

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Dušan D. Todorović

**EFEKTI VITAMINA B6, FOLNE KISELINE I
DOZIRANE FIZIČKE AKTIVNOSTI NA
BIOHEMIJSKE I HISTOMORFOLOŠKE
PROMENE KARDIOVASKULARNOG I
DIGESTIVNOG SISTEMA PACOVA,
UZROKOVANE SUBHRONIČNOM
HIPERHOMOCISTEINEMIJOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Dušan D. Todorović

**EFFECTS OF VITAMIN B6, FOLIC ACID AND
DOSED PHYSICAL ACTIVITY ON
BIOCHEMICAL AND HISTOMORPHOMETRIC
CHANGES IN CARDIOVASCULAR AND
DIGESTIVE SYSTEM OF RATS, CAUSED BY
SUBCHRONIC HYPERHOMOCYSTEINEMIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023.

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

Komentor doktorske disertacije: doc. dr Marija Stojanović, docent na Institutu za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

KOMISIJA ZA OCENU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE:

1. Prof. dr Zvezdana Kojić, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Kristina Gopčević, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Milica Labudović Borović, vanredni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
4. Doc. dr Sanja Stanković, docent Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu
5. Prof. dr Vladimir Jakovljević, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu

Datum odbrane: _____

Ova doktorska teza je realizovana u:

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

Doktorska teza je realizovana u okviru projekta Ministarstva nauke Republike Srbije broj 175043 i 200110 „Efekti homocisteina i homocisteinu srodnih supstanci na kardiovaskularni sistem: uloga gasnih transmitera NO, H₂S i CO“, čiji je rukovodilac Prof. dr Dragan Đurić.

Zahvalnica

Zahvaljujem mentoru, prof. dr Draganu Đuriću na osmišljavanju koncepta rada, prenesenom znanju i iskustvu, pravilnom usmeravanju i savetovanju, superviziji, idejama tokom rada na ovoj doktorskoj tezi.

Zahvaljujem komentorki, doc. dr Mariji Stojanović koja mi je od mojih prvih studentskih dana na fiziologiji bila podrška. Hvala na motivaciji, prijateljskim savetima i razumevanju.

Zahvaljujem mentoru doktorskih studija, prof. dr Ljiljani Šćepanović koja je uvek verovala u mene, koja je uvek bila ogromna podrška i koja je prepoznala moj trud, angažovanje i moju ljubav prema nauci.

Hvala članovima komisije, prof. dr Zvezdani Kojić, prof. dr Kristini Gopčević, prof. dr. Milici Labudović Borović, prof. dr Vladimiru Jakovljeviću i doc. dr Sanji Stanković na korisnim sugestijama koje su doprinele kvalitetu ove doktorske teze.

Hvala mojim dragim kolegama doc. dr Jovani Jakovljević Uzelac, doc. dr Slavici Mutavdžin Krmeta, Jovanu Despotoviću, Dragani Pavlović, kao i članovima kolektiva Instituta za medicinsku fiziologiju „Richard Burijan“ i studentima na pomoći i podršci prilikom eksperimentalnog rada.

Hvala prof. dr Kristini Gopčević i doc. dr Ani Medić na prenesenom znanju, podršci, savetovanju, motivaciji i pomoći tokom biohemijske analize uzoraka.

Hvala prof. dr. Milici Labudović Borović, doc. dr Jeleni Rakočević i doc. dr Sanji Despotović na pomoći oko histološke analize uzoraka.

Hvala prof. dr Dušanu Mitroviću. Njegovo poverenje mi je mnogo olakšalo rad.

Posebnu zahvalnost upućujem svojoj majci i sestri koje veruju u mene, koje su uvek tu da daju podršku i korisne savete za život, da daju praktične smernice mojoj intuitivnoj prirodi. Hvala sestriću Vuku za trenutke radosti i bezbrižnosti. Hvala mom ocu i mojim dragim bakama i dekama koji, nisu dočekali da zajedno podelimo ovaj trenutak, ali se uprkos tome raduju. Hvala im što su me naučili da je važno biti istrajan, strpljiv, što su mi dali priliku da uvidim značaj i snagu blage naravi i što su mi preneli ljubav prema prirodi, edukaciji i nauci i potrebu da postavljam pitanja i traganje za odgovorima.

Hvala mojoj tetki Dobrili, teći Radetu i braći Nikoli i Ivanu na svojoj podršci koju su mi u životu pružili.

Hvala mom bratu Nikoli Iliću za podršku i ohrabrenja koja su me ojačala.

Zahvaljujem svim svojim prijateljima: Miroslavu, Ani, Katarini, Anđeli, Jovanu, Ninoslavi, Mileni, Čedomiru i Aleksandru. Njihovo bodrenje i divni trenuci koje zajedno delimo mnogo su olakšali čitav proces rada.

Na kraju, hvala mojoj verenici Jovani koja je uvek tu uz mene da delimo i lepe i teške trenutke, koja je uvek imala razumevanje i dala podršku za moj rad, koja je moja najveća inspiracija, moja budućnost i koja je tu da zajedno otvaramo nove početke.

EFEKTI VITAMINA B6, FOLNE KISELINE I DOZIRANE FIZIČKE AKTIVNOSTI NA BIOHEMIJSKE I HISTOMORFOLOŠKE PROMENE KARDIOVASKULARNOG I DIGESTIVNOG SISTEMA PACOVA, UZROKOVANE SUBHRONIČNOM HIPERHOMOCISTEINEMIJOM

REZIME

Cilj: Istraživanje efekata dvonedeljne primene homocisteina (Hcy) i četvoronedeljne primene vitamina B6, folne kiseline (FK) i dozirane fizičke aktivnosti u uslovima hiperhomocisteinemije (HHcy) na biohemijske biomarkere u serumu i plazmi, parametre oksidativnog stresa, aktivnosti metaboličkih enzima, aktivnosti matriks metaloproteinaza (MMP), kao i histološke i histomorfometrijske promene srca, aorte, jetre i kolona.

Materijal i metode: Eksperimentalni protokol je izveden u toku 28 uzastopnih dana. Mužjaci pacova soja *Wistar albino* su randomizovano podeljeni u 12 grupa (10 pacova u svakoj grupi): kontrolna grupa K-14: aplikacija fiziološkog rastvora (fiziološki rastvor 0,9% NaCl (f.r.) 0,2 mL s.c.) dva puta na dan u razmaku od 8 sati, 14 dana; eksperimentalna grupa H-14: aplikacija Hcy (0,45 $\mu\text{mol/g tm. s.c.}$) dva puta na dan u razmaku od 8 sati, 14 dana; kontrolna grupa K-28: aplikacija fiziološkog rastvora (f.r. 0,2 mL s.c.) dva puta na dan u razmaku od 8 sati, 14 dana i fiziološkog rastvora (f.r. 0,5 mL i.p.) jedan put dnevno, 28 dana; eksperimentalna grupa H-28: aplikacija Hcy (0,45 $\mu\text{mol/g tm. s.c.}$) dva puta na dan u razmaku od 8 sati, 14 dana i fiziološkog rastvora (f.r. 0,5 mL i.p.) jedan put dnevno, 28 dana; kontrolna grupa K-B6: aplikacija fiziološkog rastvora (f.r. 0,2 mL s.c.) dva puta na dan u razmaku od 8 sati, 14 dana i vitamina B6 (7 mg/kg tm. i.p.) jedan put dnevno, 28 dana; eksperimentalna grupa H-B6: aplikacija Hcy (0,45 $\mu\text{mol/g tm. s.c.}$) dva puta na dan u razmaku od 8 sati, 14 dana i vitamina B6 (7 mg/kg tm. i.p.) jedan put dnevno, 28 dana; kontrolna grupa K-FK: aplikacija fiziološkog rastvora (f.r. 0,2 mL s.c.) dva puta na dan u razmaku od 8 sati, 14 dana i FK (5 mg/kg tm. i.p.) jedan put dnevno, 28 dana; eksperimentalna grupa H-FK: aplikacija Hcy (0,45 $\mu\text{mol/g tm. s.c.}$) dva puta na dan u razmaku od 8 sati, 14 dana i FK (5 mg/kg tm. i.p.) jedan put dnevno, 28 dana; kontrolna grupa K-B6+FK: aplikacija fiziološkog rastvora (f.r. 0,2 mL s.c.) dva puta na dan u razmaku od 8 sati, 14 dana i vitamina B6 (7 mg/kg tm. i.p.) i FK (5 mg/kg tm. i.p.) jednom dnevno, 28 dana; eksperimentalna grupa H-B6+FK: aplikacija Hcy (0,45 $\mu\text{mol/g tm. s.c.}$) dva puta na dan u razmaku od 8 sati, 14 dana i vitamina B6 (7 mg/kg tm. i.p.) i FK (5 mg/kg tm. i.p.) jednom dnevno, 28 dana; kontrolna grupa K-FA: aplikacija fiziološkog rastvora (f.r. 0,2 mL s.c.) dva puta na dan u razmaku od 8 sati, 14 dana i tretman aerobnom fizičkom aktivnošću (30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0°), 28 dana; eksperimentalna grupa H-FA: aplikacija Hcy (0,45 $\mu\text{mol/g tm. s.c.}$) dva puta na dan u razmaku od 8 sati, 14 dana i tretman aerobnom fizičkom aktivnošću (30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0°), 28 dana. Određivani su kardiovaskularni biomarkeri u serumu: koncentracija Hcy, ukupnog holesterola, lipoproteina velike gustine (HDL), lipoproteina male gustine (LDL), triglicerida, aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH), koncentracija visoko senzitivnog troponina T, vitamina B12 i folata; hemostatski biomarkeri u plazmi: koncentracija fibrinogena, D-dimera i von Willebrandovog faktora (vWF); kao i hepato-renalno-pankreatični biomarkeri u serumu: koncentracija glukoze, ukupnih proteina, albumina, aktivnost aspartat aminotransferaze (AST), aktivnost alanin aminotransferaze (ALT), koncentracija uree, kreatinina, mokraćne kiseline, aktivnost amilaze i koncentracija C reaktivnog proteina. U tkivu srca, jetre i kolona određivani su parametri oksidativnog stresa: aktivnost katalaze (CAT), superoksid dismutaze (SOD) - ukupna aktivnost i distribucija izoformi, koncentracija malondialdehida (MDA), aktivnosti i distribucija izoformi LDH i malat dehidrogenaze (MDH), relativne aktivnosti MMP izoformi: MMP-2 i MMP-9. Pored toga, tkivo srca, aorte, jetre i kolona korišćeno je za histološku analizu.

Rezultati: Aplikacija Hcy dovela je do razvoja HHcy, porasta serumske koncentracije LDL, vitamina B12, glukoze, ukupnih proteina, albumina i kreatinina i serumske aktivnosti AST, porasta ukupne aktivnosti SOD i koncentracije MDA, izazvala je porast debljine zida leve komore i debljine zida desne komore, dovela do porasta debljine tunike medije aorte i do porasta aktivnosti MMP-9 u jetri, dovela do smanjenja ukupne aktivnosti SOD u kolonu i porasta dubine Liberkinovih kripti, debljine tunike mukoze i broja ćelija u lamini propriji kolona. Aplikacija vitamina B6 dovela je do sniženja serumske koncentracije Hcy i do smanjenja ukupne aktivnosti SOD i koncentracije MDA u srcu, dovela je do smanjenja debljine zida desne komore i do sniženja koncentracije MDA u jetri, izazvala je smanjenje

dubine Liberkinovih kripti, debljine tunike mukoze i broja ćelija u lamini propriji kolona. Aplikacija FK dovela je do sniženja serumske koncentracije Hcy i do sniženja koncentracije MDA u srcu, izazvala je smanjenje debljine zida desne komore, sniženje koncentracije MDA u jetri i dovela je do smanjenja dubine Liberkinovih kripti, debljine tunike mukoze i ukupne debljine zida kolona. Kombinovana aplikacija vitamina B6 i FK dovela je do sniženja koncentracije Hcy, izazvala je sniženje serumske koncentracije LDL, vitamina B12, albumina i kreatinina i porast glikemije, dovela je do pada ukupne aktivnosti SOD i povišenja koncentracije MDA u srcu, dovela je do smanjenja aktivnosti CAT u kolonu i smanjenja dubine Liberkinovih kripti i ukupne debljine zida kolona. Tretman doziranom aerobnom fizičkom aktivnošću nije značajno uticao na sniženja koncentracije Hcy, izazvao je sniženje koncentracije HDL, vitamina B12, albumina i aktivnosti amilaze i povišene koncentracije LDL u serumu, kao i povišene koncentracije fibrinogena i vWF u plazmi, doveo je do smanjenja ukupne aktivnosti SOD u srcu, doveo je do porasta ukupne aktivnosti LDH i MDH u srcu, i jetri, i do porasta aktivnosti LDH u kolonu, doveo je do pada koncentracije MDA u jetri i do povećanja ukupne aktivnosti SOD, a sniženja koncentracije MDA u kolonu, izazvao je smanjenje dubine Liberkinovih kripti i debljine tunike medije.

Zaključci: Samostalna primena vitamina B6 i FK tokom četiri nedelje kod pacova sa HHcy dovodi do značajnih pozitivnih efekata na HHcy izmenjene biohemijske biomarkere, parametre oksidativnog stresa, aktivnost metaboličkih enzima, kao i na histomorfometrijske parametre, dok se kombinovana aplikacija vitamina B6 i FK pokazala manje efikasnom. Tretman doziranom aerobnom fizičkom aktivnošću nije uticao na koncentraciju Hcy, ali je u uslovima HHcy značajno uticao na aktivnost metaboličkih enzima.

Ključne reči: digestivni sistem, fizička aktivnost, folna kiselina, hiperhomocisteinemija, homocistein, kardiovaskularni sistem, metabolizam srca, oksidativni stres, pacov, vitamin B6.

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Fiziološke nauke

UDK broj: _____

**EFFECTS OF VITAMIN B6, FOLIC ACID AND DOSED PHYSICAL ACTIVITY ON
BIOCHEMICAL AND HISTOMORPHOMETRIC CHANGES IN CARDIOVASCULAR AND
DIGESTIVE SYSTEM OF RATS, CAUSED BY SUBCHRONIC
HYPERHOMOCYSTEINEMIA**

ABSTRACT

Objective: Examination of the effects of a two-week application of homocysteine (Hcy) and a four-week application of vitamins B6, folic acid (FK) and dosed physical activity under conditions of hyperhomocysteinemia (HHcy) on biochemical biomarkers in serum and plasma, parameters of oxidative stress, activities of metabolic enzymes, activities of matrix metalloproteinases (MMP), as well as histological and histomorphometric changes in the heart, aorta, liver, and colon.

Materials and methods: Experimental protocol was conducted during 28 consecutive days. Male *Wistar albino* rats were randomly divided into 12 groups (10 rats in each group): control group K-14: administration of saline (physiological solution 0.9% NaCl (p.s.) 0.2 mL s.c.) twice daily at 8-hour intervals for 14 days; experimental group H-14: administration of Hcy (0.45 $\mu\text{mol/g}$ b.w. s.c.) twice daily at 8-hour intervals for 14 days; control group K-28: administration of physiological saline (0.9% p.s. 0.2 mL s.c.) twice daily at 8-hour intervals for 14 days, and physiological saline (p.s. 0.5 mL i.p.) once daily for 28 days; experimental group H-28: administration of Hcy (0.45 $\mu\text{mol/g}$ b.w. s.c.) twice daily at 8-hour intervals for 14 days, and physiological saline (p.s. 0.5 mL i.p.) once daily for 28 days; control group K-B6: administration of physiological saline (p.s. 0.2 mL s.c.) twice daily at 8-hour intervals for 14 days, and vitamin B6 (7 mg/kg b.w. i.p.) once daily for 28 days; experimental group H-B6: administration of Hcy (0.45 $\mu\text{mol/g}$ b.w. s.c.) twice daily at 8-hour intervals for 14 days and vitamin B6 (7 mg/kg b.w. i.p.) once daily for 28 days; control group K-FK: administration of physiological saline (p.s. 0.2 mL s.c.) twice daily at 8-hour intervals for 14 days, and FK (5 mg/kg b.w. i.p.) once daily for 28 days; experimental group H-FK: administration of Hcy (0.45 $\mu\text{mol/g}$ b.w. s.c.) twice daily at 8-hour intervals for 14 days, and FK (5 mg/kg b.w. i.p.) once daily for 28 days; control group K-B6+FK: administration of physiological saline (p.s. 0.2 mL s.c.) twice daily at 8-hour intervals for 14 days, and vitamin B6 (7 mg/kg b.w. i.p.) and FK (5 mg/kg b.w. i.p.) once daily for 28 days; experimental group H-B6+FK: administration of Hcy (0.45 $\mu\text{mol/g}$ b.w. s.c.) twice daily at 8-hour intervals for 14 days, and vitamin B6 (7 mg/kg b.w. i.p.) and FK (5 mg/kg b.w. i.p.) once daily for 28 days; control group K-FA: administration of physiological saline (p.s. 0.2 mL s.c.) twice daily at 8-hour intervals for 14 days, and aerobic physical activity treatment (30 min/day, speed 20 m/min, inclination 0°) for 28 days; experimental group H-FA: administration of Hcy (0.45 $\mu\text{mol/g}$ b.w. s.c.) twice daily at 8-hour intervals for 14 days, and aerobic physical activity treatment (30 min/day, speed 20 m/min, inclination 0°) for 28 days. Cardiovascular biomarkers in serum were determined: concentrations of homocysteine (Hcy), total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), triglycerides, activity of lactate dehydrogenase (LDH), concentrations of high-sensitive troponin T, vitamin B12, and folates; hemostatic biomarkers in plasma: concentrations of fibrinogen, D-dimer, and von Willebrand factor (vWF); as well as hepato-renal-pancreatic biomarkers in serum: concentrations of glucose, total proteins, albumin, activity of aspartate aminotransferase (AST), activity of alanine aminotransferase (ALT), concentrations of urea, creatinine, uric acid, activity of amylase, and concentrations of C-reactive protein. In the tissues of the heart, liver, and colon, parameters of oxidative stress were determined: activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) - total activity and isoform distribution, concentrations of malondialdehyde (MDA), activities and isoform distribution of LDH and malate dehydrogenase (MDH), relative activities of MMP isoforms: MMP-2 and MMP-9. In addition, tissues of the heart, aorta, liver, and colon were used for histological analysis.

Results: The application of Hcy led to the development of HHcy, an increase in the serum concentration of LDL, vitamin B12, glucose, total protein, albumin, and creatinine, as well as an elevation in the serum activity of AST. Additionally, it resulted in an increase in the total activity of SOD and MDA concentration, an increase in the left ventricular wall thickness and the right ventricular wall thickness, caused an elevation in the aortic tunica media thickness, and led to an upsurge in the MMP-9 activity in the liver. It also resulted in a reduction in the total SOD activity in the colon, an increase in the depth of crypts of Lieberkuhn, mucosal tunica thickness, and the number of cells in the lamina propria of the colon. Upon application, vitamin B6 led to a decrease in serum Hcy concentration and a reduction in the

total activity of SOD and MDA concentration in the heart. It decreased the thickness of the right ventricular wall and reduced MDA concentration in the liver. Furthermore, it caused a decrease in the depth of crypts of Lieberkuhn, mucosal tunica thickness, and the number of cells in the lamina propria of the colon. The FK application resulted in a decrease in serum Hcy concentration and a reduction in MDA concentration in the heart. It decreased the right ventricular wall thickness, the MDA concentration in the liver, and the depth of crypts of Lieberkuhn, mucosal tunica thickness, and total colon wall thickness. The combined application of vitamins B6 and FK led to a decrease in Hcy concentration and decreased serum concentrations of LDL, vitamin B12, albumin, and creatinine, while increasing glycemia. It also resulted in a decrease in the total activity of SOD and an increase in MDA concentration in the heart. Furthermore, it decreased CAT activity in the colon and reduced the depth of crypts of Lieberkuhn and total colon wall thickness. Treatment with measured aerobic physical activity did not significantly influence the decrease in Hcy concentration. However, it did cause a decrease in the concentration of HDL, vitamin B12, albumin, and amylase activity, while leading to an increase in serum LDL concentration. Additionally, there was an increase in fibrinogen and vWF concentration in the plasma, a reduction in the total SOD activity in the heart, an increase in the total activity of LDH and MDH in the heart and liver, and an elevation in LDH activity in the colon. Moreover, it resulted in a decrease in MDA concentration in the liver, an increase in the total SOD activity, and a decrease in MDA concentration in the colon, and it caused a decrease in the depth of crypts of Lieberkuhn and the thickness of the tunica media.

Conclusions: The stand-alone application of vitamins B6 and FK over a four-week period in rats with HHcy has shown significant positive effects on HHcy-altered biochemical biomarkers, oxidative stress parameters, metabolic enzyme activities, as well as on histomorphometric parameters. However, the combined application of vitamins B6 and FK proved to be less effective. Treatment with dosed aerobic physical activity did not influence the Hcy concentration, but, under the conditions of HHcy, it significantly impacted the activity of metabolic enzymes.

Key words: cardiac metabolism, cardiovascular system, digestive system, folic acid, homocysteine, hyperhomocysteinemia, oxidative stress, physical activity, rat, vitamin B6.

Research area: Medicine

Research field: Physiological sciences

UDK No: _____

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Istorijat otkrića sumporovitih amino kiselina	2
1.2. Biološki značaj atoma sumpora u sumporovitim amino kiselinama.....	2
1.3. Metabolizam sumporovitih aminokiselina	3
1.4. Otkriće medicinskog značaja hiperhomocisteinemijske.....	5
1.5. Etiologija hiperhomocisteinemijske	6
1.6. Efekti hiperhomocisteinemijske u kardiovaskularnom sistemu.....	8
1.6.1. Uloga hiperhomocisteinemijske u razvoju endotelne disfunkcije	8
1.6.3. Uloga hiperhomocisteinemijske u patofiziološkim promenama metabolizma azot monoksida.....	11
1.6.4. Uloga hiperhomocisteinemijske u patofiziološkim promenama metabolizma vodonik sulfida	12
1.6.5. Uloga hiperhomocisteinemijske u patofiziološkim promenama metabolizma lipida.....	13
1.6.7. Uloga hiperhomocisteinemijske u patofiziološkim promenama stepena metilacije molekula u ćelijama.....	15
1.7. Efekti hiperhomocisteinemijske na jetru	16
1.8. Efekti hiperhomocisteinemijske u gastrointestinalnom sistemu	18
1.9. Biološki značaj vitamina B6.....	19
1.10. Biološki značaj folne kiseline	21
1.11. Fizička aktivnost i hiperhomocisteinemijska	23
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	24
3. MATERIJAL I METODE	27
3.1. Eksperimentalne životinje	28
3.2. Eksperimentalne grupe	28
3.3. Protokol aerobne fizičke aktivnosti.....	30
3.4. Varijable koje su praćene u studiji.....	31
3.4.1. Merenje biohemijskih parametara u serumu i plazmi.....	31
3.4.2. Merenje biohemijskih parametara u tkivu srca, jetre i kolona	31
3.4.2.1. Određivanje parametara oksidativnog stresa u tkivu srca, jetre i kolona	32
3.4.2.1.1. Određivanje aktivnosti katalaze u tkivu srca, jetre i kolona.....	32
3.4.2.1.2. Određivanje aktivnosti SOD u tkivu srca, jetre i kolona	32
3.4.2.1.3. Određivanje izoformi SOD u tkivu srca, jetre i kolona	33
3.4.2.1.4. Merenje indeksa lipidne peroksidacije u tkivu srca, jetre i kolona.....	34
3.4.2.2. Određivanje aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu srca, jetre i kolona	35
3.4.2.2.1. Određivanje ukupne aktivnosti LDH u tkivu srca, jetre i kolona	35
3.4.2.2.2. Određivanje LDH izoformi u tkivu srca, jetre i kolona	36
3.4.2.2.3. Određivanje aktivnosti malat dehidrogenaze u tkivu srca, jetre i kolona ..	36
3.4.2.2.4. Određivanje MDH izoformi u tkivu srca, jetre i kolona	37
3.4.2.3. Određivanje aktivnosti matriks metaloproteinaza u tkivu srca, jetre i kolona.....	38
3.4.3. Histološka i histomorfometrijska analiza tkiva srca, aorte, jetre i kolona	39
3.5. Hemikalije i potrošni materijal	40
3.6. Statistička analiza.....	40
4. REZULTATI.....	42
4.1. Efekti aplikacije homocisteina u odnosu na kontrolnu grupu	43
4.1.1. Efekti aplikacije homocisteina na telesnu masu eksperimentalnih životinja	43
4.1.2. Efekti aplikacije homocisteina na indeks srčane mase	44
4.1.3. Efekti aplikacije homocisteina na biohemijske parametre u serumu i plazmi	44
4.1.3.1. Koncentracija homocisteina u serumu.....	44

4.1.3.2. Efekti aplikacije homocisteina na kardiovaskularne i hemostatske biomarkere u serumu i plazmi	46
4.1.3.3. Efekti aplikacije homocisteina na hepato-renalno-pankreatične biomarkere u serumu	46
4.1.4. Efekti aplikacije homocisteina na biohemijske parametre u tkivu srca.....	47
4.1.4.1. Efekti aplikacije homocisteina na parametre oksidativnog stresa u tkivu srca.	47
4.1.4.2. Efekti aplikacije homocisteina na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu srca	50
4.1.4.3. Efekti aplikacije homocisteina na aktivnosti matriks metaloproteinaza u tkivu srca	53
4.1.5. Efekti aplikacije homocisteina na histološke promene i histomorfometrijske parametre srca	55
4.1.6. Efekti aplikacije homocisteina na histološke promene i histomorfometrijske parametre aorte.....	58
4.1.7. Efekti aplikacije homocisteina na biohemijske parametre u tkivu jetre	60
4.1.7.1. Efekti aplikacije homocisteina na parametre oksidativnog stresa u tkivu jetre	60
4.1.7.2. Efekti aplikacije homocisteina na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu jetre	63
4.1.7.3. Efekti aplikacije homocisteina na aktivnosti matriks metaloproteinaza u tkivu jetre	66
4.1.8. Efekti aplikacije homocisteina na histološke promene jetre	67
4.1.9. Efekti aplikacije homocisteina na biohemijske parametre u tkivu kolona.....	69
4.1.9.1. Efekti aplikacije homocisteina na parametre oksidativnog stresa u tkivu kolona	69
4.1.9.2. Efekti aplikacije homocisteina na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu kolona	71
4.1.9.3. Efekti aplikacije homocisteina na aktivnosti matriks metaloproteinaza u tkivu kolona.....	74
4.1.10. Efekti aplikacije homocisteina na histološke promene i histomorfometrijske parametre kolona	75
4.2. Efekti aplikacije vitamina B6 u uslovima eksperimentalno izazvane hiperhomocisteinemije	79
4.2.1. Efekti aplikacije vitamina B6 na telesnu masu eksperimentalnih životinja.....	79
4.2.2. Efekti aplikacije vitamina B6 na indeks srčane mase	80
4.2.3. Efekti aplikacije vitamina B6 na biohemijske parametre u serumu i plazmi.....	80
4.2.3.1 Efekti aplikacije vitamina B6 na koncentraciju homocisteina u serumu	80
4.2.3.2. Efekti aplikacije vitamina B6 na kardiovaskularne i hemostatske biomarkere u serumu i plazmi	81
4.2.3.3. Efekti aplikacije vitamina B6 na hepato-renalno-pankreatične biomarkere u serumu	82
4.2.4. Efekti aplikacije vitamina B6 na biohemijske parametre u tkivu srca	83
4.2.4.1. Efekti aplikacije vitamina B6 na parametre oksidativnog stresa u tkivu srca ..	83
4.2.4.2. Efekti aplikacije vitamina B6 na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu srca	85
4.2.5. Efekti aplikacije vitamina B6 na histološke promene i histomorfometrijske parametre srca	87
4.2.6. Efekti aplikacije vitamina B6 na histološke promene i histomorfometrijske parametre aorte.....	90
4.2.7. Efekti aplikacije vitamina B6 na biohemijske parametre u tkivu jetre.....	92
4.2.7.1. Efekti aplikacije vitamina B6 na parametre oksidativnog stresa u tkivu jetre..	92

4.2.7.2. Efekti aplikacije vitamina B6 na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu jetre	94
4.2.8. Efekti aplikacije vitamina B6 na histološke promene jetre.....	96
4.2.9. Efekti aplikacije vitamina B6 na biohemijske parametre u tkivu kolona	97
4.2.9.1. Efekti aplikacije vitamina B6 na parametre oksidativnog stresa u tkivu kolona	97
4.2.9.2. Efekti aplikacije vitamina B6 na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu kolona	99
4.2.10. Efekti aplikacije vitamina B6 na histološke promene i histomorfometrijske parametre kolona	100
4.3. Efekti aplikacije folne kiseline u uslovima eksperimentalno izazvane hiperhomocisteinemije	104
4.3.1. Efekti aplikacije folne kiseline na telesnu masu eksperimentalnih životinja.....	104
4.3.2. Efekti aplikacije folne kiseline na indeks srčane mase	105
4.3.3. Efekti aplikacije folne kiseline na vrednosti biohemijskih parametara u serumu i plazmi	105
4.3.3.1. Efekti aplikacije folne kiseline na koncentraciju homocisteina u serumu.....	105
4.3.3.2. Efekti aplikacije folne kiseline na kardiovaskularne i hemostatske biomarkere u serumu i plazmi	106
4.3.3.3. Efekti aplikacije folne kiseline na hepato-renalno-pankreatične biomarkere u serumu	107
4.3.4. Efekti aplikacije folne kiseline na biohemijske parametre u tkivu srca	108
4.3.4.1. Efekti aplikacije folne kiseline na parametre oksidativnog stresa u tkivu srca	108
4.3.4.2. Efekti aplikacije folne kiseline na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu srca	110
4.3.5. Efekti aplikacije folne kiseline na histološke promene i histomorfometrijske parametre srca	112
4.3.6. Efekti aplikacije folne kiseline na histološke promene i histomorfometrijske parametre aorte.....	115
4.3.7. Efekti aplikacije folne kiseline na biohemijske parametre u tkivu jetre.....	117
4.3.7.1. Efekti aplikacije folne kiseline na parametre oksidativnog stresa u tkivu jetre	117
4.3.7.2. Efekti aplikacije folne kiseline na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu jetre	119
4.3.8. Efekti aplikacije folne kiseline na histološke promene jetre.....	121
4.3.9. Efekti aplikacije folne kiseline na biohemijske parametre u tkivu kolona	122
4.3.9.1. Efekti aplikacije folne kiseline na parametre oksidativnog stresa u tkivu kolona	122
4.3.9.2. Efekti aplikacije folne kiseline na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu kolona	124
4.3.10. Efekti aplikacije folne kiseline na histološke promene i histomorfometrijske parametre kolona	125
4.4. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline u uslovima eksperimentalno izazvane hiperhomocisteinemije	129
4.4.1. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na telesnu masu eksperimentalnih životinja.....	129
4.4.2. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na indeks srčane mase	130

4.4.3. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na biohemijske parametre u serumu i plazmi.....	130
4.4.3.1. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na koncentraciju homocisteina u serumu.....	130
4.4.3.2. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na kardiovaskularne i hemostatske biomarkere u serumu i plazmi	131
4.4.3.3. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na hepato-renalno-pankreatične biomarkere u serumu	132
4.4.4. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na biohemijske parametre u tkivu srca	133
4.4.4.1. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na parametre oksidativnog stresa u tkivu srca.....	133
4.4.4.2. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu srca	135
4.4.5. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na histološke promene i histomorfometrijske parametre srca	137
4.4.6. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na histološke promene i histomorfometrijske parametre aorte.....	140
4.4.7. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na biohemijske parametre u tkivu jetre.....	142
4.4.7.1. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na parametre oksidativnog stresa u tkivu jetre	142
4.4.7.2. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu jetre.....	144
4.4.8. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na histološke promene jetre	146
4.4.9. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na biohemijske parametre u tkivu kolona	147
4.4.9.1. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na parametre oksidativnog stresa u tkivu kolona	147
4.4.9.2. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu kolona.....	149
4.4.10. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na histološke promene i histomorfometrijske parametre kolona.....	150
4.5. Efekti dozirane fizičke aktivnosti u uslovima eksperimentalno izazvane hiperhomocisteinemije	154
4.5.1. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na telesnu masu eksperimentalnih životinja....	154
4.5.2. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na indeks srčane mase.....	155
4.5.3. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na biohemijske parametre u serumu i plazmi..	155
4.5.3.1. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na koncentraciju homocisteina u serumu .	155
4.5.3.2. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na kardiovaskularne i hemostatske biomarkere u serumu i plazmi.....	156
4.5.3.3. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na hepato-renalno-pankreatične biomarkere u serumu	157
4.5.4. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na biohemijske parametre u tkivu srca	158
4.5.4.1. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na parametre oksidativnog stresa u tkivu .	158
4.5.4.2. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu srca	160
4.5.5. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na histološke promene i histomorfometrijske parametre srca	162

4.5.6. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na histološke promene i histomorfometrijske parametre aorte.....	165
4.5.7. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na biohemijske parametre u tkivu jetre.....	167
4.5.7.1. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na parametre oksidativnog stresa u tkivu jetre	167
4.5.7.2. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu jetre	169
4.5.8. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na histološke promene jetre.....	171
4.5.9. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na biohemijske parametre u tkivu kolona	172
4.5.9.1. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na parametre oksidativnog stresa u tkivu kolona.....	172
4.5.9.2. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu kolona.....	174
4.5.10. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na histološke promene i histomorfometrijske parametre kolona	175
5. DISKUSIJA.....	180
6. ZAKLJUČCI	194
7. LITERATURA	199

1. UVOD

1.1. Istorijat otkrića sumporovitih amino kiselina

Četiri glavne sumporovite aminokiseline koje su prisutne u biološkim organizmima su: metionin (Met), cistein (Cys), homocistein (Hcy) i taurin (Tau). Met i Cys predstavljaju dve od 20 amino kiselina koje učestvuju u izgradnji polipeptidnih lanaca prilikom procesa sinteze proteina. Hcy i Tau se ne ugrađuju u polipeptidne lance prilikom procesa sinteze proteina, ali imaju mnogobrojne važne fiziološke uloge u organizmima (Brosnan i Brosnan, 2006). Pored četiri osnovne navedene sumporovite amino kiseline važno je spomenuti i disulfid cistin koji predstavlja dimer dva molekula Cys povezanih disulfidnom vezom.

Cistin je bio prva sumporovita amino kiselina koja je otkrivena. Istraživa Wallstone je izolovao cistin iz urinarnih kalkulusa još davne 1810. godine, a zatim do kraja 19. veka otkriven je Cys i tada je smatran jedinom sumporovitom komponentom svih proteina (Johnson, 1911; Jakubowski, 2019). Međutim eksperimentalni dokazi iz laboratorije Liebig i saradnika od sredine 1800-ih, suprotstavljali su se ovom stanovištu i ukazivali su na to da Cys ne čini sav sumpor prisutan u proteinima (Johnson, 1911; Jakubowski, 2019). Ovo ne-cisteinsko sumporovito jedinjenje identifikovano je kao Met od strane Mueller-a u 1923. godini (Mueller, 1923; Jakubowski, 2019). Tau je dobio ime prema reči *taurus* što na latinskom jeziku znači bik, jer je ova amino kiselina izolovana iz žuči bika 1827. godine (Tiedemann i Gmelin, 1827), a nekoliko godina kasnije je izolovan i iz ljudske žuči (Ronalds, 2019). 1932. godine otkriven je i Hcy, koji je isprva sintetisan kao disulfid, homocistin, hemijskom demetilacijom Met sa sumpornom kiselinom (Butz i du Vigneaud, 1932; Jakubowski, 2019), dok je čist Hcy dobijen 3 godine kasnije redukcijom homocistina u reakciji sa natrijum-amonijakom (Riegel i du Vigneaud, 1935; Jakubowski, 2019). Naknadne studije su razjasnile fiziološku ulogu Hcy kao posrednika u metabolizmu Met i Cys putem dva glavna metabolička puta remetilacije i trans-sulfuracije.

1.2. Biološki značaj atoma sumpora u sumporovitim amino kiselinama

Zašto priroda koristi atom sumpora u svom repertoaru amino kiselina? Izuzimajući Met i Cys ostale proteinske amino kiseline izgrađene su samo od atoma ugljenika, vodonika, kiseonika i azota. Pošto i sumpor i kiseonik pripadaju istoj grupi periodnog sistema elemenata (VIa grupa) i sposobni su da stvaraju slične kovalentne veze, postavlja se pitanje zašto metioninski i cisteinski analozi, u kojima je atom sumpora zamenjen kiseonikom, nisu sposobni da obavljaju iste funkcije kao navedene sumporovite amino kiseline?

Jedna od kritičnih razlika između atoma kiseonika i atoma sumpora je manja elektronegativnost atoma sumpora u poređenju sa atomom kiseonikom koji predstavlja drugi najelektronegativniji element u periodnom sistemu, posle fluora (Brosnan i Brosnan, 2006). Manja elektronegativnost sumpora u odnosu na kiseonik značajno utiče na reaktivnost sumporovitih amino kiselina i doprinosi njihovoj većoj hidrofobnosti. Zamena sumpora kiseonikom u molekulu Met rezultirala bi nastankom mnogo hidrofилnije amino kiseline. Važnost atoma sumpora se ogleda u tome što veliki broj proteina formira svoju sekundarnu strukturu na taj način što se između dva molekula Cys gradi disulfidna veza, koja dovodi do savijanja polipeptidnog lanca na tačno definisanim mestima, pri čemu protein dobija tačno određeni oblik koji je od presudnog značaja za njegovu funkciju. Cys je sposoban da lako formira disulfidne veze upravo zbog lakoće s kojom se vodonik odvaja od tiolne (sulfhidrilne) grupe pri čemu se formira tionilni anjon. Serin, s druge strane, koji se razlikuje od Cys samo po zameni atoma sumpora za atom kiseonika, ne formira lako dioksidne veze. Razlika proizlazi iz činjenice da su tioli mnogo jače kiseline nego alkoholi, tako da alkoholna grupa u serinu ne disocira na fiziološkom pH vrednostima. Sa druge strane, zamena kiseonika za sumpor u S-adenozilmetioninu proizvela bi toliko snažan metilacioni agens da bi u ćelijama potpuno

neselektivno i nekontrolisano metilisao različite molekule bez potrebe za enzimskom katalizom reakcije, što bi moglo da ugrozi ćelijski metabolizam i dovede do ćelijske smrti (Brosnan i Brosnan, 2006).

Upravo zbog navedenih hemijskih karakteristika koje im atom sumpora daje, sumporovite aminokiseline su veoma važne za fiziološko funkcionisanje svih ćelija.

1.3. Metabolizam sumporovitih aminokiselina

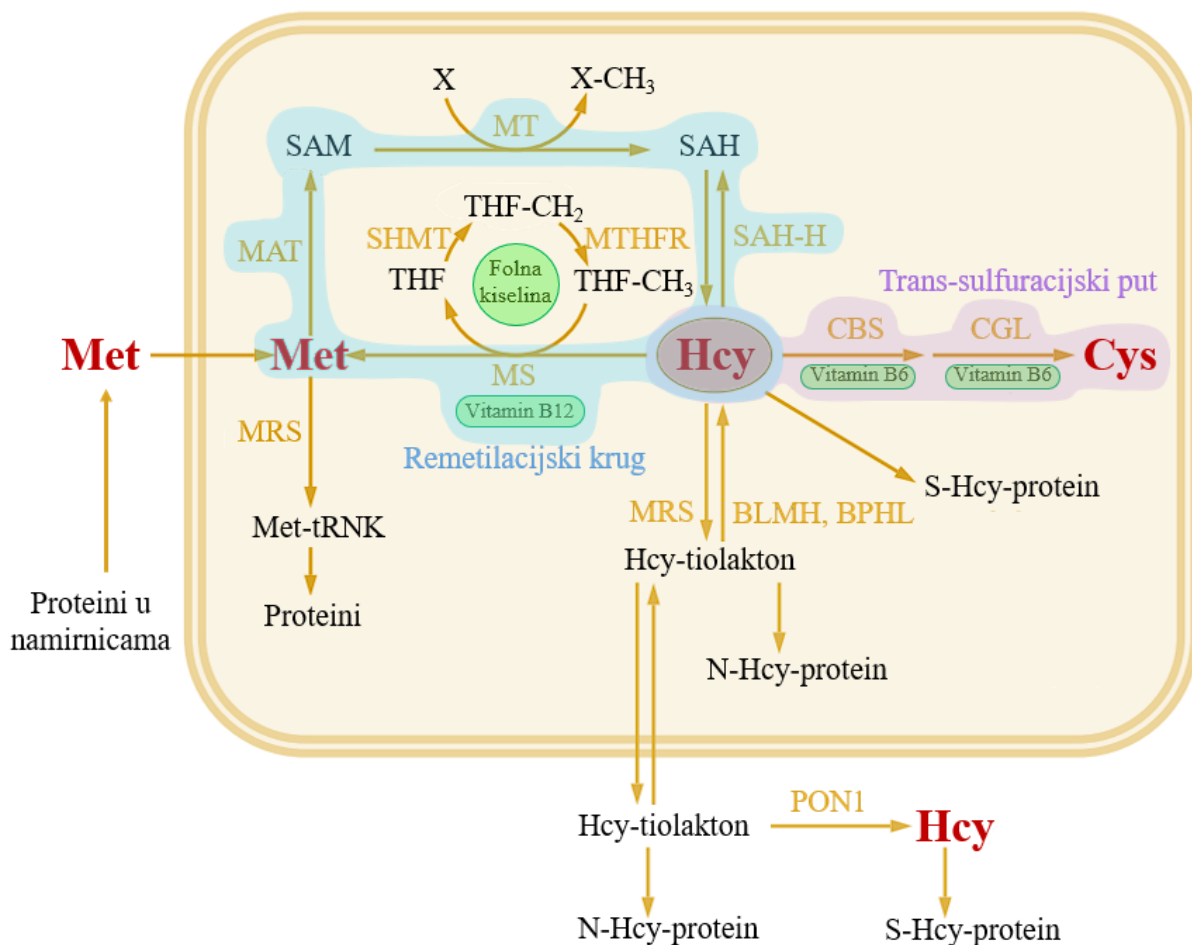
Sumporovite aminokiseline se unose u organizam najvećim delom u vidu Met i Cys koji su prisutni u proteinima namirnica. Hcy je neproteinska aminokiselina, u namirnicama se nalazi u malim količinama, a u organizmu se najvećim delom biosintetiše iz esencijalne amino kiseline Met čiji je glavni intermedijarni produkt i zato se smatra semiesencijalnom amino kiselinom. Metabolizam Hcy se odvaja kroz dva glavna metabolička puta: remetilacijski krug i trans-sulfuracijski metabolički put. Nakon što proteaze i peptidaze gastrointestinalnog trakta razlože proteine unete putem hrane do amino kiselina Met se apsorbuje i preko enterocita dospeva u krvotok, a zatim se distribuira do različitih ćelija organizma (Jakubowski, 2019).

U ćelijama Met može, ili da se poveže sa transportnom ribonukleinskom kiselinom (tRNK) u reakciji koju katalizuje enzim metionil-tRNK sintetaza (MRS) i da se tako aktiviran koristi za biosintezu proteina, ili da se putem enzima metionin S-adenoziltransferaze (MAT) prevede u S-adenozilmetionin (SAM) i tako uđe u remetilacijski metabolički krug. SAM u biološkim sistemima ima ulogu donora metil grupe i u reakcijama katalizovanim različitim metil transferazama (MT) predaje metil grupu drugim molekulima (proteinima, nukleinskim kiselinama ili manjim molekulima), pri čemu od njega nastaje S-adenozilhomocistein (SAH). SAM takođe ima i važnu ulogu u formiranju propil grupa prilikom biosinteze poliamina. U sledećoj reakciji SAH se, pod dejstvom enzima S-adenozilhomocistein hidrolaze, prevodi u Hcy (Jakubowski, 2019) (Slika 1).

Hcy koji je nastao iz Met ima nekoliko različitih sudbina: 1. može biti, pod dejstvom enzima metionin sintaze (MS), ponovo metilovan gradeći Met (metabolički put je po ovoj reakciji dobio ime „remetilacijski krug“ zato što molekul Hcy ponovo dobija metil grupu koja je sa SAM uklonjena dejstvom enzima MT u prethodnim reakcijama), 2. može ući u trans-sulfuracijski metabolički put u kome će na kraju biti konvertovan u Cys, 3. može biti preveden u toksični metabolit homocistein tiolakton (Hcy-T) pod dejstvom enzima MRS, 4. ili može nagraditi disulfidnu vezu sa bočnim lancem cisteina koji je inkorporiran u polipeptidni lanac proteina. Hcy se može takođe i izbaciti iz ćelije u svom molekulskom obliku, pa nakon toga može da u krvnoj plazmi formira disulfide vezujući se za proteine, Cys ili drugi molekul Hcy. Hcy-T se takođe izbacuje u krvnu plazmu gde može da se vezuje za proteina preko atoma azota, remeteći njihovu funkciju ili može pod dejstvom enzima paraoksonaze 1 (PON1) da bude ponovo konvertovan u Hcy (Jakubowski, 2019) (Slika 1).

Enzim MS koristi 5-metil tetrahidrofolat (THF-CH₃) kao supstrat iz koga uzima metil grupa za metilaciju Hcy. Kofaktor MS enzima je vitamin B12. THF-CH₃ je derivat folne kiseline (FK). Nakon što se unese ishranom, FK se pod dejstvom enzima dihidrofolat reduktaze redukuje u tetrahidrofolat (THF), a zatim se THF prevodi u 5,10-metilen tetrahidrofolat (THF-CH₂) u reakciji koju katalizuje enzim serin hidroksimetiltransferaza. U sledećoj reakciji enzim metilen tetrahidrofolat reduktaza (MTHFR) prevodi THF-CH₂ u THF-CH₃ i na taj način se obnavlja supstrat za metilaciju Hcy čime je omogućeno njegovo prevođenje u Met dejstvom enzima MS.

Pored enzima MS, Hcy može biti metilovan i nagraditi Met i dejstvom enzima betain homocistein metiltransferaze. Ovaj enzim prebacuje metil grupu sa betaina na Hcy, a kao produkti reakcije nastaju Met i dimetilglicin (Jakubowski, 2019).



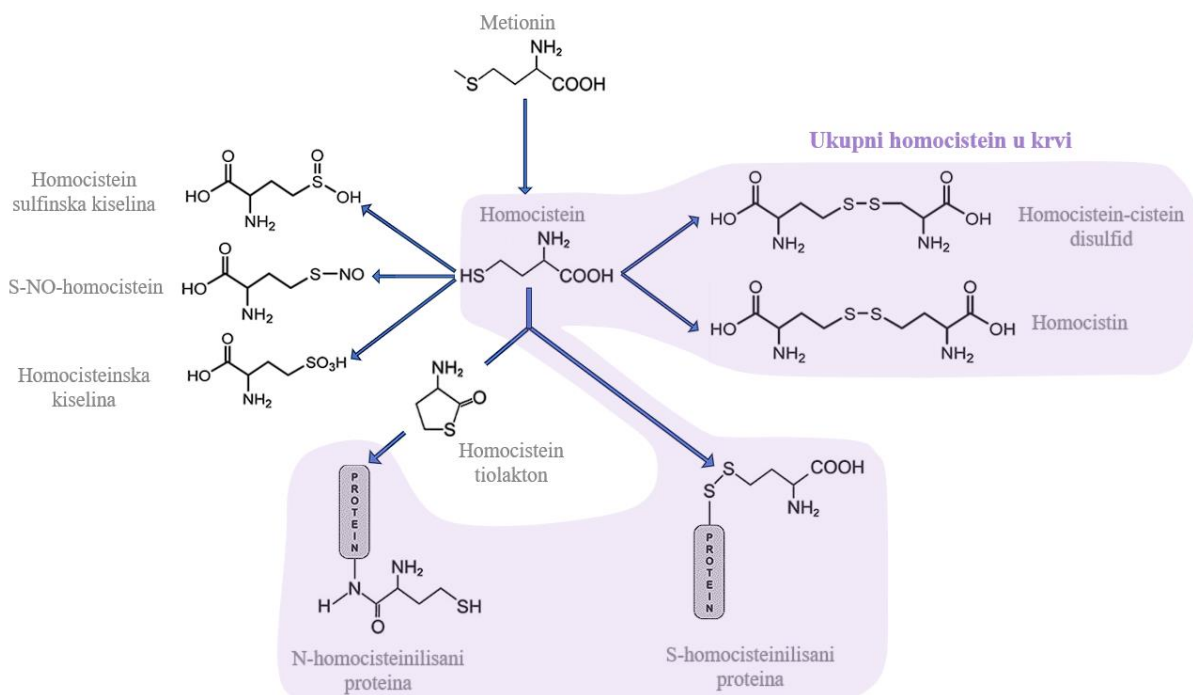
Slika 1. Metabolizam sumporovitih aminokiselina. Met - metionin, SAM - S-adenozilmetionin, X - molekul koji ulazi u reakciju metilacije, X-CH₃ - metilovani molekul, SAH - S-adenozilhomocistein, Hcy - homocistein, THF - tetrahidrofolat, THF-CH₂ - 5,10-metilen-tetrahidrofolat, THF-CH₃ - 5-metiltetrahidrofolat, Cys - cistein, MRS - metionil-tRNC sintetaza, MAT - metionin S-adenoziltransferaza, MT - metil transferaza, SAH-H - S-adenozilhomocistein hidrolaza, MS - metionin sintaza, SHMT - serin hidroksimetiltransferaza, MTHFR - metilentetrahidrofolat reduktaza, CBS - cistationin beta sintaza, CGL - cistationin gama liaza, BLMH - bleomicin hidrolaza, BPHL - enzim sličan bifenol hidrolazi (eng. *biphenol hydrolase-like enzyme*), PON1 - paraoksonaza 1 (ilustracija preuzeta i modifikovana iz Jakubowski, 2019).

U trans-sulfuracijskom metaboličkom putu Hcy se prevodi u Cys kroz dve reakcije. Prva reakcija podrazumeva spajanje Hcy i serina koje je katalizovano enzimom cistationin beta sintaza (CBS), pri čemu nastaje cistationin. U drugoj reakciji enzim cistation gama liaza (CGL) katalizuje razgradnju cistationina na alfa-ketobutirat i Cys. Cys je važna sumporovita aminokiselina jer pored toga što se u ćelijama koristi za sintezu proteina takođe upotrebljava i za sintezu tripeptida glutationa (GSH) koji je važan antioksidans u organizmu kada je u svojoj redukovanoj formi. U kontaktu sa reaktivnim oblicima kiseonika (ROS, eng. *reactive oxygen*

species) glutation biva oksidovan i pritom dolazi da formiranja disulfidne veze između dva molekula GSH (GS-SG).

1.4. Otkriće medicinskog značaja hiperhomocisteinemije

Fiziološka koncentracija Hcy u krvi iznosi 5 - 15 $\mu\text{mol/L}$ (Baszczuk i Kopczynski, 2014). HHcy označava patološko stanje u kome koncentracija Hcy u krvi prevazilazi gornju granicu fiziološkog opsega ($>15 \mu\text{mol/L}$). Na osnovu visine koncentracije Hcy u krvi, HHcy je podeljena u tri stepena: umerena (16 - 30 $\mu\text{mol/L}$), srednja (31 - 100 $\mu\text{mol/L}$) i teška ($> 100 \mu\text{mol/L}$) (Hankey i Eikelboom, 1999). Kada se meri "ukupni" Hcy, važno je izmeriti sve oblike Hcy kako bi se dobili rezultati o statusu Hcy. Međutim, samo nekoliko oblika Hcy čine "ukupni Hcy" korišćenjem standardnog komercijalnog Hcy seta. Među njima su slobodni Hcy, disulfidi Hcy i homocisteinilovani proteini (Slika 2). Pod fiziološkim uslovima, manje od 1% ukupnog Hcy je prisutno u slobodnom redukovanom obliku, oko 15% je u različitim oksidovanim oblicima u vidu disulfida (Hcy-S-S-Hcy (homocistin) i Hcy-S-S-Cys), dok najveći procenat ukupnog Hcy, približno 80%, čine S-homocisteinilovani i N-homocisteinilovani proteini (Chubarov, 2021).



Slika 2. Metaboliti homocisteina - ukupni homocistein čine: slobodni homocistein, disulfidi homocisteina i homocisteinilovani proteini (*Ilustracija preuzeta i modifikovana iz Chubarov et al., 2021*).

Teoriju o značaju Hcy u procesu razvoja i napredovanja ateroskleroze postavio je 1969. godine istraživač McCully proučavanjem patoloških promena na krvnim sudovima kod dece sa naslednim poremećajima metabolizma Hcy (McCully, 1969). Bolest homocistinurija prvi put je prepoznata 1962. godine otkrićem povećane urinarne ekskrecije Hcy kod nekoliko dece sa mentalnom retardacijom, ubrzanim rastom i sklonosti ka razvoju arterijske i venske tromboze (Carson i Neill, 1962). Uzrok homocistinurije pratila je nedovoljna funkcija enzima CBS, koji katalizuje reakciju konverzije Hcy u cistationin i koji kao kofaktor za svoju enzimsku aktivnost koristi vitamin B6 (piridoksal fosfat) (Mudd et al., 1964). Usled deficita ovog enzima, dolazi

do nakupljanja Hcy u povišenoj koncentraciji u tkivima i telesnim tečnostima kod osoba sa homocistinurijom. Akumulirani Hcy pod dejstvom enzima MS u remetilacijskom metaboličkom krugu se konvertuje u Met i na taj način postepeno dolazi i do paralelnog nakupljanja Met u organizmu.

Zainteresovan za proučavanje uloge Hcy u patološkim promenama krvnih sudova istraživač McCully se osvrnuo još i dalje u prošlost da bi u arhivi iz 1933. godine pronašao medicinski slučaj osmogodišnjeg dečaka koji je preminuo od komplikacija karotidne ateroskleroze praćene trombozom i cerebrovaskularnim insultom, kome je kasnije utvrđena dijagnoza homocistinurije na osnovu genetske povezanosti jer je od iste bolesti bolovala i njegova nećaka (McCully, 2015).

Enzimski abnormalnost u drugom slučaju homocistinurije kod dvomesečne bebe sa upalom pluća i neadekvatnim napredovanjem uočena je zbog nedovoljne funkcije enzima MS usled poremećaja u metabolizmu vitamina B12, što je dovelo do homocistinurije, cistationinurije i metilmalonske acudurije (Mudd et al., 1969). Pregled patologije ovog slučaja, prvog primera bolesti povezane sa metabolizmom vitamina B12 u literaturi, doveo je do otkrića široko rasprostranjenih, uznapredovalo razvijenih aterosklerotskih plakova u arterijama mnogih vitalnih organa, koji značajno remete protok krvi i ishranu tkiva, što je i bio uzrok zastoja u razvoju.

Nekoliko godina kasnije otkriven je i novi slučaj pojave aterosklerotskih plakova kod deteta sa homocistinurijom, koja je u ovom slučaju bila uzrokovana deficijencijom enzima MTHFR, trećim glavnim enzimskim nedostatkom koji izaziva homocistinuriju (Kanwar et al., 1976).

Ovakav bizarni medicinski fenomen pojave ubrzane progresivne ateroskleroze kod dece, uzevši u obzir da aterosklerotske promene nisu patologija tipična za pedijatrijsku populaciju, pokrenuo je naučnu potrebu za rasvetljavanjem uzroka i patofizioloških mehanizama koji se nalaze u osnovi ovakvog poremećaja. Budući da je visoka koncentracija Hcy u krvi bila jedina zajednička patološka karakteristika između navedenih slučajeva pedijatrijskih pacijenata sa različitim naslednim enzimskim abnormalnostima, zaključeno je da Hcy može da ima ulogu u razvoju aterosklerotskih plakova direktnim efektom na ćelije i tkiva arterija (McCully, 1969).

Razvoj teorije o homocisteinu i aterosklerozi nastavljen je u smeru posmatranja efekata Hcy na razvoj ateroskleroze kod eksperimentalnih životinja, proučavanjima abnormalnosti ekstracelularnog matriksa izazvanih sulfacijom u tkivnim kulturama dobijenim od pacijenata sa homocistinurijom, i dodatnim proučavanjima metaboličkih puteva Hcy, kao što je otkriće biohemijskog puta u kome se sumpor iz Hcy-T konvertuje u sulfat (McCully, 1975).

U narednim godinama sve više kliničkih studija je proučavalo povezanost Hcy i ateroskleroze. Mnoge retrospektivne i prospektivne opservacione studije na ljudima su utvrdile hiperhomocisteinemiju kao snažan nezavisni faktor rizika za aterosklerozu kod osoba koje pritom nisu imale promene u serumskim nivoima ukupnog holesterola (HOL), lipoproteina ili drugih tradicionalnih faktora rizika za aterosklerozu (McCully, 2005).

1.5. Etiologija hiperhomocisteinemije

Prema načinu nastanka HHcy može biti klasifikovana u dve kategorije: prva kategorija podrazumeva retke, ali teške, oblike HHcy koji su uzrokovani značajnim genetskim mutacijama enzima zaduženih za metabolizam Hcy, dok druga kategorija predstavlja blaže, ali češće oblike HHcy, gde je prisutno samo blago povišenje koncentracije Hcy u krvi, koje proizilazi iz kombinacije faktora sredine i manjih genetskih mutacija (Faeh et al., 2006; Todorović et al., 2021).

Ključni enzimi zaduženi za metabolizam homocisteina su MTHFR, MS i CBS (Loscalzo et al., 2014). Mutacija gena zaduženog za sintezu enzima CBS je najčešći razlog za nastanak HHcy jer CBS pretvara Hcy u cistationin. U ljudskom organizmu CBS najveću aktivnost ispoljava u jetri, bubrezima, mišićima, mozgu i jajnicima, a takođe je aktivna i tokom rane embriogeneze u nervnim i kardiovaskularnom sistemu (Que´re´ et al., 1999). Kada CBS ne funkcioniše, u trans-sulfuracijskom metaboličkom putu nedovoljna količina homocisteina se pretvara u cistationin, pa dolazi do nakupljanja Hcy u ćelijama. Polimorfizam T833C u genu za CBS pronađen je kao uzrok blage HHcy kod pripadnika različitih etničkih grupa (Dutta et al., 2005). Mutacije gena zaduženih sa sintezu MTHFR i MS ispoljavaju se u vidu polimorfizama poput MTHFR C677T i MS A2756G (Yakub et al., 2012; Qin et al., 2012). Osobe sa genotipom MTHFR C677T su pod većim rizikom od razvoja HHcy u uslovima sniženog unosa folata i vitamina B12 putem hrane ili visokim koncentracijama olova u krvi u poređenju sa osobama istog genotipa i normalnim laboratorijskim nalazima u krvi (Yakub et al., 2012). Deficit folata i deficijencija vitamina B12 povećavaju mogućnost razvoja HHcy za 2,5 i 2,6 puta, kod osoba sa genotipom C677T u poređenju sa osobom sa normalnim genotipom (Yakub et al., 2010).

Posmatranjem metaboličkih puteva Hcy jasno se uočava da je za održavanje njegove fiziološke koncentracije neophodna adekvatna dostupnost vitamina B6, FK i vitamina B12 organizmu, kako bi enzimi koji navedene vitamine koriste kao kofaktore mogli nesmetano da katalizuju reakcije metabolisanja Hcy. Sa druge strane, nedostatak navedenih vitamina može da dovede do neadekvatnog metabolisanja Hcy i njegovog nakupljanja u organizmu tj. nastanka HHcy (Loscalzo et al., 2014). Zbog svoje hidrosolubilnosti, ovi vitamini se lako mogu izgubiti putem urina, a ukoliko je njihov unos neadekvatan onda dolazi do njihovog nedostatka u organizmu. Ozbiljan nedostatak kobalamina i FK (koenzimi za remetilaciju homocisteina) i nedostatak vitamina B6 (koenzima za trans-sulfuraciju) česti su kod starije populacije. Kao rezultat, nivo Hcy u krvi raste sa starenjem (Miller, 2003). Kod odraslih sa uravnoteženom ishranom, deficit vitamina B12 je retkost, jer ukupno više od 2500 µg vitamina B12 može biti uskladišteno u jetri u vidu depo zaliha, a njegov dnevni obrt je spor (Carmel, 2008). Malapsorpcija u crevima je glavni uzrok deficita vitamina B12. Vitamin B12 se apsorbuje kroz sluznicu završnog dela tankog creva (ileuma), a kako bi njegova apsorpcija bila adekvatna, neophodan je unutrašnji faktor koji se stvara u želucu. Uzroci malapsorpcije vitamina B12 mogu biti atrofični gastritis, Kronova bolest u kojoj je inflamatornim procesom terminalni ileum oštećen, kao i hirurške resekcije želuca i terminalnog ileuma (Kozyraki i Cases, 2013). Istraživanja su pokazala takođe da suplementacija 0,5–5,0 mg/dan FK ima veći efekat na snižavanje nivoa homocisteina u krvi od drugih koenzima. Paralelna suplementacija FK i vitamina B12 ima sinergijski efekat na snižavanje nivoa homocisteina u krvi (Kim et al., 2018). Nedostatak vitamina B6 direktno dovodi do akumulacije Hcy zbog indukcije nepravilne funkcije CBS-a. Deficit vitamina B6 se lako detektuje jer se ne može sintetisati u telu, pa usled neadekvatnog unosa njegova serumska koncentracija biva niska u svim starosnim grupama (Clayton, 2006).

Met iz hrane je glavni izvor Hcy. Ishrana bogata Met indukuje formiranje Hcy u ćelijama. Miševi koji su hranjeni hranom obogaćenom Met imali su povišenu urinarnu koncentraciju Hcy naspram miševa na uobičajnom režimu uravnotežene ishrane (Chwatko et al., 2007). Hronična bubrežna insuficijencija, hipotireoza, perniciozna anemija i maligni tumori u dojci, jajnicima i pankreasu mogu izazvati hiperhomocisteinemiju, kako je opisano ispod (Humphrey et al., 2008).

1.6. Efekti hiperhomocisteinemije u kardiovaskularnom sistemu

1.6.1. Uloga hiperhomocisteinemije u razvoju endotelne disfunkcije

Endotel predstavlja unutrašnji sloj zidova krvnih sudova i glavni je regulator njihove homeostaze. Endotel ostvaruje različite funkcije uključujući regulaciju vaskularnog tonusa, propustljivosti, koagulacije, fibrinolize, inflamatornog procesa i rasta ćelija (Sena et al., 2013; Sitia et al., 2010). Oštećenje ovih funkcija pokreće niz događaja koji rezultiraju nesposobnošću endotela da reguliše vaskularnu relaksaciju i/ili ćelijsku redoks ravnotežu, što se naziva endotelna disfunkcija. Sa progresijom patoloških promena na biohemijskom nivou kasnije dolazi do pokretanja inflamatornog procesa (Cejková et al., 2016).

U toku inflamacije dolazi do pojačane ekspresije molekula za adheziju i hemokina, koji posreduju u uključivanju cirkulišućih monocita (Mestas et al., 2008). Nakon infiltracije u intimu, monociti se aktiviraju i postaju makrofagi koji zatim fagocitozom unose u sebe modifikovane lipoproteine pretvarajući se u penaste ćelije (Mestas et al., 2008). Pored toga, citokini i faktori rasta oslobođeni od strane endotela deluju na susedne ćelije, prvenstveno fibroblaste i vaskularne glatke miocite, što dovodi do strukturalnog remodelovanja aterosklerotskih plakova. Sa progresijom procesa dolazi do nastanka fibromuskularnog plaka koji može dalje napredovati i formirati fibroznu kapu, koja prekriva lipidima bogato, nekrotično jezgro plaka koja se sastoji od oksidovanih lipoproteina, HOL i ćelijskog debris (Hansson et al., 2015). U kasnijoj fazi, inflamatorno stanje endotela i apoptoza mogu doprineti strukturalnoj nestabilnosti i pucanju plaka, pri čemu dolazi do oslobađanja visoko trombogenog sadržaja nekrotičnog jezgra plaka u lumen krvnog suda, pokretanja reakcije hemostaze, tromboze i formiranja krvnog ugruška što dovodi do aterotrombotske okluzije krvnog suda (Hansson et al., 2015).

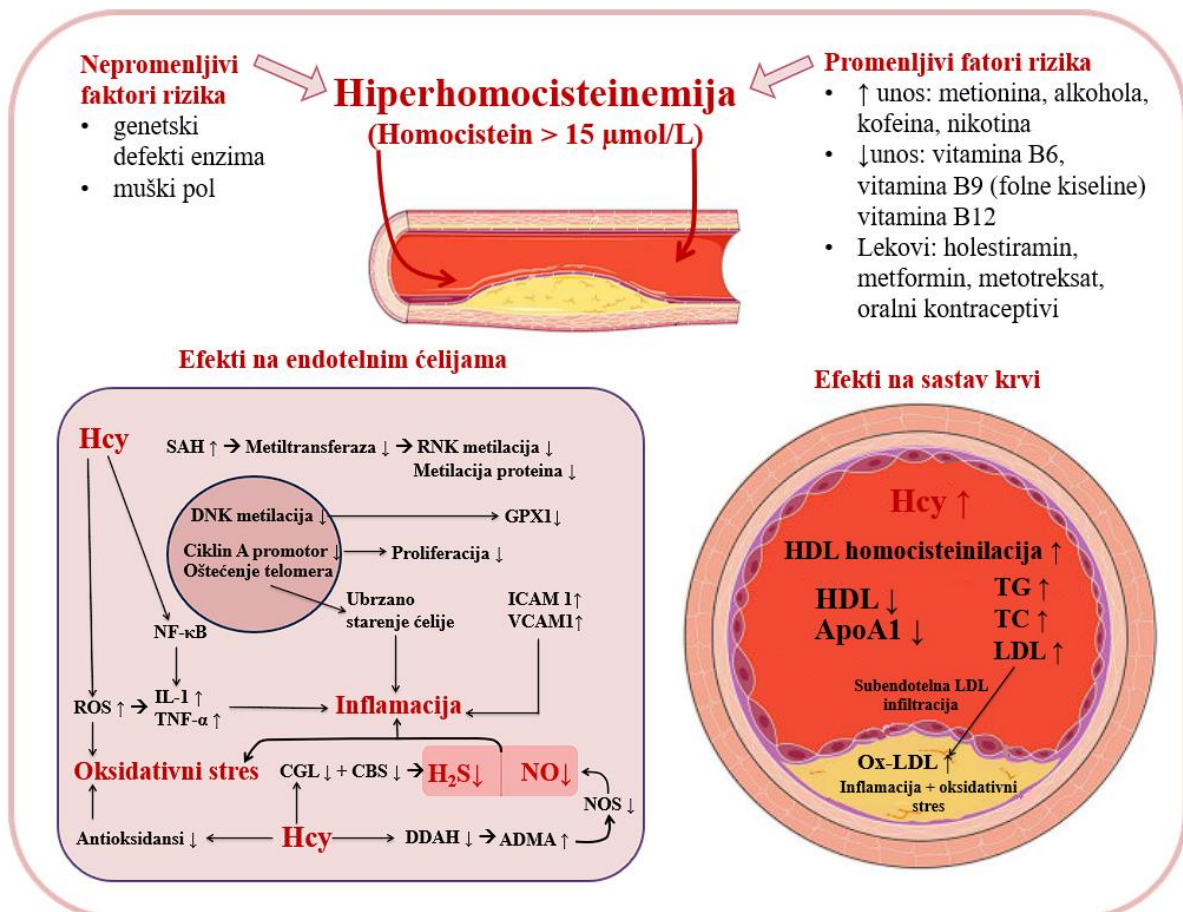
U literaturi se navode mnogobrojni dokazi da Hcy ispoljava negativne efekte na endotel narušavajući njegove fiziološke funkcije. Jedan od patofizioloških uticaja Hcy na endotel jeste remećenje sposobnosti endotela da reguliše vaskularni tonus. Endotelne ćelije održavaju vaskularni tonus oslobađanjem mnogobrojnih medijatora, kao što su azotni monoksid (NO), prostaciklin (PGI₂), endotelin-1 (ET-1) i tromboksan A₂ (TXA₂) (Mitchel et al., 2008). Istraživanja pokazuju da Hcy smanjuje biodostupnost vazodilatatora NO, a nasuprot tome Hcy koncentracija u krvi pokazuje pozitivnu korelaciju sa koncentracijom ET-1, potentnim vazokonstriktorom, kod osoba sa poremećenim metabolizmom glukoze i vaskulitisom (Gottsäter et al., 2000). Pojačana biosinteza TXA₂ takođe je primećena kod pacijenata sa visokim nivoom Hcy u krvi (Di Minno et al., 1993). Pored toga što je vazokonstriktor, TXA₂ indukuje proizvodnju trombocita u kostnoj srži i pospešuje njihovu agregaciju u toku trombocitne reakcije (Nording et al., 2015).

Trombociti takođe mogu da igraju važnu ulogu u endotelnoj disfunkciji (putem oslobađanja hemokina) i doprineti pucanju nestabilnog plaka. Meta-analiza o ishemijskoj bolesti srca pokazala je da sedamnaest studija (od dvadeset i dve) pokazuje statistički značajan efekat Hcy na povećanu aktivaciju trombocita, produkciju TXA₂ i agregaciju trombocita (Wald et al., 2011).

Smanjenje produkcije NO u endotelnim ćelijama može izazvati povećanu sintezu i ekspresiju adhezionih molekula na površini ćelijske membrane, kao što su intercelularni adhezioni molekul 1 (ICAM-1), vaskularni celularni adhezioni molekul 1 (VCAM-1), E-selektin, i molekul koji privlači makrofage 1 (MCP-1) (Yuyun et al., 2018). Slično tome, povećanje oksidativnog stresa pokrenuto Hcy može stimulisati ekspresiju citokina i molekula

za adheziju u endotelnim ćelijama preko puta nuklearnog faktora kapa B (NF-κB) (Barroso et al., 2016).

Bilo direktno ili preko putem povećane produkcije ROS, Hcy je povezan sa pokretanjem inflamatornog procesa u tkivu krvnih sudova što dodatno doprinosi napredovanju endotelne disfunkcije (Barroso et al., 2016). Studije na ćelijskim kulturama pokazale su da Hcy putem aktivacije signalnog puta NF-κB indukuje produkciju proinflamatornih citokina MCP-1 i interleukina (IL) 8 (Zhao et al., 2017). NF-κB je transkripcioni faktor koji stimuliše produkciju citokina, hemokina i molekula za adheziju, i tako doprinosi promeni funkcije endotelnih ćelija i pokretanju leukocita, što zajedno dovodi do bržeg napredovanja procesa aterogeneze. Studije na miševima sa deficijencijom apolipoproteina E (apoE) i indukovanom HHcy takođe su otkrile aktivaciju NF-κB signalnog puta i porast koncentracije proinflamatornih medijatora u aterosklerotskim lezijama (Wang et al., 2013; Hofmann et al., 2001). Na Slici 3, prikazani su etiološki faktori važni za nastanak HHcy, kao i patofiziološki mehanizmi kojima HHcy dovodi do endotelne disfunkcije i promene sastava krvi.



Slika 3. Patofiziološki efekti hiperhomocisteinemije na endotelne ćelije i sastav krvi. Hcy - homocistein, SAH - S-adenozil homocistein, RNK - ribonukleinska kiselina, DNK - deoksiribonukleinska kiselina, GPX1 - glutation peroksidaza 1, ICAM1 - međućelijski adhezioni molekul 1, VCAM1 - vaskularni ćelijski adhezioni molekul 1, NF-κB - nuklearni faktor kapa beta, ROS - reaktivni oblici kiseonika, IL-1 - interleukin 1, TNF-α - faktor nekroze tumora alfa, CGL - cistationin gama liaza, CSB - cistationin beta sintaza, H₂S - vodonik sulfid, NO - azot monoksid, eNOS - endotelna azot monoksid sintaza, DDAH - dimetilarginin dimetilaminohidrolaza, ADMA - asimetrični dimetilarginin. (Ilustracija preuzeta i modifikovana iz Yuan et al., 2023).

1.6.2. Uloga hiperhomocisteinemije u patofiziološkoj aktivaciji oksidativnog stresa

Veliki broj istraživanja ističe značajnost uloge oksidativnog stresa u endotelnoj disfunkciji i aterosklerozi koje indukuje Hcy. Pod terminom „oksidativni stres“ se obično smatra disbalans antioksidativnog kapaciteta ćelije i prooksidantnih agenasa tj. reaktivnih vrsta kiseonika, azota i ugljenika (Birben et al., 2012). Studije na humanoj populaciji i animalnim modelima pokazuju da HHcy može indukovati oksidativni stres putem različitih molekularnih mehanizama, bilo modulacijom proizvodnje ROS ili narušavanjem funkcionalnosti antioksidativnih sistema (Faverzani et al., 2017).

ROS koji nastaju u ćelijama prilikom oksidativnog stresa uključuju superoksidni anjon (O_2^-), hidroksilni radikal ($\bullet OH$) i vodonik peroksid (H_2O_2). Autooksidacija Hcy izaziva generisanje $\bullet OH$ i H_2O_2 (Richard et al., 2018). Superoksidni anjoni se u ćelijama uglavnom generišu putem aktivnosti nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) oksidaze, ksantin oksidaze i mitohondrijskog elektronskog transportnog lanca (METL) (Birben et al., 2012). Hcy povećava ekspresiju NADPH oksidaze u miševima sa HHcy, doprinoseći tako povećanju proizvodnje superoksidnog anjona (Chan et al., 2018). NADPH oksidaza je kodirana NOX familijom gena. NOX2 je predominantno eksprimirana u endotelnim ćelijama, i pronađena je pozitivna korelacija između koncentracije Hcy i ekspresije NOX2 u humanim endotelnim ćelijama i kardiomiocitima pacova (Sipkens et al., 2013; Sipkens et al., 2011). Pored toga, istraživanja u ćelijskim kulturama i animalnim modelima pokazala su da Hcy izazvana disfunkcija rezultira proizvodnjom superoksidnog anjona umesto NO (Kietadisorn et al., 2012; Xie et al., 2018). Oslobođanje superoksida, može aktivirati druge puteve proizvodnje ROS i doprineti daljem pojačavanju oksidativnog stresa. O_2^- može biti pretvoren u H_2O_2 dejstvom enzima superoksid dismutaze (SOD) ili mogu reagovati sa NO pri čemu dolazi do formiranja reaktivnog oblika azota (RNS) peroksinitrita. O_2^- i H_2O_2 su poznati aktivatori NF- κ B signalnog puta i mogu pojačati inflamatorni odgovor povezan sa HHcy. U kultivisanim endotelnim ćelijama, Hcy je takođe povezan sa povećanim H_2O_2 , direktno ili putem akumulacije SAH (Austin et al., 1998; Barroso et al., 2014). $\bullet OH$ može biti generisan kroz razgradnju H_2O_2 (Florence, 1984) i predstavlja najreaktivniji od svih ćelijskih ROS jer veoma agresivno dovodi do nekontrolisane oksidacije i oštećenja proteina, lipida, ugljenih hidrata i DNK (Birben et al., 2012). Zbog svoje visoke reaktivnosti, $\bullet OH$ doprinosi oksidaciji lipoproteina niske gustine (LDL), što je ključni događaj u procesu ateroskleroze. Pronađena je povezanost između Hcy indukovano generisanja $\bullet OH$ i oksidacije lipida u LDL u endotelnim ćelijama (Nakano et al., 2005).

Nekoliko studija takođe ističe značaj smanjenja aktivnosti antioksidativnih mehanizama u oksidativnom stresu posredovanom Hcy (Waly et al., 2016; Lubos et al., 2011; Barroso et al., 2014). Antioksidativni mehanizmi u ćeliji su klasifikovani kao enzimski i neenzimski. Prvi obuhvataju enzime koji neutrališu ROS i smanjuju oksidativni stres, u koje se obrađaju SOD, katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPx), glutation-S-transferaza, tioredoksin i peroksiredoksin, dok neenzimski antioksidansi uključuju ROS „sakupljače“, poput glutaciona, i vitamina A, C i E (Birben et al., 2012). Visoka koncentracija Hcy u krvi je kod kardioloških pacijenata povezana sa smanjenim nivoom glutaciona (Waly et al., 2016), ključnog ćelijskog antioksidansa, kao i sa smanjenjem vitamina B12 i E kod pacijenata sa HHcy (Faverzani et al., 2017). Smanjene ekspresije enzima SOD, GPx i tioredoksina izmerene su takođe u kulturama endotelnih ćelija i animalnim modelima miševa sa izazvanom HHcy (Faverzani et al., 2017; Richard et al., 2018; Mohamed et al., 2017). Pored toga, studija hipertenzivnih pacijenata sa

HHcy pokazala je da pacijenti sa visokim nivoima Hcy u krvi imaju niže aktivnosti SOD i CAT u poređenju sa pacijentima sa normalnom koncentracijom Hcy u krvi (Guo et al., 2018).

1.6.3. Uloga hiperhomocisteinemije u patofiziološkim promenama metabolizma azot monoksida

Povećani oksidativni stres indukovani HHCy može dodatno dovesti do oksidativne inaktivacije NO i disfunkcije endotelne azot monoksid sintaze (eNOS). eNOS je zadužena za produkciju NO u endotelnim ćelijama oksidacijom L-arginina. Ova reakcija zahteva NADPH i O₂ kao supstrate, a NO i citrulin nastaju kao krajnji proizvodi reakcije. Oksidativni stres sinergistički negativno utiče na biodostupnost NO u krvnim sudovima i doprinosi još većoj proizvodnji ROS, pri čemu se stvara patofiziološki začarani krug (Karbach et al., 2014). Metilovani analozi arginina: N-monometilarginin (L-NMMA) i asimetrični dimetilarginin (ADMA) inhibiraju eNOS koji se sintetisuje pod uticajem enzima poznatih kao protein arginin metiltransferaze (Leiper i Vallance, 1999). Proteolizom proteina koji sadrže L-NMMA i ADMA dolazi do njihovog oslobađanja u citosol, a zatim i do njihovog prelaska iz ćelije u krv. Povećanje cirkulišućeg ADMA je povezano sa aterosklerotskom vaskularnom bolešću (Miyazaki et al., 1999) dok sa druge strane L-NMMA ne pokazuje značajan aterogeni jer je njegova koncentracija u plazmi obično deset puta niža nego koncentracija ADMA (Teerlink, 2005).

Povećanje koncentracije ADMA i Hcy je povezano sa pojavom aterosklerotskih promena, pa se pretpostavlja da štetni efekat povišenog Hcy na endotel može biti posredovan preko ADMA. Majmuni koji su jeli dijetu bogatu Met pokazali su povećanje u ADMA i Hcy i smanjenje NO-zavisne dilatacije karotidne arterije (Böger et al., 2000a). *In vitro* studija na kulturi endotelnih ćelija je pokazala je da je povišenje koncentracije Met u medijumu endotelnih ćelija rezultovalo povećanim stvaranjem i ADMA i Hcy (Böger et al., 2000b). Mogući mehanizam koji povezuje Hcy i ADMA predložen je u studiji u kojoj je tretman endotelnih ćelija sa Hcy značajno potisnuo aktivnost i eNOS i izoforme 2 dimetilargininske dimetilaminohidrolaze (DDAH) koja predstavlja glavnu izoformu DDAH u endotelnim ćelijama (Liu, et al., 2012). Uloga enzima DDAH se ogleda u tome što katalizuje reakciju hidrolize L-NMMA i ADMA i na taj način onemogućava njihovo inhibitorno dejstvo na eNOS. Stoga, potiskivanje ekspresije DDAH2 je objašnjenje mehanizma kojim Hcy indukuje endotelnu disfunkciju.

Drugi analog arginina, simetrični dimetilarginin (SDMA), ne inhibira aktivnost eNOS (Leiper i Vallance, 1999), ali se takmiči sa argininom za njegov katjonski amino-kiselinski transporter, i tako porast SDMA može potencijalno kompromitovati intracelularnu dostupnost arginina i produkciju NO (Closs et al. 1997). Pod uticajem oksidativnog stresa, smanjuje se aktivnost DDAH, i nastaje povećanje ADMA (Ito et al., 1999), a da sa druge strane povećava se ekspresija DDAH1 izoforme, koja se primarno eksprimira u jetri i bubregu, i time se smanjuju nivoi ADMA i povećava se produkcija NO (Konishi et al., 2007). Miševi sa povećanom ekspresijom DDAH pokazivali su poboljšanu endotelnu reparaciju nakon vaskularne povrede (Tanaka et al., 2005), što ukazuje na značaj DDAH u održavanju vaskularne homeostaze.

1.6.4. Uloga hiperhomocisteinemije u patofiziološkim promenama metabolizma vodonik sulfida

Dihidrogen sulfid (sulfan, vodonik sulfid, H₂S) dugo je smatran za toksični gas i ekološki zagađivač sa mirisom pokvarenog jajeta (Liu et al., 2012). U poslednjim godinama, naučna istraživanja su donela saznanja da se H₂S proizvodi endogeno i da je signalni molekul koji reguliše nekoliko fizioloških procesa, naročito u vaskularnom sistemu gde je uključen u regulaciju endotelne homeostaze (Chen et al., 2004; Zhu et al., 2008). Dva enzima trans-sulfuracijskog metaboličkog puta, CBS i CGL, učestvuju u proizvodnji H₂S (Fioruci et al., 2005; Zanardo et al., 2006). Glavna uloga ovog metaboličkog puta je konverzija Met u Cys. Međutim, CBS i CSE pokazuju značajnu fleksibilnost u reakcionoj specifičnosti i varijabilnost u uključivanju supstrata što rezultuje mnoštvom mogućih reakcija, od kojih u nekima nastaje kao produkt H₂S (Filipovic et al., 2018). CBS i CGL su glavni enzimi u procesu vaskularne produkcije H₂S (Fioruci et al., 2005; Zanardo et al., 2006), pri čemu CBS katalizuje sintezu H₂S iz Hcy i Cys, dok CGL katalizuje produkciju piruvata i tiocisteina (Jhee et al., 2000), tiocistein se potom neenzimski razgrađuje na Cys i H₂S (Lowicka i Beltowski, 2007). Pod fiziološkim okolnostima, u perifernom vaskularnom sistemu, u produkciji H₂S ključnu ulogu ima CGL, dok je CBS dominantni H₂S-produgujući enzim u cerebrovaskularnom sistemu (Nandi i Mishra, 2017).

H₂S ostvaruje svoje korisne biološke efekte na endotelu delujući na različite signalne puteve u kojima dovodi do procesa persulfidacije, oksidativne posttranslacione modifikacije bočnih lanaca Cys u persulfide (Filipovic et al., 2018). H₂S ostvaruje inhibiciju vaskularne inflamacije smanjujući aktivnost NF-κB signalnog puta i aktivirajući kalijumske i kalcijumske kanale (Fioruci et al., 2005; Zuidema et al., 2011; Antaany et al., 2014). Pored toga, H₂S smanjuje nivo ROS u endotelnim ćelijama tako što „sakuplja“ ROS i unapređuje antioksidativni odbrambeni mehanizam (Bos et al., 2013; Yan et al., 2006; Yang et al., 2013). Nivo ekspresije antioksidativnih enzima, CAT, SOD, GPx i glutation-S-transferaze, je regulisan pomoću H₂S (Wen et al., 2013). Kao endotelni gasotransmitter, H₂S uzrokuje i relaksaciju vaskularnih glatkih miocita i tako fiziološki reguliše vrednost arterijskog krvnog pritiska (Wang, 2011; Wang et al., 2015). Takođe, H₂S stimulatívno deluje na proces angiogeneze (Szabo i Papapetropoulos, 2011).

Poremećena biodostupnost H₂S prepoznata je kao indikator progresa i prognoze endotelne disfunkcije povezane sa HHcy. Dokazano je da smanjenje aktivnosti CBS i CGL uzrokuje HHcy što rezultira iscrpljivanjem H₂S, a što vodi do pogoršanja endotelne funkcije i naknadno do vaskularne bolesti povezane sa HHcy (Cheng et al., 2013). *In vitro* studija na kulturi endotelnih ćelija pokazala je da usled smanjene aktivnosti CBS dolazi do smanjene proizvodnje H₂S u endotelu (Pushpakumar et al., 2014). Pored toga, *in vivo* studija na hipertenzivnim pacovima je pokazala da egzogeno apliciran H₂S dovodi do smanjenja stepena endotelne disfunkcije (Xue et al., 2015). Aplikacija H₂S ostvaruje protektivni uticaj na endotelne ćelije i kod pacova sa indukovanom HHcy (Zhao et al., 2018).

U skladu sa važnom ulogom u regulaciji endotelne homeostaza, H₂S ima anti-aterosklerotična svojstva, dok nedostatak H₂S, sa druge strane, ubrzava proces ateroskleroze. Kada su miševi sa defektnom ekspresijom enzima CGL hranjeni aterogenom dijetom, pokazalo se da imaju nižu aortnu proizvodnju H₂S i da razvijaju veći broj aortnih aterosklerotskih plakova nego miševi sa normalnom funkcijom CGL (Yang et al., 2008). Istraživanje na miševima sa deficitantnom aktivnošću CGL, koji su pritom bili na režimu aterogene dijetete pokazalo je povećano ekspimiranje ICAM-1 u endotelu aorte (Mani, et al., 2013). Nasuprot tome, H₂S je

ispoljio anti-aterogeni efekat i inhibirao ekspresiju ICAM-1 u aorti miševa bez apoE. U drugoj studiji egzogeni H₂S je doveo do smanjenja vaskularne inflamacije i oksidativnog stresa i usporio je formiranje aterosklerotskih plakova kod miševa bez apoE (Liu et al., 2013).

Navedene studije ukazuju na značaj povezanosti metabolizma Hcy i metabolizma H₂S i pojašnjavaju patofiziološke mehanizme kojima neadekvatna sinteza H₂S u stanju HHcy može da utiče na nastanak i progresiju endotelne disfunkcije.

1.6.5. Uloga hiperhomocisteinemije u patofiziološkim promenama metabolizma lipida

SAM predstavlja glavni supstrat u reakcijama metilacija sa koga enzimi metiltransferaze uzimaju metil grupu i prebacuju je na druge molekule. Neadekvatna funkcija enzima uključenih u remetilacijski metabolički put može da dovede do nakupljanja SAH čime se smanjuje SAM/SAH odnos te dolazi do poremećaja metilacije molekula. Neravnoteža u metilaciji koja je posredovana akumulacijom SAH može, poremetiti epigenetske mehanizme koji regulišu ekspresiju ključnih molekula uključenih u održavanje ćelijske redoks ravnoteže (Barosso et al., 2014; Barosso et al., 2016). Studija na humanim endotelnim ćelijama, je pokazala da hipometilacija posredovana akumulacijom SAH doprinosi smanjenju ekspresije GPx-1, koja je centralni antioksidativni enzim u endotelu (Barosso et al., 2014).

Nakon oštećenja endotela aterogeni lipoproteini poput LDL ulaze u intimu gde dolazi do njihove oksidacije (Ox-LDL) i nakupljanja u ekstracelularnom prostoru intime. Vremenom makrofagi fagocituju Ox-LDL putem posebnog receptora transformišući se u penaste ćelije koje čine centralnu komponentu aterosklerotskog plaka (Rader et al., 2008). Kao što je prethodno pomenuto, jedna od najpouzdanijih veza između HHcy i vaskularne bolesti je oksidativni stres. ROS generisani u HHcy mogu doprineti oksidaciji LDL čestica i promovisati njihovu akumulaciju u aterosklerotskim plakovima (Kumar et al., 2017; Griffiths et al., 2006). Hcy oslobođen iz metioninom opterećenih endotelnih ćelija potencira nitraciju proteina u LDL česticama (Griffiths et al., 2006). Nitracija LDL indukovana Hcy takođe je povezana sa povećanom migracijom monocita u aterosklerotski plak (Griffiths et al., 2006). Slično nitraciji i druge posttranslacione modifikacije LDL su povezane sa njihovom olakšanom fagocitozom od strane makrofaga. Modifikacije LDL uključuju oksidaciju, nitraciju, acetilaciju, glikaciju, metilaciju, itd. Studija na duplim „knock out“ miševima koji su imali nedostatak i apoE i CGL pokazala je da su visoki nivoi Hcy povezani sa povećanim unosom acetilovanog-LDL u makrofage (Wang et al., 2003). Za razliku od drugih modifikacija, metilacija LDL izaziva smanjeno prepoznavanje ovako modifikovane LDL čestice od strane LDL receptora (Weisgraber et al., 1978). Međutim, sa druge strane, smanjena metilacija LDL, usled nakupljanja SAH koje je izazvano HHcy, može doprineti povećanoj fagocitozi LDL od strane aktiviranih makrofaga u aterosklerotskim plakovima (Wang et al., 2003).

Za razliku od LDL, plazmatske koncentracije lipoproteina velike gustine (HDL) su inverzno povezane sa aterosklerotskom bolesti (Rader i Daugherty, 2008). HDL je glavni lipoprotein uključen u uklanjanje viška HOL iz perifernih tkiva. HDL dostavlja HOL jetri da bi bio redistribuiran u druga tkiva ili uklonjen iz tela (Maerques et al., 2018). Osim što promoviše modifikaciju LDL čestica i time favorizuje aterogenezu, Hcy je povezan i sa promenama metabolizma HDL. Kod miševa sa HHcy izmerena je smanjena koncentracija HDL u krvi, kao posledica smanjene proizvodnje HDL (Namekata et al., 2004).

1.6.6. Patofiziološki efekti homocistein tiolaktone u kardiovaskularnom sistemu

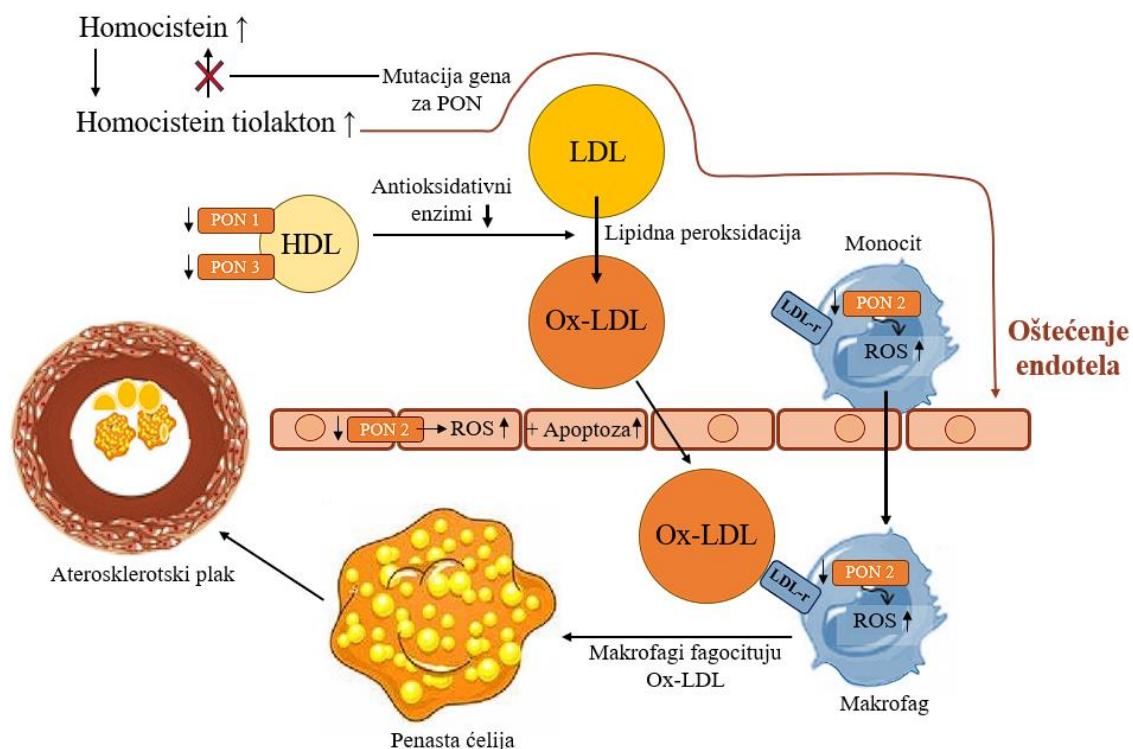
Tokom biosinteze proteina, Hcy može greškom biti iskorišćen od strane metionil-tRNK sintetaze za generisanje Hcy-T, cikličnog tionoestra, koji reaguje sa proteinima formirajući amidske veze sa amino grupama lizinskih ostataka (Jakubowski, 2022). Koncentracija Hcy-T u plazmi pacijenata sa koronarnom bolešću je takođe negativno korelirala sa koncentracijom HDL (Liao et al., 2006). Nastajanje N-homocisteinilovanih proteina sa promenjenom strukturom i biohemijским svojstvima predloženo je kao dodatni mehanizam koji doprinosi razvoju vaskularne patologije povezane sa HHcy. Studija na endotelnim ćelijama je pokazala da se Hcy dodat u medijum prevodi u Hcy-T, i da je stepen konverzije proporcionalan koncentraciji Hcy (Jakubowski, 2001), dok suprotno navedenom, suplementacija FK inhibira biosintezu Hcy-T (Jakubowski et al., 2000).

Citotoksičnost Hcy-T jasno je dokazana na kulturi endotelnih ćelija gde je u medijumu indukovana apoptozu koja je pokazala dozno zavisani efekat u odnosu na koncentraciju Hcy-T (Mercie et al., 2000). Hcy-T inhibira aktivnost tirozin kinaze insulinskog receptora, time inhibirajući fosforilaciju fosfatidilinozitol 3-kinaze i sintezu glikogena (Najib i Sánchez-Margalet, 2005) što je jedno od objašnjenja mehanizma povezanosti HHcy, hiperinsulinemije i razvoja kardiovaskularnih bolesti (Low Wang et al., 2016). Nasuprot tome, istraživanje Mutavdžin i saradnika je pokazalo da četvoronedeljna suplementacija FK, koja je uključena u metabolizam Hcy ostvaruje protektivni antidijabetogeni efekat na streptozotocin indukovanom dijabetesu melitusu kod pacova (Mutavdžin et al., 2019b). Pored toga, fibrinogen, ključni protein u procesu koagulacije, može da bude modifikovan od strane Hcy-T i na taj način pokrene pro-trombotske promene u strukturi i stabilnosti fibrinskog ugruška (Genound et al., 2018).

Pokazano je da je izražena proteinska N-homocisteinilacija prisutna kod pacijenata sa ponovljenim venskim tromboembolizmom i da se nalazi u osnovi pojačanog inflamatornog odgovora povezanog sa ovim stanjem (Szlauer et al., 2015). Urinarna koncentracija Hcy-T je prepoznata kao novi pokazatelj rizika za nastanak akutnog infarkta miokarda, nezavisno od prisustva tradicionalnih faktora rizika (Borowczyk et al., 2018), dok je koncentracija Hcy-T u plazmi pozitivno povezana sa rizikom od koronarne bolesti (Yang et al., 2006).

Kako je ranije napomenuto enzim paraoksonaza ima ulogu u konverziji Hcy-T nazad u Hcy. Polimorfizam gena za PON2 povezan je sa akumulacijom Hcy-T (Yang et al., 2006) (Slika 4). Slično tome, polimorfizam gena za PON1 dovodi do povišenja urinarne koncentracije Hcy-T (Perla-Kaján et al., 2018). Studija na pacijentima sa tipom 2 dijabetesa melitusa dokazala je negativnu korelaciju između aktivnosti homocistein tiolaktone i debljine tunike intime karotidnih arterija (Kosaka et al., 2005). Stoga, metabolička konverzija Hcy u HTL i proteinska N-homocisteinilacija od strane Hcy-T igraju važnu ulogu u oštećenju krvnih sudova izazvanom HHcy. Pored uloge u konverziji Hcy-T u Hcy, PON je enzim uključen i u proces antioksidativne zaštite, pokazuje posrednu ulogu u regulaciji inflamatornog odgovora i inhibiciji agregacije trombocita (Arab et al., 2022), stoga i ovim navedenim mehanizmima učestvuje u održavanju homeostaze krvnih sudova, pa je njegova odgovarajuća ekspresija važna za sprečavanje razvoja patoloških promena u kardiovaskularnom sistemu. HDL predstavlja nosač PON1 enzima, pa smanjenje koncentracije HDL u krvi dovodi do smanjene aktivnosti PON1 i posledične smanjene razgradnje Hcy-T, njegovog nakupljanja u organizmu i povećanog izazivanja štetnih efekata (Arab et al., 2022). Tretman sa atorvastatinom može da umanja abnormalnosti sistolne funkcije i poboljša kontraktilnost srčanog mišića pri eksperimentalno izazvanoj HHcy (Nikolic Turnic et al., 2018). Podaci iz literature ukazuju na značajnu ulogu ω -3 masnih kiselina u

smanjenju koncentracije Hcy, kao i da upotreba statina treba da bude praćena suplementacijom ω -3 masnih kiselina za kako bi se postigao bolji efekat (Nikolic Turnic et al., 2019).



Slika 4. Pokretanje procesa ateroskleroze usled mutacije gena za enzim paraoksonazu. PON – paraoksonaza, LDL – lipoprotein male gustine, Ox-LDL je oksidovani lipoprotein male gustine, LDL-r – receptor za lipoprotein male gustine, HDL – lipoprotein velike gustine, ROS – reaktivni oblici kiseonika (Ilustracija preuzeta i modifikovana iz Arab et al., 2022).

1.6.7. Uloga hiperhomocisteinemije u patofiziološkim promenama stepena metilacije molekula u ćelijama

Metabolizam Hcy igra odlučujuću ulogu u regulaciji procesa metilacije unutar ćelija. U remetilacijskom metaboličkom putu reakcija hidrolize molekula SAH u Hcy i adenzin je reverzibilna, a njena usmerenost ka sintezi SAH je termodinamički povoljnija. Međutim, pod normalnim fiziološkim uslovima ova reakcija teče u pravcu hidrolize SAH zbog brze razgradnje Hcy i adenozina metaboličkom konverzijom u druga jedinjenja, kao i usled njihovog izbacivanja iz ćelije (Ueland et al., 1982). Ukoliko pak dođe do neadekvatnog odvijanja reakcija remetilacijskog i trans-sulfuracijskog puta usled neadekvatne enzimske funkcionalnosti i nastanka HHcy, nakupljanje Hcy dovodi do pomeranja reakcije u smeru sinteze SAH, što je dokazano brojnim studijama na humanoj populaciji, životinjskim modelima i ćelijskim kulturama (Esse et al., 2013; Choumenkovitch et al., 2002; Castro et al., 2003). Pošto je SAH potentan endogeni inhibitor ćelijskih metiltransferaza, nakupljanje Hcy sa posledničnim nagomilavanjem SAH dovodi do hipometilacijskog statusa u ćelijama što može da ima značajan uticaj na ćelijsku homeostazu.

