптичких сигнала, као и централни механизми за контролу бола (314).

Ноцицептори су ексцитаторни неурони који ослобађају велики број различитих супстанци на својим централним терминалним завршецима, и имају способност побуђивања неурона другог реда различитим механизмима. Брза и спора синаптичка трансмисија су посредоване највећим делом глутаматом, као примарним неуротрансмитером, као и пептидима (супстанца Р, калцитонин ген-повезани пептид - CGRP, соматостатин) (316). Од посебног значаја у перцепцији бола је и пластичност синаптичке везе (способност појачавања хомосинаптичких и хетеросинаптичких веза) између примарних аферентних влакана и интернеурона које побуђују, као и пресинаптичка и постсинаптичка модулација нисходних фацитаторних и инхибиторних путева у кичменој мождини (317).

1.5.2. Ноцицепција и инфламација

Инфламација представља скуп врло комплексних реакција које се јављају као одговор на различите ендogene и екзогене стимулусе. Циљ ових заштитних одговора је да се из организма уклони како сам агенс који је довео до оштећења ткива, тако и да се уклоне последице настале оштећењем ткива. Ноцицептори реагују на термичке и механичке стимулусе, као и на хемијске стимулусе, који представљају најбројнију и

најразноврснију групу стимулуса, делујући при томе на све врсте аферентних влакана. У различитим болним стањима, која су праћена инфламацијом, долази до стимулације периферних нервних влакана која учествују у индукцији бола. При томе, долази и до промена у локалном протоку крви и пропустљивости крвних судова, активацији и миграцији имуних ћелија, као и до промена у ослобађању трофичких фактора и фактора раста из околног оштећеног ткива (314). Терминални завршеци нервних влакана могу бити изложени великом броју различитих супстанци у току повреде ткива и инфламације. Под утицајем ових супстанци, долази до вишеструких и сложених промена које се манифестују променама у активацији нервних влакана, сензитизацији на друге стимулусе, као и у алтерацијама у фенотипу и структури самих сензорних нерава (318). У овим случајевима долази до комплексне интеракције између различитих супстанци и неуралних (сензорних и симпатичких нерава) и не-неуралних система (сензорних нерава и имуних ћелија). Сензитизација примарних сензорних ноцицептивних неурона (ноцицептора) која се јавља у току инфламације, доводи до појачања болне сензације (хиперноцицепције). Ова сензитизација је проузрокована директном активацијом инфламаторних медијатора, као што су простагландини (PGE_2 , PGI_2), као и симпатичким аминима (допамин, адреналин) на њиховим рецепторима присутним у мембрани ноцицептора (319, 320). Такође је показано да ослобађању ових медијатора са директним дејством на ноцицептивне неуроне претходи ослобађање каскаде цитокина. У моделу индукције инфламације карагенаном, показано је да ослобађање $\text{TNF-}\alpha$ и хемокина CXCL1 изазива продукцију $\text{IL-1}\beta$, који потом индукује стварање простагландина. Показано је да након активације неутрофила, цитокини учествују у стварању крајњих медијатора запаљења, као што је PGE_2 (321). Бројни цитокини који се ослобађају из имуних ћелија у току процеса инфламације ($\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-8 , $\text{TNF}\alpha$) изазивају врло снажну хипералгезију. На месту дејства штетног стимулуса и развијене инфламације, долази до инфилтрације и активације инфламаторних ћелија, при чему ове ћелије ослобађају многобројне ензиме (неутралне протеазе, еластазе, колагеназе, фосфатазе, липазе), реактивне врсте (супероксид анјон радикал, водоник пероксид, хидроксил радикал), као и бројне хемијске медијаторе (еикосаноиде, компоненте комплемента, цитокине, хемокине, азот моноксид) и на тај начин изазивају оштећење ткива и оксидативни стрес (322). Ноцицептори поседују један или више рецептора на површини ћелије који су способни да препознају и одреагују на сваки од ових про-инфламаторних и про-алгезијских агенаса. Ове интеракције појачавају ексцитабилност нервног влакна, повећавајући на тај начин његову осетљивост на

температуру или додир. NGF (енгл. *Nerve Growth Factor*) је најпознатији по улози коју има као неуротрофни фактор, неопходан за опстанак и развој сензорних неурона у току ембриогенезе. Код одраслих се NGF ствара у случајевима повреде ткива (323). Своје дејство испољава директно на протеинска S влакна ноцицептора и појачава сензитивност на топлотне и механичке стимулусе. Поред поменутог брзог дејства, NGF показује и продужен хипералгезијски ефекат који настаје након ретроградног транспорта у једра ноцицептора, где доводи до повећане експресије про-ноцицептивних протеина, укључујући супстанцу P, TRPV1 и волтаж зависне натријумске канале (324).

1.5.3. Ноцицепција и NPY

Неуропептид Y је пептид са 36 аминокиселина који је повезан са модулацијом неколико изузетно важних функција у организму, попут узимања хране, учења, меморије, расположења. Овај пептид је изузетно заступљен у централном и периферном нервном систему, и то у регионима одговорним за трансмисију бола, укључујући ламину II дорзалних коренова кичмене мождине (325). Управо ова анатомска локализација чини NPY систем кључним у контроли бола. Наиме, спинална апликација неуропептида Y, значајно редукује бихевиоралне и неурофизиолошке знаке акутног и хроничног бола (326). У моделима акутног бола, показано је да је спинална (интратекална) администрација NPY и агониста Y₂ рецептора, значајно смањила термалну ноцицепцију (327). NPY учествује у антиноцицептивном дејству преко Y₁ и Y₂ рецептора, при чему је показано да његова интратекална администрација у анималним моделима неуропатског, инфламаторног и постоперативног бола проузрокује аналгезију, иако сами механизми овог дејства нису у потпуности разјашњени (328). Директна апликација NPY у спинални нерв инхибира пролазни или инфламаторни бол (326, 329). Показано је да интратекална примена NPY и агониста Y₂ рецептора смањује не само бихевиорални одговор на топлоту (330), већ и хипералгезију повезану са инфламацијом (331). Један од механизма којим NPY проузрокује аналгезију посредством Y₂ рецептора је смањење оксидативног стреса, које се огледа у смањењу индекса липидне пероксидације у мозгу (332). Антиинфламаторни ефекти NPY, који се огледају у смањењу TNF- α , IL-1 β и IL-6, као и неуропротективни ефекти, који се огледају у смањењу оксидативних оштећења преко

смањења нивоа MDA и пораста GSH, потврђени су у студији која је испитивала улогу NPY у моделу генерализованог конвулзивног напада (333).

1.5.4. Ноцицепција и оксидативни стрес

Бројне студије су потврдиле међусобну повезаност између инфламације и оксидативног стреса (322). У току инфламаторног процеса, активирани фагоцитни ћелије попут макрофага и неутрофила, стварају велику количину ROS и RNS, као што су супероксид радикал, водоник пероксид, хидроксил радикали, са циљем уништења штетног агенса (334). У условима различитих запаљенских стања, може доћи до стварања реактивних врста, при чему неке од ових реактивних врста излазе из фагоцитних ћелија, и последично могу изазвати локализовани оксидативни стрес и оштећење ткива (334). Продукти оксидативних оштећења, индуковани запаљенским процесом, могу посредовати у појачавању инфламацијског бола. Показано је да инјекција пероксинитрита у шапу пацова доводи до хиперноцицепције (335). Са друге стране, пак, показано је да спречавање оксидативних оштећења на месту повреде или на нивоу кичмене мождине умањује хиперноцицепцију (335, 336). Поред директне продукције реактивних врста од стране фагоцитних ћелија, нефагоцитне ћелије, такође, могу продуковати реактивне врсте као одговор на проинфламаторне цитокине (319). Као што инфламаторни процес може да изазове оксидативни стрес, тако и оксидативни стрес може да доведе до инфламације кроз активацију различитих путева. Реактивни водоник пероксид може да изазове инфламацију активацијом транскрипционог фактора NF- κ B (337). Оксидативни стрес активира NOD-like рецептор протеин-3-инфлазамом, (NLRP3), који доводи до стварања IL-1 β и IL-18 (338). Крајњи продукт арахидонске киселине, 8-изопростан, који настаје као последица липидне пероксидације, појачава експресију инфламаторног хемокина IL-8 у хуманим макрофагима, кроз активацију митоген-активирани протеин киназе (MAP киназе) (339). Оксидативни стрес изазива оксидацију плазма цистеина (Cys) и дисулфид цистеина (CySS), активира NF- κ B, као и експресију проинфламаторног цитокина IL-1 β (340). Из свега наведеног се може закључити да су инфламација и оксидативни стрес блиско повезани и међузависни патофизиолошки процеси. Уколико се оксидативни стрес јави као примарно оштећење у органу, за њим ће се убрзо развити и инфламација, и даље појачати оксидативно оштећење. Са друге стране, уколико је инфламација примарни

догађај, оксидативни стрес ће се развити као последица и додатно појачати инфламацију.

Улога оксидативног стреса у алтерацијама бола и аналгезије може се уочити и преко дејства на опиоидне рецепторе, и то у процесу старења. Познавање ефеката оксидативног стреса на опиоидне рецепторе је веома оскудно. У студији на пацовима, која се бавила испитивањем везе између оксидативног стреса узрокованог старењем и опиоидне антиноцицепције, под утицајем морфина и фентанила у тесту вруће плоче, је показано да постоји значајна негативна корелација између морфинске антиноцицепције и протеинске оксидације у кортексу, стријатуму и средњем мозгу, као и липидне пероксидације у кортексу, хипокампусу и стријатуму (341). Са процесом старења и порастом оксидативних оштећења у мозгу, праг ноцицепције и антиноцицептивни ефекти опиоида значајно се смањују. Кортекс, стријатум, хипокампус и средњи мозак поседују опиоидне рецепторе и доприносе у процесу преноса бола (342). С обзиром да је процес старења повезан са оксидативним оштећењима (343), може се закључити да процес старења утиче на осетљивост на бол и опиоидну аналгезију.

1.5.5. Анимални модели за процену ноцицепције

С обзиром на хијерархијску организацију периферног и централног нервног система у преносу болних сигнала, развијени су различити тестови којима се може проценити ноцицепција до нивоа кичмене мождине или изнад нивоа кичмене мождине. За процену термалног, механичког и хемијског бола, као и акутног и хроничног бола, користе се различити тестови. У већини тестова за процену ноцицепције животиња се излаже некој болној сензацији (термалне, механичке или хемијске природе), која представља довољно јак стимулус да би изазвала очекивану реакцију код животиње (344). Квантификација резултата ових тестова се остварује мерењем латенце, односно периода времена (s) које протекне од тренутка излагања животиње штетном стимулусу до манифестације очекиване реакције.

1.5.5.1. Анимални модели за испитивање бола изазваног термичким стимулусима

Тест вруће плоче (Hot plate test) се користи за процену термалне ноцицепције. Овим тестом је омогућена процена функције супраспиналних нивоа централног нервног система укључених у процесуирање ноцицептивних информација (345). Тест се изводи тако што се животиња постави на загрејану металну подлогу (температура подлоге је око 55°C). Ова температура је довољна да доведе до болне сензације, а да при томе не изазове тежа оштећења ткива ни опекотине. Подлога је ограничена стакленим зидовима, чиме је експериментатору омогућено да посматра реакцију животиње током трајања теста. Тестирање траје до онога тренутка када животиња испољи реакцију на топлотни стимулус. Ова реакција се манифестује одизањем шапа од подлоге, лизањем задњих шапа, или одскакањем од подлоге. Параметар који се мери у овом тесту је време до појаве реакције. У овом тесту, сва четири шапе, као и реп животиње су изложени повишеној температури.

Тест повлачења репа (Tail flick test) се користи за испитивање дејства неке фармаколошке супстанце на праг бола код глодара (мишева и пацова) (346). Овај тест спада у групу термалних тестова који се користе за процену спиналних рефлекса на ноцицептивне стимулусе. Проксимална трећина репа животиње се излаже извору топлоте (зрачења), или се реп урања у топлу воду. Параметар који се мери у овом тесту је латенца, односно време до реакције, која се испољава повлачењем репа. Тест је врло брз и једноставан за извођење, при чему је битно да животиња буде мирна у току извођења експеримента, да би се успешно проценило време до повлачења репа. Продужетак латенце говори у прилог антиноцицептивног ефекта испитиване супстанце.

Тест хладне плоче (The cold plate test) спада у групу термалних тестова за процену ноцицепције, при чему се прати реакција животиње на ниске температуре (347). Плантарни део шапе животиње се поставља на хладну плочу, температуре од -5°C, 5°C и 10°C. Хладан стимулус доводи до осећаја бола, при чему животиња испољава реакцију на ову сензацију брзим подизањем шапе од хладне плоче. Овај метод се користи за процену хладне хипералгезије у моделима селективне повреде нерва или у моделу лигатуре нерва (спиналног нерва). Хиперсензитивност на хладноћу се мери преко латенце, односно времена (s) које прође док животиња не испољи

реакцију на овај стимулус брзим подизањем шапе. Овим тестом се може испитати и хиперензитивност на хладноћу под утицајем експериментално изазване инфламације.

Hargreaves-ов тест је тест кутане хипералгезије на термални стимулус у моделу повреде нерва (348). Шапе животиња је неопходно адекватно поставити на стакленој подлози која се потом загрева емитером инфрацрвених зрака и прати се реакција животиње која се манифестује одизањем шапа од подлоге, као и њиховим лизањем.

1.5.6. Значај анималних модела у претклиничко - бихевиоралним истраживањима

Изражене анатомске и физиолошке сличности између људи и животиња (посебно сисара) представљале су полазну основу да се на животињама отпочну истраживања са циљем проучавања механизма настанка различитих болести, као и испитивања нових терапијских агенаса пре спровођења клиничких студија. Примена анималних модела у научним истраживањима има вишеструки значај. Последњих година, међутим, употреба животиња у научне сврхе је постала предмет оспоравања, преваходно из етичких разлога. Поред тога, развој молекуларних, генетских метода, као и метода биоинжењеринга, преузео је примат у савременим истраживањима.

Имајући у виду комплексност људског организма у анатомском, физиолошком и биохемијском смислу, а посебно сложеност функционисања централног нервног система, као императив у истраживањима се намеће сагледавање организма као целине. Управо из ових разлога, анимални модели представљају незаменљив методолошки приступ, који последњих година све више добија на значају, посебно у области неуробихевиоралних истраживања.

За адекватно спроведено бихевиорално истраживање неопходно је јасно дефинисање почетне хипотезе, као и одабир адекватне, стандардизоване процедуре за процену бихевиоралних ефеката од интереса за само истраживање. Поред тога, узгајање животиња под стандардизованим и строго дефинисаним условима, спровођење одговарајуће експерименталне процедуре (адекватно време, место, начин спровођења експеримента), као и начин прикупљања и обраде података, су од есенцијалног значаја у бихевиоралним испитивањима. У поређењу са другим методама истраживања у биомедицинским наукама, бихевиорална тестирања су релативно једноставна за спровођење и повољна у финансијском смислу. До података за анализу

долази се релативно брзо и лако. Међутим, тежина и сложеност ове врсте истраживања се налази у интерпретацији добијених података. Од пресудног значаја за успех истраживања је добро обучен експериментатор, како у смислу поседовања практичних вештина, тако и у смислу поседовања знања и искуства у анализи и тумачењу добијених података.

Креирати анимални модел који треба успешно да повеже комплексне феномене, попут когнитивних или емоционалних дисфункција са понашањем животиње, које представља одраз проучаване патологије, је изузетно тешко. Модел треба што прецизније и верније да репрезентује стање у људском организму које је предмет истраживања, као и да омогући исходе какви се очекују и код људи. Анимални модели имају изузетно важну улогу у откривању механизма који могу бити укључени у етиопатогенезу проучаваног стања, као и морфофункционалних промена (*post mortem* анализа мозданог ткива). Значај ових модела огледа се и у проучавању ефикасности различитих фармаколошких и/или бихевиоралних третмана. Иако се мерења могу спровести употребом једног теста, много је боље користити групу тестова (на пример, за процену степена анксиозности ОП тест, УКЛ тест, light/dark box test), с обзиром да ови тестови мере анксиозност под различитим условима и на различите начине. Подаци добијени из више различитих тестова, омогућавају много детаљнију процену појединачног бихевиоралног фенотипа.

Тренутно важећа класификација психијатријских поремећаја обухвата врло хетерогену популацију пацијената, са врло великим разликама у епи(генетским) и разним предиспонирајућим факторима, неуробиолошким механизмима, стресним животним догађајима, као и са врло различитим коморбидитетима. Комплексност самих поремећаја који се проучавају на овим моделима огледа се и у изразитој хетерогености симптоматологије, али и у великим интериндивидуалним разликама у испољавању психијатријских поремећаја, укључујући и поремећаје расположења. Поред тога, главни симптоми појединих психијатријских болести (као што су туга, осећај кривице, губитак самопоуздања, суицидалне мисли) немогуће је директно мерити код животиња. Управо зато, спровести валидно бихевиорално истраживање на добро одабраном анималном моделу је врло комплексан задатак, и акценат у овим истраживањима треба да буде на проучавању посебних психофизиолошких и бихевиоралних одговора који представљају типизоване реакције, односно одговоре животиње на стресну ситуацију и страх, којима је животиња изложена у експерименту.

Посебан значај истраживања на анималним моделима представља могућност испитивања ефеката терапије на неуробихевиоралне манифестације. Од посебног значаја је испитивање ефеката антитуморских лекова, који су врло често праћени различитим неуротоксичним оштећењима (349). Један од најчешћих нежељених ефеката који се развија код пацијената који су на дуготрајној хемиотерапији је периферна неуропатија, посебно карактеристична за терапију цис-платином (350). Ову компликацију прате бол, утрнулост, осећај пецкања у шакама и стопалима, губитак функције периферних нерава, који врло често и дуго могу да перзистирају и након престанка терапије (351). Сви ови симптоми у великој мери ремете нормално физиолошко и психолошко функционисање особе, водећи смањењу квалитета живота (352). Хемиотерапијом изазвана периферна неуротоксичност праћена је болом, сензорним оштећењима, поремећајима сна, осећајем умора (351). Уопштено, неуролошка симптоматологија код ових пацијената праћена је у великој мери психосоцијалним променама. Константно присутан бол додатно може створити и појачати анксиозност и депресију (353). Немогућност дуготрајног стајања или ходања, немогућност обављања радњи које захтевају fine покрете (попут коришћења телефона, тастатуре) стварају осећај несигурности, нервозе, напетости, и могу водити социјалној изолацији, повећаној анксиозности и депресији (354). Поремећаји сна, такође, су врло често присутни код пацијената на хемиотерапији (355). Други, врло чести нежељени ефекти дуготрајне примене ових лекова, попут главобоља, тешких мучнина, повраћања, губитка апетита, болова, такође, могу бити разлог за настанак анксиозности и/или депресије. Невезано за саму терапију, не сме се занемарити чињеница да само сазнање и свест код оболеле особе о присуству тешке малигне болести, која може бити смртоносна, ствара повећану анксиозност и/или депресију.

Управо ова повезаност неуролошке и психијатријске (психопатолошке) симптоматологије онемогаћава да се направи јасна дистинкција који од ових симптома представљају нежељене ефекте саме терапије, а који симптоми су последица психолошке реакције организма на стрес и сазнање о постојању малигне болести, односно утицаја основне болести на бихевиоралне промене. Из ових разлога, анимални модели поседују предност у селективном сагледавању објективних ефеката самог лека, без могућих интеракција са наведеним алтернативним факторима који могу да утичу на појаву психопатолошких симптома, попут повећаног степена анксиозности и депресивности. Нежељени ефекат лека, попут периферне неуропатије, се може

објективно проценити тестом вруће плоче, док је код људи податак о неуролошким сметњама, болу, сензорној симптоматологији, производ субјективног осећаја и није подвргнут објективном мерењу. Поред тога, искључена је и могућност утицаја генетских фактора, као и фактора средине и социјалног окружења, на појаву повећаног степена анксиозности и депресивности код животиња. Праћење појаве и повезаности промена је омогућено у контролисаним експерименталним условима.

Из наведених разлога, у овој студији је коришћен анимални експериментални модел за испитивање бихевиоралних манифестација артефицијално индуковане хиперхомоцистеинемije у мозгу, уз анализу потенцијалних ефеката супституције антиоксидансима.

1.6. Статини

Статини представљају групу лекова који се користе у терапији различитих хиперлипипропротеинемија. Статине је 1971. године открила група јапанских истраживача, која је успела да из одређених микроорганизама изолује супстанце које блокирају ензим одговоран за синтезу мевалоната. Мевалонат у људском организму представља почетни интермедијер у изузетно сложеном путу ендogene биосинтезе холестерола. Из овог открића је настала идеја да би ове супстанце могле блокадом овог ензима утицати на смањење нивоа холестерола у крви. Управо из ових истраживања је изоловано прво такво једињење, које лучи плесан *Penicillium citrinum*, названо мевастатин (ML-236B). Убрзо након тога, из плесни *Aspergillus terreus* је изолован ловастатин (mevinolin, МК803), први статин који је прошао све фазе клиничких истраживања и 1987. године уведен у употребу као лек (356). Након великог успеха овог лека, створени су и уведени у праксу и други статини – симвастатин, правастатин, аторвастатин, росувастатин, флувастатин, питавастатин. Изузетно снажан ефекат статина на липидни статус, чини их, упркос високој цени, једном од најпрописиванијих група лекова, и то превасходно у западним земљама, где је проблем хиперлипипропротеинемија и најзаступљенији. Поред примарне улоге у терапији различитих дислипидемија, статини су заузели врло важно место и у примарној и секундарној превенцији кардио- и цереброваскуларних обољења. Велики пораст у употреби статина потиче и од чињенице да статини поседују и бројна холестерол-независна (такозвана плеиотропна) својства, која испољавају у бројним патолошким

процесима чиме се њихове терапијске индикације, као и корист од саме терапије статинима, у великој мери проширују и изван њихових основних индикација (357).

1.6.1. Механизам дејства и класификација статина

Примарни механизам дејства статина је компетитивна, реверзибилна инхибиција HMG-CoA редуктазе, кључног ензима у биосинтези холестерола у хепатоцитима. HMG-CoA редуктаза катализује конверзију HMG-CoA у L-мевалонат и коензим-А. Везивањем статина за активно место на овом ензиму долази до конформационе промене која значајно смањује функцију овог ензима. Инхибицијом овог ензима, која представља лимитирајући корак у низу великог броја сложених реакција, статини спречавају ендегену продукцију холестерола. Додатно, смањење концентрације холестерола унутар хепатоцита покреће *up*-регулацију експресије рецептора липопротеина ниске густине - LDL (low-density lipoprotein), чиме долази до појачаног преузимања LDL и LDL-прекурсора из системске циркулације (358). Значајни део ефекта статина одговоран за снижење нивоа холестерола у плазми није само последица смањења биосинтезе холестерола, већ управо последица индиректног појачаног уклањања LDL из плазме. Други механизам којим статини смањују ниво липопротеина је инхибиција хепатичке синтезе аполиipoproteина B100, као и смањена синтеза и секреција липопротеина богатих триглицеридима (358).

Свеукупно гледајући, ефекти статина на липидни статус су идентични и огледају се у смањењу нивоа укупног холестерола, LDL, триглицерида, као и у порасту нивоа липопротеина велике густине - HDL (high-density lipoprotein). Поред тога што је основни механизам дејства статина исти, као и ефекти које испољавају на ниво холестерола, постоји више различитих класификација статина, које се базирају на разликама у њиховом пореклу, начину метаболизма, као и разликама у фармакокинетичким и физичко-хемијским особинама. На основу порекла, статини су подељени на две групе. Групу I чине природни статини, добијени ферментацијом из микроорганизама (плесни), у које спадају симвастатин (*Zocor*), ловастатин (*Mevacor*), правастатин (*Lipostat*, *Pravachol*), док групу II чине синтетски статини, и то аторвастатин (*Sortis*, *Lipitor*), флувастатин (*Lescol*), росувастатин (*Crestor*). На основу липофилности (хидрофобности) статини се деле на липофилне (хидрофобне) - симвастатин, ловастатин, аторвастатин, флувастатин, док другу групу чине лиофобни (хидрофилни) статини - правастатин, росувастатин.

Након оралне примене, сви статини се добро апсорбују из црева, пролазе кроз јетру, при чему се значајно смањује њихова биорасположивост, чак за 5-50%. Већина статина има ниску концентрацију у циркулацији и то 12% аторвастатин, 17% правастатин, 20-30% флувастатин, 5% симвастатин и ловастатин, 20% росувастатин (359).

Већина статина се примењује у виду β -хидрокси киселина, осим симвастатина и ловастатина, који се уносе у инактивном облику (лактони) и захтевају пролазак кроз јетру да би процесом хидролизе прешли у своју активну β -хидрокси форму. Унутар системске циркулације, статини се различитим афинитетом везују за албумине. Разлике између статина испољавају се и у односу на њихов полу-живот, као и волумен дистрибуције. Када је реч о метаболизму статина, доминантни метаболички пут за већину статина је преко цитохрома P450 (CYP) у јетри, при чему се симвастатин, ловастатин и аторвастатин метаболишу преко изоформе CYP3A4, док се флувастатин метаболише преко изоформе CYP2C9. За разлику од њих, правастатин се метаболише путем сулфације, док се преко 90% росувастатина уклања билијарном екскрецијом (360). Управо ове разлике у фармакокинетичким параметрима статина сматрају се одговорним за разлике у испољавању како основних холестерол-зависних, тако и њихових плеiotропних (холестереол-независних) својстава. Разлике у овим својствима статина одговорне су и за испољавање њихових нежељених ефеката.

Поред ових основних својстава, статини поседују и бројна друга својства, која су холестерол независна, у која спадају: побољшање ендотелне функције, смањење васкуларне инфламације, стабилизација атеромског плака, смањење агрегације тромбоцита, повећање неоваскуларизације исхемијског ткива, антитромботичко деловање, појачање фибринолизе, имуномодулаторна и антиоксидативна својства (357).

1.6.2. Терапијске индикације (дозирање и начин примене)

Главне терапијске индикације за примену статина су различите хиперлипипропротеинемije (HLP). Оне могу бити примарне (наследне) или секундарне (удружене са различитим болестима или могу настати као последица узимања лекова). HLP се могу поделити према врсти липида који су повишени у крви, према патогенетским узроцима настанка или према томе која је липидна фракција

доминантно повишена. У процени нежељених ефеката појединих HLP врло је важан ниво укупних вредности холестерола и триглицерида, вредности HDL и LDL холестерола, као и њихов међусобни однос.

Примарне хиперлипопротеинемије настају као последица генетских поремећаја у метаболизму појединих липопротеинских честица, услед поремећаја у функцији одговарајућих рецептора, неадекватног садржаја и функције апопротеина, неадекватног дејства ензима који учествују у метаболизму липида или комбинацијом свих наведених поремећаја. У већини случајева карактерше их рана и изражена атеросклероза. Примарне хиперлипопротеинемије су: а) доминантне хиперхолестеролемије у које спадају: полигенска хиперхолестеролемија, фамилијарна хиперхолестеролемија и фамилијарни дефицит аро В 100; б) доминантне хипертриглицеридемије у које спадају: фамилијарна хипертриглицеридемија, фамилијарни дефицит липопротеинске липазе, фамилијарни недостатак аро СII; в) хиперхолестеролемије удружене са хипертриглицеридемијом у које спадају: фамилијарна комбинована хиперлипидемија и дисбеталипопротеинемија (361).

Секундарне HPL могу бити узроковане егзогеним или ендогеним факторима, већином су реверзибилне природе (за разлику од примарних HPL), уколико је могуће успешно лечење основне болести. У односу на болести крвних судова, секундарне HPL су изузетно важан фактор ризика за њихов настанак. Најчешћи узроци секундарних HPL су: унос хране богате засићеним масним киселинама, исхрана богата угљеним хидратима, конзумирање алкохола, гојазност, трудноћа, хипотиреоидизам, хипопитуитаризам, Кушингов синдром, нефротски синдром, примарна билијарна цироза јетре, хронична бубрежна инсуфицијенција, diabetes mellitus, употреба лекова (прогестерон, циклоспорин, тиазиди, бета-блокатори, естрогени, гликокортикоиди, инхибитори протеаза) (361). У случају да одговор на дијету или било какав нефармаколошки третман (физичка активност или регулација телесне масе) није адекватан, у терапију је неопходно увести статине, као монотерапију, или у комбинацији са другим лековима.

Сви статини се примењују орално, у виду таблета. Дозирање је индивидуално и зависи од степена хиперлипопротеинемије, као и од присуства других фактора ризика и коморбидитета. Дозе симвастатина се крећу између 5-80 mg дневно. Примењују се орално, као појединачна доза, увече. Почетне дозе се крећу од 10-20 mg. Код тежих HPL може се кренути и са дозом од 20-40 mg. Прилагођавање дозе, уколико је неопходно, треба обављати у интервалима не краћим од четири недеље, до максималне

дозе од 80 mg, која се препоручује само пацијентима са тешком хиперхолестеролемијом код којих постоји висок ризик од појаве кардиоваскуларних компликација, а код којих циљ лечења није постигнут мањим дозама, и када се очекује да би корист од терапије била већа од ризика. Аторвастатин се примењује у почетној дози од 10 mg, једном дневно. Уколико је потребно, доза се може повећати. Подешавање дозе се врши у интервалима од 4 или више недеља. Највећа доза аторвастатина за одрасле износи 80 mg. Аторвастатин се може бити било када у току дана, са или без хране. Потребно је да се овај лек узима свакога дана у исто време (361).

Врло важно место статини имају у примарној и секундарној превенцији КВБ. На основу података из великог броја рандомизираних клиничких студија, најновије препоруке водича за примену статина у превенцији кардиоваскуларних болести (КВБ) дефинисале су врло прецизно групе пацијената код којих би терапија статинима значајно допринела у превенцији ових болести (362). Ове групе обухватају: (i) пацијенте са клиничким атеросклеротским КВБ, попут акутног коронарног синдрома, претходног инфаркта миокарда, стабилне и нестабилне ангине, коронарне или друге артеријске реваскуларизације, потом пацијенте са можданим ударом, са транзиторним исхемијским атаком, као и периферном артеријском болешћу атеросклеротског порекла; (ii) особе са примарним порастом нивоа LDL-C ≥ 190 mg/dL, (iii) особе старости 40-75 година са дијабетесом, као и нивоом LDL-C 70-189 mg/dl; (iv) особе старости 40-75 година са LDL-C 70-189 mg/dL и процењеним десетогодишњим ризиком од атеросклеротских КВБ $\geq 7.5\%$. С обзиром да су ови водичи имплементирани у клиничку праксу, број пацијената којима се препоручује терапија статинима је значајно порастао (363).

1.6.3. Нежељени ефекти примене статина

Имајући у виду изузетно велики број пацијената који се налазе на терапији статинима, добро познавање нежељених ефеката ових лекова је од изузетне важности како у одабиру самог лека, тако и његовог дозирања. Најчешћи нежељени ефекти примене статина су оштећења мишића различитог степена, оштећења јетре, пораст нивоа глукозе у крви, дигестивни проблеми, когнитивни поремећаји, као и појава осипа.

Оштећења мишића се јављају код чак 30% пацијената који су на терапији статинима (364). Клинички, ови симптоми се могу јављати у виду миопатије (слабост мишића), миозитиса (упала мишића), мионекрозе (коју карактерише пораст нивоа ензима креатин киназе), рабдомиолизе (тешка мионекроза са миоглобинуријом и акутном бубрежном инсуфицијенцијом), као и мијалгије (болони у мишићима). Блага мијалгија се јавља код 5-10% пацијената годишње и често је интермитентна. Животно угрожавајућа, тешка рабдомиолиза се јавља код 0.001% - 0.005% пацијената, односно код једног до пет на 1000 пацијената годишње. Показано је да статини утичу на мишићно ткиво тако што доводе до промена у функцији митохондрија и коришћењу ћелијске енергије, као и падом нивоа коензима Q10. Пацијенти који су у већем ризику да добију неки вид оштећења мишића су пацијенти са другим коморбидитетима или на терапији другим лековима.

Оштећења јетре су релативно ретка и јављају се код 3% пацијената који примају статине, а манифестују се порастом нивоа трансаминаза, које представљају маркер оштећења јетре. Ова оштећења су дозно зависна, обично реверзибилног типа, благог до умереног степена и најчешће нису повезана са дуготрајном дисфункцијом јетре.

Показано је да употреба статина доводи до повећаног ризика за настанак типа 2 дијабетеса, тако што доводи до измена у сигналним путевима инсулина, утиче на функцију панкреасних бета ћелија, као и да може довести до пораста инсулинске резистенције (364). Постоје докази да поједини статини могу бити дијабетогени, при чему је ризик од настанка дијабетеса дозно зависан. Питање да ли употреба статина доводи до значајног пораста нивоа глукозе у крви и доприноси настанку дијабетеса типа 2, додатно се компликује чињеницом да и *diabetes mellitus* тип 2, КВБ, као и пораст нивоа LDL-а имају заједничке факторе ризика.

Употреба статина може утицати и на поремећај бубрежне функције и то на два начина. Тешка рабдомиолиза може изазвати опструкцију бубрежних тубула, оштећење бубрега и исхемију. Такође, употреба статина може бити повезана са бенигном протеинуријом услед инхибиције тубуларне реабсорпције протеина мале молекулске тежине. Међутим, дуготрајна терапија статинима не доводи до реналне дисфункције (364).

Нежељена дејства изазвана употребом статина показују велику варијабилност међу пацијентима. Ова варијабилност је последица утицаја различитих фактора попут

генских полиморфизама, коадминистрације других лекова, пола, телесне масе, коморбидитета (болести јетре и бубрега, *diabetes mellitus*), конзумирања алкохола. Популација старих људи је у повећаном ризику од настанка нежељених дејстава због смањеног капацитета за метаболисање лекова, коришћења различитих врста лекова, као и смањене мишићне масе. Поред тога, интеракције статина са другим лековима могу додатно појачати испољавање њихових штетних ефеката. Лекови који су снажни инхибитори СУР3А4 (итраконазол, кетоназол, амјодарон, циклоспорин, ритонавир, индинавир) примењени у комбинацији са статинима могу довести до тешке рабдомиолизе и акутне бубрежне инсуфицијенције (365).

1.6.4. Статини и оксидативни стрес

Главни фактори ризика за настанак кардиоваскуларних болести као што су хиперхолестеролемија, *diabetes mellitus*, пушење, метаболички синдром, хипертензија, су повезани са повећаним стварањем реактивних кисеоничних врста. Повећање ROS као и последични пад васкуларне биорасположивости азот монооксида су уочени као патогенетски механизми који су укључени у ендотелну дисфункцију, патолошки процес који је повезан са настанком бројних КВБ. Као кључни медијатор у ендотелној функцији посебно је истаткнут NO, који свој ефекат испољава преко ендотел зависне васкуларне релаксације. Реакција између супероксид радикала, који настаје под дејством NADPH оксидазе или ксантин оксидазе и NO, доводи до појачаног стварања пероксинитрита, изузетно реактивне азотне врсте, која појачава стварање ROS и убрзава процес атеросклерозе директним структурним оштећењима (366). У анималним моделима је показано да појачана продукција ROS иницира атеросклерозу и то доводећи до дисфункције васкуларних ћелија, хипертрофије интима, формирања и дестабилизације атеросклеротског плака. Управо улога ROS у настанку атеросклеротских промена и последичном развоју КВБ наметнула је испитивање антиоксиданаса као потенцијалних терапијских агенаса. Међутим, бројне клиничке као и претклиничке студије нису успеле да потврде позитиван утицај класичних антиоксиданаса попут витамина С и Е, фолне киселина у комбинацији са витамином С, на кардиоваскуларне исходе (366).

Најновија истраживања су указала да статини могу имати позитивну улогу у овим обољењима и то управо путем антиоксидативних својстава које поседују. Наиме, индиректан антиоксидативни ефекат статини испољавају стимулацијом продукције NO

и истовременом инхибицијом стварања супероксид анјона (под дејством NADPH оксидазе) (367). Студије на анималним моделима, као и на културама ћелија су потврдиле да статини испољавају ефекат на расположивост азот монооксида, као и на редокс статус васкуларних ћелија. У хуманим ендотелним ћелијама је показано да аторвастатин доводи до усходне регулације експресије каталазе без утицаја на SOD изоформе и експресију GPx (368). У васкуларним глатким мишићним ћелијама симвастатин је изазвао експресију хем оксигеназе, важног ензима антиоксидативне заштите, како *in vitro*, тако и *in vivo* (369). Код спонтано хипертензивних пацова, симвастатин је довео до појачане експресије SOD и GPx у аортним прстеновима (370). Такође, и питавастатин је довео до повећане активности Cu/ZnSOD у ткиву аорте, као и до смањења продукције супероксид анјон радикала (371). На основу резултата ових студија може се закључити да статини доводе до побољшања система антиоксидативне заштите појачаном елиминацијом ROS на ћелијском нивоу. Позитиван ефекат статина на функцију ендотела се огледа и у смањењу нивоа LDL- холестерола, што појачава NO-зависну вазодилатацију и инхибира оксидативни стрес у зиду крвног суда (372). Плеiotропни ефекти статина одговорни су и за директне антиоксидативне ефекте у крвним судовима (368, 373). Показано је да статини инхибирају преузимање, као и стварање оксидисаних LDL, чиме у великој мери очувању нормалне васкуларне функције и крвотока (358).

Најновије студије су указале да је NADPH оксидаза главни извор стварања супероксид анјона у крвним судовима (374), као и у ЦНС-у (375). Један од механизма којим статини испољавају своја плеiotропна својства је инхибиција ензима NADPH оксидазе. Наиме, статини доводе до нисходне регулације активности и експресије изоформи NADPH оксидазе Nox1 (368) и Nox2 (373). До инхибиције NADPH оксидазе доводе аторвастатин, симвастатин, росувастатин и флувастатин (376). Поред тога, показано је да своја антиоксидативна својства статини испољавају и очувањем нивоа витамина Е и С, као и ендогених антиоксиданаса попут убиквиноа и глутатиона у LDL партикулама (377, 378, 379). На основу наведених података се може закључити да статини не само да доводе до смањења нивоа оксиданаса, већ обнављају и антиоксидансе, смањујући на овај начин ниво оксидативног стреса у васкуларном систему, чиме се може додатно објаснити њихов позитиван клинички ефекат.

1.6.5. Статини и оксидативна оштећења možданог ткива

Ефекти статина на централни нервни систем су постали предмет истраживања новијег датума. Наиме, бројне студије су показале да статини поседују неуропротективна својства, али сами механизми који се налазе у основи ових својстава још увек су неразјашњени. Имајући у виду чињеницу да је метаболизам холестерола у мозгу изразито специфичан, као и потпуно независан од метаболизма холестерола у циркулацији, може се закључити да су ефекти статина на možдано ткиво последица њихових плеиотропних (холестерол-независних) својстава. Између осталих, антиоксидативна својства статина могу представљати потенцијално објашњење за неуропротективне ефекте које статини остварују у možданом ткиву.

У студијама на анималним моделима потврђен је антиоксидативни ефекат статина у možданом ткиву. Наиме, аторвастатин је испољио позитиван ефекат на степен липидне пероксидације у ткиву хипокампуса код мишева након тронедељног програма физичке активности (380), као и на моделу индуковане хипертензије код пацова (381). Смањење нивоа MDA у možданом ткиву мишева је испољио и симвастатин, након тронедељног програма физичке активности (380). Симвастатин је смањио индекс липидне пероксидације и спречио смрт кортикалних неурона који су били изложени депривацији кисеоника и глукозе (382). Показано је да примена статина доводи и до пораста активности ензима антиоксидативне заштите, што је и потврђено у студији у којој је аторвастатин овај ефекат испољио на SOD у мозгу пацова на моделу индуковане хипертензије (381), док је позитиван ефекат симвастатина на активност овог ензима, као и на апоптозу хипокамбалних ћелија, потврђен код пацова на моделу сенилне деменције (383). Исти ефекат на активност CAT аторвастатин је испољио и у другој студији, на моделу тронедељног програма физичке активности (380). Такође, пораст активности каталазе у хипокамбалним ћелијама забележен је и након апликације симвастатина на моделу сенилне деменције (383). Аторвастатин је довео до смањења оксидативног оштећења у мозгу на претклиничком моделу Алзхајмерове болести, и то смањењем нивоа ROS и RNS након хроничног третмана (80 mg дневно, 14 месеци) (384). Слични закључци изведени су и из студија на мишевима, где су аторвастатин, примењен у дози од 10 mg/kg дневно (385), као и симвастатин, у дози од 20 mg/kg дневно, довели до смањења оксидативних оштећења, као и смањења инфламације (386). Статини су смањили ослобађање инфламаторних медијатора, као и

ниво RNS у астроцитима у моделима неуроинфламације изазване А β (387), тако и у моделу фокалне церебралне исхемије (388). На основу резултата наведених студија се може закључити да статини смањују оксидативна оштећења, али су неопходне детаљније студије, пре свега на анималним моделима, са циљем појашњавања самих механизма који доводе до испољавања ових ефеката.

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

На основу претходно изнетих података и резултата истраживања већег броја аутора, постављени су следећи циљеви овог истраживања:

1. Утврђивање бихевиоралних ефеката дуготрајне примене дијететског протокола са повећаним садржајем метионина код пацова.
2. Утврђивање бихевиоралних ефеката дуготрајне примене дијететског протокола са повећаним садржајем метионина уз истовремени недостатак фолата, пиридоксина и кобаламина код пацова.
3. Утврђивање бихевиоралних ефеката суплементације статинима (аторвастатин и симвастатин) током дуготрајне примене дијететског протокола са повећаним садржајем метионина код пацова.
4. Утврђивање бихевиоралних ефеката суплементације статинима (аторвастатин и симвастатин) током дуготрајне примене дијететског протокола са повећаним садржајем метионина уз истовремени недостатак фолата, пиридоксина и кобаламина код пацова.
5. Утврђивање вредности параметара оксидативног стреса у ткиву мозга током дуготрајне примене дијететског протокола са повећаним садржајем метионина.
6. Одређивање параметара оксидативног стреса у ткиву мозга током дуготрајне примене дијететског протокола са повећаним садржајем метионина уз истовремени недостатак фолата, пиридоксина и кобаламина код пацова.
7. Утврђивање утицаја суплементације статинима (аторвастатин и симвастатин) на промене параметара оксидативног стреса у ткиву мозга током дуготрајне примене дијететског протокола са повећаним садржајем метионина са или без истовременог недостатка фолата, пиридоксина и кобаламина код пацова.
8. Испитивање потенцијалне повезаности бихевиоралних промена са променама параметара оксидативног стреса у ткиву мозга насталих након спровођења наведених дијететских протокола са или без суплементације статинима код пацова.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Услови под којима су животиње чуване током трајања експерименталних протокола

У овој студији су коришћени мужјаци пацова Wistar albino соја, старости 4 недеље, телесне масе 100 ± 15 g. Животиње су чуване у стандардним транспарентним кавезима од плексигласа (59x38x20 cm), по 4 животиње у сваком кавезу. Животиње су имале слободан приступ води, као и стандардној и специјалној лабораторијској храни без ограничења (*ad libitum*) током 30 дана третмана. Амбијентални услови су били константни и подразумевали су одржавање температуре на 23 ± 1 °C, док је влажност ваздуха била одржавана на 55 ± 5 %, а циклус светлост/тама је био подешен на 12 сати (почетак светле фазе је био у 8:00). Интензитет светла у виваријуму је био 120 лукса. Током целокупног истраживања (третмана) је било обезбеђено одсуство свих звучних, механичких и светлосних сензација које би могле неповољно да утичу на понашање животиња. Кавези су чишћени два пута недељно уз минималне манипулације животињама. Животиње су набављене из Одељења за узгој лабораторијских и експерименталних животиња, Војномедицинска академија Београд. Током експерименталног протокола животиње су чуване у виваријуму Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

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 од стране Етичког одбора за добробит експерименталних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

3.2. Експерименталне групе и третман

Истраживање је обухватило 72 животиње које су биле подељене у девет (9) експерименталних група (8 животиња у групи):

1. контролна група – животиње са стандардном исхраном предвиђеном за ту врсту глодара (К)
2. експериментална група са аторвастатином – животиње са стандардном исхраном предвиђеном за ту врсту глодара уз суплементацију аторвастатином једном дневно (Ст+А)
3. експериментална група са симвастатином – животиње са стандардном исхраном предвиђеном за ту врсту глодара уз суплементацију симвастатином једном дневно (Ст+С)
4. експериментална група са повећаним уносом метионина – животиње са специјалном храном са повећаним садржајем метионина (M^+)
5. експериментална група са повећаним уносом метионина уз суплементацију аторвастатином – животиње са специјалном храном са повећаним садржајем метионина уз суплементацију аторвастатином једном дневно (M^+ +А)
6. експериментална група са повећаним уносом метионина уз суплементацију симвастатином – животиње са специјалном храном са повећаним садржајем метионина уз суплементацију симвастатином једном дневно (M^+ +С)
7. експериментална група са повећаним уносом метионина и недостатком витамина В комплекса – животиње са специјалном храном са повећаним садржајем метионина и смањеним садржајем витамина В комплекса (M^+B^-)
8. експериментална група са повећаним уносом метионина и недостатком витамина В комплекса уз суплементацију аторвастатином – животиње са специјалном храном са повећаним садржајем метионина и смањеним садржајем витамина В комплекса уз суплементацију аторвастатином једном дневно (M^+B^- +А)
9. експериментална група са повећаним уносом метионина и недостатком витамина В комплекса уз суплементацију симвастатином – животиње са специјалном храном са повећаним садржајем метионина и смањеним садржајем витамина В комплекса уз суплементацију симвастатином једном дневно (M^+B^- +С)

Третман

У литератури су описани различити начини изазивања хиперхомоцистеинемije, како код људи, тако и на животињама. Анимални модели хиперхомоцистеинемije се заснивају на индукцији повишених нивоа хомоцистеина ($>15\mu\text{mol/l}$) код дивљих животиња различитим методама: генетским, фармаколошким, као и хигијенско-дијететским. У циљу изазивања хиперхомоцистеинемije (у овом истраживању) генетски интактне животиње биле су подвргнуте режиму хиперметионинске дијете, која представља еквивалент богатој метионинској исхрани у општој хуманој популацији (389). На основу претходних истраживања која су потврдила везу између нивоа витамина В комплекса (пиридоксина-В₆, фолата-В₉ и кобаламина-В₁₂) и анксиозних поремећаја (390), повећани унос метионина комбинован је са уносом различитог садржаја витамина В групе. Примењени протоколи су подразумевали специјалну исхрану са повећаним садржајем метионина или исхрану са повећаним садржајем метионина и недостатком пиридоксина, фолата и кобаламина према раније утврђеном протоколу (391). У овој експерименталној студији су употребљене специјалне дијете за пацове различитог састава произвођача *Mucedola*, Милано, Италија, док је контролна група храњена стандардном храном за пацове. Упоредни приказ састава контролне и специјалне исхране којој су били подвргнути пацови у трајању од четири недеље је приказан табеларно (Табела 3.1.). Пре употребе храна је чувана по упутству произвођача, на сувом, тамном и хладном месту, на температури од +4 до +1°C.

Примена статина уз хроничне дијететске протоколе је дефинисана на основу претходних студија које су показале да терапија статинима има позитиван ефекат на оксидативни стрес (392, 393). Поједине групе животиња су уз наведене дијететске протоколе примале аторвастатин у дози од 3 mg/kg, интраперитонеално, или симвастатин у дози од 5mg/kg, интраперитонеално, свакога дана у исто време. Да би све групе биле изложене истим манипулативним условима, контролна група, група на исхрани обогаћеној метионином и група на исхрани обогаћеној метионином са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса, примале су свакодневно интраперитонеално физиолошки раствор у запремини од 3 ml, током трајања истраживања. На тај начин су избегнуте могуће разлике услед стресогеног ефекта самог чина администрације. Примењени протоколи су трајали 30 дана. Након 24 сата од завршетка дијететских протокола, животиње су пребачене у просторију где се изводе бихевиорални тестови (2 сата пре почетка тестирања, у циљу аклиматизације).

Слика 3.1. – Упоредни приказ састава хране током једномесечног третмана

САСТАВ	СТАНДАРДНА ХРАНА	ХРАНА ОБОГАЂЕНА МЕТИОНИНОМ	ХРАНА ОБОГАЂЕНА МЕТИОНИНОМ БЕЗ ВИТАМИНА
ВИТАМИНИ			
<i>Витамин В₆ (mg/kg)</i>	70,0	70,0	0,01
<i>Витамин В₉ (mg/kg)</i>	2,0	2,0	0,08
<i>Витамин В₁₂ (mg/kg)</i>	0,03	0,03	0,01
Витамин А (IU/kg)	4000	4000	4000
Витамин D ₃ (IU/kg)	1000	1000	1000
Витамин Е (mg/kg)	25	25	25
МАКРОНУТРИТИЈЕНСИ			
<i>Метионин (g/kg)</i>	3,8	7,7	7,7
Протеини (Казеин, %)	20	18,5	18,5
Масти (%)	7,5	7,5	7,5
Угљени хидрати (%)	2	2	2
МИНЕРАЛИ И ОЛИГОЕЛЕМЕНТИ			
Na (Натријум, %/kg)	0,15-0,25	0,15-0,25	0,15-0,25
Fe (Гвожђе цитрат, mg/kg)	40,2	40,2	40,2
P (Фосфор, %/kg)	0,5	0,5	0,5
Mn (Манган карбонат, mg/kg)	10,5	10,5	10,5
Zn (Цинк карбонат, mg/kg)	33,5	33,5	33,5
Cu (Бакар карбонат, mg/kg)	6,2	6,2	6,2
I (Калијум јодид, mg/kg)	0,21	0,21	0,21
Se (Натријум селенит, mg/kg)	0,15	0,15	0,15
Mo (Амонијум молибдат, mg/kg)	0,15	0,15	0,15
t-butylhydroquinone (mg/kg)	14	14	14
Остатак (%)	10	4	4

3.3. Бихевиорална тестирања

Након 24 сата од завршетка дијететских протокола, животиње су пребачене у својим кавезима у просторију за извођење бихевиорални тестова (око 9 часова ујутру) где су проводиле 1-2 сата како би се адаптирале на услове окружења пре почетка

извођења тестова. Бихевиорални тестови су извођени под одговарајућим условима тишине и осветљења. Животиње из истих кавеза тестиране су истога дана. Све експерименталне групе подвргнуте су тестовима по одговарајућем редоследу: тест отвореног поља, тест уздигнутог крстастог лавиринта, тест качења о реп и тест вруће плоче. С циљем избегавања (минимизирања) кумулативних проанксиозних ефеката узастопно извођених тестова, између ових тестова прављена је пауза од 15 минута.

3.3.1. Тест отвореног поља (ОП тест)

Тест отвореног поља служи за процену промена расположења (243), али је такође и један од најчешће коришћених тестова за процену опште локомоторне активности код глодара (244). Лавиринт се састојао од црне, дрвене четвртасте арене (димензија 60x60x30 cm). У циљу процене просторне дистрибуције активности, цело поље је софтверски виртуелно подељено на 16 квадрата, од којих су средишњи квадрати укупних димензија 20x20cm означени као централна зона (Слика 3.1.). На почетку теста животиње су постављане у централни део арене и током петоминутног трајања теста снимана је њихова спонтана активност. У току извођења теста експериментатор није био присутан у соби у којој се изводило тестирање. Извођење овог теста је реализовано у условима адекватног осветљења и тишине. Активност животиње се снимала дигиталном видео камером која је постављена на одговарајућој висини изнад арене, а видео записи су накнадно анализирани уз коришћење одговарајућег софтвера. Након сваког снимања лавиринт је чишћен (вода и раствор 70% етил-алкохола) да би се елиминисале могуће мирисне сензације које су могле да утичу на понашање. Након завршеног тестирања животиње су враћане у своје кавезе.

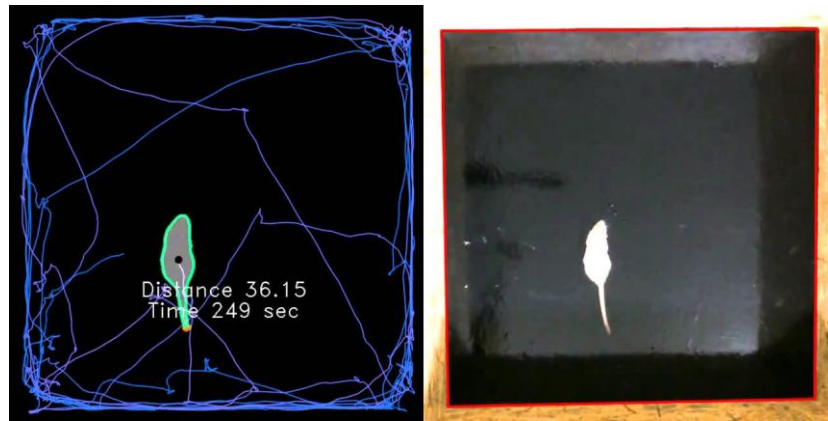
Параметри који су били праћени у тесту отвореног поља су:

1. укупни пређени пут (УПП) - укупна раздаљина пређена током пет минута трајања теста, изражена у cm;
2. проценат времена кретања током трајања теста (% ВК) - проценат времена трајања мобилности животиње у односу на укупно трајање теста;
3. просечна брзина кретања (ПБК) - средња вредност брзине кретања током теста, изражена у cm/s;
4. укупно време проведено у централној зони (УВПЦЗ) - време проведено у виртуелној зони, димензија 20 x 20 cm, која се налазила у средини арене ОП теста,

изражено у s;

5. број улазака у централну зону (БУЦЗ) - број посета виртуелној централној зони арене ОП теста;

6. број усправљања (БУ) - број подизања на задње шапе.



Слика 3.2. Приказ теста отвореног поља

Образац кретања у арене говори о анксиозном статусу животиње. Уколико се животиња слободно кретала у свим зонама арене и уколико је слободно улазила и боравила у централној зони (повећање УВПЦЗ и БУЦЗ), може се рећи да таква животиња показује мањи степен анксиозности. Животиње које највише времена проведу у угловима арене и у периферним зонама, показују повећан степен анксиозности. Параметри као што су УПП, ПБК и % ВК описују локомоторну активност животиње и уколико су наведени параметри смањени, то говори о смањеној локомоторној активности животиње, као и (индиректно) о повећаном степену анксиозности. БУ описује експлоративну активност животиње и уколико дође до повећања овог параметра може се закључити да је животиња подстакнута новом околином и да је мотивисана да истражује. Такође, умањена експлоративна активност (смањење БУ) се може сматрати индиректним показатељем повећања степена анксиозности

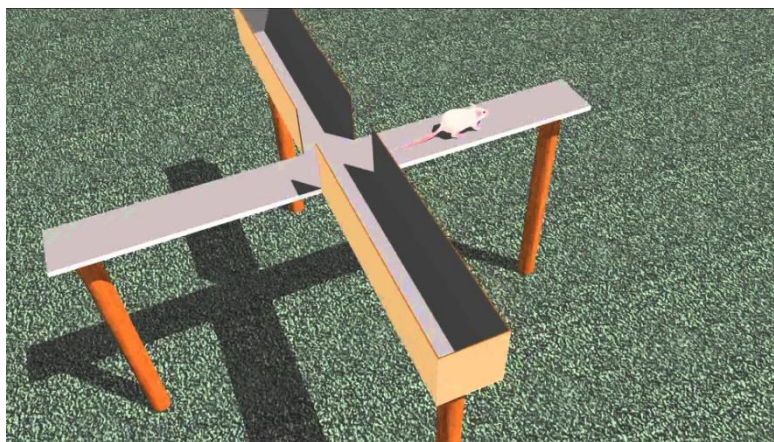
3.3.2. Тест уздигнутог крстатстог лавиринта (УКЛ тест)

Тест уздигнутог крстатстог лавиринта представља најчешће коришћени тест за процену степена анксиозности код глодара. Поред тога што пружа детаљније информације о степену анксиозности, овај тест је прошао најобимније валидације (245, 246). Овај тест се састоји од веома једноставне апаратуре и базира се на урођеној тежњи глодара да испитују нове, непознате просторе. Лавиринт се састоји од два отворена (димензија 50×20 cm) крака и два затворена крака (50×20×30 cm). Ова два крака су постављена под углом од 90 степени и уздигнута 100 cm од пода (Слика 3.2.). Животиње су постављане у центар лавиринта и то главом окренутом ка отвореном краку, при чему је у току петоминутног трајања теста, животињама омогућено да слободно истражују простор лавиринта. У овој арили животиње су имале избор да ли ће истраживати затворене (безбедне) или отворене (небезбедне) краке. Активност животиње је снимана дигиталном видео камером, постављеном на висини од 250 cm изнад уздигнутог крстатстог лавиринта. Док је трајало тестирање, експериментатор није био присутан у просторији. Овај тест је спроведен у условима адекватног осветљења и тишине. Након завршетка сваког снимања, лавиринт је чишћен (вода и раствор 70% етил-алкохола), да би се уклониле могуће мирисне сензације које су могле да испоље утицај на понашање животиње. По завршетку тестирања, животиње су враћане у своје кавезе.

Параметри који су били праћени у тесту уздигнутог крстатстог лавиринта су:

1. укупно време проведено у отвореним крацима (УВПОК) - време проведено у деловима лавиринта без бочних зидова, изражено у s;
2. број улазака у отворене краке (БУОК) - број посета деловима лавиринта без бочних зидова;
3. укупни пређени пут (УПП) - укупна раздаљина пређена током петоминутног трајања теста, изражена у cm;
4. просечна брзина кретања (ПБК) - средња вредност брзине кретања током теста, изражена у cm/s;
5. проценат времена кретања током трајања теста (% ВК) - проценат времена трајања мобилности животиње у односу на трајање теста;
6. број усправљања (БУ) - број подизања на задње шапе;
7. број нагињања (БН) - број савијања главе испод површине основе отворених кракова лавиринта;

8. број епизода укупне експлоративне активности (УЕА) - збир БУ који се региструје углавном у затвореним крацима и БН који се уочава искључиво у отвореним крацима (13).



Слика 3.3. Апаратура за извођење теста уздигнутог крстастог лавиринта

Степен анксиозности се процењује преко вредности директних параметара, и то преко УВПОК и БУОК. Повећаним степеном анксиозности се сматра ако су животиње мање времена проводиле у отвореним крацима (смањење УВПОК) и уколико су имале мањи број улазака у отворене краке (БУОК). Као индиректни параметри за процену степена анксиозности користе се параметри локомоторне активности. Смањење вредности ових параметара (УПП, ПБК и % ВК) говоре о повећаном степеном анксиозности. Поред ових, смањење вредности показатеља експлоративне активности (БУ, БН, УЕА), такође, говоре о повећаном степеном анксиозности код животиња.

3.3.3. Тест качења за реп (ТКР)

Тест качења за реп (ТКР) је установљен као скрининг тест за процену поремећаја расположења код глодара (292), при чему је његова доминантна улога у испитивању степена депресивности (295). Апарат за извођење овог теста се састајао од металног оквира (60x60 cm). У централном делу оквира налази се део за који се, помоћу адхезивне траке, фиксира животиња (Слика 3.3.). На 1 cm испод места где се животиња качи о реп, поставља се циркуларна баријера од пластике (пречника 25 cm), да би се избегло пењање животиње ка репу. Током тестирања животиња се поставља да виси главом окренутом на доле (окачена за реп). Тест качења за реп се заснива на чињеници да ће животиња, када се доведе у неприродну, безизлазну ситуацију, покушати да се

избави из те ситуације (подизањем тела, покушајима да се дохвати за реп), али да ће после одређеног времена одустати од даљих покушаја и доћи у стање имобилности. За стање имобилности се сматрало стање у коме животиња није испољила видљиве вољне покрете (обим покрета мањи од 1 cm) главе, тела или екстремитета у трајању од најмање 5 секунди. Једним обликом имобилности се сматрало и невољно љуљање. Тест се изводио у трајању од 6 минута. Током трајања тестирања, код животиња су се наизменично смењивали периоди моторне активности и имобилности. Извођење теста се снимало дигиталном видео камером, док је тестирање вршено у условима тишине. По завршетку сваког теста, апарат је чишћен водом и раствором 70% етил-алкохола да би се уклониле могуће мирисне сензације које би могле да утичу на понашање животиње. Након завршеног тестирања, животиње су враћане у своје кавезе.



Слика 3.4. Апаратура за извођење теста качења за реп

Параметри који су били праћени у ТКР су:

1. време до појаве прве имобилности (ВППИ) - латенца до првог одустајања од покушаја да се изађе из новонастале ситуације, изражена у s;
2. број епизода имобилности (БЕИ) - укупан број периода одсуства активног супростављања неприродној позицији;
3. укупно трајање имобилности (УТИ) - укупно време пасивних животиње на постојеће околности, изражено у s;
4. просечно трајање епизоде имобилности (ПТЕИ) - средња дужина трајања епизоде пасивног положаја, изражена у s.

Пораст вредности за БЕИ, УТИ и ПТЕИ, као и смањење вредности за ВППИ су

сматрани за индикаторе којима се потврђује повећан степен депресивности код испитиваних животиња.

3.3.4. Тест вруће плоче (ВП тест)

Тест вруће плоче се користи за процену брзине реакције на термални стимулус (345). Апарат се састојао од четвртасте металне плоче (димензија 43x43 cm) и стаклених зидова (висине 30 cm) да би се могло пратити понашање животиње (Слика 3.4.). Животиње су појединачно постављане на централни део плоче, чија је температура током тестирања одржавана на $51\pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Параметар који се у овом тесту користи је латенца, односно време (изражено у s), које протекне од тренутка када се животиња постави на загрејану подлогу, па до тренутка када испољи карактеристичну реакцију на термални стимулус. Реакција се може манифестовати одвајањем задњих шапа од подлоге, лизањем задњих шапа, трешењем, као и одскакивањем од подлоге (са сва четири екстремитета истовремено). Тест се прекида након 180 секунди, како би се спречио настанак опекотина код животиње. Скраћење времена до реакције животиње на термални стимулус представља хипералгезијски ефекат, док се продужетак времена до реакције карактерише као хипоалгезија.



Слика 3.5. Апаратура за извођење теста вруће плоче

3.3.5. Снимање и анализа видео записа

Извођење тестова је снимано дигиталном видео камером, а добијени видео записи су обрађивани помоћу одговарајућег софтверског пакета (*Ethovision software [version XT 10 base] Noldus Information Technology, the Netherlands*), у циљу добијања нумеричких параметара за квантификацију бихевиоралних манифестација.

3.4. Одређивање параметара оксидативног стреса у ткиву хипокампуса

После завршеног бихевиоралног тестирања, животиње су, након анестезије (интраперитонеално примењена комбинација кетамина - 10 mg/kg и ксилазина - 5 mg/kg) жртвоване декапитацијом на гилјотини. Након брзе ексцизије можданог ткива, узорци ткива хипокампуса, добијени пажљивом дисекцијом (на леду) од осталих структура мозга, су хомогенизовани у раствору фосфатног пуфера (PBS - *Phosphate Buffered Saline*, 10 mM фосфатни пуфер, 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH = 7,4), уз претходно дефинисање величине узорка (запремина у ml). Хомогенати су центрифугирани на 4000 обртаја у у минуту, током 15 минута на температури од 4 °C. Издвојени супернатанти су коришћени за одређивање параметара оксидативног стреса: индекса липидне пероксидације, супероксид-дисмутазе, каталазе и укупног глутатиона.

3.4.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (изражен као TBARS) у хипокампусу

Индекс липидне пероксидације у узорцима ткива хипокампуса одређен је по методи коју су описали *Ohkawa* и сарадници (394). Количина продуката, који настају липидном пероксидацијом полинезасићених масних киселина у ткивном хомогенату, одређује се у реакцији са 2-тиобарбитурном киселином (ТВА). Ова реакција се одиграва на високој температури (90-100°C) и у киселој средини. Супстанце које реагују са тиобарбитурном киселином (TBARS) граде обојени комплекс, чија се концентрација мери спектрофотометријски и изражава у еквивалентима малондиалдехида (MDA), који представља производ липидне пероксидације полинезасићених масних киселина у ткивима.

Реагенси:

1. 8.1% натријум додецил сулфат (SDS, *Sigma–Aldrich CHEMIE GmbH*, Немачка)
2. 20% сирћетна киселина (pH 3.5)
3. 0.8% 2-тиобарбитурна киселина (ТВА, *ABCR GmbH*, Немачка) растворена у 0.5 M NaOH
4. Основни раствор стандарда 1,1,3,3-тетраетоксипропана (*ACROS ORGANICS*, Белгија) концентрације 1 mmol/L

Израчунавање: Концентрација MDA у узорцима израчуната је коришћењем

стандардне праве 1,1,3,3-тетраетоксипропана у опсегу концентрација од 1-10 $\mu\text{mol/L}$. Количина TBARS изражена је у еквивалентима MDA (nmol MDA по 1 mg протеина) коришћењем следеће једначине:

$$\text{nmol MDA/mg протеина} = \frac{\text{nmol MDA/l}}{\text{Спротеина mg/l}}$$

где је: nmol MDA/L , концентрација MDA очитана са стандардне праве; $\text{C}_{\text{протеина}}$ mg/L , концентрација протеина изражена у милиграмима у 1 L хомогената.

3.4.2. Одређивање активности супероксид-дисмутазе (SOD) у хипокампусу

Активност ензима супероксид-дисмутазе у хомогенату ткива хипокампуса одређена је по методи коју су описали *Misra* и *Fridovich* (395). Метода је заснивана на способности SOD-е да неутралише супероксил анјон радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$) који настаје спонтаном аутооксидацијом адреналина (епинефрина) у базној средини на $\text{pH } 10.2$. Оксидација адреналина започиње у базном раствору, при чему настаје адренохром, чија боја може бити од ружичасте до браон, за разлику од епинефрина који је безбојан. Степен оксидације епинефрина у базној средини зависи од количине присутног супероксил анјон радикала, који се ствара приликом оксидације епинефрина, и што је већа количина овог радикала, убрзава се и процес аутооксидације. Присуство SOD-е смањује количину супероксил анјон радикала који настаје и самим тим успорава оксидацију епинефрина, што се може пратити спектрофотометријски на 485 nm смањењем интензитета боје раствора у односу на узорак у коме се аутооксидација епинефрина одвија без присуства SOD-е. Релативна јединица активности SOD-е је дефинисана као она активност која доводи до 50% инхибиције аутооксидације епинефрина под одређеним условима.

Реагенси:

1. 0.020 M HCl
2. 0.050 M NaHCO_3 - Na_2CO_3 пуфер, $\text{pH } 10.20$ до 10.25 са 1.00×10^{-4} M EDTA
3. 0.0100 M раствор епинефрина (*Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH*, Немачка) у 0.020 M HCl

Поступак: Одређивање V_0 . У 925 μL пуфера ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$, $\text{pH } 10.20$) додаје се 50 μL PBS-а, који је коришћен за прављење хомогената, у кивету за мерење на спектофотометру и помоћу ње се врши подешавање нуле на апарату. У исту кивету се

затим додаје 25 μL 0.0100 М раствора епинефрина, измеша и одмах мери апсорбанца на 485 nm. Вредности апсорбанце се бележе у временском интервалу од 10 секунди, у интервалу од 6 минута. Након мерења се конструише крива зависности апсорбанце од времена и одређује промена апсорбанце у току једног минута ($\Delta A/\text{min}$) на линеарном делу криве. Промена апсорбанце у минуту треба да буде у опсегу $0.025 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$ и у случају добијања друге вредности треба подесити концентрацију епинефрина док се не добије потребна вредност промене апсорбанце у минуту. Ова вредност представља V_0 . Одступања од добијених вредности при узастопним мерењима не би требало да прелазе 5%, варијација 5-10% је прихватљива. Овако припремљен раствор епинефрина се даље користи у одређивању V_{SOD} (брзине оксидације епинефрина у присуству SOD).

Одређивање V_{SOD} . Након мешања 925 μl пуфера ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$, pH 10.20) и 50 μl хомогената ткива, подеашава се нула на спектрофотометру са овом киветом. Затим се додаје 25 μl раствора епинефрина чија је концентрација подешена при одређивању V_0 , одмах се измеша и мери апсорбанца на 485 nm на сваких 10 секунди у интервалу од 6 минута. V_{SOD} представља $\Delta A/\text{мин}$ у истом временском интервалу који је коришћен за израчунавање V_0 . Сваки узорак је потребно мери у три понављања, при чему су одступања при мерењима прихватљива у опсегу 5-10%. За мерење апсорбанце коришћен је двозрачни UV-Vis спектрофотометар Halo DB-20S (*Dynamica GmbH*, Швајцарска).

