

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Dragan R. Hrnčić

**MODULACIJA EPILEPTIČNE
AKTIVNOSTI IZAZVANE HOMOCISTEIN
TIOLAKTONOM KOD PACOVA:
ULOGA HIPERMETIONINSKE DIJETE,
SPAVANJA, FIZIČKE AKTIVNOSTI I
AZOT MONOKSIDA**

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Dragan R. Hrnčić

**MODULATION OF EPILEPTIC ACTIVITY
INDUCED BY HOMOCYSTEINE
THIOLACTONE IN RATS:
THE ROLE OF HYPERMETHIONINE
DIET, SLEEP, PHYSICAL ACTIVITY AND
NITRIC OXIDE**

doctoral dissertation

Belgrade, 2013

PODACI O MENTORU I ČLANOVIMA KOMISIJE

MENTOR

Prof. dr Olivera Stanojlović

redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE

Prof. dr Dragan Đurić

redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu

Prof. dr Milica Prostran

redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu

Akademik Veselinka Šušić,

redovni član SANU

Datum odbrane: _____

**MODULACIJA EPILEPTIČNE AKTIVNOSTI
IZAZVANE HOMOCISTEIN TIOLAKTONOM KOD PACOVA:
ULOGA HIPERMETIONINSKE DIJETE, SPAVANJA,
FIZIČKE AKTIVNOSTI I AZOT MONOKSIDA**

REZIME

Epilepsija nastaje kao rezultat prevage ekscitatornih nad inhibitornim fenomenima u centralnom nervnom sistemu i jedno je od vodećih neuroloških oboljenja (1-2% u opštoj populaciji). Homocistein, zajedno sa svojim metabolitom homocistein tiolaktonom, je značajan faktor rizika za razvoj kardiovaskularnih i neuroloških oboljenja, uključujući epilepsiju. Jedini put produkcije tioaminokiseline homocisteina u organizmu je metabolizam metionina. Akutna administracija homocistein tiolaktona adultnim pacovima dovodi do elektroencefalogramске (EEG) epileptogene aktivnosti, konvulzivnog ponašanja, te predstavlja pogodan eksperimentalni model generalizovane epilepsije.

Epilepsija je često praćena anksioznošću, koja je u pozitivnoj korelaciji sanivoom homocisteina prema rezultatima ATTICA studije, dok rezultati Hordaland studije negiraju ovu povezanost. Zbog dramatičnog toka epileptičnih napada i mogućnosti povređivanja, sedentaran način života je čest kod bolesnika sa epilepsijom. Poslednjih godina pojavili su se dokazi da fizička aktivnost može smanjiti intenzitet nekih tipova konvulzivnih napada, mada postoje rezultati koji ukazuju na pojačanje epileptiformne EEG aktivnosti nakon fizičke aktivnosti. Istraživanja ukazuju da se selektivnom deprivacijom REM (eng. rapid eye movement) spavanja redukuje nivo homocisteina kod pacova. Međutim, spavanje je fiziološki proces koji čini jednu trećinu ljudskog života i njegov nedostatak je povezan sa hiperekscitabilnošću. Azot monoksid (NO) pripada grupi gasnih neurotransmitera. Neuralna NO sintaza (nNOS) je prisutna u strukturama CNS u kojima NO kao neuromodulator reguliše ekscitabilnost. Međutim, povišena

ekspresija inducibilne NOS (iNOS) pronađena je kod pacijenata sa epilepsijom. Ukazano je na moguće antikonvulzivno dejstvo NO na modelu epilepsije izazvane homocistein tiolaktonom, ali uloga nNOS i iNOS, čiju selektivnu inhibiciju je moguće ostvariti primenom 7-nitroindazola (7NI) i aminogvanidina, u ovim efektima ostaje nejasna.

Predmet rada ove doktorske disertacije bilo je ispitivanje efekata hipermetioninske dijeta, selektivne deprivacije REM spavanja, fizičke aktivnosti i NO na osetljivost pacova soja Wistar albino na epileptogenu aktivnost homocistein tiolaktona, primenom odgovarajućih bihejvioralnih, elektroencefalografskih i neurobiohemijskih metoda.

Tokom 30 dana hrana obogaćena metioninom (7,7 g/kg) ili standardna hrana (Mucedola SLR, Milano, Italija) bila je dostupna pacovima bez ograničenja. Nakon ovog perioda pratili smo ponašanje povezano sa anksioznošću upotrebom testa otvorenog polja i testa svetlost-tama, parametre konvulzivnog ponašanja i EEG aktivnost životinja (n=8 po grupi) koje su tridesetprvog dana dobile D,L homocistein tiolakton (5,5 mmol/kg). Životinje su žrtvovane 31. dana dijeta (n=16 u grupi) i uzorkovali smo mozak, srce, jetru, aortu. Odredili smo nivo ukupnog homocisteina u serumu, aktivnost enzima Na^+/K^+ -ATPaze, E-NTPDaze i acetilholinesteraze, određene indikatore oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u strukturama mozga i srcu pacova odgovarajućim spektrofotometrijskim metodama, ekspresiju markera astrocita, oligodendrocita i neurona u mozgu tehnikom Western blota. Postojanje morfoloških promena utvrdili smo na histološkim preparatima ovih organa.

Za ispitivanja efekata fizičke aktivnosti koristili smo tredmil aparat za male eksperimentalne životinje (NeuroSciLaBG-Treadmill, Elunit, Srbija). Sve životinje su bile adaptirane na tredmil i učene da trče na traci (3 dana po 10 min pri brzini trake 5-10 m/min). Za ispitivanje efekata akutne fizičke aktivnosti primenjen je: 1) u eksperimentalnoj grupi jednokratno treniranje na tredmilu u trajanju 30 min pri brzini trake od 25 m/min, a u 2) sedentarnoj grupi su životinje provodile isto vreme na tredmilu pri brzini od 0 m/min. Administracija D,L homocistein tiolaktona (subkonvulzivna doza 5,5 mmol/kg, n=8 po grupi) izvršena je

neposredno po završetku treninga. Za ispitivanje efekata *hronične fizičke aktivnosti* primenjen je bio protokol treninga od 30 min dnevno, tokom 30 uzastopnih dana, pri brzini kretanja trake od 20 m/min. Grupa sedentarnih životinja je bila formirana na prethodno opisani način. Administracija D,L homocistein tiolaktona (konvulzivna doza 8,0 mmol/kg, n=8 po grupi) izvršena je 24 h po završetku opisanog protokola.

Selektivna deprivacija spavanja realizovana je modifikovanom metodom platforme. Životinje (grupa S) borave na maloj platformi (r= 6 cm; 1 cm ispod vrha platforme je voda) koja ne dozvoljava REM spavanje, jer usled atonije životinja upada u vodu i budi se. Mala platforma omogućava sporotalasno, ali ne i REM spavanje. Stres kontrolnu grupu čine životinje na velikoj platformi (r= 15 cm, takođe okružena vodom), ali na kojoj je moguće sporotalasno i REM spavanje (grupa L). Suvu kontrolu čine životinje čuvane pojedinačno u kavezima sa prostirkom od drvenih strugotina (grupa C). Posle deprivacije REM spavanja u trajanju od 72 h životinje iz C, L i S grupe bile su prenete u suve kaveze u kojima im je administriran: 1) D,L-homocistein tiolakton (H, 5,5 mmol/kg) i formirane su eksperimentalne grupe CH, LH i SH (u svakoj n=8) ili 2) fiziološki rastvor i formirane su korespondentne kontrolne grupu Cc, Lc i Sc (u svakoj n=6).

U cilju ispitivanja uloge nNOS i iNOS, pola sata pre administracije D,L homocistein tiolaktona (5,5 mmol/kg), izvršena je selektivna inhibicija: 1) nNOS primenom 7NI u rastućim dozama (25, 50, 75 mg/kg, n=8 u svakoj) i 2) selektivna inhibicija nNOS primenom aminogvanidina (50, 75 i 100 mg/kg, n=8 u svakoj).

Rezultatima istraživanja pokazano je da je hronična hipermetioninska dijeta u trajanju od 30 dana dovela do razvoja umerene hiperhomocisteinemije kod odraslih pacova i povećanja njihove osetljivosti na epileptogenu aktivnost homocistein tiolaktona. To se manifestovalo potencijacijom bihevioralnih i EEG karakteristika epileptične aktivnosti izazvane ovim istoestrom homocisteina. Utvrđeno je da je ponašanje pacova koji su 30 dana bili na režimu hipermetioninske ishrane bilo izmenjeno u primenjenim etološkim testovima i ukazalo je na povećanu anksioznost ovih životinja, što implicira da hipermetioninska dijeta deluje proanksiogeno. Neurobiohemijska ispitivanja su

pokazala da su efekti hipermetioninske dijeta indukovali pojavu oksidativnog stresa u mozgu pacova, modulirali aktivnost Na⁺/K⁺-ATPaze i acetilholinesteraze i uzrokovali porast ekspresije markera oligodendrocita u korteksu. Međutim, pokazano je da odgovor na oksidativni stres u mozgu pacova nije bio uniforman, već se razlikovao među određenim regionima mozga.