Metilacija DNK je ključni mehanizam za epigenetsku regulaciju ekspresije gena i zato SAH-om uzrokovana hipometilacija može dovesti do poremećene metilacije DNK i neadekvatnih obrazaca ekspresije gena. Dokazano je da izloženost ćelija Hcy izaziva

hipometilaciju CpG nukleotida u pojačivaču gena H19 u humanim vaskularnim glatkim miocitima kultiviranim *in vitro* (Li et al., 2009). Nedostatak CBS enzima kod miševa i sledstveno nakupljanje Hcy u organizmu takođe je dovelo do povećane ekspresije H19 gena (Delvin et al., 2005). Mnogobrojne genetske studije pokazale su da poremećen proces metilacije izazvan nakupljanjem Hcy ili SAH dovodi do promene ekspresije gena koji su pod kontrolom cis-regulatornih elemenata. Posebno važno je istaći da su ovakve promene genske ekspresije prisutne kod gena koji su zaduženi za regulaciju ćelijskog ciklusa kao što su gen za ciklin A i BNIP3 gen (Jamaluddin et al., 2007; Naushad et al., 2012). Jasno je da je precizna ekspresija navedenih gena od ključnog značaja za fiziološku regulaciju ćelijskog ciklusa i ćelijske deobe i da bi u slučaju neadekvatne kontrole ove regulacije postojao rizik za nastanak tumora. Poremećena genska ekspresija primećena je i u genu za trombocitni faktor rasta (Han et al., 2014), genu za LDL receptor (Adaikalakoteswari et al., 2015), kao i u genu za ekstracelularnu izoformu enzima SOD (Laukkanen et al., 1999). Pored toga, promene u genskoj ekspresiji izazvane neadekvatnom metilacijom DNK otkrivene su i u genima za citokine uključene u vaskularni inflamatorni odgovor kao što su IL1 β , IL6, IL8 i ICAM1 (Tekpli et al., 2013; Barroso et al., 2016), a takođe i promoteru gena koji kodira reverznu transkriptazu humane telomeraze (Zhang et al., 2015) što može da utiče na dužinu telomera i proces ćelijskog starenja.

Poremećaj metabolizma Hcy može da dovede i do neadekvatne metilacije molekula RNK, a ne samo DNK. Nakupljanje SAH u kulturi humanih endotelnih ćelija može da izazove smanjenu metilaciju transportne RNK koja nosi selenocistein, što dovodi do izmenjene ekspresije selenoproteina, naročito GPx-1 koji je jedan od glavnih enzima uključenih u proces antioksidativne zaštite (Barroso et al., 2014).

Dokazano je da poremećaj metabolizma Hcy takođe utiče na metilaciju proteina u toku posttranslacione obrade. Na ovaj način može biti izazvana promena funkcije mnogobrojnih proteina koji su uključeni u važne biološke procese u ćeliji kao što je kontrola transkripcije, popravka DNK, obrada RNK, održavanje dužine telomera i ćelijski signalni putevi (Bedfort i Clarke, 2009; Lanouette et al., 2014). Dokazano je da intracelularna akumulacija SAH u endotelnim ćelijama izaziva hipometilaciju bočnih lanaca arginina u proteinima (Esse et al., 2013). Podaci iz literature pokazuju da Hcy može da dovede i do smanjenja metilacije karboksilnih grupa u proteinu p21 koji je važan za ćelijski rast (Wang et al., 1997). U miokardu mladunaca pacova čije su majke bile na režimu ishrane osiromašene molekulima metil donora primećena je smanjena metilacija bočnih lanaca arginina u PGC-1 α koaktivatoru transkripcije koji reguliše ekspresiju gena za proteine uključene u energetske metabolizam (Garcia et al., 2011). Poremećaj metabolizma Hcy može da dovede do promena u stepenu metilacija histona, čime se menja gustina pakovanja DNK u hromatinu, a time i epigenetska regulacija ekspresije gena. Količina Met u hepatocitima je bila u korelaciji sa nivoima metilacije lizina na histonu H3 i promenom ekspresiji gena. SAH smanjuje metilaciju lizina u histonu H3 i aktivira proinflamatorni NF-kB put, što pospešuje ekspresiju adhezivnih molekula i inflamatornih citokina i na taj način se podstiče proces aterogeneze (Barroso et al., 2016).

1.7. Efekti hiperhomocisteinemije na jetru

Poremećaji u metabolizmu Hcy mogu da dovedu do povećane osetljivosti tkiva jetre za razvoj alkoholne bolesti jetre, virusnog hepatitisa, hepatocelularnog karcinoma (HCC), fibroze i ciroze jetre (Li et al., 2020).

Promene u metabolizmu Hcy igraju ključnu ulogu u razvoju oštećenja jetre uzrokovanog alkoholom (Kharbanda, 2013). Dugoročna konzumacija etanola rezultira povišenim nivoima

Hcy i SAH. Povećanje nivoa SAH dovodi do povećane osetljivosti hepatocita citotoksične inflamatorne efekte faktora nekroze tumora α (Watson et al., 2014). Nakupljanje Hcy dovodi zaustavljanja reakcije hidrolize SAH (Esse et al., 2013) usled čega se smanjuje SAM/SAH odnos. Smanjenje SAM u ćelijama dovodi do hipometilacijskog statusa. Neravnoteža u metilaciji koja je posredovana narušenim SAM/SAH odnosom može da izazove razvoj steatoze i inhibiciju aktivnosti proteazoma, što čini prepoznatljiva obeležja oštećenja tkiva jetre izazvanog alkoholom (Ganesan et al., 2016). Etanol ometa funkciju više enzima u hepatocitima uključujući MAT, betain-homocistein S-metiltransferazu i različite MT (Auta et al., 2017). Poremećena funkcija navedenih enzima dovodi do otežane remetilacije Hcy usled čega nastaje njegovo nakupljanje u hepatocitima i smanjene odbrane od oksidativnog stresa usled pada koncentracije redukovano glutationa (Halsted, 2013) Povišenje nivoa SAH i hipometilacija DNK mogu uticati na ekspresiju/aktivnost kaspaze-8, što korelira sa pojačanom apoptozom hepatocita u alkoholnoj bolesti jetre (Hao et al., 2017).

Ekperimenti na životinjama su pokazali da je smanjenje nivoa SAM povezano sa fibrozom jetre (Guo et al., 2016). Na etanol-lipopolisaharidnom modelu fibroze jetre pacova pokazano je da aplikacija SAM, sa posledičnim povećanjem SAM/SAH odnosa može da inhibira oksidativni stres i aktivaciju hepatičnih zvezdastih ćelija, čime se značajno smanjuje oštećenje jetre i fibroza (Karra et al., 2008).

Studija na miševima koji su imali neadekvatnu funkciju enzima MAT, čija je glavna patološka karakteristika posledičan hronični nedostatak SAM, pokazala je da se u jetri ovih životinja razvija makrovezikularna steatoza, infiltracija mononukleara u periportalnom prostoru i HCC (Pascale et al., 2019). Nedovoljna koncentracija SAM izaziva hipometilaciju DNK, genomske nestabilnosti i abnormalnu signalnu transdukciju, uključujući prekomernu ekspresiju c-MYC protoonkogeni i poremećaj RAS/ERK signalnog puta (Frau et al., 2013). Smanjenje nivoa SAM dovodi do proliferacije ćelija HCC, povećanog preživljavanja tumorskih ćelija i neoangiogeneze u tumoru (Frau et al., 2013). Egzogeni SAM može inhibirati razvoj HCC vraćanjem normalnog režima metilacije DNK (Lozano-Rosas et al., 2020). U drugoj studiji, intravenska infuzija SAM tokom 24 dana nije uticala na veličinu HCC, što može biti posledica kompenzatorne indukcije glicin N-metiltransferaze i sprečavanja akumulacije SAM (Pascale et al., 2019).

Istraživanja pokazuju da poremećaji u metabolizmu Hcy mogu da dovedu i do povećane osetljivosti jetre na viruse hepatitisa. Nakon administracije SAM, antiviralni efekat interferona se pojačava (Duong et al., 2004). Aplikacija SAM poboljšava ranu antiviralnu reakciju peginterferona i ribavirina (Feld et al., 2011). SAM može smanjiti ekspresiju hepatitis C virusa u hepatocitima modulacijom aktivnosti antioksidativnih enzima, sintezom redukovano glutationa i promenom odnosa aktivnosti izoforme 1A i 2A enzima MAT (Liu et al., 2018). Odnos MAT1A/MAT2A je dobar pokazatelj verovatnoće preživljavanja pacijenata obolelih HCC sa udruženom hepatitis C virusnom infekcijom (Liu et al., 2018). SAM može izbalansirati odnos MAT1A/MAT2A, što može smanjiti ili čak sprečiti dalji razvoj bolesti. Iz rezultata navedenih studija jasno je uočljivo da usled nakupljanja Hcy u hepatocitima i sledstvenog smanjenja SAM/SAH odnosa dolazi do umanjenja svih korisnih efekata koje SAM ostvaruje u tkivu jetre.

1.8. Efekti hiperhomocisteinemije u gastrointestinalnom sistemu

Povezanost povišenje koncentracije Hcy i inflamatornih bolesti creva (IBC) prvi put je primećena od strane Lambert i saradnika. Ova grupa istraživača je detektovala da pacijenti oboleli od Kronove bolesti imaju statistički značajno povišenu koncentraciju Hcy u krvi u poređenju sa zdravim kontrolama (Lambert et al., 1996). Ovaj nalaz probudio je medicinski interes za proučavanjem uloge Hcy u patogenezi IBC. Meta-analiza koja je kod osoba sa IBC ispitivala rizik za nastanak HHcy i koncentraciju Hcy u plazmi pokazala je da je prosečna koncentracija Hcy u plazmi bila statistički značajno povišena kod osoba obolelih od IBC u poređenju sa kontrolama (Oussalah et al., 2011). Takođe u istoj studiji prosečna koncentracija Hcy u plazmi nije pokazala značajne razlike kod pacijenata sa Kronovom bolešću u odnosu na osobe obolele od ulceroznog kolitisa. Pored navedenih nalaza dokazano je i da je rizik od razvoja HHcy značajno viši kod pacijenata sa IBC u poređenju sa kontrolama. Uzrok HHcy kod pacijenata sa IBC je uglavnom pripisan niskom statusu vitamina B6 (Saibeni et al., 2003), FK (Kallel et al., 2011) i vitamina B12 (Erzin et al., 2008). Povezanost mutacije gena za enzim MTHFR i rizika za razvoj IBC se razlikuje u različitim studijama. Meta-analiza (Oussalah et al., 2011) navodi da je MTHFR 677TT genotip povezan sa većim rizikom za nastanak IBC kod pacijenata sa niskom koncentracijom folata u plazmi, a kako je pomenuto ranije, mutacije gena za MTHFR dovode do nastanka HHcy. Druga meta-analiza (Zintzaras et al., 2010) nije pronašla vezu između MTHFR C677T polimorfizma i rizika za nastanak IBC. Literaturni podaci ukazuju da je HHcy kod pacijenata sa IBC takođe povezana sa: muškim polom, starijom dobi, smanjenom koncentracijom vitamina B12 u serumu i težim stadijumom bolesti (Romagnuolo et al., 2001).

Pored IBC mnogobrojne studije ukazuju na uticaj HHcy u nastanku polipa, adenoma i karcinoma debelog creva (Stojanović et al., 2015). Pokazano je da Hcy podstiče rast malignih ćelija karcinoma debelog creva u kulturi i da se Hcy indukovani efekat podsticanja rasta umanjuje prilikom tretmana FK (Akoglu et al., 2004). Mnogobrojne studije koje su istraživale potencijalnu ulogu statusa homocisteina u patogenezi karcinoma debelog creva prijavile su kontroverzne rezultate. U studiji slučaja i kontrole, koncentracija ukupnog Hcy bila je značajno viša kod ljudi obolelih od karcinoma debelog creva poređeno sa kontrolama (Ferroni et al., 2012). Univarijantna analiza pokazala je da koncentracija Hcy značajno pozitivno korelira sa koncentracijom interleukina-6 i faktorom nekroze tumora α , i kod pacijenata sa karcinomom debelog creva, kao i kod pacijentkinja sa karcinomom dojke. Nezavisna pozitivna korelacija faktora nekroze tumora α sa ukupnim Hcy kod pacijenata sa navedenim malignitetima, ukazuje na to da inflamatorni odgovor može biti udružen sa povišenjem koncentracije Hcy u krvi. Oštećenje tkiva izazvano Hcy prilikom progresije karcinoma udruženo je i sa promenom ekspresije adhezivnih molekula, citokina i hemokina (Ferroni et al., 2012). Studija (Battistelli et al., 2006) pokazuje da pacijenti sa nemetastatskim karcinomom debelog creva, koji su bili pogodni za hirurško lečenje, imaju statistički značajno višu koncentraciju Hcy u krvi nego zdravi pojedinci kao i da porast koncentracije Hcy prisutan kod nosilaca C/C i C/T genotipa C677TMTHFR mutacije. Ista studija ukazuje na to da navedena mutacija može biti povezana sa brzinom metionin-zavisne proliferacije malignih ćelija karcinoma debelog creva i može delovati kao potencirajući faktor za razvoj karcinomom indukovane trombofilije. Isto tako, TT genotip MTHFR uvećava rizik od nastanka karcinoma debelog creva u starijoj populaciji zbog poremećaja metabolizma FK (Shannon et al., 2002). Određene studije pak pokazuju da C677T ima zaštitni efekat na razvoj karcinoma debelog creva u populaciji sa malom varijabilnošću alela i optimalnim unosom FK (Delgado-Plasencia et al., 2013).

Visoka koncentracija Hcy duplo povećava verovatnoću za incijalnu pojavu i za recidiviranje adenoma debelog creva (Bobe et al., 2010). Randomizovana klinička studija koja je ispitivala uticaj FK i/ili aspirina u prevenciji kolorektalnih adenoma, nije registrovala

povezanosti između koncentracije ukupnog Hcy u plazmi i rizika od povratka adenoma u grupama koje su primale placebo naspram grupa koje su bile na režimu suplementacije FK (Levine et al., 2010).

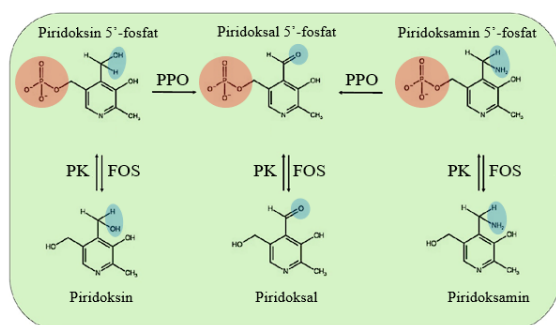
1.9. Biološki značaj vitamina B6









Vitamin B6 je veoma važan molekul neophodan za optimalno održavanje zdravlja i fiziološko funkcionisanje organizma. Naziv „vitamin B6“ je zajednički za grupu šest hemijskih jedinjenja rastvorljivih u vodi: piridoksal, piridoksamin i piridoksin, kao i njihovi 5'-fosfatni analozi. Najaktivnija forma vitamina B6, je piridoksal fosfat. U ovom obliku vitamin B6 se u organizmu koristi kao kofaktor za preko 150 različitih reakcija (Hellmann i Mooney, 2010). Budući da je vitamin B6 prisutan u toliko mnogo reakcija u telu, nije iznenađujuće što njegov nedostatak ima značajne kliničke implikacije. Preporučeni dnevni unos vitamina B6 za odrasle prema WHO je 1,3–1,7 mg dnevno, a prema podacima Službe za poljoprivredna istraživanja Ministarstva poljoprivrede Sjedinjenih Američkih Država 2 mg dnevno (Slika 5). Vitamin B6 je važan za metabolizam i eukariotskih i prokariotskih ćelija, međutim, viši organizmi nisu u stanju da ga proizvedu, stoga moraju da ga unose ishranom iz namirnica koje sadrže vitamin B6 proizveden od strane bakterija i gljivica. Ipak, ljudski organizma poseduje specifične enzime piridoksal kinaze, tako da je sposoban da neaktivne oblike vitamina B6 fosforiliše u aktivni oblik (DiSalvo et al., 2011). Vitamin B6 je uključen u reakcije metabolizma, ugljenih hidrata, lipida, aminokiselina i nukleinskih kiselina. Najvažniji biohemijski procesi u kojima vitamin B6 učestvuje kao kofaktor su: razgradnja glikogena enzimom glikogen fosforilazom, metabolizam aminokiselina. U navedenim metaboličkim reakcijama, vitamin B6 učestvuje u procesu transaminacije i dekarboksilacije kao koenzim. Vitamin B6 je važan i u reakcijama koje su katalizovane enzimima sintazama i racemazama.

Ključni metabolički putevi u čijoj regulaciju učestvuje vitamin B6 i čije promene usled deficita vitamina B6 mogu da utiču na zdravlje ljudi jesu metabolizam Hcy, metabolizam sfingozin fosfata, katabolizam triptofana i delovanje transkripcionog faktora NF- κ B (Salata et al., 2012; Desbarats, 2020). Vitamin B6 ostvaruje uticaj na renin-angiotenzin sistem i proces hemostaze, osigurava homeostazu endotela, i reguliše agregaciju trombocita. Takođe, ovaj vitamin je bitan za regulaciju enzima serin hidroksimetiltransferaza (SHMT) izoforme 2, koji je uključen u metabolizam folata.

SHMT2 takođe reguliše produkciju interferona tipa I (Walden et al., 2019; Snell i Brooks, 2015), u čemu se ogleda bitna uloga vitamina B6 i u antivirusnoj zaštiti. Vitamin B6 ima važnu ulogu u metabolizmu Hcy u trans-sulfuracijskom metaboličkom putu gde kao kofaktor enzima CBS i CGL omogućava konverziju Hcy u Cys. Nedostatak vitamina B6 rezultuje neadekvatnom funkcionalnošću trans-sulfuracijskog puta, što kao posledicu izaziva nakupljanje Hcy u organizmu i ozbiljne posledice po kardiovaskularni i digestivni sistem (Ganguly i Alam, 2015; Keshteli et al., 2015).

2 mg vitamina B6 - preporučeni dnevni unos



1. Losos  100 g sadrži 1,12 mg B6 = 56% PDU	2. Pileće belo meso  100 g sadrži 1,08 mg B6 = 56% PDU
3. Niskomasna svinjetina  100 g sadrži 0,64 mg B6 = 32% PDU	4. Tofu sir  100 g sadrži 0,58 mg B6 = 29% PDU
5. Govede meso  100 g sadrži 0,56 mg B6 = 28% PDU	6. Banane  100 g sadrži 0,44 mg B6 = 22% PDU
7. Beli krompir  100 g sadrži 0,36 mg B6 = 18% PDU	8. Slatki krompir - batat  100 g sadrži 0,28 mg B6 = 14% PDU

Slika 5. Hemijski oblici vitamina B6 i prirodne namirnice bogate vitaminom B6. PDU – preporučeni dnevni unos, B6 – vitamin B6, PPO – piridoksin 5'-fosfat oksidaza, PK – piridoksal kinaza, FOS – fosfataza (Ilustracija preuzeta i modifikovana iz Mascolo et al., 2020; podaci preuzeti sa zvaničnog sajta Službe za poljoprivredna istraživanja Ministarstva poljoprivrede Sjedinjenih Američkih Država).

Podaci iz literature pokazuju da vitamin B6 ostvaruje smanjenje inflamatornog procesa u organizmu uticajem na aktivnost inflamazoma posebno njihove komponente, NLRP3 senzornog proteina (Zhang et al., 2016). Vitamin B6 ima ulogu i u proliferaciji T limfocita kao i u sintezi brojnih interleukina, dok suprotno, njegov nedostatak dovodi do neadekvatne regulacije različitih faza u imunskom odgovoru uključujući smanjenu sintezu antitela, sniženu produkciju IL-2, a povišenu produkciju IL-4 (Qian et al., 2017). Hronična inflamacija u tkivima može dovesti do pokretanja procesa maligne alteracije, a vitamin B6 ima ulogu u modulaciji imunskog odgovora i učestvuje kao kofaktor za kritične enzime u putevima metil metabolizma. Vitamin B6 igra ključnu ulogu u kinureninskom putu kao kofaktor enzima kinureninaze. Ovaj metabolički put proizvodi anti-inflamatorne molekule kao što su kinurenini (Salata et al., 2012). Istraživanja pokazuju da optimizovana aktivnost kinureninaza sa svojim kofaktorom vitaminom B6 može inhibirati progresiju kancera *in vivo* (Zhang et al., 2016). Krajnji metabolit kinureninskog metaboličkog puta, 8-hidroksikvinolinska kiselina ima antiproliferativne i antimigracione efekte na ćelije karcinoma debelog creva (Zhang et al., 2016).

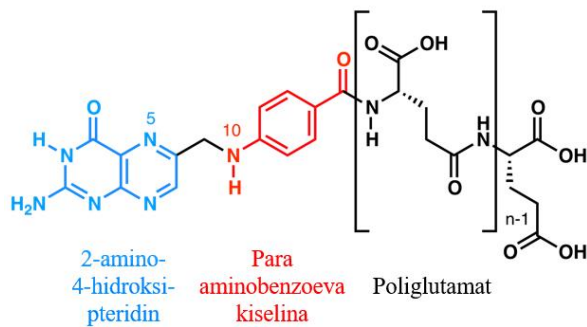
Deficit vitamina B6 kod ljudi takođe je povezan sa razvojem ateroskleroze, moždanim udarom i trombozom (Mocellin et al., 2017; Friso et al., 2001). Suplementacija vitamina B6 se pokazala korisnom za smanjenje rizika od razvoja kardiovaskularnih bolesti kod muškaraca, ali da takva veza nije postojala kod žena (Jeon i Park, 2019).

1.10. Biološki značaj folne kiseline


FK je hidrosolubilni vitamin, a njeno ime vodi poreklo od reči *folium* što na latinskom jeziku znači list. FK je poznata i kao vitamin B9. Molekulska struktura FK sadrži tri različite jedinice: ostatak glutaminske kiseline, pteroil grupu i para-aminobenzojevu kiselinu (Gazzali et al., 2016). FK se u prirodi nalazi u redukovanom obliku u vidu folata (Shelke i Keith, 2011). Ljudski organizam ne poseduje enzime pomoću kojih bi mogao da sintetizira FK tako da njena dostupnost organizmu zavisi od adekvatnog unosa namirnica koje prirodno poseduju FK u većoj količini (Slika 6), namirnica obogaćenih FK, ili putem suplementacijskih preparata. FK se apsorbira iz digestivnog trakta aktivnim transportom preko visoko afinitetnog transportera za folat u duodenumu i jejunumu. U hrani, folati se pojavljuju kao poliglutamati, koji se mogu apsorbirati u crevima nakon enzimske konverzije u folatne monoglutamate (Milman, 2012; Bernstein et al., 1970). FK u ćelijama mora biti podvrgnuta dvostepenoj enzimskoj reakciji pre nego što postane aktivan koenzim THF (Scaglione i Panzavolta, 2014). Nakon toga, THF se konvertuje u 5,10- metilentetrahidrofolat i redukuje se pomoću MTHFR u 5-metil tetrahidrofolat, koji je uključen u remetilaciju Hcy u Met, donirajući preostalu metil grupu u reakciji koju katalizuje enzim MS.

FK je esencijalan vitamin za proces sinteze nukleotida i proliferaciju ćelija kao i za remetilaciju Hcy u Met i uključena je u metilacioni ciklus (Enderami et al., 2018). Optimalni unos FK tokom trudnoće ključan je za fiziološko razvijanje neuralne cevi ploda (Scaglione i Panzavolta, 2014). S druge strane, deficit FK je povezan sa nekoliko patoloških stanja poput anemije, kardiovaskularnih bolesti, a često je prisutan deficit FK i među pacijentima koji pate od inflamatornih bolesti creva (Pan et al., 2017). Nedostatak FK može biti rezultat nedovoljnog unosa, veće potražnje, malapsorpcije ili primene određenih lekova i može dovesti do povećanog rizika od brojnih bolesti, kao što su kardiovaskularne bolesti i tumori. Nedostatak FK može rezultirati HHcy i poremećajima sinteze proteina i DNK (Karakoyun et al., 2019). FK učestvuje u jednogljaničnom (1C) metabolizmu, jer se 1C jedinice prenose na THF i esencijalne su za sintezu DNK. SAM je metil donator za biološku metilaciju, uključujući metilaciju DNK, RNK i proteina. Niska koncentracija FK tokom ćelijske deobe inhibira konverziju deoksiuridin monofosfata u deoksitimidin monofosfat prilikom sinteze DNK. Nedostatak FK može dovesti do genomske hipometilacije (Duthie et al., 2002). Dokazano je da metilacija citozina u DNK sekvenci igra važnu ulogu u genskoj ekspresiji (Otani et al., 2005). Hipometilacija uzrokovana nedostatkom FK može dovesti do indukcije protoonkogeni, koji podstiču kancerogenezu (Duthie et al., 2002).

400 µg folne kiseline - preporučeni dnevni unos



U prirodnim izvorima folna kiselina se nalazi u obliku poliglutamata

<p>1. Mlada zelena soja</p>  <p>100 g sadrži 311 µg FK = 78% PDU</p>	<p>2. Sočivo</p>  <p>100 g sadrži 181 µg FK = 45% PDU</p>
<p>3. Asparagus</p>  <p>100 g sadrži 149 µg FK = 37% PDU</p>	<p>4. Španać</p>  <p>100 g sadrži 146 µg FK = 37% PDU</p>
<p>5. Zelena salata</p>  <p>100 g sadrži 136 µg FK = 34% PDU</p>	<p>6. Brokoli</p>  <p>100 g sadrži 108 µg FK = 27% PDU</p>
<p>7. Avokado</p>  <p>100 g sadrži 81 µg FK = 20% PDU</p>	<p>8. Mango</p>  <p>100 g sadrži 43 µg FK = 11% PDU</p>

Slika 6. Hemijska formula folne kiseline i prirodne namirnice bogate folnom kiselinom. PDU – preporučeni dnevni unos (*Ilustracija preuzeta i modifikovana iz Ly et al., 2012; podaci preuzeti sa zvaničnog sajta Službe za poljoprivredna istraživanja Ministarstva poljoprivrede Sjedinjenih Američkih Država*).

Folna kiselina je osnovna za pravilan razvoj trudnoće, jer njen nedostatak povećava rizik od defekata neuralne cevi kod dece, dok njena suplementacija tokom trudnoće smanjuje rizik od srčanih poremećaja (Shelke i Keith, 2011). Zapravo, povećana potreba ploda za FK tokom gestacije može dovesti do smanjenja njegove koncentracije u krvi majke. Ključno je da folna kiselina učestvuje u sintezi proteina i amino kiselina, kao i u ćelijskoj proliferaciji, što je posebno važno u prvih nekoliko nedelja gestacije. Suplementacija FK, može smanjiti rizik od preeklampsije kod trudnica (Liu et al., 2018). Suplementacija FK (400 µg/dan) tokom pet nedelja značajno povećava nivo folata u serumu kod trudnica (Kondo et al., 2011). Trudnicama, ili ženama koje pokušavaju da zatrudne, preporučuje se da započnu sa suplementacijom 12 nedelja pre trudnoće i da je nastave tokom cele trudnoće, kao i tokom postporođajnog perioda i dojenja.

FK je važna i za eritropoezu, stoga njen nedostatak može dovesti do makrocitne anemije usled apoptoze eritroblasta (Ghishan i Kiela, 2017). Suplementacija FK je preporučena i za pušače, osobe koje se leče aspirinom, pacijente koji pate od bolesti bubrega, osoba sa HHcy, kao i kod pacijenata sa bolestima koje bi mogle da uzrokuju malapsorpciju FK, na primer, inflamatorne bolesti creva (Likis, 2016). Zeleno lisnato povrće, orašasti plodovi i mahunasto povrće su bogati prirodni izvori FK (Likis, 2016). Bioraspoloživost folata iz prirodnih izvora je procenjena na približno 50%, što je polovina u odnosu na sintetske folate u suplementima čija je bioraspoloživost između 85–100% (Shelke i Keith, 2011), a pored toga uzimanje suplemenata FK vremenski blizu uz obrok smanjuje bioraspoloživost FK. Dnevne potrebe za folnom kiselinom zavise od zdravstvenog stanja osobe. Folna kiselina, slično kao i drugi vitamini rastvorljivi u vodi, ne akumulira se u ljudskom telu i retko je poznata kao uzrok toksičnih efekata (Shelke i Keith, 2011).

1.11. Fizička aktivnost i hiperhomocisteinemija

Fizička aktivnost je jedan od važnih faktora u prevenciji kardiovaskularnih rizika. Međutim, pitanje da li fizička aktivnost i vežbanje imaju efekat na koncentraciju Hcy i dalje ostaje nejasno s obzirom da različite studije daju različite rezultate koji su često kontradiktorni (Maroto-Sanchez et al., 2013; Joubert et al., 2006). Prilikom ispitivanja povezanosti fizičke aktivnosti i Hcy različite studije su se fokusirale na različite faktore kao na primer: uticaj životnog stila, ishrane, nivoa fizičke aktivnosti, kardiovaskularne kondicije, hroničnog ili akutnog efekta vežbanja, a takođe je ispitivanje vršeno i na raznovrsnim populacijama, na životinjama ili različitim grupama ljudi: sedentarni, stariji, sportisti, gojazni, žene ili deca. Uzevši u obzir veliku varijabilnost u metodologiji različitih studija veoma je teško postići saglasnost i doneti univerzalni zaključak (Maroto-Sánchez et al., 2016).

Pojedine studije su dokazale da nakon perioda treninga dolazi do smanjenja koncentracije Hcy u krvi (Randeve et al., 2002; Choi et al., 2014) ili da je niska koncentracija Hcy bila povezana sa visokim nivoima fizičke aktivnosti i boljom kardiorespiratornom kondicijom (Kuo et al., 2005; Ruiz et al., 2007). Za razliku od navedenih rezultata, druge studije su pokazale da nakon akutnog vežbanja, perioda treninga ili nakon određenog sportskog takmičenja dolazi do porasta koncentracija Hcy u krvi (Duncan et al., 2004; Herrmann et al., 2003; Konig et al., 2003). Tačan mehanizam kojim vežbanje utiče na koncentracije Hcy i dalje je nepoznat. Stoga je važno razlikovati vrstu vežbanja i treninga, kao i njihove intenzitete i trajanja, kako bismo dublje razumeli osnovne mehanizme varijacija koncentracije Hcy u krvi usled vežbanja. Određene eksperimentalne studije su ispitale efekte akutnog vežbanja na koncentraciju Hcy, varirajući stepen intenziteta, trajanja i tipa vežbanja. Većina pregledanih članaka iz ove kategorije pronašla je povišenje koncentracije Hcy u krvi odmah nakon akutnog vežbanja. Rezultati jedne studije pokazuju povišenje koncentracije Hcy u krvi nakon 1 i 24 sata triatlonskog takmičenja (Konig et al., 2003), dok se u drugoj studiji isti ovakav odgovor postiže nakon različitih modaliteta aerobnih vežbi (Herrmann et al., 2003). Navedene studije pretpostavljaju da intenzitet i trajanje vežbanja mogu uticati na koncentraciju. Suprotno tome, druge studije koje uključuju različite intenzitete vežbanja pokazale su da je povišenje koncentracije Hcy nezavisno od stepena aktivnosti ili vrste aktivnosti (Iglesias-Gutierrez et al., 2012; Venta et al., 2009).

I u okviru studija koje analiziraju efekte hroničnih vežbanja na koncentracije ukupnog Hcy u krvi, teško je postići saglasnost zbog raznovrsnosti tipova vežbanja i programa treninga. Određena istraživanja su pokazala pad koncentracije Hcy u krvi nakon aerobnih treninga (Randeve et al., 2002; Choi et al., 2014), i nakon treninga koji uključuje vežbe sa otporom (Vincent et al., 2003; Vincent et al., 2006). Nasuprot navedenih nalaza, druge studije su prijavile povišenje koncentracije Hcy. Dve studije su detektovale povišene koncentracije Hcy, međutim dobijene vrednosti su bile unutar opsega fizioloških referentnih vrednosti ($< 15 \mu\text{mol/L}$) (Guzel et al., 2012; Molina-López et al., 2013). U studiji Okura i saradnika primećeni su različite promene koncentracije Hcy u zavisnosti od početne koncentracije Hcy (Okura et al., 2006). Porast koncentracije Hcy je izmeren nakon treninga kod ispitanika sa fiziološkim početnim koncentracijama Hcy dok je suprotan efekat uočen kod ispitanika sa HHcy na početku treninga, kod kojih je nakon programa vežbanja došlo do sniženja koncentracije Hcy (Okura et al., 2006).

Nasuprot rezultatima koji pokazuju pozitivnu i negativnu korelaciju vežbanja sa koncentracijom Hcy, druge studije ukazuju da trening ne menja koncentracije Hcy (Boreham et al., 2005).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su bili:

1. Odrediti koncentraciju Hcy u serumu pacova kojima je svakodnevno tokom 14 uzastopnih dana davan Hcy potkožno (eksperimentalne grupe), kao i pacovima u kontrolnim grupama, i dokazati razvijenu HHcy kod pacova u eksperimentalnim grupama.
2. Ispitivanje efekata subhronične HHcy izazvane potkožnim davanjem Hcy tokom 14 uzastopnih dana na:
 - a. telesnu masu životinja kroz nedelje eksperimentalnog protokola
 - b. indeks srčane mase (ISM)
 - c. kardiovaskularne biomarkere u serumu: koncentracija Hcy, HOL, LDL, HDL, triglicerida (TG), aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH), koncentracija visoko senzitivnog troponina T (hs-TnT), vitamina B12 i folata
 - d. hemostatske biomarkere u plazmi: fibrinogen, D-dimer i vonWillebrand-ov faktor (vWF)
 - e. hepato-renalno-pankreatične biomarkere: koncentracija glukoze, ukupnih proteina, albumina, aktivnost aspartat aminotransferaze (AST), aktivnost alanin aminotransferaze (ALT), koncentracija uree, kreatinina, mokraćne kiseline, aktivnost amilaze, koncentracija C-reaktivnog proteina (CRP)
 - f. parametre oksidativnog stresa u homogenatima tkiva srca, jetre i kolona pacova: CAT, SOD – ukupna aktivnost enzima, distribucija izoformi SOD i stepen lipidne peroksidacije - koncentracija malondialdehida (MDA)
 - g. aktivnosti metaboličkih enzima LDH i MDH (ukupna aktivnost i distribucija odgovarajućih izoformi) u homogenatima tkiva srca, jetre i kolona pacova
 - h. aktivnosti matriks metaloproteinaza MMP-2 i MMP-9 u homogenatima tkiva srca, jetre i kolona pacova
 - i. prisustvo histoloških promena i na histomorfometrijske parametre na mikroskopskim isečcima tkiva pacova:
 - srce: ishemijske promene, proliferacija vezivnog tkiva, debljina zida leve komore, debljina zida desne komore, debljina interventrikularnog septuma, transversalni dijametar kardiomiocita
 - aorta: prisustvo aterosklerotskih promena i remodelovanja aorte histomorfometrijskom analizom (debljina tunike medije, rastojanje između elastičnih lamina, broj elastičnih lamina)
 - jetra: prisustvo polja nekroze, promena arhitektonike hepatičnog lobulusa, proliferacija vezivnog tkiva, masna promena jetre, edem
 - kolon: dubina Liberkinovih kriпти, debljina tunike mukoze, debljina lamine muskularis mukoze, ukupna debljina zida debelog creva, broj ćelija u lamini propriji na 0,1 mm²
3. Ispitivanje efekata intraperitonealnog davanja vitamina B6, FK, kombinovane aplikacije vitamina B6 i FK, kao i efekata dozirane aerobne fizičke aktivnosti kod pacova u kontrolnoj grupi i u uslovima subhronične HHcy izazvane potkožnim davanjem Hcy tokom 14 uzastopnih dana na:
 - a. telesnu masu životinja kroz nedelje eksperimentalnog protokola
 - b. ISM
 - c. kardiovaskularne biomarkere u serumu: koncentracija Hcy, HOL, LDL, HDL, TG, LDH, hs-TnT, vitamina B12 i folata

- d. hemostatske biomarkere u plazmi: fibrinogen, D-dimer i vWF
- e. hepato-renalno-pankreatične biomarkere: koncentracija glukoze, ukupnih proteina, albumina, aktivnost AST, aktivnost ALT, koncentracija uree, kreatinina, mokraćne kiseline, aktivnost amilaze, koncentracija CRP
- f. parametre oksidativnog stresa u homogenatima tkiva srca, jetre i kolona pacova: CAT, SOD – ukupna aktivnost enzima i stepen lipidne peroksidacije - koncentracija MDA
- g. aktivnosti metaboličkih enzima LDH i MDH u homogenatima tkiva srca, jetre i kolona pacova
- h. prisustvo histoloških i na histomorfometrijske parametre na mikroskopskim isečcima tkiva pacova:
 - srce: ishemijske promene, proliferacija vezivnog tkiva, debljina zida leve komore, debljina zida desne komore, debljina interventrikularnog septuma, transverzalni dijametar kardiomiocita.
 - aorta: prisustvo aterosklerotskih promena i remodelovanja aorte histomorfometrijskom analizom (debljina tunike medije, rastojanje između elastičnih lamina, broj elastičnih lamina).
 - jetra: prisustvo polja nekroze, promena arhitektonike hepatičnog lobulusa, proliferacija vezivnog tkiva, masna promena jetre, edem.
 - kolon: dubina Liberkinovih kripti, debljina tunike mukoze, debljina lamine muskularis mukoze, ukupna debljina zida debelog creva, broj ćelija u lamini propriji na 0,1 mm².

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

Kao eksperimentalne životinje u istraživanju su korišćeni pacovi soja *Wistar albino*, mužjaci čija je telesna masa na početku eksperimentalnog protokola iznosila približno 160 g i čija je starost bila 15-20 dana. Pacovi su nabavljeni iz vivarijuma Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Pacovi su čuvani u paru u kavezima napravljenim od providnog pleksiglasa. Dno kaveza je bilo obloženo šuškom, a hrana i voda su pacovima bile slobodno dostupne (*ad libitum*). Pacovi su se nalazili u stalno regulisanim ambijentalnim uslovima (temperatura prostorije = 21 ± 2 °C; vlažnost vazduha = 55 ± 5 %). Ciklus svetlo-tama je regulisan na 12 časova sa početkom izloženosti svetlu od 07:30 časova). Pacovi su se adaptirali na ambijentalne uslove u trajanju od 3 uzastopna dana, nakon čega je započet eksperimentalni protokol. Istraživanje je odobreno od strane Etičke komisije za dobrobit eksperimentalnih životinja, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, Uprava za veterinu, Republika Srbija (rešenje broj: 323-07-02523/2018-05). Svi postupci u toku izviđenja eksperimenta bili su u skladu sa etičkim principima i propisanim zakonom o dobrobiti životinja (EU direktiva za zaštitu kičmenjaka koji se koriste u eksperimentalne i druge naučne svrhe 86/609/EES).

3.2. Eksperimentalne grupe

Pacovi su podeljeni u 12 grupa (Slika 7) i bili su tretirani prema sledećem režimu:

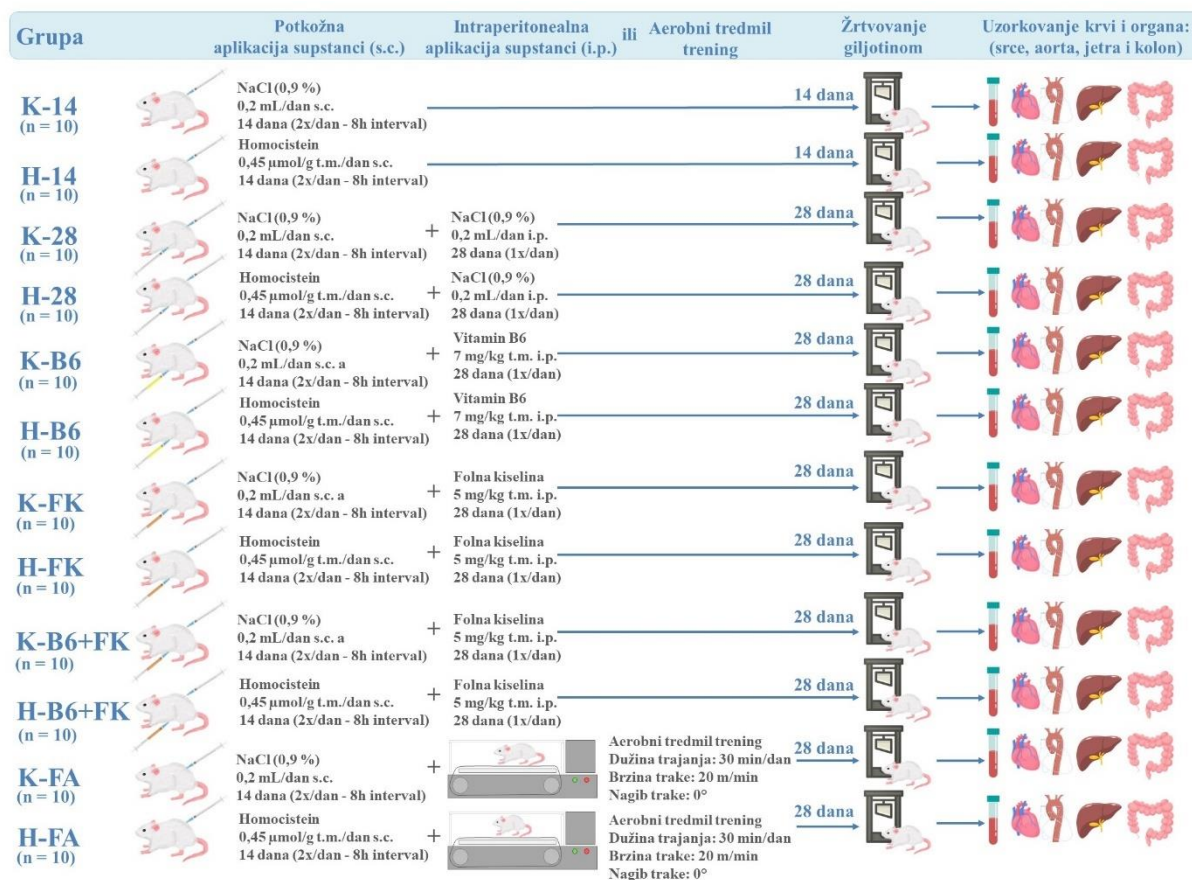
1. Kontrolna grupa (n=10) - aplikacija fiziološkog rastvora (f.r.) 0,2 mL s.c. 2x/dan u razmaku od 8 časova, tokom 14 uzastopnih dana (K-14)
2. Eksperimentalna grupa (n=10) - aplikacija D,L-homocisteina (0,45 μ mol/g tm. s.c.) 2x/dan u razmaku od 8 časova, tokom 14 uzastopnih dana (H-14) (Pavlikova et al., 2011).
3. Kontrolna grupa (n=10) - aplikacija fiziološkog rastvora (f.r. 0,2 mL s.c.) 2x/dan u razmaku od 8 časova, tokom 14 uzastopnih dana i fiziološkog rastvora (f.r. 0,5 mL i.p.) jedan put dnevno tokom 28 uzastopnih dana (K-28).
4. Eksperimentalna grupa (n=10) - aplikacija D,L-homocisteina (0,45 μ mol/g tm. s.c.) 2x/dan u razmaku od 8 časova, tokom uzastopnih 14 dana i fiziološkog rastvora (f.r. 0,5 mL i.p.) jedan put dnevno tokom 28 uzastopnih dana (H-28).
5. Kontrolna grupa (n=10) - aplikacija fiziološkog rastvora (f.r. 0,2 mL s.c.) 2x/dan u razmaku od 8 časova, tokom 14 uzastopnih dana i vitamina B6 (7 mg/kg tm. i.p.) jedan put dnevno tokom 28 uzastopnih dana (K-B6).
6. Eksperimentalna grupa (n=10) - aplikacija D,L-homocisteina (0,45 μ mol/g tm. s.c.) 2x/dan u razmaku od 8 časova, tokom 14 uzastopnih dana i vitamina B6 (7 mg/kg tm. i.p.) jedan put dnevno tokom 28 uzastopnih dana (H-B6).
7. Kontrolna grupa (n=10) - aplikacija fiziološkog rastvora (f.r. 0,2 mL s.c.) 2x/dan u razmaku od 8 časova, tokom 14 uzastopnih dana i folne kiseline (5 mg/kg tm. i.p.) jedan put dnevno tokom 28 uzastopnih dana (K-FK).
8. Eksperimentalna grupa (n=10) - aplikacija D,L-homocisteina (0,45 μ mol/g tm. s.c.) 2x/dan u razmaku od 8 časova, tokom 14 uzastopnih dana i folne kiseline (5 mg/kg tm. i.p.) jedan put dnevno tokom 28 uzastopnih dana (H-FK).
9. Kontrolna grupa (n=10) - aplikacija fiziološkog rastvora (f.r. 0,2 mL s.c.) 2x/dan u razmaku od 8 časova, tokom 14 uzastopnih dana i vitamina B6 (7 mg/kg tm. i.p.) i folne kiseline (5 mg/kg tm. i.p.) jednom dnevno tokom 28 uzastopnih dana (K-B6+FK).
10. Eksperimentalna grupa (n=10) - aplikacija D,L-homocisteina (0,45 μ mol/g tm. s.c.) 2x/dan u razmaku od 8 časova, tokom 14 uzastopnih dana i vitamina B6 (7 mg/kg tm.

i.p.) i folne kiseline (5 mg/kg tm. i.p.) jednom dnevno tokom 28 uzastopnih dana (H-B6+FK).

11. Kontrolna grupa (n=10) - aplikacija fiziološkog rastvora (f.r. 0,2 mL s.c.) 2x/dan u razmaku od 8 časova, tokom 14 uzastopnih dana + tretman aerobnom fizičkom aktivnošću tokom 28 uzastopnih dana (K-FA).
12. Eksperimentalna grupa (n=10) - aplikacija D,L-homocisteina (0,45 μ mol/g tm. s.c.) 2x/dan u razmaku od 8 časova, tokom 14 dana + tretman aerobnom fizičkom aktivnošću tokom 28 uzastopnih dana (H-FA).

Dnevne potrebe pacova za unosom FK iznose približno 2 mg/kg, prema preporukama National Research Council Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition iz 1995. god. Ishrana koja sadrži 8 mg/kg folne kiseline smatra se umerenom suplementacijom, što je ekvivalentno dnevnom unosu između 1 i 6 mg FK u humanoj populaciji. Navedene doze su u skladu sa preporučenim dnevnim dozama za ljude (Partearroyo et al., 2016). U našem istraživanju, upotrebljena je dnevnu dozu FK 5 mg/kg.

Preporuka za unos vitamina B6 kod pacova u toku jednog dana varira između 6 i 7 mg/kg, prema preporukama National Research Council Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition iz 1995. god. Utvrđeno je da minimalni nivo od 1 mg/kg vitamina B6 sprečava posledice nedostatka ovog vitamina, koje uključuju depresiju rasta (Coburn, 1994). U našem istraživanju, namera je bila da se ispita da li dodatna primena vitamina B6, u preporučenoj dozi od 7 mg/kg, izaziva pozitivne efekte na zdravlje, kontrolnih pacova i pacova sa eksperimentalno indukovanom HHcy.

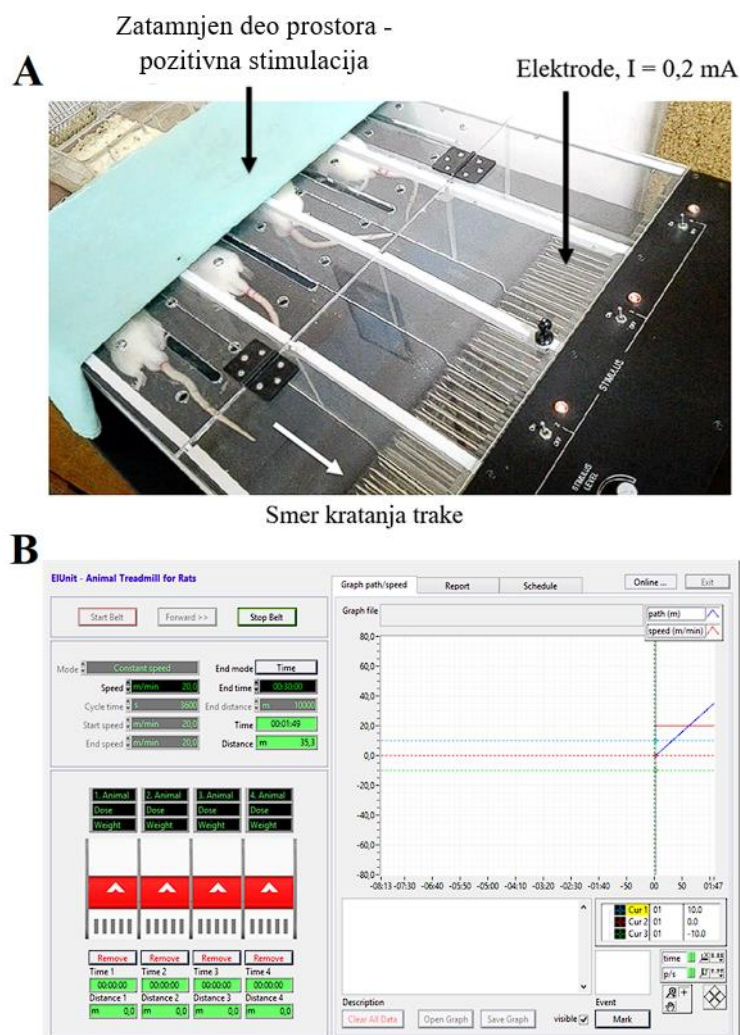


Slika 7. Shematski prikaz eksperimentalnog protokola

3.3. Protokol aerobne fizičke aktivnosti

Protokol dozirane aerobne fizičke aktivnosti izveden je na tredmilu za male eksperimentalne životinje (ElUnit, Beograd, Srbija). Na jednom kraju trake za trčanje nalazile su se elektrode koje proizvode elektrošok jačine 0,2 mA, čime su pacovi stimulisani da trče unapred. Sa druge strane, na početku trake, nalazila se pozitivna stimulacija u vidu zatamnjenog prostora. Životinja, sa ciljem da izbegne električni nadražaj na krajnjoj strani trake, trči ka suprotnoj, zatamnjenoj strani (Slika 8). Kompjuterskim programom (eTreadSoft, ElUnit, Beograd, Srbija) je unapred definisan protokol rada trake. Nagib trake se podešava manuelno i iznosio je 0°. Svi pacovi iz treniranih grupa (K-FA i H-FA) navikavani su na tredmil i učeni da trče tokom 3 vezana. Tokom perioda navikavanja brzina kretanja trake iznosila je 10 m/min, a dužina treninga 10 min. Pacovi koji su odbijali da trče ili su trčale ispodprosečno su eliminisani iz studije.

Nakon adaptacije životinje iz treniranih grupa (K-FA i H-FA) podvrgnute su kontinuiranom aerobnom tredmil treningu tokom 28 vezanih dana. Dužina treninga je iznosila 30 min/dan (subhronični trening) a brzina tredmil trake je bila podešena na 20 m/min. Podaci iz literature pokazuju da se pri navedenoj brzini trake od 20 m/min postiže ravnoteža u brzini stvaranja i uklanjanja, tj. postiže se stabilizacija koncentracije laktata u krvi pacova (Manchado et al., 2005), stoga trening pod ovakvim uslova predstavlja aerobni trening.



Slika 8. Tredmil aparat za male eksperimentalne životinje (A) i kompjuterski program eTreadSoft za upravljanje tredmil aparatom za male eksperimentalne životinje (B).

Posle 14. dana tretmana izvršeno je žrtvovanje životinja u grupama K-14 i H-14, a nakon 28. dana tretmana žrtvovanje životinja iz ostalih grupa giljotinom za male eksperimentalne životinje. Nakon dekapitacije prikupljeni su uzorci krvi, a potom je izvršeno i hirurško izolovanje srca, aorte, jetre i debelog creva. Izmerena je masa srca i izračunata vrednost ISM prema formuli: $ISM = (\text{masa srca (g)} / \text{telesna masa pacova (g)})$.

3.4. Varijable koje su praćene u studiji

U studiji je analiziran uticaj eksperimentalnih tretmana na biohemijske promene u serumu, plazmi, kao i u tkivu srca, jetre i kolona. Takođe analizirane su i histološke i histomorfometrijske promene srcu, aorti, jetri i kolonu pacova.

3.4.1. Merenje biohemijskih parametara u serumu i plazmi

Na početku eksperimenta punkcijom repne vene uzorkovana je krv životinjama iz K-14, H-14, K-28 i H-28 grupe radi određivanja bazalnih koncentracija Hcy u serumu. Hiperhomocisteinemijom smatrane su vrednosti Hcy u serumu više od 15 $\mu\text{mol/L}$.

Nakon žrtvovanja životinja krv za merenje laboratorijskih parametara u serumu i plazmi prikupljena je u specijalne epruvete postupkom iskrvarenja životinje. Nakon uzorkovanja, plazma (antikoagulans Na-citrat) i serum su ostavljeni 15 min na sobnoj temperaturi, a potom centrifugirani (15 minuta na brzini od 3000 obrtaja/min), nakon čega je pristupljeno analizi. Od parametara mereni su: kardiovaskularni biomarkeri u serumu: koncentracija Hcy, HOL, LDL, HDL, TG, aktivnost LDH, koncentracija hs-TnT, vitamina B12 i folata; hemostatski biomarkeri u plazmi: fibrinogen, D-dimer i vWF; hepato-renalno-pankreatični biomarkeri: koncentracija glukoze, ukupnih proteina, albumina, aktivnost AST, aktivnost ALT, koncentracija uree, kreatinina, mokraćne kiseline, aktivnost amilaze, koncentracija CRP. Navedeni parametri su mereni na automatskom biohemijskom analizatoru (*Dimension Xpand, Siemens*) spektrofotometrijski ili pomoću komercijalnih kitova (*SiemensHealthcare Diagnostics Ltd. Frimley, Camberley, UK*).

3.4.2. Merenje biohemijskih parametara u tkivu srca, jetre i kolona

Za potrebe analize biohemijskih parametara u tkivima srca, jetre i kolona navedena tkiva su homogenizovana u puferu koji sadrži Tris-Cl, $C = 20 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 7,5$; 250 mmol/L saharoze; Triton X-100, $C = 1\%$; inhibitor proteaza fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF), $C = 1 \text{ mmol/L}$ i inhibitor proteaza leupeptin, $C = 1 \mu\text{g/mL}$ (Rouet-Benzineb et al., 1999). Tkivo i pufer su pomešani u odnosu 1:10, a zatim je tkivo homogenizovano na ledu, ako bi se hlađenjem sprečila denaturacija proteina. Za homogenizaciju tkiva upotrebljen je homogenizer (*Witeg Labortechnik GmbH, Verthajm, Nemačka*). Homogenati tkiva su centrifugirani na brzini 10000 obrtaja/min na temperaturi $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ tokom 10 minuta. Supernatant je predstavljao celokupni ćelijski lizat u kome su mereni biohemijski parametri. Ovako pripremljeni uzorci su čuvani na -20°C do vršenja analiza.

U homogenatima tkiva parametri su određivani spektrofotometrijski upotrebom spektrofotometra UV-2600 (*Shimadzu, Kjoto, Japan*).

Najpre je u svim homogenatima tkiva izmerena koncentracija proteina metodom po Bradfordu (Bradford, 1976) tako što je pomešan 1 mL Bradfordovog reagensa (*Sigma-Aldrich, Darmštat, Nemačka*) sa 0,2 mL homogenata tkiva. Uzorci su odstojali na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 minuta, a sledstveno je na spektrofotometru očitana apsorbansa na talasnoj dužini 595 nm. Umesto homogenata tkiva, slepa proba je sadržala destilovanu vodu u istoj količini.

Jednačina standardne krive pomoću koje je očitavana koncentracija proteina u uzorcima dobijena je upotrebom rastvora goveđeg serumskog albumina poznatih koncentracija i glasila je: $A = n \times C + y$ (A – apsorbance rastvora, n – nagib krive, C – koncentracija rastvora, y – odsečak na y osi).

Kao pokazatelji oksidativnog statusa u homogenatima tkiva određivani su sledeći parametri: spektrofotometrijski aktivnost CAT, spektrofotometrijski ukupna aktivnost SOD kao i distribucija SOD izoformi metodom nativne gel elektroforeze, spektrofotometrijski koncentracija MDA kao pokazatelja lipidne peroksidacije.

Od metaboličkih enzima spektrofotometrijski je merena ukupna aktivnost enzima LDH i MDH, a nativnom gel elektroforezom detektovana je distribucija odgovarajućih izoformi LDH i MDH.

Elektroforetskom tehnikom SDS-PAGE detektovane su aktivnosti MMP-2 i MMP-9 kao pokazatelji remodelovanja tkiva.

Za denzitometrijsku analizu izoformi enzima, izdvojenih na elektroforetskim pločama, korišćen je program (ImageJ 1.48v software, National Institutes of Health, Betesda, SAD).

3.4.2.1. Određivanje parametara oksidativnog stresa u tkivu srca, jetre i kolona

3.4.2.1.1. Određivanje aktivnosti katalaze u tkivu srca, jetre i kolona

Aktivnost katalaze u uzorcima homogenata tkiva merena je spektrofotometrijskom metodom u čijoj osnovi je merenje izmene apsorbance reakcione smeše na 260 nm usled razlaganja H_2O_2 u reakcionoj smeši (Beers i Sizer, 1952) (Slika 9). Reakciona smeša je sadržala 1 mL 0,18% rastvora H_2O_2 , koji je rastvoren u fosfatnom puferu (f.p.): $C = 0,05$ mol/L, $pH = 7,0$; 2 mL f.p. $C = 0,05$ mol/l, $pH = 7,0$; i 200 μ L homogenata tkiva. Vrednosti su predstavljene kao jedinica enzimske aktivnosti (U) po miligramu proteina, pri čemu U predstavlja količinu katalaze koja ubrzava reakciju razgradnje 1 μ mol H_2O_2 u minutu, u ovako zadatim hemijskim uslovima.



Slika 9. Spektrofotometrijsko merenje aktivnosti katalaze.

3.4.2.1.2. Određivanje aktivnosti SOD u tkivu srca, jetre i kolona

Ukupna aktivnost SOD je merena u uzorcima homogenata tkiva spektrofotometrijskom metodom po Misra i Fridovich (Misra i Fridovich, 1972) (Slika 10). U osnovi ove metode je merenje izmene apsorbance na 360 nm do koga dolazi usled sposobnosti SOD da u alkalnim uslovima, $pH = 10,2$, vrši inhibiciju spontane reakcije pri kojoj se adrenalin oksiduje u adrenohrom. Reakciona smeša je sadržala 0,1 mL adrenalina, $C = 0,18$ g/L (koji je rastvoren u

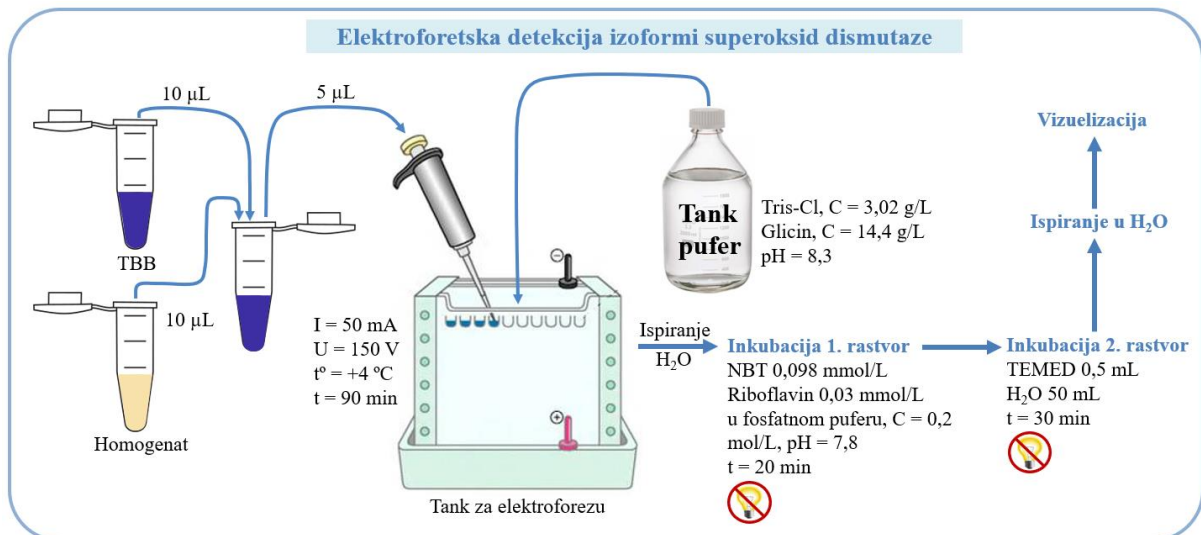
HCl, $C = 0,1 \text{ mol/L}$); 1,8 mL Tris-Cl pufera, $C = 50 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 10,2$; i 100 μL homogenata tkiva. Vrednosti su predstavljene kao jedinica enzimске aktivnosti (U) po miligramu proteina reakcije, pri čemu je U jednaka promeni apsorbance reakcione smeše za 0,001 u minutu, u ovako zadatim hemijskim uslovima.



Slika 10. Spektrofotometrijsko merenje ukupne aktivnosti superoksid dismutaze.

3.4.2.1.3. Određivanje izoformi SOD u tkivu srca, jetre i kolona

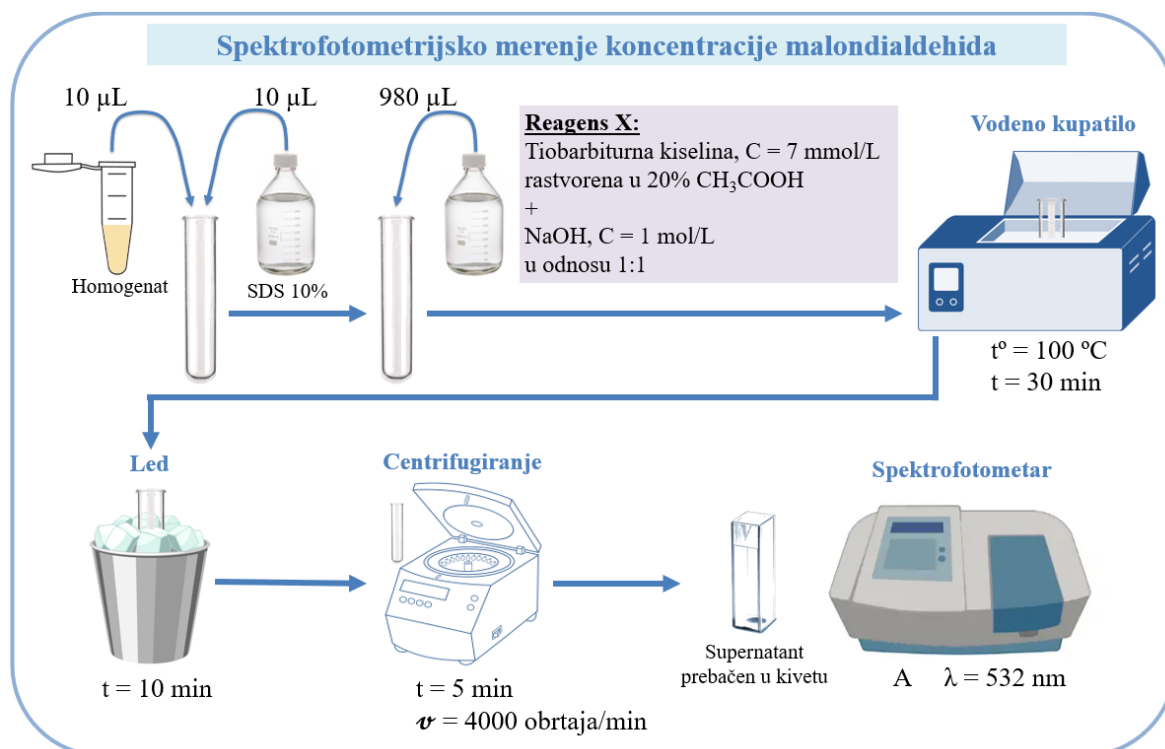
Izoforme SOD su razdvojene tehnikom native poliakrilamid gel elektroforeze u 7,5 % gelu (Flohe i Otting, 1984) (Slika 11). Najpre su uzorci pomešani sa puferom za vezivanje tkiva (eng. *tissue binding buffer*, TBB) koji sadrži Tris-Cl 2,5 mL, $C = 0,5 \text{ mol/L}$, $\text{pH} = 6,8$; glicerol 2 mL; bromfenol plavo 2 mg i destilovanu vodu do ukupne zapremine 10 mL. Uzorci su pomešani sa TBB u odnosu 1 : 1. Zatim je na gel, u svaki bunarčić, nanoseno po 5 μL pripremljenog uzorka. Elektroforetsko razdvajanje izoformi SOD je vršeno na $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ u puferu koji sadrži Tris-Cl, $C = 3,02 \text{ g/L}$ i glicin, $C = 14,4 \text{ g/L}$, $\text{pH} = 8,3$ pri struji konstantnog intenziteta 50 mA i napona 150V, tokom 90 minuta. Nakon završene elektroforeze gelovi su isprani u destilovanoj vodi, nakon čega su inkubirani u odsustvu svetlosti tokom 20 minuta u 25 mL rastvora koji u 100 mL f.p. $\text{pH} = 7,8$, sadrži 0,098 mmol/L *nitro blue tetrazolium* (NBT) i 0,03 mmol/L riboflavina. Nakon toga gelovi su potopljeni u rastvor koji sadrži 50 mL vode, 0,5 mL N,N,N,N-tetrametiletildiamina (TEMED) u odsustvu svetlosti, tokom 30 minuta, odnosno do pojave obezbojenih traka SOD aktivnosti. Gelovi su zatim isprani još jednom destilovanom vodom i vizuelizovani su na dnevnom svetlu. Pojedine izoforme SOD su zatim semikvantitativno analizirane denzitometrijski i izražene su procentualno odnosu na ukupnu aktivnost SOD (relativna aktivnost).



Slika 11. Elektroforetska detekcija izoformi superoksid dismutaze.

3.4.2.1.4. Merenje indeksa lipidne peroksidacije u tkivu srca, jetre i kolona

Merenje koncentracije MDA u homogenatima tkiva primenom esejja reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline, eng. *thiobarbituric acid reactive substances assay* - TBARS) (Ohkawa et al., 1979) predstavlja pokazatelj indeksa peroksidacije lipida (Slika 12). U epruveti je pomešano 10 μL homogenata tkiva i 10 μL 10 % rastvora natrijum dodecil sulfata (SDS), a potom je dodato 980 μL reagensa „X“ koji sadrži tiobarbiturnu kiselinu $C = 7 \text{ mmol/L}$ koja je raastvorena u 20% rastvoru sirćetne kiseline i vodeni rastvor NaOH $C = 1 \text{ mol/L}$ u odnosu 1:1. Smeša je inkubirana na 100°C tokom 30 min, a onda je reakcija zaustavljena hlađenjem uzoraka na ledu 10 minuta. Nakon hlađenja uzorci su centrifugirani na brzini 4000 obrtaja/min, 5 minuta, da bi denaturisani proteini izdvojili kao talog. Supernatant je sipan u kivete, i očitana mu je apsorbance na talasnoj dužini 532 nm. Koncentracija MDA u tkivnim homogenatima izračunata je korišćenjem Lambert-Beer-ovog zakona. Količnik apsorbance i molarnog ekstinkcionog koeficijenta ($x = 1,56 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) obojenog proizvoda reakcije, predstavlja je koncentraciju MDA koja je izražena u jedinicama μmol po mg proteina.

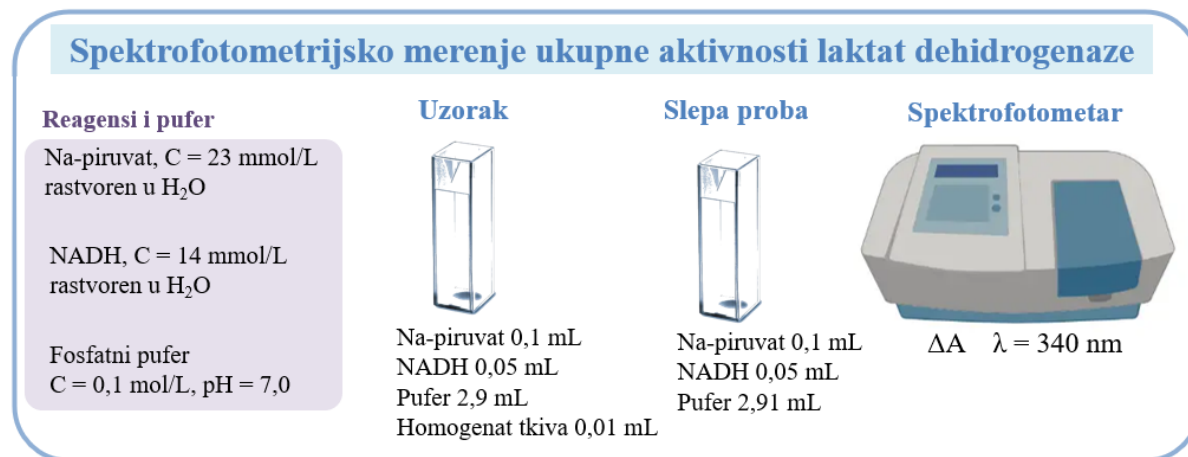


Slika 12. Spektrofotometrijsko merenje koncentracije malondialdehida.

3.4.2.2. Određivanje aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu srca, jetre i kolona

3.4.2.2.1. Određivanje ukupne aktivnosti LDH u tkivu srca, jetre i kolona

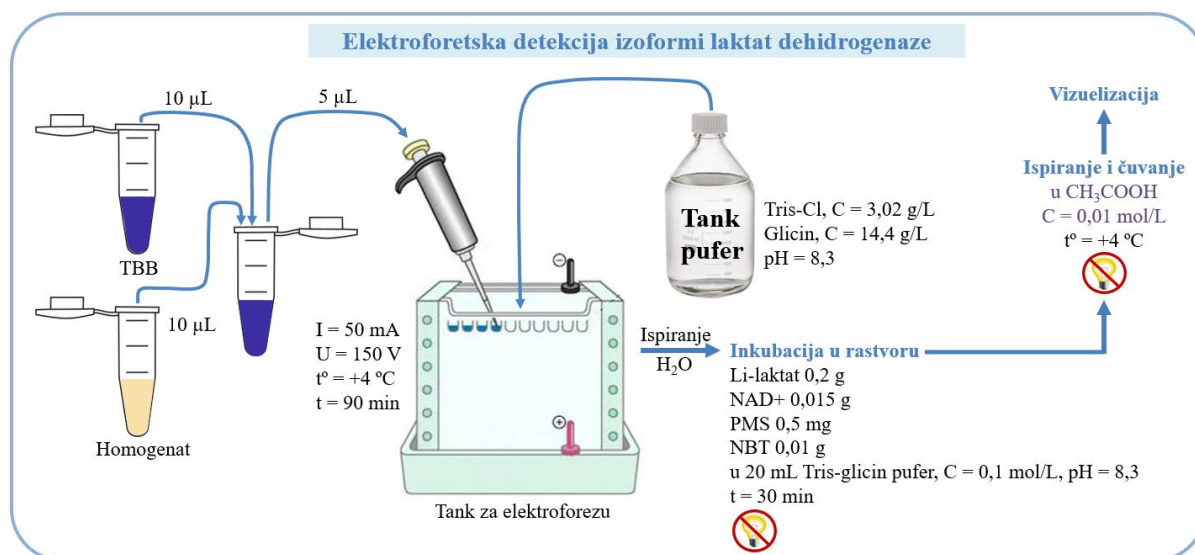
Ukupna aktivnost LDH je određivana u homogenatima tkiva spektrofotometrijski merenjem smanjivanja vrednosti apsorbance na talasnoj dužini 340 nm prilikom oksidacije NADH (Hollaar i van der Laarse, 1979) (Slika 13). Inkubaciona smeša je sadržala: 2,9 mL f.p., $C = 0,1 \text{ mol/L}$, $\text{pH} = 7,0$; 0,1 mL Na-piruvata, $C = 23 \text{ mmol/L}$ rastvorenog u destilovanoj vodi; 0,05 mL NADH, $C = 14 \text{ mmol/L}$ rastvorenog u destilovanoj vodi i 0,01 mL homogenata tkiva. Praćena je promena apsorbance tokom prvih 3 minuta reakcije na $25 \text{ }^\circ\text{C}$ na talasnoj dužini 340 nm. U predstavlja količinu enzima LDH koja ubrzava reakciju transformacije 1 μmol NADH u minuti u ovako zadatim hemijskim uslovima. Vrednosti su predstavljene kao jedinica enzimске aktivnosti (mU) po miligramu proteina.



Slika 13. Spektrofotometrijsko merenje ukupne aktivnosti laktat dehidrogenaze

3.4.2.2.2. Određivanje LDH izoformi u tkivu srca, jetre i kolona

Određivanje LDH izoformi vršeno je direktnom elektroforezom prema metodi (Cunningham et al., 1965) (Slika 14). Nativna poliakrilamid gel elektroforeza je izvedena na 7,5 % nativnom poliakrilamidnom gelu. Najpre su uzorci pripremljeni tako što je 10 μL homogenata tkiva pomešano sa 10 μL TBB. U „bunarčiče“ gela za elektroforezu naneto je po 5 μL pripremljenih uzoraka. Elektroforetsko razdvajanje izoformi LDH je vršeno na +4 °C u puferu koji sadrži Tris-Cl, C = 3,02 g/L i glicin, C = 14,4 g/L, pH = 8,3 pri struji konstantnog intenziteta 50 mA i napona 150 V, tokom 90 minuta. Nakon završene elektroforeze gelovi su isprani u destilovanoj vodi i nakon toga inkubirani u odsustvu svetlosti tokom 30 minuta u rastvoru koji je sadržao: 0,2 g Li-laktata; 15 mg NAD⁺; 0,5 mg PMS i 10 mg NBT u 20 mL TRIS-glicin pufera, C = 0,1 mol/L, pH = 8,3. Po završetku inkubacije pojavile su se plavičaste trake izoformi koje su nastale usled prebojavanja formazanom, nastalim u procesu redukcije NBT uz PMS koji ima ulogu da prenese elektrone na koenzim NAD⁺. Pojedine izoforme LDH su zatim analizirane semikvantitativno denzitometrijski i izražene su procentualno odnosu na ukupnu aktivnost LDH (relativna aktivnost).



Slika 14. Elektroforetska detekcija izoformi laktat dehidrogenaze

3.4.2.2.3. Određivanje aktivnosti malat dehidrogenaze u tkivu srca, jetre i kolona

Ukupna aktivnost MDH je određivana u homogenatima tkiva spektrofotometrijski merenjem smanjivanja vrednosti apsorbance na talasnoj dužini 340 nm prilikom oksidacije NADH (Frieden i Fernandez-Sousa, 1975) (Slika 15). Inkubaciona smeša je sadržala: 2,9 mL f.p., C = 0,1 mol/L, pH = 7,5; 0,1 mL Na₂-oksalacetata, C = 15 mmol/L rastvorenog u destilovanoj vodi; 0,05 mL NADH, C = 14 mmol/L rastvorenog u destilovanoj vodi i 0,01 mL homogenata tkiva. Praćena je promena apsorbance tokom prva 3 minuta reakcije na 25 °C na talasnoj dužini 340 nm. 1 U je ona količina enzima MDH koja katalizuje transformaciju 1 μmol NADH u minutu u ovako zadatim hemijskim uslovima. Vrednosti su predstavljene kao jedinica enzimske aktivnosti (mU) po miligramu proteina.

Spektrofotometrijsko merenje ukupne aktivnosti malat dehidrogenaze

Reagensi i pufer

Na-oksalacetat, C = 15 mmol/L
rastvoren u H₂O

NADH, C = 14 mmol/L
rastvoren u H₂O

Fosfatni pufer
C = 0,1 mol/L, pH = 7,5

Uzorak



Na₂-oksalacetat 0,1 mL
NADH 0,05 mL
Pufer 2,9 mL
Homogenat tkiva 0,01 mL

Slepa proba



Na₂-oksalacetat 0,1 mL
NADH 0,05 mL
Pufer 2,91 mL

Spektrofotometar



$\Delta A \quad \lambda = 340 \text{ nm}$

Slika 15. Spektrofotometrijsko merenje ukupne aktivnosti malat dehidrogenaze.

3.4.2.2.4. Određivanje MDH izoformi u tkivu srca, jetre i kolona

Određivanje MDH izoformi vršeno je direktnom elektroforezom na nativnom 7,5 % poliakrilamidnom gelu (Yoshimura et al., 1970) (Slika 16). Najpre su uzorci pripremljeni tako što je 10 μL homogenata tkiva pomešano sa 10 μL TBB. U „bunarčiče“ gela za elektroforezu naneto je po 5 μL pripremljenih uzoraka. Elektroforetsko razdvajanje izoformi LDH je vršeno na +4 °C u puferu koji sadrži Tris-Cl, C = 3,02 g/L i glicin, C = 14,4 g/L, pH = 8,3 pri struji konstantnog intenziteta 50 mA i napona 150 V, tokom 90 minuta. Nakon završene elektroforeze gelovi su isprani u destilovanoj vodi, posle čega su inkubirani u odsustvu svetlosti tokom 30 minuta u rastvoru koji sadrži: 10 mL rastvora natrijum maleata, C = 0,01 mol/L, pH = 6,9; 10 mL f.p., C = 0,2 mol/L, pH = 7,1, 15 mg NAD⁺; 0,5 mg PMS i 10 mg NBT. Nakon inkubacije, prikazale su se tamno plavičaste trake aktivnosti izoformi MDH koje su nastale kao posledica prebojavanja formazanom, nastalim usled redukcije NBT u prisustvu PMS koji prenosi elektrone na koenzim NAD⁺. Pojedine izoforme MDH su zatim analizirane semikvantitativno denzitometrijski i izražene su procentualno odnosu na ukupnu aktivnost LDH (relativna aktivnost).



Slika 16. Elektroforetska detekcija izoformi malat dehidrogenaze.

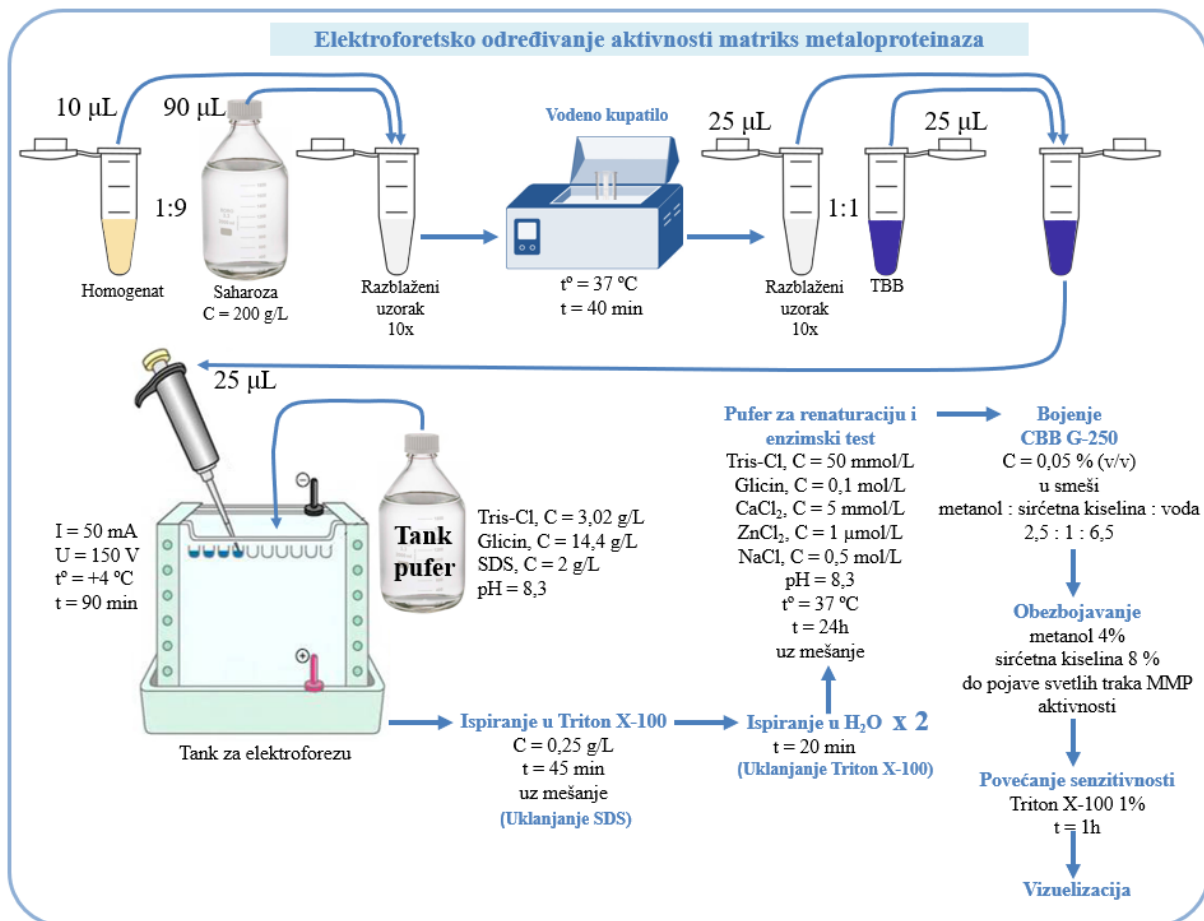
3.4.2.3. Određivanje aktivnosti matriks metaloproteinaza u tkivu srca, jetre i kolona

Prisustvo i enzimski aktivnost MMP u homogenatima tkiva određena je metodom zimografije na poliakrilamid gelovima u kojima je kopolimerizovan želatin (denaturisani kolagen) (La Rocca et al., 2004; Gopcevic et al., 2017) (Slika 17). Metoda je zasnovana na ulozi MMP da razgrađuju želatin. U uzorcima razdvajanje proteina vršeno je poludenaturišući SDS poliakrilamidnom elektroforezom (eng. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) u gelu koji je u sebi imao polimerizovan 0,1 % želatin - supstrat za MMP (Kleiner i Stetler-Stevenson, 1994). Nakon elektroforetskog razdvajanja gelovi su bili inkubirani u rastvoru za renaturaciju MMP, i tom prilikom renaturisane MMP su hidrolizovale supstrat u gelu, tako da su zone njihove aktivnosti uočene kao polja smanjenog intenziteta boje.

Najpre su uzorci pripremljeni tako što su homogenati tkiva (10 μL) razblaženi 10 puta u rastvoru saharoze, C = 200 g/L (90 μL) i inkubirani na 37 °C tokom 40 minuta. Zatim je 25 μL ovako aktiviranog uzorka pomešano sa 25 μL TBB. TBB za SDS-PAGE zimografiju je sadržao: 2,5 mL Tris-Cl C = 0,5 mol/L pH = 6,8; 4 mL SDS C = 10%; 2 mL glicerola; 2 mg bromfenol plavo i destilovanu vodu do 10 mL. U bunarčiče gela za elektroforezu naneto je po 25 μL pripremljenih uzoraka. Elektroforetsko razdvajanje izoformi LDH je vršeno na +4 °C u puferu koji sadrži TRIS-Cl C = 3,02 g/L, glicin C = 14,4 g/L, SDS C = 2g/L, pH = 8,3 pri struji konstantnog intenziteta 50 mA i napona 150 V, tokom 90 minuta.

Nakon procesa ekлектроforeze gel je opran u rastvoru Triton X-100, C = 0,25 g/L, uz mešanje 45 minuta kako bi SDS iz gela bio uklonjen. U sledećem koraku, gel je dva puta po 20 min na +4 °C opran u destilovanoj vodi da bi uklonio i Triton X-100. Zatim je gel inkubiran 24 h u puferu za renaturaciju i pokretanje enzimskog testa koji se sadržao: glicin C = 0,1 mol/L; Tris-Cl C = 50 mmol/L; CaCl₂ C = 5 mmol/L; ZnCl₂ C = 1 $\mu\text{mol/L}$ i NaCl C = 0,5 mol/L, pri pH = 8,3 na 37 °C, uz mešanje na brzini 50 obrtaja/min. Nakon inkubacije, gelovi su 3h bojani bojom CBB G-250 (eng. *comassie brilliant blue G-250*) C = 0,05 % (w/v) u smeši metanol : sirćetna kiselina : voda, u razmeri 2,5 : 1 : 6,5. Potom su gelovi obezbojavani u rastvoru koji sadrži metanol 4 % i sirćetnu kiselinu 8 %. Kako bi se postigla bolja senzitivnost, gelovi su još dopunski obezbojavani tokom 1 sata u rastvoru Triton X-100 1 %, nakon čega su se prikazale svetle zone, koje označavaju mesta aktivnosti MMP.

Pojedine izoforme MMP su zatim analizirane kvantitativno denzitometrijski. Step en aktivnosti MMP je kvantifikovan merenjem površine ispod denzitometrijskih krivih u pikselima (px), a dobijene vrednosti su zatim normalizovane u odnosu na koncentraciju proteina u uzorcima i predstavljene su jedinicom (px/mg proteina).



Slika 17. Elektroforetska detekcija izoforni matriks metaloproteinaza - SDS PAGE tehnika.

3.4.3. Histološka i histomorfometrijska analiza tkiva srca, aorte, jetre i kolona

Za potrebe histološke analize uzorci tkiva srca, aorte, jetre i kolona su radi fiksacije tkiva odlagani u posude sa 4 % neutralno puferisanim formaldehidom u toku najmanje 24 h na sobnoj temperaturi.

Srca pacova su adekvatno orijentisana i isečena na poprečne rezove debele 3 mm, dok je tkivo descendentne aorte izdvojeno na fragmente od 1 cm, tkivo jetre na komadiće dimenzija 1 cm x 1 cm x 3 mm, tkivo kolona je podeljeno na segmente dužine 1 cm. Uzorci tkiva su potom dehidratirani povećavajućim koncentracijama alkohola, prosvetljeni u ksilolu u aparaturi za procesuiranje tkiva (*Leica TP 1020 Automatic Tissue Processor*). Sledstveno su uzorci ukalupljeni u parafinu upotrebom aparata (*Tissue Tech II Tissue Embedding Center, Hatfield, SAD*). Mikrotomom (*Leica RM2235, Leica, Beč, Austrija*) uzorci su isečeni na isečke debljine 3 µm. Potom su isečki bojeni hematoksilinom i eozin/floksinom (HE). HE bojenje omogućava morfološku analizu promena na srcu, aorti, jetri i kolonu, kao i histomorfometrijsku analizu.

Preparati su posmatrani na mikroskopu *Olimpus BX 41 (Tokio, Japan)* koji u sebi sadrži *Olympus C5060-ADU "wide zoom" (Tokio, Japan)* kameru. Histomorfometrijska merenja su urađena u programu *ImageJ 1.48v software, National Institutes of Health, Bethesda, SAD*.

U histološkim preparatima srca posmatrano je potencijalno prisustvo ishemijskih promena i proliferacije vezivnog tkiva. Histomorfometrijska analiza srca obuhvatala je merenje debljine zida leve komore, debljine zida desne komore, debljinu interventrikularnog septuma,

kao i transverzalni dijametar kardiomiocita u nivou jedra. Navedeni parametri su izmereni po 10 puta na svakom histološkom preparatu srca.

U histološkim preparatima aorte posmatrano je potencijalno prisustvo aterosklerotskih promena i remodelovanja aorte. Histomorfometrijska analiza aorte obuhvatala je merenje: debljine tunike medije, rastojanja između elastičnih lamina, kao i broja elastičnih lamina u zidu aorte. Navedeni parametri su izmereni po 10 puta na svakom histološkom preparatu aorte.

U histološkim preparatima jetre posmatrano je potencijalno prisustvo polja nekroze, promene arhitektonike hepatičnog lobulusa, proliferacije vezivnog tkiva, masne promene jetre i edema.

U histološkim preparatima kolona posmatrano je potencijalno prisustvo znakova zapaljenskih bolesti creva: kriptitisi, kriptni apscesi, zone erozija i ulceracija, kao i potencijalne tumorske promene epitela. Histomorfometrijska analiza kolona obuhvatala je merenje: dubine Liberkinovih kripti, debljine tunike mukoze, debljine lamine muskularis mukoze, ukupne debljine zida debelog creva, kao i broja ćelija u lamini propriji na $0,1 \text{ mm}^2$ koji je određen brojanjem prisutnih ćelija u poligonu određene površine, a zatim je proporcijom određen broj ćelija na definisanoj površini od $0,1 \text{ mm}^2$. Navedeni parametri su izmereni po 10 puta na svakom histološkom preparatu kolona.

3.5. Hemikalije i potrošni materijal

Homocistein za izazivanje hiperhomocisteinemije nabavljen je od *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, (Šneldorf, Nemačka)*, a za tretman pacova vitamin B6 (piridoksin) (*Sigma-Aldrich Corporation, Sent Luis, SAD*) i folna kiselina (*Sigma-Aldrich Corporation, Sent Luis, SAD*). Hemikalije koje su korišćene za kvantifikaciju biohemijskih parametara su nabavljene od *Sigma-Aldrich Corporation (Sent Luis, SAD)*. Potrošni laboratorijski materijal je nabavljen od *Eppendorf (Hamburg, Nemačka)*.

3.6. Statistička analiza

Za statističku analizu i izradu grafikona korišćen je program SPSS v.23.0. Statistička analiza i grafički prikaz promene telesnih masa eksperimentalnih životinja kroz nedelje eksperimentalnog protokola urađeni su programu GraphPad Prism v.9.0.0.

Ispitivanje normalnosti raspodele numeričkih obeležja posmatranja testirano je Shapiro-Wilk testom, s obzirom da se unutar grupa nalazi manje od 50 jedinica posmatranja ($n = 10$ po grupi). Smatrano je da podaci imaju normalnu raspodelu ukoliko je vrednost testa bila $p > 0,05$.

Od metoda analitičke statistike za poređenje značajnosti razlike numeričkih obeležja sa normalnom raspodelom, prilikom ispitivanja značajnosti razlike između dve grupe korišćen je T test za nevezane uzorke.

Za ispitivanje značajnosti razlike između više od dve grupe za parametre koji su pokazali normalnu raspodelu, prvo je iskorišćen Levene test za ispitivanje homogenosti varijansi. Ukoliko je vrednost Levene testa bila $p > 0,05$ za ispitivanje značajnosti razlike između grupa korišćena je analiza varijanse (One-way ANOVA test) praćena Tukey post hoc testom, a ukoliko je vrednost Levene testa bila $p < 0,05$ korišćena je Welch ANOVA test praćen Games-Howell post hoc testom.

Ukoliko je određeni parametar pokazao odstupanje od normalne raspodele, za ispitivanje značajnosti razlike između dve grupe korišćen je Mann-Whitney U test, dok je prilikom ispitivanja značajnosti razlike između više od dve grupe korišćen Kruskal-Wallis test praćen Dunn post hoc testom.

Za statističku analizu uticaja vremena i grupe na promenu telesnih masa životinja kroz nedelje eksperimentalnog ciklusa korišćen je Two-way ANOVA model sa Šidak post hoc testom.

Za sve testove analitičke statistike vrednost $p < 0,05$ smatrana se statistički značajnom, a vrednost $p < 0,01$ visoko statistički značajnom.

Ukoliko je parametar pokazao normalnu raspodelu numeričke vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm standardna devijacija, a ukoliko je parametar odstupao od normalne raspodele numeričke vrednosti su prikazane kao medijana (25. percentil - 75. percentil).

Dobijeni rezultati su prikazani tabelarno ili grafički. Za grafički prikaz parametara koji su pokazali normalnu raspodelu korišćeni su stubičasti grafikoni, a za parametre koji odstupaju od normalne raspodele box-plot grafikoni.

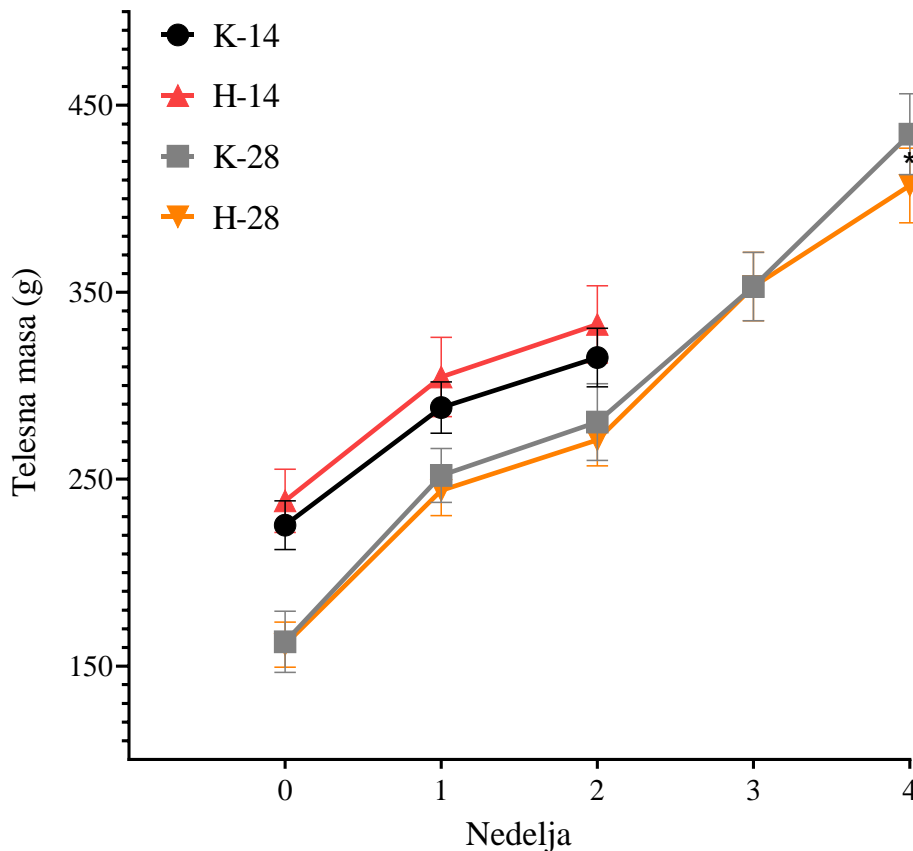
4. REZULTATI

4.1. Efekti aplikacije homocisteina u odnosu na kontrolnu grupu

Sve životinje su preživele eksperimentalne tretmane, međutim jedna životinja iz grupe H-14 (obeležena nazivom: H-14 8) je isključena iz istraživanja zbog razvijanja tromboze repne vene nakon venepunkcije koja je bila praćena gangrenom repa i lošim opštim stanjem, kako bi se izbegao potencijalni uticaj stanja životinje na dalju analizu uzoraka krvi i organa.

4.1.1. Efekti aplikacije homocisteina na telesnu masu eksperimentalnih životinja

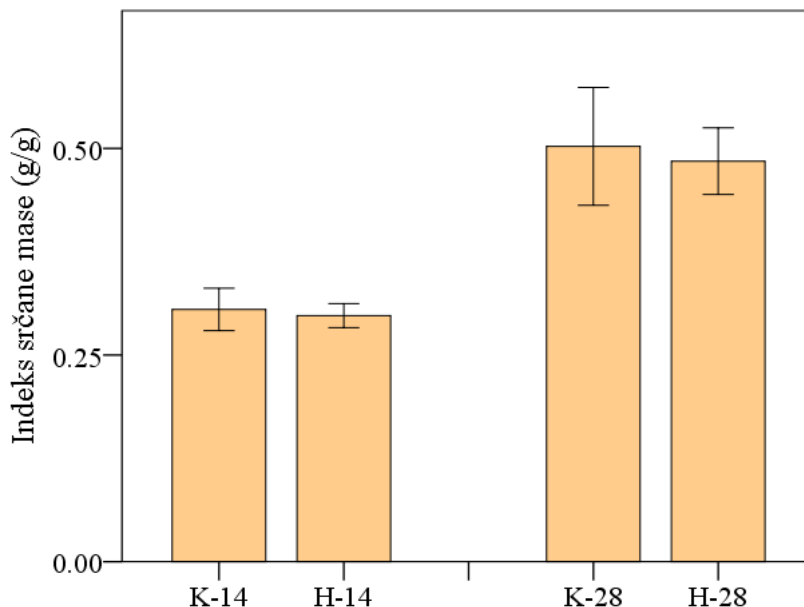
Na Grafikonu 1 prikazana je dinamika promene telesnih masa eksperimentalnih životinja. Model Two-way ANOVA ponovljenih merenja i Šidakov post hoc test za ispitivanje značajnost razlike u telesnim masama između grupa u različitim vremenskim tačkama ispitani su posebno za poređenja K-14 sa H-14 grupom i K-28 sa H-28 grupom. Modelom Two-Way ANOVA ponovljenih merenja detektovano je da generalno u toku eksperimentalnog protokola vreme značajan faktor za promenu vrednosti telesne mase, $p < 0,01$, ali ne i grupa eksperimentalnih životinja $p > 0,05$. Statistički značajno niža vrednost mase životinja uočava se jedino u 4. nedelji eksperimentalnog protokola u H-28 grupi u poređenju sa K-28 grupom, $p < 0,05$.



Grafikon 1. Efekti aplikacije homocisteina na telesnu masu eksperimentalnih životinja kroz nedelje eksperimentalnog protokola. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom - Šidakov post hoc test.

4.1.2. Efekti aplikacije homocisteina na indeks srčane mase

Vrednosti ISM se nisu statistički značajno razlikovane između K-14 ($0,305 \pm 0,026$ g/g) i H-14 grupe ($0,300 \pm 0,015$ g/g), kao ni između K-28 ($0,502 \pm 0,071$ g/g) i H-28 grupe ($0,485 \pm 0,040$ g/g) (Grafikon 2).