Израчунавање: Релативна јединица активности SOD-е је дефинисана као она активност која доводи до 50 % инхибиције аутооксидације епинефрина под одређеним условима. Брзина аутооксидације епинефрина без присуства SOD-е је V_0 (≈ 0.025), примењујући дефиницију релативне јединице активности ензима SOD-е, јединична активност овог ензима би довела до 50%-ног смањења апсорбанце, што представља половину вредности V_0 (≈ 0.0125). Активност SOD-е у релативним јединицама израчунава се из следеће формуле:

$$U_{\text{SOD}} = \frac{V_0 - V_{\text{SOD}}}{V_0/2}$$

$$U_{\text{SOD/L}} = U_{\text{SOD}} \times \frac{V_{\text{ук}}}{V_{\text{уз}}} \times 1000$$

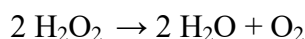
где је: $V_{\text{ук}}$, укупна запремина у кивети (1.00 ml); $V_{\text{уз}}$, запремина додатог узорка хомогената ткива (0.05 ml).

Активност SOD-е изражена у интернационалним јединицама (U) по 1 mg протеина у хомогенату се добија из следеће формуле:

$$U_{\text{SOD/mg протеина}} = \frac{U_{\text{SOD/L}}}{C_{\text{протеина mg/l}}}$$

3.4.3. Одређивање активности каталазе у ткиву хипокампуса

Каталаза, позната још и као водоник пероксид оксидоредуктаза, је ензим који припада великој групи протеина који садрже хем простетичну групу. Овај ензим заступљен је у пероксизомима аеробних ћелија и катализује дисмутацију водоник пероксида (H_2O_2) на воду (H_2O) и кисеоник (O_2), чиме штити ове ћелије од реактивних кисеоничних интермедијера из аеробног метаболизма.



Активност каталазе је мерена на основу њене способности да разгради водоник пероксид. Коришћена је квантитативна, спектрофотометријска метода коју су описали *Beers* и *Sizer* (396), којом се активност каталазе мери дејством на водоник пероксид. Водоник пероксид се користи као супстрат и брзина пада његове концентрације на 22°C у фосфатном пуферу мери се спектроскопски на 240 nm, директно преко пада апсорбанце. Овом методом показано је да се разградња водоник пероксида одвија по кинетици првог реда под различитим условима и да расте линеарно са концентрацијом каталазе.

Реагенси:

1. Водоник пероксид (H_2O_2 , 11mM)
2. PBS (0.5 M, pH=7)
3. Узорак – хомогенати ткива.

Поступак: При одређивању активности каталазе, 0.1 mL узорка хомогената ткива (приближно 0.1 mg протеина) инкубира се уз додатак 1.9 mL фосфатног пуфера (0.5 M, pH=7) на 37°C (у трајању од 60 s). Непосредно након додатка 1 ml 11mM H_2O_2 у раствор пуфера, мери се пад апсорбанце на 240 nm, у интервалима од једног минута, у трајању од 3 минута. Контролни узорак (слепа проба) садржи 0.1 ml хомогената ткива и 2.9 ml пуфера.

Активност каталазе се израчунава коришћењем следеће формуле:

$$\frac{U}{mL} = \frac{(\Delta A_s - \Delta A_0) \times 3,0(mL) \times df}{0,0436 \times 2,0 (mL)} = \Delta A \times 34,4 \times df$$

$$\frac{U}{mg \text{ протеина}} = \left(\frac{U}{mL}\right) \times 1/C_{\text{протеина}} \left(\frac{mg}{mL}\right)$$

где је:

0,0436 – милимоларни апсорпциони коефицијент водоник пероксида на 240 nm (cm²/μmol)

df – дилуциони фактор

C – концентрација протеина у узорку (mg/mL)

3.4.4. Одређивање укупног глутатиона (GSH) у хипокампусу

Садржај GSH у хомогенату ткива одређен је методом која се заснива на реакцији 2,2'-динитро-5,5'-дитио-дибензоеве киселине (DTNB) са алифатичним тиолним једињењима (-SH група) у базној средини (pH 9.0) (397). Производ реакције је *p*-нитрофенол анијон (TNB²) који је у базној средини јако жуто обојен. Мерење апсорбанције добијеног производа се врши на 412 nm.

Реагенси:

1. 0.2 mol/L K₂HPO₄,
2. mmol/L EDTA, pH 9.0
3. 10 mmol/L DTNB (2,2'-динитро-5,5'-дитио-дибензоева киселина, *Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH*, Немачка), растворен у 50 mmol/L фосфатном пуферу, pH 7,0
4. Раствор редукованог L-глутатиона у води (GSH, *Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH*, Немачка) концентрације 100 mg/mL

Поступак: У кивети за спектрофотометар помеша се 0.9 mL раствора K₂HPO₄, 0.05 ml узорка и 0.02 ml DTNB реагенса. Кивете се инкубирају 25 минута на 25°C, у мраку, а потом се врши читавање апсорбанце на 412 nm према слепој проби. Слепа проба се

припрема на исти начин као и узорак, с тим што се уместо узорка додаје иста количина пуфера који је коришћен за припрему хомогената. За мерење апсорбанце коришћен је двозрачни UV–Vis спектрофотометар Halo DB-20S (*Dynamica GmbH*, Швајцарска).

Израчунавање: Концентрација GSH се рачуна помоћу стандардне праве конструисане коришћењем воденог раствора глутатиона (GSH) као стандарда. Од основног раствора глутатиона концентрације 100 mg/mL праве се водени раствори нижих концентрација (0.300 – 0.030 mg/ml). Концентрација GSH у хомогенату ткива изражава се у mg GSH по 1 g протеина. Концентрација GSH изражена у mg/L хомогената добија се из формуле:

$$\text{GSH}_{\text{mg/l}} = C_{\text{GSH}} \times \frac{V_{\text{ук}}}{V_{\text{уз}}} \times 1000$$

где је: C_{GSH} , концентрација GSH очитана са стандардне праве изражена у mg/ml; $V_{\text{ук}}$, укупна запремина (0.97 ml); $V_{\text{уз}}$, запремина узорка (0.05 ml).

Концентрација GSH у хомогенату ткива изражена у mg GSH по 1 g добија се из формуле:

$$\text{GSH mg/g протеина} = \frac{\text{GSH mg/l}}{\text{Спротеина g/l}}$$

где је: GSH mg/L, концентрација GSH изражена у милиграмима по 1 L хомогената; $C_{\text{протеина}}$ g/L, концентрација протеина изражена у грамима по 1 L хомогената.

3.4.5. Одређивање количине укупних протеина у хомогенату ткива

Количина укупних протеина у хомогенатима ткива хипокампуса одређена је методом по *Lowry*-ју (398). Метода се базира на биуретској и *Folin–Ciocalteu* реакцији. Производ реакције је плаво обојен, а интензитет боје зависи од количине укупних протеина у узорку.

Реагенси:

1. Реагенс А: 50 mL 2% Na_2CO_3 помешан са 50 mL 0.1 N раствора NaOH
2. Реагенс Б: 10 mL 1.56% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ помешан са 10 mL 2,37% раствором KNa -тартарата
3. Радни реагенс: помешати 2 ml реагенса Б са 100 ml реагенса А

4. 1N *Folin – Ciocalteu* реагенс (*Sigma–Aldrich CHEMIE GmbH*, Немачка): 2 ml комерцијалног реагенса (2N) разблажити са истом запремином воде

5. Раствор концентрације 1mg/ml говеђег серумског албумина (BSA, *Sigma–Aldrich CHEMIE GmbH*, Немачка)

Поступак: Помеша се 0.2 ml испитиваног узорка протеина (у зависности од количине протеина у узорцима, неопходно је направити одговарајућа разблажења) са 2 ml радног реагенса (бакар сулфатног реагенса). Потом се узорци инкубирају 10 минута на собној температури. Затим се додаје 0.2 ml *Folin – Ciocalteu* реагенса и инкубира на собној температури 30 минута. Абсорбанца се читава на 750 nm. Мерење апсорбанце вршено је коришћењем двозрачног UV–Vis спектрофотометара Halo DB-20S (*Dynamica GmbH*, Швајцарска).

Израчунавање: Конструисана је стандардна права помоћу раствора концентрације од 0.1 до 1.0 mg/ml BSA. Концентрација укупних протеина непознатог узорка читава се са стандардне праве.

3.5. Одређивање серумских концентрација ензима за процену токсичности терапије статинима

По завршетку бихевиоралног тестирања, животиње су након анестезије (интраперитонеално примењена комбинација кетамина - 10 mg/kg и ксилазина - 5 mg/kg) жртвоване декапитацијом на гиљотини. Узорци крви из трупа су узети у циљу одређивања вредности ензима за процену токсичности терапије статинима. Одговарајућа запремина крви (7-8 ml) из трупа је скупљана и одвајана у (расхлађене на 0°C) епрувете (по 1 ml) за различите ензимске анализе и центрифугирана (1700×g, 10 минута, на 4°C) до издвајања серума. Узорци серума су складиштени на -80°C до одређивања концентрација ензима: аспартат аминотрансферазе (AST), аланин аминотрансферазе (ALT) и креатин киназе (СК).

3.5.1. Одређивање серумске концентрације аспартат аминотрансферазе (AST)

Одређивање концентрације аспартат аминотрансферазе (AST) у узорцима серума вршено је спектрофотометријском методом уз коришћење сензитивних китова ASTL (Aspartate Aminotransferase acc. to IFCC without pyridoxal phosphate activation).

Концентрација AST је изражавана у U/L. Сензитивност теста је била 2 IU/L. Коефицијент варијансе за интересеј је био 4,08%, док је за интраесеј износио 2%. Мерење је извршено на апарату Roche/Hitachi cobas c 501.

3.5.2. Одређивање серумске концентрације аланин аминотрансферазе (ALT)

Одређивање концентрације аминотрансферазе (ALT) у узорцима серума вршено је спектрофотометријском методом уз коришћење сензитивних китова ALTL (Alanine Aminotransferase ass. to IFCC without pyridoxal phosphate activation). Концентрација ALT је изражавана у U/L. Сензитивност теста је била 2 IU/L. Коефицијент варијансе за интересеј је био 2.43%, док је за интраесеј износио 1,2%. Мерење је извршено на апарату Roche/Hitachi cobas c 501.

3.5.3. Одређивање серумске концентрације укупне креатин киназе (СК)

Одређивање концентрације креатин киназе (СК) у узорцима серума вршено је спектрофотометријском методом уз коришћење сензитивних китова SKL (Creatine Kinase). Концентрација СК је изражавана у U/L. Сензитивност теста је била 7 IU/L. Коефицијент варијансе за интересеј је био 1,5%, док је за интраесеј износио 0.8%. Мерење је извршено на апарату Roche/Hitachi cobas c 501.

3.5.4. Одређивање серумске концентрације MM креатин киназе (СК MM)

Одређивање концентрације изоензима креатин киназе MM (СК MM) у узорцима серума вршено је методом електрофорезе уз коришћење сензитивних китова HYDRAGEL 7,15 & 30 ISO-CK (Sebia, Lisses, France). Концентрација СК је изражавана у U/L. Сензитивност теста је била 25 IU/L. Коефицијент варијансе за интересеј је био 0.4%, док је за интраесеј износио 0.8%. Мерење је извршено на апарату Sebia Hydrasis 2 analyser.

3.5.5. Одређивање серумске концентрације MB креатин киназе (СК MB)

Одређивање концентрације изоензима креатин киназе MB (СК MB) у узорцима

серума вршено је методом електрофорезе уз коришћење сензитивних китова HYDRAGEL 7,15 & 30 ISO-CK (*Sebia, Lisses, France*). Концентрација СК је изражавана у U/L. Сензитивност теста је била 25 IU/L. Коефицијент варијансе за интересеј је био 6%, док је за интраесеј износио 1.8%. Мерење је извршено на апарату *Sebia Hydrasis 2 analyser*.

3.6. Статистичка анализа података

Статистичка обрада података је вршена на следећи начин:

1. За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, коришћени су: фреквенција, проценти, узорачка средња вредност, медијана, стандардна девијација, стандардна грешка, ранг и 95% интервали поверења.
2. За испитивање нормалности расподеле користили су се тестови *Kolmogorov Smirnov* и *Shapiro Wilk*, и графици: хистограм и *normal QQ plot*.
3. За тестирање разлика између група, за испитиване параметре, коришћена је једнофакторска анализа варијансе са одговарајућом *post hoc* анализом.
4. Испитивање значајности повезаности фактора и исхода, као и величине ефеката појединих фактора је урађено уз примену *General Linear* модела (*уни- и мултиваријабилни*).
5. Модел линеарне (*simple*) регресије је коришћен за анализу повезаности параметара добијених применом различитих метода.

Статистичка обрада података је изведена у статистичком пакету *SPSS 20.0 for Windows*.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Бихевиорални тестови

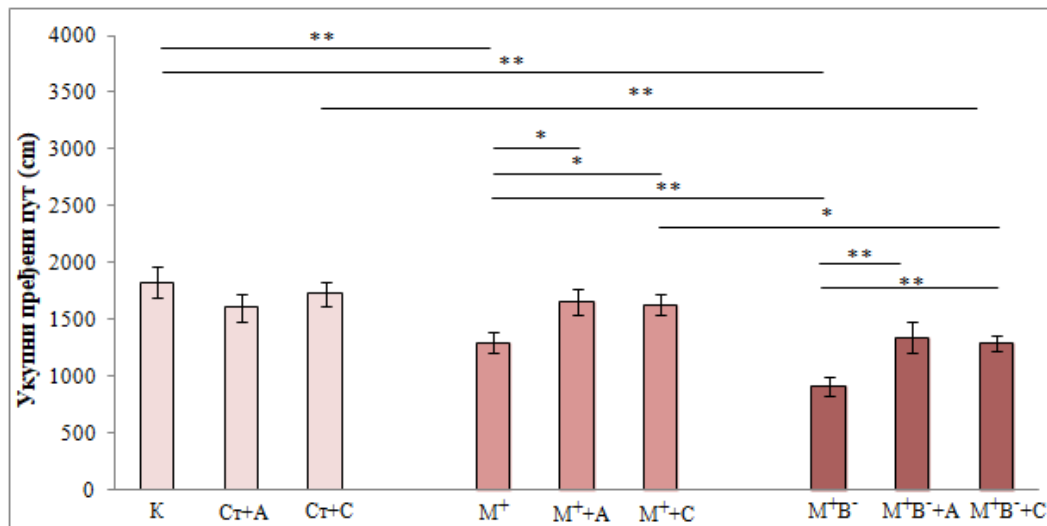
4.1.1. Тест отвореног поља (ОП) тест

4.1.1.1. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на вредности укупног пређеног пута (УПП)

На Слици 4.1. представљени су ефекти исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂), као и ефекти примене статина уз наведене дијететске протоколе на вредности УПП у тесту отвореног поља. Сви примењени протоколи доводили су до значајних промена овог параметра ($F=8.073$, $df=8$). Хронична примена дијете обogaћене метионином без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) довела је до статистички значајног смањења вредности УПП ($p<0.01$) у поређењу са групом животиња која је била на стандардној исхрани. Такође, значајно снижење УПП уочено је и код животиња које су биле на хроничној дијети обogaћеној метионином са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса ($p<0.01$) у поређењу са групом животиња која је била на стандардној исхрани. Дијета обogaћена метионином са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса довела је до још већег смањења вредности овог параметра ($p<0.01$) у поређењу са групом која је била на дијети обogaћеној метионином и са нормалним садржајем витамина В комплекса.

Примена статина (аторвастатин и симвастатин) уз стандардну исхрану није утицала на промену вредности овог параметра у поређењу са групом животиња која је била на стандардној исхрани. Примена аторвастатина заједно са дијетом обogaћеном метионином резултирала је у статистички значајном порасту УПП у поређењу са групом животиња која је била на наведеној дијети без примењеног аторвастатина ($p<0.05$). Значајан пораст УПП уочен је и код животиња које су примале симвастатин уз наведени дијететски протокол у поређењу са групом животиња која је била на идентичном дијететском протоколу без примене овог статина ($p<0.05$). Примена оба статина уз исхрану обogaћену метионином резултирала је враћањем вредности овог параметра на ниво контролних вредности. Примена аторвастатина заједно са дијетом обogaћеном метионином и са ниским садржајем витамина В комплекса довела је до значајног пораста

УПП у поређењу са групом животиња која је била на наведеној дијети без примењеног аторвастатина ($p < 0.01$). Значајан пораст УПП уочен је и код животиња које су примале симвастатин уз наведени дијететски протокол у поређењу са групом животиња која је била на идентичном дијететском протоколу без примене симвастатина ($p < 0.01$). Међутим, и након примене симвастатина уз ову дијету, вредост УПП била је значајно мања у односу на вредности УПП у контролној групи и групи животиња која је примала симвастатин уз дијету обогаћену метионном. Примена аторвастатина и симвастатина уз овај дијететски протокол није довела до враћања вредности овог параметра на ниво контролних вредности.



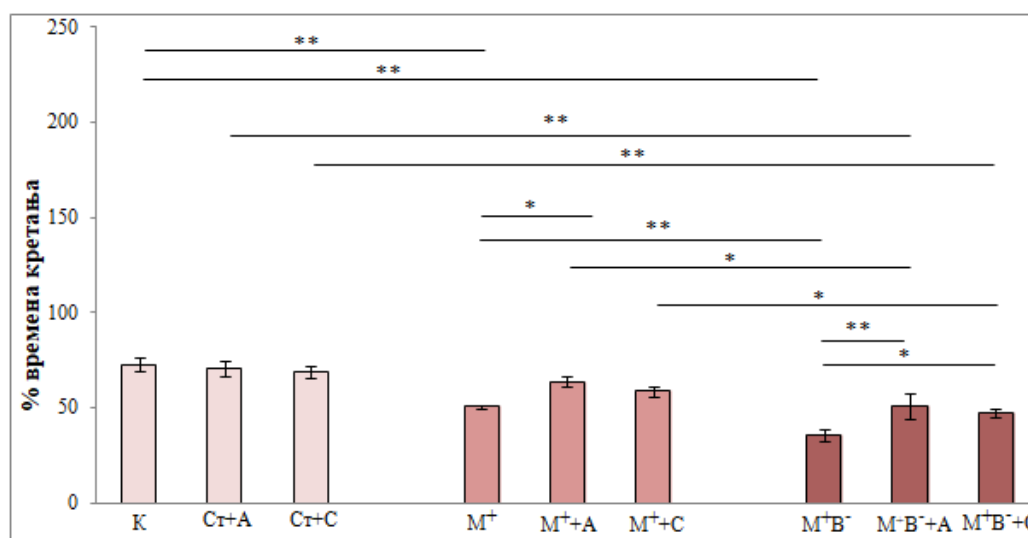
Слика 4.1. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (B_6 , B_9 , B_{12}) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на вредности укупног пређеног пута (cm) у тесту отвореног поља. К - контрола ($n=8$), Ст+А - стандардна исхрана+аторвастатин ($n=8$), Ст+С - стандардна исхрана+симвастатин ($n=8$), М⁺ - метионином обогаћена исхрана ($n=8$), М⁺А - метионином обогаћена исхрана+аторвастатин ($n=8$), М⁺С - метионином обогаћена исхрана+симвастатин ($n=8$), М⁺В⁻ - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса ($n=8$), М⁺В⁻А - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин ($n=8$), М⁺В⁻С - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин ($n=8$). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm SEM$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.1.1.2. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В6, В9, В12) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на проценат времена кретања (% ВК)

Као што је приказано на Слици 4.2., спроведени дијететски протоколи, као и примена статина уз наведене дијететске протоколе, доводили су до значајних промена процента времена кретања у тесту отвореног поља ($F=12.395$, $df=8$). Дијета обogaћена метионином за резултат је имала статистички значајно скраћење укупног трајања мобилности током петоминутног теста ($p<0.01$) у поређењу са контролном групом. Дијета обogaћена метионином са ниским садржајем витамина В комплекса такође је довела до статистички значајног скраћења укупног трајања мобилности током овог теста ($p<0.01$) у поређењу са контролном групом. Дијета обogaћена метионином са ниским садржајем витамина В комплекса довела је до додатног значајног скраћења % времена кретања ($p<0.01$) у односу на дијету обogaћену метионином и са нормалним садржајем ових витамина.

Примена оба статина уз стандардну исхрану није довела до промена вредности овог параметра у односу на контролну групу. Међутим, примена статина уз дијету са повећаним садржајем метионина за резултат је имала супротан ефекат на укупно трајање мобилности. Примена аторвастатина уз исхрану обogaћену метионином довела је до значајног повећања мобилности животиња из ове групе у поређењу са групом која је била на наведеном дијететском протоколу, али без аторвастатина ($p<0.05$), враћајући вредности овог параметра на ниво контролних. Након примене симвастатина уз идентичан дијететски протокол, ефекат на овај параметар локомоторне активности у ОП тесту је изостао. Примена аторвастатина уз исхрану обogaћену метионином и дефицијентну витаминима В комплекса проузроковала је значајно повећање % ВК ($p<0.05$) у поређењу са групом која је била на истом режиму исхране, али без примењеног аторвастатина. Аторвастатин примењен уз дијету обogaћену метионином ипак није довео до статистички значајног пораста % ВК у односу на групу која је примала аторвастатин уз стандардну исхрану, али ни у односу на групу која је примала аторвастатин уз дијету обogaћену метионином. Апликација аторвастатина уз овај дијететски режим није довела до враћања вредности овог параметра на вредности контролне групе. Примена симвастатина уз режим исхране обogaћене метионином и дефицијентне витаминима В комплекса такође је

проузроковала значајно повећање % ВК ($p < 0.05$) у поређењу са групом која је била на истоветном режиму исхране, али без примењеног симвастатина. Иако у порасту, овај параметар након примене симвастатина није показао значајну промену у поређењу са групама које су примале симвастатин уз исхрану обогаћену метионином и уз стандардну исхрану. Примена овог статина није вратила вредности овог параметра на ниво контролних вредности.



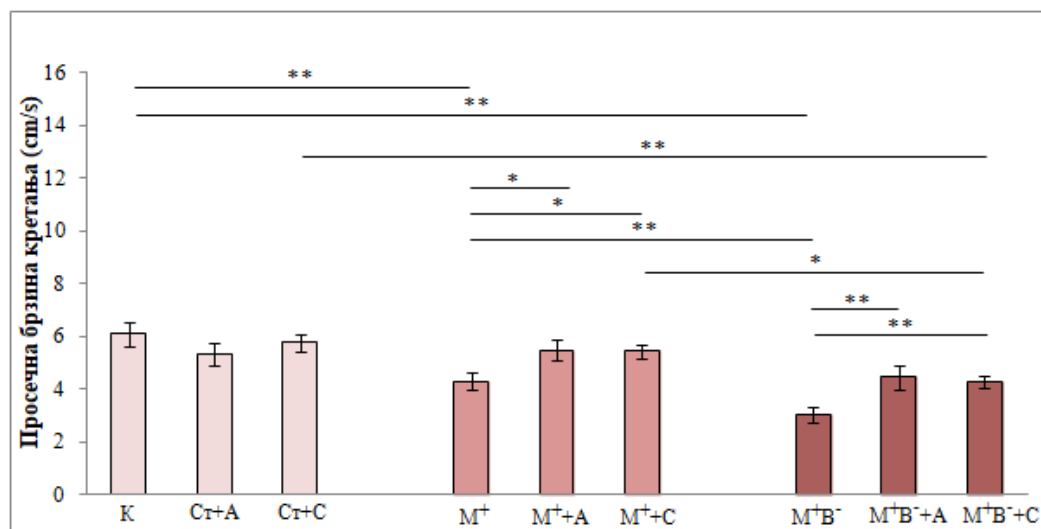
Слика 4.2. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (V_6 , V_9 , V_{12}) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на проценат времена кретања (% ВК) у тесту отвореног поља. К - контрола ($n=8$), Ст+А - стандардна исхрана+аторвастатин ($n=8$), Ст+С - стандардна исхрана+симвастатин ($n=8$), М+ - метионином обогаћена исхрана ($n=8$), М+А - метионином обогаћена исхрана+аторвастатин ($n=8$), М+С - метионином обогаћена исхрана+симвастатин ($n=8$), М+В- - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса ($n=8$), М+В+А - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин ($n=8$), М+В+С - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин ($n=8$). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.1.1.3. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на вредности просечне брзине кретања (ПБК)

Ефекти исхране обogaћене метионином, исхране обogaћене метионином и дефицитарне витаминима В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и утицај примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на вредности просечне брзине кретања (ПБК) у тесту отвореног поља приказани су на Слици 4.3. Сви примењени протоколи значајно су утицали на вредности ПБК ($F=8.073$, $df=8$). Дуготрајна исхрана обogaћена метионином довела је до статистички значајног смањења просечне брзине кретања ($p<0.01$) у односу на стандардни режим исхране. Дуготрајна исхрана обogaћена метионином и са ниским садржајем витамина В комплекса такође је довела до статистички значајног смањења просечне брзине кретања ($p<0.01$) у односу на групу са стандардним режимом исхране. Протокол који је подразумевао исхрану обogaћену метионином и са ниским садржајем витамина В комплекса довео је до још већег смањења ПБК ($p<0.01$) у односу на протокол који је подразумевао само исхрану обogaћену метионином са нормалним садржајем ових витамина.

Примена статина уз стандардни режим исхране није довела до промене просечне брзине кретања код ових животиња. Са друге стране, примена статина уз специјалне дијететске протоколе испољила је супротан ефекат на ПБК. Примена аторвастатина заједно са дијетом обogaћеном метионином за резултат је имала статистички значајно повећање ПБК у поређењу са групом која је била изложена наведеном дијететском протоколу без примене аторвастатина ($p<0.05$), при том враћајући вредности овог параметра на ниво контролних. Примена симвастатина уз идентичан дијететски протокол за резултат је такође имала статистички значајно повећање ПБК у поређењу са групом која је била изложена наведеном дијететском протоколу, али без примењеног симвастатина ($p<0.05$). Примена аторвастатина истовремено са дијетом обogaћеном метионином и са ниским садржајем витамина В комплекса за резултат је имала статистички значајно повећање ПБК у поређењу са групама које су биле изложене наведеном дијететском протоколу без примене аторвастатина ($p<0.01$), али без враћања вредности овог параметра на контролне вредности. Идентичан ефекат на овај параметар остварио је и симвастатин примењен уз наведени протокол ($p<0.01$) у поређењу са групом

на идентичном протоколу, без симвастатина. Вредности овог параметра су ипак остале значајно ниже у поређењу са вредностима из група које су примале симвастатин уз стандардни режим исхране и уз режим исхране обогаћене метионином. Након примењеног симвастатина уз дијету обогаћену метионином и са дефицијенцијом витамина В групе, вредности ПБК нису враћене на ниво контролних.



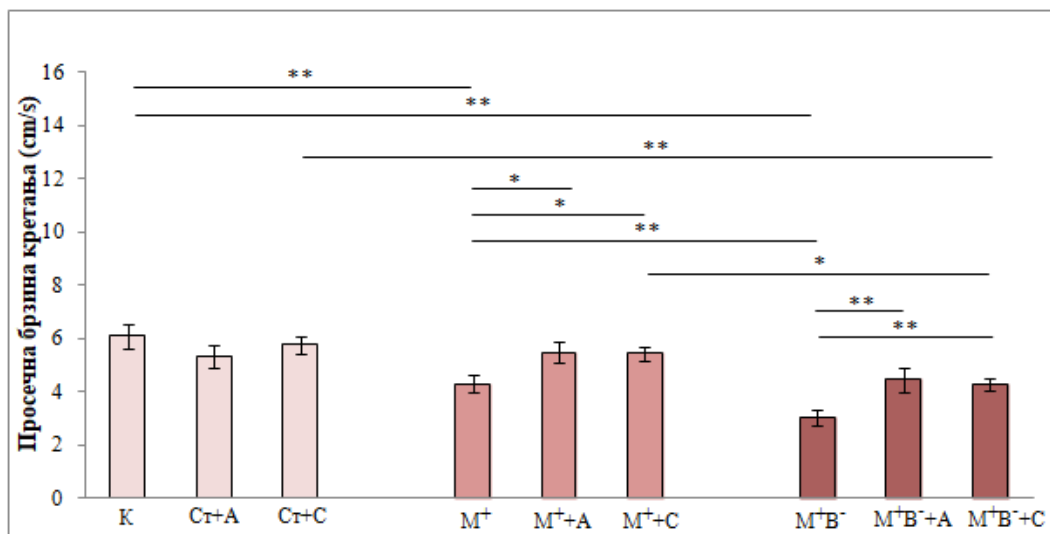
Слика 4.3. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на просечну брзину кретања (cm/s) у тесту отвореног поља. К - контрола (n=8), Ст+А - Стандардна исхрана+аторвастатин (n=8), Ст+С - Стандардна исхрана+симвастатин (n=8), М⁺ - Метионином обогаћена исхрана (n=8), М⁺А - Метионином обогаћена исхрана+аторвастатин (n=8), М⁺С - Метионином обогаћена исхрана+симвастатин (n=8), М⁺В⁻ - Метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса (n=8), М⁺В⁺А - Метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин (n=8), М⁺В⁺С - Метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

4.1.1.4. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на укупно време проведено у централној зони (УВПЦЗ)

На Слици 4.4. представљени су ефекти исхране обогаћене метионином, исхране обогаћене метонином и дефицијентне витаминима В комплекса (В₆, В₉, В₁₂), као и утицај примене статина уз наведене дијететске протоколе на укупно време проведено у централној зони у тесту отвореног поља. Сви наведени протоколи доводили су до значајних промена вредности овог параметра ($F=5.368$, $df=8$). Хронична примена хиперметионинске дијете узроковала је да животиње значајно мање времена проводе у централној зони ($p<0.05$) у односу на животиње из контролне групе. Такође, хиперметионинска дијета са дефицијенцијом витамина В комплекса довела је до значајног смањења времена које су животиње провеле у централној зони ($p<0.01$) у односу на животиње из контролне групе. Животиње које су биле на хиперметионинској дијети са дефицијенцијом витамина В комплекса проводиле су мање времена у централној зони у поређењу са животињама које су биле само на хиперметионинској дијети ($p<0.05$).

Статини нису довели до промена вредности овог параметра након примене уз стандардну храну. Аторвастатин примењен уз дијету обогаћену метионином такође није довео до значајних промена вредности овог параметра. Са друге стране, симвастатин апликован заједно са дијетом обогаћеном метионином довео је до тога да животиње значајно више времена проводе у централној зони ($p<0.01$) у односу на животиње које су биле само на хиперметионинској дијети без примене симвастатина. Вредности овог параметра након примене симвастатина приближиле су се вредностима у контролној групи. Користан ефекат примене симвастатина манифестовао се кроз повећање УВПЦЗ и код животиња које су биле на дијети обогаћеној метионином и дефицијентној витаминима В комплекса ($p<0.05$) у поређењу са животињама које су биле само на дијети обогаћеној метионином и дефицијентној витаминима В комплекса. Симвастатин није успео да врати вредности овог параметра на ниво контролних. Користан ефекат аторвастатина изостао је након његове примене уз наведени протокол, само без аторвастатина. Примена аторвастатина није резултирала значајним повећањем УВПЦЗ

како ни у односу на контролну групу тако ни у односу на групу која је примала аторвастатин уз стандардну храну.

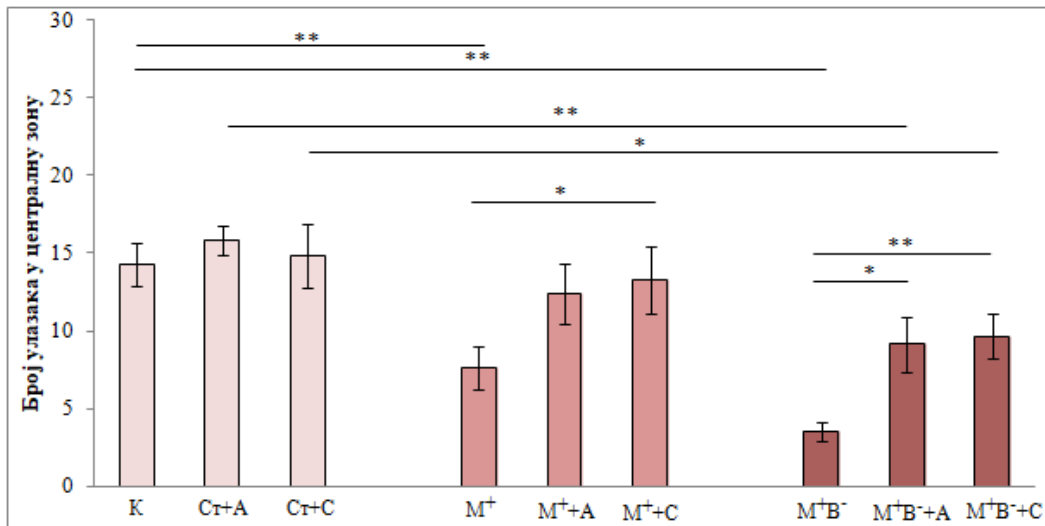


Слика 4.4. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на укупно време проведено у централној зони (s) у тесту отвореног поља. К - контрола (n=8), Ст+А - стандардна исхрана+аторвастатин (n=8), Ст+С - стандардна исхрана+симвастатин (n=8), М⁺ - метионином обogaћена исхрана (n=8), М⁺+А - метионином обogaћена исхрана+аторвастатин (n=8), М⁺+С - метионином обogaћена исхрана+симвастатин (n=8), М⁺В⁻ - метионином обogaћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса (n=8), М⁺В⁻+А - метионином обogaћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин (n=8), М⁺В⁻+С - метионином обogaћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

4.1.1.5. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на укупан број улазака у централну зону (БУЦЗ)

Укупан број улазака у централну зону (БУЦЗ) у тесту отвореног поља се значајно разликовао између група под утицајем примењених протокола ($F=6.672$, $df=8$) што је представљено на Слици 4.5. Дијета обogaћена метионином довела је до статистички значајног смањења броја улазака у централну зону ($p<0.01$) у поређењу са групом животиња на стандардној исхрани. Дијета обogaћена метионином са ниским садржајем витамина В комплекса такође је довела до статистички значајног смањења броја улазака у централну зону ($p<0.01$) у односу на вредности у групи животиња на стандардној исхрани. Међутим, није дошло до значајних промена вредности овог параметра између групе која је била на дијети обogaћеној метионином са ниским садржајем витамина В комплекса у поређењу са групом која је била на дијети обogaћеној метионином и са нормалним садржајем витамина ове групе.

Аторвастатин и симвастатин примењени уз стандардну исхрану нису довели до промене овог параметра. Примена аторвастатина истовремено са дијетом обogaћеном метионином није испољила ефекат на БУЦЗ, док је његова примена са дијетом обogaћеном метионином и са дефицијенцијом витамина В комплекса довела до значајног пораста у односу на групу са наведеном дијетом, само без аторвастатина ($p<0.05$). Међутим, БУЦЗ у овој групи није био статистички значајно повећан у односу на контролну групу, као ни у односу на групу која је примала аторвастатин уз стандардни режим исхране. Са друге стране, примена симвастатина довела је до испољавања позитивног ефекта на овај параметар у ОП тесту. Симвастатин апликован заједно са дијетом обogaћеном метионином довео је до значајног повећања БУЦЗ ($p<0.05$) у поређењу са групом која је била само на дијети обogaћеној метионином, враћајући при том вредности овог параметра на вредности контролне групе. Идентичан ефекат на БУЦЗ симвастатин је испољио примењен и уз дијету обogaћену метионином и дефицијентну витаминима В комплекса ($p<0.01$) у поређењу са групом која је била на истоветној дијети, али без примене овог статина. Међутим, БУЦЗ није био статистички значајно повећан у односу на вредности у контролној групи животиња и у односу на вредности у групи животиња која је примала симвастатин уз стандардну храну.

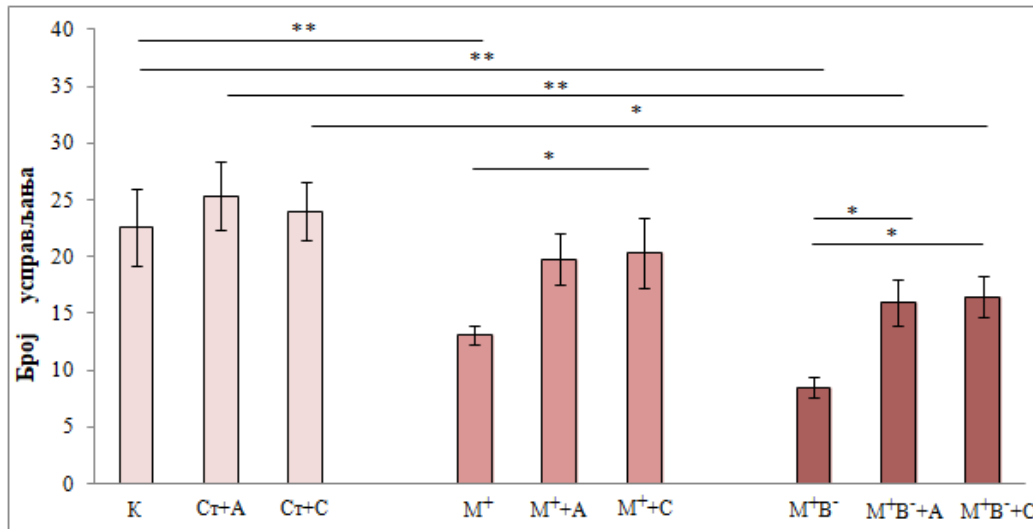


Слика 4.5. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на укупан број улазака у централну зону у тесту отвореног поља. К - контрола (n=8), Ct+A - стандардна исхрана+аторвастатин (n=8), Ct+C - стандардна исхрана+симвастатин (n=8), M⁺ - метионином обогаћена исхрана (n=8), M⁺+A - метионином обогаћена исхрана+аторвастатин (n=8), M⁺+C - метионином обогаћена исхрана+симвастатин (n=8), M⁺B⁻ - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса (n=8), M⁺B⁻+A - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин (n=8), M⁺B⁻+C - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

4.1.1.6. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на број усправљања (БУ)

Ефекти исхране обogaћене метионином, исхране обogaћене метионином и дефицијентне витаминима В групе, као и утицај примене статина уз наведене дијететске протоколе приказани су на Слици 4.6. Сви протоколи примењени у овом истраживању доводили су до значајних промена БУ у тесту отвореног поља ($F=5.516$, $df=8$). Повећани унос метионина довео је до смањења експлоративне активности животиња из ове групе изражене кроз статистички значајно смањење БУ ($p<0.01$) у поређењу са животињама из контролне групе. Повећани унос метионина са ниским садржајем пиридоксина, фолата и кобаламина такође је довео до статистички значајног смањења БУ ($p<0.01$) у поређењу са животињама из контролне групе, али без значајног смањења у поређењу са групом која је била само на исхрани обogaћеној метионином.

Оба статина, примењена уз стандардни режим исхране, нису довела до значајне промене вредности овог параметра. Аторвастатин уз дијету обogaћену метионином такође није испољио значајан ефекат на овај параметар. Са друге стране, примена симвастатина уз дијету обogaћену метионином испољила је позитиван ефекат на овај параметар експлоративне активности и довела до значајног пораста БУ ($p<0.05$) у поређењу са групом на хиперметионинској дијети, враћајући вредности овог параметра на ниво контролних вредности. Примена аторвастатина заједно са протоколом са повећаним садржајем метионина и ниским садржајем пиридоксина, фолата и кобаламина довела је до статистички значајног повећања БУ код ових животиња ($p<0.05$) у поређењу са БУ код животиња из групе на идентичном протоколу, али без аторвастатина. Након примене аторвастатина уз овај протокол, вредности овог параметра вратиле су се на ниво контролних вредности, али нису се значајно повећале у односу на вредности групе која је примала аторвастатин уз стандардну исхрану. Апликација симвастатина заједно са дијетом са повећаним садржајем метионина и ниским садржајем витамина В групе такође је довела до статистички значајног повећања овог параметра експлоративне активности ($p<0.05$) у поређењу са групом на идентичном дијететском протоколу без примене симвастатина. Након апликације симвастатина уз овај протокол, вредности БУ враћене су на ниво контролних, али нису показале статистички значајан пораст у односу на вредности из групе која је примала симвастатин уз стандардну исхрану.



Слика 4.6. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (V_6 , V_9 , V_{12}) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на укупан број усправљања у тесту отвореног поља. К - контрола (n=8), Ст+А - стандардна исхрана+аторвастатин (n=8), Ст+С - стандардна исхрана+симвастатин (n=8), М⁺ - метионином обogaћена исхрана (n=8), М⁺+А - метионином обogaћена исхрана+аторвастатин (n=8), М⁺+С - метионином обogaћена исхрана+симвастатин (n=8), М⁺В⁻ - метионином обogaћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса (n=8), М⁺В⁻+А - метионином обogaћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин (n=8), М⁺В⁻+С - метионином обogaћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

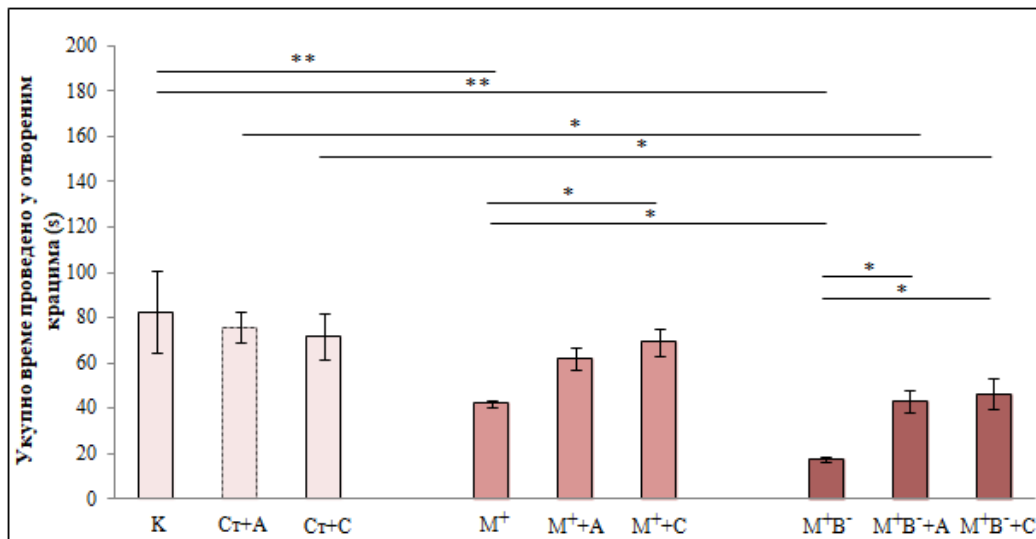
4.1.2. Тест уздигнутог крстастог лавиринта (УКЛ тест)

4.1.2.1. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на укупно време проведено у отвореним крацима (УВПОК)

На Слици 4.7. приказани су ефекти исхране обogaћене метионином, исхране обogaћене метионином и дефицијентне витаминима В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и утицај примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на укупно време проведено у отвореним крацима у тесту уздигнутог крстастог лавиринта. Сви наведени протоколи доводили су до значајних промена овог параметра ($F=6.040$, $df=8$). Дијета обogaћена метионином довела је до тога да животиње подвргнуте овом протоколу проводе значајно мање времена у отвореним крацима ($p<0.01$) у односу на групу животиња на стандардној исхрани. Исти ефекат на УВПОК је испољен и у групи животиња која је била на дијети обogaћеној метионином и дефицијентној витаминима В комплекса ($p<0.01$) у односу на животиње на стандардној исхрани. Животиње на дијети обogaћеној метионином и дефицијентној витаминима В комплекса проводиле су мање времена у отвореним крацима у поређењу са животињама из групе на дијети обogaћеној метионином и са нормалним садржајем ових витамина ($p<0.05$).

Примена статина уз стандардну храну није утицала на промену вредности овог параметра у односу на контролну групу. Ефекат аторвастатина на овај параметар такође је изостао након његове примене уз дијету обogaћену метионином. Истовремена примена аторвастатина уз исхрану обogaћену метионином и дефицијентну витаминима В комплекса такође је значајно повећала УВПОК ($p<0.05$) у односу на групу на истом дијететском протоколу без примењеног аторвастатина. Међутим, пораст УВПОК није био довољан да достигне вредности овог параметра у групи на стандардној исхрани, као ни у групи која ја примала аторвастатин уз стандардну исхрану. Са друге стране, симвастатин примењен уз хиперметионинску дијету испољио је позитиван ефекат на овај параметар и довео да значајног повећања УВПОК у поређењу са групом животиња на истоветном дијететском протоколу без примене симвастатина ($p<0.05$). Овај параметар се вратио на ниво вредности у контролној групи. Симвастатин, примењен уз дијету обogaћену метионином и са дефицијенцијом витамина В комплекса, за крајњи ефекат, такође, је

имао значајни пораст вредности овог параметра у односу на групу са истим дијететским протоколом, само без примењеног статина ($p < 0.05$). Ипак, УВПОК је било значајно мање у односу на вредности у групи која је била на стандардној исхрани, као и у односу на вредности у групи која је примала симвастатин уз стандардну исхрану.

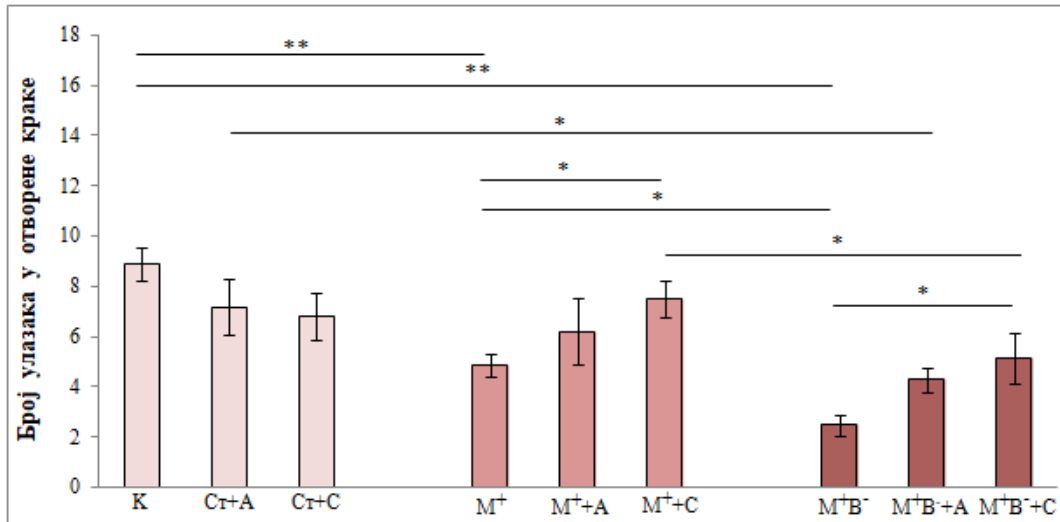


Слика 4.7. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (V_6 , V_9 , V_{12}) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на укупно време проведено у отвореним крацима (s) у тесту уздигнутог крстастог лавиринта. К - контрола ($n=8$), Ст+А - стандардна исхрана+аторвастатин ($n=8$), Ст+С - стандардна исхрана+симвастатин ($n=8$), M^+ - метионином обогаћена исхрана ($n=8$), M^+A - метионином обогаћена исхрана+аторвастатин ($n=8$), M^+C - метионином обогаћена исхрана+симвастатин ($n=8$), M^+B^- - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса ($n=8$), M^+B^-A - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин ($n=8$), M^+B^-C - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин ($n=8$). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm SEM$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.1.2.2. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на број улазака у отворене краке (БУОК)

Као што је представљено на Слици 4.8., хронични режими исхране обogaћене метионином, исхране обogaћене метионином и дефицијентне витаминима В комплекса (В₆, В₉, В₁₂), као и примена статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске режиме, доводили су до значајних промена БУОК у тесту уздигнутог крстастог лавиринта ($F=6.612$, $df=8$). Хронична примена исхране обogaћене метионином узроковала је статистички значајно смањење броја улазака у отворене краке ($p<0.01$) у односу на групу на стандардној исхрани. Идентичан ефекат на овај параметар испољила је и исхрана обogaћена метионином са дефицијенцијом витамина В комплекса у односу на стандардну исхрану ($p<0.01$). Додатно смањење БУОК уочено је код животиња из групе са исхраном обogaћеном метионином и са дефицијенцијом витамина В комплекса ($p<0.05$) у односу на животиње које су биле само на исхрани обogaћеној метионином.

Хронична примена аторвастатина и симвастатина уз стандардни режим исхране није довела до промене вредности овог параметра. Аторвастатин апликован заједно са дијетом обogaћеном метионином није довео до значајних промена БУОК, док је хронична примена симвастатина уз овај режим исхране довела до значајног повећања БУОК у поређењу са групом која је била на исхрани обogaћеној метионином ($p<0.05$). Вредности БУОК након примене симвастатина враћене су на ниво контролних вредности. Хронична примена аторвастатина уз исхрану обogaћену метионином и са ниским садржајем витамина В комплекса није резултирала значајним повећањем вредности овог параметра у УКЛ тесту. Међутим, симвастатин примењен уз овај дијететски протокол испољио је позитиван ефекат на БУОК и довео до значајног пораста вредности овог параметра у поређењу са групом на истоветном дијететском протоколу, само без примене овог статина ($p<0.05$). Иако у порасту, број улазака у отворене краке и даље је имао статистички ниже вредности у односу на групу која је примала симвастатин уз дијету обogaћену метионином и са нормалним садржајем витамина В комплекса. Примена симвастатина уз овај протокол није резултирала враћањем вредности овог параметра на ниво контролних.



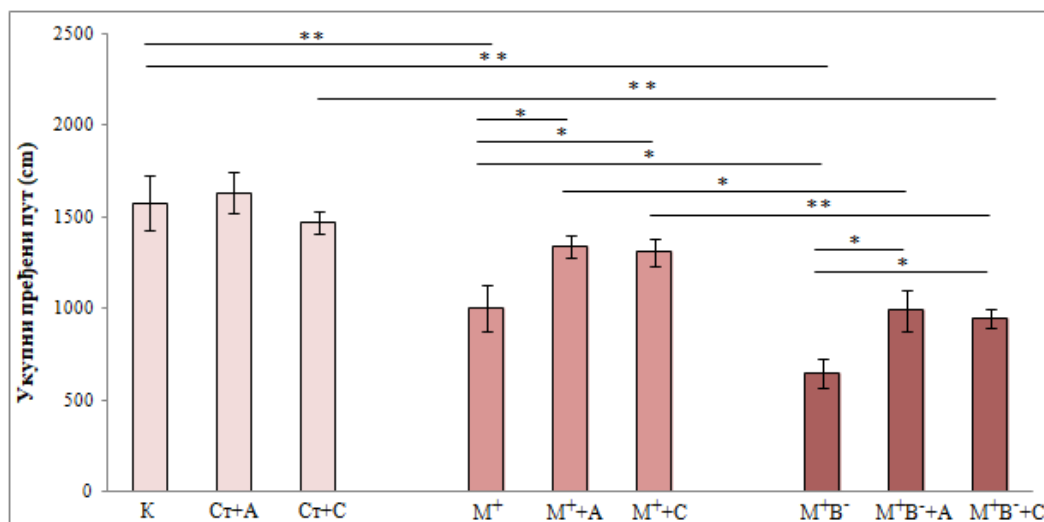
Слика 4.8. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на број улазака у отворене краке у тесту уздигнутог крстастог лавиринта. К - контрола (n=8), Ct+A - стандардна исхрана+аторвастатин (n=8), Ct+C - стандардна исхрана+симвастатин (n=8), M⁺ - метионином обogaћена исхрана (n=8), M⁺A - метионином обogaћена исхрана+аторвастатин (n=8), M⁺C - метионином обogaћена исхрана+симвастатин (n=8), M⁺B⁻ - метионином обogaћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса (n=8), M⁺B⁻A - метионином обogaћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин (n=8), M⁺B⁻C - метионином обogaћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

4.1.2.3. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на вредности укупног пређеног пута (УПП)

На Слици 4.9. представљени су ефекти дуготрајне исхране обогаћене метионином, дуготрајне исхране обогаћене метионином и са недостатком витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и утицај примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на вредности УПП у тесту уздигнутог крстастог лавиринта. Сви наведени протоколи доводили су до значајних промена УПП ($F=11.067$, $df=8$). Код групе животиња која је била подвргнута хроничној хиперметионинској дијети дошло је до статистички значајног смањења УПП ($p<0.01$) у поређењу са групом на стандардном режиму исхране. Исти ефекат на УПП испољио се и код животиња које су биле на хиперметионинској дијети са недостатком витамина В комплекса у односу на групу животиња на стандардној исхрани ($p<0.01$). Животиње из групе са хиперметионинском исхраном дефицитарном витаминима В комплекса показале су још израженије смањење УПП ($p<0.05$) у поређењу са животињама из групе са хиперметионинском исхраном.

Апликација оба статина уз стандардну исхрану није довела до промене УПП у односу на контролну групу, док је апликација ова два статина уз хиперметионинску дијету показала позитиван ефекат на овај параметар локомоторне активности. Аторвастатин, примењен уз хиперметионинску дијету, довео је до значајног повећања укупног пређеног пута ($p<0.05$) у односу на групу која је била само на хиперметионинској дијети. Исти ефекат на УПП остварила је и примена симвастатина уз исти дијететски режим у поређењу са групом на хиперметионинској дијети ($p<0.05$). Оба статина су након хроничне примене уз ову дијету за резултат имала враћање вредности овог параметра на ниво контролних вредности. Примена аторвастатина уз дијету обогаћену метионином и дефицијентну витаминима В комплекса такође је довела до значајног повећања УПП у односу на животиње из групе која је била на истоветној дијети, без овог статина ($p<0.05$). Међутим, достигнута вредност УПП у овој групи је била статистички значајно мања у односу на групу која је примала аторвастатин уз хиперметионинску дијету, као и односу на групу која је била на стандардној исхрани. УПП значајно је био повећан и у групи животиња која је примала симвастатин уз дијету богату метионином и дефицијентну витаминима В комплекса у поређењу са групом на идентичној дијети, само без овог

статина ($p < 0.05$). Апликација симвастатина уз овај режим исхране није довела до значајног повећања вредности УПП у односу на вредности у групи која је примала симвастатин уз хиперметионинску дијету, као ни у односу на вредности у групи која је примала симвастатин уз стандардну исхрану. Овај протокол није резултирао враћањем вредности УПП на ниво контролних.

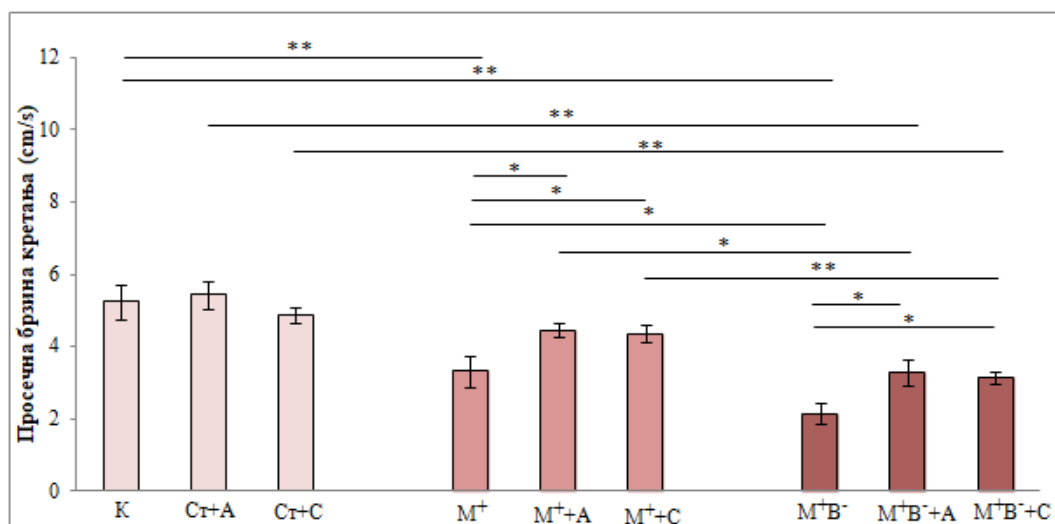


Слика 4.9. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (V_6 , V_9 , V_{12}) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на вредности укупног пређеног пута (cm) у тесту уздигнутог крстастог лавиринта. К - контрола ($n=8$), Ст+А - стандардна исхрана+аторвастатин ($n=8$), Ст+С - стандардна исхрана+симвастатин ($n=8$), М⁺ - метионином обogaћена исхрана ($n=8$), М⁺+А - метионином обogaћена исхрана+аторвастатин ($n=8$), М⁺+С - метионином обogaћена исхрана+симвастатин ($n=8$), М⁺В⁻ - метионином обogaћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса ($n=8$), М⁺В⁺+А - метионином обogaћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин ($n=8$), М⁺В⁺+С - метионином обogaћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин ($n=8$). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.1.2.4. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на вредности просечне брзине кретања (ПБК)

Ефекти исхране обogaћене метионином, исхране обogaћене метионином и дефицијентне витаминима В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и утицај примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на вредности просечне брзине кретања у тесту уздигнутог крстастог лавиринта приказани су на Слици 4.10. Сви наведени протоколи значајно су утицали на промену вредности ПБК ($F=11.067$, $df=8$). Протокол који је подразумевао исхрану обogaћену метионином довео је до значајног смањења ПБК ($p<0.01$) у односу на контролне вредности. Протокол исхране обogaћене метионином и дефицијентне витаминима В комплекса такође је довео до значајног смањења вредности овог параметра ($p<0.01$) у односу на контролу. Животиње које су биле на исхрани обogaћеној метионином и дефицијентној витаминима В комплекса показале су смањење ПБК ($p<0.05$) у односу на животиње које су биле само на исхрани обogaћеној метионином.

До промене у просечној брзини кретања није дошло након примене статина уз стандардну исхрану, док је позитиван ефекат на овај параметар уочен након њихове примене уз хиперметионинску дијету. Наиме, примена аторвастатина и симвастатина заједно са хиперметионинском дијетом резултирала је у значајном повећању ПБК у односу на групу која је била на хиперметионинској дијети ($p<0.05$). Позитиван ефекат оба статина испољен је кроз враћање вредности ПБК на ниво контролних вредности. Апликација аторвастатина и симвастатина заједно са дијетом богатом метионином и дефицијентном витаминима В групе за резултат је имала повећање ПБК у односу на групу на истоветној дијети, само без примењених статина ($p<0.05$). Иако је аторвастатин довео до пораста ПБК, вредности овог параметра значајно су остале мање у поређењу са групом која је примала аторвастатин уз дијету обogaћену метионином и у поређењу са групом која је примала аторвастатин уз стандардну храну. Симвастатин, иако је довео до пораста ПБК, такође, није проузроковао значајни пораст ПБК у односу на групе које су примале симвастатин уз исхрану обogaћену метионином и уз стандардну исхрану. Ни аторвастатин ни симвастатин примењени уз овај дијететски протокол нису вратили вредности ПБК на ниво вредности контролне групе

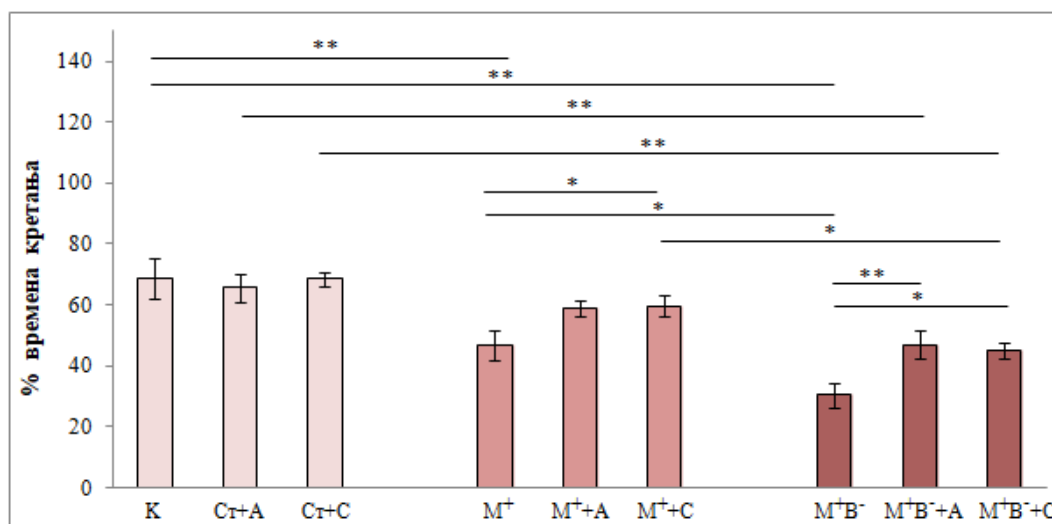


Слика 4.10. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (V_6 , V_9 , V_{12}) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на вредности просечне брзине кретања (cm/s) у тесту уздигнутог крстастог лавиринта. К - контрола (n=8), Ct+A - стандардна исхрана+аторвастатин (n=8), Ct+C - стандардна исхрана+симвастатин (n=8), M⁺ - метионином обогаћена исхрана (n=8), M⁺A - метионином обогаћена исхрана+аторвастатин (n=8), M⁺C - метионином обогаћена исхрана+симвастатин (n=8), M⁺B⁻ - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса (n=8), M⁺B⁻A - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин (n=8), M⁺B⁻C - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

4.1.2.5. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на проценат времена кретања (% ВК)

Као што је приказано на Слици 4.11., спроведени дијететски протоколи, као и примена статина уз наведене дијететске протоколе, доводили су до значајних промена процента времена кретања у тесту уздигнутог крстастог лавиринта ($F=9.189$, $df=8$). Оба дијететска протокола, протокол са повећаним садржајем метионина, као и протокол са повећаним садржајем метионина и ниским садржајем витамина В комплекса, довели су до значајног скраћења укупног трајања мобилности током петоминутног теста ($p<0.01$) у поређењу са контролном групом. Животиње из групе која је била на протоколу са повећаним садржајем метионина и ниским садржајем витамина В комплекса су се статистички значајно мање времена кретале ($p<0.05$) у односу на животиње из групе која је била на протоколу са повећаним садржајем метионина и нормалним садржајем витамина В комплекса.

Статини, примењени уз стандардни режим исхране, нису довели до промене вредности овог параметра. Ефекат на % ВК изостао је и након примене аторвастатина уз хиперметионинску дијету, док је његова апликација уз хиперметионинску дијету са ниским садржајем витамина В комплекса, значајно повећала проценат времена кретања ($p<0.01$) у односу на групу животиња која је била храњена истом дијетом, али без примене аторвастатина. Након примене овог протокола, % ВК није достигао вредности које је имао у групи која је примала аторвастатин уз стандардну исхрану, као ни вредности у контролној групи. Примена симвастатина уз хиперметионинску дијету довела је до значајног повећања %ВК ($p<0.05$) у односу на групу на хиперметионинској дијети и довела до враћања вредности овог параметра на ниво контролних. Симвастатин примењен уз дијету обогаћену метионином и са недостатком витамина В комплекса довео је до значајног пораста %ВК у односу на групу која је била храњена истом дијетом, без симвастатина ($p<0.05$). Међутим, пораст овог параметра локомоторне активности није био статистички значајан у односу на групу која је примала симвастатин уз дијету обогаћену метионином и уз стандардну храну. Овај параметар није се вратио на ниво контролних вредности након примене овог протокола.

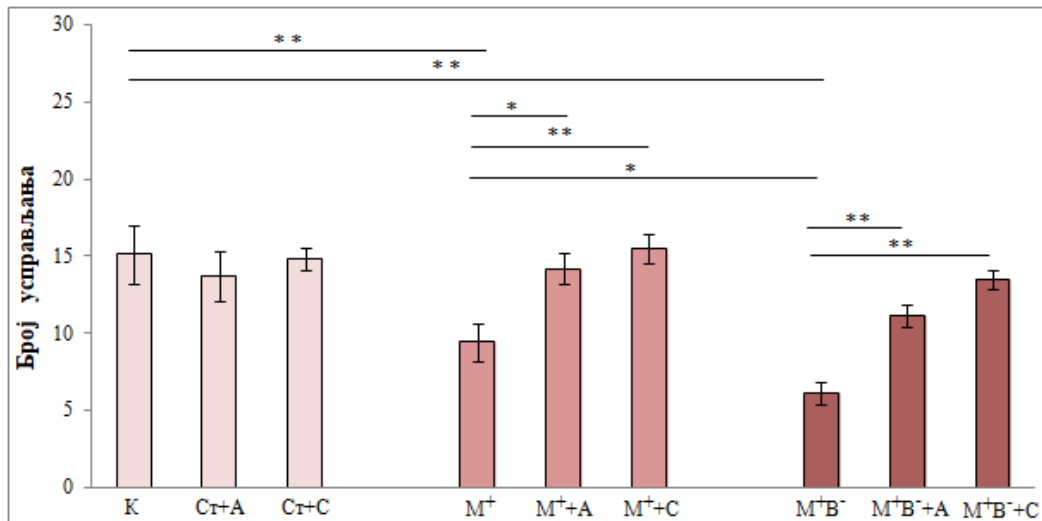


Слика 4.11. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на проценат времена кретања у тесту уздигнутог крстастог лавиринта. К - контрола (n=8), Ct+A - стандардна исхрана+аторвастатин (n=8), Ct+C - стандардна исхрана+симвастатин (n=8), M⁺ - метионином обогаћена исхрана (n=8), M⁺+A - метионином обогаћена исхрана+аторвастатин (n=8), M⁺+C - метионином обогаћена исхрана+симвастатин (n=8), M⁺B⁻ - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса (n=8), M⁺B⁻+A - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин (n=8), M⁺B⁻+C - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

4.1.2.6. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на број усправљања (БУ)

Ефекти исхране обogaћене метионином, исхране обogaћене метионином и дефицијентне витаминима В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и утицај примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на број усправљања (БУ) у тесту уздигнутог крстастог лавиринта приказани су на Слици 4.12. Сви наведени протоколи доводили су до значајних промена БУ ($F=8.018$, $df=8$). Број усправљања био је значајно смањен у групи животиња након исхране обogaћене метионином у поређењу са контролном групом ($p<0.01$). Након исхране обogaћене метионином и дефицијентне витаминима В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) такође је дошло до статистички значајног смањења броја усправљања у поређењу са групом на стандардној исхрани ($p<0.01$). Исхрана обogaћена метионином и дефицијентна витаминима В комплекса још више је смањила број усправљања ($p<0.05$) у односу на исхрану обogaћену метионином.

Примена статина уз стандардни режим исхране није довела до значајних промена БУ у поређењу са контролном групом. Апликација аторвастатина заједно са дијетом обogaћеном метионином испољила је позитиван ефекат на овај параметар експлоративне активности који се манифестовао кроз значајно повећање БУ у поређењу са групом на истом дијететском режиму без примене аторвастатина ($p<0.05$). Исти позитиван ефекат на овај параметар испољио је и симвастатин примењен уз наведени дијететски протокол у поређењу са групом на истом протоколу, али без симвастатина ($p<0.01$). Примена оба статина уз хиперметионинску дијету је као ефекат имала враћање вредности овог параметра на ниво вредности у контролној групи. Аторвастатин и симвастатин примењени уз дијету обogaћену метионином и са недостатком витамина В комплекса као резултат су имали статистички значајно повећање броја усправљања у поређењу са групом животиња на истоветном режиму исхране, али без статина ($p<0.01$). Примена симвастатина је као резултат имала враћање вредности овог параметра на ниво контролних, док је након примене аторвастатина уз овај дијететски протокол, овај ефекат изостао.

