

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Marija T. Stojanović

**FUNKCIONALNE, BIOHEMIJSKE I
HISTOLOŠKE PROMENE U
DIGESTIVNOM TRAKTU PACOVA U
USLOVIMA AKUTNE
HIPERHOMOCISTEINEMIJE ILI
SUBHRONIČNE STIMULACIJE
METIONINOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Marija T. Stojanović

**FUNCTIONAL, BIOCHEMICAL AND
HISTOLOGICAL CHANGES IN RAT
DIGESTIVE TRACT IN ACUTE
HYPERHOMOCYSTEINEMIA OR
SUBCHRONIC METHIONINE
STIMULATION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Mentor :

Prof. dr Ljiljana Šćepanović, Institut za medicinsku fiziologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Komentor :

Prof. dr Nebojša Radovanović, Klinika za digestivnu hirurgiju KCS, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

1. Prof. dr Dragan Đurić, Institut za medicinsku fiziologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Vesna Dragutinović, Institut za hemiju u medicini, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Gvozden Rosić, Katedra za fiziologiju, Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu

Zahvaljujem se svom mentoru prof. dr Ljiljani Šćepanović na nesebičnoj podršci tokom izrade doktorske disertacije. Veliko hvala na svom prenesenom znanju, iskustvu, smernicama i prijateljskom razumevanju. Naša saradnja me je naučila da zajedno možemo sve i da su posle upornog i predanog rada rezultati neminovni.

Zahvalnost dugujem i prof. dr Draganu Đuriću, rukovodiocu projekta u okviru koga je realizovana disertacija. Hvala na pruženoj mogućnosti da istraživanje realizujem u adekvatnim uslovima, na vremenu izdvojenom za sugestije, usmeravanja, komentare.

Hvala prof. dr Vesni Dragutinović i prof. dr Sunčici Borozan na nesebičnoj pomoći i saradnji u oblasti biohemijskih ispitivanja.

Zahvaljujem i timu Instituta za histologiju i embriologiju predvođenom doc. dr Milicom Labudović-Borović na pomoći oko pripreme uzoraka za histološka ispitivanja i analize preparata, uz prijateljske sugestije i savete.

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

Ova disertacija je posvećena mojoj porodici uz zahvalnost za nesebično ulaganje u moje obrazovanje.

Marija Stojanović

FUNKCIONALNE, BIOHEMIJSKE I HISTOLOŠKE PROMENE U DIGESTIVNOM TRAKTU PACOVA U USLOVIMA AKUTNE HIPERHOMOCISTEINEMIJE ILI SUBHRONIČNE STIMULACIJE METIONINOM

REZIME

Uvod: Homocistein (Hcy) je semi-esencijalna aminokiselina koja sadrži sumpor dobijen iz metionina. *In vitro* i *in vivo* studije na pacovima pokazale su alteraciju parametara oksidativnog stresa nakon primene metionina. Hiperhomocisteinemija (HHC) je uključena u patogenezu brojnih bolesti kako svojim prooksidantnim dejstvom tako i oštećenjem antioksidativne zaštite. L-cistein i N-acetil-L-cistein prepoznati su kao supstance sa antioksidativnim kapacitetom u digestivnom traktu. Jedan od načina na koji HHC menja kontraktilni odgovor creva jeste i modulacija nitregičke neurotransmisije. Studije sprovedene na pacijentima sa HHC ukazuju na to da povišene vrednosti Hcy u plazmi smanjuju stvaranje azot monoksida (NO) i njegove efekte. Cilj ove studije je da utvrdi da li akutna stimulacija homocisteinom ili subhronično opterećenje metioninom dovodi do pojave oksidativnog stresa, i da li L-cistein i N-acetil-L-cistein kao dokazani antioksidansi mogu modulirati efekte subhronične aplikacije metionina. Takođe cilj ovog rada bio je da ispita efekte najtoksičnijeg metabolita homocisteina, tj. D,L-homocistein tiolaktona na kontraktilnost izolovanog creva pacova.

Materijal i metode: Za protokol akutne HHC *in vivo* životinje su bile podeljene u dve grupe (6 po grupi): 1. 1 ml 0,9% NaCl i.p.; 2. 0,6 $\mu\text{mol/g}$ tm D,L- homocisteina i.p.. Nakon 2 sata boravka u laboratorijskim uslovima, životinje su žrtvovane, a tkiva creva i jetre su pripremljena za određivanje pokazatelja oksidativnog statusa (CAT, GPx, SOD, TAS i indeks lipidne peroksidacije). Radi ispitivanja efekata akutne HHC na izolovana tkiva (*in vitro* uslovi) parametri oksidativnog stresa su određivani u tkivima creva i jetre inkubiranim u Tirodovom rastvoru i D,L-homocistein tiolaktonu (10 $\mu\text{mol/L}$) u toku 3 h. U supernatantu su određivani parametri oksidativnog stresa (CAT, TBARS, TAS). Pratio se tonus, amplituda i frekvencija spontanijh kontrakcija izolovanog creva u Tirodovom rastvoru i u

prisustvu D,L-homocistein tiolaktona i supstanci koje utiču na NO posredovanu neurotransmisiju (L-Arginin-10 $\mu\text{mol/L}$, L-NAME-30 $\mu\text{mol/L}$). Životinje su bile podvrgnute subhroničnom opterećenju metioninom i.p., podeljene u četiri grupe (n=6 po grupi) i tretirane prema sledećem režimu: 1.Kontrolna grupa (0,9% NaCl 1 ml/dan); 2.Metionin (0,8mmol/kg/tm/dan); 3.Metionin (0,8mmol/kg/tm/dan) + L-cistein (7mg/kg/tm/dan); 4.Metionin (0,8mmol/kg/tm/dan) + N-acetil-L-cistein (50 mg/kg/tm/dan). Posle 21. dana tretmana životinje su žrtvovane giljotinom za pacove, a potom su tkiva creva i jetre izolovani i pripremljeni za biohemijska i histološka ispitivanja.

Rezultati: Dvočasovna inkubacija u D,L-homocisteinu dovela je do značajnog smanjenja aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu u svim ispitivanim organima. Aktivnost GPx bila je značajno snižena u svim organima, izuzev u kolonu gde sniženje nije bilo statistički značajno. Tokom 3h inkubacije u D,L-homocistein tiolaktonu (*in vitro*) svi parametri oksidativnog statusa bili su statistički visoko značajno promenjeni- aktivnost CAT snižena, koncentracija TBARS povišena, vrednost TAS povišena. D,L-homocistein tiolakton doveo je do povećanja tonusa, amplitude i frekvencije spontanih pokreta izolovanog duodenuma, ileuma i kolona. U prisustvu D,L-homocistein tiolaktona L-NAME doveo je do značajnog povećanja kontraktilnih parametara izolovanog duodenuma. Morfometrijska merenja u tkivu kolona pokazala su statistički značajno povećanje vrednosti svih parametara u metioninskoj grupi u poređenju sa kontrolom, a smanjenje u C (Metionin + L-Cistein) i N (Metionin + N-acetil-L-cistein) grupi u odnosu na metioninsku grupu, izuzev debljine zida creva, gde nije bilo statistički značajne razlike među grupama. Tokom tronedeljnog opterećenja metioninom parametri oksidativnog statusa bili su statistički značajno izmenjeni u jetri: aktivnost CAT povišena u C i N grupi; aktivnost GPx snižena u C grupi; GSH koncentracija povišena u grupi N; aktivnost AchE povišena u grupama C i N.

Zaključak: Akutna *in vivo* inkubacija u D,L-homocisteinu i *in vitro* u D,L-homocistein tiolaktonu dovela je do nastanka oksidativnog oštećenja tkiva. D,L-homocistein tiolakton povećao je tonus, amplitudu i frekvenciju spontanih pokreta duodenuma, što implicira kliničku primenu supstanci sa sličnim dejstvom u terapiji poremećaja motiliteta GIT-a.

Subhronična primena metionina utiče na oksidativni status i morfometrijske parametre u ispitivanim tkivima.

Ključne reči: motilitet, oksidativni stres, homocistein, metionin, crevo, jetra, pacov

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Medicinska fiziologija

FUNCTIONAL, BIOCHEMICAL AND HISTOLOGICAL CHANGES IN RAT DIGESTIVE TRACT IN ACUTE HYPERHOMOCYSTEINEMIA OR SUBCHRONIC METHIONINE STIMULATION

ABSTRACT

Introduction: Homocysteine (Hcy) is semi-essential amino acid which contains sulfur from methionine. *In vivo* and *in vitro* studies on rats showed alteration of oxidative stress parameters after methionine administration. Hyperhomocysteinemia (HHC) takes part in pathogenesis of various diseases with its prooxidant capacity, and by damaging antioxidative defence as well. L-cysteine and N-acetyl-L-cysteine are substances with antioxidative capacity in the gut. One of the pattern by which HHC change the contractile response of the gut is modulation of the nitrergic neurotransmission. Studies included patients with HHC showed that increased plasma Hcy concentrations decreased NO production and its effects. This research aimed to investigate effects of acute Hcy stimulation or subchronic methionine administration on oxidative stress parameters, and L-cysteine and N-acetyl-L-cysteine modulation of subchronic methionine load effects. Also, the aim was to investigate the effects of the most toxic metabolite of homocysteine, D,L-homocysteine thiolactone, on the contractility of isolated segments of the intestine.

Material and methods: For the acute HHC protocol *in vivo*, animals were divided into two groups (6 per group): 1. 1 ml 0.9% NaCl i.p.; 2. 0.6 $\mu\text{mol/g}$ tm D,L- homocysteine i.p. After 2h in laboratory conditions, animals were sacrificed, and gut and liver tissues were taken for further analysis (CAT, GPx, SOD, TAS, index of lipid peroxidation). For investigation of the effects of the acute HHC *in vitro*, oxidative stress parameters were determined in the gut and the liver incubated in Tyrode solution and D,L-homocysteine thiolactone (10 $\mu\text{mol/L}$) during 3h. In the tissue supernatant oxidative stress parameters were analyzed (CAT, TBARS, TAS). The tone, amplitude and frequency of the contractions of the isolated intestine segments were measured in Tyrode solution and in the presence of D,L-homocysteine thiolactone and substances which modulates NO transmission (L-Arginin-10 $\mu\text{mol/L}$, L-NAME-30 $\mu\text{mol/L}$). For subchronic methionine load

animals were divided into four groups (n=6): 1. Control group (0.9% NaCl 1 ml/day); 2. Methionine (0.8 mmol/kg/bw/day); 3. Methionine (0.8mmol/kg/bw/day) + L-cysteine (7mg/kg/bw/day); 4.Methionine (0.8mmol/kg/bw/day) + N-acetyl-L-cysteine (50mg/kg/bw/day). After 21 day of the treatment, animals were sacrificed, and gut and liver tissues were collected for biochemical and histological investigations.

Results: Two hours incubation in D,L-homocysteine leded to significant decrease of SOD activity compared to control, in all examined organs. Activity of GPx was significantly decreased in all examined organs, except in colon where decrease wasn't statistically significant. During 3h incubation in D,L-homocysteine thiolactone (*in vitro*) all oxidative stress parameters were highly statistically significant changed- CAT activity decreased, TBARS concentration increased, TAS value increased. D,L-homocysteine thiolactone leded to increase of the tone, amplitude and frequency of the isolated rat duodenum, ileum and colon. In the presence od D,L-homocysteine thiolactone, L-NAME significantly increased the contractile parameters of the isolated rat duodenum. Morphometric measurements in the colon tissue showed statistically significant increase of all parameters in methionine group compared to control, and decrease in C (L-cysteine) and N (N-acetyl-L-cysteine) group compared to methionine group, except the thickness of the colon wall, where no statistically significant changes were observed. During 3 week methionine load oxidative stress parameters were statistically significant changed in the liver: CAT activity increased in C and N group; GPx activity decreased in C group; GSH concentration increased in N group; AchE activity increased in C and N group.

Conclusion: Acute *in vivo* incubation in D,L-homocysteine and *in vitro* in D,L-homocysteine thiolactone leded to oxidative tissue damage. D,L-homocysteine thiolactone increaced the tone, amplitude and frequency of spontaneous contractions of isolated rat duodenum. This implicated clinical usage of the substances which would mimicking the D,L-homocysteine thiolactone effects, in the therapy of the gastrointestinal motility disorders. Subchronic methionine administration affected the oxidative status and morphometric parameters in examined tissues.

Keywords: motility, oxidative stress, homocysteine, methionine, gut, liver, rat

Scientific field: Medicine

Major in: Medical physiology

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Homocistein - metabolizam, funkcija i klinički značaj	2
1.1.1. Metabolizam homocisteina	4
1.1.2. Ciklus metionin - homocistein - metionin	5
1.1.3. Biohemijska osnova hiperhomocisteinemije	7
1.1.4. Homocistein kao faktor rizika za nastanak gastrointestinalnih oboljenja	9
1.1.5. Uticaj homocisteina na motoriku digestivnog trakta	10
1.2. Azot monoksid kao neurotransmiter u gastrointestinalnom traktu	11
1.2.1. Inervacija gastrointestinalnog trakta (GIT-a) - uloga neadrenergičkih - neholinergičkih (NANH) nerava	13
1.2.2. Azot monoksid (NO)	14
1.2.3. Mehanizam dejstva azot monoksida (NO)	15
1.3. Metionin - metabolizam, funkcija i eksperimentalna primena	16
1.4. Oštećenje slobodnim radikalima kao patofiziološki mehanizam nastanka bolesti digestivnog trakta	19
1.5. Sumporovite aminokiseline kao antioksidansi	21
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	23
3. MATERIJAL I METODE	25
3.1. Eksperimentalne životinje	26
3.2. Eksperimentalni protokol	26
3.2.1. Akutna hiperhomocisteinemija	26
3.2.1.A. Akutna hiperhomocisteinemija u <i>in vivo</i> uslovima	26
3.2.1.B. Akutna hiperhomocisteinemija u <i>in vitro</i> uslovima	27
3.2.2. Praćenje kontraktilnog odgovora izolovanog creva	27
3.2.3. Subhronično i.p. opterećenje metioninom tokom 3 nedelje	30
3.3. Biohemijske analize	31
3.3.1. Određivanje ukupnog homocisteina u serumu	31
3.3.2. Određivanje aktivnosti acetilholinesteraze (AchE)	31
3.3.3. Određivanje parametara oksidativnog stresa	31

3.3.3.1. Analiza enzimske aktivnosti katalaze (CAT)	31
3.3.3.2. Analiza enzimske aktivnosti glutacion peroksidaze (GPx)	32
3.3.3.3. Analiza enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)	32
3.3.3.4. Određivanje stepena lipidne peroksidacije	32
3.3.3.5. Određivanje sadržaja redukovanog glutationa (GSH)	33
3.3.3.6. Određivanje totalnog antioksidativnog statusa (TAS)	33
3.4. Histološke analize	34
3.4.1. Morfometrijska merenja	34
3.4.2. Analiza elemenata vezivnog tkiva lamine proprije	35
3.5. Statistička analiza	36
4. REZULTATI	37
4.1. AKUTNA HIPERHOMOCISTEINEMIJA <i>IN VIVO</i>	38
4.1.1. Efekti D,L-homocisteina na parametre oksidativnog stresa u tkivu duodenuma, ileuma, kolona i jetre pacova	38
4.2. AKUTNA HIPERHOMOCISTEINEMIJA <i>IN VITRO</i>	47
4.2.1. Parametri oksidativnog stresa u izolovanim segmentima creva i jetre pacova u kontrolnim uslovima	47
4.2.2. Efekti D,L-homocistein tiolaktona na parametre oksidativnog stresa u izolovanim segmentima creva i jetre pacova	50
4.3. KONTRAKTILNI ODGOVOR IZOLOVANOG CREVA	54
4.3.1. Spontana aktivnost longitudinalne muskulature izolovanog duodenuma, ileuma i kolona pacova	54
4.3.2. Efekti D,L-homocistein tiolaktona na tonus, amplitudu i frekvenciju spontanih kontrakcija izolovanog duodenuma pacova	55
4.3.3. Efekti D,L-homocistein tiolaktona na tonus, amplitudu i frekvenciju spontanih kontrakcija izolovanog ileuma pacova	57
4.3.4. Efekti D,L-homocistein tiolaktona na tonus, amplitudu i frekvenciju spontanih kontrakcija izolovanog kolona pacova	59
4.3.5. Efekti L-NAME i L-arginina na tonus, amplitudu i frekvenciju spontanih kontrakcija izolovanog duodenuma pacova	61

4.3.6. Efekti L-NAME na tonus, amplitudu i frekvenciju spontanijh kontrakcija izolovanog duodenuma pacova u prisustvu D,L-homocistein tiolaktona (D,L-HCT)	65
4.3.7. Efekti L-NAME na tonus, amplitudu i frekvenciju spontanijh kontrakcija izolovanog duodenuma pacova u prisustvu D,L-homocistein tiolaktona (D,L-HCT) i tetraetilamonijum hlorida (TEA)	67
4.4. SUBHRONIČNO I.P. OPTEREĆENJE METIONINOM	
TOKOM 3 NEDELJE	71
4.4.1. ODREĐIVANJE UKUPNOG HOMOCISTEINA U SERUMU	71
4.4.2. HISTOLOŠKA ANALIZA TKIVA CREVA PACOVA	72
4.4.2.1. Morfometrijski parametri tkiva duodenuma pacova	73
4.4.2.1.A. Dužina crevnih resica duodenuma pacova	74
4.4.2.1.B. Debljina tunike mukoze duodenuma pacova	75
4.4.2.1.C. Debljina tunike muskularis duodenuma pacova	76
4.4.2.1.D. Ukupna debljina zida duodenuma pacova	77
4.4.2.1.E. Broj ćelija u lamini propriji tunike mukoze duodenuma pacova	78
4.4.2.2. Morfometrijski parametri tkiva ileuma pacova	80
4.4.2.2.A. Dužina crevnih resica ileuma pacova	81
4.4.2.2.B. Debljina tunike mukoze ileuma pacova	82
4.4.2.2.C. Debljina tunike muskularis ileuma pacova	83
4.4.2.2.D. Ukupna debljina zida ileuma pacova	84
4.4.2.2.E. Broj ćelija u lamini propriji tunike mukoze ileuma pacova	85
4.4.2.3. Morfometrijski parametri tkiva kolona pacova	87
4.4.2.3.A. Dubina kripte u kolonu pacova	88
4.4.2.3.B. Debljina lamine muskularis mukoze kolona pacova	89
4.4.2.3.C. Debljina tunike mukoze kolona pacova	90
4.4.2.3.D. Ukupna debljina zida kolona pacova	91
4.4.2.3.E. Broj ćelija u lamini propriji tunike mukoze kolona pacova	92
4.4.2.4. Analiza elemenata vezivnog tkiva lamine proprije kolona pacova	94
4.4.3. HISTOLOŠKA ANALIZA TKIVA JETRE PACOVA	98

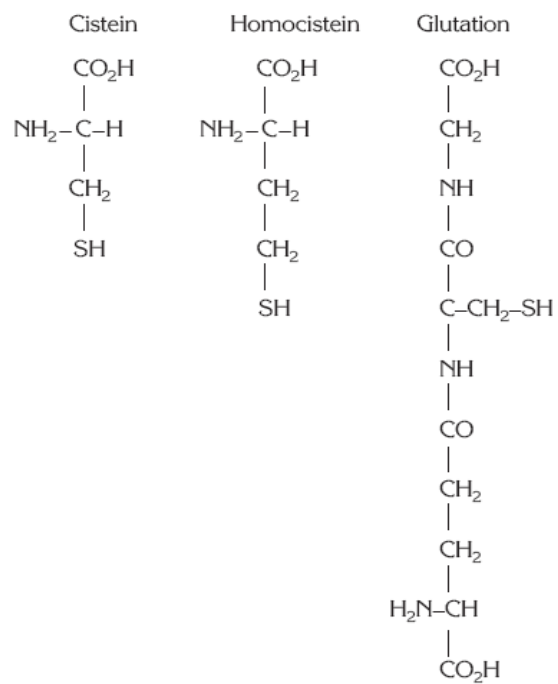
4.4.4. BIOHEMIJSKA ANALIZA TKIVA	106
4.4.4.1. Rezultati analiza enzimske aktivnosti katalaze (CAT)	106
4.4.4.2. Rezultati određivanja indeksa lipidne peroksidacije–koncentracije malondialdehida (MDA)	112
4.4.4.3. Rezultati analiza enzimske aktivnosti glutacion peroksidaze (GPx)	118
4.4.4.4. Rezultati određivanja koncentracije redukovanog glutationa (GSH)	124
4.4.4.5. Rezultati analiza enzimske aktivnosti acetilholinesteraze (AChE)	130
4.4.4.6. Rezultati analiza enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)	136
5. DISKUSIJA	142
6. ZAKLJUČCI	156
7. LITERATURA	158

1.UVOD

1.1. Homocistein- metabolizam, funkcija i klinički značaj

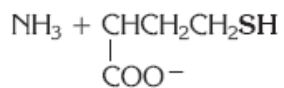
Homocistein (Hcy), kvantitativno glavni metabolit metionina, je aminokiselina, čija je hemijska struktura poznata od 1932 godine. Homocistein je predmet brojnih spekulacija, još od njegovog otkrića 1932. god. Njegove hemijske karakteristike pokazuju sličnost sa cisteinom, odakle i naziv homocistein. Zajedno sa cisteinom i glutationom ubraja se u amino tiolna jedinjenja (Slika 1). Homocistein se u organizmu nalazi slobodan, ili u obliku disulfida i proteina. Slobodnog, ili redukovanog homocisteina, ima 1–2% u odnosu na ukupnu količinu homocisteina. Homocistin i homocistein-cistin su disulfidni oblici homocisteina. Najzastupljeniji oblik u kome se u organizmu nalazi i do 80%, je homocistein vezan za proteine, uglavnom albumin (Slika 2). I pored očigledne sličnosti u hemijskom sastavu amino-tiolnih jedinjenja, njihova uloga u organizmu je različita. Termin »tiol« se odnosi na SH grupu, koja determiniše hemijske karakteristike ovih jedinjenja, koja su takva da omogućuju pomenutoj grupi jedinjenja da budu uključena u vrlo važne metaboličke puteve.

McCully je 1975. u svom radu skrenuo pažnju na slučaj nalaza povećanog nivoa homocisteina u urinu i pojave karakterističnih trombo-okluzivnih promena (McCully i Wilson, 1975). Do kraja nije razjašnjen eventualni direktni uticaj homocisteina na endotelne ćelije krvnih sudova, ili uticaj nekog drugog faktora koji učestvuje u metionin-homocistein-cisteinskom putu, odgovornom za nastanak homocisteina (vitamini B6, B12 i folna kiselina) (Mirković i sar., 2003).

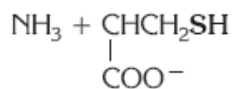


Slika 1. Biogeni amino-tioli

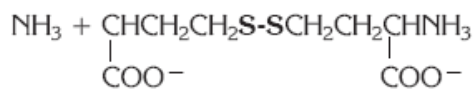
Slobodan homocistein



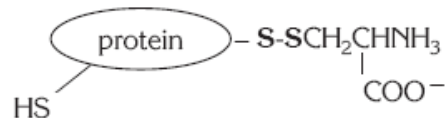
cistin



homocistin



proteinski vezan homocistein



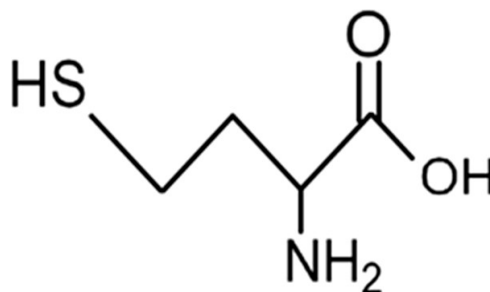
Slika 2. Oblici homocisteina u organizmu

1.1.1. Metabolizam homocisteina

Homocistein kao sumporovita aminokiselina, predstavlja intermedijer u procesu biosinteze metionina i cisteina (Faeh i sar., 2006). To je aminokiselina nastala demetilacijom metionina, vrlo zastupljenog u animalnim proteinima (Venes i Clarence, 2005). U plazmi je prisutan u četiri različite forme: oko 1% cirkuliše kao slobodan tiol, 70-80% vezano je za proteine plazme, najčešće albumin, i 20-30% formira dimere sa istim molekulima homocisteina ili sa drugim tiolima (Hankey i Eikelboom, 1999). Homocistein je ključna determinanta ciklusa metilacije (Loscalzo i Handy, 2014). Metilovan je do metionina, koji nakon S-adenozilacije formira S-adenozilmetionin (SAM) (Loscalzo i Handy, 2014). S-adenozilmetionin je glavni metil donor za sve reakcije metilacije u ćeliji, a nastaje sjedinjavanjem metionina i ATP-a (Harvey i Ferrier, 2011). Metil grupa SAM može biti prenesena i na taj način može metilovati druge supstance. Metilacija je praćena gubitkom energije, tako da je ova reakcija ireverzibilna. Sa druge strane demetilacija vodi formiranju S-adenozilhomocisteina (SAH) (Harvey i Ferrier, 2011). Odnos SAM-SAH definiše metilacioni potencijal ćelije. S-adenozilhomocistein je tioetar i analog metionina. Hidrolizom SAH nastaju homocistein i adenzin. Ovaj homocistein može biti upotrebljen na dva načina:

- a) U slučaju nedostatka metionina, homocistein može biti remetilovan do metionina. Enzim 5,10-metilen tetrahidrofolat reduktaza prevodi homocistein u metionin.
- b) U slučaju viška metionina, homocistein se koristi za stvaranje cisteina. Cystationin- β -sintaza je enzim (sa vitaminom B6 kao glavnim kofaktorom) koji prevodi homocistein u cistein. Homocistein je sintetisan od esencijalne aminokiseline metionina, tako da cistein nije esencijalna aminokiselina sve dok ima metionina u višku.

Homocistein je samo sa čisto hemijskog aspekta aminokiselina (Slika 3.). Ako se sa biohemijskog aspekta pojam aminokiseline personifikuje sa subjedinicom u sintezi proteina, homocistein to zapravo nije, jer u pomenutom procesu ne učestvuje. Isti se najjednostavnije može nazvati metabolitom esencijalne aminokiseline metionina. Nastanak homocisteina je složen biohemijski proces, vrlo fino regulisan, koji na svom značaju dobija, tek onda kada se sagleda činjenica da učestvuje u remetilacionom ciklusu koji ponovo vodi ka sintezi, odnosno obnavljanju metionina.

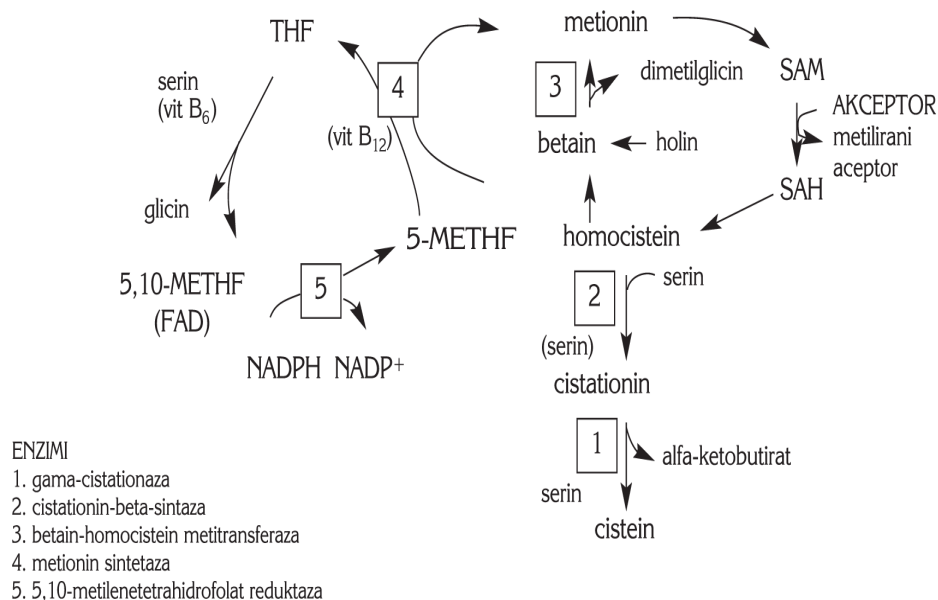


Slika 3. Struktura molekula homocisteina

1.1.2. Ciklus metionin-homocistein-metionin

Svaka ćelija organizma sisara ima sposobnost metabolizovanja metionina. Dve reakcije su u kompeticiji za raspoloživu količinu metionina: proteinska sinteza, ili početna reakcija metionin-homocistein-metionin ciklusa, nagradnja S-adenozilmetionina (Slika 4). Reakcija transformacije metionina do S-adenozilmetionina je katalizovana metionin-adenozil-transferazom. Enzim ima tri izoenzimske forme. Jetrena forma je jedina koja omogućava jetri da pozitivno odgovori na povišene vrednosti metionina u ishrani, odnosno cirkulaciji, što rezultira skokovitim promenama koncentracije adenzilmetionina u jetri, za razliku od drugih tkiva i organa, gde je koncentracija istog relativno konstantna. Sintetisani adenzilmetionin najvećim delom ostaje u ćeliji gde je sintetisan (Ueland i sar., 1992).

Adenozilmetionin može svoju metil grupu predati u nekoj od transmetilacionih reakcija, ili biti podvrgnut dekarboksilaciji u prisustvu adenozilmetionin dekarboksilaze, dajući propilaminsko jezgro, potrebno za sintezu poliamina, kao što je putrescin. Kao proizvod pomenute reakcije, 5-metiltioadenozin se uključuje u kružnu sekvencu koja rezultira resintezom metionina. Dokazano je da na raspoloživi put dekarboksilacije odlazi samo oko 10% adenozilmetionina, dok se ostatak usmerava ka sintezi homocisteina (Mudd i sar., 1989). Preostalih 90% adenozilmetionina predstavlja važan izvor metil grupe, koja biva predata različitim donorima, u prisustvu različitih transferaza, uz izdvajanje S-adenozilhomocisteina. Najznačajniji predstavnik ove grupe enzima je glicin-metiltransferaza. Bez obzira na hemijski sastav metil donora, odnosno na enzim koji proces transmetilacije katalizuje, S-adenozilhomocistein je najmoćniji inhibitor pomenutog procesa. Zato je za normalnu kinetiku transmetilacione sekvence, potrebna pravilna kontrola ovog procesa, što podrazumeva blagovremeno uklanjanje S-adenozilhomocisteina. (Mudd i Pool, 1975). Betain-homocistein-metiltransferaza je enzim koji omogućava nastavak resinteze homocisteina. Nalazi se u jetri svih sisara i koristi betain kao metal donor (Malinow i sar., 1994). Cistation-b-sintaza započinje proces uklanjanja homocisteina iz metionin-homocistein-metionin ciklusa. Ovo je transulfuracioni put, koji se završava stvaranjem cisteina. U procesu još učestvuje i enzim c-cistationaza. Oba enzima su piridoksal-fosfat zavisni (Sarna i Siow, 2015; Kurpad i sar., 2014). Transulfuracioni put metabolizma homocisteina je potpun u samo 4 organa: jetri, bubregu, malom intestinumu i pankreasu. To su organi sa najvećom potrebom za resintezom glutaciona, te transulfuracija ovog tipa i služi zadovoljenju ovih potreba (McCully, 1983). Ulazak homocisteina u transulfuracioni put je katalizovan vitamin B6 zavisnom cistation- β -sintazom (C β S), koja ima ograničenu tkivnu distribuciju.



Slika 4. Metabolički putevi homocisteina i metionina

1.1.3. Biohemijska osnova hiperhomocisteinemije

Naša studija se bavi uticajem homocisteina na kontraktilnost izolovanog creva pacova i parametre oksidativnog statusa u homogenatima tkiva digestivnog trakta, a u skorije vreme pojavljuju se članci u literaturi koji se sve više bave potencijalnom ulogom nutricionog homocisteina na organizam, kao i nutricionom terapijom u cilju regulacije nivoa homocisteina. Definicija hiperhomocisteinemije se razlikuje među studijama (Faeh i sar., 2006). Hiperhomocisteinemija je definisana kao stanje sa povišenim nivoom (iznad 15 $\mu\text{mol/L}$) homocisteina u krvi (Guo i sar., 2009). Ukupna koncentracija homocisteina u plazmi zdravih ljudi (našte) je niska i kreće se u rasponu od 5,0-15,0 $\mu\text{mol/L}$ ili 5,0-12,0 $\mu\text{mol/L}$ u zavisnosti od metode merenja (Baszczuk and Kopczynski, 2014). Nivo homocisteina od 16-30 $\mu\text{mol/L}$ klasifikovan je kao blaga, 31-100 $\mu\text{mol/L}$ kao umerena, a vrednosti preko 100 $\mu\text{mol/L}$ kao teška hiperhomocisteinemija (Hankey i Eikelboom, 1999).

Današnja nauka ima veliki izazov da utvrdi potencijalne uzroke hiperhomocisteinemije (HHC) i mehanizme koji dovode do promena u odgovarajućim tkivima i organima. Brojni su faktori koji poznatim i nepoznatim mehanizmima dovode do ove pojave. Među njima izdvajamo fiziološke, genetske i patološke.

Fiziološki faktori

Fiziološki faktori koji utiču na nivo homocisteina su: pol, starost i način života. Srednja koncentracija ukupnog homocisteina povećava se sa starenjem. Osobe starije od 50 godina imaju viši nivo homocisteinemije nego mlađe. Koncentracija ukupnog homocisteina kod muškaraca je za oko 25% viša nego kod premenopauzalnih žena. Ova razlika se smanjuje posle menopauze, ali nikad ne nestaje. U trudnoći se javlja karakteristično smanjenje homocisteinemije, zbog smanjenja koncentracije cirkulišućeg albumina, za koji je vezan veći deo homocisteina. Način ishrane je važna determinanta, koja utiče na nivo homocisteina. Nivo serumskog ukupnog homocisteina kod zdravih osoba varira sa unosom metionina hranom (Marinković i sar., 2003).

Genetski i patološki faktori

Postoje dva tipa hiperhomocisteinemije: a) retka ali teška forma uzrokovana genetskim mutacijama enzima uključenih u metabolizam homocisteina; b) češće forme sa umerenim nivoom homocisteina povezanih sa nekim genetskim ili faktorima sredine (Faeh i sar., 2006). Hiperhomocisteinemija može nastati usled genetskih defekata enzima uključenih u metabolizam homocisteina. Enzimi koji mogu biti uključeni su: 5, 10-metilen tetrahidrofolat reduktaza, metionin sintaza kao i cistation- β -sintaza (Curro i sar, 2014). Jedan od najčešćih koji je dokazan više puta širom sveta i ima visoku incidencu u različitim populacijama je polimorfizam pojedinačnog nukleotida 5, 10-metilen tetrahidrofolat reduktaze (MTHFR) koji je udružen sa blagom (13–24 $\mu\text{mol/L}$) i umerenom (25–60 $\mu\text{mol/L}$) hiperhomocisteinemijom (Curro i sar., 2014). Hankey i sar. pokazali su da je najčešći enzimski defekt, udružen sa umereno povišenim nivoom ukupnog homocisteina, tačkasta mutacija gena za MTHFR (Hankey i Eikelboom, 1999). Za najčešći genetski faktor u nastanku teške hiperhomocisteinemije i klasične homocistinurije (kongenitalna

homocistinurija) smatra se deficijencija cistationin- β -sintaze (C β S), kada vrednosti homocisteina u plazmi mogu dostići i vrednosti 40 puta više od normalnih. Hiperhomocisteinemija takođe može nastati usled deficijencije folata, vitamina B₆ i vitamina B₁₂ (Curro i sar., 2014). Nedostatak vitamina je dokazan kao jedan od glavnih razloga nastanka umerene hiperhomocisteinemije (Zhang i sar., 2015; Malina-López i sar., 2016). Cijankobalamin, piridoksal fosfat i folna kiselina su kofaktori glavnih metaboličkih puteva Hcy. Smatra se i da neadekvatna ishrana nosi rizik za nastanak HHC. Ove činjenice ukazuju na značaj određivanja nivoa homocisteina u okviru dijagnostike megaloblastne anemije odnosno utvrđivanja manjka folne kiseline.

1.1.4. Homocistein kao faktor rizika za nastanak gastrointestinalnih oboljenja

Kao što je poznato, HHC, kako bazalna tako i nakon opterećenja metioninom, može nastati usled poremećaja genetskih ili nutricionih faktora u putu transulfuracije i remetilacije tokom metabolizma metionina (Finkelstein, 1998). Literarni podaci ukazuju na to da je povišen nivo homocisteina u krvi faktor rizika za nastanak kardiovaskularnih oboljenja uključujući ishemijsku bolest srca i brojnu vaskularnu patologiju, hroničnu bubrežnu insuficijenciju, i cerebrovaskularne poremećaje (Kang i sar., 1992; Lentz, 1997). Najveći broj publikacija se bavi uticajem Hcy na bolesti kardiovaskularnog sistema. Zbog efekata koje Hcy ispoljava na ovom sistemu organa, jasno je zašto se ova aminokiselina smatra holesterolom XXI veka. Upravo su nas ova saznanja inspirisala da se posvetimo mnogo manje ispitivanim istraživinja na gastrointestinalnom sistemu.

Kliničke studije su pokazale da hiperhomocisteinemija predstavlja faktor rizika za nastanak gastrointestinalnih oboljenja (Drzewoski i sar., 2006). Povišen nivo homocisteina dokazan je u mukozi kolona i plazmi pacijenata sa inflamatornom bolesti creva (IBC) (Morgenstern i sar., 2003; Danese i sar., 2005). Pojava hiperhomocisteinemije je opisana i u populaciji bolesnika sa inflamatornom bolesti creva nakon oralnog opterećenja metioninom (Zepeda-Gómez i sar., 2008).

Inflamatorna bolest creva je hronično, idiopatsko zapaljensko oboljenje gastrointestinalnog trakta a obuhvata Kronovu bolest (KB) i ulcerozni kolitis (UK) (Cosnes i sar., 2011). Evolucija Kronove bolesti može biti praćena intestinalnim i ekstraintestinalnim komplikacijama, posebno aterotrombotičnim događajima (Kallel i sar., 2011). Među brojnim faktorima rizika za nastanak trombotičnih stanja kod pacijenata sa KB prepoznata je i hiperhomocisteinemija (Zezos i sar., 2014). Metaboliti homocisteina i Hcy-povezani geni mogu biti uključeni i u patogenezu ulceroznog kolitisa (Jiang i sar., 2010). Podaci iz literature ukazuju i na relativno čestu pojavu hiperhomocisteinemije kod pacijenata sa celijačnom bolešću (Casella i sar., 2011). Hiperhomocisteinemija je povezana sa inflamacijom i može biti faktor rizika za kolorektalni karcinom, karcinom želuca, kao i karcinogenezu kod pacijenata sa inflamatornom bolesti creva (Miller i sar., 2013; Peyrin-Biroulet i Guéant, 2007 ; Phelip i sar., 2008).

1.1.5. Uticaj homocisteina na motoriku digestivnog trakta

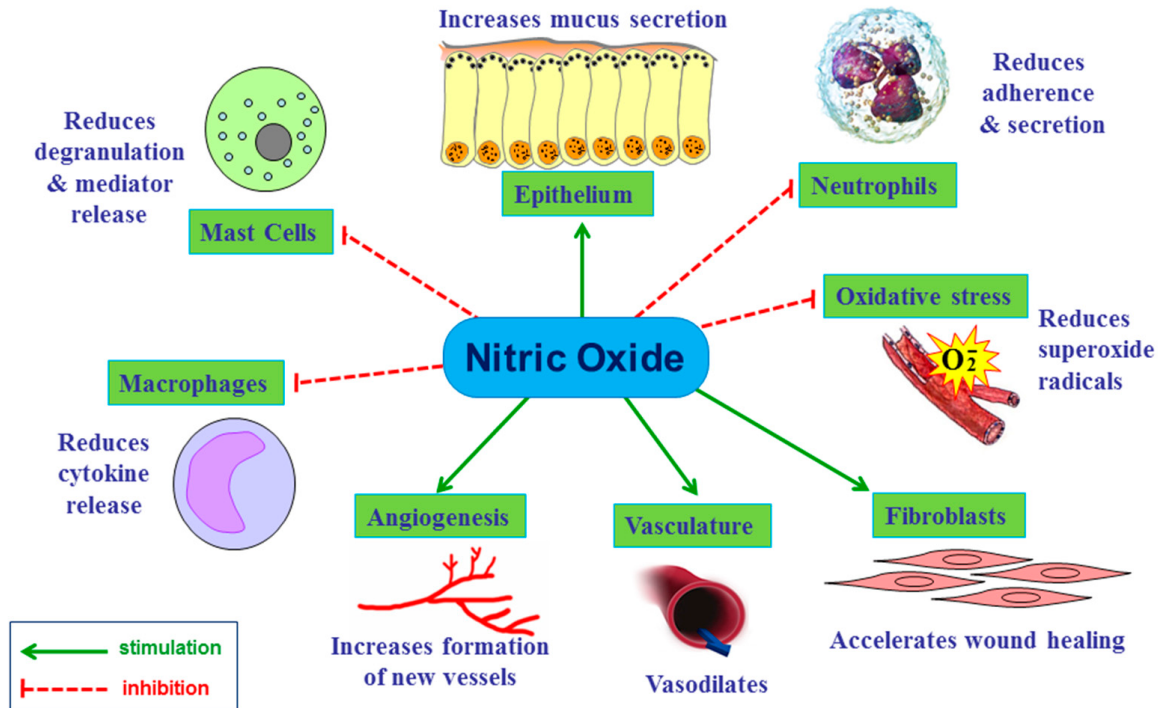
Postoje kontroverze o efektima hiperhomocisteinemije na gastrointestinalni motilitet. Jedan od načina na koji HHC menja kontraktilni odgovor creva jeste i modulacija nitrergičke neurotransmisije. Azot monoksid (NO) se oslobađa u gastrointestinalnom traktu sa ne-adrenergičkih, ne-holinergičkih neurona (Boeckxstaens i sar., 1994). Ovi neuroni regulišu tonus creva, amplitudu i frekvenciju spontanih pokreta. Azot monoksid predstavlja primarni enterički inhibitorni neurotransmiter u gastrointestinalnoj glatkoj muskulaturi (Toda i Herman, 2005). Studije sprovedene na pacijentima sa HHC ukazuju na to da povišene vrednosti Hcy u plazmi smanjuju stvaranje NO i njegove efekte, kao i da značajno umanjuju efekte NO donora (Fu i sar., 2002). Postoje dokazi o učešću NO neurona u nastanku crevnih neuropatija (Rivera i sar., 2011). Deficit u neurotransmisiji nitrergičkih neurona dokazan je i kod ezofagealne ahalazije, hipertrofične stenoze pilorusa, Hiršprungove bolesti kao i kod dijabetesa (gastropareza) (Takahashi, 2003). Hiperhomocisteinemija može modilirati kontraktilni odgovor digestivnog trakta i mehanizmima koji ne uključuju nitrergičke neurone. Tako je ispitivanje sprovedeno na kolonu miša pokazalo da HHC dovodi do sniženja intestinalnog motiliteta remodelovanjem posredstvom matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9). Opstipacija kao poremećaj motiliteta je

česta kod starijih. Smanjenje plazma nivoa homocisteina kod starih potencira opstipaciju (Givvimani i sar., 2012). Efekti HHC ne moraju biti samo inhibitorni. Prokinetičko dejstvo D,L-homocisteina identifikovano je na kolonu miša dokazom da HHC depolariše intaktne mišiće i pojačava spontane kontrakcije (Park i sar., 2005). Činjenica da su efekti HHC na kontraktilnost digestivnog trakta različiti, a mehanizam dejstva Hcy nedovoljno proučen, smatramo da bi ispitivanje kontraktilnog odgovora digestivnog trakta pacova doprinelo boljem razumevanju ove oblasti, i ukazalo na potencijalne terapijske implikacije.

1.2. Azot monoksid kao neurotransmiter u gastrointestinalnom traktu

Gasni molekul azot monoksid (NO) dokazan je kao značajan činilac u mehanizmima zaštite mukoze digestivnog trakta (Laine i sar., 2008). Vlada ustaljeno mišljenje da NO učestvuje u mnogim fiziološkim i patofiziološkim procesima koji uključuju zaštitu gastrointestinalnog integriteta i mehanizme gastroduodenalne protekcije (Magierowski i sar., 2014; Kwiecien i sar., 2012; Szlachcic i sar., 2001; Kwiecien i sar., 2008). Azot monoksid se oslobađa i sintetiše sa vaskularnog endotela i senzornih nervnih završetaka, enzimskom aktivnošću konstitutivne i inducibilne NO sintaze (eNOS, iNOS). Supstrat NOS za stvaranje NO je aminokiselina L-arginin. NO difunduje od endotela do glatkih mišićnih ćelija u zidu krvnog suda, gde reaguje sa solubilnom guanilil ciklazom (sGC) i dovodi do porasta intracelularne koncentracije sekundarnog glasnika cGMP (Bryan i sar., 2009). Efekti sekundarnog glasnika obuhvataju relaksaciju glatkih mišića, povećanje dijametra krvnog suda, što rezultira povećanim protokom krvi u datom organu (Slika 5.).

Major beneficial actions of NO in the mechanism of gastrointestinal mucosal defense



Slika 5. Uloga azot monoksida (NO) u zaštiti gastrointestinalne mukoze

*Magierowski M, Magierowska K, Kwiecien S, Brzozowski T. *Molecules*. 2015; 20: 9099-9123.

1.2.1. Inervacija gastrointestinalnog trakta (GIT-a) - uloga neadrenergičkih-neholinergičkih (NANH) nerava

U zidu creva sisara postoji grupa motoneurona koji se nazivaju neadrenergički neholinergički neuroni (Abrahamsson, 1996). Ovi neuroni utiču na funkcionalnu relaksaciju creva. Purinergički neurotransmiteri, računajući i ATP utiču na oslobađanje NO koji je odgovoran za NANH inhibitornu motornu inervaciju. Nervna stimulacija i egzogena aplikacija ATP zajedno dovode do relaksacije muskulature izolovanog preparata duodenuma pacova kao i fundusa teniae coli svinje (Adeghate i sar., 2003; Alexander, 1998; Allescher i sar., 1992). Pored toga, funkcija NO se formira u perifernim nervima gde može biti uključen u senzornu transmisiju signala kao i modulaciju transmisije (Ancha i sar., 2003; Ayajiki i sar., 2000; Baccari i sar., 2000; Bagyanszki i sar., 2000). Postoji veliki broj dokaza da je NO snažan inhibitorni neurotransmiter i da su neuroni koji sintetisu NO široko rasprostranjeni u mienteričkom i submukoznom enteričkom nervnom plaksusu zamoraca i čoveka (Bagyanszki i sar., 2000). Azot monoksid je važan modulator vaskularnog tonusa.

Tri glavna mehanizma uključena u kontrolu funkcije GIT-a su endokrina, parakrina i neuralna kontrola, od kojih poslednja obuhvata inervaciju od strane autonomnog i enteričkog nervnog sistema. Složenosti regulacije GIT-a doprinosi i postojanje neadrenergičke neholinergičke inhibitorne neurotransmisije (NANH) za čije se postojanje u GIT-u odavno zna, ali je razjašnjenje uloge pojedinih supstanci uključenih u nju usledilo po otkriću NO 1980. godine (Boeckxstaens i sar., 1991; Boeckxstaens i sar., 1990).

Azot monoksid je pošto je otkriven nazvan endotelnim faktorom relaksacije, a desetak godina kasnije više autora je objasnilo njegovu prirodu i dalo osnove mehanizma dejstva: NO aktivira oslobađanje guanil ciklaze koja iz GTP-a stvara GMP. cGMP vrši aktivaciju protein kinaze G, što rezultira fosforilacijom više proteina i relaksacijom glatkog mišića. Enzim neophodan za sintezu NO je NO sintaza (NOS) koja transformiše L-arginin u L-citrulin. Za ovu reakciju su neophodni i kofaktori: tetrahidrobiopterin (BH₄), nikotinamid dinukleotid fosfat (NADPH) i flavin adenin dinukleotid (FAD).