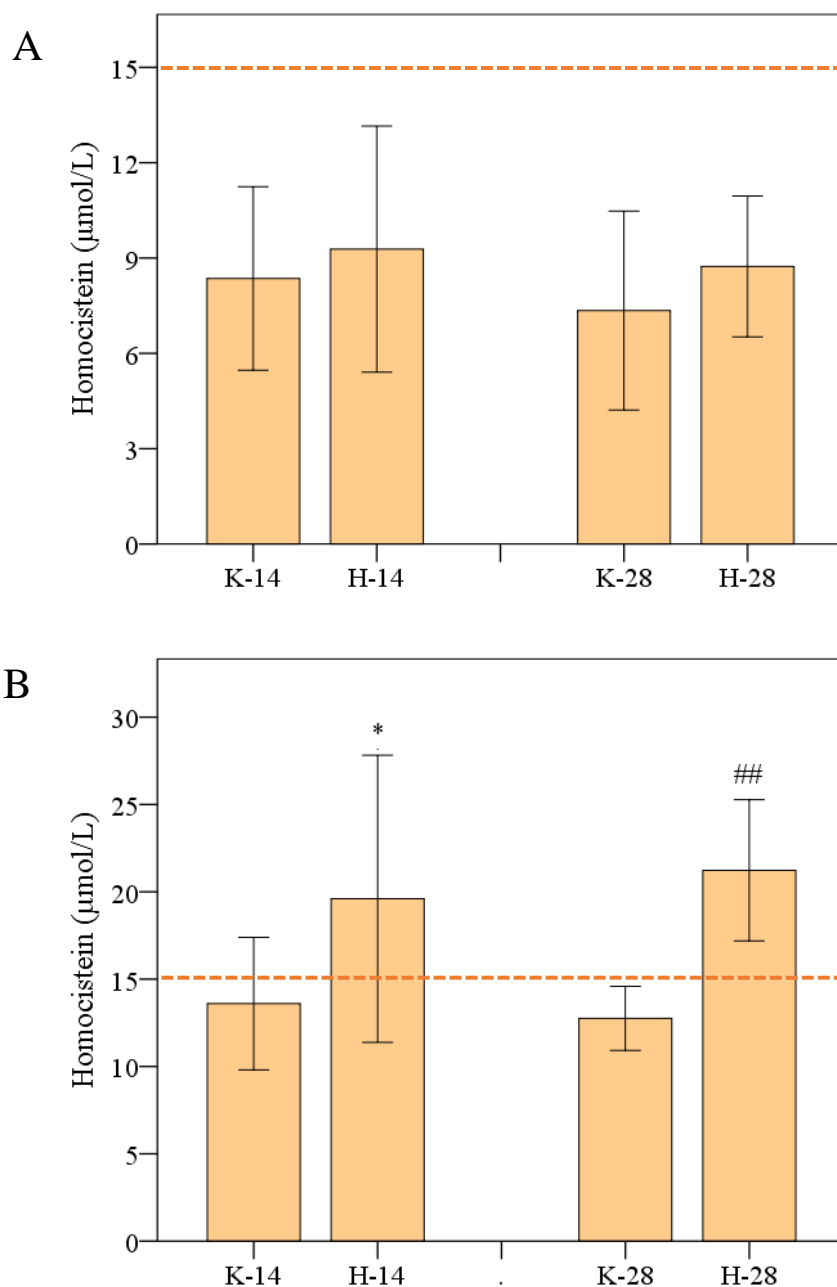
Grafikon 2. Efekti aplikacije homocisteina na indeks srčane mase. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - T test za nevezane uzorke.

4.1.3. Efekti aplikacije homocisteina na bihemijske parametre u serumu i plazmi

4.1.3.1. Koncentracija homocisteina u serumu

Na početku eksperimentalnog protokola punkcijom repne vene eksperimentalnim životinja je uzorkovana krv za određivanje bazalnih vrednosti Hcy u serumu. U kontrolnim grupama K-14 i K-28 kao i u eksperimentalnim grupama H-14 i H-28 na početku eksperimenta vrednosti Hcy u serumu su bile ispod 15 μ mol/L, tj. životinje nisu imale hiperhomocisteinemiju na početku eksperimenta. Takođe, ne uočava se statistički značajna razlika u koncentraciji Hcy između K-14 ($8,4 \pm 2,9$ μ mol/L) i H-14 grupe ($9,3 \pm 3,9$ μ mol/L), kao i između K-28 ($7,3 \pm 3,1$ μ mol/L) i H-28 grupe ($8,7 \pm 2,2$ μ mol/L) (Grafikon 3A).

Na kraju eksperimentalnog protokola, nakon žrtvovanja, u uzorcima seruma koncentracije homocisteina u grupama koje su tretirane homocisteinom subkutano bile su iznad 15 μ mol/L, tj. postignuto je stanje hiperhomocisteinemije. Koncentracija Hcy bila je značajno povišena H-14 grupi ($19,6 \pm 8,2$ μ mol/L) u odnosu na K-14 grupu ($13,6 \pm 3,8$ μ mol/L). Isto tako, koncentracija Hcy je bila statistički značajno povišena u H-28 grupi ($21,2 \pm 4,0$ μ mol/L) u poređenju sa K-28 grupom ($12,7 \pm 1,8$ μ mol/L) (Grafikon 3B).



Grafikon 3. Koncentracija homocisteina u serumu na početku eksperimentalnog protokola (A) i na kraju eksperimentalnog protokola (B). K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. ## p < 0,01 u poređenju sa K-28 grupom - T test za nevezane uzorke.

4.1.3.2. Efekti aplikacije homocisteina na kardiovaskularne i hemostatske biomarkere u serumu i plazmi

U Tabeli 1 predstavljene su vrednosti kardiovaskularnih i hemostatskih biomarkera u serumu i plazmi eksperimentalnih životinja. Koncentracija LDL u serumu bila je statistički značajno povišena u H-28 grupi ($0,26 \pm 0,10$ mmol/L) u odnosu na K-28 grupu ($0,16 \pm 0,09$ mmol/L), $p < 0,05$. Sa druge strane izmerene su statistički visoko značajno niže koncentracije TG u serumu pacova u H-28 grupi ($0,57 \pm 0,10$ mmol/L) u poređenju sa K-28 grupom ($0,77 \pm 0,17$ mmol/L), $p < 0,01$. Koncentracija vitamina B12 u serumu pacova bila je statistički značajno povišena u H-14 grupi ($243,1 \pm 50,7$ pg/mL) u odnosu na K-14 grupu ($193,5 \pm 46,2$ pg/mL), $p < 0,05$, kao i u H-28 ($627,2 \pm 81,3$ pg/mL) grupi u poređenju sa K-28 grupom ($460,2 \pm 50,0$ pg/mL).

Tabela 1. Efekti aplikacije homocisteina na kardiovaskularne i hemostatske biomarkere u serumu i plazmi

Parametar	K-14	H-14	K-28	H-28
Hcy ($\mu\text{mol/L}$)a, s	$13,6 \pm 3,8$	$19,6 \pm 8,2^*$	$12,7 \pm 1,8$	$21,2 \pm 4,0\#\#$
HOL (mmol/L)a, s	$0,88 \pm 0,26$	$1,05 \pm 0,27$	$1,75 \pm 0,25$	$1,80 \pm 0,24$
HDL (mmol/L)a, s	$0,45 \pm 0,11$	$0,49 \pm 0,11$	$1,26 \pm 0,17$	$1,30 \pm 0,17$
LDL (mmol/L)a, s	$0,31 \pm 0,12$	$0,43 \pm 0,14$	$0,16 \pm 0,09$	$0,26 \pm 0,10\#$
TG (mmol/L)a, s	$0,26 \pm 0,10$	$0,28 \pm 0,12$	$0,77 \pm 0,17$	$0,57 \pm 0,10\#\#$
LDH (U/L)a, s	2101 ± 791	2151 ± 805	3546 ± 1305	3323 ± 666
hs-TnT (ng/L)b, s	$12,5 (8,5 - 15,7)$	$15,0 (10,5 - 18,5)$	$22,0 (16,0 - 53,0)$	$21,5 (13,7 - 39,2)$
Vitamin B12 (pg/mL)a, s	$193,5 \pm 46,2$	$243,1 \pm 50,7^*$	$460,2 \pm 50,0$	$627,2 \pm 81,3\#\#$
Folat (ng/mL)b, s	$19,5 (19,0 - 20,0)$	$20,0 (19,8 - 20,0)$	$19,2 (19,0 - 20,0)$	$20,0 (20,0 - 20,0)$
Fibrinogen (g/L)b, p	$0,5 (0,5 - 0,5)$	$0,6 (0,6 - 0,6)$	$1,8 (1,6 - 2,3)$	$1,8 (1,6 - 1,9)$
D-dimer (mg/L)b, p	$2,62 (1,34 - 3,80)$	$1,42 (0,71 - 2,23)$	$0,17 (0,17 - 0,17)$	$0,17 (0,17 - 0,17)$
vWF (%)b, p	$6,0 (4,7 - 8,2)$	$6,0 (5,0 - 13,5)$	$155,0 (122,2 - 167,5)$	$151,0 (144,5 - 166,5)$

Hcy - homocistein, HOL - ukupni holesterol, HDL - lipoprotein visoke gustine, LDL - lipoprotein niske gustine, TG - trigliceridi, LDH - laktat dehidrogenaza, hs-TnT - visoko senzitivni troponin T, vWF - vonWillebrand-ov faktor, s - vrednost merena u serumu, p - vrednost merena u plazmi. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. a - * $p < 0,05$ u poređenju sa K-14 grupom, # $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom - T test za nevezane uzorke. b - $p > 0,05$ - Mann-Whitney U test.

4.1.3.3. Efekti aplikacije homocisteina na hepato-renalno-pankreatične biomarkere u serumu

U Tabeli 2 predstavljene su vrednosti hepato-renalno-pankreatičnih biomarkera u serumu eksperimentalnih životinja. Koncentracija glukoze u serumu bila je statistički značajno povišena u H-28 ($5,89 (5,67 - 6,13)$ mmol/L) grupi u poređenju sa K-28 grupom ($5,19 (4,64 - 5,80)$ mmol/L), $p < 0,05$. Izmerene vrednosti ukupne koncentracije proteina bile su statistički visoko značajno više u H-28 grupi ($68,5 (65,5 - 71,0)$ g/L) u odnosu na K-28 grupu ($64,0 (62,5 - 65,5)$ g/L), $p < 0,01$. Isto tako, koncentracija albumina je bila značajno viša u serumu pacova H-28 grupe ($48,0 (45,7 - 49,5)$ g/L) u poređenju sa serumima pacova K-28 grupe ($44,0 (42,7 - 45,2)$ g/L), $p < 0,01$. Aktivnost AST u serumu je bila statistički značajno viša u H-14 grupi ($123 (116 - 125)$ U/L) u odnosu na K-14 grupu ($105 (91 - 110)$ U/L), $p < 0,05$, ali se nije značajno razlikovala između K-28 i H-28 grupe.

Tabela 2. Efekti aplikacije homocisteina hepato-renalno-pankreatične biomarkere u serumu

Parametar	K-14	H-14	K-28	H-28
Glukoza (mmol/L) ^a	2,40 (2,10 - 2,75)	3,00 (2,20 - 3,55)	5,19 (4,64 - 5,80)	5,89 (5,67 - 6,13) #
Ukupni proteini (g/L) ^a	29,5 (24,0 - 33,0)	42,0 (26,0 - 45,0)	64,0 (62,5 - 65,5)	68,5 (65,5 - 71,0) ##
Albumin (g/L) ^a	15,0 (12,3 - 15,7)	21,0 (13,0 - 22,0)	44,0 (42,7 - 45,2)	48,0 (45,7 - 49,5) ##
AST (U/L) ^a	105 (91 - 110)	123 (116 - 125) *	227 (186 - 244)	223 (181 - 241)
ALT (U/L) ^a	26 (20-34)	35 (30-36)	65,2 ± 13,7	62,9 ± 9,2
Urea (mmol/L) ^b	5,8 ± 1,8	5,9 ± 1,4	7,2 ± 1,2	8,3 ± 1,1
Kreatinin (μmol/L) ^b	22,5 ± 4,8	27,1 ± 6,3	35,3 ± 2,5	40,2 ± 3,7 ##
Mokraćna kiselina (μmol/mL) ^b	60,0 ± 0,0	68,0 ± 17,9	86,2 ± 12,7	79,0 ± 12,1
Amilaza (U/mL) ^a	845 (791 - 1002)	1063 (598 - 1146)	3471 (2912 - 3671)	3499 (3334 - 4203)
CRP < 0,06 mg/L	10 (100 %)	9 (100 %)	10 (100 %)	10 (100 %)

AST - aspartat aminotransferaza, ALT - alanin aminotransferaza, CRP - C reaktivni protein. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. a - * p < 0,05 u poređenju sa K-14 grupom, # p < 0,05 u poređenju sa K-28 grupom, ## p < 0,01 u poređenju sa H-28 grupom - Mann-Whitney U test. b - ## p < 0,01 u poređenju sa H-28 grupom - T test za nevezane uzorke.

4.1.4. Efekti aplikacije homocisteina na biohemijske parametre u tkivu srca

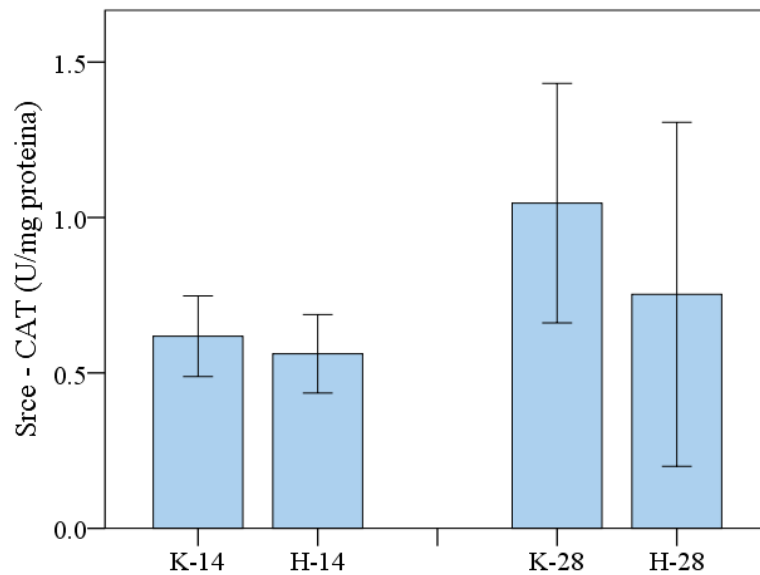
4.1.4.1. Efekti aplikacije homocisteina na parametre oksidativnog stresa u tkivu srca

Aktivnost katalaze u homogenatima tkiva srca se nije statistički značajno razlikovala između K-14 (0,618 ± 0,130 U/mg proteina) i H-14 grupe (0,561 ± 0,126 U/mg proteina), kao ni između K-28 (1,046 ± 0,385 U/mg proteina) i H-28 grupe (0,753 ± 0,553 U/mg proteina) (Grafikon 4).

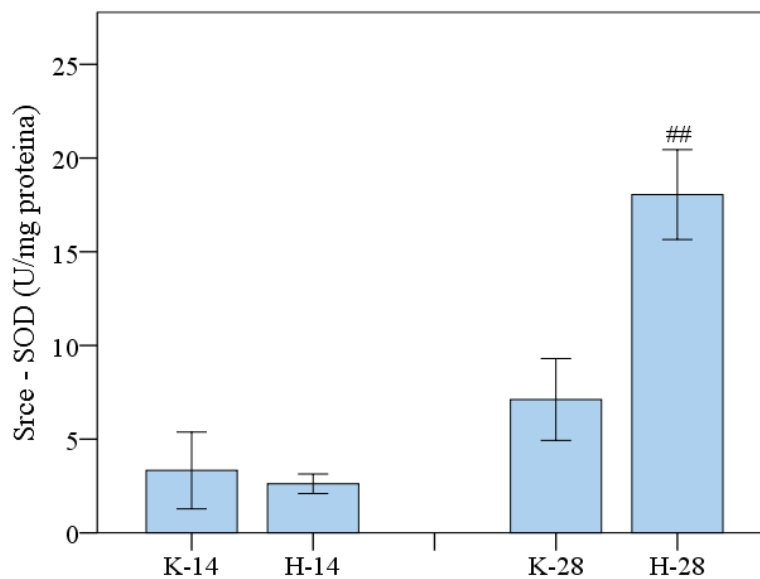
Ukupna aktivnost superoksid dismutaze nije pokazala statistički značajnu razliku između K-14 (3,331 ± 2,049 U/mg proteina) i H-14 grupe (2,620 ± 0,524 U/mg proteina). Sa druge strane životinje koje su nakon dvonedeljne aplikacije homocisteina ostale u životu još dve nedelje (H-28: 18,052 ± 2,398 U/mg proteina) imale su statistički visoko značajno veće aktivnosti superoksid dismutaze u poređenju sa odgovarajućom kontrolom (K-28: 7,116 ± 2,187 U/mg proteina) (Grafikon 5).

Nativnom gel elektroforezom detektovane su dve izoforme SOD u homogenatima tkiva srca: mangan-superoksid dismutaza (Mn-SOD) i bakar/cink-superoksid dismutaza (Cu/Zn-SOD) (Slika 18). Densitometrijskom analizom izmerena je njihova relativna aktivnost i izražena je procentualno u odnosu na ukupnu aktivnost. Nije detektovana statistički značajna razlika u relativnim aktivnostima SOD izoformi između K-14 (Mn-SOD 70,9% i Cu/Zn-SOD 29,1%) i H-14 grupe (Mn-SOD 63,5% i Cu/Zn-SOD 36,5%), kao ni između K-28 (Mn-SOD 67,1% i Cu/Zn-SOD 32,9%) i H-28 grupe (Mn-SOD 63,9% i Cu/Zn-SOD 36,1%) (Grafikon 6).

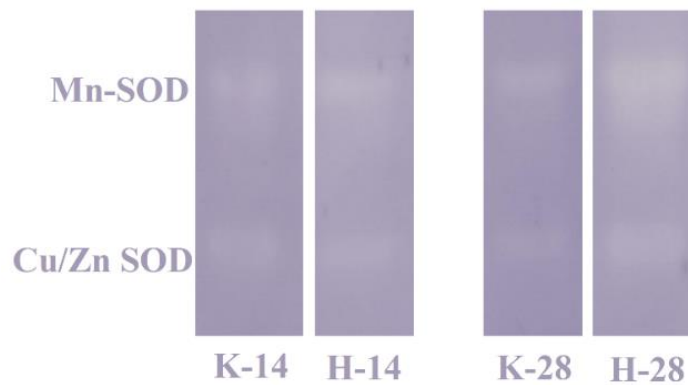
Koncentracija MDA u homogenatima tkiva srca nije se statistički značajno razlikovala između K-14 (5,561 ± 0,653 μmol/mg proteina) i H-14 grupe (5,444 ± 0,914 μmol/mg proteina), međutim, u H-28 grupi prisutno je statistički visoko značajno povišene koncentracije MDA u tkivu srca (11,116 ± 2,437 μmol/mg proteina) u odnosu na K-28 grupu (4,143 ± 0,454 μmol/mg proteina), p < 0,01 (Grafikon 7).



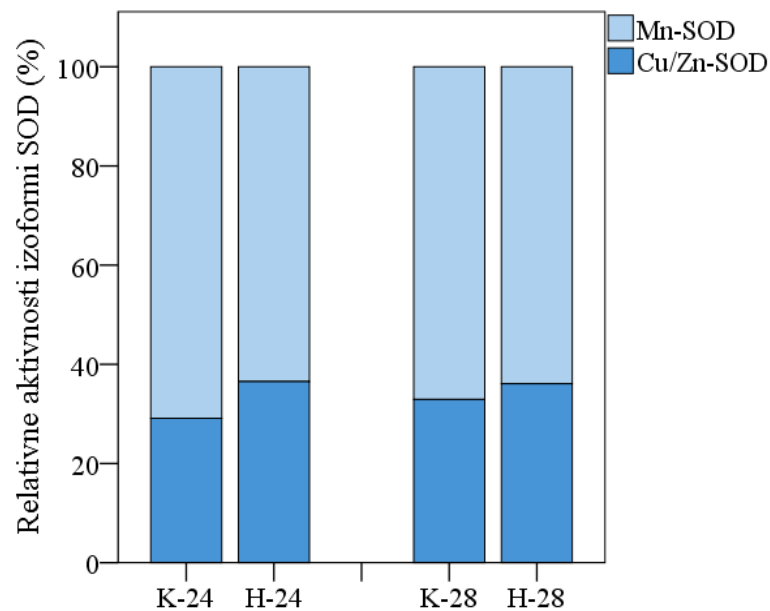
Grafikon 4. Efekti aplikacije homocisteina na aktivnost katalaze u tkivu srca. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - T test za nevezane uzorke.



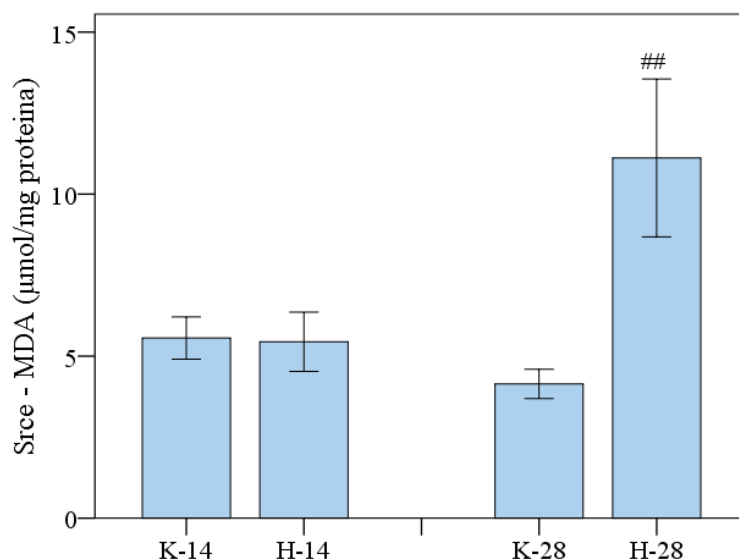
Grafikon 5. Efekti aplikacije homocisteina na ukupnu aktivnost superoksid dismutaze u tkivu srca. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. ## $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom - T test za nevezane uzorke.



Slika 18. Efekti aplikacije homocisteina na ekspresiju različitih izoformi superoksid dismutaze u tkivu srca - reprezentativni zimogrami. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana.



Grafikon 6. Efekti aplikacije homocisteina na relativnu aktivnost različitih izoformi superoksid dismutaze u tkivu srca - denzitometrijska analiza zimograma. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - T test za nevezane uzorke.



Grafikon 7. Efekti aplikacije homocisteina na koncentraciju malondialdehida u tkivu srca. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. ## p < 0,01 u poređenju sa K-28 grupom - T test za nevezane uzorke.

4.1.4.2. Efekti aplikacije homocisteina na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu srca

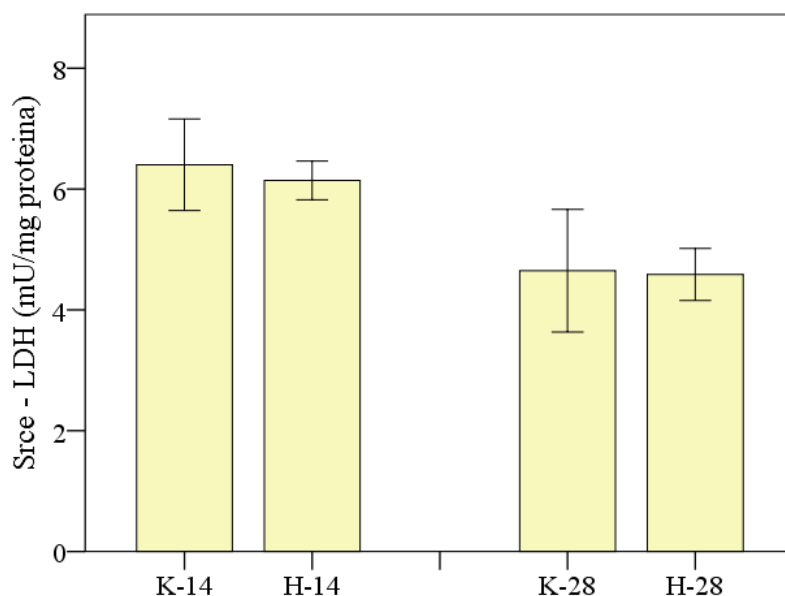
Ukupna aktivnost laktat dehidrogenaze u homogenatima tkiva srca nije pokazala statistički značajnu razliku između K-14 ($6,402 \pm 0,759$ mU/mg proteina) i H-14 grupe ($6,142 \pm 0,321$ mU/mg proteina). Takođe, statistički značajna razlika nije postignuta ni između K-28 ($4,647 \pm 1,015$ mU/mg proteina) i H-28 grupe ($4,585 \pm 0,430$ mU/mg proteina) u vrednostima aktivnosti LDH (Grafikon 8).

Nativnom gel elektroforezom detektovane su četiri izoforme LDH u homogenatima tkiva srca: LDH1, LDH2, LDH3 i LDH4 (Slika 19). Densitometrijskom analizom izmerena je njihova relativna aktivnost i izražena je procentualno u odnosu na ukupnu aktivnost. Nije detektovana statistički značajna razlika u relativnim aktivnostima LDH izoformi između K-14 (LDH1 16,3%, LDH2 32,1%, LDH3 42,6%, LDH4 9,0%) i H-14 grupe (LDH1 17,3%, LDH2 30,4%, LDH3 43,7%, LDH4 8,6%), kao ni između K-28 (LDH1 15,5%, LDH2 30,1%, LDH3 45,0%, LDH4 9,4%) i H-28 grupe (LDH1 13,9%, LDH2 30,5%, LDH3 44,6%, LDH4 11,0%) (Grafikon 9).

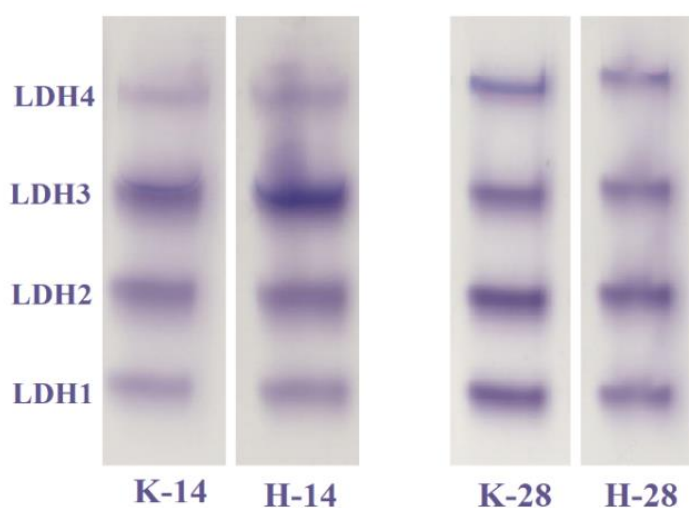
Ukupna aktivnost malat dehidrogenaze u homogenatima tkiva srca nije pokazala statistički značajnu razliku između K-14 ($6,307 \pm 0,779$ mU/mg proteina) i H-14 grupe ($5,721 \pm 0,425$ mU/mg proteina). Isto tako, statistički značajna razlika nije postignuta ni između K-28 ($3,844 \pm 0,958$ mU/mg proteina) i H-28 grupe ($4,038 \pm 1,027$ mU/mg proteina) u vrednostima aktivnosti MDH (Grafikon 10).

Nativnom gel elektroforezom detektovane su tri izoforme enzima MDH u homogenatima tkiva srca: peroksizomalna (pMDH), mitohondrijalna (mMDH) i citosolna (cMDH) (Slika 20). Densitometrijskom analizom izmerena je njihova relativna aktivnost i izražena je procentualno u odnosu na ukupnu aktivnost. Nije detektovana statistički značajna razlika u relativnim aktivnostima MDH izoformi između K-14 (pMDH 13,7%, mMDH 70,8%, cMDH 15,5%) i H-14 grupe (pMDH 12,2%, mMDH 70,8%, cMDH 17,0%) u tkivu srca. Isto tako, nije prisutna značajna razlika u relativnim aktivnostima MDH izoformi između K-28

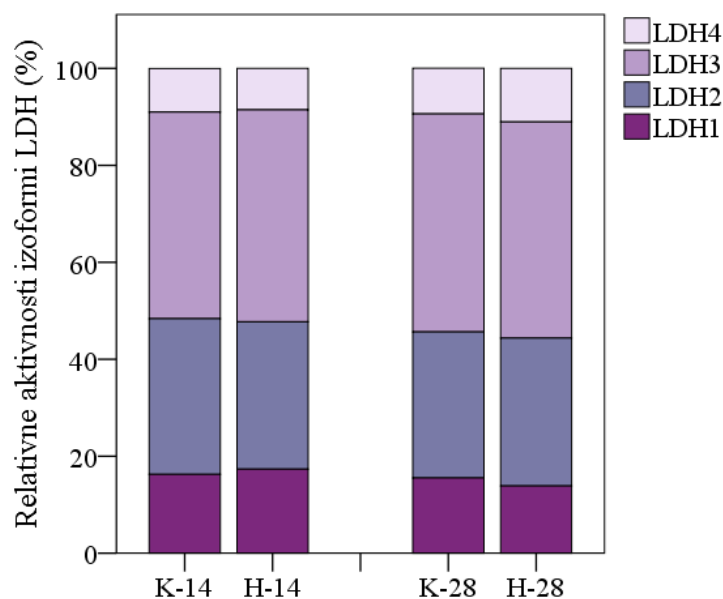
(pMDH 15,7%, mMDH 70,6%, cMDH 13,7%) i H-28 grupe (pMDH 16,4%, mMDH 71,2%, cMDH 12,4%) (Grafikon 11).



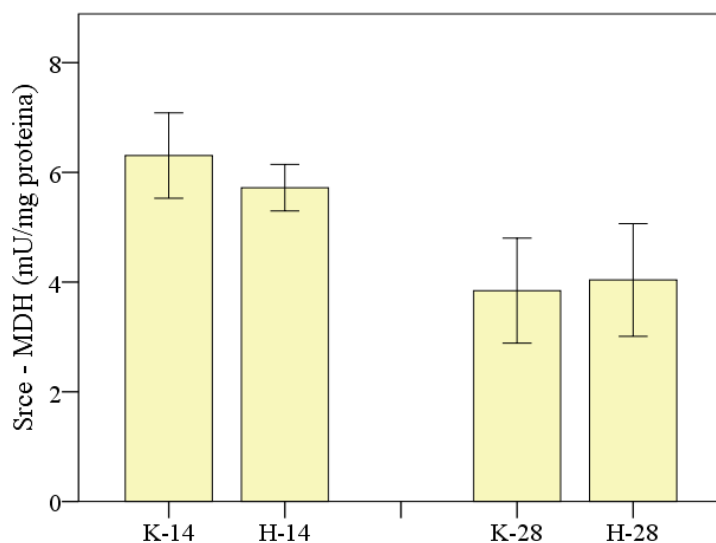
Grafikon 8. Efekti aplikacije homocisteina na ukupna aktivnost laktat dehidrogenaze u tkivu srca. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - T test za nevezane uzorke.



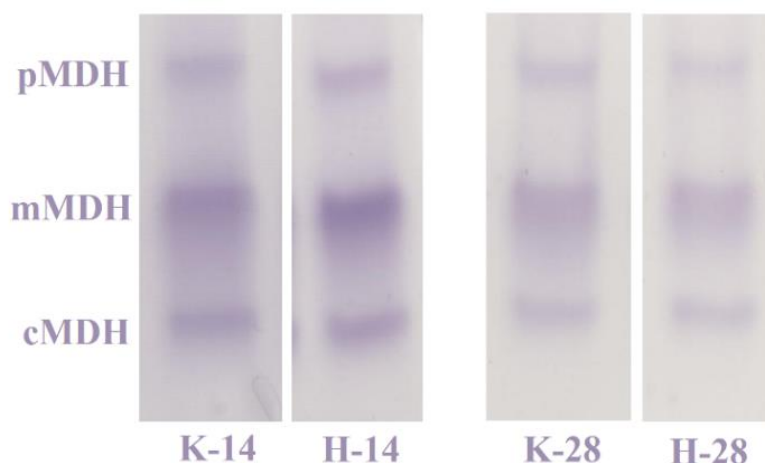
Slika 19. Efekti aplikacije homocisteina na ekspresiju različitih izoformi laktat dehidrogenaze u tkivu srca - reprezentativni zimogrami. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana.



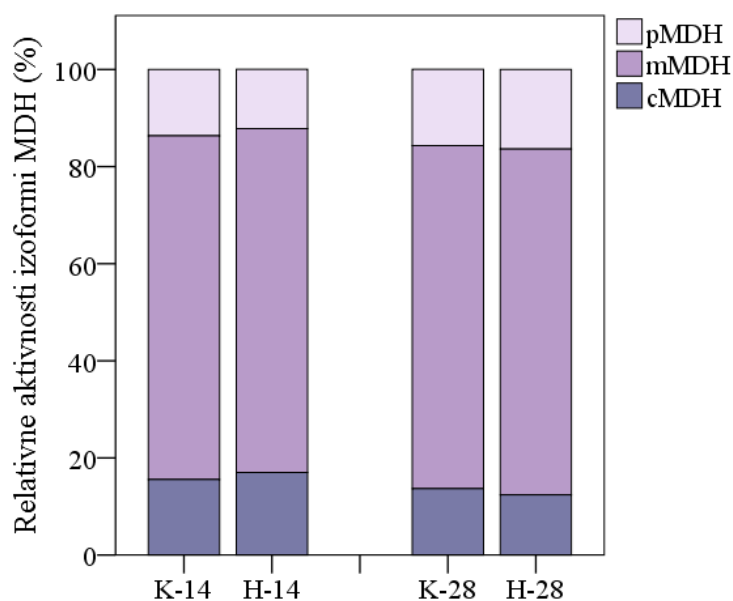
Grafikon 9. Efekti aplikacije homocisteina na relativnu aktivnost različitih izoformi laktat dehidrogenaze u tkivu srca - denzitometrijska analiza zimograma. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - T test za nevezane uzorke.



Grafikon 10. Efekti aplikacije homocisteina na ukupnu aktivnost enzima malat dehidrogenaze u tkivu srca. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - T test za nevezane uzorke.



Slika 20. Efekti aplikacije homocisteina na ekspresiju različitih izoformi laktat dehidrogenaze u tkivu srca - reprezentativni zimogrami. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana.

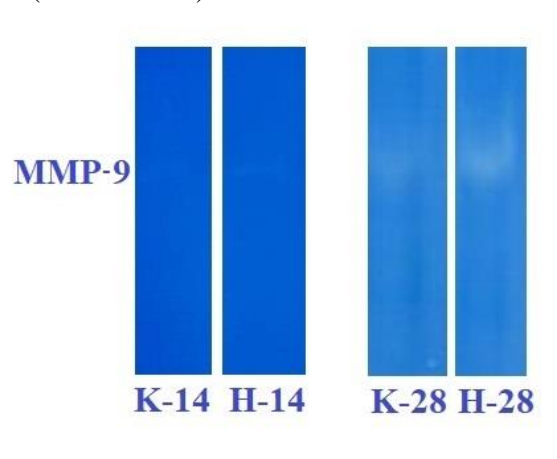


Grafikon 11. Efekti aplikacije homocisteina na relativnu aktivnost različitih izoformi malat dehidrogenaze u tkivu srca - denzitometrijska analiza zimograma. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - T test za nevezane uzorke.

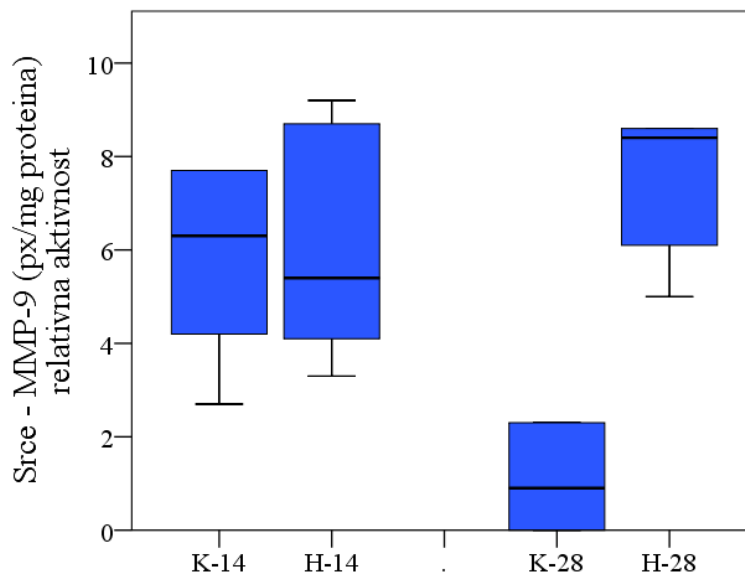
4.1.4.3. Efekti aplikacije homocisteina na aktivnosti matriks metaloproteinaza u tkivu srca

SDS-PAGE zimografskom tehnikom u homogenatima tkiva srca detektovana je samo aktivnost MMP-9 (Slika 21) i to u pojedinim uzorcima (K-14: 5/5, H-14: 5/5, K-28: 3/5, H-28:

5/5). Denzitometrijskom analizom izmerene relativne aktivnost MMP-9 u tkivu srca u grupama iznosile su: K-14: 6,3 (3,4 - 10,8) px/mg proteina, H-14: 5,4 (3,7 - 8,9) px/mg proteina, K-28: 0,9 (0,0 - 16,2) px/mg proteina i H-28: 8,4 (5,5 - 17,3) px/mg proteina. Nije detektovana statistički značajna razlika u relativnoj aktivnosti MMP-9 između K-14 i H-14 grupe, kao ni između K-28 i H-28 grupe (Grafikon 34).



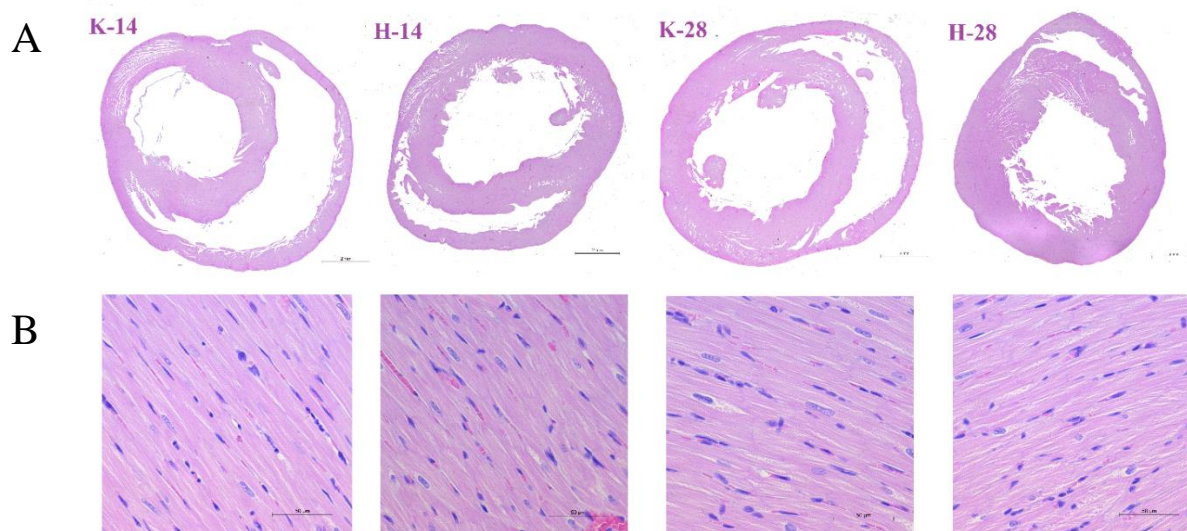
Slika 21. Efekti aplikacije homocisteina na ekspresiju matriks metaloproteinaza u tkivu srca - reprezentativni zimogrami. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana.



Grafikon 12. Efekti aplikacije homocisteina na relativnu aktivnost matriks metaloproteinaze-9 u tkivu srca. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Mann-Whitney U test.

4.1.5. Efekti aplikacije homocisteina na histološke promene i histomorfometrijske parametre srca

Na slici 22 prikazani su reprezentativni histološki uzorci tkiva srca na malom i velikom uveličanju (Slika 22). U svim ispitivanim grupama primećuje se pravilan raspored vlakna miokarda, a kardiomiociti su zadržali fiziološku morfologiju.



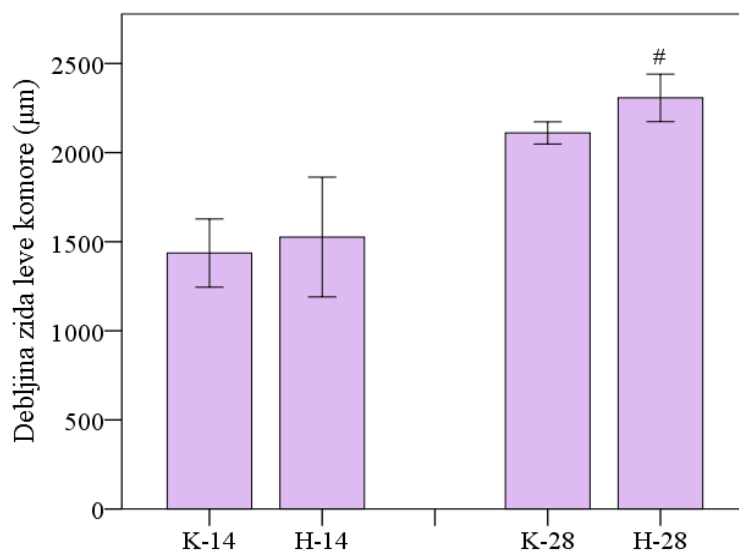
Slika 22. Poprečni presek srca - hematoksilin/eozin bojenje (A: uveličanje x50, B: uveličanje x400). K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana.

Debljina zida leve komore se nije statistički značajno razlikovala između K-14 ($1436,332 \pm 191,322 \mu\text{m}$) i H-14 grupe ($1526,087 \pm 336,076 \mu\text{m}$). Sa druge strane u H-28 grupi debljina zida leve komore ($2307,074 \pm 133,123 \mu\text{m}$) bila je statistički značajno povećana u poređenju sa K-28 grupu ($2110,814 \pm 62,286 \mu\text{m}$), $p < 0,05$ (Grafikon 13).

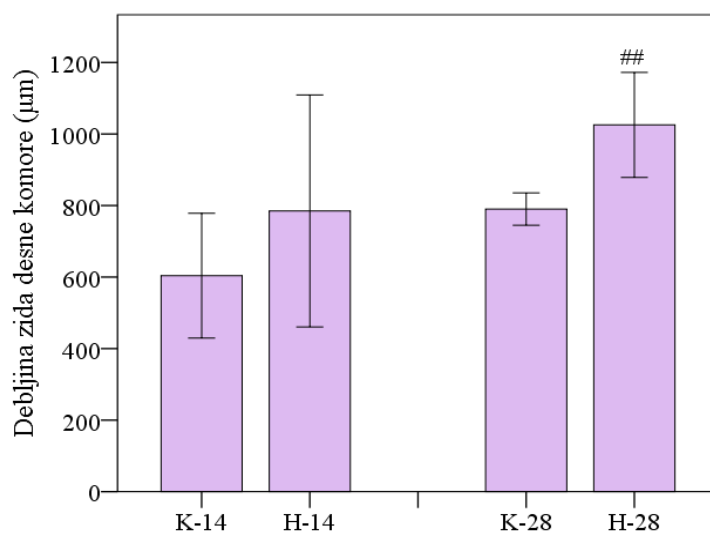
Debljina desne leve komore se nije statistički značajno razlikovala između K-14 ($603,880 \pm 174,622 \mu\text{m}$) i H-14 grupe ($784,863 \pm 324,157 \mu\text{m}$). Međutim u H-28 grupi debljina zida leve komore ($1025,889 \pm 146,921 \mu\text{m}$) bila je statistički značajno povećana u poređenju sa K-28 grupu ($790,223 \pm 45,292 \mu\text{m}$), $p < 0,01$ (Grafikon 14).

Debljina interventrikularnog septuma u K-14 grupi je iznosila $1384,300$ ($1222,606 - 1528,751$) μm , a u H-14 grupi $1365,622$ ($1150,605 - 1496,107$) μm . Između ove dve grupe nije primećena statistički značajna razlika. Debljina interventrikularnog septuma je bila najveća u H-28 grupi $2067,526$ ($1752,482 - 2144,291$) μm , ali bez dostizanja statistički značajne razlike u odnosu na K-28 grupu $1632,364$ ($1537,572 - 1772,182$) μm (Grafikon 15).

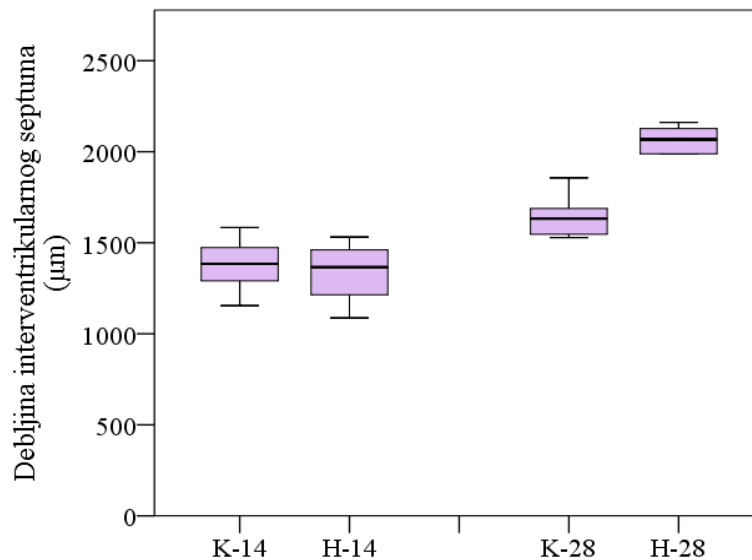
Transverzalni dijametar kardiomiocita se nije statistički značajno razlikovao između K-14 ($18,330$ ($17,707 - 19,083$) μm) i H-14 grupe ($19,209$ ($18,072 - 21,011$) μm), kao ni između K-28 ($19,328$ ($18,169 - 20,963$) μm) i H-28 grupe ($22,328$ ($20,310 - 22,622$) μm) (Grafikon 16).



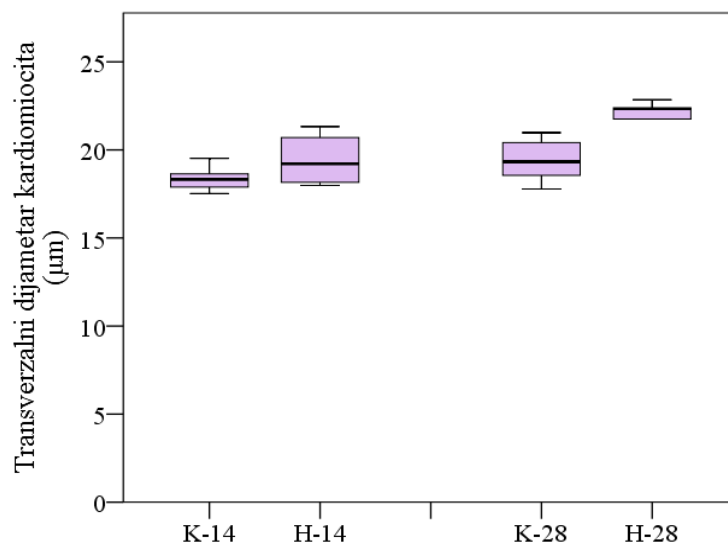
Grafikon 13. Efekti aplikacije homocisteina na debljinu zida leve komore. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. # $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom - T test za nevezane uzorke.



Grafikon 14. Efekti aplikacije homocisteina na debljinu zida leve komore. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. ## $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom - T test za nevezane uzorke.



Grafikon 15. Efekti aplikacije homocisteina na debljinu interventrikularnog septuma. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Mann-Whitney U test.



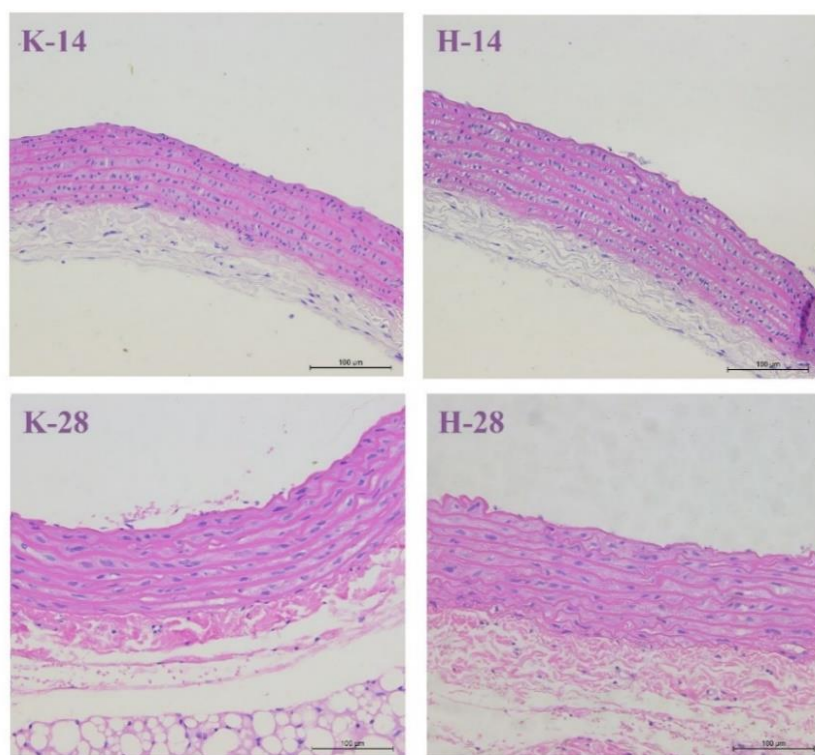
Grafikon 16. Efekti aplikacije homocisteina na transverzalni dijamer kardiomociocita. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Mann-Whitney U test.

4.1.6. Efekti aplikacije homocisteina na histološke promene i histomorfometrijske parametre aorte

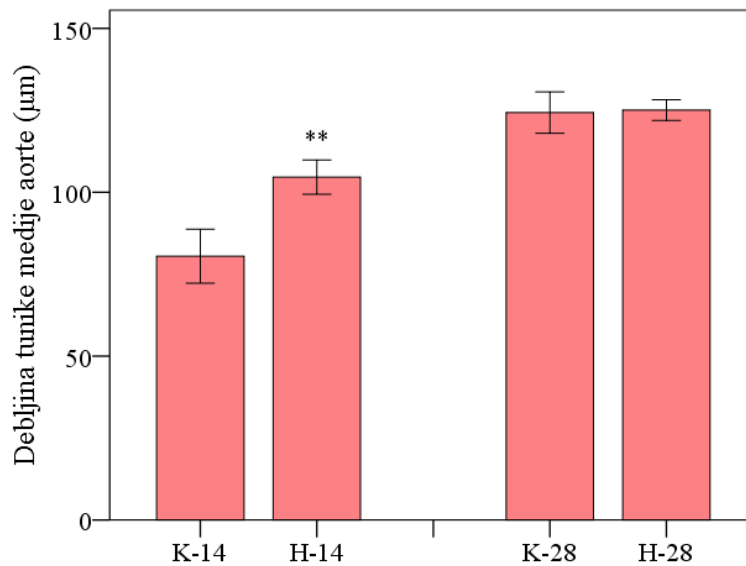
Histomorfometrijska analiza tkiva aorte pokazala je statistički značajni porast debljine tunike medije u H-14 grupi ($104,627 \pm 5,227 \mu\text{m}$) u odnosu na K-14 grupu ($80,511 \pm 8,249 \mu\text{m}$), $p < 0,01$. Debljina tunike medije se nije statistički značajno razlikovala između K-28 ($124,327 \pm 6,324 \mu\text{m}$) i H-28 grupe ($125,077 \pm 3,165 \mu\text{m}$) (Grafikon 17).

Uzorci tkiva aorte se nisu statistički značajno razlikovali u broju elastičnih lamina (EL) u tunici mediji među ispitivanim grupama: K-14: 9 (8-10) EL, H-14 10 (9-11) EL, K-28 10 (9-11) EL, H-28 10 (9-11) EL (Grafikon 18).

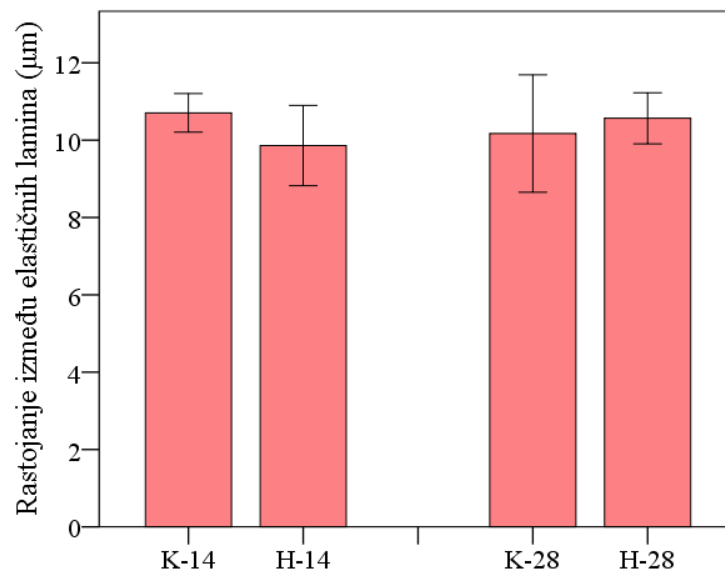
Rastojanje između elastičnih lamina se takođe nije statistički značajno razlikovalo između K-14 ($10,706 \pm 6,324 \mu\text{m}$) i H-14 grupe ($9,859 \pm 1,037 \mu\text{m}$), kao ni između K-28 ($10,170 \pm 1,518 \mu\text{m}$) i H-28 grupe ($10,566 \pm 0,661 \mu\text{m}$) (Grafikon 19).



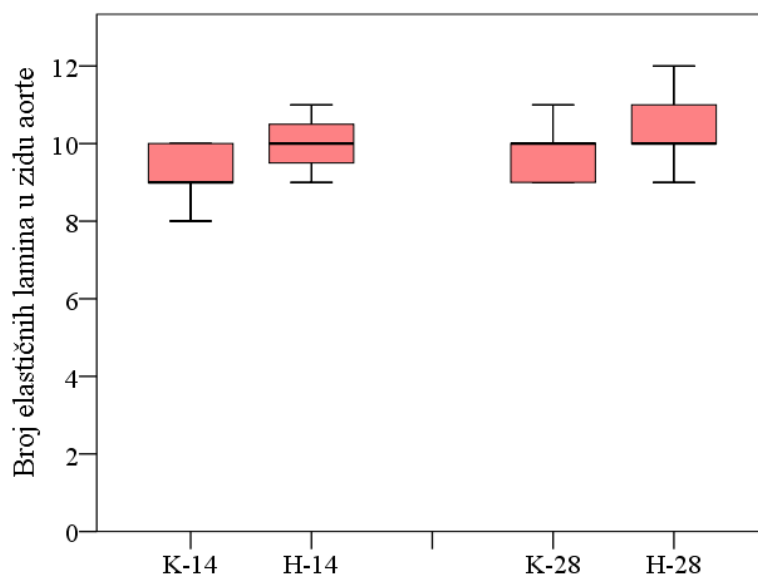
Slika 23. Poprečni presek aorte, hematoksilin/eozin bojenje, uveličanje x200. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana.



Grafikon 17. Efekti aplikacije homocisteina na debljinu tunike medije aorte. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-14 grupom - T test za nevezane uzorke.



Grafikon 18. Efekti aplikacije homocisteina na rastojanje između elastičnih lamina u zidu aorte. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - T test za nevezane uzorke.



Grafikon 19. Efekti aplikacije homocisteina na broj elastičnih lamina u zidu. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Mann-Whitney U test.

4.1.7. Efekti aplikacije homocisteina na biohemijske parametre u tkivu jetre

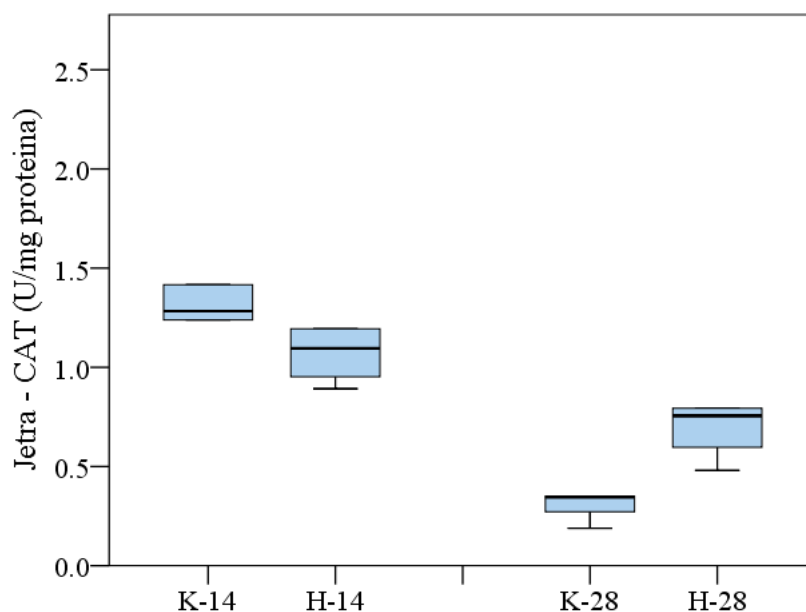
4.1.7.1. Efekti aplikacije homocisteina na parametre oksidativnog stresa u tkivu jetre

Aktivnost katalaze u homogenatima tkiva jetre u se nije značajno razlikovala između K-14 grupe (1,283 (0,893 - 1,744) U/mg proteina), i H-14 grupe (1,096 (0,922 - 1,432) U/mg proteina). Isto tako vrednost aktivnosti katalaze između grupe K-28 (0,346 (0,230 - 0,752) U/mg proteina) i grupe H-28 (0,756 (0,539 - 1,320) U/mg proteina) nije pokazala statistički značajnu razliku (Grafikon 20).

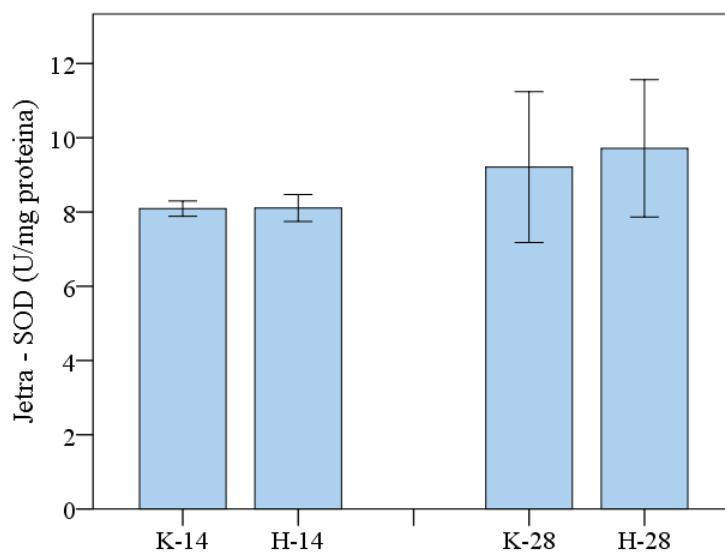
Ukupna aktivnost superoksid dismutaze u homogenatima tkiva jetre se nije značajno razlikovala između K-14 grupe ($8,091 \pm 0,206$ U/mg proteina) u odnosu na H-14 grupu ($8,107 \pm 0,365$ U/mg proteina). Takođe vrednost aktivnosti superoksid dismutaze u K-28 grupi ($9,209 \pm 2,030$ U/mg proteina) se nije statistički značajno razlikovala u odnosu na H-28 grupu ($9,713 \pm 1,849$ U/mg proteina) (Grafikon 21).

Nativnom gel elektroforezom detektovane su dve izoforme SOD u homogenatima tkiva jetre: Mn-SOD i Cu/Zn-SOD (Slika 24). Densitometrijskom analizom izmerena je njihova relativna aktivnost i izražena je procentualno u odnosu na ukupnu aktivnost. Nije detektovana statistički značajna razlika u relativnim aktivnostima SOD izoformi između K-14 (Mn-SOD 93,2% i Cu/Zn-SOD 6,8%) i H-14 grupe (Mn-SOD 92,4% i Cu/Zn-SOD 7,6%), kao ni između K-28 (Mn-SOD 92,1% i Cu/Zn-SOD 7,9%) i H-28 grupe (Mn-SOD 93,0% i Cu/Zn-SOD 7,0%) (Grafikon 22).

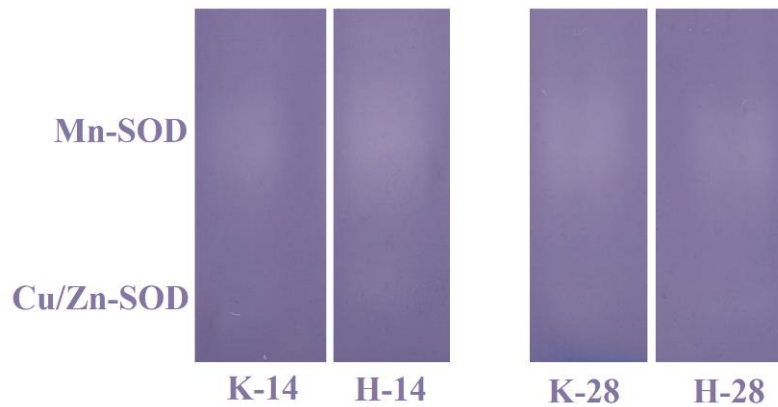
Koncentracija malondialdehida u homogenatima tkiva jetre se nije statistički značajno razlikovala između K-14 ($1,312 \pm 0,523$ μ mol/mg proteina) i H-14 grupe ($1,161 \pm 0,308$ μ mol/mg proteina). Takođe koncentracija MDA u tkivu jetre se nije statistički značajno razlikovala između K-28 grupe ($8,120 \pm 0,844$ μ mol/mg proteina) i H-28 grupe ($9,404 \pm 1,234$ μ mol/mg proteina) (Grafikon 23).



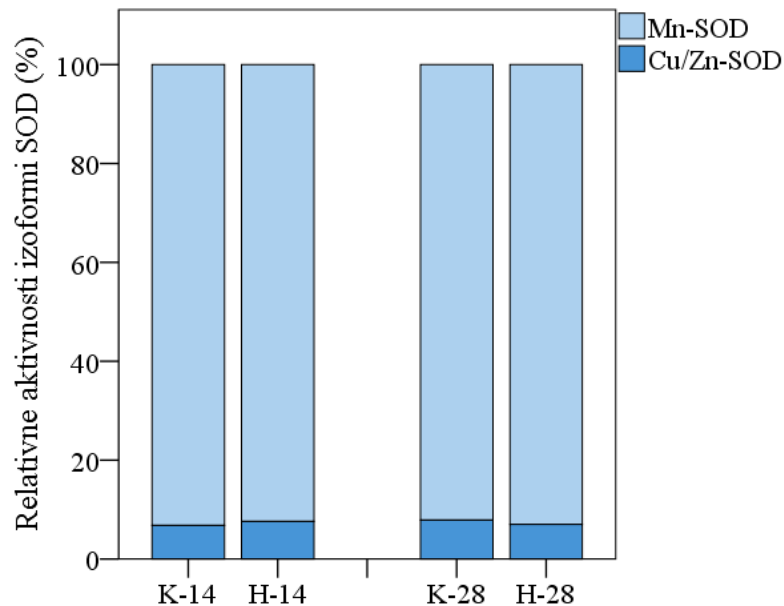
Grafikon 20. Efekti aplikacije homocisteina na aktivnost katalaze u tkivu jetre. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Mann-Whitney U test.



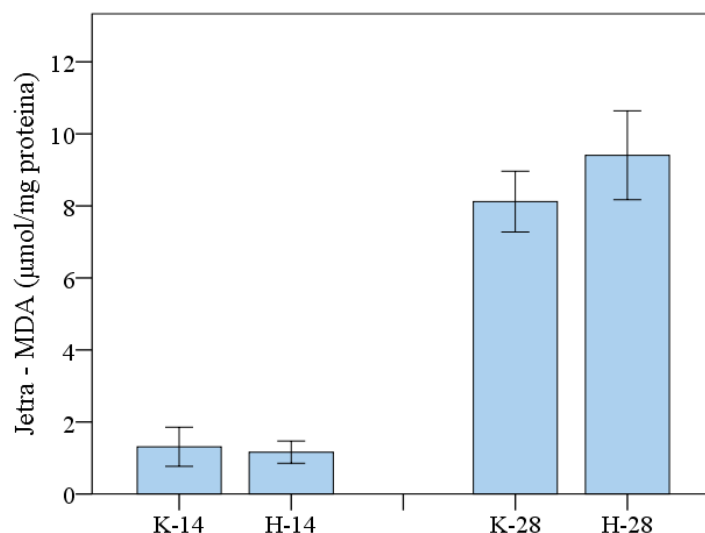
Grafikon 21. Efekti aplikacije homocisteina na ukupnu aktivnost superoksid dismutaze u tkivu jetre. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - T test za nevezane uzorke.



Slika 24. Efekti aplikacije homocisteina na ekspresiju različitih izoformi superoksid dismutaze u tkivu jetre - reprezentativni zimogrami. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana.



Grafikon 22. Efekti aplikacije homocisteina na relativnu aktivnost različitih izoformi superoksid dismutaze u tkivu jetre - denzitometrijska analiza zimogrami. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - T test za nevezane uzorke.



Grafikon 23. Efekti aplikacije homocisteina na koncentraciju malondialdehida u tkivu jetre. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - T test za nevezane uzorke.

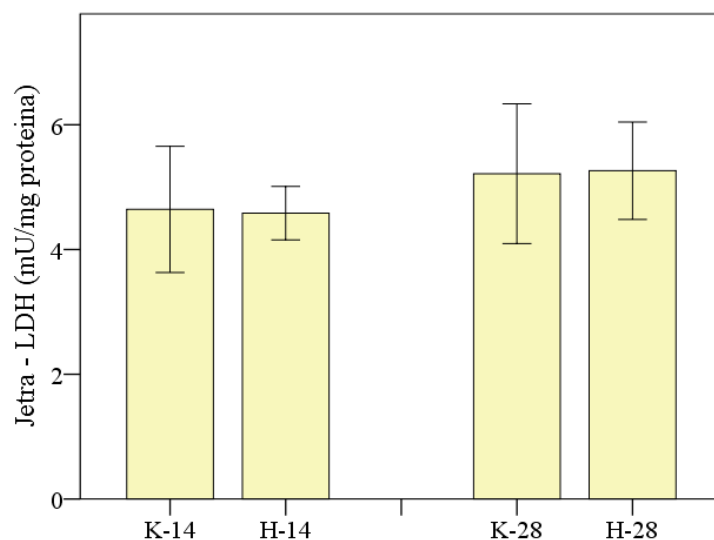
4.1.7.2. Efekti aplikacije homocisteina na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu jetre

Ukupna aktivnost enzima LDH u homogenatima tkiva jetre nije pokazala statistički značajnu razliku između K-14 ($4,644 \pm 1,012$ mU/mg proteina) i H-14 grupe ($4,583 \pm 0,429$ mU/mg proteina), kao ni između K-28 ($5,126 \pm 1,120$ mU/mg proteina) i H-28 grupe ($5,263 \pm 0,781$ mU/mg proteina) (Grafikon 24).

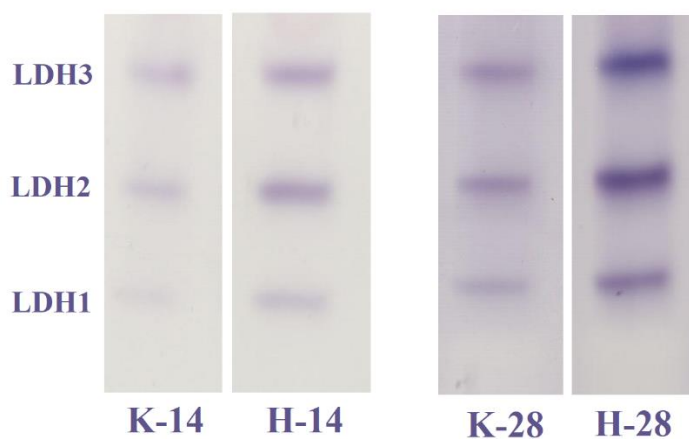
Nativnom gel elektroforezom detektovane su tri izoforme LDH u homogenatima tkiva jetre: LDH1, LDH2 i LDH3 (Slika 25). Densitometrijskom analizom izmerena je njihova relativna aktivnost i izražena je procentualno u odnosu na ukupnu aktivnost. Nije detektovana statistički značajna razlika u relativnim aktivnostima LDH izoformi između K-14 (LDH1 16,4%, LDH2 40,4%, LDH3 43,2%) i H-14 grupe (LDH1 13,1%, LDH2 26,6%, LDH3 60,3%), kao ni između K-28 (LDH1 16,7%, LDH2 37,1%, LDH3 46,2%) i H-28 grupe (LDH1 14,2%, LDH2 38,0%, LDH3 47,8%). Primećen je blagi porast relativne aktivnosti LDH3 izoforme u grupama tretiranim homocisteinom, ali bez dostizanja statistički značajne razlike u odnosu na kontrolne grupe (Grafikon 25).

Ukupna aktivnost enzima MDH u homogenatima tkiva jetre nije pokazala statistički značajnu razliku između K-14 ($25,935 (24,339 - 30,925)$ mU/mg proteina) grupe i H-14 grupe ($26,853 (23,618 - 31,041)$ mU/mg proteina). Statistički značajna razlika u ukupnoj aktivnosti MDH u tkivu jetre nije detektovana ni između K-28 ($20,975 (15,496 - 21,482)$ mU/mg proteina) i H-28 grupe ($19,415 (16,997 - 22,185)$ mU/mg proteina) (Grafikon 26).

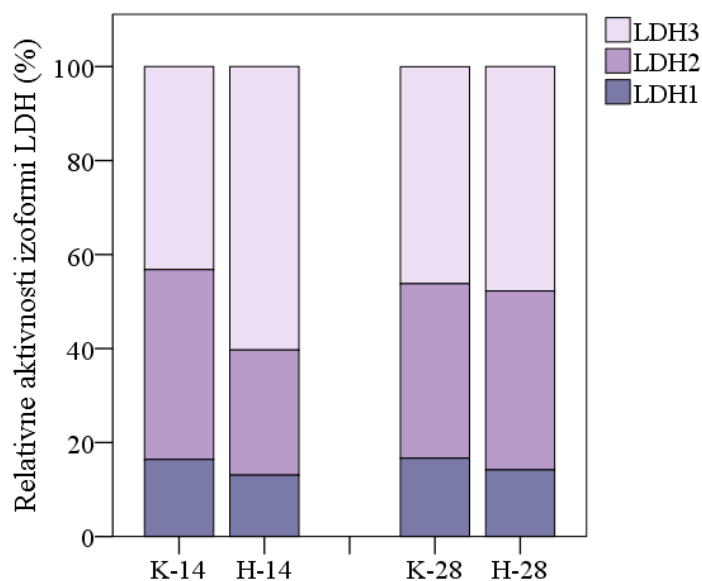
Nativnom gel elektroforezom detektovana je samo jedna izoforma enzima MDH u homogenatima tkiva jetre: mitohondrijalna MDH (Slika 26).



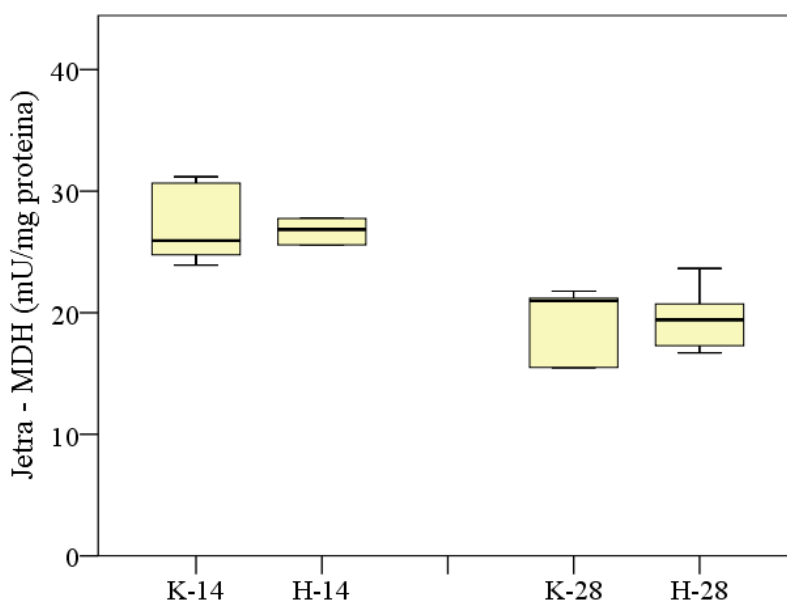
Grafikon 24. Efekti aplikacije homocisteina na ukupnu aktivnost enzima laktat dehidrogenaze u tkivu jetre. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. $p < 0,05$ - T test za nevezane uzorke.



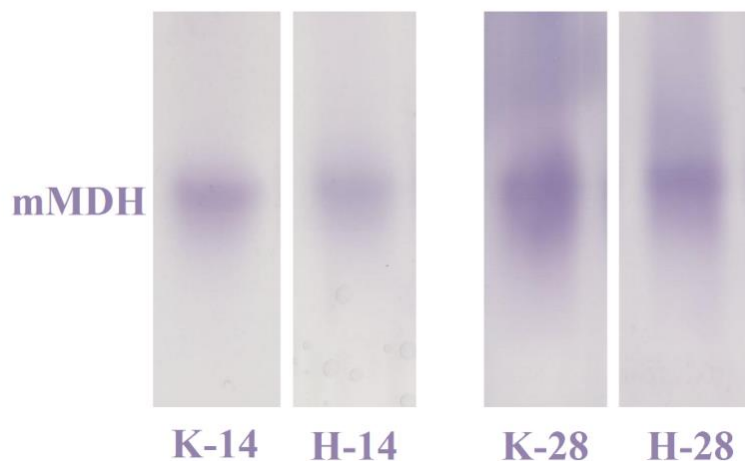
Slika 25. Reprezentativni zimogrami izoformi enzima laktat dehidrogenaze u homogenatima tkiva jetre. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana.



Grafikon 25. Efekti aplikacije homocisteina na relativnih aktivnosti izoformi enzima laktat dehidrogenaze u homogenatima tkiva jetre - Denzitometrijska analiza zimograma. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. LDH1: $p > 0,05$ - T test za nevezane uzorke, LDH2 i LDH3: $p > 0,05$ - Mann-Whitney U test.



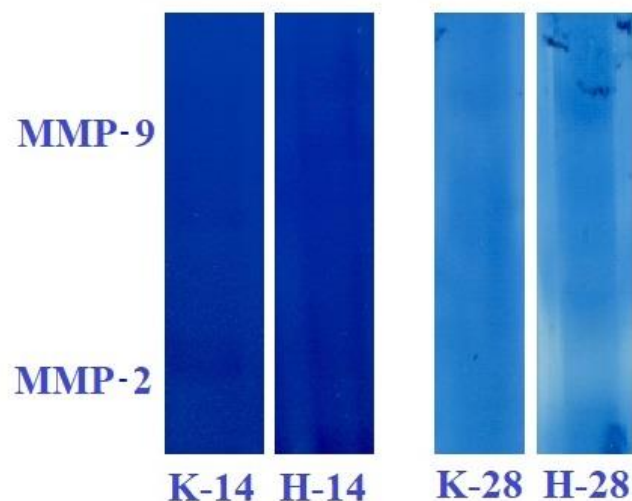
Grafikon 26. Efekti aplikacije homocisteina na ukupnu aktivnost enzima malat dehidrogenaze u tkivu jetre. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Mann-Whitney U test.



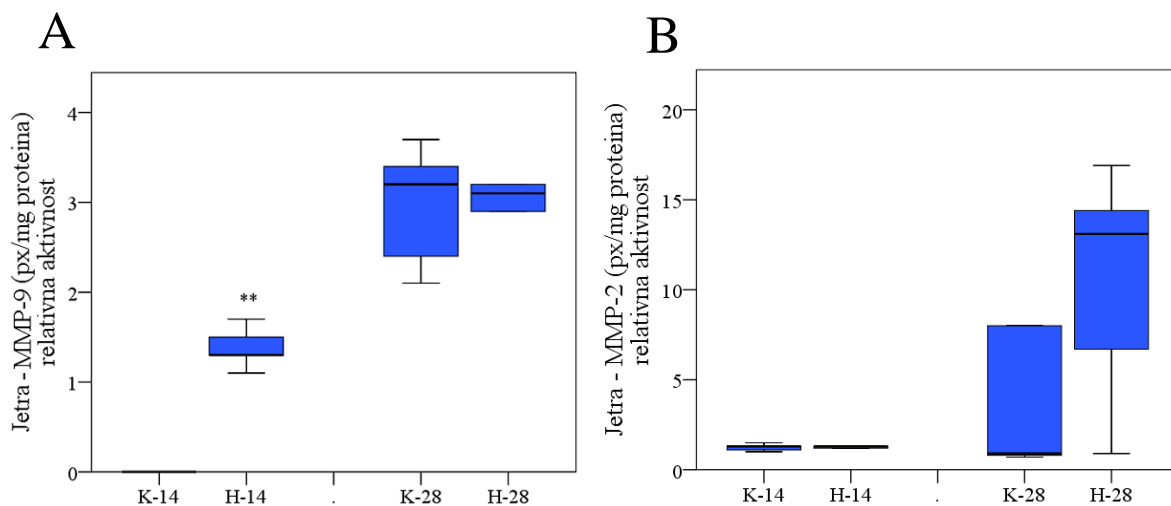
Slika 26. Reprezentativni zimogrami enzima malat dehidrogenaze u homogenatima tkiva jetre. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana.

4.1.7.3. Efekti aplikacije homocisteina na aktivnosti matriks metaloproteinaza u tkivu jetre

SDS-PAGE zimografskom tehnikom u homogenatima tkiva jetre detektovane su aktivnost MMP-9 i MMP-2 (Slika 27), s tim što je u K-14 grupi detektovana jedino aktivnost MMP-2. Denzitometrijskom analizom izmerene relativne aktivnosti MMP-9 u tkivu jetre u grupama iznosile su: K-14: (0,0 - 0,0) px/mg proteina, H-14: 1,3 (1,2 - 1,6) px/mg proteina, K-28: 3,2 (2,2 - 3,5) px/mg proteina i H-28: 3,1 (2,9 - 3,7) px/mg proteina. Relativne aktivnosti MMP-2 u grupama su iznosile: K-14: 1,3 (1,0 - 1,4) px/mg proteina, H-14: 1,3 (1,2 - 1,3) px/mg proteina, K-28: 0,9 (0,7 - 16,1) px/mg proteina i H-28: 13,1 (3,8 - 15,6) px/mg proteina. Statistički značajna razlika u aktivnosti izoforma MMP uočena je jedino u aktivnosti MMP-9 između K-14 i H-14 grupe, $p < 0,01$ (Grafikon 34).



Slika 27. Efekti aplikacije homocisteina na ekspresiju matriks metaloproteinaza u tkivu jetre - reprezentativni zimogrami. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana.

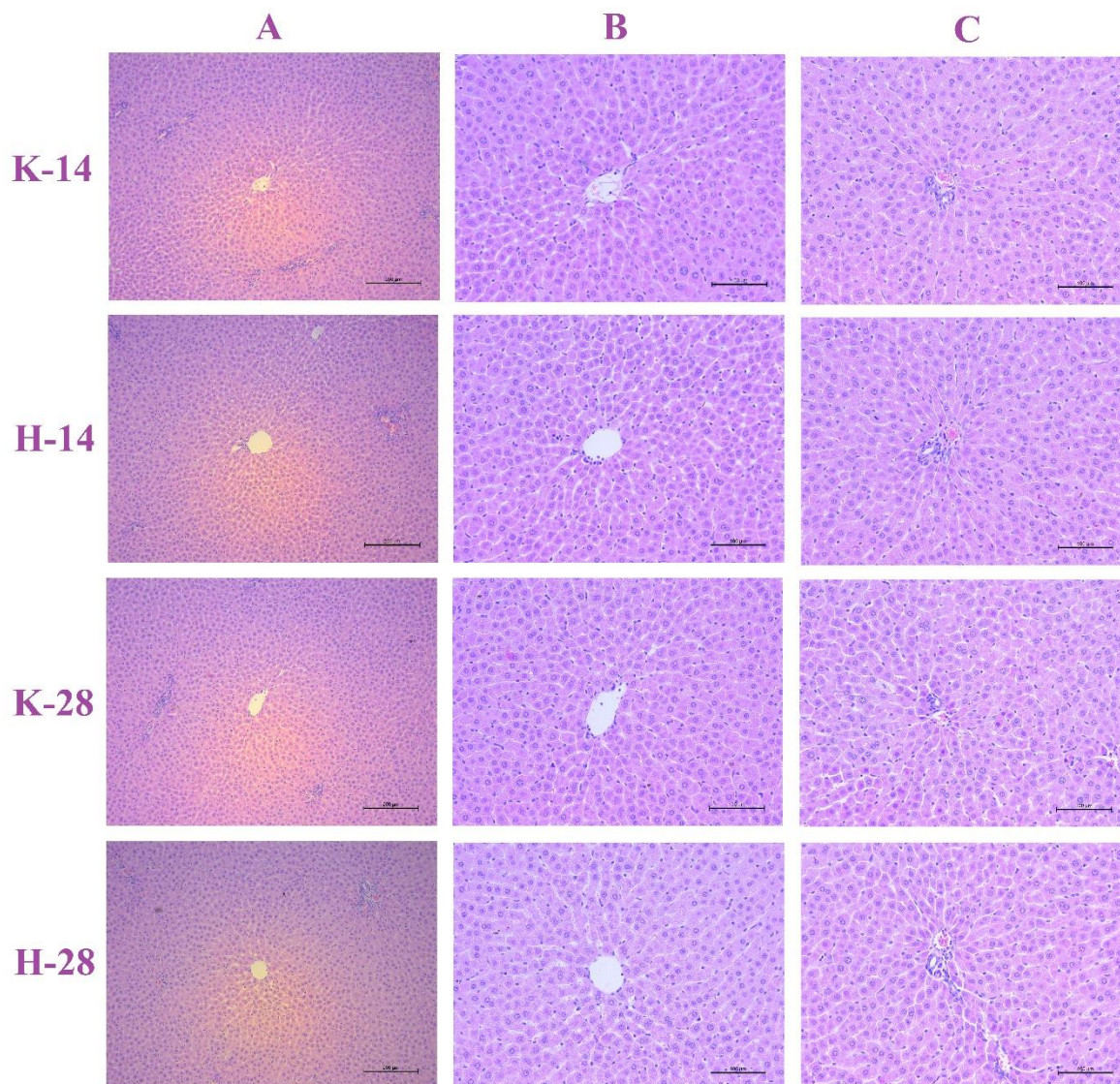


Grafikon 27. Efekti aplikacije homocisteina na aktivnost matriks metaloproteinaze-9 (A) i matriks metaloproteinaze-2 (B) u tkivu jetre. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-14 grupom - Mann-Whitney U test.

4.1.8. Efekti aplikacije homocisteina na histološke promene jetre

Histološka analiza tkiva jetre u grupama K-14, H-14, K-28 i H-28 pokazuje fiziološki radijalni raspored jetrinih gredica prema centralnoj veni (Slika 28). Jetrini lobulusi su očuvane arhitektonike. Ne primećuje se proširenje sinusoidnih kapilara između gredica hepatocita i njihova orijentacija je pravilna. Portni prostori sadrže ogranke a. hepaticae propriae, v. portae i interlobularnih žučnih kanalića i očuvane su građe. Hepatociti sadrže jedno do dva pravilna,

okrugla, euhromatska jedra u kojima se uočava formirano jedarce, kao i eozinofilnu citoplazmu sa pojedinim bazofilnim zonama koje odgovaraju endoplazmatskom retikulumu. Ne uočava se mikro i makro vezikularna masna promena hepatocita. Nije uočljiva fibroza, niti ciroza. Ne uočava se zastoj žuči. U uzorcima jetre unutar H-14 grupe se u određenim hepatocitima primećuje blago smanjenje depoa glikogena i blaga hiperplazija Kupferovih ćelija.



Slika 28. Fotomikrografije preparata tkiva jetre - hematoksilin/eozin bojenje: A - centar lobulusa, uveličanje x100, B - centar lobulusa, uveličanje x200, C - centar acinusa - portni prostor, uveličanje x200. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana.

4.1.9. Efekti aplikacije homocisteina na biohemijske parametre u tkivu kolona

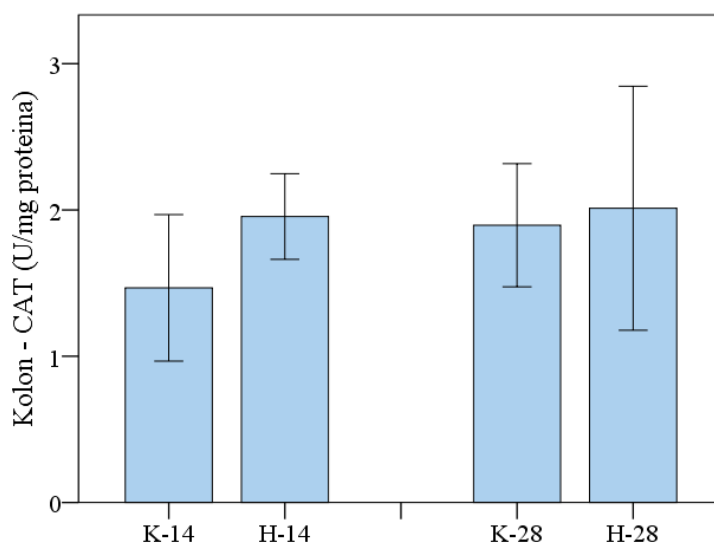
4.1.9.1. Efekti aplikacije homocisteina na parametre oksidativnog stresa u tkivu kolona

Aktivnost CAT u homogenatima tkiva kolona nije pokazala statistički značajnu razliku između K-14 ($1,467 \pm 0,501$ U/mg proteina) i H-14 grupe ($1,955 \pm 0,293$ U/mg proteina). Takođe statistički značajna razlika nije detektovana u aktivnosti CAT tkivu kolona između K-28 ($1,895 \pm 0,421$ U/mg proteina) i H-28 grupe ($2,012 \pm 0,834$ U/mg proteina) (Grafikon 28).

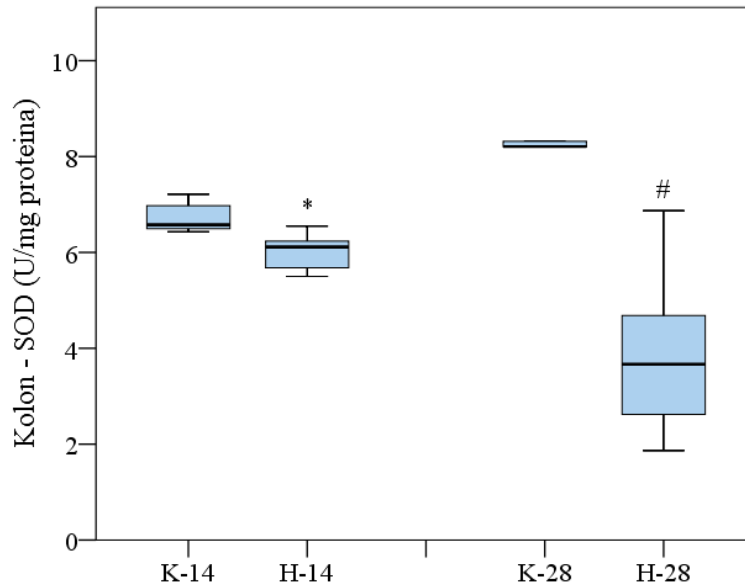
Ukupna aktivnost SOD u homogenatima tkiva kolona bila je statistički značajno snižena u H-14 grupi ($6,114$ ($5,590 - 6,391$) U/mg proteina) u poređenju sa K-14 grupom ($6,577$ ($6,464 - 7,093$) U/mg proteina), $p < 0,05$. Isti trend promene aktivnosti SOD primećuje se i u H-28 grupi ($3,667$ ($2,243 - 5,778$) U/mg proteina) u odnosu na K-28 grupu ($8,208$ ($7,481 - 8,458$) U/mg proteina), $p < 0,05$ (Grafikon 29).

Nativnom elektroforezom detektovana je samo jedna izoforma SOD u homogenatima tkiva kolona, Mn-SOD (Slika 29).

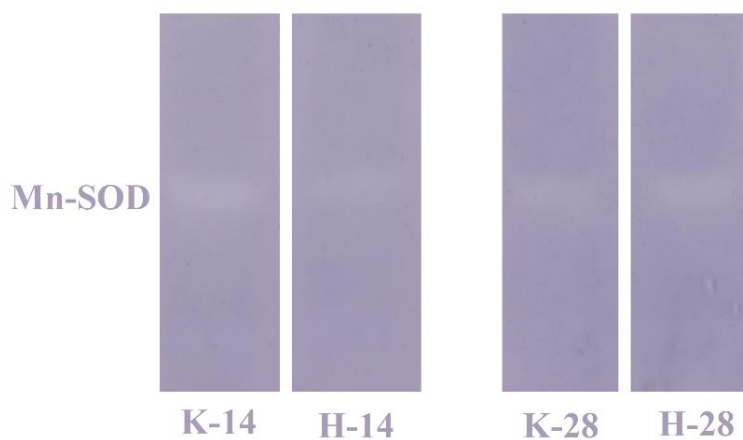
Koncentracija MDA u homogenatima tkiva kolona nije pokazala statistički značajnu razliku među ispitivanim grupama. Koncentracija je bila blago povišena u H-14 grupi ($4,717 \pm 1,653$ $\mu\text{mol/mg}$ proteina) u odnosu na K-14 grupu ($5,354 \pm 0,798$ $\mu\text{mol/mg}$ proteina), ali bez dostizanja statističke značajnosti, $p > 0,05$. Koncentracija MDA u K-28 grupi iznosila je $9,904 \pm 2,056$ $\mu\text{mol/mg}$ proteina, a u H-28 grupi $15,766 \pm 6,893$ $\mu\text{mol/mg}$ proteina (Grafikon 30).



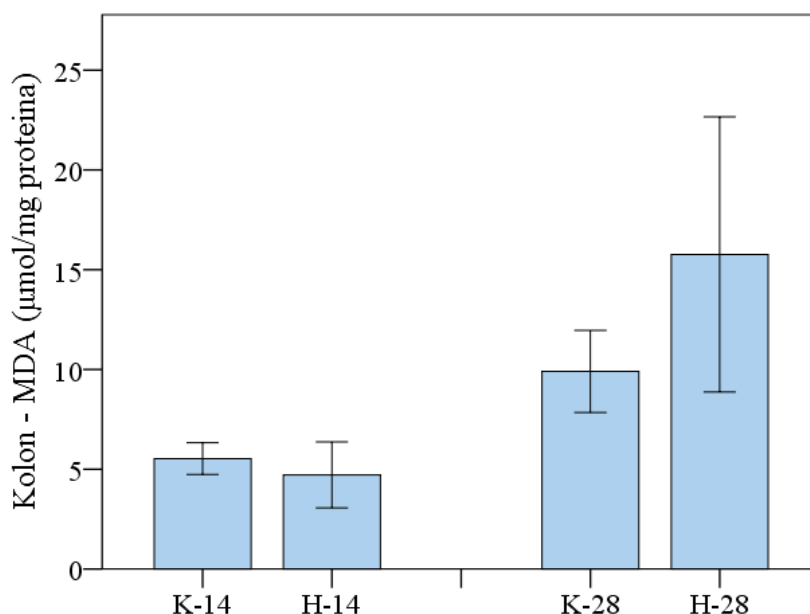
Grafikon 28. Efekti aplikacije homocisteina na ukupnu aktivnost enzima katalaze u homogenatima tkiva kolona. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - T test za nevezane uzorke.



Grafikon 29. Efekti aplikacije homocisteina na ukupnu aktivnost enzima superoksid dismutaze u homogenatima tkiva kolona. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-14 grupom, # $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom - Mann-Whitney U test.



Slika 29. Reprezentativni zimogrami enzima superoksid dismutaze u homogenatima tkiva kolona. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana.



Grafikon 30. Efekti aplikacije homocisteina na koncentraciju malondialdehida u homogenatima tkiva kolona. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - T test za nevezane uzorke.

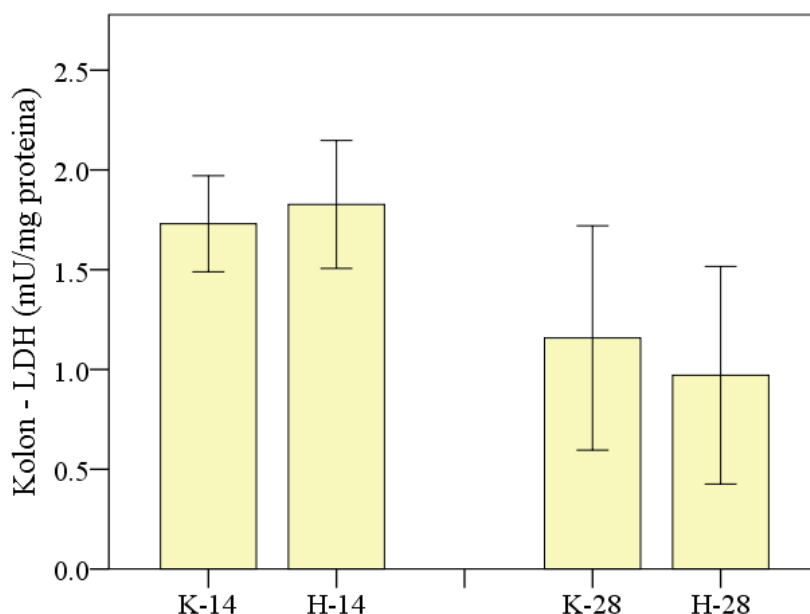
4.1.9.2. Efekti aplikacije homocisteina na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu kolona

Ukupna aktivnost LDH u homogenatima tkiva kolona se nije statistički značajno razlikovala između K-14 ($1,730 \pm 0,241$ mU/mg proteina) i H-14 grupe ($1,827 \pm 0,320$ mU/mg proteina), kao ni između K-28 ($1,158 \pm 0,560$ mU/mg proteina) i H-28 grupe ($0,971 \pm 0,545$ mU/mg proteina) (Grafikon 31).

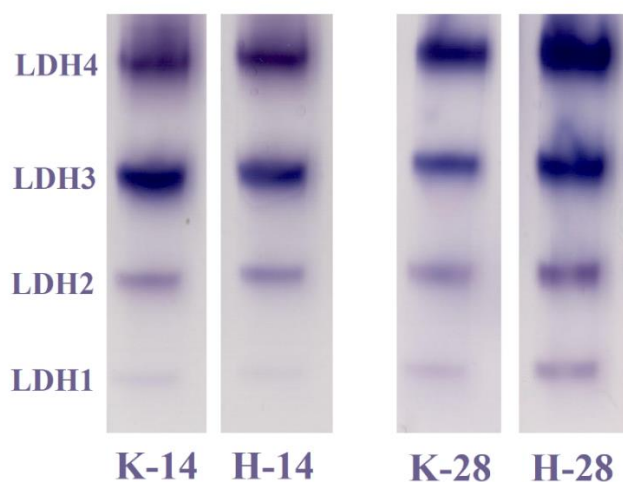
Nativnom gel elektroforezom detektovane su četiri izoforme LDH u homogenatima tkiva srca: LDH1, LDH2, LDH3 i LDH4 (Slika 30). Densitometrijskom analizom izmerena je njihova relativna aktivnost i izražena je procentualno u odnosu na ukupnu aktivnost. Relativne aktivnosti LDH izoformi u grupama su iznosile: K-14 (LDH1 1,0%, LDH2 8,6%, LDH3 48,0%, LDH4 42,4%), H-14 grupe (LDH1 1,5%, LDH2 8,9%, LDH3 40,1%, LDH4 48,5%), K-28 (LDH1 1,2%, LDH2 9,2%, LDH3 51,0%, LDH4 38,6%) i H-28 grupa (LDH1 1,3%, LDH2 11,5%, LDH3 46,2%, LDH4 41,0%). Detektovana je statistički značajna razlika u aktivnosti LDH 3 izoforme između K-14 i H-14 grupe, $p < 0,05$. Grupe K-28 i H-28 nisu međusobno pokazale statistički značajnu razliku u stepenu aktivnosti izoformi LDH (Grafikon 32).

Ukupna aktivnost malat dehidrogenaze u homogenatima tkiva kolona nije pokazala statistički značajnu razliku između K-14 ($6,462$ ($5,686 - 6,866$) mU/mg proteina) i H-14 grupe ($5,908$ ($5,404 - 14,838$) mU/mg proteina). Isto tako, statistički značajna razlika nije postignuta ni između K-28 ($7,089$ ($3,745 - 12,760$) mU/mg proteina) i H-28 grupe ($7,076$ ($3,534 - 11,681$) mU/mg proteina) u vrednostima aktivnosti MDH (Grafikon 33).

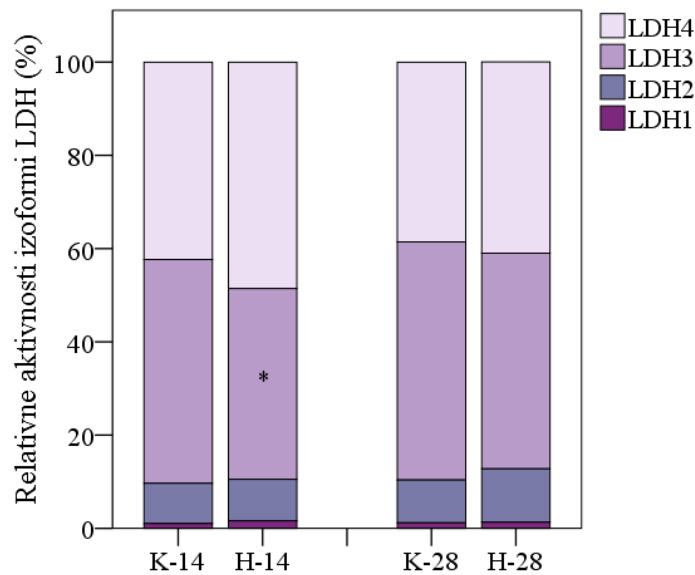
Nativnom gel elektroforezom u homogenatima tkiva kolona detektovana je samo jedna izoforma malat dehidrogenaze - mMDH (Slika 31).



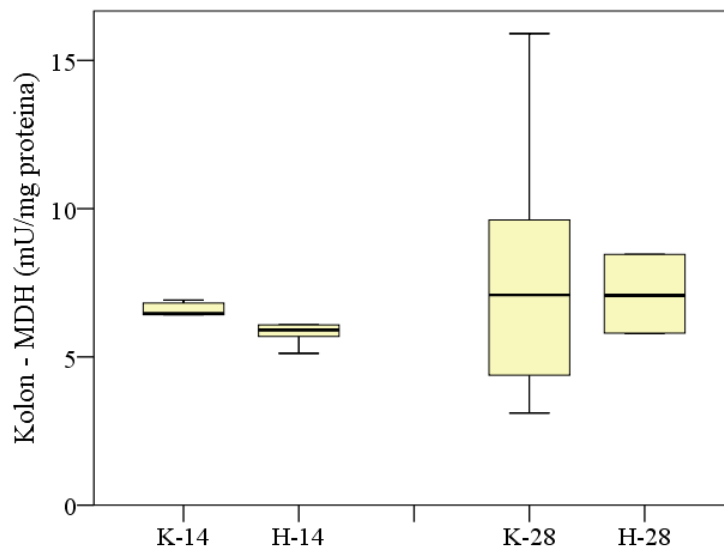
Grafikon 31. Efekti aplikacije homocisteina na ukupnu aktivnost enzima laktat dehidrogenaze u homogenatima tkiva kolona. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana.