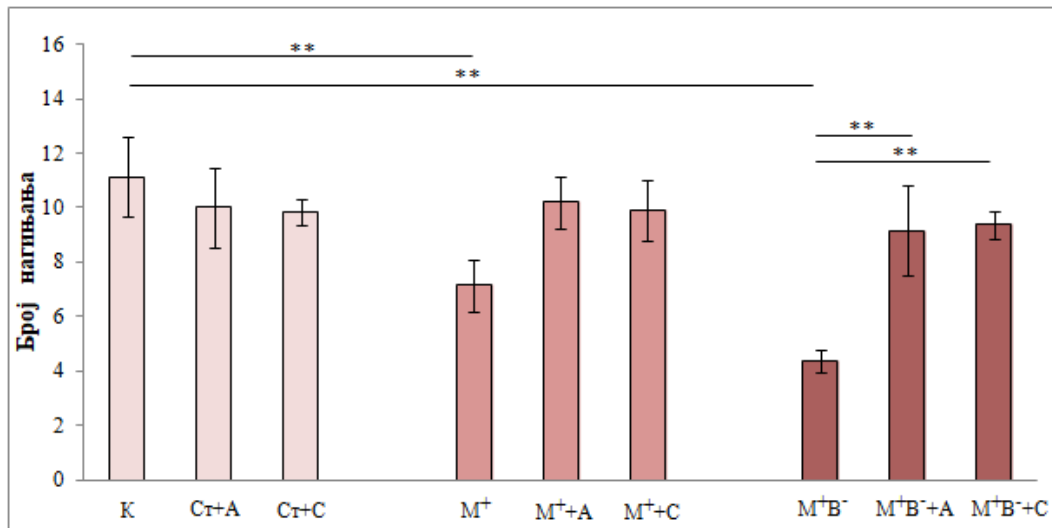


Слика 4.12. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (V_6 , V_9 , V_{12}) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на број усправљања у тесту уздигнутог крстастог лавиринта. К - контрола ($n=8$), Ст+А - стандардна исхрана+аторвастатин ($n=8$), Ст+С - стандардна исхрана+симвастатин ($n=8$), M^+ - метионином обогаћена исхрана ($n=8$), M^+ +А - метионином обогаћена исхрана+аторвастатин ($n=8$), M^+ +С - метионином обогаћена исхрана+симвастатин ($n=8$), M^+B^- - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса ($n=8$), M^+B^- +А - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин ($n=8$), M^+B^- +С - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин ($n=8$). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm SEM$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.1.2.7. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на број нагињања (БН)

На Слици 4.13 приказани су ефекти свих протокола примењених у истраживању на број нагињања (БН) у тесту уздигнутог крстастог лавиринта. Сви наведени протоколи су доводили до значајних промена овог параметра ($F=3.989$, $df=8$). Хронична исхрана са повећаним садржајем метионина свој негативан ефекат је испољила кроз смањење броја нагињања, које је било статистички значајно ($p<0.01$) у поређењу са контролном групом. Исхрана са повећаним садржајем метионина и ниским садржајем витамина В комплекса, такође, је имала за резултат значајно смањење БН у поређењу са контролном групом ($p<0.01$). Међутим, поређењем вредности овог параметра између ове две групе животиња, пад вредности овог параметра није био статистички значајан.

Статини примењени уз стандардну исхрану нису довели до промене БУ у поређењу са контролном групом. Оба статина примењена уз дијету обogaћену метионином такође нису испољила значајан ефекат на овај параметар експлоративне активности у поређењу са групом која је била само на дијети обogaћеној метионином. Са друге стране, резултати добијени у групама код којих су оба ова статина примењена уз хиперметионинску дијету са недостатком витамина В групе показали су позитиван ефекат на вредности овог параметра. Аторвастатин, као и симвастатин, довели су до значајног пораста броја нагињања у поређењу са групом која је била на дијети обogaћеној метионином и са недостатком витамина В групе ($p<0.01$). Крајњи ефекат њихове примене испољен је кроз враћање вредности овог параметра на ниво вредности у контролној групи.

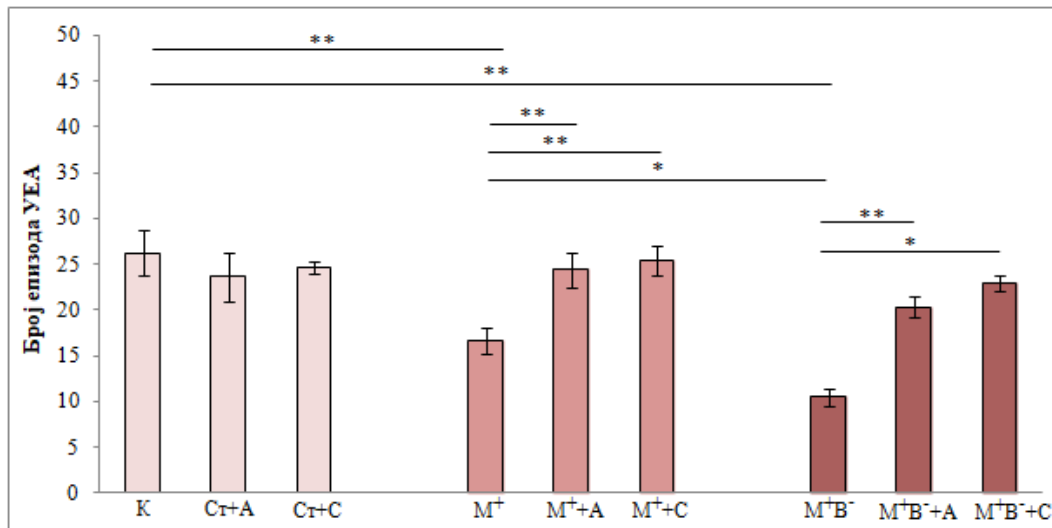


Слика 4.13. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (V_6 , V_9 , V_{12}) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на број нагињања у тесту уздигнутог крстастог лавиринта. К - контрола ($n=8$), St+A - стандардна исхрана+аторвастатин ($n=8$), St+C - стандардна исхрана+симвастатин ($n=8$), M⁺ - метионином обогаћена исхрана ($n=8$), M⁺+A - метионином обогаћена исхрана+аторвастатин ($n=8$), M⁺+C - метионином обогаћена исхрана+симвастатин ($n=8$), M⁺B⁻ - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса ($n=8$), M⁺B⁻+A - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин ($n=8$), M⁺B⁻+C - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин ($n=8$). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm SEM$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.1.2.8. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на број епизода укупне експлоративне активности (УЕА)

Као што је приказано на Слици 4.14., сви спроведени протоколи у овом истраживању доводили су до значајних промена у броју епизода укупне експлоративне активности у тесту уздигнутог крстастог лавиринта ($F=10.751$, $df=8$). Хронична хиперметионинска дијета испољила је негативан ефекат на овај параметар и довела до статистички значајног смањења броја епизода УЕА ($p<0.01$) у односу на вредности забележене у контролној групи. Група на хиперметионинској дијети са недостатком витамина В комплекса такође је довела до значајног смањења овог параметра у поређењу са контролном групом ($p<0.01$). Додатно смањење овог параметра уочено је између групе животиња која је била на хиперметионинској дијети са недостатком витамина В комплекса у односу на групу која је била на хиперметионинској дијети са нормалним садржајем витамина В комплекса ($p<0.01$).

Статини примењени уз стандардни режим исхране нису довели до значајних промена вредности овог параметра у поређењу са контролном групом животиња. Примена аторвастатина уз дијету обogaћену метионином довела је до значајног повећања броја епизода УЕА ($p<0.01$) у поређењу са групом која је била само на дијети обogaћеној метионином. Исти ефекат на овај параметар експлоративне активности испољио је и симвастатин примењен уз наведени дијететски протокол ($p<0.01$) у односу на групу која је била на дијети обogaћеној метионином. Оба статина након примене уз хиперметионинску дијету довела су до враћања вредности овог параметра на ниво контролних вредности. Истовремена примена оба статина уз дијету обogaћену метионином и са недостатком витамина В комплекса такође је резултирала у значајном порасту броја епизода УЕА у поређењу са групом на дијети обogaћеној метионином и са недостатком витамина В комплекса ($p<0.01$). Симвастатин примењен уз овај дијететски протокол довео је до враћања вредности овог параметра на ниво контролних вредности, док је овај ефекат изостао након примене аторвастатина уз идентичан дијететски протокол.



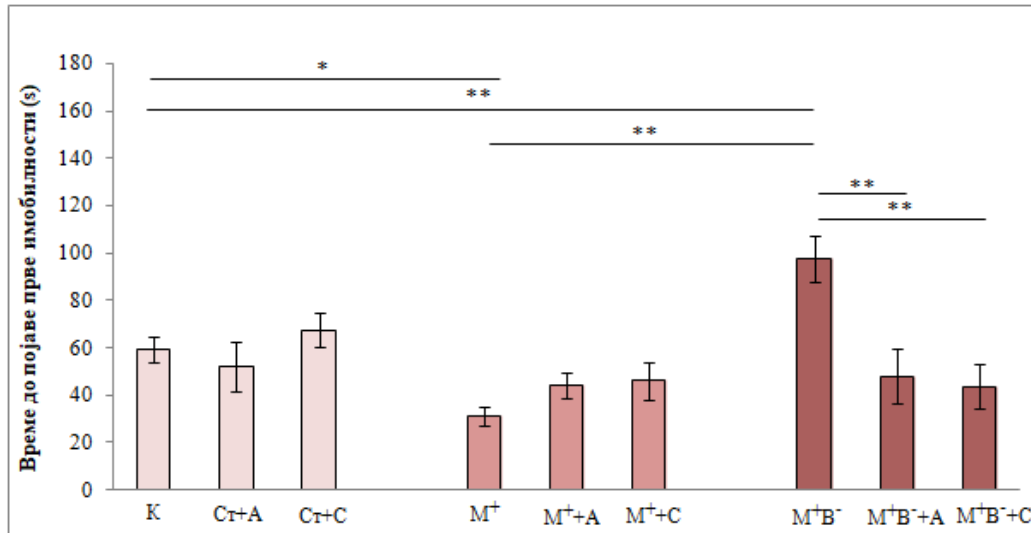
Слика 4.14. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (V_6 , V_9 , V_{12}) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на број епизода укупне експлоративне активности у тесту уздигнутог крстастог лавиринта. К - контрола ($n=8$), Ст+А - стандардна исхрана+аторвастатин ($n=8$), Ст+С - стандардна исхрана+симвастатин ($n=8$), M^+ - метионином обогаћена исхрана ($n=8$), M^+ +А - метионином обогаћена исхрана+аторвастатин ($n=8$), M^+ +С - метионином обогаћена исхрана+симвастатин ($n=8$), M^+B^- - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса ($n=8$), M^+B^-+A - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин ($n=8$), M^+B^-+C - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин ($n=8$). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm SEM$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.1.3. Тест качења за реп (ТКР)

4.1.3.1. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на време до појаве прве имобилности (ВПИ)

На Слици 4.15. представљени су ефекти исхране обогаћене метионином, исхране обогаћене метионином са недостатком фолата, пиридоксина и кобаламина, као и утицај примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на време до појаве прве имобилности у тесту качења за реп. Сви наведени протоколи доводили су до значајних промена овог параметра ($F=5.494$, $df=8$). Примена дијете обогаћене метионином довела је до значајног скраћења времена до појаве прве имобилности ($p<0.05$) у поређењу са вредностима у контролној групи, док је дијета обогаћена метионином са недостатком фолата, пиридоксина и кобаламина довела до супротног ефекта и изазвала статистички значајно продужење времена до појаве прве имобилности у поређењу са контролном групом ($p<0.01$). Значајан пораст овог параметра уочен је у групи животиња која је била на хиперметионинској дијети са недостатком витамина В групе у поређењу са групом која је била на хиперметионинској дијети ($p<0.01$).

Примена статина уз стандардну исхрану није довела до промене вредности овог параметра у поређењу са контролом. Примена аторвастатина и симвастатина уз дијету обогаћену метионином такође није довела до значајних промена вредности овог параметра. Са друге стране, хронична примена оба ова статина уз дијету обогаћену метионином и са недостатком витамина В групе довела је до статистички значајног скраћења времена до појаве прве имобилности ($p<0.01$) у односу на групу животиња која је била на идентичном дијететском протоколу, али без примене ових статина. Статини примењени уз овај дијететски протокол вратили су вредности овог параметра на ниво контролних вредности.

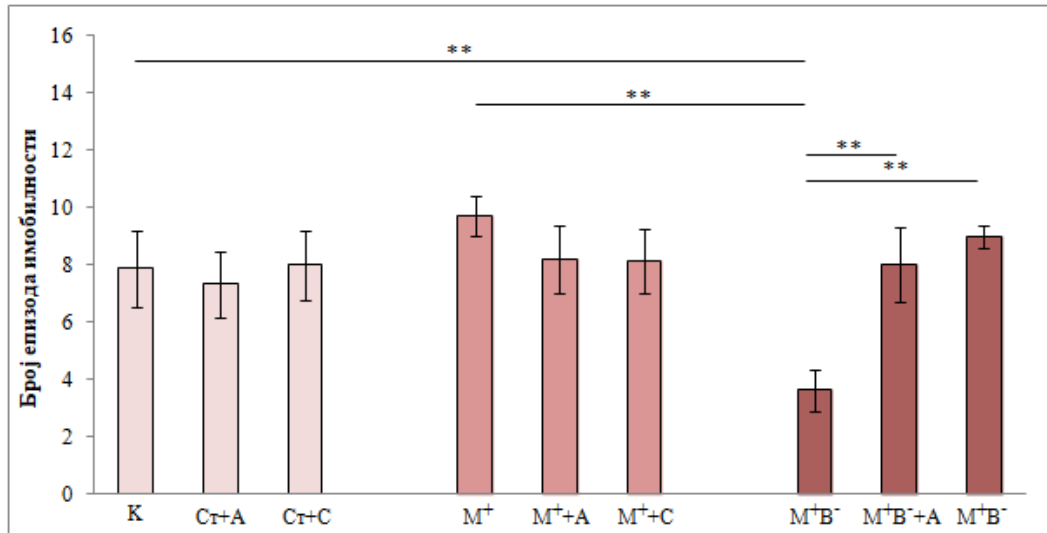


Слика 4.15. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на време до појаве прве имобилности (s) у тесту качења за реп. К - контрола (n=8), Ст+А - стандардна исхрана+аторвастатин (n=8), Ст+С - стандардна исхрана+симвастатин (n=8), М⁺ - метионином обогаћена исхрана (n=8), М⁺+А - метионином обогаћена исхрана+аторвастатин (n=8), М⁺+С - метионином обогаћена исхрана+симвастатин (n=8), М⁺V⁻ - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса (n=8), М⁺V⁻+А - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин (n=8), М⁺V⁻+С - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

4.1.3.2. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на број епизода имобилности (БЕИ)

Ефекти исхране обogaћене метионином, исхране обogaћене метионином са недостатком витамина В групе и утицај примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на број епизода имобилности у тесту качења за реп приказани су на Слици 4.16. Сви наведени протоколи доводили су до значајних промена овог параметра ($F=2.949$, $df=8$). Исхрана обogaћена метионином није довела до значајне промене вредности овог параметра у поређењу са контролном групом, док је исхрана обogaћена метионином и са недостатком фолата, пиридоксина и кобаламина довела до значајног смањења броја епизода имобилности у поређењу са контролном групом ($p<0.01$). Смањење броја епизода имобилности било је израженије у групи животиња која је била на исхрани обogaћеној метионином и са недостатком витамина В групе у поређењу са групом која је била на исхрани обogaћеној метионином и са нормалним садржајем ових витамина ($p<0.01$).

Примена статина уз стандардни режим исхране није променила вредности овог параметра у поређењу са контролом. Промене у вредности овог параметра изостале су и након примене оба статина уз хиперметионинску дијету у поређењу са групом животиња на хиперметионинској дијети. Апликација аторвастатина и симвастатина истовремено са дијетом обogaћеном метионином и са недостатком витамина В комплекса довела је до значајног повећања БЕИ у поређењу са групом која је била на истоветној дијети, само без статина ($p<0.01$). Примена оба статина довела је до враћања вредности овог параметра на ниво контролних вредности.

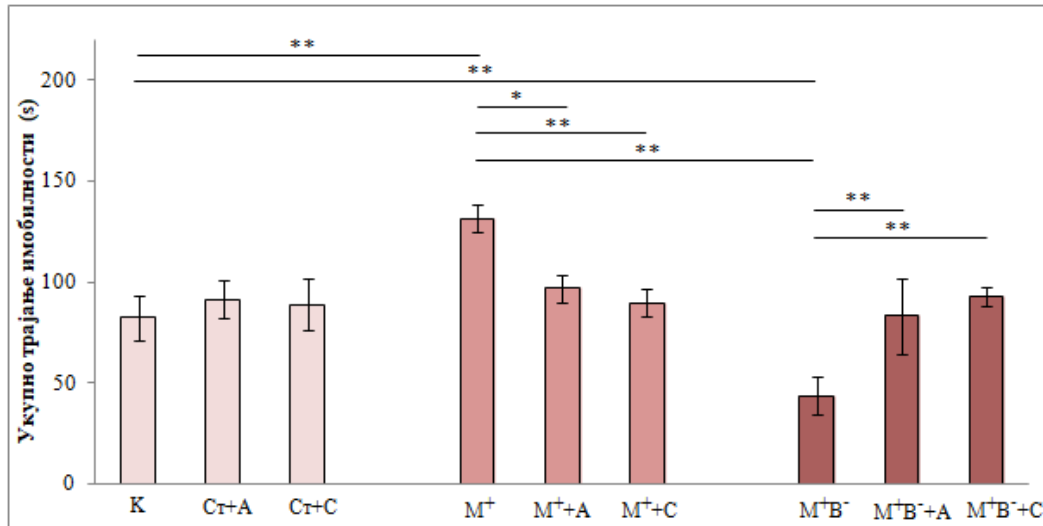


Слика 4.16. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на број епизода имобилности у тесту качења за реп. К - контрола (n=8), Ct+A - стандардна исхрана+аторвастатин (n=8), Ct+C - стандардна исхрана+симвастатин (n=8), M⁺ - метионином обогаћена исхрана (n=8), M⁺+A - метионином обогаћена исхрана+аторвастатин (n=8), M⁺+C - метионином обогаћена исхрана+симвастатин (n=8), M⁺B⁻ - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса (n=8), M⁺B⁻+A - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин (n=8), M⁺B⁻+C - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

4.1.3.3. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на укупно трајање имобилности (УТИ)

На Слици 4.17. представљени су ефекти примењених хроничних протокола на укупно трајање имобилности у тесту качења за реп. Сви наведени протоколи доводили су до значајних промена овог параметра ($F=4.940$, $df=8$). Примена дијете обогаћене метионином довела је до значајног продужавања укупног времена имобилности у односу на контролну групу ($p<0.01$). Са друге стране, дијета обогаћена метионином и са недостатком витамина В комплекса изазвала је супротан ефекат и довела до значајног снижења овог параметра у поређењу са контролном групом ($p<0.01$), али и у поређењу са групом на дијети обогаћеној метинином и са нормалним садржајем витамина В комплекса ($p<0.01$).

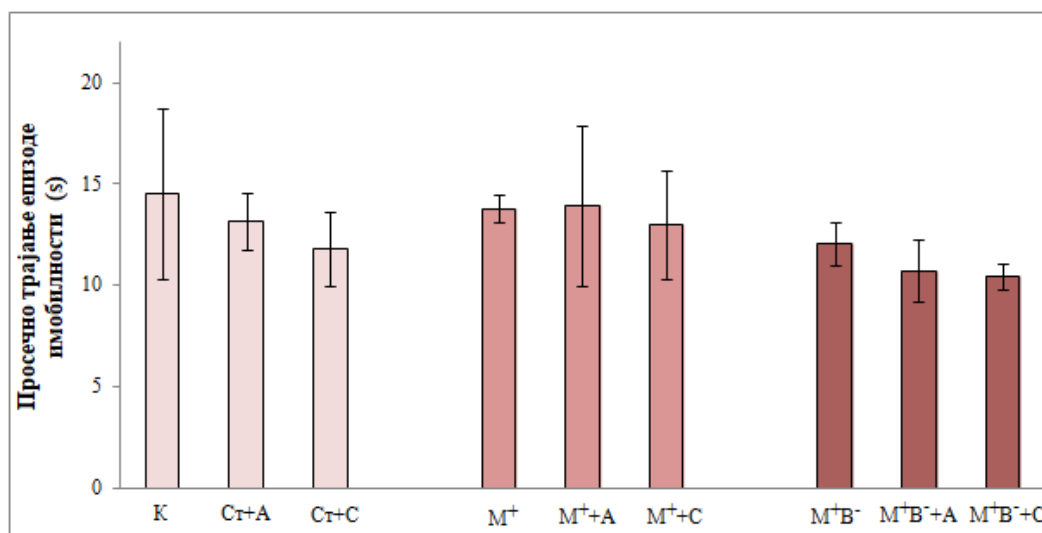
Статини примењени уз стандардни режим исхране нису довели до значајне промене вредности овог параметра. Аторвастатин примењен уз дијету обогаћену метионином испољио је позитиван ефекат и довео до значајног снижења укупног трајања имобилности ($p<0.05$) у поређењу са групом животиња која је била на дијети обогаћеној метионином ($p<0.05$). Исти ефекат на овај параметар испољила је и примена симвастатина уз идентичан дијететски протокол ($p<0.01$) у односу на групу на истом протоколу, али без примењеног статина. Примена статина уз овај дијететски протокол за резултат је имала враћање вредности УТИ на ниво контролних вредности. Апликација аторвастатина и симвастатина уз дијету обогаћену метионином и са недостатком витамина В групе довела је до тога да су животиње значајно више времена биле имобилне у току тестирања у односу на групу која је била на хиперметионинској дијети са недостатком витамина В комплекса ($p<0.01$). Оба статина примењена уз наведени дијететски режим довела су до враћања вредности овог параметра на ниво контролних.



Слика 4.17. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на укупно трајање имобилности (s) у тесту качења за реп. К - контрола (n=8), St+A - стандардна исхрана+аторвастатин (n=8), St+C - стандардна исхрана+симвастатин (n=8), M⁺ - метионином обогаћена исхрана (n=8), M⁺+A - метионином обогаћена исхрана+аторвастатин (n=8), M⁺+C - метионином обогаћена исхрана+симвастатин (n=8), M⁺B⁻ - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса (n=8), M⁺B⁻+A - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин (n=8), M⁺B⁻+C - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

4.1.3.4. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на просечно трајање епизоде имобилности (ПТЕИ)

На Слици 4.18. приказани су ефекти исхране обogaћене метионином, хроничне исхране обogaћене метионином са недостатком фолата, пиридоксина и кобаламина, и утицај примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на просечно трајање епизоде имобилности (ПТЕИ). Ниједан од спроведених протокола није довео до значајних промена вредности овог параметра ($F=0.391$, $df=8$).



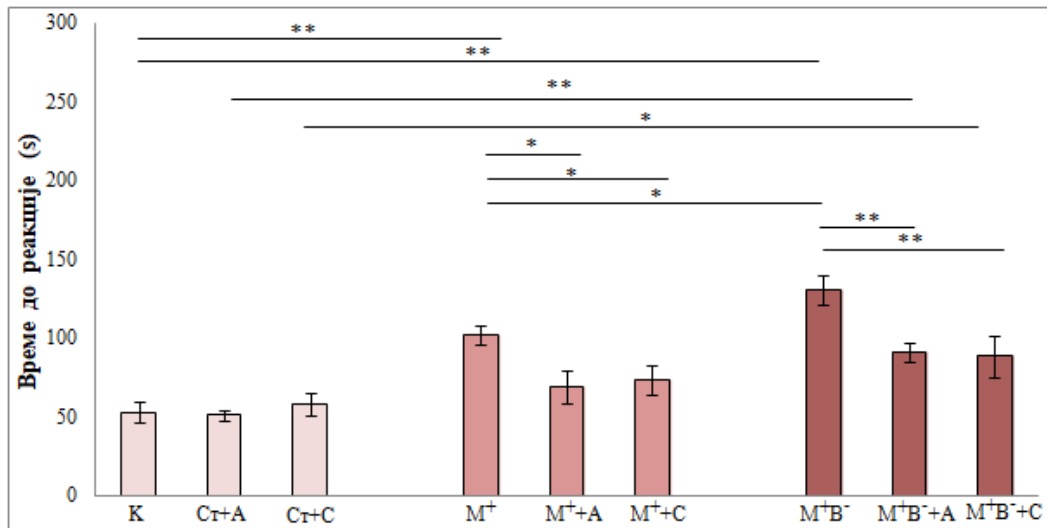
Слика 4.18. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на просечно трајање епизоде имобилности (s) у тесту качења за реп. К - контрола (n=8), Ст+А - стандардна исхрана+аторвастатин (n=8), Ст+С - стандардна исхрана+симвастатин (n=8), М⁺ - метионином обogaћена исхрана (n=8), М⁺+А - метионином обogaћена исхрана+аторвастатин (n=8), М⁺+С - метионином обogaћена исхрана+симвастатин (n=8), М⁺В⁻ - метионином обogaћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса (n=8), М⁺В⁻+А - метионином обogaћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин (n=8), М⁺В⁻+С - метионином обogaћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.1.4. Тест вруће плоче

4.1.4.1. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на време до реакције (ВР) у ВП тесту

Као што је представљено на Слици 4.19., сви примењени хронични протоколи доводили су до значајних промена времена до реакције у тесту вруће плоче ($F=8.873$, $df=8$). Исхрана обogaћена метионином узроковала је статистички значајно продужење времена до реакције у поређењу са контролним условима ($p<0.01$). Исти ефекат на ВР испољила је и исхрана обogaћена метионином и дефицијентна витаминима В комплекса у поређењу са контролном групом ($p<0.01$). Додатно продужење времена које је било потребно да животиње одреагују на примењени стимулус уочено је у групи животиња која је била на дијети обogaћеној метионином и са недостатком витамина В комплекса у односу на групу животиња која је била на дијети обogaћеној метионином и са нормалним садржајем витамина В комплекса ($p<0.05$).

Статини примењени уз стандардну исхрану нису довели до промене вредности овог параметра у тесту вруће плоче. Аторвастатин примењен истовремено уз хиперметионинску дијету довео је до значајног скраћења времена реакције у односу на групу са примењеним истим дијететским протоколом без аторвастатина ($p<0.05$). Исти ефекат на овај параметар у тесту вруће плоче испољио је и симвастатин апликован уз истоветан дијететски протокол у поређењу са групом на хиперметионинској дијети ($p<0.05$). Примена оба статина уз ову дијету резултирала је враћањем вредности овог параметра на ниво контролних вредности. Примена аторвастатина и симвастатина уз дијету обogaћену метионином и са дефицитом витамина В комплекса довела је до значајног скраћења времена до реакције у поређењу са групом животиња на идентичном дијететском протоколу, али без апликованих статина ($p<0.01$). Симвастатин, иако је снизио вредности овог параметра, није резултирао враћањем вредности времена до реакције на ниво у контролној групи, као ни на ниво вредности у групи која је уз стандардну исхрану примала симвастатин. Примена аторвастатина уз овај дијететски протокол није успела да врати вредности овог параметра на ниво котролних вредности, као ни на ниво вредности у групи оја је примала аторвастатин уз стандардни режим исхране.



Слика 4.19. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на време до реакције (s) у тесту вруће плоче. К - контрола (n=8), Ct+A - стандардна исхрана+аторвастатин (n=8), Ct+C - стандардна исхрана+симвастатин (n=8), M⁺ - метионином обогаћена исхрана (n=8), M⁺+A - метионином обогаћена исхрана+аторвастатин (n=8), M⁺+C - метионином обогаћена исхрана+симвастатин (n=8), M⁺B⁻ - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса (n=8), M⁺B⁻+A - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин (n=8), M⁺B⁻+C - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

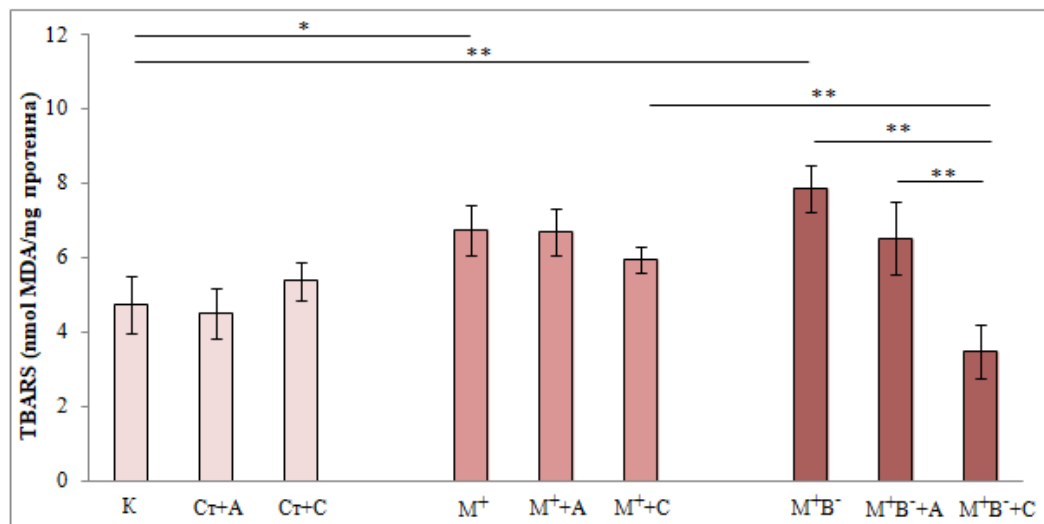
4.2. Промене оксидативног статуса у ткиву хипокампуса узроковане примењеним дијететским протоколима и применом статина

4.2.1. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В6, В9, В12) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на индекс липидне пероксидације (изражен као TBARS) у ткиву хипокампуса

На Слици 4.20. приказани су ефекти хроничне исхране обогаћене метионином, хроничне исхране обогаћене метионином са недостатком фолата, пиридоксина и кобаламина и утицај примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на вредности индекса липидне пероксидације (изражен као TBARS) у ткиву хипокампуса. Сви наведени протоколи доводили су до значајних промена индекса липидне пероксидације у хипокампусу ($F=4.162$, $df=8$). Хронични протокол исхране обогаћене метионином узроковао је статистички значајно повећање TBARS вредности ($p<0.05$) у поређењу са контролним вредностима. Исхрана обогаћена метионином и са недостатком фолата, пиридоксина и кобаламина узроковала је, такође, статистички значајно повећање TBARS вредности ($p<0.01$) у поређењу са контролним вредностима. TBARS вредности нису биле статистички значајно промењене између група животиња које су биле на наведеним дијететским протоколима.

Аторвастатин и симвастатин, апликовани истовремено уз стандардни режим исхране, као и уз исхрану обогаћену метионином, нису довели до значајних промена вредности индекса липидне пероксидације. Ефекат аторвастатина на овај параметар оксидативног статуса изостао је и након његове примене уз дијету обогаћену метионином и са недостатком витамина В групе. Са друге стране, примена симвастатина заједно са исхраном обогаћеном метионином и са недостатком фолата, пиридоксина и кобаламина резултирала је у значајном паду вредности индекса липидне пероксидације у поређењу са групом на исхрани обогаћеној метионином и са недостатком фолата, пиридоксина и кобаламина ($p<0.05$). Симвастатин је довео до већег пада липидне пероксидације у поређењу са аторвастатином ($p<0.01$) након примене уз хиперметионинску дијету са недостатком фолата, пиридоксина и кобаламина. Поред тога, симвастатин апликован заједно са дијетом обогаћеном метионином и са недостатком витамина В комплекса,

довео је до значајног пада TBARS вредности ($p < 0.01$) у поређењу са групом која је примала симвастатин заједно са дијетом обогаћеном метионином.

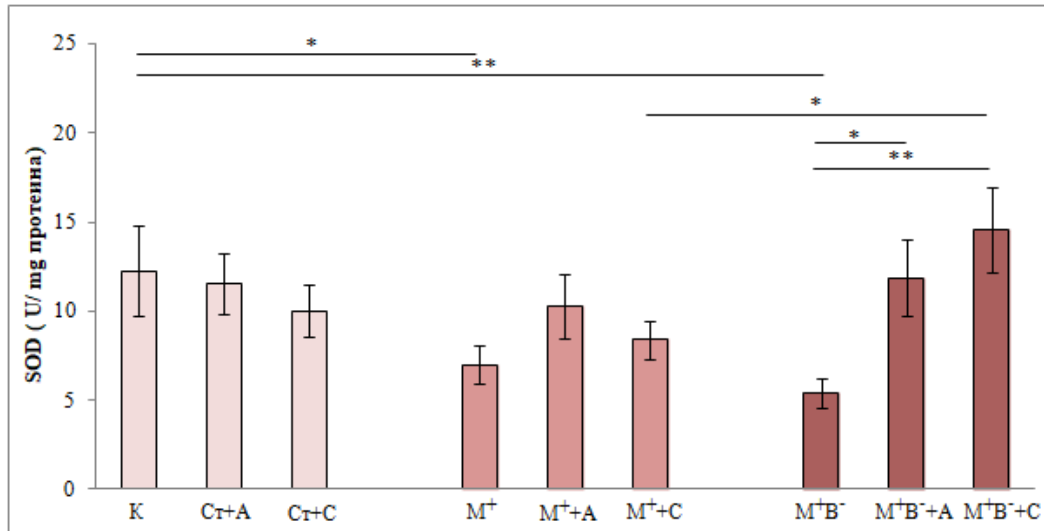


Слика 4.20. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (V_6 , V_9 , V_{12}) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на индексе липидне пероксидације (TBARS, nmol MDA/mg протеина) у ткиву хипокампуса. К - контрола ($n=8$), Ct+A - стандардна исхрана+аторвастатин ($n=8$), Ct+C - стандардна исхрана+симвастатин ($n=8$), M⁺ - метионином обогаћена исхрана ($n=8$), M⁺+A - метионином обогаћена исхрана+аторвастатин ($n=8$), M⁺+C - метионином обогаћена исхрана+симвастатин ($n=8$), M⁺B⁻ - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса ($n=8$), M⁺B⁻+A - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин ($n=8$), M⁺B⁻+C - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин ($n=8$). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm SEM$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.2.2. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В6, В9, В12) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на активност супероксид-дисмутазе (SOD) у хипокампусу

Ефекти хроничне исхране обogaћене метионином, хроничне исхране обogaћене метионином и са недостатком фолата, пиридоксина и кобаламина и утицај примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на активност супероксид-дисмутазе (SOD) у хипокампусу представљени су на Слици 4.21. Сви наведени протоколи доводили су до значајних промена активности SOD у ткиву мозга ($F=2.739$, $df=8$). Исхрана обogaћена метионином резултирала је у значајном паду активности SOD у поређењу са контролном групом ($p<0.05$). Пад активности овог ензима уочен је и код групе животиња која је била на исхрани обogaћеној метионином и са недостатком витамина В групе у поређењу са контролном групом ($p<0.01$).

Примена аторвастатина и симвастатина како уз стандардну исхрану, тако и уз исхрану обogaћену метионином, није довела до значајних промена активности овог ензима. Примена аторвастатина уз исхрану обogaћену метионином и са недостатком фолата, пиридоксина и кобаламина довела је до значајног пораста активности SOD у хипокампаалном ткиву у поређењу са вредностима у групи животиња која је била на дијети обogaћеној метионином ($p<0.05$). Исти ефекат на активност SOD испољила је и примена симвастатина уз идентичну дијету у поређењу са групом на наведеној дијети, без апликованог симвастатина. Додатно повећање активности SOD испољено је и у групи која је примала симвастатин уз исхрану обogaћену метионином и са дефицитом витамина В групе у поређењу са групом која је примала симвастатин само уз исхрану обogaћену метионином ($p<0.05$).

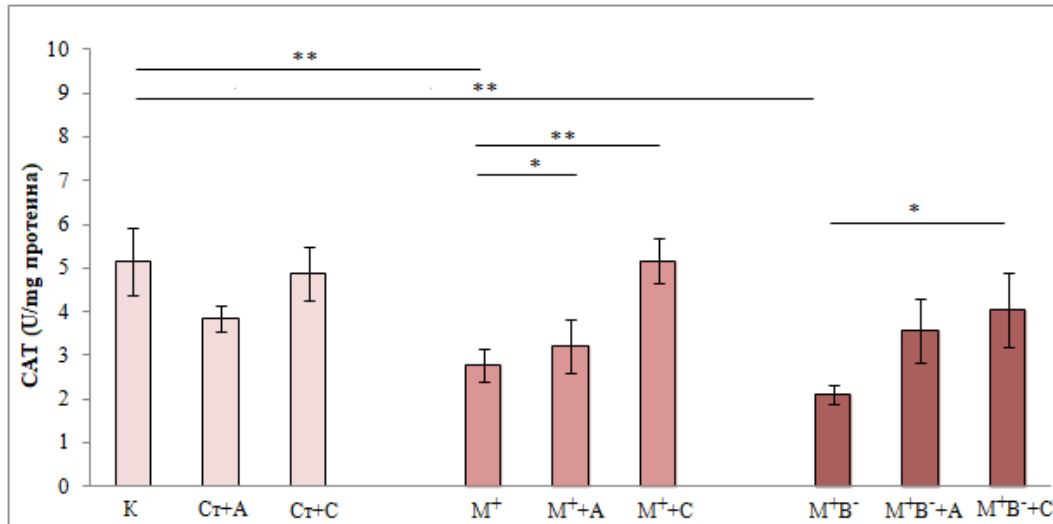


Слика 4.21. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (B_6 , B_9 , B_{12}) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на активност супероксид-дисмугазе SOD (U/mg протеина) у ткиву хипокампуса. К - контрола (n=8), Ст+А - стандардна исхрана+аторвастатин (n=8), Ст+С - стандардна исхрана+симвастатин (n=8), М⁺ - метионином обогаћена исхрана (n=8), М⁺+А - метионином обогаћена исхрана+аторвастатин (n=8), М⁺+С - метионином обогаћена исхрана+симвастатин (n=8), М⁺В⁻ - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса (n=8), М⁺В⁻+А - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин (n=8), М⁺В⁻+С - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

4.2.3. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В6, В9, В12) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на активност каталазе (САТ) у хипокампусу

На Слици 4.22. представљени су ефекти хроничне исхране обogaћене метионином, хроничне исхране обogaћене метионином са недостатком фолата, пиридоксина и кобаламина и утицај примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на активност каталазе у хипокампаљном ткиву. Сви наведени протоколи доводили су до значајних промена овог параметра у ткиву хипокампуса ($F=3.262$, $df=8$). Повећани унос метионина са нормалним садржајем витамина В комплекса довео је до значајног пада активности САТ у хипокампусу ($p<0.01$) у поређењу са вредностима из контролне групе. Повећани унос метионина са ниским садржајем витамина В комплекса такође је као ефекат имао значајан пад активности овог ензима у поређењу са контролом ($p<0.01$).

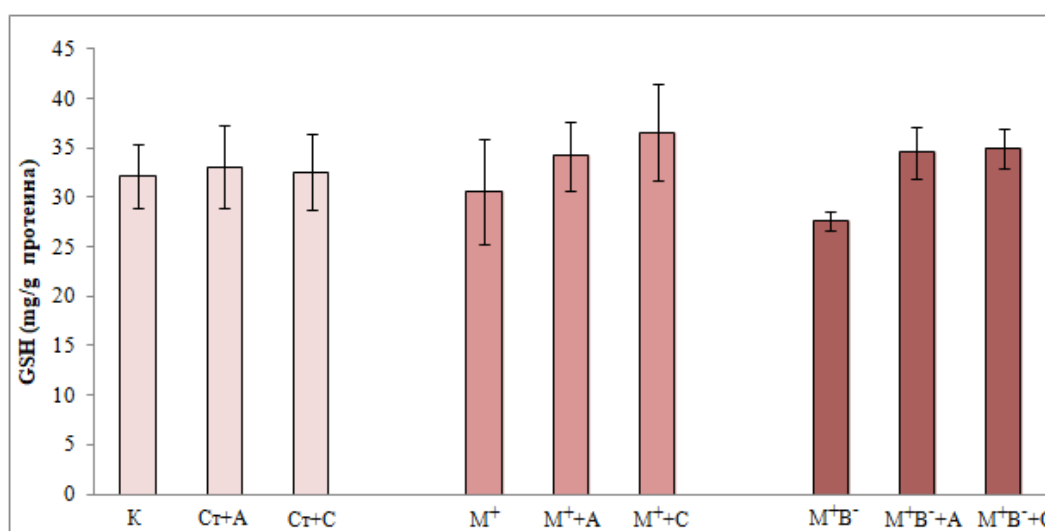
Статини примењени заједно са стандардним режимом исхране нису довели до промена САТ активности у односу на контролну групу. Аторвастатин примењен уз хиперметионинску дијету није довео до значајних промена овог параметра оксидативног статуса, за разлику од симвастатина, који је довео до значајног пораста активности каталазе примењен уз идентичан протокол у поређењу са групом животиња која је била само на хиперметионинској дијети ($p<0.01$), враћајући вредности овог параметра на ниво контролних. Симвастатин је испољио значајно повећање активности каталазе у ткиву хипокампуса у поређењу са аторвастатином ($p<0.05$) након њихове примене уз хиперметионинску дијету ($p<0.05$). Истоветан ефекат на активност овог ензима симвастатин је испољио након примене уз дијету обogaћену метионином и са дефицитом витамина В комплекса у поређењу са групом на истом дијететском протоколу, само без овог статина ($p<0.05$). Симвастатин је и у овом случају довео до враћања вредности овог параметра на ниво контролних. Аторвастатин, примењен уз исти дијететски протокол, није довео до промене у активности каталазе у ткиву хипокампуса.



Слика 4.22. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (V_6 , V_9 , V_{12}) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на на активност каталазе CAT (U/mg протеина) у ткиву хипокампуса. К - контрола (n=8), Ст+А - стандардна исхрана+аторвастатин (n=8), Ст+С - стандардна исхрана+симвастатин (n=8), М⁺ - метионином обогаћена исхрана (n=8), М⁺А - метионином обогаћена исхрана+аторвастатин (n=8), М⁺С - метионином обогаћена исхрана+симвастатин (n=8), М⁺В⁻ - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса (n=8), М⁺В⁻А - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин (n=8), М⁺В⁻С - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

4.2.4. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на укупни глутатион (GSH) у хипокампусу

На Слици 4.23. приказани су ефекти хроничне исхране обogaћене метионином, хроничне исхране обogaћене метионином са недостатком фолата, пиридоксина и кобаламина, и утицај примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на вредности укупног глутатиона (GSH) у хипокампусу. Примењени протоколи нису доводили до значајних промена овог параметра ($F=0.595$, $df=8$).



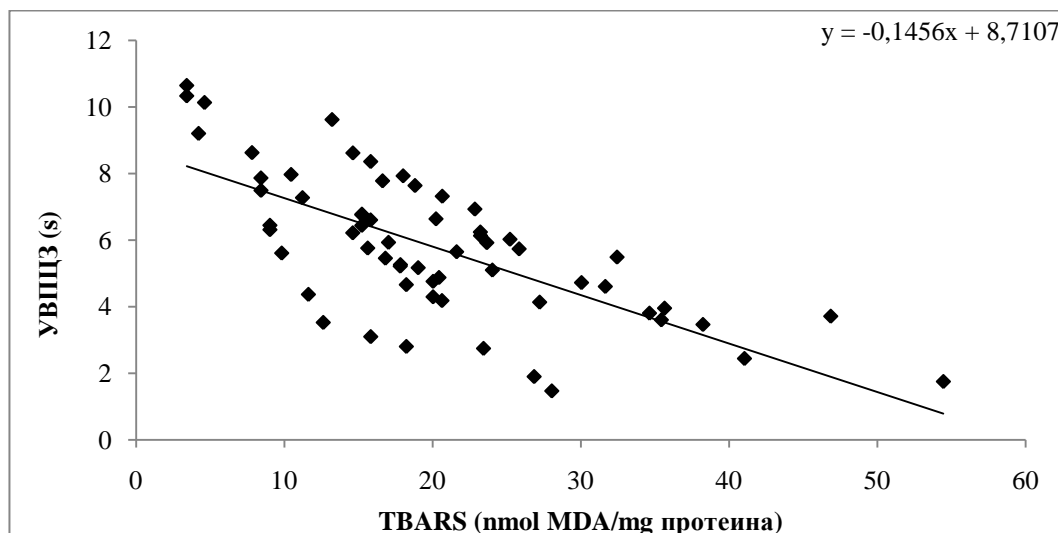
Слика 4.23. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на укупни глутатион (GSH, mg/g протеина) у ткиву хипокампуса. К - контрола (n=8), Ст+А - стандардна исхрана+аторвастатин (n=8), Ст+С - стандардна исхрана+симвастатин (n=8), М⁺ - метионином обogaћена исхрана (n=8), М⁺А - метионином обogaћена исхрана+аторвастатин (n=8), М⁺С - метионином обogaћена исхрана+симвастатин (n=8), М⁺В⁻ - метионином обogaћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса (n=8), М⁺В⁻А - метионином обogaћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин (n=8), М⁺В⁻С - метионином обogaћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.3. Анализа међусобне повезаности параметара бихевиоралних тестова и параметара оксидативног статуса

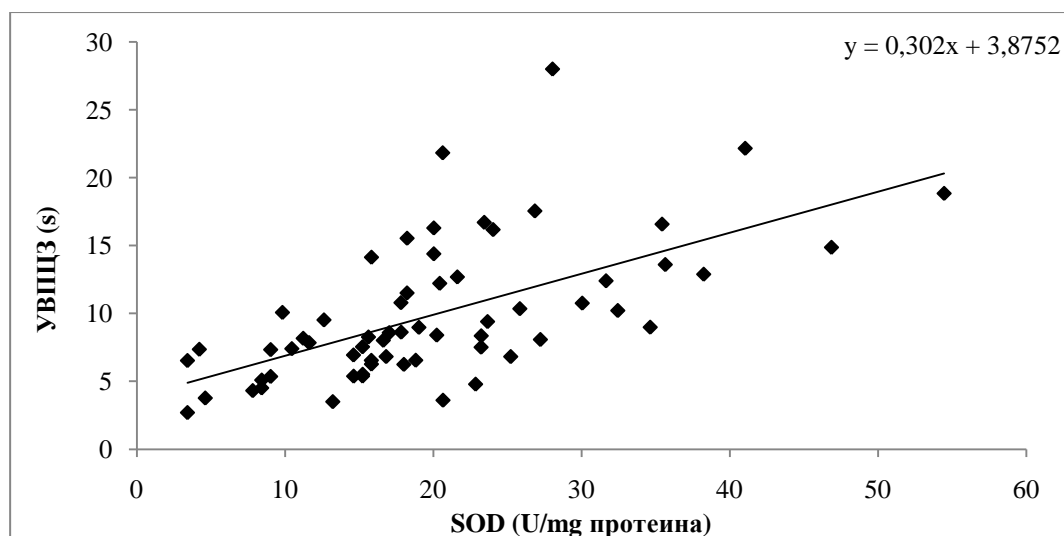
4.3.1. Анализа међусобне повезаности параметара бихевиоралних индикатора за процену степена анксиозности и оксидативног статуса

4.3.1.1. Анализа међусобне повезаности укупног времена проведеног у централној зони у ОП тесту и параметара оксидативног статуса

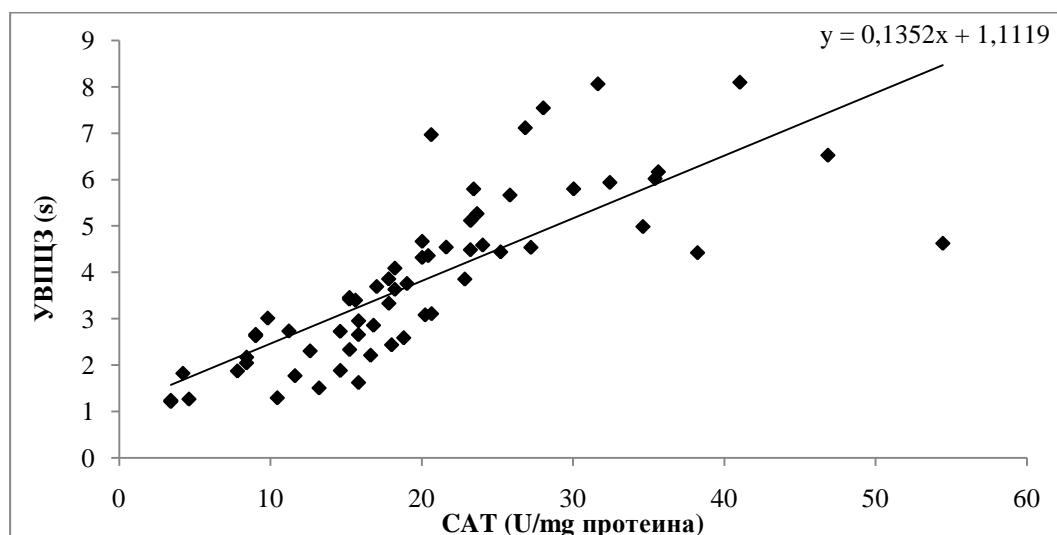
Слика 4.24. приказује међусобну повезаност вредности индекса липидне пероксидације изражене као TBARS и укупног времена проведеног у централној зони ОП теста за све испитиване групе ($n=72$). Анализа је показала да у свим испитиваним групама постоји јака, негативна корелација између вредности TBARS и укупног времена проведеног у централној зони ОП ($r = 0.70$, $p = 2.07^{-10}$). На Слици 4.25. приказана је међусобна повезаност активности SOD у хипокампусу и укупног времена проведеног у централној зони ОП теста за све испитиване групе ($n=72$). Овом анализом потврђена је јака, позитивна корелација између активности SOD ($r = 0.61$, $p = 1.31^{-07}$) и укупног времена проведеног у централној зони ОП теста за све испитиване групе ($n=72$). Међусобна повезаност активности хипокампадне САТ и укупног времена проведеног у централној зони ОП теста за све испитиване групе ($n=72$) представљена је на Слици 4.26. Анализа је показала јаку, позитивну корелацију између активности САТ ($r = 0.78$, $p = 6.89^{-14}$) и вредности укупног времена проведеног у централној зони ОП теста.



Слика 4.24. Анализа међусобне повезаности индекса липидне пероксидације (TBARS, nmol/mg протеина) у хипокампусу и укупног времена проведеног у централној зони у ОП тесту за све испитиване групе (n=72). Представљене вредности означавају средње вредности испитиваних параметара за сваку појединачну групу \pm SEM.



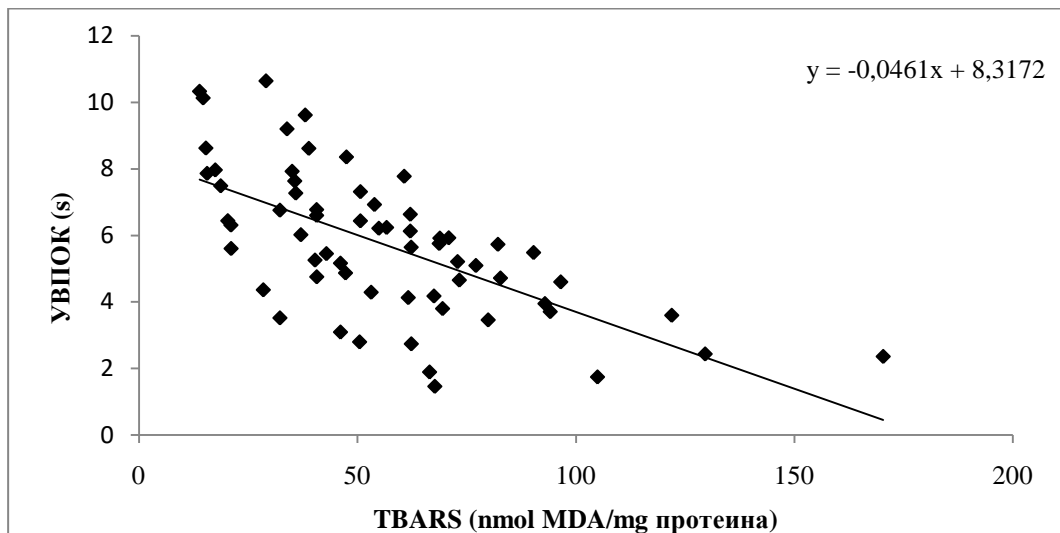
Слика 4.25. Анализа међусобне повезаности активности SOD (U/mg протеина) у хипокампусу и укупног времена проведеног у централној зони у ОП тесту за све испитиване групе (n=72). Представљене вредности означавају средње вредности испитиваних параметара за сваку појединачну групу \pm SEM.



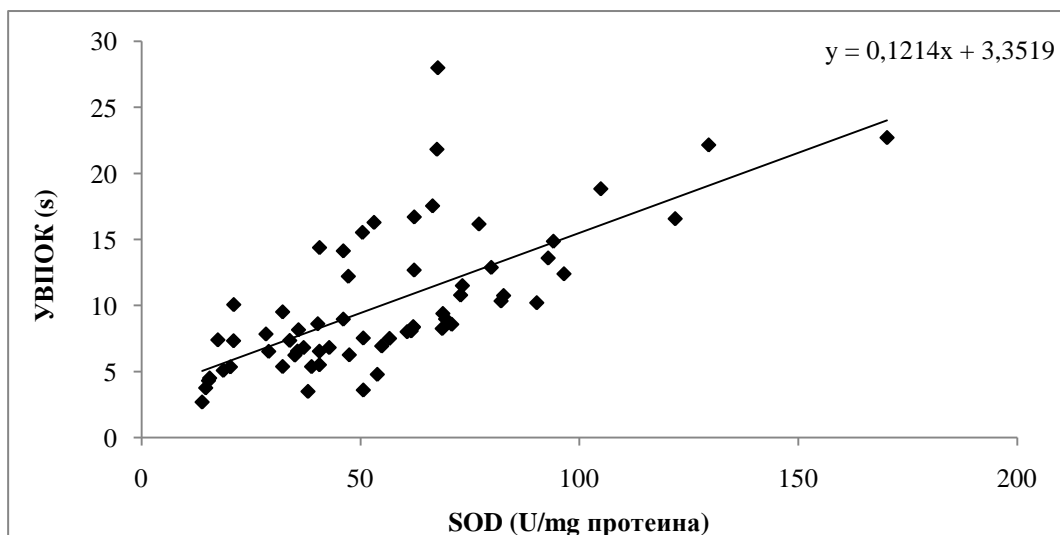
Слика 4.26. Анализа међусобне повезаности активности САТ (U/mg протеина) у хипокампусу и укупног времена проведеног у централној зони у ОП тесту за све испитиване групе (n=72). Представљене вредности означавају средње вредности испитиваних параметара за сваку појединачну групу \pm SEM.

4.3.1.2. Анализа међусобне повезаности укупног времена проведеног у отвореним крацима у УКЛ тесту и параметара оксидативног статуса

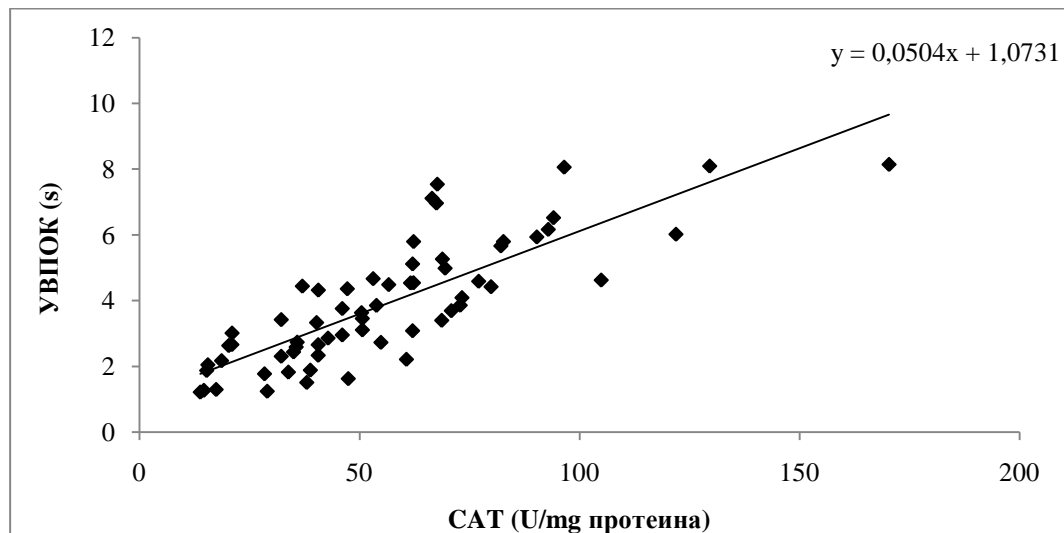
На Слици 4.27. приказана је међусобна повезаност вредности индекса липидне пероксидације (изражене као TBARS) у хипокампусу и укупног времена проведеног у централној зони УКЛ-а (поздани индикатор за процену степена анксиозности) за све испитиване групе (n=72). Анализа је показала да у свим испитиваним групама постоји јака, негативна корелација између вредности TBARS и укупног времена проведеног у отвореним крацима у УКЛ тесту ($r = 0.64$, $p = 1.75^{-8}$). Слика 4.28. приказује међусобну повезаност активности SOD у ткиву хипокампуса и укупног времена проведеног у отвореним крацима УКЛ-а за све испитиване групе (n=72). Анализом је потврђено да постоји јака, позитивна корелација између активности SOD ($r = 0.69$, $p = 1.31^{-10}$) и вредности укупног времена проведеног у отвореним крацима УКЛ-а. На Слици 4.28. приказана је међусобна повезаност активности хипокампадне САТ и укупног времена проведеног у централној зони УКЛ-а. Анализа је показала да у свим испитиваним групама постоји јака, позитивна корелација потврђена између САТ ($r = 0.82$, $p = 3.74^{-16}$) и вредности укупног времена проведеног у централној зони УКЛ-а.



Слика 4.27. Анализа међусобне повезаности индекса липидне пероксидације (TBARS, nmol MDA/mg протеина) у хипокампусу и укупног времена проведеног у отвореним крацима у УКЛ тесту за све испитиване групе (n=72). Представљене вредности означавају средње вредности испитиваних параметара за сваку појединачну групу \pm SEM.



Слика 4.28. Анализа међусобне повезаности активности SOD у хипокампусу и укупног времена проведеног у отвореним крацима у УКЛ тесту за све испитиване групе (n=72). Представљене вредности означавају средње вредности испитиваних параметара за сваку појединачну групу \pm SEM

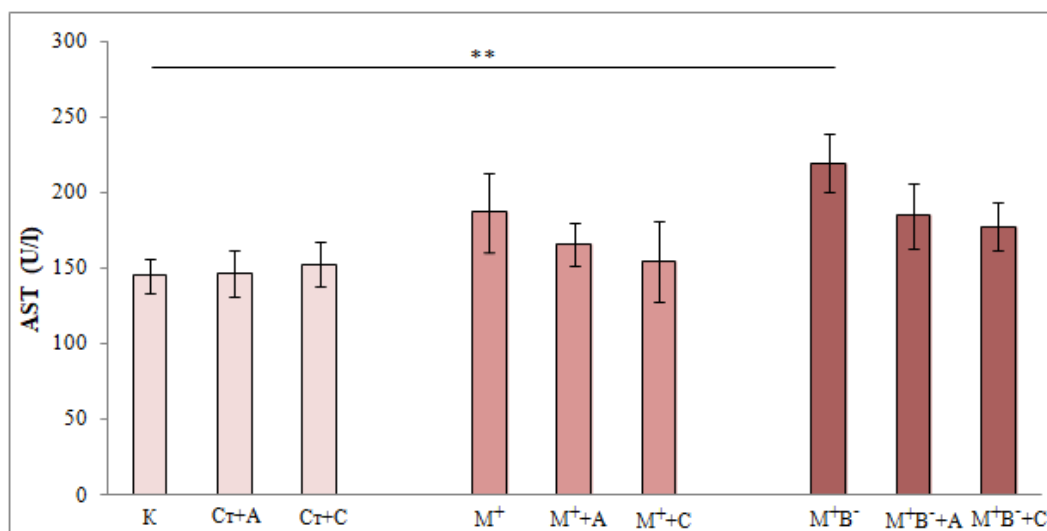


Слика 4.29. Анализа међусобне повезаности активности САТ у хипокампусу и укупног времена проведеног у отвореним крацима у УКЛ тесту за све испитиване групе (n=72). Представљене вредности означавају средње вредности испитиваних параметара за сваку појединачну групу \pm SEM.

4.4. Промене серумских концентрација ензима за процену токсичности терапије статинима

4.4.1. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на вредности серумских концентрација аспартат аминотрансферазе (AST)

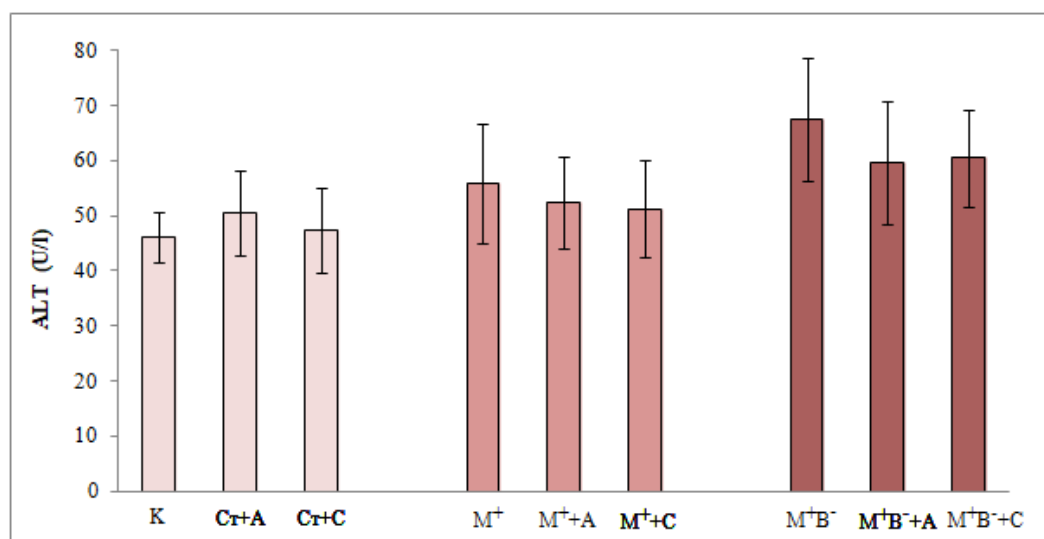
На Слици 4.30. приказани су ефекти исхране обogaћене метионином, исхране обogaћене метионином са недостатком витамина В групе и утицај примене статина на вредности серумских концентрација аспартат аминотрансферазе (AST). Протокол хиперметионинске дијете са дефицитом витамина В групе је довео до промена овог параметра ($F=1.629$, $df=8$). Дуготрајна дијета обogaћена метионином и са недостатком витамина В групе довела је до значајног пораста концентрације AST у серуму у поређењу са групом на стандардној исхрани ($p<0.01$).



Слика 4.30. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на ниво AST у серуму (U/l): К - контрола (n=8), Ст+А - стандардна исхрана+аторвастатин (n=8), Ст+С - стандардна исхрана+симвастатин (n=8), М⁺ - метионином обogaћена исхрана (n=8), М⁺+А - метионином обogaћена исхрана+аторвастатин (n=8), М⁺+С - метионином обogaћена исхрана+симвастатин (n=8), М⁺В⁻ - метионином обogaћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса (n=8), М⁺В⁻+А - метионином обogaћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин (n=8), М⁺В⁻+С - метионином обogaћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.4.2. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на вредности серумских концентрација аланин аминотрансферазе (ALT)

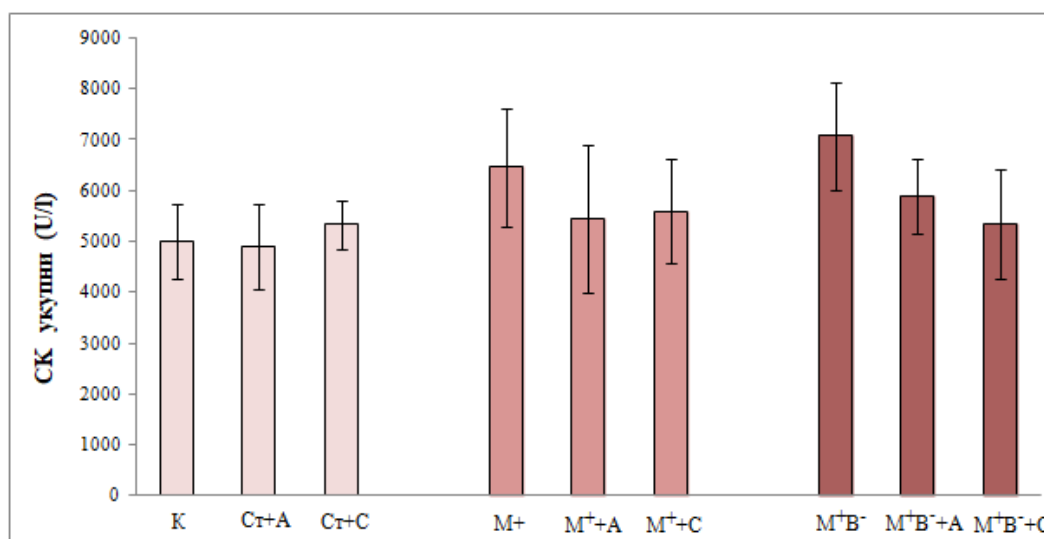
На Слици 4.31. представљени су ефекти хроничне хиперметионинске дијете, хроничне хиперметионинске дијете са дефицитом витамина В комплекса и утицај статина на наведене дијететске протоколе. Ниједан од наведених хроничних протокола није утицао на вредности серумске аланин аминотрансферазе ($F=0.613$, $df=8$).



Слика 4.31. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на ниво ALT у серуму (U/l): К - контрола (n=8), Ст+А - стандардна исхрана+аторвастатин (n=8), Ст+С - стандардна исхрана+симвастатин (n=8), М⁺ - метионином обогаћена исхрана (n=8), М⁺А - метионином обогаћена исхрана+аторвастатин (n=8), М⁺С - метионином обогаћена исхрана+симвастатин (n=8), М⁺В⁻ - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса (n=8), М⁺В⁻А - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин (n=8), М⁺В⁻С - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.4.3. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (B_6 , B_9 , B_{12}) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на вредности серумских концентрација укупне креатин киназе (СК укупни)

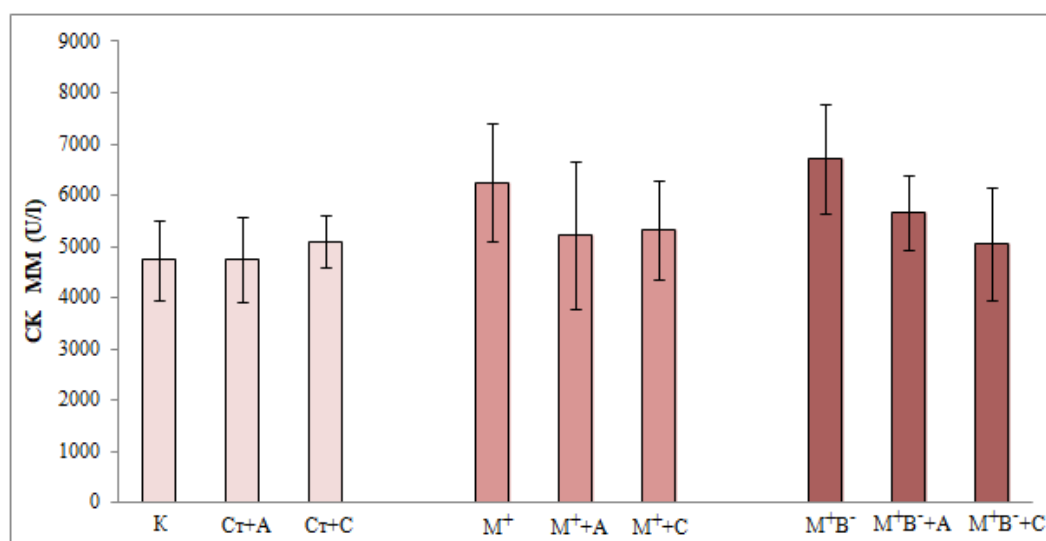
Као што је приказано на Слици 4.32., ниједан од наведених протокола у истраживању није довео до значајних промена вредности серумских концентрација укупне креатин киназе ($F=0.537$, $df=8$).