Postoje dva oblika NOS: inducibilni oblik (iNOS) i konstitutivni oblik (endotelna: eNOS i neuronalna: nNOS). Konstitutivne forme enzima se aktiviraju u prisustvu Ca^{+2} i kalmomodulina (Boeckxstaens i sar., 1991; Boeckxstaens i sar., 1994; De Man i sar., 2003; De Man i sar., 1999).

Eksperimentalna istraživanja u gastrointestinalnom traktu dovela su do zaključka da NO deluje kao inhibitorni neurotransmiter. Nervni put kojim ostvaruje ulogu zove se nitregergički ili nitroksidgergički i prima informacije u vidu električnih signala iz centralnog nervnog sistema putem parasimpatičkih vlakana (De Man i sar., 2001).

1.2.2. Azot monoksid (NO)

U pronalaženju dokaza o delovanju NO kao inhibitornog NANH neurotransmitera, najveći doprinos su dali eksperimenti na izolovanim organima. U radovima Bulta i sar., dokazano je da izolovano tkivo ileokoličnog preparata kao odgovor na električnu stimulaciju oslobađa vazorelaksantne supstance, čije se oslobađanje prekida nakon izlaganja tkiva inhibitoru enzima NOS (nitro-L-arginin), superoksid anjonu ili oksihemoglobinu (Bult i sar., 1990).

Takođe, efekat nitro-L-arginina poništava se L-argininom, prekursorom sinteze NO. Druge metode korišćene za utvrđivanje mehanizama dejstva NO, kao i za njegovu vizualizaciju bile su: hemiluminiscencija NO u mijenteričkom spletu u ileumu zamorčeta, merenje L-citrulina u inkubacionom mediju nakon električne stimulacije izolovanog preparata želuca, kao i kapilarna elektroforeza na ćelijskom nivou radi detekcije glavnih metabolita NO-citrulin puta (De Man i sar., 1991; Pique i sar., 1989). Histološki je dokazano prisustvo NOS imunoreaktivnih nervnih vlakana u mijenteričkom i submukoznom spletu sisara (Elliott i Wallace, 1998). Prisustvo Ca^{2+} i kalmomodulina je neophodno za aktivaciju nNOS (Ember i sar., 2000).

1.2.3. Mehanizam dejstva azot monoksida (NO)

Široko prihvaćena teza o načinu delovanja NO opisana je u prethodnom tekstu. Specifično za glatki mišić gastrointestinalnog trakta je to da je NO-indukovana relaksacija posredovana guanil ciklaza - cGMP putem, ali i preko hiperpolarizacije membrana. Azot monoksid i NO donori povećavaju otvorenost Ca^{2+} aktiviranih K^+ kanala i oponašaju NANH inhibitornu nervnu stimulaciju. Ukazano je na postojanje dve faze u relaksaciji glatkog mišića gastrointestinalnog trakta: brza - inicijalna i sporo razvijajuća faza. Kod knockout miševa bez cGMP - zavisne kinaze 1 na stimulaciju NO donorima dolazi do razvoja isključivo spore faze relaksacije (Ember i sar., 2001). Takođe, u prilog mišljenju da postoji više mehanizama delovanja govori sam eksperimentalni nalaz da relaksacija kao odgovor na neurogeni NO nije inhibirana nakon primene metilen plavog, poznatog kao inhibitora guanil ciklaze (Ergun i sar., 2001). Mogući mehanizmi uključeni u NO - indukovanu relaksaciju i hiperpolarizaciju su: 1) cGMP-zavisno smanjenje slobodnog Ca^{2+} u ćeliji, bez promena membranskog potencijala; 2) cGMP-zavisno otvaranje K^+ kanala ili drugih tipova jonskih kanala radi stvaranja hiperpolarizacije i relaksacije; 3) cGMP-nezavisni mehanizam, kao što je dejstvo na jonske kanale NO uključene u mišićnu kontrakciju, direktno ili putem membranske hiperpolarizacije. Veliki broj autora smatra da NO slobodni radikal najverovatnije deluje kao nitrergički neurotransmiter. Postoji i niz dokaza da uz NO postoje i kotransmiteri odgovorni za NANH inhibitorne uticaje, kao što su vazoaktivni intestinalni peptid i ATP (Lefebvre i sar., 1995).

1.3. Metionin- metabolizam, funkcija i eksperimentalna primena

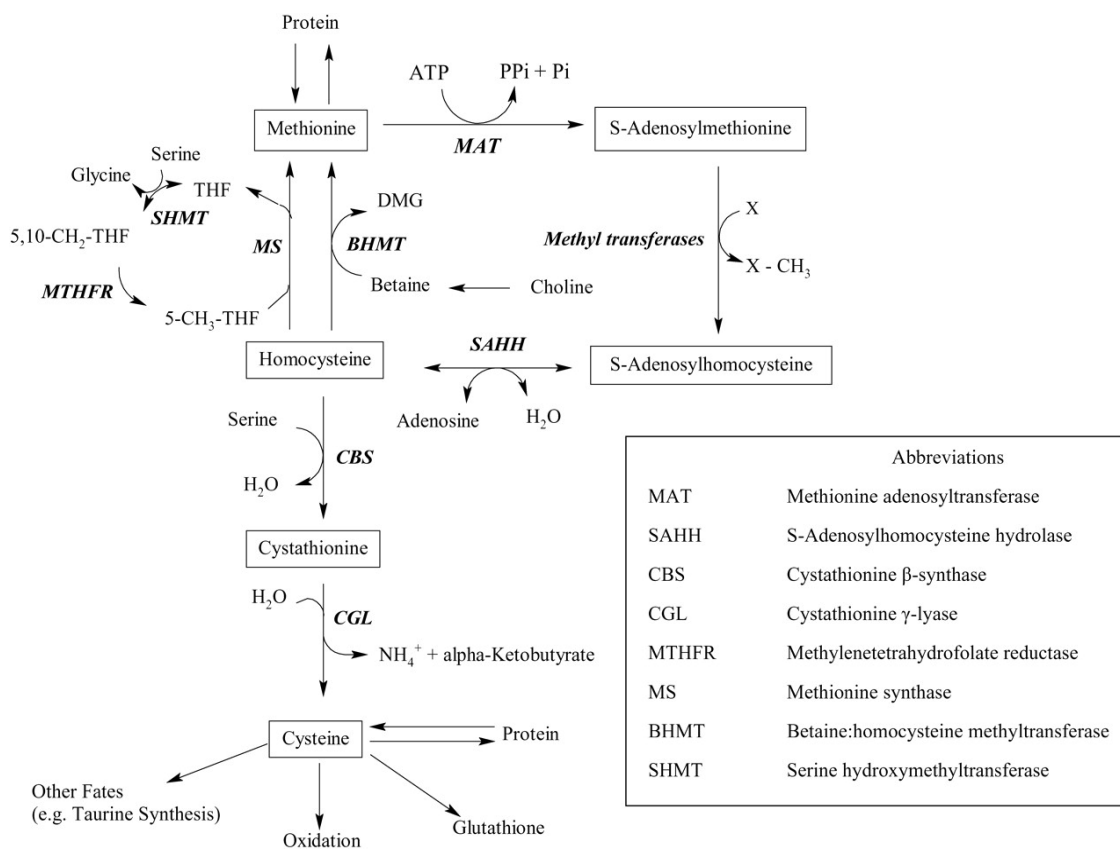
Metionin predstavlja esencijalnu sumporovitu aminokiselinu i prekursor je drugih aminokiselina koje sadrže sumpor kao što su homocistein, cistation, cistein i taurin (Stipanuk, 2004). Nakon aktivacije u S-adenozilmetionin, metionin deluje kao metil donor stvarajući S-adenozil-homocistein i posledično homocistein (Slika 6.). Homocistein može biti remetilovan u metionin ili ireverzibilno metabolisan do cistationa, stoga i cisteina, konsektivnim dejstvom cistationin- β -sintaze (C β S) i enzima cistationaze. Cistein može biti ugrađen u proteine, upotrebljen za sintezu glutaciona ili oksidovan do taurina (Stipanuk, 2004).

Metabolizam metionina počinje učešćem metionina u sintezi proteina, tj njegovom aktivacijom u S-adenozilmetionin (SAM) dejstvom metionin adenozil-transferaze (MAT). S-adenozilmetionin svojom dekarboksilacijom participira u sintezi spermidina ili donira svoju metil grupu akceptoru da bi proizveo S-adenozilhomocistein (SAH). S-adenozilhomocistein je hidrolizovan na homocistein i adozin dejstvom SAH hidrolaze. Ova kaskada reakcija predstavlja ciklus transmetilacije i široko je prisutna u ćelijama. Metabolički put biva u narednim fazama i zatvoren resintezom metionina, ili jedan deo homocisteina biva nepovratno metabolisan do cisteina (Harvey i Ferrier, 2011).

Metioninske dijete mogu da prouzrokuju hiperhomocisteinemiju, stanje koje dovodi do nastanka ateroskleroze i hipertenzije kod pacova i ljudi, i koja se povezuje sa nastankom oksidativnog stresa u *in vitro* uslovima (Robin i sar., 2004). Metionin je jedini izvor iz hrane za nastanak homocisteina, koji utiče na stanje i integritet endotela (Hennig i sar., 1993). Ekscesivni unos metionina može izazvati tipične hematološke promene, tipa akumulacije methemoglobina, ili dovesti do morfoloških promena u membrani eritrocita koje rezultiraju hemolitičkom anemijom (Klavins i sar., 1963; Benevenga i Steele, 1984). Pokazano je da povećan unos metionina ima direktne toksične efekte u tkivima kao što su srce (Hagar, 2002; Chang i sar., 2004; Devi i sar., 2006), mozak (Bouzouf i sar., 2005; Baydas i sar., 2005) i jetra (Toborek i sar., 1996; Woo i sar., 2006). Iako ovi mehanizmi nisu do kraja razjašnjeni, smatra se da oksidativni stres može da bude u njihovoj osnovi

(Toborek i sar., 1995; Fujimoto i sar., 2003; Zhou i sar., 2004). Studija koju su sproveli Durantoni i sar., pokazala je da metionin potencira karcinogenezu u intestinalnom traktu pacova (Duranton i sar., 1999). Takođe, dijeta bogata metioninom dovela je do ushodne regulacije Cdx-1 gena sa onkogenim potencijalom, koji je u najvećoj meri ispoljen u intestinalnim kriptama (Maulbecker i Gruss, 1993; Silberg i sar., 1997). Istraživanja iz oblasti centralnog nervnog sistema pokazala su da ekscesivna administracija metionina rezultira pogoršanjem memorije kod životinja (Koladiya i sar., 2008; Sudduth i sar., 2013; Baydas i sar., 2007; Vuaden i sar., 2012), kao i oštećenjem kognitivnih funkcija ljudi, putem indukovane hiperhomocisteinemije (Miller, 2003; Obeid i Herrmann, 2006).

Navedeni podaci pokazuju da je ispitivanje dejstva metionina široko zastupljeno u naučnim istraživanjima, kako u animalnim modelima, tako i na humanoj populaciji. Sprovedene studije su podrazumevale intraperitonealnu ili *per os* administraciju metionina tokom različitog vremenskog perioda. Naše istraživanje obuhvatilo je i.p. aplikaciju metionina 3 nedelje, sa ciljem da utvrdi biohemijske i histološke promene u digestivnom traktu pacova.



Slika 6. Najvažniji putevi metabolizma sumporovitih aminokiselina

*Brosnan JT, Brosnan ME. *J Nutr.* 2006 ; 136: 1636-1640.

1.4. Oštećenje slobodnim radikalima kao patofiziološki mehanizam nastanka bolesti digestivnog trakta

Slobodni radikali imaju veliki značaj u humanoj patologiji, jer je pokazana njihova uloga u patogenezi mnogih oboljenja (Halliwell, 2012). Najčešće nastaju kao produkti nepotpune redukcije kiseonika i odlikuju se ekstremnom reaktivnošću. Učestvuju u brojnim fiziološkim i biohemijskim procesima u organizmu, ali i u oštećenju ćelija i tkiva. Uloga reaktivnih vrsta kiseonika u ćelijskoj diferencijaciji, signalnim putevima, regulaciji metabolizma i intercelularnoj komunikaciji je nezaobilazna. Uspostavljanje delikatne i optimalne ravnoteže između dobrih i loših efekata slobodnih radikala je veoma važno za normalno funkcionisanje živih organizama. Naime, slobodni radikali reaguju sa važnim biološkim molekulima - enzimima, strukturnim i receptorskim proteinima, lipidima i nukleinskim kiselinama. Kumulativni efekti navedenih reakcija mogu dovesti do oštećenja ili smrti ćelije. Stoga su ćelije, u toku adaptacije na aerobni metabolizam, razvile snažne enzimske i neenzimske sisteme antioksidativne zaštite. U neenzimske antioksidante spadaju vitamini A, E i C. Svoje delovanje ispoljavaju u uslovima normalnog i pojačanog stvaranja slobodnih radikala, i predstavljaju važan nivo odbrane u zaštiti od slobodnih radikala (Delvin, 2002). Enzimske komponente antioksidativne zaštite su SOD, CAT, enzimi glutation ciklusa (GPx, GST, GR i fosfolipid-hidroperoksid) (Evereklioglu 2003; Bhattacharyya i sar., 2014), citohromoksidaza, tioredoksin i familija peroksiredoksin-proteina. Njima je zajedničko svojstvo da blokiraju početak lančanih slobodnoradikalnih reakcija.

Oksidativni stres nastaje usled poremećaja balansa između nastajanja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS, eng. reactive oxygen species) s jedne i aktivnosti antioksidativnog sistema zaštite (AOS, eng. antioxidant defence system) sa druge strane (Halliwell i Gutteridge, 1999). Poremećaj balansa između nastajanja ROS i AOS može uzrokovati razvoj različitih oštećenja ubrzavajući proces starenja, razvoj bolesti i smrt organizama (Sies, 1991).

Povećanje u stvaranju ROS prisutno je u različitim patofiziološkim stanjima: kanceru, dijabetesu, aterosklerozi, neurodegenerativnim bolestima, reumatoidnom artritisu,

i drugim bolestima (Huycke i sar., 2002; Maiese, 2015; Mateen i sar., 2016; Thanan i sar., 2015; Rezvan i sar., 2011). Postoje dokazi da starenje uključuje progresivne promene u slobodno - radikalsko - posredovanim regulatornim procesima (Droge, 2002). Poremećaj ćelijske homeostaze posredovane redoks signalizacijom može da rezultuje i kardiovaskularnim bolestima i kancerom (Fonseca i sar., 1997). ROS mogu dovesti do oštećenja ćelijskih lipida, proteina ili DNK i na taj način do poremećaja njihove normalne funkcije (Valko i sar., 2007).

Antioksidanti sprečavaju delovanje slobodnih kiseoničnih radikala na više nivoa: lokalnim smanjenjem slobodnih kiseoničnih radikala, sprečavanjem stvaranja ROS, vezivanjem slobodnih metalnih jona, uklanjanjem ROS ili prekidanjem stvaranja novih radikala (Halliwell i Gutteridge, 1989).

Hiperhomocisteinemija je uključena u patogenezu brojnih bolesti kako svojim prooksidantnim dejstvom tako i oštećenjem antioksidativne zaštite.

Kiseonični slobodni radikali se stvaraju i u gastrointestinalnom traktu ali njihova uloga u patofiziologiji i etiopatogenezi bolesti digestivnog trakta nije dovoljno proučena. Uprkos protektivnoj ulozi mukoze, ingestirane materije i mikrobnih patogeni mogu izazvati oksidativno oštećenje i inflamaciju gastrointestinalnog trakta (Inokuma i sar., 2009; Kruidenier i sar., 2003). U osnovi patogeneze brojnih gastrointestinalnih oboljenja kao što su peptički ulkus, gastrointestinalni karcinomi kao i inflamatorna bolest creva je delom i oksidativni stres (Bhattacharyya i sar., 2014).

Veliki broj podataka iz literature nam ukazuje da bi oksidativni stres mogao da bude uzročnik poremećaja koje izaziva homocistein na digestivnom traktu. Matte i saradnici (Matte i sar., 2007) su pokazali da u jetri homocisteinom tretiranih pacova dolazi do pojave oksidativnog stresa i povećane lipidne peroksidacije. Kod svih pacijenata koji imaju hroničnu hiperhomocisteinemiju smanjena je ukupna antioksidativna zaštita (TAS). Reakcije u ciklusu metionina takođe dovode do formiranja tripeptida glutationa (GSH), sa jakim uticajem na proces stvaranja slobodnih radikala i lipidnu peroksidaciju (Jordao i sar., 2009). Rezultati studije hroničnog opterećenja metioninom ukazuju na nastanak oksidativnog stresa u jetri pacova (Mendes i sar., 2014; Woo i sar., 2006). Hiperhomocisteinemija indukovana aplikacijom metionina dovodi do povećane produkcije

slobodnih radikala i markera inflamacije u peritoneumskim makrofagima miša (Song i Rosenfeld, 2004). *In vitro* i *in vivo* studija na pacovima pokazala je alteraciju parametara oksidativnog stresa nakon primene metionina (Costa i sar., 2013), dok je posle četvoronedeljne primene metionina dokazana akumulacija hemosiderina u hepatocitima pacova (Chin i sar., 2015).

Razotkrivanje signalizacije posredovane slobodnim radikalima kao i fizioloških odgovora na njihovo dejstvo je veoma važno za bolje razumevanje patogeneze bolesti i za unapređenje postojećih terapijskih protokola.

1.5. Sumporovite aminokiseline kao antioksidansi

Široko je poznato da je N-acetilcistein jedan od glavnih antioksidanasa u ćelijskoj membrani, i da štiti membranske lipide od peroksidacije tako što zarobljava peroksil, kiseonične i superoksidne radikale (Tahan i sar., 2007; Dodd i sar., 2008). Dokazano je i da vrši direktnu modulaciju aktivnosti redoks-osetljivih transkripcionih faktora (Atis i sar., 2006) i efektivnu prevenciju oksidativnog stresa i bakterijskih translokacija (Ocal i sar., 2004). U skorije vreme pokazano je da N-acetilcistein ispoljava snažno antiinflamatorno dejstvo na zapaljenje mozga indukovano traumom (Csontos i sar., 2011), na bleomicinom izazvanu pulmonarnu inflamaciju (Kikuchi i sar., 2011) kao i na inflamatorni odgovor indukovani lipopolisaharid-aktiviranim makrofagima (Palacio i sar., 2011).

Dosadašnja znanja o terapiji inflamatorne bolesti creva dopunjuju publikacije u kojima je dokazano protektivno, antiinflamatorno i antioksidantno dejstvo N-acetil-L-cisteina na eksperimentalno izazvani kolitis kod pacova (Noslova i sar., 2000; Uraz i sar., 2013). Antioksidativni kapacitet N-acetil-L-cisteina pokazan je i u modelu hroničnog oštećenja jetre kod pacova (Demiroren i sar., 2014). Studija sprovedena na humanoj populaciji pokazala je da suplementacija N-acetil-L-cisteinom poboljšava oksidativni status pacijenata posle hirurških zvata u abdomenu, što ukazuje na značaj kliničke primene ove supstance (Kuyumcu i sar., 2015).

Štaviše, brojni su podaci koji pokazuju da N-acetil-cistein ispoljava hipohomocisteinemične efekte kod pacova (Ovrebo i Svardal, 2000) i ljudi (Hultberg i sar., 1994; Wiklund i sar., 1996; Ventura i sar., 1999; Roes i sar., 2002 ; Raijmarkers i sar., 2003; Ventura i sar., 2003; Friedman i sar., 2003; Scholze i sar., 2004). Postoji nekoliko potencijalnih objašnjenja za ove hipohomocisteinemične efekte N-acetil-cisteina (Verhoef i sar., 2004; Fukada i sar., 2008): i) povećano premeštanje plazma homocisteina sa protein vezujućeg mesta na niskomolekulske disulfide praćeno povećanim renalnim klirensom, ii) smanjeno stvaranje homocisteina od metionina, iii) povećana remetilacija homocisteina. Još nije jasno rasvetljeno koji od ovih mehanizama je predominantan, mada do sada, nauka raspolaže ograničenim brojem informacija o hipohomocisteinemijskom dejstvu cisteina.

Cistein, semiesencijalna aminokiselina takođe ispoljava protektivne efekte na digestivni trakt, što je dokazano u eksperimentalnom modelu ulkusa želuca kod pacova (Salim, 1992). Prethodne studije pokazale su da L-cistein dovodi do smanjenja plazma koncentracije homocisteina (Okawa i sar., 2006).

Ovi podaci nas navode na ideju da primenom L-cisteina i N-acetil-L-cisteina u uslovima subhronične stimulacije metioninom ispitamo uticaj ovih supstanci na parametre oksidativnog stresa kao i histološke promene u tkivima digestivnog trakta.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su bili:

- Određivanje koncentracije Hcy u serumu kod pacova kojima je aplikovan metionin i.p. u toku tri nedelje
- Ispitivanje parametara oksidativnog stresa u tkivima gastrointestinalnog trakta pacova u uslovima akutne stimulacije homocisteinom *in vivo* i *in vitro*
- Ispitivanje efekata najtoksičnijeg metabolita homocisteina, tj. D,L-homocistein tiolaktona na kontraktilnost izolovanog creva pacova tokom blokade sinteze azot monoksida (NO) u kontrolnim uslovima i u uslovima akutne hiperhomocisteinemije
- Ispitivanje efekata i.p. aplikacije metionina u toku 3 nedelje (subhronične) na:
 - a. aktivnost enzima acetilholinesteraze (AChE) u tkivu duodenuma, ileuma, kolona i jetre pacova
 - b. parametre oksidativnog stresa u duodenumu, ileumu, kolonu i jetri pacova
 - c. postojanje morfoloških promena u duodenumu, ileumu, kolonu i jetri pacova
- Ispitivanje efekata aplikacije L-cisteina i N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioninom na:
 - a. aktivnost enzima AChE u tkivu duodenuma, ileuma, kolona i jetre pacova
 - b. parametre oksidativnog stresa u duodenumu, ileumu, kolonu i jetri pacova
 - c. postojanje morfoloških promena u duodenumu, ileumu, kolonu i jetri pacova

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

U eksperimentima su korišćeni mužjaci *Wistar albino* pacova uzgajani u vivarijumu Vojnomedicinske akademije u Beogradu. U ogleđima pri kojima je izazivana akutna hiperhomocisteinemija korišćene su životinje telesne mase 200-250 g. Za eksperimente sa subhroničnom aplikacijom metionina korišćeni su pacovi početne telesne mase oko 160 g i starosti 15-20 dana na početku eksperimenta. Pacovi su čuvani pojedinačno u pleksiglas-transparentnim kavezima sa dnom obloženim šuškom, sa hranom i vodom dostupnom *ad libitum* i konstantnim ambijentalnim uslovima (temperatura 21 ± 2 °C; vlažnost $55\pm 5\%$; ciklusom svetlo-tama na 12 h sa početkom svetlog perioda u 07:30 h). Period adaptacije je trajao sedam dana.

Protokol istraživanja je sproveden u skladu sa pravilima dobre laboratorijske prakse u radu sa eksperimentalnim životinjama, uz saglasnost Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj odluke 3307/2; rešenje br. 323-07-06141/2014-05). Sve korišćene hemikalije i reagensi su analitičkog stepena čistoće, proizvođača Sigma-Aldrich S.r.l. Milan, Italy.

3.2. Eksperimentalni protokol

3.2.1. AKUTNA HIPERHOMOCISTEINEMIJA

3.2.1.A. Akutna hiperhomocisteinemija u *in vivo* uslovima

Radi određivanja parametara oksidativnog stresa u tkivima pacova izloženih akutnoj hiperhomocisteinemiji životinje su podeljene u dve grupe (6 životinja po grupi). Životinje iz prve grupe su dobile po 1 ml 0,9% NaCl i.p. (kontrolna grupa), a druge po 0,6 $\mu\text{mol/g}$ tm D,L-homocisteina i.p. (eksperimentalna grupa). Nakon 2 sata boravka u kavezima u standardnim laboratorijskim uslovima, životinje su žrtvovane cervikalnom dislokacijom u opštoj anesteziji (Nesdonal, 40 mg/kg, i.p.). Posle žrtvovanja iseći duodenuma, ileuma, kolona i jetre su izolovani, a potom homogenizovani i centrifugirani 10 min na 10000

obrtaja. U homogenatu tkiva su određivani pokazatelji oksidativnog statusa (aktivnost CAT, GPx, SOD, totalni antioksidativni status (TAS) i indeks lipidne peroksidacije).

3.2.1.B. Akutna hiperhomocisteinemija u *in vitro* uslovima

Radi ispitivanja efekata akutne hiperhomocisteinemije na izolovana tkiva (*in vitro* uslovi) parametri oksidativnog stresa su određivani u tkivima duodenuma, ileuma, kolona i jetre inkubiranim u Tirodovom rastvoru (kontrolna grupa) i D,L-homocistein tiolaktonu (10 $\mu\text{mol/L}$) (eksperimentalna grupa) u toku 3 h. Životinje (6 životinja po grupi) su anestetizirane (Nesdonal, 40 mg/kg, i.p.), a potom žrtvovane cervikalnom dislokacijom. Organi su hirurški odstranjeni, postavljeni u petri šolje i inkubirani na sobnoj temperaturi u toku 3 sata. Zatim su tkiva homogenizovana, a potom centrifugirana 10 min na 10000 obrtaja. U supernatantu su određivani parametri oksidativnog stresa (aktivnost CAT, indeks lipidne peroksidacije, totalni antioksidativni status (TAS)).

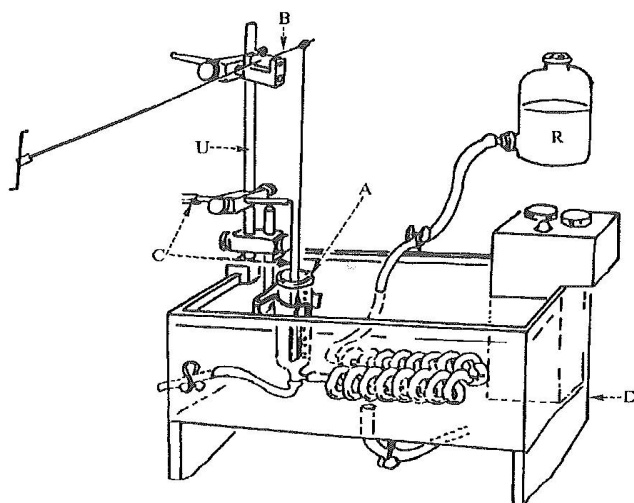
3.2.2. PRAĆENJE KONTRAKTILNOG ODGOVORA IZOLOVANOG CREVA

Eksperimenti su izvođeni na izolovanim isečcima duodenuma, ileuma i kolona pacova. Pacovi su anestetizirani injekcijom Nesdonala (40 mg/kg), a potom žrtvovani cervikalnom dislokacijom. Po žrtvovanju, preparati su postavljeni u kupatilo za izolovane organe zapremine 50 ml ispunjeno Tirodovim rastvorom (Slika 1., Slika 2., Slika 3). Rastvor se održavao na temperaturi od 37 °C, a putem staklene cevčice se dovodila mešavina kiseonika i ugljen-dioksida (95% O₂ i 5% CO₂). Nakon adaptacionog perioda od 30 min pristupilo se registrovanju mehaničke aktivnosti izolovanih segmenata creva. Kontraktilnost izolovanog segmenta creva se merila pomoću izometrijskog transdjusera pod mirovnom tenzijom od 1g pomoću pisača (Sensor Medics Dynograph Recorder R511A pisač).

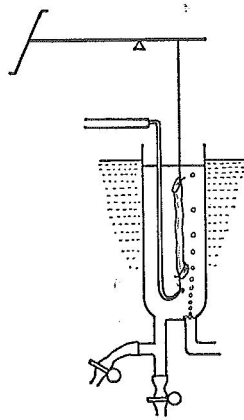
Pratio se tonus, amplituda i frekvencija spontanijh kontrakcija u Tirodovom rastvoru i u prisustvu D,L-homocistein tiolaktona i supstanci :

- koje moduliraju azot monoksidom (NO) posredovanu neurotransmisiju:
L-Arginin- 10 $\mu\text{mol/L}$
L-NAME (L-N-nitro-L-arginin metil estar)- 30 $\mu\text{mol/L}$
- koje utiĉu na dejstvo kalijumovih kanala:
TEA (Tetraetilamonijum hlorid)- 10 mmol/L.

Amplituda i tonus spontanijh kontrakcija izraĉavani su u miligramima tenzije, a frekvencija u broju kontrakcija u jednoj minuti.



Slika 7. Sistem za registrovanje motorne aktivnosti izolovanog creva pacova. A: kupatilo za izolovane organe (50 ml) ispunjeno Tirodovim rastvorom; B: poluga za registrovanje; C: dovod gasne smeše (95% O₂ i 5% CO₂); D: spoljašnje kupatilo u kome je temperatura vode konstantna (37 °C); U: stativ



Slika 7. Izolovani duodenum pacova pripremljen za registrovanje spontanijh kontrakcija longitudinalne muskulature. Isečak creva je potopljen u Tirodov rastvor na 37 °C u prisustvu 95% O₂ i 5% CO₂



Slika 8. Oprema za registrovanje kontrakcija izolovanog creva pacova u laboratoriji za gastrointestinalnu fiziologiju Instituta za medicinsku fiziologiju

3.2.3. SUBHRONIČNO I.P. OPTEREĆENJE METIONINOM TOKOM 3 NEDELJE

Pacovima se intraperitonealno aplikovao metionin tokom 21 dan (Cao YG i sar., 2009). Životinje su podeljene u četiri grupe (sa po 6 životinja u grupi) i tretirane prema sledećem režimu: 1. Kontrolna grupa (K) (0,9% NaCl 1 ml/dan); 2. Metionin (M) (0,8 mmol/kg/tm/dan); 3. Metionin (0,8 mmol/kg/tm/dan) + L-cistein (7mg/kg/tm/dan) (C) (Liapi i sar., 2009); 4. Metionin (0,8 mmol/kg/tm/dan) + N-acetil-L-cistein (50 mg/kg/tm/dan) (N) (Akbulut i sar., 2014). Vrednosti homocisteina su određivane pre početka eksperimenta, i na kraju eksperimenta. Posle 21. dana tretmana životinje su žrtvovane giljotinom za pacove, a potom su hirurški izolovani duodenum, ileum, kolon i jetra. Za potrebe biohemijskih ispitivanja tkiva su homogenizovana u fosfatnom puferu, a potom centrifugirana 10 min na 10000 obrtaja, dok su za histološku analizu odlagana u pripremljene posude sa formalinom čuvane na sobnoj temperaturi. Za određivanje koncentracije homocisteina krv je uzorkovana u specijalne epruvete postupkom iskrvarenja životinje. Uzorci seruma su nakon prikupljanja odstožali 15 min na sobnoj temperaturi, zatim su centrifugirani (15 min na 3000 obrtaja), a potom analizirani. Supernatant tkiva duodenuma, ileuma, kolona i jetre je zamrznut na -20 °C do analize.

Pratili su se efekti opterećenja metioninom na aktivnost acetilholinesteraze, parametre oksidativnog stresa, i histološke promene u ovim organima. Kao pokazatelji oksidativnog statusa ispitivani su: aktivnost katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GPx), superoksid dismutaze (SOD), indeks lipidne peroksidacije (MDA) i sadržaj redukovanog glutationa (GSH). U serumu je određivan nivo homocisteina, a hiperhomocisteinijom smatrale su se vrednosti homocisteina u plazmi veće od 15 $\mu\text{mol/L}$.

3.3. BIOHEMIJSKE ANALIZE

3.3.1. Određivanje ukupnog homocisteina u serumu

Koncentracija ukupnog homocisteina u serumu određivana je upotrebom komercijalnog kita metodom imunonefelometrije na laserskom nefelometru (BN II Dade Behring, Marburg, Germany).

3.3.2. Određivanje aktivnosti acetilholinesteraze (AChE)

Specifična aktivnost acetilholinesteraze (AChE) u tkivnom homogenatu duodenuma, ileuma, kolona i jetre određivana je spektrofotometrijski metodom po Ellman-u (1961). Princip reakcije je da acetilholinesteraza razlaže acetiltioholin jodid čiji se produkt razlaganja vezuje za DTNB (5,5'-ditiobis-2 nitro benzoeva kiselina). Kao rezultat reakcije nastaje žuto obojeni kompleks. Količina nastalog kompleksa merena je spektrofotometrijski i predstavlja indeks aktivnosti acetilholinesteraze. Epruvete su inkubirane na 37 °C u trajanju od 30 min. Smeša je zatim hlađena pod mlazom vode, i nakon toga je dodata reakciona smeša koja je sadržala DTNB i natrijum bikarbonat u 0,1 M fosfatnom puferu (pH=7,2). Nakon 5 min (radi stabilizacije temperature) dodavan je acetiltioholin jodid i praćena je promena ekstinkcije spektrofotometrijski na 412 nm u toku 3 min.

3.3.3. Određivanje parametara oksidativnog stresa

3.3.3.1. Analiza enzimske aktivnosti katalaze (CAT)

Aktivnost katalaze određivana je po metodi koja se bazira na razgradnji H₂O₂ na 240 nm u reakcionom medijumu koji sadrži 30 mM H₂O₂, 50 mmol/L kalijum-fosfat pufera, pH 7,0 i 0,1 ml uzorka (Aebi, 1984). Aktivnost katalaze je izražena u U/mg proteina.

3.3.3.2. Analiza enzimske aktivnosti glutation peroksidaze (GPx)

Metoda se bazira na oksidaciji redukovanog glutationa (GSH) sa iskorišćavanjem NADPH u reakciji koju katalizuje glutation reduktaza. Promena ekstinkcije (smanjenje) pri 340 nm (ekstinkcioni koeficijent $\epsilon = 0,0062$) kao posledica potrošnje $\text{NADPH} + \text{H}^+$ predstavlja meru aktivnosti glutation peroksidaze u vezanoj reakciji u kojoj učestvuje glutation reduktaza. Pri 340 nm i temperaturi 37 °C pratila se promena ekstinkcije po dodatku terc-butilhidroperoksida (t-BOOH) za probu. Jedinica aktivnosti je predstavljena kao U/mg proteina i ona pokazuje kolika količina enzima je potrebna da oksiduje 1 μmol NADPH/min (Kozic i sar., 2002).

3.3.3.3. Analiza enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Aktivnost SOD određivana je kao procenat inhibicije autooksidacije adrenalina u baznoj sredini (Sun i Zigman, 1987). Superoksid dismutaza katalizuje sledeću reakciju: $\cdot\text{O}_2^- + \text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ što uklanja $\cdot\text{O}_2^-$ i inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina. Aktivnost ukupne SOD određivana je kinetički, kao promena ekstinkcije u vremenu (10 minuta) na talasnoj dužini od 480 nm. Reaktivna smeša je sadržala Na-bikarbonat pufer (50mmol/L, pH 10,2), adrenalin (0,5 mmol/L) i 0,1 ml uzorka; reakcija je započela dodavanjem 0,1 ml rastvora adrenalina (0,01 M u 0,01 M HCl). Promena ekstinkcije iste reakcione smeše u koju je dodato 0,1 ml 0,01 M HCl je korišćena kao slepa proba u odnosu na koju je inhibicija preračunata. Aktivnost SOD je izražavana u jedinicama aktivnosti po mg proteina. Jedinica aktivnosti je definisana kao aktivnost enzima koji dovodi do 50% inhibicije autooksidacije adrenalina.

3.3.3.4. Određivanje stepena lipidne peroksidacije

Indeks lipidne peroksidacije je određivan merenjem koncentracije malondialdehida (MDA) u homogenatu tkiva duodenuma, ileuma, kolona i jetre pacova. Tiobarbituratna kiselina (TBA) reaguje sa malondialdehidom (MDA), koji je jedan od krajnjih proizvoda

lipidne peroksidacije. Na povišenoj temperaturi, u kiseloj sredini MDA učestvuje u reakcijama nukleofilne adicije sa TBA, pri čemu nastaje konjugat crvene boje (u odnosu 1 MDA: 2 TBA), sa pikom apsorpcije na 532 nm. Nativna (inicijalna) količina lipidnih peroksida odnosno reaktanata sa TBA u homogenatu tkiva, određuje se sprečavanjem procesa lipidne peroksidacije u fazi zagrevanja inkubacione smeše, dodavanjem antioksidansa butiliranog hidroksi-toluena (BHT). Intenzitet indukovane lipidne peroksidacije koja se pokreće u *in vitro* uslovima određivala se dodavanjem feri jona i askorbinske kiseline. Količina stvorenog MDA merila se na 533 nm (Draper i Hadley, 1990).

3.3.3.5. Određivanje sadržaja redukovanog glutationa (GSH)

Sadržaj redukovanog glutationa (GSH) određivan je spektrofotometrijski upotrebom 5,5 ditiobis-2-nitrobenzoeve kiseline (DTNB), takozvani Ellman-ov reagens (Elman, 1959). DTNB reaguje sa alifatičnim tiol jedinjenjima pri pH 8,0 stvarajući p-nitrofenol anjon žute boje. Intenzitet nastale boje koristi se za određivanje koncentracije GSH očitavanjem ekstinkcije na spektrofotometru na 412 nm. Postupak određivanja sadržaja redukovanog glutationa je da se deproteiniziran uzorak sa 10% sulfosalicilnom kiselinom u odnosu 2:1 snažno promeša i centrifugira 20 min na 6000 obrtaja/min. Dobijeni supernatant koristi se u daljem postupku. Sadržaj redukovanog glutationa izražava se kao $\mu\text{mol GSH/mg proteina}$.

3.3.3.6. Određivanje totalnog antioksidativnog statusa (TAS)

Totalni antioksidativni status je određivan sa Randox reagens setom (Randox). Određivanje je bazirano na reakciji 2,2,-azino-di-3-etilbenitiazolin sulfonat (ABTS^+) sa peroksidazom (metmioglobin) i H_2O_2 koji produkuju radikal katjon ABTS^+ (Johnstone i sar., 2006). Za totalni antioksidativni esej 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina je rastvorena u destilovanoj vodi do koncentracije od 7 mM.

ABTS radikal katjon (ABTS^+) je nastao reakcijom ABTS štok rastvora sa 2,45 mM kalijum perisulfata (krajnja koncentracija) i nakon inkubacije rastvora u mraku na sobnoj

temperaturi 12–16 h pre upotrebe. Radikal štok rastvor je razblažen sa 5 mM fosfatnog pufera (PBS; pH 7,4) radi očitavanja spektrofotometrijske vrednosti apsorbance od $0,700 \pm 0,020$ na 734 nm. Trolox (Vitamin E analog) standardi (Calbiochem) su pripremani u PBS u opsegu 0–15 μM . Za standardizaciju startne pozicije svih eseja i standarda, 10 μl uzorak/Trolox standarda je dodato u 1 ml ABTS \pm rastvora ($A_{734 \text{ nm}} = 0,700 \pm 0,020$) i čitanje apsorbance je otpočeto tačno 1 min posle inicijalnog mešanja sve do smanjenja apsorbance. Antioksidativna aktivnost je izražena kao stepen smanjenja apsorbance (min/mg protein) i kao prosek tri ponovljena merenja.

Svi parametri oksidativnog stresa analizirani su spektrofotometrijski (UV/VIS UV-2601, Rayleigh, Mainland, China).

Koncentracija proteina određivana je metodom po Bradfordu (1976).

3.4. HISTOLOŠKE ANALIZE

Duodenum, ileum, kolon i jetra su fiksirani u 10% puferisanom rastvoru formalina i kalupljeni u parafinu. Analiza tkiva duodenuma, ileuma i kolona je rađena na preparatima bojenim H/E i Masson trihromnim bojenjem. Za potrebe analize tkiva jetre su korišćeni H/E, retikulin i Masson trihromno bojenje. Za procenu indeksa proliferacije hepatocita korišćeno je imunohistohemijsko bojenje antitelima na Ki67. Isečci debljine 3-5 μm bojeni su Masson trichrome tehnikom sa ciljem prikazivanja kolagenih vlakana (Bradbury i Gordon, 1982). Za prikazivanje retikularnih vlakana korišćena je metoda impregnacije srebrom po Gomoriju. Za analizu je upotrebljen svetlosni mikroskop Olympus BX41 sa Olympus C5060-ADU “wide zoom” kamerom. Histološka obrada uzoraka podrazumevala je morfometrijska merenja i analizu zastupljenosti elemenata vezivnog tkiva.

3.4.1. Morfometrijska merenja

Od morfometrijskih parametara mereni su (izraženo u μm): dubina kripti, dužina resica, debljina lamine muskularis mukoze, debljina tunike mukoze, debljina tunike muskularis i ukupna debljina zida creva. Ovi elementi mereni su isključivo na preparatima

sa uzdužnim presekom, na uveličanju 100x. Gustina ćelija u lamini propriji tunike mukoze je izražena kao broj ćelija na $0,1 \text{ mm}^2$. Za brojanje ćelija korišćeni su preparati sa poprečnim presekom, pod uveličanjem 250x. Svi elementi analizirani su korišćenjem softvera Fiji (Schindelin i sar., 2012).

3.4.2. Analiza elemenata vezivnog tkiva lamine proprije

Određivana je zastupljenost kolagenih i retikularnih vlakana u lamini propriji delova creva pacova u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama. Analizirano je po 10 vidnih polja na svakom isečku. U svakom od vidnih polja označen je region od interesa koji je obuhvatao samo laminu propriju, a isključivao kripte. Za određivanje zastupljenosti kolagenih i retikularnih vlakana korišćen je Color Picker Threshold plugin u okviru programa Icy 1.4.3.5 (Quantitative Image Analysis Unit, Institut Pasteur, Pariz, Francuska). Color Picker Threshold plugin-om za svaki isečak odabrano je 10 “pozitivnih” i 10 “negativnih” boja. Na Masson trichrome preparatima “pozitivne” boje predstavljale su različite nijanse zelene, kojom su na datom isečku obojena kolagena vlakna, a “negativne” boje različite nijanse crvene, smeđe i bele. Na preparatima impregnisanim srebrom metodom po Gomoriju kao "pozitivna" boja uzeta je crna, dok su "negativne" boje bile različite nijanse braon, sive i bela. Color Picker Threshold plugin, dakle, zahvaljujući pravilnom odabiru boja, prepoznaje kolagena i retikularna vlakna i računa površinu koju ona zauzimaju u određenom delu lamine proprije. Zastupljenost kolagenih i retikularnih vlakana u lamini propriji izražena je u procentima i definisana kao površina pokrivena kolagenim/retikularnim vlaknima u odnosu na površinu selektovane lamine proprije u kojoj je vršeno merenje.

3.5. STATISTIČKA ANALIZA

Za statističku obradu podataka korišćen je softver GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc, Goleta, CA, USA). Od metoda analitičke statistike za poređenje numeričkih obeležja posmatranja između dve grupe korišćen je t-test. Za multiplu komparaciju prosečnih vrednosti parametarskih obeležja koristila se jednofaktorska analiza varijanse (one-way ANOVA) praćena Bonferroni testom, kao i dvofaktorska analiza varijanse (two-way ANOVA). Dobijeni rezultati su prikazani tabelama i grafikonima. Vrednost $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom, a vrednost $p < 0,01$ statistički visoko značajnom.

4. REZULTATI

4.1. AKUTNA HIPERHOMOCISTEINEMIJA *IN VIVO*

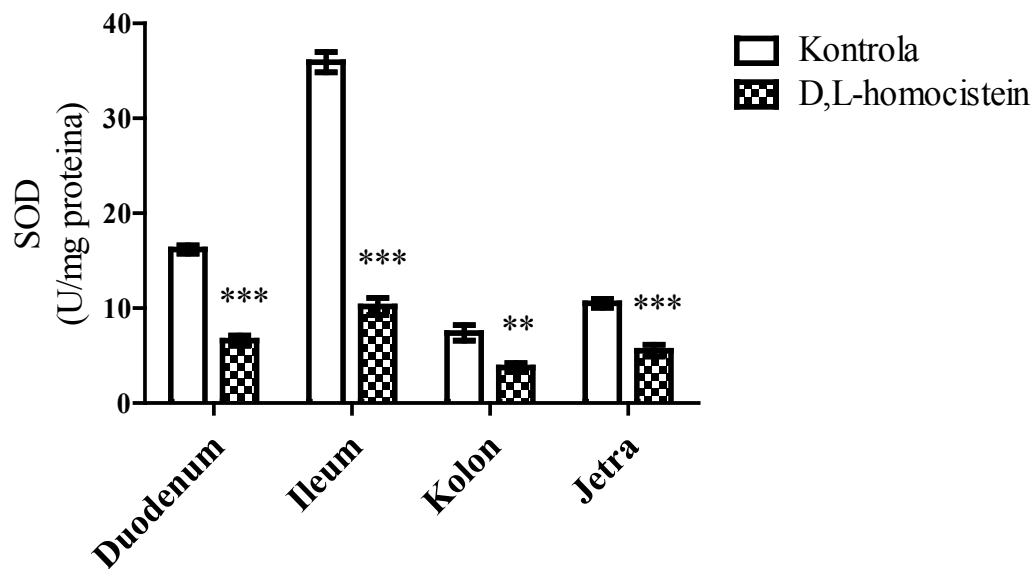
4.1.1. Efekti D,L-homocisteina na parametre oksidativnog stresa u tkivu duodenuma, ileuma, kolona i jetre pacova

Akutna administracija D,L-homocisteina (0,6 $\mu\text{mol/g tm}$) dovela je do značajnih promena u vrednostima biomarkera oksidativnog stresa u duodenumu, ileumu, kolonu i jetri pacova u poređenju sa kontrolnim životinjama koje su tretirane i.p. sa 1 ml 0,9% NaCl. Pratili smo aktivnost superoksid dismutaze (SOD), glutation peroksidaze (GPx), katalaze (CAT), indeksa lipidne peroksidacije (TBARS) i totalnog antioksidativnog statusa (TAS) 2 sata nakon i.p. aplikacije D,L-homocisteina (D,L-Hcy).

Rezultati aktivnosti SOD pokazali su smanjenje izmerenih vrednosti u grupi tretiranoj D,L-Hcy u poređenju sa kontrolnom grupom u svim ispitivanim organima. Ovo smanjenje aktivnosti enzima bilo je statistički visoko značajno ($p < 0,001$ -duodenum; $p < 0,001$ -ileum; $p < 0,01$ -kolon; $p < 0,001$ -jetra) (Grafikon 1). U grupi tretiranoj D,L-Hcy najviše vrednosti zabeležene su u ileumu ($10,17 \pm 0,90$), a najniže u kolonu ($3,75 \pm 0,46$), dok je sniženje bilo najizraženije u ileumu (za 71,68%), a najmanje u jetri (za 47,38%). Vrednosti u zagradama predstavljene su kao srednja vrednost \pm standardna greška i kao procenat promene posmatranog parametra (Tabela 1.).