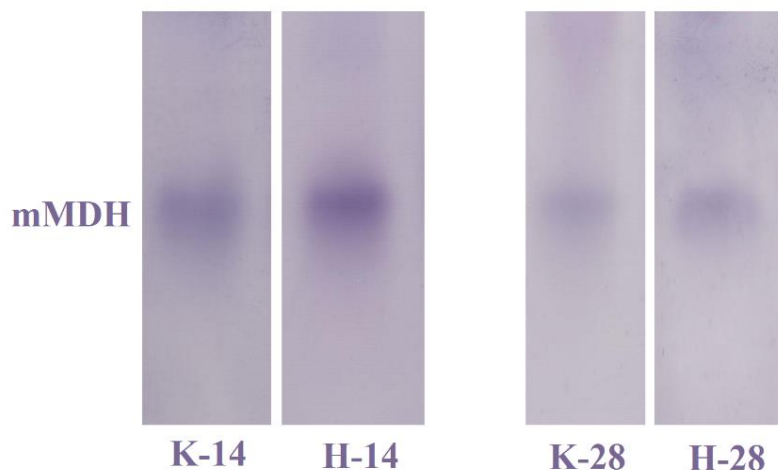
Slika 30. Reprezentativni zimogrami enzima laktat dehidrogenaze u homogenatima tkiva kolona. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana.



Grafikon 32. Efekti aplikacije homocisteina na relativnu aktivnost izoformi enzima laktat dehidrogenaze u homogenatima tkiva kolona - denzitometrijska analiza zimograma. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-14 grupom - T test za nevezane uzorke.



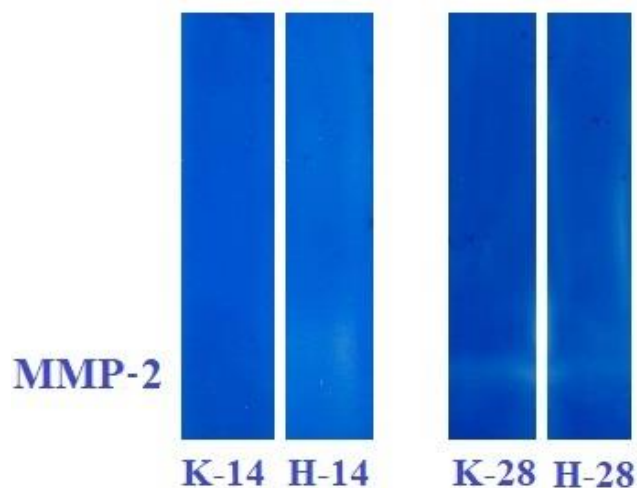
Grafikon 33. Efekti aplikacije homocisteina na ukupnu aktivnost enzima malat dehidrogenaze u homogenatima tkiva kolona. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Mann-Whitney U test.



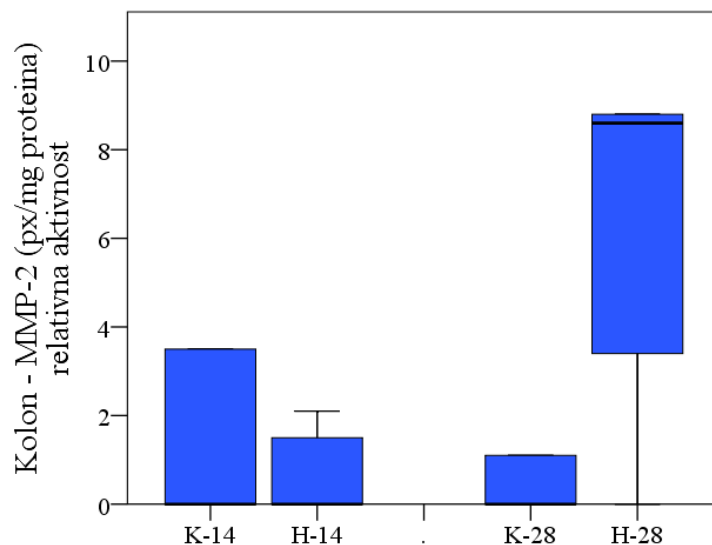
Slika 31. Reprezentativni zimogrami enzima malat dehidrogenaze u homogenatima tkiva kolona. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana.

4.1.9.3. Efekti aplikacije homocisteina na aktivnosti matriks metaloproteinaza u tkivu kolona

SDS-PAGE zimografskom tehnikom u homogenatima tkiva kolona detektovana je samo aktivnost MMP-2 (Slika 32) i to u pojedinim uzorcima (K-14: 2/5, H-14: 2/5, K-28: 2/5, H-28: 4/5). Denzitometrijskom analizom izmerene relativne aktivnosti MMP-2 u tkivu kolona u grupama iznosile su: K-14: 0,0 (0,0 - 10,5) px/mg proteina, H-14: 0,0 (0,0 - 1,8) px/mg proteina, K-28: 0,0 (0,0 - 6,4) px/mg proteina i H-28: 1,7 (8,6 - 14,9) px/mg proteina. Nije detektovana statistički značajna razlika u relativnoj aktivnosti MMP-2 između K-14 i H-14 grupe, kao ni između K-28 i H-28 grupe (Grafikon 34).



Slika 32. Efekti aplikacije homocisteina na ekspresiju matriks metaloproteinaza u tkivu kolona - reprezentativni zimogrami. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana.



Grafikon 34. Efekti aplikacije homocisteina na relativnu aktivnost matriks metaloproteinaze-2 u tkivu kolona. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Mann-Whitney U test.

4.1.10. Efekti aplikacije homocisteina na histološke promene i histomorfometrijske parametre kolona

U svim ispitivanim grupama mikroskopski isecci kolona pokazuju normalnu arhitektoniku, bez znakova za inflamatorne bolesti creva, nisu uočljivi znaci kriptitisa niti kriptni apscesi. U zidu kolona nisu uočljive erozije i ulceracije. Uzroci ne pokazuju tumorske izmene epitela (Slika 33).

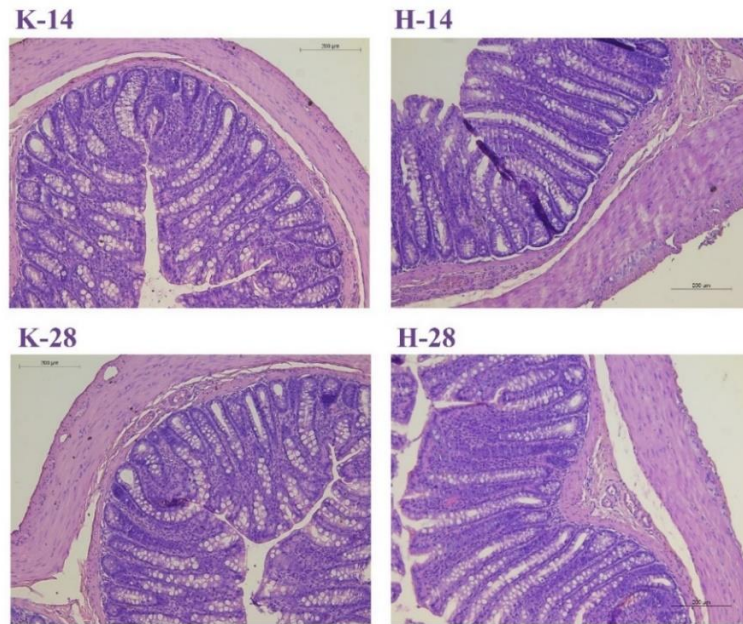
Dubina Liberkinovih kripti pokazuje statistički visoko značajno povišene vrednosti u H-14 grupi ($384,733 \pm 18,485 \mu\text{m}$) u poređenju sa K-14 grupom ($330,919 \pm 16,899 \mu\text{m}$), $p < 0,01$. Isti trend promene primećuje se i u H-28 grupi ($402,866 \pm 10,052 \mu\text{m}$) u odnosu na K-28 grupu ($374,928 \pm 12,409 \mu\text{m}$), $p < 0,01$ (Grafikon 35).

Debljina celokupne tunike mukoze je takođe bila povećana u H-14 grupi ($393,241 \pm 10,512 \mu\text{m}$) u odnosu na K-14 grupu ($341,514 \pm 26,292 \mu\text{m}$), $p < 0,01$, kao i u H-28 grupi ($433,687 \pm 8,172 \mu\text{m}$) u poređenju sa K-28 grupom ($410,385 \pm 3,697 \mu\text{m}$), $p < 0,01$ (Grafikon 36).

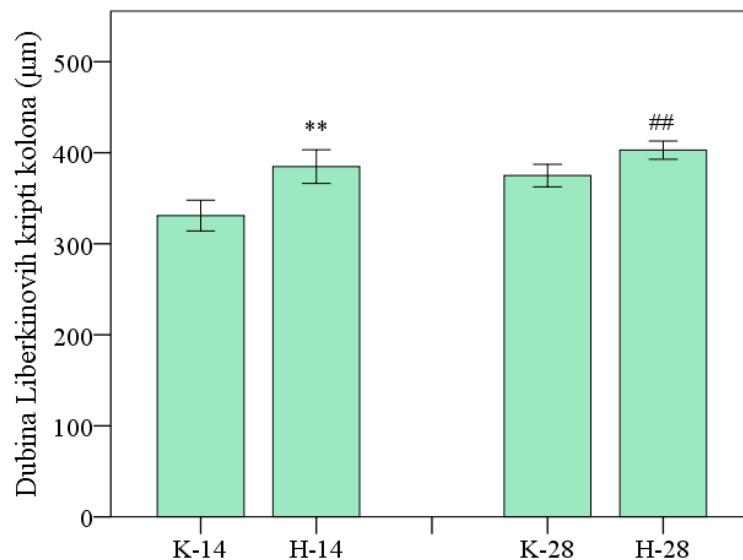
Debljina lamine muskularis mukoze nije pokazala statistički značajnu razliku prilikom poređenja K-14 grupe ($17,831 \pm 1,488 \mu\text{m}$) sa H-14 grupom ($19,544 \pm 2,123 \mu\text{m}$) niti u poređenju K-28 grupe ($20,249 \pm 1,066 \mu\text{m}$) sa H-28 grupom ($20,375 \pm 1,214 \mu\text{m}$) (Grafikon 37).

Ukupna debljina zida kolona se nije statistički značajno razlikovala između K-14 ($741,904 (710,377 - 775,496) \mu\text{m}$) i H-14 grupe ($777,393 (752,564 - 805,560) \mu\text{m}$), kao ni između K-28 ($773,601 (770,357 - 850,423) \mu\text{m}$) i H-28 grupe ($797,841 (778,022 - 850,423) \mu\text{m}$) (Grafikon 38).

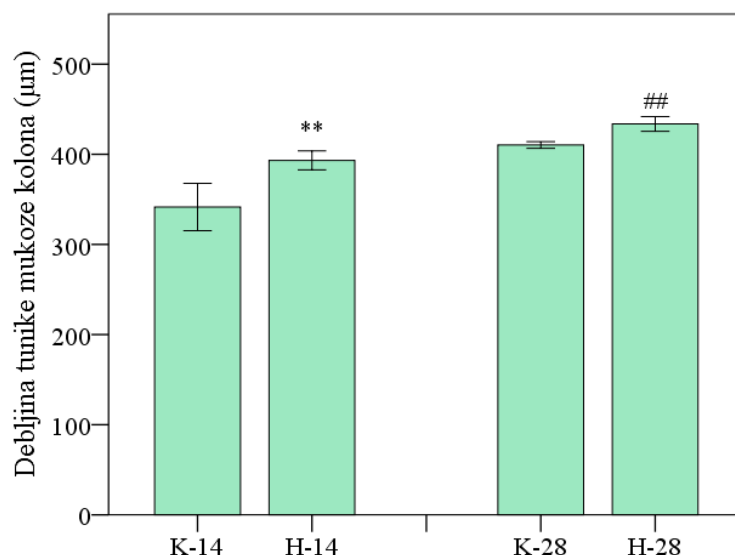
Broj ćelija u lamini propriji preračunat na površinu od $0,1 \text{ mm}^2$ je statistički visoko značajno veći u H-14 grupi (1251 ± 59 ćelija na $0,1 \text{ mm}^2$) u odnosu na K-14 grupu (1007 ± 69 ćelija na $0,1 \text{ mm}^2$), $p < 0,01$. Isti trend se primećuje i u H-28 grupi (1161 ± 76 ćelija na $0,1 \text{ mm}^2$) u odnosu na K-28 grupu (977 ± 78 ćelija na $0,1 \text{ mm}^2$), $p < 0,01$ (Grafikon 39).



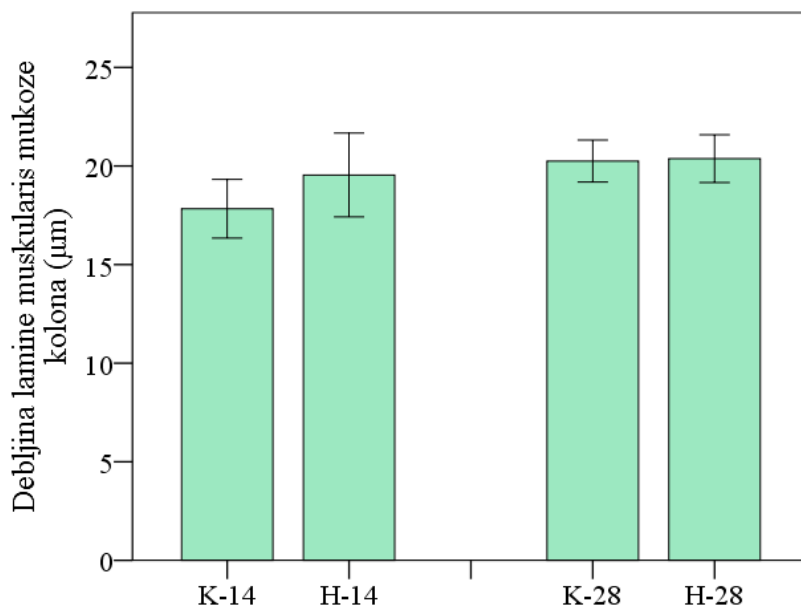
Slika 33. Poprečni presek kolona - hematoksilin/eozin bojenje, uveličanje x100. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana.



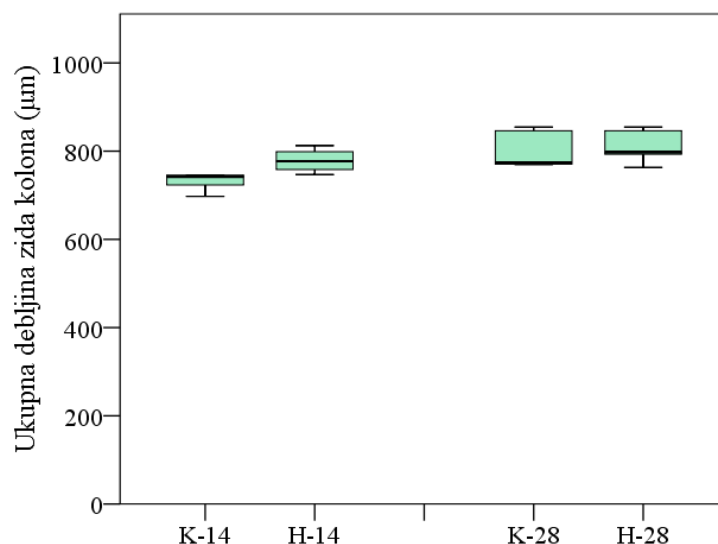
Grafikon 35. Efekti aplikacije homocisteina na dubinu Liberkinovih kripti kolona. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-14 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom - T test za nezavise uzorke.



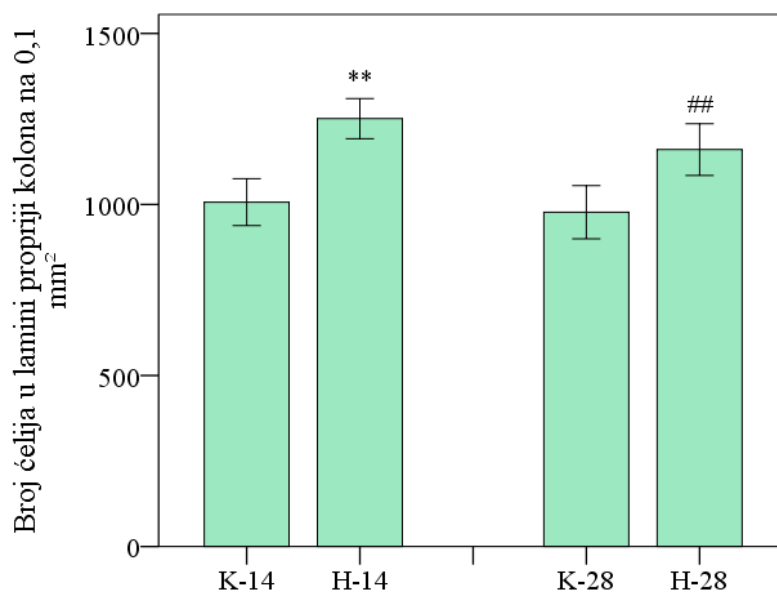
Grafikon 36. Efekti aplikacije homocisteina na debljinu tunike mukoze kolona. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-14 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom - T test za nevezane uzorke.



Grafikon 37. Efekti aplikacije homocisteina na debljinu lamine muskularis mukoze kolona. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - T test za nevezane uzorke.



Grafikon 38. Efekti aplikacije homocisteina na ukupnu debljinu zida kolona. K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Mann-Whitney U test.

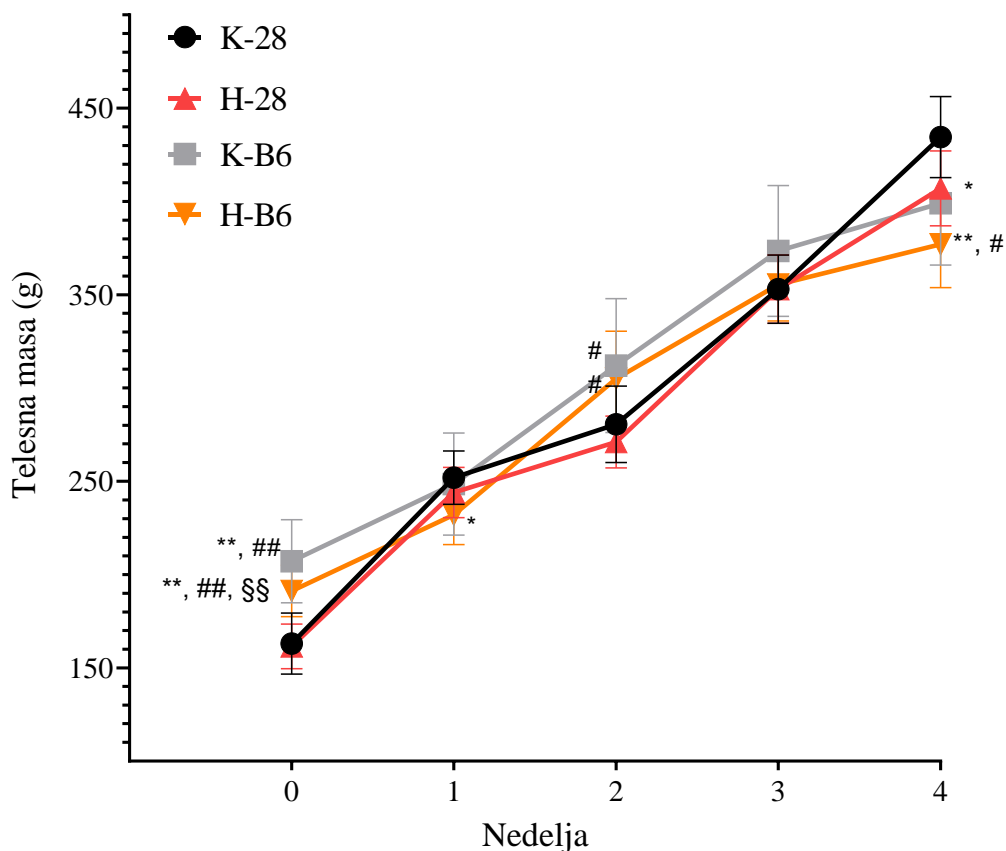


Grafikon 39. Efekti aplikacije homocisteina na broj ćelija u lamini propriji kolona na 0,1 mm². K-14: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana, H-14: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana, K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana. ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-14 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom - T test za nevezane uzorke.

4.2. Efekti aplikacije vitamina B6 u uslovima eksperimentalno izazvane hiperhomocisteinemije

4.2.1. Efekti aplikacije vitamina B6 na telesnu masu eksperimentalnih životinja

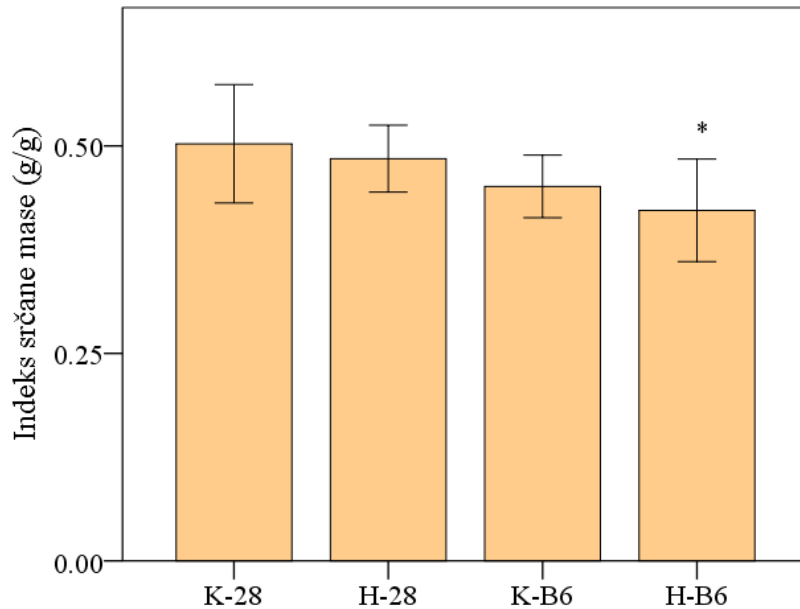
Nakon prve nedelje eksperimenta mase životinja u H-B6 grupi bile su statistički značajno niže u odnosu na kontrolnu grupu K-28, $p < 0,05$. U drugoj nedelji eksperimenta obe grupe tretirane vitaminom B6, pokazuju statistički značajno više vrednosti telesnih masa u poređenju sa H-28 grupom, $p < 0,05$. U poslednjoj nedelji eksperimenta, obe grupe tretirane homocisteinom imaju značajno niže telesne mase životinja u poređenju sa K-28 grupom ($p < 0,05$ poređeno sa H-28 i $p < 0,01$ poređeno sa H-B6). Grupe tretirane Hcy se takođe i međusobno statistički značajno razlikuju u vrednostima mase životinja na kraju eksperimenta, sa nižim vrednostima u H-B6 grupi u odnosu na H-28 grupu, $p < 0,05$ (Grafikon 40).



Grafikon 40. Efekti aplikacije vitamina B6 na telesnu masu eksperimentalnih životinja kroz nedelje eksperimentalnog protokola. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom, # $p < 0,05$ u poređenju sa H-28 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa H-28 grupom, §§ $p < 0,01$ u poređenju sa K-B6 grupom - Šidakov post hoc test.

4.2.2. Efekti aplikacije vitamina B6 na indeks srčane mase

Vrednost ISM je statistički značajno niža u H-B6 grupi ($0,422 \pm 0,062$ g/g) u poređenju sa K-28 grupom, $p < 0,05$. Vrednost ISM u K-B6 grupi ($0,451 \pm 0,038$ g/g) se nije statistički značajno razlikovala u odnosu na ostale grupe (Grafikon 41).

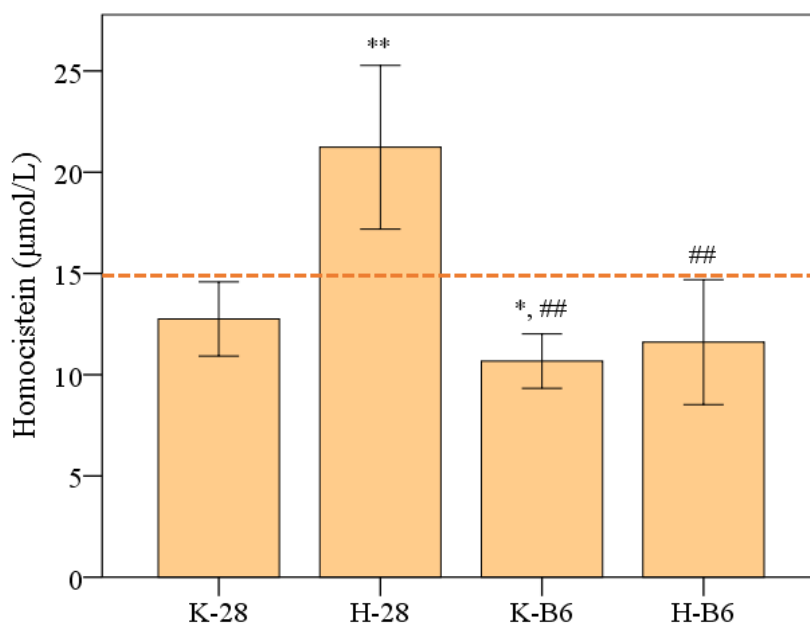


Grafikon 41. Efekti aplikacije vitamina B6 na indeks srčane mase. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.

4.2.3. Efekti aplikacije vitamina B6 na biohemijske parametre u serumu i plazmi

4.2.3.1 Efekti aplikacije vitamina B6 na koncentraciju homocisteina u serumu

Koncentracija Hcy u serumu na kraju eksperimenta u grupi koja je tretirana homocisteinom i vitaminom B6 ima vrednosti niže od 15 μ mol/L (H-B6: $11,6 \pm 3,1$ μ mol/L). Drugim rečima, i pored potkožnog davanja Hcy životinjama u toku 2 nedelje, usled paralelne i.p. aplikacije vitamina B6, hiperhomocisteinemija nije postignuta. Izmerene vrednosti Hcy u H-B6 grupi su statistički visoko značajno niže u poređenju sa H-28 grupom ($21,2 \pm 4,0$ μ mol/L), $p < 0,01$. Vrednosti Hcy u serumu u K-B6 grupi ($10,7 \pm 1,3$ μ mol/L) su očekivano značajno niže u odnosu na H-28 grupu, $p < 0,01$, ali takođe i u odnosu na K-28 grupu ($12,7 \pm 1,8$ μ mol/L), $p < 0,05$ (Grafikon 42).



Grafikon 42. Efekti aplikacije vitamina B6 na serumsku koncentraciju homocisteina. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom; ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom; ## $p < 0,01$ u poređenju sa H-28 grupom - Welch ANOVA test sa Games-Howell post hoc testom.

4.2.3.2. Efekti aplikacije vitamina B6 na kardiovaskularne i hemostatske biomarkere u serumu i plazmi

Statistički značajna razlika u izmerenim vrednostima kardiovaskularnih biomarkera primećena je jedino u koncentraciji vitamina B12 čije su vrednosti bile visoko značajno niže u K-B6 ($417,2 \pm 59,2$ pg/mL), $p < 0,01$ i H-B6 grupi ($391,9 \pm 55,4$ pg/mL), $p < 0,01$ u poređenju sa H-28 grupom ($627,2 \pm 81,3$ pg/mL) (Tabela 3).

Tabela 3. Efekti aplikacije vitamina B6 kardiovaskularne i hemostatske biomarkere u serumu i plazmi

Parametar	K-28	H-28	K-B6	H-B6
Hcy (μmol/L)a, s	12,7 ± 1,8	21,2 ± 4,0 **	10,7 ± 1,3 *, ##	11,6 ± 3,0 ##
HOL (mmol/L)b, s	1,76 (1,54 - 1,93)	1,81 (1,58 - 2,00)	2,16 (1,70 - 2,21)	1,85 (1,76 - 2,01)
HDL (mmol/L)b, s	1,25 (1,12 - 1,40)	1,29 (1,15 - 1,42)	1,52 (1,20 - 1,64)	1,39 (1,31 - 1,45)
LDL (mmol/L)c, s	0,16 ± 0,09	0,26 ± 0,10	0,199 ± 0,121	0,219 ± 0,096
TG (mmol/L)c, s	0,77 ± 0,17	0,57 ± 0,10	0,754 ± 0,218	0,628 ± 0,218
LDH (U/L)c, s	3546 ± 1305	3323 ± 666	2971 ± 732	2728 ± 708
hs-TnT (ng/L)b, s	22,0 (16,0 - 53,0)	21,5 (13,7 - 39,2)	15,0 (13,7 - 20,5)	16,5 (14,7 - 22,0)
Vitamin B12 (pg/mL)c, s	460,2 ± 50,0	627,2 ± 81,3 **	417,2 ± 59,2 ##	391,9 ± 55,4 ##
Folat (ng/mL)b, s	19,2 (19,0 - 20,0)	20,0 (20,0 - 20,0)	20,0 (19,2 - 20,0)	19,3 (18,9 - 20,0)
Fibrinogen (g/L)b, p	1,8 (1,6 - 2,3)	1,8 (1,6 - 1,9)	2,0 (1,8 - 2,6)	1,7 (1,6 - 2,3)
D-dimer (mg/L)b, p	0,17 (0,17 - 0,17)	0,17 (0,17 - 0,17)	0,17 (0,17 - 0,84)	0,17 (0,17 - 0,35)
vWF (%) b, p	155,0 (122,2 - 167,5)	151,0 (144,5 - 166,5)	78,0 (29,0 - 157,0)	155,0 (16,5 - 189,0)

Hcy - homocistein, HOL - ukupni kolesterol, HDL - lipoprotein visoke gustine, LDL - lipoprotein niske gustine, TG - trigliceridi, LDH - laktat dehidrogenaza, hs-TnT - visoko senzitivni troponin T, vWF - vonWillebrand-ov faktor, s - vrednost merena u serumu, p - vrednost merena u plazmi. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 μmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. a - * p < 0,05 u poređenju sa K-28 grupom, ** p < 0,01 u poređenju sa K-28 grupom, ## p < 0,01 u poređenju sa H-28 grupom - Welch ANOVA test sa Games-Howell post hoc testom, b - p > 0,05 - Kruskal-Wallis test, c - ** p < 0,01 u poređenju sa K-28 grupom, ## p < 0,01 u poređenju sa H-28 grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.

4.2.3.3. Efekti aplikacije vitamina B6 na hepato-renalno-pankreatične biomarkere u serumu

Koncentracija glukoze je bila statistički značajno viša u K-B6 grupi (6,27 ± 7,17 mmol/L), p < 0,01 i H-B6 grupi (6,83 ± 0,70 mmol/L), p < 0,01 u odnosu na K-28 grupu (5,20 ± 0,68 mmol/L). U H-B6 grupi koncentracija glukoze je takođe visoko značajno viša i u odnosu na H-28 grupu (5,76 ± 0,55 mmol/L), p < 0,01. Koncentracija ukupnih proteina bila je statistički značajno viša u grupama tretiranim vitaminom B6, K-B6: 64,1 ± 2,1 g/L, p < 0,01 i H-B6: 64,2 ± 2,4 g/L, p < 0,05 u odnosu na H-28 grupu. Takođe izmerene koncentracije albumina imale su više vrednosti u H-28 grupi (48,0 (45,7 - 49,5) g/L) u odnosu na K-B6 (44,0 (43,0 - 44,7) g/L), p < 0,01 i H-B6 grupu (43,0 (42,5 - 44,0) g/L), p < 0,01. Aktivnost AST u serumu je bila statistički značajno niža u H-B6 grupi (176 (166 - 181) U/L) u poređenju sa K-28 (227 (186 - 244) U/L), p < 0,01 i H-28 grupom (223 (181 - 241)), p < 0,05. Koncentracija kreatinina je bila značajno niža u obe grupe tretirane vitaminom B6 (K-B6: 31,5 (30,2 - 33,7) μmol /L, p < 0,01 i H-B6: 31,0 (30,0 - 32,0) μmol /L, p < 0,01) u odnosu na H-28 grupu (41,0 (37,2 - 44,0) μmol /L). Koncentracija mokraćne kiseline u serumu je bila statistički značajno niža u H-B6 grupi (70,2 ± 14,2 μmol /L) u odnosu na K-28 grupu (86,2 ± 12,7 μmol /L), p < 0,05. Izmerene vrednosti aktivnosti amilaze u serumu bile su značajno niže u H-B6 grupi (2908 (2773 - 3174) U/mL) u poređenju sa H-28 grupom (3499 (3334 - 4203) U/mL), p < 0,05 (Tabela 4).

Tabela 4. Efekti aplikacije vitamina B6 hepato-renalno-pankreatične biomarkere u serumu

Parametar	K-28	H-28	K-B6	H-B6
Glukoza (mmol/L) ^a	5,20 ± 0,68	5,76 ± 0,55	6,27 ± 7,17 **	6,83 ± 0,70 **, ##
Ukupni proteini (g/L) ^a	63,7 ± 3,1	68,2 ± 3,1 **	64,1 ± 2,1 ##	64,2 ± 2,4 #
Albumin (g/L) ^b	44,0 (42,7 - 45,2)	48,0 (45,7 - 49,5) *	44,0 (43,0 - 44,7) ##	43,0 (42,5 - 44,0) ##
AST (U/L) ^b	227 (186 - 244)	223 (181 - 241)	197 (189 - 208)	176 (166 - 181) **, #
ALT (U/L) ^a	65,2 ± 13,7	62,9 ± 9,2	59,4 ± 10,4	61,4 ± 9,0
Urea (mmol/L) ^a	7,2 ± 1,2	8,3 ± 1,1	7,4 ± 0,7	7,4 ± 0,9
Kreatinin (μmol/L) ^b	35,0 (34,0 - 35,7)	41,0 (37,2 - 44,0)	31,5 (30,2 - 33,7) ##	31,0 (30,0 - 32,0) ##
Mokraćna kiselina (μmol/mL) ^a	86,2 ± 12,7	79,0 ± 12,1	83,6 ± 12,1	70,2 ± 14,2 *
Amilaza (U/mL) ^b	3471 (2912 - 3671)	3499 (3334 - 4203)	3348 (2829 - 4369)	2908 (2773 - 3174) #
CRP < 0,06 mg/L	10 (100 %)	10 (100 %)	10 (100 %)	10 (100 %)

AST - aspartat aminotransferaza, ALT - alanin aminotransferaza, CRP - C reaktivni protein. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 μmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. a - * p < 0,05 u poređenju sa K-28 grupom, ** p < 0,01 u poređenju sa K-28 grupom, # p < 0,05 u poređenju sa H-28 grupom, ## p < 0,01 u poređenju sa H-28 grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom. b - * p < 0,05 u poređenju sa K-28 grupom, ** p < 0,01 u poređenju sa K-28 grupom, # p < 0,05 u poređenju sa H-28 grupom, ## p < 0,01 u poređenju sa H-28 grupom - Kruskal-Wallis test sa Dunn post hoc testom.

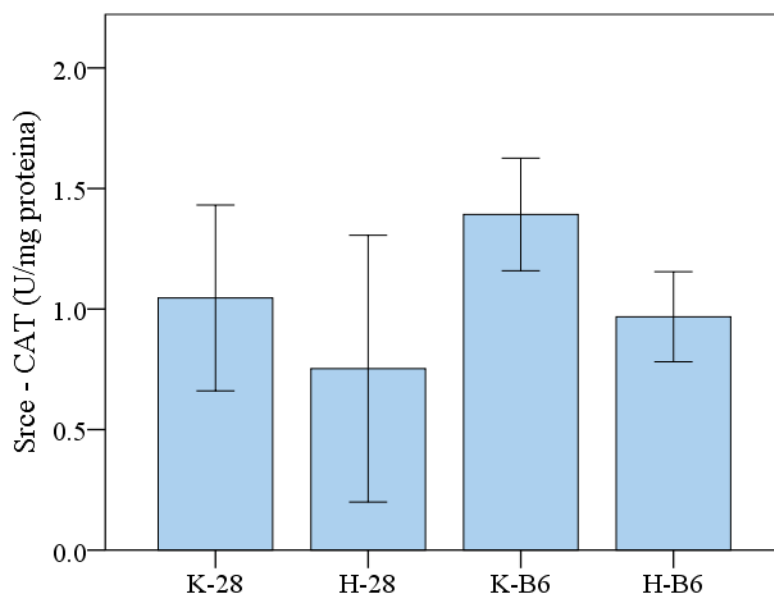
4.2.4. Efekti aplikacije vitamina B6 na biohemijske parametre u tkivu srca

4.2.4.1. Efekti aplikacije vitamina B6 na parametre oksidativnog stresa u tkivu srca

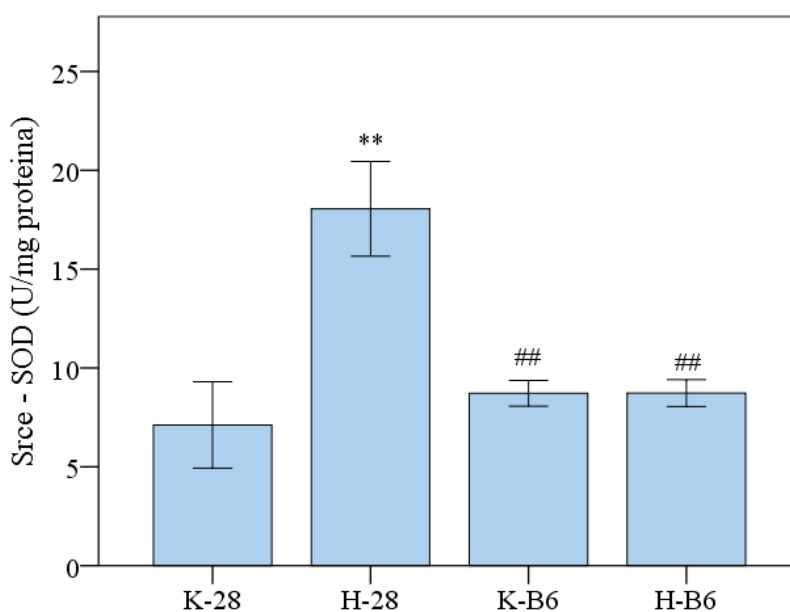
Aktivnost katalaze u homogenatima tkiva srca nije pokazala statistički značajnu razliku usled tretmana vitaminom B6 u odnosu na K-28 i H-28 grupu (Grafikon 43).

Međutim u grupama tretiranim vitaminom B6 aktivnost SOD u homogenatima tkiva srca (K-B6: 8,720 ± 0,652 U/mg proteina, p < 0,01 i H-B6- 8,731 ± 0,680 U/mg proteina) pokazuje vrednosti približne vrednostima u kontrolnoj grupi, a statistički značajno niže u odnosu na H-28 grupu (18,052 ± 2,398 U/mg proteina) (Grafikon 44).

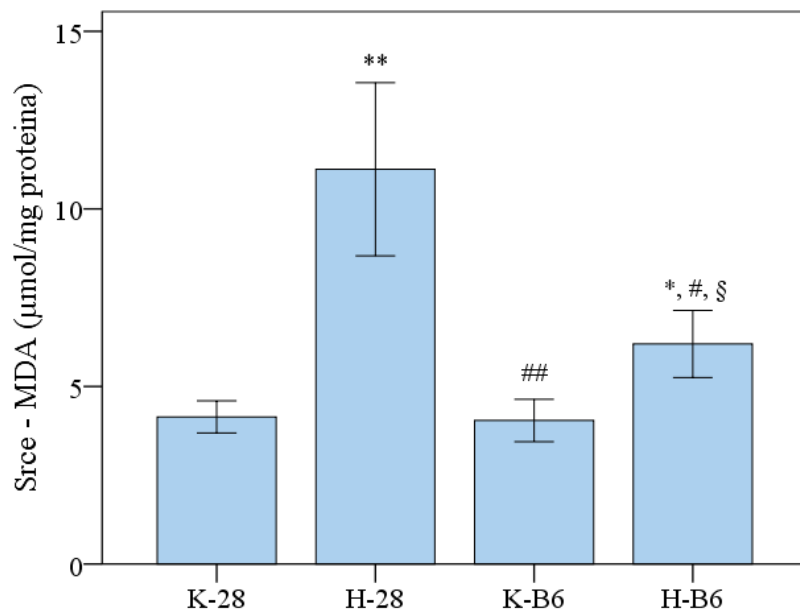
Koncentracija MDA u homogenatima tkiva srca u H-B6 grupi (6,196 ± 0,944 μmol/mg proteina) pokazuje statistički značajno niže vrednosti u poređenju sa H-28 grupom (11,116 ± 2,437 μmol/mg proteina), p < 0,05. Iako su vrednosti koncentracije MDA u srcu u H-B6 bile značajno niže u odnosu na H-28 grupu, ipak njihova vrednost je viša u poređenju sa obe kontrolne grupe (K-28: 4,143 ± 0,454 μmol/mg proteina, p < 0,05 i K-B6: 4,042 ± 0,597 μmol/mg proteina, p < 0,05) (Grafikon 45).



Grafikon 43. Efekti aplikacije vitamina B6 na aktivnost katalaze u homogenatima tkiva srca. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.



Grafikon 44. Efekti aplikacije vitamina B6 na aktivnost superoksid dismutaze u homogenatima tkiva srca. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa H-28 grupom - One-way ANOVA test.

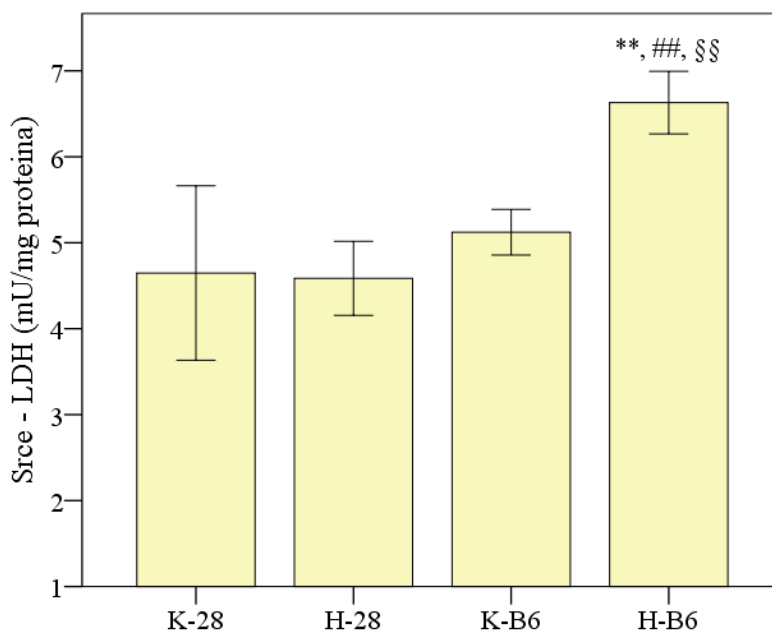


Grafikon 45. Efekti aplikacije vitamina B6 na koncentracija malondialdehida u homogenatima tkiva srca. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 μmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. * p < 0,05 u poređenju sa K-28 grupom, ** p < 0,01 u poređenju sa K-28 grupom, # p < 0,05 u poređenju sa H-28 grupom ## p < 0,01 u poređenju sa H-28 grupom, § p < 0,05 u poređenju sa K-B6 grupom - Welch ANOVA test sa Games-Howell post hoc testom.

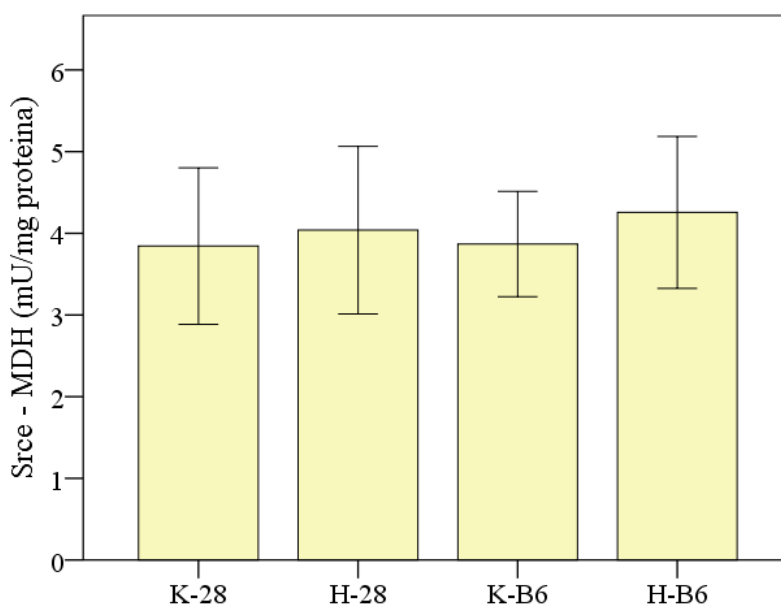
4.2.4.2. Efekti aplikacije vitamina B6 na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu srca

Aktivnost LDH u homogenatima tkiva srca u H-B6 grupi ($6,630 \pm 0,364$ mU/mg proteina) je statistički visoko značajna u poređenju sa H-28 grupom ($4,585 \pm 0,430$ mU/mg proteina, p < 0,01) i kontrolnim grupama K-28 ($4,648 \pm 1,105$ mU/mg proteina), p < 0,01 i K-B6 ($5,123 \pm 0,266$ mU/mg proteina), p < 0,01 (Grafikon 46).

Aktivnost MDH u homogenatima tkiva srca nije, usled tretmana vitaminom B6, pokazala statistički značajnu razliku među ispitivanim grupama (Grafikon 47).



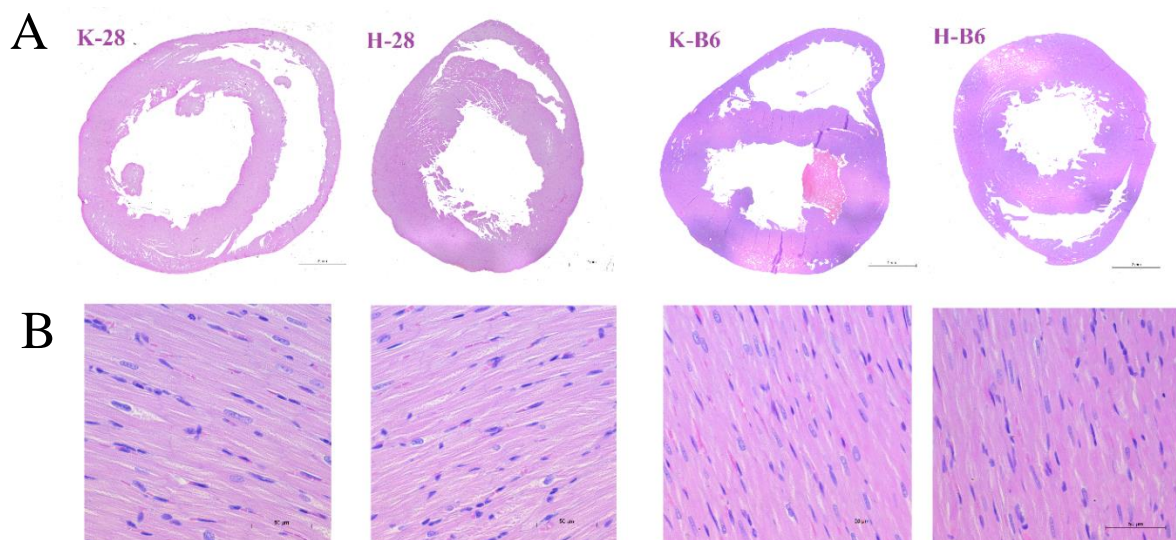
Grafikon 46. Efekti aplikacije vitamina B6 na aktivnost laktat dehidrogenaze u homogenatima tkiva srca. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. ** p < 0,01 u poređenju sa K-28 grupom, ## p < 0,01 u poređenju sa H-28 grupom, §§ p < 0,01 u poređenju sa K-B6 grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.



Grafikon 47. Efekti aplikacije vitamina B6 na aktivnost malat dehidrogenaze u homogenatima tkiva srca. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. p > 0,05 - One-way ANOVA test.

4.2.5. Efekti aplikacije vitamina B6 na histološke promene i histomorfometrijske parametre srca

Na slici 34 prikazane su reprezentativne fotomikrografije uzoraka tkiva srca na malom i velikom uveličanju (Slika 34). U svim ispitivanim grupama primećuje se pravilan raspored vlakna miokarda, a kardiomiociti su zadržali fiziološku morfologiju, nisu uočena polja nekroze niti zone proliferacije vezivnog tkiva.



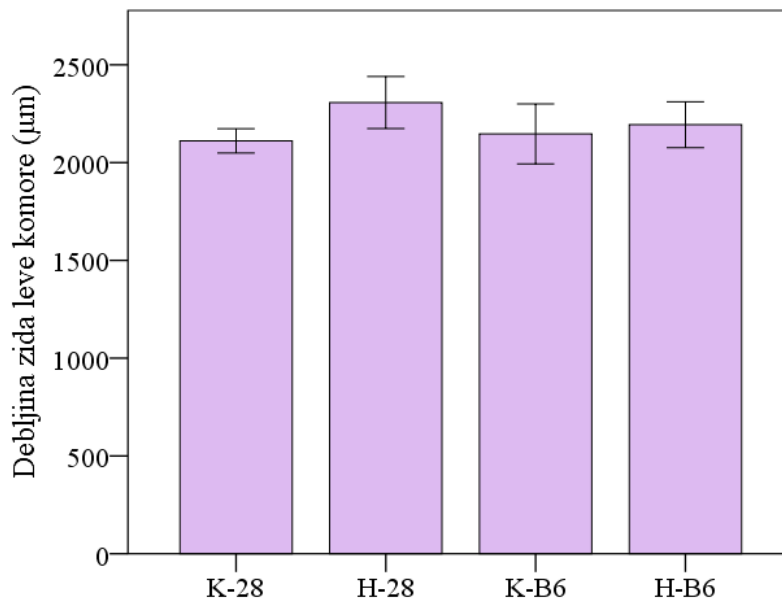
Slika 34. Poprečni presek srca - hematoksilin/eozin bojenje (A: uveličanje x50, B: uveličanje x400). K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana.

Debljina zida leve komore nije pokazala statistički značajnu promenu usled tretmana vitaminom B6 (K-B6: $2146,559 \pm 153,176 \mu\text{m}$, H-B6: $2193,774 \pm 117,271 \mu\text{m}$) u poređenju sa H-28 ($2307,074 \pm 133,123 \mu\text{m}$) i K-28 grupom ($2110,814 \pm 62,286 \mu\text{m}$) (Grafikon 47).

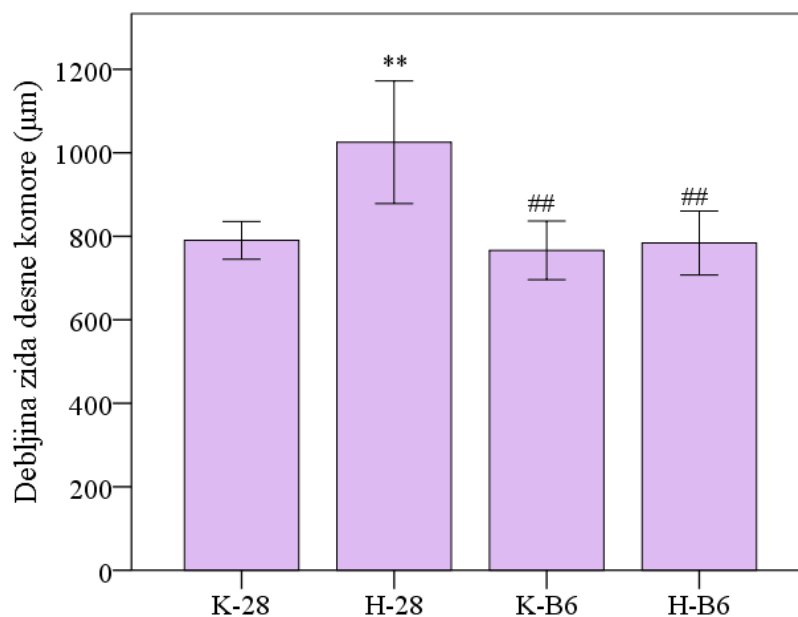
U H-B6 grupi uočava se statistički značajno smanjenje debljine zida desne komore ($766,221 \pm 70,250 \mu\text{m}$) u odnosu na H-28 grupu ($1025,389 \pm 146,921 \mu\text{m}$). H-B6 grupa se nije statistički značajno razlikovala u debljini zida desne komore u odnosu na obe kontrolne grupe K-28 ($790,223 \pm 45,292 \mu\text{m}$) i K-B6 ($766,221 \pm 70,250 \mu\text{m}$) (Grafikon 48).

Debljina interventrikularnog septuma u H-B6 grupi ($1574,035$ ($1460,828 - 1594,046$) μm), je bila približna vrednostima u kontrolnim grupama K-28 ($1632,364$ ($1537,572 - 1772,182$) μm) i K-B6 ($1623,487$ ($1472,669 - 1743,128$) μm), niža u odnosu na H-28 grupu ($2067,526$ ($1752,482 - 2144,291$) μm), ali bez dostizanja statistički značajne razlike (Grafikon 45) (Grafikon 49).

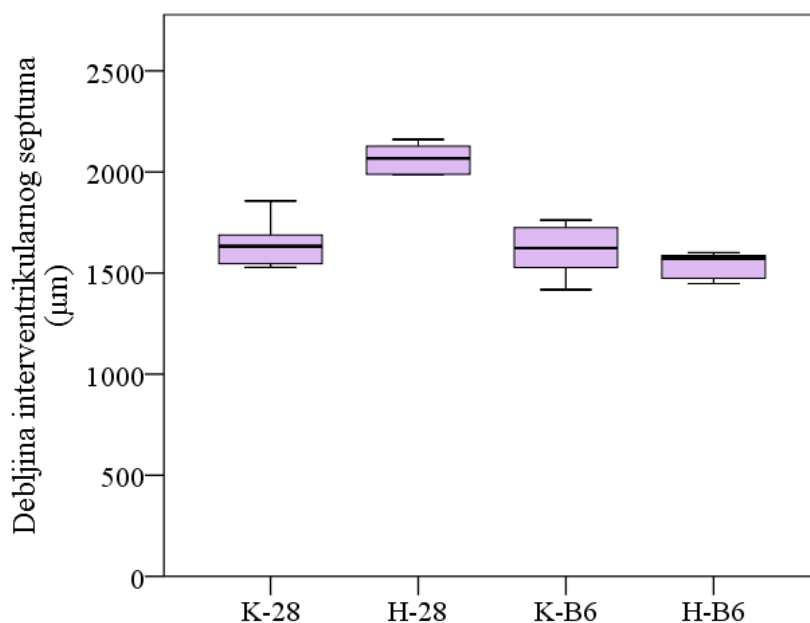
Sličan trend među grupama primećuje se i u vrednostima transverzalnog dijametra kardiomiocita (Grafikon 46). U grupama tretiranim vitaminom B6 (K-B6: $19,477$ ($18,804 - 21,984$) μm , H-B6: $19,639$ ($19,116 - 21,455$) μm) transverzalni dijametar kardiomiocita ne dostiže statistički značajnu razliku u odnosu na K-28 ($19,328$ ($18,169 - 20,963$) μm) i H-28 grupu ($22,328$ ($20,310 - 22,622$) μm) (Grafikon 50).



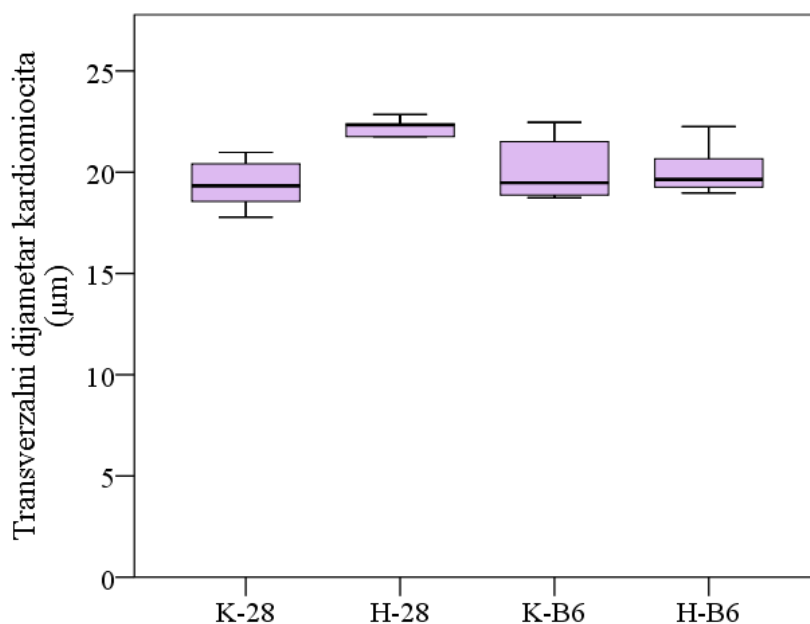
Grafikon 47. Efekti aplikacije vitamina B6 na debljinu zida leve komore. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.



Grafikon 48. Efekti aplikacije vitamina B6 na debljinu zida desne komore. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa H-28 grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.



Grafikon 49. Efekti aplikacije vitamina B6 na debljinu interventrikularnog septuma. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Kruskal-Wallis test.



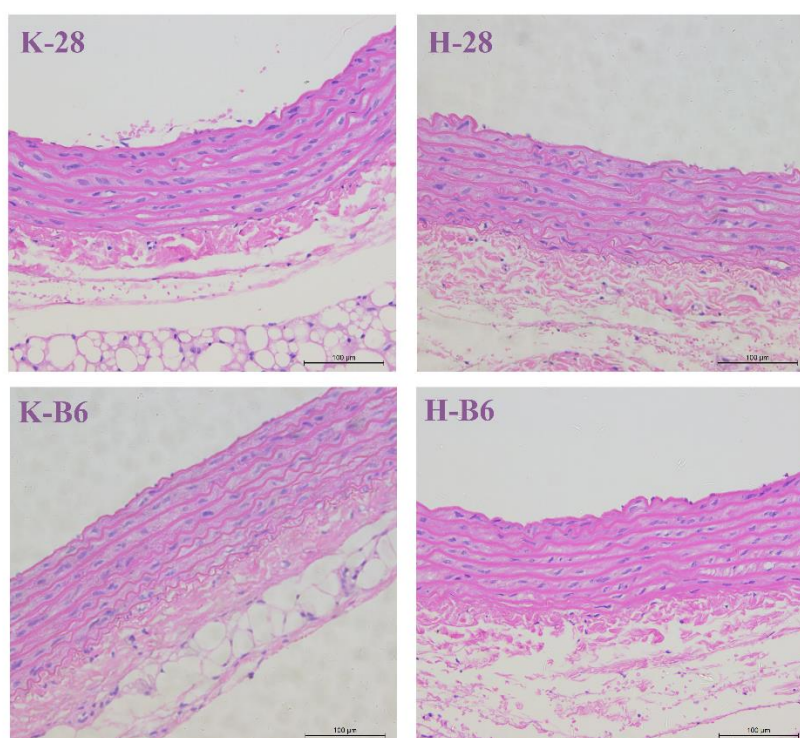
Grafikon 50. Efekti aplikacije vitamina B6 na transverzalni dijamer kardiomociocita. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Kruskal-Wallis test.

4.2.6. Efekti aplikacije vitamina B6 na histološke promene i histomorfometrijske parametre aorte

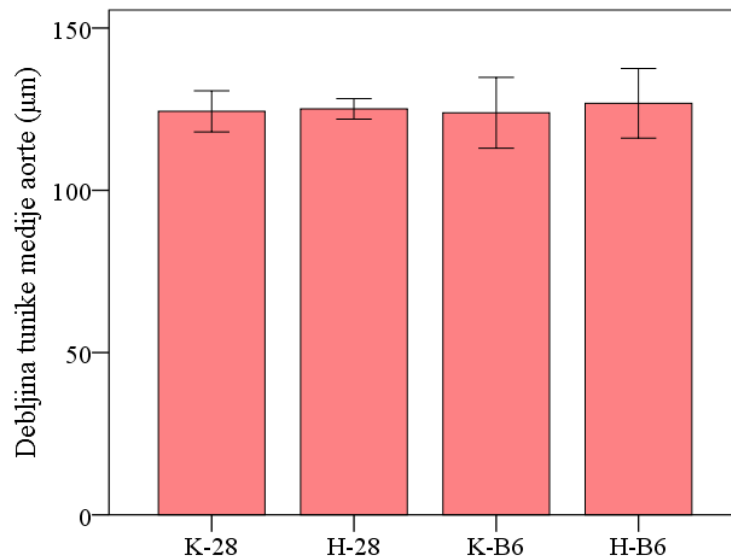
Histomorfometrijska analiza pokazuje da se ne uočava statistički značajna razlika u debljini tunike medije aorte usled tretmana vitaminom B6 (K-B6: $123,882 \pm 10,922 \mu\text{m}$, H-B6: $126,800 \pm 10,723 \mu\text{m}$) u odnosu na K-28 ($124,327 \pm 6,324 \mu\text{m}$) i H-28 grupu ($125,077 \pm 3,165 \mu\text{m}$) (Grafikon 51).

Takođe, rastojanje između elastičnih lamina se ne razlikuje statistički značajno između grupa tretiranih vitaminom B6 (K-B6: $10,895 \pm 1,109 \mu\text{m}$, H-B6: $11,134 \pm 0,905 \mu\text{m}$) u odnosu na K-28 ($10,170 \pm 1,518 \mu\text{m}$) i H-28 grupu ($10,566 \pm 0,661 \mu\text{m}$) (Grafikon 52)

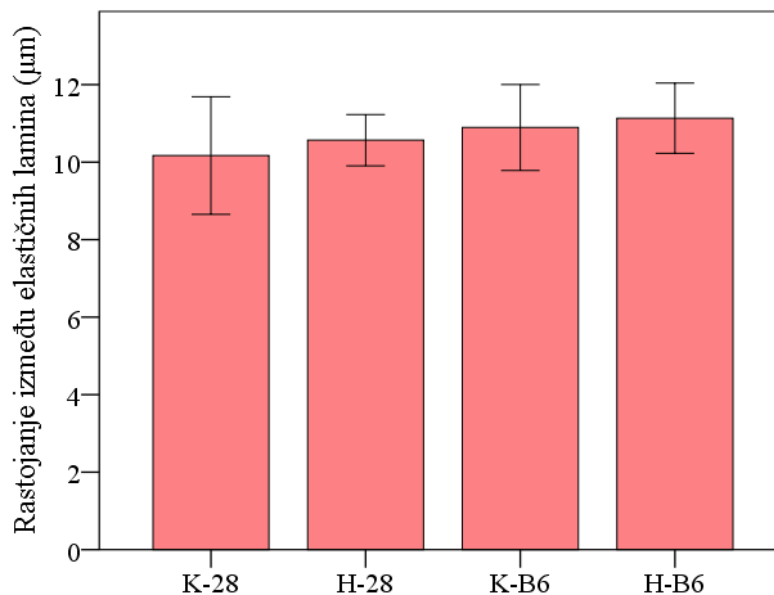
Isto tako, broj elastičnih lamina u zidu aorte se ne razlikuje statistički značajno u grupama tretiranim vitaminom B6 (K-B6: 10(9-10) EL, H-B6 10 (9-11) EL) u poređenju sa K-28 (10 (9-11) EL) i H-28 grupom (10 (9-11) EL) (Grafikon 53).



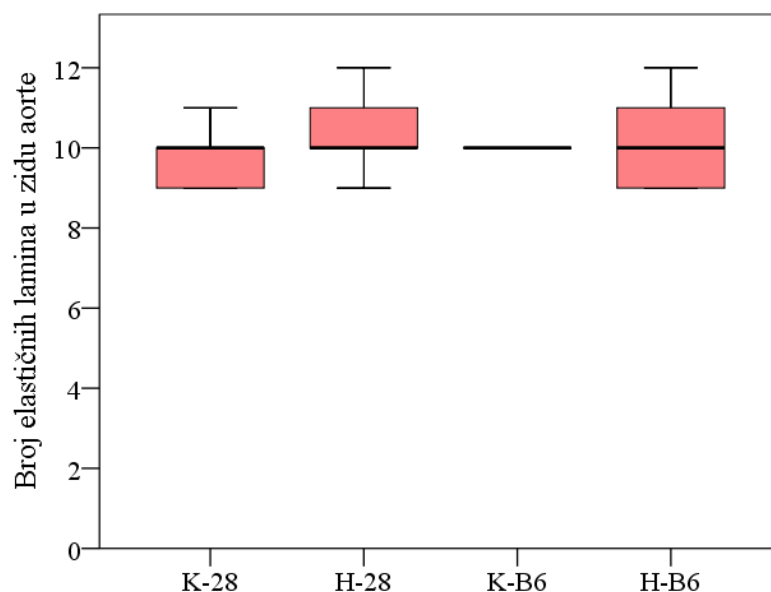
Slika 35. Poprečni presek aorte, hematoksilin/eozin bojenje, uveličanje x200. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana.



Grafikon 51. Efekti aplikacije vitamina B6 na debljinu tunike medije aorte. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.



Grafikon 52. Efekti aplikacije vitamina B6 na rastojanje između elastičnih lamina u zidu aorte. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.



Grafikon 53. Efekti aplikacije vitamina B6 na broj elastičnih lamina u zidu aorte. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Kruskal-Wallis test.

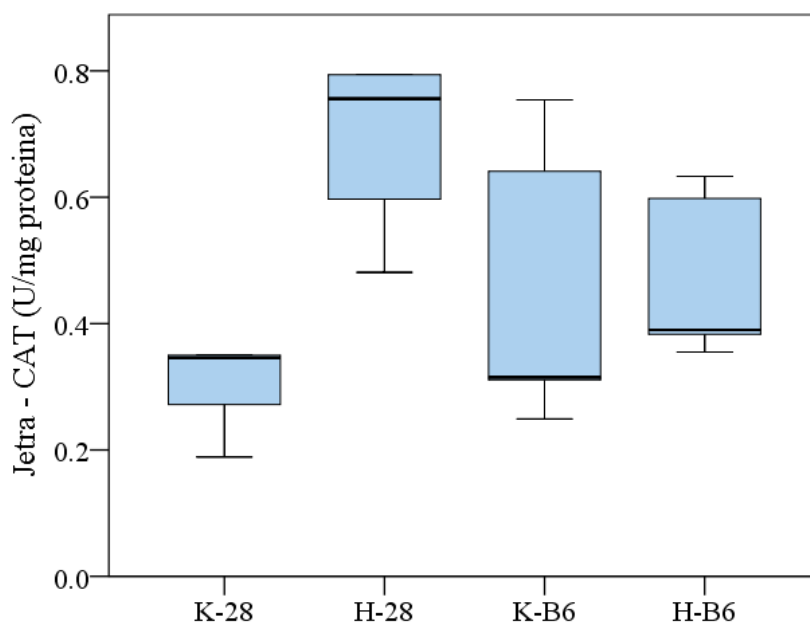
4.2.7. Efekti aplikacije vitamina B6 na biohemijske parametre u tkivu jetre

4.2.7.1. Efekti aplikacije vitamina B6 na parametre oksidativnog stresa u tkivu jetre

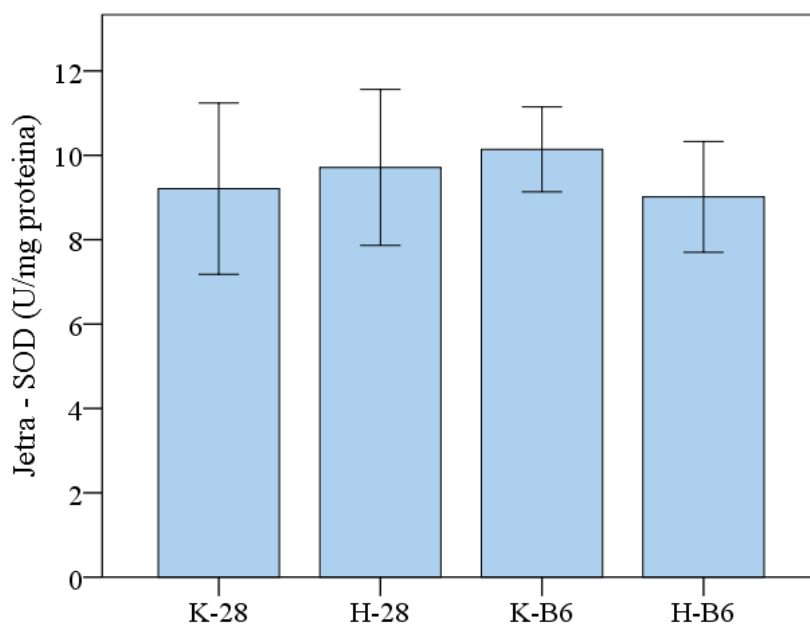
Tretman vitaminom B6 nije pokazao statistički značajan uticaj na aktivnost katalaze (K-B6: 0,315 (0,280 - 0,697) U/mg proteina, H-B6: 0,390 (0,369 - 0,615) U/mg proteina) u homogenatima tkiva jetre u poređenju sa K-28 (0,346 (0,230 - 0,752) U/mg proteina) i H-28 grupom (0,756 (0,539 - 1,320) U/mg proteina) (Grafikon 54).

Ukupna aktivnost SOD se takođe nije statistički značajno razlikovala u grupama koje su tretirane vitaminom B6 (K-B6: $10,141 \pm 1,005$ U/mg proteina, H-B6: $9,014 \pm 1,315$ U/mg proteina) u odnosu na K-28 ($9,209 \pm 2,030$ U/mg proteina) i H-28 grupu ($9,713 \pm 1,849$ U/mg proteina) (Grafikon 55).

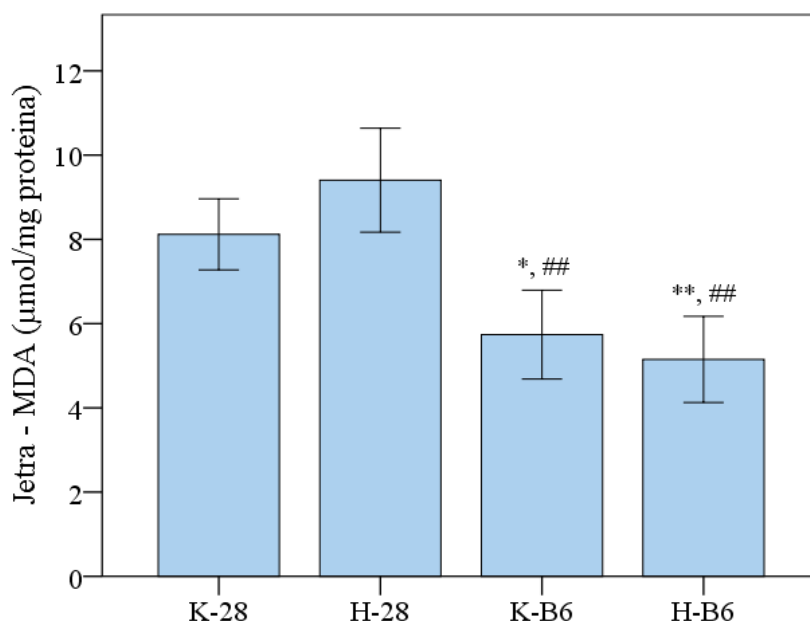
Međutim, tretman vitaminom B6 doveo je do statistički visoko značajnog sniženja koncentracije MDA u homogenatima tkiva jetre (K-B6: $5,740 \pm 1,054$ μ mol/mg proteina, $p < 0,01$ i H-B6: $5,150 \pm 1,022$ μ mol/mg proteina) u poređenju sa H-28 grupom ($9,404 \pm 1,234$ μ mol/mg proteina). Takođe, koncentracija MDA u grupama tretiranim vitaminom B6 bila je statistički značajno niža i u poređenju sa kontrolom K-28 ($8,120 \pm 0,844$ μ mol/mg proteina), K-B6 $p < 0,05$, H-B6 $p < 0,01$ (Grafikon 56).



Grafikon 54. Efekti aplikacije vitamina B6 na aktivnost katalaze u tkivu jetre. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Kruskal-Wallis test.



Grafikon 55. Efekti aplikacije vitamina B6 na aktivnost superoksid dismutaze u tkivu jetre. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.

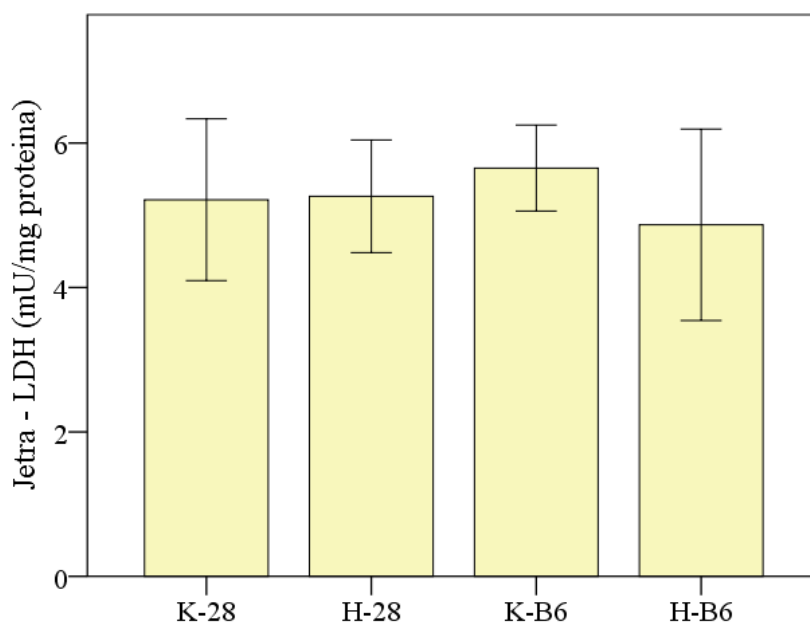


Grafikon 56. Efekti aplikacije vitamina B6 na koncentraciju malondialdehida u tkivu jetre. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.

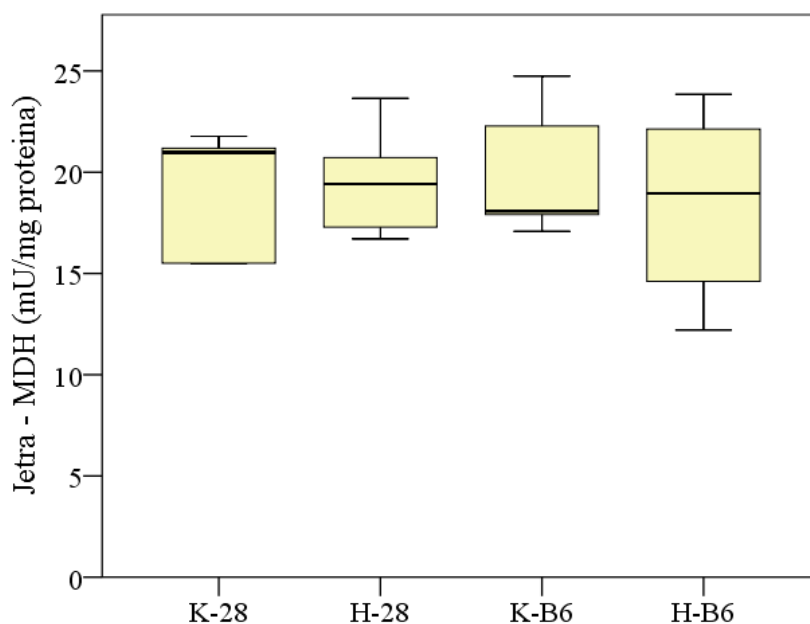
4.2.7.2. Efekti aplikacije vitamina B6 na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu jetre

Aktivnost enzima LDH u homogenatima tkiva jetre nije pokazala statistički značajno razlikovanje u grupama tretiranim vitaminom B6 (K-B6: $5,564 \pm 0,596$ mU/mg proteina, H-B6: $4,869 \pm 1,325$ mU/mg proteina) u poređenju sa K-28 ($5,126 \pm 1,120$ mU/mg proteina) i H-28 grupom ($5,263 \pm 0,781$ mU/mg proteina) (Grafikon 57).

Slično tako ni na aktivnost enzima MDH u homogenatima tkiva jetre tretman vitaminom B6 nije pokazao statistički značajan uticaj (K-B6: 18,073 (17,498 - 23,511) mU/mg proteina, H-B6: 18,956 (13,408 - 22,992) mU/mg proteina) poređeno sa K-28 (20,975 (15,496 - 21,482) mU/mg proteina) i H-28 grupom (19,415 (16,997 - 22,185) mU/mg proteina) (Grafikon 58).



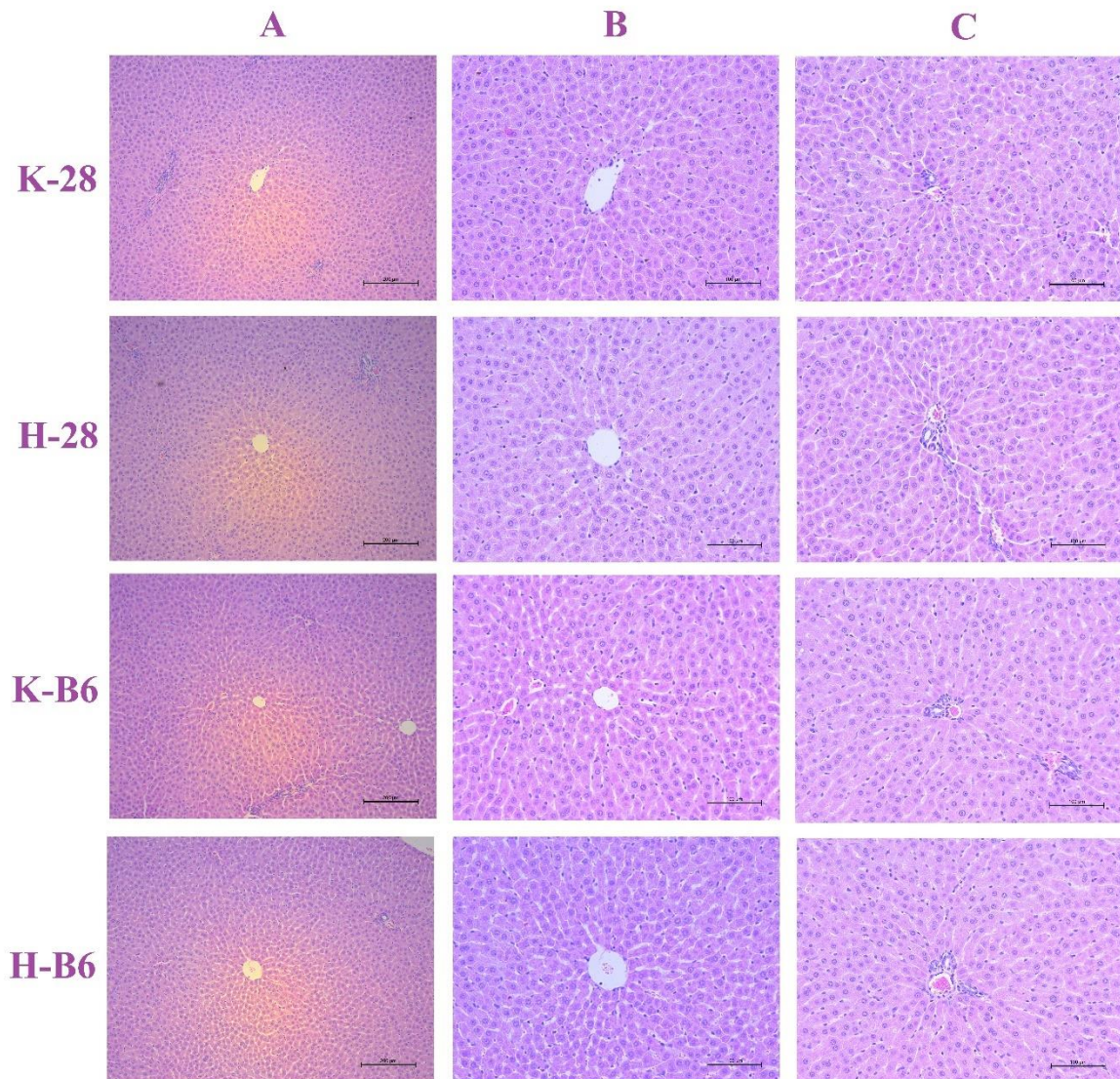
Grafikon 57. Efekti aplikacije vitamina B6 na ukupnu aktivnost laktat dehidrogenaze u tkivu jetre. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.



Grafikon 58. Efekti aplikacije vitamina B6 na ukupnu aktivnost malat dehidrogenaze u tkivu jetre. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Kruskal-Wallis test.

4.2.8. Efekti aplikacije vitamina B6 na histološke promene jetre

Histološka analiza tkiva jetre u grupama tretiranim vitaminom B6 pokazuje fiziološki radijalni raspored jetrinih gredica prema centralnoj veni. Jetrini lobulusi su očuvane arhitektonike (Slika 36). Ne primećuje se proširenje sinusoidnih kapilara između gredica hepatocita i njihova orijentacija je pravilna. Portni prostori sadrže ogranke a. hepaticae propriae, v. portae i interlobularnih žučnih kanalića i očuvane su građe. Hepatociti sadrže jedno do dva pravilna, okrugla, euhromatska jedra u kojima se uočava formirano jedarce, kao i eozinofilnu citoplazmu sa pojedinim bazofilnim zonama koje odgovaraju endoplazmatskom retikulumu. Ne uočava se mikro i makro vezikularna masna promena hepatocita. Nije uočljiva fibroza, niti ciroza. Ne uočava se zastoj žuči.



Slika 36. Fotomikrografije preparata tkiva jetre - hematoksilin/eozin bojenje: A - centar lobulusa, uveličanje x100, B - centar lobulusa, uveličanje x200, C - centar acinusa - portni prostor, uveličanje x200. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana.

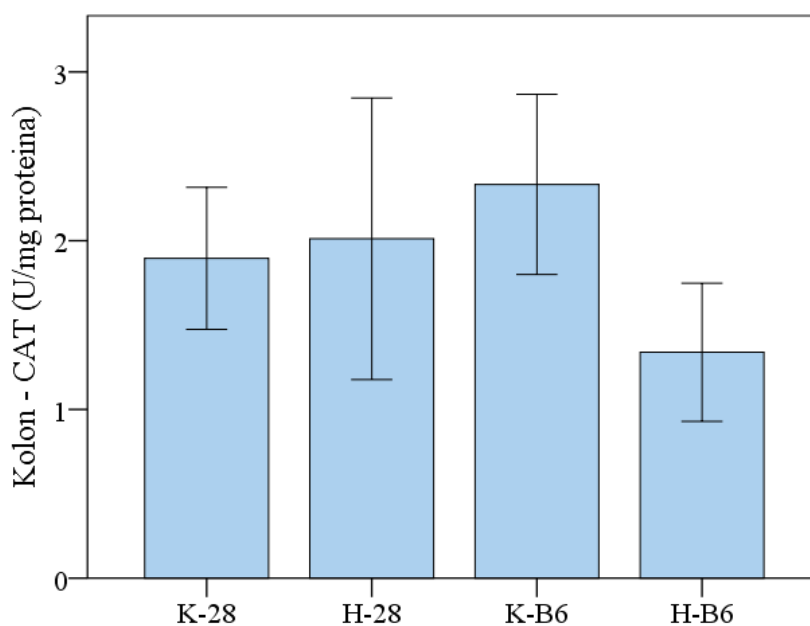
4.2.9. Efekti aplikacije vitamina B6 na biohemijske parametre u tkivu kolona

4.2.9.1. Efekti aplikacije vitamina B6 na parametre oksidativnog stresa u tkivu kolona

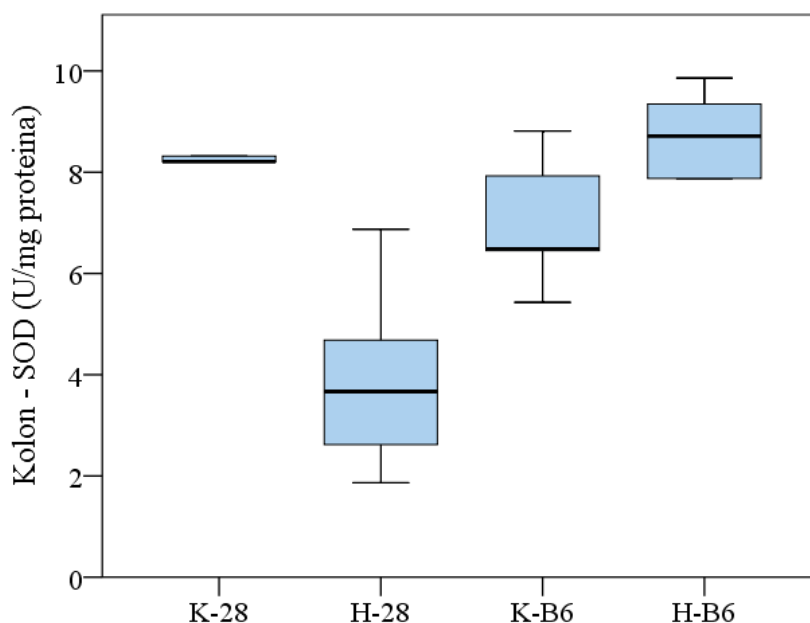
Aktivnost enzima katalaze u homogenatima tkiva kolona nije pokazala statistički značajnu razliku u grupama tretiranim vitaminom B6 (K-B6: $2,334 \pm 0,5334$ U/mg proteina, H-B6: $1,339 \pm 0,409$ U/mg proteina) u poređenju sa K-28 ($1,895 \pm 0,421$ U/mg proteina) i H-28 grupom ($2,012 \pm 0,834$ U/mg proteina) (Grafikon 59).

Aplikacija vitamina B6 nije dovela do statistički značajne promene aktivnosti SOD u tretiranim grupama (K-B6: $6,491$ ($5,940 - 8,370$) U/mg proteina, H-B6: $8,713$ ($4,905 - 9,605$) U/mg proteina) u poređenju sa K-28 ($8,208$ ($7,481 - 8,458$) U/mg proteina) i H-28 grupom ($3,667$ ($2,243 - 5,778$) U/mg proteina) (Grafikon 60).

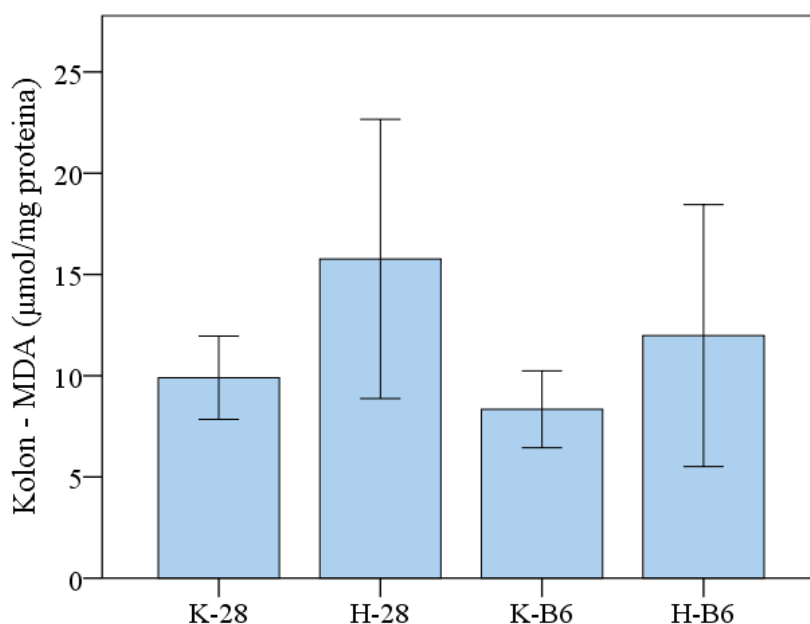
Ne uočava se statistički značajna razlika u koncentraciji MDA u grupama tretiranim vitaminom B6 (K-B6: $8,343 \pm 1,898$ $\mu\text{mol/mg}$ proteina, H-B6: $11,980 \pm 6,469$ $\mu\text{mol/mg}$ proteina) u odnosu na K-28 ($9,904 \pm 2,056$ $\mu\text{mol/mg}$ proteina) i H-28 grupu ($15,766 \pm 6,893$ $\mu\text{mol/mg}$ proteina) (Grafikon 61).



Grafikon 59. Efekti aplikacije vitamina B6 na aktivnost katalaze u tkivu kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.



Grafikon 60. Efekti aplikacije vitamina B6 na ukupnu aktivnost superoksid dismutaze u tkivu kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Kruskal-Wallis test.

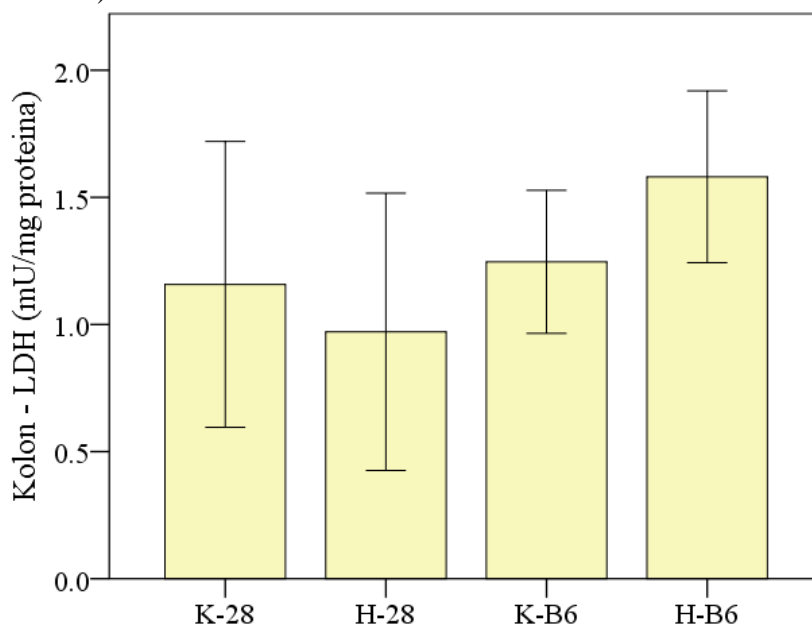


Grafikon 61. Efekti aplikacije vitamina B6 na koncentraciju malondialdehida u tkivu kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.

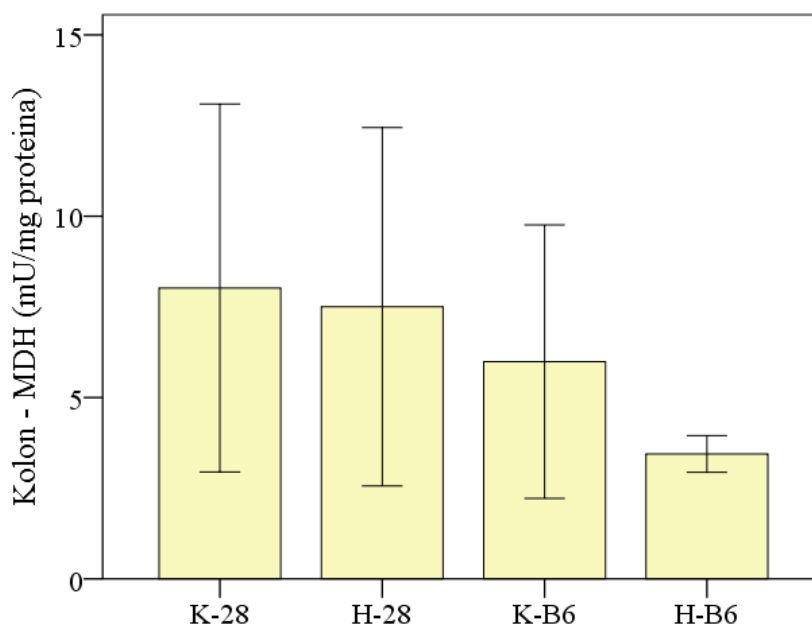
4.2.9.2. Efekti aplikacije vitamina B6 na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu kolona

Aktivnost LDH se nije statistički značajno razlikovala u grupama tretiranim vitaminom B6 (K-B6: $1,246 \pm 0,281$ mU/mg proteina, H-B6: $1,581 \pm 0,338$ mU/mg proteina) u odnosu na K-28 ($1,158 \pm 0,560$ mU/mg proteina) i H-28 grupu ($0,971 \pm 0,545$ mU/mg proteina) (Grafikon 62).

Tretman vitaminom B6 takođe nije statistički značajno uticao ni na aktivnost MDH u tkivu kolona (K-B6: $5,991 \pm 3,770$ mU/mg proteina, H-B6: $3,445 \pm 0,507$ mU/mg proteina) poređeno sa K-28 ($8,020 \pm 5,072$ mU/mg proteina) i H-28 grupom ($7,501 \pm 4,941$ mU/mg proteina) (Grafikon 63).



Grafikon 62. Efekti aplikacije vitamina B6 na ukupnu aktivnost laktat dehidrogenaze u tkivu kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.



Grafikon 63. Efekti aplikacije vitamina B6 na ukupnu aktivnost malat dehidrogenaze u tkivu kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.

4.2.10. Efekti aplikacije vitamina B6 na histološke promene i histomorfometrijske parametre kolona

U svim ispitivanim grupama mikroskopski isecci kolona pokazuju normalnu arhitektoniku, bez znakova za inflamatorne bolesti creva, nisu uocljivi znaci kriptitisa niti kriptni apscesi. U zidu kolona nisu uocljive erozije i ulceracije. Uzroci ne pokazuju tumorske izmene epitela (Slika 37).

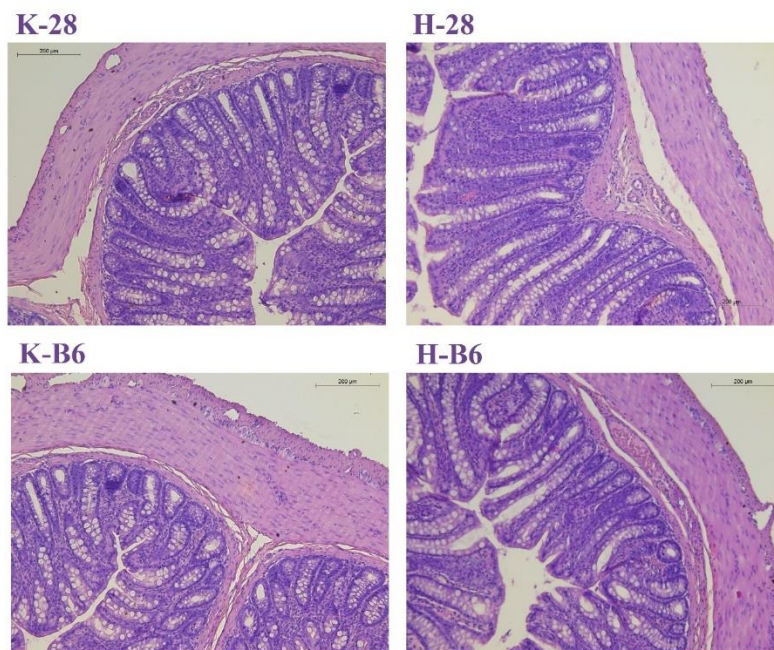
Dubina Liberkinovih kripti je statisticki znacajno niza u grupama tretiranim vitaminom B6 (K-B6: $375,885 \pm 18,563 \mu\text{m}$, $p < 0,05$, H-B6: $368,131 \pm 13,627 \mu\text{m}$, $p < 0,01$) u poređenju sa H-28 grupom ($402,866 \pm 10,052 \mu\text{m}$) (Grafikon 64).

Takođe debljina tunike mukoze je statisticki znacajno niza u grupama tretiranim vitaminom B6 (K-B6: $408,462 \pm 7,160 \mu\text{m}$, $p < 0,01$, H-B6: $409,601 \pm 11,550 \mu\text{m}$, $p < 0,05$) naspram H-28 grupe ($433,687 \pm 8,172 \mu\text{m}$) (Grafikon 65).

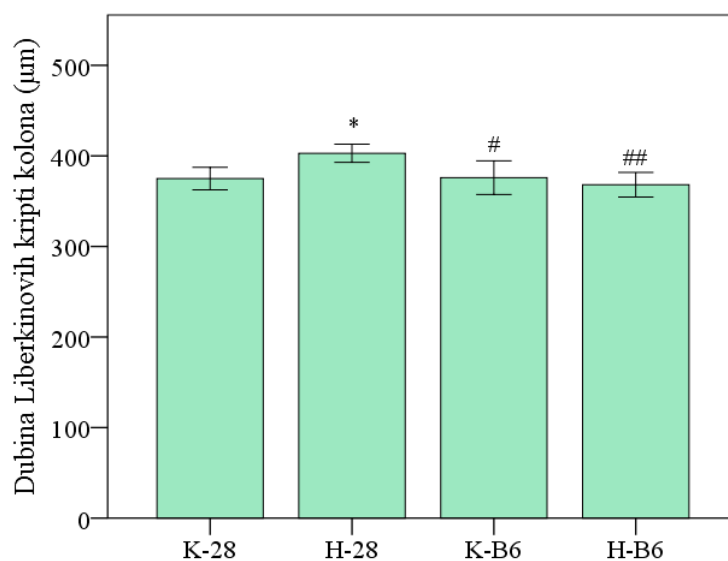
Sa druge strane, tretman vitaminom B6 nije doveo da statisticki znacajne promene debljine lamine muskularis mukoze u poređenju sa H-28 grupom (Grafikon 66).

Isto tako ukupna debljina zida kolona ne razlikuje se statisticki znacajno u grupama tretiranim vitaminom B6 u odnosu na H-28 grupu (Grafikon 67).

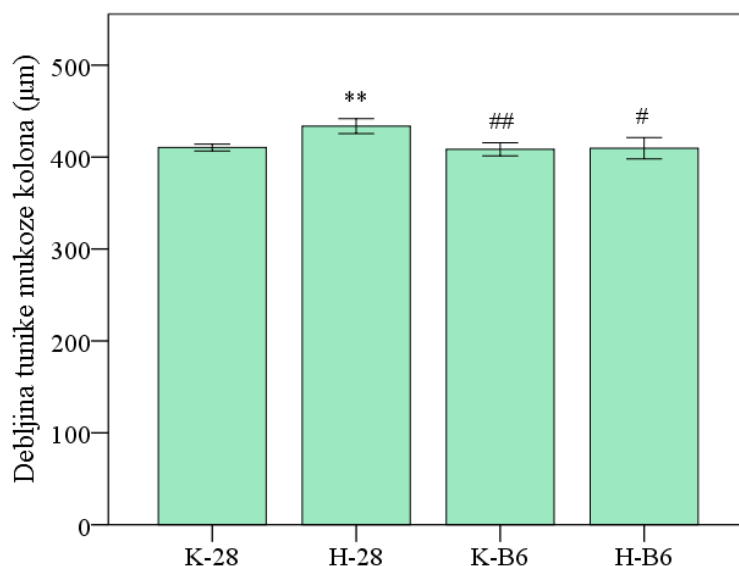
Međutim, u obe grupe tretirane vitaminom B6 izmeren je statisticki visoko znacajno manji broj celija u lamini propriji (K-B6: 954 ± 79 celija na $0,1 \text{ mm}^2$, $p < 0,01$, H-B6: 943 ± 70 celija na $0,1 \text{ mm}^2$) u poređenju sa H-28 grupom (1161 ± 76 celija na $0,1 \text{ mm}^2$) (Grafikon 70).