Слика 4.32. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (B_6 , B_9 , B_{12}) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на ниво укупне креатин киназе у серуму (U/L): K - контрола ($n=8$), St+A - стандардна исхрана+аторвастатин ($n=8$), St+C - стандардна исхрана+симвастатин ($n=8$), M+ - метионином обогаћена исхрана ($n=8$), M+A - метионином обогаћена исхрана+аторвастатин ($n=8$), M+C - метионином обогаћена исхрана+симвастатин ($n=8$), M+B- - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса ($n=8$), M+B+A - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин ($n=8$), M+B+C - метионином обогаћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин ($n=8$). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm SEM$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.4.4. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на вредности серумских концентрација ММ креатин киназе (СК ММ)

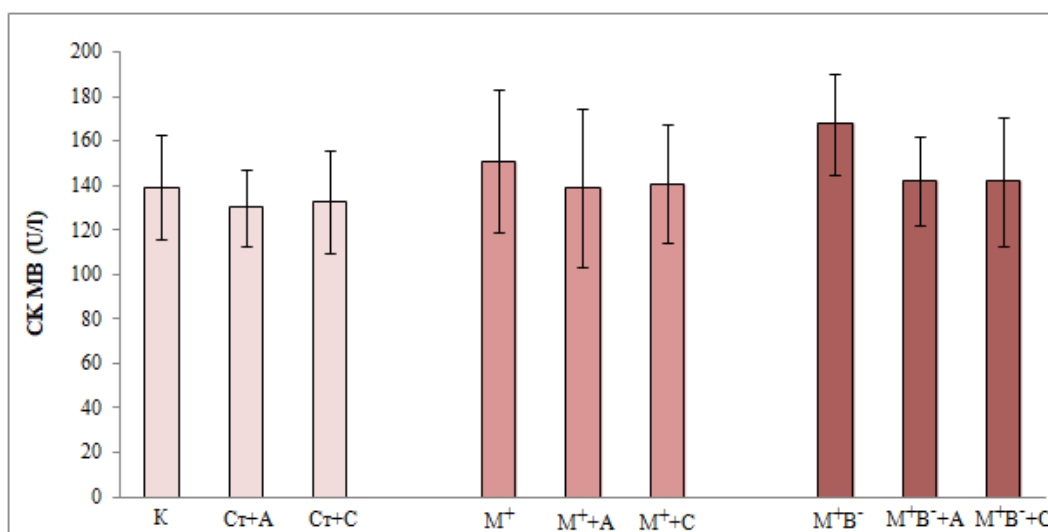
Као што је представљено на Слици 4.33., ниједан дијететски протокол, као ни примена статина уз наведене дијететске протоколе, нису довели до промена вредности концентрације ензима СК ММ ($F=0.501$, $df=8$).



Слика 4.33. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на ниво ММ креатин киназе у серуму (U/l): К - контрола (n=8), Ст+А - стандардна исхрана+аторвастатин (n=8), Ст+С - стандардна исхрана+симвастатин (n=8), М⁺ - метионином обogaћена исхрана (n=8), М⁺+А - метионином обogaћена исхрана+аторвастатин (n=8), М⁺+С - метионином обogaћена исхрана+симвастатин (n=8), М⁺В⁻ - метионином обogaћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса (n=8), М⁺В⁻+А - метионином обogaћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин (n=8), М⁺В⁻+С - метионином обogaћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.4.5. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на вредности серумских концентрација МВ креатин киназе (СК МВ)

Хронична примена хиперметионинске дијете, хиперметионинске дијете са недостатком витамина В групе, као ни примена статина уз наведене дијететске протоколе, нису довели до промена серумских концентрација МВ креатин киназе ($F=0.191$, $df=8$), што је и представљено на Слици 4.34.



Слика 4.34. Утицај исхране обogaћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на ниво МВ креатин киназе у серуму (U/L): К - контрола (n=8), Ст+А - стандардна исхрана+аторвастатин (n=8), Ст+С - стандардна исхрана+симвастатин (n=8), М⁺ - метионином обogaћена исхрана (n=8), М⁺А - метионином обogaћена исхрана+аторвастатин (n=8), М⁺С - метионином обogaћена исхрана+симвастатин (n=8), М⁺В⁻ - метионином обogaћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса (n=8), М⁺В⁻А - метионином обogaћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+аторвастатин (n=8), М⁺В⁻С - метионином обogaћена исхрана са нутритивном дефицијенцијом витамина В комплекса+симвастатин (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

5. ДИСКУСИЈА

Последње две деценије научних истраживања истакле су улогу хомоцистеина као фактора ризика за настанак различитих неуролошких и психијатријских обољења. Посебан акценат у овој области стављен је на испитивање улоге хомоцистеина у настанку анксиозности и депресије, као водећих психијатријских поремећаја у хуманој популацији. Према подацима Светске здравствене организације из 2015. године, у свету од депресије болује око 322 милиона људи, док од различитих анксиозних поремећаја око 264 милиона људи (399). Бројне епидемиолошке и клиничке студије потврдиле су присуство хиперхомоцистеинемije код особа оболелих од депресије и анксиозности (149, 152, 400). Имајући у виду резултате ових студија, епидемијске размере овог проблема савременог друштва, као и њихов социоекономски значај, као императив у истраживањима јасно се намеће детаљније испитивање и разјашњавање узрочно-последичне везе између хиперхомоцистеинемije и поремећаја расположења.

Нарушавање равнотеже између путева трансметилације и транссулфурације, који имају кључну улогу у регулацији метаболизма метионина и хомоцистеина, може довести до пораста нивоа хомоцистеина, потенцијално врло токсичног метаболита. Мозак је посебно осетљив на промене нивоа хомоцистеина због изразите лимитираности метаболичких путева одговорних за хомеостазу хомоцистеина (401). Наиме, кључни и једини пут којим се хомоцистеин метаболише у мозгу је фолат/витамин В₁₂-зависни пут. Управо из ових разлога намеће се значај испитивања улоге хомоцистеина, као и одређених нутријенаса, на развој психијатријских поремећаја.

Физиолошки опсег референтних вредности хомоцистеина у плазми је врло узак и износи 5-15 $\mu\text{mol/l}$. Пораст нивоа хомоцистеина може водити развоју благе (16-30 $\mu\text{mol/l}$), умерене (31-100 $\mu\text{mol/l}$) и тешке (>100 $\mu\text{mol/l}$) хиперхомоцистеинемije (402). Узроци благих и умерених хиперхомоцистеинемija које се најчешће срећу у хуманој популацији, везани су преваходно за нутритивни статус, животне навике, присуство хроничних болести и употребу одређених лекова. Смањен унос фолата, витамина В₁₂, повећани унос протеина, смањен унос воћа и поврћа, старост, конзумирање цигарета и алкохола, физичка неактивност, хипотироидизам, дијабетес, хронична бубрежна болест, употреба контрацептива, метотрексата и других лекова, представљају водеће узрочнике благих и умерених хиперхомоцистеинемija (60). Са друге стране, тешке хиперхомоцистеинемije су последица хомозиготних дефеката гена одговорних за синтезу ензима попут МТНFR (61) и CBS (403), праћене су врло тешком клиничком сликом и уједно су врло ретке у

хуманој популацији. Бројне клиничке и епидемиолошке студије су показале да су код пацијената који болују од анксиозности и депресије присутне хиперхомоцистеинемije благог и умереног типа (149, 404), на основу чега се истакао значај проучавања улоге управо ових типова хиперхомоцистеинемije на настанак поремећаја расположења.

У литератури су описани различити начини изазивања хиперхомоцистеинемije на анималним моделима. Хомозиготни генски дефекти MTHFR (405) праћени су тешким моторним поремећајима, менталном ретардацијом, стеатозом јетре, липидним депозитима у аорти и slabим преживљавањем, док су дефекти CBS гена (176), поред изразитог пораста нивоа хомоцистеина ($>100\mu\text{mol/l}$), праћени и хомоцистинуријом, превременом тромбозом, атеросклеротским променама на крвним судовима, скелетним малформацијама и епилептичним нападима. С обзиром на изузетно тешку и комплексну клиничку слику која се код ових модела развија, као и на чињеницу да су хиперхомоцистеинемije овог типа јако ретке у хуманој популацији ($<1\%$), може се закључити да генетски измењене животиње не представљају адекватан модел за изазивање хиперхомоцистеинемije.

Један од начина индукције хроничне хиперхомоцистеинемije представља егзогена апликација хомоцистеина или његових метаболита (406, 407). Најчешће примењиване методе за индукцију хиперхомоцистеинемije се базирају на различитим интервенцијама у режиму исхране, као што су дијета сиромашна фолатима (408), дијета обогаћена метионином (409, 410), или дијета обогаћена метионином и са дефицитом витамина В комплекса (49, 175).

С обзиром да су генетски интактне животиње на хиперметионинској дијети еквивалент богатој метионинској исхрани у општој хуманој популацији, а имајући у виду, већ описану, уску метаболичку повезаност метионина и хомоцистеина, у овом истраживању смо се определили за примену специјалне дијете са повећаним садржајем метионина. Овај режим исхране је одабран на основу претходног истраживања којим је потврђено да је дупло већи садржај метионина (7.7 g/kg) у односу на стандардну исхрану, довољан да изазове умерену хиперхомоцистеинемiju (389, 411). Поред тога, познајући и кључну улогу коју поједини витамини В комплекса (B_6 , B_9 , B_{12}) имају као кофактори у ензимским реакцијама метаболизма хомоцистеина, а са циљем детаљнијег проучавања улоге нутритивног статуса на развој хиперхомоцистеинемije и поремећаја у понашању, у овом истраживању смо применили и протокол са повећаним уносом метионина и недостатком витамина В комплекса (B_6 , B_9 , B_{12}). Овај протокол је одабран на основу

студије у којој је показано да овај режим исхране доводи до развоја хиперхомоцистеинемije умереног типа ($\sim 62\mu\text{mol/l}$) (412). Применом ових дијететских протокола смо постигли на анималном моделу нивое хомоцистеина идентичне онима који се сматрају фактором ризика за развој психијатријских поремећаја у општој хуманој популацији (11). У овом истраживању, које је трајало 30 дана, су коришћени пацови Wistar albino соја, мушког пола, којима је специјална лабораторијска храна била доступна *ad libitum*. Просечан унос метионина у нашем истраживању је износио $160\pm 10\text{mg/kg}$ дневно (413), што се потврдило у претходно наведеним студијама довољним да доведе до развоја умерене хиперхомоцистеинемije. У студији са примењеном идентичном хиперметионинском дијетом у трајању од 30 дана дошло је до четвороструког пораста нивоа Hcy (389), док је у другој студији, која је трајала 8 недеља, дошло до седмоструког пораста нивоа Hcy (414). Дијета са повећаним уносом метионина и са дефицитом одређених витамина В комплекса је довела до пораста нивоа хомоцистеина и код мишева (49).

Упркос постојању неколико теорија којима се објашњава неуротоксичност изазвана хомоцистеином, патогенетски механизми који леже у основи ове неуротоксичности, још увек нису у потпуности разјашњени. Један од механизма којим се објашњава неуротоксичност изазвана хомоцистеином је оксидативни стрес (170). Мождано ткиво је посебно осетљиво на оксидативни стрес у поређењу са другим ткивима људског организма (415). Управо стога и не чуди чињеница да се оксидативни стрес наметнуо као потенцијални механизам одговоран, барем делом, за генезу анксиозних и депресивних поремећаја. Хипотеза да је „оксидативни стрес-нови стрес“ (296), нашла је потврду у бројним студијама које су показале промене оксидативног статуса у различитим психијатријским стањима (416).

Управо из наведених разлога, непосредни циљ ове студије је био да се утврде ефекти дијетом индуковане хиперхомоцистеинемije на промене у понашању. Имајући у виду да хомоцистеин представља снажан прооксиданс, циљ овог истраживања је био и да се анализира утицај hHcy на настанак оксидативних оштећења у ткиву хипокампуса, региону мозга који је укључен у регулацију расположења и самим тим у настанак анксиозности и депресије (417, 418, 419). Оксидативни стрес може бити повезан са овим поремећајима расположења (420), при чему је показано да под утицајем оксидативног стреса долази и до оштећења хипокампуса (421, 422). На основу свега наведеног, додатни циљ овог истраживања је био и испитивање повезаности између оксидативних оштећења

у ткиву хипокампуса изазваних хиперхомоцистеинемijом и промена у понашању животиња.

Оксидативни стрес, као потенцијални механизам настанка поремећаја расположења, наметнуо је нови императив у научним истраживањима - испитивање супстанци са антиоксидантним својствима, као могућих терапијских агенаса у смањењу симптома ових стања. Бројне студије су потврдиле ефикасност конвенционалних антиоксиданаса, попут витамина Е и С, као и селена (415). Врло важну улогу у редукцији неуротоксичности је показано да имају и аминокиселине које садрже сумпор, попут L-метионина и N-ацетилцистеина (423). Посебно проучаван антиоксиданс у психијатријским поремећајима је N-ацетилцистеин (NAC), за који је показано у претклиничким студијама (424, 425) да поседује антидепресантни ефекат. Овај ефекат NAC-а је потврђен и у клиничким студијама, и то након његове самосталне примене (426, 427), или у комбинацији са стандардним лековима за терапију депресија (428, 429). Позитиван ефекат на симптоме депресије испољиле су и омега-3 полинезасићене киселине (430), коензим Q10 (431) и мелатонин (432).

Посебну пажњу научне јавности последњих година заокупљају статини. Наиме, поред већ добро познатог и утемељеног места које статини имају у терапији дислипидемија (358), најновија истраживања су показала да статини поседују и неуропротективна својства (367). Иако сам молекулски механизам којим остварују позитивне ефекте на ЦНС још увек није у потпуности разјашњен, указано је да њихова антиоксидативна дејства могу бити одговорна за ове ефекте (359, 433). Дозе статина примењене у овој студији (аторвастатин 3mg/kg, симвастатин 5mg/kg) су изабране на основу претходних истраживања која су потврдила њихов позитиван терапијски ефекат на бихевиоралне манифестације (393), као и на промене параметара оксидативног стреса (392). Примењене дозе оба статина су унутар терапијског распона којим је потврђен кардиопротективни ефекат, као и позитиван ефекат на дислипидемије различитих узрока у бројним студијама (434). Наведене дозе статина у овој студији су далеко мање од доза које доводе до манифестација токсичности, попут хепатотоксичности (435) и миотоксичности (436). Такође, важно је напоменути и да статини примењени у овом истраживању спадају у липофилне (хидрофобне) супстанце, што указује на способност несметаног проласка кроз крвно-мождану баријеру (433), а самим тим и на испитивање њиховог утицаја на možдано ткиво.

На основу свега изложеног, додатни циљ овог истраживања је био и испитивање антиоксидативних својстава статина у присуству хиперхомоцистеинемije, као и испитивање утицаја дуготрајне примене статина на бихевиоралне манифестације код испитиваних животиња.

5.1. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на промене степена анксиозности

Примењени дијететски протоколи су доводили до значајног повећања степена анксиозности на основу вредности параметара добијених у тестовима који су специфични за испитивање ове врсте бихевиоралних промена. Вредности параметара који се обично сматрају за најпоузданије индикаторе за процену анксиозности били су значајно повећани код групе животиња која је била на хиперметионинској дијети, као и код групе животиња која је била на хиперметионинској дијети са дефицитом витамина В комплекса. Као што је приказано (Слике 4.4. и 4.5.), оба дијететска протокола су доводила до значајног скраћења времена проведеног у централној зони (УВПЦЗ), као и смањења броја улазака у централну зону ОП теста (БУЦЗ), при чему је хиперметионинска дијета са недостатком витамина В комплекса испољила на оба ова параметра значајно израженији ефекат у односу на хиперметионинску дијету. Параметри добијени у УКЛ тесту, који се, такође, сматрају директним индикаторима за процену степена анксиозности, укупно време проведено у отвореним крацима лавиринта (УВПОК), као и број улазака у отворене краке (БУОК), били су, такође, значајно смањени након хроничне примене оба дијететска протокола у односу на контролне вредности (Слике 4.7. и 4.8.). Попут ситуације уочене у ОП тесту, и овде је негативни ефекат хиперметионинске дијете са дефицитом витамина В комплекса на наведене параметре био израженији у односу на ефекте које је проузроковала хиперметионинска дијета. С обзиром да у литератури постоје подаци да се промена степена анксиозности значајно одражава на локомоторну активност (243), за потврду промена нивоа анксиозности изазваних спроведеним протоколима, у овој студији су коришћени индикатори локомоторне активности добијени у ОП и УКЛ тесту. Укупни пређени пут, проценат времена кретања, као и просечна брзина кретања, били су значајно смањени у ОП тесту (Слике 4.1. – 4.3.) у односу на контролне вредности, при чему је значајан пад вредности сва три параметра локомоторне активности био израженији након хиперметионинске дијете са дефицитом витамина В комплекса у односу на

хиперметионинску дијету. Исти ефекат у односу на вредности сва три параметра локомоторне активности уочен је и у УКЛ тесту (Слике 4.4.-4.6.), при чему је, идентично као и у ОП тесту, овај ефекат био израженији у групи која је била на дијети обogaћеној метионином са дефицитом витамина В комплекса у односу на групу која је била само на дијети обogaћеној метионином. За експлоративну активност, као специфични бихевиорални образац, такође је потврђено да је у директној вези са променама нивоа анксиозности (437), на специфично дефинисан начин – смањење експлоративне активности се може сматрати индиректном потврдом повећања степена анксиозности. Примена оба дијететска протокола, дијете обogaћене метионином, као и дијете обogaћене метионином са дефицитом витамина В комплекса, изазвала је смањење експлоративне активности у ОП тесту које се огледа у статистички значајном смањењу броја усправљања у односу на контролну групу (Слика 4.6.). Смањење експлоративне активности изазвано хиперметионинском дијетом према параметрима броја усправљања и броја нагињања, као и према броју епизода укупне експлоративне активности регистровано у УКЛ тесту, било је статистички значајно у поређењу са контролном групом (Слике 4.12. - 4.14.). Као што је и очекивано, дијета обogaћена метионином са дефицитом витамина В групе довела је до још интензивнијег пада вредности параметара попут броја усправљања и броја епизода УЕА, док је овај ефекат изостао када је реч о броју нагињања.

Резултати ове студије су у складу са претходно описаним анксиогеним ефектом након хиперметионинске дијете у ОП тесту (389). Слични резултати су добијени и у студији у којој је метионин, примењен у виду 5% раствора, изазвао хиперхомоцистеинемију умереног степена, и након осмонедељног третмана, такође, изазвао анксиогени ефекат, потврђен у ОП тесту (414). Резултати АТТИСА студије показали су како код мушкараца, тако и код жена, да постоји позитивна корелација између анксиозности процењене Spielberger-овом STAI скалом и повећаних нивоа хомоцистеина, што је у сагласности са резултатима овог истраживања (438). Треба напоменути и Nordaland студију чији резултати нису показали повезаност између хиперхомоцистеинемије и анксиозности (390). Ово се може објаснити самим методолошким приступом, с обзиром да је у питању студија пресека којом није омогућено процењивање узрочно-последичне повезаности између параметара. Потенцијално објашњење за разлику у добијеним резултатима може се наћи и у чињеници да су поремећаји расположења врло често праћени анхедонијом и да самим тим

утичу на навике у исхрани (439), што се финално може одразити на статус хомоцистеина и витамина В групе.

С обзиром да хомоцистеин спада у најреактивније аминокиселине у биолошким системима (169), његова изразита метаболичка активност огледа се и у стварању бројних метаболита, као што су SAH, дисулфиди хомоцистеина, хомоцистеинска киселина. Његов токсични метаболит, Нсу-тиолактон, такође, може бити одговоран за токсичне ефекте проузроковане хомоцистеином (440, 441). Наиме, студија на мишевима је показала да је повећани унос метионина путем исхране, у трајању од четири недеље, изазвао значајан пораст концентрације Нсу-тиолактона у серуму ових животиња (442). Са друге стране, акутна примена Нсу-тиолактона је изазвала анксиогено понашање код пацова у ОП тесту (443), у чему се може тражити потенцијално објашњење настанка анксиогеног понашања под утицајем хиперхомоцистеинемije.

Ипак, за валидацију резултата који се односе на утицај хиперхомоцистеинемije на промене степена анксиозности, чини се најприменијим поређење са резултатима који су добијени применом истих или сличних дијететских протокола, као и приближно истом дужином третмана, у студији где је добијен истоветни, анксиогени ефекат хиперхомоцистеинемije (389, 414). На основу резултата наше, као и претходно наведених студија, може се закључити да је хиперхомоцистеинемija довела до анксиогеног понашања код животиња, при чему се уочава да је овај ефекат био значајно израженији у групама са тежим степеном хиперхомоцистеинемije. Овде треба напоменути да прегледом литературе нисмо наишли на студију која је проучавала бихевиоралне манифестације након примене комбинованог дијететског протокола, односно дијете са истовремено повећаним уносом метионина и смањеним уносом витамина В комплекса, што представља јединствену комбинацију разматраних експерименталних варијабли у поређењу са другим експерименталним моделима.

Супротно ефектима уоченим након хроничне примене наведених дијететских протокола, дуготрајна примена статина испољила је анксиолитичке ефекте према резултатима оствареним у тестовима специфичним за детекцију промена степена анксиозности. Ове ефекте статина су испољили након примене уз хиперметионинску дијету, као и након примене уз хиперметионинску дијету са недостатком витамина В комплекса. Међутим, ефекти статина су изостали након њихове примене уз стандардни режим исхране. Анализирајући главне показатеље промена нивоа анксиозности, дуготрајна примена симвастатина уз оба наведена дијететска протокола, довела је до

анксиолитичког ефекта израженог у виду продужења времена у централној зони ОП теста (Слика 4.4), као и у повећању броја улазака у централну зону ОП теста (Слика 4.5.). Апликација аторвастатина је испољила знатно мањи анксиолитички ефекат, који је манифестован кроз повећање броја улазака у централну зону у ОП тесту, и то након примене уз дијету обogaћену метионином и са недостатком витамина В комплекса, али без ефекта на укупно време проведено у централној зони ОП теста. И у УКЛ тесту, симвастатин је, примењен уз оба дијететска протокола, испољио анксиолитички ефекат и довео до статистички значајног продужења времена проведеног у отвореним крацима УКЛ (Слика 4.7.), као и до статистички значајног повећања броја улазака у отворене краке УКЛ (Слика 4.8.). Сходно очекиваном, и у ОП тесту, примена аторвастатина је испољила слабији анксиолитички ефекат кроз продужење укупног времена проведеног у отвореним крацима у УКЛ тесту, и то након примене уз дијету обogaћену метионином и са дефицитом витамина В комплекса, док је овај ефекат аторвастатина изостао у односу на број улазака у отворене краке, и то након апликације уз оба дијететска протокола.

Анксиолитички ефекат хроничне примене статина је изостао уз стандардни режим исхране у односу на све параметре за процену експлоративне активности и у ОП и УКЛ тесту, али је зато потврђен кроз повећање свих испитиваних параметара након примене уз специјалне дијететске протоколе. Уочено је да је дуготрајна примена симвастатина уз оба дијететска протокола довела до повећања броја усправљања у ОП тесту, док је овај ефекат аторвастатин испољио само након примене уз дијету обogaћену метионином и са недостатком витамина В комплекса (Слика 4.6.). Дуготрајна примена оба статина, према параметрима експлоративне активности у УКЛ тесту, довела је до статистички значајног повећања броја усправљања (Слика 4.12.), као и УЕА (Слика 4.14.) уз оба дијететска протокола. Када је реч о броју нагињања, администрација оба статина је испољила анксиолитички ефекат на овај параметар уз хиперметионинску дијету са дефицитом витамина В комплекса, док је овај ефекат изостао након њихове примене уз хиперметионинску дијету (Слика 4.13.).

Протокол примене статина уз стандардни режим исхране није довео до промена параметара локомоторне активности, али је примена статина уз специјалне дијететске протоколе, спроведене у овој студији, доводила до значајног повећања сва три параметра локомоторне активности (укупног пређеног пута, % времена кретања, као и просечне брзине кретања) у ОП тесту, враћајући вредности ових параметара на ниво контролних (Слике 4.1. - 4.3.). Примена оба статина уз хиперметионинску дијету резултирала је

враћањем вредности сва три параметра на ниво контролних и у УКЛ тесту (Слике 4.9. - 4.11.), док је примена статина уз хиперметионинску дијету са недостатком витамина В комплекса довела до пораста вредности ових параметара, али без статистичке значајности.

Дозе статина примењене у овом истраживању, као што је већ наведено, у складу су са дозама из студија које су потврдиле позитиван терапијски ефекат, како у односу на бихевиоралне манифестације (393), тако и у односу на оксидативни стрес (392). Када је реч о утицају статина на ниво хомоцистеина, показано је, осим у једној студији са ловастатином (444), да статини не утичу на ниво хомоцистеина код здравих субјеката, што је доказано у многим клиничким студијама (445). Ипак, позитивни ефекат статина (симвастатин 20 mg/kg, 8 недеља) на смањење вредности Нсу у серуму, показан је код пацијената са примарном хиперлипидемијом, при чему је овај ефекат зависио од почетних нивоа Нсу (446).

Познато је да дуготрајна терапија статинима може довести до оштећења мишића различитог степена, почев од благих мијалгија до тешке рабдомиолизе (447). Дозе статина примењене у овој студији су далеко ниже од доза за које је показано да доводе до испољавања миотоксичних ефеката код пацова (436). Међутим, имајући у виду да је наше истраживање хроничног типа, као и врло важну чињеницу да се за процену степена анксиозности код животиња као индиректни показатељи користе параметри локомоторне активности, од значаја је било испитати потенцијални развој миотоксичних ефеката статина. Анализом серумских нивоа укупне СК, као и СК ММ и СК МВ изоензима (Слике 4.32. - 4.34.), показано је да примењени дозни режими статина нису утицали на промене вредности ових ензима, чиме је искључен било какав утицај ове терапије на локомоторну активност, као и на следствене бихевиоралне манифестације. Овиме је омогућена квалитетна и валидна анализа и поређење бихевиоралних ефеката спроведених протокола.

С обзиром да прегледом литературе нисмо наишли на студије које су испитивале бихевиоралне ефекте примене статина у случају хиперхомоцистеинемије као патолошког супстрата, морали смо се ослонити на поређења са подацима из студија које су бихевиоралне ефекте статина испитивале у различитим експерименталним моделима. Уочени анксиолитички ефекат симвастатина у нашој студији у складу је са резултатима студије у којој је код дијете богате липидима, симвастатин, примењен у истој дози (5mg/kg дневно), након четворонедељног третмана, испољио анксиолитички ефекат у

УКЛ тесту. У овој студији симвастатин је анксиолитички ефекат испољио примењен и уз стандардни режим исхране (448). Ова разлика може се објаснити разликом у соју пацова (*Sprague-Dawley*), и, пре свега, у начину апликације симвастатина (гаважа). Наиме, гаваж као метод администрирања супстанце, сама по себи, представља фактор који може индуковати стрес и појачати анксиозност. Анксиолитички ефекат симвастатина у УКЛ тесту потврђен је и након четворонедељног третмана у дози од 10 mg/kg (449). Wang и сарадници су показали да је симвастатин примењен у дози од 10 mg/kg, али не и у дози од 1 mg/kg, изазвао повећану локомоторну активност, за разлику од претходно наведене студије (448), где није дошло до повећања спонтане локомоторне активности након примене симвастатина. У овој студији терапија симвастатином је испољила дозно зависни утицај на експлоративну и спонтану локомоторну активност. Анксиолитичко дејство у ОП тесту испољили су и аторвастатин (5mg/kg и 10 mg/kg) и симвастатин (10 mg/kg) након дуготрајне примене (17 недеља), без утицаја на ниво липида код пацова (450), што је у складу са резултатима епидемиолошке студије која је показала позитивне фармаколошке ефекте након дуготрајне употребе статина на анксиозност и депресију, без утицаја на ниво холестерола (451). Примена аторвастатина (10mg/kg и 20mg/kg) је испољила анксиолитички ефекат и код мишева у УКЛ тесту након тронедељног програма физичке активности (380).

Анксиолитички ефекат симвастатин је испољио и након акутне примене, али у дозама знатно већим од оних које су употребљене у нашој студији (10 mg/kg, 30 mg/kg), док је након примене највеће дозе (50 mg/kg) испољио анксиогени ефекат (452), што се може објаснити и токсичношћу ове изузетно велике дозе, као и прооксидативним, уместо антиоксидативним дејством. Међутим, у студији спроведеној на мишевима, за разлику од побољшања когнитивних функција, није потврђен анксиолитички ефекат примене статина током субхроничног (453), као ни током акутног третмана (454). Ове разлике у ефектима примењених статина на промене степена анксиозности могу се објаснити разликама у дужини трајања протокола, примењеним дозама статина, самим експерименталним моделима, као и у сојевима експерименталних животиња, што се све може финално рефлектовати различитим бихевиоралним манифестацијама.

Мождано ткиво је, као што је већ објашњено у уводном делу, посебно осетљиво на оксидативни стрес у односу на друга ткива људског организма (416). Стога и не чуди да је, поред већ добро познате моноаминске теорије која је објаснила генезу анксиозних

поремећаја кроз сигналну дисфункцију серотонергичког, допаминергичког и норадренергичког система (455), оксидативни стрес уочен као нови потенцијални механизам који може допринети настанку ових поремећаја. Један од механизма неуротоксичности изазване хомоцистеином је управо оксидативни стрес, у чему се може наћи потенцијално објашњење анксиогених ефеката примењених протокола. Бројне студије, како на анималним моделима (456, 457, 458), тако и код људи (180, 459, 460), потврдиле су да хомоцистеин доводи до оксидативног оштећења.

Резултати нашег истраживања су показали да је хиперхомоцистеинемија, индукована специјалним дијетама, довела до значајних промена оксидативног статуса у хипокампаљном ткиву пацова. Наиме, hHcy је довела до значајног пораста индекса липидне пероксидације (израженог као MDA) након примене оба дијететска протокола (Слика 4.20.), док је активност оба ензима антиоксидативне заштите SOD (Слика 4.21.) и CAT (Слика 4.22.) била значајно смањена. Примењени дијететски протоколи нису довели до промена нивоа GSH у хипокампусу (Слика 4.23.).

Протоколи примењени у овом истраживању су изазвали значајне промене степена липидне пероксидације (израженог као TBARS) у хипокампусу пацова (Слика 4.20.). Оба дијететска протокола, дијета обogaћена метионином, као и дијета обogaћена метионином са дефицитом витамина В комплекса, су значајно повећавала TBARS у хипокампусу у поређењу са вредностима у контролној групи. Наши резултати у складу су са резултатима студије код које је након индуковане хиперхомоцистеинемије, такође, дошло до пораста индекса липидне пероксидације (TBARS) у хипокампусу пацова на дозно зависан начин (461). Исти ефекат у мозгу пацова показан је и у пренатално изазваној хиперхомоцистеинемији (462). Истраживање које су спровели *Jara-Prado* и сарадници показало је да је пораст липидне пероксидације код хиперхомоцистеинемије изазван алтерацијама у функционисању NMDA рецептора (463). Међутим, у другим двама студијама са повећаним уносом метинина (389, 414) овај ефекат је изостао у ткиву хипокампуса, али је зато до пораста вредности TBARS дошло у другим регионима мозга, које су ове студије испитивале, као што су кортекс (389, 414) и каудално једро (389). Из резултата ових студија се може уочити да је хиперхомоцистеинемија довела до оксидативног оштећења липида у можданом ткиву, при чему је дошло до испољавања разлика у одговору различитих региона мозга на повишене нивое хомоцистеина. Ова разлика може се објаснити различитим начином индукције хиперхомоцистеинемије, као и различитим трајањем протокола. Једно од потенцијалних објашњења може бити и

специфична вулнерабилност одређених региона мозга (206). Наиме, ова специфична осетљивост одраз је хетерогености неурона у нервном систему, која подразумева разлике у морфологији и биохемијским карактеристикама различитих неуронских група у различитим деловима мозга. Управо услед ових разлика се може очекивати да ће одређена група неурона са својом јединственом и специфичном молекуларном структуром различито одреаговати на оксидативни стрес.

Оба статина примењена у овој студији нису довела до промена вредности индекса липидне пероксидације након примене уз стандардну исхрану, као ни уз хиперметионинску дијету. Једини значајан ефекат на смањење вредности TBARS испољио је симвастатин, и то примењен уз дијету обogaћену метионином и са дефицитом витамина В комплекса. Овај ефекат симвастатина био је значајно израженији у односу на ефекат аторвастатина.

Једина студија која је испитивала антиоксидативна својства статина код хиперхомоцистеинемије изазване идентичним протоколима, показала је да су оба ова статина довела до снижавања вредности TBARS у плазми пацова, при чему је симвастатин испољио значајно већи антиоксидативни ефекат у односу на аторвастатин, што је у складу са резултатима нашег претходног истраживања (412). Иако примена аторвастатина у нашем истраживању није довела до умањења степена липидне пероксидације у хипокампусу, његов позитиван ефекат на овај маркер оксидативног оштећења потврђен је у студији након тронедељног програма физичке активности на мишевима (380), као и на моделу индуковане хипертензије код пацова (381). Ова разлика у односу на резултате нашег истраживања се може објаснити знатно већим (3-7 пута) дозама аторвастатина примењеним у овим студијама, као и разликом у самим моделима, односно патолошким супстратима на којима је испитиван ефекат апликованог аторвастатина. Примена аторвастатина је позитиван ефекат на вредност индекса липидне пероксидације показала у серуму пацијената са хиперлипидемијом и метаболичким синдромом (464). Показано је да аторвастатин у присуству hNcy остварује своје дејство супримирањем активације NADPH оксидазе и стварања ROS, као и супримирањем апоптозе путем Nox4/p38MAPK зависних механизма, чиме се може објаснити позитивно дејство аторвастатина у hNcy (465, 466). Резултати нашег истраживања који се односе на ефекте примене симвастатина у складу су са резултатима студије која је, такође, показала смањење нивоа MDA у мозданом ткиву мишева под дејством овог статина након тронедељног програма физичке активности (380). Симвастатин је смањио индекс липидне

пероксидације и спречио смрт кортикалних неурона који су били изложени депривацији кисеоника и глукозе (382).

Активност супероксид дисмутазе (SOD) била је значајно измењена под утицајем примењених протокола (Слика 4.21.) У групи животиња која је била на хиперметионинској дијети, као и у групи која је била на хиперметионинској дијети са недостатком витамина В комплекса, дошло је до значајног пада активности SOD у односу на вредности у контролној групи.

Студија коју су спровели *Petras* и сарадници је показала да је хиперхомоцистеинемиа изазвала значајно смањење активности овог ензима, тачније његове изоформе Mn-SOD-е, у хипокампусу пацова, у односу на контролне вредности (467), што је у складу са резултатима нашег истраживања. *Matte* и сарадници су показали да је хронична субкутана примена хомоцистеина, такође, довела до смањења активности SOD у хипокампусу пацова (407). Супротно нашим резултатима, студије у којима је примењен повећан унос метионина, резултовале су повећањем активности SOD-е у кортексу, док у хипокампусу није дошло до промена активности SOD (389, 414). *Streck* и сарадници су, такође, показали да хиперхомоцистеинемиа није довела до промена активности SOD у хипокампусу пацова (461).

Из свега наведеног, могу се уочити разлике у резултатима студија које су проучавале активност SOD у мозгу у присуству хиперхомоцистеинемие. Смањена активност овог ензима, која је уочена у нашој студији, може рефлектовати стање у којем је под утицајем сталног оксидативног стреса и повећаног стварања ROS, дошло до исцрпљивања механизма антиоксидативне заштите. Са друге стране, повећање активности овог ензима може представљати одговор на повећан оксидативни стрес, односно, може бити последица развоја адаптивних механизма усмерених против повећане продукције ROS изазване липидном пероксидацијом. Разлике, такође, могу потицати од већ описане различите осетљивости неурона у различитим деловима мозга (206). Имајући у виду да је један од механизма неуротоксичности хомоцистеина хомоцистеинилација (180), која заправо представља структурну модификацију протеина која за последицу има и смањење њихове функције, као и да је директно зависна од вредности Hcy у плазми (459), ово може бити једно од потенцијалних објашњења смањене активности овог ензима у случају хиперхомоцистеинемие.

Иако примена статина уз стандардни режим исхране, као и уз исхрану обогаћену метионином, није довела до промена вредности SOD, ефекат примене статина се

манифестовао кроз значајан пораст активности SOD у групама које су биле на хиперметионинској дијети са дефицитом витамина В комплекса. Резултати наше студије у складу су са резултатима студије која је показала да примена оба ова статина доводи до пораста активности SOD у случају хиперхомоцистеинемije (412). Позитиван ефекат примене аторвастатина на активност SOD у мозгу пацова потврђен је на моделу индуковане хипертензије (381), док је позитиван ефекат симвастатина на активност овог ензима, као и на апоптозу хипокампаљних ћелија, потврђен код пацова на моделу сенилне деменције (383).

Активност САТ је била, такође, значајно смањена након примене оба дијететска протокола у односу на контролне вредности (Слика 4.22.). Када је реч о утицају статина на активност каталазе, резултати нашег истраживања су показали да апликација аторвастатина није испољила ефекат уз стандардни режим исхране, као ни уз специјалне дијететске протоколе. За разлику од аторвастатина, примена симвастатина је поништила про-оксидантни ефекат хиперхомоцистеинемije и значајно повећала активност овог ензима, и то уз оба дијететска протокола, док уз стандардни режим исхране није довела до промене у активности каталазе.

Резултати наше студије су у складу са резултатима студије која је показала смањену активност САТ у хипокампусу пацова са хиперхомоцистеинемijом (407). Међутим, студија са хроничном хиперметионинском исхраном је показала повећану активност САТ у мозгу пацова (389), док у студији са индукованом хиперхомоцистеинемijом није дошло до промена активности каталазе (461). Наведене разлике могу потицати, пре свега, од начина индукције хиперхомоцистеинемije, као и од других разлика у експерименталним моделима, попут врсте експерименталних животиња, као и степена тежине изазване hHcy. Већ напоменута, селективна вулнерабилност неурона, такође, може представљати једно од могућих објашњења за добијене разлике (206).

Добијени резултати су у складу са резултатима студије која је испитивала ефекте ових статина на активност САТ у случају хиперхомоцистеинемije индуковане идентичним дијететским протоколима као у нашем истраживању, при чему је и у овој студији примена симвастатина испољила знатно јачи ефекат од примене аторвастатина (412). Апликација аторвастатина, као и у нашем истраживању, није испољила ефекат на активност каталазе у мозгу хипертензивних пацова (381), док је у другој студији, на моделу тронедељног програма физичке активности, примена аторвастатина (10 mg/kg и

20 mg/kg) резултовала порастом активности САТ у мозгу мишева (380). Потенцијално објашњење за позитиван ефекат аторвастатина у овој студији се може наћи, пре свега, у примени значајно већих доза аторвастатина, као и у самом експерименталном моделу. Такође, позитиван ефекат на активност каталазе у хипокампаљним ћелијама испољила је и апликација симвастатина на моделу сенилне деменције (383).

Примена оба дијететска протокола у овој студији није значајно утицала на концентрацију укупног глутатиона у хипокампусу (Слика 4.23.). У литератури не постоји довољно података који говоре о утицају hHcy на ниво укупног глутатиона и на промене у укупном антиоксидативном капацитету. Једина студија, која је применила идентичну хиперметионинску дијету, показала је пораст GSH у хипокампусу (389). Прегледом литературе нисмо наишли на податке који се односе на вредности укупног глутатиона у мозгу након примене комбинованог дијететског режима.

Веза између промена оксидативног статуса и различитих анксиозних поремећаја потврђена је у многобројним студијама. Липидна пероксидација је један од показатеља ћелијског оштећења везаног за оксидативни стрес и уједно представља најдетаљније проучени параметар оксидативног стреса у анксиозним поремећајима. Резултати студија, како на анималним моделима (389, 413), тако и у хуманој популацији (253, 468), врло су конзистентни када је реч о овом маркеру оксидативног оштећења, и у свима је потврђен пораст индекса липидне пероксидације, што је у складу са резултатима наше студије. *Rammal* и сарадници су утврдили позитивну корелацију између интрацелуларног нивоа слободних радикала и анксиозног понашања код животиња, и при томе указали на јаку везу између пораста активности супероксид дисмутазе (SOD) и појаве анксиозности код мишева (260).

Када је реч о активностима ензима антиоксидативне заштите у различитим анксиозним поремећајима, забележени су контрадикторни резултати. Наиме, у већини студија запажен је пораст активности SOD (253, 442), што делом рефлектује кључну улогу коју овај ензим има као први ензим у путу детоксификације супероксид радикала, а делом се може објаснити, претходно већ поменути, адаптивним механизмима на стално присуство ROS. Са друге стране, код пацијената са посттрауматским стрес синдромом, као и код пацијената са паничним поремећајем није дошло до промена у активности овог ензима (256, 469). Ова неслагања у резултатима се могу приписати различитим фенотиповима, ограниченим узорцима у студијама, или хетерогености самих узорака и

проучаваних стања. Такође, када је реч о активности каталазе, постоје подаци о повећаној активности (253, 468), смањеној активности (252), као и непромењеним вредностима активности овог ензима у различитим анксиозним стањима (253, 260). Потенцијално објашњење може се наћи у чињеници да се уклањање H_2O_2 много више обавља путем GPX система, док каталазом само када су присутне изузетно високе концентрације водоник пероксида (470). Неколико различитих истраживања је показало да се при повећању анксиозности смањује ниво антиоксиданаса, попут GSH (471) и витамина Е (472).

Резултати нашег истраживања су јасно потврдили повезаност између оксидативног статуса и степена анксиозности код пацова (413). Наиме, најсензитивнији индикатори анксиозности у ОП и УКЛ тесту, укупно време проведено у централној зони (УВПЦЗ) и укупно време проведено у отвореним крацима (УВПОК), значајно су корелирали са маркерима оксидативног стреса. Позитивни (анксиолитички) ефекти примене статина на повећану анксиозност изазвану хиперметионинском дијетом, и на још израженију анксиозност изазвану хиперметионинском дијетом са недостатком витамина В комплекса, потврђени су кроз негативну корелацију између вредности индекса липидне пероксидације (TBARS) и вредности наведених параметара добијених у ОП (Слика 4.24.) и у УКЛ тесту (Слика 4.27). Са друге стране, анксиолитички ефекти дуготрајне примене аторвастатина и симвастатина, изражени преко вредности ових параметара у ОП и у УКЛ тесту, значајно су позитивно корелирали са вредностима SOD (Слике 4.25. и 4.28.), као и са вредностима CAT (Слике 4.26. и 4.29.). Управо на основу ових резултата се може јасно закључити да оксидативни стрес учествује у регулацији степена анксиозности. Наши резултати су у складу са *in vitro* студијама на анималним моделима (389, 407), као и са клиничким студијама (404), које су потврдиле да повишени нивои хомоцистеина доводе до повећања оксидативног стреса и да су праћени појачаном анксиозношћу.

Знатно слабије проучавани параметри у анксиозним поремећајима су оксидативна оштећења DNK молекула. *Irie* и сарадници (473) су показали да у леукоцитима жена са анксиозношћу долази до повећаног оксидативног оштећења DNK молекула што неминовно води ћелијској смрти, а бројни ексцитаторни ефекти хомоцистеина се управо остварују овим путем. Наиме, познато је да хомоцистеин може да интерферира са протеинском биосинтезом и смањи активност протеина (474) и модулише мембрански транспорт електрона, што може резултирати ћелијском смрћу (440).

Овде је важно напоменути да у односу на студије на људима, анимални модели нуде знатно прецизније податке о улози оксидативног стреса у настанку анксиозних поремећаја. Предности анималних модела се огледају, пре свега, у могућности анализе оксидативног статуса у специфичним регионима мозга који учествују у регулацији понашања, у минимизацији генске хетерогености при коришћењу инбредних врста, као и у могућности контроле услова средине и примене специфичних супстанци.

Расветљавање везе између Нсу и анксиозних поремећаја је од изузетне важности за унапређење терапија психијатријских обољења чији механизми укључују хомоцистеин. Управо зато, поред оксидативног стреса, не треба занемарити ни ексцитотоксичност, као један од механизма који се налази у основи оштећења мозга изазваних хомоцистеином. Наиме, показано је да хомоцистеин остварује ефекте и путем ексцитаторног дејства на NMDA рецепторе и групу I метаботропних глутаматских рецептора (mGluR), с обзиром да се хомоцистеин понаша као компетитивни агонист ових рецептора (457). Потврђено је да хомоцистеин преко N-метил-D-аспартат (NMDA) рецептора изазива појачану стимулацију смањујући преузимање глутамина, што је детектовано у паријеталном кортексу код пацова (457, 458), као и у хипокампусу младих пацова (475). Поред тога, показано је да хомоцистеин мења хипокамбални пластицитет и синаптичку трансмисију (10, 476). Ова аминокиселина делује као агониста на месту везивања глутамата за NMDA рецепторе, који су присутни како у неуронима, тако и у астроцитима (477). Показано је да хомоцистеин испољава дозно зависни цитотоксични ефекат у дозама од 2 μ M и већим у кортикалним астроцитима, као и да астроцити регулишу експресију подтипова NMDA рецептора и повећавају осетљивост неурона на токсичност глутамата (478). Такође је показано да пацови, који имају измењену експресију GluN2B субјединице NMDA рецептора у фронталном кортексу и лимбичким структурама, које су одговорне за контролу емоционалног понашања, показују већу анксиозност (479). На основу свега наведеног се може закључити да повећани нивои хомоцистеина воде појачаној глутаматергичкој неуротрансмисији у различитим регионима мозга, чиме се, делом, може објаснити проанксиогени ефекат hНсу. Оштећења неурона, изазвана описаним механизмом ексцитотоксичности, заправо настају као последица појачаног инфлуksа Ca²⁺ и стварања реактивних кисеоничних врста. Поред тога, хомоцистеин може изазвати апоптозу неурона и апоптотске процесе механизмима који оштећују DNK и изазивају дисфункцију митохондрија (480, 481).

Посебан део нашег истраживања је био и испитивање улоге статина у смањењу оксидативних оштећења изазваних хиперхомоцистеинемijом, као и њиховог утицаја на бихевиоралне манифестације, односно потенцијалне анксиолитичке и антидепресантне ефекте ових лекова. Главни и најпознатији ефекат терапије статинима је редукција нивоа холестерола, коју статини остварују као инхибитори ензима HMGCoA-редуктазе, кључног ензима у синтези холестерола (358). Имајући у виду да се у можданом ткиву налази чак 20% укупног холестерола у људском организму, као и улогу коју холестерол има у изградњи ћелијских мембрана, мијелинских овојница, као и у неуротрансмисији (482), наметнуло се и питање могућег утицаја дуготрајне терапије статинима на мождано ткиво и његово функционисање. Међутим, метаболизам холестерола у мозгу је врло специфичан (483), при чему су студије показале да дуготрајна примена статина не доводи до промена нивоа холестерола ни у можданом ткиву, ни у плазми глодара (450, 484, 485), чиме је искључена могућност утицаја терапије статинима на ниво холестерола у мозгу, као и последични негативни ефекат на ЦНС. На основу свега наведеног, рационално је претпоставити да се ефекти статина како на бихевиоралне манифестације, тако и на оксидативни статус у мозгу пацова, остварују механизмима потпуно независним од оних којима испољавају хипохолестеролемијске ефекте.

Једно од такозваних плеиотропних (холестерол-независних) својстава статина је и њихово антиоксидативно дејство. Антиоксидативни ефекти статина су потврђени како на ткивима и моделима *in vivo* на анималним моделима (486-489), тако и у клиничким студијама (490). Показано је да статини у неуронима доводе до редукције липидне пероксидације (382), као и до редукције стварања реактивних кисеоничних врста путем инхибиције NADPH-комплекса (488, 489). Статини смањују оксидативна оштећења контролом продукције NO. Наиме, показано је да појачана продукција NO доводи до оксидативних оштећења (488, 489), као и да се под дејством статина појачана продукција NO знатно умањује утицајем на nNOS и iNOS (491). Показано је да статини смањују продукцију супероксид-анјон радикала (488, 489) и пероксинитрита (492), редукују активност оксидативних ензима попут мијелопероксидазе, и повећавају активност ензима попут каталазе и параоксоназе (359). Поред тога што смањују ниво оксиданаса, показано је да статини обнављају антиоксидансе, попут витамина Е, витамина С, као и ендogene антиоксидансе попут GSH и убиквинона (377, 378, 379).

Дуготрајна примена статина у нашем истраживању је довела до значајног побољшања оксидативног статуса у хипокампусу пацова након примене уз специјалне

дијететске протоколе којима је индукована хиперхомоцистеинемија, док њихова примена уз стандардни режим исхране није довела до промена вредности оксидативних маркера (Слике 4.20. - 4.22.). Ефекат примене статина био је знатно израженији у групама које су биле на хиперметионинској дијети са дефицитом витамина В комплекса у поређењу са групама које су биле само на хиперметионинској дијети. Поређењем ефеката самих статина, може се уочити да је симвастатин испољио знатно јача антиоксидативна својства у односу на аторвастатин, и то у виду значајног смањења индекса липидне пероксидације (TBARS), као и у виду значајног пораста активности САТ. Подаци из литературе који пореде ефекте статина у присуству хиперхомоцистеинемије су јако оскудни. Резултати једине студије, која се бавила испитивањем ефеката примене статина на параметре оксидативног стреса у присуству hHcy, у складу су са нашим резултатима, и показали су значајан антиоксидативни ефекат оба статина на вредности TBARS и САТ, при чему је симвастатин, као и у нашој студији, испољио доминантнији антиоксидативни ефекат у односу на аторвастатин (412). *Ferreira* и сарадници су, поредећи ефекте аторвастатина, правастатина, росувастатина и симвастатина, показали да симвастатин поседује најјача антиоксидативна својства (493), док су поједине студије, поредећи ефекте ова два статина у различитим експерименталним моделима, попут акутне плућне повреде (494), акутне бубрежне повреде (495), као и у присуству коронарне срчане болести (496), утврдиле супротно, показавши да је аторвастатин знатно јачи антиоксиданс у односу на симвастатин. Разлози за ове инконзистентне резултате могу потицати од разлика у примењеним експерименталним моделима, дозама примењених статина, трајањем истраживања, али и у битној чињеници да су наведене студије поредиле ефекте статина у одсуству врло снажног генератора ROS, каква је hHcy.

Потенцијална објашњења за испољене разлике у антиоксидативним ефектима симвастатина и аторвастатина се могу наћи, пре свега, у њиховим различитим фармакокинетичким особинама. С обзиром да је аторвастатин, за разлику од симвастатина, синтетски инхибитор HMGCo-A редуктазе, самим тим поседује и другачије фармакокинетичке особине, које укључују разлике у метаболизму, екскрецији, полуживоту, биорасположивости, као и липофилности (357). Аторвастатин се примењује у виду β -хидрокси-киселине, док се симвастатин примењује као про-лек, и прво мора проћи кроз јетру да би прешао у своју β -хидрокси- активну форму, SVA (simvastatin hydroxy acid), која је веома потентни компетитивни инхибитор HMG-CoA редуктазе (497). Унутар системске циркулације, ови статини се различитим афинитетом везују за албумине, имају

различите полуживоте, као и волумен дистрибуције (360). Доминантни пут метаболизма оба статина је исти, и одвија се преко цитохрома P450, и то његове изоформе CYP3A4. Сматра се да је акумулација статина у ЦНС-у различитим брзинама и у различитим концентрацијама последица разлика у њиховим липосолубилностима. Имајући у виду и велике разлике у њиховој структури, склоност ка њиховом преузимању у ЦНС-у путем носача, може, такође, значајно варирати (498). Поред тога, сматра се да је снажан антиоксидативни потенцијал симвастатина последица његове способности да инхибира изопреналин који настаје у циклусу мевалоната, као и његове способности да инхибира NADPH (499, 500). За аторвастатин је, пак, потврђено да има изузетно јаку антиоксидативну способност према хидрокси- и перокси-радикалима, при чему је показано да и његови метаболити умањују липидну пероксидацију (501).

5.2. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на промене степена депресивности

Протоколи спроведени у овој студији су испољили утицај на степен депресивности, према параметрима добијеним у ТКР, осим на један параметар-просечно трајање епизода имобилности (Слика 4.18.). Анализирајући време до појаве прве имобилности (Слика 4.15.), уочава се да је хиперметионинска дијета значајно скратила време до појаве прве имобилности, док је хиперметионинска дијета са дефицитом витамина В комплекса испољила супротан ефекат и значајно продужила овај период. Анализирајући број епизода имобилности (Слика 4.16.), у хиперметионинској дијети није дошло до значајне промене овог параметра, док је у групи која је била на хиперметионинској дијети са дефицитом витамина В комплекса, број епизода имобилности био статистички значајно смањен, како у односу на контролну групу, тако и у односу на групу која је била на хиперметионинској дијети. Укупно трајање имобилности (Слика 4.17.) је било значајно повећано код групе која је била на хиперметионинској дијети, док је код групе која је била на хиперметионинској дијети са недостатком витамина В групе, овај параметар значајно смањен, како у односу на контролне вредности, тако и у односу на групу која је била на хиперметионинској дијети. Ефекат испољен кроз промене три наведена параметра у ТКР тесту, у случају дијете обогаћене метионином, је продепресантни, док би се код дијете обогаћене метионином и са недостатком витамина В комплекса, овај ефекат могао назвати „антидепресантним”. Међутим, ако ове резултате упоредимо са резултатима добијеним у ОП и УКЛ тесту, онда је јасно да се у групи која је била на комбинованом режиму исхране, заправо испољава јак анксиогени ефекат. Имајући у виду да према подацима из литературе (247), веома јак анксиогени ефекат неког третмана може маскирати повећање степена депресивности, мишљења смо да је уочени „антидепресантни” ефекат добијен у групи са комбинованим дијететским режимом, пре свега, последица изузетно великог повећања анксиозности. Потврда ове тезе се налази и у чињеници да се анксиолитички ефекат примене статина у групи са хронично повећаним уносом метионина уз рестрикцију В витамина манифестује као „продепресантни” ефекат. Примена статина, уствари, само „демаскира” продепресантни ефекат оваквог дијететског протокола, који се може уочити једино након претходног смањења степена анксиозности.

Подаци из литературе који се односе на везу између хиперхомоцистеинемije и депресивног понашања код животиња су јако оскудни. Наиме, студија која је испитивала ову везу, добила је супротне резултате од резултата овог истраживања, показавши да је дуготрајни унос метионина (1 g/kg дневно) у трајању од осам недеља, довео до пораста нивоа хомоцистеина, али при томе није потврђена повезаност hHcy са додатним повећањем депресивности (502). Потенцијално објашњење за разлике у резултатима између наше и ове студије, може се наћи у самом анималном моделу, с обзиром да је овде примењен модел хроничног непредвидивог благог стреса (CUMS), који представља посебан анимални модел за изазивање депресије, а базиран је на основној карактеристици депресивних стања, анхедонији (287). Наиме, депресивно понашање пацова у овом истраживању је било присутно и пре примене егзогеног метионина. Једно од могућих објашњења се налази у претходном тумачењу истовремене индукције повећања анксиозности и депресивности чије клиничке манифестације често могу бити супротне природе, анулирајући на тај начин клинички супстрат преко кога би се могле квантификовати промене расположења овог типа. У појединим клиничким студијама, такође, није установљена веза између хиперхомоцистеинемije и склоности ка развоју депресивног понашања (148, 503).

Међутим, резултати наше студије у складу су са бројним клиничким и епидемиолошким студијама које су потврдиле везу између хиперхомоцистеинемije и депресије. Наиме, утврђено је да су код пацијената са депресијом присутне високе концентрације хомоцистеина у плазми или серуму (149, 152), при чему је показано да је степен депресивности директно повезан са нивоом хомоцистеина у плазми депресивних пацијената (149, 504). Поред тога, хиперхомоцистеинемija код депресивних пацијената праћена је смањеним вредностима фолата (505), као и смањеним вредностима витамина B₁₂ (148), док су резултати Nordaland студије показали да је депресија повезана са концентрацијом хомоцистеина, али да серумске вредности фолата и витамина B₁₂ не утичу на појаву депресије (390).

У расветљавању улоге коју хомоцистеин може имати у настанку депресије, свакако се не сме заобићи утицај који ова аминокиселина остварује преко серотонергичког и допаминергичког система, чија је улога у генези депресивних поремећаја већ добро позната (455). Наиме, пораст нивоа хомоцистеина у мозгу за последицу има активацију реверзне SAH-хидролазе, која преводи Hcy у SAH, врло снажан инхибитор метил-трансфераза (152). Ови ензими имају кључну улогу у, већ

описаним, трансметилационим реакцијама, које су одговорне за синтезу биогених амина и неуротрансмитера који учествују у регулацији расположења. Нарушавање физиолошких образаца метилационих процеса може довести до поремећаја у стварању ових супстанци, што може бити једно од потенцијалних објашњења утицаја хиперхомоцистеинемije на настанак депресије. Поред тога, пораст концентрације SAH води смањењу концентрације SAM, а управо је за SAM показано да има антидепресивна својства (506), као и антиоксидативну улогу, тиме што стимулише продукцију глутатиона и смањује ниво липидне пероксидације (507).

У многобројним студијама је потврђено да су различити депресивни поремећаји праћени снижавањем концентрације BDNF (енгл. *brain-derived neurotrophic factor*), што за последицу има смањење неурогенезе и прогресију депресије (508-511). Студије на анималним моделима су показале негативан утицај хиперхомоцистеинемije на концентрације нервног фактора раста (512, 513, 514), као и на ниво серотонина и допамина у хипокампусу пацова (512), што се, такође, доводи у везу са патогенезом депресије. Повећани оксидативни стрес је један од механизма којим долази до снижавања нивоа BDNF (515, 516), што може бити и индиректан начин којим Нсу утиче на BDNF и настанак депресије, с обзиром на већ поменуто прооксидативно дејство хиперхомоцистеинемije (440). Екситотоксичност коју хомоцистеин испољава преко NMDA рецептора може бити одговорна за продепресантне ефекте хомоцистеина (440). Новији подаци указали су да су управо NMDA рецептори укључени у патофизиологију депресије, као и у механизам дејства антидепресива, за које се показало да испољавају директно инхибиторно дејство на ове рецепторе (517, 518). Претклиничке студије су показале да блокирање рецептора NMDA комплекса доводи до анксиолитичког и антидепресантног ефекта у различитим анималним моделима (519, 520, 521).

Аторвастатин и симвастатин примењени у овом истраживању испољили су антидепресантни ефекат потврђен кроз статистички значајно скраћење укупног трајања имобилности (Слика 4.17.). Овај ефекат је испољен уз хиперметионинску дијету, при чему није испољена значајна разлика у ефектима између самих статина. Смањење степена депресивности изазвано апликацијом статина је потврђено враћањем вредности укупног трајања имобилности до нивоа ученог у контролној групи. Статини, примењени уз стандардни режим исхране, нису довели до промена вредности наведених параметара у ТКР тесту.

С обзиром да прегледом литературе нисмо наишли на студију сличног дизајна, која је испитивала ефекте статина на бихевиоралне манифестације у присуству хиперхомоцистеинемије као патолошког супстрата, наше резултате смо могли поредити само са резултатима студија које су испитивале ефекте статина у различитим експерименталним моделима. Резултати других истраживачких група у сагласности су са нашим резултатима, који су потврдили антидепресантни ефекат статина. Симвастатин након хроничне примене (5 mg/kg, 4 недеље) уз дијету богату мастима, испољио је антидепресантни ефекат, побољшао когнитивну функцију и повећао број пирамидалних неурона хипокампуса, при чему је антидепресантни ефекат симвастатина био испољен и након примене уз стандардни режим исхране (448). Чињеница да се у резултатима наше студије не уочава утицај статина на степен депресивности уз стандардни режим исхране, за разлику од претходно наведене студије, такође се, може објаснити променом степена депресивности узрокованог хроничним стресом изазваним начином спровођења форсиране исхране животиња (гаважа). У студијама у којима је симвастатин примењен у дозама од 5mg/kg и 10mg/kg, након 14 дана третмана, потврдиле су његов антидепресантни ефекат на моделу хроничног благог стреса (522), као и на моделу дијабетеса (523), при чему је примена симвастатина резултовала порастом концентрације серотонина у хипокампусу (523), што може бити, делом, одговорно за његов антидепресантни ефекат. Дуготрајна примена симвастатина (17 недеља) у дози од 10 mg/kg, такође је испољила антидепресантни ефекат, без утицаја на ниво липида у серуму пацова (450). Симвастатин је овај ефекат испољио и након акутне примене код мишева (524), као и код пацова (452), али у дозама значајно већим од доза примењених у овом истраживању. Потврђено је да је примена симвастатина доводила до појачане експресије D1и D2 рецептора, као и eNOS у паријеталном кортексу пацова (525). Поред тога, потврђено је да постоји блиска интеракција између регулације NMDA рецептора и допаминергичког система (526), као и да NMDA антагонисти попут амантадина повећавају стријатални допамин (527), што све указује да симвастатин може своје позитивне ефекте испољити и преко допаминергичког система. Апликација аторвастатина је, такође, довела до испољавања антидепресантног ефекта, како у хроничним (450), тако и у акутним протоколима код мишева (524) и пацова (452). Поред тога, примена аторвастатина је повећала број допаминских неурона и довела до значајног пораста неуронског фактора раста (528). Резултати студије на мишевима су показали да је акутна примена аторвастатина испољила антидепресантни ефекат, при чему је довела до

повећања нивоа BDNF у хипокампусу, инхибиције NMDA рецептора и NO-cGMP синтезе (454). Истраживањима је показано да је примена аторвастатина испољила дозно зависан негативан ефекат на активност ензима индоламин 2,3-диоксигеназе (IDO), који има улогу у разградњи триптофана у кинуренинском путу (529). С обзиром да је триптофан прекурсор неуротрансмитера серотонина, и да је показано да су ниски нивои триптофана повезани са депресијом (530, 531), ово може бити једно од потенцијалних објашњења његових антидепресантних својстава.

Међутим, литературни подаци који се односе на ефекте статина на депресију код људи и даље су недовољни и конфликтни. Наиме, одређене епидемиолошке студије указале су на могућу улогу статина у редукцији симптома депресије (451, 532, 533), при чему је најновија мета-анализа, коју су спровели *Parsaik* и сарадници, показала да је употреба статина повезана са мањим ризиком од настанка депресије (534). Поред тога, показано је да статини смањују ризик од настанка депресије након можданог удара (535), али и да повећавају већ постојећи ризик појаве депресије код пацијената са хиперлипидемијама (536), док одређени број студија није потврдио везу између употребе статина и овог ризика (537, 538). Контрадикторност ових резултата може се приписати, пре свега, типу студија. Наиме, већина студија које проучавају ефекте статина на поремећаје расположења, су епидемиолошког типа. Студије на анималним моделима које се баве проучавањем механизма дејства статина су врло оскудне, због чега су и претпостављени механизми дејства статина на ЦНС још увек дискутабилни. Да ли су протективни ефекти статина на депресију последица њихових фармаколошких ефеката, попут периферних (хиполипидемијских) или централних (неуропротективних) ефеката, резултат других фактора (попут промена начина живота, навика у исхрани) који прате основне клиничке протоколе или, пак, комбинација свих наведених фактора, још увек остаје неразјашњено.

Оксидативни стрес, као један од механизма неуротоксичности изазване хомоцистеином, детаљно је већ описан. Резултати овог истраживања су показали да је хиперхомоцистеинемија, изазвана повећаним уносом метионина, довела до оксидативних оштећења, која су се манифестовала порастом индекса липидне пероксидације, као и смањењем активности SOD и CAT (Слике 4.20. и 4.21.). Ова оксидативна оштећења могу, барем једним делом, бити одговорна за продепресантни ефекат hHcy.

Веза између оксидативног стреса и депресивних поремећаја је документована у бројним студијама. Резултати студија на анималним моделима показали су пораст индекса липидне (310, 539) и протеинске пероксидације (310, 539), као и оштећења DNK (540). Преклинички модели депресије потврдили су снижен ниво GSH (541), редукцију GSH-Px (542), као и снижење нивоа витамина А, С и Е (306) у моделима стресом индуковане депресије. Снижење активности SOD (543, 544, 545) је генерално присутно у моделима хроничног стреса, док је активност CAT снижена (546, 547) или повишена (310, 546) у различитим моделима стресом индуковане депресије.

Клиничке студије су потврдиле присуство бројних оксидативних оштећења код пацијената оболелих од депресивних поремећаја. Код депресивних пацијената је показано да су маркери оксидативног оштећења липида значајно повишени (548, 549), посебно у току депресивних епизода (550), док су повишени нивои изопростана уочени у урину (551, 552), серуму (553) и плазми (554). Оксидативна оштећења DNK, такође, су детектована у серуму (555) и леукоцитима (556). Када је реч о ензимима антиоксидативне заштите у депресивним поремећајима, активности ових ензима, попут SOD (557, 558), CAT (559, 560) и GSH-Px (560) су углавном смањене, али су неке студије показале и пораст активности појединих ензима, попут SOD (548, 549, 561).

Пораст активности ензима антиоксидативне заштите се може сматрати компензаторним одговором на оксидативни стрес, док опадање њихових вредности може рефлектовати исцрпљеност механизма ензимске антиоксидативне заштите услед стално присутног оксидативног стреса. Свеукупно гледајући, литературни подаци нуде, врло недвосмислено, доказе да је оксидативни статус значајно измењен у депресивним стањима. У интерпретацији масе података које нуде претклиничке и клиничке студије, у обзир се морају узети контекст, као и ограничења сваког истраживања. Наиме, поремећаји расположења су етиолошки врло хетерогени, хроничног тока, врло често мултифазични, али се и врло често преклапају. Све ово додатно компликује специфичност промена индивидуалних маркера оксидативних оштећења, као и њихово тумачење. Предност у истраживањима, свакако, имају лонгитудиналне студије, као и студије са већим бројем испитаника, у односу на студије пресека, које не могу установити узрочно-последичну везу између поремећаја оксидативног статуса и депресије и, заправо, представљају одраз тренутног, динамичког стања ових маркера унутар врло комплексних и повезаних биохемијских путева који учествују у одржавању редокс равнотеже.

5.3. Утицај исхране обогаћене метионином са или без нутритивне дефицијенције витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) и ефекти примене статина (аторвастатин и симвастатин) уз наведене дијететске протоколе на ноцицепцију

Резултати добијени у овој студији показују да су хронични специјални дијететски протоколи имали значајан утицај на ноцицепцију, изражену кроз време до реакције у тесту вруће плоче (Слика 4.19.). Антиноцицептивни ефекат специјалних дијететских протокола забележен у овој студији је био манифестован значајним продужењем времена до реакције у тесту вруће плоче.

У литератури постоји врло мало података који се односе на ефекте хиперхомоцистеинемије на ноцицепцију. Једно од могућих објашњења овог хипоалгезијског ефекта hНсу се може наћи у оштећењима васкуларног ендотела. Наиме, иако је улога ендотелних ћелија у механизмима настанка периферног бола први пут сугерисана пре доста година (562), директна улога дисфункције ових ћелија је тек скорије потврђена у моделима различитих болних синдрома (563). На основу претходних клиничких опсервација, код пацијената са хиперхомоцистеинемијом потврђена је ендотелна дисфункција (564, 565, 566), што је подстакло даља експериментална истраживања са циљем детаљнијег проучавања улоге hНсу на ендотелну дисфункцију (567, 568). Студија коју су спровели *Joseph* и сарадници испитивала је улогу акутне и хроничне хиперхомоцистеинемије, изазване егзогеном апликацијом метионина, на настанак ендотелне дисфункције и показала дозно-зависни хипоалгезијски ефекат (569), што је у складу са резултатима нашег истраживања.

Хипоалгезијски ефекат hНсу се може објаснити и низом биохемијских промена које доводе до оштећења периферних нерава, као и свих структура укључених у трансмисију и контролу бола (кичмена мождина и кортикалне структуре). Потврда ове претпоставке се може наћи у чињеници да тежина хиперхомоцистеинемије директно корелира са хипоалгезијским ефектом (продужава се време до реакције у групи са хиперметионинским режимом, и још више се продужава у групи са комбинованим дијететским режимом). Додатну потврду ове тезе представља и податак да симултана примена статина током провођења оба поменута режима модификоване исхране доводи до смањења претходно индукованог хипоалгезијског ефекта. Позитиван ефекат примене статина на хипоалгезију изазвану наведеним дијететским протоколима, може се објаснити њиховим, већ описаним, дејством на васкуларни ендотел. Наиме, статини смањују повећану продукцију NO, нисходном регулацијом pNOS и iNOS (492). Поред тога,

статици супримирају експресију вазоконстриктивног пептида, ендотелина-1 (570), који, као снажан проноцицептивни медијатор генерише болне сензације механизмом који укључује ефекте на ендотелним ћелијама, као и директним дејством на сензорне неуроне одговорне за ноцицепцију (571).

6. ЗАКЉУЧЦИ

1. Промене степена анксиозности

Хронична примена дијете обogaћене метионином доводила је до повећања анксиозности. Још израженије повећање анксиозности изазвала је дијета обogaћена метионином са истовременим недостатком витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂).