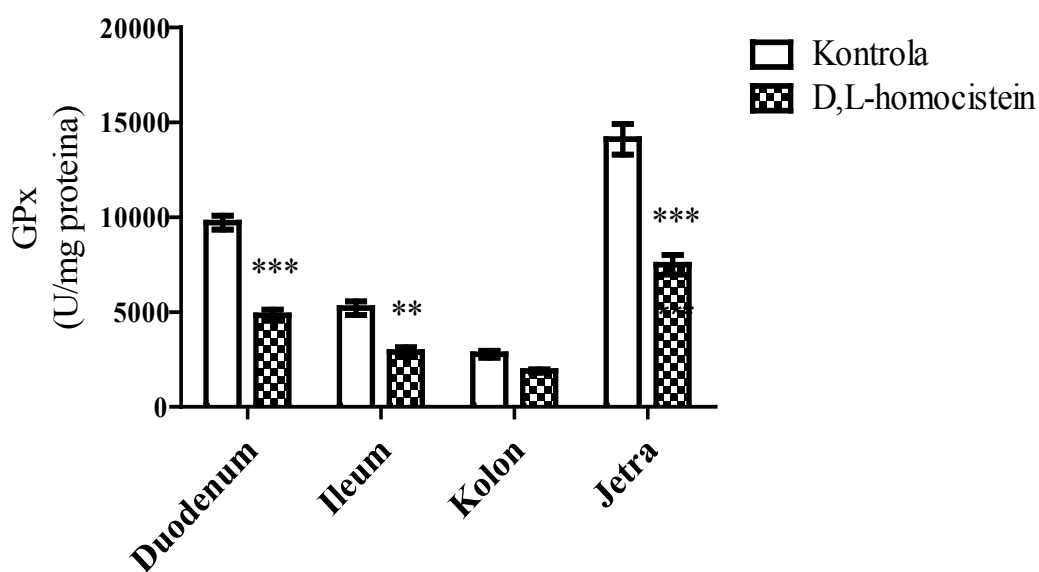
Tabela 1. Parametri oksidativnog stresa u duodenumu, ileumu, kolonu i jetri kontrolnih životinja (grupa I) i životinja tretiranih D,L-homocisteinom (grupa II). Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška (SE) za po 6 životinja u grupi; (u grupi II % promena u poređenju sa kontrolnim vrednostima; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

	Superoksid dismutaza (U/mg proteina)		Glutation peroksidaza (U/mg proteina)	
	Grupa I	Grupa II	Grupa I	Grupa II
Duodenum	16,18 \pm 0,45	6,58 \pm 0,55*** ↓ 59,3%	9709,33 \pm 366,708	4831,67 \pm 287,69*** ↓ 50,23%
Ileum	35,91 \pm 1,07	10,17 \pm 0,90*** ↓ 71,68%	5204,33 \pm 355,17	2896,17 \pm 252,20** ↓ 44,35%
Kolon	7,40 \pm 0,82	3,75 \pm 0,46** ↓ 49,32%	2768,67 \pm 183,28	1889,83 \pm 82,89 ↓ 31,76%
Jetra	10,51 \pm 0,47	5,53 \pm 0,63*** ↓ 47,38%	14103,67 \pm 809,96	7491,00 \pm 516,86*** ↓ 46,89%



Grafikon 1. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u duodenumu, ileumu, kolonu i jetri kontrolnih životinja i životinja tretiranih D,L-homocisteinom; po 6 životinja u grupi (n=6); **p<0,01; ***p<0,001 statistički visoko značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom

Rezultati aktivnosti GPx pokazali su smanjenje izmerenih vrednosti u grupi tretiranoj D,L-Hcy u poređenju sa kontrolnom grupom u svim ispitivanim organima. Smanjenje aktivnosti enzima bilo je statistički visoko značajno u tri organa ($p < 0,001$ -duodenum; $p < 0,01$ -ileum; $p < 0,001$ -jetra), dok promena u kolonu nije bila statistički značajna (Grafikon 2). U grupi tretiranoj D,L-homocisteinom najviše vrednosti zabeležene su u jetri ($7491,00 \pm 516,86$), a najniže u kolonu ($1889,83 \pm 82,89$), dok je sniženje bilo najizraženije u duodenumu (za 50,23%), a najmanje u kolonu (za 31,76%). Vrednosti u zagradama predstavljene su kao srednja vrednost \pm standardna greška i kao procenat promene posmatranog parametra (Tabela 1.).

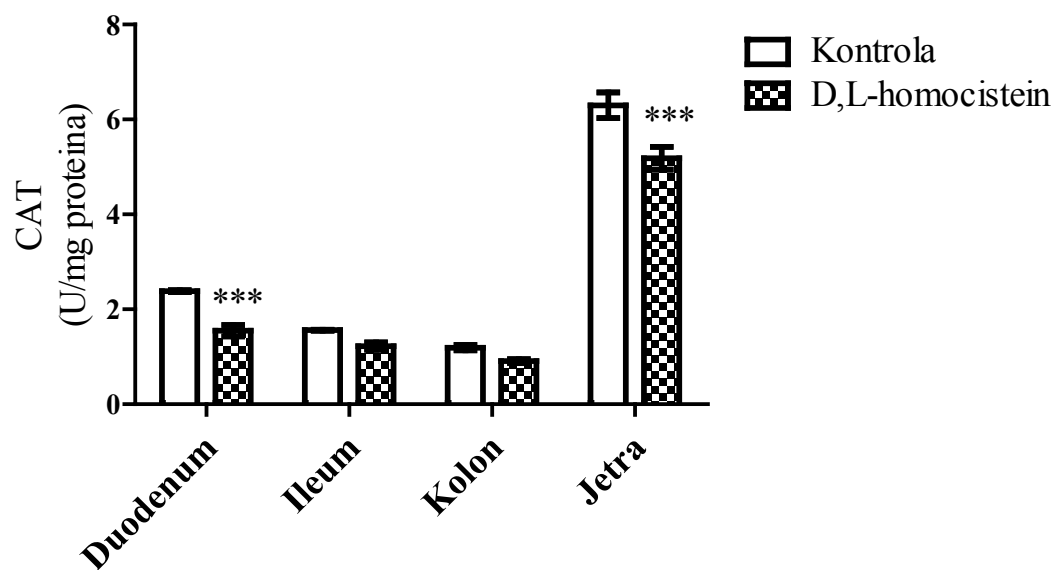


Grafikon 2. Aktivnost glutation peroksidaze (GPx) u duodenumu, ileumu, kolonu i jetri kontrolnih životinja i životinja tretiranih D,L-homocisteinom; po 6 životinja u grupi ($n=6$); ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom

Rezultati aktivnosti CAT pokazali su smanjenje izmerenih vrednosti u grupi tretiranoj D,L-Hcy u poređenju sa kontrolnom grupom u svim ispitivanim organima. Smanjenje aktivnosti enzima bilo je statistički visoko značajno u dva organa ($p < 0,001$ -duodenum; $p < 0,001$ -jetra), dok promena u ileumu i kolonu nije bila statistički značajna (Grafikon 3). U grupi tretiranoj D,L-homocisteinom najviše vrednosti zabeležene su u jetri ($5,18 \pm 0,24$), a najniže u kolonu ($0,91 \pm 0,04$), dok je sniženje bilo najizraženije u duodenumu (za 34,87%), a najmanje u jetri (za 17,78%). Vrednosti u zagradama predstavljene su kao srednja vrednost \pm standardna greška i kao procenat promene posmatranog parametra (Tabela 2.).

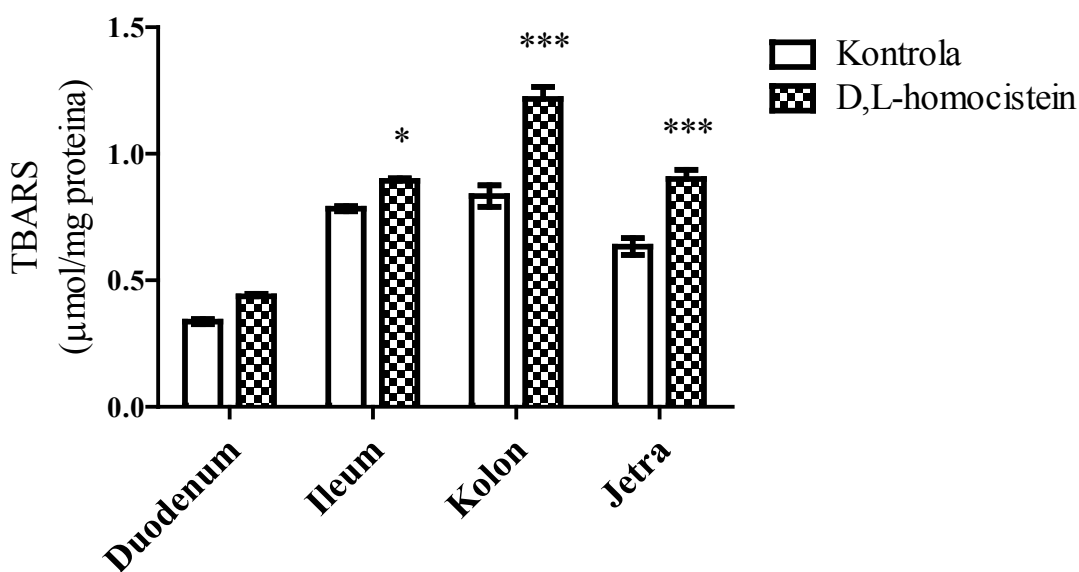
Tabela 2. Parametri oksidativnog stresa u duodenumu, ileumu, kolonu i jetri kontrolnih životinja (grupa I) i životinja tretiranih D,L-homocisteinom (grupa II). Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna greška (SE) za po 6 životinja u grupi; (u grupi II % promena u poređenju sa kontrolnim vrednostima; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

	Katalaza (U/mg proteina)		TBARS (μmol/mg proteina)		TAS (mmol Trolox/mg proteina)	
	Grupa I	Grupa II	Grupa I	Grupa II	Grupa I	Grupa II
Duodenum	2,38±0,02	1,55±0,12 *** ↓ 34,87 %	0,34±0,01	0,44±0,01 ↑ 29,67%	0,58±0,01	0,41±0,01 ↓ 28,42%
Ileum	1,56 ±0,01	1,22±0,08 ↓ 21,79%	0,78±0,01	0,89±0,01 * ↑ 14,05%	1,64±0,01	1,45±0,01 ↓ 11,60%
Kolon	1,19±0,05	0,91±0,04 ↓ 23,53%	0,83±0,04	1,22±0,05 *** ↑ 46,10%	4,37±0,06	3,68±0,08 ** ↓ 15,66%
Jetra	6,30±0,27	5,18±0,24 *** ↓ 17,78%	0,63±0,03	0,90±0,04 *** ↑ 42,86%	5,43±0,34	4,12±0,11 *** ↓ 24,22%



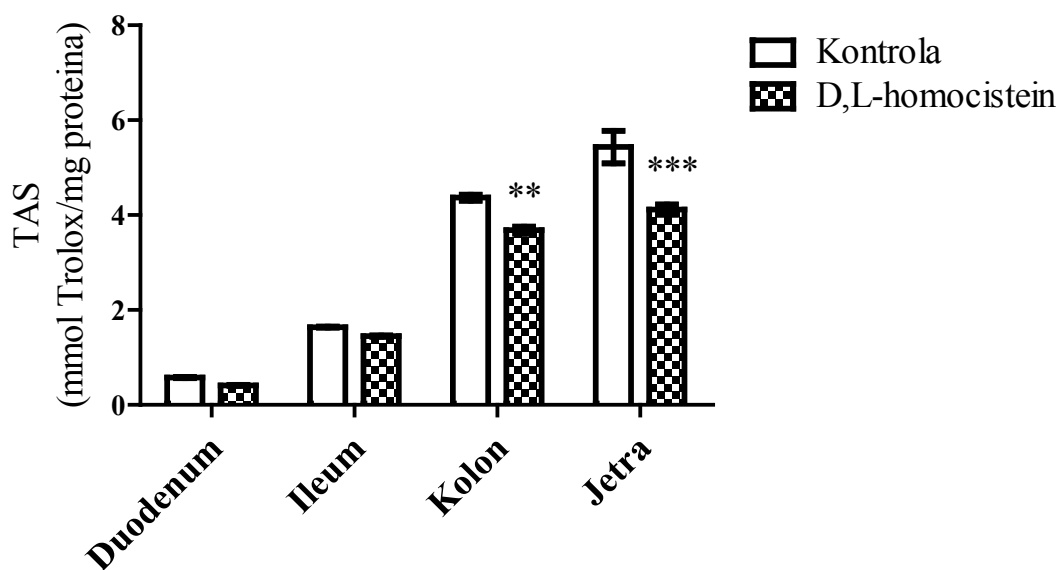
Grafikon 3. Aktivnost katalaze (CAT) u duodenumu, ileumu, kolonu i jetri kontrolnih životinja i životinja tretiranih D,L-homocisteinom; po 6 životinja u grupi (n=6); ***p<0,001 statistički visoko značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom

Rezultati merenja lipidne peroksidacije pokazali su povećanje izmerenih vrednosti TBARS u grupi tretiranoj D,L-Hcy u poređenju sa kontrolnom grupom u svim ispitivanim organima. Povećanje koncentracije TBARS bilo je statistički značajno u tri organa ($p < 0,05$ –ileum; $p < 0,001$ –kolon; $p < 0,001$ –jetra), dok promena u duodenumu nije bila statistički značajna (Grafikon 4). U grupi tretiranoj D,L-homocisteinom najviše vrednosti zabeležene su u kolonu ($1,22 \pm 0,05$), a najniže u duodenumu ($0,44 \pm 0,01$), dok je povećanje bilo najizraženije u kolonu (za 46,10%), a najmanje u ileumu (za 14,05%). Vrednosti u zagradama predstavljene su kao srednja vrednost \pm standardna greška i kao procenat promene posmatranog parametra (Tabela 2.).



Grafikon 4. Koncentracija TBARS u duodenumu, ileumu, kolonu i jetri kontrolnih životinja i životinja tretiranih D,L-homocisteinom; po 6 životinja u grupi (n=6); * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom; *** $p < 0,001$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom

Rezultati merenja totalnog antioksidativnog statusa (TAS), izraženi kao koncentracija Troloxa, pokazali su smanjenje izmerenih vrednosti u grupi tretiranoj D,L-Hcy u poređenju sa kontrolnom grupom u svim ispitivanim organima. Smanjenje TAS-a bilo je statistički visoko značajno u dva organa ($p < 0,01$ -kolon; $p < 0,001$ -jetra), dok promena u duodenumu i ileumu nije bila statistički značajna (Grafikon 5). U grupi tretiranoj D,L-homocisteinom najviše vrednosti zabeležene su u jetri ($4,12 \pm 0,11$), a najniže u duodenumu ($0,41 \pm 0,01$), dok je sniženje bilo najizraženije u duodenumu (za 28,42%), a najmanje u ileumu (za 11,60%). Vrednosti u zagradama predstavljene su kao srednja vrednost \pm standardna greška i kao procenat promene posmatranog parametra (Tabela 2.).



Grafikon 5. Totalni antioksidativni status (TAS) u duodenumu, ileumu, kolonu i jetri kontrolnih životinja i životinja tretiranih D,L-homocisteinom; po 6 životinja u grupi ($n=6$); ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom

4.2. AKUTNA HIPERHOMOCISTEINEMIJA *IN VITRO*

4.2.1. Parametri oksidativnog stresa u izolovanim segmentima creva i jetre pacova u kontrolnim uslovima

Aktivnost katalaze (CAT), indeks lipidne peroksidacije (TBARS) i totalni antioksidativni status (TAS) u izolovanim segmentima duodenuma, ileuma, kolona i jetre inkubiranih u Tirodovom rastvoru tokom 3 sata

Kontrolne vrednosti parametara oksidativnog stresa (aktivnost CAT, TBARS i TAS) prikazani su u Tabeli 3.

Tabela 3. Parametri oksidativnog stresa u duodenumu, ileumu, kolonu i jetri kontrolnih životinja (grupa I) i životinja tretiranih D,L-homocistein tiolaktonom (grupa II). Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška za po 6 životinja u grupi (n=6); (u grupi II % promena u poređenju sa kontrolnim vrednostima); *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

	Katalaza (U/mg proteina)		TBARS (μmol/mg proteina)		TAS (mmol Trolox/mg proteina)	
	Grupa I	Grupa II	Grupa I	Grupa II	Grupa I	Grupa II
Duodenum	166,50 \pm 10,44	121,45 \pm 4,88 ** ↓ 27,04%	0,92 \pm 0,23	2,23 \pm 0,28 ** ↑ 106,05%	7,24 \pm 0,45	8,73 \pm 0,64 *** ↑ 20,68%
Ileum	291,99 \pm 14,92	203,50 \pm 31,12 *** ↓ 37,27%	1,10 \pm 0,10	1,62 \pm 0,10 ** ↑ 47,24%	5,39 \pm 0,28	6,73 \pm 0,20 *** ↑ 24,74%
Kolon	232,11 \pm 14,92	152,79 \pm 15,11 *** ↓ 34,17%	1,10 \pm 0,14	2,34 \pm 0,24 ** ↑ 112,75 %	5,87 \pm 0,14	6,74 \pm 0,09 *** ↑ 14,88%
Jetra	347,63 \pm 60,11	113,13 \pm 10,77 *** ↓ 67,46%	2,43 \pm 0,18	3,21 \pm 0,29 ** ↑ 32,07%	5,34 \pm 0,41	6,37 \pm 0,43 *** ↑ 19,35%

Aktivnost katalaze pokazala je najviše vrednosti u jetri ($347,63 \pm 60,11$), a najniže vrednosti u duodenumu ($166,50 \pm 10,44$). Prisutna je statistički značajna razlika među vrednostima u jetri i drugim ispitivanim organima gastrointestinalnog trakta. Takođe, postoji i razlika među drugim organima: duodenum –D; ileum –I; kolon –C; jetra –J (D/I $p < 0,01$; D/C $p < 0,01$; D/J $p < 0,05$; I/C ne postoji statistički značajna razlika; I/J $p < 0,01$; C/J $p < 0,05$). Vrednosti u zagradama predstavljene su kao srednja vrednost \pm standardna greška.

TBARS koncentracija pokazivala je najviše vrednosti u jetri ($2,43 \pm 0,1$), a najniže u duodenumu ($0,92 \pm 0,23$). Postojala je statistički značajna razlika između kontrolnih vrednosti u jetri i drugim ispitivanim organima ($P < 0,001$), ali razlika između duodenuma, ileuma i kolona nije bila značajna (D/I ne postoji statistički značajna razlika; D/K ne postoji statistički značajna razlika; D/J $p < 0,001$; I/K ne postoji statistički značajna razlika; I/J $p < 0,001$, K/J $p < 0,001$). Vrednosti u zagradama predstavljene su kao srednja vrednost \pm standardna greška.

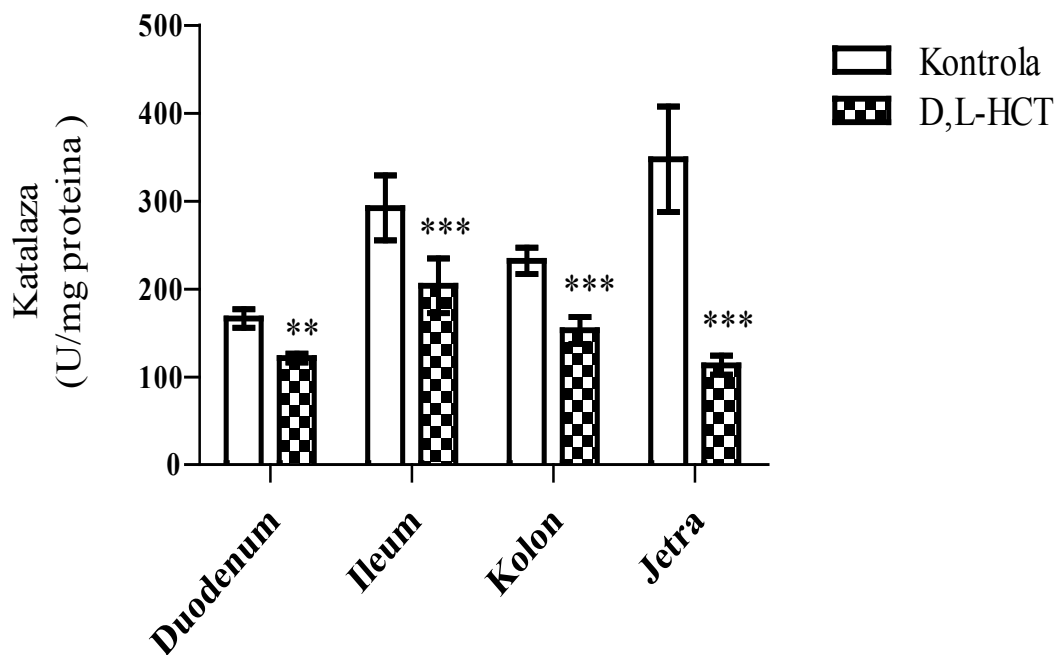
TAS vrednosti bile su najviše u duodenumu ($7,24 \pm 0,45$), statistički značajno više u poređenju sa vrednostima u ileumu, kolonu i jetri. D/I $p < 0,05$; D/K $p < 0,05$; D/J $p < 0,05$. Nije bilo značajne razlike između vrednosti u druga tri ispitivana organa (I/K ne postoji statistički značajna razlika; I/J ne postoji statistički značajna razlika, K/J ne postoji statistički značajna razlika). Vrednosti u zagradama predstavljene su kao srednja vrednost \pm standardna greška.

4.2.2. Efekti D,L-homocistein tiolaktona na parametre oksidativnog stresa u izolovanim segmentima creva i jetre pacova

Aktivnost katalaze (CAT), indeks lipidne peroksidacije (TBARS) i totalni antioksidativni status (TAS) u izolovanim segmentima duodenuma, ileuma, kolona i jetre inkubiranih u D,L-homocistein tiolaktonu (10 $\mu\text{mol/L}$) tokom 3 sata

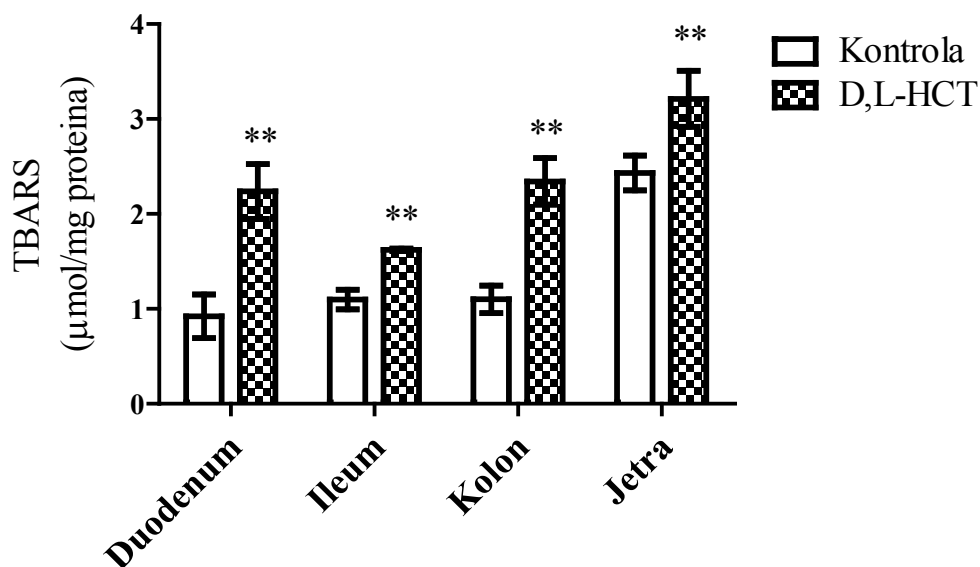
Inkubacija u D,L-homocistein tiolaktonu tokom 3 sata pokazala je značajan uticaj na antioksidativnu zaštitu i indeks lipidne peroksidacije u svim ispitivanim organima (Tabela 3.).

Aktivnost katalaze je bila smanjena u svim organima, a maksimalno sniženje je primećeno u ileumu i jetri. Apsolutne vrednosti ukazuju na najvišu aktivnost katalaze u ileumu ($203,50 \pm 31,12$) a najniže u jetri ($113,13 \pm 10,78$). Na grafikonu 6. su prikazane kontrolne vrednosti i smanjenje aktivnosti katalaze posle inkubacije u D,L-homocistein tiolaktonu (varirale su od 27,04% u duodenumu do 67,6% u jetri). Pokazana je statistički značajna razlika u poređenju sa kontrolnim vrednostima: $p < 0,01$, ali su i razlike među nekim organima bile statistički značajne: (D/I $p < 0,05$; D/K ne postoji statistički značajna razlika; D/J ne postoji statistički značajna razlika; I/K ne postoji statistički značajna razlika; I/J $p < 0,05$; K/J ne postoji statistički značajna razlika). Vrednosti u zagradama predstavljene su kao srednja vrednost \pm standardna greška i kao procenat promene posmatranog parametra.



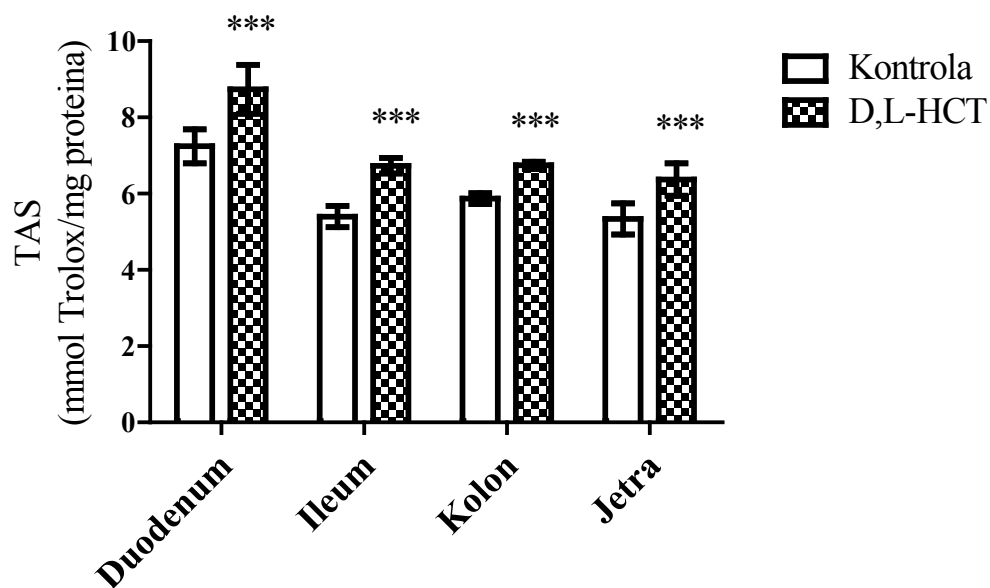
Grafikon 6. Aktivnost katalaze u duodenumu, ileumu, kolonu i jetri kontrolnih životinja i životinja tretiranih D,L-homocistein tiolaktonom (D,L-HCT); rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška za po 6 životinja u grupi; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom

Grafikon 7. prikazuje vrednosti TBARS. Najviši nivo TBARS izmeren je u jetri ($3,21 \pm 0,30$), dok su najniže vrednosti bile u ileumu ($1,62 \pm 0,01$). Najviše povećanje u poređenju sa kontrolnom grupom je izmereno u kolonu (112,76%), a najniže u jetri (32,07%). Sve vrednosti bile su statistički značajne u poređenju sa kontrolom (D/I ne postoji statistički značajna razlika; D/K ne postoji statistički značajna razlika; D/J $p < 0,05$; I/K $p < 0,05$; I/J $p < 0,001$; K/J $p < 0,05$). Vrednosti u zagradama predstavljene su kao srednja vrednost \pm standardna greška i kao procenat promene posmatranog parametra.



Grafikon 7. Koncentracija TBARS u duodenumu, ileumu, kolonu i jetri kontrolnih životinja i životinja tretiranih D,L-homocistein tiolaktonom (D,L-HCT); rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška za po 6 životinja u grupi; ** $p < 0,01$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom

Na Grafikonu 8. prikazani su nivoi TAS. Povećane vrednosti varirale su od najviših u duodenumu ($8,73 \pm 0,64$), do najnižih u jetri ($6,37 \pm 0,43$). Povećanje je variralo od najnižeg (14,88%) u kolonu do najvišeg (24,74%) u ileumu. Sve vrednosti bile su statistički značajne u poređenju sa kontrolom (D/I $p < 0,05$; D/K $p < 0,05$; D/J $p < 0,05$; I/K ne postoji statistički značajna razlika; I/J ne postoji statistički značajna razlika; K/J ne postoji statistički značajna razlika). Vrednosti u zagradama predstavljene su kao srednja vrednost \pm standardna greška i kao procenat promene posmatranog parametra.



Grafikon 8. Totalni antioksidativni status (TAS) u duodenumu, ileumu, kolonu i jetri kontrolnih životinja i životinja tretiranih D,L-homocistein tiolaktonom (D,L-HCT); rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška za po 6 životinja u grupi; *** $p < 0,001$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom

4.3. KONTRAKTILNI ODGOVOR IZOLOVANOG CREVA

4.3.1. Spontana aktivnost longitudinalne muskulature izolovanog duodenuma, ileuma i kolona pacova

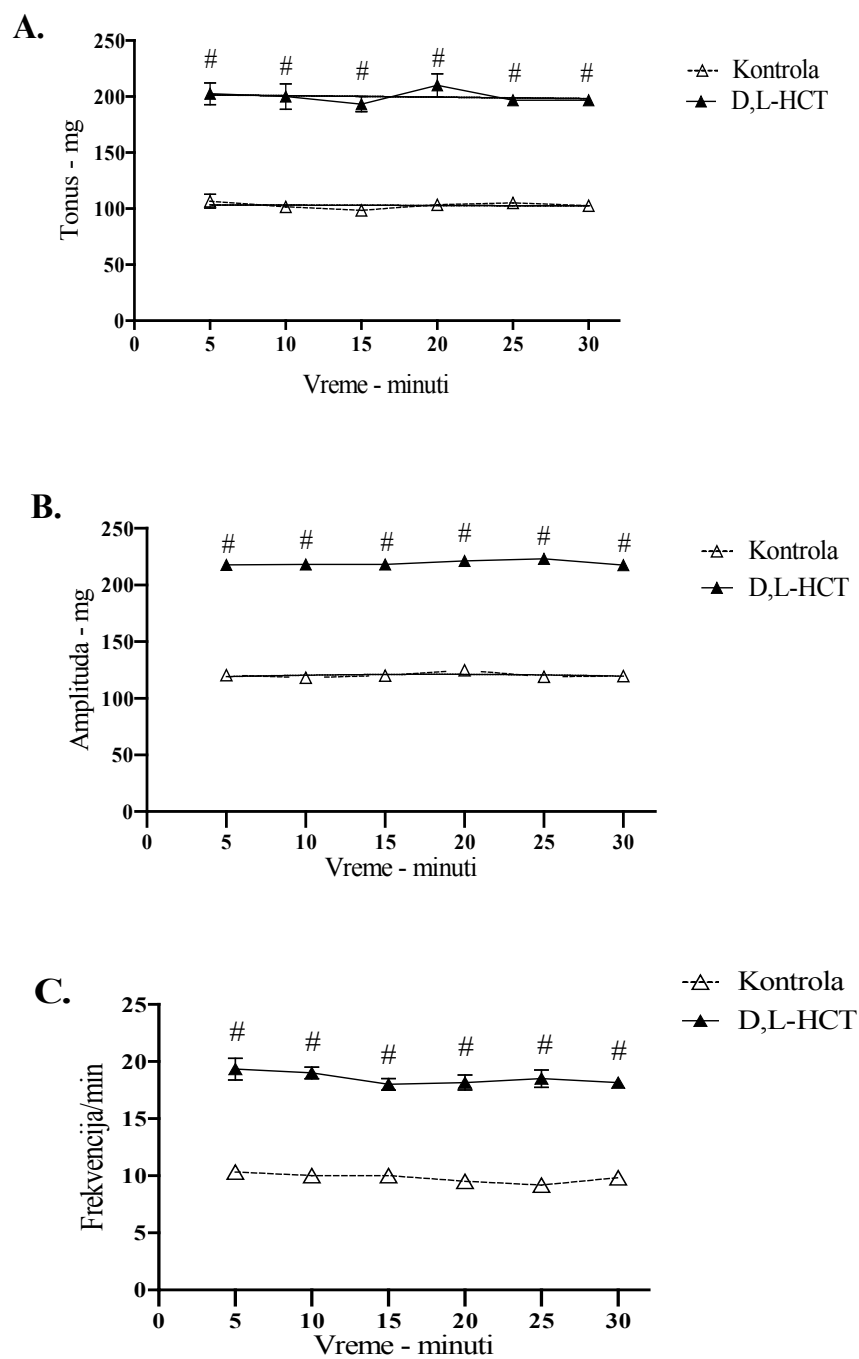
Spontana aktivnost izolovanih segmenata creva (duodenum, ileum, kolon) praćena je posle jednog sata adaptacije u Tirodovom rastvoru. U duodenumu vrednosti tonusa kretale su se od 98,33 – 106,70 mg, sa srednjom vrednošću $102,90 \pm 1,17$ mg. Amplituda kontrakcija segmenata duodenuma kretala se od 118,10 – 124,60 mg, ($120,30 \pm 0,93$ mg), dok je frekvencija spontanih pokreta iznosila 9,17 - 10,33 /min ($9,81 \pm 0,17$ /min). Spontana aktivnost ilealnih segmenata pokazala je vrednosti tonusa 110 – 122,5 mg ($115,8 \pm 1,95$ mg), amplitude 128,7 – 136,6 mg ($131,4 \pm 1,18$ mg) i frekvencije u rasponu 10,17 – 12,50 /min ($11,33 \pm 0,31$ /min). Izolovani segmenti kolona pokazuju spontanu aktivnost sa vrednostima tonusa 108 – 114,2 mg ($111,7 \pm 0,95$ mg), amplitude 132,5 – 140,9 mg ($135,8 \pm 1,3$) i frekvencije u rasponu od 9,83 – 10,50 /min ($10,31 \pm 0,13$ /min). Vrednosti u zagradi prikazane su kao srednja vrednost \pm standardna greška (Tabela 4.).

Tabela 4. Parametri kontraktilne funkcije izolovanih segmenata creva tokom inkubacije u Tirodovom rastvoru. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm standardna greška za po 6 životinja u grupi (n=6)

	Tonus (mg)	Amplituda (mg)	Frekvencija /min
Duodenum	$102,9 \pm 1,17$	$120,3 \pm 0,93$	$9,81 \pm 0,17$
Ileum	$115,8 \pm 1,95$	$131,4 \pm 1,18$	$11,33 \pm 0,31$
Kolon	$111,7 \pm 0,95$	$135,8 \pm 1,30$	$10,31 \pm 0,13$

4.3.2. Efekti D,L-homocistein tiolaktona na tonus, amplitudu i frekvenciju spontanijh kontrakcija izolovanog duodenuma pacova

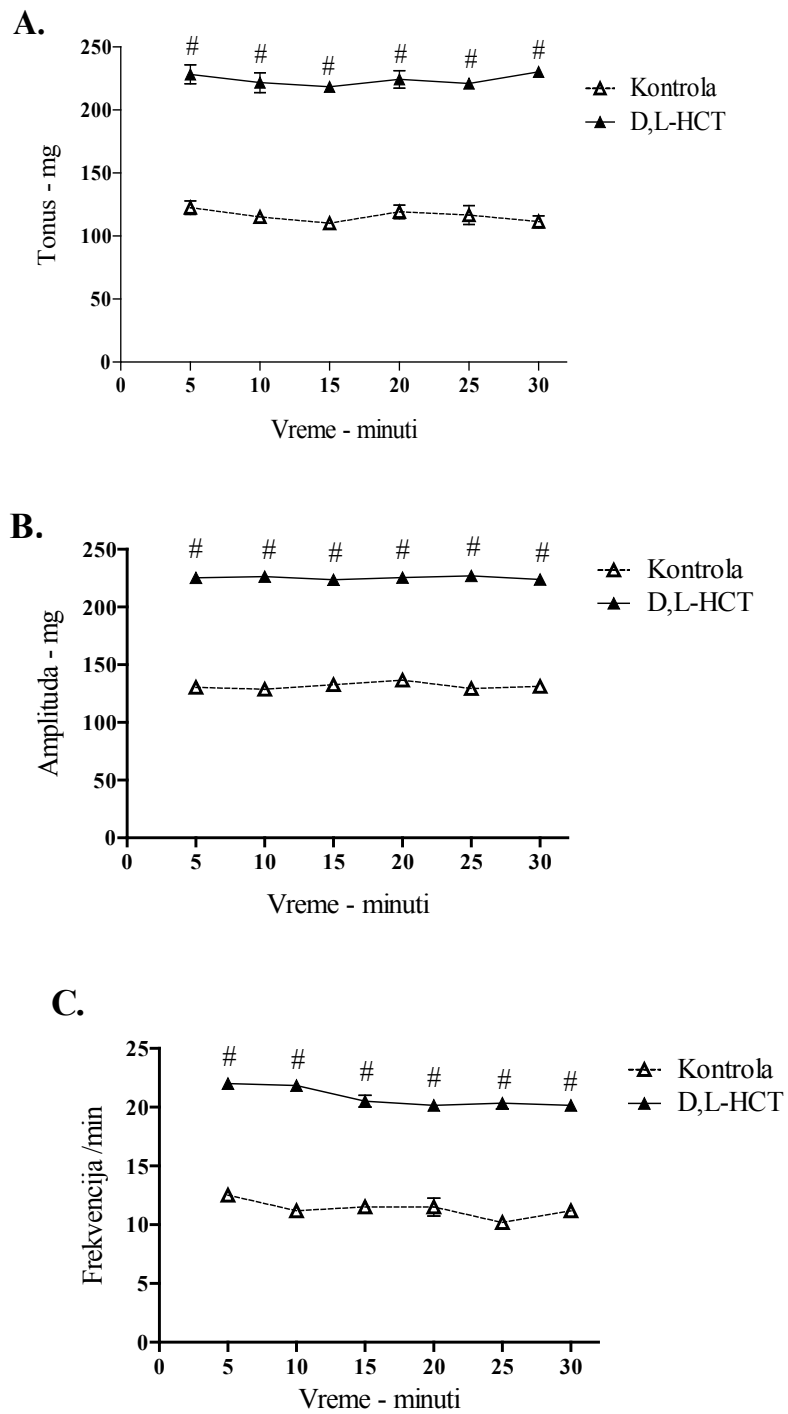
Kontraktilni odgovor izolovanog duodenuma pacova praćen je tokom 30 min. Razlika između kontrolnih vrednosti (Tirodov rastvor) i vrednosti u prisustvu D,L-homocistein tiolaktona (D,L-HCT) su određivane svakih 5 min (Grafikon 9.). D,L-homocistein tiolakton u koncentraciji 10 $\mu\text{mol/L}$ dovodi do trenutnog porasta tonusa, amplitude i frekvencije spontanijh kontrakcija. Izmerene vrednosti posmatranih parametara u grupi tretiranoj D,L-HCT na svakih 5 min, pokazuju statistički visoko značajno povećanje u odnosu na kontrolne vrednosti ($p < 0,001$). Tokom inkubacije u D,L-HCT najviše vrednosti tonusa ($210,00 \pm 10,33$) zapažene su nakon 20 min. registrovanja, amplitude u 25. minutu ($223,09 \pm 1,06$), dok je u 5. minutu izmerena najviša frekvencija spontanijh kontrakcija ($19,33 \pm 0,95$). Vrednosti u zagradama predstavljene su kao srednja vrednost \pm standardna greška.



Grafikon 9. Efekti D,L-homocistein tiolaktona (D,L-HCT) na tonus (A), amplitudu (B) i frekvenciju (C) spontanijh kontrakcija izolovanog duodenuma pacova; po 6 životinja u grupi (n=6); #p<0,001 statistički visoko značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom

4.3.3. Efekti D,L-homocistein tiolaktona na tonus, amplitudu i frekvenciju spontanijh kontrakcija izolovanog ileuma pacova

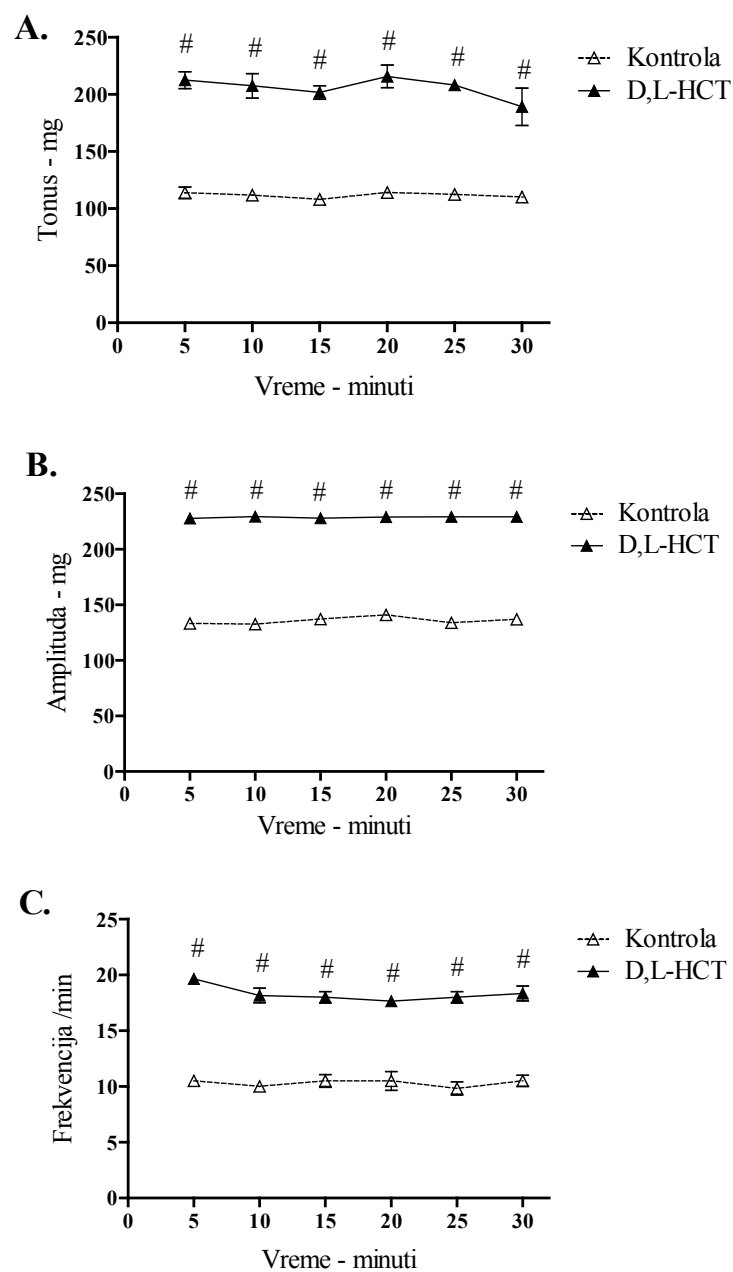
Kontraktilni odgovor izolovanog ileuma pacova praćen je tokom 30 min. Razlika između kontrolnih vrednosti (Tirodov rastvor) i vrednosti u prisustvu D,L-homocistein tiolaktona (D,L-HCT) su određivane svakih 5 min (Grafikon 10.). D,L-homocistein tiolakton u koncentraciji 10 $\mu\text{mol/L}$ dovodi do trenutnog porasta tonusa, amplitude i frekvencije spontanijh kontrakcija. Izmerene vrednosti posmatranih parametara u grupi tretiranoj D,L-HCT na svakih 5 min, pokazuju statistički visoko značajno povećanje u odnosu na kontrolne vrednosti ($p < 0,001$). Tokom inkubacije u D,L-HCT najviše vrednosti tonusa ($230,33 \pm 4,22$) zapažene su nakon 30 min. registrovanja, amplitude u 25. minutu ($226,92 \pm 1,93$), dok je u 5. minutu izmerena najviša frekvencija spontanijh kontrakcija ($22,00 \pm 0,36$). Vrednosti u zagradama predstavljene su kao srednja vrednost \pm standardna greška.



Grafikon 10. Efekti D,L-homocistein tiolaktona (D,L-HCT) na tonus (A), amplitudu (B) i frekvenciju (C) spontanijh kontrakcija izolovanog ileuma pacova; po 6 životinja u grupi (n=6); #p<0,001 statistički visoko značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom

4.3.4. Efekti D,L-homocistein tiolaktona na tonus, amplitudu i frekvenciju spontanijh kontrakcija izolovanog kolona pacova

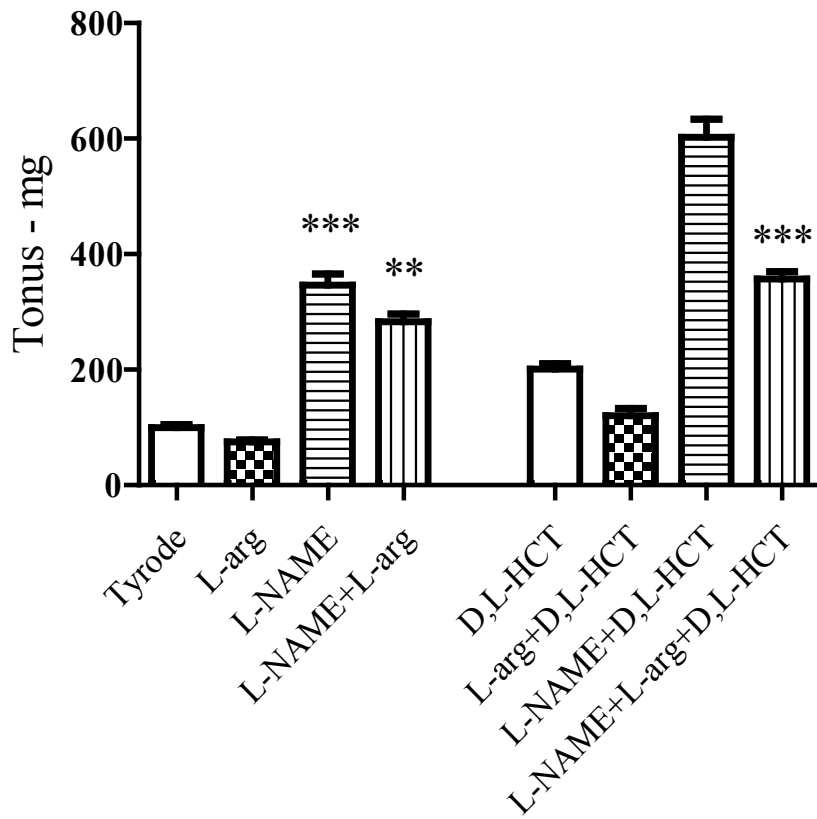
Kontraktilni odgovor izolovanog kolona pacova praćen je tokom 30 min. Razlika između kontrolnih vrednosti (Tirodov rastvor) i vrednosti u prisustvu D,L-homocistein tiolaktona (D,L-HCT) su određivane svakih 5 min (Grafikon 11.). D,L-homocistein tiolakton u koncentraciji 10 $\mu\text{mol/L}$ dovodi do trenutnog porasta tonusa, amplitude i frekvencije spontanijh kontrakcija. Izmerene vrednosti posmatranih parametara u grupi tretiranoj D,L-HCT na svakih 5 min, pokazuju statistički visoko značajno povećanje u odnosu na kontrolne vrednosti ($p < 0,001$). Tokom inkubacije u D,L-HCT najviše vrednosti tonusa ($215,83 \pm 9,87$) zapažene su nakon 20 min. registrovanja, amplitude u 10. minutu ($229,57 \pm 1,98$), dok je u 5. minutu izmerena najviša frekvencija spontanijh kontrakcija ($19,67 \pm 0,33$). Vrednosti u zagradama predstavljene su kao srednja vrednost \pm standardna greška.