Selektivna deprivacija REM spavanja potencirala je bihevioralne i EEG parametre epileptične aktivnosti izazvane subkonvulzivnom dozom homocistein tiolaktona.

Primenjena akutna fizička aktivnost na tredmilu nije potencirala konvulzivne napade izazvane homocistein tiolaktonom kod pacova. Hronično (redovno) fizičko vežbanje na tredmilu u trajanju od 30 dana dovelo je do značajnog smanjenja osetljivosti adultnih pacova na epileptogenu aktivnost homocistein tiolaktona mehanizmima koji uključuju jačanje antioksidativne zaštite.

Selektivni inhibitor nNOS, 7-nitroindazol, potencirao je pojavu bihevioralnih i EEG manifestacija epileptične aktivnosti izazvane homocistein tiolaktonom kod odraslih pacova, što znači da postoji funkcionalna uloga nNOS u proepileptogenim efektima homocistein tiolaktona. Aminogvanidin, selektivni iNOS inhibitor potencirao je epileptičnu aktivnost izazvanu homocistein tiolaktonom kod odraslih pacova. Na ovaj način je pokazano da postoji funkcionalna veza između nNOS, iNOS i prokonvulzivnih efekata homocistein tiolaktona.

Ključne reči: epilepsija, anksioznost, spavanje, fizičko vežbanje, homocistein tiolakton, 7-nitroindazol, aminogvanidin, bihevior, EEG, pacovi

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Fiziološke nauke - neurofiziologija

**MODULATION OF EPILEPTIC ACTIVITY
INDUCED BY HOMOCYSTEINE THIOLACTONE IN RATS:
THE ROLE OF HYPERMETHIONINE DIET, SLEEP,
PHYSICAL ACTIVITY AND NITRIC OXIDE**

ABSTRACT

Epilepsy is a result of an imbalance between inhibitory and excitatory phenomena in the central nervous system. It is one of the leading neurological disorders and affects 1-2% of the world's population. Homocysteine, together with its metabolite homocysteine thiolactone is a risk factor for numerous cardiovascular and neurological disorders, including epilepsy. Homocysteine is produced by metabolism of methionine. Systemic administration of homocysteine to adult rats significantly alters neuronal circuits, leading to specific epileptogenic activity in the electroencephalogram (EEG) with convulsive episodes in animal behavior. Therefore, it represents suitable experimental model of generalized epilepsy.

Anxiety is a common comorbidity among epileptic patients. Results of ATTICA study showed positive correlation between homocysteine and anxiety, while results of Hordaland study did not show the existence of this relationship. Increased sedentary lifestyle among epileptic patients is observed in population-based studies Physical activity can play a favorable role in reducing the frequency and intensity of some seizures. However, an exercise - induced increase of epileptiform EEG activity has been also reported. Recent studies have shown that REM sleep deprivation can lower plasma homocysteine levels. On the other hand, sleep is a cyclic and vital physiological process that constitutes one-third of human life and deprivation of sleep is associated with hyperexcitability. Nitric oxide (NO) is a member of gasotransmitter family. Neuronal NO synthase (nNOS) is expressed in various brain regions in which NO acts as modulator of excitability. However, inducible NOS (iNOS) is found to be overexpressed in brains of humans with

epilepsy. Anticonvulsive role of NO has been indicated in the epilepsy model induced by homocysteine thiolactone, but the role of nNOS and iNOS, which could be selectively inhibited by 7-nitroindazole (7NI) and aminoguanidine, in these effects still remains unknown.

The aim of this PhD thesis was to investigate the effects of hypermethionine diet, selective deprivation of REM sleep, physical activity, and NO on susceptibility of Wistar albino rats on epileptogenic activity of homocysteine thiolactone, by appropriate behavioral, electroencephalographic and neurobiochemical methods.

Standard or methionine-enriched diet (double content comparing to standard, 7.7 g/kg, Mucedola SLR, Milano, Italy) was available to rats during 30 days. At the end of this period, anxiety-related behavior in open field and light-dark test, convulsive behavior and EEG activity was recorded (n=8 per group). Epileptic activity was elicited by D, L homocysteine thiolactone (5.5 mmol/kg). Animals were sacrificed and the brain, heart, liver and aorta were sampled on the 31st day upon diet beginning (n=16). Total serum homocysteine, the activity of Na⁺/K⁺-ATPase, E-NTPDase and acetylcholinesterase, certain indicators of oxidative stress and antioxidative capacities in the certain rat brain structures and heart were determined by appropriate spectrophotometric methods. Expression of astrocyte, oligodendrocyte and neuronal markers were determined in the brain by Western blot. Histological analysis of these organs was also performed.

Standard treadmill apparatus (NeuroSciLaBG-Treadmill, Elunit, Serbia) for small laboratory animals was used in the study. All rats were familiarized with the treadmill (3 days in sessions of 10 min at ramp belt velocity of 5-10 m/min). For assessment of acute physical activity rats in experimental group were run on treadmill (one session, 30 min, belt velocity of 25 m/min), while those in sedentary spend the same time in treadmill apparatus at 0 m/min. D,L homocysteine thiolactone was administered immediately upon the end of training (subconvulsive dose 5.5 mmol/kg, n=8 per group). For assessment of chronic physical activity 30-min treadmill training at 20 m/min velocity for 30 days was applied. The sedentary group was formed as previously described. D,L homocysteine

thiolactone (convulsive dose 8.0 mmol/kg, n=8 per group) was administered 24h upon the end of described training protocol.

Selective deprivation of REM sleep was achieved by the platform method. Animals placed on small platform (6.0 cm in diameter surrounded with water 1 cm beneath the platform top) would awake when muscle atonia appear during REM sleep. Therefore, small platform allows slow-wave sleep (SWS), but not paradoxical sleep (group S). The corresponding stress control group included animals on the large platform (15.0 cm in diameter, also surrounded with water), but with a larger surface allowing both SWS and REM sleep (group L). Cage control (group C) comprised of animals maintained in dry transparent plastic cages separately. The outlined experimental conditions lasted for 72h, after which animals received either 1) D,L homocysteine thiolactone (H, 5.5 mmol/kg) for the CH, LH and SH groups (n=8 in each) or 2) a saline injection for the Cc, Lc and Sc groups (n=6 in each group).

In order to investigate the role of nNOS and iNOS, 30 min prior to D,L homocysteine thiolactone administration (5.5 mmol/kg), selective inhibition of 1) nNOS was achieved by 7NI (25, 50, 75 mg/kg, n=8 in each group) and 2) iNOS was achieved by aminoguanidine (50, 75 and 100 mg/kg, n=8 in each group).

Results of this study showed that chronic hypermethionine diet after 30 days induced development of mild hyperhomocysteinaemia in rats accompanied with increased rat susceptibility to epileptogenic activity of homocysteine thiolactone, what was manifested as potentiation of behavioral and EEG characteristics of epileptic activity induced by this thioester of homocysteine. Behavior of rats after 30 days on hypermethionine diet was altered in ethological test indicating increased anxiety in these animals. Neurobiochemical investigations showed induction of oxidative stress in the rat brain, modulation of Na⁺/K⁺-ATPase and acetylcholinesterase activity that effects of hypermethionine diet induced and increased expression of oligodendrocyte markers in the cortex after hypermethionine diet. However, response to oxidative stress in the rat brain was not uniform.

Selective deprivation of REM sleep potentiated behavioral and EEG manifestations of epileptic activity induced by subconvulsive dose of homocysteine thiolactone.

Acute physical activity did not potentiate convulsive response induced by homocysteine thiolactone in rats. Chronic physical training on treadmill decreased susceptibility of rats for homocysteine thiolactone-induced seizure. These effects could be, at least in part, a consequence of improved antioxidant enzymes activity.

Selective inhibition of nNOS by 7-nitroindazole potentiated the appearance of behavioral and EEG manifestations of epileptic activity induced by homocysteine thiolactone in rats. The same holds true for the effects of aminoguanidine, selective inhibitor of iNOS. In this way, the functional role between nNOS, iNOS and proconvulsive effects of homocysteine thiolactone has been proved.

Key words: epilepsy, anxiety, sleep, physical activity, homocysteine thiolactone, 7-nitroindazole, aminoguanidine, behavior, EEG, rats

Scientific field: Medicine

Narrow scientific field: Physiological sciences - Neurophysiology

ZAHVALNOST

*„Es ist nicht genug zu wissen, man muss auch anwenden;
es ist nicht genug zu wollen, man muss auch tun“
J.W. von Goethe*

Poštovanom i dragom Prof. dr Draganu Đuriću, na svesrdnoj podršci mom sveukupnom profesionalnom i naučnom razvoju.

Dragoj kolegini Doc. dr Aleksandri Rašić-Marković, na pruženoj kolegijalnoj pomoći u realizaciji postavljenih zadataka i ciljeva.

Na ostvarenoj saradnji u realizaciji zajedničkih ciljeva:

Doc. dr Danijeli Krstić sa Instituta za medicinsku hemiju Medicinskog fakulteta u Beogradu i Dr Mirjani Čolović sa Instituta za nuklearne nauke Vinča,

Prof. dr Nataši Petronijević i njenom timu Dr Gordani Jevtić, Dr Milici Velimirović i Dr Tihomiru Stojkoviću iz Laboratorije za neurohemiju Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Doc. dr Neli Puškaš sa Instituta za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“
Dr sci Radmili Obrenović, Centar za medicinsku biohemiju Kliničkog centra Srbije.