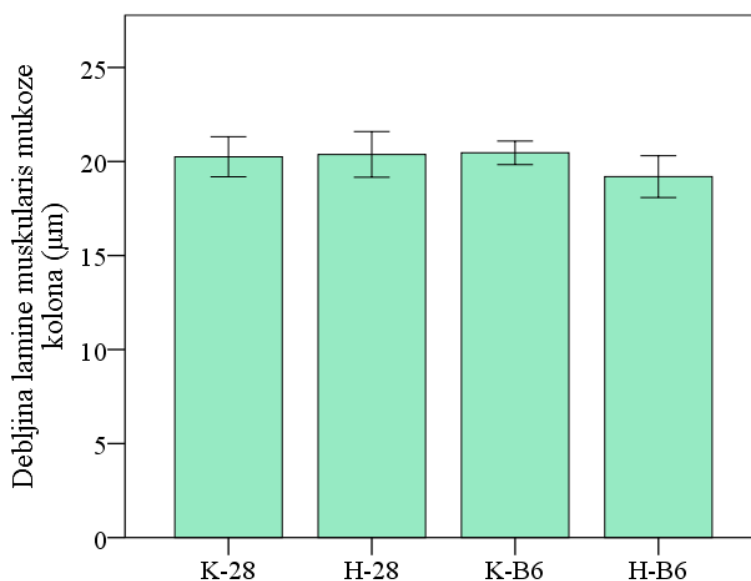
Slika 37. Poprečni presek kolona - hematoksilin/eozin bojenje, uveličanje x100. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana.



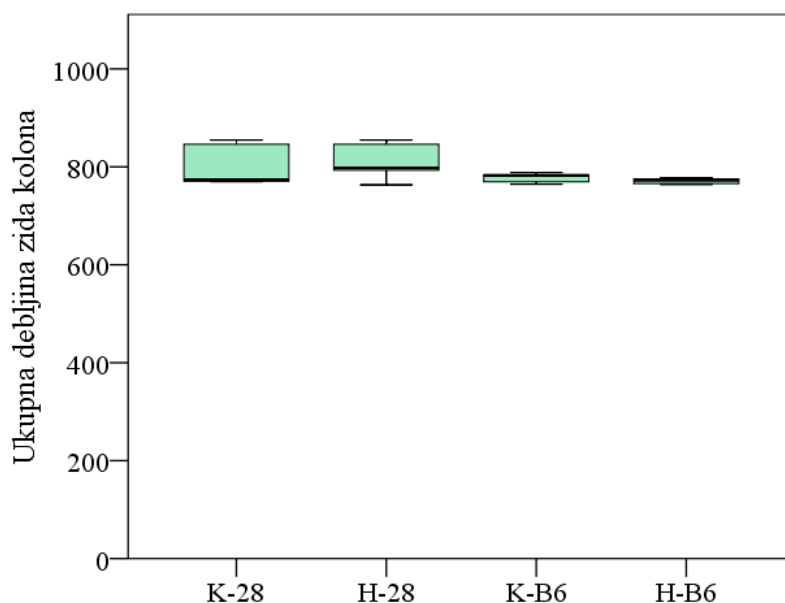
Grafikon 64. Efekti aplikacije vitamina B6 na dubinu Liberkinovih kripti kolona. K-28 K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom, # $p < 0,05$ u poređenju sa H-28 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa H-28 grupom – One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.



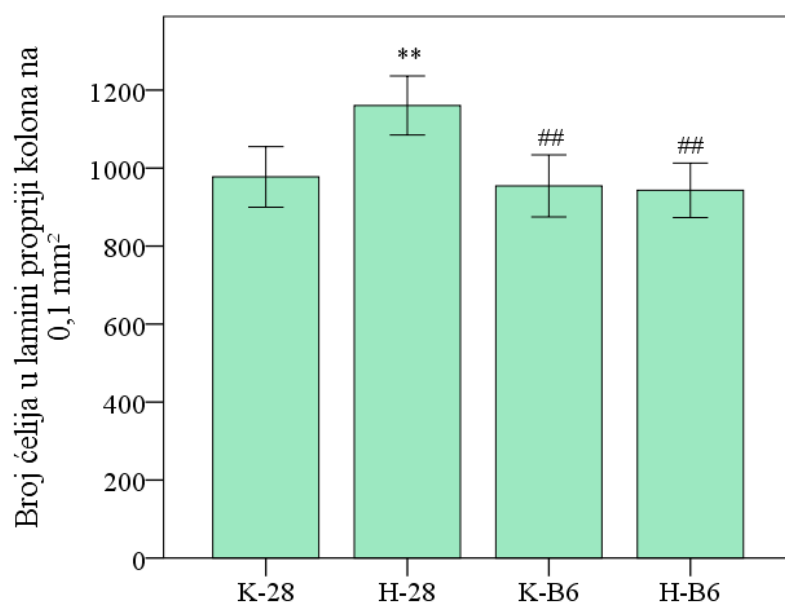
Grafikon 65. Efekti aplikacije vitamina B6 na debljinu tunike mukoze kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom, # $p < 0,05$ u poređenju sa H-28 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa H-28 grupom – Welch ANOVA test sa Games-Howell post hoc testom.



Grafikon 66. Efekti aplikacije vitamina B6 na debljinu lamine muskularis mukoze kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.



Grafikon 67. Efekti aplikacije vitamina B6 na ukupnu debljinu zida kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Kruskal-Wallis test.

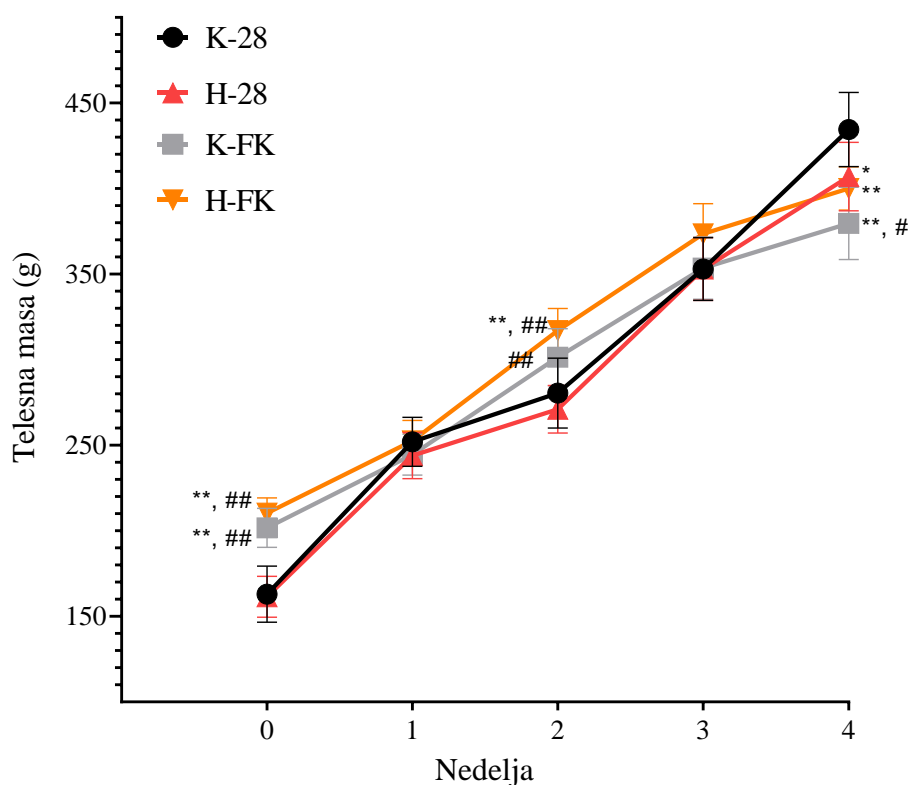


Grafikon 68. Efekti aplikacije vitamina B6 na broj ćelija u lamini propriji kolona na 0,1 mm^2 . K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa H-28 grupom – One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.

4.3. Efekti aplikacije folne kiseline u uslovima eksperimentalno izazvane hiperhomocisteinemije

4.3.1. Efekti aplikacije folne kiseline na telesnu masu eksperimentalnih životinja

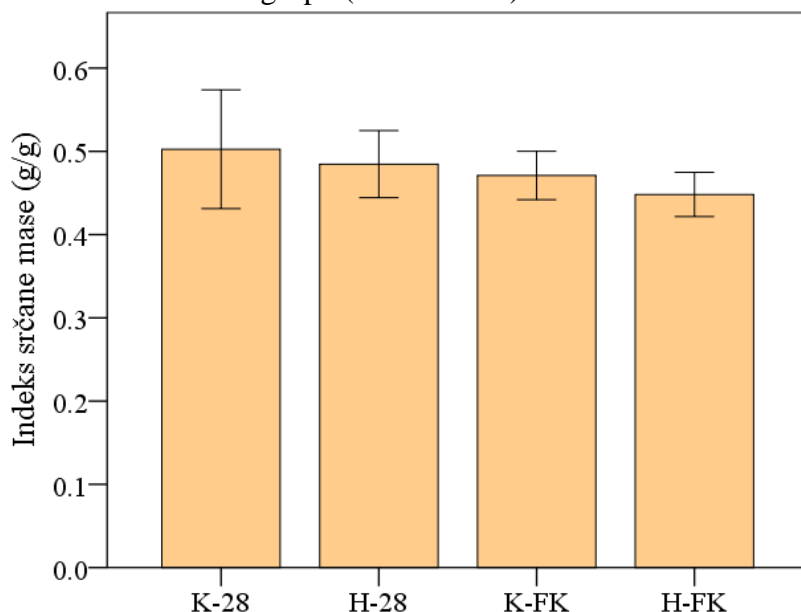
Nakon druge nedelje eksperimenta mase životinja koje su bile tretirane folnom kiselinom (K-FK i H-FK) bile su statistički značajno više u odnosu na H-28 grupu, $p < 0,01$. Životinje u H-B6 grupi su u drugoj nedelji imale statistički visoko značajno veće telesne mase i u odnosu na kontrolu K-28, $p < 0,01$. Međutim na kraju eksperimentalnog protokola mase životinja u K-28 grupi bile su statistički značajno više u odnosu na H-28 grupu, $p < 0,05$ i statistički visoko značajno više u odnosu na obe grupe tretirane folnom kiselinom, $p < 0,01$. Kroz sve nedelje eksperimentalnog protokola životinje u K-FK i životinje iz H-FK grupe nisu međusobno imale statistički značajno različite telesne mase (Grafikon 69).



Grafikon 69. Efekti aplikacije folne kiseline na telesnu masu eksperimentalnih životinja kroz nedelje eksperimentalnog protokola. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom, # $p < 0,05$ u poređenju sa H-28 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa H-28 grupom - Šidakov post hoc test.

4.3.2. Efekti aplikacije folne kiseline na indeks srčane mase

Vrednost ISM se nije statistički značajno razlikovala kod životinja tretiranih folnom kiselinom u odnosu na H-28 i K-28 grupu (Grafikon 70).

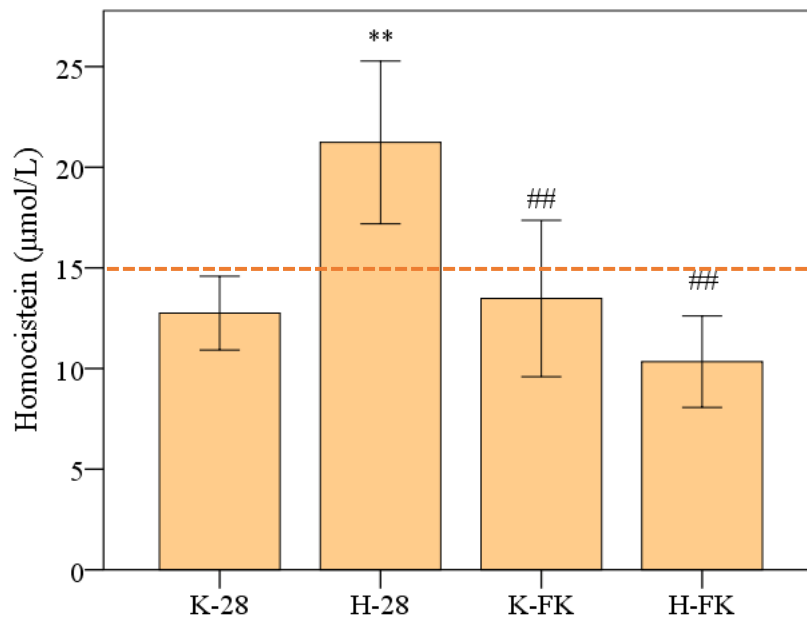


Grafikon 70. Efekti aplikacije folne kiseline na indeks srčane mase. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Welch ANOVA test.

4.3.3. Efekti aplikacije folne kiseline na vrednosti biohemijskih parametara u serumu i plazmi

4.3.3.1. Efekti aplikacije folne kiseline na koncentraciju homocisteina u serumu

Koncentracija Hcy u serumu bila je statistički visoko značajno niža u H-FK grupi ($10,3 \pm 2,3 \mu\text{mol/L}$) u odnosu na H-28 grupu ($21,2 \pm 4,0 \mu\text{mol/L}$), $p < 0,01$. U K-FK grupi koncentracija Hcy u serumu iznosila je $13,5 \pm 3,9 \mu\text{mol/L}$. U obe grupe tretirane folnom kiselinom na kraju eksperimentalnog protokola prosečne vrednosti serumske koncentracije homocisteina iznosile su ispod $15 \mu\text{mol/L}$. Nije prisutna statistički značajna razlika u serumskoj koncentraciji Hcy između grupa tretiranih folnom kiselinom i kontrolne K-28 grupe (Grafikon 71).



Grafikon 71. Efekti aplikacije folne kiseline na serumsku koncentraciju homocisteina. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa H-28 grupom – One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.

4.3.3.2. Efekti aplikacije folne kiseline na kardiovaskularne i hemostatske biomarkere u serumu i plazmi

Izmerene koncentracije HOL bile su statistički značajno više u H-FK grupi ($2,03 \pm 0,18$ mmol/L), $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu K-28 ($1,75 \pm 0,25$ mmol/L), ali ova statistička značajnost nije od velikog biološkog značaja s obzirom da je koncentracija HOL u H-FK grupi još uvek u referentnom opsegu normalnih vrednosti (do 5,2 mmol/L). Sličan trend primećuje se i u pogledu koncentracije LDL u serumu koja je u obe grupe tretirane folnom kiselinom bila statistički značajno viša (K-FK: $0,30 \pm 0,10$ mmol/L, $p < 0,01$, H-FK: $0,30 \pm 0,06$ mmol/L, $p < 0,01$) u poređenju sa kontrolom K-28 ($0,16 \pm 0,09$ mmol/L), ali i u ovom slučaju u svim grupama su vrednosti bile ispod gornje granice referentnog opsega (do 3,4 mmol/L). Koncentracija HDL je bila značajno viša u H-FK grupi ($1,45 \pm 0,13$ mmol/L) u poređenju sa K-28 grupom ($1,45 \pm 0,13$ mmol/L). Koncentracija TG u serumu je pak bila statistički značajno niža u obe grupe tretirane folnom kiselinom (K-FK: $0,60 \pm 0,10$ mmol/L, $p < 0,05$, H-FK: $0,60 \pm 0,13$ mmol/L, $p < 0,05$) u poređenju sa kontrolom K-28 ($0,77 \pm 0,17$ mmol/L), ali se nisu razlikovale značajno u odnosu na H-28 grupu ($0,57 \pm 0,10$ mmol/L). Koncentracija vitamina B12 bila je visoko značajno niža u grupi K-FK ($433,4 \pm 74,6$ pg/mL, $p < 0,01$) i grupi H-FK ($385,7 \pm 57,4$ pg/mL, $p < 0,01$) u odnosu na H-28 grupu ($627,2 \pm 81,3$ pg/mL). vWF je bio značajno snižen u K-FK (128,0 (89,7 – 144,2) %, $p < 0,05$) i H-FK grupi (131,0 (111,5 – 144,0) %, $p < 0,05$) u poređenju sa H-28 grupom (151,0 (144,5 – 166,5) %) (Tabela 5).

Tabela 5. Efekti aplikacije folne kiseline na kardiovaskularne i hemostatske biomarkere u serumu i plazmi

Parametar	K-28	H-28	K-FK	H-FK
Hcy (μmol/L)a, s	12,7 ± 1,8	21,2 ± 4,0 **	13,5 ± 3,9 ##	10,3 ± 2,3 ##
HOL (mmol/L)a, s	1,75 ± 0,25	1,80 ± 0,24	1,98 ± 1,89	2,03 ± 0,18 *
HDL (mmol/L)a, s	1,26 ± 0,17	1,30 ± 0,17	1,41 ± 0,12	1,45 ± 0,13 *
LDL (mmol/L)a, s	0,16 ± 0,09	0,26 ± 0,10	0,30 ± 0,10 **	0,30 ± 0,06 **
TG (mmol/L)a, s	0,77 ± 0,17	0,57 ± 0,10 **	0,60 ± 0,10 *	0,60 ± 0,13 *
LDH (U/L)b, s	3546 ± 1305	3323 ± 666	2925 ± 512	2904 ± 316
hs-TnT (ng/L)c, s	22,0 (16,0 - 53,0)	21,5 (13,7 - 39,2)	15,5 (14,0 - 22,2)	19,0 (14,0 - 27,5)
Vitamin B12 (pg/mL)a, s	460,2 ± 50,0	627,2 ± 81,3 **	433,4 ± 74,6 ##	385,7 ± 57,4 ##
Folat (ng/mL)c, s	19,2 (19,0 - 20,0)	20,0 (20,0 - 20,0)	20,0 (20,0 - 20,0)	20,0 (20,0 - 20,0)
Fibrinogen (g/L)a, p	1,9 ± 0,4	1,8 ± 0,1	2,3 ± 0,5	2,2 ± 0,5
D-dimer < 0,17 mg/L	10 (100 %)	10 (100 %)	10 (100 %)	10 (100 %)
vWF (%)c, p	155,0 (122,2 - 167,5)	151,0 (144,5 - 166,5)	128,0 (89,7 - 144,2) #	131,0 (111,5 - 144,0) #

Hcy - homocistein, HOL - ukupni kolesterol, HDL - lipoprotein visoke gustine, LDL - lipoprotein niske gustine, TG - trigliceridi, LDH - laktat dehidrogenaza, hs-TnT - visoko senzitivni troponin T, vWF - vonWillebrand-ov faktor, s - vrednost merena u serumu, p - vrednost merena u plazmi. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 μmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. a – * p < 0,05 u poređenju sa K-28 grupom, ** p < 0,01 u poređenju sa K-28 grupom, ## p < 0,01 u poređenju sa H-28 grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom. b - p > 0,05 – Welch ANOVA test. c - # p < 0,05 u poređenju sa H-28 – Kruskal-Wallis test sa Dunn post hoc testom.

4.3.3.3. Efekti aplikacije folne kiseline na hepato-renalno-pankreatične biomarkere u serumu

Koncentracija glukoze bila je statistički značajno povišena u H-FK grupi (6,60 (6,40 – 7,30) mmol/L) u poređenju sa K-28 (5,19 (4,64 - 5,80) mmol/L), p < 0,01 i H-28 grupom (5,89 (5,67 - 6,13) mmol/L), p < 0,01. Takođe koncentracija glukoze bila je viša i u K-FK grupi (6,10 (5,90 – 6,50) mmol/L) u poređenju sa K-28 grupom, p < 0,05. Koncentracija albumina je bila niža u obe grupe tretirane folnom kiselinom (K-FK: 43,0 ± 1,6 g/L, p < 0,01, H-FK: 43,6 ± 2,7 g/L, p < 0,01) u poređenju sa H-28 grupom (48,1 ± 2,3 g/L). Aktivnost AST u serumu je bila snižena u obe grupe tretirane folnom kiselinom, ali je statistički značajna razlika prisutna jedino u K-FK grupi (168 (154 - 197) U/L) u odnosu na K-28 (227 (186 - 244) U/L, p < 0,05) i H-28 grupu (223 (181 - 241) U/L, p < 0,05). Koncentracija kreatinina je bila statistički visoko značajno niža u H-FK grupi (35,0 (34,0 – 36,0) μmol /L, p < 0,01) u odnosu na H-28 grupu (41,0 (37,2 - 44,0) μmol /L). Serumska aktivnost amilaze je bila statistički visoko značajno niža u H-FK grupi (2571 (2366 - 2691) U/mL) u odnosu na H-28 grupu (3499 (3334 - 4203) U/mL, p < 0,01), i značajno niža u odnosu na kontrolu K-28 (3471 (2912 - 3671) U/mL, p < 0,05) (Tabela 6).

Tabela 6. Efekti aplikacije folne kiseline na hepato-renalno-pankreatične biomarkere u serumu

Parametar	K-28	H-28	K-FK	H-FK
Glukoza (mmol/L) ^a	5,19 (4,64 - 5,80)	5,89 (5,67 - 6,13)	6,10 (5,90 - 6,50) *	6,60 (6,40 - 7,30) **, ##
Ukupni proteini (g/L) ^b	63,7 ± 3,1	68,2 ± 3,1 *	66,7 ± 2,2	65,2 ± 0,9
Albumin (g/L) ^c	43,9 ± 1,7	48,1 ± 2,3 **	43,0 ± 1,6 ##	43,6 ± 2,7 ##
AST (U/L) ^a	227 (186 - 244)	223 (181 - 241)	168 (154 - 197) *, #	177 (161 - 193)
ALT (U/L) ^a	64 (51 - 79)	63 (56 - 70)	57 (53 - 63)	56 (46 - 75)
Urea (mmol/L) ^a	7,5 (6,8 - 8,0)	8,4 (7,1 - 9,2)	7,8 (7,2 - 9,6)	7,7 (6,8 - 8,4)
Kreatinin (μmol /L) ^a	35,0 (34,0 - 35,7)	41,0 (37,2 - 44,0) *	37,5 (34,0 - 41,0)	35,0 (34,0 - 36,0) ##
Mokraćna kiselina (μmol/mL) ^c	86,2 ± 12,7	79,0 ± 12,1	87,9 ± 11,9	76,2 ± 12,1
Amilaza (U/mL) ^a	3471 (2912 - 3671)	3499 (3334 - 4203)	2936 (2360 - 3191)	2571 (2366 - 2691) *, ##
CRP < 0,6 mg/L	10 (100 %)	10 (100 %)	10 (100 %)	10 (100 %)

AST - aspartat aminotransferaza, ALT - alanin aminotransferaza, CRP - C reaktivni protein. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 μmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. a - * p < 0,05 u poređenju sa K-28 grupom, ** p < 0,01 u poređenju sa K-28 grupom, # p < 0,05 u poređenju sa H-28 grupom, ## p < 0,01 u poređenju sa H-28 grupom - Kruskal-Wallis test sa Dunn post hoc testom. b - * p < 0,05 u poređenju sa K-28 grupom - Welch ANOVA test sa Games-Howell post hoc testom. c - ** p < 0,01 u poređenju sa K-28 grupom, ## p < 0,01 u poređenju sa H-28 grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.

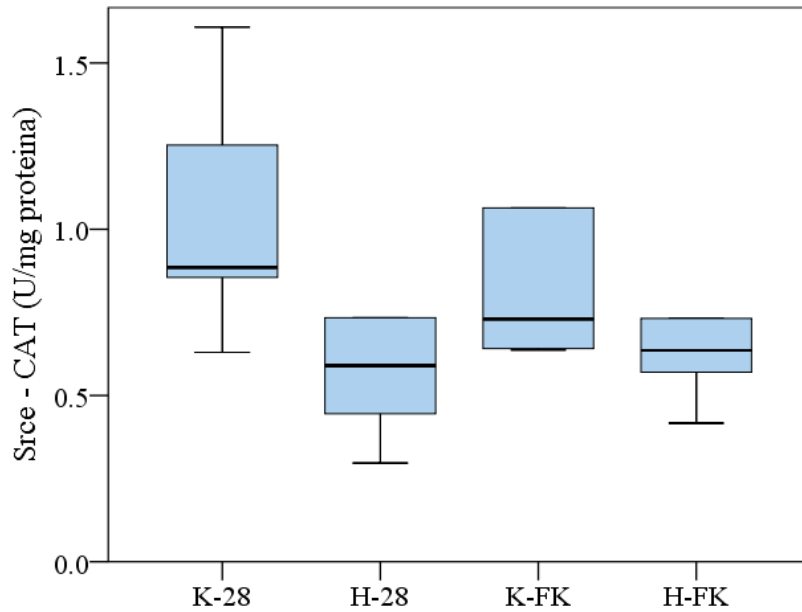
4.3.4. Efekti aplikacije folne kiseline na biohemijske parametre u tkivu srca

4.3.4.1. Efekti aplikacije folne kiseline na parametre oksidativnog stresa u tkivu srca

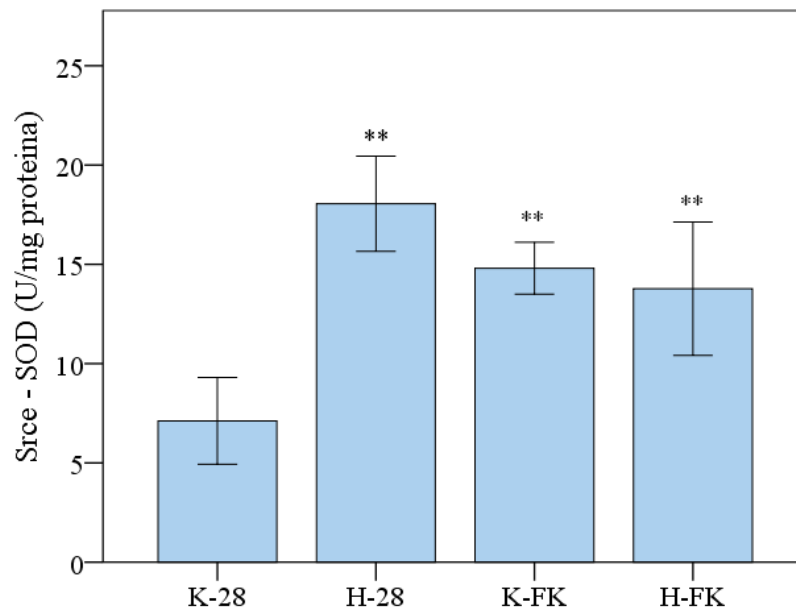
Aplikacija FK nije dovela do statistički značajne promene aktivnost katalaze u homogenatima tkiva srca u tretiranim grupama odnosu na H-28 i K-28 grupu (Grafikon 72).

Ukupna aktivnost SOD u homogenatima tkiva srca je bila statistički visoko značajno viša u obe grupe tretirane folnom kiselinom (K-FK: 14,801 ± 1,306 U/mg proteina, p < 0,01, H-FK: 13,772 ± 3,358 U/mg proteina, p < 0,01), u poređenju sa kontrolom K-28 (7,116 ± 2,187 U/mg proteina), ali, iako su vrednosti bile blago niže, nisu se razlikovale statistički značajno u odnosu na H-28 grupu (18,052 ± 2,398 U/mg proteina) (Grafikon 73).

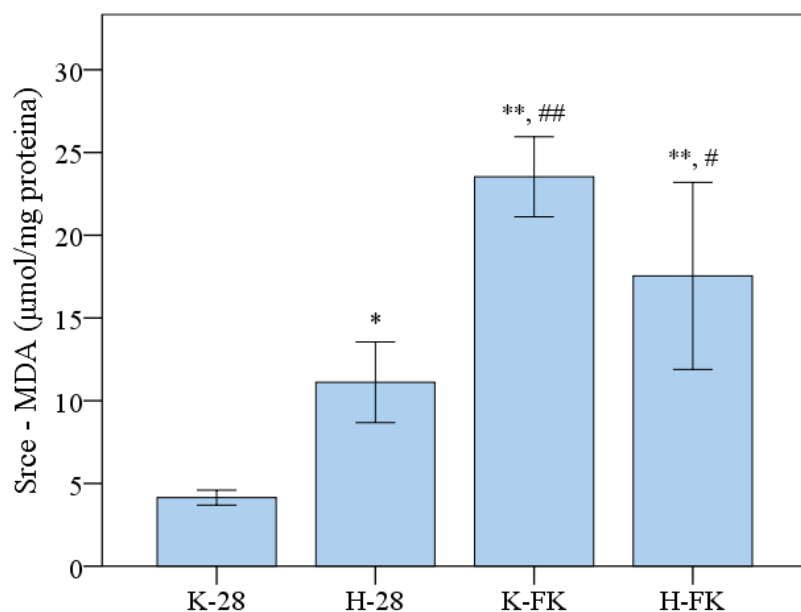
Koncentracija MDA u homogenatima tkiva srca bila je značajno povišena u obe grupe tretirane folnom kiselinom (K-FK: 23,532 ± 2,414 μmol/mg proteina, H-FK: 17,541 ± 5,650 μmol/mg proteina) u odnosu na K-28 (4,143 ± 0,454 μmol/mg proteina) (p < 0,01 i p < 0,01) i kao i u odnosu na H-28 (11,116 ± 2,437 μmol/mg proteina) (p < 0,01 i p < 0,05) (Grafikon 74).



Grafikon 72. Efekti aplikacije folne kiseline na aktivnost katalaze u tkivu srca. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ – Kruskal-Wallis test.



Grafikon 73. Efekti aplikacije folne kiseline na ukupnu aktivnost superoksid dismutaze u tkivu srca. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.

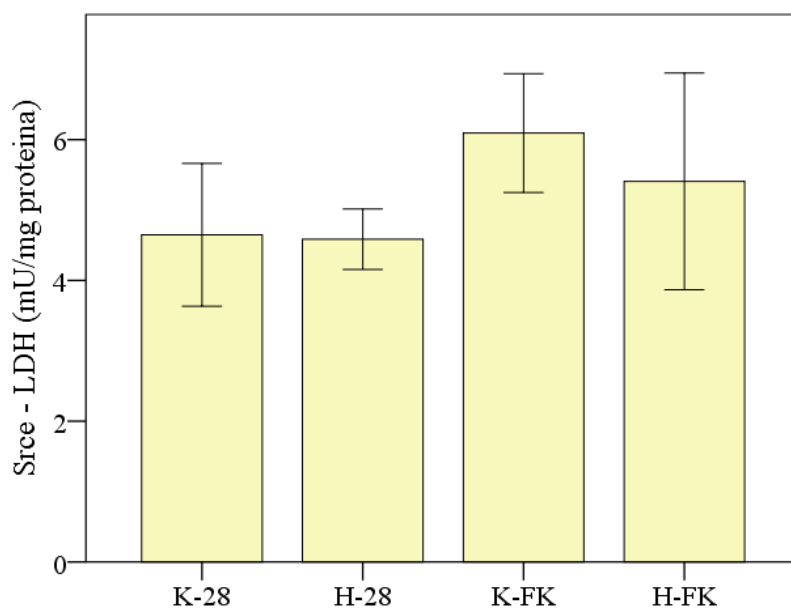


Grafikon 74. Efekti aplikacije folne kiseline na koncentraciju malondialdehida u tkivu srca. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 μmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom, # $p < 0,05$ u poređenju sa H-28 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa H-28 grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.

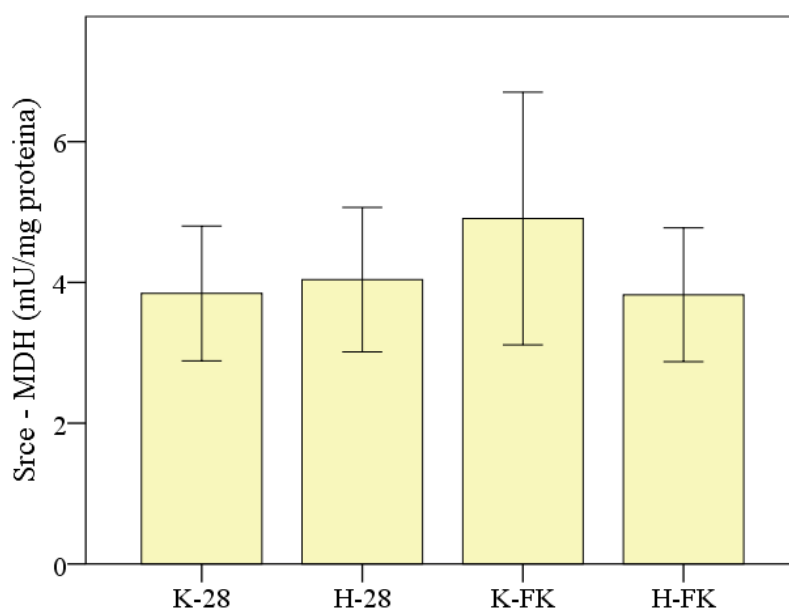
4.3.4.2. Efekti aplikacije folne kiseline na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu srca

Nije prisutna statistički značajna razlika ukupne aktivnosti LDH u homogenatima tkiva srca u grupama tretiranim folnom kiselinom u poređenju sa K-28 i H-28 grupom, $p > 0,05$ (Grafikon 75).

Takođe ni ukupna aktivnost MDH u homogenatima tkiva srca nije pokazala statistički značajnu razliku usled tretmana folnom kiselinom u poređenju sa K-28 i H-28 grupom $p > 0,05$ (Grafikon 76).



Grafikon 75. Efekti aplikacije folne kiseline na ukupnu aktivnost laktat dehidrogenaze u tkivu srca. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.



Grafikon 76. Efekti aplikacije folne kiseline na ukupnu aktivnost malat dehidrogenaze u tkivu srca. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.

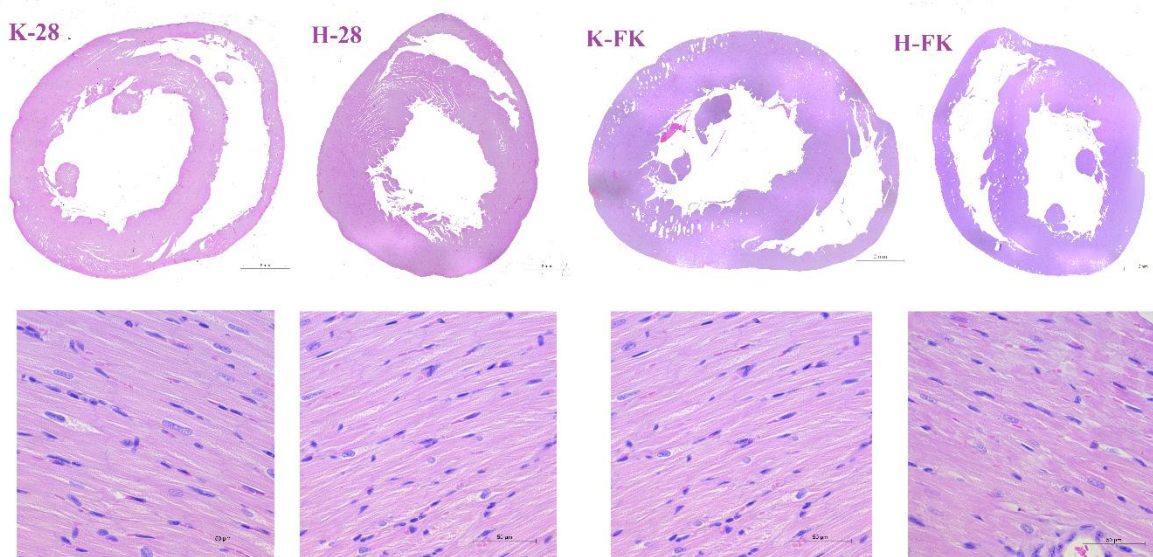
4.3.5. Efekti aplikacije folne kiseline na histološke promene i histomorfometrijske parametre srca

Na slici 38 prikazane su reprezentativne fotomikrografije uzoraka tkiva srca na malom i velikom uveličanju (Slika 38). U svim ispitivanim grupama primećuje se pravilan raspored vlakna miokarda, a kardiomiociti su zadržali fiziološku morfologiju. Nisu uočena polja nekroze niti zone proliferacije vezivnog tkiva.

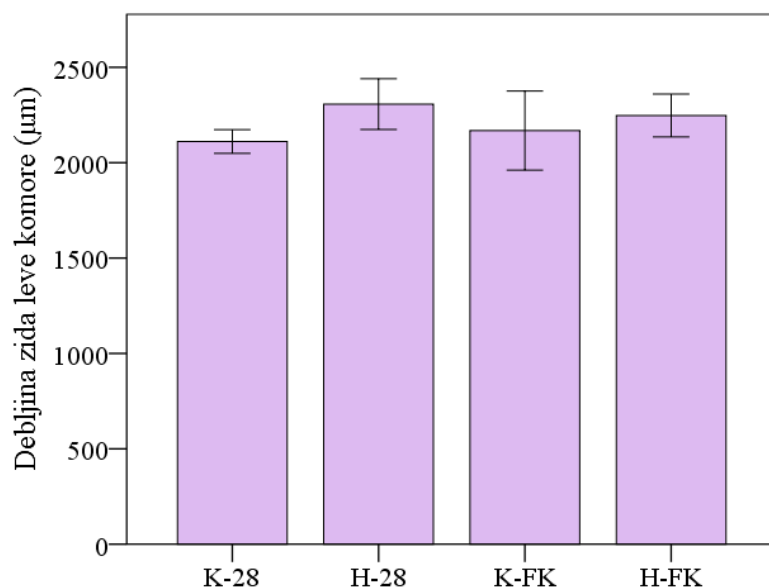
Debljina zida leve komore se nije značajno promenila u grupama koje su bile pod tretmanom folnom kiselinom u poređenju sa K-28 i H-28 grupom, $p > 0,05$ (Grafikon 77).

Međutim, debljina zida desne komore je statistički značajno niža u obe grupe tretirane folnom kiselinom (K-FK: 739,093 (688,881 - 821,252) μm , $p < 0,05$, H-FK: 733,034 (719,708 - 796,458) μm , $p < 0,05$) u poređenju sa H-28 grupom (1086,397 (885,725 - 1134,521) μm) (Grafikon 78).

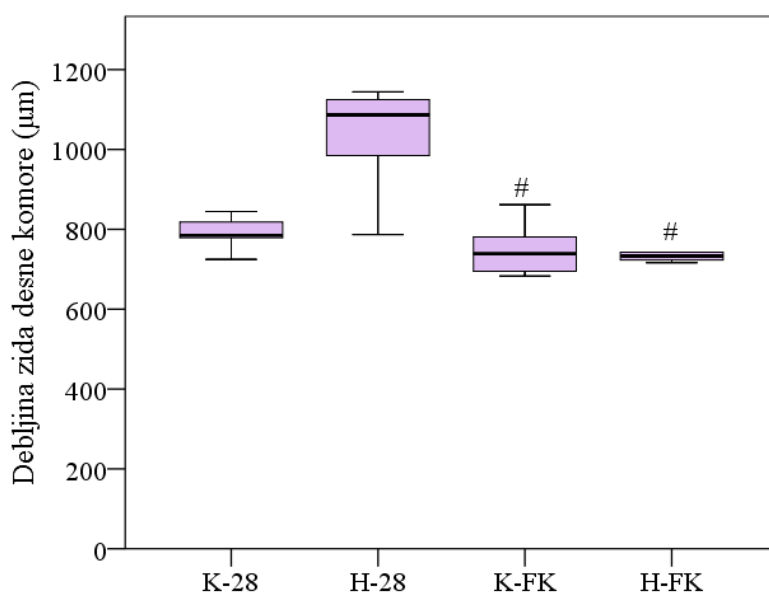
Debljina interventrikularnog septuma ne pokazuje statistički značajnu razliku usled tretmana folnom kiselinom u odnosu na H-28 i K-28 grupu, $p > 0,05$ (Grafikon 79), kao ni transverzalni dijametar kardiomiocita, $p > 0,05$ (Grafikon 80).



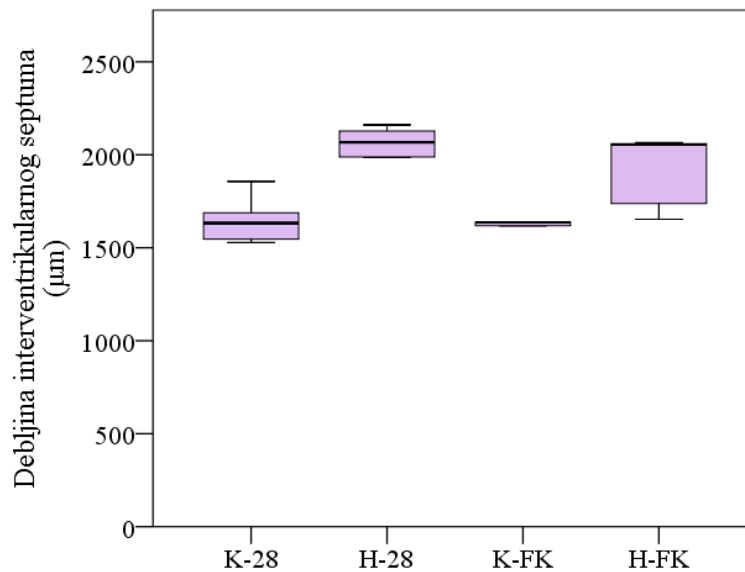
Slika 38. Poprečni presek srca - hematoksilin/ezoin bojenje (A: uveličanje x50, B: uveličanje x400). K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana.



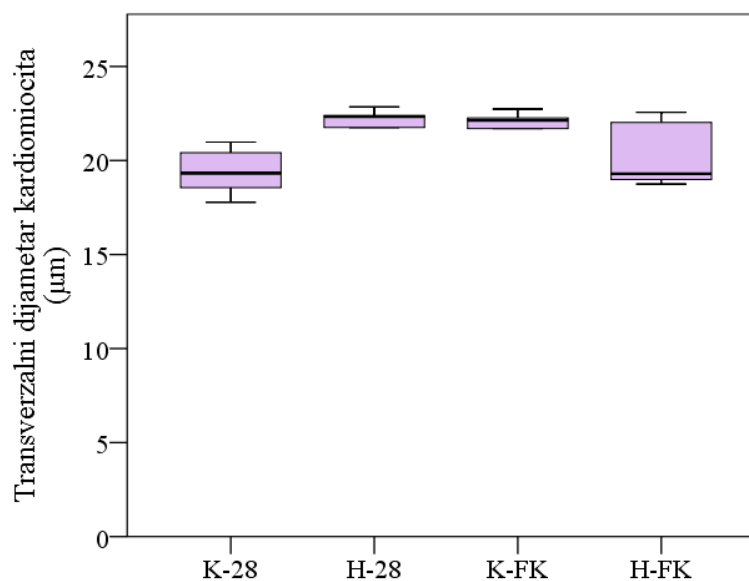
Grafikon 77. Efekti aplikacije folne kiseline na debljinu zida leve komore. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Welch ANOVA test sa Games-Howell post hoc testom.



Grafikon 78. Efekti aplikacije folne kiseline na debljinu zida desne komore. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. # $p < 0,05$ u poređenju sa H-28 grupom - Kruskal-Wallis test sa Dunn post hoc testom.



Grafikon 79. Efekti aplikacije folne kiseline na debljinu interventrikularnog septuma. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Kruskal-Wallis test.

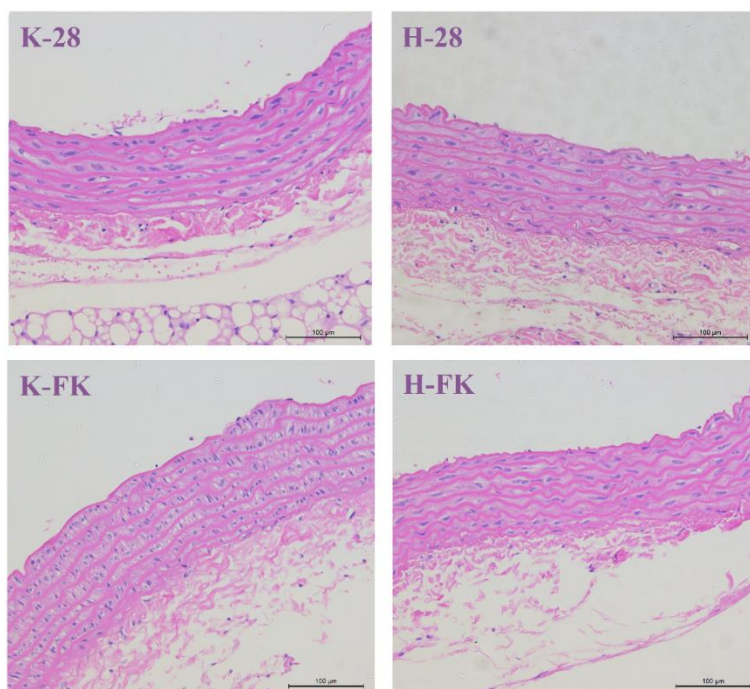


Grafikon 80. Efekti aplikacije folne kiseline na transverzalni dijamer kardiomocita. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Kruskal-Wallis test.

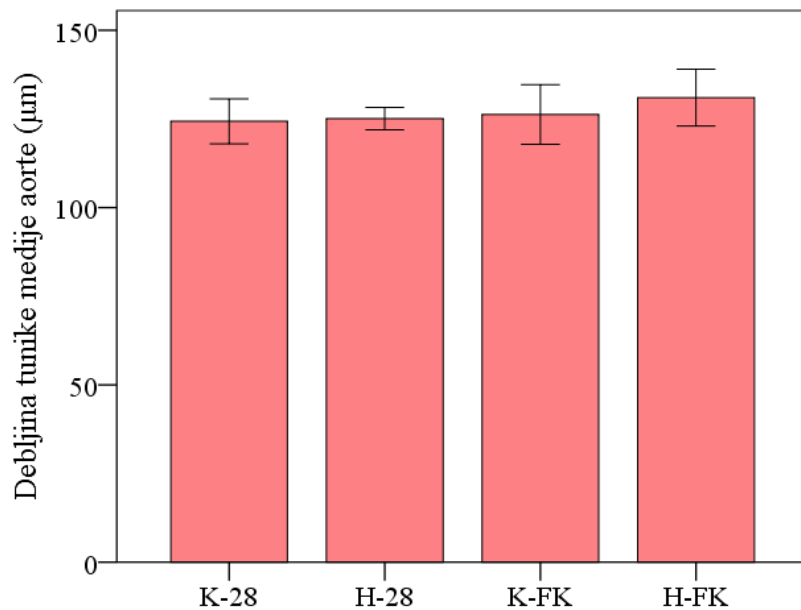
4.3.6. Efekti aplikacije folne kiseline na histološke promene i histomorfometrijske parametre aorte

Histomorfometrijska analiza tkiva aorte pokazuje da ne postoji statistički značajna razlika u debljini tunike medije u grupama koje su tretirane folnom kiselinom u poređenju sa H-28 i K-28 grupom, $p > 0,05$ (Grafikon 81).

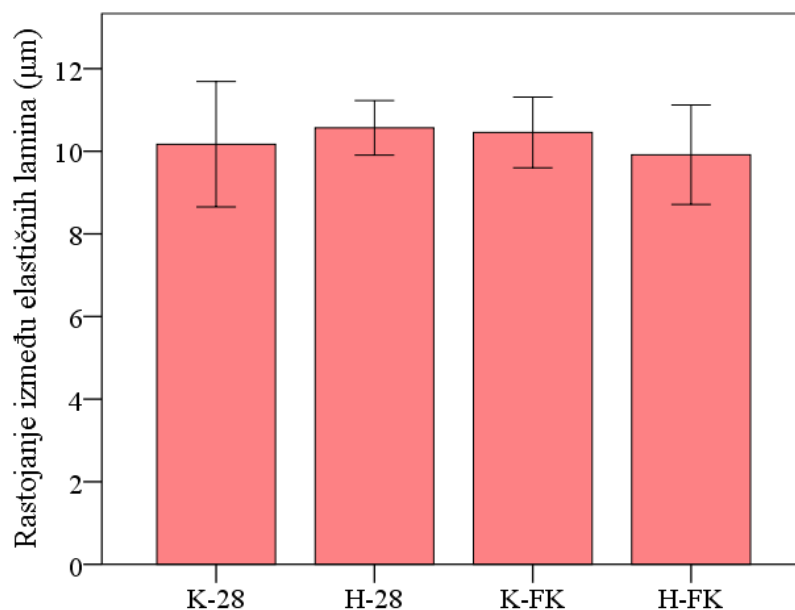
Isto tako ispitivane grupe se nisu statistički značajno razlikovane ni u rastojanju između elastičnih lamina u zidu aorte, $p > 0,05$ (Grafikon 82), kao ni u njihovom broju, $p > 0,05$ (Grafikon 83).



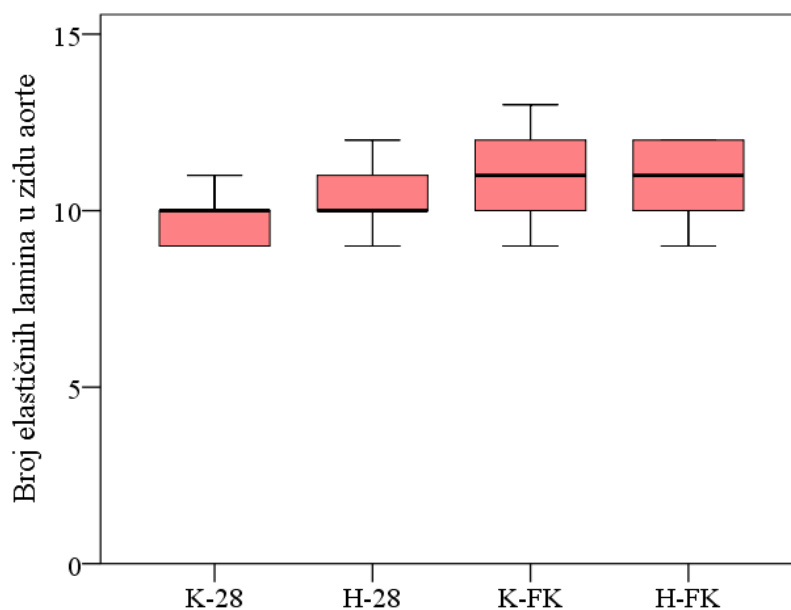
Slika 39. Poprečni presek aorte, hematoksilin/eozin bojenje, uveličanje x200. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana.



Grafikon 81. Efekti aplikacije folne kiseline na debljinu tunike medije aorte. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.



Grafikon 82. Efekti aplikacije folne kiseline na rastojanje između elastičnih lamina u zidu aorte. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.



Grafikon 83. Efekti aplikacije folne kiseline na broj elastičnih lamina u zidu aorte. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Kruskal-Wallis test.

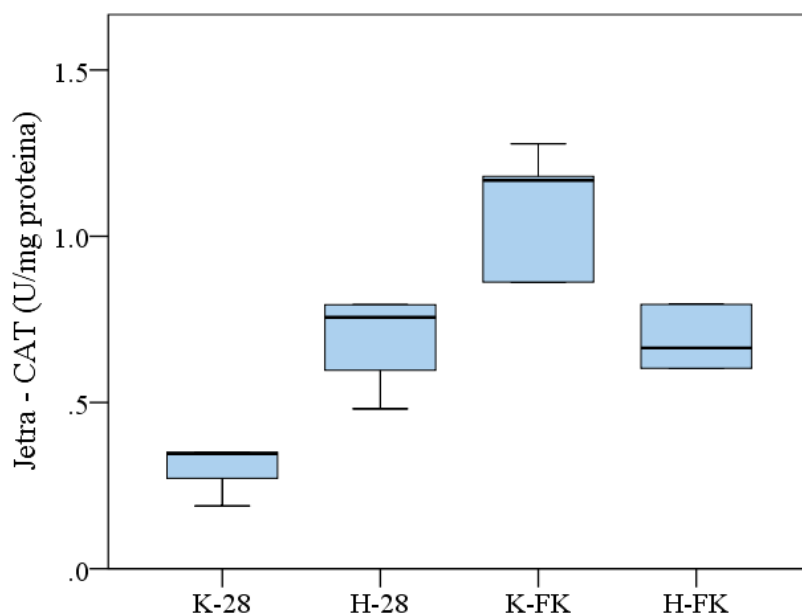
4.3.7. Efekti aplikacije folne kiseline na biohemijske parametre u tkivu jetre

4.3.7.1. Efekti aplikacije folne kiseline na parametre oksidativnog stresa u tkivu jetre

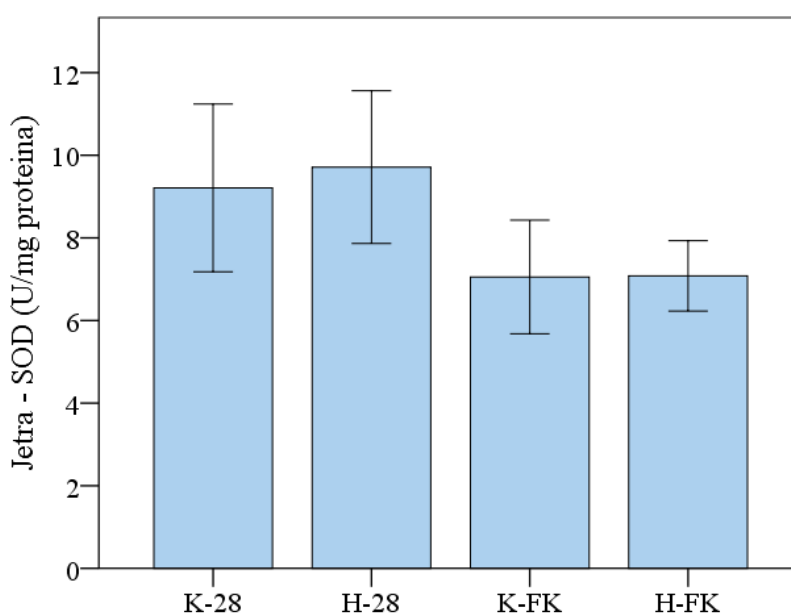
Aplikacija FK nije dovela do statistički značajne promene aktivnosti katalaze u homogenatima tkiva jetre u odnosu na H-28 i K-28 grupu, $p > 0,05$ (Grafikon 84).

Isto tako, ni ukupna aktivnost SOD u homogenatima tkiva jetre se nije značajno promenila usled tretmana folnom kiselinom u poređenju sa H-28 i K-28 grupom, $p > 0,05$ (Grafikon 85).

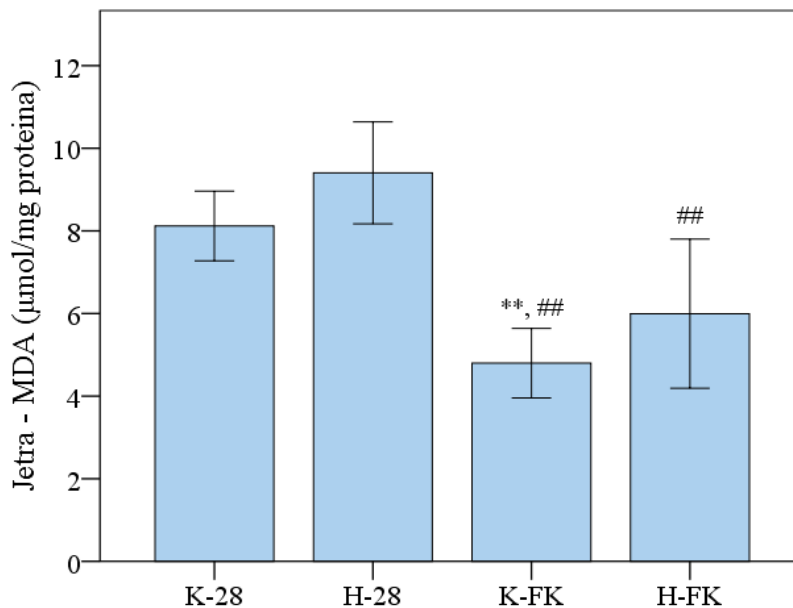
Sa druge strane, tretman folnom kiselinom doveo je do statistički visoko značajnog sniženja koncentracije MDA u homogenatima tkiva jetre u obe tretirane grupe (K-FK: $4,798 \pm 0,843$ $\mu\text{mol/mg}$ proteina, $p < 0,01$, H-FK: $5,995 \pm 1,803$ $\mu\text{mol/mg}$ proteina, $p < 0,01$) u odnosu na H-28 grupu ($9,404 \pm 1,234$ $\mu\text{mol/mg}$ proteina). Takođe samostalni tretman folnom kiselinom je u K-FK grupi doveo do visoko značajnog sniženja koncentracije MDA u poređenju sa kontrolom K-28 ($8,120 \pm 0,844$ $\mu\text{mol/mg}$ proteina), $p < 0,01$ (Grafikon 86).



Grafikon 84. Efekti aplikacije folne kiseline na aktivnost katalaze u tkivu jetre. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Kruskal-Wallis test.



Grafikon 85. Efekti aplikacije folne kiseline na ukupnu aktivnost superoksid dismutaze u tkivu jetre. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.

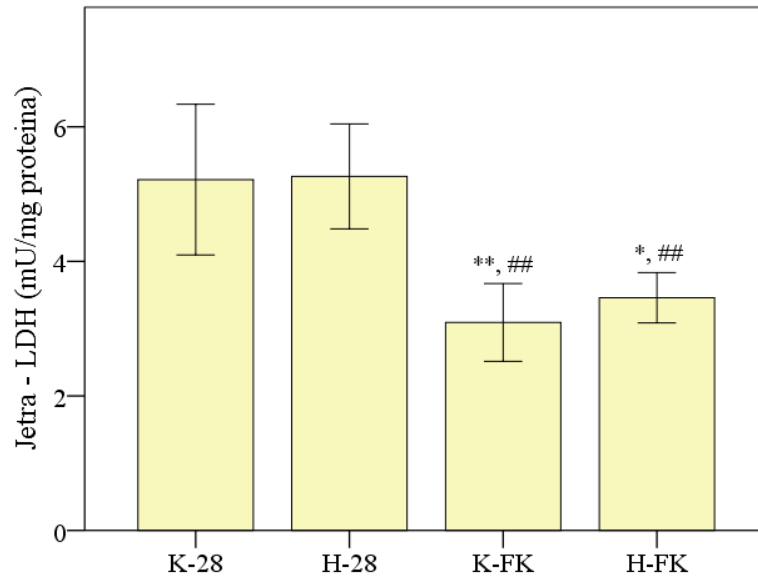


Grafikon 86. Efekti aplikacije folne kiseline na koncentraciju malondialdehida u tkivu jetre. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa H-28 grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.

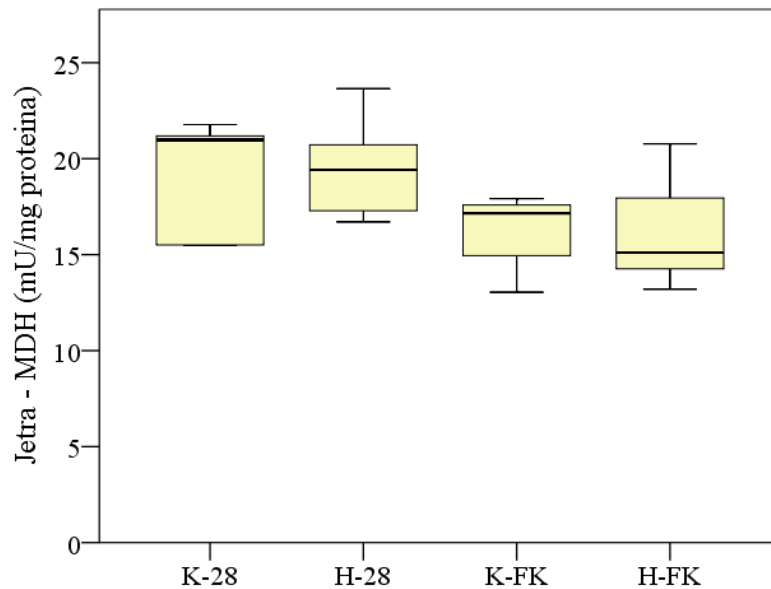
4.3.7.2. Efekti aplikacije folne kiseline na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu jetre

Tretman folnom kiselinom doveo je do statistički visoko značajnog sniženja ukupne aktivnosti LDH u homogenatima tkiva jetre u obe tretirane grupe (K-FK: $3,092 \pm 0,578$ mU/mg proteina, $p < 0,01$, H-FK: $3,460 \pm 0,374$ mU/mg proteina, $p < 0,01$) u poređenju sa H-28 grupom ($5,263 \pm 0,781$ mU/mg proteina). Takođe sniženje aktivnosti LDH u tkivu jetre u grupama tretiranim folnom kiselinom prisutno je i u odnosu na kontrolu K-28 ($5,216 \pm 1,120$ mU/mg proteina), $p < 0,01$ naspram K-FK i $p < 0,05$ naspram H-FK (Grafikon 87).

Sa druge strane, aplikacija FK nije statistički značajno uticala na promenu aktivnosti MDH u homogenatima tkiva jetre, $p > 0,05$ (Grafikon 88).



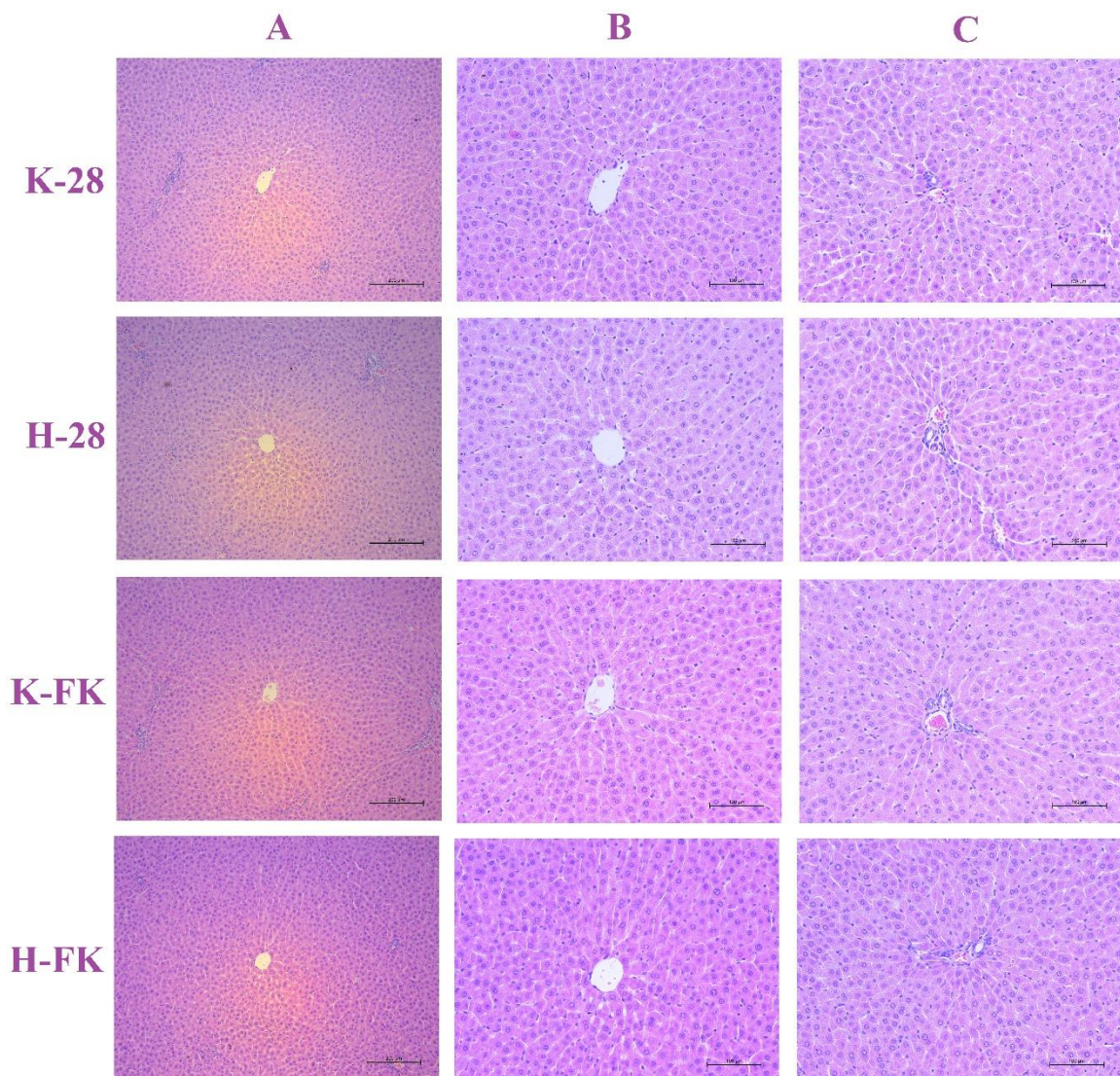
Grafikon 87. Efekti aplikacije folne kiseline na ukupnu aktivnost laktat dehidrogenaze u tkivu jetre. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa H-28 grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.



Grafikon 88. Efekti aplikacije folne kiseline na ukupnu aktivnost malat dehidrogenaze u tkivu jetre. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Kruskal-Wallis test.

4.3.8. Efekti aplikacije folne kiseline na histološke promene jetre

Histološka analiza tkiva jetre u grupama tretiranim folnom kiselinom pokazuje fiziološki radijalni raspored jetrinih gredica prema centralnoj veni. Jetrini lobulusi su očuvane arhitektonike (Slika 40). Ne primećuje se proširenje sinusoidnih kapilara između gredica hepatocita i njihova orijentacija je pravilna. Portni prostori sadrže ogranke a. hepaticae propriae, v. portae i interlobularnih žučnih kanalića i očuvane su građe. Hepatociti sadrže jedno do dva pravilna, okrugla, euhromatska jedra u kojima se uočava formirano jedarce, kao i eozinofilnu citoplazmu sa pojedinim bazofilnim zonama koje odgovaraju endoplazmatskom retikulumu. Ne uočava se mikro i makro vezikularna masna promena hepatocita. Nije uočljiva fibroza, niti ciroza. Ne uočava se zastoj žuči.



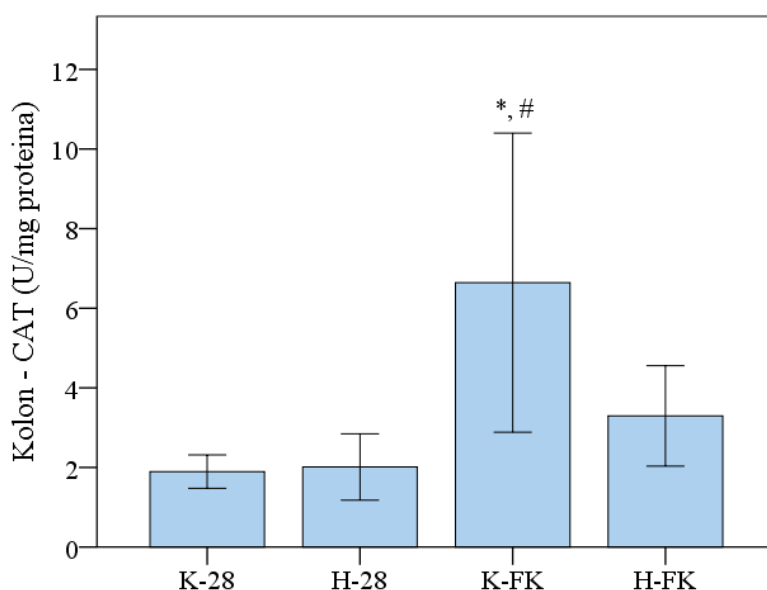
Slika 40. Fotomikrografije preparata tkiva jetre - hematoksilin/eozin bojenje: A - centar lobulusa, uveličanje x100, B - centar lobulusa, uveličanje x200, C - centar acinusa - portni prostor, uveličanje x200. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana.

4.3.9. Efekti aplikacije folne kiseline na biohemijske parametre u tkivu kolona

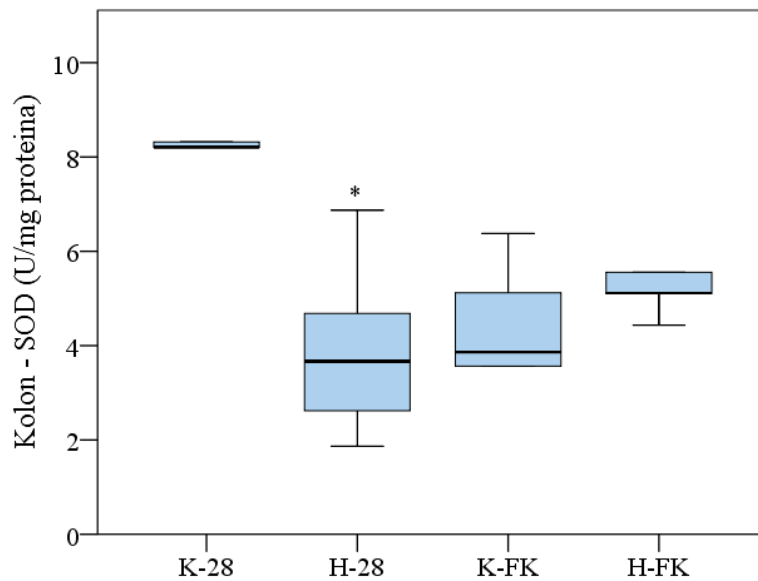
4.3.9.1. Efekti aplikacije folne kiseline na parametre oksidativnog stresa u tkivu kolona

Aktivnost katalaze u homogenatima tkiva kolona bila je statistički visoko značajno povišena u K-FK grupi ($6,643 \pm 3,757$ U/mg proteina) u odnosu na K-28 ($1,895 \pm 0,421$ U/mg proteina), $p < 0,05$ i H-28 grupi ($2,012 \pm 0,834$ U/mg proteina), $p < 0,05$. Sa druge strane, povećanje aktivnosti katalaze u tkivu kolona nije prisutno u grupi kojoj je pored FK aplikovan i homocistein (H-FK), $p > 0,05$ (Grafikon 89).

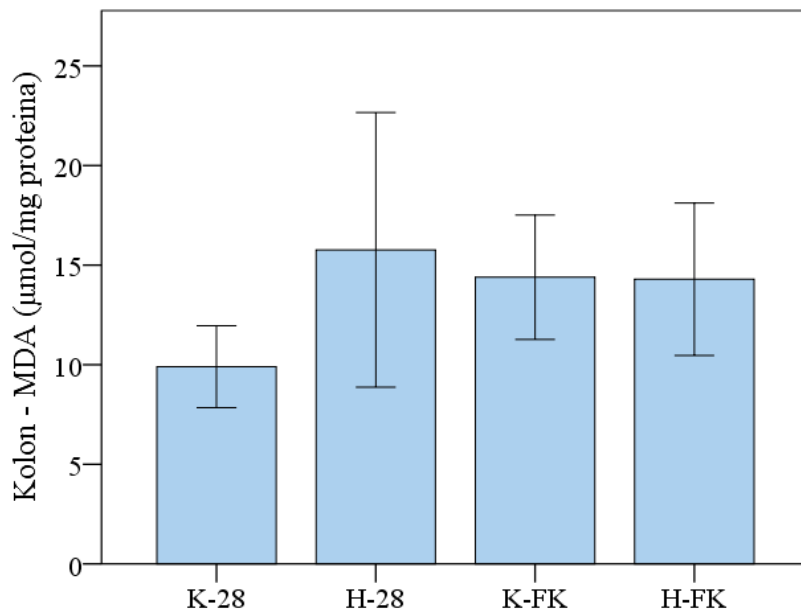
Tretman folnom kiselinom nije statistički značajno uticao na aktivnost superoksid dismutaze ($p > 0,05$) (Grafikon 90) i koncentraciju malondialdehida ($p > 0,05$) u homogenatima tkiva kolona, u odnosu na K-28 i H-28 grupu (Grafikon 91).



Grafikon 89. Efekti aplikacije folne kiseline na aktivnost katalaze u tkivu kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom, # $p < 0,05$ u poređenju sa H-28 grupom - Welch ANOVA test sa Games-Howell post hoc testom.



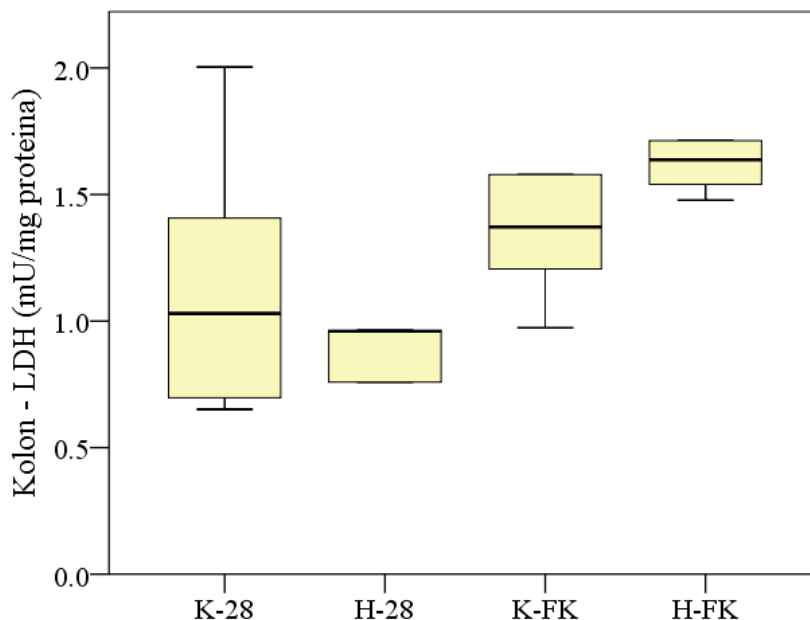
Grafikon 90. Efekti aplikacije folne kiseline na ukupnu aktivnost superoksid dismutaze u tkivu kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom - Kruskal-Wallis test sa Dunn post hoc testom.



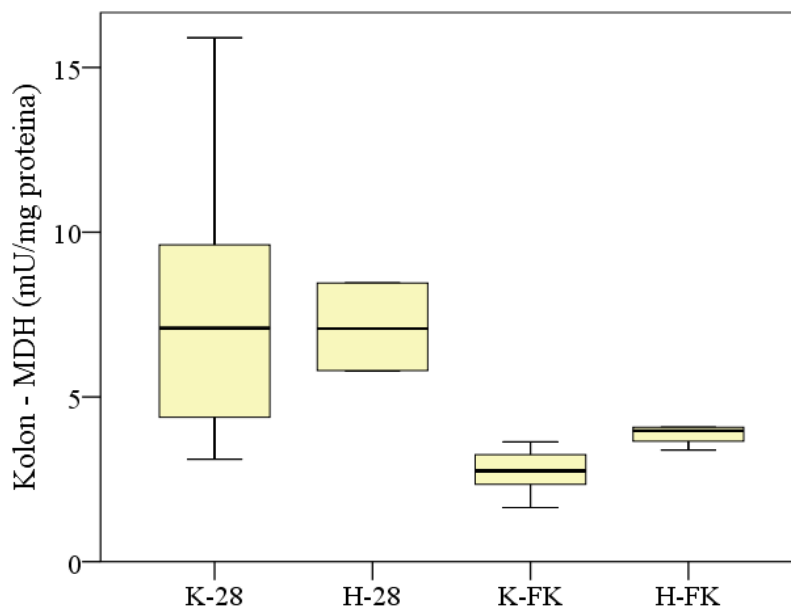
Grafikon 91. Efekti aplikacije folne kiseline na koncentraciju malondialdehida u tkivu kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.

4.3.9.2. Efekti aplikacije folne kiseline na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu kolona

Aplikacija FK nije ostvarila statistički značajan uticaj na promenu aktivnosti metaboličkih enzima LDH ($p > 0,05$) (Grafikon 92) i MDH ($p > 0,05$) (Grafikon 93) u homogenatima tkiva kolona u odnosu na K-28 i H-28 grupu.



Grafikon 92. Efekti aplikacije folne kiseline na ukupnu aktivnost laktat dehidrogenaze u tkivu kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Kruskal-Wallis test.



Grafikon 93. Efekti aplikacije folne kiseline na ukupnu aktivnost malat dehidrogenaze u tkivu kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Kruskal-Wallis test.

4.3.10. Efekti aplikacije folne kiseline na histološke promene i histomorfometrijske parametre kolona

U grupama tretiranim folnom kiselinom (K-FK i H-FK) mikroskopski isečci kolona pokazuju normalnu arhitektoniku, bez znakova za inflamatorne bolesti creva, nisu uočljivi znaci kriptitisa niti kriptni apscesi. U zidu kolona nisu uočljive erozije i ulceracije. Uzroci ne pokazuju tumorske izmene epitela (Slika 41).

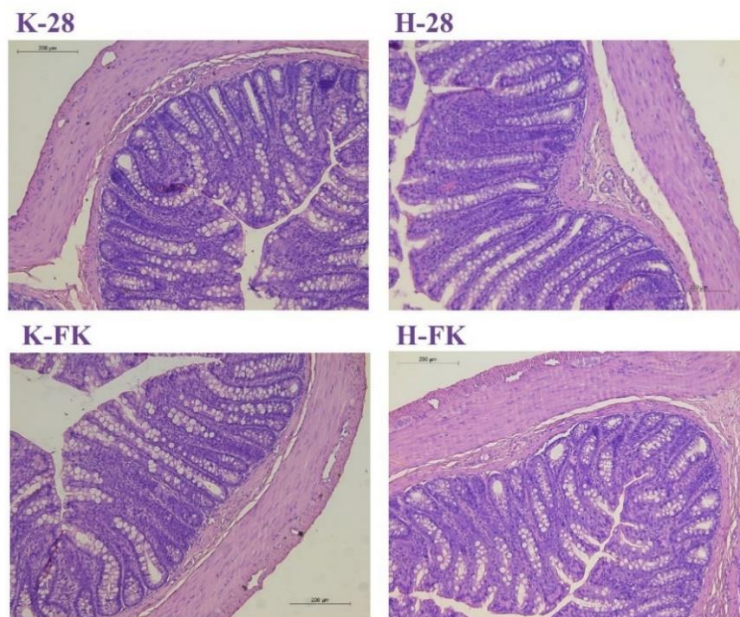
Dubina Liberkinovih kripti kolona je statistički visoko značajno manja u grupama tretiranim folnom kiselinom (K-FK: $360,259 \pm 22,331 \mu\text{m}$, $p < 0,01$, H-FK: $352,618 \pm 11,123 \mu\text{m}$) u poređenju sa H-28 grupom ($402,866 \pm 10,052 \mu\text{m}$) (Grafikon 94).

Debljina tunike mukoze kolona bila je značajno manja u H-FK grupi ($383,638 \pm 8,170 \mu\text{m}$) u odnosu na K-28 grupu ($410,385 \pm 3,697 \mu\text{m}$), $p < 0,01$, H-28 grupu ($433,687 \pm 8,172 \mu\text{m}$), $p < 0,01$, kao i u odnosu na K-FK grupu ($401,570 \pm 11,651 \mu\text{m}$), $p < 0,05$ (Grafikon 95).

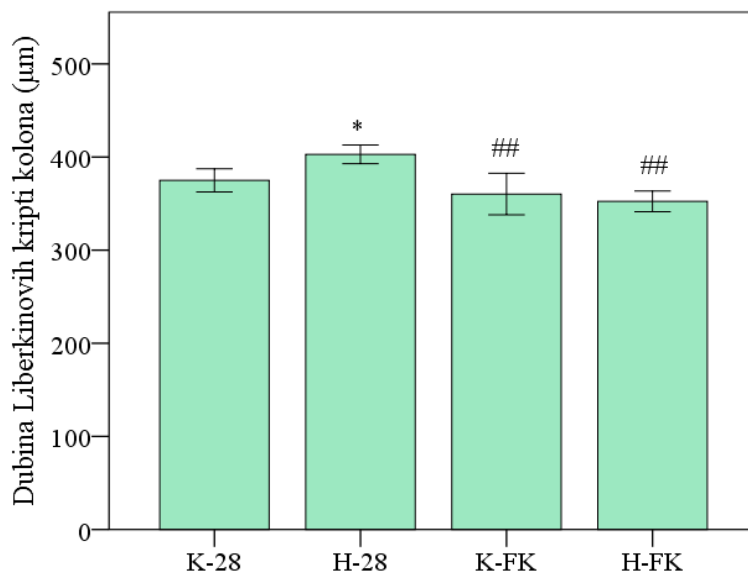
Debljina lamine muskularis mukoze kolona je statistički značajno veća u H-FK grupi ($22,717 \pm 0,609 \mu\text{m}$) u odnosu na K-28 ($20,249 \pm 1,066 \mu\text{m}$), $p < 0,05$ i H-28 grupu ($20,375 \pm 1,214 \mu\text{m}$), $p < 0,05$ (Grafikon 96).

Ukupna debljina zida kolona je statistički značajno manja u H-FK grupi ($735,559 (663,230 - 748,468) \mu\text{m}$) u poređenju sa H-28 grupom ($797,841 (778,022 - 850,423) \mu\text{m}$), $p < 0,05$ (Grafikon 97).

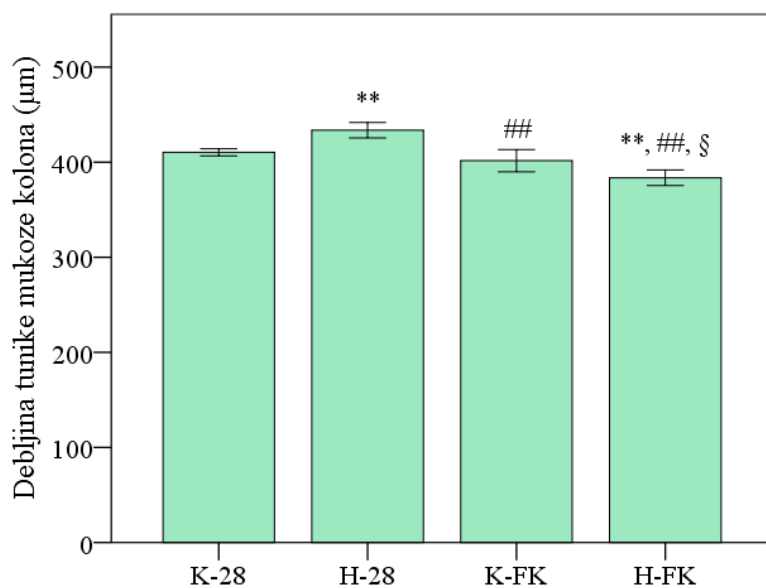
Broj ćelija u lamini propriji kolona se nije statistički značajno razlikovao između H-FK i H-28 grupe. Broja ćelija u lamini propriji kolona jedino je niži u K-FK grupi (997 ± 35 ćelija na $0,1 \text{ mm}^2$) u odnosu na H-28 grupu (1160 ± 76 ćelija na $0,1 \text{ mm}^2$), $p < 0,05$ (Grafikon 98).



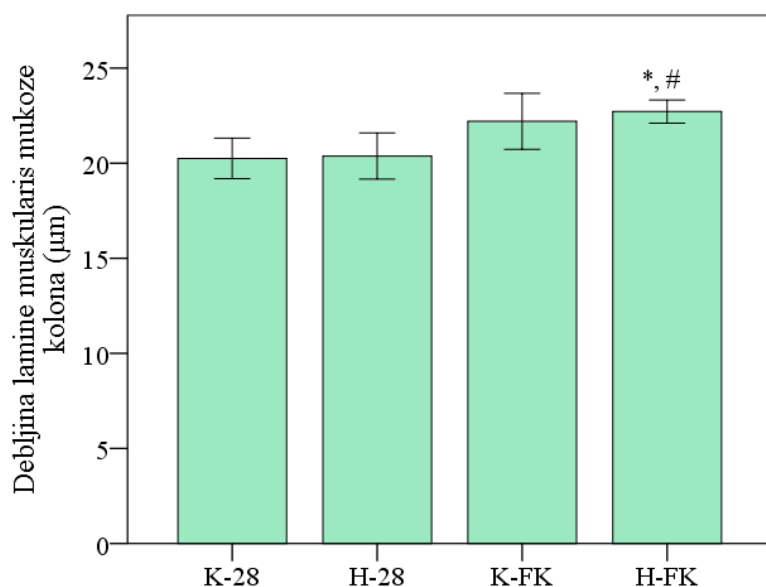
Slika 41. Poprečni presek kolona - hematoksilin/eozin bojenje, uveličanje x100. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana.



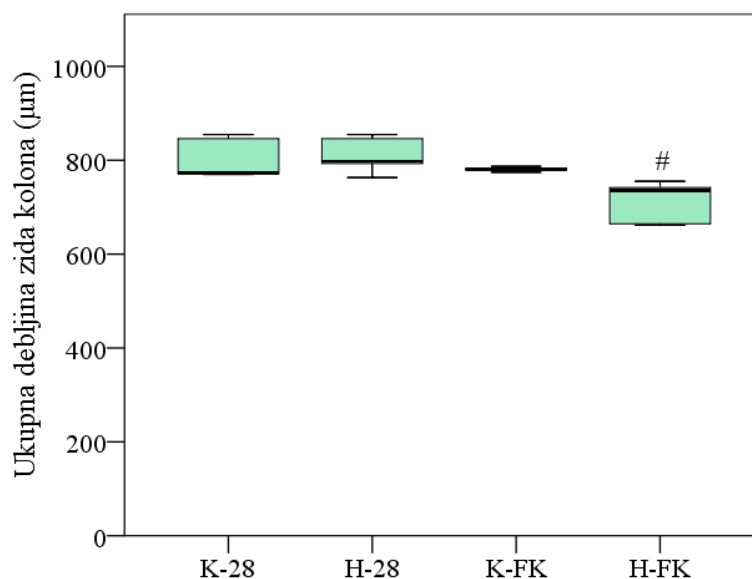
Grafikon 94. Efekti aplikacije folne kiseline na dubinu Liberkinovih kripti kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa H-28 grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.



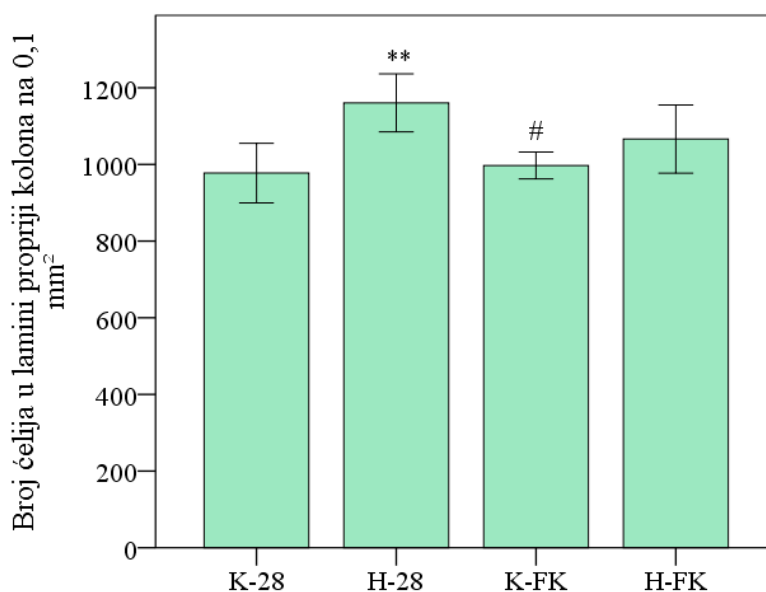
Grafikon 95. Efekti aplikacije folne kiseline na debljinu tunike mukoze kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. ** p < 0,01 u poređenju sa K-28 grupom, ## p < 0,01 u poređenju sa H-28 grupom, § p < 0,05 u poređenju sa K-FK grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.



Grafikon 96. Efekti aplikacije folne kiseline na debljinu lamine muskularis mukoze kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. * p < 0,05 u poređenju sa K-28 grupom, # p < 0,05 u poređenju sa H-28 grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.



Grafikon 97. Efekti aplikacije folne kiseline na ukupnu debljinu zida kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. # $p < 0,05$ u poređenju sa H-28 grupom - Kruskal-Wallis test sa Dunn post hoc testom.

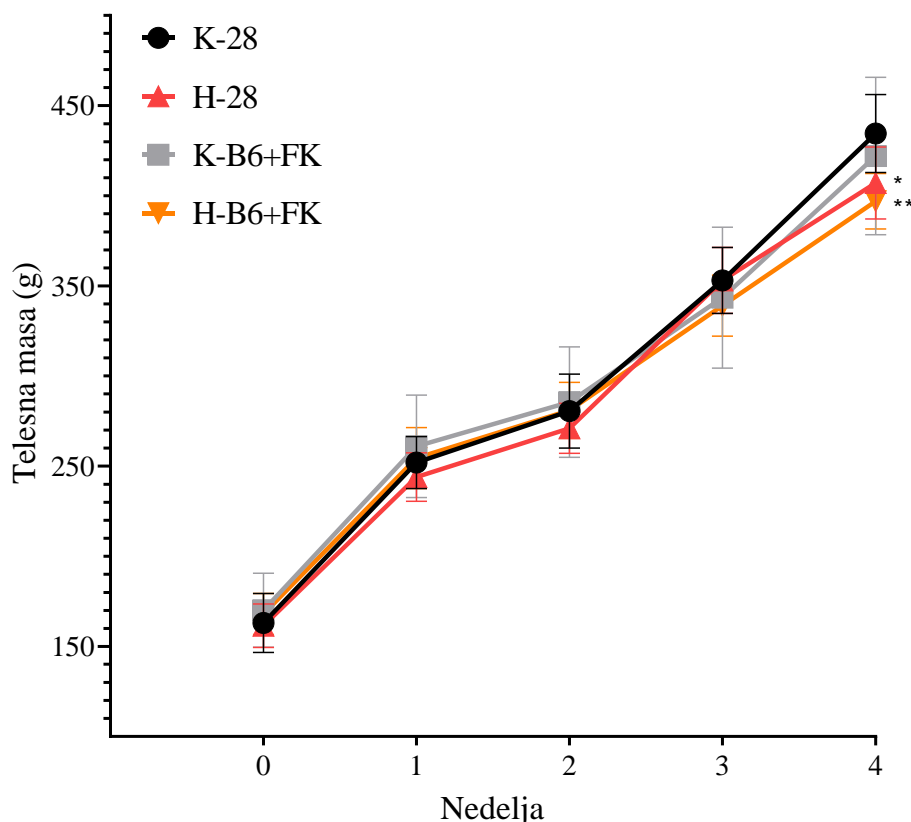


Grafikon 98. Efekti aplikacije folne kiseline na broj ćelija u lamini propriji kolona na 0,1 mm². K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-FK: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom, # $p < 0,05$ u poređenju sa H-28 grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.

4.4. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline u uslovima eksperimentalno izazvane hiperhomocisteinemije

4.4.1. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na telesnu masu eksperimentalnih životinja

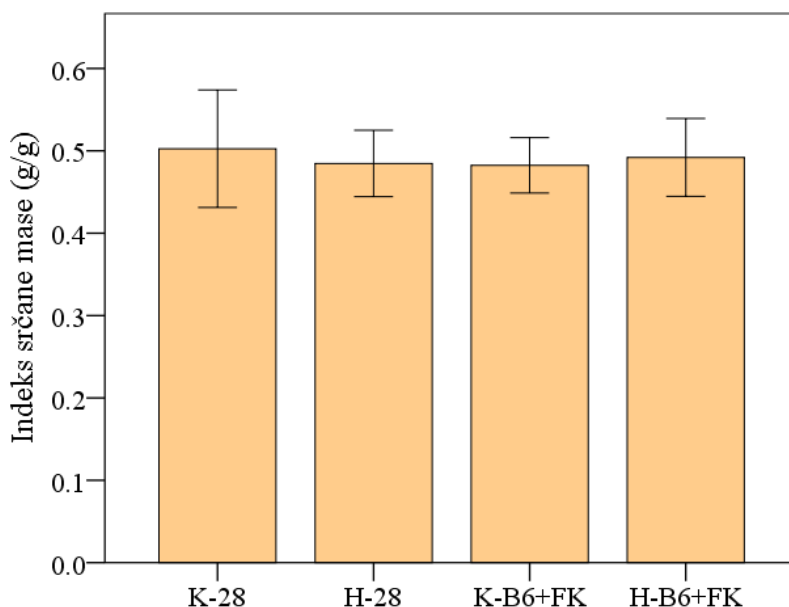
Statistički značajna razlika u masama životinja unutar različitih grupa prisutna je u poslednjoj nedelji eksperimentalnog ciklusa, grupe koje su tretirane homocisteinom (H-28, $p < 0,05$ i H-B6+FK $p < 0,01$) imaju manju telesnu masu u odnosu na životinje kontrolne grupe K-28. Kroz sve nedelje eksperimentalnog protokola životinje u K-B6+FK i životinje iz H-B6+FK grupe nisu međusobno imale statistički značajno različite telesne mase (Grafikon 99).



Grafikon 99. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na telesnu masu eksperimentalnih životinja kroz nedelje eksperimentalnog protokola. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom - Šidakov post hoc test.

4.4.2. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na indeks srčane mase

Životinje tretirane kombinovanom aplikacijom vitamina B6 i FK nisu se statistički značajno razlikovale u vrednosti ISM u odnosu na životinje K-28 i H-28 grupe, $p > 0,05$ (Grafikon 100).

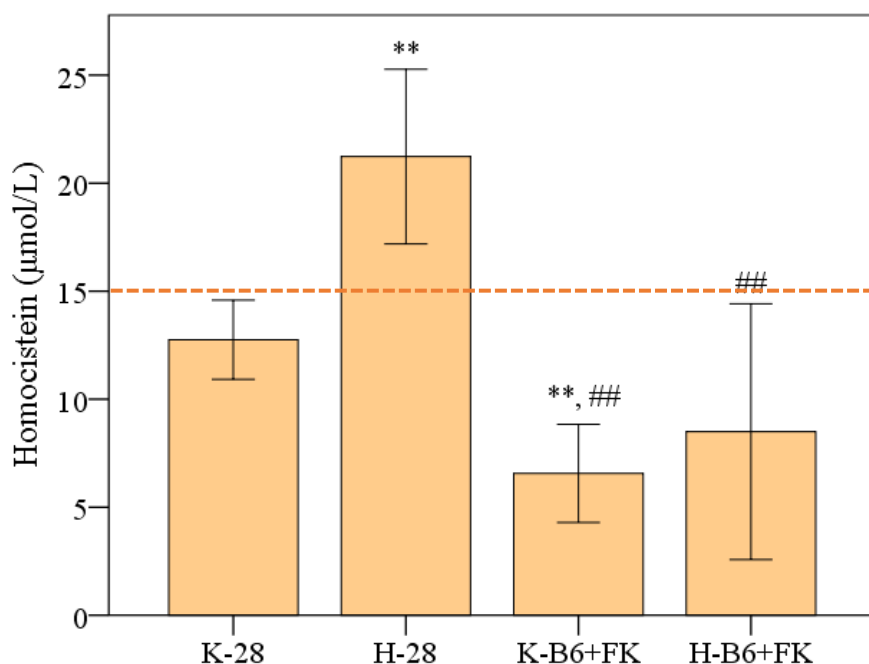


Grafikon 100. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na indeks srčane mase. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.

4.4.3. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na biohemijske parametre u serumu i plazmi

4.4.3.1. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na koncentraciju homocisteina u serumu

Koncentracija homocisteina u serumu je imala statistički visoko značajno niže vrednosti u obe grupe poje su tretirane kombinovanom aplikacijom vitamina B6 i FK (K-B6+FK: $6,6 \pm 2,3$ $\mu\text{mol/L}$, $p < 0,01$, H-B6+FK: $8,5 \pm 5,9$ $\mu\text{mol/L}$, $p < 0,01$) u odnosu na H-28 grupu ($21,2 \pm 4,0$ $\mu\text{mol/L}$). Takođe, kontrolna grupa K-B6+FK imala je statistički visoko značajno niže serumske koncentracije homocisteina u poređenju sa K-28 kontrolom koja je bila tretirana samo fiziološkim rastvorom ($12,7 \pm 1,8$ $\mu\text{mol/L}$), $p < 0,01$. Grupe K-B6+FK i H-B6+FK se međusobno nisu statistički značajno razlikovane u vrednostima serumske koncentracije homocisteina (Grafikon 101).



Grafikon 101. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na serumsku koncentraciju homocisteina. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. ** p < 0,01 u poređenju sa K-28 grupom, ## p < 0,01 u poređenju sa H-28 grupom - Welch ANOVA test sa Games-Howell post hoc testom.

4.4.3.2. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na kardiovaskularne i hemostatske biomarkere u serumu i plazmi

Koncentracija LDL u serumu bila je statistički visoko značajno niža u H-B6+FK grupi ($0,09 \pm 0,07$ mmol/L) u odnosu na H-28 grupu ($0,26 \pm 0,10$ mmol/L), p < 0,01, kao i u K-B6+FK grupi ($0,13 \pm 0,09$ mmol/L) u odnosu na H-28 grupu, p < 0,01. Koncentracija vitamina B12 je bila statistički visoko značajno niža u obe grupe tretirane kombinovanom aplikacijom vitamina B6 i FK (K-B6+FK: $486,4 \pm 68,2$ pg/mL, p < 0,01, H-B6+FK: $463,5 \pm 66,1$ pg/mL, p < 0,01) u poređenju sa H-28 grupom ($627,2 \pm 81,3$ pg/mL) (Tabela 7).

Tabela 7. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na kardiovaskularne i hemostatske biomarkere u serumu i plazmi

Parametar	K-28	H-28	K-B6+FK	H-B6+FK
Hcy ($\mu\text{mol/L}$)a, s	12,7 \pm 1,8	21,2 \pm 4,0 **	6,6 \pm 2,3 **, ##	8,5 \pm 5,9 ##
HOL (mmol/L)b, s	1,76 (1,54 - 1,93)	1,81 (1,58 - 2,00)	1,56 (1,24 - 1,68)	1,58 (1,49 - 2,07)
HDL (mmol/L)b, s	1,25 (1,12 - 1,40)	1,29 (1,15 - 1,42)	1,20 (1,02 - 1,36)	1,27 (1,24 - 1,64)
LDL (mmol/L)c, s	0,16 \pm 0,09	0,26 \pm 0,10	0,13 \pm 0,09 ##	0,09 \pm 0,07 ##
TG (mmol/L)c, s	0,77 \pm 0,17	0,57 \pm 0,10	0,69 \pm 0,29	0,76 \pm 0,20
LDH (U/L)a, s	3546 \pm 1305	3323 \pm 666	3257 \pm 666	2865 \pm 604
hs-TnT (ng/L)b, s	22,0 (16,0 - 53,0)	21,5 (13,7 - 39,2)	24,0 (17,2 - 38,7)	15,5 (14,0 - 61,2)
Vitamin B12 (pg/mL)c, s	460,2 \pm 50,0	627,2 \pm 81,3 **	486,4 \pm 68,2 ##	463,5 \pm 66,1 ##
Folat (ng/mL)b, s	19,2 (19,0 - 20,0)	20,0 (20,0 - 20,0)	20,0 (20,0 - 20,0)	20,0 (20,0 - 20,0)
Fibrinogen (g/L)a, p	1,9 \pm 0,4	1,8 \pm 0,1	1,9 \pm 0,2	1,7 \pm 0,2
D-dimer < 0,17 mg/L p	10 (100 %)	10 (100 %)	10 (100 %)	10 (100 %)
vWF (%b, p	155,0 (122,2 - 167,5)	151,0 (144,5 - 166,5)	151,0 (145,2 - 151,0)	151,0 (144,7 - 151,0)

Hcy - homocistein, HOL - ukupni kolesterol, HDL - lipoprotein visoke gustine, LDL - lipoprotein niske gustine, TG - trigliceridi, LDH - laktat dehidrogenaza, hs-TnT - visoko senzitivni troponin T, vWF - vonWillebrand-ov faktor, s - vrednost merena u serumu, p - vrednost merena u plazmi. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. a - ** p < 0,01 u poređenju sa K-28 grupom, ## p < 0,01 u poređenju sa H-28 grupom - Welch ANOVA test sa Games-Howell post hoc testom, b - p < 0,05 - Kruskal-Wallis test, c - ** p < 0,01 u poređenju sa K-28 grupom, ## p < 0,01 u poređenju sa H-28 grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.