Дуготрајна примена статина (аторвастатин и симвастатин), спровођена уз стандардну исхрану, није утицала на промену степена анксиозности. Истовремена примена статина уз дијететски протокол са повећаним уносом метионина, као и уз додатни недостатак витамина В комплекса, је смањивала анксиогени ефекат наведених дијететских режима.

2. Промене степена депресивности

Дуготрајна примена дијете са повећаним садржајем метионина је доводила до повећања депресивности, док је дуготрајно повећани унос метионина, уз истовремени недостатак витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) доводио до испољавања јаког анксиогеног ефекта, маскирајући повећање депресивности.

Паралелна примена статина уз стандардни режим исхране није довела до промена степена депресивности. Истовремена апликација статина уз исхрану са повећаним садржајем метионина је испољавала антидепресантни ефекат, док је њихова примена уз исти дијететски протокол са континуираним дефицитом витамина В групе смањивала анксиогени ефекат дијете.

3. Промене ноцицепције

Хронична примена оба дијететска режима, дијете са повећаним уносом метионина, као и дијете са додатном дефицијенцијом витамина В комплекса (В₆, В₉, В₁₂) је доводила до хипоалгезијских манифестација, док је истовремена апликација статина уз наведене дијететске протоколе смањивала толеранцију термалног стимулуса.

4. Промене параметара оксидативног статуса

Параметри за процену оксидативног стреса су били значајно измењени под утицајем специјалних дијететских протокола. Након примене протокола са повећаним уносом метионина је дошло до пораста индекса липидне пероксидације (TBARS) и смањења активности ензима антиоксидативне заштите (SOD и CAT), при чему се вредност укупног глутатиона није мењала. Истовремена рестрикција уноса витамина В комплекса је додатно повећавала параметре оксидативног оштећења, такође, без утицаја на ћелијски садржај глутатиона.

Паралелна примена статина уз оба наведена дијететска протокола је доводила до смањења прооксидативног ефекта дијететских режима, што се манифестовало смањењем вредности TBARS, као и повећањем активности SOD и CAT.

5. Повезаност параметара оксидативног статуса са бихевиоралним манифестацијама спроведених протокола

Повећани степен оксидативног оштећења изазван хроничним дијететским интервенцијама је значајно корелирао са бихевиоралним последицама повећања нивоа хомоцистеина – повећање степена анксиозности, депресивности и хипоалгезија. Смањење оксидативног оштећења након примене статина је за резултат имало ублажавање бихевиоралних промена узрокованих спроведеним дијететским протоколима.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine, pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998;157(2 Suppl): 40S-44S.
2. Carson NA, Neil DW. Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch Dis Child* 1962;37:505-13.
3. Gibson JB, Carson NA, Neill DW. Pathological findings in homocystinuria. *J Clin Pathol* 1964;17:427-37.
4. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969;56:111-28.
5. Arnesen E, Refsum H, Bonna KH, Ueland PM, Forde OH, Nordrehaug JE. Serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int J Epidemiol* 1995;24:704-9.
6. Homocysteine Studies Collaboration: Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA* 2002;288:2015-22.
7. Castro R, Rivera I, Blom HJ, Jakobs C, Tavares de Almeida I. Homocysteine metabolism, hyperhomocysteinemia and vascular disease: An overview. *J Inher Metab Dis* 2006;29:3-20.
8. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and stroke. *Curr Opin Neurol* 2001;14(1):95-102.
9. Faraci FM, Lentz SR. Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction. *Stroke* 2004;35:345-7.
10. Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 2003;26:137-46.
11. Obeid R, McCaddon A, Herrmann W. The role of hyperhomocysteinemia and B vitamin deficiency in neurological and psychiatric diseases. *Clin Chem Lab Med* 2007;45(12):1590-1606.
12. Elshorbagy AK, Gjesdal CG, Nurk E, Tell GS, Ueland PM, Nygard O, et al. Cysteine, homocysteine and bone mineral density: a role for body composition? *Bone* 2009;44:954-8.
13. Perna AF, Lanza D, Sepe I, Conzo G, Altucci L, Ingrosso D. Altered folate receptor 2 expression in uraemic patients on haemodialysis: Implications for folate resistance. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28:1214-24.
14. Givvimani S, Munjal C, Narayanan N, Aqil F, Tyagi G, Metreveli N, et al. Hyperhomocysteinemia decreases intestinal motility leading to constipation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;303(3):G281-90.

15. Cao HX, Gao CM, Takezaki T, Wu JZ, Ding JH, Liu YT, et al. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and susceptibility to colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2008;9:203-8.
16. Almadori G, Bussu F, Galli J, Cadoni G, Zappacosta B, Persichilli S, et al. Serum levels of folate, homocysteine, and vitamin B12 in head and neck squamous cell carcinoma and in laryngeal leukoplakia. *Cancer* 2005;103:284-92.
17. Ozkan Y, Yardim-Akaydin S, Firat H, Caliřkan-Can E, Ardiç S, Simřek B. Usefulness of homocysteine as a cancer marker: total thiol compounds and folate levels in untreated lung cancer patients. *Anticancer Res.* 2007;27(2):1185-9.
18. Iacobazzi V, Infantino V, Castegna A, Andria G. Hyperhomocysteinemia: Related genetic diseases and congenital defects, abnormal DNA methylation and newborn screening issues. *Mol Genet Metab* 2014;113:27-33.
19. řkovierová H, Vidomanová E, Mahomet S, Sopková J, Drgová A, řerveňová T, et al. The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism imbalance on human health. *Int Mol Sci* 2016;17(10):1733.
20. Wainfan E, Poirier LA. Methyl groups in carcinogenesis: effects on DNA methylation and gene expression. *Cancer Res* 1992;52(7 Suppl):2071S-2077S.
21. Pogribny IP, Basnakian AG, Miller BJ, Lopatina NG, Poirier LA, James SJ. Breaks in genomic DNA and within the p53 gene are associated with hypomethylation in livers of folate/methyldeficient rats. *Cancer Res* 1995;55:1894-1901.
22. Mudd SH, Ebert MH, Scriver CR. Labile methyl group balances in the human: The role of sarcosine. *Metabolism* 1980;29:707-20.
23. Stead LM, Au KP, Jacobs RL, Brosnan ME, Brosnan JT. Methylation demand and homocysteine metabolism: Effects of dietary provision of creatine and guanidinoacetate. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;281:E1095-E1100.
24. Kerr SJ. Competing methyltransferase systems. *J Biol Chem* 1972;247:4248-52.
25. Jung M, Pfeifer GP. Aging and DNA methylation. *BMC Biol* 2015;13:7.
26. Scott JM, Weir DG. Folic acid, homocysteine and onecarbon metabolism: a review of the essential biochemistry. *J Cardiovasc Risk* 1998;5:223-7.
27. Sunden S, Renduchintala MS, Park EI, Miklasz SD, Garrow TA. Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. *Arch Biochem Biophys* 1997;345:171-4.

28. Stipanuk MH. Sulfur amino acid metabolism: Pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu Rev Nutr* 2004;24(1):539-77.
29. Mato JM, Martinez-Chantar ML, Lu SC. S-adenosylmethionine metabolism and liver disease. *Ann Hepatol* 2013;12(2):183-9.
30. Wang R. Gasotransmitters: Growing pains and joys. *Trends Biochem Sci* 2014;39:227-32.
31. Lee M, Schwab C, Yu S, McGeer E, McGeer PL. Astrocytes produce the antiinflammatory and neuroprotective agent hydrogen sulfide. *Neurobiol Aging* 2009; 30:1523-34.
32. Belalcázar AD, Ball JG, Frost LM, Valentovic MA, Wilkinson J. Transsulfuration is a significant source of sulfur for glutathione production in human mammary epithelial cells. *ISRN Biochem* 2013;637897. <https://doi.org/10.1155/2013/637897>
33. Mudd SH, Poole JR. Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. *Metabolism* 1975; 24:721-35.
34. Mudd SH, Ebert MH, Scriver CR. Labile methyl group balances in the human: the role of sarcosine. *Metabolism* 1980;29:707-20.
35. Stead LM, Brosnan JT, Brosnan ME, Vance DE, Jacobs RL. Is it time to reevaluate methyl balance in humans? *Am J Clin Nutr* 2006;83:5-10.
36. Scott JM, Molloy AM, Kennedy DG, Kennedy S, Weir DG. Effects of the disruption of transmethylation in the central nervous system: an animal model. *Acta Neurol Scand* 1994;154:27-31.
37. Troen AM. The central nervous system in animal models of hyperhomocysteinemia. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2005;29:1140-51.
38. 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* 1991;81:551-6.
39. Chadwick LH, McCandless SE, Silverman GL, Schwartz S, Westaway D, Nadeau JH. Betaine-homocysteine methyltransferase-2: cDNA cloning, gene sequence, physical mapping, and expression of the human and mouse genes. *Genomics* 2000;70:66-73.
40. Heinonen K. Studies on cystathionase activity in rat liver and brain during development. Effects of hormones and amino acids in vivo. *Biochem J* 1973;136:1011-5.
41. Griffiths R, Tudball N. Observations on the fate of cystathionine in rat brain. *Life Sci* 1976;19:1217-24.

42. Awata S, Nakayama K, Suzuki I, Sugahara K, Kodama H. Changes in cystathionine gamma-lyase in various regions of rat brain during development. *Biochem Mol Biol Int* 1995;35:1331-8.
43. Kranich O, Dringen R, Sandberg M, Hamprecht B. Utilization of cysteine and cysteine precursors for the synthesis of glutathione in astroglial cultures: preference for cystine. *Glia* 1998;22:11-8.
44. Shanker G, Allen JW, Mutkus LA, Aschner M. The uptake of cysteine in cultured primary astrocytes and neurons. *Brain Res* 2001;901:156-63.
45. Grieve A, Butcher SP, Griffiths R. Synaptosomal plasma membrane transport of excitatory sulphur amino acid transmitter candidates: kinetic characterisation and analysis of carrier specificity. *J Neurosci Res* 1992;32:60-8.
46. Griffiths R, Grieve A, Allen S, Olverman HJ. Neuronal and glial plasma membrane carrier-mediated uptake of L-homocysteate is not selectively blocked by beta-*p*-chlorophenylglutamate. *Neurosci Lett* 1992;147:175-8.
47. Zeise ML, Knopfel T, Zieglgansberger W. (+/-)-beta-Parachlorophenylglutamate selectively enhances the depolarizing response to L-homocysteic acid in neocortical neurons of the rat: evidence for a specific uptake system. *Brain Res* 1998;443:373-6.
48. Ho PI, Ashline D, Dhitavat S, Ortiz D, Collins SC, Shea TB, et al. Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine. *Neurobiol Dis* 2003;14:32-42.
49. Kamath AF, Chauhan AK, Kisucka J, Dole VS, Loscalzo J, Handy DE, et al. Elevated levels of homocysteine compromise blood-brain barrier integrity in mice. *Blood* 2006;107:591-3.
50. Eto K, Asada T, Arima K, Makifuchi T, Kimura H. Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:1485-8.
51. Regland B, Andersson M, Abrahamsson L, Bagby J, Dyrehag LE, Gottfries CG. Increased concentrations of homocysteine in the cerebrospinal fluid in patients with fibromyalgia and chronic fatigue syndrome. *Scand J Rheumatol* 1997;26:301-7.
52. Regland B, Abrahamsson L, Blennow K, Grenfeldt B, Gottfries CG. CSF-methionine is elevated in psychotic patients. *J Neural Transm* 2004;111:631-40.
53. Yanai Y, Shibasaki T, Kohno N, Mitsui T, Nakajima H. Concentrations of sulfur-containing free amino acids in lumbar cerebrospinal fluid from patients with consciousness disturbances. *Acta Neurol Scand* 1983;68:386-93.

54. Isobe C, Murata T, Sato C, Terayama Y. Increase of total homocysteine concentration in cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Life Sci.* 2005;77:1836-43.
55. Surtees R, Bowron A, Leonard J. Cerebrospinal fluid and plasma total homocysteine and related metabolites in children with cystathionine beta-synthase deficiency: the effect of treatment. *Pediatr Res* 1997;42:577-82.
56. Jakubowski H. Homocysteine is a protein amino acid in humans: Implications for homocysteine-linked disease. *J Biol Chem* 2002;277:30425-8.
57. Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy. *J Lab Clin Med* 1989;114:473-501.
58. 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;57:467-77.
59. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002; 346:476-83.
60. Sachdev P. Homocysteine and neuropsychiatric disorders. *Rev Bra Psiquiat* 2004;26(1): 50-6.
61. Kang SS, Wong PW, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N, et al. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet* 1991;48:546-51.
62. Stein JH, McBride PE. Hyperhomocysteinemia and atherosclerotic vascular disease: pathophysiology, screening, and treatment. *Arch Intern Med* 1998;158:1301-6.
63. Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AM, Rosenblatt DS, Matthews RG, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 1994;7:195-200.
64. Ma J, Stampfer MJ, Hennekens CH, Frosst P, Selhub J, Horsford J, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in US physicians. *Circulation* 1996;94:2410-6.
65. Safarinejad MR, Shafiei N, Safarinejad S. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T, A1298C and G1793A polymorphisms: Association with risk for clear cell renal cell carcinoma and tumour behaviour in men. *Clin Oncol* 2012;24:269-81.

66. Watkins D, Rosenblatt DS. Functional methionine synthase deficiency (cb1E and cb1G), clinical and biochemical heterogeneity. *Am J Med Genet* 1989;34:427-34.
67. Zappacosta B, Mastroiacovo P, Persichilli S, Prunes G, Ruggeri S, Minucci A, et al. Homocysteine lowering by folate-rich diet or pharmacological supplementations in subjects with moderate hyperhomocysteinemia. *Nutrients* 2013;5:1531-43.
68. Fohr IP, Prinz-Langenohl R, Brönstrup A, Bohlmann AM, Nau H, Berthold HK, et al. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase genotype determines the plasma homocysteine-lowering effect of supplementation with 5-methyltetrahydrofolate or folic acid in healthy young women. *Am J Clin Nutr* 2002;75:275-82.
69. Venn BJ, Green TJ, Moser R, Mann JI. Comparison of the effect of low-dose supplementation with L-5-methyltetrahydrofolate or folic acid on plasma homocysteine: A randomized placebo-controlled study. *Am J Clin Nutr* 2003;77:658-62.
70. Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, et al. Hyperhomocysteinemia: An independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991;324:1149-55.
71. Williams KT, Schalinske KL. Homocysteine metabolism and its relation to health and disease. *Biofactors* 2010;36:19-24.
72. Woodward M, Rumley A, Rumley A, Rumley C, Lewington S, Morrison CE, et al. The association between homocysteine and myocardial infarction is independent of age, sex, blood pressure, cholesterol, smoking and markers of inflammation: The Glasgow Myocardial Infarction Study. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2006;17:1-5.
73. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998;49:31-69.
74. De Chiara B, Sedda V, Parolini M, Campolo J, De Maria R, Caruso R, et al. Plasma total cysteine and cardiovascular risk burden: Action and interaction. *Sci World J* 2012;303654. <http://dx.doi.org/10.1100/2012/303654>
75. Clarke R, Halsey J, Lewington S, Lonn E, Armitage J, Manson JE, et al. Effects of lowering homocysteine levels with B vitamins on cardiovascular disease, cancer, and cause-specific mortality: Meta-analysis of 8 randomized trials involving 37,485 individuals. *Arch Intern Med* 2010;170:1622-31.
76. Devlin AM, Arning E, Bottiglieri T, Faraci FM, Rozen R, Lentz SR. Effect of Mthfr genotype on diet-induced hyperhomocysteinemia and vascular function in mice. *Blood* 2004;103:2624-9.

77. Dayal S, Arning E, Bottiglieri T, Böger RH, Sigmund CD, Faraci FM, et al. Cerebral vascular dysfunction mediated by superoxide in hyperhomocysteinemic mice. *Stroke*. 2004;35:1957-62.
78. Dayal S, Bottiglieri T, Arning E, Maeda N, Malinow MR, Sigmund CD, et al. Endothelial dysfunction and elevation of S-adenosylhomocysteine in cystathionine b-synthase-deficient mice. *Circ Res* 2001;88:1203-9.
79. Dayal S, Wilson KM, Leo L, Arning E, Bottiglieri T, Lentz SR. Enhanced susceptibility to arterial thrombosis in a murine model of hyperhomocysteinemia. *Blood* 2006;108:2237-43.
80. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-3.
81. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996;93:7-9.
82. Zhang H, Liu Z, Ma S, Zhang H, Kong F, He Y, et al. Ratio of S-adenosylmethionine to S-adenosylhomocysteine as a sensitive indicator of atherosclerosis. *Mol Med Rep* 2016;14:289-300.
83. Bogdanski P, Miller-Kasprzak E, Pupek-Musialik D, Jablecka A, Lacinski M, Jagodzinski P, et al. Plasma total homocysteine is a determinant of carotid intima-media thickness and circulating endothelial progenitor cells in patients with newly diagnosed hypertension. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:1107-13.
84. Danese S, Sgambato A, Papa A, Scaldaferrri F, Pola R, Sans M, et al. Homocysteine triggers mucosal microvascular activation in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2005;100:886-95.
85. Munjal C, Givvimani S, Qipshidze N, Tyagi N, Falcone JC, Tyagi SC. Mesenteric vascular remodeling in hyperhomocysteinemia. *Mol Cell Biochem* 2011;348:99-108.
86. Givvimani S, Munjal C, Narayanan N, Aqil F, Tyagi G, Metreveli N, et al. Hyperhomocysteinemia decreases intestinal motility leading to constipation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;303:G281-90.
87. Wiernicki I, Millo B, Safranow K, Gorecka-Szyld B, Gutowski P. MMP-9, homocysteine and CRP circulating levels are associated with intraluminal thrombus thickness of

- abdominal aortic aneurysms: new implication of the old biomarkers. *Dis Markers* 2011;31:67-74.
88. Chowers Y, Sela BA, Holland R, Fidder H, Simoni FB, Bar-Meir S. Increased levels of homocysteine in patients with Crohn's disease are related to folate levels. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3498-502.
89. Oussalah A, Guéant JL, Peyrin-Biroulet L. Meta-analysis: hyperhomocysteinemia in inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;34:1173-84.
90. Schulpis KH, Karikas GA, Georgala S, Michas T, Tsakiris S. Elevated plasma homocysteine levels in patients on isotretinoin therapy for cystic acne. *Int J Dermatol* 2001;40:33-6.
91. Thakrar BT, Robinson NJ. Isotretinoin use and the risk of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2011;106:1000-2.
92. Hofmann MA, Kohl K, Zumbach MS, Borcea V, Bierhaus A, Henkels A, et al. Hyperhomocyst(e)inemia and endothelial dysfunction in IDDM. *Diabetes Care* 1997;20:1880-6.
93. Poirier LA, Brown AT, Fink LM, Wise CK, Randolph CJ, DeLongchamp RR, et al. Blood S-adenosylmethionine concentrations and lymphocyte methylenetetrahydrofolate reductase activity in diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *Metabolism* 2001;50:1014-8.
94. Robillon JF, Canivet B, Candito M, Sadoul JL, Jullien D, Morand P, et al. Type 1 diabetes mellitus and homocyst(e)ine. *Diabete Metab* 1994;20:494-6.
95. Jacobs RL, House JD, Brosnan ME, Brosnan JT. Effects of streptozotocin-induced diabetes and of insulin treatment on homocysteine metabolism in the rat. *Diabetes* 1998;47:1967-70.
96. Jacobs RL, Steads LM, Brosnan ME, Brosnan JT. Hyperglucagonemia in rats results in decreased plasma homocysteine and increased flux through the transsulfuration pathway in liver. *J Biol Chem* 2001;276:43740-7.
97. Nieman KM, Hartz CS, Szegedi SS, Garrow TA, Sparks JD, Schalinske KL. Folate status modulates the induction of hepatic glycine N-methyltransferase and homocysteine metabolism in diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:E1235-42.
98. Nieman KM, Rowling MJ, Garrow TA, Schalinske KL. Modulation of methyl group metabolism by streptozotocin-induced diabetes and alltrans-retinoic acid. *J Biol Chem* 2004;279:45708-12.

99. Ratnam S, Maclean KN, Jacobs RL, Brosnan ME, Kraus JP, Brosnan JT. Hormonal regulation of cystathionine b-synthase expression in liver. *J Biol Chem* 2002;277:42912-8.
100. Ratnam S, Wijekoon EP, Hall B, Garrow TA, Brosnan ME, Brosnan JT. Effects of diabetes and insulin on betaine-homocysteine S-methyltransferase expression in rat liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;290:E933-9.
101. Wang L, Jhee K-H, Hua X, DiBello PM, Jacobsen DW, Kruger WD. Modulation of cystathionine b-synthase level regulates total serum homocysteine in mice. *Circ Res* 2004;94:1318-24.
102. Hartz CS, Nieman KM, Jacobs RL, Vance DE, Schalinske KL. Hepatic phosphatidyl-ethanolamine N-methyltransferase expression is increased in diabetic rats. *J Nutr* 2006;136:3005-9.
103. Nieman KM, Schalinske KL. Insulin abrogates perturbation of methyl group and homocysteine metabolism in diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;301:E560-5.
104. Tessari P, Coracina A, Kiwanuka E, Vedovato M, Vettore M, Valerio A, et al. Effects of insulin on methionine and homocysteine kinetics in type 2 diabetes with nephropathy. *Diabetes* 2005;54:2968-76.
105. Matsushita K, Coresh J, Sang Y, Chalmers J, Fox C, Guallar E, et al. CKD Prognosis Consortium: Estimated glomerular filtration rate and albuminuria for prediction of cardiovascular outcomes: A collaborative meta-analysis of individual participant data. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015;3:514-25.
106. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart disease and stroke statistics - 2016 update: A report from the American Heart Association. *Circulation* 2016;133:e38-e360.
107. Kumar T, Sharma GS, Singh LR. Homocystinuria: Therapeutic approach. *Clin Chim Acta* 2016;458:55-62.
108. Smith DE, Hornstra JM, Kok RM, Blom HJ, Smulders YM. Folic acid supplementation does not reduce intracellular homocysteine, and may disturb intracellular one-carbon metabolism. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1643-50.
109. van Meurs JB, Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, van der Klift M, de Jonge R, Lindemans J, et al. Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture. *N Engl J Med* 2004;350:2033-41.

110. Kim DJ, Koh JM, Lee O, Kim NJ, Lee YS, Kim YS, et al. Homocysteine enhances apoptosis in human bone marrow stromal cells. *Bone* 2006;39:582-90.
111. Herrmann M, Tami A, Wildemann B, Wolny M, Wagner A, Schorr H et al. Hyperhomocysteinemia induces a tissue specific accumulation of homocysteine in bone by collagen binding and adversely affects bone. *Bone* 2009;44:467-75.
112. Almadori G, Bussu F, Galli J, Cadoni G, Zappacosta B, Persichilli S, et al. Serum levels of folate, homocysteine, and vitamin B12 in head and neck squamous cell carcinoma and in laryngeal leukoplakia. *Cancer* 2005;103:284-92.
113. Kato I, Dnistrian AM, Schwartz M, Toniolo P, Koenig K, Shore RE, et al. Serum folate, homocysteine and colorectal cancer risk in women: A nested case-control study. *Br J Cancer* 1999;79:1917-22.
114. Sun CF, Haven TR, Wu TL, Tsao KC, Wu JT. Serum total homocysteine increases with the rapid proliferation rate of tumor cells and decline upon cell death: A potential new tumor marker. *Clin Chim Acta* 2002;321:55-62.
115. Warnecke PM, Bestor TH. Cytosine methylation and human cancer. *Curr Opin Oncol* 2000;12:68-73.
116. Naushad SM, Reddy CA, Kumaraswami K, Divyya S, Kotamraju S, Gottumukkala, SR, et al. Impact of hyperhomocysteinemia on breast cancer initiation and progression: Epigenetic perspective. *Cell Biochem Biophys* 2014;68:397-406.
117. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;79:368-76.
118. O'Suilleabhain PE, Sung V, Hernandez C, Lacritz L, Dewey RB Jr, Bottiglieri T, et al. Elevated plasma homocysteine level in patients with Parkinson disease: motor, affective, and cognitive associations. *Arch Neurol* 2004;61:865-8.
119. O'Suilleabhain PE, Oberle R, Bartis C, Dewey RB, Bottiglieri T, Diaz-Arrastia R. Clinical course in Parkinson's disease with elevated homocysteine. *Parkinsonism Relat Disord* 2006;12:103-7.
120. Lee SH, Kim MJ, Kim BJ, Kim SR, Chun S, Ryu JS, et al. Homocysteine-lowering therapy or antioxidant therapy for bone loss in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2010;25:332-40.
121. Zylberstein DE, Lissner L, Bjorkelund C, Mehlig K, Thelle D, Gustafson D, et al. Midlife homocysteine and late-life dementia in women: a prospective population study. *Neurobiol Aging* 2011;32:380-6.

122. Oulhaj A, Refsum H, Beaumont H, Williams J, King E, Jacoby R, et al. Homocysteine as a predictor of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 2010;25:82-90.
123. Chen CS, Chou MC, Yeh YC, Yang YH, Lai CL, Yen CF, et al. Plasma homocysteine levels and major depressive disorders in Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry* 2010;18:1045-8.
124. Guo T, Chen H, Liu B, Ji W, Yang C. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms C677T and risk of autism in the Chinese Han population. *Genet Test Mol Biomark* 2012;16:968-73.
125. Park JW, Ro MJ, Pyun JA, Kwack KB, Nam M, et al. MTHFR 1298A > C is a risk factor for autism spectrum disorder in the Korean population. *Psychiatry Res* 2014;215: 258-9.
126. Rai V. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T polymorphism with autism: Evidence of genetic susceptibility. *Metab Brain Dis* 2016; 31:727-35.
127. Bandelow B, Michaelis S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. *Dialogues Clin Neurosci* 2015;17(3):327-35.
128. Steel Z, Marnane C, Iranpour C, Chey T, Jackson JW, Patel V, et al. The global prevalence of common mental disorders: a systematic review and meta-analysis 1980-2013. *Int J Epidemiol* 2013;43(2):476-93.
129. Fernstrom JD. Can nutrient supplements modify brain function? *Am J Clin Nutr* 2000;71(6 Suppl):1669S-1675S.
130. Petrie WM, Ban TA. Vitamins in psychiatry: do they have a role? *Drugs* 1985;30:58-65.
131. Bottiglieri T, Crellin R, Reynolds EH. Folate and neuropsychiatry. In: Bailey LB, ed. *Folate in Health and Disease*. New York, NY: Marcel Dekker;1995.p. 435-62.
132. Lava M, Borus JS, Alpert JE, Nierenberg AA, Rosenbaum JF, Bottiglieri T. Folate, vitamin B12, and homocysteine in major depressive disorder. *Am J Psychiatry* 1997; 154:426-8.
133. Bottiglieri T, Hyland K, Laundry M, Godfrey P, Carney MW, Toone BK, et al. Folate deficiency, bipterin and monoamine metabolism in depression. *Psychol Med* 1992;22:871-6.
134. Carney MW. Serum folate values in 423 psychiatric patients. *BMJ* 1967;4:512-6.
135. Ghadirian A, Anath J, Engelsmann F. Folic acid deficiency and depression. *Psychosomatics* 1980;21:926-9.

136. Reynolds EH, Preece JM, Bailey J, Copping A. Folate deficiency in depressive illness. *Br J Psychiatry* 1970;117:287-92.
137. Wilkinson AM, Anderson DN, Abou-Saleh MT, Wesson M, Blair JA, Farrar G, et al. 5-Methyltetrahydrofolate level in the serum of depressed subjects and its relationship to the outcome of ECT. *J Affect Disord* 1994;32:163-8.
138. Wesson VA, Levitt AJ, Joffe RT. Change in folate status with antidepressant treatment. *Psychiatry Res* 1994;53:313-22.
139. Abou-Saleh MT, Coppen A. The biology of folate in depression: implications for nutritional hypotheses of the psychoses. *J Psychiatric Res.* 1986;20:91-101.
140. Levitt AJ, Joffe RT. Folate, B12, and life course of depressive illness. *Biol Psychiatry* 1989;25:867-72.
141. Coppen A, Abou-Saleh MT. Plasma folate and affective morbidity during long-term lithium therapy. *Br J Psychiatry* 1982;141:87-9.
142. Carney MW, Chary TK, Laundry M, Bottiglieri T, Chanarin I, Reynolds EH, et al. Red cell folate concentrations in psychiatric patients. *J Affect Disord* 1990;19:207-13.
143. Abou-Saleh MT, Coppen A. Serum and red blood cell folate in depression. *Acta Psychiatr Scand* 1989;80:78-82.
144. Coppen A, Bailey J. Enhancement of the antidepressant action of fluoxetine by folic acid: a randomised, placebo controlled trial. *J Affect Disord* 2000;60:121-30.
145. Passeri M, Cucinotta D, Abate G, Senin U, Ventura A, Stramba Badiale M, et al. Oral 5'-methyltetrahydrofolic acid in senile organic mental disorders with depression: results of a double-blind multicenter study. *Aging* 1993;5:63-71.
146. Coppen A, Chaudhry S, Swade C. Folic acid enhances lithium prophylaxis. *J Affect Disord* 1986;10:9-13.
147. Godfrey PS, Toone BK, Carney MW, Flynn TG, Bottiglieri T, Laundry M, et al. Enhancement of recovery from psychiatric illness by methylfolate. *Lancet.* 1990;336:392-5.
148. Penninx BW, Guralnik JM, Ferrucci L, Fried LP, Allen RH, Stabler SP. Vitamin B(12) deficiency and depression in physically disabled older women: epidemiologic evidence from the Women's Health and Aging Study. *Am J Psychiatry* 2000;157:715-21.
149. Tolmunen T, Hintikka J, Voutilainen S, Ruusunen A, Alfthan G, Nyssonen K, et al. Association between depressive symptoms and serum concentrations of homocysteine in men: a population study. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1574-8.

150. Tiemeier H, van Tuijl HR, Hofman A, Meijer J, Kiliaan AJ, Breteler MM. Vitamin B12, folate, and homocysteine in depression: the Rotterdam Study. *Am J Psychiatry* 2002;159:2099-101.
151. Morris MS, Fava M, Jacques PF, Selhub J, Rosenberg IH. Depression and folate status in the US population. *Psychother Psychosom* 2003;72:80-7.
152. Bottiglieri T, Laundry M, Crellin R, Toone BK, Carney MW, Reynolds EH. Homocysteine, folate, methylation, and monoamine metabolism in depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;69:228-32.
153. Reynolds EH, Carney MW, Toone BK. Methylation and mood. *Lancet* 1984;2:196-8.
154. Hvas AM, Juul S, Bech P, Nexø E. Vitamin B6 level is associated with symptoms of depression. *Psychother Psychosom* 2004;73:340-3.
155. Mischoulon D, Fava M. Role of S-adenosyl-L-methionine in the treatment of depression: a review of the evidence. *Am J Clin Nutr* 2002;76:1158-61.
156. Kufferle B, Grunberger J. Early clinical double-blind study with S-adenosyl-L-methionine: a new potential antidepressant. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1982;32:175-80.
157. Kagan BL, Sultzer DL, Rosenlicht N, Gerner RH. Oral S-adenosylmethionine in depression: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Psychiatry* 1990;147:591-5.
158. Bell KM, Plon L, Bunney WE Jr, Potkin SG. S-adenosylmethionine treatment of depression: a controlled clinical trial. *Am J Psychiatry* 1988;145:1110-4.
159. Coppen A, Bolander-Gouaille C. Treatment of depression: time to consider folic acid and vitamin B12. *J Psychopharmacol* 2005;19:59-65.
160. Abou-Saleh MT, Coppen A. Folic acid and the treatment of depression. *J Psychosom Res* 2006;61:285-7.
161. Vermeer SE, van Dijk EJ, Koudstaal PJ, Oudkerk M, Hofman A, Clarke R, et al. Homocysteine, silent brain infarcts, and white matter lesions: The Rotterdam Scan Study. *Ann Neurol* 2002;51:285-9.
162. Sachdev P. Homocysteine, cerebrovascular disease and brain atrophy. *J Neurol Sci* 2004;226:25-9.
163. Hogervorst E, Ribeiro HM, Molyneux A, Budge M, Smith AD. Plasma homocysteine levels, cerebrovascular risk factors, and cerebral white matter changes (leukoaraiosis) in patients with Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2002;59:787-93.

164. Wong A, Mok V, Fan YH, Lam WW, Liang KS, Wong KS. Hyperhomocysteinemia is associated with volumetric white matter change in patients with small vessel disease. *J Neurol* 2006;253:441-7.
165. den Heijer T, Vermeer SE, Clarke R, Oudkerk M, Koudstaal PJ, Hofman A, et al. Homocysteine and brain atrophy on MRI of non-demented elderly. *Brain* 2003;126:170-5.
166. Sachdev P, Parslow R, Salonikas C, Lux O, Wen W, Kumar R, et al. Homocysteine and the brain in midadult life: evidence for an increased risk of leukoaraiosis in men. *Arch Neurol* 2004;61:1369-76.
167. Lehmann M, Regland B, Blennow K, Gottfries CG. Vitamin B12-B6-folate treatment improves blood-brain barrier function in patients with hyperhomocysteinaemia and mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2003;16:145-50.
168. Vermeulen EG, Stehouwer CD, Valk J, van der Knaap M, van den Berg M, Twisk JW, et al. Effect of homocysteine lowering treatment with folic acid plus vitamin B on cerebrovascular atherosclerosis and white matter abnormalities as determined by MRA and MRI: a placebocontrolled, randomized trial. *Eur J Clin Invest* 2004;34:256-61.
169. Petras M, Tatarkova Z, Kovalska M, Mokra D, Dobrota D, Lehotsky J, et al. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for the neuronal system disorders. *J Physio Pharmacol* 2014;65(1):15-23.
170. Zou CG, Banerjee R. Homocysteine and redox signaling. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:547-59.
171. Postea O, Krotz F, Henger A, Keller C, Weiss N. Stereospecific and redox-sensitive increase in monocyte adhesion to endothelial cells by homocysteine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:508-13.
172. Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D'Emilia DM, Rayudu PV, et al. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:5923-8.
173. Parsons RB, Waring RH, Ramsden DB, Williams AC. In vitro effect of the cysteine metabolites homocysteic acid, homocysteine and cysteic acid upon human neuronal cell lines. *Neurotoxicology* 1998;19:599-603.
174. Kruman II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L, et al. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci* 2000;20:6920-6.

175. Vitvitsky V, Dayal S, Stabler S, Zhou Y, Wang H, Lentz SR, et al. Perturbations in homocysteine-linked redox homeostasis in a murine model for hyperhomocysteinemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;287:39-46.
176. Watanabe M, Osada J, Aratani Y, Kluckman K, Reddick R, Malinow MR, et al. Mice deficient in cystathionine beta-synthase: animal models for mild and severe homocyst(e)inemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1585-9.
177. Algaidi SA, Christie LA, Jenkinson AM, Whalley L, Riedel G, Platt B. Long-term homocysteine exposure induces alterations in spatial learning, hippocampal signalling and synaptic plasticity. *Exp Neurol* 2006;197:8-21.
178. Streck EL, Bavaresco CS, Netto CA, Wyse AT. Chronic hyperhomocysteinemia provokes a memory deficit in rats in the Morris water maze task. *Behav Brain Res* 2004;153:377-81.
179. Streck EL, Delwing D, Tagliari B, Matte C, Wannmacher CM, Wajner M, et al. Brain energy metabolism is compromised by the metabolites accumulating in homocystinuria. *Neurochem Int* 2003;43:597-602.
180. Jakubowski H. Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cell Mol Life Sci* 2004;6:470-87.
181. Lazarewicz JW, Ziembowicz A, Matyja E, Stafiej A, Zieminska E. Homocysteine evoked ⁴⁵Ca release in the rabbit hippocampus is mediated by both NMDA and group I metabotropic glutamate receptors: in vivo microdialysis study. *Neurochem Res* 2003; 28:259-69.
182. Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D'Emilia DM, Rayudy PV, et al. Neurotoxicity associated with dual actions of Homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94:5923-8.
183. Stanojlović O, Hrnčić D, Rašić-Marković A, Macut Dj, Djurić D, Šušić V. Sleep peptides in experimental models of epilepsy. *Glas Srp Akad Nauka Med* 2011;(51):141-9.
184. Shi QS, Savage JE, Hufeisen SJ, Rauser L, Grajkowska E, Ernsberger P. L-Homocysteine sulfinic acid and other acidic homocysteine derivatives are potent and selective metabotropic glutamate receptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;305:131-42.
185. Ho PI, Ortiz D, Rogers E, She TB. Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage. *J Neurosci. Res*. 2002;70:694-702.
186. Sachdev PS. Homocysteine and brain atrophy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005;29:1152-61.

187. Zou CG, Zhao YS, Gao SY, Li SD, Cao XZ, Zhang M, Zhang KQ. Homocysteine promotes proliferation and activation of microglia. *Neurobiol Aging* 2010;31(12):2069-79.
188. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2007;35(5):1147-50.
189. Davies, K.J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* 1995;61:1-31.
190. Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, et al. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:444-8.
191. Viner RI, Ferrington DA, Huhmer AF, Bigelow DJ, Schoneich C. Accumulation of nitrotyrosine on the SERCA2a isoform of SR Ca-ATPase of rat skeletal muscle during aging: a peroxynitrite-mediated process? *FEBS Lett* 1996;379:286-90.
192. Jones DP. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol* 2002;348:93-112.
193. Halliwell B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends Biochem Sci* 2006;31(9):509-15.
194. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(1):44-84.
195. Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(10): 2175-83.
196. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 2002; 30(6):620-50.
197. Konat GW. H₂O₂-induced higher order chromatin degradation: a novel mechanism of oxidative genotoxicity. *J Biosci* 2003;28(1):57-60.
198. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 2003;25(3-4):207-18.
199. Horton AA, Fairhurst S. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *Crit Rev Toxicol* 1987;18(1):27-79.
200. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *Am J Med Genet* 2001;106(1):62-70.

201. Filomeni G, Ciriolo MR. Redox control of apoptosis: an update. *Antioxid Redox Signal* 2006;8(11-12):2187-92.
202. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). *Free Radic Biol Med* 1988;5(5-6):363-9.
203. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci* 2004;61(2):192-208.
204. Bouayed J, Rammal H, Soulimani R. Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. *Oxid Med Cell Longev* 2009;2(2):63-7.
205. Clarke DD, Sokoloff L. Circulation and energy metabolism of the brain. In: Sigel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, ed. *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. Philadelphia: Lippincott-Raven 1999; p 637-69.
206. Wang X, Michaelis EK. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front Aging Neurosci* 2010; <https://doi.org/10.3389/fnagi.2010.00012>
207. Gutierrez J, Ballinger SW, Darley-Usmar VM, Landar A. Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction in vascular cells. *Circ Res* 2006;99:924-32.
208. Kamsler A, Segal M. Control of neuronal plasticity by reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal* 2007;9:165-7.
209. Janssen-Heininger YM, Mossman BT, Heintz NH, Forman HJ, Kalyanaraman B, Finkel T, et al. Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radic Biol Med* 2008;45:1-17.
210. Avshalumov MV, Chen BT, Rice ME. Mechanisms underlying H₂O₂-mediated inhibition of synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Brain Res* 2000;882:86-94.
211. Steullet P, Neijt HC, Cuenod M, Do KQ. Synaptic plasticity impairment and hypofunction of NMDA receptors induced by glutathione deficit: relevance to schizophrenia. *Neuroscience* 2006;137:807-19.
212. Kamsler A, Segal M. Hydrogen peroxide as a diffusible signal molecule in synaptic plasticity. *Mol Neurobiol* 2004;29:167-78.
213. Öhman A. Fear and anxiety as emotional phenomena: Clinical phenomenology, evolutionary perspectives, and information-processing mechanisms. In: Lewis M, Haviland JM, ed. *New York, NY, US: Guilford Press Handbook of emotions* 1993; p. 511-36.

214. McLean CP, Asnaani A, Litz, BT, Hofmann SG. Gender differences in anxiety disorders: prevalence, course of illness, comorbidity and burden of illness. *J Psychiatr Res* 2011;45(8):1027-35.
215. Bandelow B, Michaelis S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. *Dialogues Clin Neurosci* 2015;17(3):327-35.
216. Michaelis T, Zetche U, Margaf J. Epidemiology of anxiety disorders. *Epidemiology and Psychopharmacology* 2007;6(4):136-42.
217. Ruhe HG, Mason NS, Schene AH. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. *Mol Psychiatry* 2007;12:331-59.
218. Mineur YS, Obayemi A, Wigstrand MB, Fote GM, Calarco CA, et al. Cholinergic signaling in the hippocampus regulates social stress resilience and anxiety- and depression-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(9):3573-8.
219. Nuss P. Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2015;11:165-75.
220. Amiel JM, Mathew SJ. Glutamate and anxiety disorders. *Curr Psychiatry Rep* 2007;9(4):278-83.
221. Binder EB, Nemeroff CB. The CRF system, stress, depression and anxiety -insights from human genetic studies. *Mol Psychiatry* 2010;15(6):574-88.
222. Suliman S, Hemmings SMJ, Seedat S. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) protein levels in anxiety disorders: systematic review and meta-regression analysis. *Front Integr Neurosci* 2013;7:55.
223. Iemolo A, Seiglie M, Blasio A, Cottone P, Sabino V. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the central nucleus of the amygdala induces anxiety via melanocortin receptors. *Psychopharmacology* 2016;233(17):3269-77.
224. Pandaranandaka J, Poonyachoti S, Kalandakanond Thongsong S. Differential effects of exogenous and endogenous estrogen on anxiety as measured by elevated T-maze in relation to the serotonergic system. *Behav Brain Res* 2009;198(1):142-8.
225. Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci* 2009;10(6):434-45.
226. Weinstock M. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci Biobehav Rev* 2008;32(6):1073-86.

227. Nishi M, Horii-Hayashi N, Sasagawa T. Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation models in rodents. *Front Neurosci* 2014;8:166.
228. Atcheson JB, Tyler FH. Circadian rhythm: man and animals. In: Greep RO, Astwood EB, editors. *Handbook of physiology*. Washington: American Physiological Society, 1975. p. 127-34.
229. Castro JP, Frussa-Filho R, Fukushiro DF, Chinen CC, Abrilio VC, Silva RH. Effects of long-term continuous exposure to light on memory and anxiety in mice. *Physiol Behav* 2005;86:218-23.
230. Ravindran R, Rathinasamy SD, Samson J, Senthilvelan M. Noisestress-induced brain neurotransmitter changes and the effect of *Ocimum sanctum* (Linn) treatment in albino rats. *J Pharmacol Sci* 2005;98:354-60.
231. Kvetnansky R, Weise VK, Gewirtz GP, Kopin IJ. Synthesis of adrenal catecholamines in rats during and after immobilization stress. *Endocrinology* 1971;89:46-9.
232. Jaggi AS, Bhatia N, Kumar N, Singh N, Anand P, Dhawan R. A review on animal models for screening potential anti-stress agents. *Neurol Sci* 2011;32:993-1005.
233. Kvetnansky R, Mikulaj L. Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. *Endocrinology* 1970;87:738-43.
234. Padovan CM, Guimaraes FS. Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus-maze. *Braz J Med Biol Res* 2000;33:79-83.
235. Hill MN, Hunter RG, McEwen BS. Chronic stress differentially regulates cannabinoid CB1 receptor binding in distinct hippocampal subfields. *Eur J Pharmacol* 2009;614:66-9.
236. Kasuga S, Ushijima M, Morihara N, Itakura Y, Nakata Y. Effect of aged garlic extract (AGE) on hyperglycemia induced by immobilization stress in mice. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 1999;114:191-7.
237. Herrmann L, Ionescu IA, Henes K, Golub Y, Wang NX, Buell DR, et al. Long-lasting hippocampal synaptic protein loss in a mouse model of posttraumatic stress disorder. *PLoS One* 2012;7:e42603.
238. Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioral-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* 2005;52(2):90-110.
239. Willner P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: history, evaluation and usage. *Neurobiol Stress* 2017(6):78-93.

240. Millan MJ. The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol* 2003;70:83-244.
241. Belzung C, Griebel G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behav Brain Res* 2001;125:141-9.
242. Holmes A, Wrenn CC, Harris AP, Thayer KE, Crawley JN. Behavioral profiles of inbred strains on novel olfactory, spatial and emotional tests for reference memory in mice. *Genes Brain Behav* 2002;1:55-69.
243. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *Eur J Pharmacol* 2003;463(1-3):3-33.
244. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp* 2015;(96):52434.
245. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2007;2(2):322-8.
246. Rodgers RJ, Haller J, Holmes A, Halasz J, Walton TJ, Brain PF. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiol Behav* 1999;68:47-53.
247. Selakovic D, Joksimovic J, Obradovic D, Milovanovic D, Djuric M, Rosic G. The adverse effects of exercise and supraphysiological dose of testosterone-enanthate (TE) on exploratory activity in elevated plus maze (EPM) test - indications for using total exploratory activity (TEA) as a new parameter for ex. *Neuro Endocrinol Lett* 2016;37(5):383-8.
248. Crawley J, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 1980;13:167-70.
249. Bourin M, Hascoet M. The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol* 2003;463:55-65.
250. Vogel JR, Beer B, Clody DE. A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. *Psychopharmacologia* 1971;21:1-7.
251. Pearce JM, Hall G. A model for Pavlovian learning: variations in the effectiveness of conditioned but not of unconditioned stimuli. *Psychol Rev* 1980;87:532-52.
252. Atmaca M, Kuloglu M, Tezcan E, Ustundag B. Antioxidant enzyme and malondialdehyde levels in patients with social phobia. *Psychiatry Res* 2008;159(1-2):95-100.
253. Kuloglu M, Atmaca M, Tezcan E, Ustundag B, Bulut S. Antioxidant enzyme and malondialdehyde levels in patients with panic disorder. *Neuropsychobiology* 2002;46(4):186-9.

254. Ozdemir E, Cetinkaya S, Ersan S, Kucukosman S, Ersan EE. Serum selenium and plasma malondialdehyde levels and antioxidant enzyme activities in patients with obsessive-compulsive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009;33(1):62-5.
255. Kuloglu M, Atmaca M, Tezcan E, Gecici O, Tunckol H, Ustundag B. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels in patients with obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychobiology* 2002;46(1):27-32.
256. Tezcan E, Atmaca M, Kuloglu M, Ustundag B. Free radicals in patients with post-traumatic stress disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2003;253(2):89-91.
257. Hovatta I, Tennant RS, Helton R, Marr RA, Singer O, Redwine JM, et al. Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. *Nature* 2005;438:662-6.
258. Bouayed J, Rammal H, Younos C, Soulimani R. Positive correlation between peripheral blood granulocyte oxidative status and level of anxiety in mice. *Eur J Pharmacol* 2007;564:146-9.
259. Rammal H, Bouayed J, Younos C, Soulimani R. The impact of high anxiety levels on the oxidative status of mouse peripheral blood lymphocytes, granulocytes and monocytes. *Eur J Pharmacol* 2008;589:173-5.
260. Rammal H, Bouayed J, Younos C, Soulimani R. Evidence that oxidative stress is linked to anxiety-related behaviour in mice. *Brain Behav Immun* 2008;22:1156-9.
261. Salim S, Sarraj N, Taneja M, Saha K, Tejada-Simon MV, Chugh G. Moderate treadmill exercise prevents oxidative stress-induced anxiety-like behavior in rats. *Behav Brain Res* 2010;208(2):545-52.
262. Masood A, Nadeem A, Mustafa SJ, O'Donnell JM. Reversal of oxidative stress induced anxiety by inhibition of phosphodiesterase-2 in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;326(2):369-79.
263. de Oliveira MR, Silvestrin RB, Mello EST, Moreira JC. Oxidative stress in the hippocampus, anxiety-like behavior and decreased locomotory and exploratory activity of adult rats: effects of sub acute vitamin A supplementation at therapeutic doses. *Neurotoxicology* 2007;28(6):1191-9.
264. Desrumaux C, Risold PY, Schroeder H, Deckert V, Masson D, Athias A, et al. Phospholipid transfer protein (PLTP) deficiency reduces brain vitamin E content and increases anxiety in mice. *FASEB J* 2005;19(2):296-7.

265. Souza CG, Moreira JD, Siqueira IR, Pereira AG, Rieger DK, Souza DO, et al. Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety like behavior. *Life Sciences* 2007; 81:198-203.
266. Berry A, Capone F, Giorgio M, Pelicci PG, de Kloet ER, Alleva E, et al. Deletion of the life span determinant p66Shc prevents age-dependent increases in emotionality and pain sensitivity in mice. *Exp Gerontol* 2007;42:37-45.
267. Stadtman ER. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann NY Acad Sci* 2001;928:22-38.
268. Kendler KS, Thornton LM, Prescott CA. Gender differences in the rates of exposure to stressful life events and sensitivity to their depressogenic effects. *Am J Psychiatry* 2001;158:587-93.
269. Brigitta B. Pathophysiology of depression and mechanisms of treatment. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 2002;4(1):7-20.
270. Lavori PW, Keller MB, Scheftner W, Fawcett J, Mueller TI. Recurrence after recovery in unipolar MDD. An observational follow-up study of clinical predictors and somatic treatment as a mediating factor. *Int J Methods Psychiatry Res* 1994;4:211-29.
271. Yang L, Zhao Y, Wang Y, Liu L, Zhang X, Li, B, et al. The effects of psychological stress on depression. *Curr Neuropharmacol* 2015;13(4):494-504.
272. Souery D, Rivelli SK, Mendlewicz J. Molecular genetic and family studies in affective disorders: state of the art. *J Affect Disord* 2001;62:45-55.
273. Schildkraut JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry*. 1965;122:509-22.
274. Stahl SM. Basic psychopharmacology of antidepressants, part 1: Antidepressants have seven distinct mechanisms of action. *J Clin Psychiatry* 1998;59(4):5-14.
275. Herbert J. Cortisol and depression: three questions for psychiatry. *Psychol Med* 2013 43(3):449-69.
276. Jarrett DB, Miewald JM, Kupfer DJ. Recurrent Depression Is Associated With a Persistent Reduction in Sleep-Related Growth Hormone Secretion. *Arch Gen Psychiatry* 1990;47(2):113-8.
277. Montero-Pedrezuela A, Venero C, Lavado-Autric R, Fernandez-Lamo I, Garcia-Verdugo JM, Bernal J, et al. Modulation of adult hippocampal neurogenesis by thyroid hormones: implications in depressive-like behavior. *Mol Psychiatry* 2006;11:361-71.

278. Shors TJ, Leuner B. Estrogen-mediated effects on depression and memory formation in females. *J Affect Disord* 2003;74(1):85-96.
279. Keller J, Gomez R, Williams G, Lembke A, Lazzeroni L, Murphy GM, et al. HPA axis in major depression: cortisol, clinical symptomatology, and genetic variation predict cognition. *Molecular Psychiatry* 2017;22(4):527-36.
280. Connor TJ, Leonard BE. Depression, stress and immunological activation: the role of cytokines in depressive disorders. *Life Sci* 1998;62:583-606.
281. Sternberg EM. Emotions and disease: from balance of humors to balance of molecules. *Nat Med* 1997;3:264-7.
282. Altar CA. Neurotrophins and depression. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:59-61.
283. Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry* 2001;50:260-5.
284. Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 1981;5:247-51.
285. Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)* 1997;134:319-29.
286. Katz RJ. Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. *Pharmacol Biochem Behav* 1982;16:965-8.
287. Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)* 1987;93:358-64.
288. Monleon S, D'Aquila P, Parra A, Simon VM, Brain PF, Willner P. Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine. *Psychopharmacology (Berl)* 1995;117:453-7.
289. Willner P, Wilkes M, Orwin A. Attributional style and perceived stress in endogenous and reactive depression. *J Affect Disord* 1990;18:281-7.
290. David DJ, Samuels BA, Rainer Q, Wang JW, Marsteller D, Mendez I, et al. Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* 2009;62:479-93.
291. Yan HC, Cao X, Das M, Zhu XH, Gao TM. Behavioral animal models of depression. *Neurosci Bull* 2010;26(4):327-37.

292. Cryan JF, Mombereau C, Vassout A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 2005;29:571-625.
293. Lucki I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *BehavPharmacol* 1997;8:523-32.
294. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 1978; 47:379-91.
295. Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 1985;85:367-70.
296. Gingrich JA. Oxidative stress is the new stress. *Nat Med* 2005;11:1281-2.
297. Maes M, De Vos N, Pioli R, Demedts P, Wauters A, Neels H, et al. Lower serum vitamin E concentrations in major depression. Another marker of lowered antioxidant defenses in that illness. *J Affect Disord* 2000;58(3):241-6.
298. Kodydková J, Vávrová L, Zeman M, Jiráček R, Macásek J, Stanková B, et al. Antioxidative enzymes and increased oxidative stress in depressive women. *Clin Biochem* 2009;42(13-14):1368-74.
299. Schmelzer C, Lindner I, Rimbach G, Niklowitz P, Menke T, Döring F. Functions of coenzyme Q10 in inflammation and gene expression. *Biofactors* 2008;32(1-4):179-83.
300. Maes M, Mihaylova I, Kubera M, Uytterhoeven M, Vrydags N, Bosmans E. Coenzyme Q10 deficiency in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS) is related to fatigue, autonomic and neurocognitive symptoms and is another risk factor explaining the early mortality in ME/CFS due to cardiovascular disorder. *Neuro Endocrinol Lett* 2009;30(4):470-6.
301. Cumurcu BE, Ozyurt H, Etikan I, Demir S, Karlıdag R. Total antioxidant capacity and total oxidant status in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. *Psychiatry Clin Neurosci* 2009;63(5):639-45.
302. Gałecki P, Szemraj J, Bieńkiewicz M, Zboralski K, Gałecka E. Oxidative stress parameters after combined fluoxetine and acetylsalicylic acid therapy in depressive patients. *Hum Psychopharmacol* 2009;24:277-86.
303. Maes M, Gałecki P, Chang YS, Berk M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011;35(3):676-92.

304. Pal SN, Dandiya PC. Glutathione as a cerebral substrate in depressive behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 1994;48(4):845-51.
305. de Souza FG, Rodrigues MD, Tufik S, Nobrega JN, D'Almeida V. Acute stressor-selective effects on homocysteine metabolism and oxidative stress parameters in female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;85(2):400-7.
306. Eren I, Naziroğlu M, Demirdaş A. Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. *Neurochem Res* 2007;32(7):1188-95.
307. Eren I, Naziroğlu M, Demirdaş A, Celik O, Uğguz AC, Altunbaşsak A, et al. Venlafaxine modulates depression-induced oxidative stress in brain and medulla of rat. *Neurochem Res* 2007;32(3):497-505.
308. Song C, Killeen AA, Leonard BE. Catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in neutrophils of sham-operated and olfactory-bulbectomised rats following chronic treatment with desipramine and lithium chloride. *Neuropsychobiology* 1994;30(1):24-8.
309. Zhang D, Wen XS, Wang XY, Shi M, Zhao Y. Antidepressant effect of Shudihuang on mice exposed to unpredictable chronic mild stress. *J Ethnopharmacol* 2009;123(1):55-60.
310. Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Vuolo F, Petronilho F, et al. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochem Int* 2009;54:358-62.
311. Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Vuolo F, Petronilho F, et al. Increased oxidative stress in submitochondrial particles into the brain of rats submitted to the chronic mild stress paradigm. *J Psychiatr Res* 2009;43(9):864-9.
312. Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest* 2010;120(11):3760-72.
313. Terman GW, Bonica JJ. Spinal mechanisms and their modulation. In: Loeser JD, Butler SH, Chapman CR, Turk DC, eds. *Bonica's Management of Pain*. 3rd ed. Philadelphia, Pennsylvania, USA: Lippincott Williams and Wilkins; 2003:p.73.
314. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 2009;139(2):267-84.
315. Eccleston C. Role of psychology in pain management. *Br J Anaesth* 2001;87(1):144-152.
316. Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 1999;57(1):1-164.

317. Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 2009;10(9):895-926.
318. McMahon SB, Bennett DLH, Bevan S. Inflammatory mediators and modulators of pain. In: McMahon SB, Koltzenburg M, ed. *Wall and Melzack's textbook of Pain*. Elsevier; 2008. p.49-72.
319. Verri WA Jr, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther* 2006;112:116-38.
320. Khasar SG, Mccarter G, Levine JD. Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. *J Neurophysiol*. 1999;81:1104-1112.
321. Cunha TM, Verri WA Jr, Schivo IR, Napimoga MH, Parada CA, Poole S, et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *J Leukoc Biol* 2008;83:824-32.
322. Biswas SK. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? *Oxid Med Cell Longev* 2016; <https://doi.org/10.1155/2016/5698931>.
323. Lewin GR, Lechner SG, Smith ES. Nerve growth factor and nociception: from experimental embryology to new analgesic therapy. *Handb Exp Pharmacol* 2014;220:251-82.
324. Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:299-309.
325. Taylor BK, Fu W, Kuphal KE, Stiller CO, Winter MK, Chen W, et al. Inflammation enhances Y1 receptor signaling, neuropeptide Y-mediated inhibition of hyperalgesia, and substance P release from primary afferent neurons. *Neuroscience* 2014;256:178-94.
326. Smith PA, Moran TD, Abdulla F, Tumber KK, Taylor BK. Spinal mechanisms of NPY analgesia. *Peptides*. 2007;28(2):464-74.
327. Malet M, Leiguarda C, Gaston G, McCarthy C, Brumovsky P. Spinal activation of the NPY Y1 receptor reduces mechanical and cold allodynia in rats with chronic constriction injury. *Peptides* 2017;92:38-45.
328. Diaz-del Castillo M, Woldbay DPD, Heegaard HM. Neuropeptide Y and its involvement in chronic pain. *Neuroscience*2017; <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.08.050>.

329. Taylor BK, Abhyankar SS, Vo NT, Kriedt CL, Churi SB, Urban JH. Neuropeptide Y acts at Y1 receptors in the rostral ventral medulla to inhibit neuropathic pain. *Pain* 2007;131:83-95.
330. Taiwo OB, Taylor BK. Antihyperalgesic effects of intrathecal neuropeptide Y during inflammation are mediated by Y1 receptors. *Pain* 2002;96:353-63.
331. Mahinda TB, Taylor BK. Intrathecal neuropeptide Y inhibits behavioral and cardiovascular responses to noxious inflammatory stimuli in awake rats. *Physiol Behav* 2004;80:703-11.
332. dos Santos VV, Santos DB, Lach G, Rodrigues AL, Farina M, De Lima TC, Prediger RD. Neuropeptide Y (NPY) prevents depressive-like behavior, spatial memory deficits and oxidative stress following amyloid- β (A β (1-40)) administration in mice. *Behav Brain Res* 2013;244:107-15.
333. Oztas B, Sahin D, Kir H, Eraldemir FC, Musul M, Kuskay S, Ates N. The effect of leptin, ghrelin, and neuropeptide-Y on serum Tnf-A, Il-1 β , Il-6, Fgf-2, galanin levels and oxidative stress in an experimental generalized convulsive seizure model. *Neuropeptides* 2017;61:31-7.
334. Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med* 2007;42(2):153-64.
335. Khattab MM. TEMPOL, a membrane-permeable radical scavenger, attenuates peroxynitrite- and superoxide anion-enhanced carrageenan-induced paw edema and hyperalgesia: a key role for superoxide anion. *Eur J Pharmacol* 2006;548(1-3):167-73.
336. Ji G, Li Z, Neugebauer V. Reactive oxygen species (ROS) mediate visceral pain-related amygdala plasticity and behaviors. *Pain* 2015;156(5):825-36.
337. Flohe L, Brigelius-Flohe R, Saliou C, Traber MG, Packer L. Redox regulation of NF- κ B activation. *Free Radic Biol Med* 1997;22(6):1115-26.
338. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010;140(6):821-32.
339. Scholz H, Yndestad A, Damas JK et al. 8-Isoprostane increases expression of interleukin-8 in human macrophages through activation of mitogen-activated protein kinases. *Cardiovasc Res* 2003;59(4):945-54.
340. Iyer SS, Accardi CJ, Ziegler TR et al. Cysteine redox potential determines pro-inflammatory IL-1 β levels. *PLoS ONE* 2009;4(3):e5017.
341. Raut A, Ratka A. Oxidative damage and sensitivity to nociceptive stimulus and opioids in aging rats. *Neurobiol Aging* 2009;30(6):910-19.

342. Chan SH, Lai YY. Effects of aging on pain responses and analgesic efficacy of morphine and clonidine in rats. *Exp Neurol* 1982;75:112-9.
343. Kasapoglu M, Ozben T. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging. *Exp Gerontol* 2001;36:209-20.
344. Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal Models of Nociception. *Pharmacological Reviews* 2001;53(4):597-652.
345. Menendez L, Lastra A, Hidalgo A, Baamonde A. Unilateral hot plate test: a simple and sensitive method for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice. *J Neurosci Methods* 2002;113:91-7.
346. Tjelsen A, Lund A, Berge OG, Hole K. An improved method for tail-flick testing with adjustment for tail skin temperature. *J Neurosci Meth* 1989;26:259-65.
347. Jasmin L, Kohan L, Franssen M, Janni G, Goff JR. The cold plate as a test of nociceptive behaviors: description and application to the study of chronic neuropathic and inflammatory pain models. *Pain* 1998;75(2-3):367-82.
348. Cheah M, Fawcett JW, Andrews MR. Assessment of thermal pain sensation in rats and mice using the Hargreaves test. *Bio Protoc* 2017; 20;7(16):e2506.
349. Markman M. Chemotherapy-associated neurotoxicity: an important side-effect impacting on quality, rather than quantity of life. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996;122:511-12.
350. Kim BJ, Park HR, Roh HJ, et al. Chemotherapy-related polyneuropathy may deteriorate quality of life in patients with B-cell lymphoma. *Qual Life Res* 2010;19:1097-103.
351. Hong JS, Tian J, Wu LH. The influence of chemotherapy-induced neurotoxicity on psychological distress and sleep disturbance in cancer patients. *Curr Oncol* 2014;21(4):174-80.
352. Almadrones L, McGuire DB, Walczak JR, Florio CM, Tian C. Psychometric evaluation of two scales assessing functional status and peripheral neuropathy associated with chemotherapy for ovarian cancer: a gynecologic oncology study group. *Oncol Nurs Forum* 2004;31:615-23.
353. Tofthagen C, Donovan KA, Morgan MA, Shibata D, Yeh Y. Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy's effects on health-related quality of life of colorectal cancer survivors. *Support Care Cancer* 2013;21:3307-13.
354. Zabora J, Brintzenhofeszoc K, Curbow B, Hooker C, Piantadosi S. The prevalence of psychological distress by cancer site. *Psychooncology* 2001;10:19-28.

355. Liu L, Fiorentino L, Natarajan L, et al. Pre-treatment symptom cluster in breast cancer patients is associated with worse sleep, fatigue, and depression during chemotherapy. *Psychooncology* 2009;18:187-94.
356. Endo A. A historical perspective on the discovery of statins. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2010;86(5):484-93.
357. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors. *Arter Thromb Vasc Biol* 2001;21:1712-9.
358. Stancu C, Sima A. Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med* 2001;5(4):378-87.
359. McFarland AJ, Anoopkumar-Dukie S, Arora DS, Grant GD, McDermott CM, Perkins AV, et al. Molecular mechanisms underlying the effects of statins in the central nervous system. *Int J Mol Sci* 2014;15(11):20607-37.
360. Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: An update. *Fundam Clin Pharmacol* 2005;19:117-25.
361. Buhaescu I, Izzedine H. Mevalonate pathway: a review of clinical and therapeutical implications. *Clin Biochem* 2007;40(9-10):575-84.
362. Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014;129(25 suppl 2): S1–S45.
363. Pencina MJ, Navar-Boggan AM, D'Agostino RB Sr, et al. Application of new cholesterol guidelines to a population-based sample. *N Engl J Med*. 2014;370(15): 1422–1431.
364. Golomb BA, Evans MA. Statin adverse effects: a review of the literature and evidence for a mitochondrial mechanism. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2008;8(6):373-418.
365. Davies JT, Delfino SF, Feinberg CE, Johnson MF, Nappi VL, Olinger JT, Schwab AP, Swanson HI. Current and Emerging Uses of Statins in Clinical Therapeutics: A Review. *Lipid Insights*. 2016 Nov 14;9:13-29.
366. Malfitano AM, Marasco G, Proto MC, Laezza C, Gazzero P, Bifulco M. Statins in neurological disorders: an overview and update. *Pharmacol Res* 2014;88:74-83.
367. van der Most PJ, Dolga AM, Nijholt IM, Luiten PGM, Eisel ULM. Statins: mechanisms of neuroprotection. *Prog Neurobiol* 2009;88(1):64-75.

368. Wassmann S, Laufs U, Muller K, Konkol C, Ahlbory K, Bäumer AT, et al. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:300-5.
369. Lee TS, Chang CC, Zhu Y, Shyy JY. Simvastatin induces heme oxygenase-1: a novel mechanism of vessel protection. *Circulation* 2004;110:1296-302.
370. Carneado J, Alvarez de Sotomayor M, Perez-Guerrero C, Jimenez L, Her-rera MD, Pamies E, et al. Simvastatin improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats through a superoxide dismutase mediated antioxidant effect. *J Hypertens* 2002;20:429-37.
371. Umeji K, Umemoto S, Itoh S, Tanaka M, Kawahara S, Fukai T, et al. Comparative effects of pitavastatin and probucol on oxidative stress, Cu/Zn superoxidedismutase, PPAR-gamma, and aortic stiffness in hypercholesterolemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H2522-32.
372. Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC, Frei B, Selwyn AP, Ganz P. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N Engl J Med* 1995;332:488-93.
373. Rueckschloss U, Galle J, Holtz J, Zerkowski HR, Morawietz H. Induction of NAD(P)H oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells: antioxidative potential of hydroxyl methyl glutaryl coenzyme A reductase inhibitor therapy. *Circulation* 2001;104:1767-72.
374. Cai H, Griendling KK, Harrison DG. The vascular NAD(P)H oxidase as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2003;24:471-8.
375. Serrano F, Kolluri NS, Wientjes FB, Card JP, Klann E. NADPH oxidase immunoreactivity in mouse brain. *Brain Res* 2003;988:193-8.
376. Guzik TJ, Harrison DG. Vascular NADPH oxidases as drug targets for novel antioxidant strategies. *Drug Discov Today* 2006;11:524-33.
377. Blaha V, Zadak Z, Solichova D, Bratova M, Havel E. Hypocholesterolemic effect of pravastatin is associated with increased content of antioxidant vitamin-E in cholesterol fractions. *Acta Medica* 1998;41:87-90.
378. Laaksonen R, Jokelainen K, Laakso J, Sahi T, Harkonen M, Tikkanen MJ, Himberg JJ. The effect of simvastatin treatment on natural antioxidants in low-density lipoproteins and high-energy phosphates and ubiquinone in skeletal muscle. *Am J Cardiol* 1996;77:851-4.

379. Suzumura K, Kasahara E, Ohnishi Y, Chien KC, Inoue M. Fluvastatin normalizes the decreased turnovers of glutathione and ascorbic acid in Watanabe heritable hyperlipidaemic rabbits. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000;27:709-14.
380. Kumar A, Vashist A, Kumar P, Kalonia H, Mishra J. Protective effect of HMG-CoA reductase inhibitors against running wheel activity induced fatigue, anxiety like behavior, oxidative stress and mitochondrial dysfunction in mice. *Pharmacol Rep* 2012;64:1326-36.
381. Mohammadi MT, Amini R, Jahanbakhsh Z, Shekarforoush S. Effects of atorvastatin on the hypertension-induced oxidative stress in the rat brain. *IBJ* 2013;17(3):152-7.
382. Lee JH, Lee YH, Choi IY, Oh YK, Kim HS, Park JS, et al. Simvastatin prevents oxygen and glucose deprivation/reoxygenation-induced death of cortical neurons by reducing the production and toxicity of 4-hydroxy-2E-nonenal. *J Neurochem* 2006;97:140-50.
383. Liu W, Zhao Y, Zhang X, Ji J, Sim Bao XM, Wu CF, et al. Simvastatin ameliorates cognitive impairments via inhibition of oxidative stress induced apoptosis of hippocampal cells through the ERK/AKT signaling pathway in a rat model of senile dementia. *Mol Med Rep* 2018;17(1):1885-92.
384. Barone E, Cenini G, di Domenico F, Martin S, Sultana R, Mancuso C, et al. Long-term high-dose atorvastatin decreases brain oxidative and nitrosative stress in a preclinical model of Alzheimer disease: A novel mechanism of action. *Pharmacol Res* 2011;63:172-80.
385. Piermartiri TC, Figueiredo CP, Rial D, Duarte FS, Bezerra SC, Mancini G, et al. Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid- β (1-40) administration in mice: Evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. *Exp Neurol* 2010;226:274-84.
386. Tong XK, Nicolakakis N, Fernandes P, Ongali B, Brouillette J, Quirion R, et al. Simvastatin improves cerebrovascular function and counters soluble amyloid- β , inflammation and oxidative stress in aged APP mice. *Neurobiol Dis* 2009;35:406-14.
387. Cordle A, Landreth G. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors attenuate β -amyloid-induced microglial inflammatory responses. *J Neurosci* 2005;25:299-307.
388. Asahi M, Huang Z, Thomas S, Yoshimura SI, Sumii T, Mori T, et al. Protective effects of statins involving both eNOS and tPA in focal cerebral ischemia. *J Cerebr Blood Flow Metab* 2005;25:722-9.