Prof. dr Vladimiru Jakovljeviću sa Fakulteta medicinskih nauka u Kragujevcu za podršku.

U toku perioda realizacije istraživanja u okviru ove doktorske disertacije u Laboratoriji za neurofiziologiju Instituta za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“ svoja prva istraživačka iskustva i korake u nauci pravili su i brojni studenti Medicinskog fakulteta u Beogradu, kao i studenti na naučnoj razmeni iz Kanade, Francuske, Brazila, Egipta, Japana, Italije, sa kojima je bilo zadovoljstvo raditi. U laboratorijskom radu nezamenljiva je bila pomoć Jovana Despotovića.

Akademik Veselinki Šušić za konstantno i neumorno usmeravanje i podršku.

Posebnu zahvalnost dugujem mom uvaženom i dragom Mentoru Prof. dr Oliveri Stanojlović, čiji entuzijizam, nesebična i stalna podrška u svim etapama realizacije ovih i prethodnih istraživanja i poduhvata su stubovi ostvarenih rezultata i uspeha u mom stručnom, profesionalnom i naučnom radu.

Svojim najdražima

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Eksperimentalni modeli epilepsija.....	3
1.2. Metabolizam homocisteina.....	6
1.3. Enzimaska aktivnost Na ⁺ /K ⁺ -ATPaze i acetilholinesteraze.....	8
1.4. Mehanizmi oksidativnog stresa.....	10
1.5. Spavanje i epileptična aktivnost: uloga selektivne deprivacije REM spavanja.....	11
1.6. Fizička aktivnost i epilepsije.....	13
1.7. Gasni neurotransmiter azot monoksida (NO) u centralnom nervnom sistemu.....	16
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	22
3. MATERIJAL I METODE	24
3.1. Eksperimentalne životinje.....	25
3.2. Eksperimentalni protokol.....	25
3.3. Metode.....	30
3.4. Korišćene supstance	38
3.5. Statistička analiza.....	39
4. REZULTATI	40
4.1. Efekti hipermetioninske dijeta	41
4.2. Efekti selektivne deprivacije REM spavanja.....	88
4.3. Efekti akutne fizičke aktivnosti.....	96
4.4. Efekti hronične fizičke aktivnosti.....	103
4.5. Efekti selektivne inhibicije nNOS.....	113
4.6. Efekti selektivne inhibicije iNOS.....	120
5. DISKUSIJA	127
5.1. Hipermetioninska dijeta i razvoj umerene hiperhomocisteinemije.....	128

5.2. Proepileptogeni efekti hipermetioninske dijete.....	131
5.3. Proanskiogeni efekti hipermetioninske dijete.....	133
5.4. Biohemijske promene uzrokovane hipermetioninskom dijetom.....	136
5.5. Modulatorni efekat deprivacije spavanja na epileptičnu aktivnost izazvanu homocistein tiolaktonom.....	144
5.6. Akutna fizička aktivnosti ne potencira epileptičnu aktivnost izazvanu homocistein tiolaktonom	148
5.7. Hronična fizička aktivnosti smanjuje osetljivost na epileptičnu aktivnost izazvanu homocistein tiolaktonom	150
5.8. Uloga nNOS u razvoju epileptične aktivnosti izazvane homocistein tiolaktonom	154
5.9. Uloga iNOS u razvoju epileptične aktivnosti izazvane homocistein tiolaktonom.....	157
6. ZAKLJUČCI.....	160
7. LITERATURA.....	163
PRILOZI.....	203
Biografija autora	204
Objavljeni rezultati	205
Obavezni prilozi.....	209

1. UVOD

Jedini put produkcije tioaminokiseline homocisteina u organizmu je metabolizam metionina (Hoffer, 2004). Blaga (15-30 $\mu\text{mol/l}$) i umerena (31-100 $\mu\text{mol/l}$) hiperhomocisteinemija nastaju kao rezultat promena načina života ili kao posledica bolesti i terapije lekovima, dok je teška (>100 $\mu\text{mol/l}$) hiperhomocisteinemija rezultat genetičkih poremećaja (De Bree et al., 2002). Većina eksperimentalnih modela hronične hiperhomocisteinemije nastaje egzogenom aplikacijom homocisteina (Scherer et al., 2011). Sa druge strane, genetički intaktne životinje na režimu hipermetioninske ishrane su ekvivalent bogatoj metioninskoj ishrani u opštoj humanoj populaciji.

Homocistein, zajedno sa svojim metabolitom homocistein tiolaktonom (Jakubowski and Głowacki, 2011), je značajan faktor rizika za razvoj kardiovaskularnih i neuroloških oboljenja, uključujući epilepsiju (Herrmann and Obeid, 2011). Epilepsija nastaje kao rezultat prevage ekscitatornih nad inhibitornim fenomenima u centralnom nervnom sistemu (CNS) i jedno je od vodećih neuroloških oboljenja (1-2% u opštoj populaciji) (Ono et al., 2012). Stanojlović i saradnici (Stanojlović et al., 2009) su pokazali da akutna administracija homocistein tiolaktona adultnim pacovima dovodi do elektroencefalogramске (EEG) epileptogene aktivnosti, konvulzivnog ponašanja, te predstavlja pogodan eksperimentalni model generalizovane epilepsije. Potencijalni mehanizam u epileptogenezi homocisteina (i njegovih metabolita) je produkcija slobodnih radikala i/ili smanjenje antioksidativnog kapaciteta (Troen et al., 2005), ali i brojni drugi još uvek nedovoljno razjašnjeni mehanizmi.

Poznato je da je epilepsija često praćena anksioznošću (osećaj unutrašnje uznemirenosti i napetosti neproporcionalan prirodni potencijalne preteće opasnosti) (Hamidet al., 2011), koja je u pozitivnoj korelaciji sa nivoom homocisteina prema rezultatima ATTICA studije (Pitsavos et al., 2006). Rezultati Hordaland studije (Bjelland et al., 2003) negiraju pomenutu povezanost.

Sedentaran način života je čest kod bolesnika sa epilepsijom, te su pozitivni efekti aerobne fizičke aktivnosti svedeni na minimum. Razlozi za takav način života su iznenađan i dramatičan tok epileptičnih napada i mogućnost povreda tokom fizičke aktivnosti (Dubow and Kelly, 2003). Poslednjih godina postoje dokazi

dobijeni u kliničkim (Nakken et al., 1990) i eksperimentalnim (Arida et al., 2004) studijama (trčanjem na tredmilu) da fizička aktivnost može smanjiti intenzitet nekih tipova konvulzivnih napada, mada postoje rezultati koji ukazuju na pojačanje epileptiformne EEG aktivnosti nakon fizičke aktivnosti (Kuijer et al., 1980).

Istraživanja ukazuju da se lišavanjem spavanja selektivnom REM (eng. rapid eye movement) deprivacijom spavanja redukuje nivo homocisteina kod pacova (Oliveira et al., 2002). Međutim, spavanje je fiziološki proces koji čini jednu trećinu ljudskog života (Stanojlović et al., 2011) i njegov nedostatak je povezan sa hiperekscitabilnošću. Na taj način deprivacija REM spavanja kod predisponiranih osoba može dovesti do epileptičnih napada (Matos et al., 2010).

Grupi gasnih neurotransmitera pripadaju azot monoksid (NO), vodonik sulfid (H₂S) i ugljen monoksid (CO) koji ispoljavaju pro- i anti-konvulzivno dejstvo (Wang et al., 2010). Neuralna NO sintaza (nNOS) je prisutna u strukturama CNS u kojima NO kao neuromodulator reguliše ekscitabilnost (Zhou et al., 2009). Međutim, povišena ekspresija inducibilne NOS (iNOS) pronađena je kod pacijenata sa epilepsijom (González-Hernández et al., 2000). Ukazano je na moguće antikonvulzivno dejstvo NO na modelu epilepsije izazvane homocistein tiolaktonom (Hrnčić et al., 2010), ali uloga nNOS i iNOS, čiju selektivnu inhibiciju je moguće ostvariti primenom 7-nitroindazola (7NI) i aminogvanidina, u ovim efektima ostaje nejasna.

1.1. Eksperimentalni modeli epilepsija

Ogroman sociomedicinski značaj koji imaju epilepsije, potiče od činjenice da od epilepsije boluje 1-2% svetske populacije (Loscher, 2002; Ono et al., 2012). I pored ogromnog napretka u razumevanje etiopatogeneze epileptične aktivnosti i stalnom napretku antikonvulzivne terapije, i dalje je čak 40% obolelih refraktarno na primenjenu medikamentoznu terapiju. Motorne manifestacije napada zavise od normalne funkcije regiona koji su zahvaćeni epileptičkim pražnjenjem, i traju najčešće od nekoliko sekundi do nekoliko minuta (Fisher et al., 2005). Eksperimentalni modeli epilepsije su od velike važnosti u cilju rasvetljavanja

etiopatogeneze i adekvatne antikonvulzivne terapije. Fisher (1989, 2005) je opisao preko 50 različitih modela epilepsije, jer epilepsije ne predstavljaju jedinstven nozološki entitet. Oni omogućavaju izučavanje porekla i mehanizma EEG promena, sinhronizacije neurona, interiktalnih događaja, i mehanizma dejstva prokonvulzivnih i antikonvulzivnih supstanci. Animalni modeli su neophodni za sintetisanje i ispitivanje lekova koji bi se koristili u terapiji epilepsije (Stanojlović et al., 2004).