4.4.3.3. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na hepato-renalno-pankreatične biomarkere u serumu

Koncentracija glukoze je bila statistički visoko značajno viša u obe grupe tretirane kombinovanom aplikacijom vitamina B6 i FK (K-B6+FK: 6,35 (6,05 - 6,85) mmol/L, p < 0,01, H-B6+FK: 6,50 (6,35 - 6,80) mmol/L, p < 0,01) u poređenju sa kontrolom K-28 (5,19 (4,64 - 5,80) mmol/L). Koncentracija glukoze je takođe bila značajno viša i u H-B6+FK grupi u poređenju sa H-28 grupom (5,89 (5,67 - 6,13) mmol/L), p < 0,05. Koncentracija ukupnih proteina je bila povišena u H-B6+FK grupi (66,8 \pm 2,0 g/L) u poređenju sa K-28 grupom (63,7 \pm 3,1 g/L), p < 0,05, ali značajno niža u K-B6+FK grupi (64,9 \pm 2,1 g/L) u odnosu na H-28 grupu (68,2 \pm 3,1 g/L), p < 0,05. Koncentracija albumina je bila značajno niža u H-B6+FK grupi (45,7 \pm 1,6 g/L) u odnosu na H-28 grupu (48,1 \pm 2,3 g/L), p < 0,05, kao i visoko značajno niža u K-B6+FK grupi (44,9 \pm 1,7 g/L) u odnosu na H-28 grupu, p < 0,01. Koncentracija uree u serumu je bila značajno povišena u obe grupe tretirane kombinovanom aplikacijom vitamina B6 i FK (K-B6+FK: 10,7 (9,3 - 10,9) mmol/L, p < 0,01, H-B6+FK: 9,1 (8,4 - 9,9) mmol/L, p < 0,05) u poređenju sa kontrolom K-28 (7,5 (6,8 - 8,0) mmol/L). Takođe u K-B6+FK grupi serumska koncentracija uree je bila viša i u odnosu na H-28 grupu (8,4 (7,1 - 9,2) mmol/L), p < 0,05. Koncentracija kreatinina je bila niža u K-B6+FK (35,7 \pm 3,8 $\mu\text{mol/L}$, p < 0,05) i H-B6+FK grupi (33,5 \pm 2,7 $\mu\text{mol/L}$, p < 0,01) u odnosu na H-28 grupu (40,2 \pm 3,7 $\mu\text{mol/L}$). Koncentracija mokraćne kiseline u serumu je bila statistički značajno niža u H-B6+FK grupi (62,5 (60,5 - 79,5) $\mu\text{mol/mL}$) u poređenju sa kontrolom K-28 (87,5 (78,7 - 97,2) $\mu\text{mol/mL}$), p < 0,05 (Tabela 8).

Tabela 8. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na hepato-renalno-pankreatične biomarkere u serumu

Parametar	K-28	H-28	K-B6+FK	H-B6+FK
Glukoza (mmol/L) ^a	5,19 (4,64 - 5,80)	5,89 (5,67 - 6,13)	6,35 (6,05 - 6,85) **	6,50 (6,35 - 6,80) **, #
Ukupni proteini (g/L) ^b	63,7 ± 3,1	68,2 ± 3,1 **	64,9 ± 2,1 #	66,8 ± 2,0 *
Albumin (g/L) ^b	43,9 ± 1,7	48,1 ± 2,3 **	44,9 ± 1,7 ##	45,7 ± 1,6 #
AST (U/L) ^b	224 ± 47	218 ± 36	220 ± 41	214 ± 46
ALT (U/L) ^c	65,2 ± 13,7	62,9 ± 9,2	64,7 ± 5,2	63,8 ± 7,9
Urea (mmol/L) ^a	7,5 (6,8 - 8,0)	8,4 (7,1 - 9,2)	10,7 (9,3 - 10,9) **, #	9,1 (8,4 - 9,9) *
Kreatinin (μmol/L) ^b	35,3 ± 2,4	40,2 ± 3,7 **	35,7 ± 3,8 #	33,5 ± 2,7 ##
Mokraćna kiselina (μmol/mL) ^a	87,5 (78,7 - 97,2)	75,5 (68,7 - 90,0)	71,5 (60,7 - 78,7)	62,5 (60,5 - 79,5) *
Amilaza (U/mL) ^a	3471 (2912 - 3671)	3499 (3334 - 4203)	3393 (2869 - 4083)	3449 (3209 - 3884)
CRP < 0,06 mg/L	10 (100 %)	10 (100 %)	10 (100 %)	10 (100 %)

AST - aspartat aminotransferaza, ALT - alanin aminotransferaza, CRP - C reaktivni protein. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 μmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. a - * p < 0,05 u poređenju sa K-28 grupom, ** p < 0,01 u poređenju sa K-28 grupom, ## p < 0,01 u poređenju sa H-28 grupom - Kruskal-Wallis test sa Dunn post hoc testom, b - * p < 0,05 u poređenju sa K-28 grupom, ** p < 0,01 u poređenju sa K-28 grupom, # p < 0,05 u poređenju sa H-28 grupom, ## p < 0,01 u poređenju sa H-28 grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom, c - p > 0,05 - Welch ANOVA test.

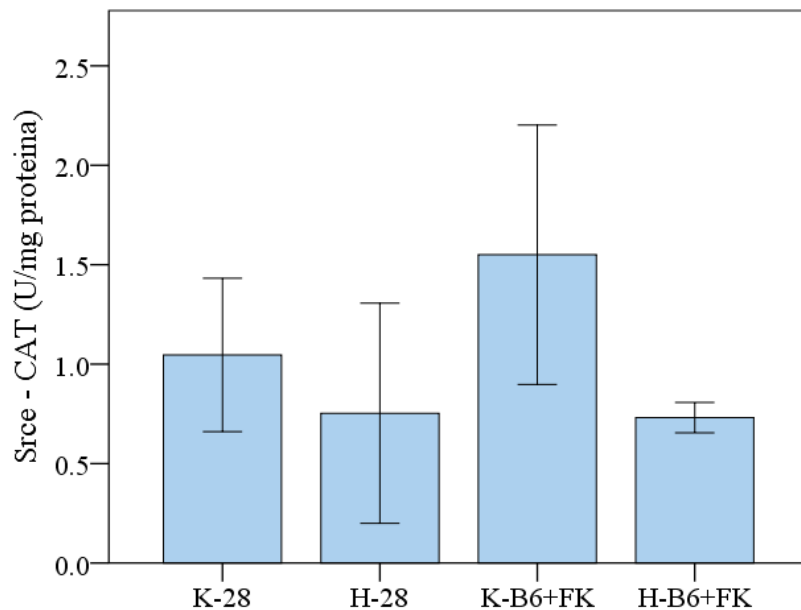
4.4.4. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na biohemijske parametre u tkivu srca

4.4.4.1. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na parametre oksidativnog stresa u tkivu srca

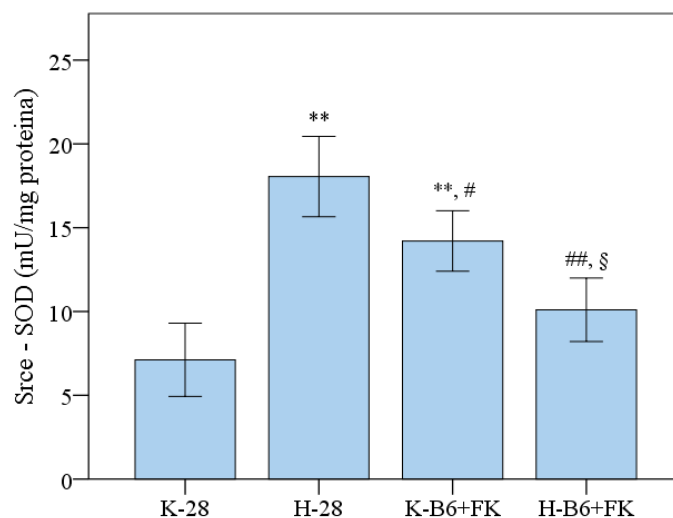
Aktivnost katalaze u homogenatima tkiva srca se nije statistički značajno razlikovala u K-B6+FK (1,550 ± 0,652 U/mg proteina) i H-B6+FK grupi (0,731 ± 0,766 U/mg proteina) u odnosu na H-28 i K-28 grupu (Grafikon 102).

Ukupna aktivnost SOD je u grupama tretiranim kombinovanom aplikacijom vitamina B6 i FK (K-B6+FK: 14,207 ± 1,804 U/mg proteina, p < 0,05, H-B6+FK: 10,103 ± 1,891 U/mg proteina, p < 0,01), bila statistički značajno niža u poređenju sa H-28 grupom (18,052 ± 2,398 U/mg proteina) (Grafikon 103).

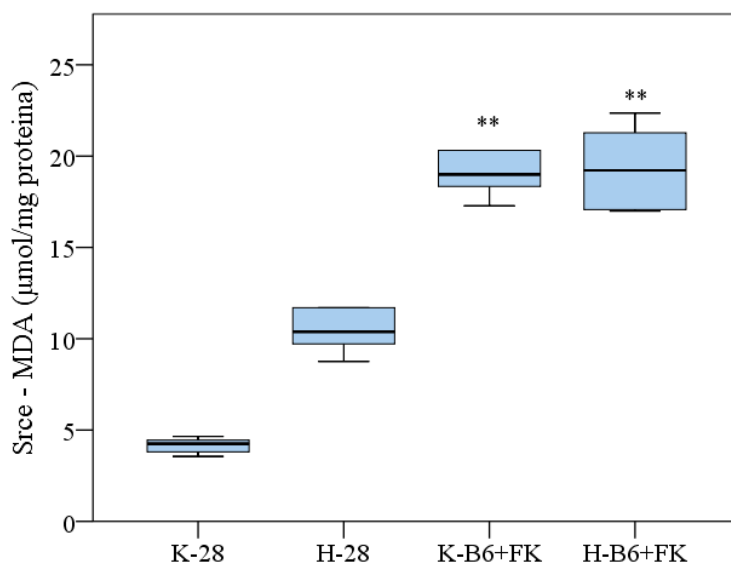
Koncentracija MDA je bila statistički visoko značajno viša u K-B6+FK (18,997 (17,810 - 25,891) μmol/mg proteina, p < 0,01) i H-B6+FK grupi (19,223 (17,029 - 21,814) μmol/mg proteina, p < 0,01) u odnosu na kontrolu K-28 (4,254 (6,679 - 4,551) μmol/mg proteina) (Grafikon 104).



Grafikon 102. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na aktivnost katalaze u tkivu srca. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.



Grafikon 103. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na ukupnu aktivnost superoksid dismutaze u tkivu srca. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom, # - $p < 0,05$ u poređenju sa H-28 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa H-28 grupom, § $p < 0,05$ u poređenju sa K-B6+FK grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.

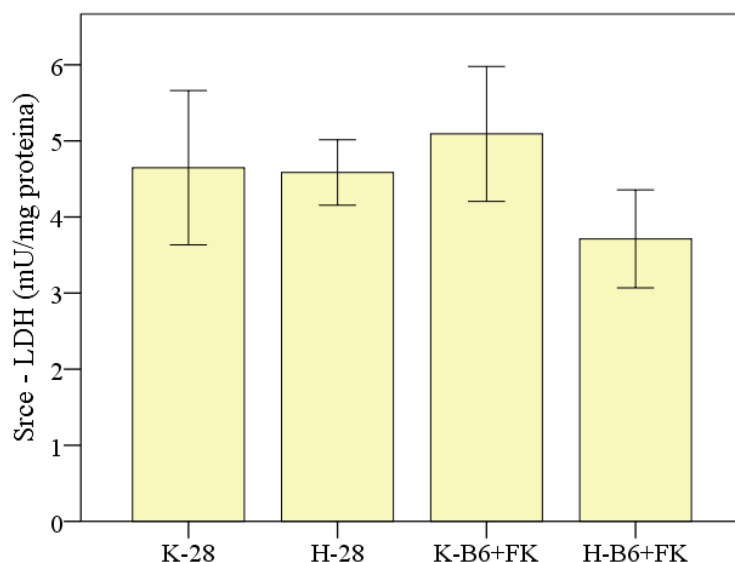


Grafikon 104. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na koncentraciju malondialdehida u tkivu srca. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom - Kruskal-Wallis test sa Dunn post hoc testom.

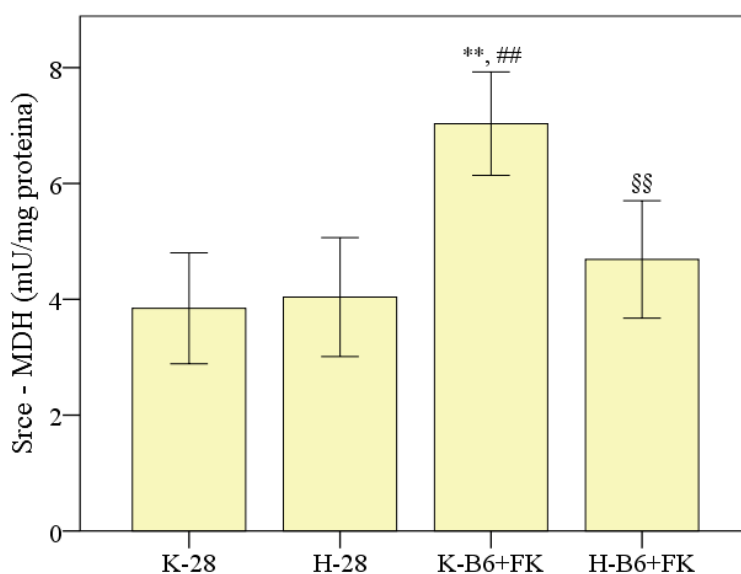
4.4.4.2. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu srca

Ukupna aktivnost LDH u homogenatima tkiva srca nije se statistički značajno razlikovala u grupama tretiranim kombinovanom aplikacijom vitamina B6 i FK u poređenju sa K-28 i H-28 grupom. Najniža vrednost ukupne aktivnosti LDH u srcu primećuje se u H-B6+FK grupi ali bez dostizanja statističke značajnosti (Grafikon 105).

Ukupna aktivnost MDH u homogenatima tkiva srca je bila statistički visoko značajno viša u K-B6+FK grupi ($7,032 \pm 0,893$ mU/mg proteina) u odnosu na K-28 ($3,884 \pm 0,958$ mU/mg proteina), $p < 0,01$ i H-28 grupu ($4,039 \pm 1,026$ mU/mg proteina), $p < 0,01$. U H-B6+FK ($4,689 \pm 1,013$ mU/mg proteina) grupi primećuje se statistički visoko značajno niža ukupna aktivnost MDH u tkivu srca u poređenju sa K-B6+FK grupom, $p < 0,01$ (Grafikon 106).



Grafikon 105. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na ukupnu aktivnost laktat dehidrogenaze u tkivu srca. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.



Grafikon 106. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na ukupnu aktivnost malat dehidrogenaze u tkivu srca. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa H-28 grupom, §§ $p < 0,01$ u poređenju sa K-B6+FK grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.

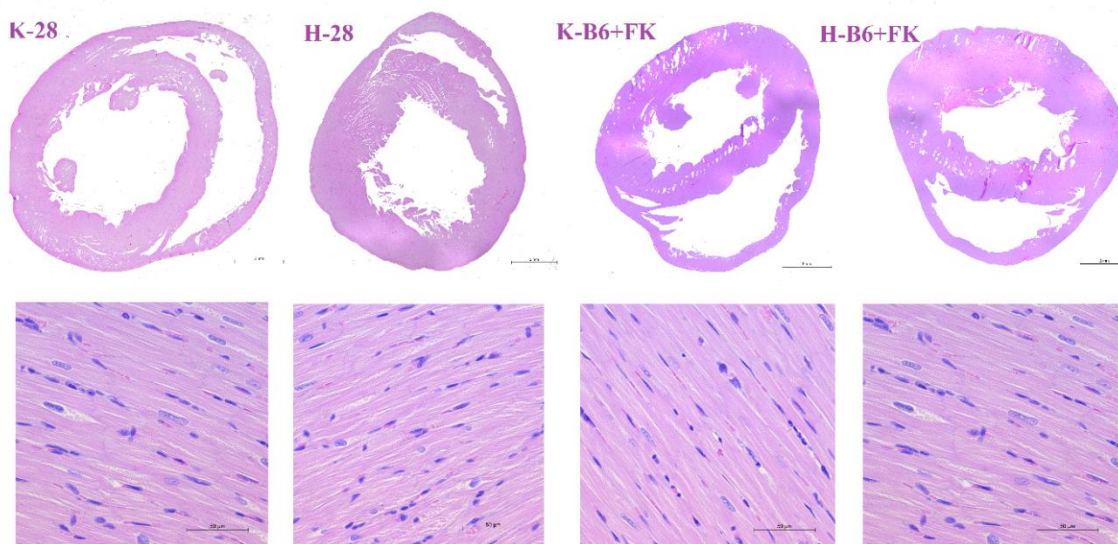
4.4.5. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na histološke promene i histomorfometrijske parametre srca

Na slici 42 prikazane su reprezentativne fotomikrografije uzoraka tkiva srca na malom i velikom uveličanju. U svim ispitivanim grupama primećuje se pravilan raspored vlakna miokarda, a kardiomiociti su zadržali fiziološku morfologiju (Slika 42). Nisu uočena polja nekroze niti zone proliferacije vezivnog tkiva.

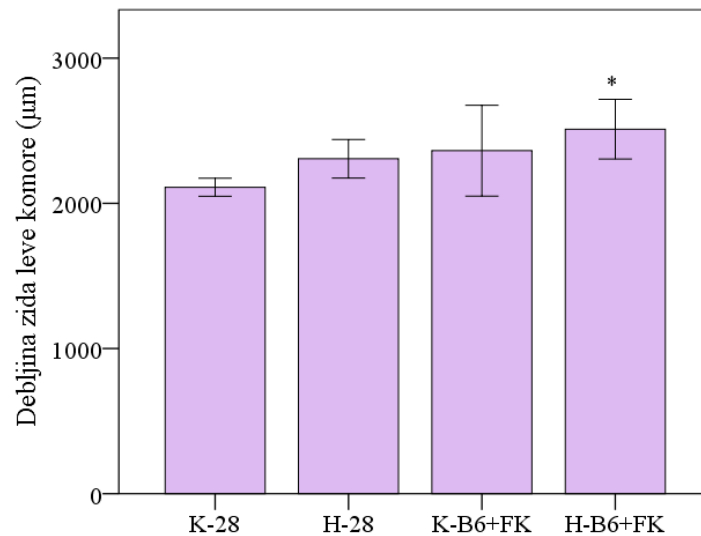
Debljina zida leve komore pokazuje statistički značajno višu vrednost u H-B6+FK ($2510,894 \pm 205,858 \mu\text{m}$) grupi u poređenju sa kontrolom K-28 ($2110,814 \pm 62,286 \mu\text{m}$), $p < 0,05$ (Grafikon 107).

Debljina zida desne komore bila je statistički visoko značajno niža u K-B6+FK ($777,082 \pm 59,444 \mu\text{m}$), $p < 0,01$ i H-B6+FK grupi ($756,628 \pm 51,717 \mu\text{m}$), $p < 0,01$ u poređenju sa H-28 grupom ($2307,074 \pm 133,123 \mu\text{m}$) (Grafikon 108).

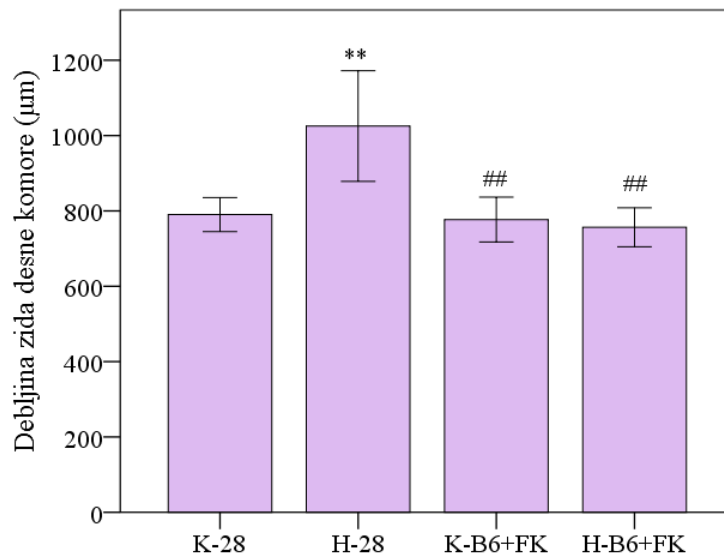
Debljina interventrikularnog septuma (Grafikon 109) i transversalni dijametar kardiomiocita (Grafikon 110) se nisu statistički značajno razlikovali u grupama koje su tretirane kombinovanom aplikacijom vitamina B6 i fole kiseline u poređenju sa K-28 i H-28 grupom.



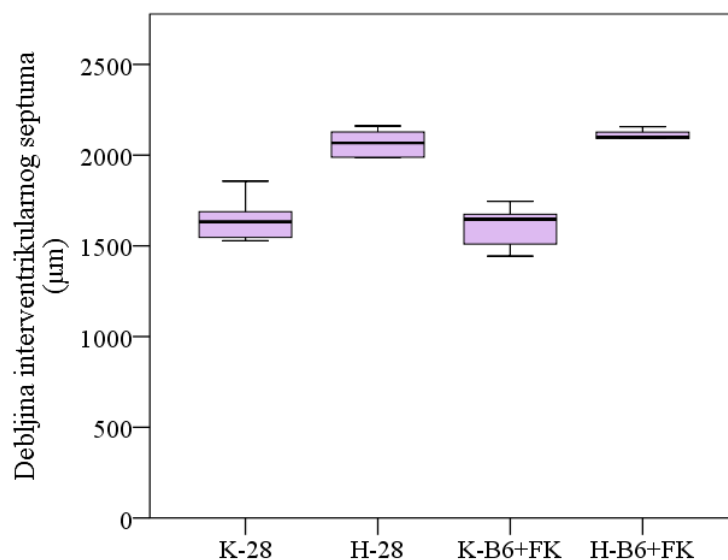
Slika 42. Poprečni presek srca - hematoksilin/eozin bojenje (A: uveličanje x50, B: uveličanje x400). K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana.



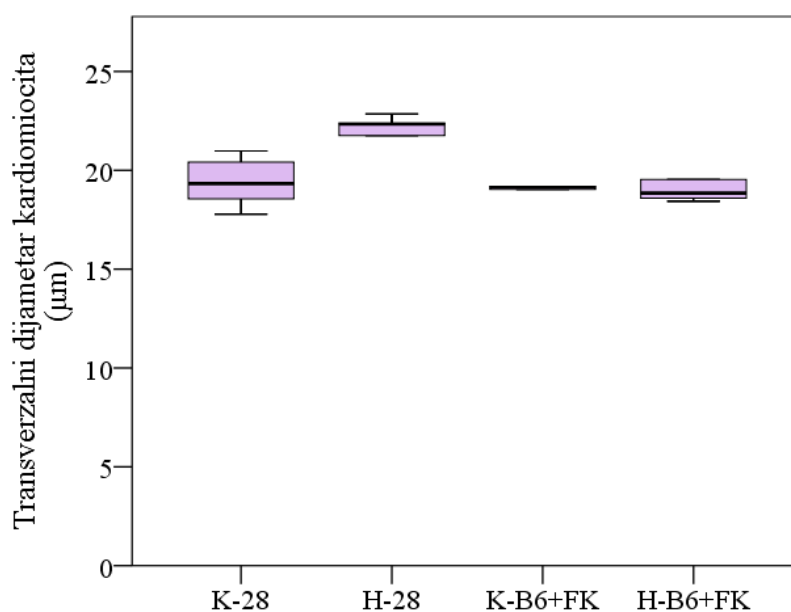
Grafikon 107. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na debljinu zida leve komore. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom - Welch ANOVA test sa Games-Howell post hoc testom.



Grafikon 108. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na debljinu zida desne komore. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa H-28 grupom - Welch ANOVA test sa Games-Howell post hoc testom.



Grafikon 109. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na debljinu interventrikularnog septuma. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Kruskal-Wallis test.

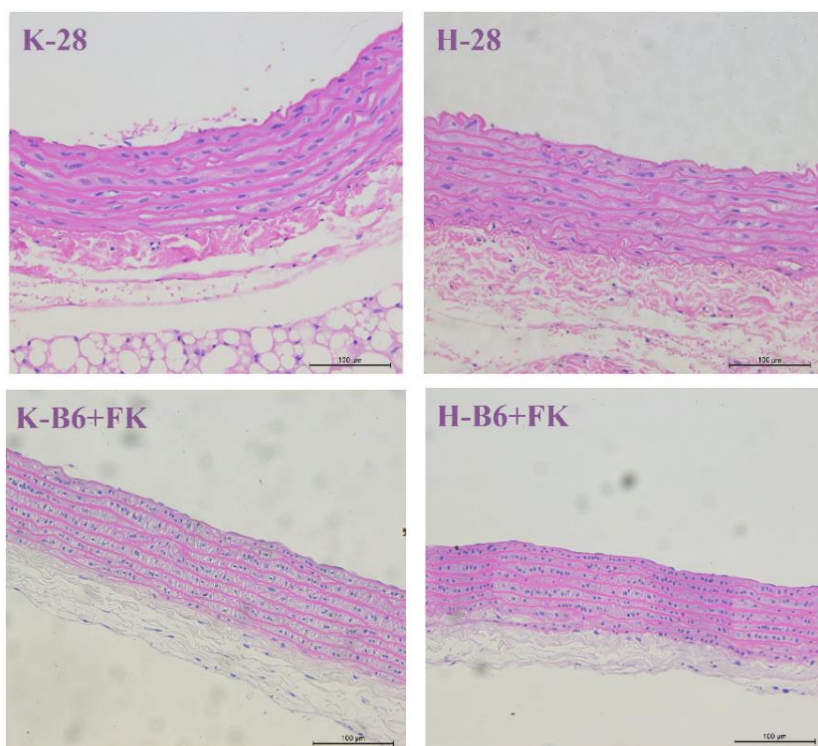


Grafikon 110. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na transverzalni dijamer kardiomociota. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Kruskal-Wallis test.

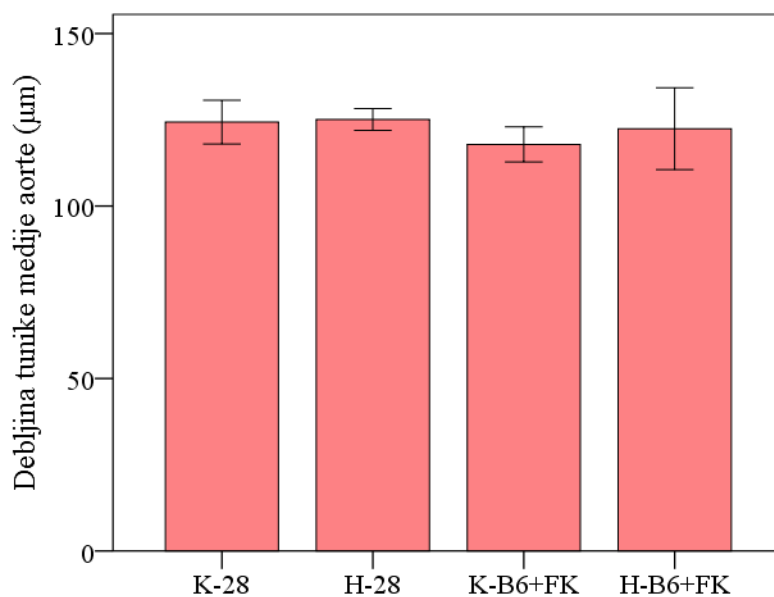
4.4.6. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na histološke promene i histomorfometrijske parametre aorte

Histomorfometrijska analiza tkiva aorte pokazuje da ne postoji statistički značajna razlika u debljini tunike medije u grupama koje su tretirane kombinovanom aplikacijom vitamina B6 i FK u poređenju sa H-28 i K-28 grupom, $p > 0,05$ (Grafikon 111).

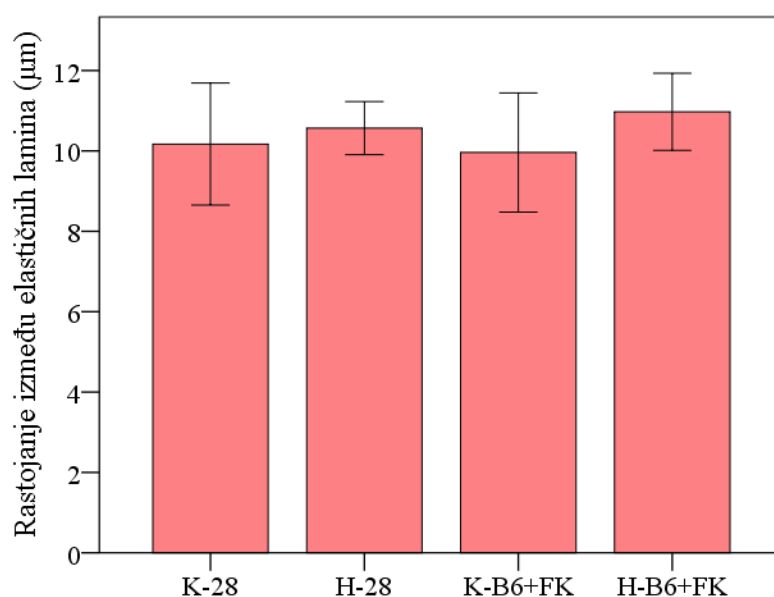
Isto tako ispitivane grupe se nisu statistički značajno razlikovane ni u rastojanju između elastičnih lamina u zidu aorte, $p > 0,05$ (Grafikon 112), kao ni u njihovom broju, $p > 0,05$ (Grafikon 113).



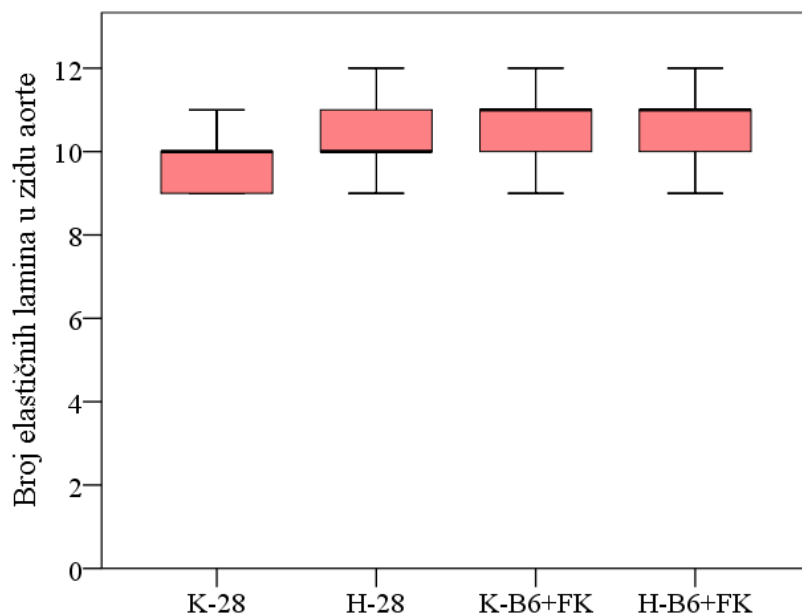
Slika 43. Poprečni presek aorte, hematoksilin/eozin bojenje, uveličanje x200. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana.



Grafikon 111. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na debljinu tunike medije aorte. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.



Grafikon 112. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na rastojanje između elastičnih lamina u zidu aorte. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.



Grafikon 113. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na broj elastičnih lamina u zidu aorte. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Kruskal-Wallis test.

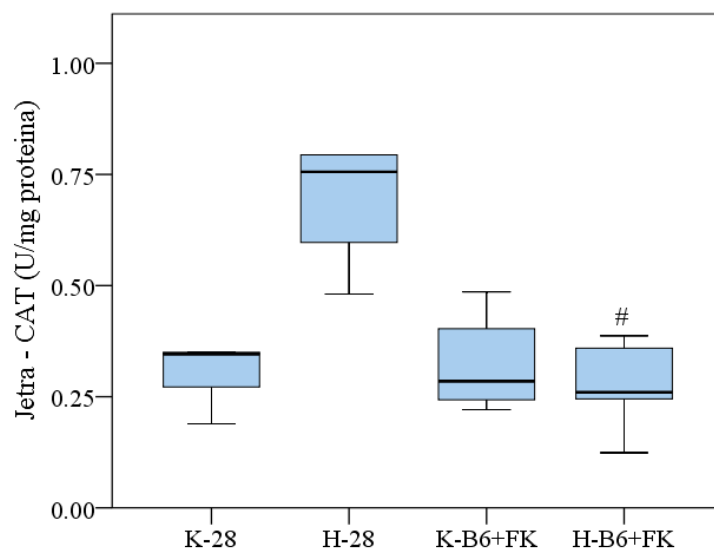
4.4.7. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na biohemijske parametre u tkivu jetre

4.4.7.1. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na parametre oksidativnog stresa u tkivu jetre

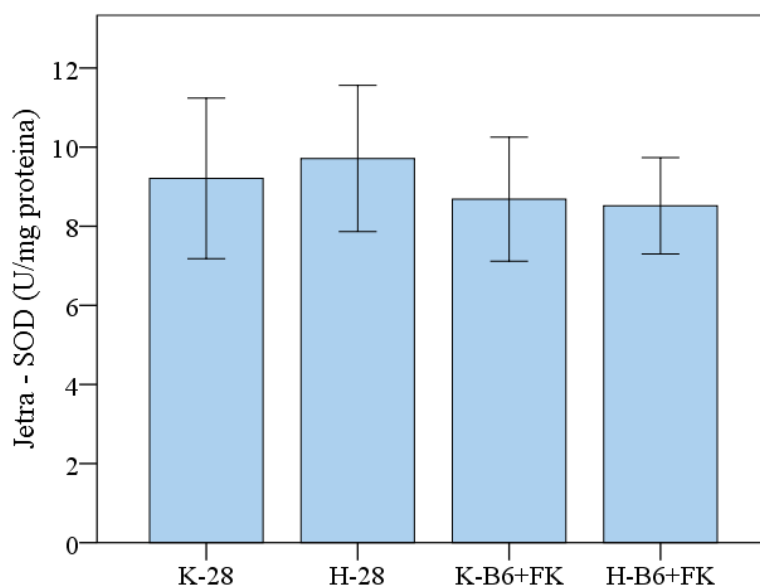
Aktivnost katalaze u homogenatima tkiva jetre je bila statistički značajno niža u H-B6+FK grupi (0,260 (0,184 - 0,373) U/mg proteina) u poređenju sa H-28 grupom (0,756 (0,539 - 1,320) U/mg proteina), $p < 0,05$ (Grafikon 114).

Ukupna aktivnost SOD u homogenatima tkiva jetre nije pokazala statistički značajnu razliku u grupama koje su tretirane kombinovanom aplikacijom vitamina B6 i FK u odnosu na K-28 i H-28 grupu (Grafikon 115).

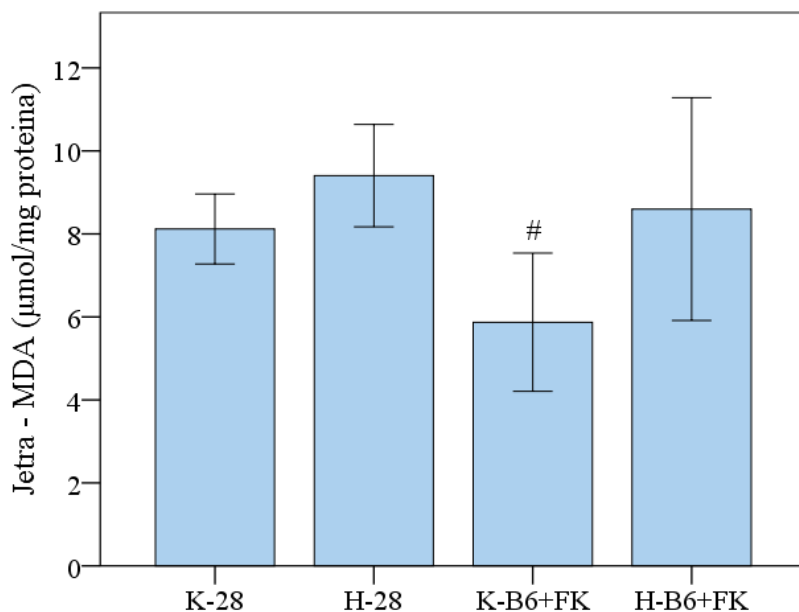
Koncentracija malondialdehida u homogenatima tkiva jetre bila je niža u K-B6+FK grupi ($5,872 \pm 1,667$ $\mu\text{mol/mg}$ proteina) u poređenju sa H-28 grupom ($9,404 \pm 1,234$ $\mu\text{mol/mg}$ proteina), $p < 0,05$, ali ne i u H-B6+FK grupi (Grafikon 116).



Grafikon 114. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na aktivnost katalaze u tkivu jetre. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. # $p < 0,05$ u poređenju sa H-28 grupom - Kruskal-Wallis test sa Dunn post hoc testom.



Grafikon 115. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na ukupnu aktivnost superoksid dismutaze u tkivu jetre. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.

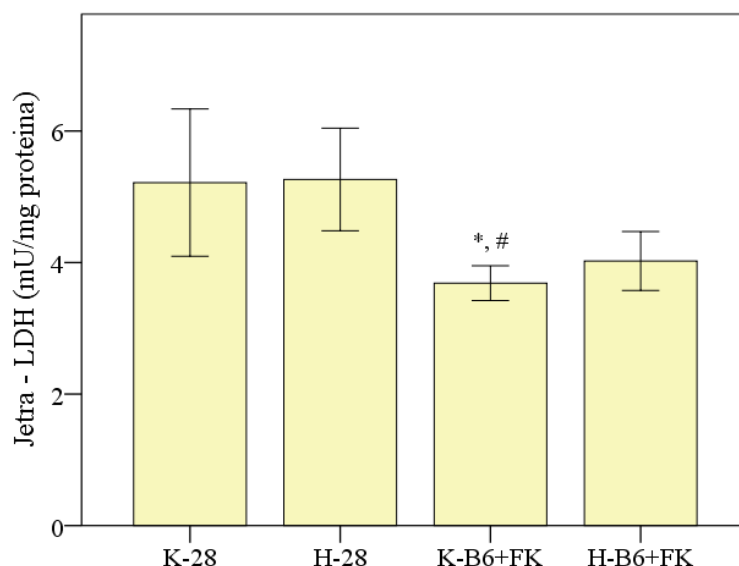


Grafikon 116. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na koncentraciju malondialdehida u tkivu jetre. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. # $p < 0,05$ u poređenju sa H-28 grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.

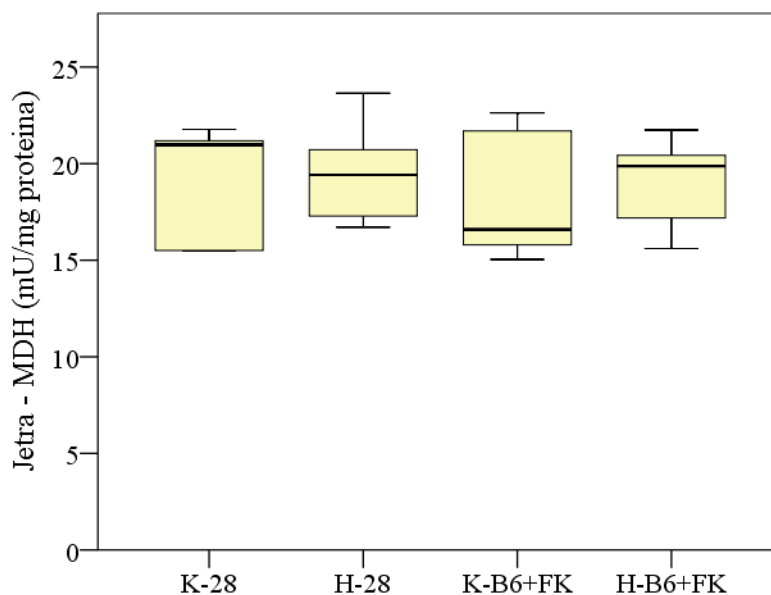
4.4.7.2. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu jetre

Ukupna aktivnost LDH u homogenatima tkiva jetre je bila statistički značajno niža u K-B6+FK grupi ($3,687 \pm 0,264$ mU/mg proteina) u poređenju sa K-28 ($5,216 \pm 1,120$ mU/mg proteina), $p < 0,05$ i H-28 grupom ($5,263 \pm 0,781$ mU/mg proteina), $p < 0,05$ (Grafikon 117). Ukupna aktivnost LDH u tkivu jetre u H-B6+FK grupi je imala niže vrednosti u odnosu na K-28 i H-28 ali bez dostizanja statističke značajnosti.

Ukupna aktivnost MDH se nije statistički značajno razlikovala u K-B6+FK i H-B6+FK grupi u odnosu na K-28 i H-28 grupu (Grafikon 118).



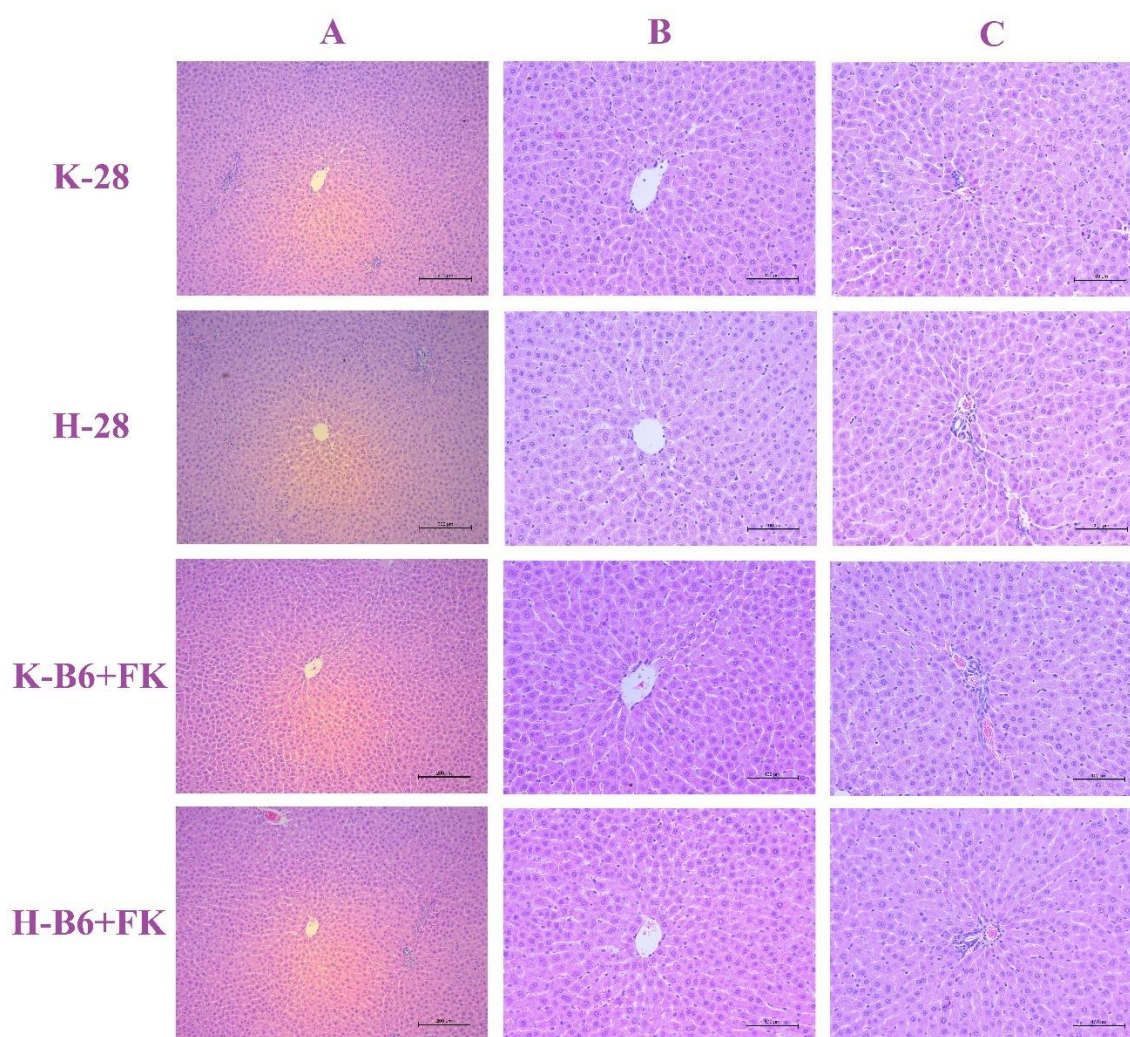
Grafikon 117. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na ukupnu aktivnost laktat dehidrogenaze u tkivu jetre. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom, # $p < 0,05$ u poređenju sa H-28 grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.



Grafikon 118. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na ukupnu aktivnost malat dehidrogenaze u tkivu jetre. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Kruskal-Wallis test.

4.4.8. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na histološke promene jetre

Histološka analiza tkiva jetre u grupama tretiranim kombinovanom aplikacijom vitamina B6 i FK pokazuje fiziološki radijalni raspored jetrinih gredica prema centralnoj veni. Jetrini lobulusi su očuvane arhitektonike (Slika 44). Ne primećuje se proširenje sinusoidnih kapilara između gredica hepatocita i njihova orijentacija je pravilna. Portni prostori sadrže ogranke a. hepaticae propriae, v. portae i interlobularnih žučnih kanalića i očuvane su građe. Hepatociti sadrže jedno do dva pravilna, okrugla, euhromatska jedra u kojima se uočava formirano jedarce, kao i eozinofilnu citoplazmu sa pojedinim bazofilnim zonama koje odgovaraju endoplazmatskom retikulumu. Ne uočava se mikro i makro vezikularna masna promena hepatocita. Nije uočljiva fibroza, niti ciroza. Ne uočava se zastoj žuči.



Slika 44. Fotomikrografije preparata tkiva jetre - hematoksilin/eozin bojenje: A - centar lobulosa, uveličanje x100, B - centar lobulosa, uveličanje x200, C - centar acinusa - portni prostor, uveličanje x200. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana.

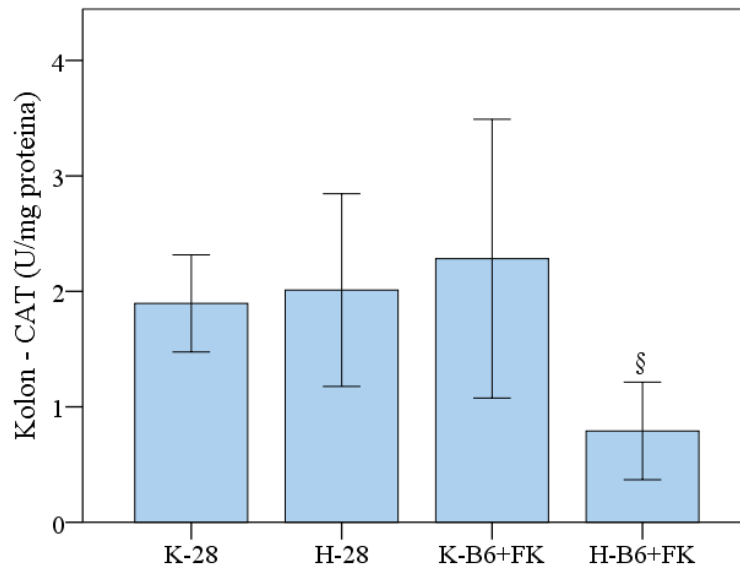
4.4.9. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na biohemijske parametre u tkivu kolona

4.4.9.1. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na parametre oksidativnog stresa u tkivu kolona

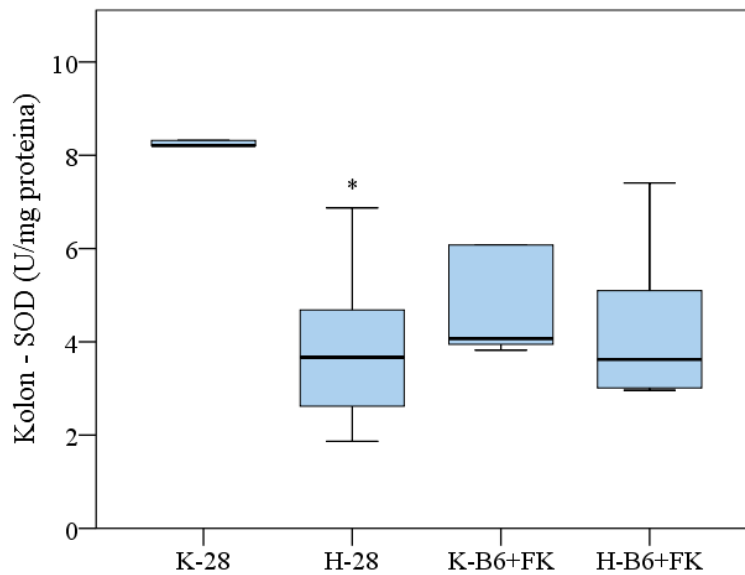
Aktivnost CAT u homogenatima tkiva kolona je bila statistički značajno niža u H-B6+FK grupi ($0,791 \pm 0,423$ U/mg proteina) u poređenju sa K-B6+FK grupom ($2,283 \pm 1,207$ U/mg proteina), $p < 0,05$ (Grafikon 119).

Kombinovana aplikacija vitamina B6 i FK nije dovela do statistički značajne promene ukupne aktivnosti SOD u homogenatima tkiva kolona u tretiranim grupama u poređenju sa K-28 i H-28 grupom (Grafikon 120).

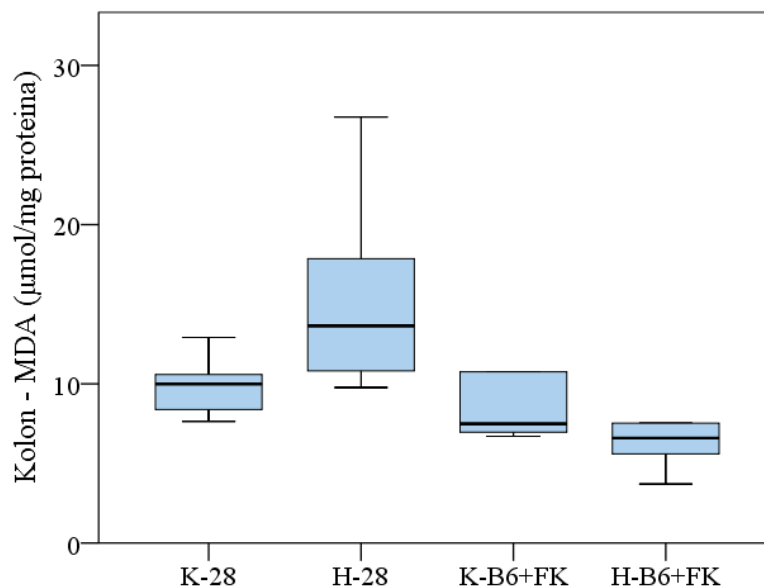
Isto tako, koncentracija MDA u homogenatima tkiva kolona se nije statistički značajno razlikovala u K-B6+FK i H-B6+FK grupama u odnosu na K-28 i H-28 grupe (Grafikon 121).



Grafikon 119. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na aktivnost katalaze u tkivu kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. § $p < 0,05$ u poređenju sa K-B6+FK grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.



Grafikon 120. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na ukupnu aktivnost superoksid dismutaze u tkivu kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom - Kruskal-Wallis test sa Dunn post hoc testom.

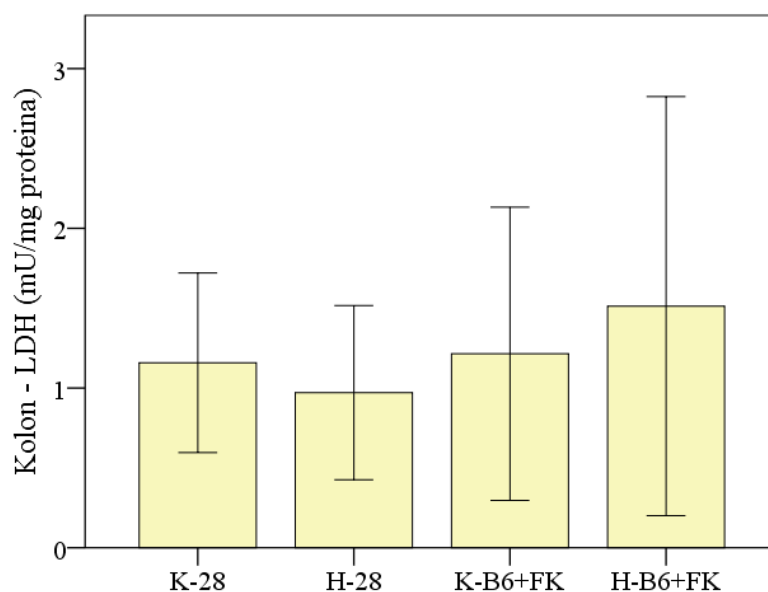


Grafikon 121. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na ukupnu aktivnost superoksid dismutaze u tkivu kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Kruskal-Wallis test.

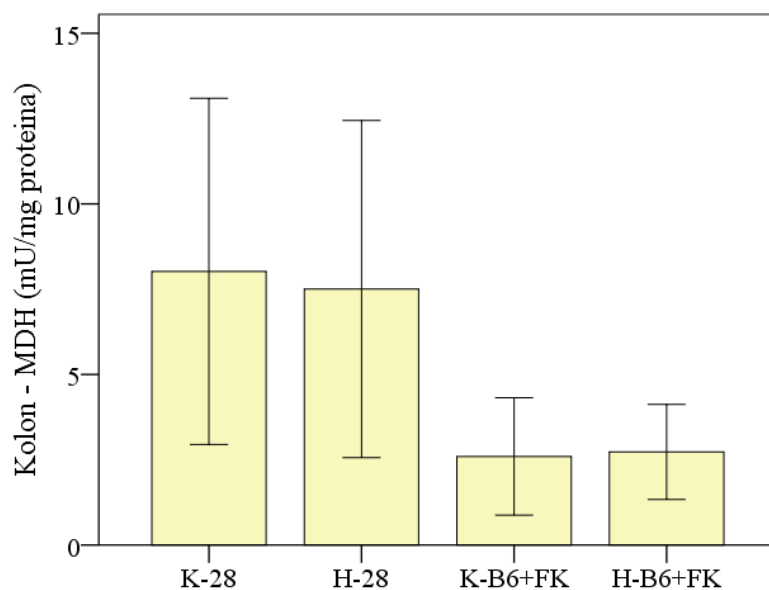
4.4.9.2. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu kolona

Ukupna aktivnost LDH u homogenatima tkiva kolona nije pokazala statistički značajnu razliku u K-B6+FK i H-B6+FK grupi u odnosu na K-28 i H-28 grupu (Grafikon 122).

Takođe, statistički značajna razlika se ne primećuje ni u ukupnoj aktivnosti MDH u homogenatima tkiva kolona u grupama tretiranim kombinovanom aplikacijom vitamina B6 i FK u poređenju sa K-28 i H-28 grupom (Grafikon 123).



Grafikon 122. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na ukupnu aktivnost laktat dehidrogenaze u tkivu kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.



Grafikon 123. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na ukupnu aktivnost malat dehidrogenaze u tkivu kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.

4.4.10. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na histološke promene i histomorfometrijske parametre kolona

U grupama tretiranim kombinovanom aplikacijom vitamina B6 i FK (K-B6+FK i H-B6+FK) mikroskopski isecci kolona pokazuju normalnu arhitektoniku, bez znakova za inflamatorne bolesti creva, nisu uocljivi znaci kriptitisa niti kriptni apscesi. U zidu kolona nisu uocljive erozije i ulceracije. Uzroci ne pokazuju tumorske izmene epitela (Slika 45).

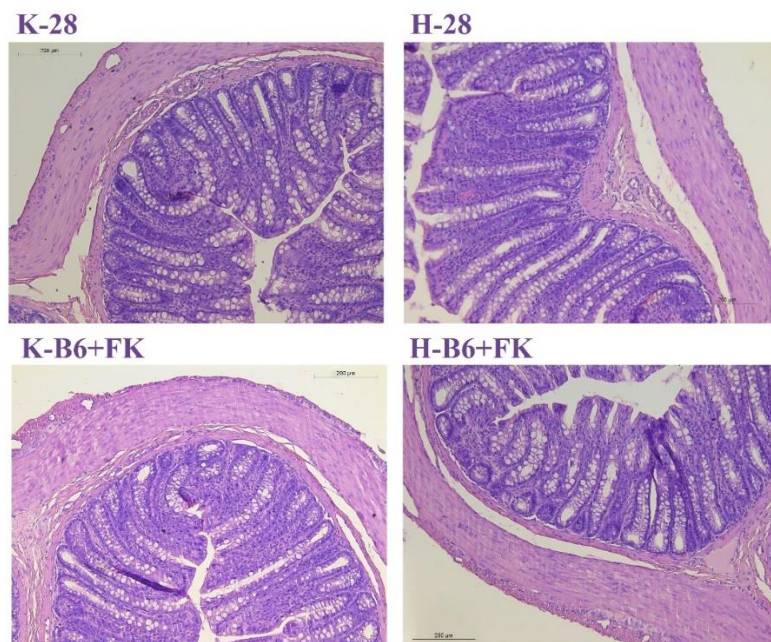
Dubina Liberkinovih kripti bila je statistički značajno manja u K-B6+FK grupi ($362,994 \pm 31,820 \mu\text{m}$) u odnosu na H-28 grupu ($402,866 \pm 10,052 \mu\text{m}$), $p < 0,05$ i statistički visoko značajno manja u H-B6+FK grupi ($346,834 \pm 21,518 \mu\text{m}$) u odnosu na H-28 grupu, $p < 0,01$ (Grafikon 124).

Debljina tunike mukoze kolona bila je značajno manja u K-B6+FK grupi ($397,131 \pm 16,022 \mu\text{m}$) u odnosu na H-28 grupu ($433,687 \pm 8,172 \mu\text{m}$), $p < 0,05$ (Grafikon 125).

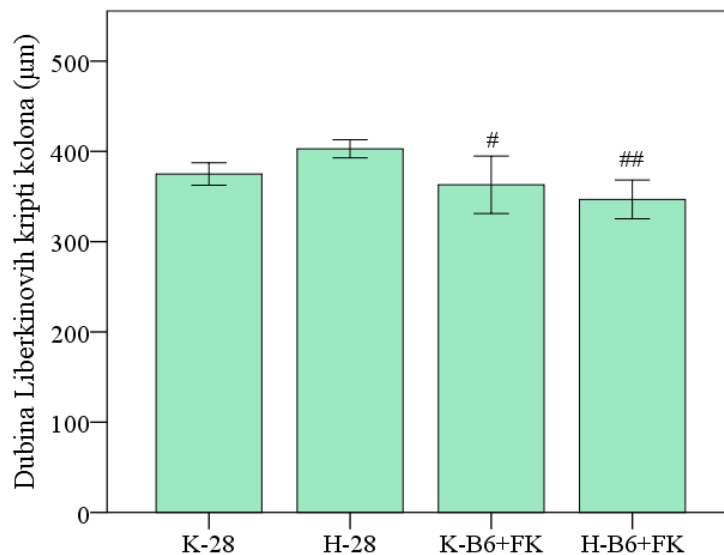
Debljina lamine muskularis mukoze kolona se nije statistički značajno razlikovala u K-B6+FK i H-B6+FK grupama u poređenju sa K-28 i H-28 grupom. (Grafikon 126).

Ukupna debljina zida kolona je statistički značajno manja u H-B6+FK grupi ($674,963 (668,658 - 755,182) \mu\text{m}$) u poređenju sa H-28 grupom ($797,841 (778,022 - 850,423) \mu\text{m}$), $p < 0,05$ i K-28 grupom ($773,601 (770,357 - 850,423) \mu\text{m}$), $p < 0,05$ (Grafikon 127).

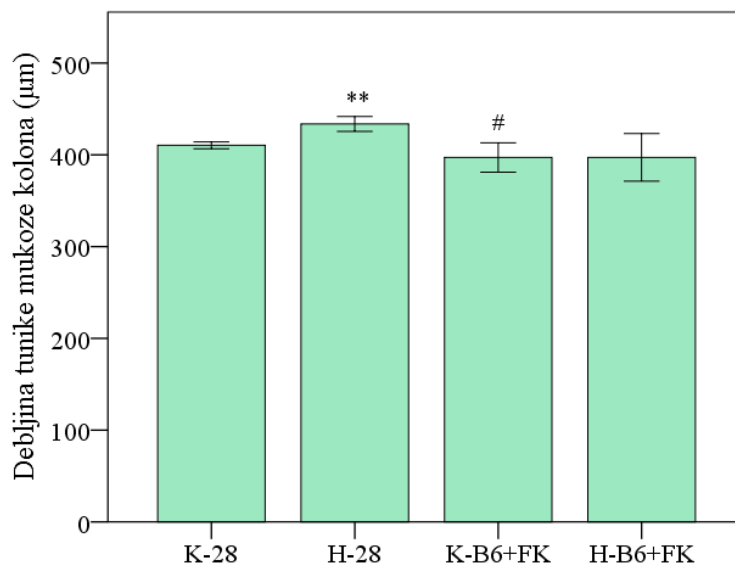
Broj ćelija u lamini propriji kolona se nije statistički značajno razlikovao u grupama tretiranim kombinovanom aplikacijom vitamina B6 i FK u poređenju sa K-28 i H-28 grupom (Grafikon 128).



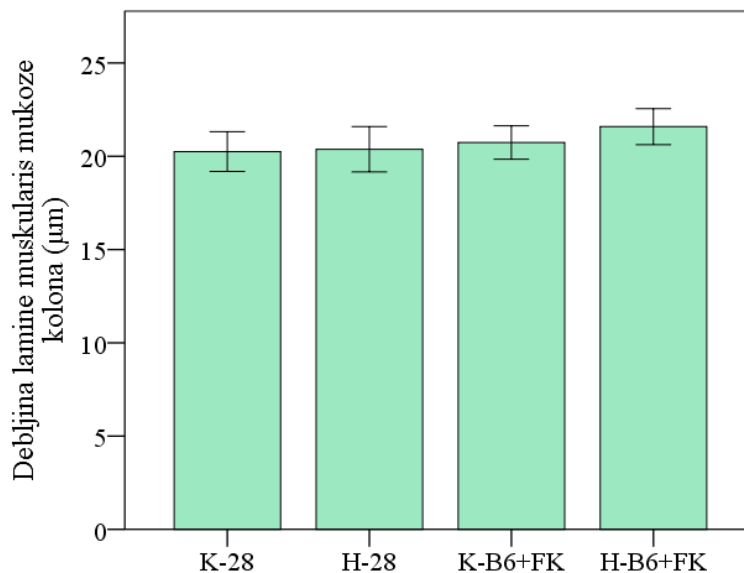
Slika 45. Poprečni presek kolona - hematoksilin/eozin bojenje, uveličanje x100. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana.



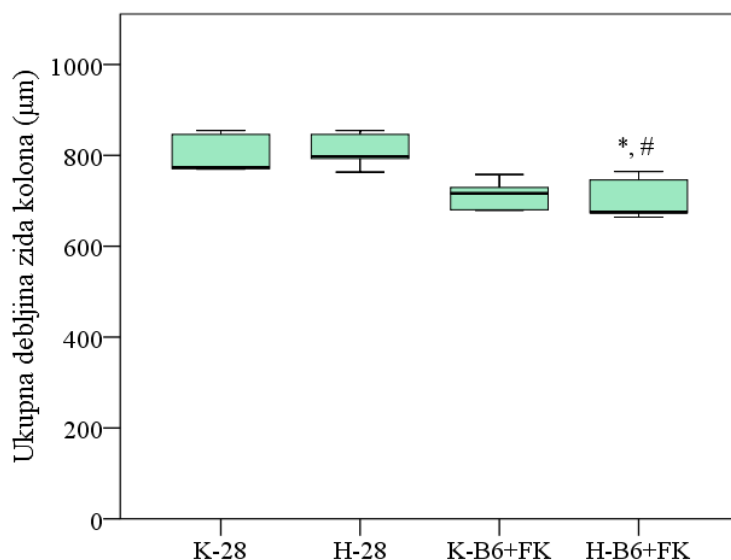
Grafikon 124. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na dubinu Liberkinih kripti kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. # $p < 0,05$ u poređenju sa H-28 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa H-28 grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.



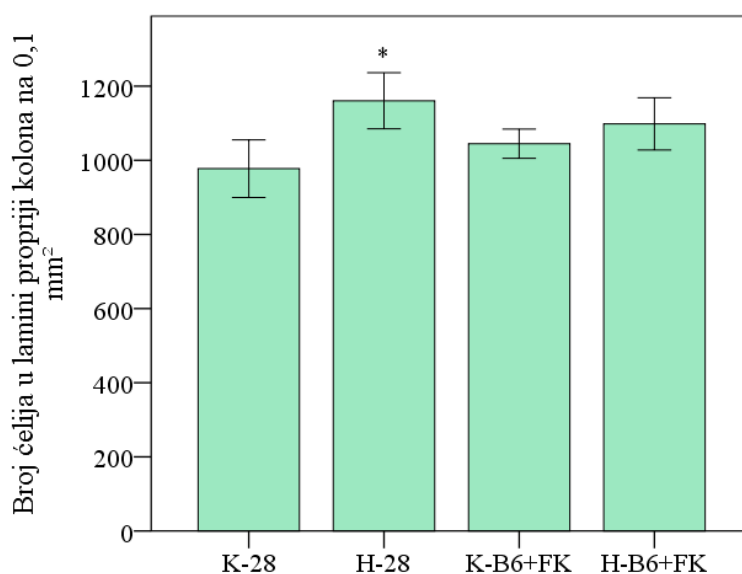
Grafikon 125. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na debljinu tunike mukoze kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. # $p < 0,05$ u poređenju sa H-28 grupom - Welch ANOVA test sa Games-Howell post hoc testom.



Grafikon 126. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na debljinu lamine muskularis mukoze kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.



Grafikon 127. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na ukupnu debljinu zida kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. * p < 0,05 u poređenju sa K-28 grupom, # p < 0,05 u poređenju sa H-28 grupom - Kruskal-Wallis test sa Dunn post hoc testom.

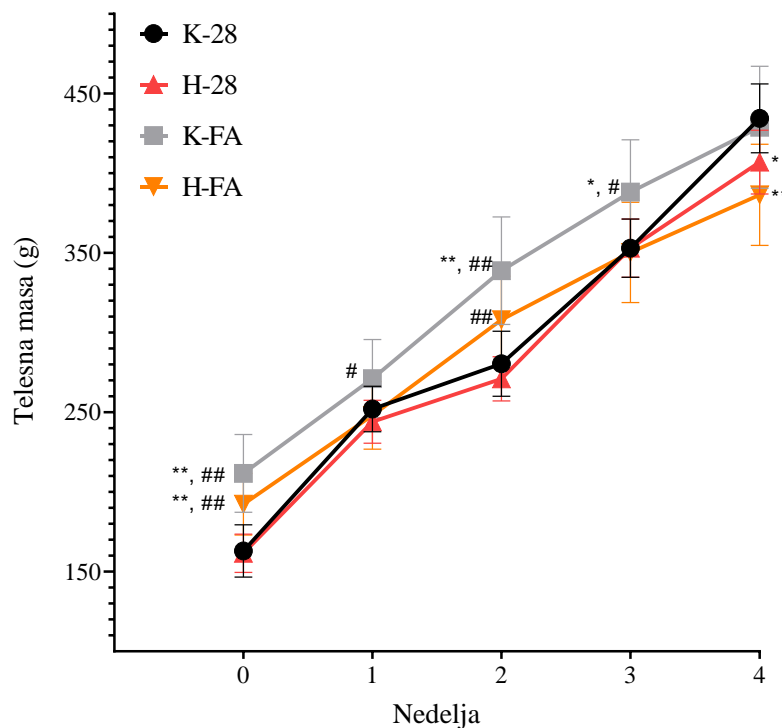


Grafikon 128. Efekti kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na broj ćelija u lamini propriji kolona na 0,1 mm². K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-B6+FK: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana, H-B6+FK: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + vit. B6 7 mg/kg tm. i FK 5 mg/kg tm. i.p. tokom 28 dana. * p < 0,05 u poređenju sa K-28 grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.

4.5. Efekti dozirane fizičke aktivnosti u uslovima eksperimentalno izazvane hiperhomocisteinemije

4.5.1. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na telesnu masu eksperimentalnih životinja

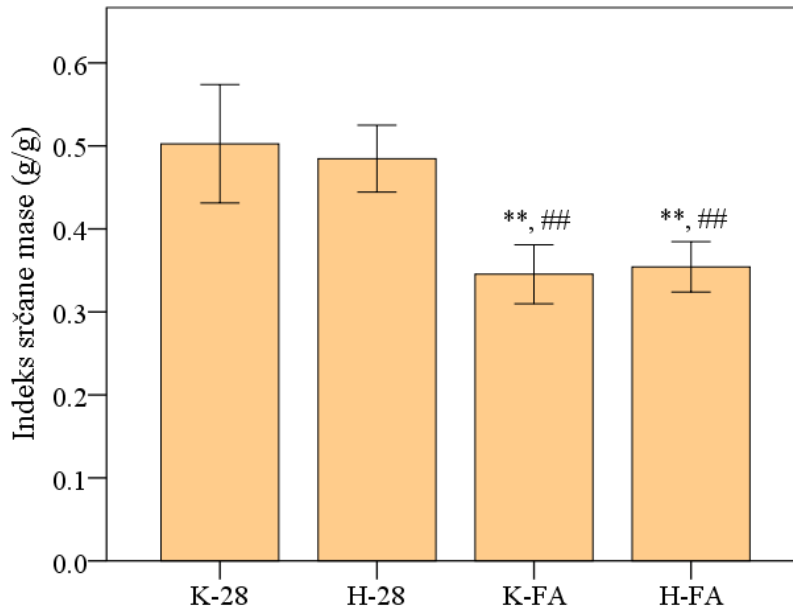
Na početku eksperimentalnog protokola mase pacova su bile statistički značajno više u fizički aktivnim grupama u poređenju sa K-28 i H-28 grupom, $p < 0,01$. Posle prve nedelje tretmana uočava se jedino statistički značajno viša vrednost telesne mase u K-FA grupi u odnosu na H-28 grupu, $p < 0,05$. U drugoj nedelji eksperimentalnog protokola fizički aktivne životinje su imale visoko značajno veću telesnu masu u poređenju sa životinjama iz H-28 grupe, $p < 0,01$, a telesne mase životinja u K-FA grupi bile su statistički značajno više i u odnosu na K-28 grupu, $p < 0,01$. U trećoj nedelji životinje grupe K-FA imale su statistički značajno veću masu u poređenju sa životinjama iz K-28 grupe, $p < 0,05$ i H-28 grupe, $p < 0,05$. U poslednjoj nedelji eksperimenta životinje iz obe grupe tretirane homocisteinom imale su statistički manju masu u odnosu na kontrolnu grupu K-28 (H-28 $p < 0,05$, H-FA $p < 0,01$). Kroz sve nedelje eksperimentalnog protokola životinje u K-FA i životinje iz H-FA grupe nisu međusobno imale statistički značajno različite telesne mase (Grafikon 129).



Grafikon 129. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na telesnu masu eksperimentalnih životinja kroz nedelje eksperimentalnog protokola. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom, # $p < 0,05$ u poređenju sa H-28 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa H-28 grupom - Šidakov post hoc test.

4.5.2. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na indeks srčane mase

Vrednost ISM bila je statistički visoko značajno niža u fizički aktivnim grupama (K-FA: $0,345 \pm 0,035$ g/g, H-FA: $0,354 \pm 0,303$ g/g) u odnosu na H-28 grupu ($0,485 \pm 0,040$ g/g), $p < 0,01$, kao i u odnosu na K-28 grupu ($0,502 \pm 0,071$ g/g), $p < 0,01$ (Grafikon 130).

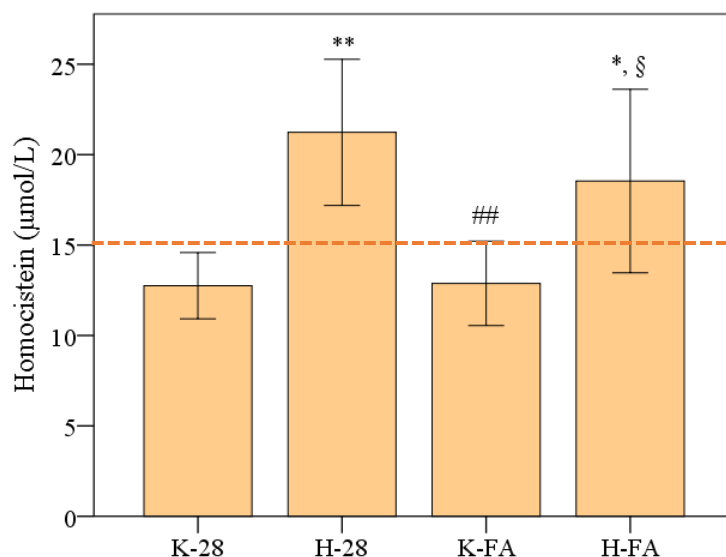


Grafikon 130. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na indeks srčane mase. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa H-28 grupom -Welch ANOVA test sa Games-Howell post hoc testom.

4.5.3. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na biohemijske parametre u serumu i plazmi

4.5.3.1. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na koncentraciju homocisteina u serumu

Tretman aerobnom fizičkom aktivnošću nije doveo da značajnijih promena koncentracije homocisteina u serumu. Ne uočava se statistički značajna razlika između serumske koncentracije homocisteina u H-FA ($18,5 \pm 5,1$ $\mu\text{mol/L}$) i H-28 grupi ($21,2 \pm 4,0$ $\mu\text{mol/L}$). U grupi H-FA vrednosti homocisteina u serumu su statistički značajno više u odnosu na obe kontrolne grupe (K-28: $12,7 \pm 1,8$ $\mu\text{mol/L}$, $p < 0,05$, K-FA: $12,9 \pm 2,3$ $\mu\text{mol/L}$, $p < 0,05$) (Grafikon 131).



Grafikon 131. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na koncentraciju homocisteina. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. ** p < 0,01 u poređenju sa K-28 grupom, * p < 0,01 u poređenju sa H-28 grupom -Welch ANOVA test sa Games-Howell post hoc testom.

4.5.3.2. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na kardiovaskularne i hemostatske biomarkere u serumu i plazmi

Koncentracija HDL u serumu je bila statistički visoko značajno niža u obe fizički aktivne grupe (K-FA: $0,66 \pm 0,05$ mmol/L, H-FA: $0,65 \pm 0,06$ mmol/L) u odnosu na K-28 grupu ($1,26 \pm 0,17$ mmol/L), p < 0,01, kao i u odnosu na H-28 grupu ($1,30 \pm 0,17$ mmol/L), p < 0,01. Koncentracija LDL u serumu je bila statistički visoko značajno viša u obe fizički aktivne grupe (K-FA: $0,72 \pm 0,08$ mmol/L, H-FA: $0,80 \pm 0,14$ mmol/L) u odnosu na K-28 grupu ($0,16 \pm 0,09$ mmol/L), p < 0,01, kao i u odnosu na H-28 grupu ($0,26 \pm 0,10$ mmol/L), p < 0,01. Serumna koncentracija TG je bila niža u fizički aktivnim grupama (K-FA: $0,51 \pm 0,13$ mmol/L, H-FA: $0,43 \pm 0,15$ mmol/L) u poređenju sa K-28 grupom ($0,77 \pm 0,17$ mmol/L), p < 0,01, ali se nije statistički značajno razlikovala u poređenju sa H-28 grupom.

Fizički aktivne grupe su imale značajno višu koncentraciju vitamina B12 u serumu (K-FA: 432,9 (374,3 - 549,3) pg/mL, p < 0,05, H-FA: 419,1 (336,6 - 455,2) pg/mL, p < 0,01) u odnosu na H-28 grupu (605,5 (569,0 - 670,2) pg/mL).

Koncentracija fibrinogena u plazmi u K-FA grupi (2,7 (2,5 - 2,9) g/L) bila je viša u odnosu na H-28 grupu (1,8 (1,6 - 1,9) g/L), p < 0,05, a u H-FA grupi je koncentracija fibrinogena u plazmi (2,9 (2,4 - 3,1) g/L) bila viša u odnosu na K-28 (1,8 (1,6 - 2,3) g/L), p < 0,05 i H-28 grupu, p < 0,01. Koncentracija vWF je bila viša u fizički aktivnim grupama (K-FA: 191,0 (185,7 - 213,2) %, H-FA: 193,5 (178,5 - 242,7)) u poređenju sa K-28 grupom (155,0 (122,2 - 167,5) %), p < 0,05 i H-28 grupom (151,0 (144,5 - 166,5)), p < 0,05 (Tabela 9).

Tabela 9. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na kardiovaskularne i hemostatske biomarkere u serumu i plazmi

Parametar	K-28	H-28	K-FA	H-FA
Hcy (μmol/L)a, s	12,7 ± 1,8	21,2 ± 4,0 **	12,9 ± 2,3	18,5 ± 5,1
HOL (mmol/L)b, s	1,75 ± 0,25	1,80 ± 0,24	1,61 ± 0,13	1,64 ± 0,15
HDL (mmol/L)a, s	1,26 ± 0,17	1,30 ± 0,17	0,66 ± 0,05 **, ##	0,65 ± 0,06 **, ##
LDL (mmol/L)b, s	0,16 ± 0,09	0,26 ± 0,10	0,72 ± 0,08 **, ##	0,80 ± 0,14 **, ##
TG (mmol/L)b, s	0,77 ± 0,17	0,57 ± 0,10 *	0,51 ± 0,13 **	0,43 ± 0,15 **
LDH (U/L)a, s	3546 ± 1305	3323 ± 666	3928 ± 481	3692 ± 782
hs-TnT (ng/L)c, s	22,0 (16,0 - 53,0)	21,5 (13,7 - 39,2)	21,5 (17,7 - 32,7)	37,0 (18,0 - 48,2)
Vitamin B12 (pg/mL)c, s	461,5 (410,0 - 488,7)	605,5 (569,0 - 670,2) *	432,9 (374,3 - 549,3) #	419,1 (336,6 - 455,2) ##
Folat > 18 ng/mL s	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
Fibrinogen (g/L)c, p	1,8 (1,6 - 2,3)	1,8 (1,6 - 1,9)	2,7 (2,5 - 2,9) #	2,9 (2,4 - 3,1) *, ##
D-dimer < 0,2 mg/L p	10 (100%)	10 (100%)	9 (90%)	10 (100%)
vWF (%)c, p	155,0 (122,2 - 167,5)	151,0 (144,5 - 166,5)	191,0 (185,7 - 213,2) *, #	193,5 (178,5 - 242,7) *, #

Hcy - homocistein, HOL - ukupni holesterol, HDL - lipoprotein visoke gustine, LDL - lipoprotein niske gustine, TG - trigliceridi, LDH - laktat dehidrogenaza, hs-TnT - visoko senzitivni troponin T, vWF - vonWillebrand-ov faktor, s - vrednost merena u serumu, p - vrednost merena u plazmi. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 μmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. a - ** p < 0,01 u poređenju sa K-28 grupom, ## p < 0,01 u poređenju sa H-28 grupom - Welch ANOVA test sa Games-Howell post hoc testom, b - * p < 0,05 u poređenju sa K-28 grupom, ** p < 0,01 u poređenju sa K-28 grupom, ## p < 0,01 u poređenju sa H-28 grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom, c - * p < 0,05 u poređenju sa K-28 grupom # p < 0,05 u poređenju sa H-28 grupom, ## p < 0,01 u poređenju sa H-28 grupom - Kruskal-Wallis test sa Dunn post hoc testom.

4.5.3.3. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na hepato-renalno-pankreatične biomarkere u serumu

Koncentracija albumina u serumu je bila statistički visoko značajno niža u obe fizički aktivne grupe (K-FA: 32,4 ± 1,2 g/L, H-FA: 31,3 ± 2,4 g/L) u odnosu na K-28 grupu (43,9 ± 1,7 g/L) p < 0,01, kao i u odnosu na H-28 grupu (48,1 ± 2,3 g/L) p < 0,01. Serumaska koncentracija kreatinina je bila visoko značajno viša u K-FA (42,0 ± 2,4 μmol/L, p < 0,01) i H-FA grupi (42,0 ± 1,6 μmol/L, p < 0,01) u poređenju sa K-28 grupom (35,3 ± 2,4 μmol/L). Koncentracija mokraćne kiseline je bila niža u K-FA grupi (70,0 (60,0 - 72,5) μmol/mL) u poređenju sa kontrolom K-28 (87,5 (78,7 - 97,2) μmol/mL), p < 0,05. Aktivnost amilaze u serumu je bila statistički visoko značajno niža u obe fizički aktivne grupe (K-FA: 1661 (1517 - 1932) U/mL, H-FA: 1553 (1341 - 1802) U/mL) u poređenju sa K-28 (3471 (2912 - 3671) U/mL), p < 0,01 i H-28 grupom (3499 (3334 - 4203) u/mL), p < 0,01.

Tabela 10. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na hepato-renalno-pankreatične biomarkere u serumu

Parametar	K-28	H-28	K-FA	H-FA
Glukoza (mmol/L) ^a	5,19 (4,64 - 5,80)	5,89 (5,67 - 6,13)	5,60 (5,27 - 6,30)	5,60 (5,42 - 6,35)
Ukupni proteini (g/L) ^a	64,0 (62,5 - 65,5)	68,5 (65,5 - 71,0)	62,0 (62,0 - 62,7)	61,5 (59,2 - 62,0)
Albumin (g/L) ^b	43,9 ± 1,7	48,1 ± 2,3 **	32,4 ± 1,2 **, ##	31,3 ± 2,4 **, ##
AST (U/L) ^b	224 ± 47	218 ± 36	214 ± 24	220 ± 40
ALT (U/L) ^a	64 (51 - 79)	63 (56 - 70)	52 (47 - 58)	57 (53 - 59)
Urea (mmol/L) ^a	7,5 (6,8 - 8,0)	8,4 (7,1 - 9,2)	8,9 (6,7 - 9,3)	8,3 (7,5 - 9,4)
Kreatinin (μmol/L) ^b	35,3 ± 2,4	40,2 ± 3,7 **	42,0 ± 2,4 **	42,0 ± 1,6 **
Mokraćna kiselina (μmol/mL) ^a	87,5 (78,7 - 97,2)	75,5 (68,7 - 90,0)	70,0 (60,0 - 72,5) *	70,0 (60,0 - 80,0)
Amilaza (U/mL) ^a	3471 (2912 - 3671)	3499 (3334 - 4203)	1661 (1517 - 1932) **, ##	1553 (1341 - 1802) **, ##
CRP < 1 mg/L	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)

AST - aspartat aminotransferaza, ALT - alanin aminotransferaza, CRP - C reaktivni protein. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 μmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. a - * p < 0,05 u poređenju sa K-28 grupom, ** p < 0,01 u poređenju sa K-28 grupom, ## p < 0,01 u poređenju sa H-28 grupom - Kruskal-Wallis test sa Dunn post hoc testom, b - ** p < 0,01 u poređenju sa K-28 grupom, ## p < 0,01 u poređenju sa H-28 grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.

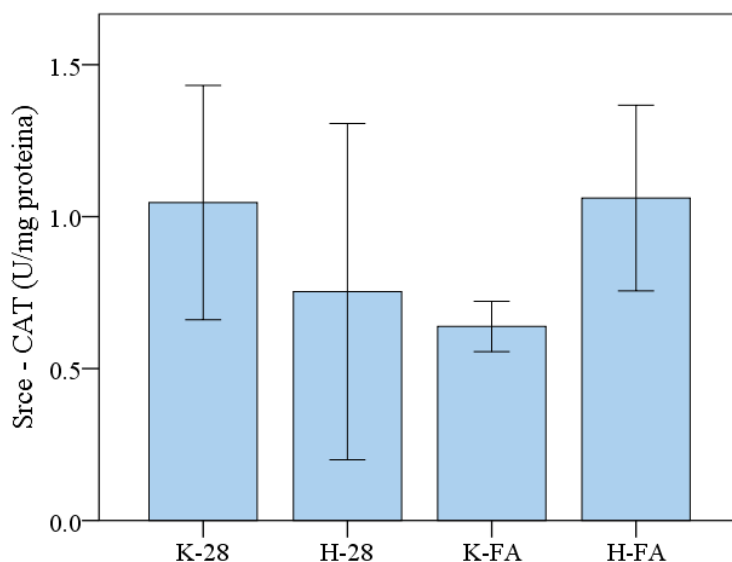
4.5.4. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na biohemijske parametre u tkivu srca

4.5.4.1. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na parametre oksidativnog stresa u tkivu

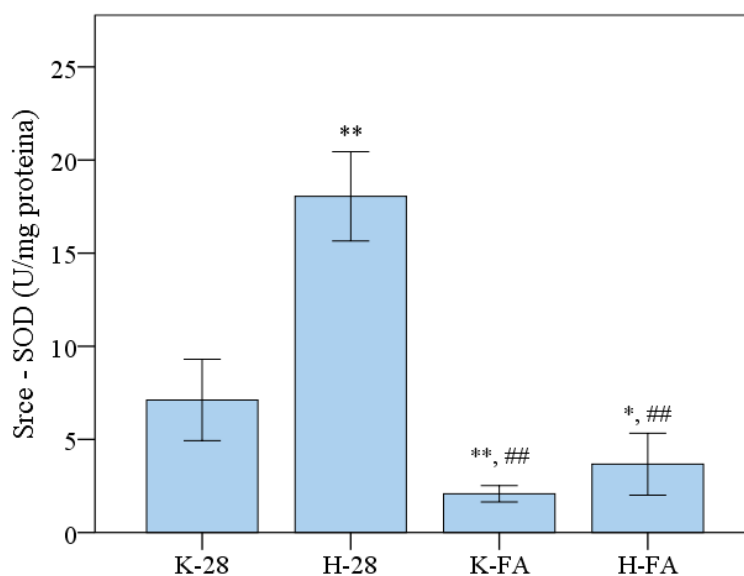
Aktivnost CAT u homogenatima tkiva srca se nije statistički značajno razlikovala usled tretmana aerobnog tredmil treninga u odnosu na K-28 i H-28 grupu, p > 0,05 (Grafikon 132).

Ukupna aktivnost SOD u homogenatima tkiva srca bila je statistički značajno niža u H-FA grupi (3,668 ± 1,666 U/mg proteina) u poređenju sa H-28 grupom (18,052 ± 2,398 U/mg proteina), p < 0,01, kao i u odnosu na K-28 grupu (7,116 ± 2,187 U/mg proteina), p < 0,05. Ukupna aktivnost SOD u homogenatima tkiva srca bila je visoko značajno niža u K-FA grupi (2,083 ± 0,440 U/mg proteina) naspram K-28, p < 0,01 i H-28 grupe, p < 0,01 (Grafikon 133).

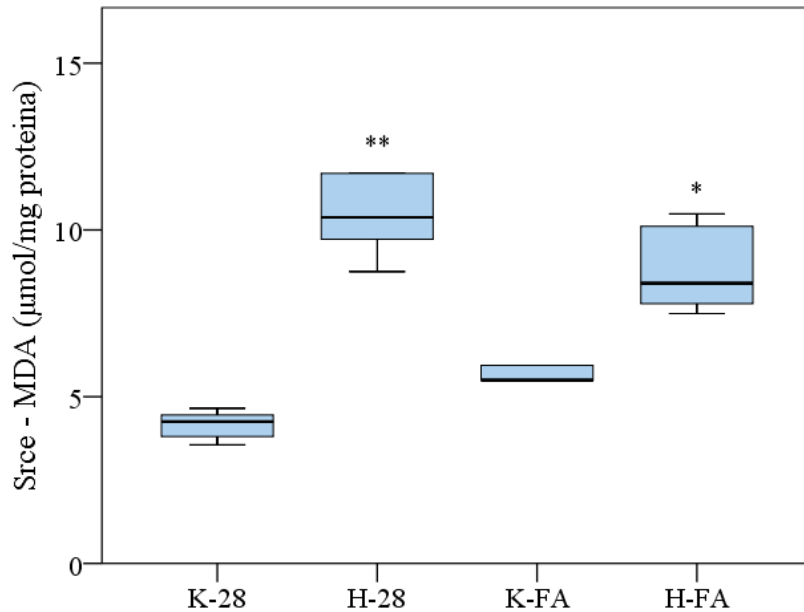
Koncentracija MDA u homogenatima tkiva srca je bila statistički značajno niža u H-FA (8,404 (7,643–10,300) μmol/mg protein) grupi u poređenju sa K-28 grupom (4,254 (3,679 - 4,551) μmol/mg protein), p < 0,05 (Grafikon 134).



Grafikon 132. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na aktivnost katalaze u tkivu srca. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. $p < 0,05$ - One-way ANOVA test.



Grafikon 133. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na ukupnu aktivnost superoksid dismutaze u tkivu srca. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa H-28 grupom - One-way ANOVA test.

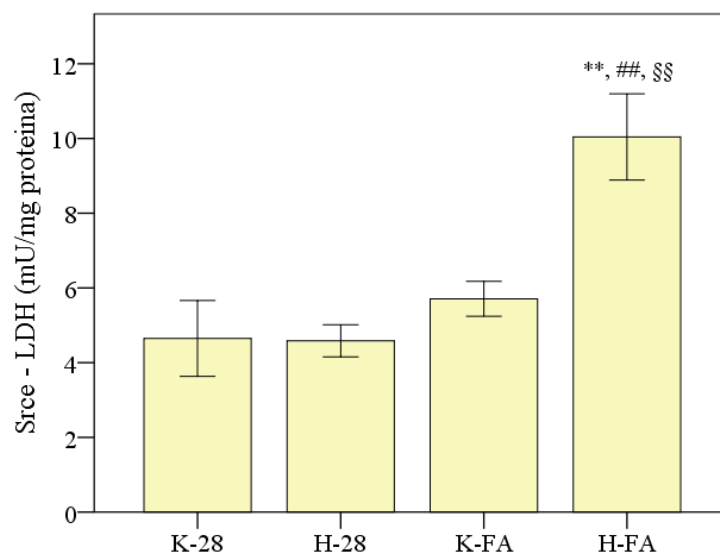


Grafikon 134. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na koncentraciju malondialdehida u tkivu srca. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom - Kruskal-Wallis test sa Dunn post hoc testom.

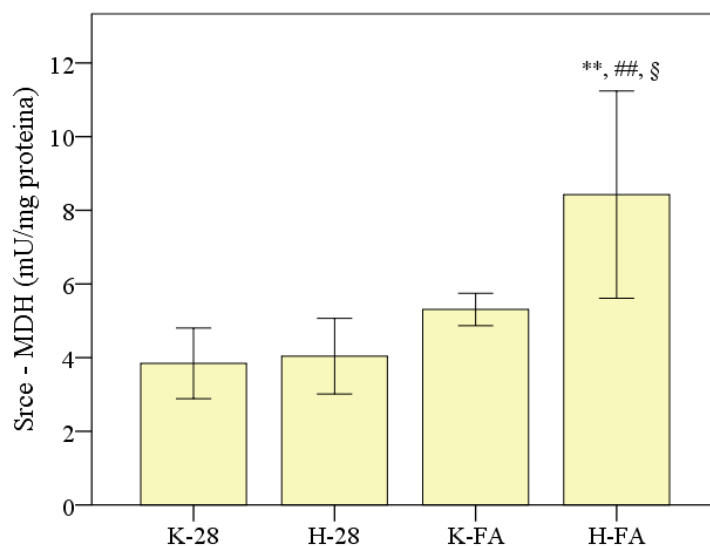
4.5.4.2. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu srca

Ukupna aktivnost LDH u homogenatima tkiva srca bila je statistički visoko značajno viša u H-FA grupi ($10,040 \pm 1,154$ mU/mg proteina) u poređenju sa K-28 ($4,647 \pm 1,015$ mU/mg proteina), $p < 0,01$, H-28 ($4,585 \pm 0,430$ mU/mg proteina), $p < 0,01$ i K-FA grupom ($5,708 \pm 0,468$ mU/mg proteina), $p < 0,01$ (Grafikon 135).

Ukupna aktivnost MDH u homogenatima tkiva srca bila je statistički visoko značajno viša u H-FA grupi ($8,425 \pm 2,815$ mU/mg proteina) u poređenju sa K-28 ($3,844 \pm 0,958$ mU/mg proteina), $p < 0,01$, H-28 ($4,038 \pm 1,027$ mU/mg proteina), $p < 0,01$ i K-FA grupom ($5,308 \pm 0,440$ mU/mg proteina), $p < 0,05$ (Grafikon 136).



Grafikon 135. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na ukupnu aktivnost laktat dehidrogenaze u tkivu srca. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa H-28 grupom, §§ $p < 0,01$ u poređenju sa K-FA grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.



Grafikon 136. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na ukupnu aktivnost malat dehidrogenaze u tkivu srca. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa H-28 grupom, § $p < 0,05$ u poređenju sa K-FA grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.

4.5.5. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na histološke promene i histomorfometrijske parametre srca

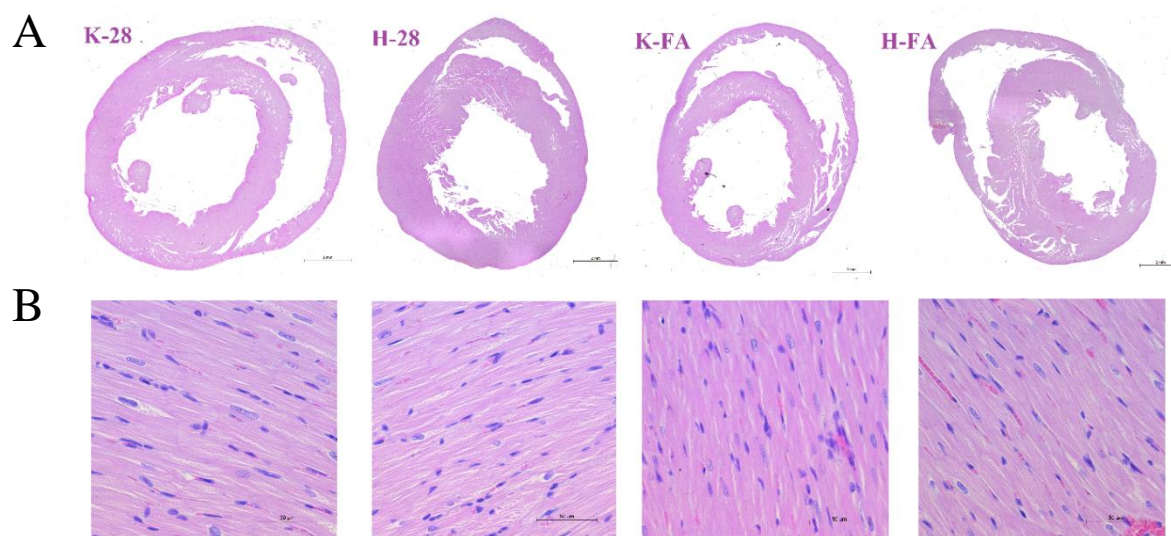
Na slici 46 prikazane su reprezentativne fotomikrografije uzoraka tkiva srca na malom i velikom uveličanju (Slika 46). U svim ispitivanim grupama primećuje se pravilan raspored vlakna miokarda, a kardiomiociti su zadržali fiziološku morfologiju. Nisu uočena polja nekroze niti zone proliferacije vezivnog tkiva.

Debljina zida leve komore se nije statistički značajno razlikovala u grupama tretiranim doziranom fizičkom aktivnošću u poređenju sa K-28 i H-28 grupom (Grafikon 137).

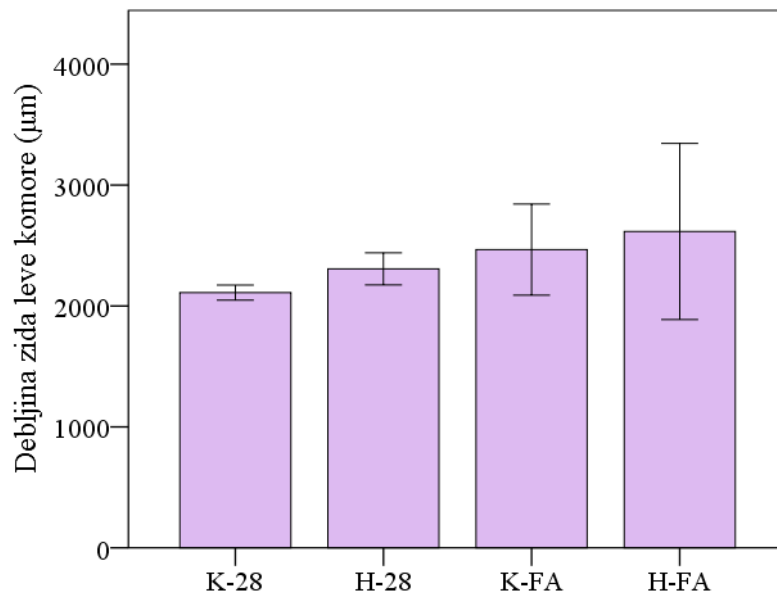
Debljina zida desne komore bila je blago povećana u fizički aktivnoj (H-FA) i u pasivnoj grupi (H-28) koje su bile tretirane homocisteinom naspram kontrolnih grupa, ali bez dostizanja statističke značajnosti (Grafikon 138).

Debljina interventrikularnog septuma bila je statistički značajno veća u H-FA grupi (2683,771 (2222,992 - 2715,505 μm)) u poređenju sa kontrolom K-28 (1632,364 (1537,572 - 1772,182) μm), $p < 0,05$ (Grafikon 139).

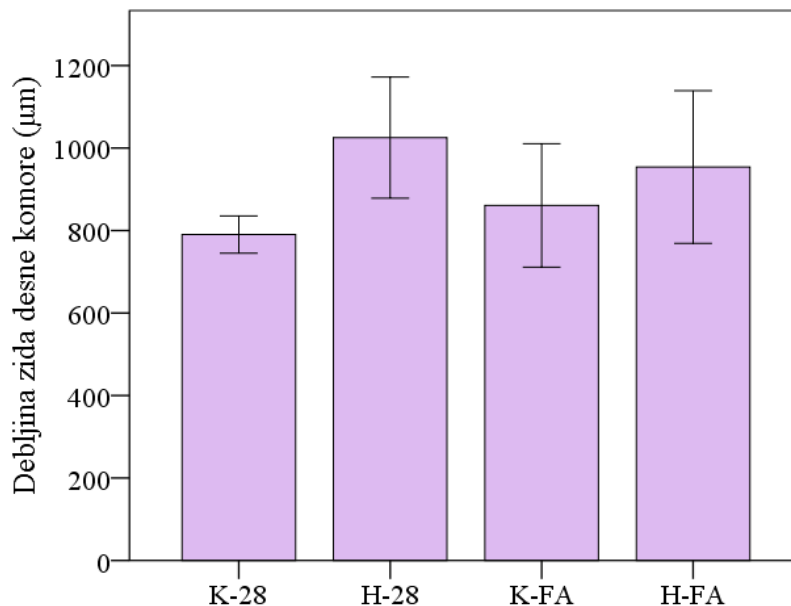
Debljina transverzalnog dijametra kardiomiocita bila je statistički značajno veća u H-FA grupi (23,525 (21,192 - 24,215) μm) u odnosu na K-28 grupu (19,328 (18,169 - 20,963) μm), $p < 0,05$ (Grafikon 140).