389. Hrnčić D, Mikić J, Rašić-Marković A, Velimirović M, Stojković T, Obrenović R, et al. Anxiety-related behavior in hyperhomocysteinemia induced by methionine nutritional overload in rats: role of the brain oxidative stress. *Can J Physiol Pharmacol* 2016;94(10):1074-82.
390. Bjelland I, Tell G, Vollset S, Refsum H, Ueland P. Folate, vitamin B12, homocysteine, and the MTHFR 677C>T polymorphism in anxiety and depression, the Hordaland Homocysteine Study. *Arch Gen Psychiatry* 2003;60(6):618-26.
391. Zhang R, Ma J, Xia M, Zhu H, Ling WH. Mild hyperhomocysteinemia induced by feeding rats diets rich in methionine or deficient in folate promotes early atherosclerotic inflammatory processes. *J Nutr* 2004;825-30.
392. Sodha NR, Boodhwani M, Ramlawi B, Clements RT, Mieno S, Feng J, et al. Atorvastatin increases myocardial indices of oxidative stress in a porcine model of hypercholesterolemia and chronic ischemia. *J Card Surg* 2008;23(4):312-20.
393. Parle M, Singh N. Reversal of memory deficits by atorvastatin and simvastatin in rats. *Yakugaku Zasshi* 2007;127(7):1125-37.
394. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-8.
395. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247:3170-5.
396. Beers RF, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 1952;195(1):133-40.
397. Ellman GL. Tissue sulphhydryl group. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70-7.
398. Lowry OH, Rosebrough NL, Farr AL, Randall RI. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
399. World Health Organization. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. Geneva. 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
400. Stanger O, Fowler B, Piertzik K, et al. Homocysteine, folate, and vitamin B₁₂ in neuropsychiatric disease: review and treatment recommendations. *Expert Rev Neurother* 2009;9(9):1393-412.
401. Schalinske KL, Smazal AL. Homocysteine imbalance: a pathological metabolic marker. *ASN Adv Nutr* 2012;3:755-62.

402. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993; 39(9):1764-79.
403. Mudd SH, Finkelstein JD, Irreverre F, Laster L. Homocystinuria: an enzymatic defect *Science* 1964;143:1443-5.
404. Chung KH, Chiou HY, Chen YH. Associations between serum homocysteine levels and anxiety and depression among children and adolescents in Taiwan. *Sci Rep* 2017;7(1):8330.
405. Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, Pogribny IP, Melnyk S, Lussier-Cacan S, et al. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum Mol Genet* 2001;10(5):433-44.
406. Scherer EB, da Cunha AA, Kolling J, da Cunha MJ, Schmitz F, Sitta A, et al. Development of an animal model for chronic mild hyperhomocysteinemia and its response to oxidative damage. *Int J Dev Neurosci* 2011;29(7):693-9.
407. Matté C, Mackedanz V, Stefanello FM, Scherer EB, Andreazza AC, Zanotto C, et al. Chronic hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increases DNA damage in brain and blood of rats: protective effect of folic acid. *Neurochem Int* 2009;54(1):7-13.
408. Blaise SA, Nédélec E, Schroeder H, Alberto JM, Bossenmeyer-Pourié C, Guéant JL, et al. Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. *Am J Pathol* 2007;170(2):667-79.
409. Baydas G, Ozer M, Yasar A, Tuzcu M, Koz ST. Melatonin improves learning and memory performances impaired by hyperhomocysteinemia in rats. *Brain Res* 2005;1046:187-94.
410. 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;135:879-86.
411. Hrnčić D, Rašić-Marković A, Stojković T, Velimirović M, Puškaš N, Obrenović R, et al. Hyperhomocysteinemia induced by methionine dietary nutritional overload modulates acetylcholinesterase activity in the rat brain. *Mol Cell Biochem* 2014;396(1-2):99-105.

412. Nikolić T, Zivković V, Srejić I, Stojić I, Jeremić N, Jeremić 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):109-118.
413. Mijailović N, Selaković D, Joksimović J, Mihailović V, Katanić J, Jakovljević V, Nikolić T, Bolevich S, Zivković V, Pantić M, Rosić G. The anxiolytic effects of atorvastatin and simvastatin on dietary-induced increase in homocysteine levels in rats. *Mol Cell Biochem* 2018;doi:10.1007/s11010-018-3425-6.
414. Viggiano A, Viggiano E, Monda M, Ingrosso D, Perna AF, De Luca B. Methionine-enriched diet decreases hippocampal antioxidant defences and impairs spontaneous behaviour and long term potentiation in rats. *Brain Res* 2012;1471:66-74.
415. Hovatta I, Juhila J, Donner J. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. *Neurosci Res* 2010;68(4):261-75.
416. Salim S. Oxidative Stress and Psychological Disorders. *Curr Neuropharmacol* 2014; 12:140-7.
417. Bannerman DM, Grubb M, Deacon RMJ, Yee BK, Feldon J, Rawlins JNP. Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behav Brain Res* 2003;139:197-213.
418. Deacon RMJ, Rawlins JNP. Hippocampal lesions, species-typical behaviours and anxiety in mice. *Behav Brain Res* 2005;156:241-9.
419. File SE, Kenny PJ, Cheeta S. The role of the dorsal hippocampal serotonergic and cholinergic systems in the modulation of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 2000;66:65-72.
420. Thiels E, Klann E. Hippocampal memory and plasticity in superoxide dismutase mutant mice. *Physiol Behav* 2002;77:601-5.
421. Bonatto F, Polydoro M, Andrades ME, Frota MLC Jr, Dal-Pizzol F, Rotta LN, et al. Effect of protein malnutrition on redox state of the hippocampus of rat. *Brain Res* 2005;1042:17-22.
422. Serrano F, Klann E. Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Res Rev* 2004;3:431-43.
423. Rosić G, Joksimović J, Selaković D, Jakovljević V, Živković V, Srejić I, Djurić M, Djurić D. The beneficial effects of sulfur-containing amino acids on cisplatin-induced cardiotoxicity and neurotoxicity in rodents. *Curr Med Chem* 2018;25(3):391-403.

424. Arent CO, Reus GZ, Abelaira HM, Ribeiro KF, Steckert AV, Mina F, et al. Synergist effects of N-acetylcysteine and deferoxamine treatment on behavioral and oxidative parameters induced by chronic mild stress in rats. *Neurochem Int* 2012;61(7):1072-80.
425. Smaga I, Pomierny B, Krzyzanowska W, Pomierny-Chamiolo L, Miszkiel J, Niedzielska E, et al. N-acetylcysteine possesses antidepressant-like activity through reduction of oxidative stress: behavioral and biochemical analyses in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2012;39(2):280-7.
426. Berk M, Copolov DL, Dean O, Lu K, Jeavons S, Schapkaitz I, et al. N-acetylcysteine for depressive symptoms in bipolar disorder - a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Biol Psychiatry* 2008;64(6):468-75.
427. Magalhaes PV, Dean OM, Bush AI, Copolov DL, Malhi GS, Kohlmann K, et al. N-acetyl cysteine for major depressive episodes in bipolar disorder. *Rev Bras Psiquiatr* 2011;33(4):374-8.
428. Berk M, Dean O, Cotton SM, Gama CS, Kapczinski F, Fernandes BS, et al. The efficacy of N-acetylcysteine as an adjunctive treatment in bipolar depression: an open label trial. *J Affect Disord* 2011;135(1-3):389-94.
429. Magalhaes PV, Dean OM, Bush AI, Copolov DL, Malhi GS, Kohlmann K, et al. N-acetylcysteine add-on treatment for bipolar II disorder: a subgroup analysis of a randomized placebo-controlled trial. *J Affect Disord* 2011;129(1-3):317-20.
430. Peet M, Horrobin DF. A dose-ranging study of the effects of ethyl-eicosapentaenoate in patients with ongoing depression despite apparently adequate treatment with standard drugs. *Arch Gen Psychiatry* 2002;59(10):913-9.
431. Aboul-Fotouh S. Coenzyme Q10 displays antidepressant-like activity with reduction of hippocampal oxidative/nitrosative DNA damage in chronically stressed rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2013;104:105-12.
432. Tasset I, Medina FJ, Pena J, Jimena I, Del Carmen Munoz M, Salcedo M, et al. Olfactory bulbectomy induced oxidative and cell damage in rat: protective effect of melatonin. *Physiol Res* 2010;59(1):105-12.
433. McFarlane SI, Muniyappa R, Francisco R, Sowers JR. Pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(4):1451-58.
434. Ludman A, Venugopal V, Yellon DM, Hausenloy DJ. Statins and cardioprotection-more than just lipid lowering? *Pharmacol Ther* 2009;122(1):30-43.
435. Clarke AT, Johnson PC, Hall GC, Ford I, Mills PR. High dose atorvastatin associated

- with increased risk of significant hepatotoxicity in comparison to simvastatin in UK GPRD cohort. *PLoS One* 2016;11(3):e0151587.
436. Westwood FR, Bigley A, Randall K, Marsden AM, Scott RC. Statin-induced muscle necrosis in the rat: distribution, development, and fibre selectivity. *Toxicol Pathol* 2005;33(2):246-57.
437. Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1986;24(3):525-9.
438. Pitsavos C, Panagiotakos D, Papageorgiou C. Anxiety in relation to inflammation and coagulation markers, among healthy adults: The ATTICA Study. *Atherosclerosis* 2006;320-6.
439. Winer ES, Bryant J, Bartoszek G, Rojas E, Nadorff MR, Kilgore J. Mapping the relationship between anxiety, anhedonia, and depression. *J Affect Disord* 2017;221:289-96.
440. Perla-Kajan J, Twardowski T, Jakubowski H. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids* 2007;32:561-72.
441. Jakubowski H. The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease. *J Physiol Pharmacol* 2008;59(9):155-67.
442. Jakubowski H, Perla-Kaján J, Finnell RH, Cabrera RM, Wang H, Gupta S, et al. Genetic or nutritional disorders in homocysteine or folate metabolism increase protein N-homocysteinylation in mice. *FASEB J* 2009;23:1721-7.
443. Hrnčić D, Rašić-Marković A, Mikić J, Demchuk G, Leković J, Šušić V, et al. Anxiety-related behavior in adult rats after acute homocysteine thiolactone treatment. *Clin Neurophysiol* 2013;124(7):14-5.
444. Ridker PM, Shih J, Cook TJ, et al. Plasma homocysteine concentration, statin therapy, and the risk of first acute coronary events. *Circulation* 2002;105:1776-9.
445. Dierkes J, Luley C, Westphal S. Effect of lipid-lowering and anti-hypertensive drugs on plasma homocysteine levels. *Vasc Health Risk Manag* 2007;3(1):99-108.
446. Jiang S, Chen Q, Venners SA, Zhong G, Hsu YH, Xing H, et al. Effect of simvastatin on plasma homocysteine levels and its modification by MTHFR C677T polymorphism in Chinese patients with primary hyperlipidemia. *Cardiovasc Ther* 2013;31(4):27-33.
447. Clark LT. Treating dyslipidemia with statins: the risk-benefit profile. *Am Heart J* 2003;145:387-96.

448. Can ÖD, Ulupınar E, Özkay ÜD, Yegin B, Öztürk Y. The effect of simvastatin treatment on behavioral parameters, cognitive performance, and hippocampal morphology in rats fed a standard or a high-fat diet. *Behav Pharmacol* 2012;23:582-92.
449. Wang Q, Zengin A, Deng C, Li Y, Newell KA, Yang GY, et al. High dose of simvastatin induces hyperlocomotive and anxiolytic-like activities: The association with the up-regulation of NMDA receptor binding in the rat brain. *Exp Neurol* 2009;216:132-8.
450. Citraro R, Chimirri S, Aiello R, Gallelli L, Trimboli F, Britti D, et al. Protective effects of some statins on epileptogenesis and depressive-like behavior in WAG/Rij rats, a genetic animal model of absence epilepsy. *Epilepsia* 2014;55(8):1284-91.
451. Young-Xu Y, Chan KA, Liao JK, Ravid S, Blatt CM. Long-term statin use and psychological well-being. *J Am Coll Cardiol* 2003;42(4):690-7.
452. Kilic FS, Ozatik Y, Kaygisiz B, Baydemir C, Erol K. Acute antidepressant and anxiolytic effects of simvastatin and its mechanisms in rats. *Neurosciences* 2012;17(1):39-43.
453. Vandresen-Filho S, França LM, Alcantara-Junior J, Nogueira LC, de Brito TM, Lopes L, et al. Statins enhance cognitive performance in object location test in albino Swiss mice: involvement of beta-adrenoceptors. *Physiol Behav* 2015;143:27-34.
454. Ludka FK, Zomkowski AD, Cunha MP, Dal-Cim T, Zeni AL, Rodrigues AL, et al. Acute atorvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in mice via the L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway and increases BDNF levels. *Eur Neuropsychopharmacol* 2013;23(5):400-12.
455. Schlidkraut JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 1965;122(5):509-22.
456. Kolling J, Scherer EB, da Cunha AA, da Cunha MJ, Wyse AT. Homocysteine induces oxidative-nitrative stress in heart of rats: prevention by folic acid. *Cardiovasc Toxicol* 2011;11:67-73.
457. da Cunha MJ, da Cunha AA, Ferreira AG, et al. Physical exercise reverses glutamate uptake and oxidative stress effects of chronic homocysteine administration in the rat. *Int J Dev Neurosci* 2012;30:69-74.
458. Matte C, Mussulini BH, dos Santos TM, et al. Hyperhomocysteinemia reduces glutamate uptake in parietal cortex of rats. *Int J Dev Neurosci* 2010;28:183-7.
459. Perla-Kajan J, Twardowski T, Jakubowski H. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids* 2007;32:561-72.

460. Aparna P, Betigeri AM, Pasupathi P. Homocysteine and oxidative stress markers and inflammation in patients with coronary artery disease. *Int J Biol Med Res* 2010;1:125-9.
461. Streck EL, Vieira PS, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wyse AT. In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. *Metab Brain Dis* 2003;18(2):147-54.
462. Makhro AV, Mashkina AP, Solenaya OA, et al. Prenatal hyperhomocysteinemia as a model of oxidative stress of the brain. *Bull Exp Biol Med* 2008;146:33-5.
463. Jara-Prado A, Ortega-Vazquez A, Martinez-Ruano L, Rios C, Santamaria A. Homocysteine-induced brain lipid peroxidation: effects of NMDA receptor blockade, antioxidant treatment, and nitric oxide synthase inhibition. *Neurotox Res* 2003;5(4):237-43.
464. Murrow JR, Sher S, Ali S, Uphoff I, Patel R, Porkert M, et al. The differential effect of statins on oxidative stress and endothelial function: atorvastatin versus pravastatin. *J Clin Lipidol* 2012;6(1):42-9.
465. Bao XM, Wu CF, Lu GP. Atorvastatin inhibits homocysteine-induced dysfunction and apoptosis in endothelial progenitor cells. *Acta Pharmacol Sin* 2010;31(4):476-84.
466. Bao XM, Wu CF, Lu GP. Atorvastatin attenuates homocysteine-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells via inhibiting NADPH oxidase-related oxidative stress-triggered p38MAPK signaling. *Acta Pharmacol Sin* 2009;30(10):1392-8.
467. Petráš M, Drgová A, Kovalská A, Tatarková Z, Tóthová B, Křižanová O, et al. Effect of Hyperhomocysteinemia on Redox Balance and Redox Defence Enzymes in Ischemia–Reperfusion Injury and/or After Ischemic Preconditioning in Rats. *Cell Mol Neurobiol* 2017;37(8):1417-31.
468. Atmaca M, Tezcan E, Kuloglu M, Ustundag B, Bulut S. Antioxidant enzyme and malondialdehyde values in social phobia before and after citalopram treatment. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2004;254:231-5.
469. Herken H, Akyol O, Yilmaz HR, Tutkun H, Savas HA, Ozen ME, et al. Nitric oxide, adenosine deaminase, xanthine oxidase and superoxide dismutase in patients with panic disorder: alterations by antidepressant treatment. *Hum Psychopharmacol* 2006;2:53-9.
470. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 2007. Oxford University Press, Oxford.
471. Eskiocak S, Gozen AS, Kilic AS, Molla S. Association between mental stress and some antioxidant enzymes of seminal plasma. *Indian J Med Res* 2005;122(6):491-6.

472. Ersan S, Bakir S, Erdal Ersan E, Dogan O. Examination of free radical metabolism and antioxidant defence system elements in patients with obsessive-compulsive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006;30:1039-42.
473. Irie M, Asami S, Nagata S, Ikeda M, Miyata M, Kasai H. Psychosocial factors as a potential trigger of oxidative DNA damage in human leukocytes. *Jpn J Cancer Res* 2001;92:367-76.
474. Chwatko G, Jakubowski H. The determination of homocysteine-thiolactone in human plasma. *Anal Biochem* 2005;337:271-7.
475. Machado FR, Ferreira AG, da Cunha AA, et al. Homocysteine alters glutamate uptake and Na⁺,K⁺-ATPase activity and oxidative status in rats hippocampus: protection by vitamin C. *Metab Brain Dis* 2011; 26:61-7.
476. Christie LA, Riedel G, Algaidi SA, Whalley LJ, Platt B. Enhanced hippocampal long-term potentiation in rats after chronic exposure to homocysteine. *Neurosci Lett* 2005; 373:119-24.
477. Daniels M, Brown DR. Astrocytes regulate N-methyl-D-aspartate receptor subunit composition increasing neuronal sensitivity to excitotoxicity. *J Biol Chem* 2001;276: 22446-52.
478. Maler JM, Seifert W, Huther G, et al. Homocysteine induces cell death of rat astrocytes in vitro. *Neurosci Lett* 2003; 347:85-8.
479. Lehner M, Wislowska-Stanek A, Skorzevska A, et al. Expression of N-methyl-D-aspartate (R)(GluN2B)-subunits in the brain structures of rats selected for low and high anxiety. *J Physiol Pharmacol* 2011;62:473-82.
480. Fields RD, Stevens-Graham B. New insights into neuroglia communication. *Science* 2002;298:556-62.
481. Huang RF, Huang SM, Lin BS, Wei JS, Liu TZ. Homocysteine thiolactone induces apoptotic DNA damage mediated by increased intracellular hydrogen peroxide and caspase 3 activation in HL-60 cells. *Life Sci* 2001;68:2799-811.
482. Bjorkhem I, Meaney S. Brain Cholesterol: Long Secret Life Behind a Barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:806-15.
483. Zhang J, Liu Q. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein Cell* 2015;6(4):254-64.

484. Selley ML. Simvastatin prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine induced striatal dopamine depletion and protein tyrosine nitration in mice. *Brain Res* 2005;1037(1–2):1-6.
485. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Fruchart JC, Tailleux A, Fiévet C, Auwerx J. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors reduce serum triglyceride levels through modulation of apolipoprotein C-III and lipoprotein lipase. *FEBS Lett* 1999;452(3):160-4.
486. Chen L, Haught WH, Yang B, Saldeen TG, Parathasarathy S, Mehta JL. Preservation of endogenous antioxidant activity and inhibition of lipid peroxidation as common mechanisms of antiatherosclerotic effects of vitamin E, lovastatin and amlodipine. *J Am Coll Cardiol* 1997;30:569-75.
487. Hussein O, Schlezinger S, Rosenblat M, Keidar S, Aviram M. Reduced susceptibility of low density lipoprotein (LDL) to lipid peroxidation after fluvastatin therapy is associated with the hypocholesterolemic effect of the drug and its binding to the LDL. *Atherosclerosis* 1997;128:11-8.
488. Wang H, Lynch JR, Song P, Yang HJ, Yates RB, Mace B, et al. Simvastatin and atorvastatin improve behavioral outcome, reduce hippocampal degeneration, and improve cerebral blood flow after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol* 2007;206:59-69.
489. Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, Muller K, Konkol C, Sauer H, et al. Inhibition of geranylgeranylation reduces angiotensin II-mediated free radical production in vascular smooth muscle cells: involvement of angiotensin AT1 receptor expression and Rac1 GTPase. *Mol Pharmacol* 2001;59:646-54.
490. Guasti L, Marino F, Cosentino M, Maio RC, Rasini E, Ferrari M, et al. Prolonged statin-associated reduction in neutrophil reactive oxygen species and angiotensin II type 1 receptor expression: 1-year follow-up. *Eur Heart J* 2008;29:1118-26.
491. Endres M, Laufs U, Liao JK, Moskowitz MA. Targeting eNOS for stroke protection. *Trends Neurosci* 2004;27:283-9.
492. Moro MA, Cardenas A, Hurtado O, Leza JC, Lizasoain I. Role of nitric oxide after brain ischaemia. *Cell Calcium* 2004;36:265-75.
493. Ferreira TS, Lanzetti M, Barroso MV, et al. Oxidative stress and inflammation are differentially affected by atorvastatin, pravastatin, rosuvastatin, and simvastatin on lungs from mice exposed to cigarette smoke. *Inflammation* 2014;37:1355-65.

494. Melo AC, Valenca SS, Gitirana LB, et al. Redox markers and inflammation are differentially affected by atorvastatin, pravastatin or simvastatin administered before endotoxin-induced acute lung injury. *Int Immunopharmacol* 2013;17(1):57-64.
495. Wang XL, Zhang T, Hu LH, Sun SQ, Zhang WF, Sun Z, et al. Comparison of effects of different statins on contrast-induced acute kidney injury in rats: histopathological and biochemical findings. *Oxid Med Cell Longev* 2017; doi:10.1155/2017/6282486.
496. Li J, Sun YM, Wang LF, Li ZQ, Pan W, Cao HY. Comparison of effects of simvastatin versus atorvastatin on oxidative stress in patients with coronary heart disease. *Clin Cardiol* 2010;33:222-7.
497. Lennernas H. Clinical pharmacokinetics of atorvastatin. *Clin Pharmacokinet* 2003;42:1141-60.
498. Garcia MJ, Reinoso RF, Sanchez Navarro A, Prous JR. Clinical pharmacokinetics of statins. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2003;25:457-81.
499. Variya BC, Patel SS, Trivedi JI, et al. Comparative evaluation of HMG CoA reductase inhibitors in experimentally-induced myocardial necrosis: biochemical, morphological and histological studies. *Eur J Pharmacol* 2015;764:283-91.
500. Tunceli K, Sajjan SG, Ramey DR et al. Switching from high-efficacy lipid-lowering therapies to simvastatin and lowdensity lipoprotein cholesterol goal attainment in coronary heart disease/coronary heart disease-equivalent patients. *J Clin Lipidol* 2010;4(6):491-500.
501. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS. Atorvastatin and gemfibrozil metabolites, but not the parent drugs, are potent antioxidants against lipoprotein oxidation. *Atherosclerosis* 1998;138:271-80.
502. Chengfeng S, Wei L, Xinxing W, Lei W, Rui Z, Lingjia Q. Hyperhomocysteinemia is a result, rather than a cause, of depression under chronic stress. *PLoS One*. 2014;doi: 10.1371/journal.pone.0106625.
503. Watanabe H, Suganuma N, Hayashi A, Hirowatari Y, Hirowatari T, Ohsawa M. No relation between folate and homocysteine levels and depression in early pregnant women. *Biosci Trends* 2010;4(6):344-50.
504. Sachdev PS, Parslow RA, Lux O, Salonikas C, Wen W, Naidoo D, et al. Relationship of homocysteine, folic acid and vitamin B12 with depression in a middle-aged community sample. *Psychol Med* 2005;35:529-38.

505. Ramos MI, Allen LH, Haan MN, Green R, Miller JW. Plasma folate concentrations are associated with depressive symptoms in elderly Latina women despite folic acid fortification. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1024-8.
506. Lu SC. S-Adenosylmethionine. *Int J Biochem Cell Biol* 2000;32:391-5.
507. Villalobos MA, De La Cruz JP, Cuerda MA, Ortiz P, Smith-Agreda JM, Sanchez DLS. Effect of S-adenosyl-L-methionine on rat brain oxidative stress damage in a combined model of permanent focal ischemia and global ischemia-reperfusion. *Brain Res* 2000; 883:31-40.
508. Brunoni AR, Lopes M, Fregni F. A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression. *Int J Neuropsychopharmacol* 2008;11(8):1169-80.
509. Lee BH, Kim YK. The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment. *Psychiatry Investig* 2010;7(4):231-5.
510. Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, et al. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry* 2003;54(1):70-5.
511. Sen S, Duman R, Sanacora G. Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications. *Biol Psychiatry* 2008;64(6):527-32.
512. Gao L, Zeng XN, Guo HM, Wu XM, Chen HJ, Di RK, et al. Cognitive and neurochemical alterations in hyperhomocysteinemic rat. *Neurol Sci* 2012;(1):39-43.
513. Wei H, Xu J, Li M, Tang J, Zou W, Zhang P, et al. Hydrogen sulfide inhibits homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and neuronal apoptosis in rat hippocampus via upregulation of the BDNF-TrkB pathway. *Acta Pharmacologica Sinica* 2014;35:707-15.
514. Matté C, Pereira LO, Dos Santos TM, Mackedanz V, Cunha AA, Netto CA, et al. Acute homocysteine administration impairs memory consolidation on inhibitory avoidance task and decreases hippocampal brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity: prevention by folic acid treatment. *Neuroscience* 2009;163(4):1039-45.
515. Kapczinski F, Frey BN, Andreazza AC, Kauer-Sant'Anna M, Cunha AB, Post RM. Increased oxidative stress as a mechanism for decreased BDNF levels in acute manic episodes. *Rev Bras Psiquiatr* 2008;30(3):243-5.

516. Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. The interplay between oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor modulates the outcome of a saturated fat diet on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci* 2004;19(7):1699-707.
517. Szasz BK, Mike A, Karoly R, Gerevich Z, Illes P, Vizi ES, et al. Direct inhibitory effect of fluoxetine on N-methyl-D-aspartate receptors in the central nervous system. *Biol Psychiatry* 2007;62(11):1303-9.
518. Mayer A, Szasz BK, Kiss JP. Inhibitory effect of antidepressants on the NMDA-evoked [(3)H]noradrenaline release from rat hippocampal slices. *Neurochem Int* 2009;55(6):383-8.
519. Pittenger C, Sanacora G, Krystal JH. The NMDA receptor as a therapeutic target in major depressive disorder. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2007;6(2):101-15.
520. Bermudo-Soriano RC, Perez-Rodriguez MM, Vaquero-Lorenzo C, Baca-Garcia E. New perspectives in glutamate and anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 2012;100(4):752-74.
521. Skolnick P, Popik P, Trullas R. Glutamate-based antidepressants 20 years on. *Trends Pharmacol Sci* 2009;30(11):563-9.
522. Lin PY, Chang AY, Lin TK. Simvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in rats exposed to chronic mild stress. *Pharmacol Biochem Behav* 2014;124:174-9.
523. El Batsh MM. Antidepressant-like effect of simvastatin in diabetic rats. *Can J Physiol* 2015;93(8):649-56.
524. Anupama MG, Shrishail VH, Shashikant T. Evaluation of antidepressant activity of simvastatin, lovastatin and atorvastatin in male swiss mice - an experimental study. *Int J Drug Dev Res* 2013;5(2):102-8.
525. Wang Q, Ting WL, Yang H, Wong PT. High doses of simvastatin upregulate dopamine D1 and D2 receptor expression in the rat prefrontal cortex: possible involvement of endothelial nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 2005;144:933-9.
526. Zeevalk GD, Manzino L, Sonsalla PK. NMDA receptors modulate dopamine loss due to energy impairment in the substantia nigra but not striatum. *Exp Neurol* 2000; 161:638-46.
527. Arai A, Kannari K, Shen H, Maeda T, Suda T, Matsunaga M. Amantadine increases L-DOPA-derived extracellular dopamine in the striatum of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Brain Res* 2003;972:229-34.
528. Castro AA, Wiemes BP, Matheus FC, Lapa FR, Viola GG, Santos AR, Tasca CI, Prediger RD. Atorvastatin improves cognitive, emotional and motor impairments induced by

- intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats, an experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res* 2013;1513:103-16.
529. Neurauter G, Wirleitner B, Laich A, Schennach H, Weiss G, Fuchs D. Atorvastatin suppresses interferon-gamma-induced neopterin formation and tryptophan degradation in human peripheral blood mononuclear cells and in monocytic cell lines. *Clin Exp Immunol* 2003;131:264-7.
530. Widner B, Laich A, Sperner-Unterweger B, Ledochowski M, Fuchs D. Neopterin production, tryptophan degradation and mental depression-what is the link? *Brain Behav Immun* 2002;16:590-5.
531. Wirleitner B, Sperner-Unterweger B, Fuchs D. Statins to reduce risk of depression. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:1132.
532. Feng L, Tan CH, Merchant RA, Ng TP. Association between depressive symptoms and use of HMG-CoA reductase inhibitors (statins), corticosteroids and histamine H2 receptor antagonists in community-dwelling older persons: Cross-sectional analysis of a population-based cohort. *Drugs Aging* 2008;25:795-805.
533. Stafford L, Berk M. The use of statins after a cardiac intervention is associated with reduced risk of subsequent depression: Proof of concept for the inflammatory and oxidative hypotheses of depression? *J Clin Psychiatry* 2011;72:1229-35.
534. Parsaik AK, Singh B, Hassan MM, Singh K, Mascarenhas SS, Williams MD, et al. Statins use and risk of depression: A systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord* 2014;160:62-7.
535. Kim JM, Stewart R, Kang HJ, Bae KY, Kim SW, Shin IS, et al. A prospective study of statin use and poststroke depression. *J Clin Psychopharmacol* 2014;34:72-9.
536. Chuang CS, Yang TY, Muo CH, Su HL, Sung FC, Kao CH. Hyperlipidemia, statin use and the risk of developing depression: A nationwide retrospective cohort study. *Gen Hosp Psychiatry* 2014;36:497-501.
537. Agostini JV, Tinetti ME, Han L, McAvay G, Foody JM, Concato J. Effects of statin use on muscle strength, cognition and depressive symptoms in older adults. *J Am Geriatr Soc* 2007;55:420-5.
538. Feng L, Yap KB, Kua EH, Ng TP. Statin use and depressive symptoms in a prospective study of community-living older persons. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2010;19:942-8.

539. Abelaira HM, Reus GZ, Ribeiro KF, Steckert AV, Mina F, Rosa DV, et al. Effects of lamotrigine on behavior, oxidative parameters and signaling cascades in rats exposed to the chronic mild stress model. *Neurosci Res* 2013;75(4):324-30.
540. Aboul-Fotouh S. Coenzyme Q10 displays antidepressant-like activity with reduction of hippocampal oxidative/nitrosative DNA damage in chronically stressed rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2013;104:105-12.
541. Kumar B, Kuhad A, Chopra K. Neuropsychopharmacological effect of sesamol in unpredictable chronic mild stress model of depression: behavioral and biochemical evidences. *Psychopharmacology (Berl)* 2011;214(4):819-28.
542. Schaalán MF, Nassar NN. Effects of octreotide in chronically mild stressed rats: possible role of immune and oxidative stress pathways. *Neurochem Res* 2011;36(10):1717-23.
543. Tasset I, Pena J, Jimena I, Feijoo M, Del Carmen Munoz M, Montilla P, et al. Effect of 17beta-estradiol on olfactory bulbectomy-induced oxidative stress and behavioral changes in rats. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2008;4(2):441-9.
544. Tasset I, Drucker-Colin R, Pena J, Jimena I, Montilla P, Medina FJ, et al. Antioxidant-like effects and protective action of transcranial magnetic stimulation in depression caused by olfactory bulbectomy. *Neurochem Res* 2010;35(8):1182-7.
545. Zafir A, Banu N. Antioxidant potential of fluoxetine in comparison to *Curcuma longa* in restraint-stressed rats. *Eur J Pharmacol* 2007;572(1):23-31.
546. Zafir A, Banu N. Modulation of in vivo oxidative status by exogenous cortico-sterone and restraint stress in rats. *Stress* 2009;12(2):167-77.
547. Bouffleur N, Antoniazzi CT, Pase CS, Benvegno DM, Dias VT, Segat HJ, et al. Neonatal handling prevents anxiety-like symptoms in rats exposed to chronic mild stress: behavioral and oxidative parameters. *Stress* 2013;16(3):321-30.
548. Khanzode SD, Dakhale GN, Khanzode SS, Saoji A, Palasodkar R. Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors. *Redox Rep* 2003;8(6):365-70.
549. Andreatza AC, Cassini C, Rosa AR, Leite MC, de Almeida LM, Nardin P, et al. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. *J Psychiatr Res* 2007;41(6):523-9.
550. Galecki P, Szemraj J, Bienkiewicz M, Florkowski A, Galecka E. Lipid peroxidation and antioxidant protection in patients during acute depressive episodes and in remission after fluoxetine treatment. *Pharmacol Rep* 2009;61(3):436-47.

551. Chung CP, Schmidt D, Stein CM, Morrow JD, Salomon RM. Increased oxidative stress in patients with depression and its relationship to treatment. *Psychiatry Res* 2013;206(2-3):213-6.
552. Milaneschi Y, Cesari M, Simonsick EM, Vogelzangs N, Kanaya AM, Yaffe K, et al. Lipid peroxidation and depressed mood in community-dwelling older men and women. *PLOS ONE* 2013;8(6):e65406.
553. Yager S, Forlenza MJ, Miller GE. Depression and oxidative damage to lipids. *Psychoneuroendocrinology* 2010;35(9):1356-62.
554. Dimopoulos N, Piperi C, Psarra V, Lea RW, Kalofoutis A. Increased plasma levels of 8-iso-PGF₂alpha and IL-6 in an elderly population with depression. *Psychiatry Res* 2008;161(1):59-66.
555. Forlenza MJ, Miller GE. Increased serum levels of 8-hydroxy-20-deoxyguanosine in clinical depression. *Psychosom Med* 2006;68(1):1-7.
556. Irie M, Miyata M, Kasai H. Depression and possible cancer risk due to oxidative DNA damage. *J Psychiatr Res* 2005;39(6):553-60.
557. Selek S, Savas HA, Gergerlioglu HS, Bulbul F, Uz E, Yumru M. The course of nitric oxide and superoxide dismutase during treatment of bipolar depressive episode. *J Affect Disord* 2008;107(1-3):89-94.
558. Herken H, Gurel A, Selek S, Armutcu F, Ozen ME, Bulut M, et al. Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, and xanthine oxidase in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. *Arch Med Res* 2007;38(2):247-52.
559. Wei YC, Zhou FL, He DL, Bai JR, Hui LY, Wang XY, et al. The level of oxidative stress and the expression of genes involved in DNA-damage signaling pathways in depressive patients with colorectal carcinoma. *J Psychosom Res* 2009;66(3):259-66.
560. Ozcan ME, Gulec M, Ozerol E, Polat R, Akyol O. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. *Int Clin Psychopharmacol* 2004;19(2):89-95.
561. Bilici M, Efe H, Koroglu MA, Uydu HA, Bekaroglu M, Deger O. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *J Affect Disord* 2001;64(1):43-51.
562. Burnstock G. Release of vasoactive substances from endothelial cells by shear stress and purinergic mechanosensory transduction. *J Anat* 1999;194:335-42.

563. Joseph EK, Green PG, Bogen O, Alvarez P, Levine JD. Vascular endothelial cells mediate mechanical stimulation-induced enhancement of endothelin hyperalgesia via activation of P2X2/3 receptors on nociceptors. *J Neurosci* 2013;33:2849-59.
564. Bellamy MF, McDowell IF, Ramsey MW, Brownlee M, Bones C, Newcombe RG, Lewis MJ. Hyperhomocysteinemia after an oral methionine load acutely impairs endothelial function in healthy adults. *Circulation* 1998;98:1848-52.
565. Chao CL, Kuo TL, Lee YT. Effects of methionine-induced hyperhomocysteinemia on endothelium-dependent vasodilation and oxidative status in healthy adults. *Circulation*. 2000;101:485-90.
566. Upchurch GRJ, Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine, EDRF, and endothelial function. *J Nutr* 1996;126:1290S-1294S.
567. De Vriese AS, Blom HJ, Heil SG, Mortier S, Kluijtmans LA, Van de Voorde J, Lameire NH. Endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated renal vasodilatory response is impaired during acute and chronic hyperhomocysteinemia. *Circulation* 2004;109:2331-6.
568. Sharma S, Singh M, Sharma PL. Mechanism of hyperhomocysteinemia-induced vascular endothelium dysfunction - possible dysregulation of phosphatidylinositol-3-kinase and its downstream phosphoinositide dependent kinase and protein kinase B. *Eur J Pharmacol* 2013;721:365-72.
569. Joseph EK, Green PG, Ferrari LF, Levine JD. Homocysteine-induced attenuation of vascular endothelium-dependent hyperalgesia in the rat. *Neuroscience* 2015;284:678-84.
570. Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J, Sanchez-Pascuala R, Hernandez G, Diaz C, et al. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1998;101:2711-9.
571. Millecamps M, Laferriere A, Ragavendran JV, Stone LS, Coderre TJ. Role of peripheral endothelin receptors in an animal model of complex regional pain syndrome type 1 (CRPS-I). *Pain* 2010;151:174-83.

СКРАЋЕНИЦЕ

Hcy - Хомоцистеин

Met - Метионин

SAM - S-аденозил метионин

MAT - Метионин-аденозил трансфераза

ATP - Аденозин-трифосфат

DNK – дезоксирибонуклеинска киселина

MT - Метил трансфераза

PEMT - фосфатидил еаноламин-N-метил-трансфераза

GAMT - гванидин ацетат-N-метил-трансфераза

GNMT - глицин N-метил-трансфераза

SAH - S-аденозил хомоцистеин

MTHFR – метилен- тетраhydro-фолат редуктаза

THF – тетраhydroфолат

NADPH - никотин-амид-динуклеотид-фосфат

BHMT – бетаин-хомоцистеин метил-трансфераза

Ser - серин

CBS - цистатион- β -синтетаза

B6 - пиридоксин

CSE - цистатионин- γ -лиаза

GSH – глутатион

ЦСТ - цереброспинална течност

tHcy - укупни хомоцистеин

hHcy - хиперхомоцистеинемичја

MS – метионин синтетаза

КВБ - кардиоваскуларне болести

ХББ - хронична бубрежна болест

NMDA – N-метил-D-аспартат

ROS - реактивне кисеоничне врсте

RNS - реактивне азотне врсте

SOD - супероксид дисмутаза

CAT - каталаза

GPx - глутатион пероксидаза - GPx

GSR - глутатион редуктаза

GSSH - глутатион дисулфид

ЦНС - централни нервни систем

LTP - дуготрајна потенцијација

PD - панични поремећај

PTSD - посттрауматски стрес поремећај

OCD - опсесивно-компулзивни поремећај

GAD - генерализовани анксиозни поремећај

GABA - гама-амино бутерна киселина

CRF - фактор за ослобађање кортикотропина

BDNF - неуротрофини фактор пореклом из мозга

PACAP - хипофизни аденилат циклаза-активишући полипептид

HPA осовина - хипоталамо-хипофизно-адренална осовина

CMS - хронични благи стрес

CUMS - хронични благи непредвидиви стрес

ОП тест - тест отвореног поља

УПП - укупни пређени пут

ВК - време кретања

ПБК - просечна брзина кретања

БУЦЗ - број улазака у централну зону

УВЦЗ - укупно време проведено у централној зони

БУ - број усправљања

УКЛ - тест уздигнутог крстатог лавиринта

БУОК – број улазака у отворене краке

УВПОК – укупно време проведено у отвореним крацима

БН – број нагињања

УЕА – број епизода укупне експлоративне активности

ТКР – тест качења за реп

ВППИ – време до појаве прве имобилности

БЕИ – број епизода имобилности

УТИ – укупно трајање имобилности

ПТЕИ – просечно трајање епизода имобилности

ВП – тест вруће плоче

ВР – време до реакције

PBS – раствор фосфатног пуфера

ТВА – тиобарбитурна киселина

MDA – малондиалдехид

НМGSо-А – хидрокси-метил-глутарил-коензим А

AST - аспартат аминотрансфераза

ALT – аланин аминотрансфераза

СК – креатин киназа

НАС – N-ацетилцистеин

SVA – симвастатин хидрокси киселина

БИОГРАФИЈА

Наташа Р. Мијаиловић је рођена 03. 11. 1978. године у Приштини, Република Србија. Медицински факултет у Крагујевцу уписала је школске 1997/1998. године, а звање доктора медицине стекла је 14. 03. 2008. године. Факултет је завршила са просечном оценом 9,06. Након завршених студија обавила је обавезан приправнички стаж и положила стручни испит 2009. године. Докторске академске студије на Медицинском факултету у Крагујевцу је уписала школске 2009/2010. године – изборно подручје Молекулска медицина, подмодул Клиничка и експериментална фармакологија. Положила је све испите предвиђене студијским планом и програмом. Усмени докторски испит положила је 04. 05. 2012. године са оценом 9 (девет). Године 2011. изабрана је за сарадника у настави за ужу научну област Физичка хемија на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. У изборном периоду активно је учествовала у извођењу наставе на предмету Увод у фармацеутску праксу са физиком, а од школске 2012/2013. године учествује у извођењу наставе на предмету Молекуларна фармакологија. Од септембра 2014. изабрана је у звање асистента за ужу научну област Физичка хемија. Активно учествује у извођењу наставе на предмету Основи физичке хемије. Аутор је у две публикације категорије М23 (први аутор у једној публикацији), у једној публикацији категорије М51 (први аутор) и у једној публикацији категорије М53 (први аутор).

БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Mijailović N**, Selaković D, Joksimović J, Mihailović V, Katanić J, Jakovljević V, Nikolić T, Bolevich S, Živković V, Pantić M, Rosić G. The anxiolytic effects of atorvastatin and simvastatin on dietary-induced increase in homocysteine levels in rats. *Mol Cell Biochem.* 2018. doi: 10.1007/s11010-018-3425-6. **M23**
2. **Mijailović N**, Selaković D, Joksimović J, Jakovljević V, Nikolić T, Rosić G. The effects of methionine-enriched and vitamin (folate, pyridoxine and cobalamine) deficient diets on exploratory activity in rats - a brief report. *Ser J Exp Clin Res.* 2017;18(4):307-12. **M51**
3. Janković SM, Aleksić D, Bahtijari Z, Jelić A, Klačar J, Kovačević A, **Mijailović N**, Milovanović O, Petrović A, Radovanović A, Sovrlić M, Ružić Zečević D. Risk factors for severe dental anxiety among students of a medical faculty. *Vojnosanit Pregl.* 2014;71(1):16-21. **M23**

8. ПРИЛОГ

8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број - РБ:

Идентификациони број - ИБР:

Тип документације - ТД: Монографска публикација

Тип записа - ТЗ: Текстуални штампани материјал

Врста рада - ВР: Докторска дисертација

Аутор - АУ: Наташа Мијаиловић

Ментор/коментор - МН: др сци.мед. Гвозден Росић, редовни професор

Наслов рада - НР: Бихевиорални ефекти дуготрајне примене дијететских протокола са повећаним садржајем метионина и недостатком фолата, пиридоксина и кобаламина код пацова

Језик публикације - ЈП: српски/ћирилица

Језик извода - ЈИ: српски/енглески

Земља публикавања - ЗП: Република Србија

Уже географско подручје - УГП: Централна Србија

Година - ГО: 2019. година

Издавач - ИЗ: Ауторски репринт

Место и адреса - МС: 34 000 Крагујевац, Светозара Марковића 69, Република Србија

Физичи опис рада - ФО: 222 страна, 42 слике

Научна област - УДК: Медицина

Научна дисциплина - ДИ: Физиологија

Предметна одредница/ кључне речи - ПО: хомоцистеин, аторвастатин, симвастатин, анксиозност, депресија, оксидативни стрес

Чува се - ЧУ: У библиотеци Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

Важна напомена- МН:

Извод - ИД:

Увод: У овој студији су испитивани бихевиорални ефекти дуготрајне примене дијететских протокола са повећаним садржајем метионина и недостатком фолата, пиридоксина и кобаламина, као и утицај примене статина уз наведене дијететске протоколе код пацова.

Материјал и методе: Студија је спроведена на 72 пацова Wistar albino соја, старости четири недеље, телесне масе 100 ± 15 g, подељених у 9 група, на основу примењених дијететских протокола - стандардна храна, храна са повећаним садржајем метионина, храна са повећаним садржајем метионина и смањеним садржајем фолата, пиридоксина и кобаламина. У одговарајућим групама уз наведене протоколе, аплицирани су статини - аторвастатин (3 mg/kg) или симвастатин (5 mg/kg). Протоколи су трајали 30 дана, након чега су вршени бихевиорални тестови, а након тога су животиње жртвоване у циљу добијања узорака за анализу параметара оксидативног статуса у ткиву хипокампуса.

Резултати: Резултати бихевиоралног испитивања су показали да примењени дијететски протоколи са повећаним садржајем метионина, као и са повећаним садржајем метионина и недостатком витамина В комплекса (B_6 , B_9 , B_{12}) доводе до испољавања анксиогеног и продепресантног ефекта. Истовремена примена статина уз наведене протоколе је ублажавала негативне бихевиоралне ефекте дијететских режима. Параметри за процену оксидативног стреса у хипокампусу су потврђивали оксидативно оштећење узроковано дијететским протоколима, док је симултана примена статина смањивала оксидативно оштећење хипокампалног ткива.

Закључак: Хронична примена дијете са повећаним садржајем метионина, као и са повећаним садржајем метионина уз недостатак витамина В комплекса (B_6 , B_9 , B_{12}) је довела до испољавања анксиогеног и продепресантног ефекта, уз истовремено повећање оксидативног оштећења у ткиву хипокампуса. Истовремена примена статина (аторвастатин и симвастатин) спровођена уз дијететски протокол са повећаним уносом метионина, као и уз додатни недостатак витамина В комплекса, је ублажавала негативне бихевиоралне ефекте изазване дијететским протоколима, уз смањење степена оксидативног оштећења ткива хипокампуса.

Кључне речи: хомоцистеин, аторвастатин, симвастатин, анксиозност, депресија, оксидативни стрес

Датум прихватања теме од стране ННВ - ДП: 12.07.2017.

Датум одбране - ДО:

Чланови комисије - КО:

1. Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, председник;
2. Проф. др Душан Митровић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, члан;
3. Доц. др Драгица Селаковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, члан;
4. Доц. др Владимир Михаиловић, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, члан;
5. Доц. др Јанко Самарцић, доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду, члан.

KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC

FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

Accession number - ANO:

Identification number - INO:

Documentation type - DT: Monographic publication

Type of record - TR: Textual printed material

Contents code - CC: Ph. D. Thesis

Author - AU: Nataša Mijailović

Menthor/co-mentor - MN: Full professor Gvozden Rosić, M.D.Ph.D.

Title - TI: Behavioral effects of long-term application of dietary protocols enriched with methionine and deficient in folate, pyridoxine and cobalamine in rats

Language of text - LT: Serbian/Cyrillic

Language of abstract: Serbian/English

Country of publication - CP: Republic of Serbia

Locality of publication - LP: Central Serbia

Publication year - PY: 2019

Publisher - PU: Author reprint

Publication place - PP: 34 000 Kragujevac, Svetozara Markovića 69, Republic of Serbia

Physical description - PD: 222 pages, 42 figures

Scientific field - SF: Medicine

Scientific discipline - SD: Physiology

Subject/key words - SKW: homocysteine, atorvastatin, simvastatin, anxiety, depression, oxidative stress

UDC

Holding data: Library of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Republic of Serbia

Note - N:

ABSTRACT - AB

Introduction: The aim of this study was to evaluate behavioral effects of special dietary protocols enriched with methionine and deficient in folate, pyridoxine and cobalamine in rats. The effects of statins, simultaneously applied with special dietary protocols, were also investigated in this study.

Material and methods: The investigation was performed on 72 male Wistar albino rats, 4 weeks old, 100 ± 15 g body weight. They were divided (eight per group) according to the basic dietary protocols: standard chow, methionine-enriched, and methionine-enriched vitamins B (B_6 , B_9 , B_{12}) deficient diet. Each dietary protocol included groups with atorvastatin (3 mg/kg/day) and simvastatin (5 mg/kg/day). Applied dietary protocols lasted for 30 days. Behavioral testing was performed following completion of dietary pretreatment and parameters of oxidative stress were determined in hippocampal tissue samples following decapitation after anesthesia.

Results: The results of behavioral testing showed that methionine-load dietary protocols, as well as methionine-enriched diet with restricted vitamins B intake, induced anxiogenic and prodepressant effects. Simultaneous administration of statins attenuated negative behavioral effects of both applied dietary protocols. Parameters for oxidative stress estimation confirmed oxidative damage in rat hippocampus, while simultaneous application of statins attenuated oxidative damage caused by applied dietary protocols.

Conclusion: Chronic dietary interventions enriched with methionine and deficient in folate, pyridoxine and cobalamine induced anxiogenic and prodepressant effects, which were accompanied by increased oxidative stress in rat hippocampus. Simultaneous administration of statins with methionine overloading dietary protocols showed beneficial effects by means of attenuation of both negative behavioral effects and parameters of oxidative stress in hippocampal tissue.

Key words: homocysteine, atorvastatin, simvastatin, anxiety, depression, oxidative stress

Accepted by the Scientific Board on - ASB: 12th July 2017.

Defended on - DE:

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

1. Full Professor Vladimir Jakovljević, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, chairman;
2. Full Professor Dušan Mitrović, M.D, Ph.D, Faculty of Medicine, University of Belgrade, member;
3. Assistant Professor Dragica Selaković, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member;
4. Assistant Professor Vladimir Mihailović, Ph.D, Faculty of Science, University of Kragujevac, member;
5. Assistant Professor Janko Samardžić, M.D, Ph.D, Faculty of Medicine, University of Belgrade, member.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Наташа Мијаиловић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

«БИХЕВИОРАЛНИ ЕФЕКТИ ДУГОТРАЈНЕ ПРИМЕНЕ ДИЈЕТЕТСКИХ
ПРОТОКОЛА СА ПОВЕЋАНИМ САДРЖАЈЕМ МЕТИОНИНА И НЕДОСТАТКОМ
ФОЛАТА, ПИРИДОКСИНА И КОБАЛАМИНА КОД ПАЦОВА»

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког
рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 30.01.2019. године,

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Наташа Мијаиловић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

«БИХЕВИОРАЛНИ ЕФЕКТИ ДУГОТРАЈНЕ ПРИМЕНЕ ДИЈЕТЕТСКИХ
ПРОТОКОЛА СА ПОВЕЋАНИМ САДРЖАЈЕМ МЕТИОНИНА И НЕДОСТАТКОМ
ФОЛАТА, ПИРИДОКСИНА И КОБАЛАМИНА КОД ПАЦОВА»

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 30.01.2019. године,

потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>

Радови који су били услов за пријаву завршене докторске дисертације

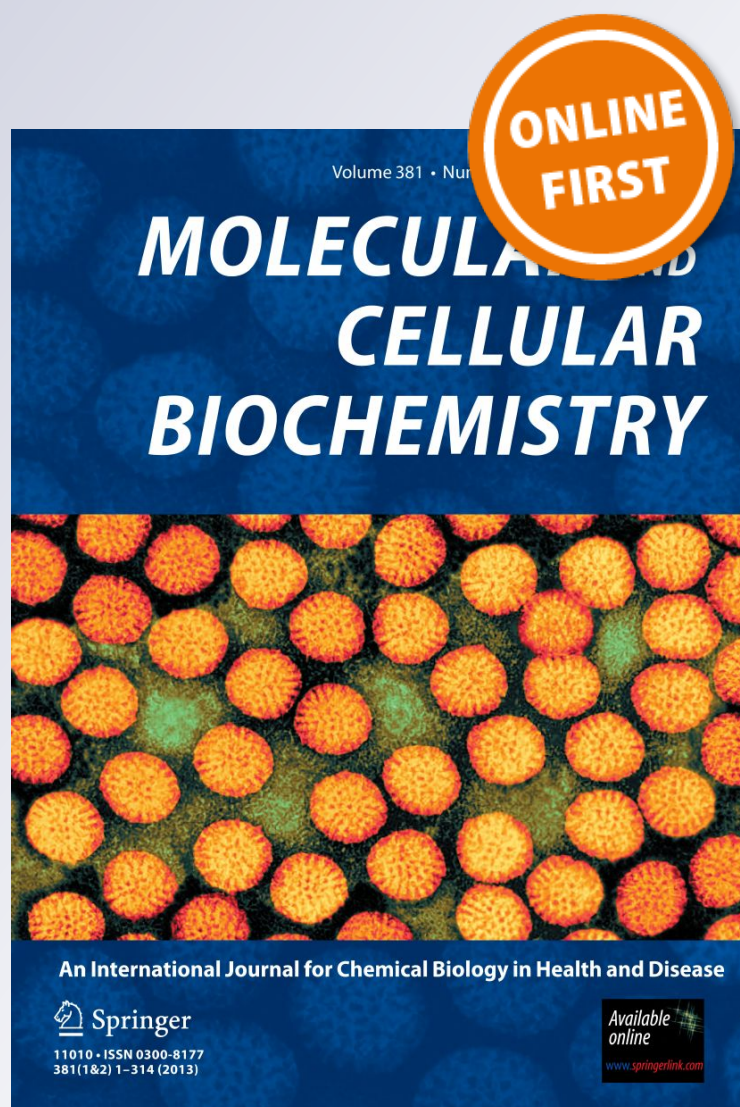
The anxiolytic effects of atorvastatin and simvastatin on dietary-induced increase in homocysteine levels in rats

Natasa Mijailovic, Dragica Selakovic, Jovana Joksimovic, Vladimir Mihailovic, Jelena Katanic, Vladimir Jakovljevic, et al.

Molecular and Cellular Biochemistry
An International Journal for Chemical
Biology in Health and Disease

ISSN 0300-8177


Mol Cell Biochem
DOI 10.1007/s11010-018-3425-6



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".



The anxiolytic effects of atorvastatin and simvastatin on dietary-induced increase in homocysteine levels in rats

Natasa Mijailovic¹ · Dragica Selakovic¹ · Jovana Joksimovic¹ · Vladimir Mihailovic² · Jelena Katanic² · Vladimir Jakovljevic^{1,3}  · Tamara Nikolic¹ · Sergey Bolevich³ · Vladimir Zivkovic¹ · Milica Pantic¹ · Gvozden Rosic¹

Received: 18 February 2018 / Accepted: 14 August 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of atorvastatin and simvastatin on behavioral manifestations that followed hyperhomocysteinemia induced by special dietary protocols enriched in methionine and deficient in B vitamins (B6, B9, B12) by means of alterations in anxiety levels in rats. Simultaneously, we investigated the alterations of oxidative stress markers in rat hippocampus induced by applied dietary protocols. Furthermore, considering the well-known antioxidant properties of statins, we attempted to assess their impact on major markers of oxidative stress and their possible beneficial role on anxiety-like behavior effect in rats. The 4-week-old male Wistar albino rats were divided (eight per group) according to basic dietary protocols: standard chow, methionine-enriched, and methionine-enriched vitamins B (B6, B9, B12) deficient. Each dietary protocol (30 days) included groups with atorvastatin (3 mg/kg/day i.p.) and simvastatin (5 mg/kg/day i.p.). The behavioral testing was performed in the open field and elevated plus maze tests. Parameters of oxidative stress (index of lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase activity, glutathione) were determined in hippocampal tissue samples following decapitation after anesthesia. Methionine-load dietary protocols induced increased oxidative stress in rat hippocampus, which was accompanied by anxiogenic behavioral manifestations. The methionine-enriched diet with restricted vitamins B intake induced more pronounced anxiogenic effect, as well as increased oxidative stress compared to the methionine-load diet with normal vitamins B content. Simultaneous administration of statins showed beneficial effects by means of both decreased parameters of oxidative stress and attenuation of anxiety. The results obtained with simvastatin were more convincing compared to atorvastatin.

Keywords Homocysteine · Atorvastatin · Simvastatin · Anxiety · Oxidative stress · Rats

Abbreviations

Met	Methionine	SH	Sulfhydryl
SAM	S-adenosylmethionine	SOD	Superoxide dismutase
SAH	S-adenosylhomocysteine	CAT	Catalase
Hcy	Homocysteine	OF	Open field
MS	Methionine synthase	EPM	Elevated plus maze
GSH	Glutathione	TBARS	Thiobarbituric acid reactive substance
		MDA	Malondialdehyde

✉ Vladimir Jakovljevic
drvladakgbg@yahoo.com

¹ Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Kragujevac 34000, Serbia

² Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovica 12, Kragujevac 34000, Serbia

³ Department of Human Pathology, 1st Moscow State Medical University IM Sechenov, Moscow, Russia

Introduction

Methionine (Met) is essential, sulfur-containing amino-acid that has an important role in one-carbon metabolism. Methionine is converted to its active form, S-adenosylmethionine (SAM), the major donor of methyl-group in the numerous intracellular transmethylation reactions. SAM is converted to S-adenosylhomocysteine (SAH), which is intermediate of all transmethylation reactions. SAH is hydrolyzed

by a reversible enzyme SAH-hydrolase to homocysteine (Hcy) and adenosine [1]. Homocysteine is sulphurated, non-proteinogenic amino acid exclusively derived from ingested methionine in the reaction of demethylation. Homocysteine–methionine cycle plays a crucial role in maintaining the biochemical balance by methylation reactions within the central nervous system [2]. Hcy is normally metabolized via two biochemical pathways—remethylation, which converts Hcy back to methionine and transsulfuration that result in the conversion of Hcy to cysteine and taurine, with a notable role of B complex vitamins (B6, B9, B12). Under normal conditions, Hcy levels are maintained in a narrow range (5–15 μM) as a result of a balance between remethylation and transsulfuration processes [3].

However, Hcy metabolism in the brain is significantly different compared to other organs and tissues, resembling the folate/B12 remethylation pathway as the exclusive mechanism for maintaining normal levels of Hcy in the brain. Therefore, the lack of important enzymes involved in Hcy metabolism may explain the higher vulnerability of CNS to the increased Hcy levels [4]. In addition, the methylation reactions that are required for the proper synthesis of serotonin, other monoamine neurotransmitters and catecholamines [5], which play an important role in normal brain functioning and mood regulation, are largely relying on B vitamins as necessary cofactors in these reactions [6].

Dysregulation of Hcy metabolism is implicated in a number of adverse clinical outcomes. Numerous epidemiological studies have confirmed that hyperhomocysteinemia represents a risk factor for various disorders affecting CNS, such as neurological cognitive deficit [7], mental retardation [8], demyelination [9], Alzheimer's disease [10], Parkinson's disease [11], and stroke [12]. There is a growing interest in the causative relationship between impaired Hcy metabolism and psychiatric disorders [13, 14]. Several studies confirmed that elevated Hcy levels have been present in patients with major depression [15, 16]. Hyperhomocysteinemia, vitamin B12 deficiency, and folate deficiency are significantly related to depressive disorders [17]. Besides the role in depressive disorders, the effect of impaired one-carbon metabolism on anxiety disorders has been established in several studies [18], especially in obsessive–compulsive disorder [19, 20]. Animal studies have also confirmed the role of Hcy and folate metabolism in the supply of methyl groups and regulation of the biochemical pathways for methylation processes [21, 22].

The toxicity of Hcy on neuronal cells has been the focus of many investigations in past years [23, 24]. The underlying mechanisms of Hcy toxicity on brain tissue have not yet been completely clarified. One of the suggested mechanisms of neurotoxicity caused by hyperhomocysteinemia is increased oxidative damage [25, 26]. The brain tissue is more vulnerable to oxidative stress due to its modest antioxidative defense

compared to other organs and high oxygen utilization, that is necessary for normal brain functioning and, therefore, represents a source of free radical by-products [27]. In addition, the metabolism of catecholamines, neurotransmitters that are released in anxiety disorders, also represents an important source of free radicals in the brain [28]. Lipid-rich brain constitution also favors lipid peroxidation in the presence of oxidative imbalance [29]. As a result, oxidative stress may alter neurotransmission, neuronal function, and overall brain activity [30].

The role of oxidative stress as a possible pathogenic mechanism underlying psychiatric disorders, including anxiety, has been intensively studied in past years. Oxidative pathophysiology in psychiatric disorders is strongly supported by numerous human studies. The results of these studies confirmed alterations in antioxidant enzyme activities [31, 32] and decreased levels of non-enzymatic antioxidants such as vitamins C and E, glutathione (GSH), and specific antioxidant components such as free sulfhydryl (SH) groups, uric acid, and bilirubin [33, 34]. Still, it has been reported that antioxidant status was not diminished in patients with Parkinson's disease and obsessive–compulsive disorder [35, 36]. Increased lipid peroxidation (the most studied marker of oxidative stress in psychiatric disorders) has been consistently reported in numerous clinical trials [37, 38]. It has been shown that methionine-enriched diet leads to the development of hyperhomocysteinemia. The alterations in oxidative status observed in those studies included modifications in the lipid peroxidation, superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) activity, as well as GSH content. Both of these studies confirmed that hyperhomocysteinemia induced by methionine nutritional overload increased anxiety-related behavior in rats [39, 40].

The proposed causal role of oxidative stress in anxiety disorders implicated the potential benefits of antioxidative therapy in the treatment of anxiety. Numerous studies have confirmed the efficacy of the conventional antioxidants, such as vitamins C and E, and selenium, in reducing anxiety symptoms [41]. The sulfur-containing amino acids, such as methionine and *N*-acetylcysteine, have been also reported to have an important role in the reduction of neurotoxicity [42]. Strong evidence exist for the use of herbal supplements containing extracts of passionflower or kava and combinations of L-lysine and L-arginine, magnesium-containing supplements, inositol [43], and some polyphenols [44].

Statins, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, are widely used in the treatment of dyslipidemia and in the primary and secondary prevention of cardiovascular diseases and stroke. Statins also exert pleiotropic effects independent of their hypolipidemic action. They improve blood-flow, reduce coagulation, modulate the immune system, and reduce oxidative damage [45]. Their strong antioxidant effects have been the focus of many

studies [46]. Statins' beneficial effects on CNS disorders have received increasing attention in recent years. However, the underlying mechanisms of their neuroprotective effects are not completely understood [47]. Studies on animal models concerning the effects of statins on anxiety-like and depressive-like behavior are very scarce. Under various pathological conditions, such as hypertension [48], diabetes [49], chronic mild stress [50], increased intake of high-fat diet [51], absence epilepsy [52], and depression [53], the administration of statins showed beneficial effects. Since oxidative stress has been implicated as a possible underlying pathogenic mechanism in all of these conditions, these beneficial effects can be, at least in a part, attributed to their antioxidant properties.

In order to estimate the potential benefits of statins in treatment of dietary-induced behavioral alterations, we evaluated the effects of hyperhomocysteinemia induced by special dietary protocols enriched in methionine and deficient in B vitamins (B6, B9, B12) on anxiety levels in rats by means of behavioral testing (open field—OF and elevated plus maze—EPM tests). Simultaneously, we investigated the alterations of oxidative stress markers in rat hippocampus induced by applied dietary protocols. Furthermore, considering the well-known antioxidant properties of statins, we attempted to assess their impact on major markers of oxidative stress and their possible beneficial role on anxiety-like behavior effect in rats.

Materials and methods

Ethical statement

All research procedures were carried out in accordance with European Directive for the welfare of laboratory animals No. 86/609/EEC and principles of Good Laboratory Practice (GLP), approved by Ethical Committee of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia.

Animals and treatments

The dietary protocols were performed on male Wistar albino rats ($n = 72$; 4 weeks old; 100 ± 15 g body weight). Animals were housed in standard environmental conditions (temperature 23 ± 1 °C, 12/12 light/dark cycle) in polycarbonate cages (four animals per cage). Rats had free access to water and standard or special laboratory food. Special dietary protocols were applied for inducing hyperhomocysteinemia [40]. Commercial methionine-enriched chow contained a double amount of methionine compared to standard rodent chow (7.7 vs. 3.85 g methionine/kg). Based on the previous studies that confirmed the relationship between levels of B-vitamins (pyridoxine—B6, folic acid—B9, and

cobalamine—B12) with anxiety disorders [54], methionine nutritional overload was combined with variable vitamin B content (Mucedola SRL., Milan, Italy). Animals received methionine-enriched chow with regular vitamin B content (folate, pyridoxine and cobalamine; 2.0, 70.0, and 0.03 mg/kg, respectively) or methionine-enriched B vitamin complex deficient chow (folate, pyridoxine and cobalamine; 0.08, 0.01 and 0.01 mg/kg, respectively). The content of other compounds was identical in both diets. Application of statins along with chronic dietary protocols was defined on the basis of previous studies that have shown that treatment with statins has the beneficial effect on oxidative stress [55, 56]. Animals were exposed to treatment with atorvastatin at a dose of 3 mg/kg/day i.p. or simvastatin at a dose of 5 mg/kg/day i.p. at the same time every day (between 8 and 9 a.m.). Applied dietary protocols lasted for 30 days.

Animals were randomly divided into nine different groups (8 animals per group) as follows:

1. Control group—animals fed with standard rodent chow (C)
2. Animals fed with standard rodent chow and with the administration of atorvastatin (St + A)
3. Animals fed with standard rodent chow and with the application of simvastatin (St + S)
4. Animals fed with the methionine-enriched diet with regular vitamin B content (M^+)
5. Animals fed with a diet rich in methionine with atorvastatin application ($M^+ + A$)
6. Animals fed with a diet rich in methionine with the application of simvastatin ($M^+ + S$)
7. Animals fed with the methionine-enriched diet with the deficiency in vitamin B complex—B6, B9, B12 (M^+B^-)
8. Animals fed with a diet rich in methionine with the deficiency in B vitamins with the administration of atorvastatin ($M^+B^- + A$)
9. Animals fed with a diet rich in methionine with the deficiency in B vitamins with simvastatin administration ($M^+B^- + S$)

To ensure that all experimental groups have similar experiences and consistent treatment before behavioral testing, control group, M^+ group, M^+B^- group received at the same time approximately the same amount of saline in the same manner (by means of volume and route of administration) as other six groups received therapy (i.p. injections of statins).

Behavioral testing was performed 24 h following the completion of dietary pretreatment. Rats were transported in their home cages to the testing room (approximately at 9 a.m.), and allowed to accommodate for 1 h before behavioral testing. The same-housed animals were tested on the same day. Open field test and elevated plus maze test were performed under proper conditions of silence and illumination

for this kind of behavioral testing. Both tests were performed one by one (for all experimental groups) in the following order: the open field test and afterward elevated plus maze test. In order to avoid (minimize) the cumulative effects of the repeated anxiety-provoking testing, inter-trial interval of approximately 15 min between these tests was allowed. During the behavioral testing, mazes were cleaned with water and ethanol (70%) following the trial for each animal to remove possible interfering scents.

Open field test

The open field test is one of the commonly used tests for evaluation of anxiety-like behavior. The apparatus consisted of a square arena (60×60×30) made of black wood. At the beginning of the test, each rat was placed in the center of the arena and spontaneous exploration activity was recorded. During a trial, the experimenter was not present in the testing room. The movements of the rats were recorded for 5 min by a digital video camera mounted 150 cm above the open field and then analyzed. The following parameters were obtained during OF test: cumulative duration in the centre zone—CDCZ (s), frequency to the centre zone—FCZ, total distance moved—TDM (cm), velocity (cm/s), the percentage of time moving—%TM, the number of rearings. The moving pattern in arena provides information about the anxious-like state. The total time spent in the centre zone was determined as the major index for anxiety and more ambulations toward centre zone of the open field reflect less anxiety [57].