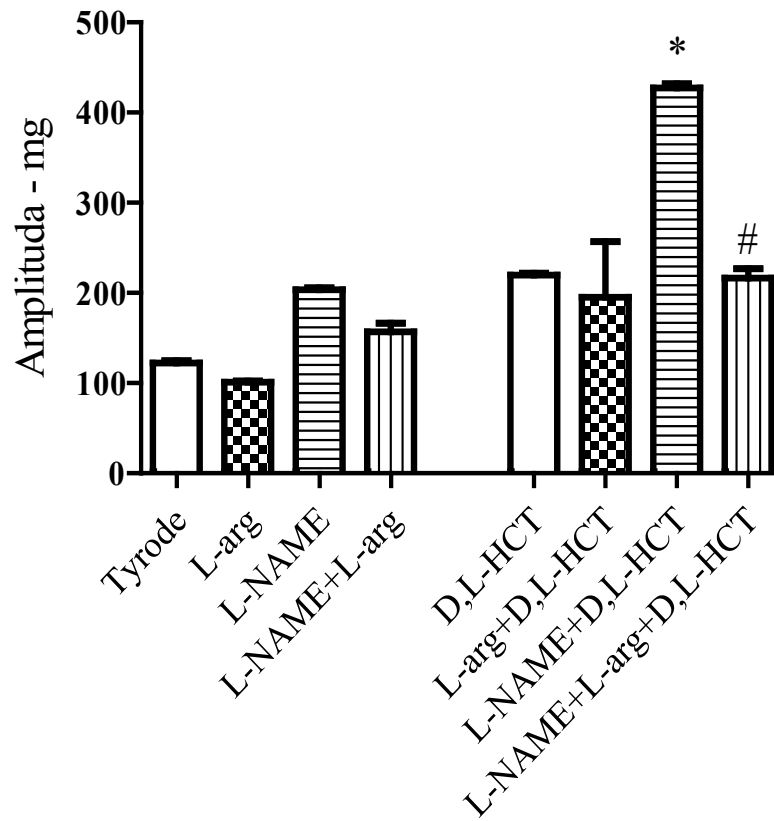
Grafikon 11. Efekti D,L-homocistein tiolaktona (D,L-HCT) na tonus (A), amplitudu (B) i frekvenciju (C) spontanijh kontrakcija izolovanog kolona pacova; po 6 životinja u grupi (n=6); #p<0,001 statistički visoko značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom

4.3.5. Efekti L-NAME i L-arginina na tonus, amplitudu i frekvenciju spontanih kontrakcija izolovanog duodenuma pacova

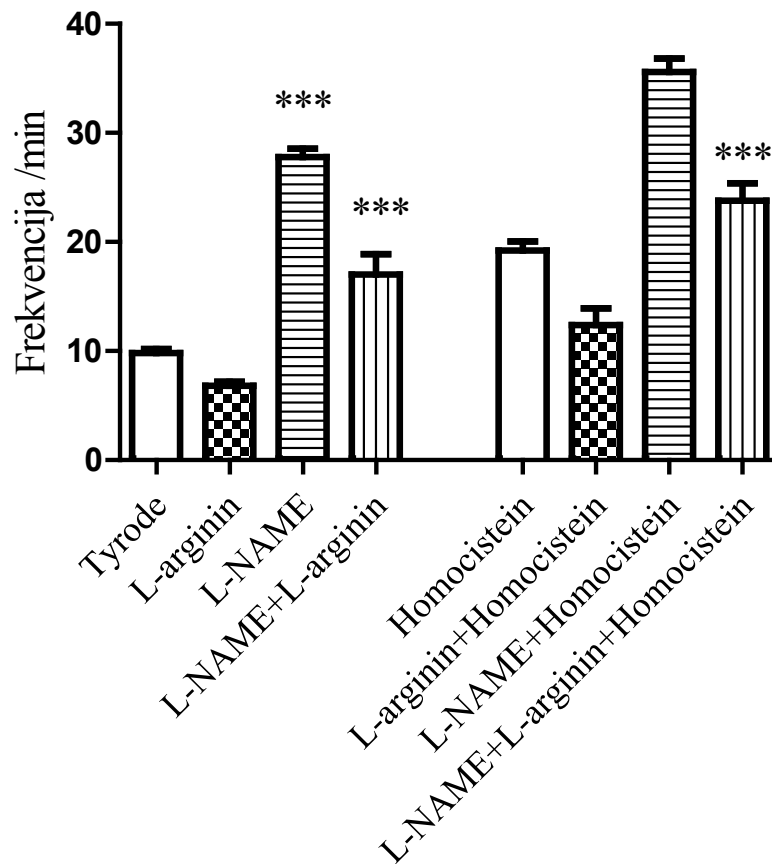
Kontraktilni odgovor izolovanog duodenuma pacova praćen je radi ispitivanja uticaja supstanci koje utiču na azot monoksidom (NO) posredovanu neurotransmisiju u prisustvu D,L-homocistein tiolaktona (D,L-HCT). L-NAME je doveo do porasta tonusa, amplitude i frekvencije spontanih pokreta izolovanog duodenuma pacova u poređenju sa kontrolnom grupom (Tirodov rastvor) (Grafikon 12,13,14). Ovaj efekat nastao je neposredno nakon aplikacije i trajao je 5 min. Kada se preparat izolovanog duodenuma pre dodavanja L-NAME inkubirao u 10 $\mu\text{mol/L}$ L-arginina, efekti L-NAME su značajno redukovani, ali ne u potpunosti blokirani. Aplikacija L-arginina nakon inkubacije preparata tokom 30 min u prisustvu 10 $\mu\text{mol/L}$ D,L-HCT, dovela je do znatno manjeg porasta tonusa, amplitude i frekvencije spontanih kontrakcija longitudinalne muskulature izolovanih segmenata duodenuma u odnosu na primenu samo D,L-HCT.



Grafikon 12. Efekti L-NAME i L-arginina na tonus spontanijh kontrakcija izolovanog duodenuma pacova u prisustvu D,L-homocistein tiolaktona (D,L-HCT); ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ statistički visoko značajna razlika u odnosu na L-arg



Grafikon 13. Efekti L-NAME i L-arginina na amplitudu spontanijh kontrakcija izolovanog duodenuma pacova u prisustvu D,L-homocistein tiolaktona (D,L-HCT); * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na L-NAME; # $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na L-NAME+L-arg+D,L-HCT



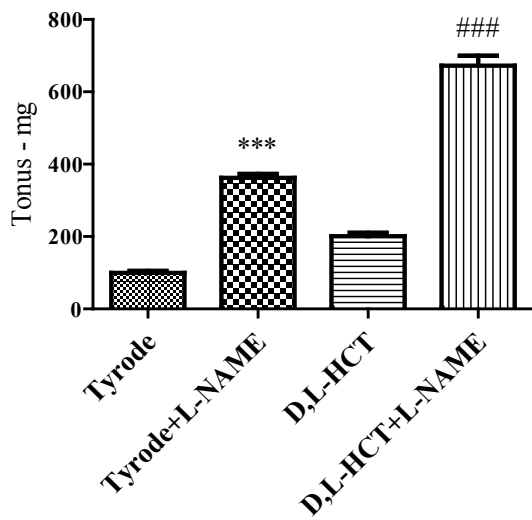
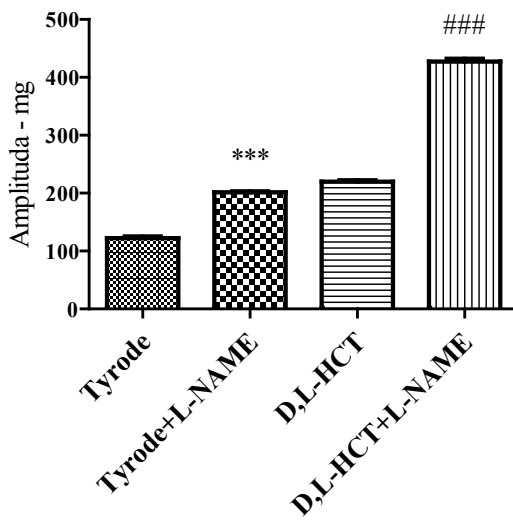
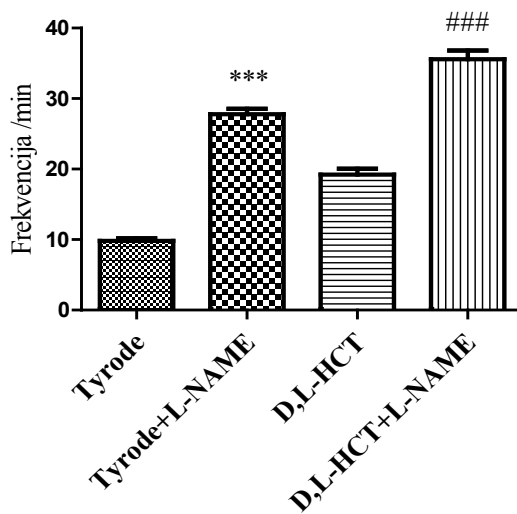
Grafikon 14. Efekti L-NAME i L-arginina na frekvenciju spontanijh kontrakcija izolovanog duodenuma pacova u prisustvu D,L-homocistein tiolaktona (D,L-HCT); *** $p < 0,001$ statistički visoko značajna razlika u odnosu na L-arg

4.3.6. Efekti L-NAME na tonus, amplitudu i frekvenciju spontanijh kontrakcija izolovanog duodenuma pacova u prisustvu D,L-homocistein tiolaktona (D,L-HCT)

U cilju ispitivanja uticaja nitregeričke neurotransmisije na kontraktilnost izolovanog creva, segmenti duodenuma pacova inkubirani su u prisustvu L-NAME (30 $\mu\text{mol/L}$). Došlo je do statistički visoko značajnog ($p < 0,001$) porasta tonusa, amplitude i frekvencije kontrakcija u poređenju sa kontrolnom grupom (Tyrodov rastvor). Preparat je potom inkubiran u prisustvu D,L-homocistein tiolaktona (10 $\mu\text{mol/L}$), nakon čega je aplikovan L-NAME u koncentraciji od 30 $\mu\text{mol/L}$. Došlo je do statistički visoko značajnog ($p < 0,001$) porasta tonusa, amplitude i frekvencije spontanijh pokreta longitudinalne muskulature izolovanog duodenuma pacova u poređenju sa inkubacijom samo u D,L-HCT (Grafikon 15; Tabela 5.).

Tabela 5. Efekti L-NAME na paremetre kontraktilnosti izolovanog duodenuma pacova u prisustvu D,L-homocistein tiolaktona (D,L-HCT); rezultati su prikazani kao procenat (%) povećanja u odnosu na kontrolne vrednosti (100%).

	Kontrola	Tyrode+L-NAME	D,L-HCT	D,L-HCT+L-NAME
Tonus	100%	363,45%	201,81%	674,7%
Amplituda	100%	164,81%	179,79%	349,7%
Frekvencija	100%	283,67%	195,92%	363,27%

A.**B.****C.**

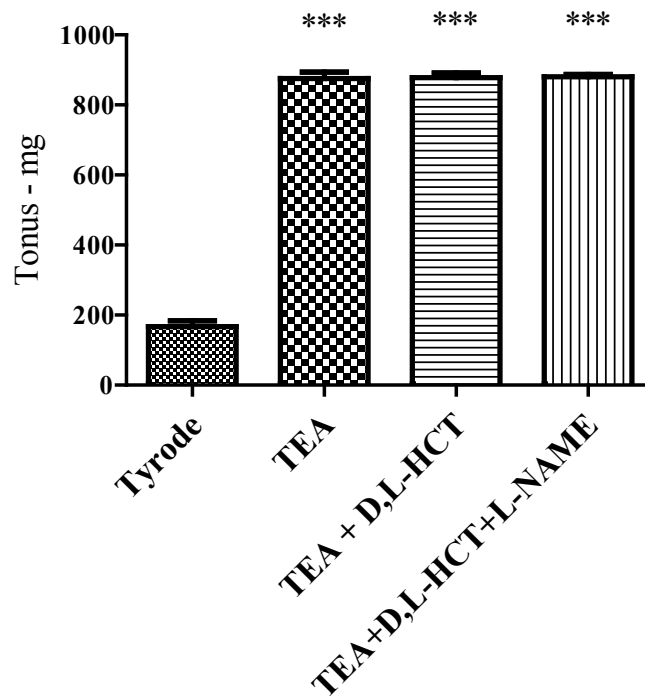
Grafikon 15. Efekti L-NAME na tonus (A), amplitudu (B) i frekvenciju (C) spontanijih kontrakcija izolovanog duodenuma pacova u prisustvu D,L-homocistein tiolaktona (D,L-HCT); *** $p < 0,001$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa Tyrode; ### $p < 0,001$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa D,L-HCT

4.3.7. Efekti L-NAME na tonus, amplitudu i frekvenciju spontanijh kontrakcija izolovanog duodenuma pacova u prisustvu D,L-homocistein tiolaktona (D,L-HCT) i tetraetilamonijum-hlorida (TEA)

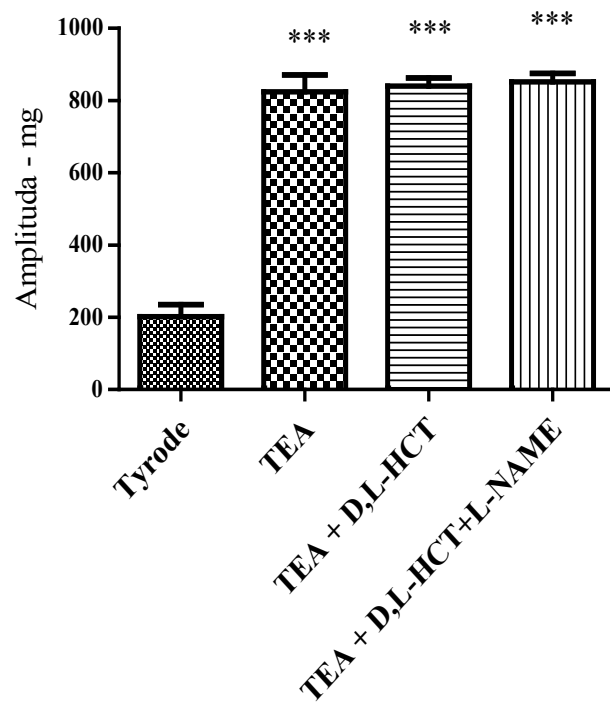
Učešće kalijumovih kanala u nitregeričkim odgovorima testirano je pomoću neselektivnog blokatora kalijumovih kanala tetraetilamonijum hlorida (TEA). Posle 30-o minutne inkubacije u prisustvu 10 $\mu\text{mol/L}$ D,L-homocistein tiolaktona i 10 mmol/L TEA, L-NAME (30 $\mu\text{mol/L}$) je aplikovan, i praćen je kontraktilni odgovor. Rezultati pokazuju da su efekti L-NAME na tonus ($p < 0,05$), amplitudu ($p < 0,05$) i frekvenciju ($p < 0,05$) spontanijh kontrakcija izolovanog duodenuma bili su potencirani u prisustvu TEA i D,L-HCT (Grafikon 16., 17., 18.). Procenat promene u odnosu na kontrolne vrednosti prikazan je u Tabeli 6.

Tabela 6. Efekti L-NAME na parametre kontraktilnosti izolovanog duodenuma pacova u prisustvu D,L-homocistein tiolaktona (D,L-HCT) i tetraetilamonijum hlorida (TEA); rezultati su prikazani kao procenat (%) povećanja u odnosu na kontrolne vrednosti (100%); *** $p < 0,001$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa kontrolnim vrednostima

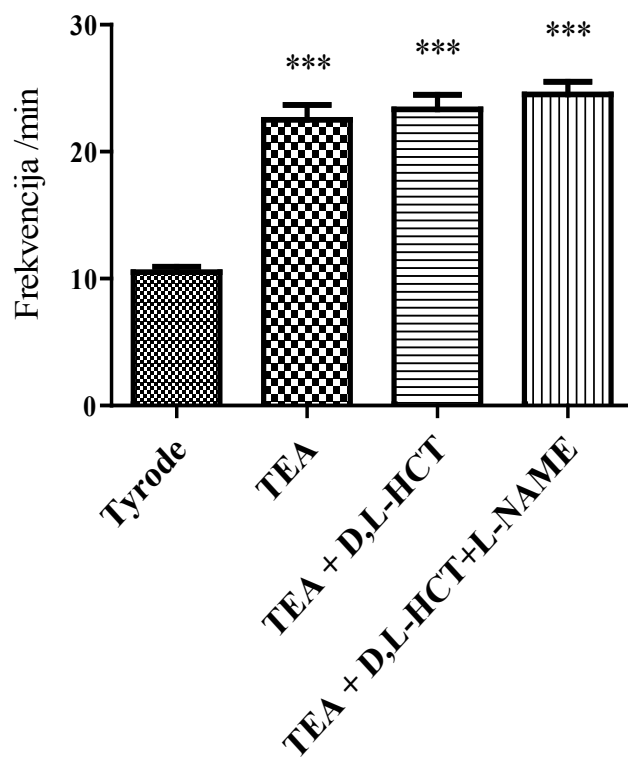
	Kontrola	TEA	TEA+D,L-HCT	TEA+ D,L-HCT+ L-NAME
Tonus	100%	524,90%	526,87%	527,89%***
Amplituda	100%	408,93%	416,87%	422,68%***
Frekvencija	100%	214,29%	222,19%	233,33%***



Grafikon 16. Efekti tetraetilamonijum hlorida (TEA) na tonus spontanijh kontrakcija izolovanog duodenuma pacova u prisustvu D,L-homocistein tiolaktona (D,L-HCT) i L-NAME; *** $p < 0,001$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom (Tyrode)



Grafikon 17. Efekti tetraetilamonijum hlorida (TEA) na amplitudu spontanijh kontrakcija izolovanog duodenuma pacova u prisustvu D,L-homocistein tiolaktona i L-NAME; *** $p < 0,001$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom (Tyrode)



Grafikon 18. Efekti tetraetilamonijum hlorida (TEA) na frekvenciju spontanijh kontrakcija izolovanog duodenuma pacova u prisustvu D,L-homocistein tiolaktona i L-NAME; *** $p < 0,001$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom (Tyrode)

4.4. SUBHRONIČNO I.P. OPTEREĆENJE METIONINOM TOKOM 3 NEDELJE

4.4.1. ODREĐIVANJE UKUPNOG HOMOCISTEINA U SERUMU

Nakon tronedeljne i.p. aplikacije metionina u serumu pacova određivana je koncentracija homocisteina u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama. Koncentracija homocisteina u kontrolnoj grupi životinja, koji su dobijali 0,1 ml 0,9% NaCl/dan, bila je u fiziološkom opsegu vrednosti ($9,98 \pm 0,65 \mu\text{mol/L}$). Sa druge strane, vrednosti odredivanog parametra kod životinja u eksperimentalnim grupama ne pokazuju statistički značajnu razliku u poređenju sa kontrolnim vrednostima (Tabela 7.).

Tabela 7. Koncentracija homocisteina u serumu pacova kontrolne i eksperimentalnih grupa nakon i.p. aplikacije metionina tokom 3 nedelje; rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška za po 6 životinja u grupi (n=6)

Grupa	Homocistein ($\mu\text{mol/L}$)
Kontrola	$9,98 \pm 0,65$
Metionin	$9,51 \pm 0,59$
Metionin + L-cistein	$10,35 \pm 0,93$
Metionin + N-acetil-L-cistein	$10,21 \pm 0,71$

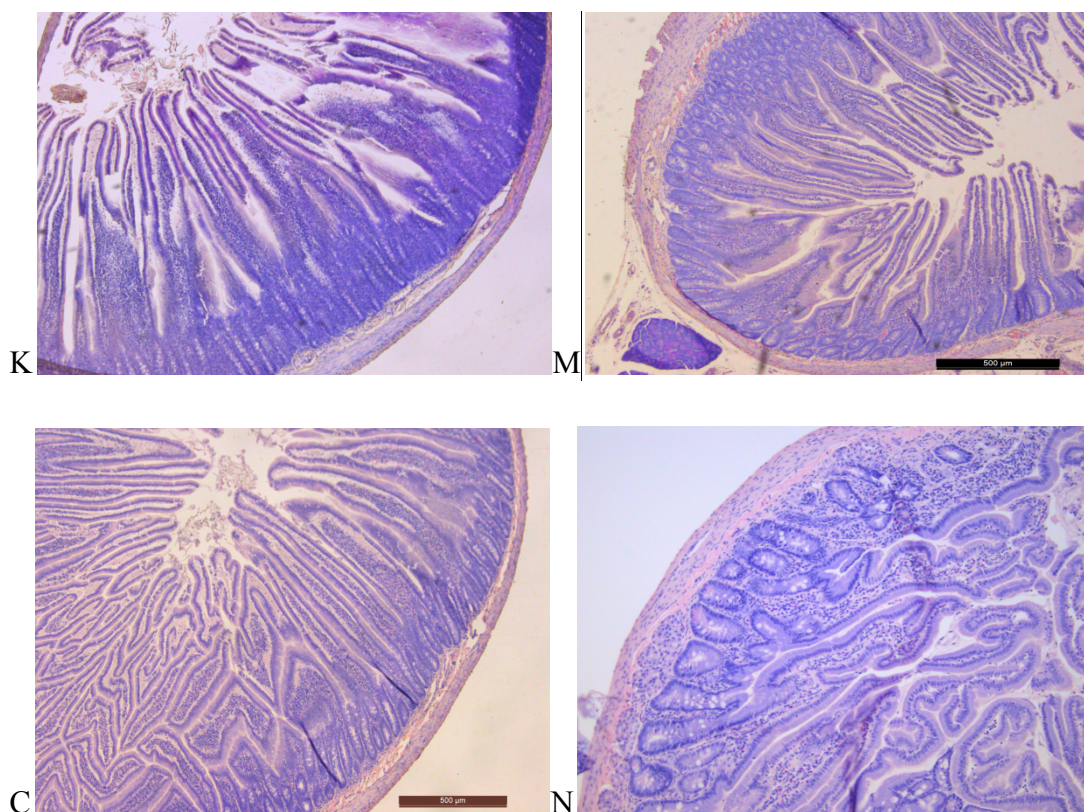
4.4.2. HISTOLOŠKA ANALIZA TKIVA CREVA PACOVA

Nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina određivani su sledeći parametri na histološkim preparatima duodenuma, ileuma i kolona pacova: dubina kripti, dužina resica, debljina lamine muskularis mukoze, debljina tunike mukoze, debljina tunike muskularis, ukupna debljina zida creva i broj ćelija u lamini propriji tunike mukoze. Analizirana je i zastupljenost kolagenih i retikularnih vlakana lamine proprije. Svi navedeni parametri praćeni su u 4 grupe, sa po 6 životinja u grupi (n=6):

1. K- Kontrolna grupa (0,9% NaCl 1 ml/dan);
2. M- Metionin (0,8 mmol/kg/tm/dan);
3. C- Metionin (0,8 mmol/kg/tm/dan) + L-cistein (7 mg/kg/tm/dan);
4. N- Metionin (0,8 mmol/kg/tm/dan) + N-acetil-L-cistein (50 mg/kg/tm/dan).

4.4.2.1. Morfometrijski parametri tkiva duodenuma pacova:

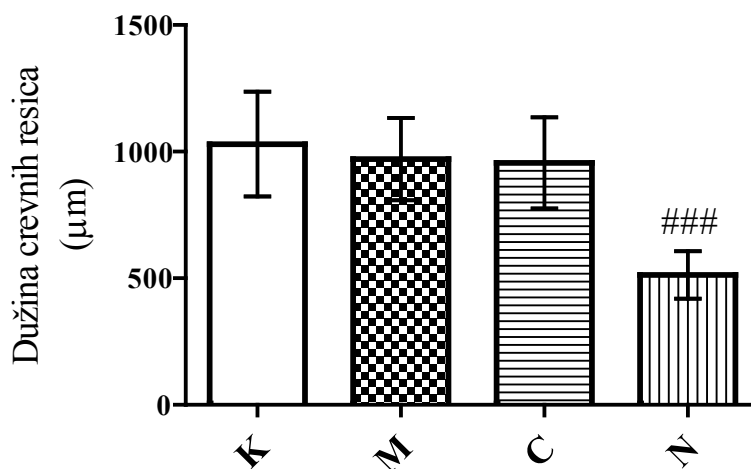
Nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina određivani su sledeći parametri na histološkim preparatima duodenuma pacova: dužina crevnih resica, debljina tunike mukoze, debljina tunike muskularis, ukupna debljina zida creva i broj ćelija u lamini proprijii tunike mukoze. Svi navedeni parametri analizirani su u 4 grupe: K- Kontrolna grupa; M- Metionin; C- Metionin + L-cistein; N- Metionin + N-acetil-L-cistein (Slika 9).



Slika 9. Tkivo duodenuma u kontrolnim uslovima (K), tokom opterećenja metioninom (M) i nakon primene L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) u uslovima opterećenja metioninom; bojenje hematoxilinom i eozinom; originalna uveličanja: K, M i C – 50x; N– 100x

4.4.2.1.A. Dužina crevnih resica duodenuma pacova:

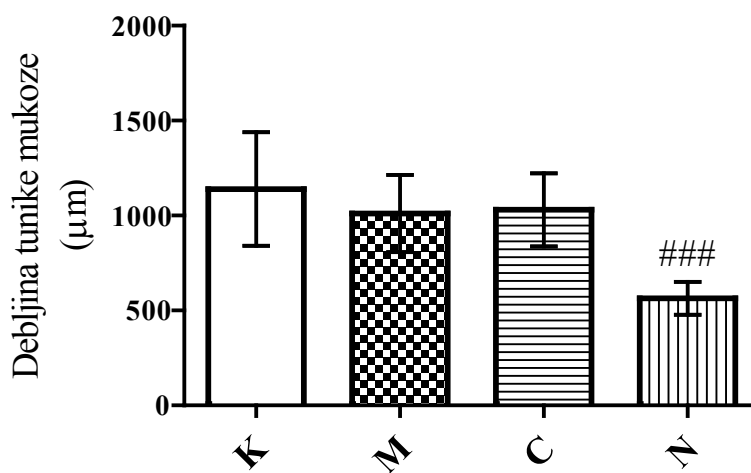
Opterećenje metioninom dovelo je do sniženja dužine crevnih resica ($M = 970,2 \pm 46,86 \mu\text{m}$) u odnosu na kontrolnu grupu ($K = 1030 \pm 62,33 \mu\text{m}$) – umanjeње za 5,81% u odnosu na K. Aplikacija L-cisteina i N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioninom takođe je dovela do smanjenja dužine resica, pri čemu ova promena u grupi C nije bila statistički značajna, dok je u grupi N bila statistički visoko značajna ($p < 0,001$). Smanjenje nakon primene L-cisteina ($C = 955,3 \pm 43,71 \mu\text{m}$) iznosilo je za 1,54% u odnosu na M, dok je primena N-acetil-L-cisteina ($N = 513,0 \pm 31,20 \mu\text{m}$) u istim uslovima dovela do smanjenja za 47,12%. Vrednosti u zagradama su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška. (Tabela 8., Grafikon 19.).



Grafikon 19. Dužina crevnih resica duodenuma pacova usled opterećenja metioninom (M) i primene L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) u uslovima opterećenja metioninom; ### $p < 0,001$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa M grupom

4.4.2.1.B. Debljina tunike mukoze duodenuma pacova:

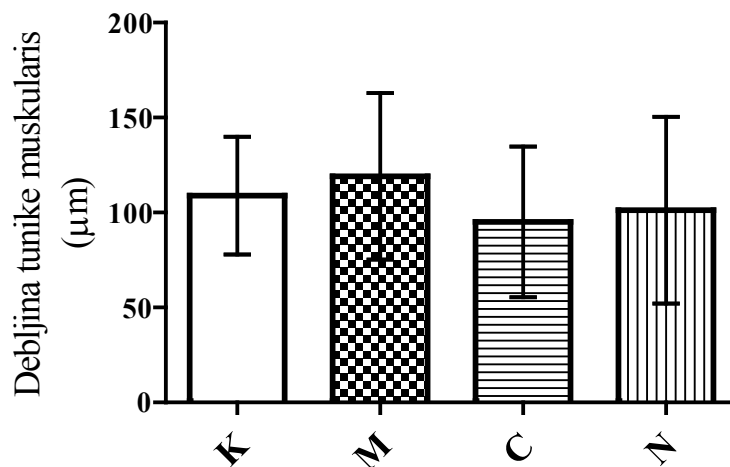
Opterećenje metioninom dovelo je do smanjenja debljine tunike mukoze duodenuma pacova ($M = 1010 \pm 56,41 \mu\text{m}$) u odnosu na kontrolnu grupu ($K = 1140 \pm 90,16 \mu\text{m}$) – sniženje za 11,40% u odnosu na K koje nije bilo statistički značajno. U grupi C došlo je do povećanja merenog parametra u odnosu na grupu M, koje nije pokazalo statističku značajnost. Aplikacija N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioninom dovela je do statistički visoko značajnog ($p < 0,001$) smanjenja debljine tunike mukoze. Povećanje nakon primene L-cisteina ($C = 1030 \pm 46,67 \mu\text{m}$) iznosilo je za 1,98% u odnosu na M, dok je primena N-acetil-L-cisteina ($N = 564,2 \pm 28,62 \mu\text{m}$) u istim uslovima dovela do smanjenja za 44,14%. Vrednosti u zagradama su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška. (Tabela 8.; Grafikon 20.).



Grafikon 20. Debljina tunike mukoze duodenuma pacova usled opterećenja metioninom (M) i primene L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) u uslovima opterećenja metioninom; ### $p < 0,001$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa M grupom

4.4.2.1.C. Debljina tunike muskularis duodenuma pacova:

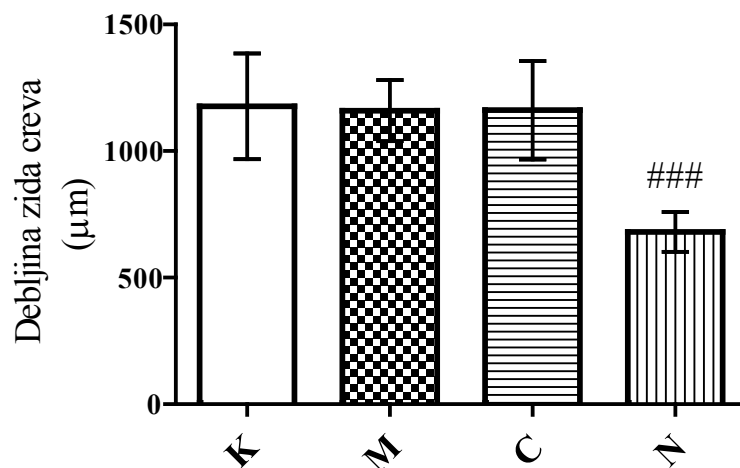
Opterećenje metioninom nije dovelo do statistički značajnih promena debljine tunike muskularis duodenuma pacova ($M = 119,1 \pm 12,15 \mu\text{m}$) u odnosu na kontrolnu grupu ($K = 108,9 \pm 8,94 \mu\text{m}$) – povećanje za 9,37% u odnosu na K. Aplikacija L-cisteina i N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioninom nije izazvala statistički značajne promene debljine tunike muskularis duodenuma. Smanjenje nakon primene L-cisteina ($95,11 \pm 8,87 \mu\text{m}$) iznosilo je za 20,14% u odnosu na M, dok je primena N-acetil-L-cisteina ($N = 101,3 \pm 15,55 \mu\text{m}$) u istim uslovima dovela do umanjivanja za 14,94%. Vrednosti u zagradama su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška (Tabela 8.; Grafikon 21.).



Grafikon 21. Debljina tunike muskularis duodenuma pacova usled opterećenja metioninom (M) i primene L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) u uslovima opterećenja metioninom

4.4.2.1.D. Ukupna debljina zida duodenuma pacova:

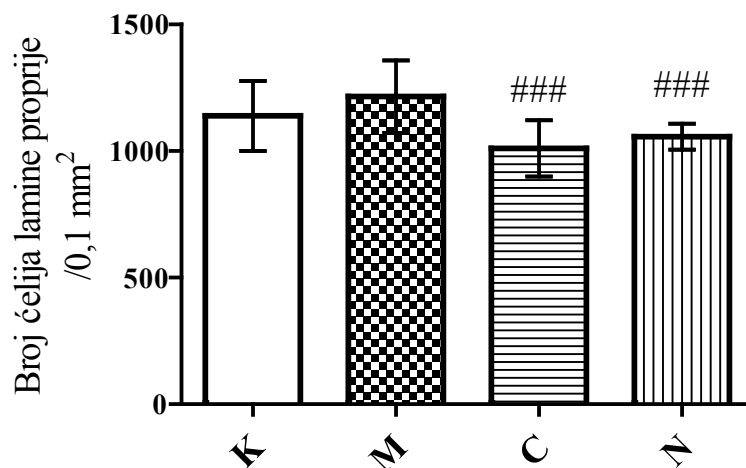
Opterećenje metioninom dovelo je do smanjenja debljine zida duodenuma pacova ($M = 1160 \pm 36,34 \mu\text{m}$) u odnosu na kontrolnu grupu ($K = 1177 \pm 66,03 \mu\text{m}$) – sniženje za 1,44% u odnosu na K, koje nije bilo statistički značajno. U grupi C došlo je do neznatnog povećanja vrednosti posmatranog parametra, koje nije pokazivalo statističku značajnost. Aplikacija N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioninom dovela je do statistički visoko značajnog ($p < 0,001$) smanjenja ukupne debljine zida creva. Povećanje nakon primene L-cisteina ($C = 1161 \pm 51,92 \mu\text{m}$) iznosilo je za 0,09% u odnosu na M, dok je primena N-acetil-L-cisteina ($N = 680,7 \pm 27,67 \mu\text{m}$) u istim uslovima dovela do smanjenja za 41,32%. Vrednosti u zagradama su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška (Tabela 8.; Grafikon 22.).



Grafikon 22. Debljina zida duodenuma pacova usled opterećenja metioninom (M) i primene L-cisteina (C) i N-acetil-L-cisteina (N) u uslovima opterećenja metioninom; ### $p < 0,001$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa M grupom

4.4.2.1.E. Broj ćelija u lamini propriji tunike mukoze duodenuma pacova:

Opterećenje metioninom nije dovelo do statistički značajnog povećanja broja ćelija u lamini propriji tunike mukoze duodenuma pacova ($M = 1215 \pm 31,24$ ćelija/ mm^2) u odnosu na kontrolnu grupu ($K = 1139 \pm 30,88$ ćelija/ mm^2) – povećanje za 6,67% u odnosu na K. Aplikacija L-cisteina i N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioninom dovela je do statistički visoko značajnog ($p < 0,001$) smanjenja broja ćelija lamine proprije tunike mukoze. Smanjenje nakon primene L-cisteina ($C = 1010 \pm 20,71$ ćelija/ mm^2) iznosilo je za 16,87% u odnosu na M, dok je primena N-acetil-L-cisteina ($N = 1057 \pm 11,49$ ćelija/ mm^2) u istim uslovima dovela do smanjenja za 13,00%. Vrednosti u zagradama su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška. (Tabela 8.; Grafikon 23.).



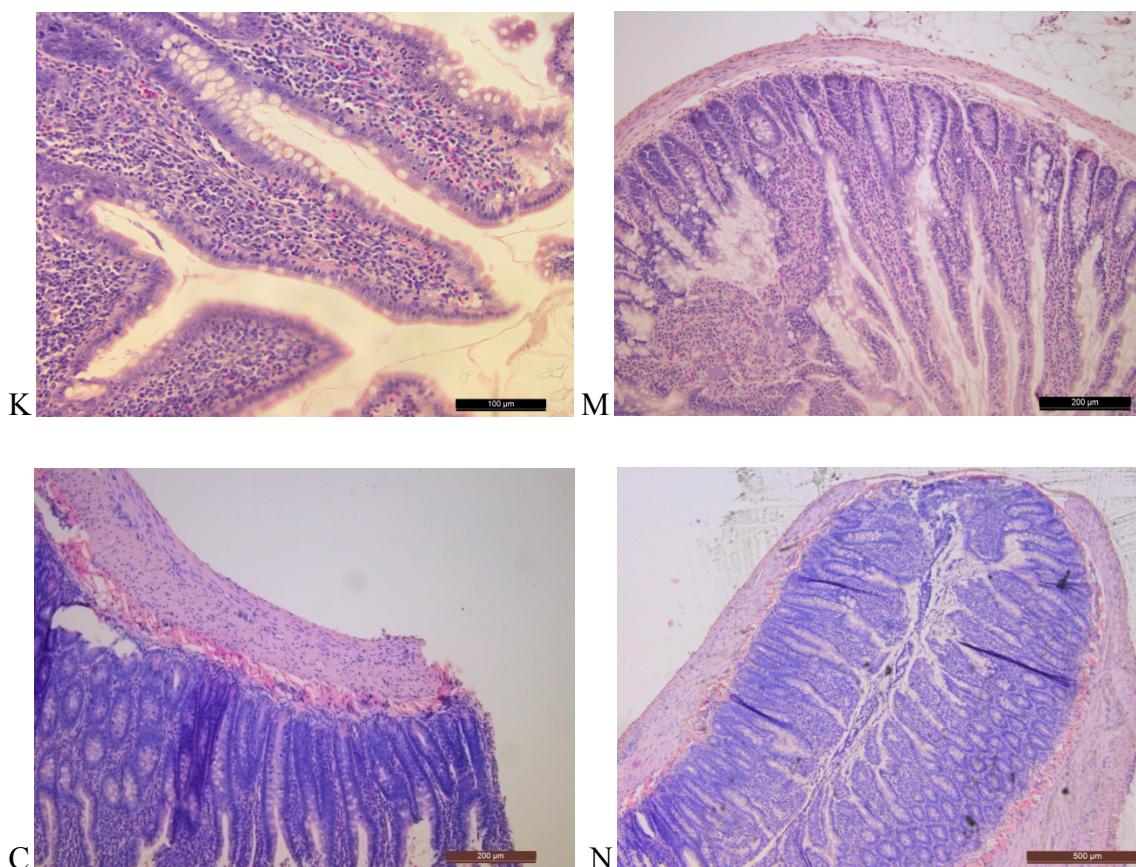
Grafikon 23. Broj ćelija lamine proprije duodenuma pacova usled opterećenja metioninom (M) i primene L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) u uslovima opterećenja metioninom; ### $p < 0,001$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa M grupom

Tabela 8. Morfometrijski parametri tkiva duodenuma pacova u kontrolnim uslovima (K), tokom opterećenja metioninom (M) i nakon primene L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) u uslovima opterećenja metioninom; vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna greška za po 6 životinja u grupi; ***p<0,001 statistički visoko značajna razlika u poređenju sa M grupom

	Kontrola (K)	Metionin (M)	Metionin + L-cistein (C)	Metionin + N-acetil-L-cistein (N)
Dužina resice (μm)	1030 ± 62,33	970,2 ± 46,86	955,3 ± 43,71	513,0±31,20***
Debljina tunike mukoze (μm)	1140 ± 90,16	1010 ± 56,41	1030 ± 46,67	564,2±28,62***
Debljina tunike muskularis (μm)	108,9 ± 8,94	119,1 ± 12,15	95,11 ± 8,87	101,3 ± 15,55
Ukupna debljina zida creva (μm)	1177 ± 66,03	1160 ± 36,34	1161 ± 51,92	680,7±27,67***
Broj ćelija lamine proprije po 0,1 mm^2	1139 ± 30,88	1215 ± 31,24	1010±20,71***	1057±11,49***

4.4.2.2. Morfometrijski parametri tkiva ileuma pacova:

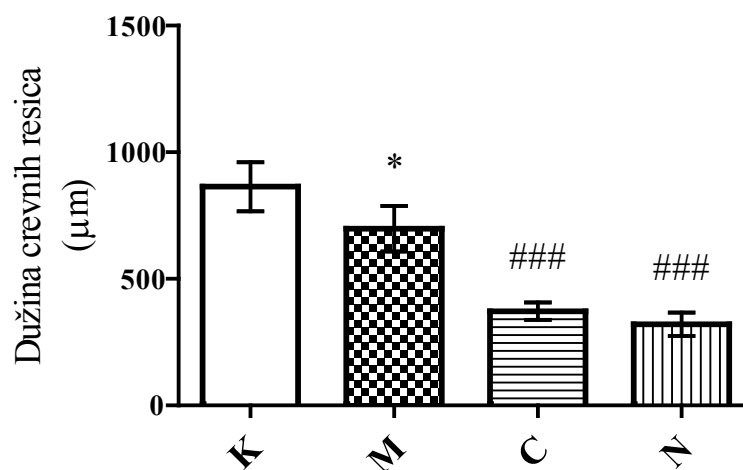
Nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina određivani su sledeći parametri na histološkim preparatima ileuma pacova: dužina crevnih resica, debljina tunike mukoze, debljina tunike muskularis, ukupna debljina zida creva i broj ćelija u lamini propriji tunike mukoze. Svi navedeni parametri analizirani su u 4 grupe: K- Kontrolna grupa; M- Metionin; C- Metionin + L-cistein; N- Metionin + N-acetil-L-cistein (Slika 10).



Slika 10. Tkivo ileuma u kontrolnim uslovima (K), tokom opterećenja metioninom (M) i nakon primene L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) u uslovima opterećenja metioninom; bojenje hematoxilinom i eozinom; originalna uveličanja: K – 200x; M i C – 100x; N– 50x

4.4.2.2.A. Dužina crevnih resica ileuma pacova:

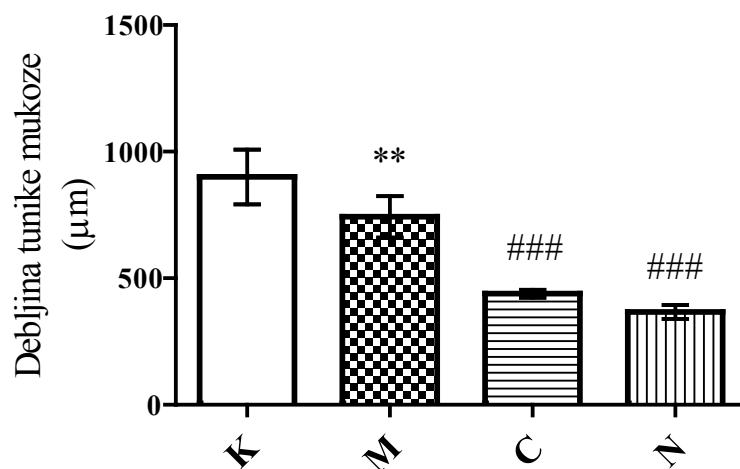
Opterećenje metioninom dovelo je do statistički značajnog ($p < 0,05$) sniženja dužine crevnih resica ($M = 698,1 \pm 31,75 \mu\text{m}$) u odnosu na kontrolnu grupu ($K = 863,8 \pm 34,17 \mu\text{m}$) – sniženje za 19,18% u odnosu na K. Aplikacija L-cisteina i N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioninom dovelo je do statistički visoko značajnog ($p < 0,001$) smanjenja dužine resica. Smanjenje nakon primene L-cisteina ($C = 372,3 \pm 15,23 \mu\text{m}$) iznosilo je za 46,67% u odnosu na M, dok je primena N-acetil-L-cisteina ($N = 321,1 \pm 20,67 \mu\text{m}$) u istim uslovima dovela do smanjenja za 54,00%. Vrednosti u zagradama su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška. (Tabela 9.; Grafikon 24.).



Grafikon 24. Dužina crevnih resica ileuma pacova usled opterećenja metioninom (M) i primene L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) u uslovima opterećenja metioninom; * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom (K); ### $p < 0,001$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa M grupom

4.4.2.2.B. Debljina tunike mukoze ileuma pacova:

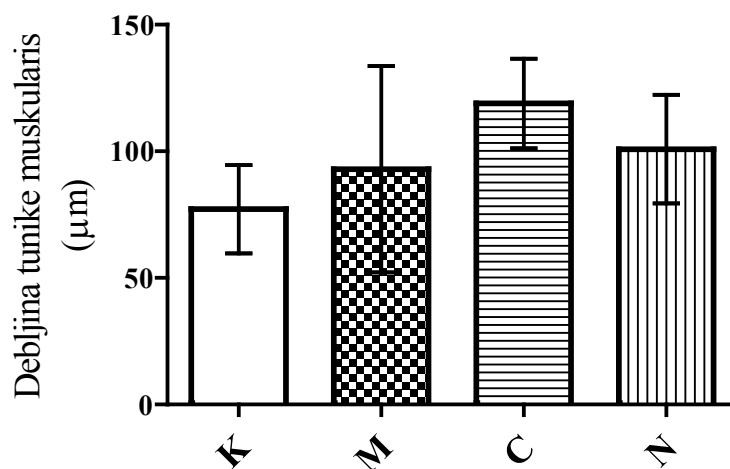
Opterećenje metioninom dovelo je do statistički visoko značajnog ($p < 0,01$) smanjenja debljine tunike mukoze ileuma pacova ($M = 742,6 \pm 28,88 \mu\text{m}$) u odnosu na kontrolnu grupu ($K = 900,2 \pm 38,19 \mu\text{m}$) – sniženje za 17,51% u odnosu na K. Aplikacija L-cisteina i N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioninom dovelo je do statistički visoko značajnog ($p < 0,001$) smanjenja debljine tunike mukoze. Smanjenje nakon primene L-cisteina ($C = 438,8 \pm 7,10 \mu\text{m}$) iznosilo je za 40,91% u odnosu na M, dok je primena N-acetil-L-cisteina ($N = 367,0 \pm 13,66 \mu\text{m}$) u istim uslovima dovela do smanjenja za 50,58%. Vrednosti u zagradama su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška. (Tabela 9.; Grafikon 25.).



Grafikon 25. Debljina tunike mukoze ileuma pacova usled opterećenja metioninom (M) i primene L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) u uslovima opterećenja metioninom; ** $p < 0,01$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom (K); ### $p < 0,001$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa M grupom

4.4.2.2.C. Debljina tunike muskularis ileuma pacova:

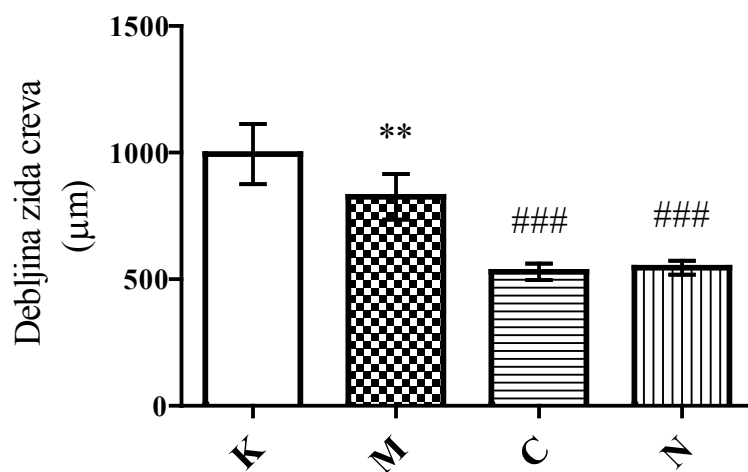
Opterećenje metioninom nije dovelo do statistički značajnih promena debljine tunike muskularis ileuma pacova ($M = 92,91 \pm 10,19 \mu\text{m}$) u odnosu na kontrolnu grupu ($K = 77,15 \pm 5,52 \mu\text{m}$) – povećanje za 20,43% u odnosu na K. Aplikacija L-cisteina i N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioninom nije dovela do statistički značajne promene debljine tunike muskularis ileuma. Povećanje nakon primene L-cisteina ($118,9 \pm 7,21 \mu\text{m}$) iznosilo je za 27,97% u odnosu na M, dok je primena N-acetil-L-cisteina ($N = 100,9 \pm 6,79 \mu\text{m}$) u istim uslovima dovela do povećanja za 8,60%. Vrednosti u zagradama su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška (Tabela 9.; Grafikon 26.).



Grafikon 26. Debljina tunike muskularis ileuma pacova usled opterećenja metioninom (M) i primene L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) u uslovima opterećenja metioninom

4.4.2.2.D. Ukupna debljina zida ileuma pacova:

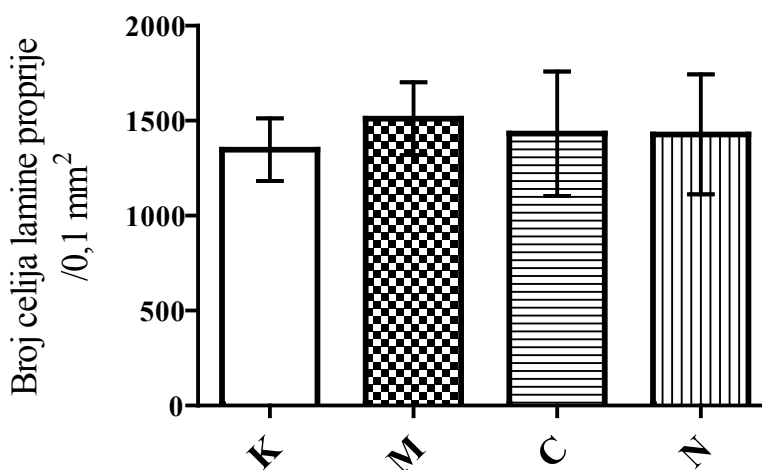
Opterećenje metioninom dovelo je do statistički visoko značajnog ($p < 0,01$) smanjenja debljine zida ileuma pacova ($M = 825,8 \pm 31,82 \mu\text{m}$) u odnosu na kontrolnu grupu ($K = 994,4 \pm 44,89 \mu\text{m}$) – sniženje za 16,95% u odnosu na K. Aplikacija L-cisteina i N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioninom dovela je do statistički visoko značajnog ($p < 0,001$) smanjenja ukupne debljine zida creva. Smanjenje nakon primene L-cisteina ($C = 529,3 \pm 14,35 \mu\text{m}$) iznosilo je za 35,90% u odnosu na M, dok je primena N-acetil-L-cisteina ($N = 545,4 \pm 15,95 \mu\text{m}$) u istim uslovima dovela do smanjenja za 33,95%. Vrednosti u zagradama su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška. (Tabela 9.; Grafikon 27.).