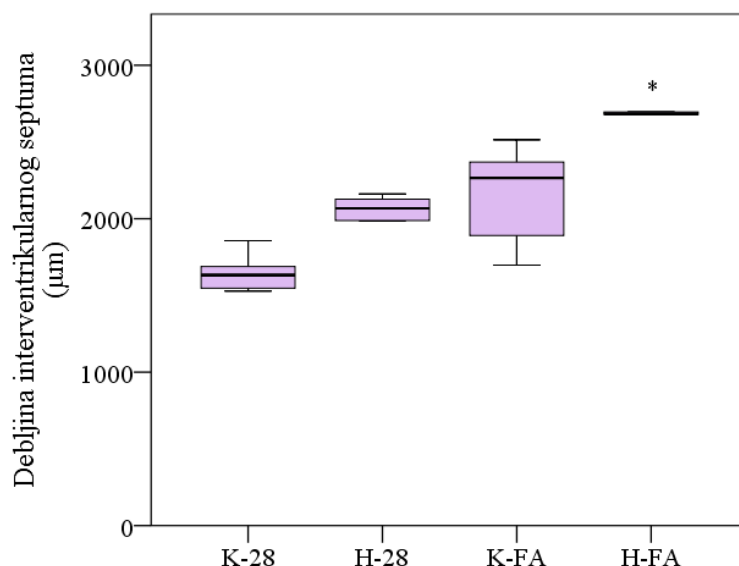
Slika 46. Poprečni presek srca - hematoksilin/eozin bojenje (A: uveličanje x50, B: uveličanje x400). K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana.



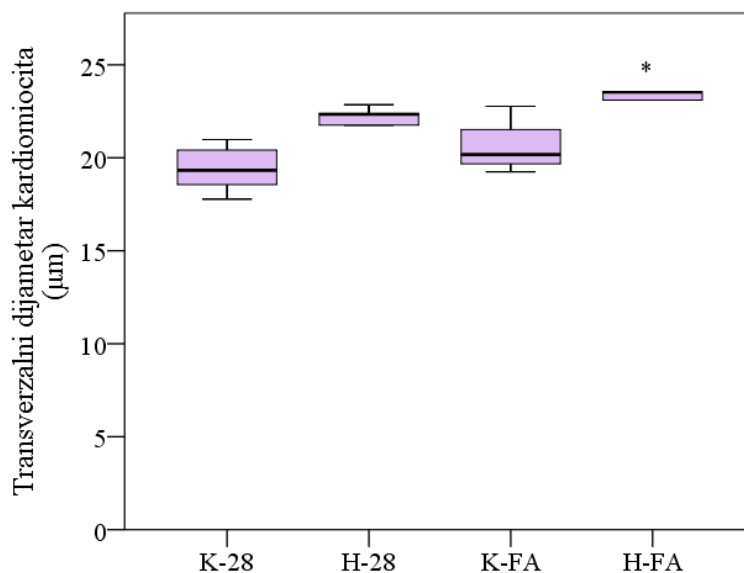
Grafikon 137. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na debljinu zida leve komore. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.



Grafikon 138. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na debljinu zida desne komore. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.



Grafikon 139. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na debljinu interventrikularnog septuma. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom - Kruskal-Wallis test sa Dunn post hoc testom.

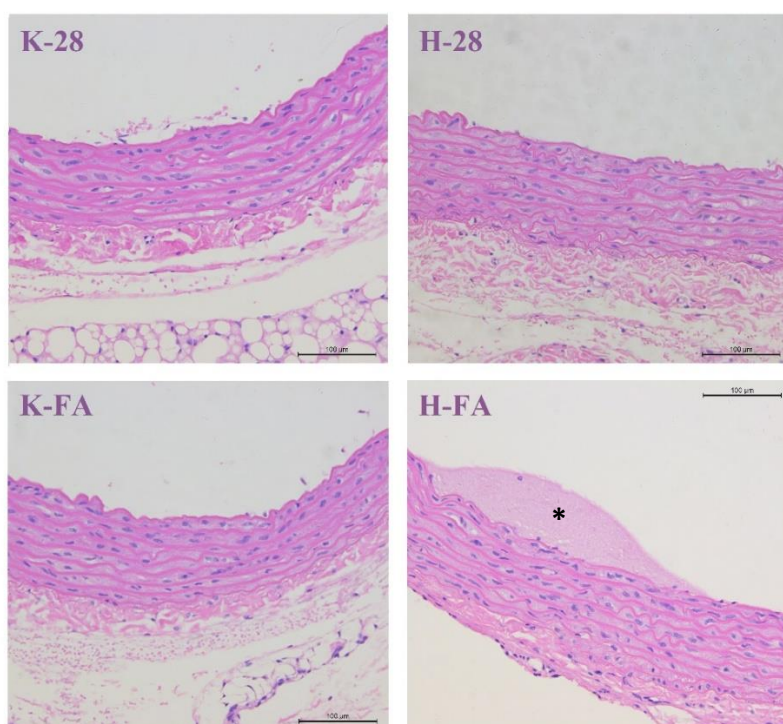


Grafikon 140. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na transversalni dijamer kardiomiocita. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom - Kruskal-Wallis test sa Dunn post hoc testom.

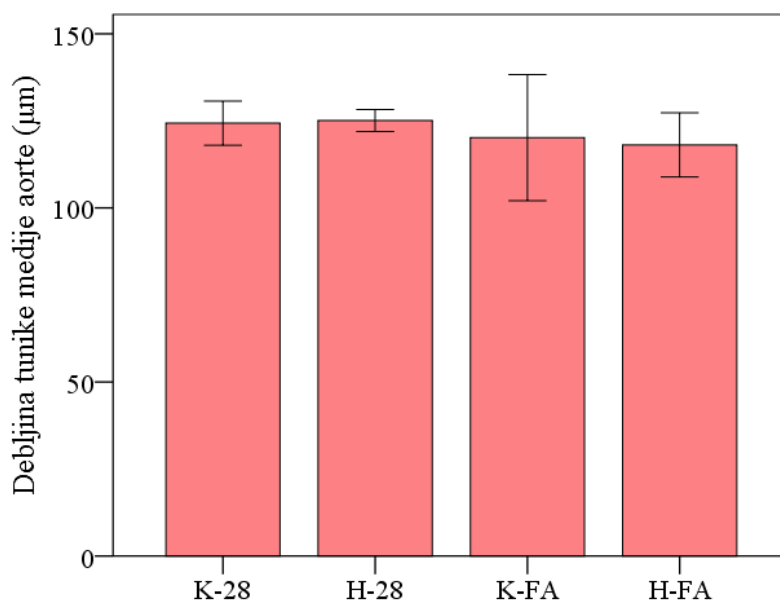
4.5.6. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na histološke promene i histomorfometrijske parametre aorte

U histološkim isečcima aorte u H-FA grupi primećeno je prisustvo aterosklerotskih plakova (Slika 47). Histomorfometrijska analiza tkiva aorte pokazuje da ne postoji statistički značajna razlika u debljini tunike medije aorte u grupama koje su tretirane doziranom fizičkom aktivnošću u poređenju sa H-28 i K-28 grupom, $p > 0,05$ (Grafikon 141).

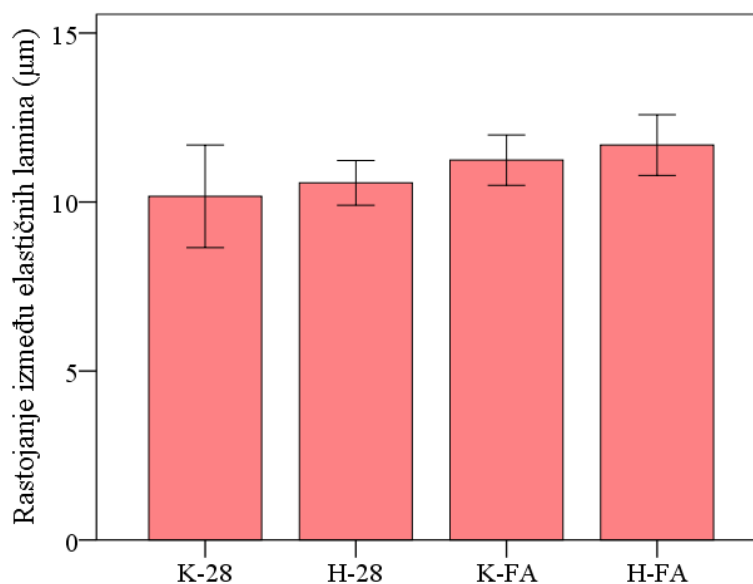
Isto tako ispitivane grupe se nisu statistički značajno razlikovane ni u rastojanju između elastičnih lamina u zidu aorte, $p > 0,05$ (Grafikon 142), kao ni broju elastičnih lamina u zidu aorte, $p > 0,05$ (Grafikon 143).



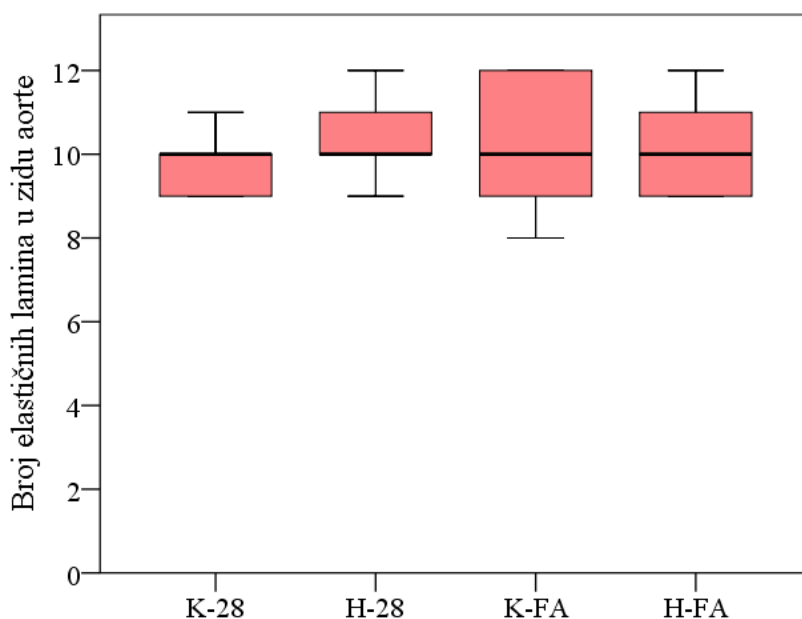
Slika 47. Poprečni presek aorte, hematoksilin/eozin bojenje, uveličanje x200. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. * - aterosklerotski plak.



Grafikon 141. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na debljinu tunike medije aorte. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Welch ANOVA.



Grafikon 142. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na rastojanje između elastičnih lamina u zidu aorte. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA.



Grafikon 143. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na broj elastičnih lamina u zidu aorte. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Kruskal-Wallis test.

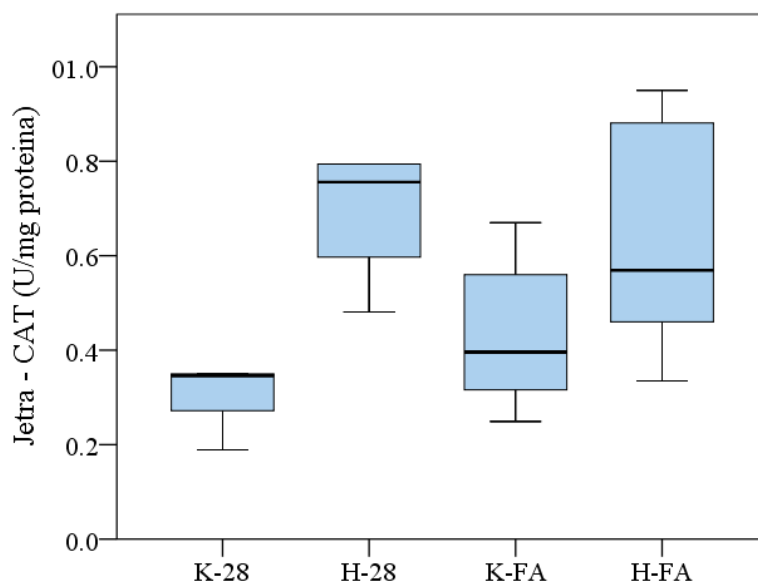
4.5.7. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na biohemijske parametre u tkivu jetre

4.5.7.1. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na parametre oksidativnog stresa u tkivu jetre

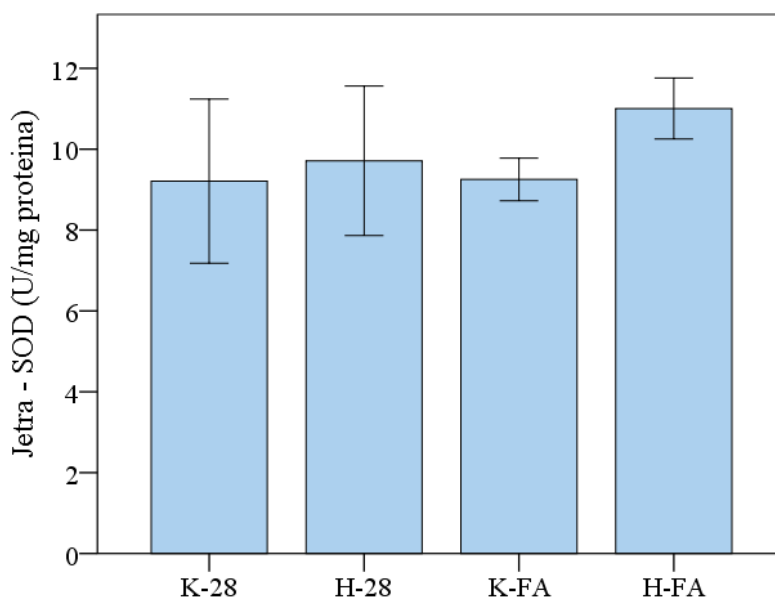
Aktivnost CAT u homogenatima tkiva jetre nije pokazala statistički značajnu razliku usled tretmana doziranom fizičkom aktivnošću u poređenju sa K-28 i H-28 grupom, $p > 0,05$ (Grafikon 144).

Ukupna aktivnost SOD u homogenatima tkiva jetre se takođe nije statistički značajno razlikovala u fizički aktivnim grupama u odnosu na K-28 i H-28 grupu, $p > 0,05$ (Grafikon 145).

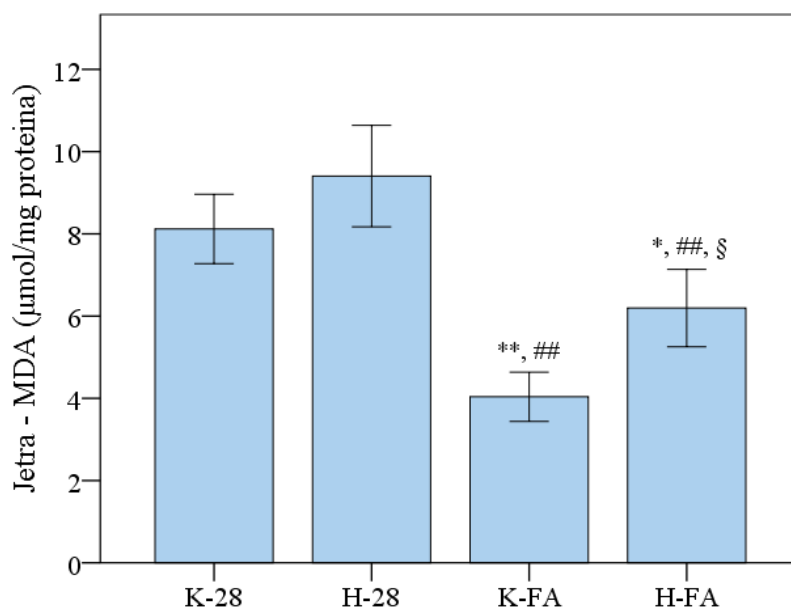
Sa druge strane, koncentracija MDA u homogenatima tkiva jetre je u obe fizički aktivne grupe (K-FA: $4,038 \pm 0,598$ $\mu\text{mol/mg}$ proteina, H-FA: $6,195 \pm 0,942$ $\mu\text{mol/mg}$ proteina) bila je statistički visoko značajno niža u odnosu na H-28 grupu ($9,404 \pm 1,234$ $\mu\text{mol/mg}$ proteina), $p < 0,01$. Takođe u K-FA grupi koncentracija MDA u tkivu jetre je bila visoko značajno niža i u odnosu na kontrolu K-28 ($8,120 \pm 0,844$ $\mu\text{mol/mg}$ proteina), $p < 0,01$, a u H-FA grupi značajno niža naspram kontrole K-28, $p < 0,05$. Koncentracija MDA u jetri je bila viša u H-FA grupi u poređenju sa K-FA grupom, $p < 0,05$ (Grafikon 146).



Grafikon 144. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na aktivnost katalaze u tkivu jetre. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Kruskal-Wallis test.



Grafikon 145. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na ukupnu aktivnost superoksid dismutaze u tkivu jetre. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.

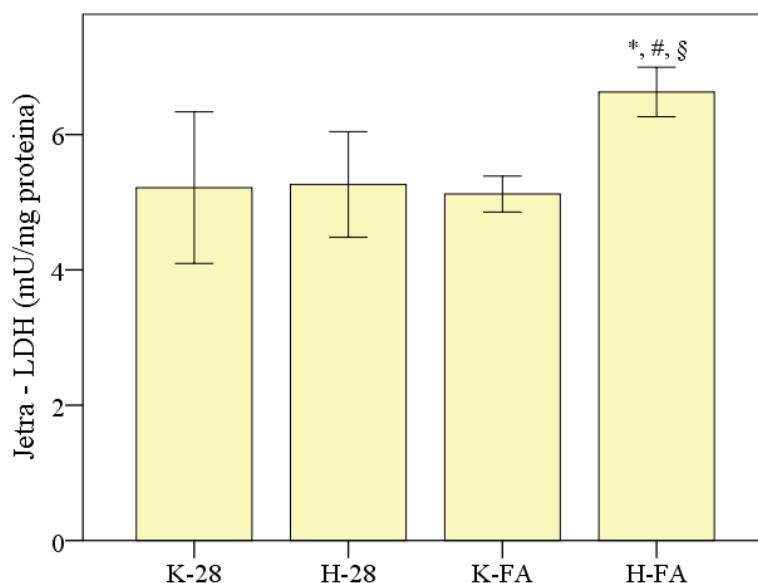


Grafikon 146. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na koncentraciju malondialdehida u tkivu jetre. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa H-28 grupom, § $p < 0,05$ u poređenju sa K-FA grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.

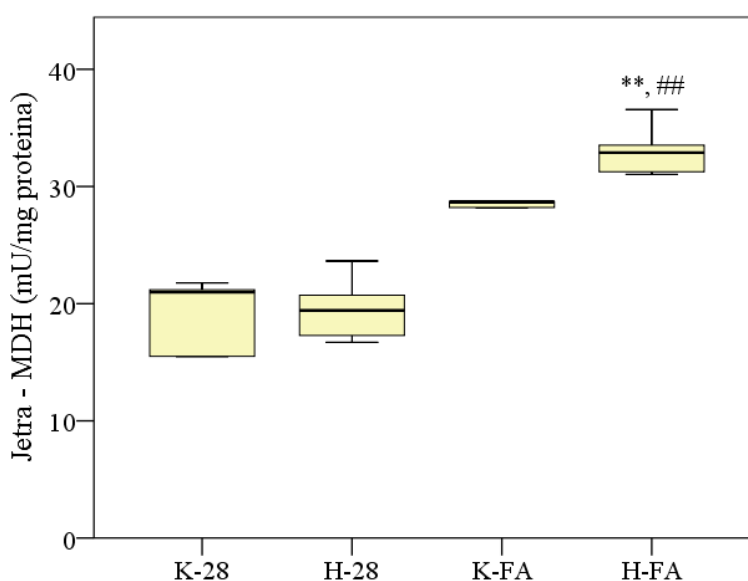
4.5.7.2. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu jetre

Ukupna aktivnost LDH bila je statistički značajno povišena u H-FA grupi ($6,629 \pm 0,365$ mU/mg proteina) u poređenju sa K-28 ($5,126 \pm 1,120$ mU/mg proteina) $p < 0,05$, H-28 ($5,263 \pm 0,781$ mU/mg proteina) $p < 0,05$ i K-FA grupom ($5,121 \pm 0,266$ mU/mg proteina) $p < 0,05$ (Grafikon 147).

Ukupna aktivnost MDH u homogenatima tkiva jetre bila je statistički visoko značajno povišena u H-FA grupi ($32,886$ ($31,142 - 35,046$) mU/mg proteina) u odnosu na K-28 ($20,975$ ($15,496 - 21,482$) mU/mg proteina), $p < 0,01$ i H-28 grupu ($19,415$ ($16,997 - 22,185$) mU/mg proteina), $p < 0,01$ (Grafikon 148).



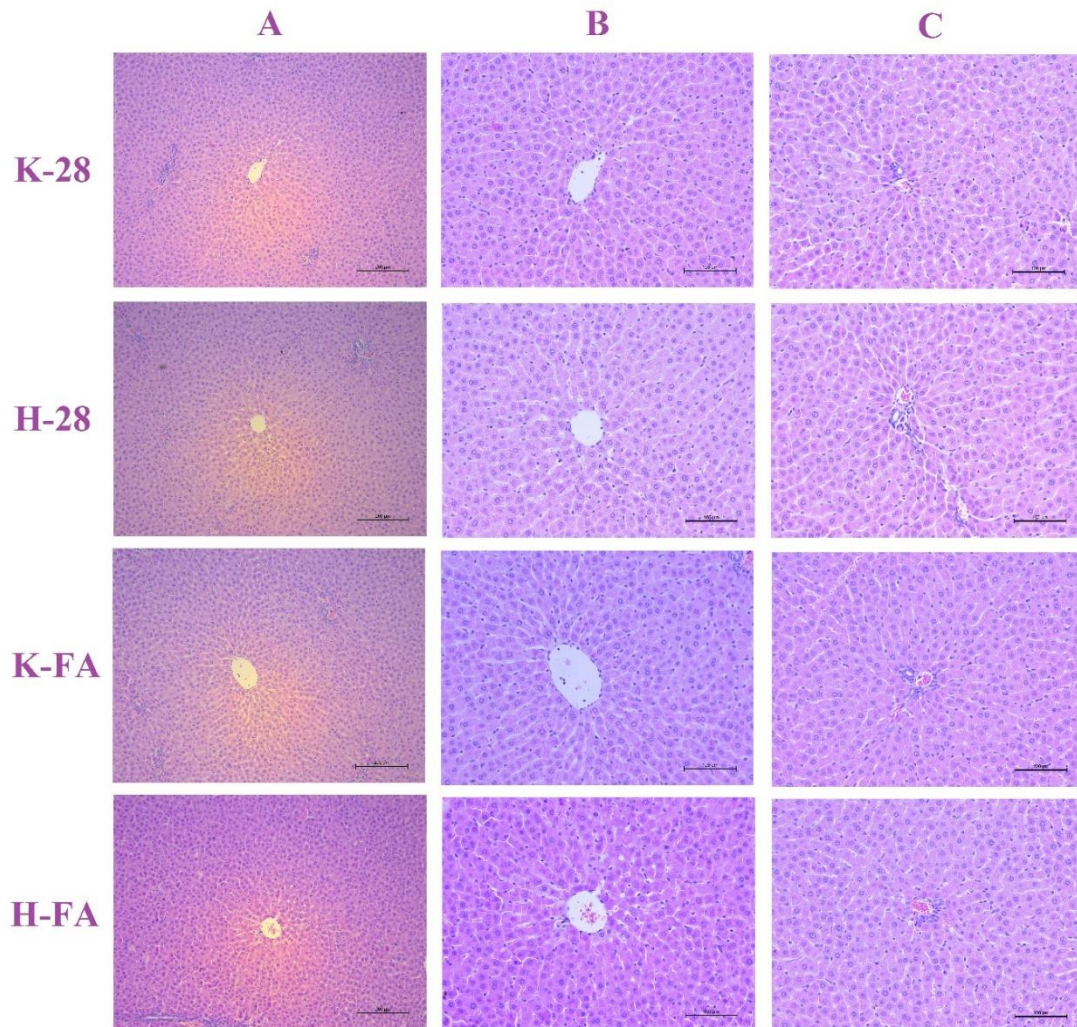
Grafikon 147. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na ukupnu aktivnost laktat dehidrogenaze u tkivu jetre. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom, # $p < 0,05$ u poređenju sa H-28 grupom, § $p < 0,05$ u poređenju sa K-FA grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.



Grafikon 148. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na ukupnu aktivnost malat dehidrogenaze u tkivu jetre. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom, ## $p < 0,01$ u poređenju sa H-28 grupom - Kruskal-Wallis test sa Dunn post hoc testom.

4.5.8. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na histološke promene jetre

Histološka analiza tkiva jetre u K-FA i H-FA grupi pokazuje fiziološki radijalni raspored jetrinih gredica prema centralnoj veni. Jetrini lobulusi su očuvane arhitektonike. Ne primećuje se proširenje sinusoidnih kapilara između gredica hepatocita i njihova orijentacija je pravilna. Portni prostori sadrže ogranke a. hepaticae propriae, v. portae i interlobularnih žučnih kanalića i očuvane su građe. Hepatociti sadrže jedno do dva pravilna, okrugla, euhromatska jedra u kojima se uočava formirano jedarce, kao i eozinofilnu citoplazmu sa pojedinim bazofilnim zonama koje odgovaraju endoplazmatskom retikulumu. Ne uočava se mikro i makro vezikularna masna promena hepatocita. Nije uočljiva fibroza, niti ciroza (Slika 48).



Slika 48. Fotomikrografije preparata tkiva jetre - hematoksilin/eozin bojenje: A - centar lobulusa, uveličanje x100, B - centar lobulusa, uveličanje x200, C - centar acinusa - portni prostor, uveličanje x200. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana.

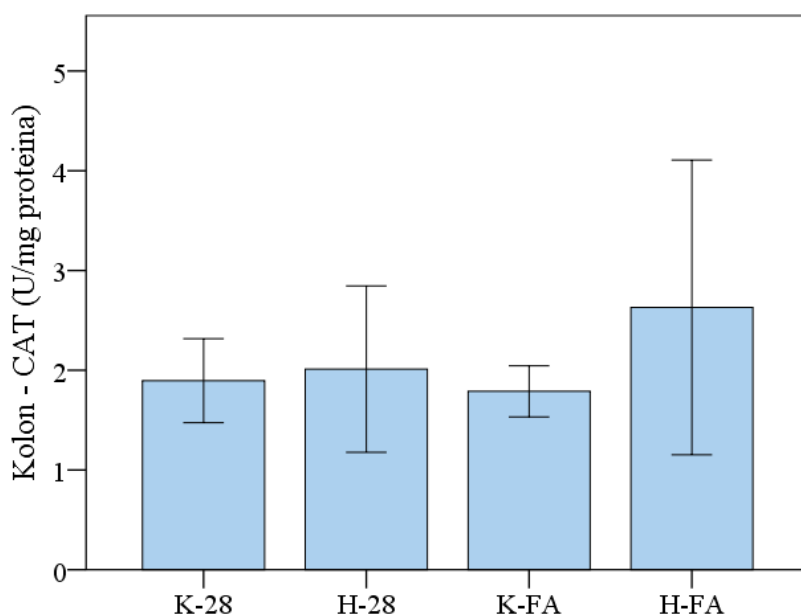
4.5.9. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na biohemijske parametre u tkivu kolona

4.5.9.1. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na parametre oksidativnog stresa u tkivu kolona

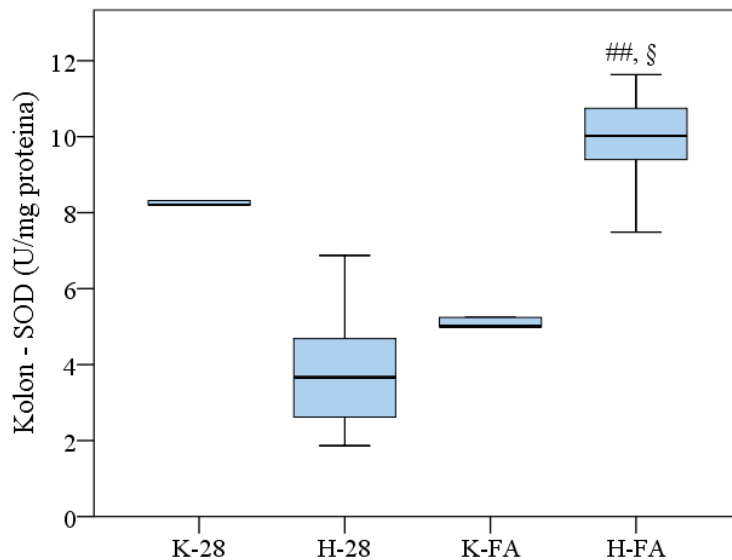
Aktivnost CAT u homogenatima tkiva kolona se nije statistički značajno razlikovala u fizički aktivnim grupama u poređenju sa grupom K-28 i H-28, $p > 0,05$ (Grafikon 149).

Ukupna aktivnost SOD u homogenatima tkiva kolona, bila je statistički visoko značajno veća u H-FA grupi (10,022 (8,441 - 11,190) U/mg proteina) u odnosu na H-28 grupu (3,667 (2,243 - 5,778) U/mg proteina) $p < 0,01$ i statistički značajno veća u odnosu na K-FA grupu (5,006 (4,986 - 5,441) U/mg proteina) $p < 0,05$ (Grafikon 150).

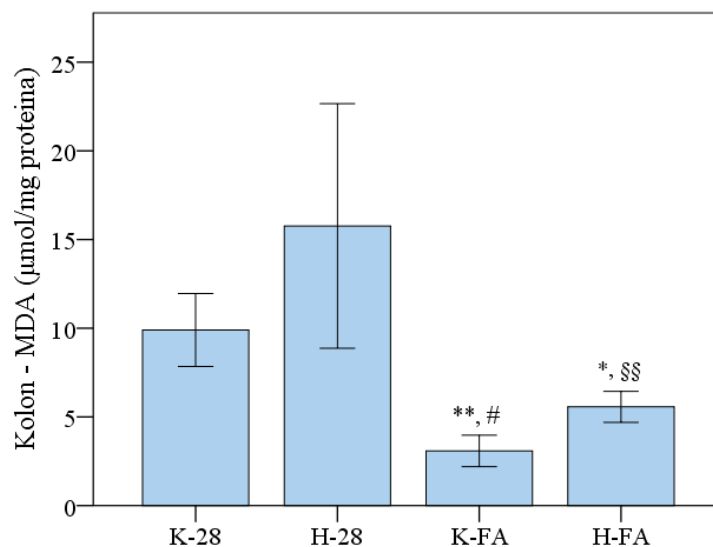
Koncentracija MDA u homogenatima tkiva kolona bila je statistički značajno niža u H-FA grupi ($5,568 \pm 0,872$ $\mu\text{mol/mg}$ proteina) u poređenju sa K-28 ($9,904 \pm 2,056$ $\mu\text{mol/mg}$ proteina), $p < 0,05$, ali statistički visoko značajno viša u poređenju sa K-FA grupom ($3,080 \pm 0,887$ $\mu\text{mol/mg}$ proteina), $p < 0,01$. U K-FA grupi koncentracija MDA u tkivu kolona bila je statistički značajno niža i u poređenju sa H-28 grupom ($15,766 \pm 6,893$ $\mu\text{mol/mg}$ proteina), $p < 0,05$ i K-28 grupom, $p < 0,01$ (Grafikon 151).



Grafikon 149. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na aktivnost katalaze u tkivu kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Welch ANOVA test.



Grafikon 150. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na ukupnu aktivnost superoksid dismutaze u tkivu kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. ## $p < 0,01$ u poređenju sa H-28 grupom, § $p < 0,05$ u poređenju sa K-FA grupom - Kruskal-Wallis test sa Dunn post hoc testom.

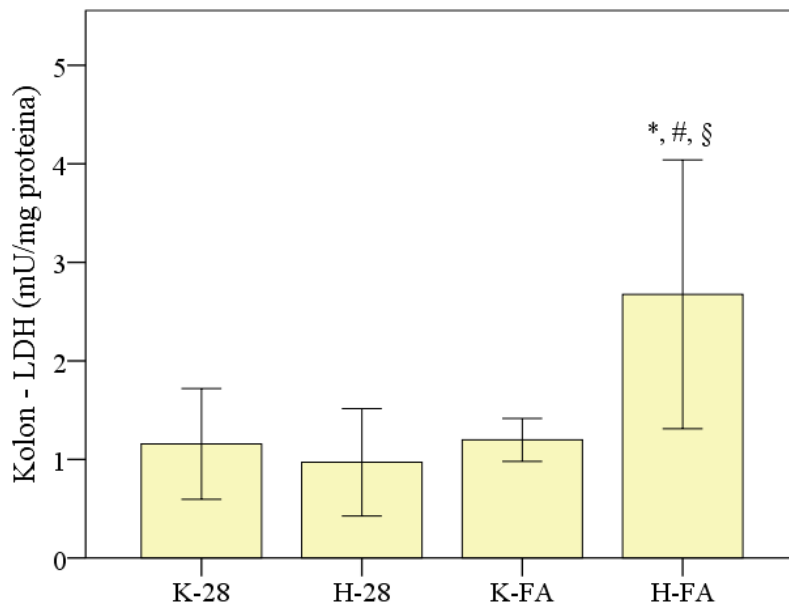


Grafikon 151. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na koncentraciju malondialdehida u tkivu kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom, ** $p < 0,01$ u poređenju sa K-28 grupom, # $p < 0,05$ u poređenju sa H-28 grupom, §§ $p < 0,01$ u poređenju sa K-FA grupom - Welch ANOVA test sa Games-Howell post hoc testom.

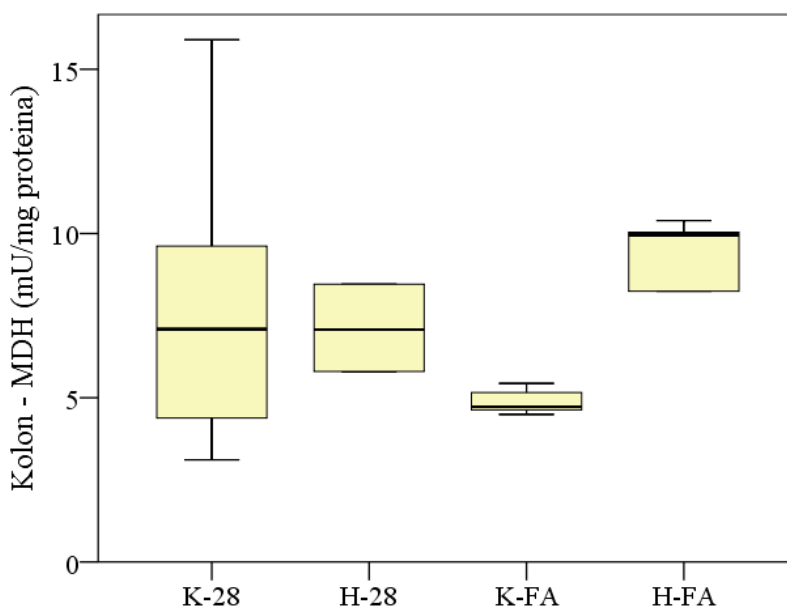
4.5.9.2. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na aktivnosti metaboličkih enzima u tkivu kolona

Ukupna aktivnost LDH u homogenatima tkiva kolona bila je statistički značajno povišena u H-FA grupi ($2,675 \pm 1,364$ mU/mg proteina) u poređenju sa K-28 ($1,158 \pm 0,560$ mU/mg proteina), $p < 0,05$, H-28 ($0,971 \pm 0,545$ mU/mg proteina), $p < 0,05$ i K-FA grupom ($1,198 \pm 0,217$ mU/mg proteina), $p < 0,05$ (Grafikon 152).

Ukupna aktivnost MDH u homogenatima tkiva kolona se nije statistički značajno razlikovala u fizički aktivnim grupama u odnosu na K-28 i H-28 grupu, vrednost je bila viša u H-FA grupi u odnosu na K-FA grupu, ali bez dostizanja statističke značajnosti, $p > 0,05$ (Grafikon 153).



Grafikon 152. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na ukupnu aktivnost laktat dehidrogenaze u tkivu kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 μ mol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. * $p < 0,05$ u poređenju sa K-28 grupom, # $p < 0,05$ u poređenju sa H-28 grupom, § $p < 0,05$ u poređenju sa K-FA grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.



Grafikon 153. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na ukupnu aktivnost malat dehidrogenaze u tkivu kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. $p > 0,05$ - Kruskal-Wallis test.

4.5.10. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na histološke promene i histomorfometrijske parametre kolona

U fizički aktivnim grupama mikroskopski iseći kolona pokazuju normalnu arhitektoniku, bez znakova za inflamatorne bolesti creva, nisu uočljivi znaci kriptitisa niti kriptni apscesi. U zidu kolona nisu uočljive erozije i ulceracije. Uzroci ne pokazuju tumorske izmene epitela (Slika 49).

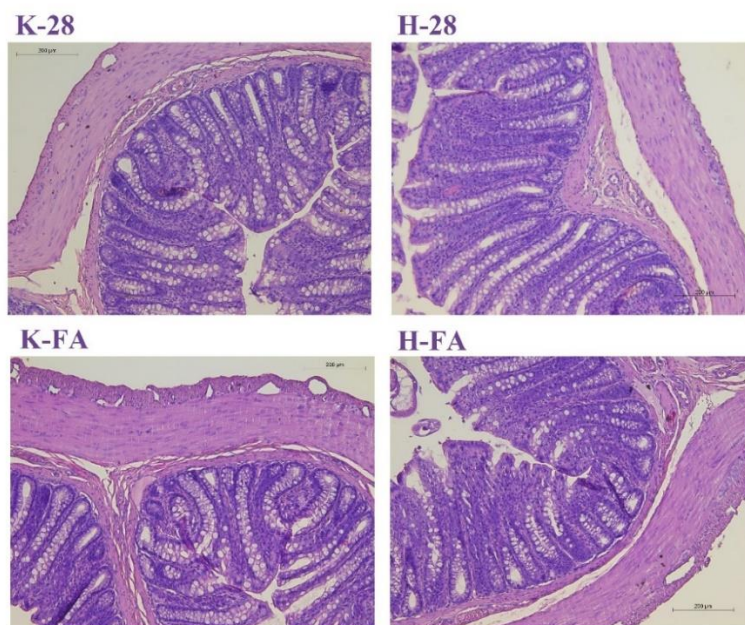
Dubina Liberkinovih kripti bila je statistički visoko značajno niža u H-FA grupi ($330,669 \pm 21,801 \mu\text{m}$) u poređenju sa K-28 ($402,866 \pm 10,052 \mu\text{m}$), $p < 0,01$ i H-28 grupom ($374,928 \pm 12,409 \mu\text{m}$), $p < 0,01$, ali statistički značajno viša u odnosu na K-FA grupu ($301,075 \pm 12,343 \mu\text{m}$), $p < 0,05$. U K-FA grupi je dubina Liberkinovih kripti bila statistički visoko značajno niža u odnosu na K-28, $p < 0,01$ i H-28 grupu, $p < 0,01$ (Grafikon 154).

Debljina tunike mukoze kolona je bila statistički značajno niža u H-FA grupi ($348,995 \pm 29,844 \mu\text{m}$) u poređenju sa K-28 grupom ($410,385 \pm 3,697 \mu\text{m}$), $p < 0,05$ i visoko značajno niža u poređenju sa H-28 grupom ($433,687 \pm 8,172 \mu\text{m}$), $p < 0,01$. Isto tako debljina tunike mukoze je bila statistički visoko značajno niža u K-FA grupi ($328,007 \pm 18,216 \mu\text{m}$) u odnosu na K-28, $p < 0,01$ i H-28 grupu, $p < 0,01$ (Grafikon 155).

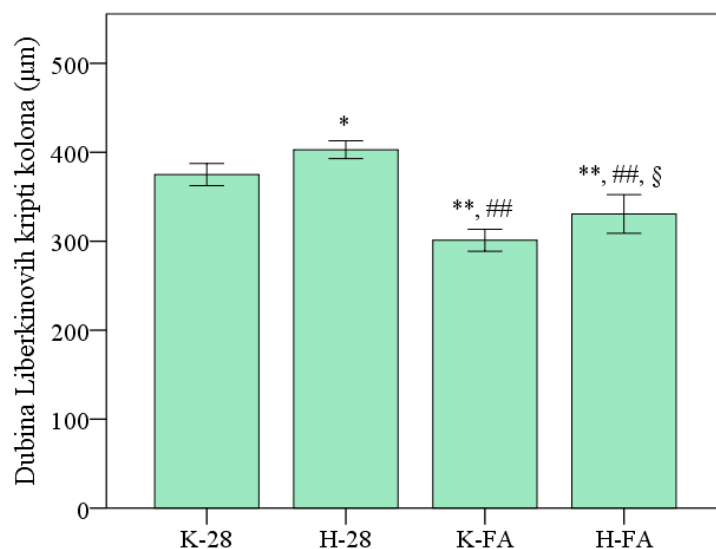
Debljina lamine muskularis mukoze se nije statistički značajno razlikovala u fizički aktivnim grupama u poređenju sa K-28 i H-28 grupom, $p > 0,05$ (Grafikon 156).

Ukupna debljina zida kolona bila je statistički značajno niža jedino u K-FA grupi ($720,304 (676,672 - 741,495) \mu\text{m}$) u odnosu na H-28 grupu ($797,841 (778,022 - 850,423) \mu\text{m}$), $p < 0,05$ (Grafikon 157).

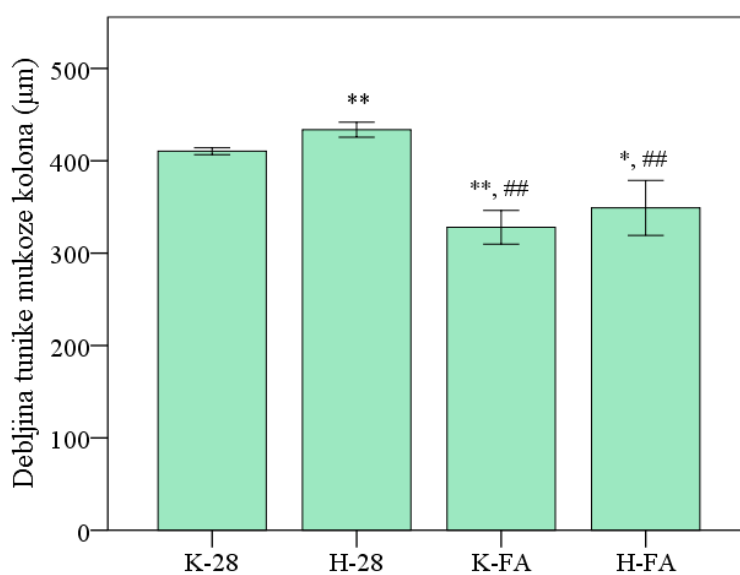
Broj ćelija u lamini propriji kolona na površini $0,1 \text{ mm}^2$ bio je statistički značajno niži u K-FA grupi (1011 ± 40 ćelija na $0,1 \text{ mm}^2$) u poređenju sa H-28 grupom (1161 ± 76 ćelija na $0,1 \text{ mm}^2$), $p < 0,05$, dok je u H-FA grupi (1169 ± 110 ćelija na $0,1 \text{ mm}^2$) bio statistički značajno viši u poređenju sa i sa aktivnom i sa pasivnom kontrolnom grupom: K-FA, $p < 0,05$, (K-28: 977 ± 78 ćelija na $0,1 \text{ mm}^2$), $p < 0,05$ (Grafikon 158).



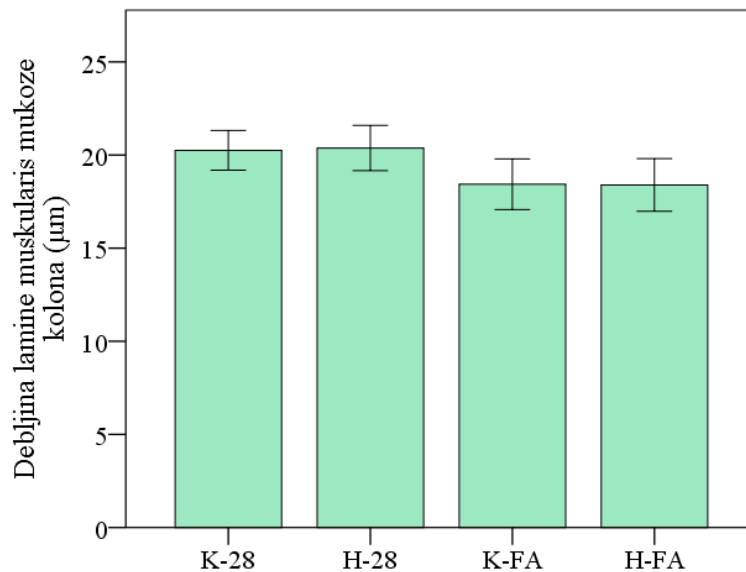
Slika 49. Poprečni presek kolona - hematoksilin/eozin bojenje, uveličanje x100. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana.



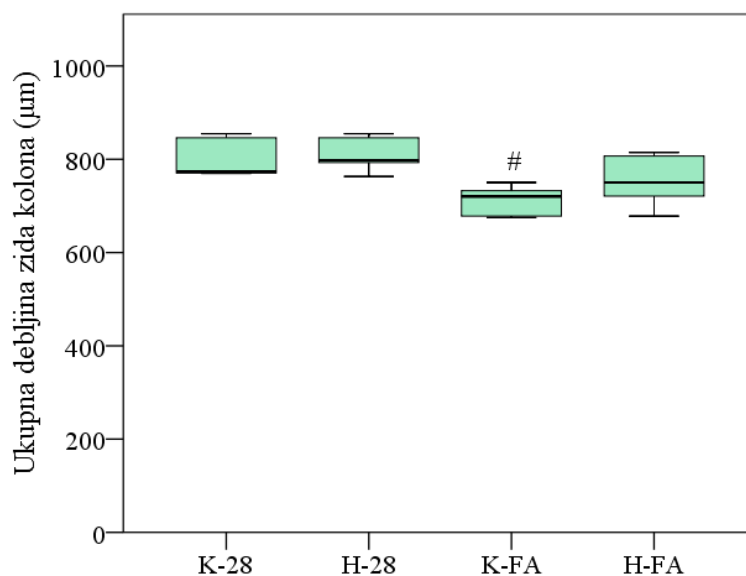
Grafikon 154. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na dubinu Liberkinovih kriпти kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. * p < 0,05 u poređenju sa K-28 grupom, ** p < 0,01 u poređenju sa K-28 grupom, ### p < 0,01 u poređenju sa H-28 grupom, § p < 0,05 u poređenju sa K-FA grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.



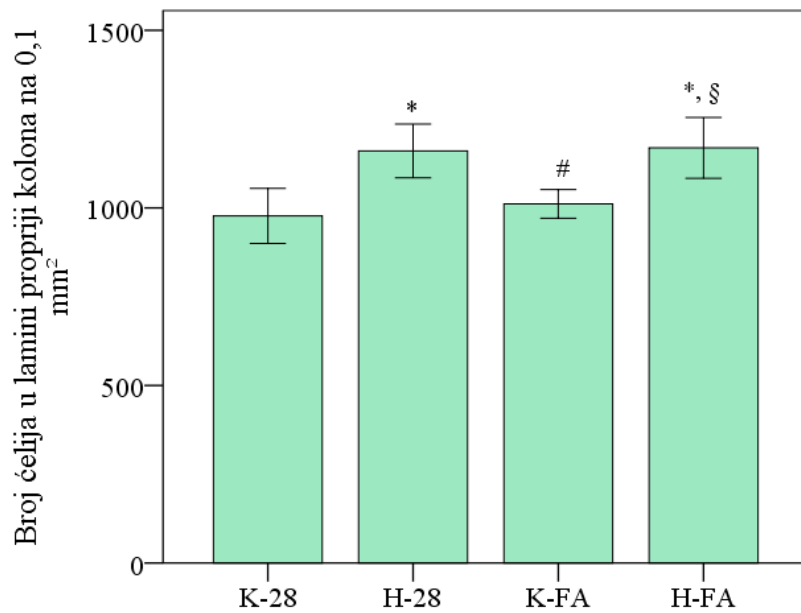
Grafikon 155. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na dubinu Liberkinovih kriпти kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. * p < 0,05 u poređenju sa K-28 grupom, ** p < 0,01 u poređenju sa K-28 grupom, ### p < 0,01 u poređenju sa H-28 grupom - Welch ANOVA test sa Games-Howell post hoc testom.



Grafikon 156. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na debljinu lamine muskularis mukoze kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. $p > 0,05$ - One-way ANOVA test.



Grafikon 157. Efekti dozirane fizičke aktivnosti ukupnu debljinu zida kolona. K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. # $p < 0,05$ u poređenju sa H-28 grupom - Kruskal-Wallis test sa Dunn post hoc testom.



Grafikon 158. Efekti dozirane fizičke aktivnosti na broj ćelija u lamini proprijii kolona na 0,1 mm². K-28: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, H-28: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana, K-FA: f.r. 0,2 mL/2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana, H-FA: homocistein 0,45 µmol/g t.m./2x/dan s.c. tokom 14 dana + aerobni tredmil trening 30 min/dan, brzina trake 20 m/min, nagib trake 0° tokom 28 dana. * p < 0,05 u poređenju sa K-28 grupom, # p < 0,05 u poređenju sa H-28 grupom, § p < 0,05 u poređenju sa K-FA grupom - One-way ANOVA test sa Tukey post hoc testom.

5. DISKUSIJA

Ova studija je ispitivala potencijalno korisne efekte intraperitonealne aplikacije vitamina B6 i FK, kao i uticaj aerobne dozirane fizičke aktivnosti na kardiovaskularni (srce i aorta) i digestivni sistem (jetra i debelo crevo) pacova u uslovima subhroničnog opterećenja Hcy, dvonedeljnom potkožnom aplikacijom Hcy. Ispitivane su promene kardiovaskularnih, hemostatskih i hepato-renalno-pankreatičnih parametara u serumu i plazmi, kao i biohemijske promene u homogenatima tkiva (parametri oksidativnog stresa, aktivnosti metaboličkih enzima i aktivnosti matriks metaloproteinaza), kao i histomorfometrijske promene u tkivu srca, aorte, jetre i kolona.

Podaci iz literature ukazuju na to da HHcy može putem mnogobrojnih patofizioloških mehanizama dovesti do narušavanja homeostaze u kardiovaskularnom i digestivnom sistemu. Model izazivanja HHcy izveden je po uzoru na studiju Pavlikove i saradnika (Pavlikova et al., 2011) gde je Hcy aplikovan potkožno u periodu od dve nedelje dva puta dnevno u intervalu od 8h u dozi 0,45 $\mu\text{mol/g}$ tm.

Dvonedeljna aplikacija Hcy je izazvala značajno povišenje koncentracije Hcy u serumu u H-28 grupi u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu K-28 ($p < 0,01$), kao i u H-14 grupi u odnosu na K-14 grupu ($p < 0,05$). Aplikacija vitamina B6 kod pacova koji su bili tretirani sa Hcy izazvala je statistički visoko značajno smanjenje porasta Hcy u serumu u poređenju sa pacovima koji su bili tretirani samo sa Hcy. Takođe, kontrolna grupa koja je bila tretirana vitaminom B6 imala je nižu serumsku koncentraciju Hcy u poređenju sa kontrolom K-28 koja je primala samo fiziološki rastvor. Dobijeni rezultati su u skladu sa funkcijom vitamina B6 koji predstavlja kofaktor za enzime trans-sulfuracijskog puta: CBS i CGL u kome dolazi do konverzije Hcy u Cys (Jakubowski, 2019), pri čemu se smanjuje količina Hcy u organizmu. Podaci iz literature pokazuju da usled neadekvatne funkcije CGS ili CGL može doći do nakupljanja Hcy u ćelijama (McCully, 2005; Djuric et al., 2018). Takođe pacovi koji su u ovoj studiji bili tretirani sa FK i Hcy na kraju eksperimentalnog protokola imali su koncentraciju Hcy u serumu statistički visoko značajno nižu u odnosu na pacove koji su bili tretirani samo subkutanom aplikacijom Hcy. Pored toga vrednosti Hcy u serumu pacova tretiranih sa Hcy i FK bile su ispod granice za HHcy: 15 $\mu\text{mol/L}$ (Hankey i Eikelboom, 1999; Chubarov, 2021). FK je vitamin koji ima ulogu u remetilacijskom metaboličkom krugu u kome dolazi do prebacivanja metil grupe sa THF na Hcy pri čemu nastaje Met. Ovu reakciju katalizuje enzim MTHFR koji je značajan za snižavanje koncentracije Hcy u organizmu. Istraživanja pokazuju da usled mutacije gena za MTHFR dolazi do povećanog rizika od razvoja HHcy u uslovima sniženog unosa FK putem hrane (Yakub et al., 2012). Deficit FK povećava mogućnost razvoja HHcy kod osoba sa genotipom C677T enzima MTHFR u poređenju sa osobama sa koje imaju normalan genotip (Yakub et al., 2010). Pacovi koji su bili tretirani kombinovanom aplikacijom vitamina B6 i FK i paralelnim davanjem Hcy subkutano imali su statistički visoko značajno niže koncentracije Hcy u serumu u odnosu na pacove koji su primali samo Hcy. Isto tako, kontrolna grupa pacova koji su bili na tretmanu kombinovane intraperitonealne aplikacije vitamina B6 i FK imala je statistički visoko značajno niže koncentracije Hcy u serumu u poređenju sa kontrolom K-28 koja je primala samo fiziološki rastvor. Dobijeni rezultati su u skladu sa ranije navedenim ulogama vitamina B6 i FK kao kofaktora enzima uključenih u metaboličke puteve remetilacije i trans-sulfuracije (Jakubowski, 2019). Pacovi koji su bili na tretmanu aerobnog tredmil treninga u toku četiri nedelje i kojima je subkutano aplikovan Hcy nisu imali statistički značajno niže koncentracije Hcy u serumu u poređenju sa pacovima koji su primali samo Hcy. Kada je u pitanju uticaj fizičke aktivnosti na koncentraciju Hcy u krvi rezultati studija su veoma varijabilni. Rezultati ove studije su u skladu sa studijom Boreham i saradnika (Boreham et al., 2005) čiji rezultati pokazuju da trening ne menja koncentracije Hcy. Dobijeni nalazi su suprotni nalazima studija koje pokazuju da fizička aktivnost može da snizi koncentraciju Hcy u krvi. Studija Choi i saradnika pokazala je da nakon perioda treninga dolazi do sniženja koncentracije Hcy u krvi, dok su studije Kuo i saradnika i Ruiz i saradnika pokazale

da je koncentracija Hcy bila u negativnoj korelaciji sa visokim nivoima fizičke aktivnosti i boljom kardiorespiratornom kondicijom (Kuo et al., 2005; Ruiz et al., 2007). Pojedine studije navode potpuno suprotne rezultate, da u toku fizičke aktivnosti dolazi do povišenja koncentracije Hcy u krvi (Konig et al., 2003; Herrmann et al., 2003). Naši rezultati nisu u skladu sa ovakvim nalazima, fizički aktivna kontrola (K-FA) nema statistički značajno različitu koncentraciju Hcy u serumu u poređenju sa sedentarnom kontrolom K-28. U eksperimentalnoj studiji Ilić i saradnika (Ilic et al., 2021) kod pacova sa infarktom miokarda izazvanim izoprenalinom uočavaju se visoke koncentracije Hcy iznad 15 $\mu\text{mol/L}$, dok tretman 4'-hlordiazepamom dovodi do značajnog sniženja koncentracije Hcy kod pacova sa infarktom miokarda izazvanim aplikacijom izoprenalina u odnosu na pacove tretirane samo izoprenalinom.

Kod pacova grupe H-28 izmerene su statistički visoko značajno više koncentracije LDL i statistički visoko značajno niže koncentracije TG u serumu u odnosu na kontrolu K-28; međutim vrednosti su bile u granicama fiziološkog referentnog opsega. U grupama tretiranim vitaminom B6 svi parametri lipidnog statusa (HOL, LDL, HDL i TG) nisu se statistički značajno razlikovali u poređenju sa K-28 i H-28 grupom. HOL i HDL u serumu bili su povišeni kod pacova H-FK grupe u poređenju sa kontrolom K-28, dok je koncentracija LDL bila viša u H-FK i u K-FK grupi u odnosu na kontrolu K-28, a koncentracija TG niža u H-FK i u K-FK grupi u odnosu na K-28. U studiji Mutavdžin i saradnika (Mutavdžin et al., 2019a) tretman FK doveo je do statistički značajnog sniženja serumske koncentracije HDL i porasta koncentracije LDL i TG u poređenju sa kontrolnom grupom. U studiji Jakovljević Uzelac i saradnika (Jakovljević Uzelac et al., 2020b) tretman folnom kiselinom nije izazvao značajne promene lipidnog statusa u odnosu na kontrolnu grupu. Kombinovana aplikacija vitamina B6 i folne kiseline dovela je do statistički značajnog sniženja serumske koncentracije LDL u obe tretirane grupe (K-B6+FK i H-B6+FK) u odnosu na H-28 grupu. U studiji koja je ispitala uticaj kombinovane aplikacije vitamina B6 i FK na monokrotalinskom modelu insuficijencije desnog srca, kombinovana aplikacija navedenih vitamina nije dovela do značajnih promena lipidnog statusa u odnosu na kontrolnu grupu (Jakovljević Uzelac et al., 2020a). Kod pacova koje su bili na režimu aerobne fizičke aktivnosti, izmerene koncentracije TG u serumu su bile statistički visoko značajno niže u odnosu na kontrolu K-28, što je u skladu sa metaboličkom potrošnjom masnih rezervi lipolizom i beta oksidacijom masnih kiselina u toku aerobnog metabolizma. Povišeni nivoi Hcy, IL-6, CRP i fibrinogena u plazmi detektovani su kod pacijenata sa visokim kliničkim SYNTAX skorom preko 33 (Đurić et al., 2021). Rezultati iste studije su pokazali da HHcy i inflamatorni biomarkeri mogu predvideti ozbiljnije i opsežnije oblike koronarne arterijske bolesti kod pacijenata sa stabilnom anginom pectoris (Đurić et al., 2021).

Koncentracija vitamina B12 u serumu bila je statistički značajno viša u obe grupe tretirane sa Hcy H-14 i H-28 u poređenju sa odgovarajućim kontrolama K-14 i K-28. U metabolizmu Hcy vitamin B12 ima ulogu kofaktora za enzim MS (Jakubowski, 2019). Vitamin B12 je hidrosolubilni vitamin i u hepatocitima se nalaze njegove rezerve (Guéant et al., 2022), pa je moguće da je došlo do njegovog oslobađanja iz jetre u krvotok kod pacova koji su tretirani sa Hcy kako bi se kompenzatorno povećanom aktivnošću enzima MS vršila veća konverzija Hcy u Met. Kod pacova koji su bili na tretmanu vitaminom B6 (K-B6 i H-B6) i čije su koncentracije Hcy bile ispod 15 $\mu\text{mol/L}$, koncentracija vitamina B12 u serumu je bila statistički značajno niža u poređenju sa H-28 grupom i nije se statistički značajno razlikovala u odnosu na kontrolu K-28. Slični rezultati zapaženi su i kod pacova koji su bili na tretmanu FK, kao i kombinovanom aplikacijom vitamina B6 i FK. Međutim, kod pacova koji su bili fizički aktivni i tretirani sa Hcy, i imali koncentraciju Hcy višu od 15 $\mu\text{mol/L}$, serumska koncentracija vitamina B12 nije bila statistički značajno povišena u odnosu na kontrolu K-28, a bila je visoko značajno niža u poređenju sa H-28 grupom.

Koncentracija glukoze u krvi bila je statistički značajno viša u H-28 grupi u odnosu na K-28 grupu, dok se H-14 i K-14 grupe nisu značajno razlikovale u vrednostima koncentracije glukoze. Obe grupe tretirane vitaminom B6 imale su statistički značajno više koncentracije glukoze u krvi u poređenju sa kontrolnom grupom, a u H-B6 grupi je prisutna i statistička značajnost u odnosu na H-28 grupu. Sličan trend je prisutan i u grupama tretiranim sa FK i u grupama tretiranim kombinovanom aplikacijom vitamina B6 i FK. U studiji u kojoj je ispitivan uticaj FK u na streptozotocinskom modelu dijabetesa melitusa (Mutavdzin et al., 2019b) pacovi koji su primali samo FK nisu imali statistički značajno različitu koncentraciju glukoze u krvi u odnosu na kontrolu. Međutim, prema rezultatima ove studije tretman sa FK kod pacova kod kojih je streptozotocinom izazvan dijabetes melitus doveo je do statistički visoko značajno nižeg porasta koncentracije glukoze u krvi u poređenju sa grupom pacova koji su tretirani samo streptozotocinom. Ovakvi rezultati ukazuju na antidijabetogeni efekat FK kod pacova koji već imaju razvijenu hiperglikemiju. Pacovi koji su unutar grupa koje su bile na režimu dozirane aerobne fizičke aktivnosti nisu imali statistički značajno različitu koncentraciju glukoze u krvi u odnosu na pacove iz K-28 i H-28 grupe.

Aplikacija Hcy u H-28 grupi dovela je do statistički značajnog povišenja koncentracije glukoze, ukupnih proteina i albumina u serumu u odnosu na K-28 grupu, dok je sa druge strane koncentracija ukupnih proteina i albumina bila niža u grupama tretiranim vitaminom B6 u poređenju sa H-28 grupom. Grupe koje su bile tretirane FK imale su jedino nižu koncentraciju albumina u serumu u odnosu na H-28 grupu, a slični rezultati zabeleženi su i u grupama tretiranim kombinovanom aplikacijom vitamina B6 i FK. Obe fizički aktivne grupe K-FA i H-FA imale su nižu koncentraciju albumina u serumu u odnosu na sedentarne grupe K-28 i H-28.

Aktivnosti aminotransferaza, ALT i AST, merene su kako bi se procenila funkcija jetre. U H-14 grupi serumska aktivnost AST bila je značajno povišena u poređenju sa K-14 grupom (Todorovic et al., 2021). Mnoge studije su pokazale da povišena koncentracija Met u krvi može uticati na funkciju i izazvati oštećenja u perifernim tkivima (Mudd et al., 2011). Moguće objašnjenje za ove nalaze leži u konverziji metionina u Hcy u ciklusu remetilacije i njegovom efektu na povećanje oksidativnog stresa. Yamada i saradnici (Yamada et al., 2012) su izvestili da opterećenje metioninom u ishrani menja metabolizam lipida u hepatocitima, izaziva oksidativni stres i indukuje oštećenje hepatocita. Tretman pacova sa Met takođe može dovesti do morfoloških promena u tkivu jetre kao što su retke fokalne nekroze hepatocita i periportalna mononuklearna infiltracija (Stojanović et al., 2018). Unutar H-B6 grupe serumska aktivnost AST bila je statistički značajno niža u odnosu na H-28 grupu, što bi moglo da ukazuje na protektivni uticaj vitamina B6 na tkivo jetre. Sa druge strane, kod pacova tretiranih sa FK i kombinovanom aplikacijom vitamina B6 i FK nije bila prisutna statistički značajna razlika u serumskoj aktivnosti AST i ALT u odnosu na H-28 grupu. Isti trend je prisutan i kod pacova koji su bili na režimu dozirane fizičke aktivnosti.

Podaci iz literature prepoznaju da HHcy takođe može uticati na bubrežnu funkciju. U više studija prijavljeno je da nivoi Hcy u krvi direktno koreliraju sa nivoima kreatinina u serumu i veličinom glomerularne filtracije (Foucher et al., 2010; Dong et al., 2012; Merti et al., 2011). Hronična uremija takođe oštećuje ekstrarenalnu aktivnost enzima odgovornih za metabolizam Hcy (Jacobsen et al., 1994). U ovom istraživanju, koncentracija kreatinina bila je statistički visoko značajno povišena u H-28 grupi u odnosu na K-28 grupu. Sa druge strane, unutar H-B6 grupe pacovi su imali statistički visoko značajno nižu serumsku koncentraciju kreatinina u poređenju sa H-28 grupom. Isti trend je prisutan i kod pacova H-FK grupe i H-B6+FK grupe u čijem serumu je koncentracija kreatinina bila statistički visoko značajno niža u odnosu na H-28 grupu. Kod fizički aktivnih pacova koncentracija kreatinina je bila viša u obe aktivne grupe u odnosu na kontrolu K-28, ali se nije statistički značajno razlikovala u odnosu na H-28 grupu. Podaci iz literature ukazuju na to da opterećenje Met može da utiče na hemostatske parametre dovodeći do snižavanja aktivnosti vWF (Kostić et al., 2019).

Kako bi se procenio stepen oksidativnog stresa i kapacitet antioksidativne zaštite, u ovoj studiji, u tkivu srca, jetre i kolona merene su spektrofotometrijski aktivnosti enzima CAT, SOD i koncentracija MDA kao pokazatelja lipidne peroksidacije i elektroforetski su određivane izoforme enzima SOD. Nekoliko studija je pokazalo da je oksidativni stres pri HHcy povezan sa izmenjenim sistemom antioksidativne odbrane. U fiziološkim uslovima ROS koje nastaju u METL su uglavnom eliminisani antioksidansima, međutim, oslabljena antioksidativna odbrana je povezana sa povišenim nivoima ROS i oksidativnim stresom (Tan et al., 2018). Ključni enzimi koji čine sistem antioksidativne odbrane uključuju CAT, SOD, GPx. Mitohondrijalni SOD (MnSOD ili SOD2) neutrališe superoksidne anjone generisane u METL stvarajući H₂O₂ i O₂. Vodonik-peroksid uklanjaju enzimi, katalaza i GPx. Rezultati ove studije pokazuju da je u tkivu srca došlo do statistički značajnog povećanja aktivnosti SOD u H-28 grupi u odnosu na kontrolu K-28. Relativne aktivnosti Mn-SOD i Cu/Zn-SOD se nije statistički značajno razlikovala između K-28 i H-28 grupe u tkivu srca. Porast aktivnosti SOD u grupi tretiranoj sa Hcy mogao bi da se objasni kao kompenzatorno povećanje aktivnosti antioksidativnog enzima sa ciljem povećanog uklanjanja superoksidnog anjona u uslovima povećanog oksidativnog stresa. Aplikacija Hcy nije dovela do statistički značajne razlike aktivnosti CAT u tkivu srca u poređenju sa kontrolom. Međutim tretman sa Hcy je doveo do visoko značajnog povišenja stepena lipidne peroksidacije u srcu u odnosu na kontrolu. Podaci iz literature pokazuju da je hronična HHcy kod miševa bila povezana sa povećanom aktivnošću citosolne izoforme SOD Cu/Zn-SOD i CAT u putamenu i substanciji nigri (Bhattacharjee et al., 2016). Slično tome, hronična blaga HHcy dovela je do povećanja aktivnosti CAT, SOD i GPx u amigdalama i prefrontalnom korteksu pacova (Dos Santos et al., 2019). Pokazano je da je aktivnost Mn-SOD ostala nepromenjena u korteksu i hipokampusu pacova hronično tretiranih sa Hcy (Kumar et al., 2020). Studije koje su ispitivale uticaj Hcy na tkivo srca daju delimično različite rezultate: relativna aktivnost Mn-SOD izoforme i aktivnost CAT bile su snižene u grupama tretiranim sa Hcy (Chang et al., 2008; Longoni et al., 2017), dok je aktivnost GPx bila povišena (Longoni et al., 2017). Ukupna antioksidativna zaštita je bila značajno oslabljena u H9C2 embrionalnim srčanim ćelijama pacova tretiranim sa Hcy (Aminzadeh et al., 2018). Dokumentovani su padovi u antioksidativnoj odbrani indukovani aplikacijom Hcy u modelu endotelne disfunkcije izazvane aplikacijom Hcy-T (Wu et al., 2015). U našoj studiji u tkivu jetre pacova nije primećena značajna promena aktivnosti CAT, ukupne aktivnosti SOD i koncentracije MDA kod pacova H-28 grupe u odnosu na kontrolu K-28. Takođe u H-28 grupi nije došlo ni do promena u relativnoj aktivnosti SOD izoformi u odnosu na odgovarajuću kontrolu. U homogenatima tkiva kolona aplikacija Hcy je dovela do statistički značajnog sniženja ukupne aktivnosti SOD u H-14 grupi u poređenju sa K-14 grupom, ako i u H-28 grupi u odnosu na K-28 grupu. Koncentracije MDA u tkivu kolona u H-28 grupi pokazuje povećanje koje nije dostiglo statističku značajnost kada se poredi sa kontrolom K-28. U homogenatima tkiva kolona prisutna je samo ekspresija Mn-SOD izoforme. Rezultati studije koja je ispitivala uticaj aplikacije Hcy-T na oksidativni stres u organima digestivnog sistema (Stojanović et al., 2016) pokazuju statistički visoko značajno sniženje aktivnosti CAT u organima digestivnog sistema (duodenum, ileum, kolon i jetra) u grupi tretiranih sa Hcy-T u odnosu na kontrolu. Isto tako u istoj studiji Hcy-T je doveo do statistički visoko značajnog povećanja stepena lipidne peroksidacije u navedenim organima (Stojanović et al., 2016). Koaplikacija Hcy-T i blokatora N-metil-D-aspartat receptora MK-801 može da dovede do povišenja lipidne peroksidacije (Srejavic et al., 2015).

Aplikacija vitamina B6 nije značajno uticala na aktivnost CAT u tkivu srca, ali je dovela do statistički značajnog sniženja ukupne aktivnosti SOD u H-B6 grupi u odnosu na H-28 grupu. Stepem lipidne peroksidacije u tkivu srca je bio statistički značajno niži u H-B6 grupi u poređenju sa H-28 grupom. Sa druge strane, H-B6 grupa je imala statistički značajno višu koncentraciju MDA u tkivu srca u poređenju sa kontrolama K-28 i K-B6, uzevši u obzir da je

grupa H-B6 bila tretirana sa Hcy. U tkivu jetre aplikacija vitamina B6 nije značajno uticala na aktivnost CAT i ukupnu aktivnost SOD, međutim uočava se statistički visoko značajno sniženje stepena lipidne peroksidacije u H-B6 grupi u odnosu na H-28 grupu. Takođe stepen lipidne peroksidacije je bio niži u obe grupe tretirane vitaminom B6 u odnosu na kontrolu K-28. Uzevši u obzir ulogu vitamina B6 kao kofaktora enzima u trans-sulfuracijskom metaboličkom putu, moguće je da je povećana dostupnost vitamina B6 izazvala povećanu konverziju Hcy u Cys i time sniženje štetnog uticaja Hcy. Trans-sulfuracijski metabolički put ne samo da snižava koncentraciju Hcy već dovodi po proizvodnje Cys glavne funkcionalne aminokiseline u tripeptidu glutationu, koji predstavlja jedan od ključnih ćelijskih antioksidanasa. Jetra je centralni organ u organizmu u kome se najvećim delom obavlja metabolizam Hcy i glutationa (Lauterburg et al., 1984). Studije na prasićima u kojoj je lipopolisaharidom izvršena aktivacija makrofaga i inflamatorna reakcija pokazala je da tretman sa Cys može da utiče protektivno na ćelije povećavajući aktivnosti CAT, SOD, koncentraciju ukupnog glutationa, kao i odnosa redukovano i oksidovanog glutationa u digestivnom sistemu prasića (Song et al., 2016). Studija koja je ispitivala efekte opterećenja sa Met na tkivo jetre pacova pokazala je da aplikacija Met dovodi do statistički značajnog porasta koncentracije MDA u tkivu jetre, a značajnog sniženja aktivnosti SOD i GPx u odnosu na kontrolnu grupu (Stojanović et al., 2018). U našoj studiji aplikacija vitamina B6 nije dovela do statistički značajne promene aktivnosti CAT i SOD, kao i stepena lipidne peroksidacije u tkivu kolona u H-B6 grupi u odnosu na H-28 grupu. Prema rezultatima studije Živković i saradnika (Zivkovic et al., 2012) L-Hcy-T može da dovede do kardiotoksičnih efekata i slabljenja kontraktilne sposobnosti srca, ali i do smanjenja oslobađanja superoksidnih anjona. Takođe DL-Hcy-T može da izazove slabljenje kontraktilnosti srca, ali sniženja stepena lipidne peroksidacije (Zivkovic et al., 2013).

U ovoj studiji aplikacija FK nije izazvala statički značajnu promenu aktivnosti CAT u tkivu srca, dok je aktivnost SOD bila povećana u grupi H-FK u odnosu na kontrolu K-28, ali se nije značajno razlikovala u odnosu na H-28 grupu. Aplikacija FK dovela je do statistički značajnog porasta koncentracije MDA u srcu u obe tretirane grupe (K-FK i H-FK) u poređenju sa K-28 i H-28 grupom. U tkivu jetre aktivnost CAT i SOD se nije statistički značajno razlikovala u grupama tretiranim sa FK u odnosu na H-28 i K-28 grupu. Međutim, aplikacija FK je dovela do statistički visoko značajnog sniženja stepena lipidne peroksidacije u obe tretirane grupe u odnosu na H-28 grupu. Kontrola koja je bila tretirana sa FK pokazala je niži stepen lipidne peroksidacije u tkivu jetre i u odnosu na kontrolu K-28 koja je primala samo fiziološki rastvor. Aplikacija FK je u tkivu kolona dovela do statistički značajnog porasta aktivnosti CAT u odnosu na H-28 i K-28 grupu, dok na ukupnu aktivnost SOD i koncentraciju MDA nije imala značajan uticaj. U studiji Mutavdžin i saradnika (Mutavdžin et al., 2019a) pokazano je da aplikacija folne kiseline u modelu dijabetesa melitusa ostvaruje protektivne efekte na tkivo srca dovodeći do snižavanja aktivnosti enzima CAT i SOD u odnosu na pacove koji su imali razvijen dijabetes melitus, a nisu primali suplementaciju FK. Smatra se da je aktivnost navedenih enzima bila niža zbog smanjene produkcije vodonik peroksida i superoksidnih anjona u tkivu srca usled tretmana sa FK. Studija (Stanhewicz i Kenney, 2017) navodi smanjenje produkcije superoksidnih anjona u reakciji enzima NO sintaze usled tretmana sa FK. Rezultati studije (Djuric et al., 2007) navode da je na izolovanom srcu pacova, aplikacija FK dovela do povećanja koronarnog protoka i smanjenja produkcije superoksidnih anjona. Međutim u istoj studiji došlo je do povećanja indeksa lipidne peroksidacije usled aplikacije FK. Aplikacija L-NAME, koji je inhibitor enzima NO sintaze dovela je do suprotnih efekata ili je umanjila efekte delovanja FK, na osnovu čega se može izvesti zaključak da su efekti delovanja FK u kardiovaskularnom sistemu posredovani sa NO.

Kombinovana aplikacija vitamina B i FK dovela je do sniženja ukupne aktivnosti SOD u tkivu srca u obe tretirane grupe u poređenju sa grupom H-28, dok sa druge strane nije ostvarila značajan uticaj na aktivnost enzima CAT. Suprotno očekivanom protektivnom uticaju,

kombinovana aplikacija vitamina B6 i FK izazvala je porast lipidne peroksidacije u srcu u obe tretirane grupe. U tkivu jetre u H-B6+FK grupi aktivnost CAT je bila značajno niža nego u H-28 grupi, dok se aktivnost SOD i koncentracija MDA u tkivu jetre nije značajno razlikovala u grupama tretiranim vitaminom B6 i FK u odnosu na H-28 grupu. U tkivu kolona se uočava da je aktivnost CAT bila najniža u H-B6+FK grupi ali bez dostizanja statističke značajnosti u poređenju sa H-28 grupom, dok se aktivnost SOD i koncentracija MDA nisu statistički značajno razlikovali u poređenju sa H-28 grupom. U studiji u kojoj je ispityvan uticaj kombinovane aplikacije vitamina B6 i folne kiseline na modelu insuficijencije desnog srca izazvane monokrotalinom, pokazano je da koaplikacija navedenih vitamina kod pacova koji su tretirani monokrotalinom dovodi do sniženja aktivnosti SOD, dok na GPx nema značajan uticaj (Jakovljevic Uzelac et al., 2020a). Slično sniženje aktivnosti SOD uočeno je kod trudnica prilikom suplementacije vitaminima (Hunaiti i Saleh, 1996).

Tretman doziranom aerobnom fizičkom aktivnošću u uslovima opterećenja sa Hcy nije statistički značajno uticao na aktivnost CAT, niti na koncentraciju MDA u tkivu srca u odnosu na H-28 grupu. Koncentracija MDA je bila povišena u obe grupe tretirane sa Hcy (H-28 i H-FA) u odnosu na kontrolu K-28. Sa druge strane aktivnost SOD bila je statistički značajno niža u obe fizički aktivne grupe u poređenju sa H-28 i K-28 grupom. U tkivu jetre aerobna fizička aktivnost nije pokazala značajan uticaj na aktivnosti CAT i SOD, ali se u tkivu jetre pokazala kao protektivna statistički značajno snižavajući stepen lipidne peroksidacije u obe aktivne grupe u odnosu na sedentarne grupe K-28 i H-28. Ipak, aktivna grupa koja je bila opterećena subkutanom aplikacijom Hcy imala je značajno višu koncentraciju MDA u tkivu jetre u odnosu na fizički aktivnu kontrolu. Slični rezultati uočavaju se u tkivu kolona gde je fizička aktivnost dovela do značajnog sniženja koncentracije MDA u odnosu na kontrolu K-28, ali je koncentracija MDA bila ipak značajno viša u H-FA grupi u poređenju sa K-FA grupom. U H-FA grupi primećena je statistički značajno veća aktivnost SOD u tkivu kolona u odnosu na H-28 i K-FA grupu, dok sa druge strane tretman aerobnom fizičkom aktivnošću nije imao značajan uticaj na aktivnost CAT u tkivu kolona. Nekoliko studija pokazalo je da fizička aktivnost može da ima značajan uticaj u modulaciji oksidativnog stresa. Niži stepen oksidativnog stresa uočen je kod sportista u odnosu na kontrolne ispitanike, kako u mirovanju tako i neposredno nakon vežbanja (Pingitore et al., 2015). Koncentracija MDA i karbonilne grupe u proteinima bili su niži kod utreniranih u poređenju sa neutreniranim ispitanicima, dok je aktivnost SOD bila viša kod sportista u poređenju sa sedentarnim ispitanicima (Vassalle et al., 2002; Ortenblad et al., 1997). S druge strane, aktivnosti CAT i GPx, bile su više kod sportista u poređenju sa sedentarnim ispitanicima (Dékány et al., 2006). Zanimljivo je napomenuti da dobro utrenirani ispitanici takođe mogu biti otporniji na nagla opterećenja organizma oksidativnim stresom koje izaziva akutno vežbanje visokog intenziteta, što je potvrđeno na animalnim modelima i studijama na ljudima (Radak et al., 2008). Akutno iscrpljujuće vežbanje povišilo je koncentraciju MDA u eritrocitima kod sedentarnih, ali ne i kod utreniranih pacova, i snizio je aktivnost eritrocitne SOD kod sedentarnih pacova, dok je povećalo aktivnost ovog enzima kod utreniranih pacova (Oztasan et al., 2004).

Istraživanja pokazuju da su značajna povećanja u generisanju mitohondrijalnih ROS takođe uočena u korteksu velikog mozga i hipokampusu pacova koji su bili hronično tretirani sa Hcy (Folbergrová et al., 2007; Kumar et al., 2020; Kumar et al., 2018). Istraživanja na izolovanim mitohondrijama su pokazala da Hcy povećava produkciju ROS u bubrezima, dok je produkcija ROS u srcu i mozgu bila smanjena (Gomez et al., 2011). Međutim postoje i studije koje su dale drugačije rezultate. Rezultati Zhang i saradnika pokazuju da akutni tretman neuralnih ćelija sa visokom koncentracijom Hcy, inhibitorno deluje na mitohondrijalnu respiraciju i smanjuje produkciju ROS u mitohondrijama (Zhang et al., 2016). Sa druge strane, određene studije navode da Hcy nije ostvario značajan uticaj na parametre oksidativnog stresa. Produkcija ROS i oksidativna oštećenja su ostala nepromenjena u mozgu i srcu pacova sa

hroničnom blagom HHcy (Timkova et al., 2016; Dos Santos et al., 2019). Kao što je ranije pomenuto, postoji nekoliko potencijalnih mehanizama koji objašnjavaju kako Hcy može da utiče na produkciju ROS, uključujući auto-oksidaciju Hcy, izmenjenu gensku ekspresiju i postranslacione modifikacije prooksidativnih/antioksidativnih enzima. U prisustvu prelaznih metala koji se ponašaju kao katalizatori, Hcy može generisati superoksidne radikale i H₂O₂ putem spore auto-oksidacije (Hogg et al., 1999). Povećana produkcija H₂O₂ kroz auto-oksidaciju Hcy u prisustvu bakra je dovela do oštećenja kultivisanih endotelnih ćelija (Starkebaum et al., 1986). U mitohondrijama kardiomiocita, generisanje superoksidnih radikala i H₂O₂ je indukovano odmah nakon inicijacije mitohondrijalne respiracije sukcinatom kao supstratom (Chang et al., 2004). Ovaj nalaz sugerise da Hcy pospešuje povećanu produkciju superoksida u reakcijama METL. Pod fiziološkim uslovima, oslobađanje superoksida u ovim reakcijama je slabo i u fiziološkoj meri aktivira redoks signalne puteve, što rezultira aktivacijom sistema antioksidativne odbrane i zanemarljivim stepenom oksidativnog stresa. Međutim, neravnoteža u reakcijama METL koju izloženost Hcy izaziva, može povisiti koncentraciju mitohondrijalnih ROS i oksidativni stres. Nakupljanje ROS dalje pojačava disfunkciju METL i vodi u začarani krug generisanja ROS. Jedan od verovatnih mehanizama koji leže u osnovi promena aktivnosti kompleksa METL i povećanog „curenja“ ROS u uslovima HHcy je postranslaciona modifikacija proteina. Ekspresija enzima antioksidanasa regulisana je putem Keap1-Nrf2 signalnog puta, koji je glavni regulator ćelijske redoks homeostaze. Pri povećanoj proizvodnji ROS, Nrf2 se oslobađa Keap1-posredovane degradacije i ulazi u jedro gde aktivira transkripciju gena koji kodiraju antioksidantne enzime (Holmström et al., 2016). Nrf2 signalizacija takođe igra ulogu u mitohondrijalnoj homeostazi, i patofiziološke promene u Nrf2 putu mogu da dovedu do poremećaja funkcije mitohondrija (Holmström et al., 2016; Kaidery et al., 2019). Smanjena ekspresija Nrf2 izazvana sa Hcy paralelno sa smanjenom ekspresijom i aktivnošću antioksidativnih enzima i povećanom produkcijom ROS je dokumentovana u nekoliko studija (Tan et al., 2013; Wu et al., 2019a). Akutni tretman sa Hcy može da dovede do aktivacije osovine Nrf2-GPx, dok hronična HHcy uzrokuje značajno smanjenje Nrf2 i aktivnosti GPx (Wu et al., 2019b). Hcy aktivira Nrf2 kroz oksidaciju njegovog inhibitornog proteina Keap1, dok se inhibicija puta Nrf2 u hroničnoj HHcy objašnjava izmenjenom metilacijom DNK (Wu et al., 2019b). Iz navedenih rezultata se uočava da promene u antioksidantnim i prooksidativnim enzimima mogu doprineti Hcy-posredovanom oksidativnom stresu i mitohondrijskoj disfunkciji. Gubitak aktivnosti antioksidativnih enzima izazvan sa Hcy može proizilaziti takođe i iz promenjene sinteze enzima zbog promena u ekspresiji gena. SAH se pokazao kao potentan inhibitor transmetilacionih reakcija zavisnih od SAM jer dovodi do smanjenja SAM/SAH odnosa. Pokazano je da u HHcy dolazi do paralelnog povišenja koncentracije SAH u ćelijama i smanjenja kapaciteta metilacije, što rezultira hipometilacijom DNK (Mandaviya et al., 2014). Hipometilacija DNK i modifikacije histona posredovane povišenjem koncentracije Hcy, narušavaju epigenetsku kontrolu ekspresije gena i mogu doprineti patogenezi različitih bolesti povezanih sa HHcy.

Podaci iz literature pokazuju da opterećenje sa Hcy može da vrši uticaj na promenu aktivnosti enzima koji su uključeni u reakcije energetskog metabolizma. Analiziranjem uticaja HHcy kod ljudi i na animalnim modelima studija Cueto i saradnika navodi da 15 nuklearnih gena za proteine METL pokazuje smanjenu ekspresiju u uslovima HHcy (Cueto et al., 2018). Među identifikovanim genima, jedanaest je bilo za kompleks I METL, jedan za kompleks IV METL i dva za kompleks V METL. Pošto 4 od 11 gena kompleksa I METL, čiju je ekspresiju Hcy smanjio, kodiraju osnovne podjedinice koje su neophodne za njegovu aktivnost, autori sugerisu da disfunkcija kompleksa I zbog promena u ekspresiji gena može igrati primarnu ulogu u promenama energetskog metabolizma izazvanih sa Hcy. Ova studija je takođe pokazala da su srce i mozak organi koja su posebno osetljivi na uticaj HHcy na energetski metabolizam. Neravnoteža među kompleksima METL može rezultirati povećanim oslobađanjem ROS i

oksidativnim oštećenjem. Značajni dokazi o mitohondrijskom oksidativnom oštećenju povezanim sa HHcy su dobijeni u različitim tkivima u raznim eksperimentalnim okolnostima. Mitohondrijska DNK (mtDNK) je dvostruka, kružna DNK u čijem sastavu se nalaze geni za kodiranje 13 mitohondrijskih proteina, koji predstavljaju subjedinice kompleksa I, III, IV i V METL. Za razliku od jedarne DNK, mtDNK nije zaštićena histonskim proteinima i ima manje efikasne sisteme popravke i stoga je podložnija oksidativnim oštećenjima i mutacijama. Proteini predstavljaju primarne target molekule za ROS. Modifikacije proteina, kao što su oksidacija sulfhidrilnih grupa, nitracija tirozina i formiranje karbonilnih grupa, usled HHcy u tkivu srca, mozga i krvnih sudova prijavljene su od strane više studija (Longoni et al., 2017; Folbergrová et al., 2010; Perez-De-Arce et al., 2005). Navedene modifikacije proteina rezultiraju njihovim strukturalnim promenama i gubitkom funkcije, što za posledicu ima narušavanje homeostaze energetskeg metabolizma.

U ovoj studiji procena energetskeg metabolizma vršena je spektrofotometrijskim merenjem ukupne aktivnosti enzima LDH i MDH kao i elektroforetskim određivanjem ekspresije njihovih izoformi i denzitometrijskom kvantifikacijom relativnih aktivnosti izoformi LDH i MDH u tkivu srca, jetre i kolona. Aplikacija Hcy nije pokazala značajni uticaj na ukupne aktivnosti LDH i MDH. U tkivu srca detektovane su 4 izoforme LDH: LDH1, LDH2, LDH3 i LDH4 i 3 izoforme MDH: pMDH, mMDH i cMDH. Nije detektovana statistički značajna razlika u relativnim aktivnostima LDH i MDH u tkivu srca usled tretmana sa Hcy. Slični rezultati su dobijeni i u tkivu jetre, gde se ukupne aktivnosti LDH i MDH nisu razlikovale u grupama tretiranim sa Hcy u poređenju sa odgovarajućim kontrolama. U tkivu jetre aktivnosti su pokazale samo 3 izoforme LDH: LDH1, LDH2 i LDH3 i izoforme se nisu međusobno razlikovale u relativnoj aktivnosti. U tkivu jetre detektovana je aktivnost jedino mMDH izoforme. U tkivu kolona tretman sa Hcy takođe nije doveo do statistički značajnih promena ukupnih aktivnosti LDH i MDH u poređenju sa kontrolama. U tkivu kolona aktivnosti su ispoljile 4 izoforme LDH i denzitometrijskim određivanjem relativnih aktivnosti primećuje se statistički značajno snižene aktivnosti izoforme LDH3, na račun povećanja LDH4 u grupi H-14 u odnosu na K-14 grupu. Rezultati studije Ostapiv i saradnika (Ostapiv et al., 2015) navode da ovakva promena odnosa izoformi LDH ukazuje da u tkivu vladaju hipoksični uslovi. MDH je u tkivu kolona kao i u tkivu jetre pokazala aktivnost samo mMDH izoforme.

Tretman vitaminom B6 u uslovima opterećenja sa Hcy doveo je do statistički značajnog porasta aktivnosti LDH u srcu u odnosu na H-28 grupu, ali nije pokazao značajan uticaj na aktivnost MDH. Sa druge strane u tkivu jetre i kolona aplikacija vitamina B6 nije dovela do značajnih promena aktivnosti enzima LDH i MDH.

Tretman FK u uslovima opterećenja Hcy nije značajno uticao na aktivnosti LDH i MDH u tkivu srca i kolona, ali je u tkivu jetre doveo do statistički značajnog sniženja aktivnosti LDH u obe tretirane grupe (K-FK i H-FK) u odnosu na H-28 grupu i kontrolu K-28. U studiji Mutavdžin i saradnika (Mutavdžin et al., 2019a) aplikacija FK nije značajno uticala na aktivnost LDH u tkivu srca pacova, što je u skladu sa našim rezultatima. U istoj studiji samostalno primenjena FK nije dovela do značajnih promena aktivnosti MDH u srcu, međutim kod pacova sa izazvanim dijabetesom melitusom FK je dovela do statistički značajnog sniženja aktivnosti MDH u tkivu srca u odnosu na kontrolne i pacove sa dijabetesom koji nisu primali FK.

Kombinovana aplikacija vitamina B6 i FK je u ovoj studiji dovela do povišenja aktivnosti MDH u tkivu srca jedino kada je samostalno primenjena, ali u uslovima opterećenja Hcy ne dolazi do navedenih promena MDH aktivnosti. Sa druge strane u tkivu srca aktivnost LDH se nije promenila pri kombinovanoj aplikaciji vitamina B6 i FK.

Četvoronedeljni aerobni tredmil trening je u uslovima HHcy doveo do statistički značajnog povećanja aktivnosti LDH i MDH u tkivu srca u odnosu na H-28 i K-28 grupu. Iste promene se uočavaju i u tkivu jetre, dok je u tkivu kolona došlo do porasta aktivnosti LDH, ali aktivnost MDH nije pokazala značajne promene u odnosu na H-28 i K-28 grupu. Važno je istaći

da je tredmil trening koji je primenjen u ovoj studiji, prema podacima iz literature (Manchado et al., 2005), odgovarao aerobnom treningu, jer se pri brzini trake od 20 m/min postiže ravnotežna tačka u kojoj je brzina proizvodnje laktata jednaka brzini njegovog uklanjanja, tj. postiže se maksimalna stabilizacija koncentracije laktata u krvi pacova. Takođe, bitno je naglasiti da promene aktivnosti metaboličkih enzima nisu bile značajne u fizički aktivnoj kontroli, međutim kada su pacovi bili aktivni u uslovima opterećenja sa Hcy došlo je do promena aktivnosti metaboličkih enzima (Todorovic et al., 2021).

Istraživački podaci navode da opterećenje sa Hcy može uticati na aktivnost enzima uključenih u energetske metabolizam. Eksperimentalna studija na pacovima koju su sproveli Kolling i saradnici istraživala je efekat hronične HHcy na aktivnosti enzima Krebsovog ciklusa (Kolling et al., 2013). Prema rezultatima ove studije, Hcy samostalno nije izazvao promenu u aktivnosti enzima uključenih u Krebsov ciklus: citrat sintetaze, izocitrat dehidrogenaze i MDH. Međutim, u kombinaciji sa primenom kreatina, aplikacija Hcy je izazvala promenu aktivnosti citrat sintetaze i izocitrat dehidrogenaze. Sinteza kreatinina i Hcy su najverovatnije metabolički povezane, te su Wyss i saradnici (Wyss et al., 2000) pokazali da je endogena sinteza kreatinina najvažniji faktor u održavanju ravnoteže između metilacije i stvaranja Hcy u ćelijama. kao i da je suplementacija kreatinina mogla da koriguje disbalans energetskog metabolizma usled HHcy. Moguće je da u skladu sa navedenim rezultatima i u našoj studiji, aplikacija Hcy samostalno nije dovela do promene aktivnosti enzima uključenih u energetske metabolizam u poređenju sa kontrolnom grupom, ali pod uslovima fizičke aktivnosti, Hcy može uticati na promenu aktivnosti ovih enzima. Ključne metaboličke reakcije uključene u produkciju energije, kao što su Krebsov ciklus i reakcije METL, odvijaju se u mitohondrijama. Mnoge studije su potvrdile da HHcy može uticati na mitohondrijsku respiraciju menjanjem aktivnosti enzima uključenih u ove reakcije. *In vitro* i *in vivo* studije su pokazale da Hcy može sniziti aktivnost kompleksa II, III i IV METL i smanjiti produkciju energije u srčanom tkivu (Chang et al., 2008; Timkova et al., 2016; Longoni et al., 2017). Aktivnost sukcinat dehidrogenaze, enzima Krebsovog ciklusa koji je vezan za unutrašnju membranu mitohondrija, smanjena je u srčanom tkivu nakon akutne primene Hcy na isečcima srca tokom 1 h (Chang et al., 2008). S druge strane, hronična primena Hcy je dovela do povećane aktivnosti sukcinat dehidrogenaze u srcu pacova (Longoni et al., 2017). Timkova i saradnici opisali su adaptivnu „up regulaciju“ izocitrat dehidrogenaze u srčanom tkivu pacova sa blagom HHcy (Timkova et al., 2016).

Uzimajući u obzir sve ove efekte HHcy na komponente METL, promene u aktivnostima enzima uključenih u energetske metabolizam mogu se objasniti kao kompenzatorni mehanizam koji ima za cilj održavanje produkcije ATP na adekvatnom nivou, što bi moglo biti moguće objašnjenje za povećanje aktivnosti mMDH u HPA grupi u ovoj studiji. Zanimljivo je da je ukupna aktivnost LDH takođe povećana u HPA grupi iako je model fizičke aktivnosti korišćen u ovoj studiji model koji je dokazano aktivira aerobni metabolizam, a konverzija piruvata u laktat katalizovana sa LDH je reakcija anaerobnog metabolizma. Možemo pretpostaviti da je povećana ukupna aktivnost LDH u HFA grupi mogla biti kompenzatorni odgovor koji usmerava energetske metabolizam prema anaerobnim reakcijama zbog prethodno pomenutih efekata HHcy na respiratorni lanac u mitohondrijama. Tačan mehanizam ovih metaboličkih efekata Hcy treba istražiti u novim studijama koje se fokusiraju na merenje aktivnosti drugih enzima aerobnog metabolizma pod istim uslovima. Ako imamo na umu da je LDH poznat kao biohemijski marker oštećenja tkiva, njegovo povećanje može se objasniti, barem delimično, stresom izazvanim Hcy. Takođe, povećana potreba za kiseonikom tokom četvoronedeljnog perioda aerobnog treninga potencijalno je povezana sa pojačanom produkcijom ROS, doprinoseći oštećenju srčanog tkiva i povišuju LDH aktivnosti. Slično našim rezultatima, povišene vrednosti LDH su zabeležene tokom ishemijsko-reperfuzione povrede, mada su ovi efekti bili ublaženi visoko-intenzivnim intervalnim treningom prvog i sedmog dana nakon vežbanja (Rahimi et al., 2015). Iako postoji široko rasprostranjeno uverenje da fizička aktivnost

ima povoljne efekte na srčano tkivo, čini se da su i trajanje i intenzitet vežbanja važni faktori u postizanju potencijalno kardioprotektivnih efekata fizičke aktivnosti (Kavazis et al., 2009), posebno u nefiziološkim uslovima kao što je opterećenje sa Hcy, koje može da utiče na promenu aktivnosti metaboličkih enzima.

Za procenu uticaja opterećenja Hcy na remodelovanje tkiva srca, jetre i kolona u homogenatima organa detektovane su aktivnosti enzima MMP SDS-PAGE elektroforetskom tehnikom. u tkivu srca detektovana je izoforma MMP-9 i denzitometrijskom analizom nije uočena statistički značajna razlika u relativnoj aktivnosti MMP-9 u grupama tretiranim Hcy u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim grupama. U tkivu jetre detektovane su dve izoforme MMP: MMP-9 i MMP-2. Denzitometrijskom analizom primećen je statistički visoko značajni porast aktivnosti MMP-9 u tkivu jetre u H-14 grupi u odnosu na K-14 grupu. Međutim slična promena aktivnosti nije prisutna kada se poredi H-28 grupa sa K-28 grupom. Takođe u tkivu jetre tretman Hcy nije doveo do značajnih promena aktivnosti MMP-2. U tkivu kolona detektovana je samo izoforma MMP-2. Relativna aktivnost MMP-2 u tkivu kolona je bila najveća u H-28 grupi, ali bez dostizanja statističke značajnosti u poređenju sa kontrolom. Istraživački podaci ukazuju na to da Hcy može da indukuje formiranje ROS i dovede do aktivacije MMP. Hcy može da stimuliše akumulaciju mastocita i sintezu intersticijumskog kolagena u tkivu srca, što dovodi do perivaskularne fibroze i poremećaja odnosa kolagen/elastin (Perla-Kaján et al., 2008). Opisane histološke promene su od velikog funkcionalnog značaja jer mogu da poremete kontraktilnu sposobnost miokarda (Perla-Kaján et al., 2008). Kao krajnji ishod, navedene promene u tkivu srca oslabljuju kontraktilnu efikasnost srčanog mišića dovodeći do srčane insuficijencije. Povećana aktivnost MMP može izazvati oštećenje funkcije jonskih kanala i uzrokovati poremećaje u provođenju impulsa između kardiomiocita, što posledično dovodi do razvoja aritmija (Moshal et al., 2007). Podaci iz literature navode da su MMP slabo aktivne u intaktnom miokardu, ali da tokom HHcy njihova aktivnost raste (Tyagi et al., 1998). U našoj studiji tretman sa Hcy nije doveo do značajnih promena aktivnosti MMP u tkivu srca i kolona, ali je u tkivu jetre detektovan porast aktivnosti izoforme MMP-9 u grupi kojoj je aplikovan Hcy subkutano u toku dve nedelje. Potrebno je uraditi dodatna istraživanja koja bi ispitivala efekat različitih doza Hcy i različite dužine tretmana opterećenja sa Hcy kako bi se detaljnije ispitala dinamika uticaja Hcy na aktivnost MMP u različitim tkivima.