Osnova patoloških procesa koji dovode do nastanka epilepsija nisu u potpunosti razjašnjeni. Jedan od najčećih mehanizama je narušavanje ravnoteže izmedju ekscitacijske i inhibicijske neurotransmisije. Međutim, u obzir treba uzeti i druge potencijalne mehanizme.

U Laboratoriji za neurofiziologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu razvijeno je nekoliko eksperimentalnih modela epilepsija, kao što su audiogena epilepsija izazvana metafitom (Šušić et al., 1991; Stanojlović et al., 2000), epilepsija izazvana imipenem/cilstatinom (Živanović et al., 2004), model epilepsije izazvane lindanom (Vučević et al., 2008), kao i model generalizovane epilepsije izazvane homocistein tiolaktonom kod odraslih pacova (Stanojlović et al., 2009).

Epilepsija izazvana metafitom predstavlja model generalizovane, refleksne audiogene epilepsije. Metafit (1-1(3-izotiocianatofenil) cikloheksil) piperidin) je analog fenilciklidina (PCP) od koga se razlikuje po izotiocijanatnoj grupi u meta poziciji aromatičnog prstena (Rafferty et al., 1987). Metafit indukuje hiperekscitabilno stanje mozga (Lipovac et al., 1993) koje na audiogenu stimulaciju progredira do generalizovanog konvulzivnog napada (Šušić et al., 1991, Stanojlović et al., 2000). U osnovi konvulzivnog dejstva metafita nalazi se nekoliko mehanizama. Metafit se ireverzibilno vezuje za PCP mesto na N-metil - D-aspartatskom (NMDA) receptorskom kompleksu, što uslovljava otvaranje jonskog kanala ovog glutamatskog receptorskog kompleksa i influks jona Na^+ i Ca^{2+} . Dugotrajne promene u voltažno - zavisnom Na^+ kanalu mogu takođe doprineti konvulzivnom dejstvu metafita (Debler et al., 1993; Lipovac et al., 1993). Nedavno je sugerisano da metafit inhibira transportne sisteme za klirens glutamata iz moždanog parenhima, što za posledicu ima povećan nivo glutamata u mozgu. Svi

pomenuti mehanizmi rezultuju moždanom hiperekscitabilnošću. EEG manifestacije metafitskog dejstva su u vidu šiljaka i šiljak-talas kompleksa, koji na audiogenu stimulaciju progrediraju u multiple šiljke visoke amplitude i niske frekvence (Šušić et al., 1991; Stanojlović et al., 2000; Hrnčić et al., 2006).

Lindan (γ -heksahlorcikloheksan) je organohlorid koji se koristi kao pesticid, naročito u nerazvijenim zemljama, dok skabijes predstavlja glavnu medicinsku indikaciju za njegovu primenu. Prema podacima Agencije za hranu i lekove (Food and Drug Administration, FDA) u Americi se lindan svake godine propiše više od milion puta (FDA, 2003), što je razlog čestim intoksikacijama. Tokom 70-ih godina XX veka, zbog česte pojave intoksikacija, štetnog dejstva na brojne organske sisteme (nervni, kardiovaskularni, gastrointestinalni, urinarni) i potencijalnog kancerogenog dejstva njegova upotreba je limitirana u mnogim zemljama. U zemljama u razvoju lindan je i dalje u upotrebi. Repetitivni epileptički napadi koji mogu dovesti do statusa epilepticusa, hipotermije, hipofagije, respiratorne depresije su glavni simptomi intoksikacije lindanom (Zucchini-Pascal et al., 2009; Sauvit et al., 2002). Epilepsija izazvana lindanom kod pacova predstavlja eksperimentalni model generalizovane epilepsije koji se može koristiti za istraživanje potencijalnih antikonvulzivnih lekova i mehanizama epileptogenog dejstva (Vučević et al., 2008; Mladenović et al., 2007, 2010; Hrnčić et al., 2009). Na osnovu naših dosadašnjih rezultata zaključili smo da je doza lindana od 4 mg/kg subkonvulzivna i pogodna za ispitivanje potencijalno proepileptogenih supstanci. Veća doza lindana od 8 mg/kg je konvulzivna, te je stoga pogodna za ispitivanje potencijalnih antiepileptika.

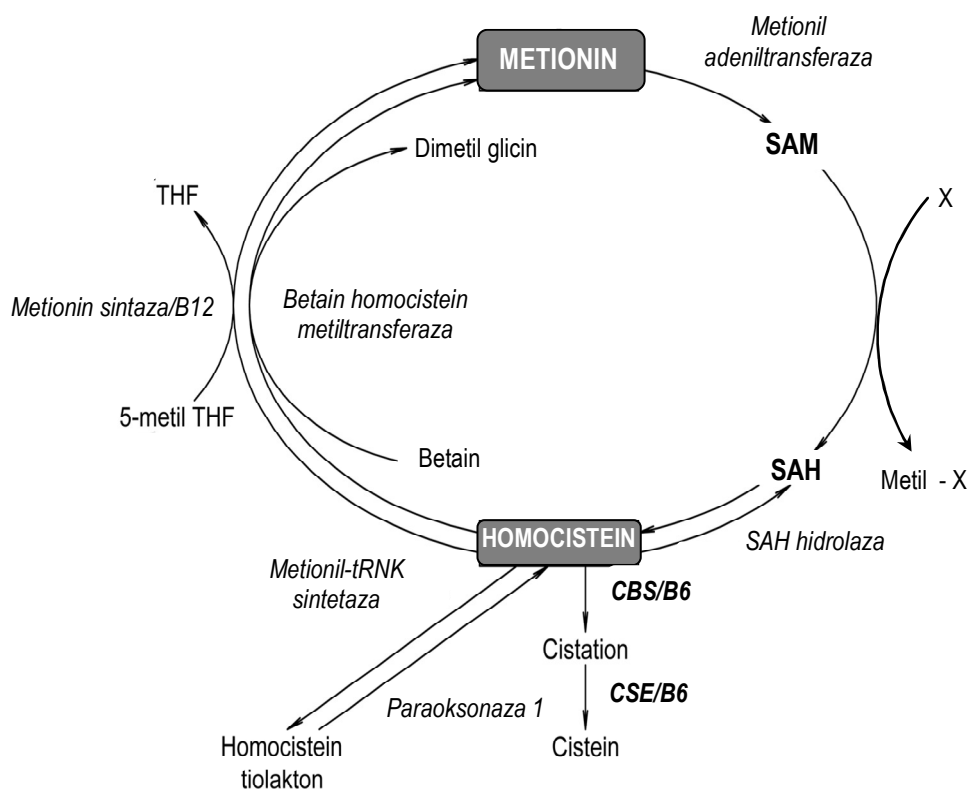
Stanojlović i saradnici (Stanojlović et al., 2009) su pokazali da sistemska administracija homocistein tiolaktona adultnim pacovima dovodi do elektroencefalogramске (EEG) epileptogene aktivnosti, kao i konvulzivnog ponašanja, te predstavlja pogodan eksperimentalni model generalizovane epilepsije. Na osnovu naših dosadašnjih rezultata (Stanojlović et al., 2009; Hrnčić et al., 2010) zaključili smo da je doza homocistein tiolaktona od 5,5 mmol/kg subkonvulzivna i pogodna za ispitivanje potencijalno proepileptogenih supstanci.

Veća doza homocistein tiolaktona od 8,0 mmol/kg je konvulzivna, te je stoga pogodna za ispitivanje potencijalnih antiepileptika.

1.2. Metabolizam homocisteina

Metabolizam tioaminokiseline homocisteina je u tesnoj vezi sa metabolizmom metionina. Naime, homocistein nastaje procesom demetilacije iz metionina. U ovom procesu metionin se konvertuje u S-adenozil metionin (SAM) koji je donator metil grupe u reakcijama metilacije (DNK, RNK, fosfolipida i dr). Tom prilikom SAM prelazi u S-adenozil homocistein (SAH) koji nakon hidrolize daje homocistein. Kada je u pitanju dalja metabolička sudbina homocisteina, onda se zna da se metabolizam homocisteina odvija na 2 načina, i to: remetilacijom i/ili transulfuracijom. U procesu remetilacije, dolazi do konverzije homocisteina u metionin, a pod dejstvom metionin sintaze i uz prisustvo vitamina B12. Sa druge strane, proces transulfuracije se odvija pod katalitičkim dejstvom enzima označenog kao cistation – beta sintaza (CBS), a kao rezultat nastaje cistation, potom i cistein. Vitamin B6 je neophodan za odvijanje opisanog procesa transulfuracije (Hoffer, 2004; Jakubowski 2011).