Grafikon 27. Debljina zida ileuma pacova usled opterećenja metioninom (M) i primene L-cisteina (C) i N-acetil-L-cisteina (N) u uslovima opterećenja metioninom; ** $p < 0,01$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom (K); ### $p < 0,001$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa M grupom

4.4.2.2.E. Broj ćelija u lamini propriji tunike mukoze ileuma pacova:

Opterećenje metioninom nije dovelo do statistički značajnog povećanja broja ćelija u lamini propriji tunike mukoze ileuma pacova ($M = 1511 \pm 39,97$ ćelija/ mm^2) u odnosu na kontrolnu grupu ($K = 1347 \pm 36,89$ ćelija/ mm^2) – povećanje za 12,17% u odnosu na K. Aplikacija L-cisteina i N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioninom dovela je do smanjenja broja ćelija lamine proprije tunike mukoze koje nije bilo statistički značajno. Smanjenje nakon primene L-cisteina ($C = 1432 \pm 103,6$ ćelija/ mm^2) iznosilo je za 5,23% u odnosu na M, dok je primena N-acetil-L-cisteina ($N = 1428 \pm 91,30$ ćelija/ mm^2) u istim uslovima dovela do smanjenja za 5,49 %. Vrednosti u zagradama su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška. (Tabela 9.; Grafikon 28.).



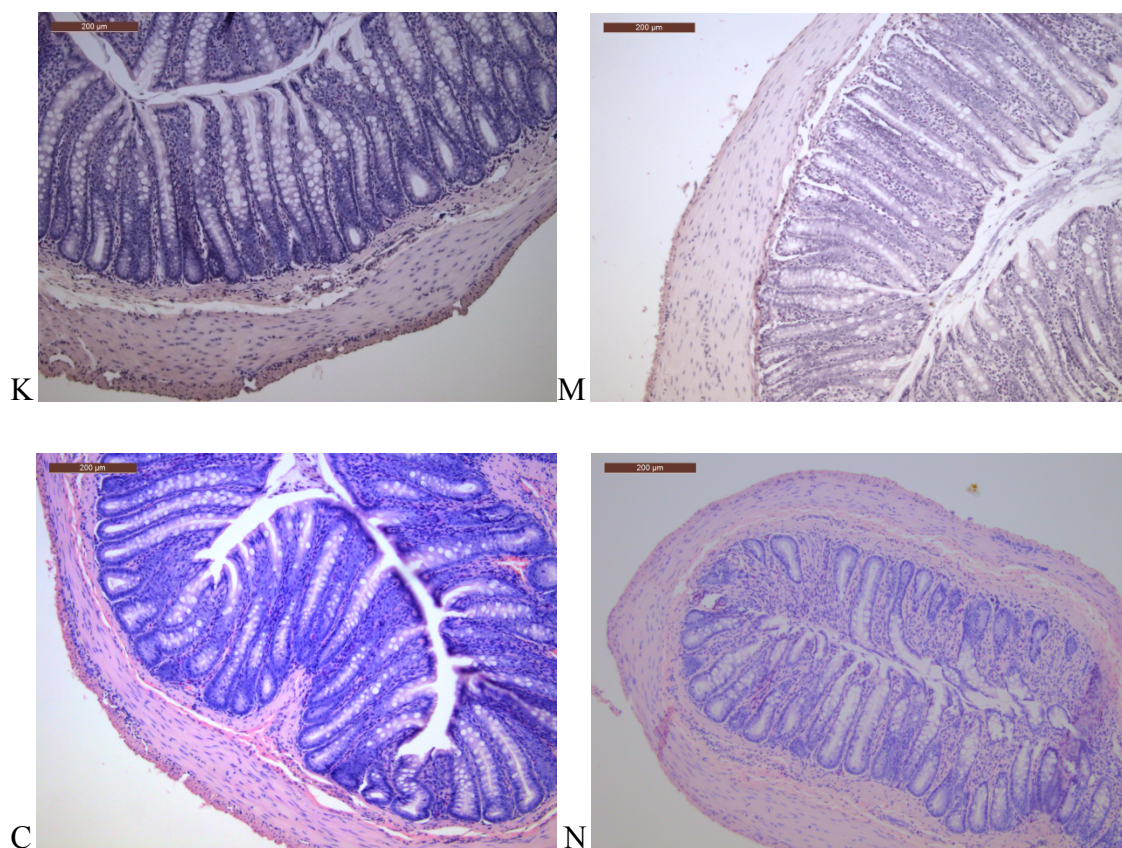
Grafikon 28. Broj ćelija lamine proprije ileuma pacova usled opterećenja metioninom (M) i primene L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) u uslovima opterećenja metioninom

Tabela 9. Morfometrijski parametri tkiva ileuma pacova u kontrolnim uslovima (K), tokom opterećenja metioninom (M) i nakon primene L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) u uslovima opterećenja metioninom; vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška za po 6 životinja u grupi; * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u poređenju sa K grupom; ** $p < 0,01$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa K grupom; *** $p < 0,001$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa M grupom

	Kontrola (K)	Metionin (M)	Metionin + L-cistein (C)	Metionin + N-acetil-L-cistein (N)
Dužina resice (μm)	863,8 \pm 34,17	698,1 \pm 31,75*	372,3 \pm 15,23***	321,1 \pm 20,67***
Debljina tunike mukoze (μm)	900,2 \pm 38,19	742,6 \pm 28,88**	438,8 \pm 7,10***	367,0 \pm 13,66***
Debljina tunike muskularis (μm)	77,15 \pm 5,52	92,91 \pm 10,19	118,9 \pm 7,21	100,9 \pm 6,79
Ukupna debljina zida creva (μm)	994,4 \pm 44,89	825,8 \pm 31,82**	529,3 \pm 14,35***	545,4 \pm 15,95***
Broj ćelija lamine proprije po 0,1 mm ²	1347 \pm 36,89	1511 \pm 39,97	1432 \pm 103,6	1428 \pm 91,30

4.4.2.3. Morfometrijski parametri tkiva kolona pacova:

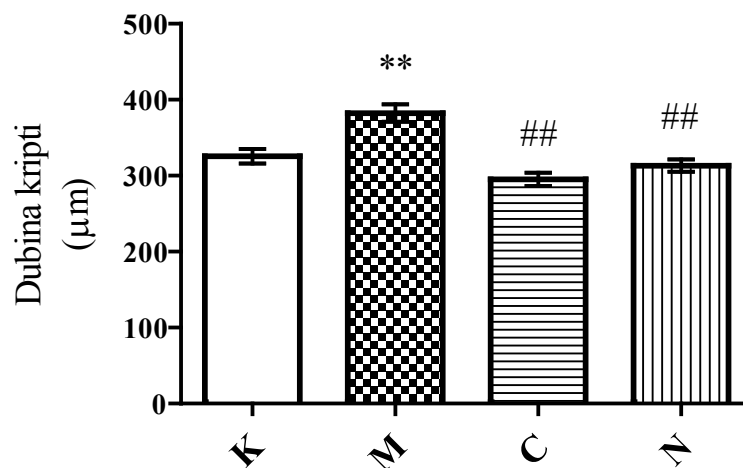
Nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina određivani su sledeći parametri na histološkim preparatima kolona pacova: dubina kripti, debljina lamine muskularis mukoze, debljina tunike mukoze, ukupna debljina zida creva i broj ćelija u lamini propriji tunike mukoze. Svi navedeni parametri analizirani su u 4 grupe: K- Kontrolna grupa; M- Metionin; C- Metionin + L-cistein; N- Metionin + N-acetil-L-cistein (Slika 11.).



Slika 11. Tkivo kolona u kontrolnim uslovima (K), tokom opterećenja metioninom (M) i nakon primene L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) u uslovima opterećenja metioninom; bojenje hematoksilinom i eozinom; originalna uveličanja: K, M, C, N – 100x

4.4.2.3.A. Dubina kripti u kolonu pacova:

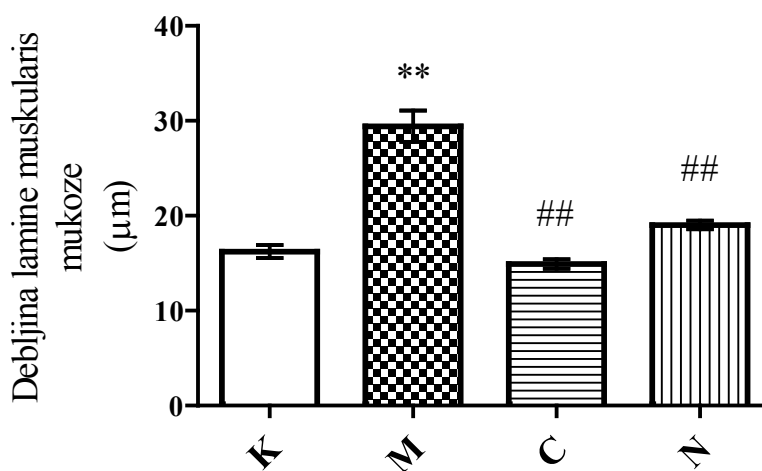
Opterećenje metioninom dovelo je do statistički visoko značajnog ($p < 0,01$) porasta dubine kripti ($M = 382,4 \pm 11,5 \mu\text{m}$) u odnosu na kontrolnu grupu ($K = 325,8 \pm 9,6 \mu\text{m}$) – povećanje za 17,4% u odnosu na K. Aplikacija L-cisteina i N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioninom dovela je do statistički visoko značajnog ($p < 0,01$) smanjenja dubine kripti. Smanjenje nakon primene L-cisteina ($C = 295,2 \pm 8,6 \mu\text{m}$) iznosilo je za 22,7% u odnosu na M, dok je primena N-acetil-L-cisteina ($N = 313 \pm 8,2 \mu\text{m}$) u istim uslovima dovela do smanjenja za 18,06%. Vrednosti u zagradama su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška (Tabela 10.; Grafikon 29.).



Grafikon 29. Dubina kripti kolona pacova usled opterećenja metioninom (M) i primene L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) u uslovima opterećenja metioninom; ** $p < 0,01$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom (K); ## $p < 0,01$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa M grupom

4.4.2.3.B. Debljina lamine muskularis mukoze kolona pacova:

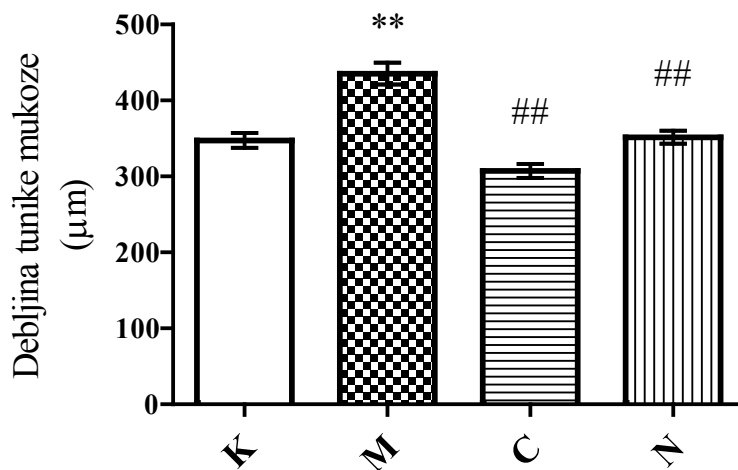
Opterećenje metioninom dovelo je do statistički visoko značajnog ($p < 0,01$) porasta debljine lamine muskularis mukoze kolona pacova ($M = 29,4 \pm 1,6 \mu\text{m}$) u odnosu na kontrolnu grupu ($K = 16,2 \pm 0,7 \mu\text{m}$) – povećanje za 81,3% u odnosu na K. Aplikacija L-cisteina i N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioninom dovela je do statistički visoko značajnog ($p < 0,01$) smanjenja debljine lamine muskularis mukoze. Smanjenje nakon primene L-cisteina ($C = 14,9 \pm 0,5 \mu\text{m}$) iznosilo je za 49,3% u odnosu na M, dok je primena N-acetil-L-cisteina ($N = 19,0 \pm 0,4 \mu\text{m}$) u istim uslovima dovela do smanjenja za 35,4%. Vrednosti u zagradama su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška (Tabela 10; Grafikon 30.).



Grafikon 30. Debljina lamine muskularis mukoze kolona pacova usled opterećenja metioninom (M) i primene L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) u uslovima opterećenja metioninom; ** $p < 0,01$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom (K); ## $p < 0,01$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa M grupom

4.4.2.3.C. Debljina tunike mukoze kolona pacova:

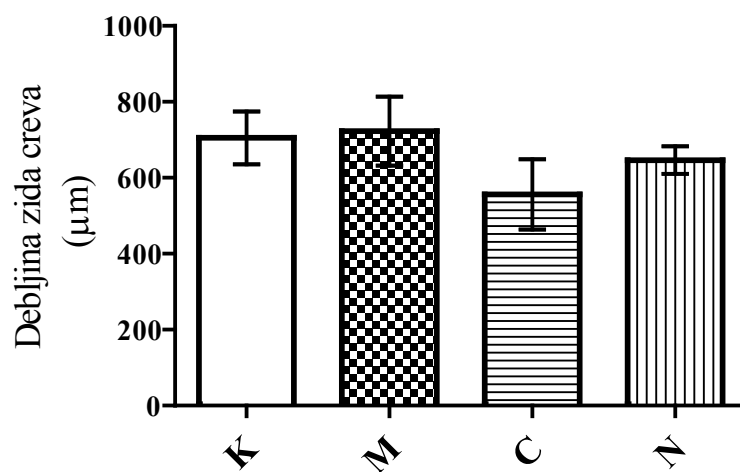
Opterećenje metioninom dovelo je do statistički visoko značajnog ($p < 0,01$) porasta debljine tunike mukoze kolona pacova ($M = 435,2 \pm 14,4 \mu\text{m}$) u odnosu na kontrolnu grupu ($K = 347,4 \pm 9,7 \mu\text{m}$) – povećanje za 25,3% u odnosu na K. Aplikacija L-cisteina i N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioninom dovela je do statistički visoko značajnog ($p < 0,01$) smanjenja debljine tunike mukoze. Smanjenje nakon primene L-cisteina ($C = 307,2 \pm 9,1 \mu\text{m}$) iznosilo je za 29,4% u odnosu na M, dok je primena N-acetil-L-cisteina ($N = 351,6 \pm 8,6 \mu\text{m}$) u istim uslovima dovela do smanjenja za 19,2%. Vrednosti u zagradama su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška (Tabela 10.; Grafikon 31.).



Grafikon 31. Debljina tunike mukoze kolona pacova usled opterećenja metioninom (M) i primene L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) u uslovima opterećenja metioninom; ** $p < 0,01$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom (K); ## $p < 0,01$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa M grupom

4.4.2.3.D. Ukupna debljina zida kolona pacova:

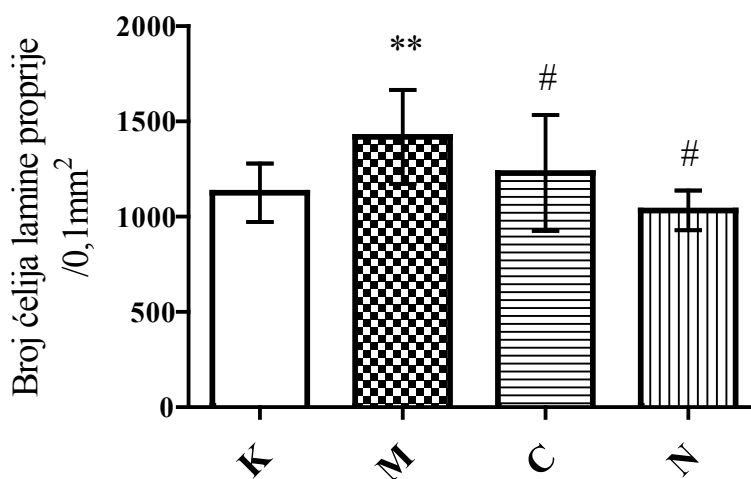
Opterećenje metioninom nije dovelo do statistički značajnih promena ukupne debljine zida kolona pacova ($M = 722,7 \pm 90,9 \mu\text{m}$) u odnosu na kontrolnu grupu ($K = 705,0 \pm 69,7 \mu\text{m}$) – povećanje za 2,5% u odnosu na K. Aplikacija L-cisteina i N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioninom nije dovela do statistički značajne promene ukupne debljine zida kolona. Smanjenje nakon primene L-cisteina ($556,3 \pm 9,3 \mu\text{m}$) iznosilo je za 23,1% u odnosu na M, dok je primena N-acetil-L-cisteina ($N = 646,5 \pm 36,5 \mu\text{m}$) u istim uslovima dovela do smanjenja za 10,5%. Vrednosti u zagradama su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška (Tabela 10.; Grafikon 32.).



Grafikon 32. Ukupna debljina zida kolona pacova usled opterećenja metioninom (M) i primene L-cisteina (C) i N-acetil-L-cisteina (N) u uslovima opterećenja metioninom

4.4.2.3.E. Broj ćelija u lamini propriji tunike mukoze kolona pacova:

Opterećenje metioninom dovelo je do statistički visoko značajne ($p < 0,01$) promene broja ćelija u lamini propriji tunike mukoze kolona pacova ($M = 1419 \pm 56,5$ ćelija/ mm^2) u odnosu na kontrolnu grupu ($K = 1126 \pm 28,1$ ćelija/ mm^2) – povećanje za 26,0% u odnosu na K. Aplikacija L-cisteina i N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioninom dovela je do statistički značajnog ($p < 0,05$) smanjenja broja ćelija u lamini propriji tunike mukoze. Smanjenje nakon primene L-cisteina ($C = 1230 \pm 55,4$ ćelija/ mm^2) iznosilo je za 13,3% u odnosu na M, dok je primena N-acetil-L-cisteina ($N = 1033 \pm 18,9$ ćelija/ mm^2) u istim uslovima dovela do smanjenja za 27,2%. Vrednosti u zagradama su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška (Tabela 10.; Grafikon 33.).



Grafikon 33. Broj ćelija lamine proprije kolona pacova usled opterećenja metioninom (M) i primene L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) u uslovima opterećenja metioninom; ** $p < 0,01$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom (K); # $p < 0,05$ statistički značajna razlika u poređenju sa M grupom

Tabela 10. Morfometrijski parametri tkiva kolona pacova u kontrolnim uslovima (K), tokom opterećenja metioninom (M) i nakon primene L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) u uslovima opterećenja metioninom; vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna greška za po 6 životinja u grupi; *p<0,01 statistički visoko značajna razlika u poređenju sa K grupom; **p<0,01 statistički visoko značajna razlika u poređenju sa M grupom; ***p<0,05 statistički značajna razlika u poređenju sa M grupom

	Kontrola (K)	Metionin (M)	Metionin + L-cistein (C)	Metionin + N-acetil-L-cistein (N)
Dubina kripti (μm)	325,8 ± 9,6	382,4 ± 11,5*	295,2 ± 8,6**	313,3 ± 8,2**
Debljina lamine muskularis mukoze (μm)	16,23 ± 0,7	29,43 ± 1,6*	14,92 ± 0,5**	19,02 ± 0,4**
Debljina tunike mukoze (μm)	347,4 ± 9,7	435,2 ± 14,4*	307,2 ± 9,1**	351,6 ± 8,6**
Ukupna debljina zida creva (μm)	705,0 ± 69,7	722,7 ± 90,9	556,3 ± 9,3	646,5 ± 36,5
Broj ćelija lamine proprije po 0,1 mm²	1126 ± 28,1	1419 ± 56,5*	1230±55,4***	1033±18,9***

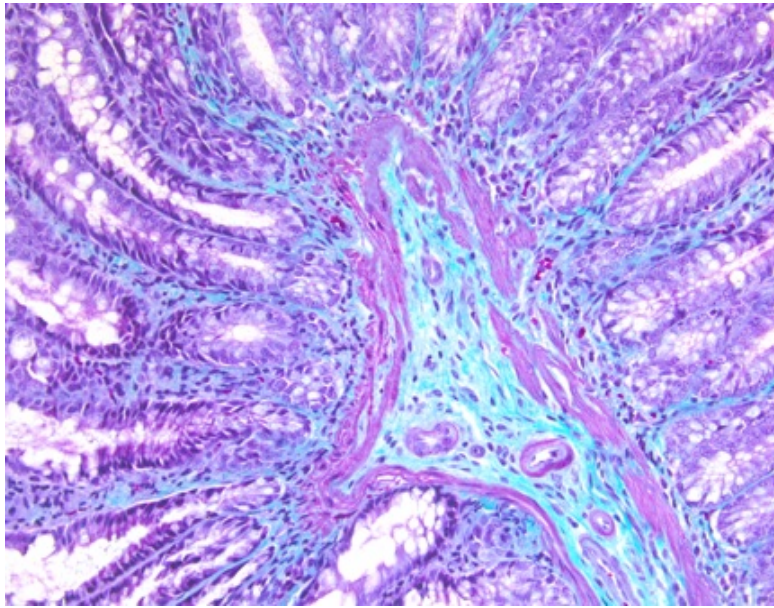
4.4.2.4. Analiza elemenata vezivnog tkiva lamine proprije kolona pacova

Isečci kolona pacova debljine 3-5 μm bojeni su Masson trichrome tehnikom u cilju prikazivanja kolagenih vlakana, dok su retikularna vlakna dokazivana nakon impregnacije srebrom po Gomoriju. Nakon adekvatne pripreme preparata, izvršena je analiza mikrografija:

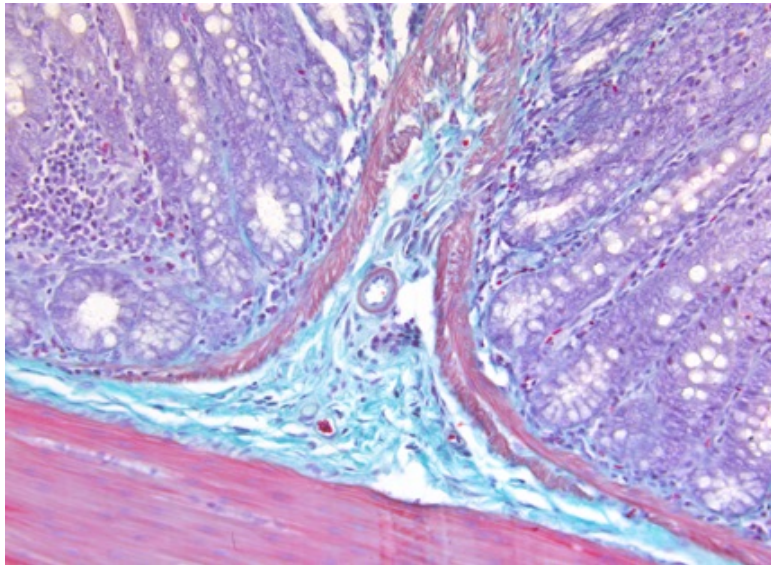
U lamini propriji kolona pacova kontrolne grupe kolagena vlakna su debela, međusobno blisko postavljena i pravilno organizovana. Zrakasto se šire od lamine muskularis mukoze kroz celu laminu propriju (Slika 12). Kod životinja tretiranih metioninom zapaža se veći broj ćelija u lamini propriji. Mali krvni sudovi i kapilari se takođe češće uočavaju. Uočava se blag edem lamine proprije. Kolagena vlakna su istanjena, ali pravilno organizovana (Slika 12). Kod životinja koje su uz metionin dobijale L-cistein i N-acetil-L-cistein, osim smanjenja broja ćelija u lamini propriji ne uočavaju se promene u izgledu i organizaciji kolagenih vlakana u odnosu na životinje tretiranje metioninom. Ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti kolagenih vlakana u lamini propriji kod životinja različitih grupa (Tabela 11).

Tabela 11. Zastupljenost kolagenih vlakana (%) u lamini propriji kolona pacova

	Broj životinja	Srednja vrednost (%)	Standardna devijacija
Kontrolna grupa (K)	8	38,62	7,15
Metionin grupa (M)	8	33,67	12,09
Metionin+L-cistein grupa (C)	8	36,48	9,01
Metionin+N-acetil- L-cistein grupa (N)	8	33,3	10,61



A.



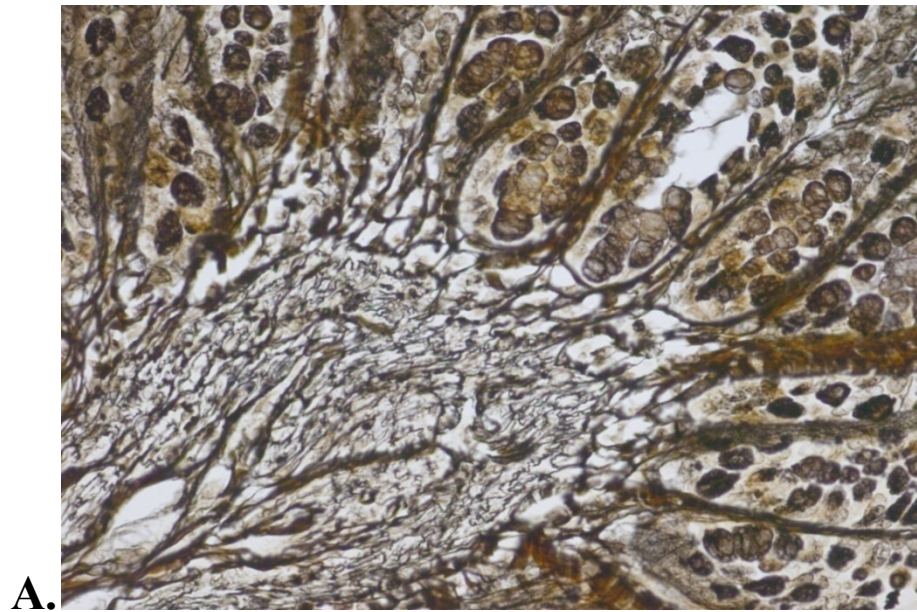
B.

Slika 12. Uzdužni presek sluznice debelog creva pacova kontrolne grupe (A) i nakon tronedeljnog tretmana metioninom (B). A- Kolagena vlakna su debela, međusobno blisko postavljena i pravilno organizovana. Masson trichrome bojenje, x200. B- Uočava se povećan broj ćelija i kapilara u lamini propriji. Kolagena vlakna su diskretno istanjena ali pravilno organizovana. Masson trichrome bojenje, x200.

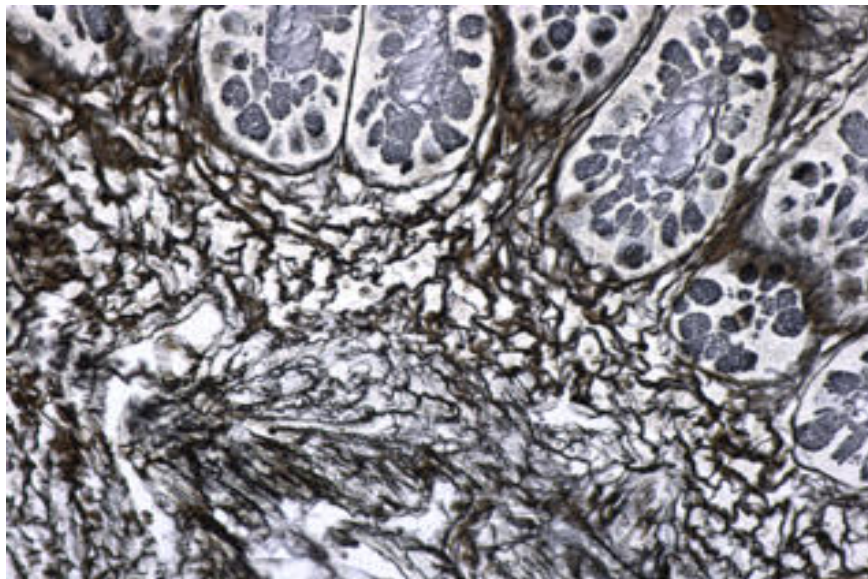
Impregnacijom srebrom po Gomoriju retikularna vlakna se boje crno. Retikularna vlakna u sve 4 grupe životinja su tanka, pravilno raspoređena oko ćelija, celom dužinom lamine proprije (Slika 13). Nema statistički značajne razlike u zastupljenosti retikularnih vlakana u lamini propriji pacova u sve 4 grupe (Tabela 12).

Tabela 12. Zastupljenost retikularnih vlakana (%) u lamini propriji kolona pacova

	Broj životinja	Srednja vrednost (%)	Standardna devijacija
Kontrolna grupa (K)	8	48,33	9,79
Metionin grupa (M)	8	45,39	6,62
Metionin+L-cistein grupa (C)	8	46,28	10,59
Metionin+N-acetil- L-cistein grupa (N)	8	46,82	14,58



A.



B.

Slika 13. Uzdužni presek sluznice debelog creva pacova kontrolne grupe (A) i nakon tronedeljnog opterećenja metioninom (B). Impregnacija sprebrom po Gomoriju, x400.

4.4.3. HISTOLOŠKA ANALIZA TKIVA JETRE PACOVA

Posle tronedeljne i.p. aplikacije metionina isečci tkiva jetre su bojeni odgovarajućim tehnikama, a potom su analizirani histološki parametri u četiri grupe:

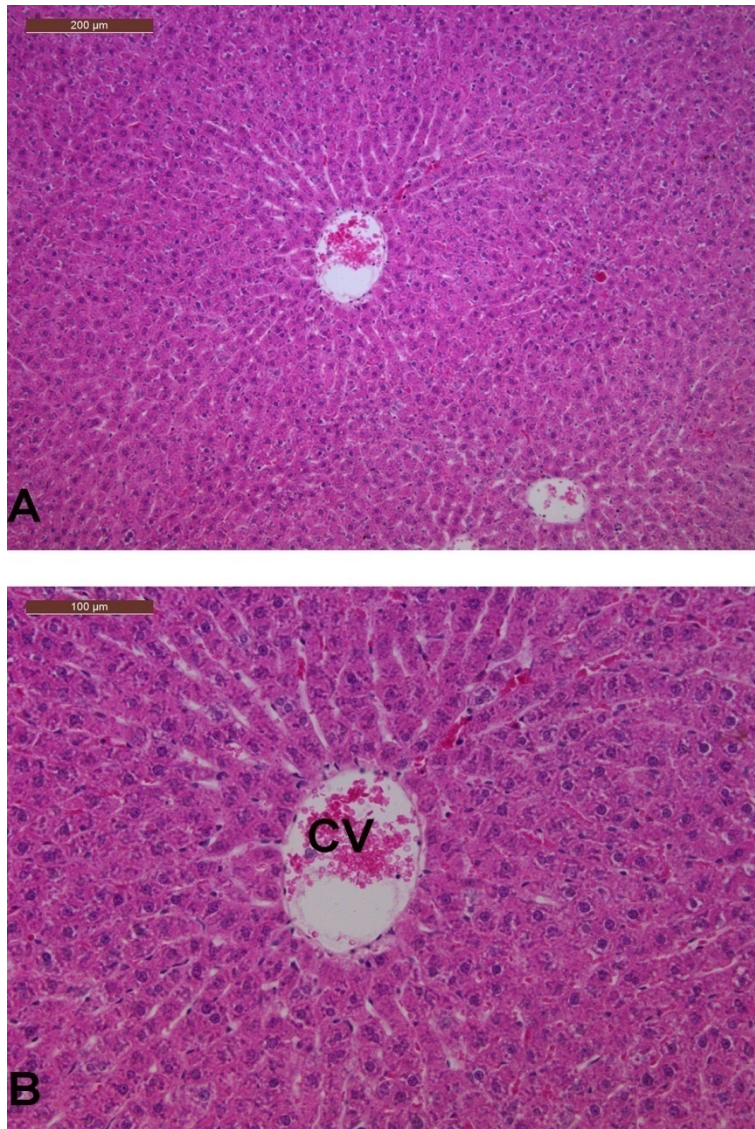
1. K- Kontrolna grupa (0,9% NaCl 1 ml/dan);
2. M- Metionin (0,8 mmol/kg/tm/dan);
3. C- Metionin (0,8 mmol/kg/tm/dan) + L-cistein (7 mg/kg/tm/dan);
4. N- Metionin (0,8 mmol/kg/tm/dan) + N-acetil-L-cistein (50 mg/kg/tm/dan).

Opis preparata po grupama:

GRUPA K

Histološkom analizom organizacije tkiva jetre grupe K uočen je pravilan radijalni raspored jetrinih gredica u odnosu na centralnu venu (*v. centralis*). Građa jetrinih lobulusa je očuvana. Između gredica hepatocita nalaze se sinusoidalni kapilari pravilne orijentacije, bez promena (Slika 14. – A i B). Portni prostori su očuvane građe sa ograncima *a. hepaticae propriae*, *venae portae* i interlobularnim žučnim kanalićima. U portnim prostorima pojedinih životinja kontrolne grupe (K1) uočava se lak inflamatorni infiltrat.

Hepatociti sadrže jedno do dva pravilna, okrugla, euhromatska jedra sa jedarcetom. Indeks proliferacije hepatocita potvrđen je imunohistohemijским bojenjem na Ki67 i morfometrijskom metodom. Citoplazma hepatocita je eozinofilna sa brojnim bazofilnim poljima na mestima prisustva razvijenog granulisanog endoplazminog retikuluma (Slika 14. – A i B).



Slika 14. Tkivo jetre – grupa K (bojenje hematoxilinom i eozinom; originalna uveličanja: A – 100x; B – 200x): A i B – v. centralis (CV) sa pravilnim, radijalnim rasporedom hepatocita, hepatociti pravilne morfologije, sinusoidalni kapilari bez promena

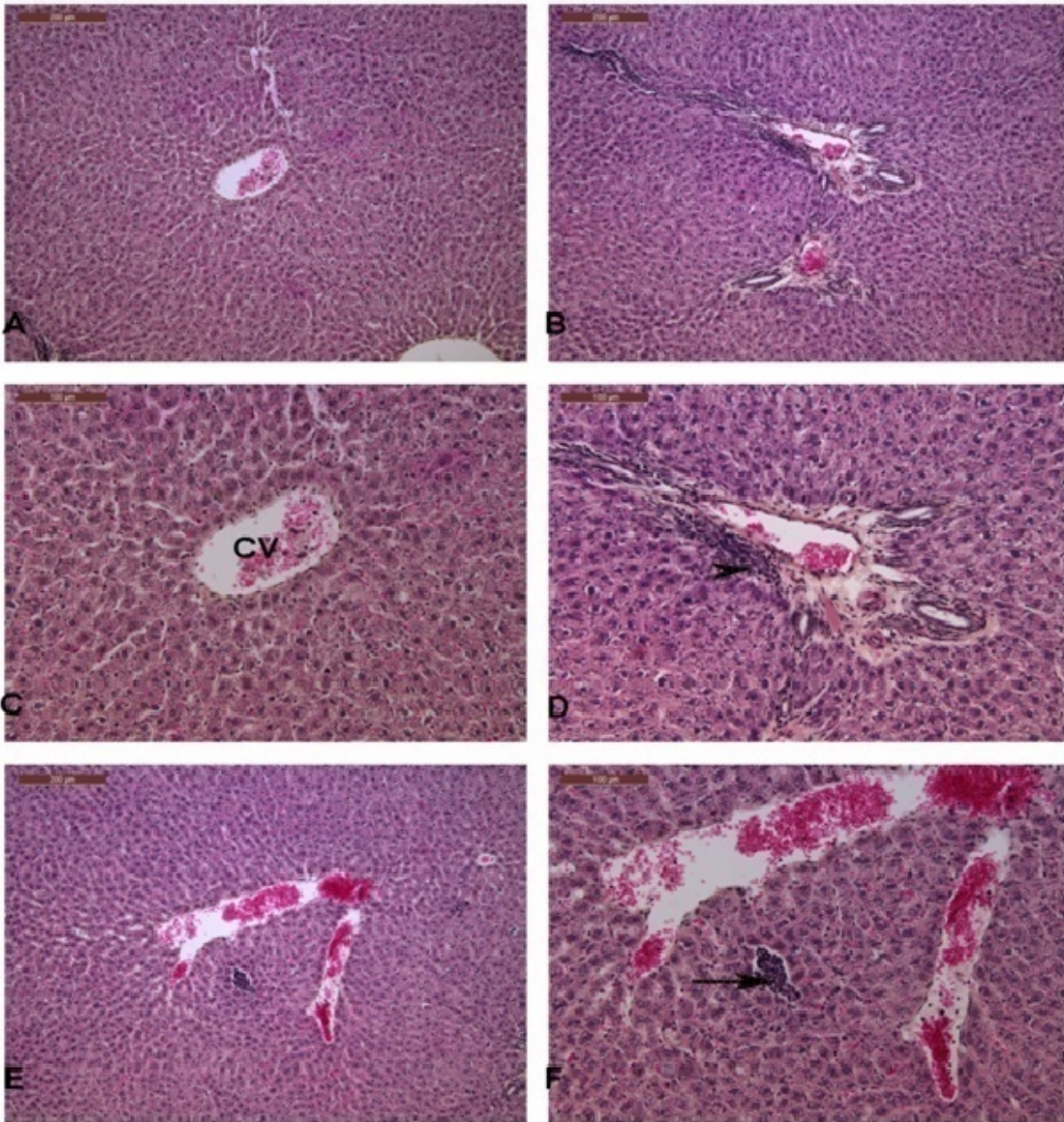
GRUPA M

Histološkom analizom organizacije tkiva jetre grupe M uočen je pravilan radijalni raspored jetrinih gredica u odnosu na centralnu venu (*v. centralis*). Građa jetrinih lobulusa je očuvana. Između gredica hepatocita nalaze se sinusoidalni kapilari pravilne orijentacije, bez promena (Slika 15. – A i C).

Hepatociti sadrže jedno do dva pravilna, okrugla, euhromatska jedra sa jedarcetom. Indeks proliferacije hepatocita potvrđen je imunohistohemijskim bojenjem na Ki67 i morfometrijskom metodom. Citoplazma hepatocita sadrži brojna bazofilna polja razvijenog granulisanog endoplazminog retikuluma.

Histološkom analizom tkiva jetre grupe M uočene su sledeće promene:

- Lako periportalno zapaljenje sa dominantno mononuklearnim inflamatornim infiltratom, sastavljenim od limfocita i monocita i vrlo lakim edemom vezivnog tkiva pojedinih portnih prostora (Slika 15. – B i D);
- Retke fokalne nekroze hepatocita, raspoređene difuzno po parenhimu jetre (Slika 15. – E i F);
- Laka redukcija depoa glikogena u pojedinim hepatocitima u odnosu na kontrolnu grupu;
- Laka hiperplazija Kupferovih ćelija;
- Nema fibroze, ni ciroze. Nema mikro- i makrovezikularne masne promene.



Slika 15. Tkivo jetre – grupa M (bojenje hematoxilinom i eozinom; originalna uveličanja: A, B i E – 100x; C, D i F – 200x): A i C – v. centralis (CV) sa pravilnim, radijalnim rasporedom hepatocita; B i D – portni prostori sa lakim edemom vezivnog tkiva i inflamacijom (glava strelice); E i F - fokalna nekroza hepatocita (strelica).

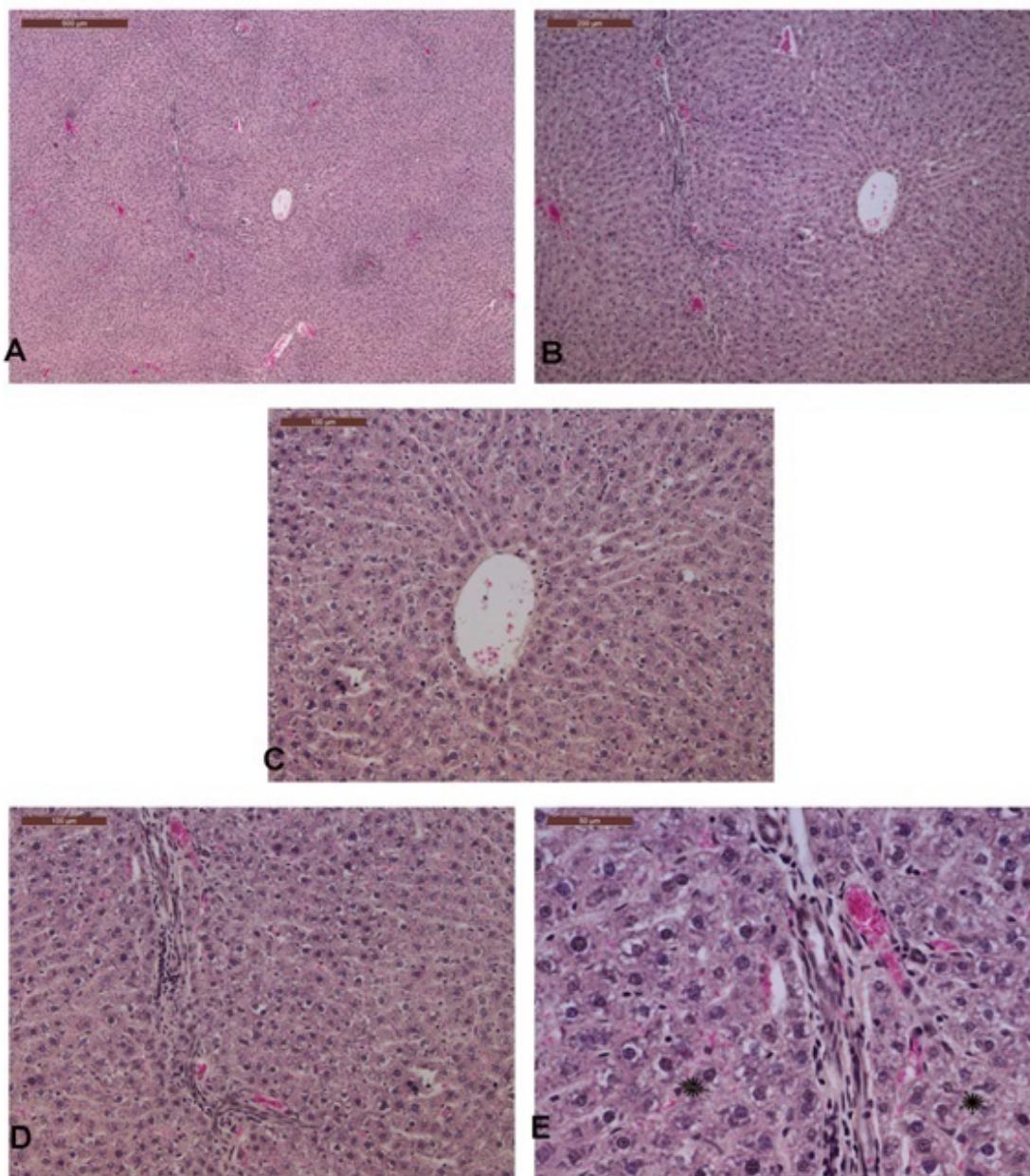
GRUPA C

Histološkom analizom organizacije tkiva jetre grupe C uočen je pravilan radijalni raspored jetrinih gredica u odnosu na centralnu venu (*v. centralis*). Građa jetrinih lobulusa je očuvana. Između gredica hepatocita nalaze se sinusoidalni kapilari pravilne orijentacije, bez promena (Slika 16. – A-C).

Hepatociti sadrže jedno do dva pravilna, okrugla, euhromatska jedra sa jednim, dva ili više jedaraca. Indeks proliferacije hepatocita potvrđen je imunohistohemijским bojenjem na Ki67 i morfometrijskom metodom. U odnosu na kontrolnu grupu i druge eksperimentalne grupe, citoplazma hepatocita sadrži redukovana bazofilna polja porekla granulisanog endoplazminog retikuluma.

Histološkom analizom tkiva jetre grupe C uočene su sledeće promene:

- Laka parenhimska degeneracija i intracelularni edem pojedinih hepatocita periportalno, u zoni 1 jetrinog acinusa (Slika 16. – D-E);
- Laka redukcija depoa glikogena u pojedinim hepatocitima u odnosu na kontrolnu grupu;
- Laka hiperplazija Kupferovih ćelija;
- Nema fibroze, ni ciroze. Nema mikro- i makrovezikularne masne promene.



Slika 16. Tkivo jetre – grupa C (bojenje hematoksilinom i eozinom; originalna uveličanja: A – 50x; B – 100x; C i D – 200x; E – 400x): A – C – v. centralis sa pravilnim, radijalnim rasporedom hepatocita; D i E – laka parenhimska degeneracija pojedinih hepatocita, intracelularni edem i redukcija depoa glikogena (zvezdice).

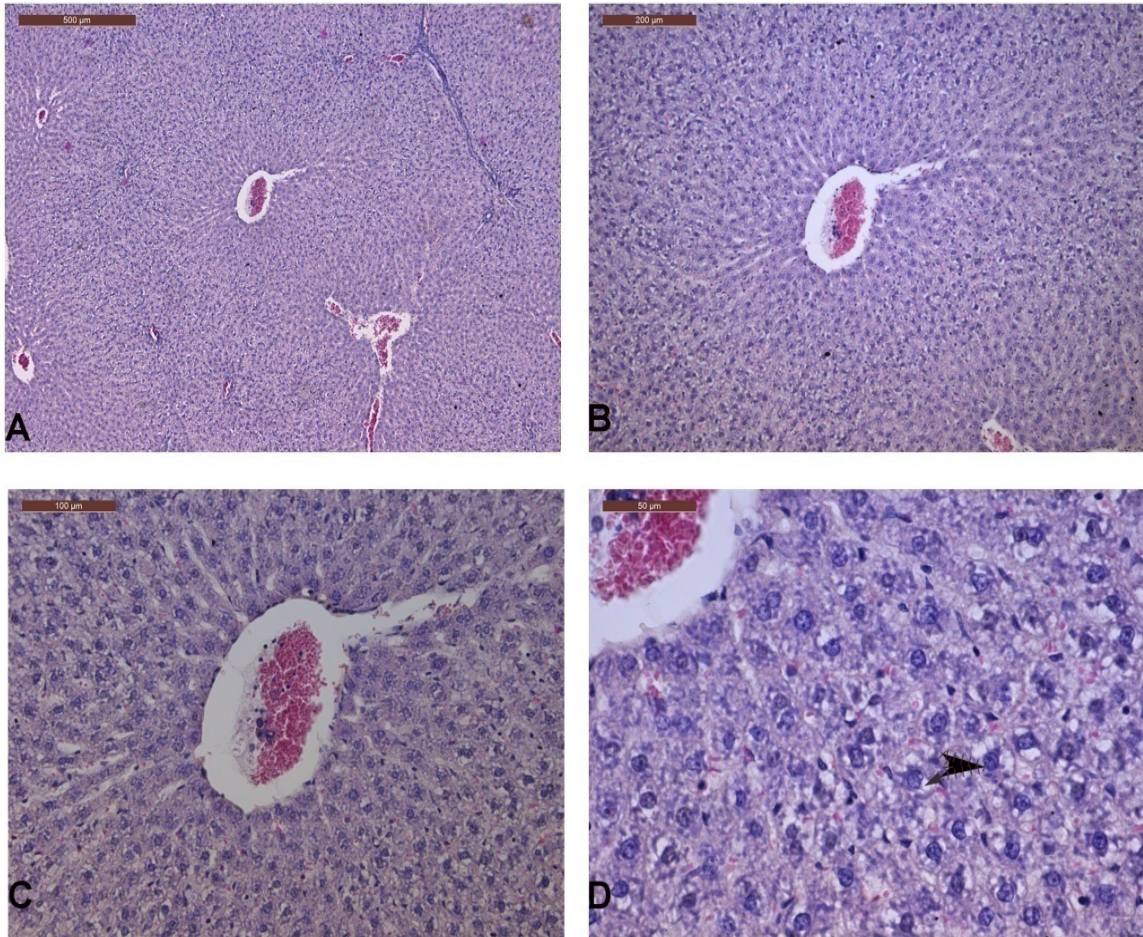
GRUPA N

Histološkom analizom organizacije tkiva jetre grupe N uočen je pravilan radijalni raspored jetrinih gredica u odnosu na centralnu venu (*v. centralis*). Građa jetrinih lobulusa je očuvana. Između gredica hepatocita nalaze se sinusoidalni kapilari pravilne orijentacije, bez promena (Slika 17. – A-C).