Elevated plus maze test

The elevated plus maze (EPM) test is widely used behavioral assay for rodents and is considered as a standard for measuring the anxiety responses. EPM consisted of two opposite open (50×20 cm²) and two opposite enclosed arms (50×20×30 cm³) and an open roof. The entire maze was elevated 100 cm from the floor. Each rat was placed in the center of the elevated plus maze facing the open arm and was allowed 5 min for free exploration. This test enables determining the emotional reactivity of animals by means of a conflict between secure parts of the maze (2 enclosed arms) and aversive parts of the maze (open arms). The following parameters were estimated by this test: cumulative duration (the total time spent) in the open arms—CDOA (s), frequency (the number of entries) to open arms—FOA, total distance moved—TDM (cm), velocity (cm/s), percentage of time moving—%TM, the number of rearings, the number of head dippings, and the number of total exploratory activity (TEA) episodes. These parameters are considered as indicators of anxiogenic effect [58, 59]. In order to estimate the overall exploratory activity in EPM test, we used a recently proposed parameter—the total exploratory activity [60] that

includes patterns of exploratory activity observed in different zones of EPM (closed and open arms). TEA is calculated as the sum of the numbers of rearings and head dippings during 5 min of testing in EPM. The activity of the rats was recorded by a digital video camera mounted centrally 250 cm above the elevated plus maze.

Video recording system and analysis

OF and EPM tests were recorded by the digital video camera mounted above mazes at the appropriate height. Video files were analyzed using Ethovision software, an integrating video tracking system for automatic recording of activity movement and interactions of animals [Noldus Information Technology, the Netherlands].

After the completion of behavioral tests, animals were anaesthetized by short-term narcosis, induced by intraperitoneal application of ketamine (10 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg), and then sacrificed by decapitation. Brains were carefully removed from the skull, hippocampal tissue was dissected according to Li [61], and tissue samples were homogenized in PBS (Phosphate-buffered saline, 0.01 M, pH 7.4) with a manual homogenizer and stored in a freezer (−80 °C) until analysis, as previously described [62].

Parameters of oxidative stress quantification

Hippocampus tissue homogenates were centrifuged at 4000 rpm for 15 min at 4 °C. Supernatants obtained by this procedure were utilized for the evaluation of oxidative stress parameters including thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) level, catalase (CAT), and superoxide dismutase (SOD) activities and reduced glutathione (GSH) level, by spectrophotometric assays. TBARS was measured as malondialdehyde (MDA) level in hippocampal tissue according to the method of Okawa and coworkers [63] and calculated using the standard curve of 1,1,3,3-tetraethoxypropane. Results were expressed as nanomoles of MDA per milligram of protein (nmol/mg protein). The enzymatic activity of SOD was determined by following the inhibition of adrenochrome formation from adrenalin at 480 nm [64]. The activity of CAT in hippocampal tissue homogenate was determined spectrophotometrically by monitoring the decomposition rate of hydrogen peroxide at 240 nm following the procedures described by Beers and Sizer [65]. Both SOD and CAT activities were expressed as enzymatic units per milligram of protein (U/mg protein). The concentration of GSH was determined spectrophotometrically according to the method of Ellman [66] on the basis of the reaction with 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid). Results were expressed as milligrams of GSH per g of protein (mg/g protein). Protein concentrations were determined according to

the method of Lowry et al. [67], using bovine serum albumin as the standard.

Statistical analysis

The results were expressed as the means \pm SEM. Parameters obtained in OF test and EPM test and oxidative stress markers were initially submitted to Levene's test for homogeneity of variance and to Shapiro–Wilk test of normality. Comparisons between groups were performed using One-way ANOVA, followed by Bonferroni test. A value of $p < 0.05$ was considered to be significant. Statistical analysis was performed with SPSS version 20.0 statistical package (IBM SPSS Statistics 20).

Results

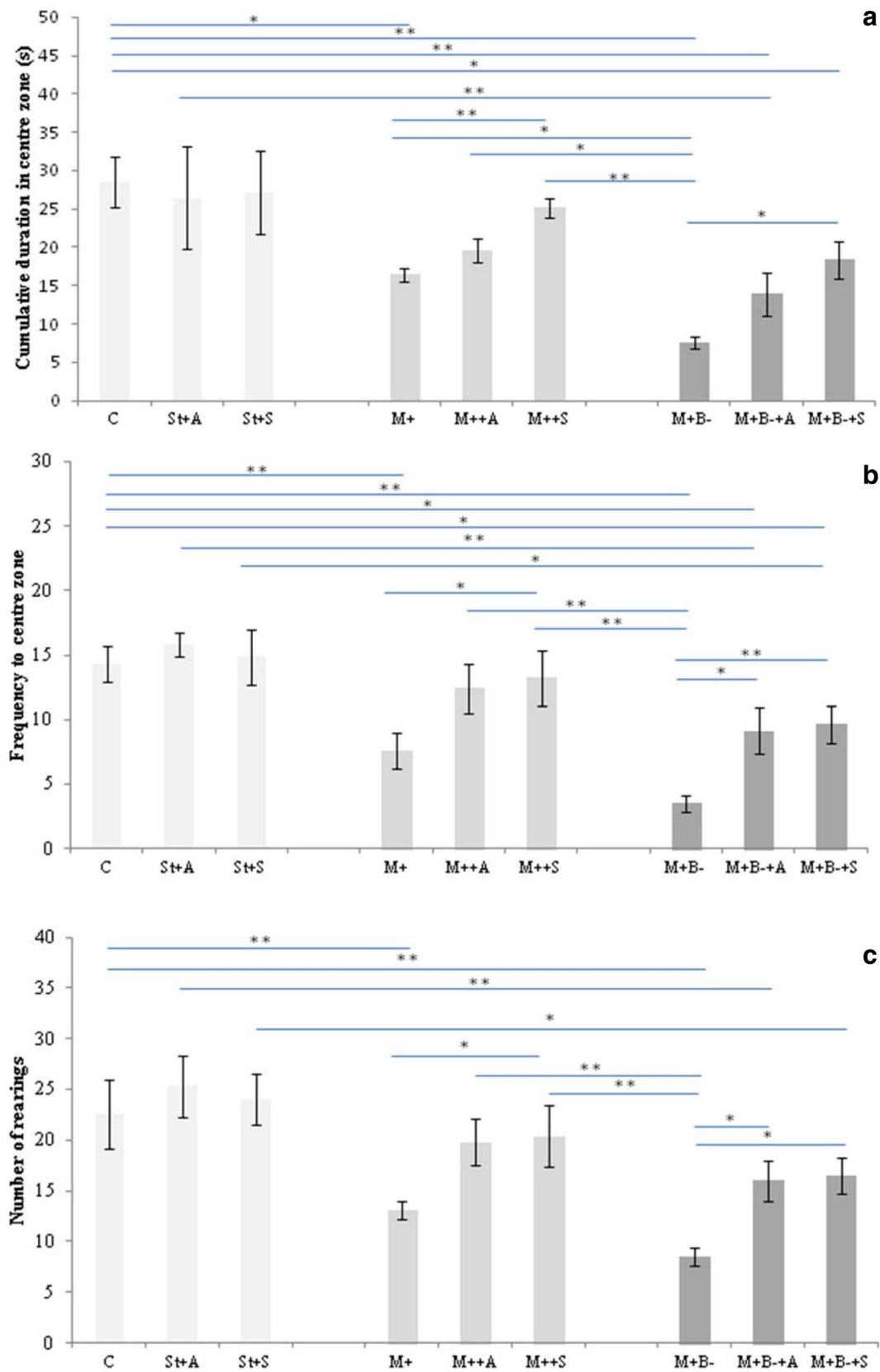
Both the methionine-enriched diet and methionine-enriched folate, vitamin B₆ and B₁₂ deficient diet lowered cumulative duration in the centre zone (Fig. 1a) and frequency to the centre zone (Fig. 1b) compared to the group fed with standard rodent chow ($df=8$, $F=5.368$ and 6.672 , respectively, $p < 0.01$). Diet rich in methionine and deficient in B vitamins also lowered cumulative duration in the centre zone compared to the group fed with methionine-enriched diet ($p < 0.05$). Administration of simvastatin along with methionine-enriched diet significantly increased cumulative duration and frequency to the centre zone ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively) compared to the group that was fed with the methionine-enriched diet without statins supplementation. The treatment with simvastatin along with methionine-enriched diet with B vitamin complex deficiency also increased cumulative duration and frequency to the centre zone ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) compared to the group that was fed with methionine-enriched vitamin B deficiency diet. Atorvastatin application along with methionine-enriched and B complex deficiency diet increased only frequency to the centre zone compared to the group fed with methionine-enriched and B complex deficiency diet ($p < 0.05$). The treatment with atorvastatin along with both dietary protocols, methionine-enriched, and methionine-enriched vitamin B deficiency protocol, showed no significant alterations in total time spent in the centre zone and no alterations in frequency to the centre zone when applied with methionine-enriched diet.

As shown in the Fig. 1c, increased methionine intake and increased methionine intake with folate and vitamin B6 and B12 deficiency induced significant decrease in the vertical exploratory activity in OF test, expressed as the number of rearings, compared to the control group ($F=5.516$, $p < 0.01$). Administration of atorvastatin along with methionine-enriched folate and vitamin B6 and B12

deficient diet significantly increased the number of rearings ($p < 0.05$) compared to the group with methionine-enriched folate and vitamin B6 and B12 deficient diet. Simvastatin application along with methionine-enriched diet and methionine-enriched folate and vitamin B6 and B12 deficient diet also significantly increased the number of rearings ($p < 0.05$) compared to both dietary protocols without simvastatin applied.

The parameters of locomotor activity—total distance moved (Fig. 1d), velocity (Fig. 1e) and percentage of time moving (Fig. 1f) were significantly reduced in the methionine-enriched diet and methionine-enriched diet with deficiency in B vitamins compared to the control group ($df=8$, $F=8.073$, 8.073 and 12.395 , respectively, $p < 0.01$). Diet rich in methionine with vitamin B complex deficiency resulted in even more pronounced decline in locomotor activity by means of all three parameters compared to the group on diet rich in methionine ($p < 0.01$). Administration of atorvastatin along with methionine-enriched diet and methionine-enriched vitamin B complex deficient diet resulted in significant increase in all three parameters of locomotor activity compared to the groups that were fed with same dietary protocols without atorvastatin applied ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). Simvastatin application along with the diet rich in methionine increased total distance moved and velocity compared to the group fed with food rich in methionine ($p < 0.05$), but with no effect on the percentage of time moving. Administration of simvastatin along with the diet rich in methionine and deficient in B vitamin complex also significantly increased parameters of locomotor activity compared to the group on diet rich in methionine and deficient in B vitamin complex ($p < 0.01$ for TDM and velocity, and $p < 0.05$ for %TM).

Both dietary protocols, methionine-enriched diet with no deficiency in B vitamins (folic acid, B6, and B12) and methionine-enriched diet deficient in B vitamins, significantly reduced the total time spent in open arms (Fig. 2a) and frequency to open arms (Fig. 2b) compared to the group fed with standard rodent chow ($df=8$, $F=6040$, and 6612 , respectively, $p < 0.01$). The methionine-enriched diet deficient in B vitamins additionally reduced total time spent in open arms and the number of entries to open arms when compared to the group on the methionine-enriched diet ($p < 0.05$). Cumulative duration in open arms and the number of entries to open arms were increased in the groups that were exposed to chronic simvastatin treatment along with methionine-enriched diet and the methionine-enriched diet deficient in B vitamins ($p < 0.05$) compared to the groups on the same dietary regimens without statins. Simultaneous treatment with atorvastatin along with methionine-enriched vitamin B deficient diet also increased total time spent in open arms compared to the group on methionine-enriched vitamin B deficient diet



◀ **Fig. 1** Parameters calculated from the open field test: **a** CDCZ, **b** FCZ, **c** number of rearings, **d** TDM, **e** velocity, **f** %TM. *C* control group, *St+A* standard chew + atorvastatin group, *St+S* standard chew + simvastatin, *M⁺* methionine rich, *M⁺+A* methionine rich + atorvastatin group, *M⁺+S* methionine rich + simvastatin group, *M⁺B⁻* methionine rich, vitamin B (B6, B9, B12) deficient group, *M⁺B⁻+A* methionine rich, vitamin B (B6, B9, B12) deficient + atorvastatin group, *M⁺B⁻+S* methionine rich, vitamin B (B6, B9, B12) deficient + simvastatin group, (mean ± SEM, *significant difference $p < 0.05$, **significant difference $p < 0.01$)

($p < 0.05$), with no significant effect on frequency to open arms.

Locomotor activity observed in EPM was significantly reduced by both chronic dietary protocols when compared to the control group by means of reduction in total distance moved (Fig. 2c), velocity (Fig. 2d), and percentage of time moving (Fig. 2e) ($F = 11.067$, 11.067 and 9.189 , respectively, $p < 0.01$). The reduction of locomotor activity was even more pronounced in the group with the methionine-enriched diet deficient in B vitamins compared to the methionine-enriched dietary regime ($p < 0.05$). Atorvastatin administration along with methionine-enriched diet and methionine-enriched vitamin B deficient diet increased locomotor activity by means of TDM and velocity compared to the groups on methionine-enriched diet and methionine-enriched vitamin B deficient diet ($p < 0.05$). After application of atorvastatin, the percentage of time moving was significantly increased in the group with methionine-enriched vitamin B deficient group compared to the methionine-enriched vitamin B deficient group ($p < 0.01$), with no significant alteration compared to the methionine-enriched group. Chronic simvastatin administration resulted in significant increase in all three parameters of locomotor activity compared to both methionine-enriched and methionine-enriched vitamin B deficient group ($p < 0.05$).

Exploratory activity in EPM, expressed by means of the number of rearings (Fig. 2f), the number of head dippings (Fig. 2g) and the number of TEA episodes (Fig. 2h) was significantly decreased by both dietary protocols, diet rich in methionine and diet rich in methionine and deficient in B vitamins, compared to the control ($F = 8.018$, 3.989 and 10.751 , respectively, $p < 0.01$). The methionine-enriched diet deficient in B vitamins resulted in an additional decline in the number of rearings and the number of TEA episodes when compared to the group on the methionine-enriched diet ($p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively), with no significant decrease in the number of head dippings compared to methionine-enriched diet group. Atorvastatin administration along with methionine-enriched diet resulted in significant increase in the number of rearings and the number of TEA episodes ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) compared to the group on the methionine-enriched diet. The same effect on these two parameters of exploratory activity

was observed after the simvastatin application along with methionine-enriched diet compared to the group on the methionine-enriched diet ($p < 0.01$). The application of both statins along with methionine-enriched diet had no significant effect on the number of head dippings compared to the group on the methionine-enriched diet. Results obtained in the groups with simultaneous administration of atorvastatin and simvastatin along with methionine-enriched vitamin B deficient diet showed a significant increase in all three parameters for evaluation of exploratory activity in EPM test compared to the group on the methionine-enriched vitamin B deficient diet ($p < 0.01$).

The applied diet protocols also significantly altered the oxidative stress markers in hippocampal tissue. As shown in the Fig. 3a, methionine-enriched diet and methionine-enriched vitamin B deficient diet induced a significant increase in TBARS when compared to the control group ($df = 8$, $F = 4.162$, $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). On the other hand, application of simvastatin along with methionine-enriched vitamin B deficient diet protocol resulted in a significant decrease in the index of lipid peroxidation (expressed in nmol of MDA per mg of tissue proteins) compared to the methionine-enriched vitamin B deficient diet group ($p < 0.05$). Simvastatin induced more pronounced decline in lipid peroxidation compared to atorvastatin group ($p < 0.01$) following the methionine-enriched vitamin B complex deficient diet. Chronic supplementation with atorvastatin had no effect on TBARS values compared to control, neither to the group with methionine-enriched diet nor to the methionine-enriched vitamin B complex deficient diet group.

Both methionine-enriched and methionine-enriched vitamin B (B6, B9, B12) deficient diet (Fig. 3b) significantly altered enzymatic activity of SOD ($df = 8$, $F = 2.739$) resulting in a significant decline in SOD activity compared to control group ($p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively). Although with no effect following standard chow and methionine-enriched diet, atorvastatin and simvastatin supplementation significantly increased SOD activity following the methionine-enriched vitamin B deficient diet ($p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively). As shown in Fig. 3c, increased methionine intake, with or without vitamin B complex deficiency, decreased hippocampal tissue CAT levels ($df = 8$, $F = 3.262$, $p < 0.01$). While atorvastatin supplementation failed to increase CAT levels, chronic administration of simvastatin significantly increased CAT levels in hippocampus, following both methionine-enriched and methionine-enriched vitamin B complex deficient dietary protocols ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively). The increase in hippocampal CAT values following simvastatin administration was significant even compared to atorvastatin supplemented group in methionine-enriched chow diet group ($p < 0.05$). As shown in Fig. 3d,

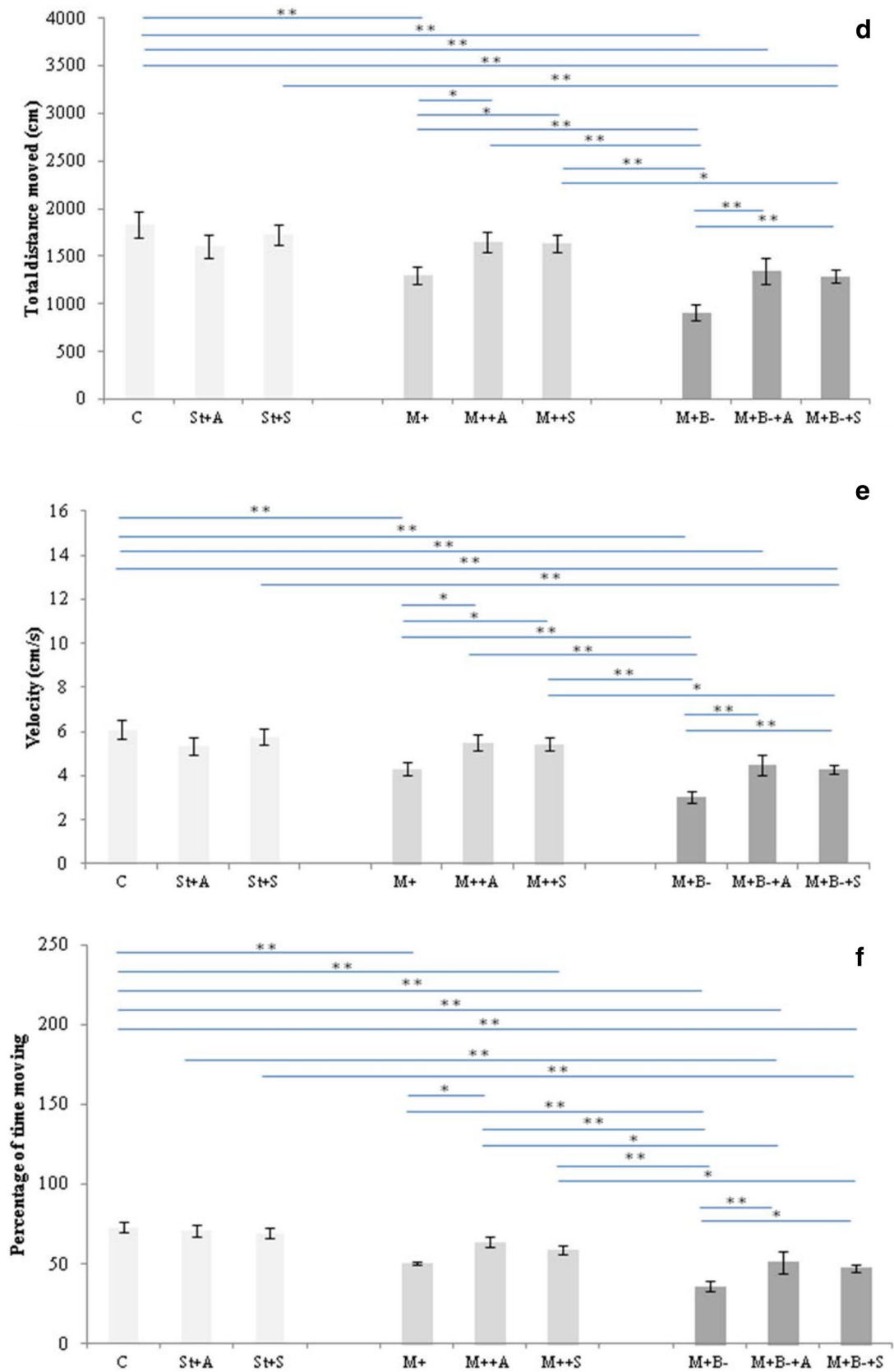


Fig. 1 (continued)

none of the applied dietary protocols resulted in significant alteration of total GSH levels in hippocampal tissue samples.

Simple regression analysis revealed that both CDCZ (Fig. 4a) and CDOA (Fig. 5a) significantly (negatively) correlated with TBARS in hippocampal tissue samples (Pearson's $r=0.70$ and $r=0.64$, $p=2.07^{-10}$ and $p=1.75^{-8}$, respectively). The regression analysis also confirmed that CDCZ (Fig. 4b, c) and CDOA (Fig. 5b, c) significantly (positively) correlated with SOD and CAT activity in rat hippocampal tissue (Pearson's $r=0.61$ and $r=0.78$, $p=1.31^{-07}$ and $p=6.89^{-14}$, for CDCZ, and Pearson's $r=0.69$ and $r=0.82$, $p=5.57^{-10}$ and $p=3.74^{-16}$, for CDOA).

Discussion

There is growing evidence for the impact of hyperhomocysteinemia on various dysfunctions of the central nervous system. Therefore, it seems very reasonable to investigate the possible interventions considering therapeutic regulation of methionine metabolism, especially in the brain. Since the imbalance in methionine levels in the brain has been accompanied with increased oxidative damage [68], it is legitimate to search for potential improvement of oxidative status altered by hyperhomocysteinemia, in order to prevent amelioration of various behavioral patterns, including the mood disorders.

Protocols applied in this study resulted in significant alterations of both behavioral (Figs. 1, 2), evaluated by means of estimation of anxiety levels, and parameters of oxidative stress (Fig. 3). An average methionine intake in this study was 160 ± 10 mg/kg/daily. Literature data confirm that this methionine load was sufficient to increase homocysteine levels. Our previous study with the same dietary protocols induced increase serum Hcy levels up to the ~ 22 $\mu\text{M/L}$ with methionine-enriched diet and ~ 62 $\mu\text{M/L}$ following methionine-enriched vitamins B deficient diet, compared to control levels at 8 $\mu\text{M/L}$ [69]. Depending on the duration of dietary protocols, increased methionine intake induced the elevation of serum Hcy levels by four (30 days protocol) [40] and seven times (8 weeks protocol) [39]. The vulnerability of Hcy metabolism in the brain was previously confirmed following dietary protocols with increase methionine intake and decreased the content of B vitamins (B6, B9 and B12), such as performed in this study, that resulted in increased serum Hcy levels by 5–6-fold in mice [70].

The evaluation of statins influence on Hcy levels, except for one report (with lovastatin) [71], leads to the conclusion that statins do not influence homocysteine concentrations significantly in healthy subjects by means of results observed in numerous clinical trials [72]. Still, the beneficial effects of statins (simvastatin, 20 mg/day, for 8 weeks) on lowering serum Hcy levels were reported in patients with

primary hyperlipidemia and this effect was dependent on the initial levels of serum Hcy [73]. The doses of statins applied in this study (atorvastatin 3 mg/kg/day, simvastatin 5 mg/kg/day) were chosen according to previously reported effects that cover both behavioral alterations [56] and changes in oxidative stress [55]. The applied doses of both statins were within the therapeutic range determined for cardioprotection and treatment of various dyslipidemia patterns in numerous studies [74], and significantly below the reported toxic doses [75].

The results of behavioral tests performed in this study clearly demonstrate that described dietary interventions, considering (increased) methionine load in the chow, resulted in anxiogenic effect. Methionine-enriched diet induced a significant increase of anxiety indicators in both OF (Fig. 1) and EPM test (Fig. 2). The anxiogenic effect of two-fold increased methionine load was unequivocal by means of alterations in "direct indicators" of anxiety in OF test, such as CDCZ and FCZ (Fig. 1a, b), and in EPM test - CDOA and FOA (Fig. 2a, b). Additionally, observed anxiogenic effect was confirmed by means of significantly decreased parameters of locomotor activity in both mazes (Figs. 1d, e, f, 2c–e), indicating previously described influence of anxiety levels on locomotor performance [76]. Furthermore, the parameters of exploratory activity in OF and EPM tests (Figs. 1c, 2f–h), alternative indicators of increased anxiety state [59], also revealed the anxiogenic effect of methionine-enriched diet. Moreover, restriction in vitamins B (B6, B9, and B12) intake, performed simultaneously with increased methionine load, resulted in even more pronounced anxiogenic effect compared to behavioral manifestations of the methionine-enriched diet itself (Figs. 1, 2). The overall enhancement of anxiogenic behavioral patterns following 30 days of simultaneously increased methionine load and deficient vitamin B complex intake was obvious by means of decreased time and frequency in the centre zone of the OF (Fig. 1a, b) and decreased cumulative duration and frequency to open arms in EPM test (Fig. 2a, b), as well as by means of significant additional decline in both exploratory and locomotor activity estimated in behavioral tests (Figs. 1, 2). The results obtained in this study are in accordance with previously reported anxiogenic effects following both acute [77] and chronic [39] increased methionine intake, with subsequent elevation of homocysteine levels, although the simultaneous increase of methionine load and restriction in vitamins essential for cysteine metabolism in brain (vitamin B6, B9, and B12) on behavioral alterations, including anxiogenic effects, has not been evaluated yet.

Administration of statins, atorvastatin and simvastatin, in the doses with confirmed beneficial therapeutic effects of both agents [55, 56], still far from defined toxic doses, did not influence anxiety level parameters when applied with standard chow. Since there is no similar experimental

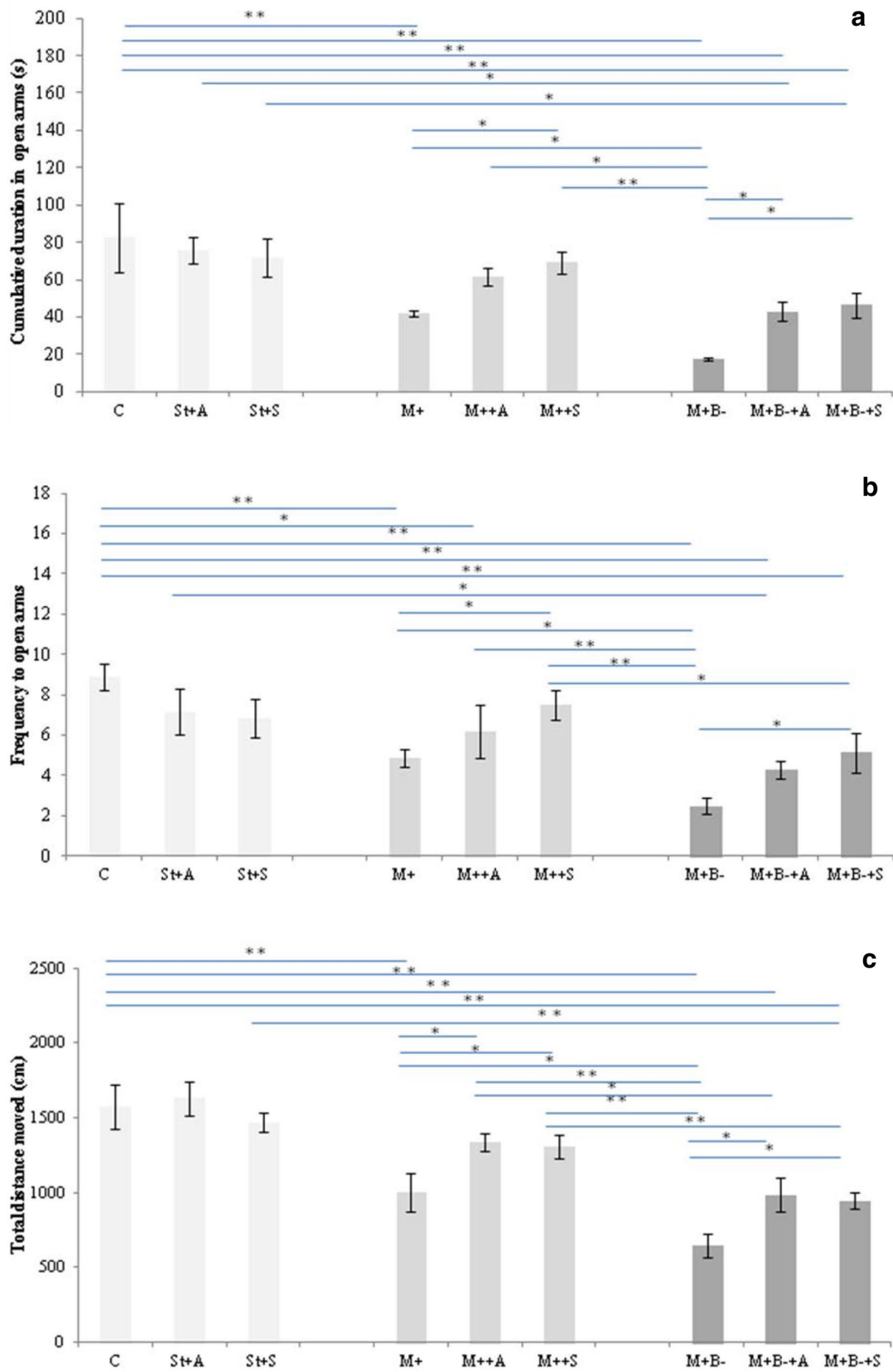


Fig. 2 Parameters calculated from the elevated plus maze test: **a** CDOA, **b** FOA, **c** TDM, **d** velocity, **e** %TM, **f** number of rearings, **g** number of head dippings, **h** number of TEA episodes. *C* control group, *St*+*A* standard chew+atorvastatin group, *St*+*S* standard chew+simvastatin, *M*⁺ methionine rich, *M*⁺+*A* methionine rich+atorvastatin group, *M*⁺+*S* methionine rich+simvastatin group, *M*⁺*B*⁻ methionine rich, vitamin B (B6, B9, B12) deficient group, *M*⁺*B*⁻+*A* methionine rich, vitamin B (B6, B9, B12) deficient+atorvastatin group, *M*⁺*B*⁻+*S* methionine rich, vitamin B (B6, B9, B12) deficient+simvastatin group, (mean±SEM, *significant difference $p < 0.05$, **significant difference $p < 0.01$)

design described in literature (significant differences in the applied doses, durations of protocols, various statins, etc.), it is hard to compare the results considering the effects of statins on anxiety levels with literature data, and we can only compare our results with previously reported data based on different experimental protocols. Unlike in our study, acute administration of simvastatin induced the anxiolytic effect in healthy rats [78]. That effect was observed following application of 2–10-fold higher doses than applied in this study. The similar (anxiolytic) effect was observed after subchronic (14 days) treatment of both atorvastatin and simvastatin [79]. The only study considering the effects of statins on anxiety state levels in animal experimental models showed that chronic administration of both statins applied in our study resulted in anxiolytic effect, although with the doses that were 2–3-fold above the doses applied in this study [52].

However, simultaneous administration of simvastatin diminished the anxiogenic effect that appeared following the methionine-enriched diet for 30 days, by means of a significant increase of anxiety indicators in both OF, CDCZ and FCZ (Fig. 1a, b) and EPM test, CDOA and FOA (Fig. 2a, b). The beneficial effect of simvastatin, manifested as the significant attenuation of anxiogenic effect expressed by the alterations in the same parameters, was also observed after performing dietary protocol with methionine-enriched diet along with restriction in vitamins B (Figs. 1, 2). The enhancement of exploratory and locomotor activity observed in OF (Fig. 1) and EPM test (Fig. 2) confirmed that applied dose of simvastatin was sufficient to attenuate anxiogenic effects induced by methionine-enriched diet, and even under conditions with simultaneous restriction in B6, B9, and B12 vitamins. The administration of atorvastatin along with described dietary protocols showed similar, but less pronounced, effects to simvastatin. The application of atorvastatin failed to significantly reduce anxiogenic effects of methionine-enriched and methionine-enriched vitamins B deficient intake for 30 days (except for FCZ in OF test, Fig. 1b). Still, the dose of atorvastatin such as applied in this study significantly improved parameters of locomotion following a dietary-induced reduction in both tests (Figs. 1, 2). The similar beneficial effect of atorvastatin was manifested by means of increased exploratory activity under the dietary protocol

that included high methionine and restricted vitamins B intake (Figs. 1, 2). The behavioral manifestations, which include estimation of anxiety state levels, of prolonged statins' administration under the common pathological conditions that require indicated usage of statins in animal experimental models that parallel human pathology, have not yet been described in the literature. Since there is no follow-up study that analyzed the effects of chronic administration of statins on anxiety state levels under pathophysiological conditions in animal experimental models, we assume that the findings in this study are in line with the results obtained in our investigation, confirming that long-term administration of statins (in the therapeutic doses as applied in this study) may be beneficial in avoiding anxiogenic effects in chronic metabolic disorders sufficient to induce pathological alterations, such as coronary artery disease [80].

Both homocysteine load-increasing dietary protocols applied in this study resulted in enhanced lipid peroxidation. Methionine-enriched diet for 30 days significantly increased TBARS, while simultaneously applied dietary protocol with double fold methionine intake with restricted B vitamins (B6, B9, and B12) intake induced additional increase in lipid peroxidation, although not significant compared to methionine-enriched group (Fig. 3). Our results correspond with previously published data based on in vitro studies that also showed the potentiation of lipid peroxidation in rat hippocampus induced by increasing homocysteine levels in a dose-dependent manner [68]. At the same time, the postulated mechanism of Hcy-induced increase of lipid peroxidation was proposed by Jara-Prado and coworkers, and it was based on the Hcy-induced alterations in NMDA receptors function [29]. The results considering diminishing effects of Hcy-loading diets on antioxidant enzymes activity obtained in this study (Fig. 3) confirm that both dietary protocols resulted in decreased SOD and CAT activity. Decreased antioxidant capacity was more pronounced following restriction of vitamins B intake, although it was not significant compared to the effects of methionine-enriched diet only. Since there is no literature data considering the effects of increased methionine load on the activity of antioxidant enzymes in vivo, we can only confirm that our results are in line with reported total radical trapping antioxidant potential in rat hippocampus [68]. The total GSH levels remained unaffected by dietary protocols performed in this study, which corresponds to reported lack of influence of Hcy levels on hippocampal glutathione in rats [68].

Simultaneous administration of statins with Hcy overloading dietary protocols showed their beneficial effects by means of decreased oxidative stress. The antioxidant effect of atorvastatin was clearly observed only by increased CAT activity following methionine-enriched vitamin B restricted diet (Fig. 3c), while by far more pronounced effect of simvastatin was obvious by means of decreased

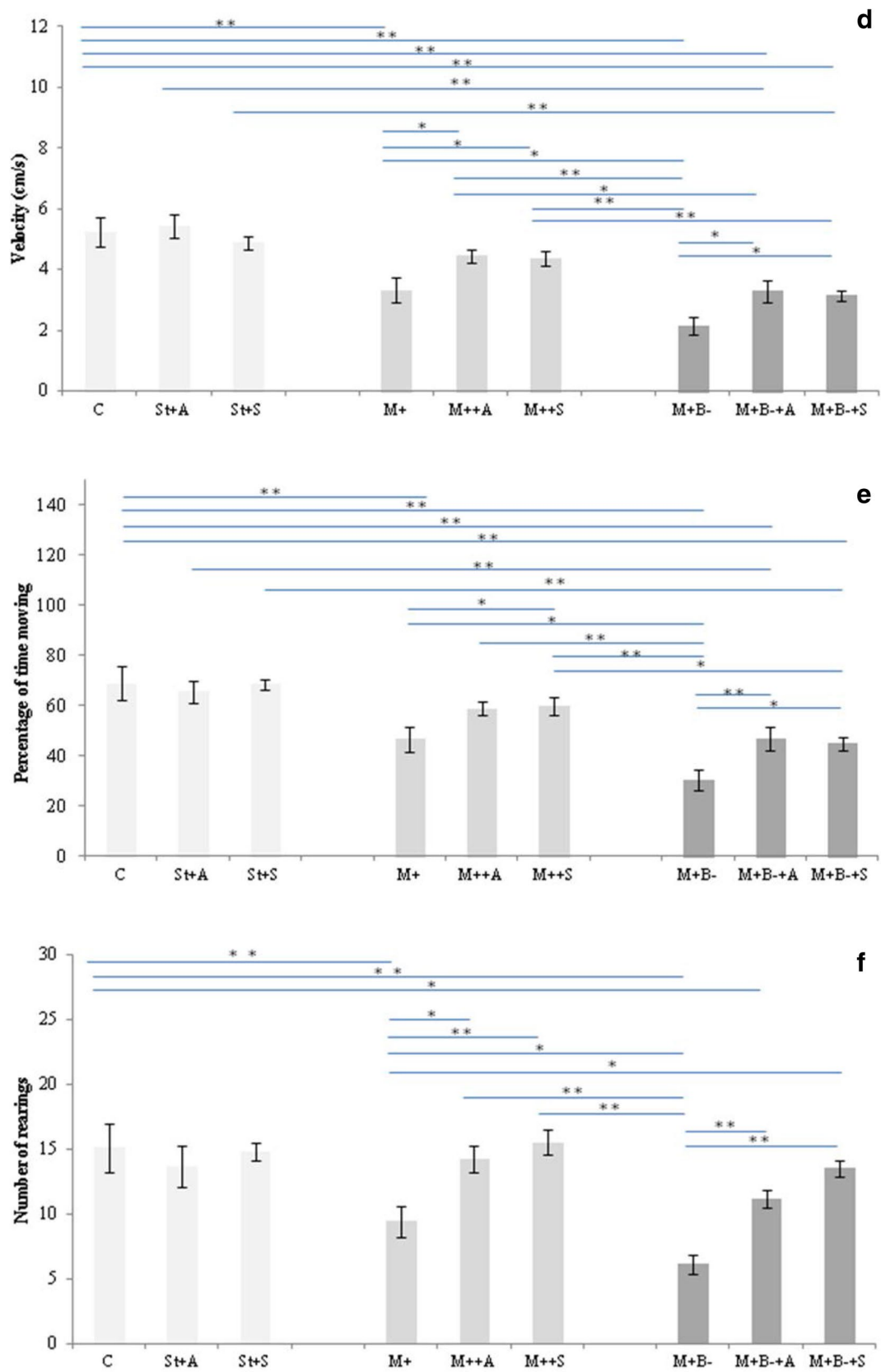


Fig. 2 (continued)

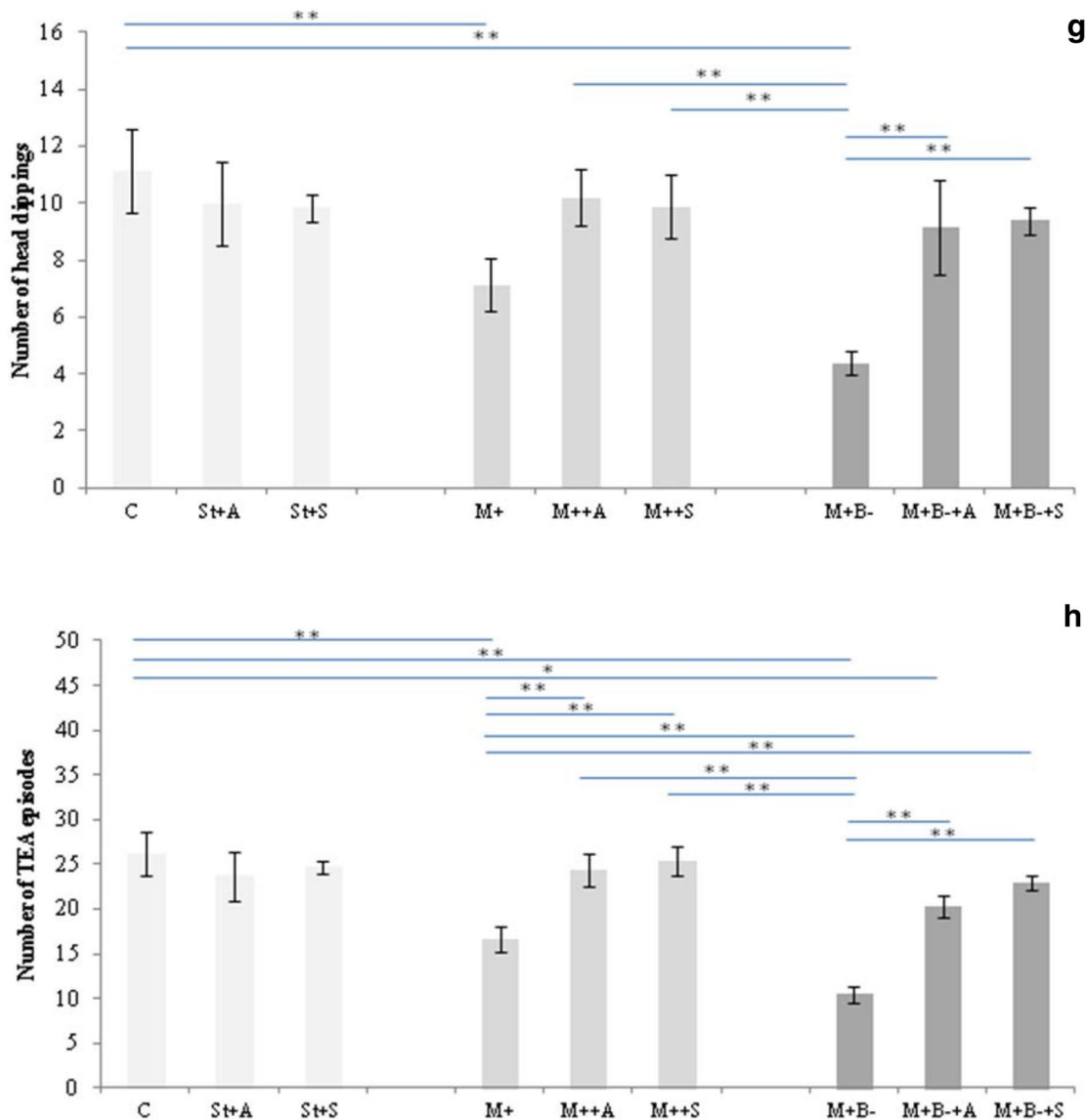


Fig. 2 (continued)

lipid peroxidation after methionine-enriched vitamin B restricted diet (Fig. 3a), as well as by increased activity of both estimated antioxidant enzymes (Fig. 3b, c). Our findings correspond to previously reported beneficial effects of atorvastatin expressed by a reduction of lipid peroxidation in rat brain tissue [81]. The results of our study are also in line with recently demonstrated findings that administration of simvastatin up-regulates SOD and CAT in oxidative stress processes in rat hippocampal cells [82].

The most sensitive indicators of anxiety state level in OF (Fig. 4) and EPM (Fig. 5) tests, the cumulative duration in centre zone and open arms, significantly correlated with oxidative stress markers. The beneficial (anxiolytic) effects

of statin supplementation on the increased anxiety state levels following methionine-enriched diet, and even more pronounced anxiogenic effect of methionine-enriched diet deficient in B vitamins, were negatively correlated to lipid peroxidation by means of parameters obtained in both OF (Fig. 4a) and EPM (Fig. 5a) tests. On the other hand, the anxiolytic effect of prolonged atorvastatin and simvastatin administration significantly positively correlated to both SOD and CAT activity (Figs. 4b, c, 5b, c). Our results strongly confirm that oxidative damage may contribute to the regulation of anxiety state levels. This is in line with previously reported findings based on the results obtained in in vitro study and clinical trial confirming that elevated

Fig. 3 Parameters of oxidative status in rat hippocampus: **a** TBARS, **b** SOD, **c** CAT, **d** GSH. *C* control group, *St*+*A* standard chew + atorvastatin group, *St*+*S* standard chew + simvastatin, *M*⁺ methionine rich, *M*⁺+*A* methionine rich + atorvastatin group, *M*⁺+*S* methionine rich + simvastatin group, *M*⁺*B*⁻ methionine rich, vitamin B (B6, B9, B12) deficient group, *M*⁺*B*⁻+*A* methionine rich, vitamin B (B6, B9, B12) deficient + atorvastatin group, *M*⁺*B*⁻+*S* methionine rich, vitamin B (B6, B9, B12) deficient + Simvastatin group, (Mean ± SEM, *significant difference $p < 0.05$, **significant difference $p < 0.01$)

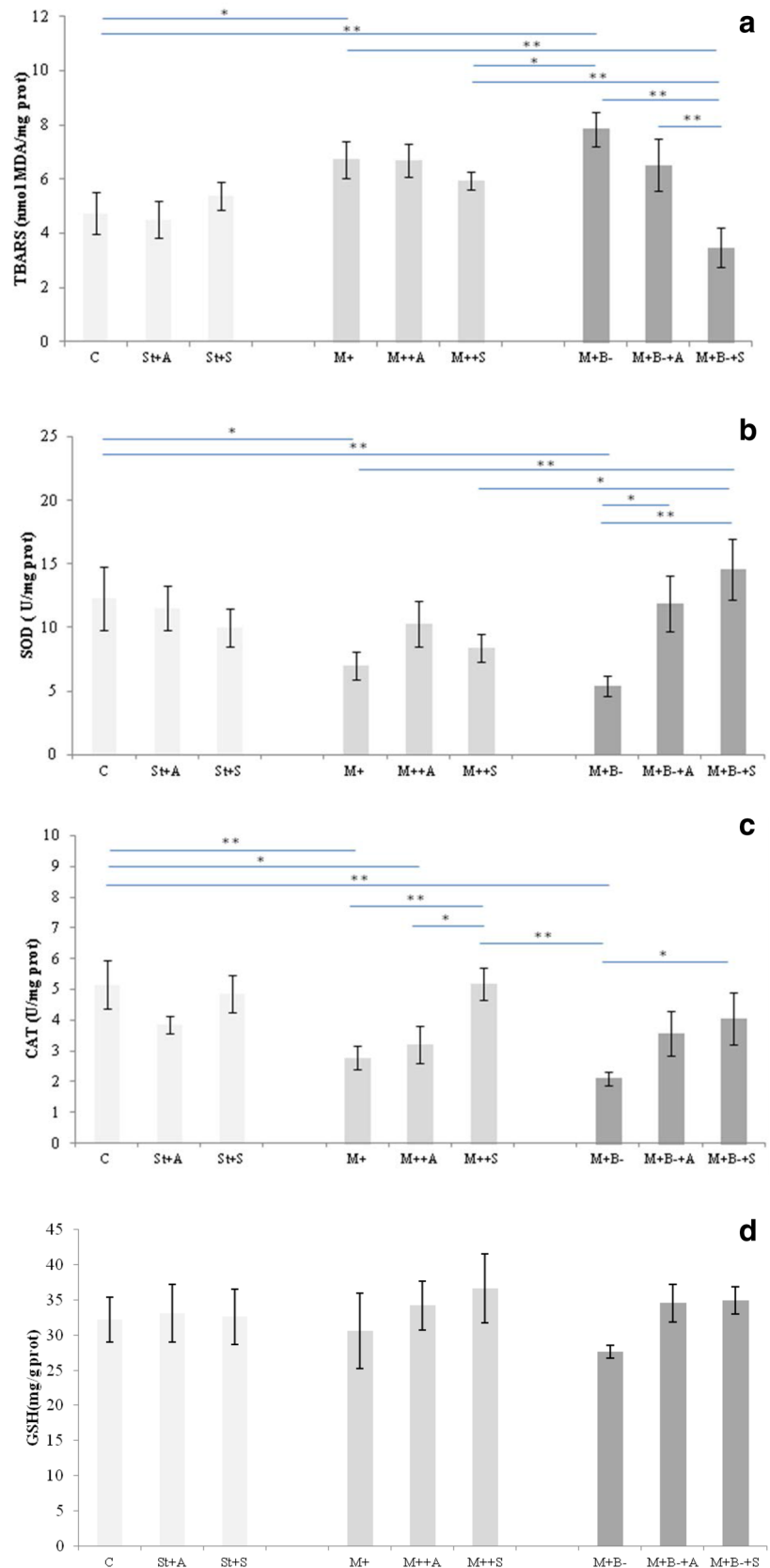


Fig. 4 Relationship between the cumulative duration in centre zone and **a** index of lipid peroxidation (expressed as TBARS), **b** SOD activity, **c** CAT activity in rat hippocampus for all investigated groups. Simple regression analysis ($n=72$) indicated that the cumulative duration in centre zone and TBARS were significantly and negatively correlated ($r=0.70$, $p=2.07^{-10}$), while significantly and positively correlated with SOD and CAT ($r=0.61$, $p=1.31^{-07}$ and $r=0.78$, $p=6.89^{-14}$, respectively)

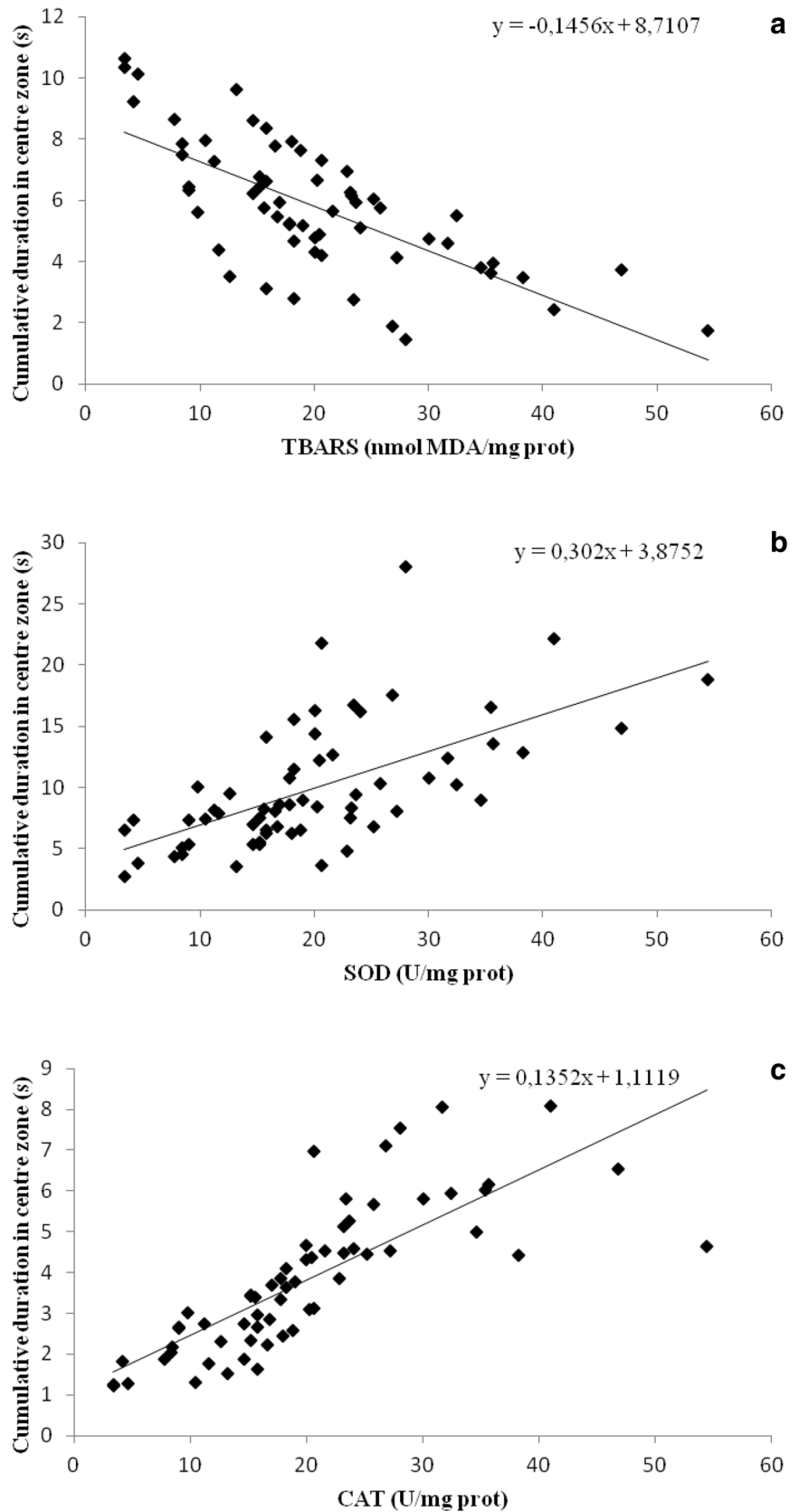
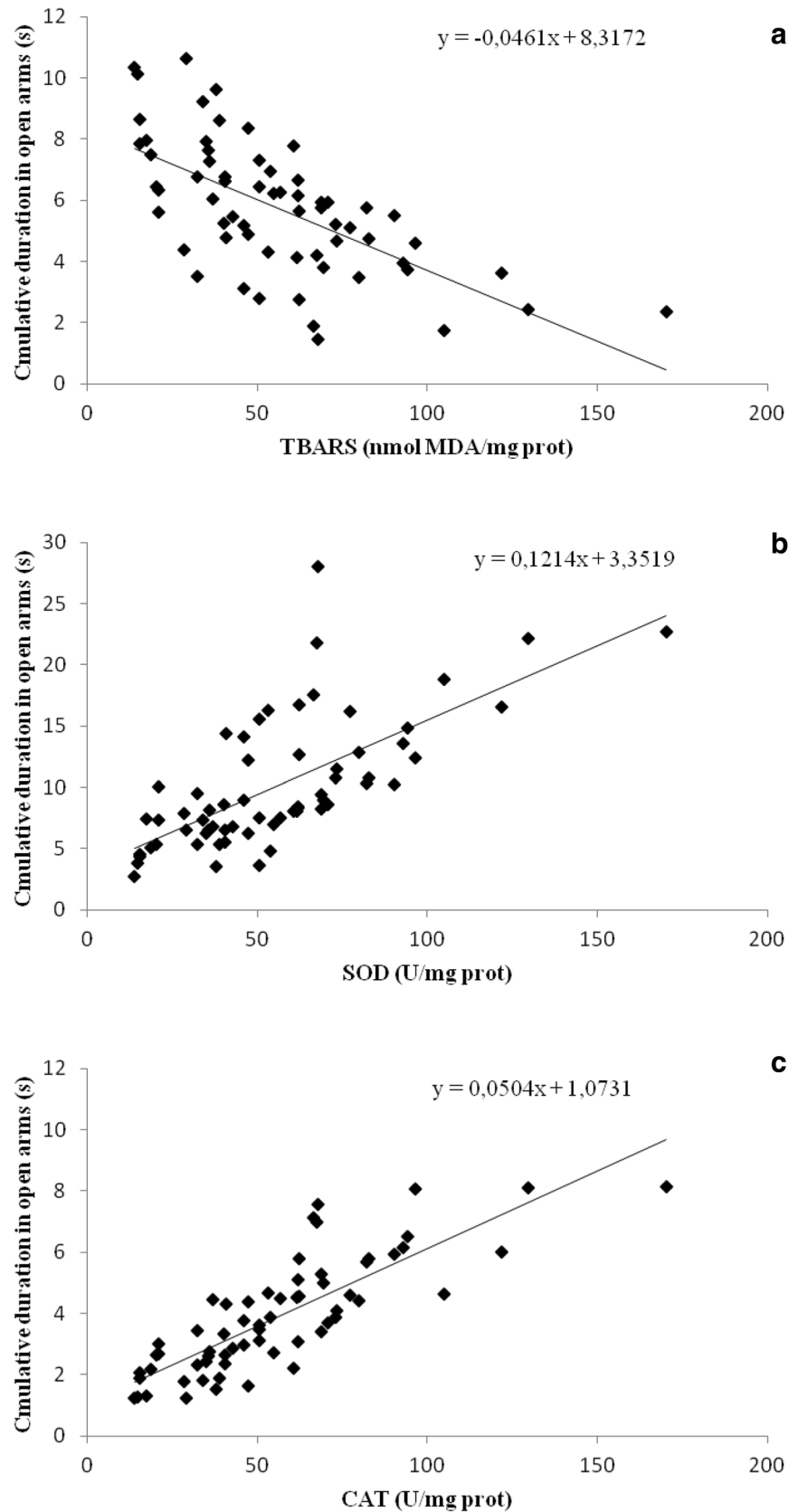


Fig. 5 Relationship between the cumulative duration in open arms and **a** index of lipid peroxidation (expressed as TBARS), **b** SOD activity, **c** CAT activity in rat hippocampus for all investigated groups. Simple regression analysis ($n=72$) indicated that the cumulative duration in open arms and TBARS were significantly and negatively correlated ($r=0.64$, $p=1.75^{-8}$), while significantly and positively correlated with SOD and CAT ($r=0.69$, $p=5.57^{-10}$ and $r=0.82$, $p=3.74^{-16}$, respectively)



homocysteine levels increased oxidative stress [68] and also are accompanied to behavioral alterations including increased anxiety levels [18].

In conclusion, the results obtained in this study confirmed that methionine-load dietary protocols induced increased oxidative stress in rat hippocampus, which was accompanied by anxiogenic behavioral manifestations. Simultaneous administration of statins showed beneficial effects by means of both decreased parameters of oxidative stress and attenuation of anxiety. The results obtained with simvastatin were more convincing compared to atorvastatin. Altogether, our findings support that increasing number of hyperhomocysteinemia (of different origin) with various clinical manifestations (including behavioral) may be considered as an indication for (pre)medication with statins.

Acknowledgements This work was supported by the Faculty of Medical Sciences (JP 01/13), University of Kragujevac, Serbia.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Škovierová H, Vidomanová E, Mahmood S, Sopková J, Drgová A, Červeňová T, Halašova E, Lehotský J (2016) The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism imbalance on human health. *Int J Mol Sci* 17(10):1733
- Lu SC (2000) S-Adenosylmethionine. *Int J Biochem Cell Biol* 32:391–395
- Petras M, Tatarkova Z, Kovalska M, Mokra D, Dobrota D, Lehotsky J, Drgova A (2014) Hyperhomocysteinemia as a risk factor for the neuronal system disorders. *J Physio Pharmacol* 65(1):15–23
- Obeid R, Herrmann W (2006) Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Lett* 580:2994–3005
- Reynolds EH, Carney MW, Toone BK (1984) Methylation and mood. *Lancet* 2:196–198
- Türksoy N, Bilici R, Yağcıner A, Ozdemir Y, Ornek I, Tufan AE, Kara A (2014) Vitamin B12, folate, and homocysteine levels in patients with obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychiatr Dis Treat* 10:1671–1675
- Lehmann M, Gottfries C, Regland G B (1999) Identification of Cognitive impairment in the elderly: Homocysteine is a farly marker. *Dement Geriatr Cogn Disord* 10:12–20
- Kahler SG, Fahey MC (2003) Metabolic disorders and mental retardation. *Am J Med Genet Part* 117:31–41
- Chamberlin ME, Ubagai T, Mudd SH, Wilson WG, Leonard JV, Chou JY (1996) Demyelination of the brain is associated with methionine adenosyltransferase I/III deficiency. *JCI* 98(4):1021–1027
- Oulhaj A, Refsum H, Beaumont H, Williams J, King E, Jacoby R, Smith AD (2010) Homocysteine as a predictor of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 25:82–90
- Blandini F, Fancellu R, Martignoni E, Mangiagalli A, Pacchetti C, Samuele A, Nappi G (2001) Plasma homocysteine and l-dopa metabolism in patients with Parkinson disease. *Clin Chem* 47(6):1102–1104
- Hankey GJ, Eikelboom JW (2001) Homocysteine and stroke. *Curr Opin Neurol* 14(1):95–102
- Obeid R, Mc Caddon A, Herrmann W (2007) The role of hyperhomocysteinemia and B vitamin deficiency in neurological and psychiatric diseases. *Clin Chem Lab Med* 45(12):1590–1606
- Moustafa AA, Hewedi DH, Eissa AM, Frydecka D, Misiak B (2014) Homocysteine levels in schizophrenia and affective disorders—focus on cognition. *Front Behav Neurosci* 8:343
- Gu P, DeFina LF, Leonard D, John S, Weiner MF, Brown ES (2012) Relationship between serum homocysteine levels and depressive symptoms: the Cooper Center Longitudinal Study. *J Clin Psychiatr* 73:691–695
- Folstein M, Liu T, Peter I, Buell J, Arsenault L, Scott T et al (2007) The homocysteine hypothesis of depression. *Am J Psychiatr* 164:861–867
- Tiemeier H, van Tuijl HR, Hofman A, Meijer J, Kiliaan AJ, Breteler MB (2002) Vitamin B₁₂, folate, and homocysteine in depression: the Rotterdam study. *Am J Psychiatr* 159:2099–2101
- Chung KH, Chiou HY, Chen YH (2017) Associations between serum homocysteine levels and anxiety and depression among children and adolescents in Taiwan. *Sci Rep* 7(1):8330
- Atmaca M, Tezcan E, Kuloglu M, Kirtas O, Ustandag B (2005) Serum folate and homocysteine levels in patients with obsessive-compulsive disorder. *Psychiatry Clin Neurosci* 59(5):616–620
- Levine J, Timinsky I, Vishne T et al (2008) Elevated serum homocysteine levels in male patients with PTSD. *Depress Anxiety* 25(11):154–157
- Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, Pogribny IP, Melnyk S, Lusier-Cacan S, Chen MF, Pai A, John SW, Smith RS et al (2001) Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum Mol Genet* 10:433–443
- Jakubowski H, Perla-Kaján J, Finnell RH, Cabrera RM, Wang H, Gupta S, Kruger WD, Kraus JP, Shih DM (2009) Genetic or nutritional disorders in homocysteine or folate metabolism increase protein N-homocysteinylation in mice. *FASEB J* 23:1721–1727
- Parsons RB, Waring RH, Ramsden DB, Williams AC (1998) In vitro effect of the cysteine metabolites homocysteic acid, homocysteine and cysteic acid upon human neuronal cell lines. *Neurotoxicology* 19:599–603
- Kruman II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L, Mattson MP (2000) Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci* 20:6920–6926
- Zou CG, Banerjee R (2005) Homocysteine and redox signaling. *Antioxid Redox Signal* 7:547–559
- Perna AF, Ingrosso D, De Santo NG (2003) Homocysteine and oxidative stress. *Amino Acids* 25:409–417
- Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97(6):1634–1658
- Weber GF (1994) The pathophysiology of reactive oxygen intermediates in the central nervous system. *Med Hypotheses* 43(4):223–230
- Jara-Prado A, Ortega-Vazquez A, Martinez-Ruano L, Rios C, Santamaria A (2003) Homocysteine-induced brain lipid peroxidation: effects of NMDA receptor blockade, antioxidant treatment, and nitric oxide synthase inhibition. *Neurotox Res* 5(4):237–243
- Lebel C (1991) Oxygen radicals: Common mediators of neurotoxicity. *Neurotox Teratol* 13:341–346
- Herken H, Akyol O, Yilmaz HR, Tutkun H, Savas HA, Ozen ME, Kalenderoglu A, Gulec M (2006) Nitric oxide, adenosine deaminase, xanthine oxidase and superoxide dismutase in patients

- with panic disorder: alterations by antidepressant treatment. *Hum Psychopharmacol* 21:53–59
32. Herken H, Gurel A, Selek S, Armutcu F, Ozen ME, Bulut M, Kap O, Yumru M, Savas HA, Akyol O (2007) Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, and xanthine oxidase in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. *Arch Med Res* 38:247–252
 33. Ersan S, Bakir S, Erdal Ersan E, Dogan O (2006) Examination of free radical metabolism and antioxidant defence system elements in patients with obsessive-compulsive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatr* 30:1039–1042
 34. Kodykova J, Vavrova L, Zeman M, Jirak R, Macasek J, Stankova B, Tvrzicka E, Zak A (2009) Antioxidative enzymes and increased oxidative stress in depressive women. *Clin Biochem* 42:1368–1374
 35. Ersoy MA, Selek S, Celik H, Erel O, Kaya MC, Savas HA, Herken H (2008) Role of oxidative and antioxidative parameters in etiopathogenesis and prognosis of panic disorder. *Int J Neurosci* 118:1025–1037
 36. Selek S, Herken H, Bulut M, Ceylan MF, Celik H, Savas HA, Erel O (2008) Oxidative imbalance in obsessive compulsive disorder patients: a total evaluation of oxidant-antioxidant status. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatr* 32:487–491
 37. Atmaca M, Kuloglu M, Tezcan E, Ustundag B (2008) Antioxidant enzyme and malondialdehyde levels in patients with social phobia. *Psychiatr Res* 159:95–100
 38. Galecki P, Szmraj J, Bienkiewicz M, Florkowski A, Galecka E (2009) Lipid peroxidation and antioxidant protection in patients during acute depressive episodes and in remission after fluoxetine treatment. *Pharmacol Rep* 61:436–447
 39. Viggiano A, Viggiano E, Monda M, Ingresso D, Perna AF, De Luca B (2012) Methionine-enriched diet decreases hippocampal antioxidant defences and impairs spontaneous behaviour and long term potentiation in rats. *Brain Res* 1471:66–74
 40. Hrnčić D, Mikić J, Rašić-Marković A, Velimirović M, Stojković T, Obrenović R, Rankov-Petrović B, Šušić V, Djurić D, Petronijević N, Stanojlović O (2016) Anxiety-related behavior in hyperhomocysteinemia induced by methionine nutritional overload in rats: role of the brain oxidative stress. *Can J Physiol Pharmacol* 94(10):1074–1082
 41. Hovatta I, Juhila J, Donner J (2010) Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. *Neurosci Res* 68(4):261–275
 42. Rosic G, Joksimovic J, Selakovic D, Jakovljevic V, Živkovic V, Srejovic I, Djuric M, Djuric D (2018) The beneficial effects of sulfur-containing amino acids on cisplatin-induced cardiotoxicity and neurotoxicity in rodents. *Curr Med Chem* 25(3):391–403
 43. Lakhan V (2010) Nutritional and herbal supplements for anxiety and anxiety-related disorders: systematic review. *Nutr J* 9:42
 44. Vignes M, Maurice T, Lanté F, Nedjar M, Thethi K, Guirmand J, Récasens M (2006) Anxiolytic properties of green tea polyphenol (–)-epigallocatechin gallate (EGCG). *Brain Res* 1110:102–115
 45. McFarlane SI, Muniyappa R, Francisco R, Sowers JR (2002) Pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond. *J Clin Endocrinol Metab* 87(4):1451–1458
 46. Murrow JR, Sher S, Ali S, Uphoff I, Patel R, Porkert M et al (2012) The differential effect of statins on oxidative stress and endothelial function: atorvastatin versus pravastatin. *J Clin Lipidol* 6(1):42–49
 47. Van der Most PJ, Dolga AM, Nijholt IM, Luiten PGM, Eisel ULM (2009) Statins: mechanisms of neuroprotection. *Prog Neurobiol* 88(1):64–75
 48. Mohammadi MT, Amini R, Jahanbakhsh Z, Shekarforoush S (2013) Effects of atorvastatin on the hypertension-induced oxidative stress in the rat brain. *IBJ* 17(3):152–157
 49. ElBatsh MM (2015) Antidepressant-like effect of simvastatin in diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol* 93(8):649–656
 50. Lin PY, Chang AY, Lin TK (2014) Simvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in rats exposed to chronic mild stress. *Pharmacol Biochem Behav* 124:174–179
 51. Can ÖD, Ulupinar E, Özkay ÜD, Yegin B, Öztürk Y (2012) The effect of simvastatin treatment on behavioral parameters, cognitive performance, and hippocampal morphology in rats fed a standard or a high-fat diet. *Behav Pharmacol* 23:582–592
 52. Citraro R, Chimirri S, Aiello R, Gallelli L, Trimboli F, Britti D, De Sarro G, Russo E (2014) Protective effects of some statins on epileptogenesis and depressive-like behavior in WAG/Rij rats, a genetic animal model of absence epilepsy. *Epilepsia* 55(8):1284–1291
 53. Anupama GM, Shrishail HV, Shashikant T (2013) Evaluation of antidepressant activity of simvastatin, lovastatin and atorvastatin in male swiss mice - an experimental study. *Int J Drug Dev Res* 5(2):102–108
 54. Bjelland I, Tell G, Vollset S, Refsum H, Ueland P (2003) Folate, vitamin B12, homocysteine, and the MTHFR 677C>T polymorphism in anxiety and depression. the Hordaland Homocysteine Study. *Arch Gen Psychiatr* 60(6):618–626
 55. Sodha NR, Boodhwani M, Ramlawi B, Clements RT, Mieno S, Feng J, Xu SH, Bianchi S, Sellke FW (2008) Atorvastatin increases myocardial indices of oxidative stress in a porcine model of hypercholesterolemia and chronic ischemia. *J Card Surg* 23(4):312–320
 56. Parle M, Singh N (2007) Reversal of memory deficits by atorvastatin and simvastatin in rats. *Yakugaku Zasshi* 127(7):1125–1137
 57. Prut L, Belzung C (2003) The open field as a paradigm to measure the effect of drugs on anxiety-like behaviours: a review. *Eur J Pharmacol* 463(1–3):3–33
 58. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14(3):149–167
 59. Pellow S, File SE (1986) Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 24(3):525–529
 60. Selakovic D, Joksimovic J, Obradovic D, Milovanovic D, Djuric M, Rosic G (2016) The adverse effects of exercise and supraphysiological dose of testosterone-enanthate (TE) on exploratory activity in elevated plus maze (EPM) test—indications for using total exploratory activity (TEA) as a new parameter for exploratory activity estimation in EPM. *Neuroendocrinol Lett* 37(5):101–106
 61. Li KW (2011) *Neuroproteomics*. Humana Press Springer, New York
 62. Wohlenberg M, Almeida D, Bokowski L, Medeiros N, Agostini F, Funchal C, Dani C (2014) Antioxidant activity of grapevine leaf extracts against oxidative stress induced by carbon tetrachloride in cerebral cortex, hippocampus and cerebellum of rats. *Antioxidants* 3(2):200–211
 63. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351–358
 64. Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247:3170–3175
 65. Beers RF, Sizer IW (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 195(1):133–140
 66. Ellman GL (1959) Tissue sulphhydryl group. *Arch Biochem Biophys* 82:70–77
 67. Lowry OH, Rosebrough NL, Farr AL, Randall RI (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275

68. Streck EL, Vieira PS, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wyse AT (2003) In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. *Metab Brain Dis* 18(2):147–154
69. Nikolić T (2017) The effects of hyperhomocysteinemia on myocardial function, coronary circulation and redox status of the isolated heart rat: role of hydroxymethyl glutaryl inhibitor coenzyme-A (HMG-COA) reductase. Dissertation, University of Kragujevac
70. Kamath AF, Chauhan AK, Kisucka J, Dole VS, Loscalzo J, Handy DE, Wagner DD (2006) Elevated levels of homocysteine compromise blood-brain barrier integrity in mice. *Blood* 107(2):591–593
71. Ridker PM, Shih J, Cook TJ et al (2002) Plasma homocysteine concentration, statin therapy, and the risk of first acute coronary events. *Circulation* 105:1776–1779
72. Dierkes J, Luley C, Westphal S (2007) Effect of lipid-lowering and anti-hypertensive drugs on plasma homocysteine levels. *Vasc Health Risk Manag* 3(1):99–108
73. Jiang S, Chen Q, Venners SA, Zhong G, Hsu YH, Xing H, Wang X, Xu X (2013) Effect of simvastatin on plasma homocysteine levels and its modification by MTHFR C677T polymorphism in Chinese patients with primary hyperlipidemia. *Cardiovasc Ther* 31(4):27–33
74. Ludman A, Venugopal V, Yellon DM, Hausenloy DJ (2009) Statins and cardioprotection—more than just lipid lowering? *Pharmacol Ther* 122(1):30–43
75. Clarke AT, Johnson PC, Hall GC, Ford I, Mills PR (2016) High dose atorvastatin associated with increased risk of significant hepatotoxicity in comparison to simvastatin in UK GPRD cohort. *PLoS ONE* 11(3):e0151587
76. Selakovic D, Joksimovic J, Zaletel I, Puskas N, Matovic M, Rosic G (2017) The opposite effects of nandrolone decanoate and exercise on anxiety levels in rats may involve alterations in hippocampal parvalbumin-positive interneurons. *PLoS ONE* 12(12):e0189595
77. Hrnčić D, Rašić- Marković A, Mikić J, Demchuk G, Leković J, Šušić V, Macut D, Djurić D, Stanojlović O (2013) Anxiety-related behavior in adult rats after acute homocysteine thiolactone treatment. *Clin Neurophysiol* 124(7):14–15
78. Kilic FS, Ozatik Y, Kaygisiz B, Baydemir C, Erol K (2012) Acute antidepressant and anxiolytic effects of simvastatin and its mechanisms in rats. *Neurosciences* 17(1):39–43
79. Pemminati S, Nandini Colaco MB, Patchava D, Shivaprakash G, Sheetal Ullal D, Gopalakrishna HN, Rathnakar UP, Shenoy AK (2012) Role of statins in animal models of anxiety in Normocholesterolemic rats. *J Pharm Res* 5(7):3764–3766
80. Young-Xu Y, Chan KA, Liao JK, Ravid S, Blatt CM (2003) Long-term statin use and psychological well-being. *J Am Coll Cardiol* 42(4):690–697
81. Koladiya RU, Jaggi AS, Singh N, Sharma BK (2008) Ameliorative role of Atorvastatin and Pitavastatin in L-Methionine induced vascular dementia in rats. *BMC Pharmacol* 8:14
82. Liu W, Zhao Y, Zhang X, Ji J (2018) Simvastatin ameliorates cognitive impairments via inhibition of oxidative stress induced apoptosis of hippocampal cells through the ERK/AKT signaling pathway in a rat model of senile dementia. *Mol Med Rep* 17(1):1885–1892

THE EFFECTS OF METHIONINE-ENRICHED AND VITAMINS (FOLATE, PYRIDOXINE AND COBALAMINE)-DEFICIENT DIET ON EXPLORATORY ACTIVITY IN RATS - A BRIEF REPORT

Natasa Mijailovic, Dragica Selakovic, Jovana Joksimovic, Vladimir Jakovljevic, Tamara Nikolic and Gvozden Rosic
Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

EFEKTI METIONINOM-OBOGAĆENE I VITAMINIMA (FOLATI, PIRIDOKSIN I KOBALAMIN) DEFICIJENTNE DIJETE NA EKSPLOATIVNU AKTIVNOST PACOVA-KRATAK IZVEŠTAJ

Nataša Mijailović, Dragica Selaković, Jovana Joksimović, Vladimir Jakovljević, Tamara Nikolić i Gvozden Rosić
Katedra za Fiziologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Srbija

Received / Priljen: 06. 02. 2017.