Brojni štetni efekti homocisteina mogu biti posledica njegove konverzije u reaktivni tioestar homocistein tiolakton. Ovu reakciju katalizuje enzim metionil-tRNK-sintetaza. Bitno je naglasiti da je ova dvostepena konverzija homocisteina u homocistein tiolakton moguća u svim tkivima (Jakubowski, 2011). Fiziološki opseg koncentracije homocistein tiolaktona u plazmi se kreće od 0 do 34,8 nmol/l. Na taj način homocistein tiolakton čini 0,002 – 0,300 % od ukupnog homocisteina plazme. Homocistein tiolakton se sporo hidrolizuje do homocisteina pri neutralnim vrednostima pH i temperaturi 37°C, a vreme poluraspada je preko 30 časova (Dudman et al., 1991). Za rekonverziju homocistein tiolaktona u homocistein odgovorni su enzimi bleomicin hidrolaza, prisutna intracelularno, i enzim paraoksonaza 1, Ca²⁺-zavisni ekstracelularni enzim (Jakubowski, 2000; Jakubowski, 2010; Perla-Kajan and Jakubowski, 2012)



Slika 1.1. Shematski prikaz metabolizma homocisteina.

Demetilacijom metionina nastaje homocistein.

SAM - S-adenozil metionin, SAH- S-adenozil homocistein, CBS- Cistation beta sintetaza, CSE - Cistation gama liaza, THF- tetrahidrofolat

Prema: Jakubowski, 2011

Utvrđeno je da povećanje plazma koncentracije homocisteina za 5 $\mu\text{mol/l}$, povećava i rizik nastanka Alchajmerove bolesti za 40% (Seshadri et al., 2002). Povišene plazma koncentracije homocisteina (>14 $\mu\text{mol/l}$) pronađene su kod pacijenata obolelih i od drugih oblika demencija, te predstavljaju rani marker kognitivnog poremećaja u starijem životnom dobu. Sem toga, utvrđeno je da pri koncentracijama homocisteina u plazmi od 12 do 16 $\mu\text{mol/l}$ i više, značajno raste rizik za nastanak cerebrovaskularnih bolesti. Naime, Sydney Stroke studija (Seshadri et al., 2002) je pokazala da su povećane koncentracija homocisteina u

plazmi ($>15 \mu\text{mol/l}$) pronađene kod 60 % osoba sa cerebralnim inzultom. Stoga, povećanje koncentracije homocisteina može da predvidi brzinu progresije bolesti. U uslovima hiperhomocisteinemije, homocistein se preuzima u neurone putem Na^+ zavisnog membranskog transportera što izaziva povećanje intracelularne koncentracije homocisteina (Bleich et al., 2004). Treba istaći da je mozak posebno osetljiv na visoke koncentracije homocisteina, jer ne poseduje dva glavna metabolička puta za njegovu eliminaciju: betain remetilaciju i transsulfuraciju (Sachdev, 2005).

Kao što je napomenuto, homocistein se može konvertovati u tioestar, homocistein tiolakton (Jakubowski, 2004; Perla-Kajan and Jakubowski, 2012). Sistemska aplikacija homocistein tiolaktona deluje neurotoksično i izaziva konvulzije i smrt eksperimentalnih životinja (Spence et al., 1995). Sem toga, predpostavlja se da toksični uticaj homocistein tiolaktona može biti posledica njegovog metabolisanja u homocisteinsku kiselinu koja je snažni ekscitatorni neurotransmiter (Jakubowski, 2004).

Stanojlović et al. (2009) su pokazali da administracija homocistein tiolaktona odraslim pacovima predstavlja pogodan model generalizovanih epilepsija koga karakterišu definisani motorni fenomeni u ponašanju životinja, kao i pojava karakterističnih električnih fenomena u elektroencefalogramu (EEG) koji po svojim karakteristikama zadovoljavaju kriterijume iktalnih grafoelemenata poznatih kao šiljak talas pražnjenje (SWD), a u ponašanju su korelisani apsansnim tipom bihevioralnih manifestacija.

1.3. Enzimska aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze i acetilholinesteraze

Homeostaza jonskog sastava ekstracelularne i intracelularne tečnosti od vitalnog je značaja za funkcionisanje ekscitabilnih tkiva. Na^+/K^+ -ATPaza (EC 3.6.3.9.) je enzim ćelijske membrane koji učestvuje u održavanju visoke intracelularne koncentracije kalijuma i visoke ekstracelularne koncentracije natrijuma i pripada P-tipu ATP-aza (Reinhard et al., 2013). Smatra se da je Na^+/K^+ -ATPaza glavni potrošač ATP-a u nervnom tkivu. U poslednje vreme sve je više

dokaza da, pored aktivnosti jonske pumpe, Na^+/K^+ -ATPaza učestvuje u interakcijama sa susednim membranskim proteinima i predstavlja deo određenih signalnih puteva (Pierre and Xie, 2006). Različite moždane strukture razlikuju se po zastupljenosti različitih izoformi Na^+/K^+ -ATPaze (Viola et al., 2007). Ektonukleozid trifosfat difosfohidrolaza (E-NTPDaza, ekto-ATP-aze, EC 3.6.1.5), grupa enzima plazma membrane, hidrolizuje ekstracelularne nukleotide (ATP i ADP) u prisustvu dvovalentnih katjona (jona Ca^{2+} ili Mg^{2+}), te predstavljaju jedan od glavnih delova purinergičkog signalnog puta (Robson et al., 2006).

Promena aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze utiče na oslobađanje brojnih neurotransmitera uključujući, između ostalog GABA-u i glutamat, što za posledicu može imati razvoj hiperekscitabilnosti (Vaillend et al., 2002). Akutna administracija homocistein tiolaktona izazvala je snažnu inhibiciju Na^+/K^+ -ATPaze u različitim strukturama mozga (Rašić-Marković et al., 2009), a primena L-arginina, prekursora NO, sprečava inhibitorni uticaj homocistein tiolaktona na ovo smanjenje i vrši potpunu reverziju inhibicije E-NTPDaze izazvane homocistein tiolaktonom (Hrnčić et al., 2010).

Acetilholinesteraza (AChE, EC 3.1.1.7.) i butirilholinesteraza (ChE, EC 3.1.1.8.) su enzimi sposobni za hidrolizu neurotransmitera acetilholina. Acetilholinesteraza pripada grupi serin proteaza i jedan je od najefikasnijih poznatih enzima kod sisara, jer se zna da jedan molekul acetilholinesteraze u toku jednog minuta može da hidrolizuje 6×10^5 molekula acetilholina (Cooper et al. 2003). Fiziološka uloga ovog enzima, ostvarena u prvom redu hidrolizom acetilholina, je prekid agonističkog delovanja acetilholina na muskarinske i nikotinske receptore. Aktivni centar acetilholinesteraze čine anjonsko i estarsko mesto koji su definisani određenom aminokiselinskom sekvencom, pri čemu anjonsko mesto učestvuje u pravilnoj orijentaciji supstrata, tj, acetilholina. Posle formiranja reverzibilnog kompleksa, dolazi do reakcije između acetil grupe acetilholina i hidroksilne grupe serina, pri čemu se formiraju acetilovani enzimi molekul holina (Prado et al., 2002; Cooper et al., 2003).

Acetilholinesteraza postoji u nekoliko izoformi, bez obzira što je kod sisara produkt samo jednog gena, zahvaljujući različitim posttranslacionim

modifikacijama i udruživanju sa strukturnim proteinima. Tako postoje: AchE_T, AchE_R i AchE_H, pri čemu tetramer AchE_T je najzastupljenija u mozgu sisara (Perrier et al., 2005). Pored katalitičke uloge vezane za acetilholin, pokazano je da ovaj enzim može imati i druge neenzimske funkcije, uključujući trofičke uticaje, efekte na ćelijsku proliferaciju i diferencijaciju, kao i odgovor na različite stimuluse, uključujući stres (Gralewicz, 2006; Grisaru et al., 1999)

Ispitivanje uloge acetilholinesteraze u procesu epileptogeneze sve više dobija na značaju (de Araujo Furtado et al., 2012). Aktivacija holinergičkog sistema može suprimirati eksitacijske procese delujući na povećano oslobađanje GABA iz interneuronskih terminala (Pitler and Alger, 1992), dok sa druge strane, acetilholin potencira frekvencu NMDA-uzrokovanih interiktalnih pražnjenja u hipokampusu (Mikroulis and Psarro, 2012).

1.4. Mehanizmi oksidativnog stresa

Slobodni radikali su molekuli koji sadrže jedan nesparen elektron. Stoga su oni vrlo nestabilni i veoma reaktivni, tj. lako stupaju u reakcije sa drugim molekulima. Slobodni radikali su podeljeni na reaktivne kiseonične vrste (ROS) i reaktivne azotne vrste (RNS). I jedni i drugi nastaju u fiziološkim procesima i imaju odgovarajuće uloge u malim i umerenim koncentracijama, ali takođe i značajne neželjene efekte u povećanim koncentracijama kada postoji oksidativni, odnosno nitrozativni stres (Kovačić and Jacintho, 2001; Ridnour et al., 2005; Valko et al., 2001).