Hepatociti sadrže jedno do dva pravilna, okrugla, euhromatska jedra sa jedarcetom. Indeks proliferacije hepatocita potvrđen je imunohistohemijskim bojenjem na Ki67 i morfometrijskom metodom. Citoplazma hepatocita sadrži brojna bazofilna polja razvijenog granulisanog endoplazminog retikuluma.

Histološkom analizom tkiva jetre grupe N uočene su sledeće promene:

- Laka mikrovezikularna masna pomena u pojedinim hepatocitima lokalizovanim periportalno ili u zonama 1 i 2 jetrinog acinusa (Slika 17. – D);
- Laka redukcija depoa glikogena u pojedinim hepatocitima u odnosu na kontrolnu grupu;
- Laka hiperplazija Kupferovih ćelija;
- Apoptoza pojedinih hepatocita;
- Nema fibroze, ni ciroze.



Slika 17. Tkivo jetre – grupa N (bojenje hematoksilinom i eozinom; originalna uveličanja: A – 50x; B – 100x; C – 200x; D – 400x): A – D – v. centralis sa pravilnim, radijalnim rasporedom hepatocita; D – mikrovezikularna masna promena u pojedinim hepatocitima (zona 2 jetrinog acinusa) (glava strelice).

4.4.4. BIOHEMIJSKA ANALIZA TKIVA

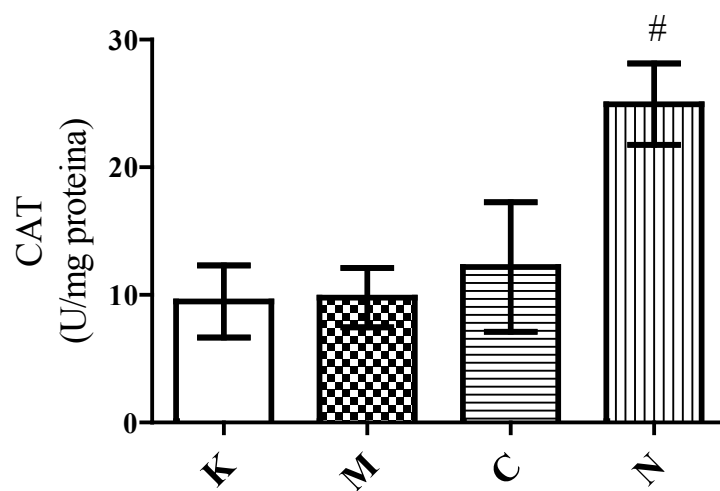
4.4.4.1. Rezultati analiza enzimske aktivnosti katalaze (CAT)

Analiza enzimske aktivnosti CAT vršena je u uzorcima tkiva duodenuma, ileuma, kolona i jetre nakon tronedelnog opterećenja metioninom. Praćena je aktivnost enzima u četiri grupe: kontrolnoj (K), u grupi životinja opterećenih metioninom tokom tri nedelje (M), u grupi kojoj je tokom 3 nedelje uz metionin aplikovan i L-cistein (C), kao i u grupi kojoj je tokom 3 nedelje uz metionin aplikovan i N-acetil-L-cistein (N).

Rezultati analiza tkiva duodenuma pokazuju da prisutno povećanje aktivnosti CAT u grupi M u odnosu na kontrolnu vrednost (za 3,16%) nije statistički značajno. Primena L-cisteina dovela je do povećanja praćenog parametra za 24,51% u odnosu na grupu M koje nije statistički značajno. Aktivnost CAT u grupi N je povišena za 154,75% u odnosu na M grupu pri čemu je dokazana razlika statistički značajna $p < 0,05$ (Tabela 13., Grafikon 34.).

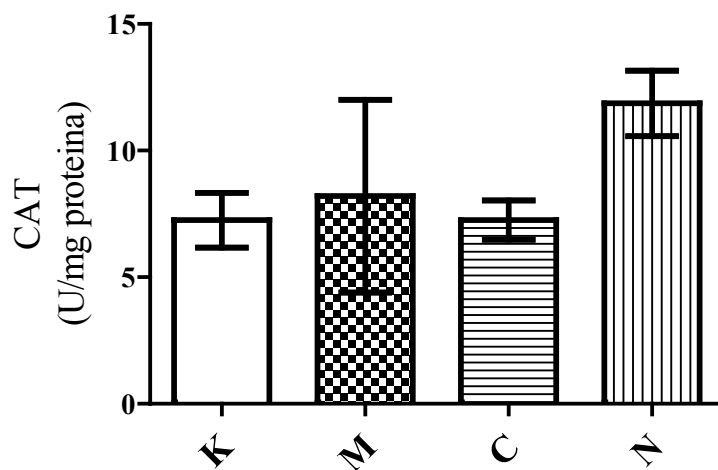
Tabela 13. Promena aktivnosti CAT u duodenumu, ileumu, kolonu i jetri pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), tokom primene L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) u uslovima opterećenja metioninom; vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška i kao procenat promene datog parametra za po 6 životinja u grupi (n=6); *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001

	Kontrola (K)	Metionin (M)	Metionin + L-Cistein (C)	Metionin + N-acetil-L-cistein (N)
Duodenum	9,49 \pm 2,82	9,79 \pm 2,33 (\uparrow 3,16%) vs K	12,19 \pm 5,07 (\uparrow 24,51%) vs M	24,94 \pm 3,19 (\uparrow 154,75%) vs M *
Ileum	7,25 \pm 1,08	8,20 \pm 3,81 (\uparrow 13,10%) vs K	7,25 \pm 0,77 (\downarrow 11,59%) vs M	11,87 \pm 1,29 (\uparrow 44,76%) vs M
Kolon	10,06 \pm 3,01	7,59 \pm 1,11 (\downarrow 24,55%) vs K	10,16 \pm 1,73 (\uparrow 33,86%) vs M	10,47 \pm 1,34 (\uparrow 37,94%) vs M
Jetra	77,84 \pm 3,82	69,69 \pm 3,62 (\downarrow 10,47%) vs K	90,85 \pm 4,73 (\uparrow 30,36%) vs M **	102,1 \pm 2,36 (\uparrow 46,50%) vs M***



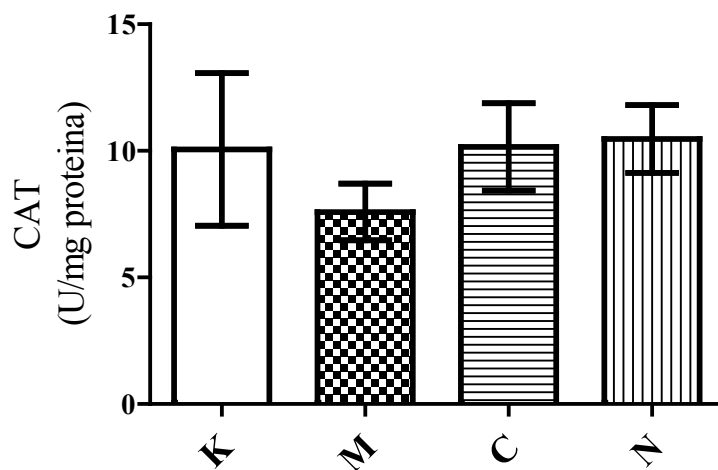
Grafikon 34. Aktivnost katalaze (CAT) u tkivu duodenuma pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), uz istovremenu primenu L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) tokom tronedeljne aplikacije metionina; šest životinja po grupi (n=6); #p<0,05 statistički značajna razlika u poređenju sa M grupom

Rezultati analiza tkiva ileuma pokazuju da prisutno povećanje aktivnosti CAT u grupi M u odnosu na kontrolnu vrednost (za 13,10%) nije bilo statistički značajno. Primena L-cisteina dovela je do smanjenja praćenog parametra za 11,59% u odnosu na grupu M koje nije statistički značajno. Aktivnost CAT u grupi N je povišena za 44,76% u odnosu na M grupu pri čemu dokazana razlika nije bila statistički značajna (Tabela 13., Grafikon 34.).



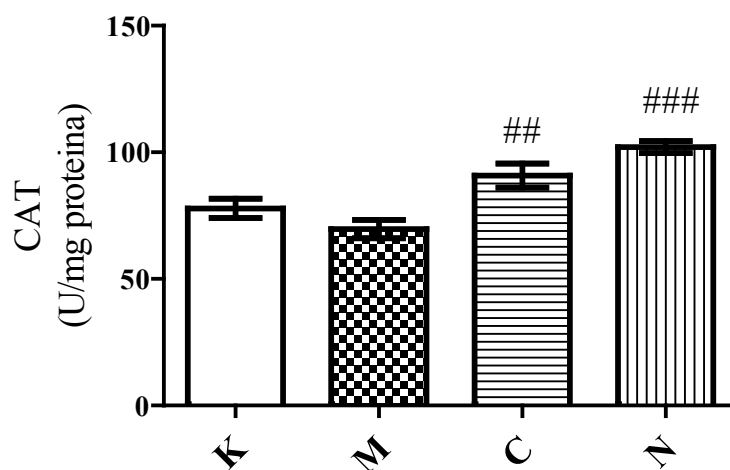
Grafikon 34. Aktivnost katalaze (CAT) u tkivu ileuma pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), uz istovremenu primenu L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) tokom tronedeljne aplikacije metionina; šest životinja po grupi (n=6)

Rezultati analiza tkiva kolona pokazuju da prisutno smanjenje aktivnosti CAT u grupi M u odnosu na kontrolnu vrednost (za 24,55%) nije bilo statistički značajno. Primena L-cisteina dovela je do povećanja praćenog parametra za 33,86% u odnosu na grupu M koje nije statistički značajno. Aktivnost CAT u grupi N je povišena za 37,94% u odnosu na M grupu pri čemu dokazana razlika nije bila statistički značajna (Tabela 13., Grafikon 35.).



Grafikon 35. Aktivnost katalaze (CAT) u tkivu kolona pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), uz istovremenu primenu L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) tokom tronedeljne aplikacije metionina; šest životinja po grupi (n=6)

Rezultati analiza tkiva jetre pokazuju da prisutno smanjenje aktivnosti CAT u grupi M u odnosu na kontrolnu vrednost (za 10,47%) nije bilo statistički značajno. Primena L-cisteina dovela je do statistički visoko značajnog povećanja praćenog parametra za 30,36% u odnosu na grupu M ($p < 0,01$). Aktivnost CAT u grupi N je povišena za 46,50% u odnosu na M grupu pri čemu je dokazana razlika bila statistički visoko značajna ($p < 0,001$) (Tabela 13., Grafikon 36.).



Grafikon 36. Aktivnost katalaze (CAT) u tkivu jetre pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), uz istovremenu primenu L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) tokom tronedeljne aplikacije metionina; šest životinja po grupi ($n=6$); ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa M grupom

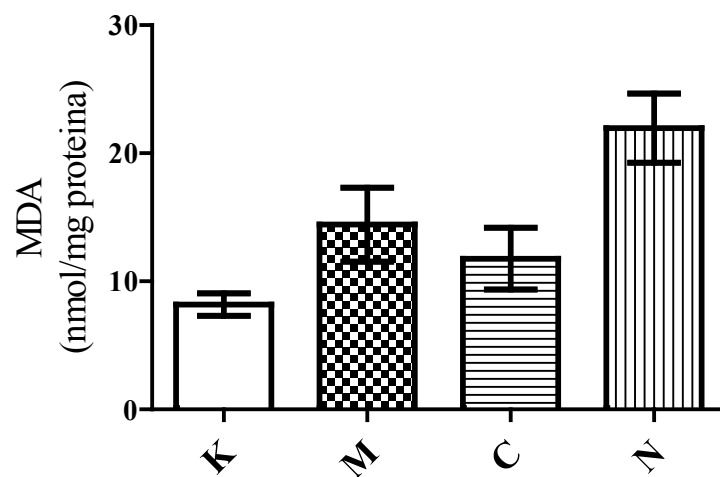
4.4.4.2. Rezultati određivanja indeksa lipidne peroksidacije - koncentracije malondialdehida (MDA)

Analiza indeksa lipidne peroksidacije vršena je u uzorcima tkiva duodenuma, ileuma, kolona i jetre nakon tronedeljnog opterećenja metioninom. Praćena je koncentracija MDA u četiri grupe: kontrolnoj- (K), u grupi životinja opterećenih metioninom tokom tri nedelje (M), u grupi kojoj je tokom 3 nedelje uz metionin aplikovan i L-cistein (C), kao i u grupi kojoj je tokom 3 nedelje uz metionin aplikovan N-acetil-L-cistein (N).

Rezultati analiza tkiva duodenuma pokazali su da prisutno povećanje koncentracije MDA u grupi M u odnosu na kontrolnu vrednost (za 76,41%) nije statistički značajno. Primena L-cisteina dovela je do smanjenja praćenog parametra za 18,43% u odnosu na grupu M koje nije bilo statistički značajno. Koncentracija MDA u grupi N je povišena za 52,25% u odnosu na M grupu pri čemu dokazana razlika nije bila statistički značajna (Tabela 14., Grafikon 37.).

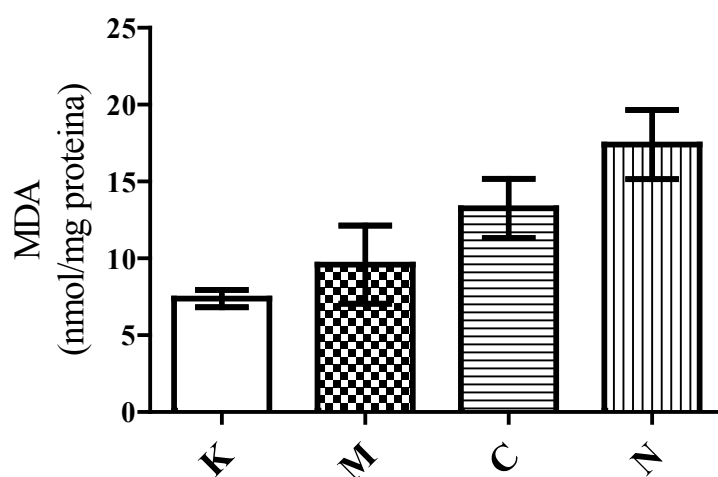
Tabela 14. Promena koncentracije MDA u duodenumu, ileumu, kolonu i jetri pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), tokom primene L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) u uslovima opterećenja metioninom; vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška i kao procenat promene datog parametra za po 6 životinja u grupi (n=6)

	Kontrola (K)	Metionin (M)	Metionin + L-Cistein (C)	Metionin + N-acetil-L-cistein (N)
Duodenum	8,18 \pm 0,88	14,43 \pm 2,89 (\uparrow 76,41%) vs K	11,77 \pm 2,41 (\downarrow 18,43%) vs M	21,97 \pm 2,70 (\uparrow 52,25%) vs M
Ileum	7,38 \pm 0,56	9,59 \pm 2,54 (\uparrow 29,95%) vs K	13,26 \pm 1,93 (\uparrow 38,27%) vs M	17,41 \pm 2,26 (\uparrow 81,54%) vs M
Kolon	8,91 \pm 1,74	9,09 \pm 3,03 (\uparrow 2,02%) vs K	14,12 \pm 2,68 (\uparrow 55,34%) vs M	17,10 \pm 3,33 (\uparrow 88,12%) vs M
Jetra	5,54 \pm 0,74	6,48 \pm 1,64 (\uparrow 16,97%) vs K	5,99 \pm 1,30 (\downarrow 7,56%) vs M	10,21 \pm 1,89 (\uparrow 57,56 %) vs M



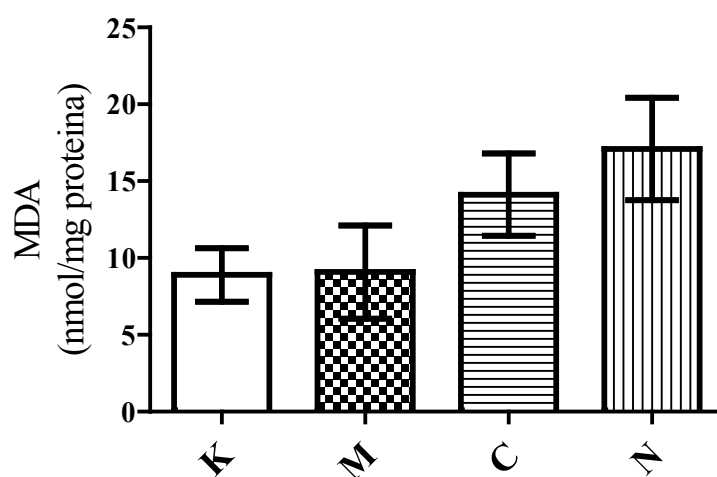
Grafikon 37. Koncentracija malondialdehida (MDA) u tkivu duodenuma pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), uz istovremenu primenu L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) tokom tronedeljne aplikacije metionina; šest životinja po grupi (n=6)

Rezultati analiza tkiva ileuma pokazuju da prisutno povećanje koncentracije MDA u grupi M u odnosu na kontrolnu vrednost (za 29,95%) nije bilo statistički značajno. Primena L-cisteina dovela je do povećanja praćenog parametra za 38,27% u odnosu na grupu M koje nije bilo statistički značajno. Koncentracija MDA u grupi N bila je povišena za 81,54% u odnosu na M grupu pri čemu dokazana razlika nije statistički značajna (Tabela 14., Grafikon 38).



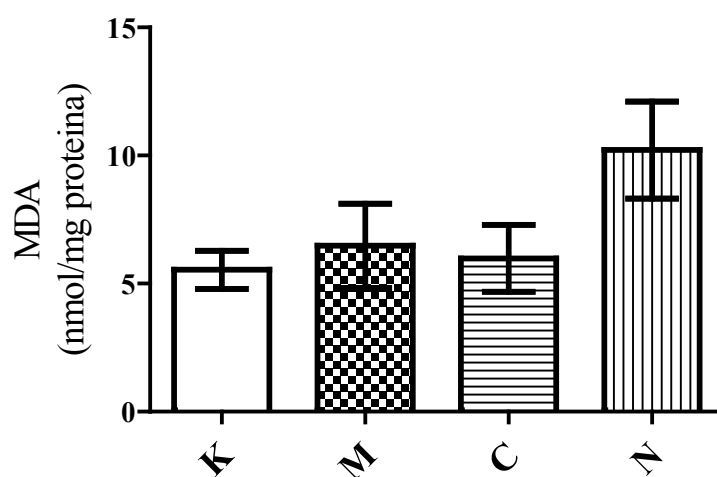
Grafikon 38. Koncentracija malondialdehida (MDA) u tkivu ileuma pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), uz istovremenu primenu L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) tokom tronedeljne aplikacije metionina; šest životinja po grupi (n=6)

Rezultati analiza tkiva kolona pokazuju da prisutno povećanje koncentracije MDA u grupi M u odnosu na kontrolnu vrednost (za 2,02%) nije bilo statistički značajno. Primena L-cisteina dovela je do povećanja praćenog parametra za 55,34% u odnosu na grupu M koje takođe nije bilo statistički značajno. Koncentracija MDA u grupi N bila je povišena za 88,12% u odnosu na M grupu pri čemu ova razlika nije statistički značajna (Tabela 14., Grafikon 39).



Grafikon 39. Koncentracija malondialdehida (MDA) u tkivu kolona pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), uz istovremenu primenu L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) tokom tronedeljne aplikacije metionina; šest životinja po grupi (n=6)

Rezultati analiza tkiva jetre pokazuju da prisutno povećanje koncentracije MDA u grupi M u odnosu na kontrolnu vrednost (za 16,97%) nije bilo statistički značajno. Primena L-cisteina dovela je do smanjenja praćenog parametra za 7,56% u odnosu na grupu M koje nije statistički značajno. Koncentracija MDA u grupi N bila je povišena za 57,56% u odnosu na M grupu pri čemu dokazana razlika nije statistički značajna (Tabela 14., Grafikon 40.).



Grafikon 40. Koncentracija malondialdehida (MDA) u tkivu jetre pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), uz istovremenu primenu L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) tokom tronedeljne aplikacije metionina; šest životinja po grupi (n=6)

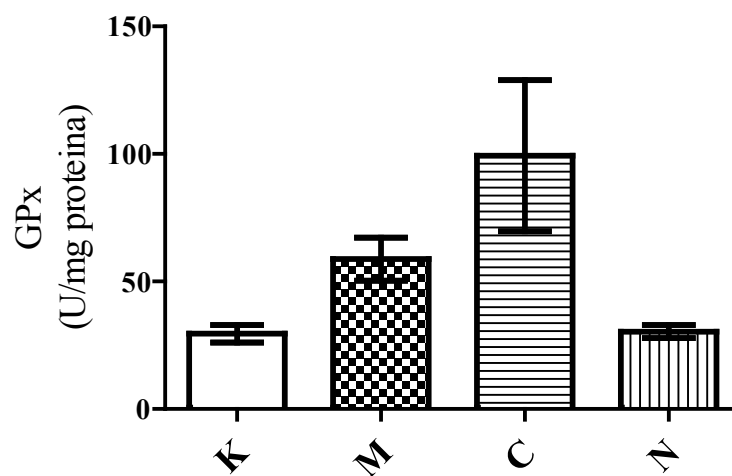
4.4.4.3. Rezultati analiza enzimske aktivnosti glutation peroksidaze (GPx)

Analiza enzimske aktivnosti GPx vršena je u uzorcima tkiva duodenuma, ileuma, kolona i jetre nakon tronedeljnog opterećenja metioninom. Praćena je aktivnost enzima u četiri grupe: kontrolnoj (K), u grupi životinja opterećenih metioninom tokom tri nedelje (M), u grupi kojoj je tokom 3 nedelje uz metionin aplikovan i L-cistein (C), kao i u grupi kojoj je tokom 3 nedelje uz metionin aplikovan N-acetil-L-cistein (N).

Rezultati analiza tkiva duodenuma pokazuju da prisutno povećanje aktivnosti GPx u grupi M u odnosu na kontrolnu vrednost (za 98,95%) nije bilo statistički značajno. Primena L-cisteina dovela je do povećanja praćenog parametra za 69,00% u odnosu na grupu M koje nije bilo statistički značajno. Aktivnost GPx u grupi N bila je snižena za 48,36% u odnosu na M grupu pri čemu dokazana razlika nije statistički značajna (Tabela 15., Grafikon 41.).

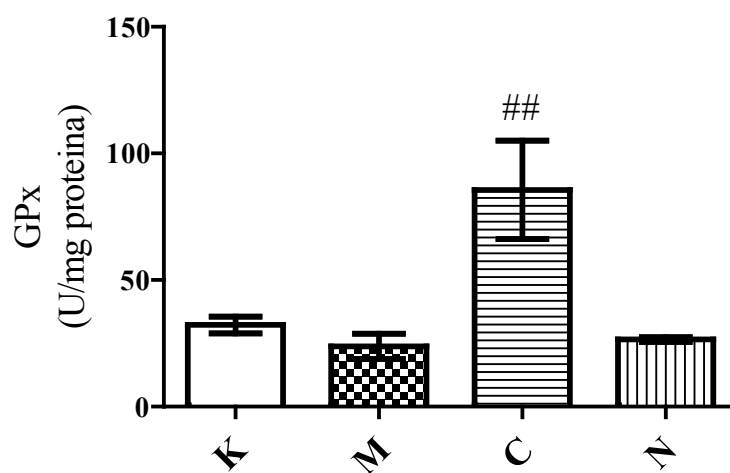
Tabela 15. Promena aktivnosti glutathion peroksidaze (GPx) u duodenumu, ileumu, kolonu i jetri pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), tokom primene L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) u uslovima opterećenja metioninom; vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška i kao procenat promene datog parametra za po 6 životinja u grupi; *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001

	Kontrola (K)	Metionin (M)	Metionin + L-Cistein (C)	Metionin + N-acetil-L-cistein (N)
Duodenum	29,54 \pm 3,45	58,77 \pm 8,41 (\uparrow 98,95%) vs K	99,32 \pm 29,63 (\uparrow 69,00%) vs M	30,35 \pm 2,58 (\downarrow 48,36%) vs M
Ileum	32,25 \pm 3,32	23,79 \pm 5,01 (\downarrow 26,23%) vs K	85,62 \pm 19,41 (\uparrow 259,90%) vs M **	26,52 \pm 0,94 (\uparrow 11,48%) vs M
Kolon	36,87 \pm 8,34	43,58 \pm 11,97 (\uparrow 18,20%) vs K	33,64 \pm 6,58 (\downarrow 22,81%) vs M	26,77 \pm 4,41 (\downarrow 38,57%) vs M
Jetra	51,64 \pm 8,58	71,84 \pm 10,85 (\uparrow 39,12%) vs K	14,08 \pm 10,00 (\downarrow 80,40%) vs M ***	108,00 \pm 3,48 (\uparrow 50,33%) vs M *



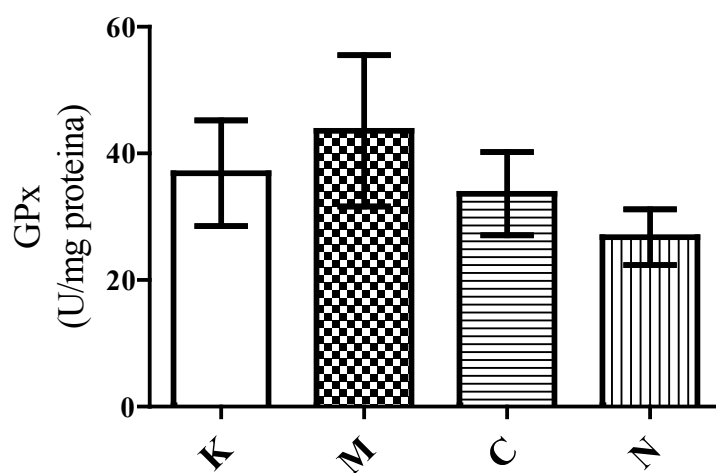
Grafikon 41. Aktivnost glutation peroksidaze (GPx) u tkivu duodenuma pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), uz istovremenu primenu L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) tokom tronedeljne aplikacije metionina; šest životinja po grupi (n=6)

Rezultati analiza tkiva ileuma pokazali su da prisutno smanjenje aktivnosti GPx u grupi M u odnosu na kontrolnu vrednost (za 26,23%) nije bilo statistički značajno. Primena L-cisteina dovela je do povećanja praćenog parametra za 259,90% u odnosu na grupu M koje je bilo statistički visoko značajno ($p < 0,01$). Aktivnost GPx u grupi N bila je povišena za 11,48% u odnosu na M grupu pri čemu dokazana razlika nije statistički značajna (Tabela 15., Grafikon 42.).



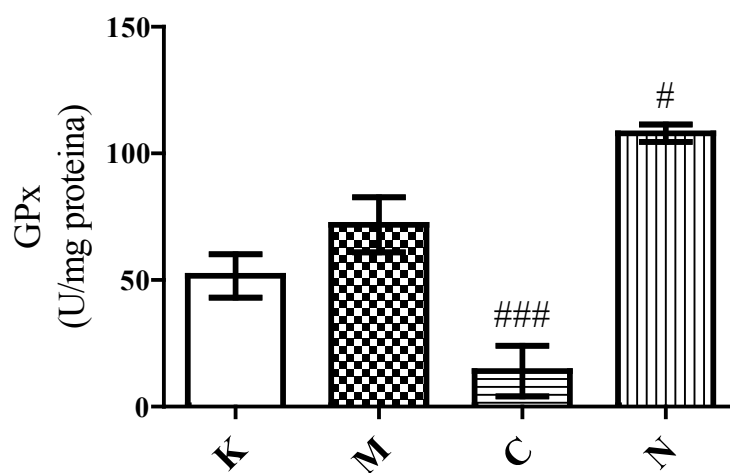
Grafikon 42. Aktivnost glutation peroksidaze (GPx) u tkivu ileuma pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), uz istovremenu primenu L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) tokom tronedeljne aplikacije metionina; šest životinja po grupi ($n=6$); $##p < 0,01$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa M grupom

Rezultati analiza tkiva kolona pokazali su da prisutno povećanje aktivnosti GPx u grupi M u odnosu na kontrolnu vrednost (za 18,20%) nije bilo statistički značajno. Primena L-cisteina dovela je do smanjenja praćenog parametra za 22,81% u odnosu na grupu M koje nije bilo statistički značajno. Aktivnost GPx u grupi N bila je snižena za 38,57% u odnosu na M grupu pri čemu dokazana razlika nije statistički značajna (Tabela 15., Grafikon 43.).



Grafikon 43. Aktivnost glutation peroksidaze (GPx) u tkivu kolona pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), uz istovremenu primenu L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) tokom tronedeljne aplikacije metionina; šest životinja po grupi (n=6)

Rezultati analiza tkiva jetre pokazali su da prisutno povećanje aktivnosti GPx u grupi M u odnosu na kontrolnu vrednost (za 39,12%) nije bilo statistički značajno. Primena L-cisteina dovela je do smanjenja praćenog parametra za 80,40% u odnosu na grupu M koje je bilo statistički visoko značajno ($p < 0,001$). Aktivnost GPx u grupi N bila je povišena za 50,33% u odnosu na M grupu pri čemu je dokazana razlika bila statistički značajna ($p < 0,05$) (Tabela 15., Grafikon 44.).



Grafikon 44. Aktivnost glutation peroksidaze (GPx) u tkivu jetre pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), uz istovremenu primenu L-cisteina (C) i N-acetil-L-cisteina (N) tokom tronedeljne aplikacije metionina; šest životinja po grupi (n=6); # $p < 0,05$ statistički značajna razlika u poređenju sa M grupom; ### $p < 0,001$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa M grupom

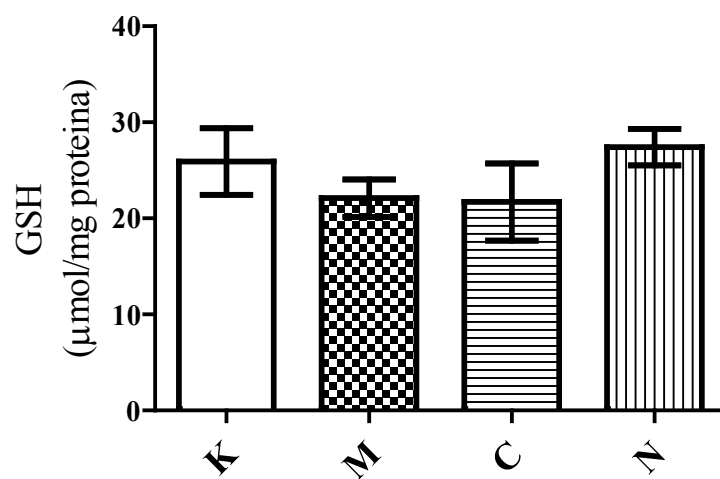
4.4.4.4. Rezultati određivanja koncentracije redukovanog glutationa (GSH)

Analiza koncentracije redukovanog glutationa (GSH) vršena je u uzorcima tkiva duodenuma, ileuma, kolona i jetre nakon tronedeljnog opterećenja metioninom. Praćena je koncentracija GSH u četiri grupe: kontrolnoj (K), u grupi životinja opterećenih metioninom tokom tri nedelje (M), u grupi kojoj je tokom 3 nedelje uz metionin aplikovan i L-cistein (C), kao i u grupi kojoj je tokom 3 nedelje uz metionin aplikovan N-acetil-L-cistein (N).

Rezultati analiza tkiva duodenuma pokazuju da prisutno smanjenje koncentracije GSH u grupi M u odnosu na kontrolnu vrednost (za 14,73%) nije bilo statistički značajno. Primena L-cisteina dovela je do smanjenja praćenog parametra za 1,85% u odnosu na grupu M koje nije statistički značajno. Koncentracija GSH u grupi N bila je povišena za 24,06% u odnosu na M grupu pri čemu dokazana razlika nije statistički značajna (Tabela 16., Grafikon 45.).

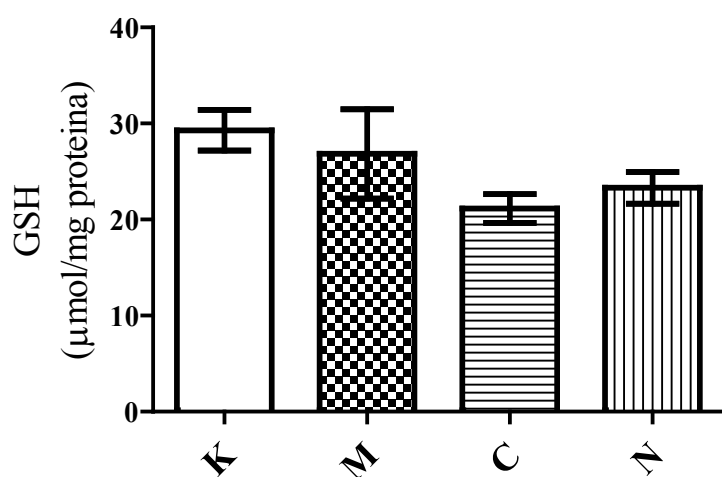
Tabela 16. Promena koncentracije GSH u duodenumu, ileumu, kolonu i jetri pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), tokom primene L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) u uslovima opterećenja metioninom; vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška i kao procenat promene datog parametra za po 6 životinja u grupi; ***p<0,001

	Kontrola (K)	Metionin (M)	Metionin + L-Cistein (C)	Metionin + N-acetil-L-cistein (N)
Duodenum	25,93 \pm 3,47	22,11 \pm 1,95 (\downarrow 14,73%) vs K	21,70 \pm 4,00 (\downarrow 1,85%) vs M	27,43 \pm 1,90 (\uparrow 24,06%) vs M
Ileum	29,30 \pm 2,12	26,84 \pm 4,65 (\downarrow 8,40%) vs K	21,15 \pm 1,50 (\downarrow 21,20%) vs M	23,30 \pm 1,65 (\downarrow 13,19%) vs M
Kolon	24,74 \pm 2,57	18,26 \pm 1,02 (\downarrow 26,19%) vs K	17,27 \pm 1,26 (\downarrow 5,42%) vs M	23,01 \pm 2,76 (\uparrow 26,01%) vs M
Jetra	16,55 \pm 0,79	15,22 \pm 0,44 (\downarrow 8,04%) vs K	17,07 \pm 1,07 (\uparrow 12,16%) vs M	24,64 \pm 0,85 (\uparrow 61,89%) vs M***



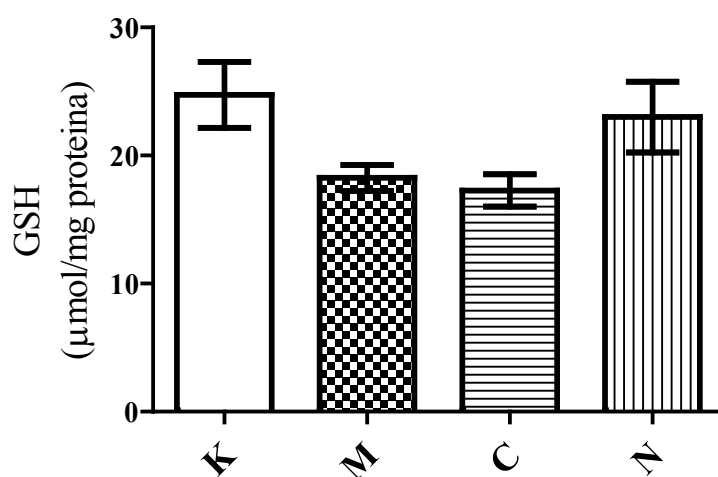
Grafikon 45. Koncentracija redukovanog glutationa (GSH) u tkivu duodenuma pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), uz istovremenu primenu L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) tokom tronedeljne aplikacije metionina; šest životinja po grupi (n=6)

Rezultati analiza tkiva ileuma pokazuju da prisutno smanjenje koncentracije GSH u grupi M u odnosu na kontrolnu vrednost (za 8,40%) nije bilo statistički značajno. Primena L-cisteina dovela je do smanjenja praćenog parametra za 21,20% u odnosu na grupu M koje nije statistički značajno. Koncentracija GSH u grupi N bila je snižena za 13,19% u odnosu na M grupu pri čemu dokazana razlika nije bila statistički značajna (Tabela 16., Grafikon 46.).



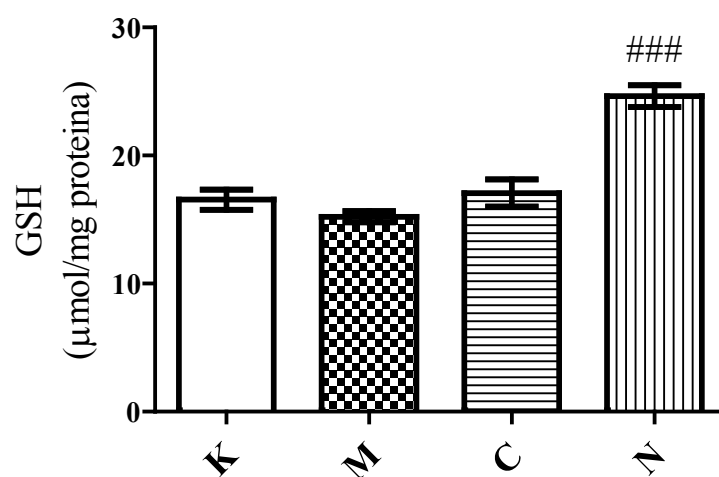
Grafikon 46. Koncentracija redukovanog glutationa (GSH) u tkivu ileuma pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), uz istovremenu primenu L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) tokom tronedeljne aplikacije metionina; šest životinja po grupi (n=6)

Rezultati analiza tkiva kolona pokazali su da prisutno smanjenje koncentracije GSH u grupi M u odnosu na kontrolnu vrednost (za 26,19%) nije bilo statistički značajno. Primena L-cisteina dovela je do smanjenja praćenog parametra za 5,42% u odnosu na grupu M koje nije statistički značajno. Koncentracija GSH u grupi N bila je povišena za 26,01% u odnosu na M grupu pri čemu dokazana razlika nije statistički značajna (Tabela 16., Grafikon 47.).



Grafikon 47. Koncentracija redukovano glutationa (GSH) u tkivu kolona pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), uz istovremenu primenu L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) tokom tronedeljne aplikacije metionina; šest životinja po grupi (n=6)

Rezultati analiza tkiva jetre pokazuju da prisutno smanjenje koncentracije GSH u grupi M u odnosu na kontrolnu vrednost (za 8,04%) nije bilo statistički značajno. Primena L-cisteina dovela je do povećanja praćenog parametra za 12,16% u odnosu na grupu M koje nije statistički značajno. Koncentracija GSH u grupi N bila je povišena za 61,89% u odnosu na M grupu pri čemu je dokazana razlika bila statistički visoko značajna ($p < 0,001$) (Tabela 16., Grafikon 48.).



Grafikon 48. Koncentracija redukovano glutationa (GSH) u tkivu jetre pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), uz istovremenu primenu L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) tokom tronedeljne aplikacije metionina; šest životinja po grupi (n=6); ### $p < 0,001$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa M grupom

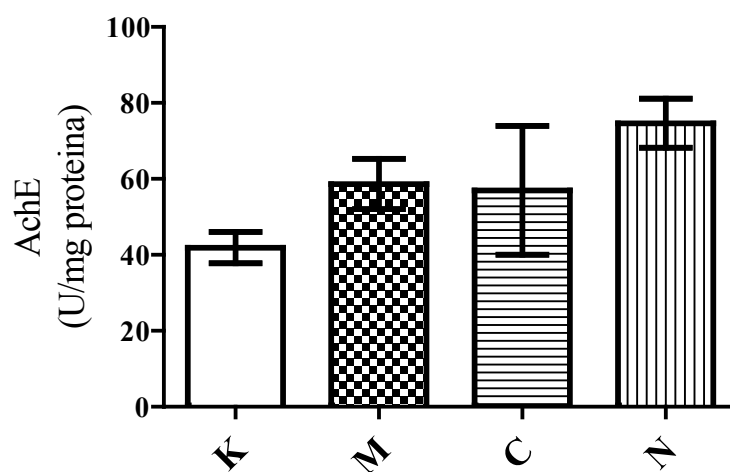
4.4.4.5. Rezultati analiza enzimske aktivnosti acetilholinesteraze (AchE)

Analiza enzimske aktivnosti AchE vršena je u uzorcima tkiva duodenuma, ileuma, kolona i jetre nakon tronedeljnog opterećenja metioninom. Praćena je aktivnost enzima u četiri grupe: kontrolnoj (K), u grupi životinja opterećenih metioninom tokom tri nedelje (M), u grupi kojoj je tokom 3 nedelje uz metionin aplikovan i L-cistein (C), kao i u grupi kojoj je tokom 3 nedelje uz metionin aplikovan N-acetil-L-cistein (N).

Rezultati analiza tkiva duodenuma pokazuju da prisutno povećanje aktivnosti AchE u grupi M u odnosu na kontrolnu vrednost (za 39,92%) nije bilo statistički značajno. Primena L-cisteina dovela je do smanjenja praćenog parametra za 2,83% u odnosu na grupu M koje nije statistički značajno. Aktivnost AchE u grupi N bila je povišena za 27,32% u odnosu na M grupu pri čemu dokazana razlika nije statistički značajna (Tabela 17., Grafikon 49.).

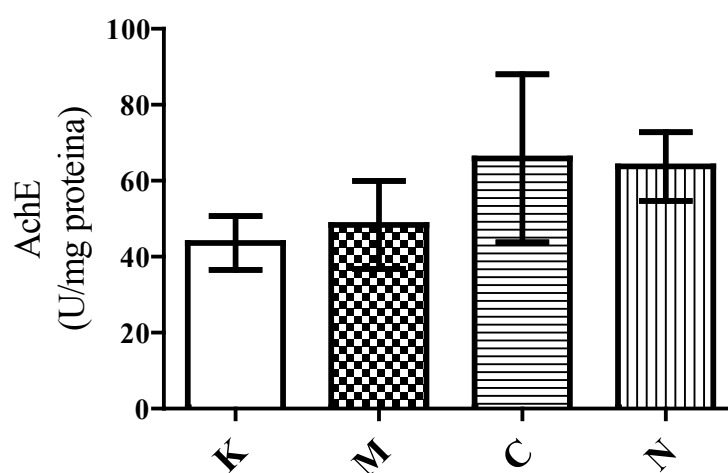
Tabela 17. Promena aktivnosti acetilholinesteraze (AchE) u duodenumu, ileumu, kolonu i jetri pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), tokom primene L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) u uslovima opterećenja metioninom; vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška i kao procenat promene datog parametra za po 6 životinja u grupi (n=6); *p<0,05; ***p<0,001

	Kontrola (K)	Metionin (M)	Metionin + L-Cistein (C)	Metionin + N-acetil-L-cistein (N)
Duodenum	41,91 \pm 4,11	58,64 \pm 6,63 (\uparrow 39,92%) vs K	56,98 \pm 16,95 (\downarrow 2,83%) vs M	74,66 \pm 6,49 (\uparrow 27,32%) vs M
Ileum	43,64 \pm 7,09	48,37 \pm 11,56 (\uparrow 10,84%) vs K	65,89 \pm 22,13 (\uparrow 36,22%) vs M	63,76 \pm 9,06 (\uparrow 31,82%) vs M
Kolon	21,20 \pm 5,95	20,41 \pm 1,91 (\downarrow 3,72%) vs K	30,22 \pm 1,84 (\uparrow 48,06%) vs M	29,81 \pm 2,81 (\uparrow 46,05%) vs M
Jetra	6,68 \pm 0,43	6,66 \pm 0,66 (\downarrow 0,30%) vs K	9,72 \pm 1,04 (\uparrow 45,95%) vs M*	11,52 \pm 0,65 (\uparrow 72,97%) vs M***



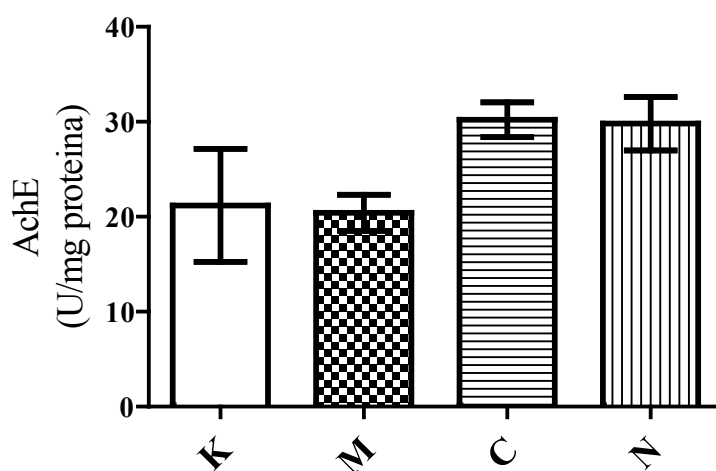
Grafikon 49. Aktivnost acetilholinesteraze (AchE) u tkivu duodenuma pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), uz istovremenu primenu L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) tokom tronedeljne aplikacije metionina; šest životinja po grupi (n=6)

Rezultati analiza tkiva ileuma pokazali su da prisutno povećanje aktivnosti AchE u grupi M u odnosu na kontrolnu vrednost (za 10,84%) nije bilo statistički značajno. Primena L-cisteina dovela je do povećanja praćenog parametra za 36,22% u odnosu na grupu M koje nije statistički značajno. Aktivnost AchE u grupi N bila je povišena za 31,82% u odnosu na M grupu pri čemu dokazana razlika nije statistički značajna (Tabela 17., Grafikon 50.).



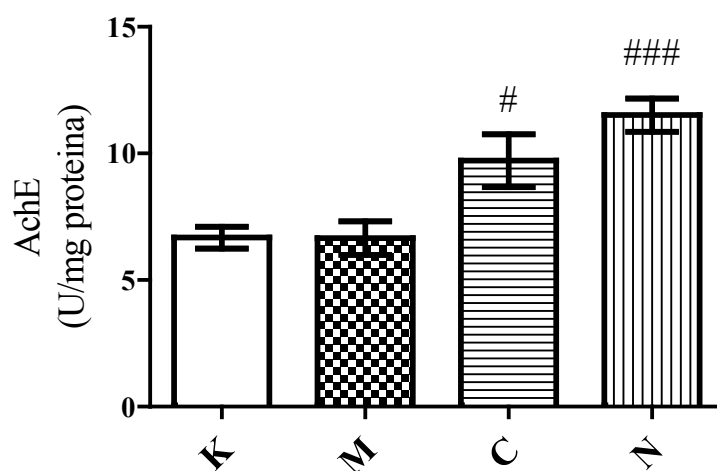
Grafikon 50. Aktivnost acetilholinesteraze (AchE) u tkivu ileuma pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), uz istovremenu primenu L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) tokom tronedeljne aplikacije metionina; šest životinja po grupi (n=6)

Rezultati analiza tkiva kolona pokazuju da prisutno smanjenje aktivnosti AchE u grupi M u odnosu na kontrolnu vrednost (za 3,72%) nije bilo statistički značajno. Primena L-cisteina dovela je do povećanja praćenog parametra za 48,06% u odnosu na grupu M koje nije statistički značajno. Aktivnost AchE u grupi N bila je povišena za 46,05% u odnosu na M grupu pri čemu dokazana razlika nije statistički značajna (Tabela 17., Grafikon 51.).