Na histološkim preparatima tkiva srca ne uočavaju se znaci ishemijske, i raspored vlakana miokarda je pravilan u grupama tretiranim sa Hcy. Histomorfometrijska analiza tkiva srca pokazala je da tretman Hcy doveo do statistički značajnog porasta debljine zida leve i desne komore u H-28 grupi u poređenju sa K-28, ali se takve promene ne uočavaju u H-14 grupi. Debljina interventrikularnog septuma i transverzalni dijametar kardiomiocita su ostali nepromenjeni usled tretmana Hcy.

U grupi koja je bila tretirana vitaminom B6 i Hcy ne uočava se porast debljine zida leve i desne komore. Debljina zida desne komore bila je statistički visoko značajno niža u H-B6 grupi u odnosu na H-28 grupu, dok između H-B6 i kontrolnih grupa nije uočena statistički značajna razlika.

Slično efektu vitamina B6 i tretman sa FK je sprečio povećanje debljine zida desne komore koje je prisutno u grupi H-28. Debljina zida desne komore je statistički značajno niža u H-FK grupi u odnosu na H-28 grupu.

Kombinovana aplikacija vitamina B6 i folne kiseline je dovela do sličnih rezultata. U H-B6+FK grupi debljina zida desne komore je statistički visoko značajno niža nego u H-28 grupi, a ne razlikuje se značajno u odnosu na kontrolnu grupu.

U grupama koje su bile fizički aktivne primećen je statistički blag porast debljine interventrikularnog septuma i transverzalnog dijametra kardiomiocita, ali se ne uočavaju značajne promene debljine zida leve i desne komore.

Histološka analiza tkiva aorte pokazala je da je tretman sa Hcy doveo do statistički visoko značajnog porasta debljine tunike medije u H-14 grupi u odnosu na K-14 grupu, međutim takva promena nije uočena u H-28 grupi. Tretman sa vitaminom B6, FK ili kombinovanom aplikacijom vitamina B6 i FK, nije doveo do značajnijih promena u histološkoj arhitektonici tkiva aorte. Međutim, u grupi koja je bila fizički aktivna u uslovima izazvane HHcy, primećuje se pojava aterosklerotskog plaka (Todorovic et al., 2023).

Prema dosadašnji saznanjima, HHcy je snažno povezana sa procesom remodelovanja miokardnog tkiva. HHcy može da dovede do hipertrofije kardiomiocita i apoptoze usled povećane aktivacije kaspaze 3 (Chaouad et al., 2019). Akumulacija kolagenih vlakana je posledica neravnoteže u aktivnosti matriks metaloproteinaza MMP-2 i MMP-9, i tkivnih inhibitora matriks metaloproteinaza (TIMP) TIMP1 i TIMP2 (Chaouad et al., 2019). Faktor transformacije rasta beta (TGF- β) se smatra glavnim posrednikom u procesu miokardne fibroze. Imunohistohemijske tehnike koristeći indirektnu avidin-biotin-peroksidazu metodu amplifikacije otkrile su povećano prisustvo kolagena I i kolagena III u intersticijumu, naročito u perivaskularnim delovima, zatim povećanu ekspresiju TGF- β , MMP-9 i TIMP2, i smanjenu imunoekspresiju MMP-2 i TIMP1. Takođe, intenzivno imunohistohemijsko prebojavanje kaspaze 3 je detektovano u kardiomiocitima i fibroblastima srčanog tkiva (Chaouad et al., 2019). Akutno indukovana HHcy kod zdravih ispitanika smanjuje aortnu distenzibilnost i pogoršava funkcionalnost miokarda leve komore, kako je pokazano Tei indeksom, koji se izračunava kada se zbir trajanja izovolometrijske relaksacije i izovolometrijske kontrakcije deli vremenom eejkcije. Ovo istraživanje pruža podatke koji ukazuju na funkcionalne promene usled procesa strukturalnog remodelovanja (Eleftheriadou et al., 2013). Mehanizam remodelovanja srčanog tkiva u HHcy se objašnjava i promenama u metabolizmu NO koje doprinose oksidativnom stresu i povećavaju aktivaciju MMP, što dovodi do vaskularnog remodelovanja u koronarnoj cirkulaciji (Steed i Tyagi, 2011; Carnicer et al., 2007). Posledice navedenih promena su nesrazmerna asimetrična dilatacija i hipertrofija leve komore (Alter et al., 2010; Joseph et al., 2003). HHcy može da izazove remodelovanje srčanog tkiva, i da bude povezana sa izraženijom intersticijalnom i perivaskularnom fibrozom, opterećenje sa Met bez vitamin B kompleksa može da izazove značajne negativne efekte povezane sa HHcy (Jeremic et al., 2018).

Aplikacija Hcy nije dovela do značajnih histoloških promena u tkivu jetre. Hepatociti su zadržali fiziološki radijalni raspored prema centralnoj veni u vidu jetrinih gredica. Jetrini lobulusi su očuvane arhitektonike. Ne primećuje se proširenje sinusoidnih kapilara između gredica hepatocita i njihova orijentacija je pravilna. Hepatociti sadrže jedno do dva pravilna, okrugla, euhromatska jedra u kojima se uočava formirano jedarce, kao i eozinofilnu citoplazmu sa pojedinim bazofilnim zonama koje odgovaraju endoplazmatskom retikulumu. Ne uočava se mikro- i makrovezikularna masna promena hepatocita. Nije uočljiva fibroza, niti ciroza. Ne uočava se zastoj žuči. Jedino je u uzorcima jetre unutar H-14 grupe određenim hepatocitima primećeno blago smanjenje depoa glikogena i blaga hiperplazija Kupferovih ćelija.

Takođe, tretman sa vitaminom B6, FK ili kombinovanom aplikacijom vitamina B6 i FK, kao ni tretman doziranom aerobnom fizičkom aktivnošću nisu doveli do značajnijih promena u histološkoj arhitektonici tkiva jetre.

Istraživački podaci pokazuju da Hcy može da dovede do značajnih histoloških promena u tkivu jetre, iako u našoj studiji takvi nalazi nisu zabeleženi. Povišenje koncentracije SAH i hipometilacija DNK mogu ozbiljno uticati na ekspresiju kaspaze-8, usled čega može doći do povećane apoptoze hepatocita (Hao et al., 2017). Usled nakupljanja Hcy u ćelijama dolazi do smanjenja konverzije SAH u Hcy, pa nastaje i nakupljanje SAH i smanjenje SAM/SAH odnosa. Smanjenje nivoa SAM može uzrokovati fibrozu jetre (Guo et al., 2016). Hronični nedostatak SAM, doveo je do razvoja makrovezikularne masne promene, infiltracije mononukleara u periportnom prostoru i HCC kod eksperimentalnih pacova (Pascale et al., 2019).

Histološkom analizom tkiva kolona nisu primećeni znakovi IBC, znaci kriptitisa, niti kriptni apscesi, nisu uočljive erozije i ulceracije, niti tumorske izmene epitela u grupama koje su tretirane sa Hcy. Aplikacija Hcy dovela je do statistički značajnog porasta dubine Liberkinovih kripti, debljine tunike mukoze i broja ćelija u lamini propriji u odnosu na kontrolu, dok debljina lamine muskularis mukoze i ukupna debljina zida kolona nisu pokazale statistički značajnu razliku.

Usled tretmana vitaminom B6 došlo je do statistički značajnog smanjenja dubine Liberkinovih kripti, debljine tunike mukoze i broja ćelija u lamini propriji kolona u H-B6 u odnosu na H-28 grupu. Slični rezultati prisutni su i u grupi H-FK, gde su dubina Liberkinovih kripti i debljine tunike mukoze kolona imale značajno niže vrednosti u poređenju sa H-28 grupom. Međutim, u H-FK grupi se ne primećuje statistički značajna razlika u broju ćelija u lamini propriji kolona u odnosu na H-28, ali je zato ukupna debljina zida kolona statistički značajno snižena i debljina lamine muskularis mukoze kolona značajno povećana u odnosu na H-28 grupu. Kombinovana aplikacija vitamina B6 i FK dovela je do značajnog smanjenja dubine Liberkinovih kripti i ukupne debljine zida kolona u H-B6+FK grupi u odnosu na H-28 grupu, ali nije značajno uticala na debljinu tunike mukoze, debljinu lamine muskularis mukoze i broj ćelija u lamini propriji kolona. U H-FA grupi u odnosu na H-28 grupu dubina Liberkinovih kripti i debljina tunike mukoze kolona bile su statistički značajno snižene, dok se debljina lamine muskularis mukoze, ukupna debljina zida i broj ćelija u lamini propriji kolona nisu statistički značajno razlikovali.

Povezanost povišene koncentracije Hcy i IBC prvi put je referisana još 1996 godine kad je uočeno da pacijenti oboleli od Kronove bolesti imaju statistički značajno višu koncentraciju Hcy u krvi u poređenju sa zdravim ispitanicima (Lambert et al., 1996). Uzrok HHcy kod pacijenata sa IBC je uglavnom pripisan nižoj koncentraciji vitamina B6 (Saibeni et al., 2003), FK (Kallel et al., 2011) i vitamina B12 (Erzin et al., 2008). U našoj studiji nisu uočeni znakovi IBC kod pacova koji su tretirani sa Hcy, prisutne su jedino promene u histomorfometrijskim parametrima. Studija na svinjama koja je posmatrala histološke promene u zidu jejunuma, ileuma i kolona u uslovima nedostatka sumporovitih amino kiselina detektovala je smanjenje visine i površine crevnih resica, dubine kripti, kao i smanjenje broja peharastih ćelija u tkivu jejunuma i ileuma (Bauchart-Thevret et al., 2009). Ki67 marker proliferacije ćelija pokazao je manju ekspresiju u jejunumu i kolonu u eksperimentalnoj grupi u poređenju sa kontrolnom. Rezultati navedene studije pokazuju da nedostatak sumporovitih amino kiselina dovodi do inhibicije rasta epitela i smanjenja morfometrijskih parametara u digestivnom traktu. S druge strane, naši rezultati pokazuju, da je opterećenje sa Hcy dovelo do povećanja broja ćelija u lamini propriji, što može ukazivati na početne pro-inflamatorne efekte, mada znaci uznapređovalog inflamatornog oštećenja tkiva nisu prisutni. Nasuprot tome, primena vitamina B6, preokrenula je efekte Hcy i dovela do smanjenja broja ćelija u H-B6 grupi čak i pored primene Hcy. Dobijeni rezultati su u skladu sa fiziološkom ulogom vitamina B6 kao kofaktora enzima CBS i CGL, koji u trans-sulfuracijskom metaboličkom putu dovode do konverzije Hcy u Met i time do sniženja njegove koncentracije. Takođe dobijeni rezultati su u skladu sa nalazima studije (Saibeni et al., 2003) koja pokazuje da je kod pacijenata sa IBC snižena koncentracija vitamina B6. Zhu i saradnici su u svojoj studiji na modelu kolitisa izazvanog aplikacijom natrijum dekstran sulfata kod pacova, posmatrali efekte HHcy i zaključili da HHcy (indukovana oralnim unosom Met) potencira zapaljenske promene u tkivu kolona pacova (Zhu et al., 2015). Istraživački podaci ukazuju na to da SAM može ostvariti povoljne efekte u smanjenju rizika za nastanak karcinoma debelog creva indukovano zapaljenskim procesom kod miševa (Li et al., 2012).

Iz mnogobrojnih istraživanja, kao i iz rezultata ove studije, vidi se da su efekti Hcy u nivou kardiovaskularnog i digestivnog sistema mnogobrojni i da HHcy može da ostvari uticaj na promenu homeostaze različitim mehanizmima. HHcy dovodi do značajnih promena

parametara oksidativnog stresa, parametara energetskog metabolizma, ostvaruje uticaj na remodelovanje tkiva i dovodi do histoloških promena u različitim organima. Tretman sa vitaminom B6 i/ili FK, kao i doziranom aerobnom aktivnošću, može delimično da utiče na efekte koje HHcy ostvaruje u organizmu. Stoga, kako bismo preciznije razumeli uticaj Hcy na organizam i ulogu navedenih vitamina u njegovom metabolizmu, neophodno je uraditi dodatna istraživanja koja bi ispitala efekte aplikacije različitih doza Hcy, vitamina B6 i FK, različitu dužinu njihove aplikacije, kao i različit intenzitet, dužinu i vrstu fizičke aktivnost na organizam u uslovima eksperimentalno indukovane subhronične HHcy i posmatrati promene koje se javljaju na genetskom, biohemijском, histološkom nivou, kao i funkcionalne promene na nivou različitih sistema organa i organizma kao celine.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

(I) Nakon subhronične aplikacije Hcy u trajanju od 14 dana odnosu na kontrolnu grupu

Aplikacija Hcy:

- dovela je do razvoja HHcy, serumske vrednosti Hcy su iznosile iznad 15 $\mu\text{mol/L}$ i bile su značajno povećane u odnosu na kontrolu,
- nije značajno uticala na vrednost ISM,
- dovela je do značajnog porasta serumske koncentracije LDL, vitamina B12, glukoze, ukupnih proteina, albumina i kreatinina i serumske aktivnosti AST i sniženja serumske koncentracije TG.
- u tkivu srca:
 - je dovela do porasta ukupne aktivnosti SOD i koncentracije MDA, ali nije značajno uticala na aktivnost CAT i relativne aktivnosti izoformi Mn-SOD i Cu/Zn-SOD,
 - nije izazvala značajne promene ukupne aktivnosti LDH, kao ni relativnih aktivnosti LDH izoformi LDH1, LDH2, LDH3 i LDH4 i nije izazvala značajnu promenu ukupne aktivnosti MDH, kao ni relativnih aktivnosti pMDH, mMDH i cMDH,
 - dovela je do ekspresije MMP-9, ali ne do značajnih promena MMP-9 aktivnosti u odnosu na kontrolu,
 - izazvala je značajan porast debljine zida leve komore i debljine zida desne komore, ali nije značajno promenila debljinu interventrikularnog septuma i transverzalni dijametar kardiomiocita.
- u tkivu aorte:
 - je dovela do porasta debljine tunike medije, ali ne i do promene broja EL i rastojanja između EL.
- u tkivu jetre:
 - nije dovela do značajnih promena aktivnosti CAT, SOD, relativnih aktivnosti Mn-SOD i Cu/Zn-SOD, kao i koncentracije MDA,
 - nije dovela do značajnih promena ukupne aktivnosti LDH, kao i relativnih aktivnosti izoformi LDH1, LDH2 i LDH3, a takođe nije značajno uticala na ukupnu aktivnost MDH i dovela je do ekspresije samo mMDH izoforme,
 - dovela je do značajnog porasta aktivnosti MMP-9 izoforme, ali nije značajno uticala na aktivnost MMP-2 izoforme,
 - nije značajno uticala na histološke karakteristike.
- u tkivu kolona:
 - je dovela do značajnog smanjenja ukupne aktivnosti SOD, ali nije značajno uticala na aktivnost CAT i koncentraciju MDA, dovela je do ekspresije samo Mn-SOD izoforme,
 - nije značajno uticala na ukupnu aktivnost LDH i ukupnu aktivnost MDH, izazvala je porast relativne aktivnosti LDH3 izoforme i dovela je do ekspresije samo Mn-SOD izoforme,
 - je dovela do ekspresije samo MMP-2 izoforme i nije značajno uticala na aktivnost MMP-2,
 - je izazvala porast dubine Liberkinovih kripti, debljine tunike mukoze i broja ćelija u lamini propriji, ali nije ostvarila značajan uticaj na debljinu lamine muskularis mukoze i ukupnu debljinu zida kolona.

(II) Nakon aplikacije vitamina B6 u trajanju od 28 dana u uslovima subhronično indukovane hiperhomocisteinemije

Aplikacija vitamina B6 u uslovima indukovane HHcy:

- dovela je do značajnog sniženja serumske koncentracije Hcy,
- izazvala je smanjenje ISM,
- dovela je do sniženja serumske koncentracije vitamina B12, ukupnih proteina, albumina, kreatinina, mokraćne kiseline i serumske aktivnosti amilaze i do porasta glikemije.
- u tkivu srca:
 - je dovela do značajnog smanjenja ukupne aktivnosti SOD i koncentracije MDA, ali nije značajno uticala na aktivnost CAT,
 - je izazvala porast ukupne aktivnosti LDH, ali bez značajnih promena aktivnosti MDH,
 - je dovela do značajnog smanjenja debljine zida desne komore, ali nije značajno uticala na debljinu zida leve komore, debljinu interventrikularnog septuma i transverzalni dijametar kardiomiocita.
- u tkivu aorte:
 - nije dovela do značajnih promena debljine tunike medije, broja EL i rastojanja između EL.
- u tkivu jetre:
 - je dovela do značajnog sniženja koncentracije MDA, ali nije značajno uticala na aktivnost CAT i SOD,
 - nije ostvarila značajan uticaj na ukupnu aktivnost LDH i MDH,
 - nije dovela do značajnih promena u histološkim karakteristikama.
- u tkivu kolona:
 - nije dovela do značajnih promena aktivnosti CAT, SOD i koncentracije MDA,
 - nije pokazala značajan uticaj na ukupnu aktivnost metaboličkih enzima LDH i MDH,
 - je izazvala smanjenje dubine Liberkinovih kripti, debljine tunike mukoze i broja ćelija u lamini propriji, ali nije ostvarila značajan uticaj na debljinu lamine muskularis mukoze i ukupnu debljinu zida kolona.

(III) Nakon aplikacije folne kiseline u trajanju od 28 dana u uslovima subhronično indukovane hiperhomocisteinemije

Aplikacija FK u uslovima indukovane HHcy:

- dovela je do značajnog sniženja serumske koncentracije Hcy,
- nije značajno uticala na vrednost ISM,
- dovela je do porasta koncentracije HOL, HDL, LDL, TG, glikemije i pada koncentracije vitamina B12, vWF, albumina, kreatinina i aktivnosti amilaze.
- u tkivu srca:
 - je dovela do sniženja koncentracije MDA, neznatne promene aktivnosti CAT i SOD u odnosu na grupu tretiranu Hcy 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m. 2x/dan s.c. tokom 14 dana i f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana (H-28),
 - nije dovela do značajnih promena ukupne aktivnosti LDH i MDH,

- izazvala je smanjenje debljine zida desne komore, ali nije značajno uticala na debljinu zida leve komore, debljinu interventrikularnog septuma i transverzalni dijametar kardiomiocita.
- u tkivu aorte:
 - nije dovela do značajnih promena debljine tunike medije, broja EL i rastojanja između EL.
- u tkivu jetre:
 - izazvala je sniženje koncentracije MDA, ali nije značajno uticala na aktivnost CAT i SOD,
 - dovela je do smanjenja ukupne aktivnosti LDH, ali nije značajno uticala na ukupnu aktivnost MDH,
 - nije dovela do značajnih promena u histološkim karakteristikama.
- u tkivu kolona:
 - nije dovela do značajnih promena aktivnosti CAT i SOD i koncentracije MDA,
 - nije značajno uticala na ukupnu aktivnost LDH i MDH,
 - dovela je do smanjenja dubine Liberkinovih kriпти, debljine tunike mukoze i ukupne debljine zida kolona, izazvala je povećanje debljine lamine muskularis mukoze i nije ostvarila značajne promene broja ćelija u lamini propriji.

(IV) Nakon kombinovane aplikacije vitamina B6 i FK u trajanju od 28 dana u uslovima subhronično indukovane hiperhomocisteinemije

Kombinovana aplikacija vitamina B6 i FK u uslovima indukovane HHcy:

- dovela je do značajnog sniženja koncentracije Hcy u serumu,
- nije značajno uticala na vrednost ISM,
- izazvala je sniženje serumske koncentracije LDL, vitamina B12, albumina i kreatinina i porast glikemije.
- u tkivu srca:
 - dovela je do pada ukupne aktivnosti SOD i povišenja koncentracije MDA, ali nije značajno uticala na aktivnost CAT,
 - nije izazvala značajne promene ukupne aktivnosti LDH i MDH,
 - dovela je do smanjenja debljine zida desne komore u odnosu na grupu tretiranu Hcy 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m. 2x/dan s.c. tokom 14 dana i f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana (H-28), a povećanja debljine zida leve komore u odnosu na kontrolu i nije značajno uticala na debljinu interventrikularnog septuma i transverzalnog dijametra kardiomiocita.
- u tkivu aorte:
 - nije dovela do značajnih promena debljine tunike medije, broja EL i rastojanja između EL.
- u tkivu jetre:
 - dovela je do smanjenja aktivnosti CAT, ali nije značajno uticala na ukupnu aktivnost SOD i koncentraciju MDA,
 - nije dovela do značajnih promena ukupne aktivnosti LDH i MDH,
 - nije dovela do značajnih promena u histološkim karakteristikama.
- u tkivu kolona:
 - izazvala je smanjenje aktivnosti CAT u odnosu na grupu tretiranu f.r. 0,2 mL 2x/dan s.c. tokom 14 dana i kombinovanom aplikacijom vitamina B6 (7mg/kg t.m./dan i.p.)

i FK (5 mg/kg t.m./dan i.p.) tokom 28 dana (K-B6+FK), ali nije značajno uticala na ukupnu aktivnost SOD i koncentraciju MDA,

- nije dovela do značajnih promena ukupne aktivnosti LDH i MDH,
- dovela je do smanjenja dubine Liberkinovih kripti i ukupne debljine zida kolona, ali nije ostvarila značajne promene debljine tunike mukoze, debljine lamine muskularis mukoze i broja ćelija u lamini propriji.

(V) Nakon dozirane aerobne fizičke aktivnosti u trajanju od 28 dana u uslovima subhronično indukovane hiperhomocisteinemije

Tretman doziranom aerobnom fizičkom aktivnošću u uslovima indukovane HHcy:

- nije značajno uticao na sniženje koncentracije Hcy u serumu u odnosu na grupu tretiranu Hcy 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m. 2x/dan s.c. tokom 14 dana i f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana (H-28),
- doveo je do smanjenja vrednosti ISM,
- izazvao je sniženje koncentracije HDL, vitamina B12, albumina i aktivnosti amilaze i povišenja koncentracije LDL u serumu, kao i povišenja koncentracije fibrinogena i vWF u plazmi.
- u tkivu srca:
 - doveo je do smanjenja ukupne aktivnost SOD, nije značajno uticao na aktivnost CAT i povisio je koncentraciju MDA u odnosu na kontrolu,
 - doveo je do statistički visoko značajnog porasta ukupne aktivnosti LDH i MDH,
 - nije doveo do značajnih promena debljine zida leve i desne komore, međutim izazvao je porast debljine interventrikularnog septuma i transverzalnog dijametra kardiomiocita u odnosu na kontrolu, ali ne i u odnosu na grupu tretiranu Hcy 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m. 2x/dan s.c. tokom 14 dana i f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana (H-28).
- u tkivu aorte:
 - indukovao je proces stvaranja aterosklerotskog plaka, ali nije pokazao značajan uticaj na histomorfometrijske parametre: debljinu tunike medije, broj EL i rastojanje između EL.
- u tkivu jetre:
 - doveo je do značajnog pada koncentracije MDA, ali nije značajno uticao na aktivnosti CAT i SOD,
 - doveo je do značajnog porasta ukupne aktivnost LDH i MDH,
 - nije doveo do značajnih promena u histološkim karakteristikama.
- u tkivu kolona:
 - doveo je do povećanja ukupne aktivnosti SOD, sniženja koncentracije MDA i neznatnog uticaja na aktivnost CAT,
 - izazvao je značajan porast ukupne aktivnosti LDH, ali nije doveo do promena ukupne aktivnosti MDH,
 - izazvao je značajno smanjenje dubine Liberkinovih kripti i debljine tunike medije, nije ostvario značajan uticaj na debljinu lamine muskularis mukoze i ukupne debljine zida kolona, a doveo je do porasta broja ćelija u lamini propriji u odnosu na kontrolnu grupu, ali ne i u odnosu na grupu tretiranu Hcy 0,45 $\mu\text{mol/g}$ t.m. 2x/dan s.c. tokom 14 dana i f.r. 0,5 mL/dan i.p. tokom 28 dana (H-28).

7. LITERATURA

- Adaikalakoteswari A, Finer S, Voyias PD, McCarthy CM, Vatish M, Moore J, Smart-Halajko M, Bawazeer N, Al-Daghri NM, McTernan PG, Kumar S, Hitman GA, Saravanan P, Tripathi G. Vitamin B12 insufficiency induces cholesterol biosynthesis by limiting s-adenosylmethionine and modulating the methylation of SREBF1 and LDLR genes. *Clin Epigenetics*. 2015;7(1):14.
- Akoglu B, Milovic V, Caspary WF, Faust D. Hyperproliferation of homocysteine-treated colon cancer cells is reversed by folate and 5-methyltetrahydrofolate. *Eur J Nutr*. 2004;43:93-99.
- Alter P, Rupp H, Rominger MB, Figiel JH, Renz H, Klose KJ, Maisch B. Association of hyperhomocysteinemia with left ventricular dilatation and mass in human heart. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48:555-560.
- Aminzadeh A, Mehrzadi S. Cardioprotective effect of levosimendan against homocysteine-induced mitochondrial stress and apoptotic cell death in H9C2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;507:395-399.
- Ammal Kaidery N, Ahuja M, Thomas B. Crosstalk between Nrf2 signaling and mitochondrial function in Parkinson's disease. *Mol Cell Neurosci*. 2019;101:103413.
- Arab ZN, Khayatan D, Razavi SM, Zare K, Kheradkhah E, Momtaz S, Ferretti G, Bacchetti T, Sathyapalan T, Emami SA, Abdolghaffari AH, Sahebkar A. Phytochemicals as modulators of paraoxonase-1 in health and diseases. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(7):1273.
- Austin RC, Sood SK, Dorward AM, Singh G, Shaughnessy SG, Pamidi S, Outinen PA, Weitz JI. Homocysteine-dependent alterations in mitochondrial gene expression, function and structure. Homocysteine and H₂O₂ act synergistically to enhance mitochondrial damage. *J Biol Chem*. 1998;273:30808-30817.
- Auta J, Zhang H, Pandey SC, Guidotti A. Chronic alcohol exposure differentially alters one-carbon metabolism in rat liver and brain. *Alcohol Clin Exp Res*. 2017;41:1105-1111.
- Barroso M, Florindo C, Kalwa H, Silva Z, Turanov AA, Carlson BA, de Almeida IT, Blom HJ, Gladyshev VN, Hatfield DL, Michel T, Castro R, Loscalzo J, Handy DE. Inhibition of cellular methyltransferases promotes endothelial cell activation by suppressing glutathione peroxidase 1 protein expression. *J Biol Chem*. 2014;289(22):15350-15362.
- Barroso M, Kao D, Blom HJ, Tavares de Almeida I, Castro R, Loscalzo J, Handy DE. S-adenosylhomocysteine induces inflammation through NFκB: A possible role for EZH2 in endothelial cell activation. *Biochim. Biophys. Acta Mol Basis Dis*. 2016;1862:82-92.
- Baszczuk A, Kopczyński Z. Hyperhomocysteinemia in patients with cardiovascular disease. *Postepy Hig Med Dosw*. 2014;68:579.
- Battistelli S, Vittoria A, Stefanoni M, Bing C, Roviello F. Total plasma homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in patients with colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2006;12:6128-6132.
- Bauchart-Thevret C, Stoll B, Burrin DG. Intestinal metabolism of sulfur amino acids. *Nutr Res Rev*. 2009;22(2):175-187.
- Bedford MT, Clarke SG. Protein arginine methylation in mammals: Who, what, and why. *Mol Cell*. 2009;33:1-13.
- Beers RF Jr, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem*. 1952;195(1):133-160.
- Bernstein LH, Gutstein S, Weiner S, Efron G. The absorption and malabsorption of folic acid and its polyglutamates. *Am J Med*. 1970;48:570-579.

- Bhattacharjee N, Paul R, Giri A, Borah A. Chronic exposure of homocysteine in mice contributes to dopamine loss by enhancing oxidative stress in nigrostriatum and produces behavioral phenotypes of Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;6:47-53.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012;5:9-19.
- Bobe G, Murphy G, Rogers CJ, Hance KW, Albert PS, Laiyemo AO, Sansbury LB, Lanza E, Schatzkin A, Cross AJ. Serum adiponectin, leptin, C-peptide, homocysteine, and colorectal adenoma recurrence in the Polyp Prevention Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19:1441-1452.
- Böger RH, Bode-Böger SM, Sydow K, Heistad DD, Lentz SR. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000a;20:1557-1564.
- Böger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Böger SM. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: Involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res*. 2000b;87:99-105.
- Boreham CA, Kennedy RA, Murphy MH, Tully M, Wallace WF, Young I. Training effects of short bouts of stair climbing on cardiorespiratory fitness, blood lipids, and homocysteine in sedentary young women. *Br J Sports Med*. 2005;39:590-593.
- Borowczyk K, Piechocka J, Głowacki R, Dhar I, Midtun Ø, Tell GS, Ueland PM, Nygård O, Jakubowski H. Urinary excretion of homocysteine thiolactone and the risk of acute myocardial infarction in coronary artery disease patients: The WENBIT trial. *J Intern Med*. 2018;285:232-244.
- 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.
- Brosnan JT, Brosnan ME. The sulfur-containing amino acids: An overview. *J Nutr*. 2006;136(6 Suppl):1636S-1640S.
- Butz LW, du Vigneaud V. The formation of homologue of cysteine by the decomposition of methionine with sulfuric acid. *J Biol Chem*; 1932;99:135-142.
- Carmel R. How I treat cobalamin (vitamin B12) deficiency. *Blood*. 2008;112:2214-2221.
- Carnicer R, Navarro MA, Arbonés-Mainar JM, Arnal C, Surra JC, Acín S, Sarría A, Blanco-Vaca F, Maeda N, Osada J. Genetically based hypertension generated through interaction of mild hypoalphalipoproteinemia and mild hyperhomocysteinemia. *J Hypertens*. 2007;25:1597-1607.
- Carson NAJ, Neill DW. Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch Dis Child*. 1962;37:505-513.
- Castro R, Rivera I, Struys EA, Jansen EEW, Ravasco P, Camilo ME, Blom HJ, Jakobs C, Tavares de Almeida I. Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease. *Clin Chem*. 2003;49:1292-1296.
- Cejková S, Králová-Lesná I, Poledne R. Monocyte adhesion to the endothelium is an initial stage of atherosclerosis development. *Cor Vasa*. 2016;58:e419-e425.
- Chan SH, Hung CH, Shih JY, Chu PM, Cheng YH, Lin HC, Hsieh PL, Tsai KL. Exercise intervention attenuates hyperhomocysteinemia-induced aortic endothelial

oxidative injury by regulating SIRT1 through mitigating NADPH oxidase/LOX-1 signaling. *Redox Biol.* 2018;14:116-125.

- Chang L, Geng B, Yu F, Zhao J, Jiang H, Du J, Tang C. Hydrogen sulfide inhibits myocardial injury induced by homocysteine in rats. *Amino Acids.* 2008;34:573-585.
- 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.
- Chaouad B, Moudilou EN, Ghoul A, Zerrouk F, Moulahoum A, Othmani-Mecif K, El HadiCherifi M, Exbrayat JM, Benazzoug Y. Hyperhomocysteinemia and myocardial remodeling in the sand rat. *Psammomysobesus Acta Histochem.* 2019;121:823-832.
- Cheng, X. Updating the relationship between hyperhomocysteinemia lowering therapy and cardiovascular events. *Cardiovasc Ther.* 2013;31:e19-e26.
- Choi JK, Moon KM, Jung SY, Kim JY, Choi SH, Kim DY, Kang S, Chu CW, Kwon SM. Regular exercise training increases the number of endothelial progenitor cells and decreases homocysteine levels in healthy peripheral blood. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2014;18(2):163-168.
- Choumenkovitch SF, Selhub J, Bagley PJ, Maeda N, Nadeau MR, Smith DE, Choi SW. In the cystathionine beta-synthase knockout mouse, elevations in total plasma homocysteine increase tissue S-adenosylhomocysteine, but responses of S-adenosylmethionine and DNA methylation are tissue specific. *J Nutr.* 2002;132:2157-2160.
- Chubarov AS. Homocysteine thiolactone: Biology and chemistry. *Encyclopedia.* 2021;1:445-459.
- Chwatko G, Boers GH, Strauss KA, Shih DM, Jakubowski H. Mutations in methylenetetrahydrofolate reductase or cystathionine beta-synthase gene, or a high-methionine diet, increase homocysteine thiolactone levels in humans and mice. *FASEB J.* 2007;21:1707-1713.
- Clayton PT. B6-responsive disorders: a model of vitamin dependency. *J Inherit Metab Dis.* 2006;29:317-326.
- Closs EI, Basha FZ, Habermeier A, Förstermann U. Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y+ carrier hCAT-2B. *Nitric Oxide Biol Chem.* 1997;1:65-73.
- Coburn SP (1994). A critical review of minimal vitamin B6 requirements for growth in various species with a proposed method of calculation. *Vitam Horm* 48:259-300.
- Cueto R, Zhang L, Shan HM, Huang X, Li X, Li YF, Lopez J, Yang WY, Lavallee M, Yu C, Ji Y, Yang X, Wang H. Identification of homocysteine-suppressive mitochondrial ETC complex genes and tissue expression profile - Novel hypothesis establishment. *Redox Biol.* 2018;17:70-88.
- Cunningham VR, Phillips J, Field EJ. Lactic dehydrogenase isoenzymes in normal and pathological spinal fluids. *J Clin Pathol.* 1965;18(6):765-770.
- Dékány M, Nemeskéri V, Györe I, Harbula I, Malomsoki J, Pucsok J. Antioxidant status of interval-trained athletes in various sports. *Int J Sports Med.* 2006;27:112-116.
- Delgado-Plasencia L, Medina-Arana V, Bravo-Gutiérrez A, Pérez-Palma J, Álvarez-Argüelles H, Salido-Ruiz E, FernándezPeralta AM, González-Aguilera JJ. Impact of the MTHFR C677T polymorphism on colorectal cancer in a population with low genetic variability. *Int J Colorectal Dis.* 2013;28:1187-1193.
- Desbarats J. Pyridoxal 5'-phosphate to mitigate immune dysregulation and coagulopathy in COVID-19. *Preprints.* 2020;2020050144.

- Devlin AM, Bottiglieri T, Domann FE, Lentz SR. Tissue-specific changes in H19 methylation and expression in mice with hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem.* 2005;280:25506-25511.
- Di Minno G, Davì G, Margaglione M, Cirillo F, Grandone E, Ciabattone G, Catalano I, Strisciuglio P, Andria G, Patrono C, et al. Abnormally high thromboxane biosynthesis in homozygous homocystinuria. Evidence for platelet involvement and probucol-sensitive mechanism. *J Clin Invest.* 1993;92(3):1400-1406.
- Di Salvo ML, Contestabile R, Safo MK. Vitamin B6 salvage enzymes: Mechanism, structure and regulation. *Biochim. Biophys. Biochim Biophys Acta.* 2011;1814: 1597-1608.
- Djuric D, Jakovljevic V, Zivkovic V, Srejovic I. Homocysteine and homocysteine-related compounds: An overview of the roles in the pathology of the cardiovascular and nervous systems. *Can J Physiol Pharmacol.* 2018;96(10):991-1003.
- Djuric D, Vusanovic A, Jakovljevic V. The effects of folic acid and nitric oxide synthase inhibition on coronary flow and oxidative stress markers in isolated rat heart. *Mol Cell Biochem* 2007;300:177-183.
- Dong Q, Tang G, He M, Cai Y, Cai Y, Xing H, Sun L, Li J, Zhang Y, Fan F, Wang B, Sun N, Liu L, Xu X, Hou F, Shen H, Xu X, Huo Y. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with estimated glomerular filtration rate in hypertensive Chinese males. *BMC Med Genet.* 2012;13:74.
- Dos Santos TM, Siebert C, De Oliveira, MF, Manfredini V, Wyse ATS. Chronic mild hyperhomocysteinemia impairs energy metabolism, promotes DNA damage and induces a Nrf2 response to oxidative stress in rats brain. *Cell Mol Neurobiol.* 2019;39: 687-700.
- Duncan GE, Perri MG, Anton SD, Limacher MC, Martin AD, Lowenthal DT, Arning E, Bottiglieri T, Stacpoole PW. Effects of exercise on emerging and traditional cardiovascular risk factors. *Prev Med.* 2004;39(5):894-902.
- Duong FHT, Filipowicz M, Tripodi M, La Monica N, Heim MH. Hepatitis C virus inhibits interferon signaling through up-regulation of protein phosphatase 2A. *Gastroenterology.* 2004;126:263-277.
- Duthie SJ, Narayanan S, Brand GM, Pirie L, Grant G. Impact of folate deficiency on DNA stability. *J Nutr.* 2002;132:2444S-2449S.
- Dutta S, Sinha S, Chattopadhyay A, Gangopadhyay PK, Mukhopadhyay J, Singh M, Mukhopadhyay K. Cystathionine beta-synthase T833C/844INS68 polymorphism: A family-based study on mentally retarded children. *Behav Brain Funct.* 2005;1:25.
- Eleftheriadou I, Grigoropoulou P, Moysakis I, Kokkinos A, Perrea D, Toutouzias K, Katsilambros N, Tentolouris N. The effect of hyperhomocysteinemia on aortic distensibility in healthy individuals. *Nutrition.* 2013;29:876-880.
- Đurić P, Mladenović Z, Spasić M, Jović Z, Marić-Kocijančić J, Prokić Đ, Subota V, Radojičić Z, Đurić D. Hyperhomocysteinemia and inflammatory biomarkers are associated with higher clinical SYNTAX score in patients with stable coronary artery disease. *Vojnosanitetski pregled.* 2021;78(7):736-744.
- Enderami A, Zarghami M, Darvishi-Khezri H. The effects and potential mechanisms of folic acid on cognitive function: A comprehensive review. *Neurol Sci.* 2018;39: 1667-1675.
- Erzin Y, Uzun H, Celik AF, Aydin S, Dirican A, Uzunismail H. Hyperhomocysteinemia in inflammatory bowel disease patients without past intestinal resections: Correlations with cobalamin, pyridoxine, folate concentrations, acute phase reactants, disease

activity, and prior thromboembolic complications. *J Clin Gastroenterol.* 2008;42:481-486.

- Esse R, Florindo C, Imbard A, Rocha MS, de Vriese AS, Smulders YM, Teerlink T, Tavares de Almeida I, Castro R, Blom HJ. Global protein and histone arginine methylation are affected in a tissue-specific manner in a rat model of diet-induced hyperhomocysteinemia. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832:1708-1714.
- Esse R, Rocha MS, Barroso M, Florindo C, Teerlink T, Kok RM, Smulders YM, Rivera I, Leandro P, Koolwijk P, Castro R, Blom HJ, de Almeida IT. Protein arginine methylation is more prone to inhibition by S-adenosylhomocysteine than DNA methylation in vascular endothelial cells. *PLoS One.* 2013;8(2):e55483.
- Faeh D, Chiolerio A, Paccaud F. Homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: Should we (still) worry about it? *Swiss Med Wkly.* 2006;136:745-756.
- Faverzani JL, Hammerschmidt TG, Sitta A, Deon M, Wajner M, Vargas CR. Oxidative stress in homocystinuria due to cystathionine β -synthase deficiency: Findings in patients and in animal models. *Cell Mol Neurobiol.* 2017;37:1477-1485.
- Feld JJ, Modi AA, El-Diwany R, Rotman Y, Thomas E, Ahlenstiel G, Titerence R, Koh C, Cherepanov V, Heller T, Ghany MG, Park Y, Hoofnagle JH, Liang TJ. S-adenosyl methionine improves early viral responses and interferon-stimulated gene induction in hepatitis C nonresponders. *Gastroenterology.* 2011;140(3):830-839.
- Ferroni P, Riondino S, Vazzana N, Santoro N, Guadagni F, Davì G. Biomarkers of platelet activation in acute coronary syndromes. *Thromb Haemost.* 2012;108:1109-1123.
- Flohe L, Otting F. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol.* 1984;105:93-104.
- Florence TM. The production of hydroxyl radical from hydrogen peroxide. *J Inorg Biochem.* 1984;22,:221-230.
- Folbergrová J, Jesina P, Haugvicová R, Lisý V, Houstek J. Sustained deficiency of mitochondrial complex I activity during long periods of survival after seizures induced in immature rats by homocysteic acid. *Neurochem Int.* 2010;56(3):394-403.
- Folbergrová J, Ješina P, Drahotka Z, Lisý V, Haugvicová R, Pecinová A, Houstek J. Mitochondrial complex I inhibition in cerebral cortex of immature rats following homocysteic acid-induced seizures. *Exp Neurol.* 2007;204:597-609.
- Foucher C, Brugère L, Ansquer JC. Fenofibrate, homocysteine and renal function. *Curr Vasc Pharmacol.* 2010;8(5):589-603.
- Frau M, Feo F, Pascale RM. Pleiotropic effects of methionine adenosyltransferases deregulation as determinants of liver cancer progression and prognosis. *J Hepatol.* 2013;59(4):830-41.
- Frieden C, Fernandez-Sousa J. Kinetic studies on pig heart cytoplasmic malate dehydrogenase. *J Biol Chem.* 1975;250(6):2106-2113.
- Friso S, Jacques PF, Wilson PW, Rosenberg IH, Selhub J. Low circulating vitamin B(6) is associated with elevation of the inflammation marker C-reactive protein independently of plasma homocysteine levels. *Circulation.* 2001;103(23):2788-2791.
- Ganesan M, Feng D, Barton RW, Thomes PG, McVicker BL, Tuma DJ, Osna NA, Kharbanda KK. Creatine supplementation does not prevent the development of alcoholic steatosis. *Alcohol Clin Exp Res.* 2016;40(11):2312-2319.
- Ganguly P, Alam SF. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutr J.* 2015;14:6.
- Garcia MM, Guéant-Rodriguez RM, Pooya S, Brachet P, Alberto JM, Jeannesson E, Maskali F, Gueguen N, Marie PY, Lacolley P, Herrmann M, Juillièrè Y, Malthiery Y, Guéant JL. Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered

methylation/acetylation of PGC-1 α by PRMT1 and SIRT1. *J Pathol.* 2011;225(3):324-335.

- Gazzali AM, Lobry M, Colombeau L, Acherar S, Azaïs H, Mordon S, Arnoux P, Baros F, Vanderesse R, Frochot C. Stability of folic acid under several parameters. *Eur J Pharm Sci.* 2016;93:419-430.
- Genoud V, Quintana PG, Gionco S, Baldessari A, Quintana I. Structural changes of fibrinogen molecule mediated by the N-homocysteinylation reaction. *J Thromb Thrombolysis.* 2018;45(1):66-76.
- Ghishan FK, Kiela PR. Vitamins and minerals in IBD. *Gastroenterol Clin.* 2017;46:797-808.
- Gomez J, Sanchez-Roman I, Gomez A, Sanchez C, Suarez H, Lopez-Torres M, Barja G. Methionine and homocysteine modulate the rate of ROS generation of isolated mitochondria in vitro. *J Bioenerg Biomembr.* 2011;43(4):377-386.
- Gopcevic K, Rovcanin B, Kekic D, Krivokapic Z, Dragutinovic V. Matrix metalloproteinase-2 and -9, lactate and malate dehydrogenase and lipid peroxides in sera of patients with colorectal carcinoma. *Folia Biologica.* 2017;63:190-196.
- Gottsäter A, Anwaar I, Eriksson KF, Mattiasson I, Lindgårde F, Gottsäter A. Homocysteine is related to neopterin and endothelin-1 in plasma of subjects with disturbed glucose metabolism and reference subjects. *Angiology.* 2000;51:489-497.
- Griffiths HR, Aldred S, Dale C, Nakano E, Kitas GD, Grant MG, Nugent D, Taiwo FA, Li L, Powers HJ. Homocysteine from endothelial cells promotes LDL nitration and scavenger receptor uptake. *Free Radic Biol Med.* 2006;40(3):488-500.
- Guéant JL, Guéant-Rodriguez RM, Alpers DH. Vitamin B12 absorption and malabsorption. *Vitam Horm.* 2022;119:241-274.
- Guo T, He Y, Ma W, Liu Z, Liu Q. Feasibility and efficacy of S-adenosyl-L-methionine in patients with HBV-related HCC with different BCLC stages. *Gastroenterol Res Pract.* 2016;2016:4134053.
- Guzel NA, Pinar L, Colakoglu F, Karacan S, Ozer C. Long-term callisthenic exercise-related changes in blood lipids, homocysteine, nitric oxide levels and body composition in middle-aged healthy sedentary women. *Chin J Physiol.* 2012;55:202-209.
- Halsted CH. B-Vitamin dependent methionine metabolism and alcoholic liver disease. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(3):457-465.
- Han XB, Zhang HP, Cao CJ, Wang YH, Tian J, Yang XL, Yang AN, Wang J, Jiang YD, Xu H. Aberrant DNA methylation of the PDGF gene in homocysteine-mediated VSMC proliferation and its underlying mechanism. *Mol Med Rep.* 2014;10(2):947-954.
- Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet.* 1999;354:407-413.
- Hansson GK, Libby P, Tabas I. Inflammation and plaque vulnerability. *J Intern Med.* 2015;278:483-493.
- Hao F, Cubero FJ, Ramadori P, Liao L, Haas U, Lambertz D, Sonntag R, Bangen JM, Gassler N, Hoss M, Streetz KL, Reissing J, Zimmermann HW, Trautwein C, Liedtke C, Nevzorova YA. Inhibition of caspase-8 does not protect from alcohol-induced liver apoptosis but alleviates alcoholic hepatic steatosis in mice. *Cell Death Dis.* 2017;8(10):e3152.
- Hellmann H, Mooney S. Vitamin B6: A molecule for human health? *Molecules.* 2010;15:442-459.
- Herrmann M, Schorr H, Obeid R, Scharhag J, Urhausen A, Kindermann W, Herrmann W. Homocysteine increases during endurance exercise. *Clin Chem Lab Med.* 2003;41(11):1518-1524.

- Hofmann MA, Lalla E, Lu Y, Gleason MR, Wolf BM, Tanji N, Ferran LJ Jr, Kohl B, Rao V, Kisiel W, Stern DM, Schmidt AM. Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *J Clin Invest.* 2001;107(6):675-83.
- Hogg N. The effect of cyst(e)ine on the auto-oxidation of homocysteine. *Free Radic Biol Med.* 1999;27:28-33.
- Hollaar L, Van der Laarse A. Interference of the measurement of lactate dehydrogenase (LDH) activity in human serum and plasma by LDH from blood cells. *Clin Chim Acta.* 1979;99(2):135-142.
- Holmström KM, Kostov RV, Dinkova-Kostova AT. The multifaceted role of Nrf2 in mitochondrial function. *Curr Opin Toxicol.* 2016;1:80-91.
- Humphrey LL, Fu R, Rogers K, Freeman M, Helfand M. Homocysteine level and coronary heart disease incidence: A systematic review and meta-analysis. *Mayo Clin Proc.* 2008;83:1203-1212.
- Hunaiti AA, Saleh MS. Effects of iron, zinc, calcium, and vitamins on the activity and contents of human placental copper/zinc and manganese superoxide dismutases. *Biol Trace Elem Res.* 1996;54(3):231-238.
- Iglesias-Gutiérrez E, Egan B, Díaz-Martínez ÁE, Peñalvo JL, González-Medina A, Martínez-Cambor P, O'Gorman DJ, Úbeda N. Transient increase in homocysteine but not hyperhomocysteinemia during acute exercise at different intensities in sedentary individuals. *PLoS One.* 2012;7(12):e51185.
- Ilic A, Todorovic D, Mutavdzin S, Boricic N, Bozic Nedeljkovic B, Stankovic S, Simic T, Stevanovic P, Celic V, Djuric D. Translocator Protein Modulation by 4'-Chlorodiazepam and NO Synthase Inhibition Affect Cardiac Oxidative Stress, Cardiometabolic and Inflammatory Markers in Isoprenaline-Induced Rat Myocardial Infarction. *Int J Mol Sci.* 2021;22(6):2867.
- Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: Dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation.* 1999;99(24):3092-3095.
- Jacobsen DW, Gatautis VJ, Green R, Robinson K, Savon SR, Secic M, Ji J, Otto JM, Taylor LM Jr. Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: Sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects. *Clin Chem.* 1994;40(6):873-881.
- Jakovljevic Uzelac J, Djukic T, Mutavdzin S, Stankovic S, Labudovic Borovic M, Rakocevic J, Milic N, Savic Radojevic A, Vasic M, Japundzic Zigon N, Simic T, Djuric D. The influence of subchronic co-application of vitamins B6 and folic acid on cardiac oxidative stress and biochemical markers in monocrotaline-induced heart failure in male Wistar albino rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2020a;98(2):93-102.
- Jakovljevic Uzelac J, Djukic T, Radic T, Mutavdzin S, Stankovic S, Rakocevic JK, Labudovic Borovic M, Milic N, Simic T, Savic-Radojevic A, Djuric D. Folic acid affects cardiometabolic, oxidative stress, and immunohistochemical parameters in monocrotaline-induced rat heart failure. *Can J Physiol Pharmacol.* 2020b;98(10):708-716.
- Jakubowski H, Zhang L, Bardeguet A, Aviv A. Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation in human endothelial cells: Implications for atherosclerosis. *Circ Res.* 2000;87(1):45-51.
- Jakubowski H. Homocysteine modification in protein structure/function and human disease. *Physiol Rev.* 2019;99(1):555-604.

- Jakubowski, H. Homocysteine is a protein amino acid in humans: Implications for homocysteine-linked disease. *J Biol Chem.* 2002;277:30425-30428.
- Jakubowski, H. Protein N-homocysteinylation: Implications for atherosclerosis. *Biomed. Pharmacother.* 2001;55:443-447.
- Jeon J, Park K. Dietary Vitamin B6 intake associated with a decreased risk of cardiovascular disease: A prospective cohort study. *Nutrients.* 2019;11(7):1484.
- Jeremic J, Nikolic Turnic T, Zivkovic V, Jeremic N, Milosavljevic I, Srejavic I, Obrenovic R, Jancic S, Rakocevic M, Matic S, Djuric D, Jakovljevic V. Vitamin B complex mitigates cardiac dysfunction in high-methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2018;45(7):683-693.
- Johnson TB. Sulfur linkages in proteins. *J Biol Chem.* 1911;9:439-448.
- Joseph J, Joseph L, Shekhawat NS, Devi S, Wang J, Melchert RB, Hauer-Jensen M, Kennedy RH. Hyperhomocysteinemia leads to pathological ventricular hypertrophy in normotensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H679-H686.
- Joubert LM, Manore MM. Exercise, nutrition, and homocysteine. *Int J Sport Nutr Exer Metab.* 2006;16:341-361.
- Kallel L, Feki M, Sekri W, Segheir L, Fekih M, Boubaker J, Kaabachi N, Filali A. Prevalence and risk factors of hyperhomocysteinemia in Tunisian patients with Crohn's disease. *J Crohns Colitis* 2011;5:110-114.
- Kanwar YS, Manaligod JR, Wong WK. Morphologic studies in a patient with homocystinuria due to 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Pediatr Res.* 1976;10:598-609.
- Karaa A, Thompson KJ, McKillop IH, Clemens MG, Schrum LW. S-adenosyl-L-methionine attenuates oxidative stress and hepatic stellate cell activation in an ethanol-LPS-induced fibrotic rat model. *Shock.* 2008;30(2):197-205.
- Karakoyun I, Duman C, Demet Arslan F, Baysoy A, Isbilen Basok B. Vitamin B12 and folic acid associated megaloblastic anemia: Could it mislead the diagnosis of breast cancer? *Int J Vitam Nutr Res.* 2019;89(5-6):255-260.
- Karbach S, Wenzel P, Waisman A, Munzel T, Daiber A. eNOS uncoupling in cardiovascular diseases - the role of oxidative stress and inflammation. *Curr Pharm Des.* 2014;20(22):3579-3594.
- Kavazis AN. Exercise preconditioning of the myocardium. *Sports Med.* 2009;39:923-935.
- Keshteli AH, Baracos VE, Madsen KL. Hyperhomocysteinemia as a potential contributor of colorectal cancer development in inflammatory bowel diseases: A review. *World J Gastroenterol.* 2015;21(4):1081-1090.
- Kharbanda KK. Methionine metabolic pathway in alcoholic liver injury. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2013;16:89-95.
- Kietadisorn R, Juni RP, Moens AL. Tackling endothelial dysfunction by modulating NOS uncoupling: New insights into its pathogenesis and therapeutic possibilities. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;302(5):E481-E495.
- Kim J, Kim H, Roh H, Kwon Y. Causes of hyperhomocysteinemia and its pathological significance. *Arch Pharm Res.* 2018;41(4):372-383.
- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem.* 1994;218(2):325-329.
- Kolling J, Scherer EB, Siebert C, Hansen F, Torres FV, Scaini G, Ferreira G, de Andrade RB, Gonçalves CA, Streck EL, Wannmacher CM, Wyse AT. Homocysteine induces energy imbalance in rat skeletal muscle: Is creatine a protector? *Cell Biochem Funct.* 2013;31(7):575-584.

- Kondo A, Asada Y, Shibata K, Kihira M, Ninomiya K, Suzuki M, Oguchi H, Hayashi Y, Narita O, Watanabe J, Shimosuka Y. Dietary folate intakes and effects of folic acid supplementation on folate concentrations among Japanese pregnant women. *J Obstet Gynaecol Res.* 2011;37(4):331-336.
- Konig D, Bisse E, Deibert P, Muller HM, Wieland H, Berg A. Influence of training volume and acute physical exercise on the homocysteine levels in endurance-trained men: interactions with plasma folate and vitamin B12. *Ann Nutr Metab.* 2003;47:114-118.
- Konishi H, Sydow K, Cooke JP. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase promotes endothelial repair after vascular injury. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49:1099-1105.
- Kosaka T, Yamaguchi M, Motomura T, Mizuno K. Investigation of the relationship between atherosclerosis and paraoxonase or homocysteine thiolactonase activity in patients with type 2 diabetes mellitus using a commercially available assay. *Clin Chim Acta.* 2005;359(1-2):156-162.
- Kostić S, Mićović Ž, Andrejević L, Cvetković S, Stamenković A, Stanković S, Obrenović R, Labudović-Borović M, Hrnčić D, Jakovljević V, Djurić D. The effects of L-cysteine and N-acetyl-L-cysteine on homocysteine metabolism and haemostatic markers, and on cardiac and aortic histology in subchronically methionine-treated Wistar male rats. *Mol Cell Biochem.* 2019;451(1-2):43-54.
- Kozyraki R, Cases O. Vitamin B12 absorption: Mammalian physiology and acquired and inherited disorders. *Biochimie.* 2013;95:1002-1007.
- Kumar A, Palfrey HA, Pathak R, Kadowitz PJ, Gettys TW, Murthy SN. The metabolism and significance of homocysteine in nutrition and health. *Nutr Metab (Lond).* 2017;14:78.
- Kumar M, Sandhir R. Hydrogen sulfide attenuates hyperhomocysteinemia-induced mitochondrial dysfunctions in brain. *Mitochondrion.* 2020;50:158-169.
- Kumar M, Sandhir R. Neuroprotective effect of hydrogen sulfide in hyperhomocysteinemia is mediated through antioxidant action involving Nrf2. *Neuro Molec Med.* 2018;20:475-490.
- Kuo HK, Yen CJ, Bean JF. Levels of homocysteine are inversely associated with cardiovascular fitness in women, but not in men: Data from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002. *J Intern Med.* 2005;258:328-335.
- La Rocca G, Pucci-Minafra I, Marrazzo A, Taormina P, Minafra S. Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast sera. *Br J Cancer.* 2004;90:1414-1421.
- Lambert D, Benhayoun S, Adjalla C, Gelot MA, Renkes P, Felden F, Gerard P, Belleville F, Gaucher P, Guéant JL, Nicolas JP. Crohn's disease and vitamin B12 metabolism. *Dig Dis Sci.* 1996;41:1417-1422.
- Lanouette S, Mongeon V, Figeys D, Couture JF. The functional diversity of protein lysine methylation. *Mol Syst Biol.* 2014;10(4):724.
- Laukkanen MO, Mannermaa S, Hiltunen MO, Aittomäki S, Airenne K, Jänne J, Ylä-Herttuala S. Local hypomethylation in atherosclerosis found in rabbit *ec-sod* gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(9):2171-2178.
- Lauterburg BH, Adams JD, Mitchell JR. Hepatic glutathione homeostasis in the rat: Efflux accounts for glutathione turnover. *Hepatology.* 1984;4(4):586-590.
- Leiper J, Vallance P. Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res.* 1999;43:542-548.
- Levine AJ, Grau MV, Mott LA, Ueland PM, Baron JA. Baseline plasma total homocysteine and adenoma recurrence: Results from a double blind randomized clinical

trial of aspirin and folate supplementation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19:2541-2548.

- Li L, Xie J, Zhang M, Wang S. Homocysteine harasses the imprinting expression of IGF2 and H19 by demethylation of differentially methylated region between IGF2/H19 genes. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2009;41(6):464-471.
- Li TW, Yang H, Peng H, Xia M, Mato JM, Lu SC. Effects of S-adenosylmethionine and methylthioadenosine on inflammation-induced colon cancer in mice. *Carcinogenesis*. 2012;33(2):427-435.
- Li Z, Wang F, Liang B, Su Y, Sun S, Xia S, Shao J, Zhang Z, Hong M, Zhang F, Zheng S. Methionine metabolism in chronic liver diseases: An update on molecular mechanism and therapeutic implication. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):280.
- Liao D, Tan H, Hui R, Li Z, Jiang X, Gaubatz J, Yang F, Durante W, Chan L, Schafer AI, Pownall HJ, Yang X, Wang H. Hyperhomocysteinemia decreases circulating high-density lipoprotein by inhibiting apolipoprotein A-I protein synthesis and enhancing HDL cholesterol clearance. *Circ Res*. 2006;99(6):598-606.
- Likis F. Folic Acid. *J Midwifery Women's Health*. 2016;61:797-798.
- Liu C, Liu C, Wang Q, Zhang Z. Supplementation of folic acid in pregnancy and the risk of preeclampsia and gestational hypertension: A meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet*. 2018;298:697-704.
- Liu LH, Guo Z, Feng M, Wu ZZ, He ZM, Xiong Y. Protection of DDAH2 overexpression against homocysteine-induced impairments of DDAH / ADMA / NOS / NO pathway in endothelial cells. *Cell Physiol Biochem*. 2012;30(6):1413-1422.
- Liu T, Yang H, Fan W, Tu J, Li TWH, Wang J, Shen H, Yang J, Xiong T, Steggerda J, Liu Z, Noureddin M, Maldonado SS, Annamalai A, Seki E, Mato JM, Lu SC. Mechanisms of MAFG dysregulation in cholestatic liver injury and development of liver cancer. *Gastroenterology*. 2018;155(2):557-571.
- Liu Z, Han Y, Li L, Lu H, Meng G, Li X, Shirhan M, Peh MT, Xie L, Zhou S, Wang X, Chen Q, Dai W, Tan CH, Pan S, Moore PK, Ji Y. The hydrogen sulfide donor, GYY4137, exhibits anti-atherosclerotic activity in high fat fed apolipoprotein E(-/-) mice. *Br J Pharmacol*. 2013;169(8):1795-1809.
- Longoni A, Kolling J, Siebert C, Dos Santos JP, da Silva JS, Pettenuzzo LF, Meira-Martins LA, Gonçalves CA, de Assis AM, Wyse AT. 1,25-dihydroxyvitamin D3 prevents deleterious effects of homocysteine on mitochondrial function and redox status in heart slices. *Nutr Res*. 2017;38:52-63.
- Loscalzo J, Handy DE. Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease (2013 Grover Conference Series). *Pulm Circ*. 2014;4(2):169-174.
- Low Wang CC, Hess CN, Hiatt WR, Goldfine AB. Clinical update: Cardiovascular disease in diabetes mellitus: Atherosclerotic cardiovascular disease and heart failure in type 2 diabetes mellitus - mechanisms, management, and clinical considerations. *Circulation*. 2016;133(24):2459-2502.
- Lozano-Rosas MG, Chávez E, Velasco-Loyden G, Domínguez-López M, Martínez-Pérez L, Chagoya De Sánchez V. Diminished S-adenosylmethionine biosynthesis and its metabolism in a model of hepatocellular carcinoma is recuperated by an adenosine derivative. *Cancer Biol Ther*. 2020;21(1):81-94.
- Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(7):1957-1997.

- Ly A, Hoyt L, Crowell J, Kim YI. Folate and DNA methylation. *Antioxid Redox Signal*. 2012;17(2):302-326.
- Manchado FDB, Gobatto CA, Mello MARD. The maximal lactate steady state in running rats. *J Exercise Physiol*. 2005;8(4):29-35.
- Mandaviya PR, Stolk L, Heil SG. Homocysteine and DNA methylation: A review of animal and human literature. *Mol Genet Metab*. 2014;113(4):243-252.
- Mani S, Li H, Untereiner A, Wu L, Yang G, Austin RC, Dickhout JG, Lhoták Š, Meng QH, Wang R. Decreased endogenous production of hydrogen sulfide accelerates atherosclerosis. *Circulation*. 2013;127(25):2523-3254.
- Maroto-Sánchez B, Lopez-Torres O, Palacios G, González-Gross M. What do we know about homocysteine and exercise? A review from the literature. *Clin Chem Lab Med*. 2016;54(10):1561-1577.
- Maroto-Sanchez B, Valtuena J, Albers U, Benito PJ, GonzalezGross M. Acute physical exercise increases homocysteine concentrations in young trained male subjects. *Nutr Hosp*. 2013;28:325-332.
- Marques LR, Diniz TA, Antunes BM, Rossi FE, Caperuto EC, Lira FS, Gonçalves DC. Reverse cholesterol transport: Molecular mechanisms and the non-medical approach to enhance HDL cholesterol. *Front Physiol*. 2018;9:526.
- Marti F, Vollenweider P, Marques-Vidal PM, Mooser V, Waeber G, Paccaud F, Bochud M. Hyperhomocysteinemia is independently associated with albuminuria in the population-based CoLaus study. *BMC Public Health*. 2011;11:733.
- Mascolo E, Verni F. Vitamin B6 and diabetes: Relationship and molecular mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2020;21(10):3669.
- McCully KS, Wilson RB. Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis*. 1975;22(2):215-27.
- McCully KS. Homocysteine and the pathogenesis of atherosclerosis. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2015;8(2):211-219.
- McCully KS. Hyperhomocysteinemia and arteriosclerosis: Historical aspects. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43:980-986.
- McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: Implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Amer J Pathol*. 1969;56:111-128.
- Mercié P, Garnier O, Lascoste L, Renard M, Closse C, Durrieu F, Marit G, Boisseau RM, Belloc F. Homocysteine-thiolactone induces caspase-independent vascular endothelial cell death with apoptotic features. *Apoptosis*. 2000;5(5):403-411.
- Miller AL. The methionine-homocysteine cycle and its effects on cognitive diseases. *Altern Med Rev*. 2003;8:7-19.
- Milman N. Intestinal absorption of folic acid - new physiologic & molecular aspects. *Indian J Med Res*. 2012;136:725-728.
- Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972;247(10):3170-3175.
- Mitchell JA, Ali F, Bailey L, Moreno L, Harrington LS. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp Physiol*. 2008;93:141-147.
- Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: A novel marker of atherosclerosis. *Circulation*. 1999;99(9):1141-1146.
- Mocellin S, Briarava M, Pilati P. Vitamin B6 and cancer risk: A field synopsis and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2017 Mar 1;109(3):1-9.

- Molina-López J, Molina JM, Chiroso LJ, Florea DI, Sáez L, Planells E. Effect of folic acid supplementation on homocysteine concentration and association with training in handball players. *J Int Soc Sports Nutr.* 2013;10(1):10.
- Moshal KS, Camel CK, Kartha GK, Steed MM, Tyagi N, Sen U, Kang YJ, Lominadze D, Maldonado C, Tyagi SC. Cardiac dys-synchronization and arrhythmia in hyperhomocysteinemia. *Curr Neurovasc Res.* 2007;4(4):289-294.
- Mudd SH, Finkelstein JD, Irreverere F, Laster L. Homocystinuria – an enzymatic defect. *Science.* 1964;143:1443-1445.
- Mudd SH, Levy HL, Abeles RH. A derangement in the metabolism of vitamin B12 leading to homocystinuria, cystathioninuria and methylmalonicaciduria. *Biochem Biophys Res Commun.* 1969;35:121-126.
- Mudd SH. Hypermethioninemias of genetic and non genetic origin: A review. *Am J Med Genet C.* 2011;157:3-32.
- Mueller JH. A new sulfur-containing amino acid isolated from the hydrolytic products of protein. *J Biol Chem.* 1923;58:157-169.
- Mutavdzin S, Gopcevic K, Stankovic S, Jakovljevic Uzelac J, Labudovic Borovic M, Djuric D. The effects of folic acid administration on cardiac oxidative stress and cardiovascular biomarkers in diabetic rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2019a;2019:1342549.
- Mutavdzin S, Gopcevic K, Stankovic S, Jakovljevic Uzelac J, Labudovic Borovic M, Djuric D. The effect of folic acid administration on cardiac tissue matrix metalloproteinase activity and hepatorenal biomarkers in diabetic rats 1. *Can J Physiol Pharmacol.* 2019b;97(9):893-901.
- Najib S, Sánchez-Margalet V. Homocysteine thiolactone inhibits insulin-stimulated DNA and protein synthesis: Possible role of mitogen-activated protein kinase (MAPK), glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) and p70 S6K phosphorylation. *J Mol Endocrinol.* 2005;34:119-126.
- Nakano E, Taiwo FA, Nugent D, Griffiths HR, Aldred S, Paisi M, Kwok M, Bhatt P, Hill MH, Moat S, Powers HJ. Downstream effects on human low density lipoprotein of homocysteine exported from endothelial cells in an in vitro system. *J Lipid Res.* 2005;46(3):484-493.
- Namekata K, Enokido Y, Ishii I, Nagai Y, Harada T, Kimura H. Abnormal lipid metabolism in cystathionine beta-synthase-deficient mice, an animal model for hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem.* 2004;279(51):52961-52969.
- National Research Council (US) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition (1995). Nutrient requirements of laboratory animals. 4th rev ed. Washington, DC: National Academies Press
- Naushad SM, Prayaga A, Digumarti RR, Gottumukkala SR, Kutala VK. Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3 (BNIP3) expression is epigenetically regulated by one-carbon metabolism in invasive duct cell carcinoma of breast. *Mol Cell Biochem.* 2012;361(1-2):189-195.
- Nikolic Turnic T, Arsic A, Vucic V, Petrovic S, Ristic-Medic D, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic J, Radonjic T, Milosavljevic I, Bolevich S, Bolevich S, Djuric D, Jakovljevic V. Hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors differentially modulate plasma fatty acids in rats with diet-induced-hyperhomocysteinemia: Is ω -3 fatty acids supplementation necessary? *Front Physiol.* 2019;10:892.
- Nikolic Turnic TR, Jakovljevic VL, Djuric DM, Jeremic NS, Jeremic JN, Milosavljevic IM, Srejovic IM, Selakovic DV, Zivkovic VI. Efficiency of atorvastatin and simvastatin

in improving cardiac function during the different degrees of hyperhomocysteinemia. *Can J Physiol Pharmacol.* 2018;96(10):1040-1049.

- Nording HM, Seizer P, Langer HF. Platelets in inflammation and atherogenesis. *Front Immunol.* 2015;6:98.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95:351-358.
- Okura T, Rankinen T, Gagnon J, Lussier-Cacan S, Davignon J, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH, Bouchard C. Effect of regular exercise on homocysteine concentrations: the HERITAGE Family Study. *Eur J Appl Physiol.* 2006;98(4):394-401.
- Ortenblad N, Madsen K, Djurhuus MS. Antioxidant status and lipid peroxidation after short-term maximal exercise in trained and untrained humans. *Am J Physiol* 1997;272:1258-63.
- Ostapiv RD, Humenyuk SL, Manko VV. Activity and isozyme content of lactate dehydrogenase under long term oral taurine administration to rats. *Ukr Biochem J.* 2015;87(4):54-62.
- Otani T, Iwasaki M, Hanaoka T, Kobayashi M, Ishihara J, Natsukawa S, Shaura K, Koizumi Y, Kasuga Y, Yoshimura K, Yoshida T, Tsugane S. Folate, vitamin B6, vitamin B12, and vitamin B2 intake, genetic polymorphisms of related enzymes, and risk of colorectal cancer in a hospital-based case-control study in Japan. *Nutr Cancer.* 2005;53(1):42-50.
- Oussalah A, Guéant JL, Peyrin-Biroulet L. Meta-analysis: Hyperhomocysteinemia in inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;34:1173-1184.
- Oztasan N, Taysi S, Gumustekin K, Altinkaynak K, Aktas O, Timur H, Siktar E, Keles S, Akar S, Akcay F, Dane S, Gul M. Endurance training attenuates exercise-induced oxidative stress in erythrocytes in rat. *Eur J Appl Physiol.* 2004;91:622-627.
- Pan Y, Liu Y, Guo H, Jabir MS, Liu X, Cui W, Li D. Associations between folate and vitamin B12 levels and inflammatory bowel disease: A meta-analysis. *Nutrients.* 2017;9(4):382.
- Partearroyo T, Pérez-Miguelsanz J, Peña-Melián Á, Maestro-de Las-Casas C, Úbeda N, Varela-Moreiras G (2016). Low and high dietary folic acid levels perturb postnatal cerebellar morphology in growing rats. *Br J Nutr* 115(11):1967-1977.
- Pascale RM, Peitta G, Simile MM, Feo F. Alterations of methionine metabolism as potential targets for the prevention and therapy of hepatocellular carcinoma. *Medicina (Kaunas).* 2019;55(6):296.
- Pavlikova M, Kovalska M, Tatarkova Z, Sivonova-Kmetova M, Kaplan P, Lehotsky J. Response of secretory pathways Ca(2+) ATPase gene expression to hyperhomocysteinemia and/or ischemic preconditioning in rat cerebral cortex and hippocampus. *Gen Physiol Biophys.* 2011;30 Spec No:S61-69.
- Perez-de-Arce K, Foncea R, Leighton F. Reactive oxygen species mediates homocysteine-induced mitochondrial biogenesis in human endothelial cells: Modulation by antioxidants. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;338(2):1103-9.
- Perla-Kaján J, Borowczyk K, Głowacki R, Nygård O, Jakubowski H. Paraoxonase 1 Q192R genotype and activity affect homocysteine thiolactone levels in humans. *FASEB J.* 2018:fj201800346R.
- Perla-Kaján J, Stanger O, Luczak M, Ziółkowska A, Malendowicz LK, Twardowski T, Lhotak S, Austin RC, Jakubowski H. Immunohistochemical detection of N-homocysteinylation proteins in humans and mice. *Biomed Pharmacother.* 2008;62(7):473-479.

- Pingitore A, Lima GP, Mastorci F, Quinones A, Iervasi G, Vassalle C. Exercise and oxidative stress: Potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition*. 2015;31(7-8):916-922.
- Pushpakumar S, Kundu S, Sen U. Endothelial dysfunction: The link between homocysteine and hydrogen sulfide. *Curr Med Chem*. 2014;21(32):3662-3672.
- Qian B, Shen S, Zhang J, Jing P. Effects of vitamin B6 deficiency on the composition and functional potential of T cell populations. *J Immunol Res*. 2017;2017:2197975.
- Qin X, Li J, Cui Y, Liu Z, Zhao Z, Ge J, Guan D, Hu J, Wang Y, Zhang F, Xu X, Wang X, Xu X, Huo Y. MTHFR C677T and MTR A2756G polymorphisms and the homocysteine lowering efficacy of different doses of folic acid in hypertensive Chinese adults. *Nutr J*. 2012;11:2.
- Que´re´ I, Paul V, Rouillac C, Janbon C, London J, Demaille J, Kamoun P, Dufier JL, Abitbol M, Chasse´ JF. Spatial and temporal expression of the cystathionine beta-synthase gene during early human development. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;254:127–137.
- Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med* 2008;44:153-159.
- Rader DJ, Daugherty A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature*. 2008;451:904-913.
- Rahimi M, Shekarforoush S, Asgari AR, Khoshbaten A, Rajabi H, Bazgir B, Mohammadi MT, Sobhani V, Shakibae A. The effect of high intensity interval training on cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in Wistar rats. *EXCLI J*. 2015;14:237-46.
- Randeva HS, Lewandowski KC, Drzewoski J, Brooke-Wavell K, O'Callaghan C, Czupryniak L, Hillhouse EW, Prelevic GM. Exercise decreases plasma total homocysteine in overweight young women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4496-4501.
- Richard E, Gallego-Villar L, Rivera-Barahona A, Oyarzábal A, Pérez B, Rodríguez-Pombo P, Desviat LR. Altered redox homeostasis in branched-chain amino acid disorders, organic acidurias, and homocystinuria. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:1246069.
- Riegel B, Du Vigneaud V. The isolation of homocysteine and its conversion to a thiolactone. *J Biol Chem*. 1935;112:149-154.
- Romagnuolo J, Fedorak RN, Dias VC, Bamforth F, Teltscher M. Hyperhomocysteinemia and inflammatory bowel disease: Prevalence and predictors in a cross-sectional study. *Am J Gastroenterol*. 2001;96:2143-2149.
- Ronalds BF. Bringing together academic and industrial chemistry: Edmund Ronald' contribution. *Substantia*. 2019;3(1):139-152.
- Rouet-Benzineb P, Buhler JM, Dreyfus P, Delcourt A, Dorent R, Perennec J, Crozatier B, Harf A, Lafuma C. Altered balance between matrix gelatinases (MMP-2 and MMP-9) and their tissue inhibitors in human dilated cardiomyopathy: Potential role of MMP-9 in myosin-heavy chain degradation. *Eur J Heart Fail*. 1999;1(4):337-352.
- Ruiz JR, Sola R, Gonzalez-Gross M, Ortega FB, Vicente-Rodriguez G, Garcia-Fuentes M, Gutierrez A, Sjöström M, Pietrzik K, Castillo MJ. Cardiovascular fitness is negatively associated with homocysteine levels in female adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2007;161:166-171.
- Saibeni S, Cattaneo M, Vecchi M, Zighetti ML, Lecchi A, Lombardi R, Meucci G, Spina L, de Franchis R. Low vitamin B(6) plasma levels, a risk factor for thrombosis,

in inflammatory bowel disease: Role of inflammation and correlation with acute phase reactants. *Am J Gastroenterol.* 2003;98:112-117.

- Salata D, Budkowska M, Dolegowska B. Sphingosine-1-phosphate—molecular maestro. *Postepy Biochem.* 2012;58:281-291.
- Scaglione F, Panzavolta G. Folate, folic acid and 5-methyltetrahydrofolate are not the same thing. *Xenobiotica.* 2014;44:480-488.
- Sena CM, Pereira AM, Seica R. Endothelial dysfunction - A major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2013;1832:2216-2231.
- Shannon B, Gnanasampanthan S, Beilby J, Iacopetta B. A polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene predisposes to colorectal cancers with microsatellite instability. *Gut.* 2002;50:520-524.
- Shelke N, Keith L. Folic acid supplementation for women of childbearing age versus supplementation for the general population: A review of the known advantages and risks. *Int J Fam Med.* 2011;2011:173705.
- Sipkens JA, Hahn N, van den Brand CS, Meischl C, Cillessen SA, Smith DE, Juffermans LJ, Musters RJ, Roos D, Jakobs C, Blom HJ, Smulders YM, Krijnen PA, Stehouwer CD, Rauwerda JA, van Hinsbergh VW, Niessen HW. Homocysteine-induced apoptosis in endothelial cells coincides with nuclear NOX2 and peri-nuclear NOX4 activity. *Cell Biochem Biophys.* 2013;67(2):341-52.
- Sipkens JA, Krijnen PA, Hahn NE, Wassink M, Meischl C, Smith DE, Musters RJ, Stehouwer CD, Rauwerda JA, van Hinsbergh VW, Niessen HW. Homocysteine-induced cardiomyocyte apoptosis and plasma membrane flip-flop are independent of S-adenosylhomocysteine: A crucial role for nuclear p47(phox). *Mol Cell Biochem.* 2011;358(1-2):229-239.
- Sitia S, Tomasoni L, Atzeni F, Ambrosio G, Cordiano C, Catapano A, Tramontana S, Perticone F, Naccarato P, Camici P, Picano E, Cortigiani L, Bevilacqua M, Milazzo L, Cusi D, Barlassina C, Sarzi-Puttini P, Turiel M. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun Rev.* 2010;9(12):830-834.
- Snell LM, Brooks DG. New insights into type I interferon and the immunopathogenesis of persistent viral infections. *Curr Opin Immunol.* 2015;34:91-98.
- Song Zh, Tong G, Xiao K, Jiao le F, Ke Y, Hu Ch. L-cysteine protects intestinal integrity, attenuates intestinal inflammation and oxidant stress, and modulates NF- κ B and Nrf2 pathways in weaned piglets after LPS challenge. *Innate Immun.* 2016;22(3):152-161.
- Srejevic I, Jakovljevic V, Zivkovic V, Barudzic N, Radovanovic A, Stanojlovic O, Djuric DM. The effects of the modulation of NMDA receptors by homocysteine thiolactone and dizocilpine on cardiodynamics and oxidative stress in isolated rat heart. *Mol Cell Biochem.* 2015;401(1-2):97-105.
- Stanhewicz AE, Kenney WL. Role of folic acid in nitric oxide bioavailability and vascular endothelial function. *Nutrition Reviews.* 2017;75(1):61-70.
- Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Investig.* 1986;77:1370-1376.
- Steed MM, Tyagi SC. Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15:1927-1943.
- Stojanović M, Šćepanović L, Hrnčić D, Rašić-Marković A, Djuric D, Stanojlović O. Multidisciplinary approach to nitric oxide signaling: Focus on the gastrointestinal and the central nervous system. *Vojnosanit Pregl.* 2015;72(7):619-24.
- Stojanović M, Šćepanović Lj, Bosnić O, Mitrović D, Jozanov-Stankov O, Šćepanović V, Šćepanović R, Stojanović T, Ilić S, Djuric D. Effects of acute administration of D,L-

homocysteine thiolactone on the antioxidative status of rat intestine and liver. *Acta Veterinaria*. 2016;66(1):26-36.

- Stojanović M, Todorović D, Šćepanović L, Mitrović D, Borozan S, Dragutinović V, Labudović-Borović M, Krstić D, Čolović M, Djuric D. Subchronic methionine load induces oxidative stress and provokes biochemical and histological changes in the rat liver tissue. *Mol Cell Biochem*. 2018;448(1-2):43-50.
- Szlauer A, Mielimonka A, Głowacki R, Borowczyk K, Stachniuk J, Undas A. Protein N-linked homocysteine is associated with recurrence of venous thromboembolism. *Thromb Res*. 2015;136(5):911-916.
- Tan BL, Norhaizan ME, Liew WP, Sulaiman Rahman H. Antioxidant and oxidative stress: A mutual interplay in age-related diseases. *Front Pharmacol*. 2018;9:1162.
- Tan M, Ouyang Y, Jin M, Chen M, Liu P, Chao X, Chen Z, Chen X, Ramassamy C, Gao Y, Pi R. Downregulation of Nrf2/HO-1 pathway and activation of JNK/c-Jun pathway are involved in homocysteic acid-induced cytotoxicity in HT-22 cells. *Toxicol Lett*. 2013;223(1):1-8.
- Tanaka M, Sydow K, Gunawan F, Jacobi J, Tsao PS, Robbins RC, Cooke JP. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpression suppresses graft coronary artery disease. *Circulation*. 2005;112(11):1549-1556.
- Teerlink T. Determination of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine in biological samples by HPLC. *Methods Mol Med*. 2005;108:263-274.
- Tekpli X, Landvik NE, Anmarkud KH, Skaug V, Haugen A, Zienolddiny S. DNA methylation at promoter regions of interleukin 1B, interleukin 6, and interleukin 8 in non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2013;62(2):337-345.
- Tiedemann F, Gmelin L. Einige neue Bestandtheile der Galle des Ochsen. *Annalen der Physik*. 1827;85(2):326-337.
- Timkova V, Tatarkova Z, Lehotsky J, Racay P, Dobrota D, Kaplan P. Effects of mild hyperhomocysteinemia on electron transport chain complexes, oxidative stress, and protein expression in rat cardiac mitochondria. *Mol Cell Biochem*. 2016;411(1-2):261-270.
- Todorovic D, Stojanovic M, Gopcevic K, Medic A, Stankovic S, Kotlica B, Labudovic Borovic M, Djuric D. Effects of four weeks lasting aerobic physical activity on cardiovascular biomarkers, oxidative stress and histomorphometric changes of heart and aorta in rats with experimentally induced hyperhomocysteinemia. *Mol Cell Biochem*. 2023;478(1):161-172.
- Todorovic D, Stojanovic M, Medic A, Gopcevic K, Mutavdzin S, Stankovic S, Djuric D. Four weeks of aerobic training affects cardiac tissue matrix metalloproteinase, lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase enzymes activities, and hepatorenal biomarkers in experimental hyperhomocysteinemia in rats. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13):6792.
- Todorović D, Stojanović M, Šćepanović Lj, Mitrović D, Šćepanović V, Šćepanović R, Ilić S, Šćepanović T, Djuric D. Roles of sulfur-containing amino acids in gastrointestinal physiology and pathophysiology. *Vojnosanitetski pregled*. 2021; 78(11): 1222-1228.
- Tyagi SC, Smiley LM, Mujumdar VS, Clonts B, Parker JL. Reduction-oxidation (Redox) and vascular tissue level of homocyst(e)ine in human coronary atherosclerotic lesions and role in extracellular matrix remodeling and vascular tone. *Mol Cell Biochem*. 1998;181(1-2):107-116.

- Ueland PM. Pharmacological and biochemical aspects of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Pharmacol Rev.* 1982;34:223-253.
- Vassalle C, Lubrano V, L'Abbate A, Clerico A. Determination of nitrite plus nitrate and malondialdehyde in human plasma: Analytical performance and the effect of smoking and exercise. *Clin Chem Lab Med.* 2002;40:802-809.
- Venta R, Cruz E, Valcarcel G, Terrados N. Plasma vitamins, amino acids, and renal function in postexercise hyperhomocysteinemia. *Med Sci Sports Exerc.* 2009;41:1645-1651.
- Vincent HK, Bourguignon C, Vincent KR. Resistance training lowers exercise-induced oxidative stress and homocysteine levels in overweight and obese older adults. *Obesity.* 2006;14:1921-1930.
- Vincent KR, Braith RW, Bottiglieri T, Vincent HK, Lowenthal DT. Homocysteine and lipoprotein levels following resistance training in older adults. *Prev Cardiol.* 2003;6:197-203.
- Wald DS, Morris JK, Wald NJ. Reconciling the evidence on serum homocysteine and ischaemic heart disease: A meta-analysis. *PLoS ONE.* 2011;6:e16473.
- Walden M, Tian L, Ross RL, Sykora UM, Byrne DP, Hesketh EL, Masandi SK, Cassel J, George R, Ault JR, El Oualid F, Pawłowski K, Salvino JM, Eysers PA, Ranson NA, Del Galdo F, Greenberg RA, Zeqiraj E. Metabolic control of BRISC-SHMT2 assembly regulates immune signalling. *Nature.* 2019;570(7760):194-199.
- Waly MI, Ali A, Al-Nassri A, Al-Mukhaini M, Valliatte J, Al-Farsi Y. Low nourishment of B-vitamins is associated with hyperhomocysteinemia and oxidative stress in newly diagnosed cardiac patients. *Exp Biol Med (Maywood).* 2016;241(1):46-51.
- Wang H, Jiang X, Yang F, Gaubatz JW, Ma L, Magera MJ, Yang X, Berger PB, Durante W, Pownall HJ, Schafer AI. Hyperhomocysteinemia accelerates atherosclerosis in cystathionine beta-synthase and apolipoprotein E double knock-out mice with and without dietary perturbation. *Blood.* 2003;101(10):3901-3907.
- Wang H, Yoshizumi M, Lai K, Tsai JC, Perrella MA, Haber E, Lee ME. Inhibition of growth and p21ras methylation in vascular endothelial cells by homocysteine but not cysteine. *J Biol Chem.* 1997;272(40):25380-25385.
- Wang J, Jiang Y, Yang A, Sun W, Ma C, Ma S, Gong H, Shi Y, Wei J. Hyperhomocysteinemia-induced monocyte chemoattractant protein-1 promoter DNA methylation by nuclear factor- κ B/DNA methyltransferase 1 in apolipoprotein E-deficient mice. *Biores Open Access.* 2013;2(2):118-127.
- Watson WH, Burke TJ, Doll MA, McClain CJ. S-adenosylhomocysteine inhibits NF- κ B-mediated gene expression in hepatocytes and confers sensitivity to TNF cytotoxicity. *Alcohol Clin Exp Res.* 2014;38(4):889-896.
- Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW. Role of lysine residues of plasma lipoproteins in high affinity binding to cell surface receptors on human fibroblasts. *J Biol Chem.* 1978;253(24):9053-9062.
- Wu B, Yue H, Zhou GH, Zhu YY, Wu TH, Wen JF, Cho KW, Jin SN. Protective effects of oxymatrine on homocysteine-induced endothelial injury: Involvement of mitochondria-dependent apoptosis and Akt-eNOS-NO signaling pathways. *Eur J Pharmacol.* 2019;864:172717.
- Wu S, Gao X, Yang S, Meng M, Yang X, Ge B. The role of endoplasmic reticulum stress in endothelial dysfunction induced by homocysteine thiolactone. *Fundam Clin Pharmacol.* 2015;29(3):252-259.

- Wu X, Zhang L, Miao Y, Yang J, Wang X, Wang CC, Feng J, Wang L. Homocysteine causes vascular endothelial dysfunction by disrupting endoplasmic reticulum redox homeostasis. *Redox Biol.* 2019;20:46-59.
- Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev.* 2000;80:1107-1213.
- Xie X, Zhang Z, Wang X, Luo Z, Lai B, Xiao L, Wang N. Stachydrine protects eNOS uncoupling and ameliorates endothelial dysfunction induced by homocysteine. *Mol Med.* 2018;24(1):10.
- Xue H, Zhou S, Xiao L, Guo Q, Liu S, Wu Y. Hydrogen sulfide improves the endothelial dysfunction in renovascular hypertensive rats. *Physiol Res.* 2015;64(5):663-672.
- Yakub M, Moti N, Parveen S, Chaudhry B, Azam I, Iqbal MP. Polymorphisms in MTHFR, MS and CBS genes and homocysteine levels in a Pakistani population. *PLoS ONE.* 2012;7:e33222.
- Yamada H, Akahoshi N, Kamata S, Hagiya Y, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Takano N, Mori M, Ishizaki Y, Izumi T, Kumagai Y, Kasahara T, Suematsu M, Ishii I. Methionine excess in diet induces acute lethal hepatitis in mice lacking cystathionine γ -lyase, an animal model of cystathioninuria. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(9):1716-1726.
- Yang X, Gao Y, Zhou J, Zhen Y, Yang Y, Wang J, Song L, Liu Y, Xu H, Chen Z, Hui R. Plasma homocysteine thiolactone adducts associated with risk of coronary heart disease. *Clin Chim Acta.* 2006;364(1-2):230-234.
- Yoshimura Y, Kawano T, Kuroi M, Morishita M, Mori M, Kawakatsu K. Zymographic demonstration of lactate and malate dehydrogenases isoenzymes in the rodent salivary glands. *Histochemie.* 1970;22(4):337-346.
- Yuan D, Chu J, Lin H, Zhu G, Qian J, Yu Y, Yao T, Ping F, Chen F, Liu X. Mechanism of homocysteine-mediated endothelial injury and its consequences for atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med.* 2023;9:1109445.
- Yuyun MF, Ng LL, Ng GA. Endothelial dysfunction, endothelial nitric oxide bioavailability, tetrahydrobiopterin, and 5-methyltetrahydrofolate in cardiovascular disease. Where are we with therapy? *Microvasc Res.* 2018;119:7-12.
- Zhang D, Sun X, Liu J, Xie X, Cui W, Zhu Y. Homocysteine accelerates senescence of endothelial cells via DNA hypomethylation of human telomerase reverse transcriptase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(1):71-8.
- Zhang P, Tsuchiya K, Kinoshita T, Kushiyama H, Suidasari S, Hatakeyama M, Imura H, Kato N, Suda T. Vitamin B6 prevents IL-1 β protein production by inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *J Biol Chem.* 2016;291:24517-24527.
- Zhao J, Chen H, Liu N, Chen J, Gu Y, Chen J, Yang K. Role of hyperhomocysteinemia and hyperuricemia in pathogenesis of atherosclerosis. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2017;26(12):2695-2699.
- Zhao Z, Liu X, Shi S, Li H, Gao F, Zhong X, Wang Y. Exogenous hydrogen sulfide protects from endothelial cell damage, platelet activation, and neutrophils extracellular traps formation in hyperhomocysteinemia rats. *Exp Cell Res.* 2018 Sep 15;370(2):434-443.
- Zhu S, Li J, Bing Y, Yan W, Zhu Y, Xia B, Chen M. Diet-induced hyperhomocysteinemia increases intestinal inflammation in an animal model of colitis. *J Crohns Colitis.* 2015;9(9):708-719.
- Zintzaras E. Genetic variants of homocysteine/folate metabolism pathway and risk of inflammatory bowel disease: A synopsis and meta-analysis of genetic association studies. *Biomarkers.* 2010;15:69-79 .

- Zivkovic V, Jakovljevic V, Djordjevic D, Vuletic M, Barudzic N, Djuric D. The effects of homocysteine-related compounds on cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers in isolated rat heart. *Mol Cell Biochem.* 2012;370(1-2):59-67.
- Zivkovic V, Jakovljevic V, Pechanova O, Srejovic I, Joksimovic J, Selakovic D, Barudzic N, Djuric DM. Effects of DL-homocysteine thiolactone on cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers in the isolated rat heart: the role of different gasotransmitters. *Biomed Res Int.* 2013;2013:318471.

Spisak skraćenica korišćenih u tekstu

•OH - hidroksilni radikal	MT - metil transferaza
1C - jednogljedični	MTHFR - metilen tetrahidrofolat reduktaza
ADMA - asimetrični dimetilarginin	NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
ALT - alanin aminotransferaza	NBT - <i>nitro blue tetrazolium</i>
apoE - apolipoprotein E	NF-κB - nuklearni faktor kapa B
AST - aspartat aminotransferaza	NO - azot monoksid
CAT - katalaza	O ₂ ⁻ - superoksidni anjon
CBB G-250 - <i>comassie brilliant blue G-250</i>	Ox-LDL - oksidovani lipoprotein niske gustine
CBS - cistationin beta sintaza	PGI ₂ - prostaciklin
CGL - cistationin gama liaza	PMSF - fenilmetilsulfonyl fluorid
CRP - C reaktivni protein	PON - paraoksonaza
Cys - cistein	RNS - reaktivni oblici azota
DDAH - dimetilargininska dimetilaminohidrolaza	ROS - reaktivni oblici kiseonika
eNOS - endotelna azot monoksid sintaza	SAH - S-adenozilhomocistein
ET-1 - endotelin-1	SAM - S-adenozilmetionin
FK - folna kiselina	SDMA - simetrični dimetilarginin
f.p. - fosfatni pufer	SDS - natrijum dodecil sulfat
f.r. - fiziološki rastvor	SHMT - serin hidroksimetiltransferaza
GPx - glutation peroksidaza	SOD - superoksid dismutaza
GSH - redukovani glutation	Tau - taurin
GS-SG - oksidovani glutation	TBARS - esej reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline
H ₂ O ₂ - vodonik peroksid	TBB - pufer za vezivanje tkiva
H ₂ S - vodonik sulfid	TEMED - N,N,N,N-tetrametiletildiamin
HCC - hepatocelularni karcinom	TG - trigliceridi
Hcy - homocistein	TGF-β - faktor transformacije rasta beta TXA ₂ - tromboksan A ₂
Hcy-S-S-Cys - homocistein-cistein disulfid	THF - tetrahidrofolat
Hcy-S-S-Hcy - homocistin	THF-CH ₂ - 5,10-metilen tetrahidrofolat
Hcy-T - homocistein tiolakton	THF-CH ₃ - 5-metil tetrahidrofolat
HE - hematoksilin i eozin/floksin	TIMP - tkivni inhibitor matriks metaloproteinaze
HHcy - hiperhomocisteinemija	tRNK - transportna ribonukleinska kiselina
HOL - ukupni holesterol	U - jedinica enzimske aktivnosti
hs-TnT - visoko senzitivni troponin T	VCAM-1 - vaskularni celularni adhezioni molekul 1
IBC - inflamatorna bolest creva	vit. B6 - vitamin B6
ICAM-1 - intercelularni adhezioni molekul 1	vWF - von Willebrand-ov faktor
IL - interleukin	w/v - masa po zapremini
ISM - indeks srčane mase	
LDH - laktat dehidrogenaza	
LDL - lipoprotein niske gustine	
L-NMMA - N-monometilarginin	
MAT - metionin S-adenoziltransferaza	
MCP-1 - molekul koji privlači makrofage 1	
MDA - malondialdehid	
Met - metionin	
METL - mitohondrijski elektronski transportni lanac	
MMP - matriks metaloproteinaza	
MRS - metionil-tRNK sintetaza	
MS - metionin sintaza	

Publikovani radovi iz ove doktorske disertacije

Originalni radovi *in extenso* u časopisima sa JCR (Journal Citation Reports) liste:

Todorovic D, Stojanovic M, Gopcevic K, Medic A, Stankovic S, Kotlica B, Labudovic Borovic M, Djuric D. Effects of four weeks lasting aerobic physical activity on cardiovascular biomarkers, oxidative stress and histomorphometric changes of heart and aorta in rats with experimentally induced hyperhomocysteinemia. *Mol Cell Biochem.* 2023;478(1):161-172. doi: 10.1007/s11010-022-04503-3.

Todorovic D, Stojanovic M, Medic A, Gopcevic K, Mutavdzin S, Stankovic S, Djuric D. Four weeks of aerobic training affects cardiac tissue matrix metalloproteinase, lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase enzymes activities, and hepatorenal biomarkers in experimental hyperhomocysteinemia in rats. *Int J Mol Sci.* 2021;22(13):6792. doi: 10.3390/ijms22136792.

Pregledni radovi:

Todorović D, Stojanović M, Đurić D. Hiperhomocisteinemija kao faktor rizika za razvoj patoloških promena u kardiovaskularnom sistemu: mehanizmi i posledice. *Medicinski podmladak.* 2024; 75(3). doi: 10.5937/mp75-46356.

PRILOZI

Biografija autora

Dr Dušan Todorović rođen je 27.11.1991. godine u Čupriji. Kao dobitnik Vukove diplome i đak generacije završio je osnovnu školu „13. oktobar“ u Čupriji, a zatim i Gimnaziju „Pomoravski heroji“ u Čupriji, takođe kao đak generacije i dobitnik Vukove diplome. U toku osnovne i srednje škole bio je polaznik Regionalnog centra za talente u oblasti hemije, kao i Istraživačke stanice Petnica takođe u oblasti hemije. Integrisane akademske studije na Medicinskom fakultetu u Beogradu upisao je 2010. godine, a završio 2016. godine sa prosečnom ocenom 9,52. Bio je demonstrator na Katedri za histologiju i embriologiju u toku školske 2011/2012. godine i demonstrator na Katedri za medicinsku fiziologiju u toku školskih godina 2012/2013., 2013/2014., 2014/2015. i 2015/2016. Kao student, na Institutu za medicinsku fiziologiju, počeo je da se bavi naučnoistraživačkim radom u Laboratoriji za gastrointestinalnu fiziologiju pod mentorstvom prof. dr Ljiljane Šćepanović iz čega su proizišla 3 autorska i 3 koautorska rada.

Od 2016. godine dr Dušan Todorović je student doktorskih studija na Medicinskom fakultetu u Beogradu, smer: Fiziološke nauke. Zaposlen je na Katedri za medicinsku fiziologiju, u zvanju saradnik u nastavi od 2017. godine, a u zvanju asistent od 2019. godine. Dr Dušan Todorović se aktivno bavi naučnoistraživačkim radom u Laboratoriji za kardiovaskularna istraživanja i Laboratoriji za gastrointestinalnu fiziologiju Instituta za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“. Od 2017. godine je član projekta „Efekti homocisteina i homocisteinu srodnih supstanci na kardiovaskularni sistem: Uloga gasnih transmitera NO, H₂S i CO“ broj projekta: OI-175043 i 200110, pod rukovodstvom prof. dr Dragana Đurića. Tema doktorske disertacije pod nazivom „Efekti vitamina B6, folne kiseline i dozirane fizičke aktivnosti na biohemijske i histomorfološke promene kardiovaskularnog i digestivnog sistema pacova, uzrokovane subhroničnom hiperhomocisteinijom“ odobrena je 02.7.2019. godine na Veću naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu, za mentora je imenovan prof. dr Dragan Đurić, a za komentora doc. dr Marija Stojanović.

Iz rada u laboratoriji za kardiovaskularna istraživanja proisteklo je 7 radova u časopisima sa liste JCR/WoS i 5 radova u časopisima u drugim indeksiranim bazama. Za naučnoistraživački rad predstavljen na „The 7th Meeting of the European Section and the 8th Meeting of the North American Section of the International Academy of Cardiovascular Sciences (IACS)“ 2021. godine u Banja Luci dobio je nagradu za najbolji poster. Dr Todorović je autor i koautor u 44 publikacije od kojih je 10 štampano *in extenso* u časopisima sa JCR liste. Upisao je zdravstvenu specijalizaciju iz Fizikalne medicine i rehabilitacije 2019. godine na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: **Dušan Todorović**

Broj indeksa: **5065/2016**

Izjavljujem


Da je doktorska disertacija pod naslovom:

Efekti vitamina B6, folne kiseline i dozirane fizičke aktivnosti na biohemijske i histomorfološke promene kardiovaskularnog i digestivnog sistema pacova, uzrokovane subhroničnom hiperhomocisteinemijom

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

Potpis autora

U Beogradu, 17.11.2023. godine



Dušan Todorović

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora : **Dušan Todorović**

Broj indeksa: **5065/2016**

Studijski program: **Doktorske studije iz medicinskih nauka – smer Fiziološke nauke**

Naslov rada: **Efekti vitamina B6, folne kiseline i dozirane fizičke aktivnosti na biohemijske i histomorfološke promene kardiovaskularnog i digestivnog sistema pacova, uzrokovane subhroničnom hiperhomocisteinemijom**

Mentori: **prof. dr Dragan Đurić, doc. dr Marija Stojanović**

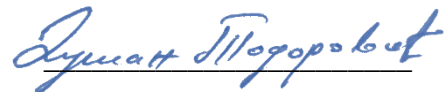
Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva 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.

Potpis autora

U Beogradu, 17.11.2023. godine



Izjava o korišćenju

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

Efekti vitamina B6, folne kiseline i dozirane fizičke aktivnosti na biohemijske i histomorfološke promene kardiovaskularnog i digestivnog sistema pacova, uzrokovane subhroničnom hiperhomocisteinemijom

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora

U Beogradu, 17.11.2023. godine



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 najslobodnija 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 prerada.** 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 prerada.** 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.