ROS su najvažnija kategorija slobodnih radikala i nastaju iz kiseonika. Primarni ROS smatra se da je superoksidni anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$) i on može dalje stupati u reakcije i formirati sekundarne ROS kao što su hidroksilni radikal ($\bullet OH$), peroksi radikal (ROO^{\bullet}) i hidrogen peroksid (H_2O_2).

U visokim koncentracijama ROS izazivaju oštećenje lipida, proteina, kao i DNK i odgovorni su za narušavanje ravnoteže redoks signalnih puteva. Redoks stanje je definisano pulom elektrona u ćelijskim kompartmanima (Schafer and Buettner, 2001). Oštećenje DNK se događa kako na purinskim, tako i na

pirimidinskim bazama, ali i na samom skeletu DNK molekula (Halliwell and Gutteridge, 1999). Ove promene su u osnovi mutageneze, karcinogeneze i starenja (Valko et al., 2007). Oštećenje lipida odigrava se putem lipidne peroksidacije i uključuje polinezasićene masne kiseline, koje su izrazito osetljive na oksidativno oštećenje. Oštećenje proteina se sastoji u oksidaciji amino kiselina, naročito cisteinskih i metioninskih rezidua (Stadtman, 2004).

Oksidativni stres je stanje u kom je ravnoteža između stvaranja reaktivnih ROS i nivoa antioksidanasa značajno poremećena i rezultuje oštećenjem ćelija ekscesivnim ROS (Valko et al., 2007). Do oksidativnog stresa dolazi kada je produkcija ROS povećana ili postoji smanjenje kapaciteta antioksidativnih mehanizama. Ćelijski nivoi ROS se nalaze pod kontrolom antioksidantnih enzima i malo-molekularnih antioksidanasa. Neki od njih su: superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GPx), glutation reduktaza (GR), katalaza (CAT) i neenzimski antioksidansi (glutation- GSH i vitamin E).

Poznato je da je oksidativni stres uključen u patogenezu brojnih oboljenja kao što su dijabetes melitus, ishemijsko/reperfuzijsko oštećenje, inflamatorne bolesti, različiti kanceri, neurodegenerativna oboljenja i dr (Dalle-Donne et al., 2006; Dhalla et al., 2000; Jenner, 2003; Sayre, et al., 2001). Rezultati skorašnjih studija su doveli do identifikacije oksidativnog stresa kao jednog od mehanizama uključenog u epileptogenezu (Cardenas Rodriguez et al., 2013).

1.5. Spavanje i epileptična aktivnost: uloga selektivne deprivacije REM spavanja

Spavanje je vitalno važan fiziološki proces koji čini jednu trećinu ljudskog života (Martins et al., 2008). Elektrofiziološke studije su pokazale da postoje dve vrste spavanja: NREM (eng. non-rapid eye movement) i REM (eng. rapid eye movement) koja se zbog intenzivne moždane aktivnosti, slične onoj koja karakteriše budno stanje, označava i kao paradoksalno spavanje (Jouvet, 1998).

Kumulativni efekti gubitka i poremećaja spavanja su povezani sa širokim spektrom štetnih posledica po zdravlje, uključujući povećan rizik od depresije, gojaznosti, dijabetesa, brojnih kardiovaskularnih i mnogih neuroloških poremećaja (Strine, 2005). Sa druge strane, danas jedna petina svetske populacije pati od nedostatka spavanja, a glavni uzroci za to su promena životnog stila i poremećaji spavanja (insomnija, opstruktivna apneja u spavanju i drugi). Od posebnog je interesa kompleksna i recipročna veza između spavanja i epilepsije, koja je vekovima predmet interesovanja naučne i stručne medicinske misli. Ipak, i dalje se malo zna o neurofiziološkim mehanizmima ove interakcije (Malow et al., 1996).

Deprivacija spavanja, inače jedan od najčešćih uzroka stresa savremenog doba (Rechtschaffen et al., 1983), uglavnom se dešava u REM fazi, tokom zadnje polovine spavanja (Tufik et al., 2009). Upravo zbog toga razvijeno je nekoliko eksperimentalnih tehnika selektivne deprivacije REM spavanja sa različitim prednostima i nedostacima, koje se uglavnom temelje na originalnoj tzv. metodi platforme po Jouvet (Jouvet et al., 1964). Uspešnu modifikaciju ove tehnike učinile su i Šušić i Marković (Šušić and Marković et al., 1993).

Deprivacija spavanja pogoršava kontrolu epilepsije, a epileptični napadi razaraju strukturu spavanja i remete dnevno funkcionisanje bolesnika (Bazil et al., 1997). Produženi gubitak spavanja je udružen sa hiperekscitabilnošću, što može dovesti do napada epilepsije kod osetljivih osoba, ali i kod onih koji ranije nisu imali ni jedan konvulzivni napad.

Deprivacija REM spavanja deluje kao facilitator za epileptične napade favorizujući procese ekscitacije nad inhibitornim procesima, a homocistein tiolakton, kao ekscitatorna supstanca ima prokonvulzivno i neurotoksično dejstvo. Međutim, rezultati novijih studija pokazuju da REM deprivacija snižava nivo homocisteina u plazmi kako adultnih, tako i juvenilnih pacova (Oliveira et al., 2002; Andersen et al., 2004). Ovakvi rezultati su još više aktuelizovali pitanje odnosa homocisteina i njegovih metabolita u epileptogenezi.

1.6. Fizička aktivnost i epilepsije

Pored kardioprotektivnog efekta, redovna fizička aktivnost prouzrokuje brojne pozitivne uticaje na imuni sistem, tip II diabetes, stres i osteomuskularni sistem (Hu et al., 2001). Učestalo i periodično vežbanje pomaže u prevenciji brojnih hroničnih oboljenja i stanja kao što su arterijska hipertenzija, gojaznost, depresija i stres (Wong et al., 2006; Sperling et al., 2008). Sem toga, učestovanje u sportskim aktivnostima može dovesti do socijalne integracije i povećanja samopouzdanja, za koje je dokazano da je u direktnoj vezi sa kako sa fizičkim izgledom, tako i sa ličnim stavom o sopstvenoj telesnoj kompoziciji (McEwan et al., 2004), što zajedno može da utiče na kvalitet života pacijenata od različitih psihosomatskih oboljenja (Fountain et al., 2003).

Snižen kvalitet života kod pacijenata sa epilepsijom rezultat je restrikcija i ograničenja koja su vezana za samu bolest, ali i mišljenja i stavova okoline prema bolesniku, jer je epilepsija praćena velikim predrasudama i stigmatizacijom. Nažalost, osobe sa epilepsijom su ranije bile obeshrabrivane da učestvuju u bilo kakvoj fizičkoj aktivnosti i sportu, zbog straha od povećanja učestalosti napada (Arida et al., 2008). To za konsekvencu često ima potpunu socijalnu izolaciju pojedine dece i adolescenata sa epilepsijom (Fountain et al., 2003). Odbojnost obolele populacije prema fizičkoj aktivnosti na žalost i dalje perzistira, iako u savremenoj medicinskoj doktrini postepeno dolazi do promene u ovom stavu. Uprkos tome što danas postoje preporuke za bavljenje sportom, osobe sa epilepsijom su i dalje daleko manje aktivne nego opšta populacija (Arida et al., 2004).

Kad je u pitanju sam odnos fizičke aktivnosti i epilepsije, stavovi istraživača su kontradiktorni, i dok jedni posebno naglašavaju protektivnu ulogu fizičke aktivnosti, drugi ističu da ona u pojedinim slučajevima može da izazove i povećanje epileptiformne aktivnosti sa manifestacijama na EEG-u.

1.6.1. Istorijski aspekti odnosa fizičke aktivnosti i epilepsije

Osobe sa epilepsijom su ranije bile obeshrabrivane da učestvuju u bilo kakvoj fizičkoj aktivnosti i sportu, zbog straha od indukcije napada ili povećanja njihove učestalosti usled paroksizmalne prirode epileptičnih napada i njihovog dramatičnog toka. Glavna pitanja koja su se postavljala pred medicinsku praksu bila su da li osobe sa epilepsijom treba da se bave nekim i kojim oblikom fizičke aktivnosti i kakve preporuke da im se daju po tom pitanju. Dugo su lekari svojim pacijentima savetovali uzdržavanje od bavljenja fizičkom aktivnošću.

Godine 1968 Američka Medicinska Asocijacija (AMA) je izdala preporuku da treba limitirati kontaktne sportove i fizičku aktivnost kod pacijenata kod kojih nije postignuta zadovoljavajuća kontrola napada primenom dostupne medikamentne terapije. Od tada se ove preporuke stalno revidiraju, kako od strane AMA tako i od strane drugih regulatornih tela, kao što je Američko Udruženje Pedijatara. Poslednja preporuka doneta je od strane Međunarodne lige za borbu protiv epilepsije (ILAE) 1997. po kojoj se limitira učešće pacijenata sa epilepsijom u skuba ronjenju. Preovladava mišljenje da ovi pacijenti neće biti podložniji povredama u drugim sportovima više nego drugi sportisti (Wirrell et al., 2006).