Grafikon 51. Aktivnost acetilholinesteraze (AchE) u tkivu kolona pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), uz istovremenu primenu L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) tokom tronedeljne aplikacije metionina; šest životinja po grupi (n=6)

Rezultati analiza tkiva jetre pokazuju da prisutno smanjenje aktivnosti AchE u grupi M u odnosu na kontrolnu vrednost (za 0,30%) nije bilo statistički značajno. Primena L-cisteina dovela je do statistički značajnog ($p < 0,05$) povećanja praćenog parametra za 45,95% u odnosu na grupu M. Aktivnost AchE u grupi N bila je povišena za 72,97% u odnosu na M grupu pri čemu je dokazana razlika bila statistički visoko značajna ($p < 0,001$). (Tabela 17., Grafikon 52.).



Grafikon 52. Aktivnost acetilholinesteraze (AchE) u tkivu jetre pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), uz istovremenu primenu L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) tokom tronedeljne aplikacije metionina; šest životinja po grupi ($n=6$); # $p < 0,05$ statistički značajna razlika u poređenju sa M grupom; ### $p < 0,001$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa M grupom

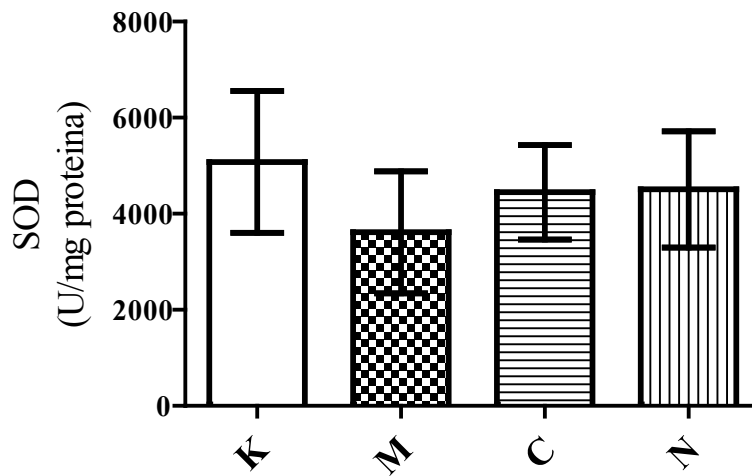
4.4.4.6. Rezultati analiza enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Analiza enzimske aktivnosti SOD vršena je u uzorcima tkiva duodenuma, ileuma, kolona i jetre nakon tronedelnog opterećenja metioninom. Praćena je aktivnost enzima u četiri grupe: kontrolnoj (K), u grupi životinja opterećenih metioninom tokom tri nedelje (M), u grupi kojoj je tokom 3 nedelje uz metionin aplikovan i L-cistein (C), kao i u grupi kojoj je tokom 3 nedelje uz metionin aplikovan N-acetil-L-cistein (N).

Rezultati analiza tkiva duodenuma pokazuju da prisutno smanjenje aktivnosti SOD u grupi M u odnosu na kontrolnu vrednost (za 28,82%) nije bilo statistički značajno. Primena L-cisteina dovela je do povećanja praćenog parametra za 23,01% u odnosu na grupu M koje nije bilo statistički značajno. Aktivnost SOD u grupi N bila je povišena za 24,67% u odnosu na M grupu pri čemu dokazana razlika nije statistički značajna (Tabela 18.; Grafikon 53.).

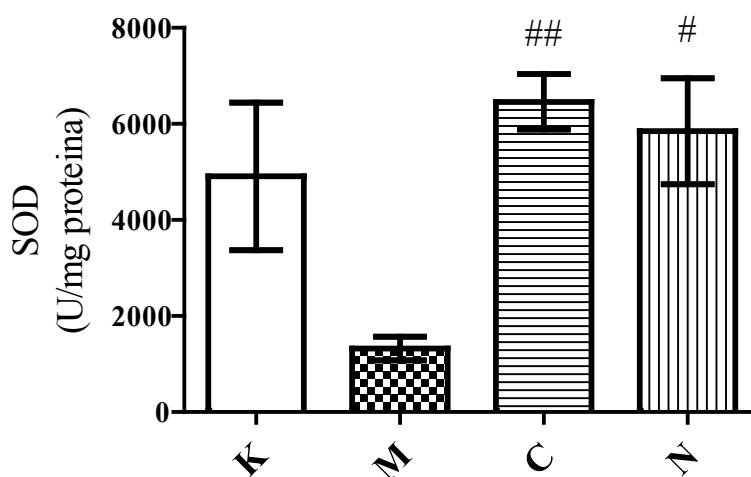
Tabela 18. Promena aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u duodenumu, ileumu, kolonu i jetri pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), tokom primene L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) u uslovima opterećenja metioninom; vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška i kao procenat promene datog parametra za po 6 životinja u grupi (n=6); *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001

	Kontrola (K)	Metionin (M)	Metionin + L-Cistein (C)	Metionin + N-acetil-L-cistein (N)
Duodenum	5079 \pm 1477	3615 \pm 1270 (\downarrow 28,82%) vs K	4447 \pm 985,1 (\uparrow 23,01%) vs M	4507 \pm 1208 (\uparrow 24,67%) vs M
Ileum	4907 \pm 1535	1323 \pm 248,0 (\downarrow 73,04%) vs K	6460 \pm 579,5 (\uparrow 388,28%) vs M**	5848 \pm 1102 (\uparrow 342,03%) vs M*
Kolon	3277 \pm 1048	2038 \pm 287,5 (\downarrow 37,81%) vs K	2848 \pm 370,9 (\uparrow 39,74%) vs M	2739 \pm 456,9 (\uparrow 34,40%) vs M
Jetra	1632 \pm 52,63	1579 \pm 65,35 (\downarrow 3,25%) vs K	2013 \pm 73,58 (\uparrow 27,49%) vs M***	2261 \pm 45,11 (\uparrow 43,19%) vs M ***



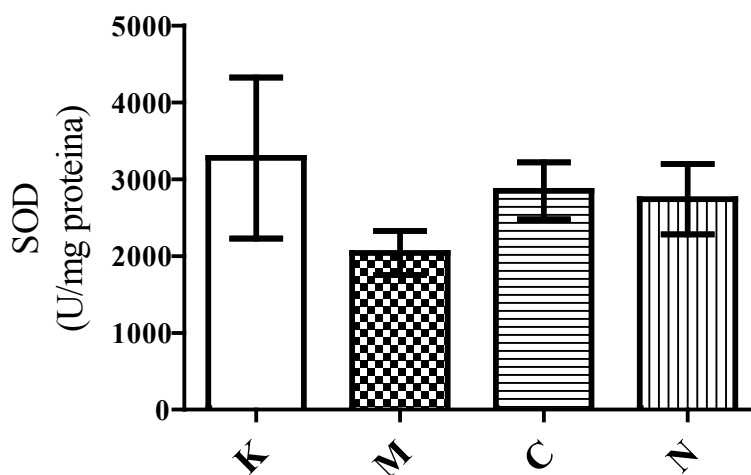
Grafikon 53. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u tkivu duodenuma pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), uz istovremenu primenu L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) tokom tronedeljne aplikacije metionina; po 6 životinja u grupi (n=6)

Rezultati analiza tkiva ileuma pokazuju da prisutno smanjenje aktivnosti SOD u grupi M u odnosu na kontrolnu vrednost (za 73,04%) nije bilo statistički značajno. Primena L-cisteina dovela je do statistički visoko značajnog ($p < 0,01$) povećanja praćenog parametra za 388,28% u odnosu na grupu M. Aktivnost SOD u grupi N bila je povišena za 342,03% u odnosu na M grupu pri čemu je dokazana razlika bila statistički značajna ($p < 0,05$). (Tabela 18.; Grafikon 54.).



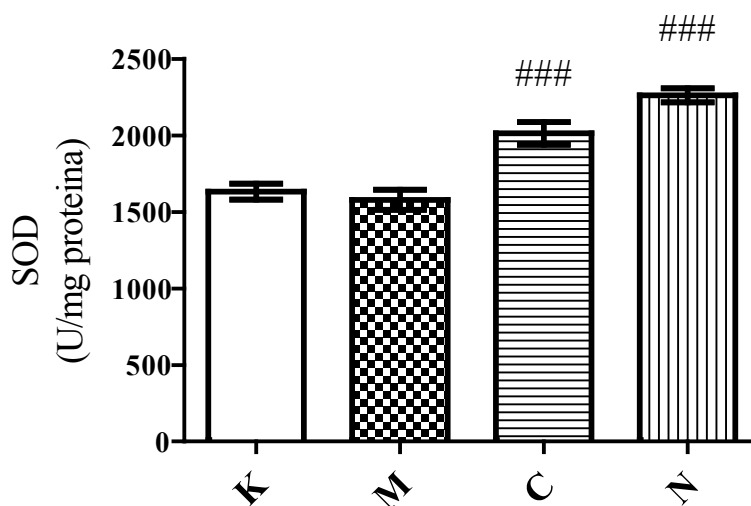
Grafikon 54. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u tkivu ileuma pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), uz istovremenu primenu L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) tokom tronedeljne aplikacije metionina; po šest životinja u grupi (n=6); # $p < 0,05$ statistički značajna razlika u poređenju sa M grupom; ## $p < 0,01$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa M grupom

Rezultati analiza tkiva kolona pokazuju da prisutno smanjenje aktivnosti SOD u grupi M u odnosu na kontrolnu vrednost (za 37,81%) nije bilo statistički značajno. Primena L-cisteina dovela je do povećanja praćenog parametra za 39,74% u odnosu na grupu M, koje nije statistički značajno. Aktivnost SOD u grupi N bila je povišena za 34,40% u odnosu na M grupu pri čemu dokazana razlika nije bila statistički značajna. (Tabela 18.; Grafikon 55.).



Grafikon 55. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u tkivu kolona pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), uz istovremenu primenu L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) tokom tronedeljne aplikacije metionina; po šest životinja u grupi (n=6)

Rezultati analiza tkiva jetre pokazuju da prisutno smanjenje aktivnosti SOD u grupi M u odnosu na kontrolnu vrednost (za 3,25%) nije bilo statistički značajno. Primena L-cisteina dovela je do statistički visoko značajnog ($p < 0,001$) povećanja praćenog parametra za 27,49% u odnosu na grupu M. Aktivnost SOD u grupi N bila je povišena za 43,19% u odnosu na M grupu pri čemu je dokazana razlika bila statistički visoko značajna ($p < 0,001$). (Tabela 18.; Grafikon 56.).



Grafikon 56. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u tkivu jetre pacova u kontrolnim uslovima (K), nakon 3 nedelje i.p. aplikacije metionina (M), uz istovremenu primenu L-cisteina (C) ili N-acetil-L-cisteina (N) tokom tronedeljne aplikacije metionina; po šest životinja u grupi (n=6); ### $p < 0,01$ statistički visoko značajna razlika u poređenju sa M grupom

5. DISKUSIJA

Deo ovog istraživanja obuhvatio je ispitivanje efekata akutne administracije D,L-homocistein tiolaktona na parametre oksidativnog statusa u *in vivo* i *in vitro* uslovima. Pratili smo promene parametara oksidativnog stresa u tkivu duodenuma, ileuma, kolona i jetre pacova. Rezultati *in vitro* studije su pokazali da tročasovna inkubacija ovih tkiva u D,L-homocistein tiolaktonu smanjuje aktivnost katalaze (CAT) u poređenju sa kontrolnom grupom. Postoje literarni podaci koji ukazuju na značajno smanjenje aktivnosti CAT u jetri i crevu pacova, nakon inkubacije u homocisteinu (Hcy) (Huang i sar., 2001; Woo i sar., 2006). Druge studije pokazuju negativnu korelaciju između nivoa Hcy u plazmi i aktivnosti CAT u jetri pacova, ukazujući na značajnu redukciju antioksidativnog kapaciteta jetre (Chanson i sar., 2007). Naše istraživanje pokazalo je značajnu inhibiciju aktivnosti CAT u duodenumu, ileumu, kolonu i jetri pacova tokom eksperimentalno izazvane hiperhomocisteinemije *in vivo*, pri čemu je statistički značajno sniženje bilo prisutno samo u duodenumu i jetri. U skladu sa našim rezultatima su i istraživanja drugih autora koja ukazuju na značajno smanjenje antioksidativne zaštite jetre, sa negativnom korelacijom između plazma nivoa Hcy i aktivnosti CAT (Starkebaum i Harlan, 1986; Gonzalez-Flecha i sar., 1991). Ovi rezultati pokazuju da homocistein može delovati direktno na katalazu i inhibirati razgradnju H₂O₂. Činjenica da Hcy može da potpomogne stvaranje H₂O₂, uz učešće bakra, može biti jedno od potencijalnih mehanizama njegovog dejstva. Snižena aktivnost CAT prisutna je u kolorektalnom karcinomu (Chang i sar., 2012), adenokarcinomu želuca i *Helicobacter pylori* gastritisu (Monar i sar., 2009). Prmećena je i snižena aktivnost CAT u mononuklearima pacijenata sa Kronovom bolešću (Ibrahim i sar., 2010).

Naši rezultati pokazuju da je izloženost visokim koncentracijama D,L-homocistein tiolaktona značajno povećala vrednosti nivoa TBARS u duodenumu, ileumu, kolonu i jetri pacova u *in vitro* uslovima (Stojanović i sar., 2016), dok *in vivo* studija pokazuje značajno povećanje indeksa lipidne peroksidacije (TBARS) u svim organima, izuzev u duodenumu, gde promene nisu bile statistički značajne. Kolling i sar., pokazali su da Hcy dovodi do povećanja indeksa lipidne peroksidacije i nivoa TBARS u srcu pacova (Kolling i sar., 2011). Indeks lipidne peroksidacije ispitivan je i u jetri pacova, i pokazalo se da je povezan

sa Hcy izazvanim oštećenjem ćelija, uključujući apoptozu i inflamaciju u bolestima jetre (Huang i sar., 2001; Woo i sar., 2006). Postoji jaka povezanost između lipidne peroksidacije ćelija jetre i nivoa Hcy (Kukolj, 2014). Slične rezultate objavili su Matte i sar. (Matté i sar., 2009), i pokazali su pojavu oksidativnog stresa, smanjenu antioksidativnu zaštitu (enzimsku i neenzimsku) kao i povišenu lipidnu peroksidaciju uz inflamatornu infiltraciju u jetri homocisteinom tretiranih pacova, što govori u prilog rezultatima naših istraživanja.

Totalni antioksidativni status (TAS) je koristan pokazatelj antioksidativnog statusa jer uzima u obzir ne samo kvantitet već i reaktivnost antioksidanasa. Naši rezultati *in vitro* pokazali su značajno povećanje vrednosti TAS u homogenatima tkiva duodenuma, ileuma, kolona i jetre, ukazujući time na akutno povećanje neenzimskih antioksidanasa u jetri i crevu pacova (Stojanović i sar., 2016). Povišene vrednosti TAS nastaju kao rezultat adaptivnog odgovora na stvaranje slobodnih radikala, ukazujući na nesposobnost sistema antioksidativne zaštite da odbrani tkiva od štetnog efekta Hcy. Rezultati *in vivo* studije pokazali su smanjenje TAS-a u svim ispitivanim organima, što govori u prilog pretpostavci da Hcy izaziva oksidativna oštećenja tkiva, i smanjuje njihov antioksidativni kapacitet. Naši rezultati ukazuju da izloženost homocisteinu direktno inhibira aktivnost katalaze, aktivira process lipidne peroksidacije i povećava totalni antioksidativni status u izolovanom crevu i jetri pacova. Pokazano povećanje indeksa lipidne peroksidacije i TAS sugerišu prisustvo oksidativnog stresa u gastrointestinalnom sistemu. Povezanost između oksidativnog stresa i visokih nivoa homocisteina demonstrirana je i na vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama (Yan i sar., 2006). Homocistein inhibira endotel-zavisnu NO-posredovanu dilataciju u arteriolama retine svinje, produkcijom superoksida (Omae i sar., 2013). Iako je naše istraživanje uključilo samo akutne efekte Hcy na parametre oksidativnog stresa pacova, izazov je i razmatranje prooksidativnih dejstva Hcy na gastrointestinalnom sistemu humane populacije.

Pokazano je da hronični oksidativni stres učestvuje u patogenezi nekih inflamatornih bolesti digestivnog trakta. Iako je u digestivnom traktu dokazano stvaranje reaktivnih kiseoničnih radikala, njihova uloga u patofiziologiji i patogenezi bolesti ovog

sistema organa, još nije dovoljno istražena. Povišeni nivoi Hcy su povezani sa inflamacijom i remodelovanjem intestinalnog vaskularnog odeljka, a dokazan je i udeo Hcy na pogoršanje toka inflamatorne bolesti creva (IBC) uključujući Kronovu bolest (KB) i ulcerozni colitis (UK). Zanimljivo je da kolon predstavlja glavno mesto regulacije nivoa Hcy u plazmi. Brojni podaci iz literature ukazuju na povezanost između oksidativnog stresa i nivoa homocisteina u bolestima digestivnog trakta (Morgenstern, 2003). Rana identifikacija hiperhomocisteinemije i markera oksidativnog stresa mogu smanjiti progresiju nekih gastrointestinalnih oboljenja i udruženih komplikacija kao u slučaju KB, UK i sumnje na trombotične događaje (Morgenstern, 2003).

Niska aktivnost katalaze u eritrocitima udružena je sa visokim serumskim nivoom Hcy kod pacijenata sa akutnim infarktom miokarda. Hiperhomocisteinemija može pogoršati miokardnu disfunkciju ekscisivnom produkcijom reaktivnih kiseoničnih radikala, što je dokazano povišenim indeksom lipidne peroksidacije u ovom stanju (Góth i Vitai, 2003; Ji i Kaplowitz, 2004; Noichri i sar., 2013). Hronična izloženost visokim nivoima homocisteina, kod pacijenata sa dijabetes melitusom, kardiovaskularnim poremećajima, gastrointestinalnim oboljenjima i metaboličkim sindromom (gojaznih) pokazuje snižene vrednosti TAS (Evelson, 2001). Studija koju su sproveli Nanetti i saradnici takođe dokazuje značajnu povezanost između markera oksidativnog stresa i nivoa homocisteina (Nanetti i sar., 2013). Njihovo istraživanje pretpostavilo je da bi kontrola nivoa Hcy mogla pozitivno da deluje na neke patološke promene tokom evolucije cerebralnog ishemijskog ataka. Ispitivanja nervnog sistema ukazala su da homocistein inhibira razgradnju H_2O_2 katalazom u kulturi humanog neuroblastoma (Milton i sar., 2008). Oksidativni stres je uključen i u patogenezu primarnog glaukom otvorenog ugla u čemu sudeluje Hcy (Atti i Saseekala., 2012). Publikovani su rezultati koji dokazuju da povišeni nivoi Hcy mogu dovesti do oksidativnog stresa i samnjenja gustine kostiju u postmenopauzalnoj osteoporozi (Zhang i sar., 2015).

Smatra se da je oksidativni stres u osnovi oštećenja koja hiperhomocisteinemija ostavruje na različitim sistemima organa, uključujući i kardiovaskularni, nervni i urinarni sistem. Smatra se da sa starenjem dolazi do porasta nivoa homocisteina, a da se sa druge

strane, smanjuje stepen antioksidativne zaštite (Albu i sar., 2009). Homocistein se može podvrći intracelularnoj ili ekstracelularnoj autooksidaciji u prisustvu molekularnog kiseonika, i na taj način učestvovati u stvaranju slobodnih radikala. Slobodni radikali, zatim, dovode direktno do oštećenja, reagovanjem sa ćelijskim konstituentima i malim molekulima kao što je NO. Pokazano je da izloženost kulture endotelnih ćelija homocisteinu smanjuje raspoloživost NO i dovodi do citotoksičnosti posredstvom hidrogen peroksida (Carmel i Jacobsen, 2001). Alternativa teoriji oksidativnog stresa, je hipoteza o target molekulima. Homocistein može reagovati sa različitim target molekulima, kako ekstracelularnim, tako i intracelularnim. Tako da, homocisteinilacija može dovesti do poremećaja funkcija brojnih enzima, receptora, faktora rasta i strukturnih proteina (Krumdieck i Prince, 2000). Krajnji efekti ovih reakcija zavise od koncentracije i vremena izloženosti homocisteinu. Pokazano je da nastaju znatno veća biohemijska oštećenja, sa porastom koncentracije i perioda izloženosti homocisteinu (Mattson i sar, 1999). U tom kontekstu, studija sprovedena od strane Ling i sar., pokazala je porast aktivnosti SOD nakon tretmana glatkih mišića aorte pacova D,L-homocisteinom (0 - 500 $\mu\text{mol/L}$) u dozno zavisnom maniru. Suprotno, aktivnost GPx bila je snižena nakon administracije homocisteina, ali nije bilo efekata na aktivnost katalaze (Ling i Hajjar, 2000). Druga istraživanja su pokazala da Hcy direktno inhibiše aktivnost razgradnje H_2O_2 katalazom, konverzijom enzima u neaktivnu formu (Krumdieck i Prince, 2000). U kombinaciji i sa inhibicijom aktivnosti GPx, homocistein se smatra jednim od glavnih faktora oštećenja u neurodegenerativnim bolestima, koja se u najvećem broju slučajeva povezuje sa oksidativnim stresom (Nishio i Watanbe, 1997). Naše istraživanje koje je obuhvatilo akutno izlaganje D,L-homocisteinu u *in vivo* uslovima pokazuje statistički značajno sniženje aktivnosti SOD u svim ispitivanim organima (duodenum, ileum, kolon, jetra). Aktivnost GPx u istim uslovima bila je značajno snižena u svim organima izuzev u kolonu, gde nije bilo statistički značajnih promena. U skladu sa našim rezultatim su i nalazi kije su dobili Catana i sar., 2011. U njihovim eksperimentima kratkotrajna izloženost homocisteinu (2 sata) dovela je do smanjene aktivnosti eritrocitne SOD. Smanjenje je bilo prisutno i u grupi mlađih i starijih pacova. Ovi nalazi nas nadovezuju na temu plazma nivoa homocisteina u odnosu na starost. Nije na odmet napomenuti da u humanojoj populaciji, plazma nivo

homocisteina raste sa godinama, i da je ovaj fenomen delom objašnjen postepenim smanjenjem funkcije bubrega. Posmatrano od detinjstva do starijeg doba nivo homocisteina se skoro udvostručava (Refsum i sar., 2004). Posle 60. godine porast nivoa homocisteina u plazmi je znatno brži, sa dobitkom od 1 $\mu\text{mol/L}$ za svakih 10 godina života.

Patogeneza brojnih GI oboljenja uključujući peptički ulkus, gastrointestinalne karcinome, i inflamatornu bolest creva delom je rezultat oksidativnog stresa (Bhattacharyya i sar., 2014; Hijová i sar., 2014). Rasvetljavanje signalnih puteva koji leže u osnovi oštećenja izazvanih slobodnim radikalima u perspektivi, su vrlo značajni za bolje razumevanje patogeneze ovih bolesti i unapređenje postojećih terapijskih protokola.

Sledeći cilj našeg istraživanja bio je da ispita efekte D,L-homocistein tiolaktona na neadrenergičku neholinergičku (NANC) neurotransmisiju u izolovanom crevu pacova. Sve je veći broj epidemioloških i eksperimentalnih studija po kojima je i umereno povišen nivo Hcy u plazmi ($> 16 \mu\text{mol/L}$) nezavistan faktor rizika za okluzivne bolesti, aterosklerozu, dijabetes melitus, hipertenziju, kao i bubrežnu insuficijenciju (Stampfer i Malinow, 1995). Bez obzira na sve, podaci kojima raspolažemo, ukazuju na to da efekti Hcy na gastrointestinalni trakt nisu dovoljno proučeni. U našem radu ispitivali smo efekte D,L-homocistein tiolaktona, za koga se zna da ima prokinetička dejstva, na duodenum, ileum i kolon pacova. Naši rezultati pokazali su da D,L-homocistein tiolakton dovodi do povećanja tonusa, amplitude i frekvencije spontanij pokreta svih ispitivanih delova creva. Ovi rezultati su u skladu sa studijom Parka i sar., koji ukazuju na to da sumporovite aminokiseline, kao što je D,L-homocistein tiolakton potenciraju depolarizaciju ćelija proksimalnog kolona svinje. Ovi efekti uključuju povećanje amplitude i frekvencije spontanij kontrakcija izolovanih segmenata kolona svinje (Park i sar., 2005). Choe i sar., ispitivali su efekte metionina na kontraktilnu aktivnost humanog kolona *in vitro* (Choe i sar., 2012). Kao što je već pomenuto, metionin je sumporovita aminokiselina koja se transformiše u homocistein tokom biometabolizma. Njihovi rezultati pokazali su da metionin povećava amplitudu kontrakcija izolovanih segmenata kolona.

Široko je prihvaćeno da stimulacija određene grupe neurona u zidu creva dovodi do relaksacije (Allescher i sar., 1993; Mourelle i sar., 1993; Szilvassy i sar., 1996). Ovi nervi su poznati kao neadrenergički neholinergički, ili NANC. Ova grupa neurona ima veliku važnost jer posreduju u većini inhibitornih odgovora u gastrointestinalnom (GI) traktu, i regulišu mnoge važne fiziološke reflekse, kao npr. relaksaciju donjeg ezofagealnog sfinktera nakon povraćanja, receptivnu relaksaciju proksimalnog želuca tokom obroka, i smanjenje inhibicije kao odgovor na distenziju (Takahashi i sar., 2003). Brojne studije identifikuju ulogu azot monoksida u NANC neuromuskularnoj transmisiji u mnogim tkivima, kao u ileokoličnom spoju i duodenumu psa, fundusu pacova i donjem ezofagealnom sfinkteru oposuma (Kasakov i sar., 1995; Bult i sar., 1990; Toda i sar., 1991; Boeckxstaens i sar., 1991; Tottrup i sar., 1991). Fu i sar. su pokazali da homocistein smanjuje stvaranje NO i njegove efekte. Takođe su pokazali da su značajno smanjeni efekti donora NO kod pacijenata sa hiperhomocisteinemijom (Fu i sar., 2002). S obzirom da je deo zida digestivnog trakta sačinjen od glatke muskulature, smatrali smo da je od interesa kako povišen nivo homocisteina utiče na kontraktilnost digestivnog trakta i neurotransmisiju posredovanu azot monoksidom.

Najpotentniji inhibitor sinteze NO je L-N-nitro-L-arginin metal estar - L-NAME (Rees i sar., 1990). L-N-nitro-L-arginin metil estar je korišćen od strane velikog broja istraživača sa ciljem da pokaže ulogu endogenog azot monoksida na brojna fiziološka i patofiziološka stanja. U našim eksperimentima, L-NAME pokazao je povećanje tonusa, amplitude i frekvencije kontrakcija izolovanih duodenalnih segmenata (Stojanović i sar., 2013). Ovi efekti bili su značajno redukovani pretretmanom sa L-argininom. U prisustvu L-NAME, D,L-homocistein tiolakton (10 μ mol/L) doveo je do značajnog porasta tonusa, amplitude i frekvencije kontrakcija. Ovi rezultati sugerišu da su mehanizmi dejstva Hcy na kontraktilnost gastrointestinalnog trakta bazirani na modulaciji nitrergičke neurotransmisije. Studija Karasu i sar., suprotno našim rezultatima, ukazuje da eksperimentalna hiperhomocisteinemija, indukovana metioninskom dijetom tokom 12 nedelja, ne uzrokuje značajne promene NANH-posredovanih odgovora duodenuma pacova (Karasu i sar., 2008). Naši rezultati su u skladu sa studijom sprovedenom od strane

Glasgow i sar., tokom koje su ispitivali efekte L-NAME i L-arginina na pokrete antruma i duodenuma pacova (Glasgow i sar., 1998).

Istraživanja sprovedena na animalnim modelima ukazuju na to da je NO posredovana transmisija uključena u sledeće procese: relaksaciju donjeg ezofagealnog sfinktera (DES), peristaltiku u donjem delu jednjaka, kao i vremensko usklađivanje između ovih procesa. Histološka ispitivanja ukazuju da smanjena inhibitorna neurotransmisija u DES-u ili na intersticijalnim Kahalovim ćelijama može biti patofiziološki supstrat ezofagealne ahalazije (Lefebvre i sar., 1991).

U eksperimentima sprovedenim na izolovanim organima životinja i čoveka, posebno na fundusu želuca i piloričnom sfinkteru, došlo se do zaključka da NO dovodi do inhibitornog sinaptičkog potencijala (Lefebvre i sar., 1995). Odgovor izolovanog piloričnog sfinktera majmuna na nitrergičku stimulaciju je relaksacija. Nakon primene inhibitora NOS, efekat relaksacije se poništava, dok primena L-arginina ponovo uspostavlja stanje relaksacije sfinktera. Primarno mesto dejstva NO u fundusu želuca je najverovatnije presinaptički nivo holinergičkih eferentnih nerava. Eksperimenti sprovedeni na zdravim dobrovoljcima ukazuju da je NO uključen u održavanje bazalnog tonusa fundusa želuca, kao i u obrokom izazvanu relaksaciju fundusa (Lefebvre i sar., 1998).

Azot monoksid ima vodeću ulogu u NANH izazvanoj relaksaciji u duodenumu, jejunumu i ileumu. (Li i Rand, 1989). Povezanost NO i regulacije motiliteta ispitivana je na animalnim modelima, gde je uočeno da inhibicija sinteze NO dovodi do razvoja brzopropagirajućih peristaltičkih talasa, kao i skraćenje postprandijalnog perioda (Kuiken i sar., 2002).

Utvrđivanje uloge NO u debelom crevu vršeno je eksperimentima na zdravim ispitanicima, kao i onima sa dijagnozom iritabilnog kolona, putem stimulacije NO - cGMP puta. Za stimulaciju je korišćen sildenafil. Tom prilikom zapaženo je smanjenje tonusa rektuma, što je praćeno povećanjem zapremine rektuma, zatim supresija kontrakcija i relaksacija unutrašnjeg analnog sfinktera. Utvrđen je nedostatak nitrergičke stimulacije u kolonu kod Hiršprungove bolesti, kao i u unutrašnjem analnom sfinkteru kod ahalazije ovog sfinktera (Kuiken i sar., 2002).

Na osnovu navedenog, možemo pretpostaviti da supstanca koja bi imitirala dejstvo D,L-homocistein tiolaktona može imati prokinetičko dejstvo u humanom gastrointestinalnom traktu. Poremećaji motiliteta koji bi primenom ovakve supstance bili poboljšani su postoperativni ileus, akutna pseudoopstrukcija kolona, hronična intestinalna pseudoopstrukcija, idiopatska opstipacija i Hiršprungova bolest.

Mehanizmi kojim homocistein dovodi do povećanja kontraktilnosti glatke muskulature digestivnog trakta nisu dovoljno poznati. Postoje podaci koji ukazuju na to da je pretpostavljeni mehanizam blokada kalijumovih kanala na istezanje (SDK) i posledična depolarizacija. Rezultati koji potkrepljuju ove pretpostavke dobijeni su ispitivanjima na kolonu svinje (Park i sar., 2005).

Kalijumovi kanali imaju važnu ulogu u regulaciji motiliteta gastrointestinalnog trakta i posreduju u enteričkoj inhibitornoj neurotransmisiji (Sandhiya i sar., 2009; Koh i Sanders, 2001). U radu Parka i sar. je pokazano da aminokiseline sa sumporom (L-metionin, L-cistein i D,L-homocistein) mogu da blokiraju kalijumove kanale i tako povećaju frekvenciju i amplitudu spontanijih mišićnih pokreta gastrointestinalnog trakta (Choe i sar., 2012; Park i sar., 2005; Romagnoulo i sar., 2001).

Rezultati eksperimenata u ovom radu su takođe pokazali statistički značajan porast amplitude, frekvencije i tonusa spontanijih kontrakcija na izolovanom duodenumu pacova pod dejstvom D,L-homocistein tiolaktona. Navedeni efekti se objašnjavaju sposobnošću homocisteina, kao aminokiseline sa sumporom, da blokira kalijumske kanale, dovodeći do depolarizacije membrane miocita duodenuma i porast spontanijih pokreta. Blokator kalijumovih kanala, TEA, povećava amplitudu spontanijih kontrakcija glatkih mišića gastrointestinalnog trakta (Fagundes i sar., 2007; Santoso i sar., 2011). Eksperimenti ovog rada su takođe pokazali značajan porast amplitude i tonusa spontanijih kontrakcija longitudinalne muskulature izolovanih segmenata duodenuma. I za razliku od rezultata Koh i Sandersa, tetraetilamonijum hlorid se pokazao kao blokator kalijumovih kanala, što je rezultovalo povećanjem ispitivanih parametara (amplitude, frekvencije, tonusa). Nakon dodatka D,L-homocistein tiolaktona tetraetilamonijum hloridu, nije došlo do statistički značajne promene amplitude, frekvencije i tonusa spontanijih kontrakcija longitudinalne muskulature izolovanih segmenata duodenuma. Do promene efekta na dejstvo D,L-HCT

nije došlo zbog prethodne blokade kalijumovih kanala tetraetilamonijum hloridom, čime je onemogućeno dejstvo Hcy. I u radu drugih autora (Choe i sar., 2012), primećeno je da metionin, kao aminokiselina sa sumporom, blokira SDK kanale u miocitima kolona. Time je pokazano moguće prokinetičko dejstvo aminokiselina sa sumporom. Može se reći da su pod uticajem tetraetilamonijum hlorida (TEA), kao blokatora kalijumovih kanala, onemogućeni efekti D,L-homocistein tiolaktona u smislu povećanja amplitude, frekvencije i tonusa spontanih kontrakcija longitudinalne muskulature izolovanih segmenata duodenuma, čime se pokazuje da D,L-homocistein tiolakton svoje dejstvo ostvaruje preko kalijumovih kanala. Prethodnom blokadom kalijumovih kanala, onemogućeno je njegovo dejstvo.

Oksidativni stres se definiše kao poremećaj odnosa između prooksidanasa i antioksidativne zaštite u tkivu (Gregus i Klaasen, 2001). Smatra se da je oksidativni stres jedan od faktora rizika u oštećenju tkiva izazvanog hiperhomocisteinemijom (Cheng i Kaplowitz, 2004). Ishrana bogata metioninom često dovodi do povišenog nivoa homocisteina u serumu i smatra se da dovodi do patoloških i metaboličkih poremećaja u tkivima, posebno jetri. Opisan je porast lipidne peroksidacije u jetri eksperimentalnih životinja koje su hranjene hipermetioninskom dijetom (Toborek i sar., 1996; Woo i sar., 2006; Robin i sar., 2004; Balkan i sar., 2004). Ali rezultati u literaturi se razlikuju u zavisnosti od primenjene doze metionina i vremena ishrane hipermetioninskom dijetom. U studiji Yalcunakaya i sar., 2007, primenjena je dijeta kod pacova bogata metioninom (1g/kg tm) u toku 6 meseci, nakon čega je došlo do značajnog povećanja nivoa homocisteina. Ovi rezultati nisu u skladu sa rezultatima naših istraživanja, koja pokazuju da nakon tri nedelje i.p. aplikacije metionina nije došlo do statistički značajnog povećanja nivoa homocisteina u serumu. Ovo se može objasniti načinom primene metionina, kao i dužinom tretmana. Može se uzeti u obzir da se intraperitonealnom aplikacijom metionina zaobilazi metabolizam prvog prolaska kroz jetru, što je od velikog značaja za konverziju metionina u homocistein. U studiji Yalcunakaya i sar. nivo MDA je značajno bio povišen u jetri, sadržaj redukovano glutaciona (GSH) i aktivnost GPx značajno smanjeni, dok nije pokazana značajna promena aktivnosti SOD, za razliku od rezultata ove disertacije, po kojima nema značajnih promena ovih pokazatelja oksidativnog stresa u jetri pacova metioninske grupe, u poređenju sa

kontrolom. Prethodno citirana studija pokazala je da hipermetioninska dijeta dovodi do histopatoloških promena u jetri: povećana limfocitna i neutrofilna infiltracija, mikrovezikularna steatoza i degeneracija hepatocita, što je u skladu sa rezultatima ove disertacije, po kojima je opisana mononuklearna infiltracija jetrinog parenhima, kao i edem veziva, sa zonama nekroze hepatocita u grupi životinja tretiranih metioninom. Iako je nekoliko ispitivača saopštilo da hipermetioninska dijeta izaziva prooksidativno stanje jetre kod eksperimentalnih životinja, samo dve studije u literaturi su saopštile da je došlo do steatoze, inflamatorne reakcije i oštećenja hepatocita u uslovima hiperhomocisteinemije (Toborek i sar., 1996; Woo i sar., 2006;).

Drugi cilj nase studije je da pokaže efekte L-cisteina (grupa C) i N-acetil-L-cisteina (grupa N) na promene u različitim organima (duodenum, ileum, kolon, jetra) izazvane subhroničnim opterećenjem metioninom. Podaci iz literature pokazuju da taurin, takođe sumporovita aminokiselina ublažava hiperhomocisteinijom izazvanu produkciju slobodnih radikala, kao i da inhibira aktivnost SOD i CAT u miokardu pacova hranjenih hipermetioninskom dijetom. Naši rezultati pokazali su da i.p. opterećenje metioninom tokom tri nedelje dovodi do promene aktivnosti CAT i SOD. Aktivnost CAT u grupama C i N bila je povišena u poređenju sa grupom životinja tretiranih samo metioninom u svim ispitivanim organima. Statistički značajne promene zapažene su samo u duodenumu i jetri. S obzirom na to da su CAT i SOD enzimi antioksidativne zaštite možemo pretpostaviti da ovi nalazi proističu iz antioksidativnih sposobnosti L-cisteina i N-acetil-L-cisteina. Postoji nekoliko mehanizama koji bi mogli da objasne antioksidativni kapacitet sumporovitih aminokiselina. Taurin ispoljava celularno protektivno dejstvo tako što zarobljava slobodne radikale, tako što dovodi do ushodne regulacije antioksidativne zaštite, ili tako što svojom sulfonskom grupom vezuje slobodne metale kao npr. Fe^{2+} (Schaffer i sar., 2003; Redmond i sar., 1996). Pošto je cistein prekursor taurina i GSH, suplementacija taurinom može da dovede do povećanja nivoa GSH, preusmeravanjem cisteina ka GSH sintezi. Tako povećanje GSH nakon tretmana cisteinom igra dodatnu ulogu u smanjenju oksidativnog streasa. Cistein i opterećenje metioninom smanjuju broj ćelija koje su zahvaćene apoptozom u jetri pacova. Iz tih razloga možemo smatrati da tretiranje taurinom smanjuje efekte hiperhomocisteinom izazvane apoptoze tako što smanjuje apoptozu i inhibira

oksidativni i nitrozativni stres u jetri. Pored toga tretman taurinom smanjuje serumske vrednosti ALT i AST i smanjuje histopatološke promene jetre izazvane hipermetioninskom dijetom.

Naša studija je prva u literaturi koja se bavila ispitivanjem efekata L-cisteina i N-acetil-L-cisteina na promene u duodenumu, ileumu, kolonu i jetri izazvanih tokom i.p. opterećenja metioninom tokom 3 nedelje. Rezultati određivanja sadržaja redukovano glutaciona pokazali su da nema značajne razlike među grupama u većini ispitivanih organa. Međutim, u tkivu jetre je primećen značajan porast GSH u grupi N u poređenju sa grupom životinja koje su bile tretirane samo metioninom. Ovakav nalaz potkrepljuje prethodno navedene činjenice o protektivnom uticaju N-acetil-L-cisteina, kroz njegova antioksidativna svojstva. Naše pretpostavke o potencijalnom antioksidativnom svojstvu L-cisteina, potvrđuju rezultati aktivnosti GPx. U svim ispitivanim organima došlo je do porasta aktivnosti GPx u grupi C u poređenju sa grupom M (tretirani samo metioninom). Jedino je u ileumu zapažena statistički značajna promena. Kawakami i sar., pokazali su hipohomocisteinemijsko dejstvo cisteina, kod pacova hranjenih niskoproteinskom dijetom (Kawakami i sar., 2008).

Postoji nekoliko objašnjenja hipohomocisteinemijskih efekata cisteina ili N-acetilcisteina. Kod ljudi, oko 75% plazma homocisteina je vezano za proteine disulfidnim vezama sa cisteinskim reziduama plazma proteina, posebno albumina, a ostatak je uglavnom u obliku niskomolekularnih disulfida kao što su homocistin i homocistein-cistein (Ueland, 1995). Hultberg i sar., pokazali su da je ukupna koncentracija homocisteina u plazmi kod zdravih ljudi, bila snižena nakon pojedinačne oralne primene N-acetilcisteina, pri čemu je koncentracija neproteinske frakcije homocisteina bila povišena. Na osnovu ovih rezultata oni su dali objašnjenje da bi administracija N-acetilcisteina ili cisteina mogla da pomeri homocistein sa svog protein - vezujućeg mesta, posredstvom reakcije disulfidne zamene, i tako dovesti do stvaranja niskomolekularnih disulfida cisteina i N-acetilcisteina, sa visokim nivoom renalnog klirensa, i povišenom metaboličkom raspoloživošću, i tako eliminisati homocistein iz plazme (Hultberg i sar., 1994). S druge strane, Verhoef i sar., nude druge mehanizme objašnjenja za hipohomocisteinemične efekte cisteina. U tom

smislu, navodi se povećana utilizacija metionina za sintezu proteina, dovodeći do smanjenog stvaranja homocisteina i povećane remetilacije homocisteina u metionin, kao rezultat smanjenog stvaranja cistationina zbog inhibicije aktivnosti CBS. Može se istaći da je najznačajniji nalaz studije Kawakami i sar., da je hipohomocisteinemijski efekat cisteina uvek praćen povećanjem koncentracije cisteina u plazmi. Ovo ukazuje da efekti cisteina, mogu bar jednim delom biti povezani sa povećanjem plazma koncentracije cisteina.

Inflamatorna bolest creva karakteriše se povećanom produkcijom iflamatornih medijatora, uključujući i reaktivne vrste kiseonika i brojne citokine (Mirbagheri i sar., 2008). Upravo se i savremeni pristup terapiji ove bolesti bazira se na eliminisanju medijatora i pokretača inflamatornog odgovora. Model kolitisa izazvanog sirćetnom kiselinom je jednostavan za postavljanje i pokazuje mnoge karakteristike kolitisa u humanoj populaciji (Mac Pherson i Pfeiffer, 1978). Na ovom modelu kolitisa autori su ispitivali antioksidativne efekte terapije N-acetilcisteinom (Cetinkaya i sar., 2005; Akgun i sar., 2005). Pokazano je da primena N-acetilcisteina smanjuje nivo oksidativnog stresa u ovom modelu. Rezultati koje su publikovali Uraz i sar., na istom modelu su u skladu sa ovim nalazima, i ukazuju na smanjen nivo produkcije slobodnih radikala nakon primene N-acetilcisteina (Uraz i sar., 2013). Takođe rezultati ove studije ukazali su na smanjen stepen infiltracije polimorfonuklearima, kao i na smanjenu produkciju proinflamatornih citokina. Ovo je ujedno i prvo istraživanje koje je pored antioksidativnog potvrdilo i antiinflamatorne karakteristike N-acetilcisteina. Na osnovu svega navedenog može se pretpostaviti da bi N-acetilcistein bio pogodan za kliničku primenu u lečenju ulceroznog kolitisa.

Pored prethodno diskutovanih biohemijskih parametara, naše istraživanje obuhvatilo je i histolšku analizu duodenuma, ileuma, kolona i jetre u uslovima subhroničnog opterećenja metioninom.

Održavanje optimalnog redoks statusa je od velike važnosti za gastrointestinalni sistem, s obzirom da su intestinalne epitelne ćelije stalno izložene luminalnim toksinima i oksidansima iz hrane. Studije na intestinalnim epitelnim ćelijama pokazale su da povećan nivo oksidativnog stresa i redoks disbalans smanjuju ćelijsku proliferaciju i indukuju

apoptozu (Jonas i sar., 2002). Posebno se ističe značaj raspoloživosti cisteina za održanje optimalnog nivoa glutaciona u ćeliji i ćelijsko preživljavanje. Cistein je sastavna komponenta tripeptida glutaciona, i predstavlja prekursor taurina, sulfata i koenzima A (Stipanuk i sar., 2004). Studija koju su sprovedi Bauchart-Thevret i sar., obuhvatila je morfološko ispitivanje jejunuma, ileuma i kolona svinje, u uslovima nedostatka sumporovitih aminokiselina (Bauchart-Thevret i sar., 2009). Rezultati histoloških ispitivanja su pokazali smanjenje dužine crevnih resica, dubine kripti, kao i smanjenje broja peharastih ćelija u grupi životinja koje su bile na dijeti bez sumporovitih aminokiselina u poređenju sa kontrolnom grupom. Indeks proliferacije Ki67 ćelija kripti bio je niži u jejunumu i kolonu u eksperimentalnoj grupi, u poređenju sa kontrolom. Sumarno se može reći da rezultati ove studije pokazuju da u uslovima nedostatka sumporovitih aminokiselina dolazi do inhibicije epitelnog rasta, i smanjenja ispitivanih morfometrijskih parametara creva. Naši rezultati histoloških ispitivanja su pokazali da primena metionina različito utiče na morfometrijske parametre po organima. U duodenumu je došlo do sniženja dužine resica i debljina tunike mukoze, dok je debljina tunike muskularis bila povišena, kao i broj ćelija. Slični rezultati su prikupljeni analizom tkiva ileuma, s tim što je pokazano sniženje broja ćelija lamine proprije ileuma. Najkonzistentniji rezultati su dobijeni analizom isečaka kolona: svi parametri su bili povišeni u grupi tretiranoj metioninom (dubina kripti, debljina lamine muskularis mukoze, debljina tunike mukoze, ukupna debljina zida creva i broj ćelija lamine proprije), dok je u grupama C i N došlo do smanjenja svih posmatranih parametara. Ove rezultate objašnjavamo potencijalnim protektivnim dejstvom primenjenih sumporovitih aminokiselina (L-cisteina i N-acetil-L-cisteina). U svetlu ovih ispitivanja može se pretpostaviti da L-cistein ili N-acetil-L-cistein pored antioksidativnog ispoljavaju i antiinflamatorne efekte. Antioksidativni efekat mogli smo potvrditi analizom različitih parametara oksidativnog stresa nakon subhroničnog opterećenja metioninom, dok bi neka buduća ispitivanja mogla biti usmerena na određivanje markera inflamacije u istim uslovima, što bi potvrdilo naše pretpostavke, i još bolje potkrepilo rezultate ove disertacije.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu prikazanih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Hiperhomocisteinemija izazvana u *in vivo* uslovima dovodi do nastanka oksidativnog stresa u homogenatu tkiva duodenuma, ileuma, kolona i jetre pacova
2. Hiperhomocisteinemija u *in vitro* uslovima, indukovana nakon 3 h inkubacije duodenuma, ileuma, kolona i jetre u petri šolji, dovodi do nastanka oksidativnog stresa
3. D,L-homocistein tiolakton u koncentraciji od 10 $\mu\text{mol/L}$ dovodi do trenutnog porasta tonusa, amplitude i frekvencije spontanij pokreta izolovanog segmenta duodenuma, ileuma i kolona pacova
4. Posle inkubacije u prisustvu 10 $\mu\text{mol/L}$ D,L-homocistein tiolaktona, a po dodavanju L-NAME u koncentraciji od 30 $\mu\text{mol/L}$, došlo je do porasta tonusa, amplitude i frekvencije spontanij kontrakcija longitudinalne muskulature izolovanih segmenata duodenuma u odnosu na kontrolnu grupu
5. Subhronična stimulacija metioninom tokom 3 nedelje dovodi do nastanka oksidativnog stresa u tkivu duodenuma, ileuma, kolona i jetre, dok primena L-cisteina i N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioniom, umanjuje efekte nastale dejstvom metionina, što govori u prilog antioksidativnog kapaciteta ovih supstanci
6. Histološka analiza tkiva digestivnog trakta nakon subhroničnog opterećenja metioninom ukazuje na povišene vrednosti ispitivanih parametara (dubina kripi, debljina lamine muskularis mukoze, debljina tunike mukoze, debljina zida creva i broj ćelija lamine proprije na 0,1 mm^2), dok u slučaju primene L-cisteina i N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioninom dolazi do smanjivanja datih vrednosti.