Accepted / Prihvaćen: 09. 02. 2017.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the impact of increased homocysteine levels induced by methionine nutritional overload (twice as standard) and deficiency of the vitamins folate, pyridoxine and cobalamine, which plays an important role in homocysteine metabolism in anxiety-related behaviour, expressed by means of exploratory activity in rats. Twenty-three male Wistar albino rats (4 weeks old, 100 ± 15 g body weight) were divided into three groups: control ($n=8$), methionine-enriched (Meth+, 7.7 g of methionine/kg chow, $n=7$) and methionine-enriched vitamin-deficient (Meth+Vit-, 7.7 g of methionine/kg chow, deficient in folate, pyridoxine and cobalamine - 0.08, 0.01 and 0.01 mg/kg, $n=8$). All animals had free access to food and water for 30 days. Behavioural testing was performed using the elevated plus maze (EPM) test. Standard parameters for vertical exploratory activity, the number of rearings and the number of head-dippings, as well as the total exploratory activity (summarizing overall exploratory activity in the EPM) were significantly reduced following 30 days of methionine nutritional overload ($p<0.05$, $p<0.05$ and $p<0.01$, respectively). A methionine-enriched diet coupled with a reduction in some B vitamins resulted in a more pronounced decline in exploratory drive observed in the EPM test compared to the control ($p<0.01$). The decline in total exploratory activity associated with vitamin deficiency was significant compared to the Meth+ group ($p<0.05$). The results of this study highlight the important role of homocysteine in the modulation of exploratory activity in rats. Decreased exploratory drive induced by both a methionine-enriched and vitamin-deficient diet could be attributed to an anxiogenic effect of hyperhomocysteinemia.

Keywords: methionine, homocysteine, folate, pyridoxine, cobalamine, exploratory activity, anxiety, rats

SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja je bio ispitivanje uticaja povišenih nivoa homocisteina, uzrokovanih povećanim sadržajem metionina u hrani (dvostruko u odnosu na standard), kao i deficijencijom vitamina (folati, piridoksin, kobalamin) koji imaju značajnu ulogu u metabolizmu homocisteina, na nivo anksioznosti koji se iskazuje u ponašanju. Dvadeset tri Wistar albino pacova muškog pola (4 nedelje starosti, 100 ± 15 g telesne mase) je podeljeno u 3 grupe: kontrola ($n=8$), metioninom obogaćena (Meth+, 7,7 g metionina/kg hrane, $n=7$) i metioninom obogaćena i deficijentna u sadržaju vitamina (Meth+Vit-, 7,7 g metionina/kg hrane, deficijentna u sadržaju folata, piridoksina i kobalamina - 0,08, 0,01 i 0,01 mg/kg, $n=8$). Sve životinje su imale slobodan pristup hrani i vodi tokom 30 dana. Bihevioralno testiranje je sprovedeno u testu uzdignutog krstastog lavirinta (UKL). Standardni parametri vertikalne eksplorativne aktivnosti, broj uspravljanja i broj naginjanja, kao i ukupna eksplorativna aktivnost (sumacija sveukupne eksplorativne aktivnosti u UKL), su bili značajno smanjeni nakon 30 dana povećanog unosa metionina ($p<0,05$, $p<0,05$ i $p<0,01$). Metioninom obogaćena ishrana, udružena sa smanjenjem pojedinih B vitamina, je uzrokovala dodatno smanjenje eksplorativne aktivnosti u UKL testu u odnosu na kontrolu ($p<0,01$). Smanjenje ukupne eksplorativne aktivnosti uzrokovano dodatnom deficijencijom vitamina je bilo značajno u odnosu na Meth+ grupu ($p<0,05$). Rezultati ove studije naglašavaju značajnu ulogu homocisteina u modulaciji eksplorativne aktivnosti kod pacova. Smanjena eksplorativna aktivnost uzrokovana metioninom obogaćenom ishranom i deficijencijom vitamina u hrani se može smatrati anksiogenim efektom hiperhomocisteinemije.

Ključne reči: metionin, homocistein, folati, piridoksin, kobalamin, eksplorativna aktivnost, anksioznost, pacovi

ABBREVIATIONS

BHMT - betaine-homocysteine methyl-transferase	EPM - elevated plus maze
CBS - cystathionine-beta-synthase	Hcy - homocysteine
CNS - central nervous system	SAM - S-adenosylmethionine
CSE - cystathionine-gamma-lyase	TEA - total exploratory activity



INTRODUCTION

Homocysteine (Hcy) is a non-protein-forming, sulfur-containing, non-essential amino acid. Increased Hcy levels have been associated with a diversity of diseases, including cardiovascular diseases (1, 2), malignancies (3), birth defects and pregnancy complications (4, 5), as well as with central nervous system (CNS) dysfunction (6, 7).

Hcy is synthesized by transmethylation of the (essential) diet-derived amino acid methionine. Its metabolism may be represented as the intersection of two metabolic pathways: remethylation and transsulfuration (8). In the remethylation pathway, Hcy is recycled to methionine under the catalysis of methionine synthase or betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT). In the transsulfuration pathway, Hcy is condensed with serine, forming cystathionine (by enzyme cystathionine-beta-synthase, CBS), which is subsequently hydrolyzed to cysteine (by enzyme cystathionine-gammapyrase, CSE), essential for the formation of glutathione, or finally decomposed to taurine (9-11).

Folic acid (B_9), pyridoxine (B_6) and cobalamine (B_{12}) are crucially involved in processes important for homocysteine metabolism. B_6 -dependent enzymes CBS and CSE are basically involved in the transsulfuration pathway, as previously described (12). Folate and vitamin B_{12} are involved in the remethylation reactions of Hcy back to methionine to complete the methyl cycle (folate/ B_{12} -dependent remethylation). Folate, in the form of coenzyme N-5-methyl tetrahydrofolate, can donate a methyl group to Hcy in a reaction catalyzed by the vitamin B_{12} -dependent enzyme methionine synthase. The remethylation reactions of Hcy to methionine may also include folate/ B_{12} -independent remethylation, which involves betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT). Therefore, vitamins B_9 and B_{12} play an important role in Hcy content within the cell and, subsequently, in plasma level circulation (12).

Hyperhomocysteinemia represents a risk factor for numerous disorders affecting the CNS, such as neurological cognitive deficit, mental retardation, demyelination (13, 14), Alzheimer's disease (15), Parkinson's disease (16), stroke (17) and schizophrenia (18). The strong causal connectivity between elevated Hcy levels and this diversity of CNS disorders may be found in some differences in Hcy metabolism that are specific for brain tissue. It has been reported that transmethylation of Hcy in the brain is limited exclusively to the folate/ B_{12} -dependent pathway due to lack of BHMT in brain tissue. The other metabolic pathway of Hcy, transsulfuration, in brain tissue is also limited due to lack of CSE (also observed in adipose tissue). Therefore, the metabolic processes that can limit Hcy accumulation in brain tissue are limited only to folate/ B_{12} -dependent remethylation, which may explain the higher vulnerability of the CNS to increased Hcy levels (19). In addition, the methylation reactions that are critical for the proper synthesis of serotonin, other monoamine neurotransmitters and catecholamines (20), which play an important role in mood regulation, largely rely on B vitamin cofactors (B_6 , B_3 and B_{12}).

Numerous clinical trials have provided additional information on the importance of the factors that may affect Hcy metabolism in the genesis of various mood disorders. Therefore, it has been reported that patients with depression had lower serum levels of folate and vitamin B_{12} (21, 22). Additionally, numerous anxiety disorders are related to impaired one-carbon metabolism (23-26).

The aim of this study was to evaluate the impact of increased Hcy levels induced by methionine nutritional overload, as well as by deficiency in vitamins (folate, pyridoxine and cobalamine) that play an important role in homocysteine metabolism in anxiety-related behaviour, expressed by means of exploratory activity in rats.

MATERIALS AND METHODS

Animals and treatment

The dietary protocols were performed on 23 male Wistar albino rats (4 weeks old, 100 ± 15 g body weight). Rats were housed in standard environmental conditions (12/12 h light/dark cycle, 23 ± 1 °C) in polycarbonate cages (2 animals per cage). The rats were randomly divided into three groups: control ($n=8$), methionine-enriched (Meth+, $n=7$) and methionine-enriched vitamin-deficient (Meth+Vit-, $n=8$). The animals in the control group were fed with standard chow, whereas the animals in the two other groups were fed with commercial methionine-enriched chow (7.7 g of methionine/kg) combined with variable vitamin B content (Mucedola SRL., Milan, Italy). Methionine content in enriched diets was twice as high compared to that in standard chow (3.85 g of methionine/kg, (27)). The Meth+ group received methionine-enriched chow with regular vitamin B content (folate, pyridoxine and cobalamine: 2.0, 70.0 and 0.03 mg/kg, respectively). The Meth+Vit- group was fed with the methionine-enriched chow that was deficient in folate, pyridoxine and cobalamine (0.08, 0.01 and 0.01 mg/kg, respectively). All animals had free access to food and water. Applied dietary protocols lasted for 30 days.

Behavioural testing

Behavioural testing was performed 24 h following the completion of dietary pretreatment. Rats were transported in their home cages to the testing room (approx. at 9 a.m.) and allowed to acclimate 1 hour prior to testing. Testing was performed in the elevated plus maze (EPM), as the EPM test is commonly considered a standard for measuring anxiety levels in rodents (28). EPM consisted of two opposite open arms (50x20 cm) and two opposite enclosed arms (50x20x30 cm), elevated 100 cm from the floor. Each rat was placed in the centre of the elevated plus maze facing the open arm and was allowed 5 minutes of free exploration. The following parameters of exploratory activity in the EPM test were estimated: the number of rearings, the number of head-dippings and the total exploratory activity (TEA). The number of rearings and the number of



head-dippings are considered indicators of anxiety level (28, 29) because exploratory drive is in conflict with fear of the unknown, i.e., anxiety (30). To estimate overall exploratory activity in the EPM test, we used a recently proposed parameter—total exploratory activity (31)—which includes patterns of exploratory activity observed in different zones of the EPM (closed and open arms). TEA is calculated as the sum of the numbers of rearings and head-dippings during 5 minutes of testing in the EPM. EPM tests were recorded by digital camera, mounted above mazes at the appropriate height, under proper conditions of silence and illumination. Video files were analysed using Ethovision software XT 12, Noldus Information Technology, the Netherlands.

All research procedures were carried out in accordance with the European Directive for the welfare of laboratory animals No: 2010/63/EU and Principles of Good Laboratory Practice (GLP). The protocol for the current study was approved by the Ethics Committee for experimental animal wellbeing of the Faculty of Medical Sciences of the University of Kragujevac, Serbia (No: 01-11794).

RESULTS

Both the methionine-enriched diet and the methionine-enriched, folate-, vitamin B₆- and B₁₂-deficient diet resulted in significant decline in exploratory activity in the EPM test by means of the number of rearings ($F=9.011$, $df=2$), the number of head-dippings ($F=10.851$, $df=2$), and total exploratory activity ($F=19.779$, $df=2$).

As shown in Fig. 1, increased methionine intake for one month induced significant decreases in vertical exploratory activity in the EPM test, expressed as the number of rearings, compared to the control ($p<0.05$). The methionine-enriched diet coupled with the total restriction of folate, vitamin B₆ and vitamin B₁₂ intake also reduced the number of rearings in the EPM test compared to the control ($p<0.01$), but this additional decline in exploratory activity was not significant when compared to the group on the methionine-enriched diet.

The prolonged intake of methionine-enriched chow also reduced the other pattern of vertical exploratory activity in the EPM test, the number of head-dippings (Fig. 2), compared to the control ($p<0.05$). Folate, vitamin B₆ and B₁₂ deficiency, simultaneously applied with the methionine-enriched diet, resulted in an even greater reduction in the number of head-dippings when compared to the control group ($p<0.01$). However, such a decrease in this behavioural pattern was not significant compared to the effects of the methionine-enriched diet with sufficient folate, vitamin B₆ and B₁₂ intake.

The total exploratory activity in the EPM, expressed by means of the sum of the number of rearings and the number of head-dippings, was confirmed to be a more sensitive marker of exploratory activity in the EPM test, as it covers both patterns of vertical exploratory activity (Fig. 3).

Therefore, both applied dietary protocols resulted in significant reductions in the total exploratory activity compared to the control ($p<0.01$). Moreover, unlike the indi-

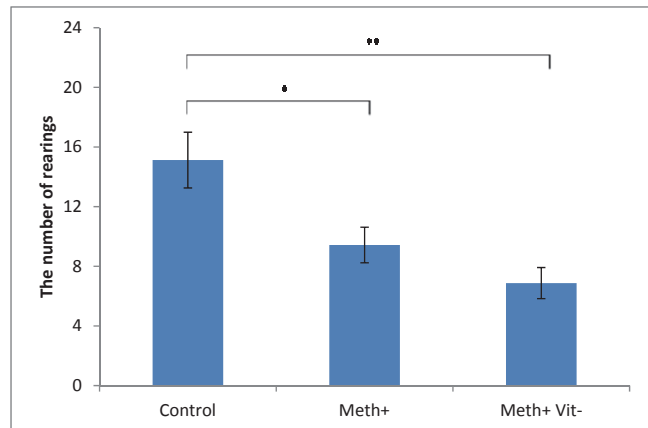


Figure 1 The number of rearings (Mean ± SEM, *denotes a significant difference $p<0.05$, **denotes a significant difference $p<0.01$). Control: control group, Meth+: methionine-enriched diet group, Meth+Vit-: methionine-enriched vitamin-deficient diet group.

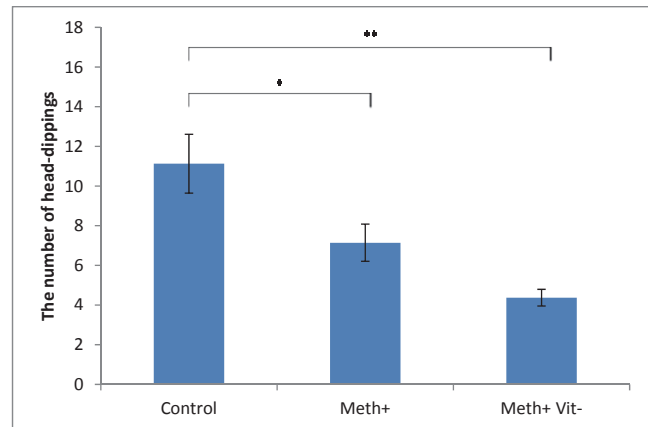


Figure 2 The number of head-dippings (Mean ± SEM, *denotes a significant difference $p<0.05$, **denotes a significant difference $p<0.01$). Control: control group, Meth+: methionine-enriched diet group, Meth+Vit-: methionine-enriched vitamin-deficient diet group.

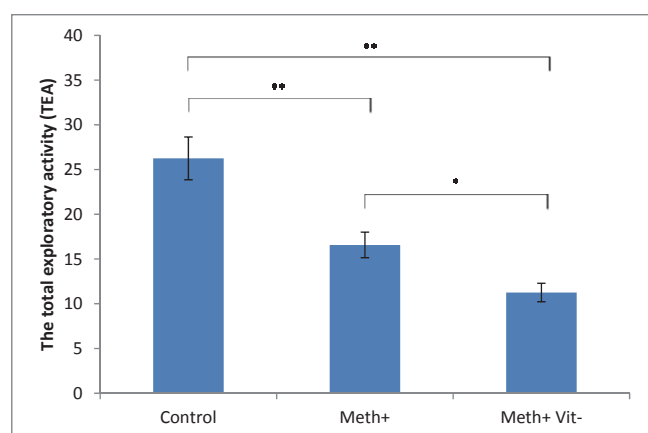


Figure 3 The total exploratory activity (Mean ± SEM, *denotes a significant difference $p<0.05$, **denotes a significant difference $p<0.01$). Control: control group, Meth+: methionine-enriched diet group, Meth+Vit-: methionine-enriched vitamin-deficient diet group.



vidual markers of exploratory activity in the EPM test, the total exploratory activity revealed that total restriction in folate, vitamin B₆ and B₁₂ accompanied with methionine-enriched diet significantly diminished total exploratory activity compared to the group with adequate folate, vitamin B₆ and B₁₂ intake ($p < 0.05$).

DISCUSSION

Results of this study showed that dietary protocols designed to provide significant imbalance in Hcy metabolism can alter some specific behavioural patterns, such as exploratory activity in rats. On the other hand, exploratory activity obtained in the EPM test has been widely used as an indicator of anxiety (32-34). Because the reduction in exploratory activity has been interpreted as an augmented anxiety response in rodents (35, 36), our results confirmed the role of Hcy in maintaining anxiety state level.

Both standard parameters for vertical exploratory activity, the number of rearings (which mostly occur in the closed arms of the EPM) and the number of head-dippings (which occur exclusively in the open arms of the EPM), as well as the total exploratory activity (which summarizes overall exploratory activity in the EPM), were significantly reduced following 30 days of methionine nutritional overload. Although there are very few reports on the effects of high methionine intake on exploratory activity in rodents, our results correspond to previous research on the decreased number of rearings in the open field test following 30 days of nutritional overload with methionine (27). However, it seems that an acute increase in methionine-enriched food intake had no effect on exploratory drive, whereas a prolonged dietary protocol (5 and 10 mg/kg of L-methionine daily) resulted in significant decline in the number of rearings after 21 days (37). The proposed explanation for observed behavioural alterations was found in the fact that increased methionine intake induced lowering of S-adenosylmethionine (SAM, the compound that is involved in methylation cycle, affecting the formation of Hcy) in some specific brain regions that are responsible for the control of various brain functions (38). Methionine content in the applied diet was sufficient to produce an increase (4-5 folds) in serum Hcy levels (27). It is well known that the neurotoxic effects of hyperhomocysteinemia may be provoked directly by inducing DNA damage, resulting in increased apoptosis (39), as well as via N-methyl-D-aspartate and group I metabotropic glutamate receptors (40). Additionally, a methionine-enriched diet has been reported to significantly enhance the oxidative damage in different brain regions, such as the hippocampus, that have a crucial role in maintaining anxiety state levels (27). The reported alterations in brain oxidative status following methionine nutritional overload are mainly based on the reduction of antioxidant enzyme activity and depletion of glutathione levels (27). It has also been reported that increased reac-

tive oxygen species production in specific brain regions is accompanied by increased anxiety levels in rodents (41) and in humans (42).

A methionine-enriched diet (for one month) accompanied with a reduction in some B vitamins (folate, pyridoxine and cobalamine) that are crucial for Hcy metabolism resulted in even more pronounced decline in exploratory drive observed in the EPM test compared to the control. Although the additional reduction in the number of rearings and the number of head-dippings was not significant comparing to methionine-enriched diet alone, diminishment of total exploratory activity (the most comprehensive indicator of exploratory drive in the EPM) revealed that deficiency in certain B vitamins can seriously inhibit exploratory activity in rats. There is no existing data on the impact of deficiency in the named vitamins (along with methionine overload) on the genesis of anxiety disorders by means of parameters of exploratory activity. However, our results are in line with previous reports of decreased exploratory drive in B vitamin (B₂, B₉, B₁₂, choline) deficiency in mice (43). The observed anxiogenic effect following B vitamin deficiency was achieved after 8 weeks of treatment and was accompanied by increased homocysteine plasma levels. Hyperhomocysteinemia, which may underlie the anxiogenic effect (such as that observed in this study), was also reported following dietary protocols with B₉ (44). Additionally, vitamin B₆ deficiency in rat chow resulted in hyperhomocysteinemia and enhanced lipid peroxidation accompanied by decreased SAM and glutathione levels in plasma and liver (45). Furthermore, the beneficial effects of B₁₂ supplementation on hyperhomocysteinemia in aged rats have confirmed the importance of cobalamine in methionine metabolism in the brain (46). Although, numerous studies have pointed to the key role of hyperhomocysteinemia-induced neurotoxicity in various brain regions, recent research has presented the crucial possibility that hyperhomocysteinemia may be just a result of, rather than a cause of, at least some mood disorders, such as depression under chronic stress (47).

Based on reports that different patterns of exploratory activity can be considered reliable indicators of anxiety (48-50), we can also compare our results with clinical trials that analyse the connection between impaired one-carbon metabolism and anxiety disorders, such as obsessive-compulsive disorder (23, 24, 26).

In summary, the results of this study suggest the important role of Hcy in the modulation of exploratory activity in rats. Even more, because exploratory drive represents a reliable indicator of anxiety state level, it seems that future investigations considering protocols that can influence homocysteine metabolism (especially in the brain) may be a useful tool in the prevention and cure of some anxiety-related disorders.

Acknowledgements

This work was supported by the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia (JP 01/13).



REFERENCES

1. Refsum H, Ueland PM, Nygård O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med.* 1998; 49:31-62.
2. Djuric D, Jakovljevic V, Rasic-Markovic A, Djuric A, Stanojlovic O. Homocysteine, folic acid and coronary artery disease: possible impact on prognosis and therapy. *Indian J Chest Dis Allied Sci.* 2008; 50(1):39-48.
3. Kim YI. Folate and cancer prevention: a new medical application of folate beyond hyperhomocysteinemia and neural tube defects. *Nutr Rev.* 1999; 57(10):314-21.
4. Scholl TO, Johnson WG. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71(5 Suppl):1295S-303S.
5. Nelen WL. Hyperhomocysteinemia and human reproduction. *Clin Chem Lab Med.* 2001; 39(8):758-63.
6. Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 1998; 55(11):1449-55.
7. Selhub J, Bagley LC, Miller J, Rosenberg IH. B vitamins, homocysteine, and neurocognitive function in the elderly. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71(2):614S-620S.
8. Troen AM. The central nervous system in animal models of hyperhomocysteinemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2005; 29(7):1140-51.
9. Kloor D, Stumvoll W, Schmid H, Kömpf J, Mack A, Oswald H. Localization of S-adenosylhomocysteine hydrolase in the rat kidney. *J Histochem Cytochem.* 2000; 48(2):211-8.
10. Ntaios G, Savopoulos C, Grekas D, Hatzitolios A. The controversial role of B-vitamins in cardiovascular risk: An update. *Arch Cardiovasc Dis.* 2009; 102(12):847-54.
11. Ball RO, Courtney-Martin G, Pencharz PB. The in vivo sparing of methionine by cysteine in sulfur amino acid requirements in animal models and adult humans. *J Nutr.* 2006; 136(6 Suppl):1682S-1693S.
12. 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).
13. Chamberlin ME, Ubagai T, Mudd SH, Wilson WG, Leonard JV, Chou JY. Demyelination of the brain is associated with methionine adenosyltransferase I/III deficiency. *Journal of Clinical Investigation.* 1996; 98(4), 1021-7.
14. Mudd SH, Jenden DJ, Capdevila A, Roch M, Levy HL, Wagner C. Isolated hypermethioninemia: measurements of S-adenosylmethionine and choline. *Metabolism.* 2000; 49(12):1542-7.
15. Hasegawa T. Prolonged stress will induce Alzheimer's disease in elderly people by increased release of homocysteic acid. *Med Hypotheses.* 2007; 69(5):1135-9.
16. Blandini F, Fancellu R, Martignoni E, Mangiagalli A, Pacchetti C, Samuele A, Nappi G. Plasma homocysteine and l-dopa metabolism in patients with Parkinson disease. *Clin Chem.* 2001; 47(6):1102-4.
17. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and stroke. *Curr Opin Neurol.* 2001; 14(1):95-102.
18. Moustafa AA, Hewedi DH, Eissa AM, Frydecka D, Misiak B. Homocysteine levels in schizophrenia and affective disorders—focus on cognition. *Frontiers in Behavioral Neuroscience.* 2014; 6 (8):343
19. Sunden SL, Renduchintala MS, Park EI, Miklasz SD, Garrow TA. Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. *Arch Biochem Biophys.* 1997; 345(1):171-4.
20. Bottiglieri T. Folate, vitamin B12, and neuropsychiatric disorders. *Nutr Rev.* 1996; 54(12):382-90.
21. Sachdev PS, Parslow RA, Lux O, Salonikas C, Wen W, Naidoo D, Christensen H, Jorm AF. Relationship of homocysteine, folic acid and vitamin B12 with depression in a middle-aged community sample. *Psychol Med.* 2005; 35(4):529-38.
22. Kim JM, Stewart R, Kim SW, Yang SJ, Shin IS, Yoon JS. Predictive value of folate, vitamin B12 and homocysteine levels in late-life depression. *Br J Psychiatry.* 2008; 192(4):268-74.
23. Hermesh H, Weizman A, Shahar A, Munitz H. Vitamin B12 and folic acid serum levels in obsessive compulsive disorder.
24. Atmaca M, Tezcan E, Kuloglu M, Kirtas O, Ustundag B. Serum folate and homocysteine levels in patients with obsessive-compulsive disorder. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2005; 59(5):616-20.
25. Levine J, Timinsky I, Vishne T, Dwolatzky T, Roitman S, Kaplan Z, Kotler M, Sela BA, Spivak B. Elevated serum homocysteine levels in male patients with PTSD. *Depress Anxiety.* 2008; 25(11):E154-7.
26. Sharma V, Biswas D. Cobalamin deficiency presenting as obsessive compulsive disorder: case report. *Gen Hosp Psychiatry.* 2012; 34(5):578.e7-8.
27. Hrcic D, Mikić J, Rasic-Markovic A, Velimirović M, Stojković T, Obrenović R, Rankov-Petrović B, Šušić V, Djuric D, Petronijević N, Stanojlovic O. Anxiety-related behavior in hyperhomocysteinemia induced by methionine nutritional overload in rats: role of the brain oxidative stress. *Can J Physiol Pharmacol.* 2016; 94(10):1074-82.
28. Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 1986; 24(3):525-9
29. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods.* 1985; 14(3):149-67.
30. Ennaceur A. Tests of unconditioned anxiety - pitfalls and disappointments. *Physiol Behav.* 2014; 135:55-71. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.05.032.



31. Selakovic D, Joksimovic J, Obradovic D, Milovanovic D, Djuric M, Rosic G. The adverse effects of exercise and supraphysiological dose of testosterone-enanthate (TE) on exploratory activity in elevated plus maze (EPM) test – indications for using total exploratory activity (TEA) as a new parameter for exploratory activity estimation in *Neuroendocrinol Lett* 2016; 37(5):101–6.
32. Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Gil L, Aguilar R, Tobeña A, Driscoll P. Inbred Roman high- and low-avoidance rats: differences in anxiety, novelty-seeking, and shuttlebox behaviors. *Physiol Behav.* 1999; 67(1):19-26.
33. Lepicard EM, Joubert C, Hagneau I, Perez-Diaz F, Chapouthier G. Differences in anxiety-related behavior and response to diazepam in BALB/cByJ and C57BL/6J strains of mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000; 67(4):739-48.
34. Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev.* 1997; 21(6):801-10.
35. Belzung C, Griebel G. Measuring normal and pathological anxiety-like behavior in mice: a review. *Behav Brain Res.* 2001; 125(1-2):141-9.
36. Cole JC, Rodgers RJ. Ethological comparison of the effects of diazepam and acute/chronic imipramine on the behaviour of mice in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav.* 1995; 52(3):473-8.
37. Onaolapo AY, Onaolapo OJ, Blessing IC, Hameed SA, Raimot R. Low-dose L-methionine-associated changes in behavioural indices in young rats. *International Journal of Neuroscience and Behavioral Science.* 2016; 4:11-9.
38. Young SN, Shalchi M. The effect of methionine and S-adenosylmethionine on S-adenosylmethionine levels in the rat brain. *J Psychiatry Neurosci.* 2005; 30(1):44–8.
39. Kruman II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L, Mattson MP. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci.* 2000; 20(18):6920-6.
40. Folbergrová J. Anticonvulsant action of both NMDA and non-NMDA receptor antagonists against seizures induced by homocysteine in immature rats. *Exp Neurol.* 1997; 145(2 Pt 1):442-50.
41. Rammal H, Bouayed J, Younos C, Soulimani R. Evidence that oxidative stress is linked to anxiety-related behaviour in mice. *Brain Behav Immun.* 2008; 22(8):1156-9. doi: 10.1016/j.bbi.2008.06.005.
42. Hovatta I, Juhila J, Donner J. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. *Neurosci Res.* 2010; 68(4):261-75. doi: 10.1016/j.neures.2010.08.007.
43. Lalonde R, Barraud H, Ravey J, Guéant JL, Bronowicki JP, Strazielle C. Effects of a B-vitamin-deficient diet on exploratory activity, motor coordination, and spatial learning in young adult Balb/c mice. *Brain Res.* 2008; 1188:122-31.
44. Miller JW, Nadeau MR, Smith D, Selhub J. Vitamin B-6 deficiency vs folate deficiency: comparison of responses to methionine loading in rats. *Am J Clin Nutr.* 1994; 59(5):1033-9.
45. Taysi S, Keles MS, Gumustekin K, Akyuz M, Boyuk A, Cikman O, Bakan N. Plasma homocysteine and liver tissue S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine status in vitamin B6-deficient rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015; 19(1):154-60.
46. Wei W, Liu YH, Zhang CE, Wang Q, Wei Z, Mousseau DD, Wang JZ, Tian Q, Liu GP. Folate/vitamin-B12 prevents chronic hyperhomocysteinemia-induced tau hyperphosphorylation and memory deficits in aged rats. *J Alzheimers Dis.* 2011; 27(3):639-50.
47. Chengfeng S, Wei L, Xinxing W, Lei W, Rui Z, Lingjia Q. Hyperhomocysteinemia is a result, rather than a cause, of depression under chronic stress. *PLoS One.* 2014; 9(10):e106625.
48. Cruz AP, Frei F, Graeff FG. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994; 49(1):171-6.
49. Rodgers RJ, Johnson NJ. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 1995; 52(2):297-303.
50. Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res.* 1997; 30(3):289-304.

ВОЈНОСАНИТЕТСКИ ПРЕГЛЕД

Часопис лекара и фармацеутика Војске Србије

Military Medical and Pharmaceutical Journal of Serbia



Vojnosanitetski pregled

Vojnosanit Pregl 2014; January Vol. 71 (No. 1): p. 1-126.



VOJNOSANITETSKI PREGLED

Prvi broj *Vojnosanitetskog pregleda* izašao je septembra meseca 1944. godine

Časopis nastavlja tradiciju *Vojno-sanitetskog glasnika*, koji je izlazio od 1930. do 1941. godine

IZDAVAČ

Uprava za vojno zdravstvo MO Srbije

IZDAVAČKI SAVET

prof. dr sc. med. **Boris Ajdinović**
prof. dr sc. pharm. **Mirjana Antunović**
prof. dr sc. med. **Dragan Dinčić**, puk.
prof. dr sc. med. **Zoran Hajduković**, puk.
prof. dr sc. med. **Nebojša Jović**, puk.
prof. dr sc. med. **Marijan Novaković**, brigadni general
prof. dr sc. med. **Zoran Popović**, brigadni general (predsednik)
prof. dr **Sonja Radaković**
prof. dr sc. med. **Predrag Romić**, puk.
prim. dr **Stevan Sikimić**, puk.

MEĐUNARODNI UREĐIVAČKI ODBOR

Prof. **Andrej Aleksandrov** (Russia)
Assoc. Prof. **Kiyoshi Ameno** (Japan)
Prof. **Rocco Bellantone** (Italy)
Prof. **Hanoch Hod** (Israel)
Prof. **Abu-Elmagd Kareem** (USA)
Prof. **Hiroshi Kinoshita** (Japan)
Prof. **Celestino Pio Lombardi** (Italy)
Prof. **Philippe Morel** (Switzerland)
Prof. **Kiyotaka Okuno** (Japan)
Prof. **Stane Repše** (Slovenia)
Prof. **Mitchell B. Sheinkop** (USA)
Prof. **Hitoshi Shiozaki** (Japan)
Prof. **H. Ralph Schumacher** (USA)
Prof. **Miodrag Stojković** (UK)
Assist. Prof. **Tibor Tot** (Sweden)

UREĐIVAČKI ODBOR

Glavni i odgovorni urednik
prof. dr sc. pharm. **Silva Dobrić**

Urednici:

prof. dr sc. med. **Bela Balint**
prof. dr sc. stom. **Zlata Brkić**
prof. dr sc. med. **Snežana Cerović**
akademik **Miodrag Čolić**, brigadni general
akademik **Radoje Colović**
prof. dr sc. med. **Aleksandar Đurović**, puk.
prof. dr sc. med. **Branka Đurović**
prof. dr sc. med. **Borisav Janković**
prof. dr sc. med. **Lidija Kandolf-Sekulović**
akademik **Vladimir Kanjuh**
akademik **Vladimir Kostić**
prof. dr sc. med. **Zvonko Magić**
prof. dr sc. med. **Đoko Maksić**, puk.
prof. dr sc. med. **Gordana Mandić-Gajić**
prof. dr sc. med. **Dragan Mikić**, puk.
prof. dr sc. med. **Darko Mirković**
prof. dr sc. med. **Slobodan Obradović**, potpukovnik
akademik **Miodrag Ostojić**
akademik **Predrag Peško**, FACS
akademik **Đorđe Radak**
prof. dr sc. med. **Ranko Raičević**, puk.
prof. dr sc. med. **Predrag Romić**, puk.
prof. dr sc. med. **Vojkan Stanić**, puk.
prof. dr sc. med. **Dara Stefanović**
prof. dr sc. med. **Dušan Štefanović**, puk.
prof. dr sc. med. **Vesna Šuljagić**
prof. dr sc. stom. **Ljubomir Todorović**
prof. dr sc. med. **Milan Višnjijć**
prof. dr sc. med. **Slavica Vučinić**

Tehnički sekretari uređivačkog odbora:

dr sc. Aleksandra Gogić, dr Snežana Janković

REDAKCIJA

Glavni menadžer časopisa:

dr sc. Aleksandra Gogić

Stručni redaktori:

mr sc. med. dr Sonja Andrić-Krivokuća, dr Maja Marković,
dr Snežana Janković

Tehnički urednik: Milan Perovanović

Redaktor za srpski i engleski jezik:

Dragana Mučibabić, prof.

Korektori: Ljiljana Milenović, Brana Savić

Kompjutersko-grafička obrada:

Vesna Totić, Jelena Vasilj, Snežana Čujić



Adresa redakcije: Vojnomedicinska akademija, Institut za naučne informacije, Crnotravska 17, poštanski fah 33–55, 11040 Beograd, Srbija. Telefoni: glavni i odgovorni urednik 3609 311, glavni menadžer časopisa 3609 479, pretplata 3608 997. Faks 2669 689. E-mail (redakcija): vsp@vma.mod.gov.rs

Radove objavljene u „Vojnosanitetskom pregledu“ indeksiraju: Science Citation Index Expanded (SCIE), Journal Citation Reports/Science Edition, Index Medicus (Medline), Excerpta Medica (EMBASE), EBSCO, Biomedicina Serbica. Sadržaje objavljuju Giornale di Medicina Militare i Revista de Medicina Militara. Prikaze originalnih radova i izvoda iz sadržaja objavljuje International Review of the Armed Forces Medical Services.

Časopis izlazi dvanaest puta godišnje. Pretplate: Žiro račun br. 840-314849-70 MO – Sredstva objedinjene naplate – VMA (za Vojnosanitetski pregled), poziv na broj 12274231295521415. Za pretplatu iz inostranstva obratiti se službi pretplate na tel. 3608 997. Godišnja pretplata: 5 000 dinara za građane Srbije, 10 000 dinara za ustanove iz Srbije i 150 € (u dinarskoj protivvrednosti na dan uplate) za pretplatnike iz inostranstva. Kopiju uplatnice dostaviti na gornju adresu.



Risk factors for severe dental anxiety among medical students

Faktori rizika od nastanka izrazitog straha od stomatološke intervencije kod studenata medicine

Slobodan M. Janković*, Dragana Aleksić†, Zulfer Bahtijari*, Anica Jelić*,
Jelena Klačar*, Aleksandra Kovačević‡, Nataša Mijailović*, Olivera
Milovanović*, Aleksandra Petrović*, Ana Radovanović*, Miroslav Sovrlić*,
Dejana Ružić Zečević*

*Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia, †Sector for
Pharmacy, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia; ‡Faculty of Medicine of the
Military Medical Academy, University of Defence, Belgrade, Serbia

Abstract

Background/Aim. Severe dental anxiety (SDA) is the most severe form of dental anxiety, thus the aim of this study was to determine the factors associated with SDA in students of health-related disciplines. **Methods.** In this case-control study the cases were students with severe dental anxiety. The study was conducted at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. The participants were undergraduate students attending lectures during spring semester 2010/2011 ($n = 1,812$). A random sample of 800 students was assessed for the association between various risk factors and the severe dental anxiety. The main outcome measures were the data on demographics, dental anxiety, habits concerning oral hygiene, nutrition, general anxiety and (co)morbidity which were collected from the study participants by semi-structured question-

naire. **Results.** Less frequent visits to the dentist (OR adjusted = 7.02 [2.65; 18.60]) and visiting the dentist only when there is a dental problem (OR adjusted = 8.08 [1.28; 50.93]) were associated with severe dental anxiety. The same was true for improper oral hygiene (OR adjusted = 4.25 [1.16; 15.60]). Factors as changing toothbrush more frequently (OR adjusted = 0.33 [0.14; 0.76]) and having chronic disease (OR adjusted = 0.01 [0.00; 0.09]) were inversely associated with severe dental anxiety. The level of education of students was not associated with severe dental anxiety. **Conclusion.** Inappropriate oral hygiene, less frequent changes of a toothbrush and less frequent visits to the dentist are important risk factors for severe dental anxiety.

Key words:

dental anxiety; students, medical; oral hygiene; dental care.

Apstrakt

Uvod/Cilj. Izraženi strah od stomatoloških intervencija spada u najsnažniji vid straha od zubara, te je cilj ove studije bio da se otkriju faktori koji utiču na nastanak izrazitog straha od stomatološke intervencije kod studenata fakulteta zdravstvene stuke. **Metode.** Učesnici u istraživanju bili su dodiplomski studenti Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, koji su pohađali nastavu tokom letnjeg semestra školske 2010/2011. godine ($n = 1812$). Metodom slučajnog uzorkovanja određeno je 800 studenata kod kojih je utvrđivana povezanost različitih faktora rizika i nastanka izrazitog straha od stomatološke intervencije. Izabrana je studija slučaj – kontrola, pri čemu su slučajevne činili studenti koji imaju izrazit strah od stomatološke intervencije. Svi učesnici istraživanja popunili su specijalno sastavljeni polu-strukturisani upitnik iz koga su dobijeni glavni ishodi studije: demografski podaci, stepen straha od stomatološke intervencije, navike vezane za higijenu usne duplje, način ishrane, stepen opšte anksioznosti i udru-

žene bolesti. **Rezultati.** Ređi odlazak studenata kod stomatologa ($Or_{adjusted} = 7,02 [2,65; 18,60]$) i odlazak samo kada su imali neki problem sa zubima ($Or_{adjusted} = 8,08 [1,28; 50,93]$) bili su povezani sa izrazitim strahom od stomatološke intervencije. Isti rezultat je dobijen i kod studenata sa neadekvatnom higijenom usne duplje ($Or_{adjusted} = 4,25 [1,16; 15,60]$). Ređi nastanak izrazitog straha od stomatološke intervencije bio je povezan sa češćim menjanjem četkice za zube ($Or_{adjusted} = 0,33 [0,14; 0,76]$) i hroničnim oboljenjem ($Or_{adjusted} = 0,01 [0,00; 0,09]$). Stepen obrazovanja studenta nije bio povezan sa izrazitim strahom od stomatološke intervencije. **Zaključak.** Za nastanak izrazitog straha od stomatološke intervencije značajni faktori rizika su neadekvatna higijena usne duplje, ređe menjanje četkice za zube i ređi odlazak kod stomatologa na kontrolne preglede.

Ključne reči:

anksioznost, stomatološka; studenti medicine; usta, higijena; zubi, nega i lečenje.

Introduction

Dental anxiety is exaggerated, fearsome psychological reaction of a person to possible or immediate dental intervention which seems to that person as being harmful or dangerous. Severe dental anxiety (SDA) is the most severe form of dental anxiety¹. The prevalence of SDA is relatively high: in a study on urban population of Goteborg, Sweden, SDA was encountered in 6.7% when scale of dental anxiety with 10 questions was used, and in 5.4% with Corah's dental anxiety scale¹. It is about four times higher in persons between 18 and 39 years of age than in persons older than 60². In Norway SDA was found among 11.3% of 25-year-old males and 19.8% of females of the same age, showing that it affects mostly younger people³. Severe dental anxiety has negative impact on dental and oral cavity health. In patients with SDA the average number of Decayed, Missing and Filled teeth (DMF) score is 18.6 ± 5.6 , and deterioration of dental and oral cavity health, expressed as the presence of root remnants, could be found in as much as 57% of cases⁴.

There are many factors potentially associated with SDA, but their absolute and relative importance was differently estimated in previous studies. While some of the studies found association of general anxiety with the SDA², other studies did not reach such conclusion⁵. Kirova et al.⁶ found that age, level of education and type of labor correlate with the Corah's scale score, while sex of the patients did not. In a case/control study conducted on general population in Denmark, SDA was associated with fear of drilling, negative dentist contacts, general fear tendency, avoidance of treatment and increased oral symptoms⁷. Predictors of SDA in general French population were younger age, living on a farm and unskilled labor⁸.

There are few published studies dealing with the prevalence and/or predictors of SDA in the population of university students. The study on 503 university students from various fields was conducted in Pakistan, showing that the prevalence of high to severe dental anxiety was 21.6% among males and 24% among females⁹, much higher than in general population. Although there is little data on the prevalence among students of health-related disciplines, SDA in this subpopulation could adversely affect their attitude towards the patients with dental problems and aggravate their future communication with patients.

The aim of our study was to investigate the prevalence and risk factors associated with SDA in medical students.

Methods

Our study was conducted at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, a higher public education institution situated at the town of Kragujevac, Serbia. The study population consisted of all the students of undergraduate studies who attended lectures regularly in spring semester of the school year 2010/2011 ($n = 1.812$).

The study was conducted on a random sample of 800 students in April and May, 2011. Demographic data and data on dental anxiety, habits concerning dental and oral cavity

hygiene, nutrition, general anxiety and (co)morbidity were obtained from an anonymous structured questionnaire. All the data were obtained after previous written consent of the study participants, and the study protocol was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac.

Based on the expected study power of 80%, the probability of the statistical error type 1 (α) of 0.05, two-way testing of difference in frequencies of risk factors between the study groups using χ^2 -test, and the expected difference of 12% in reasons for visiting a dentist (with frequency of 40% for a reason in one of the groups) we calculated a minimal sample size of 605 students in both groups¹⁰. In order to compensate for response failure, we decided to work with a sample of 800 students.

The study sample of 800 students was chosen randomly from the study population in following way: a list of all students was taken from the Faculty's offices and the students on the list were numbered from 1 to 1,820; then, using the function "randbetween" from the Microsoft Excel program, version 2007, 800 the students were chosen from the list.

The design of our study was of the case-control type, with the aim to assess the association between various risk factors and the occurrence of SDA. The study participants completed the Corah's dental anxiety self-rating scale. The Corah's dental anxiety scale consists of 4 items with score range from 4 to 20. Participants who score 15 or higher on the Corah's dental anxiety scale were considered to belong to the group with SDA. The cases were all students from the study sample with the SDA, i.e. having a score of 15 or higher on Corah's dental anxiety scale^{1,2}. The controls were selected from the study sample after matching with the cases by age and sex. From the matching students we selected four study participants for each case (sex- and age- matched), using the function "randbetween" from the Microsoft Excel program, version 2007. No exclusion criteria were employed for both cases and controls.

In order to identify potential risk factors, the following groups of variables were measured: socio-demographic data (sex, age, year of study, average grade, number of repeated academic years, monthly income of students' families and having a chronic disease), pattern of visiting dentist (frequency of visiting a dentist, reason for visiting a dentist, having a chosen dentist, using private or public dental service, having frightening experience with a dentist and family attitude towards visiting a dentist), pattern of keeping dental and oral cavity hygiene (frequency of brushing teeth, use of a dental floss, frequency of changing a toothbrush and average duration of brushing teeth), dental status (number of extracted permanent teeth, number of filled permanent teeth and number of decayed permanent teeth and halitosis) and feeding habits (frequency and quantity of sweets consumed and frequency and quantity of uncooked fruits and vegetables consumed). The variables were measured using structured questionnaire.

Dental anxiety was measured by the Corah's dental anxiety scale^{1,2}. General anxiety was measured by the Zung self-rating anxiety scale score. This scale consists of 20 self-

reported items related to anxiety symptoms with a total score range from 20 to 80. The score range 20–44 indicates normal state, 45–59 mild to moderate anxiety levels, 60–74 marked to severe anxiety levels and 75–80 extreme anxiety levels¹¹.

The prevalence of each risk factor was determined for both cases and controls. The differences between cases and controls in the observed characteristics were assessed by the Student *t*-test for continuous variables and the χ^2 -test for frequencies. The differences were considered significant if probability of null hypothesis was less than 0.05. In order to estimate the association between potential risk factors and

SDA, crude and adjusted odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (95% CI) were calculated using logistic regression^{12, 13}.

Results

The total number of students enrolled in the study was 800, out of who 620 students responded to the questionnaire (response rate 77.5%), and were included in final data analysis. Baseline characteristics of the cases and controls, and the differences between them, are shown in Table 1. The differ-

Table 1

Socio-demographic data, pattern of visiting the dentist, pattern of keeping dental and oral cavity hygiene, dental status and feeding habits in the study group and controls*

Variables	Study group (n = 46)	Controls (n = 184)	Statistical significance (<i>p</i>)	Crude OR (95% CI)
Sex, n (%)				
male	7 (15%)	28 (15)		
female	39 (85)	156 (85)	1.000	1.00 (0.41, 2.46)
Age (years), $\bar{x} \pm SD$	22.6 \pm 3.7	22.1 \pm 2.5	0.247	1.07 (0.96, 1.19)
Frequency of visiting a dentist, n (%)				
< once in 2 years	9 (20)	11 (6)		
once in 2 years	11 (24)	17 (9)		
once per year	18 (39)	59 (32)	0.000**	2.21 (1.58, 3.09)
\geq 2 times per year	8 (17)	97(53)		
Reason for visiting a dentist, n (%)				
primarily when there is a problem	41(89)	109(59)	0.000**	5.64 (2.13, 14.94)
primarily for check-up	5 (11)	75 (41)		
Number of decayed permanent teeth, $\bar{x} \pm SD$	1.8 \pm 1.5	1.0 \pm 2.5	0.030**	1.15 (0.97, 1.36)
Halitosis, n (%)	1/34/11	10/156/18		
yes	1 (2)	10 (5)	0.028**	2.70 (1.26, 5.82)
no	34 (74)	156 (85)		
do not know	11 (24)	18 (10)		
Frequency of brushing teeth times per day, $\bar{x} \pm SD$	2.4 \pm 0.8	2.7 \pm 0.8	0.013**	0.56 (0.35, 0.89)
Frequency of changing a toothbrush, n (%)				
once per 2 months or more frequently	21 (46)	65 (35)		
every 2–6 months	17(37)	99 (54)		
every 6–12 months	6 (13)	13 (7)	0.214	0.95 (0.62, 1.46)
once per year or more rarely	2 (4)	7 (4)		
Average duration of brushing teeth (minutes), $\bar{x} \pm SD$	2.8 \pm 1.0	3.2 \pm 1.4	0.090	0.77 (0.57, 1.04)
Frequency of fresh fruits intake, n (%)				
every day	19 (41)	114 (62)		
3–4 times per week	12 (26)	47 (26)		
once per week	6 (13)	15 (8)	0.002**	1.79 (1.29, 2.46)
rarely	9 (20)	8 (4)		
Frequency of fresh vegetables intake, n (%)				
every day	19 (41)	114 (62)		
3–4 times per week	12 (26)	47 (26)		
once per week	6 (13)	15 (8)	0.006**	1.62 (1.18, 2.23)
rarely	9 (20)	8 (4)		
Having a chronic disease, n (%)				
yes	1 (2)	29 (16)	0.014**	0.12 (0.02, 0.90)
no	45 (98)	155 (84)		
Having frightening experience with a dentist, n (%)				
yes	23(50)	45 (24)	0.001**	3.09 (1.58, 6.03)
no	23(50)	139 (76)		
Zung Self-Rating Anxiety Scale score, $\bar{x} \pm SD$	34.7 \pm 9.2	33.5 \pm 8.6	0.421	1.02 (0.98, 1.05)

*For the sake of clarity, variables with frequency of an event less than 2% and some less important variables with insignificant differences between the cases and the controls are not shown in the table; **Significant difference; OR – odds ratios; CI – confidence interval.

ences between the cases and controls were not significant in terms of age, sex, year of study, average grade, number of repeated academic years, monthly income of students families, frequency of visiting a dentist, number of extracted permanent teeth, number of filled permanent teeth, use of a dental floss, frequency of changing a toothbrush, average duration of brushing teeth, using private or public dental service, frequency and quantity of sweets consumed, quantity of uncooked fruits and vegetables consumed, family attitude towards visiting a dentist and the Zung self-rating anxiety scale score.

However, significant differences between the cases and controls were found in: the reason for visiting a dentist, the number of decayed permanent teeth, halitosis, frequency of brushing teeth, having a chosen dentist, frequency of uncooked fruits and vegetables consumed, having a chronic disease and having frightening experience with a dentist.

The results of the logistic regression analysis (Cox & Snell R square 0.405, Nagelkerke R square 0.633, Hosmer-Lemeshow Chi square 21.05, $df = 8$, $p = 0.007$) with adjustment for potential confounders are shown in Table 2. The

(see Tables 1 and 2), after adjustment confidence limits of these odds ratios included the value of one.

The interaction between risk factors which are likely to have an additive risk for SDA was investigated (Table 3). The analysis did not show a clear synergistic effect for any of factors that were individually associated with SDA. Although adjusted odds ratios were still significant and their confidence limits excluded the value of one when the frequency of visiting a dentist interacted with the reason for visiting a dentist, or when the reason for visiting a dentist interacted with halitosis, synergistic effects could not be confirmed because adjusted odds ratios did not increase, but remained closer to one than odds ratios for individual factors.

Discussion

The obtained results show that the students visiting a dentist less frequently and only when they have a dental problem are more prone to have SDA. The same is true for those with improper oral hygiene and having halitosis. On the other hand, the study participants changing toothbrush

Table 2
Crude and adjusted odds ratios (OR) of the risk factors for severe dental anxiety

Risk factors	Crude OR (95% CI)	Adjusted* OR (95% CI)
Frequency of visiting a dentist (< once in 2 years/once in 2 years/ once per year/ ≥ 2 times per year)	2.21 (1.58, 3.09)	7.02 (2.65, 18.60)
Reason for visiting a dentist (primarily when there is a problem/primarily for check-up)	5.64 (2.13, 14.94)	8.08 (1.28, 50.93)
Halitosis	2.70 (1.26, 5.82)	4.25 (1.16, 15.60)
Frequency of changing a toothbrush (once per 2 months or more frequently/every 2-6 months/every 6-12 months/once per year or more rarely)	0.95 (0.62, 1.46)	0.33 (0.14, 0.76)
Having a chronic disease	0.12 (0.02, 0.90)	0.01 (0.00, 0.09)
Study course: physician/dentist/pharmacist/nurse/physiotherapist	1.54 (1.22, 1.94)	1.53 (0.93, 2.51)
Frequency of brushing teeth (times per day)	0.56 (0.35, 0.89)	0.46 (0.19, 1.07)
Having frightening experience with a dentist	3.09 (1.58, 6.03)	6.35 (0.56, 73.07)
Having a chosen dentist	0.50 (0.26, 0.95)	2.60 (0.59, 11.38)

*Adjusted for year of study†, average grade†, number of repeated academic years†, monthly income of a student's family†, frequency of visiting a dentist†, number of extracted permanent teeth†, number of filled permanent teeth†, use of a dental floss†, frequency of changing a toothbrush, average duration of brushing teeth†, using private or public dental service†, frequency and quantity of sweets consumed†, quantity of uncooked fruits and vegetables consumed†, parental education†, family attitude towards visiting a dentist†, area of residence†, parental age†, number of siblings†, Zung Self-Rating Anxiety Scale score†, study course, reason for visiting a dentist, number of decayed permanent teeth†, halitosis, frequency of brushing teeth, having a chosen dentist, frequency of uncooked fruits and vegetables consumed†, having a chronic disease and having frightening experience with a dentist.

†Crude and adjusted odds ratios are not shown in the table for the sake of clarity.

only significant associations were between severe dental anxiety and frequency of visiting a dentist ($OR_{adjusted}$ 7.02; CI 2.65, 18.60; $p = 0.000$), reason for visiting a dentist ($OR_{adjusted}$ 8.08; CI 1.28, 50.93; $p = 0.026$), halitosis ($OR_{adjusted}$ 4.25; 1.16, 15.60; $p = 0.029$), frequency of changing a toothbrush ($OR_{adjusted}$ 0.33; CI 0.14, 0.76; $p = 0.009$) and having a chronic disease ($OR_{adjusted}$ 0.01; CI 0.00, 0.09; $p = 0.002$). Although the crude odds ratios for frequency of brushing teeth, having frightening experience with a dentist and having a chosen dentist were significantly different from one

more frequently and having chronic disease also less frequently have SDA. Our results are partially in accordance with the results of a Danish study⁷, since visiting a dentist rarely and only when there is a problem is actually avoidance of treatment. The association of avoidant behavior, poor oral hygiene and the SDA was also observed in several case reports¹⁴. It is interesting that the level of education of the students (year of study) was not associated with the occurrence of SDA, showing that only understanding of the problem is not helpful for relieving SDA.

Table 3

Interactions between the frequency of visiting a dentist and the reason for visiting a dentist and the reason for visiting a dentist and halitosis

Variables	Crude odds ratio (95% CI)	Adjusted* odds ratio (95% CI)
No difference in frequency of visiting dentist	1.0 (reference)	1.0 (reference)
Only frequency of visiting a dentist (<once in 2 years/once in 2 years/once per year/≥ 2 times per year)	2.21 (1.58, 3.09)	7.02 (2.65, 18.60)
Only reason for visiting a dentist (primarily when there is a problem/primarily for check-up)	5.64 (2.13, 14.94)	8.08 (1.28, 50.93)
Both frequency of visiting a dentist and reason for visiting a dentist	2.22 (1.65, 2.97)	4.87 (2.32, 10.20)
No halitosis	1.0 (reference)	1.0 (reference)
Only reason for visiting a dentist (primarily when there is a problem/primarily for check-up)	5.64 (2.13, 14.94)	8.08 (1.28, 50.93)
Only halitosis	2.70 (1.26, 5.82)	4.25 (1.16, 15.60)
Both reason for visiting a dentist and halitosis	2.21 (1.49, 3.28)	2.77 (1.31, 5.87)

*Adjusted for year of study, average grade, number of repeated academic years, monthly income of a student's family, frequency of visiting a dentist, number of extracted permanent teeth†, number of filled permanent teeth, use of a dental floss, frequency of changing a toothbrush, average duration of brushing teeth‡, using private or public dental service, frequency and quantity of sweets consumed, quantity of uncooked fruits and vegetables consumed, parental education, family attitude towards visiting a dentist, area of residence, parental age, number of siblings, Zung Self-Rating Anxiety Scale score, study course, reason for visiting a dentist, number of decayed permanent teeth, halitosis, frequency of brushing teeth, having a chosen dentist, frequency of uncooked fruits and vegetables consumed, having a chronic disease and having frightening experience with a dentist.

In spite of widespread beliefs that fear and anxiety of dental treatment is a simple continuum of frightening experience that occurred in the past, this link is not straightforward, and there are numerous examples where previous frightening experience does not exist in persons with very SDA¹⁵. Whether a person will develop SDA after a painful experience with a dentist depends a lot on her/his cognitive abilities; it was shown that younger and less educated more frequently develop SDA than others^{2,3,16}. Besides, good verbal and nonverbal communication between dentist and patient, which reflects care, respect and empathy, is strong preventative factor against the development of SDA¹⁷.

An interesting finding in our study was that the students with chronic diseases had fewer chances to develop SDA. This could be explained by observation that children with chronic illness use coping as their predominant strategy for adapting to common painful and stressful events¹⁸, which helps them to avoid developing SDA.

Frequency of brushing teeth was associated with decreased chances of the SDA in our study. Although there are no other studies confirming such link, frequent teeth brushing and other positive elements of oral hygiene behavior were linked to good dental caries status in students¹⁹ and avoidance of visiting a dentist was associated with poor oral hygiene²⁰, suggesting an indirect association advocating our results.

The factors associated with SDA in our study were not interacting with each other, but acted rather independently. When interactions were introduced in the logistic regression model, the odds ratios for the associated factors decreased instead to increase, confirming their independence.

Although in children aged 3–6 years²¹ and 15-year-olds²² SDA is positively correlated with general anxiety, our study shows that this is not the case in student population.

Our findings are in accordance with other studies of dental anxiety among patients older than 15 years, which either show that the correlation between SDA and general anxiety observed in children weakens with their transition to adolescence and adulthood²³, or do not find any correlation between SDA and general anxiety²⁴. Previously published explanations of this phenomenon are only tentative, and further research is necessary for full understanding of this disagreement.

In our study we did not take into account variables representative of personality characteristics, which is serious limitation. It has already been shown in general population that neurotic extraverts who seek for novelty and experience brief dissociative periods and magical thinking are prone to develop SDA²⁵. Perfectionism was found to be associated with general anxiety and distress in university students of health-related disciplines, and it might be associated with the SDA, as well²⁶. Therefore, in order to better understand causes of SDA, future research of risk factors for SDA in medical students which will include personality traits is necessary.

Conclusion

The results of our study suggest that avoidant behavior in regard to visiting the dentist and poor oral hygiene are factors more frequently associated with SDA than patient's medical knowledge or previous negative experiences with the dentist.

Acknowledgements

This study was partially financed by the grant No. 175007 given by the Serbian Ministry of Education, Science and Technological Development and by the grant given by the Ministry of Science, Montenegro.

R E F E R E N C E S

1. *Hakeberg M, Berggren U, Carlsson SG.* Prevalence of dental anxiety in an adult population in a major urban area in Sweden. *Community Dent Oral Epidemiol* 1992; 20(2): 97–101.
2. *Humphris GM, Dyer TA, Robinson PG.* The modified dental anxiety scale: UK general public population norms in 2008 with further psychometrics and effects of age. *BMC Oral Health* 2009; 9: 20.
3. *Astrom AN, Skaret E, Haugejorden O.* Dental anxiety and dental attendance among 25-year-olds in Norway: time trends from 1997 to 2007. *BMC Oral Health* 2011; 11: 10.
4. *Boman UW, Lundgren J, Berggren U, Carlsson SG.* Psychosocial and dental factors in the maintenance of severe dental fear. *Swed Dent J* 2010; 34(3): 121–7.
5. *Bellini M, Maltoni O, Gatto MR, Pelliccioni G, Checchi V, Checchi L.* Dental phobia in dentistry patients. *Minerva Stomatol* 2008; 57(10): 485–95. (English, Italian)
6. *Kirova DG, Atanasov DT, Lalabonova CK, Janevska S.* Dental anxiety in adults in Bulgaria. *Folia Med (Plovdiv)* 2010; 52(2): 49–56.
7. *Moore R, Birn H, Kirkegaard E, Brodsgaard I, Schentz F.* Prevalence and characteristics of dental anxiety in Danish adults. *Community Dent Oral Epidemiol* 1993; 21(5): 292–6.
8. *Nicolas E, Collado V, Faulks D, Bullier B, Hennequin M.* A national cross-sectional survey of dental anxiety in the French adult population. *BMC Oral Health* 2007; 7: 12.
9. *Shaikh MA, Kamal A.* Over dental anxiety problems among university students: perspective from Pakistan. *J Coll Physicians Surg Pak* 2011; 21(4): 237–8.
10. *Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang AG.* Statistical power analyses using G*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods* 2009; 41(4): 1149–60.
11. *Zung WW.* A rating instrument for anxiety disorders. *Psychosomatics* 1971; 12(6): 371–9.
12. *Machin D, Campbell MJ, Walters SJ.* *Medical Statistics, a textbook for the health sciences.* 4th ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2007.
13. *Perera R, Heneghan C, Badenoch D.* *Statistics Toolkit.* 1st ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing; 2008.
14. *Levitt J, Megoldrick P, Evans D.* The management of severe dental phobia in an adolescent boy: a case report. *Int J Paediatr Dent* 2000; 10(4): 348–53.
15. *Weiner AA, Sheehan DV.* Differentiating anxiety-panic disorders from psychologic dental anxiety. *Dent Clin North Am* 1988; 32(4): 823–40.
16. *Maggiaris J, Locker D.* Psychological factors and perceptions of pain associated with dental treatment. *Community Dent Oral Epidemiol* 2002; 30(2): 151–9.
17. *Bernson JM, Hallberg LR, Elfstrom ML, Hakeberg M.* 'Making dental care possible: a mutual affair': a grounded theory relating to adult patients with dental fear and regular dental treatment. *Eur J Oral Sci* 2011; 119(5): 373–80.
18. *Olson AL, Johansen SG, Powers LE, Pope JB, Klein RB.* Cognitive coping strategies of children with chronic illness. *J Dev Behav Pediatr* 1993; 14(4): 217–23.
19. *Kumar S, Gupta A, Dixit A, et al.* Factors that effect dental caries status of medical students in Udaipur city, India. *Int J Dent Hyg* 2010; 8(2): 110–5.
20. *Pohjola V, Lahti S, Tolvanen M, Hansen H.* Dental fear and oral health habits among adults in Finland. *Acta Odontol Scand* 2008; 66(3): 148–53.
21. *Salem K, Kousba M, Anissian A, Shababi A.* Dental Fear and Concomitant Factors in 3-6 Year-old Children. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospect* 2012; 6(2): 70–4.
22. *Stenebrand A, Boman UW, Hakeberg M.* Dental anxiety and symptoms of general anxiety and depression in 15-year-olds. *Int J Dent Hyg* 2012; 11(2): 99–104.
23. *Fejérdy L, Fábíán C, Kaán B, Fábíán G, Gáspár J, Fábíán TK.* Epidemiological study of dental fear scores in several Hungarian sub-populations. *Fogorv Sz* 2003; 96(6): 277–81.
24. *Smith TA, Heaton LJ.* Fear of dental care: are we making any progress? *J Am Dent Assoc* 2003; 134(8): 1101–8.
25. *Bergdahl M, Bergdahl J.* Temperament and character personality dimensions in patients with dental anxiety. *Eur J Oral Sci* 2003; 111(2): 93–8.
26. *Henning K, Ey S, Shaw D.* Perfectionism, the imposter phenomenon and psychological adjustment in medical, dental, nursing and pharmacy students. *Med Educ* 1998; 32(5): 456–64.

Received on February 29, 2012.

Revised on October 1, 2012.

Accepted on October 15, 2012.