Dok su ove preporuke imale za cilj da zaštite pacijente sa epilepsijom, za to vreme svi pozitivni efekti fizičke aktivnosti bili su im nedostupni (Fountain et al., 2003). Ovo je od posebnog značaja za pedijatrijsku populaciju pacijenata kod kojih fizička aktivnost ima velikog značaja na sveukupni psihosocijalni razvoj.

1.6.2. Fizička aktivnost i epilepsije kod ljudi

Do sada su u ispitivanjima uloge fizičke aktivnosti kod pacijenata sa epilepsijom uglavnom korišćena dva metodološka pristupa. Prva od ovih metoda zasniva se na korišćenju standardnih upitnika koji sadrže pitanja o nivou i vrsti fizičke aktivnosti pacijenata sa epilepsijom. Eksperimentalni pristupi u ovom slučaju variraju u zavisnosti od veličine obuhvaćene populacije, kontrolnih grupa i

samih pitanja unutar upitnika. Ukoliko se studija zasniva na većem uzorku, to omogućava bolje sagledavanje informacija o vrsti i nivou fizičke aktivnosti, ali se javlja problem sa dobijanjem podataka o samim karakteristikama i učestalosti napada. Obrnuto je u slučaju manjeg uzorka. Rezultati ovih studija doveli su do različitih zaključaka. Naime, studije koje su bazirane na većem uzorku pokazuju da osobe sa epilepsijom nisu više sedentarne nego opšta populacija (Ablah et al., 2009; Elliott et al., 2005; Gordon et al., 2010). Međutim, ono što su ove studije pokazale, jeste razlika u vrsti fizičke aktivnosti koja je zastupljena kod pacijenata sa epilepsijom u odnosu na opštu populaciju. Naime, u svim navedenim studijama pokazano je da pacijenti sa epilepsijom kao dominantnu vrstu fizičke aktivnosti navode šetnju. U vezi sa ovim treba naglasiti da pacijenti sa epilepsijom nemaju pravo na vozačku dozvolu (Gordon et al., 2010).

Sa druge strane, studije bazirane na manjem uzorku pokazale su drugačije rezultate i pokazuju da pacijenti sa epilepsijom vode više sedentaran način života (Arida et al., 1998; Bjorholt et al., 1990; Wong and Wirrell, 2006). Naime, utvrđeno je da su pacijenti sa epilepsijom manje fizički aktivni, imaju veći indeks telesne mase i smanjene kardiopulmonalne kapacitete. Međutim, studija koju su sproveli Nakken i saradnici u Norveškoj pokazala je da nema razlike u nivou fizičke aktivnosti između opšte populacije i populacije pacijenata sa epilepsijom (Nakken et al., 1999). Uočene razlike između studija mogu biti posledica razlika u veličini uzorka, različitih pitanja i sl.

Prve preporuke od strane AMA bile su zasnovane na mišljenju da fizička aktivnost i vežbanje mogu indukovati epileptične napade per se. Postoje i studije koje su pružile dokaze za ovakvo mišljenje (Ogunyemi et al., 1988). Takođe i neke genetičke distonije mogu imati konvulzivne aspekte tokom fizičke aktivnosti (Munchau et al., 2000) Svakako, nameće se pitanje da li su opservirani efekti rezultat fizičkog napora ili sekundarna posledica stresa, hipoksije i hipertermije.

Određene studije na pacijentima su pružile dokaze da pacijenti koji treniraju ili neće imati promenu učestalosti napada ili će ona biti manja (Eriksen et al., 1994; Nakken et al., 1990). Skorašnja studija Arida i saradnici (Arida et al.,

2010) pokazala je da pacijenti imaju smanjenu epileptiformnu aktivnost u EEG-u tokom fizičke aktivnosti.

1.7. Gasni neurotransmiter azot monoksida (NO) u centralnom nervnom sistemu

Azot monoksid (NO) je visokoreaktivni molekul gasa koga sintetiše porodica enzima prisutnih u većini ćelija u organizmu. Ubikvitarno prisustvo NO-a ukazuje na širok dijapazon njegovih uloga u fiziološkim procesima. Zbog visoke reaktivnosti sa proteinima, može biti uključen u brojne patofiziološke procese. Značaj NO u mozgu determinisan je kako njegovim specifičnim fiziološkim ulogama u neuronima, gliji i vaskularnom tkivu, tako i učešćem u neurodegenerativnim bolestima, što otvara mogućnost farmakološke terapije ciljajući komponente NO metaboličkih puteva.

1.7.1. Sinteza NO

NO nastaje iz aminokiseline L – arginina pod katalitičkim dejstvom grupe enzima označenih kao NO sintaze - *NOS*. Poznata su četiri člana porodice NOS: neuronska - *nNOS*; endotelna - *eNOS*; inducibilna - *iNOS* i mitohondrijalna - *mtNOS*. Na unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani prisutna je *mtNOS* izoforma *nNOS* (Elfering et al., 2002). Sve NO sintaze dele 50-60% zajedničkih sekvenci (Lamas et al., 1992).

Ca^{2+} -kalmodulin zavisni enzimi, konstantno eksprimirani u ćelijama sisara su *nNOS* i *eNOS* (Mungrue et al., 2003) i generišu porast nivoa NO koji traje nekoliko minuta. Ca^{2+} - kalmodulin nezavisan enzim je *iNOS* čija regulacija zavisi od *de novo* sinteze (Ebadi and Sharma, 2003). Imunološka ili inflamatorna stimulacija u makrofagima, astrocitima, mikrogliji i drugim ćelijama koje proizvode visoke količine NO u trajanju od nekoliko sati ili dana dovode do ekspresije *iNOS*.

Svaka NOS se sastoji od C-terminalnog reduktaznog domena i N-terminalnog oksigenaznog domena koji čine aktivno mesto enzima (Hemmens and Mayer, 1998). Katalitička aktivnost NOS zahteva prisustvo kofaktora: NADPH, BH₄, FAD, FMN, O₂ i protoporfirina IX (Stuehr, 1999).

Konstitutivne izoforme NOS su odgovorne za sintezu fizioloških nivoa NO (Bredt and Snyder, 1990), dok iNOS proizvodi visoke nivoe NO u dužem vremenskom periodu (Aktan, 2004). Sve tri izoforme su eksprimirane u različitim ćelijama mozga i mogu uticati na moždane funkcije. Neuronima proizvode NO uglavnom preko aktivacije nNOS (Knowles and Moncada, 1994), koja je pronađena u cerebralnom korteksu, hipokampusu, corpusu striatumu, cerebelumu, kao i nekim ganglionima autonomnog nervnog sistema (Zhou and Zhu, 2009). Pronađena je povećana ekspresija iNOS u mozgu kod osoba sa epilepsijom, kao i kod nekih spontano epileptičnih miševa (Gonzalez - Hernandez et al., 2000; Murashima, 2000).

Farmakološka modulacija nivoa NO može se postići primenom NO donora, neselektivnih i selektivnih NOS inhibitora. Među donorima, L-arginin, kao prekursor, i natrijum nitroprusid (SNP) se najčešće upotrebljavaju u eksperimentalnom radu. N-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) je neselektivni NOS inhibitor. Sa druge strane, 7-nitroindazol i aminogvanidin su selektivni inhibitori nNOS, odnosno iNOS i vrlo često se koriste u cilju ispitivanja uloge nNOS i iNOS u različitim funkcijama mozga (Babbedge et al., 1993; Griffiths et al., 1993).

1.7.2. Efekti NO na nivou ćelije – aktivacija gvanilat ciklaze

Glavni celularni NO signalni put je aktivacija gvanilat ciklaze (GC) sa posledičnom produkcijom gvanozin-3'-5'-monofosfata (cGMP) (Ignaro et al., 1991) i fosforilacija proteina, ali NO ostvaruje i druge efekte nezavisno od aktivacije GC.

NO reaguje sa hem grupom GC-e preko gvožđa lociranog u njenom centru, što dovodi do konformacionih promena i aktivacije katalize gvanozin-trifosfata, (GTP) u cGMP. cGMP je sekundarni glasnik koji aktivira protein kinaze (PK): 1) PKG I, koja je solubilna i vrlo eksprimirana u cerebelarnim Purkinjije ćelijama i

glatkim mišićnim ćelijama; 2) PKG II, koja je za membranu vezani protein opisan u mozgu, crevima i bubrežima. Jedna od glavnih uloga PKG I je kontrola intracelularnog kalcijuma, dok PKG II kontroliše fluks anjona, kao što su hloridi (Lau et al., 2003).

Sem toga, cGMP moduliše aktivnost i određenih fosfodiesteraza cikličnih nukleotida (PDE). cGMP – posredovana inhibicija PDE III povećava intracelularne nivoe cAMP u srcu sisara i posledično aktivira proteine u cAMP –zavisnom putu.