7. LITERATURA

Abrahamsson H. Non-adrenergic non-cholinergic nervous control of gastrointestinal motility patterns. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1986; 280 (Suppl): 50 – 61.

Adeghate E, al-Ramadi B, Saleh AM, Vijayarasathy C, Ponery AS, Arafat K, Howarth FC, El-Sharkawy T. Increase in neuronal nitric oxide synthase content of the gastroduodenal tract of diabetic rats. *Cell Mol Life Sci.* 2003; 60: 1172–1179.

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121-126.

Akbulut S, Elbe H, Eris C, Dogan Z, Toprak G, Otan E, Erdemli E, Turkoz Y. Cytoprotective effects of amifostine, ascorbic acid and N-acetylcysteine against methotrexate-induced hepatotoxicity in rats. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(29): 10158-10165.

Akgun E, Caliskan C, Celik HA, Ozutemiz AO, Tuncyurek M, Aydin HH. Effects of N-acetylcysteine treatment on oxidative stress in acetic acid-induced experimental colitis in rats. *J Intern Med Res.* 2005; 33: 196–206 .

Albu E, Filip C, Zamosteanu N. Investigation of correlation stress hyperhomocysteinemia, in rats. *Therap Pharm and Clin Tox.* 2009; 13(3): 261-265.

Allescher HD, Tougas G, Vergara P, Lu S, Daniel EE. Nitric oxide as a putative nonadrenergic noncholinergic inhibitory transmitter in the canine pylorus in vivo. *Am J Physiol.* 1992; 262: 695–702.

Allescher HD, Lu S, Daniel EE, Classen M. Nitric oxide as putative nonadrenergic noncholinergic inhibitory transmitter in the opossum sphincter of Oddi. *Can J Physiol Pharmacol.* 1993; 71: 525-530.

Alexander B. The role of nitric oxide in hepatic circulation. *Nutrition.* 1998; 14: 376 –390.

Ancha H, Ojeas H, Tedesco D, Ward A, Harty RF. Somatostatin-induced gastric protection against ethanol: involvement of nitric oxide and effects on gastric mucosal blood flow. *Regul Pept.* 2003; 110: 107–113.

Atis S, Nayci A, Ozge A, Comelekoglu U, Gunes S, Bagdatoglu O. N-acetylcysteine protects the rats against phrenic nerve dysfunction in sepsis. *Shock*. 2006; 25: 30–35.

Atti SH, Saseekala A. Homocysteine levels and role of oxidative stress in primary open angle glaucoma. *IJCRR*. 2012; 4: 52-58.

Ayajiki K, Tanaka T, Okamura T, Toda N. Evidence for nitroxidergic innervation in monkey ophthalmic arteries in vivo and in vitro. *Am J Physiol*. 2000; 279: 2006-2012.

Baccari MC, Romagnani P, Calamai F. Impaired nitrenergic relaxations in the gastric fundus of dystrophic (mdx) mice. *Neurosci Lett*. 2000; 282: 105–108.

Bagyanszki M, Roman V, Fekete E. Quantitative distribution of NADPH diaphorase-positive myenteric neurons in different segments of the developing chicken small intestine and colon. *Histochem J*. 2000; 32: 679–684.

Balkan J, Doğru-Abbasoğlu S, Çevikbaş U, Aykaç-Toker G, Uysal M. Methionine supplementation did not augment oxidative stress, atherosclerotic changes and hepatotoxicity induced by high cholesterol diet in C57BL/6J mice. *J Nutr Sci Vitaminol*. 2004; 50: 258–264.

Baszczuk A, Kopczynski Z. Hyperhomocysteinemia in patients with cardiovascular disease [Abstract]. *Postepy Hig Med Dosw*. 2014; 68: 579.

Bauchart-Thevret C, Stoll B, Chacko S, Burrin DG. Sulfur amino acid deficiency upregulates intestinal methionine cycle activity and suppresses epithelial growth in neonatal pigs. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009; 296(6): 1239-1250.

Baydas G, Reiter RJ, Akbulut M, Tuzcu M, Tamer S. Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome c translocation and caspase-3 activation and by regulating pro- and anti-apoptotic protein levels. *Neuroscience*. 2005; 135: 879–886.

Baydas G, Koz ST, Tuzcu M, Nedzvetsky VS, Etem E. Effects of maternal hyperhomocysteinemia induced by high methionine diet on the learning and memory performance in offspring. *Int J Dev Neurosci.* 2007; 25(3): 133–139.

Benevenga NJ and Steele RD. Adverse effects of excessive consumption of amino acids. *Ann Rev Nutr.* 1984; 4: 157.

Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev.* 2014; 94(2): 329-354.

Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Bult H, De Man JG, Herman AG, Van Maercke YM. Non-adrenergic non-cholinergic relaxation mediated by nitric oxide in the canine ileocolonic junction. *Eur J Pharmacol.* 1990; 190: 239 –246.

Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Bult H, De Man JG, Herman AG, Van Maercke YM. Evidence for nitric oxide as mediator of non-adrenergic, non-cholinergic relaxations induced by ATP and GABA in the canine gut. *Br J Pharmacol.* 1991; 102: 434–438.

Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Bogers JJ, Bult H, De Man JG, Oosterbosch L, Herman AG, Van Maercke YM. Release of nitric oxide upon stimulation of nonadrenergic noncholinergic nerves in the rat gastric fundus. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991; 256: 441-447.

Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Herman AG, Van Mearcke YM. Involvement of nitric oxide in the inhibitory innervation of the human isolated colon. *Gastroenterology.* 1994; 104: 690–697.

Bouzouf M, Martinez-Cruz F, Molinero P, Guerrero JM, Osuna C. Melatonin prevents hyperhomocysteinemia and neural lipid peroxidation induced by methionine intake. *Curr Neurovasc Res.* 2005; 2: 175–178.

Bradbury P., Gordon KC. Connective tissues and stains. In: *Theory and practice of histological techniques.* 2nd ed. Bancroft JD and Stevens A. (eds). Churchill Livingstone. Edinburgh. 1982; 122-144.

Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248–254.

Bryan NS, Bian K, Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Front Biosci.* 2009; 14: 1–18.

Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature.* 1990; 345: 346-347.

Cao YG, Chai JG, Chen YC, Zhao J, Zhou J, Shao JP, Ma C, Liu XD, Liu XQ. Beneficial effects of danshensu, an active component of *Salvia miltiorrhiza*, on homocysteine metabolism via the trans-sulphuration pathway in rats. *Br J Pharmacol.* 2009; 157(3): 482–490.

Carmel R, Jacobsen DW. *Homocysteine in health and disease.* Cambridge University Press, United Kingdom. 2001; 435-436.

Casella G, Bassotti G, Villanacci V, Di Bella C, Pagni F, Corti GL. Is hyperhomocysteinemia relevant in patients with celiac disease? *World J Gastroenterol.* 2011; 17(24): 2941-2944.

Cătană CS, Crăciun EC, Dronca M, Cristea V, Dronca E, Moldovan C. The effect of acute homocysteine administration on superoxide dismutase activity in young and aged rats. *Journ Agroalimen Proc Techn.* 2011; 17(2): 173-178.

Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Ciralik H, Kantarceken B, Buyukbese MA. Beneficial effects of Nacetylcysteine on acetic acid-induced colitis in rats. *Tohoku J Exp.* 2005; 206: 131–139 .

Chang L, Xu J, Yu F, Zhao J, Tang X, Tang C. Taurine protected myocardial mitochondria injury induced by hyperhomocysteinemia in rats. *Amino Acids.* 2004; 27: 37–48.

Chang D, Hu ZL, Zhang L, Zhao YS, Meng QH, Guan QB, Zhou J, Pan HZ. Association of catalase genotype with oxidative stress in the predication of colorectal cancer: modification by epidemiological factors. *Biomed Environ Sci*. 2012; 25: 156–162.

Chanson A, Rock E, Martin JF, Liotard A, Brachet P. Preferential response of glutathione-related enzymes to folate-dependent changes in the redox state of rat liver. *Eur J Nutr*. 2007; 46: 204–212.

Chin K, Toue S, Kawamata Y, Watanabe A, Miwa T, Smriga M. A 4-week toxicity study of methionine in male rats. *Int J Toxicol*. 2015; 34(3): 233-241.

Cheng J, Kaplowitz N. Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress and alcoholic liver injury. *World J Gastroenterol*. 2004; 10: 1699–1708.

Choe EK, Moon JS, Park KJ. Methionine enhances the contractile activity of human colon circular smooth muscle in vitro. *J Korean Med Sci*. 2012; 27: 777-783.

Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011; 140: 1785-1794.

Costa MZ, da Silva TM, Flores NP, Schmitz F, da Silva Scherer EB, Viau CM, Saffi J, Barschak AG, de Souza Wyse AT, Spanevello RM, Stefanello FM. Methionine and methionine sulfoxide alter parameters of oxidative stress in the liver of young rats: in vitro and in vivo studies. *Mol Cell Biochem*. 2013; 384(1-2): 21-28.

Csontos C, Rezman B, Foldi V, Bogar L, Bognar Z, Drenkovic L, Roth E, Weber G, Lantos J. Effect of N-acetylcysteine treatment on the expression of leukocyte surface markers after burn injury. *Burns*. 2011; 37: 453-464.

Curro M, Gugliandolo A, Gangemi C, Risitano R, Ientile R, Caccamo D. Toxic effects of mildly elevated homocysteine concentrations in neuronal-like cells. *Neurochem Res*. 2014; 39: 1485–1495.

Danese S, Semeraro S, Papa A, Roberto I, Scaldaferri F, Fedeli G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2005; 11(46): 7227-7236.

Delvin MT. Textbook of biochemistry with clinical correlations. New York: Wiley-Liss; 2002; 1139-1148.

De Man JG, Pelckmans PA, Boeckxstaens GE, Bult H, Oosterbosch L, Herman AG, Van Maercke YM. The role of nitric oxide in inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission in the canine lower oesophageal sphincter. *Br J Pharmacol.* 1991; 103: 1092–1096.

De Man JG, Moreels TG, De Winter BY, Herman AG, Pelckmans PA. Neocuproine potentiates the activity of the nitrenergic neurotransmitter but inhibits that of S-nitrosothiols. *Eur J Pharmacol.* 1999; 381: 151–159.

De Man JG, Moreels TG, De Winter BY, Herman AG, Pelckmans PA. Preand postjunctional protective effect of neocuproine on the nitrenergic neurotransmitter in the mouse gastric fundus. *Br J Pharmacol.* 2001; 132: 277–285.

De Man JG, De Winter BY, Seerden TC, De Schepper HU, Herman AG, Pelckmans PA. Functional evidence that ATP or a related purine is an inhibitory NANC neurotransmitter in the mouse jejunum: study on the identity of P2X and P2Y purinoceptors involved. *Br J Pharmacol.* 2003; 140: 1108 –1116.

Demiroren K, Dogan Y, Kocamaz H, Ozercan IH, Ilhan S, Ustundag B, Bahcecioglu IH. Protective effects of L-carnitine, N-acetylcysteine and genistein in an experimental model of liver fibrosis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2014; 38(1): 63-72.

Devi S, Kennedy RH, Joseph L, Shekhawat NS, Melchert RB, Joseph J. Effect of long-term hyperhomocysteinemia on myocardial structure and function in hypertensive rats. *Cardiovasc Pathol.* 2006; 15: 75–82.

Dodd S, Dean O, Copolov DL, Malhi GS, Berk M. N-acetylcysteine for antioxidant therapy: Pharmacology and clinical utility. *Expert Opin Biol Ther.* 2008; 8: 1955–1962.

Draper H, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 421-431.

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82: 47-95.

Drzewoski J, Gasiorowska A, Malecka-Panas E, Bald E, Czupryniak L. Plasma total homocysteine in the active stage of ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006; 21: 739–743.

Duranton B, Freund JN, Galluser M, Schleiffer R, Gosse F, Bergmann C, Hasselmann M, Raul F. Promotion of intestinal carcinogenesis by dietary methionine. *Carcinogenesis.* 1999; 20(3): 493-497.

Elliott SN, Wallace JL. Nitric oxide: a regulator of mucosal defense and injury. *J Gastroenterol.* 1998; 33: 792– 803.

Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics.* 1959; 82: 70-77.

Ellman GL, Courtney KD, Andres VJr, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961; 7: 88-95.

Ember Z, Reti A, Feher E. Enzyme - and immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in nerves of the porcine pancreas. *Neurosci Lett.* 2000; 292: 163–166.

Ember Z, Yago M, Singh J. Distribution of nitric oxide synthase and secretory role of exogenous nitric oxide in the isolated rat pancreas. *Int J Gastrointest Cancer.* 2001; 29: 77-84.

Ergun Y, Ogulener N. Evidence for the interaction between nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide in the mouse gastric fundus. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 299: 945–950.

Evelson P, Travacio M, Repetto M, Escobar J, Llesuy SF, Lissi E. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch Biochem Biophys.* 2001; 388: 261–266.

Evereklioglu C, Er H, Doganay S, Cekmen M, Turkoz Y, Otlu B, Ozerol E. Nitric oxide and lipid peroxidation are increased and associated with decreased antioxidant enzyme activities in patients with age-related macular degeneration. *Doc Ophthalmol.* 2003; 106 (2): 129-136.

Faeh D, Chiolero A, Paccaud F. Homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: should we (still) worry about it? *Swiss Med Wkly.* 2006; 136: 745–756.

Fagundes DS, Grasa L, Arruebo MP, Plaza MA, Murillo MD. Ca^{2+} -activated K^{+} channels involved in duodenal dysmotility induced by ethanol. *Alcohol & Alcoholism.* 2007; 42: 291-295.

Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine : Pathways and regulation. *Eur J Pediatr.* 1998; 157: 40-44.

Fonseca VA, Stone A, Munshi M, Baliga BS, Aljada A, Thusu K, Fink L, Dandona P. Oxidative stress in diabetic macrovascular disease: does homocysteine play a role? *South Med J.* 1997; 90: 903–906.

Friedman AN, Bostom AG, Laliberty P, Selhub J, Shemin D. The effect of N-acetylcysteine on plasma total homocysteine levels in hemodialysis: a randomized, controlled study. *Am J Kidney Dis.* 2003; 41: 442-446.

Fu WY, Dudman NP, Perry MA, Wang XL. Homocysteine attenuates hemodynamic responses to nitric oxide in vivo. *Atherosclerosis.* 2002; 161: 169-176.

Fujimoto S, Togane Y, Matsuzaki C, Yamashina S, Nakano H, Yamazaki J. Effects of long-term administration of methionine on vascular endothelium in rabbits. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2003; 13: 20–27.

Fukada S, Morita T, Sugiyama K. Effects of various amino acids on methionine-induced hyperhomocysteinemia in rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008; 72: 1940-1943.

Givvimani S, Munjal C, Narayanan N, Aqil F, Tyagi G, Metreveli N, Tyagi SC. Hyperhomocysteinemia decreases intestinal motility leading to constipation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012; 303(3): 281-290.

Glasgow I, Mattar K, Krantis A. Rat gastroduodenal motility in vivo: involvement of NO and ATP in spontaneous motor activity. *Am J Physiol.* 1998; 275: 889-896.

Gonzalez-Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Radic Biol Med.* 1991; 10: 93–100.

Góth L, Vitai M. The effects of hydrogen peroxide promoted by homocysteine and inherited catalase deficiency on human hypocatalasemic patients. *Free Radic Biol Med.* 2003; 35: 882-888.

Gregus Z, Klaassen CD. Mechanisms of toxicity. in: C.D. Klaassen (Ed.) *Casarett and Doull's toxicology.* McGraw-Hill, New York. 2001; 35–81.

Guo H, Chi J, Xing Y, Wang P. Influence of folic acid on plasma homocysteine levels & arterial endothelial function in patients with unstable angina. *Indian J Med Res.* 2009; 129(3): 279–284.

Hagar HH. Folic acid and vitamin B₁₂ supplementation attenuates isoprenaline-induced myocardial infarction in experimental hyperhomocysteinemic rats. *Pharmacol Res.* 2002; 46: 213–219.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* New York, Oxford University Press. 1989; 1-543.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, third ed. Oxford University Press, New York. 1999.

Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev.* 2012; 70(5): 257-265.

Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet.* 1999; 354: 407–413.

Harvey RA, Ferrier DR. In: Rhyner S, editor. *Lippincott's Illustrated Reviews, Biochemistry*. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health. 2011; 264–265.

Hennig B, Toborek M, Alvarado CA, Decker E. Nutrition, endothelial cell metabolism, and atherosclerosis. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1993; 34: 253.

Hijová E, Szabadosova V, Štöfi lová J, Salaj R, Bomba A. Inulin diet intervention on chemopreventive and inflammatory markers in tumorigenesis of colorectal cancer. *Acta Veterinaria.* 2014; 64(4): 519-525.

Huang RF, Hsu YC, Lin HL, Yang FL. Folate depletion and elevated plasma homocysteine promote oxidative stress in rat livers. *J Nutr.* 2001; 131: 33-38.

Hultberg B, Andersson A, Masson P, Larson M, Tunek A. Plasma homocysteine and thiol compound fractions after oral administration of N-acetylcysteine. *Scand J Clin Lab Invest.* 1994; 54: 417-422.

Huycke MM, Abrams V, Moore DR. *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis.* 2002; 23: 529-536.

Ibrahim CB, Aroniadis OC, Brandt LJ. On the role of ischemia in the pathogenesis of IBD: a review. *Inflamm Bowel Dis.* 2010; 16: 696–702.

Inokuma T, Haraguchi M, Fujita F, Tajima Y, Kanematsu T. Oxidative stress and tumor progression in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology.* 2009; 56: 343-347.

Ji C, Kaplowitz N. Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic liver injury. *World J Gastroenterol.* 2004; 10: 1699–1708.

Jiang Y, Zhao J, Xu CL, Cao SG, Lin LM, Lei Y Huang S, Wang CG, Xia B. The relationship of methylenetetrahydrofolate reductase G1793A gene polymorphism, hyperhomocysteinaemia and ulcerative colitis. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* 2010; 49(8): 675-679.

Johnstone C, Day JG, Staines H, Benson EE: The development of a 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolourisation assay for evaluating total antioxidant status in an alga used to monitor environmental impacts in urban aquatic habitats. *Ecol Indic.* 2006; 6: 280-289.

Jonas CR, Ziegler TR, Gu LH, Jones DP. Extracellular thiol/disulfide redox state affects proliferation rate in a human colon carcinoma (Caco2) cell line. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33: 1499–1506.

Jordao AA, Domenici FA, Lataro RC, Portari GV, Vannucchi H. Effect of methionine load on homocysteine levels, lipid peroxidation and DNA damage in rats receiving ethanol. *Braz J ourl of Pharm Sci.* 2009; 45(4): 709-714.

Kallel L, Feki M, Sekri W, Segheir L, Fekih M, Boubaker J. Prevalence and risk factors of hyperhomocysteinemia in Tunisian patients with Crohn's disease. *J Crohns Colitis.* 2011; 5(2): 110-114.

Karasu E, Gulay, Tasataragil A. Effects of hyperhomocystemia on non-adrenergic non-cholinergic relaxation in isolated rat duodenum. *Dig Dis Sci.* 2008; 53: 2106-2112.

Kasakov L, Cellek S, Moncada S. Characterization of nitrenergic neurotransmission during short- and long-term electrical stimulation of the rabbit anococcygeus muscle. *Br J Pharmacol.* 1995; 115: 1149-1154.

Kang SS, Wong PWK, Malinow MR. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Ann Rev Nutr.* 1992; 12: 279-298.

Kawakami Y, Ohuchi S, Morita T, Sugiyama K. Hypohomocysteinemic effect of cysteine is associated with increased plasma cysteine concentration in rats fed diets low in protein and methionine levels. *J Nutr Sci Vit.* 2009; 55(1): 66-74.

Kikuchi N, Ishii Y, Morishima Y, Yageta Y, Haraguchi N, Yamadori T, Masuko H, Sakamoto T, Yanagawa T, Warabi E, Ishii T, Hizawa N. Aggravation of bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice lacking peroxiredoxin I. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011; 45: 600-609.

Klavins JV and Kinney TD. Histopathologic changes in methionine excess. *Arch Pathol.* 1963; 75: 661.

Koh SD, Sanders KM. Stretch-dependent potassium channels in murine colonic smooth muscle cells. *Journal of Physiology.* 2001; 533: 155-163.

Koladiya RU, Jaggi AS, Singh N, Sharma BK. Ameliorative role of Atorvastatin and Pitavastatin in L-Methionine induced vascular dementia in rats. *BMC Pharmacol.* 2008; 8: 14.

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.

Kozic A, Popovic M, Ivetic V, Pilijs V. Aktivnosti glutation peroksidaze, glutationa i glutation reduktaze kod zdravih ljudi i dijabetičara (insulin-zavisnih). *Praxis medica.* 2002; 30(1-2): 13-20.

Kruidenier L, Kuiper L, Lamers CB, Verspaget HW. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *J Pathol.* 2003; 201: 28-36.

Krumdieck CL, Prince CW. Mechanism of homocysteine toxicity on connective tissues: Implications for the morbidity of aging. *Journ Nutr.* 2000; 130(2): 365-368.

Kuiken SD, Tytgat GN, Boeckxstaens GE. Role of endogenous nitric oxide in regulating antropyloroduodenal motility in humans. *Am J Gastroenterol.* 2002; 97: 1661–1667.

Kukolj V: Myofibroblasts in normal and fibrotic liver in different animal species. *Acta Veterinaria.* 2014; 64(4): 397-412.

Kurpad AV, Anand P, Dwarkanath P, Hsu JW, Thomas T, Devi S, Thomas A, Mhaskar R, Jahoor F. Whole body methionine kinetics, transmethylation, transsulfuration and remethylation during pregnancy. *Clin Nutr.* 2014; 33(1): 122-129.

Kuyumcu A, Akyol A, Buyuktuncer Z, Ozmen MM, Besler HT. Improved oxidative status in major abdominal surgery patients after N-acetyl cysteine supplementation. *Nutr J.* 2015; 14: 4.

Kwiecień S, Pawlik MW, Brzozowski T, Konturek PC, Śliwowski Z, Pawlik WW, Konturek SJ. Nitric oxide (NO) - Releasing aspirin and other (NO) donors in protection of gastric mucosa against stress. *J. Physiol. Pharmacol.* 2008; 59: 103–115.

Kwiecień S, Ptak-Belowska A, Krzysiek-Mączka G, Targosz A, Jasnos K, Magierowski M, Szczyrk U, Brzozowski B, Konturek SJ, Konturek PC. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, interacts with gastric oxidative metabolism and enhances stress-induced gastric lesions. *J Physiol Pharmacol.* 2012; 63: 515–524.

Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: Bench to bedside. *Gastroenterology.* 2008; 135: 41–60.

Lefebvre RA, Hasrat J, Gobert A. Influence of NG-nitro-L-arginine methyl ester on vagally-induced gastric relaxation. *Br J Pharmacol.* 1991; 104: 4.

Lefebvre RA, Smits GJ, Timmermans JP. Study of NO and VIP as non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitters in the pig gastric fundus. *Br J Pharmacol.* 1995; 116: 2017–2026.

Lefebvre RA, Vandekerckhove K. Effect of nitroglycerin and long-term electrical stimulation on nitreergic relaxation in the pig gastric fundus. *Br J Pharmacol.* 1998; 123: 143–149.

Lentz SR. Homocysteine and vascular dysfunction. *Life Sci.* 1997; 61: 1205-1215.

Li CG, Rand MJ. Evidence for a role of nitric oxide in the neurotransmittersystem mediating relaxation of the rat anococcygeus muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1989; 16: 933–938.

Liapi C, Zarros A, Theocharis S, Al-Humadi H, Anifantaki F, Gkrouzman E, Mellios Z, Skandali N, Tsakiris S. The neuroprotective role of L-cysteine towards the effects of short-term exposure to lanthanum on the adult rat brain antioxidant status and the activities of acetylcholinesterase, (Na⁺,K⁺)- and Mg²⁺-ATPase. *Biometals.* 2009; 22(2): 329-335.

Ling Q, Hajjar KA. Inhibition of endothelial cell thromboresistance by homocysteine. *Journ Nutr.* 2000; 130(2): 373-376.

Loscalzo J, Handy DE. Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease. (2013 Grover Conference Series). *Pulm Circ.* 2014; 4(2): 169-174.

MacPherson BR, Pfeiffer CJ. Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion.* 1978; 17: 135–150 .

Magierowski M, Jasnos K, Sliwowski Z, Surmiak M, Krzysiek-Maczka G, Ptak-Belowska A, Kwiecien S, Brzozowski T. Exogenous asymmetric dimethylarginine (ADMA) in pathogenesis of ischemia-reperfusion-induced gastric lesions: Interaction with protective nitric oxide (NO) and calcitonin gene-related peptide (CGRP). *Int J Mol Sci.* 2014; 15: 4946–4964.

Maiese K. New Insights for Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. *Oxid Med Cell Longev.* 2015; 2015: 875961.

Malinow MR, Axthelm MK, Meredith MJ, Macdonald NA, Upson BM. Synthesis and transsulfuration of homocysteine in blood. *J Lab Clin Med.* 1994; 123: 421–429.

Mateen S, Moin S, Qayyum Khan A, Zafar A, Fatima N. Increased Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis. *PLoS One*. 2016; 11(4): e0152925.

Matte' C, Scherer EBS, Stefanello FM, Barschak AG, Vargas CR, Netto CA, Wyse AT. Concurrent folate treatment prevents Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition and memory impairments caused by chronic hyperhomocysteinemia during rat development. *Int J Dev Neurosci*. 2007; 25: 545–552.

Matté C, Stefanello FM, Mackedanz V, Pederzoli CD, Lamers ML, Dutra-Filho CS, Dos Santos MF, Wyse AT. Homocysteine induces oxidative stress, inflammatory infiltration, fibrosis and reduces glycogen/glycoprotein content in liver of rats. *Int J Dev Neurosci*. 2009; 27: 337-344.

Mattson MP, Pedersen WA, Duan W, Culmsee C, Camandola S. Cellular and molecular mechanisms underlying perturbed energy metabolism and neuronal degeneration in Alzheimer's diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999; 893: 154-175.

Maulbecker CC, Gruss P. The oncogenic potential of deregulated homeobox genes. *Cell Growth Differ*. 1993; 4: 431–441.

McCully KS. Homocysteine theory of arteriosclerosis: Development and current status. *Atheroscler Rev* 1983; 11: 157–246.

McCully KS, Wilson RB. Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis*. 1975; 22(2): 215-227.

Mendes RH, Mostarda C, Candido GO, Moraes-Silva IC, D'Almeida V, Belló-Klein A, Irigoyen MC, Rigatto K. Moderate hyperhomocysteinemia provokes dysfunction of cardiovascular autonomic system and liver oxidative stress in rats. *Auton Neurosci*. 2014; 180: 43-47.

Miller AL. The methionine-homocysteine cycle and its effects on cognitive diseases. *Altern Med Rev*. 2003; 8(1): 7–19.

Miller JW, Beresford SA, Neuhouser ML, Cheng TY, Song X, Brown EC, Zheng Y, Rodriguez B, Green R, Ulrich CM. Homocysteine, cysteine, and risk of incident colorectal cancer in the Women's Health Initiative observational cohort. *Am J Clin Nutr.* 2013; 97(4): 827-834.

Milton NG. Homocysteine inhibits hydrogen peroxide breakdown by catalase. *Open Enzym Inhib J.* 2008; 1: 34-41.

Mirbagheri SA, Nezami BG, Assa S, Hajimahmoodi M. Rectal administration of d-alpha tocopherol for active ulcerative colitis: a preliminary report. *World J Gastroenterol.* 2008; 14: 5990–5995 .

Mirković D, Majkić-Singh N, Ignjatović S. Homocistein: hemija, metabolizam i uloga u patofiziološkim procesima. *Jugoslov Med Biohem.* 2003; 22: 127-140.

Molina-López J, Florea D, Quintero-Osso B, de la Cruz AP, Rodríguez-Elvira M, Del Pozo EP. Pyridoxal-5'-phosphate deficiency is associated with hyperhomocysteinemia regardless of antioxidant, thiamine, riboflavin, cobalamine, and folate status in critically ill patients. *Clin Nutr.* 2016; 35(3): 706-712.

Monari M, Foschi J, Calabrese C, Liguori G, Di FG, Rizzello F, Gionchetti P, Trinchero A, Serrazanetti GP. Implications of antioxidant enzymes in human gastric neoplasms. *Int J Mol Med.* 2009; 24: 693–700.

Morgenstern I, Raijmakers MT, Peters WH, Hoensch H, Kirch W. Homocysteine, cysteine, and glutathione in human colonic mucosa: elevated levels of homocysteine in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 2003; 48(10): 2083-2090.

Mourelle M, Guarner F, Moncada S, Malagelada JR. The arginine/nitric oxide pathway modulates sphincter of Oddi motor activity in guinea pigs and rabbits. *Gastroenterology.* 1993; 105: 1299-1305.

Mudd SH, Levy HL, Skovby F. The methabolic basis of inherited diseases. New York: McGraw-Hill. 1989; 693–734.

Mudd SH, Pool JR. Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. *Metabolism*. 1975; 24: 721–735.

Nanetti T, Vignini A, Raffaelli F, Giulietti F, Bartolini M, Cecilia Perozzi C, Silvestrini M, Provinciali L, Mazzanti L. Homocysteine and oxidative stress in acute stroke. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2013; 4: 15-23.

Nishio E, Watanabe Y. Homocysteine as a modulator of platelet-derived growth factor action in vascular smooth muscle cells: A possible role for hydrogen peroxide. *Brit Jour Pharm*. 1997; 122(2): 269-274.

Noichri Y, Chalghoum A, Chkioua L, Baudin B, Ernez S, Ferchichi S, Miled A. Low erythrocyte catalase enzyme activity is correlated with high serum total homocysteine levels in Tunisian patients with acute myocardial infarction. *Diagn Pathol*. 2013; 30: 8-68.

Nosál'ová V, Cerná S, Bauer V. Effect of N-acetylcysteine on colitis induced by acetic acid in rats. *Gen Pharmacol*. 2000; 35(2): 77-81.

Obeid R and Herrmann W. Mechanisms of homocysteine neuro-toxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Lett*. 2006; 580(13): 2994–3005.

Ocal K, Avlan D, Cinel I. The effects of N-acetyl cysteine on oxidative stress in intestine and bacterial translocation after thermal injury. *Burns*. 2004; 30: 778–784.

Okawa H, Morita T, Sugiyama K. Cysteine supplementation decreases plasma homocysteine concentration in rats fed on a low-casein diet in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006; 70: 91-97.

Omae I, Nagaoka T, Tanano I, Yoshida A. Homocysteine inhibition of endothelium-dependent nitric oxide-mediated dilation of porcine retinal arterioles via enhanced superoxide production. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013; 54: 2288-2295.

Ovrebo KK, Svardal A. The effect of glutathione modulation on the concentration of homocysteine in plasma of rats. *Pharmacol Toxicol*. 2000; 87: 103-107.

Palacio JR, Markert UR, Martinez P. Anti-inflammatory properties of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-activated macrophages. *Inflamm Res*. 2011; 60: 695-704.

Park KJ, Baker SA, Cho SY, Sanders KM, Koh SD. Sulfur-containing amino acids block stretch-dependent K⁺ channels and nitrenergic responses in the murine colon. *Br J Pharmacol*. 2005; 144: 1126-1137.

Peyrin-Biroulet L, Guéant JL. Does hyperhomocysteinemia contribute to gastric carcinogenesis in *Helicobacter pylori* infected patients? *Gut*. 2007; 56(10): 1480.

Phelip JM, Ducros V, Faucheron JL, Flourie B, Roblin X. Association of hyperhomocysteinemia and folate deficiency with colon tumors in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2008; 14(2): 242-248.

Pique JM, Whittle BJR, Esplugues JV. The vasodilator role of endogenous nitric oxide in the rat gastric microcirculation. *Eur J Pharmacol*. 1989; 174: 293–296.

Raijmakers MTM, Schilders GW, Roes EM, van Tits LJH, Hak-Lemmers HLM, Steegers EAP, Peters WHM. N-Acetylcysteine improves the disrupted thiol redox balance after methionine loading. *Clin Sci*. 2003; 105: 173-180.

Redmond HP, Wang JH, Bouchier-Hayes D. Taurine attenuates nitric oxide- and reactive oxygen intermediate-dependent hepatocyte injury. *Arch Surg*. 1996; 131: 1280–1288.

Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF S, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*. 1990; 101: 746-752.

Refsum H, Smith AD, Ueland PM, McPartlin C, Scott JM. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: An Expert Opinion. *Clinical Chemistry*. 2004; 50(1): 3-32.

Rezvan A, Ni CW, Alberts-Grill N, Jo H. Animal, in vitro, and ex vivo models of flow-dependent atherosclerosis: role of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 15(5): 1433–1448.

Rivera LR, Poole DP, Thacker M, Furness JB. The involvement of nitric oxide synthase neurons in enteric neuropathies. *Neurogastroenterol Motil.* 2011; 23: 980-988.

Robin S, Courderot-Masuyer C, Nicod L, Jacqueson A, Richert L, Berthelot A. Opposite effect of methionine-supplemented diet, a model of hyperhomocysteinemia, on plasma and liver antioxidant status in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Biochem.* 2004; 15(2): 80-89.

Roes EM, Raijmakers MTM, Peters WHM, Steegers EAP. Effects of oral N-acetylcysteine on plasma homocysteine and whole blood glutathione levels in healthy, non-pregnant women. *Clin Chem Lab Med.* 2002; 40: 496-498.

Romagnoulo J, Federak Rn, Dias VC, Bumforth F, Teltcher M. Hyperhomocysteinemia and inflammatory bowel disease: prevalence and predictors in cross-sectional study. *Am J Gastroenterol.* 2001; 23: 2143-2140.

Salim AS. Role of sulfhydryl-containing agents in the healing of erosive gastritis and chronic gastric ulceration in the rat. *J Pharm Sci.* 1992; 81(1): 70-73.

Sandhiya S, Sandhiya S, Dkhar A. Potassium channels in health, disease & development of channel modulators. *Indian J Med Res.* 2009; 129: 223-232.

Santoso AGH, Lo WN, Liang W. Differential Effects of K⁺ Channel Blockers on Phasic Contractility of Transverse and Longitudinal Rat Detrusor Strips. *Open Journal of Urology.* 2011; 1: 60-65.

Sarna LK, Siow YL. The CBS/CSE system: a potential therapeutic target in NAFLD? *Can J Physiol Pharmacol.* 2015; 93(1): 1-11.

Schaffer S, Azuma J, Takahashi K, Mozaffari M. Why is taurine cytoprotective?. *Adv Exp Med Biol.* 2003; 526: 307-321.

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012; 9(7): 676-682.

Scholze A, Rinder C, Beige J, Riezler R, Zidek W, Tepel M. Acetylcysteine reduces plasma homocysteine concentration and improves pulse pressure and endothelial function in patients with end-stage renal failure *Circulation*. 2004; 109: 369-374.

Sies H. *Oxidative stress, oxidants and antioxidants*, New York, Academic Press. 1991.

Silberg DG, Furth EEJ, Taylor K, Schuck T, Chiou T, Traber PG. CDX1 protein expression in normal, metaplastic and neoplastic human alimentary tract epithelium. *Gastroenterology*. 1997; 113: 478–486.

Song YS, Rosenfeld ME. Methionine-induced hyperhomocysteinemia promotes superoxide anion generation and NFkappaB activation in peritoneal macrophages of C57BL/6 mice. *J Med Food*. 2004; 7(2): 229-234.

Stampfer MJ, Malinow MR. Can lowering homocysteine levels reduce cardiovascular risk? *N Engl J Med*. 1995; 332: 328-329.

Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to coppercatalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest*. 1986; 77: 1370-1376.

Stipanuk MH. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu Rev Nutr*. 2004; 24: 539-577.

Stojanović M, Šćepanović Lj, Mitrović D, Šćepanović V, Stojanović T, Stojković M, Ilić S, Đurić D. Rat duodenal motility *in vitro*: procinetic effects of D,L-homocysteine thiolactone and modulation of nitric oxide mediated inhibition. *Arch Biol Sci*. 2013; 65(4): 1323-1330.

Stojanović M, Šćepanović Lj, Bosnić O, Mitrović D, Jozanov-Stankov O, Šćepanović V, Šćepanović R, Stojanović T, Ilić S, Djuric D. The effects of the acute administration of D,L-homocysteine thiolactone on antioxidative status of rat intestine and liver. *Acta Vet-Beograd*. 2016; 66(1): 26-36.

Sudduth TL, Powell DK, Smith CD, Greenstein A, Wilcock DM. Induction of hyperhomocysteinemia models vascular dementia by induction of cerebral microhemorrhages and neuroinflammation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013; 33: 708–715.

Sun M, Zigman S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autooxidation. *Anal Biochem*. 1987; 90: 81-89.

Szilvassy Z, Nagy I, Szilvassy J, Jakab I, Csati S, Lonovics J. Impaired nitrergic relaxation of the sphincter of Oddi of hyperlipidaemic rabbits. *Eur J Pharmacol*. 1996; 301: 17-18.

Szlachcic A, Bilski R, Dziadusiak-Sokolowska A, Michalski J, Mroczka J. The effect of nitric oxide donors and L-arginine on the gastric electrolyte barrier. *J Physiol Pharmacol*. 2001; 52: 211–220.

Tahan G, Tarcin O, Tahan V, Eren F, Gedik N, Sahan E, Biberoglu N, Guzel S, Bozbas A, Tozun N, Yucel O. The effects of N-acetylcysteine on bile duct ligation-induced liver fibrosis in rats. *Dig Dis Sci*. 2007; 52: 3348-3354.

Takahashi T. Pathophysiological significance of neuronal nitric oxide synthase in the gastrointestinal tract. *J Gastroenterol*. 2003; 38: 421-430.

Thanan R, Oikawa S, Hiraku Y, Ohnishi S, Ma N, Pinlaor S, Yongvanit P, Kawanishi S, Murata M. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(1): 193–217.

Toborek M, Kopiczna-Grzebieniak E, Drozd M, Wieczorek M. Increased lipid peroxidation as a mechanism of methionine-induced atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*. 1995; 115: 217–234.

Toborek M, Kopieczna-Grzebieniak E, Drozd M, Wieczorek M. Increased lipid peroxidation and antioxidant activity in methionine-induced hepatitis in rabbits. *Nutrition*. 1996; 12: 534–537.

Toda N, Baba H, Okamura T. Role of nitric oxide in non-adrenergic, non-cholinergic nerve-mediated relaxation in dog duodenal longitudinal muscle strips. *Jpn J Pharmacol*. 1991; 53: 281-284.

Toda N, Herman AG. Gastrointestinal function regulation by nitrergic efferent nerves. *Pharmacol Rev*. 2005; 57: 315-338.

Tottrup A, Svane D, Forman A. Nitric oxide mediating NANC inhibition in opossum lower esophageal sphincter. *Am J Physiol*. 1991; 260: 385-389.

Ueland PM, Refsum H, Brattstrom L. Atherosclerotic cardiovascular disease, hemostasis and endothelial function. New York: Marcel Dekker. 1992; 183–196.

Ueland PM. Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin Chem*. 1995; 41: 340-342.

Uraz S, Tahan G, Aytakin H, Tahan V. N-acetylcysteine expresses powerful anti-inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic acid-induced colitis in rats. *Scand J Clin Lab Invest*. 2013; 73(1): 61-66.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006; 160(1): 1-40.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39(1): 44-84.

Venes D, Clarence WT. In: Venes D, editor. *Taber's Cyclopedic Medical Dictionary*. 21st ed. Philadelphia: FA Davis. 2005; 1089.

Ventura P, Panini R, Pasini MC, Scarpetta G, Salvioli G. N-Acetyl-cysteine reduces homocysteine plasma levels after single intravenous administration by increasing thiols urinary excretion. *Pharmacol Res.* 1999; 40: 345-350.

Ventura P, Panini R, Abbati G, Marchetti G, Salvioli G. Urinary and plasma homocysteine and cysteine levels during prolonged oral N-acetylcysteine therapy. *Pharmacology.* 2003; 68: 105-114.

Verhoef P, Steenge GR, Boelsma E, van Viet T, Olthof MR, Katan MB. Dietary serine and cysteine attenuate the homocysteine-raising effect of dietary methionine: a randomized crossover trial in humans. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80: 674-679.

Vuaden FC, Savio LE, Piato AL, Pereira TC, Vianna MR, Bogo MR, Bonan CD, Wyse AT. Long-term methionine exposure induces memory impairment on inhibitory avoidance task and alters acetylcholinesterase activity and expression in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurochem. Res.* 2012; 37(7): 1545–1553.

Wiklund O, Fager G, Andersson A, Lundstam U, Masson P, Hultberg B. N-Acetylcysteine treatment lowers plasma homocysteine but not serum lipoprotein(a) levels. *Atherosclerosis.* 1996; 119: 99-106.

Woo CW, Prathapasinghe GA, Siow YL. Hyperhomocysteinemia induces liver injury in rat: Protective effect of folic acid supplementation. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1762(7): 656-665.

Yalçinkaya S, Ünlüçerçi Y, Uysal M. Methionine-supplemented diet augments hepatotoxicity and prooxidant status in chronically ethanol-treated rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2007; 58: 455–459.

Yan SK, Chang T, Wang H, Wu L, Wang R, Meng QH. Effects of hydrogen sulfide on homocysteine-induced oxidative stress in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 351: 485-491.

Zepeda-Gómez S, Montano-Loza A, Zapata-Colindres JC, Vargas-Vorackova F, Majluf-Cruz A, Uscanga L. Oral challenge with a methionine load in patients with inflammatory bowel disease: a better test to identify hyperhomocysteinemia. *Inflamm Bowel Dis*. 2008; 14(3): 383-388.

Zezos P, Kouklakis G, Saibil F. Inflammatory bowel disease and thromboembolism. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(38): 13863-13878.

Zhang Y, He Y, Zong Y, Guo J, Sun L, Ma Y, Dong W, Gui L. 17 β -estradiol attenuates homocysteine-induced oxidative stress and inflammatory response as well as MAPKs cascade via activating PI3-K/Akt signal transduction pathway in Raw 264.7 cells. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2015; 47: 65-72.

Zhang D, Wen X, Wu W, Guo Y, Cui W. Elevated homocysteine level and folate deficiency associated with increased overall risk of carcinogenesis: meta-analysis of 83 case-control studies involving 35,758 individuals. *PLoS One*. 2015; 10(5): e0123423.

Zhou J, Werstuck GH, Lhotak S, De Koning ABL, Sood SK, Hossain GS. Association of multiple cellular stress pathway with accelerated atherosclerosis in hyperhomocysteinemic apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2004; 110: 207-213.

SPISAK SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU

AchE - acetilholinesteraza

ABTS - 2,2,-azino-di-3-etilbenitiazolin sulfonat

ANOVA - analiza varijanse

AOS - sistem antioksidativne zaštite (eng. antioxidant defence system)

BH4 - tetrahidrobiopterin

BHT - butilirani hidroksi-toluen

CAT - katalaza

C β S - cistationin- β -sintaza

D,L-HCT - D,L-homocistein tiolakton

DTNB - 5,5 ditiobis-2-nitrobenzoeva kiselina

FAD - flavin adenin dinukleotid

GI – gastrointestinalni (trakt)

GPx - glutation peroksidaza

GR - glutation reduktaza

GSH - redukovani glutation

GST - glutation-S-transferaza

HCl - hlorovodonična kiselina

Hcy - homocistein

HHC - hiperhomocisteinemija

H⁺ - vodonik

H₂O₂ - vodonik peroksid

IBC - inflamatorna boleost creva

i.p. - intraperitonealno

KB – Kronova boleost

L-NAME - L-N-nitro-L-arginin metil ester

MAT - metionin adenzil-transferaza

MDA - malondialdehid

MTHFR - 5, 10-metilen tetrahidrofolat reduktaza

NaCl - natrijum hlorid

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NANH – neadrenergička neholinergička (inervacija)

NO - azot monoksid

PBS - fosfatni pufer (eng. phosphate buffer solution)

pH - negativni logaritam koncentracije vodonikovih jona

ROS - reaktivne vrste kiseonika (eng. reactive oxygen species)

SAH - s- adenzilhomocistein

SAM - s - adenzilmetionin

SDK - kalijumovi kanali na istežanje (eng. stretch -dependent K⁺ channels)

SOD - superoksid dismutaza

TAS - totalni antioksidativni status

TBA - tiobarbituratna kiselina

t-BOOH - terc-butilhidroperoksid

TEA - tetraetilamonijum hlorid

UK – ulcerozni kolitis

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Marija Stojanović rođena je 14.09.1985. godine u Kraljevu. Medicinski fakultet u Beogradu upisala je školske 2004/2005. god., a završila 2010. god. sa prosečnom ocenom 9,19. Nastavu iz medicinske fiziologije pohađala je 2005/2006. god. a završni ispit položila je sa ocenom 10. Bila je demonstrator na Institutu za anatomiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu tokom dve školske godine: 2005/2006., 2006/2007. U toku studija učestvovala je na kongresima studenata medicine u zemlji i inostranstvu. Interesovanje za oblast medicinske fiziologije pokazala je odabirom teme za diplomski ispit pod nazivom: „Uloga gastrointestinalnog sistema u homeostazi“. Diplomski ispit je odbranila 30.11.2010. godine pred komisijom u sastavu: prof. dr Ljiljana Šćepanović, mentor, prof. dr Dragan Đurić i prof. dr Dušan Mitrović. Godine 2010. upisala je specijalističke akademske studije iz oblasti Eksperimentalne fiziologije i patološke fiziologije. Završni akademski specijalistički rad pod nazivom: „Efekti D,L-homocistein tiolaktona na spontani motilitet izolovanog duodenuma pacova i neurotransmisiju posredovanu azot monoksidom“ odbranila je 12.07.2012. godine pred komisijom u sastavu : prof. dr Dragan Đurić, predsednik, prof. dr Vesna Lačković i prof. dr Ljiljana Šćepanović, mentor. Od 2011. god. je student doktorskih studija, smer: fiziološke nauke. Zdravstvenu specijalizaciju iz kliničke biohemije upisala je 2013. god. Zaposlena je na Institutu za medicinsku fiziologiju u zvanju asistenta od 03.11.2013. Izvodi nastavu na osnovnim i postdiplomskim studijama. Učestvovala je u izadi Praktikumima iz medicinske fiziologije za osnovnu nastavu. Autor je i koautor u 19 radova i publikacija, od kojih je 4 rada štampano *in extenso* u časopisima sa JCR liste.

PRILOZI

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Marija Stojanović

broj upisa FN-04/11

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

"FUNKCIONALNE, BIOHEMIJSKE I HISTOLOŠKE PROMENE U DIGESTIVNOM TRAKTU PACOVA U USLOVIMA AKUTNE HIPERHOMOCISTEINEMIJE ILI SUBHRONIČNE STIMULACIJE METIONINOM,"

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 12.05.2016. god.

Marija Stojanović

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora ___ Marija Stojanović _____

Broj upisa _____ FN-04/11 _____

Studijski program ___ Fiziološke nauke _____

Naslov rada

“FUNKCIONALNE, BIOHEMIJSKE I HISTOLOŠKE PROMENE U DIGESTIVNOM
TRAKTU PACOVA U USLOVIMA AKUTNE HIPERHOMOCISTEINEMIJE ILI
SUBHRONIČNE STIMULACIJE METIONINOM,,

Mentor _____ prof. dr Ljiljana Šćepanović _____

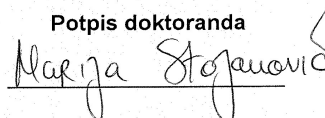
Potpisani _____ Marija Stojanović _____

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 12.05.2016. god.

Potpis doktoranda


Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

“FUNKCIONALNE, BIOHEMIJSKE I HISTOLOŠKE PROMENE U DIGESTIVNOM TRAKTU PACOVA U USLOVIMA AKUTNE HIPERHOMOCISTEINEMIJE ILI SUBHRONIČNE STIMULACIJE METIONINOM „

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 12.05.2016. god.

Marica Stojanović

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslabodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.