1.7.3. Fiziološki efekti NO u nervnom sistemu – molekularni mehanizmi

NO je neurotransmiter i/ili neuromodulator kako u centralnom (CNS), tako i u perifernom nervnom sistemu, uglavnom preko cGMP-zavisnih mehanizama (Lewko and Stepinski, 2002). Da postoje uloge NO-a u mozgu znalo se i pre nego što je otkrivena njegova hemijska priroda. Garthwaite et al. (1988) su bili prvi koji su pokazali da aktivacija NMDA receptora rezultira oslobađanjem NO. Aktivacija nNOS u CNS-u je povezana sa percepcijom bola, naročito na nivou kičmene moždine, a takođe je poznata aktivnost nNOS u kontroli spavanja, apetita, termoregulaciji, neuronskoj ontogenezi i sinaptičkoj plastičnosti (Monti and Jantos, 2004; Cheng et al., 2003).

Maksimalna aktivacija nNOS nastaje 5-15 min nakon NMDA receptorskog vezivanja sa povratkom na bazalne vrednosti nakon 60 min, prevažodno zbog degradacije supstrata (Do et al., 2002). Ovaj proces opisan je u nekoliko moždanih regiona (hipokampus, striatum, hipotalamus i locus ceruleus) (Trabace et al., 2004). Opisan je odnos između NO i glutamata kao obrnuto proporcionalan. *In vivo* i *in vitro* studijama sa NO donorima, NOS inhibitorima i antagonistima glutamatskih receptora pokazano je da NO povećava oslobađanje glutamata u nekoliko regiona mozga i kičmene moždine (Prast and Philippu, 1998). Ovaj retrogradni mehanizam značajan je za procese memorije. Dugotrajna potencijacija (LTP) je pretpostavljeni glavni mehanizam za čuvanje informacija. Da bi se održala postsinaptička aktivacija, retrogradna komunikacija sa presinaptičkom

komponentom mora postojati. Sugerisano je da NO, kao retrogradni molekul, aktivira oslobađanje glutamata preko cGMP-zavisnog puta.

Nivo NO utiče na oslobađanje glutamata, tako da kada je koncentracija NO niska postoji smanjenje oslobađanja glutamata uprkos povišenim nivoima cGMP-a. Povećana koncentracija NO povećava nivo cGMP-a, te se inhibitorni efekat na oslobađanje glutamata obrne, pokazujući da cGMP pokazuje bifazične efekte (Sequeira et al., 1997).

Poznato je da aktivacija NMDA receptora dovodi do aktivacije nNOS, koja može imati protektivnu ulogu blokiranjem caspaza (Khaldi et al., 2002). Izgleda da je S-nitrozilacija NMDA receptora inhibitorni mehanizam kojim je regulisana aktivnost NMDA receptora i kojim su prevenirani toksični efekti. Međutim, Dawson et al., (1991) su sugerisali da je NO aktivator NMDA-zavisne neurotoksičnosti.

Holinergička transmisija u ventralnom strijatumu modulirana je endogenim NO. Izgleda da NO ne dovodi direktno do lučenja acetilholina iz holinergičkih neurona već stimulacijom susednih glutamatergičkih neurona (Prast and Philippu, 1998).

Efekat NO na oslobađanje GABA-e i glutamata je bifazičan i zavisi od koncentracije NO. Bazalni nivoi NO indukuju redukciju GABA-e, dok visoke koncentracije NO povećavaju oslobađanje GABA-e (Getting et al., 1996). NO izazvano oslobađanje GABA-e odvija se preko dva različita mehanizma: Ca²⁺-zavisnim procesom i Na⁺-zavisnim nosačem-moduliranim GABA prenosom (Ohkuma et al., 1996).

NMDA receptori i NO su odgovorni za modulaciju oslobađanja noradrenalina. Donori NO stimulišu otpuštanje noradrenalina u hipokampusu, a NO inhibitori smanjuju nivo NO (Feldman and Weidenfeld, 2004). Druge studije pokazale su da su tiolna jedinjenja, kao što je L-cistein, neophodna za oslobađanje neurotransmitera koje je indukovano NO-om. Kolo et al. (2004) i Shelkownikov et al. (2004) su ukazali na vazodilatatorna svojstva NO i ONOO⁻ koje nastaje direktnom reakcijom sa noradrenalinom kada deaktiviraju.

1.7.4. Uloga NO u epileptogenezi

Sve je više dokaza koji upućuju da NO, pored fizioloških uloga učestvuje i u patogenezi brojnih neuroloških poremećaja uključujući epilepsiju. Vrlo je kontradiktorna uloga NO u nastanku i propagaciji epilepsije, jer postoje dokazi za njegovo prokonvulzivno i antikonvulzivno dejstvo. Naime, na više eksperimentalnih modela epilepsije pokazano je antikonvulzivno dejstvo usled povećanih koncentracija NO. S druge strane postoje dokazi i za prokonvulzivno dejstvo NO.

Pokazano je da NO, na modelu epilepsije izazvane lindanom ima prokonvulzivno dejstvo, za razliku od rezultata drugih autora koji su kontradiktorni, a dobijeni su na različitim modelima epilepsije (Hrncic et al., 2011).

Prokonvulzivno dejstvo NO dokazano je na modelima epilepsije izazvane kainatnom kiselinom (Mulsch et al., 1994), organofosfatima (Kim et al., 1997) i pilokarpinom.

Antikonvulzivni efekti pokazani su na modelima limbičke epilepsije (Rondouin G et al., 1993), epilepsije izazvane amigdala kindling-om (Rondouin et al., 1992) i kvinolinskom kiselinom (Haberny et al., 1992).

Poseban paradoks predstavlja NO kao prokonvulzivni (Osonoe et al., 1994) tako i antikonvulzivni agent (Del Bel et al., 1997) na modelu epilepsije izazvane pentilenetetrazolom.

Navedene razlike u efektima dejstva NO, izrazito liposolubilnog molekula, mogu biti objašnjene širokim spektrom molekula sa kojima može da reaguje, zatim razlikama u mehanizmima nastanka ovih konvulzija, starošću i vrstom životinja i na kraju specifičnostima samog modela.

Različiti mehanizmi mogu biti uključeni u prokonvulzivno dejstvo NO na lindanskom modelu epilepsije. Usled i.p. administriranja L-arginina, povećava se endogena sinteza i koncentracija NO koja aktivira solubilne guanilil ciklaze (sGC) i značajno povećava ciklični guanozin monofosfat (cGMP-a) koji u funkciji sekundarnog glasnika stimuliše protein kinazu G (Lucas et al., 2000), fosforiliše

GABA_A receptor i time ga inaktivira (Robello et al., 1996). Jedan od glavnih mehanizama epileptogenog dejstva lindana predstavlja upravo inaktivacija GABA_A-receptora, te je prokonvulzantni efekat NO moguće objasniti njegovom kooperacijom sa lindanom pri inaktivaciji GABA_A-receptora.

Treba napomenuti da cGMP deluje i na brojne cGMP zavisne kanale i na cGMP zavisne fosfodiesteraze. Značajno je istaći da lindan izaziva povećanje intracelularnog Ca²⁺ preko rianodinskih receptora (Rosa et al., 1997; Buck et al., 1999) na koje takođe deluje i NO (Willmott et al., 2000; Horn et al., 2002), čime može potencirati dejstvo lindana. Dokazano je da u epilepsiji izazvanoj lindanom učestvuju ekscitatorne amino kiseline. NO povećava oslobađanje glutamata, glavnog ekscitatornog neurotransmitera (Marcoli et al 2006), te je moguć signergistički efekat NO-a i lindana i na ovom nivou.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije bili su sledeći:

1. Ispitati efekte hronične hipermetioninske dijeta u trajanju od 30 dana na:
 - a. epileptičnu aktivnost homocistein tiolaktona,
 - b. ponašanje povezano sa anksioznošću,
 - c. oksidativni stres u strukturama mozga i srcu pacova,
 - d. aktivnost enzima Na⁺/K⁺-ATPaze, E-NTPDaze i acetilholinesteraze u mozgu,
 - e. ekspresiju ćelijskih markera u mozgu
 - f. postojanje morfoloških promena u mozgu, jetri, srcu i zidu aorte

2. Registrovati posledice selektivne deprivacije REM spavanja na bihevioralne i EEG karakteristike epilepsije izazvane homocistein tiolaktonom,

3. Ispitati epileptogenu aktivnost posle akutne fizičke aktivnosti na tredmilu kod pacova tretiranih homocistein tiolaktonom,

4. Ispitati epileptogenu aktivnost posle hronične fizičke aktivnosti na tredmilu kod pacova tretiranih homocistein tiolaktonom i ulogu oksidativnog stresa u efektima ove aktivnosti,

5. Primenom 7 nitroindazola, ispitati ulogu nNOS u mehanizmima epileptogenog dejstva homocistein tiolaktona,

6. Primenom aminogvanidina, ispitati ulogu iNOS u mehanizmima epileptogenog dejstva homocistein tiolaktona.

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

U eksperimentima su korišćeni mužjaci pacova soja Wistar albino, mase oko 110 g i starosti 25-30 dana na početku eksperimenta. Životinje su nabavljene iz Vivarijuma Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Pacovi su bili čuvani u pleksiglas-transparentnim kavezima (55x35x30 cm) obloženim šuškom, sa hranom i vodom bez ograničenja i konstantnim ambijentalnim uslovima. Ambijentalna temperatura je održavana na 22 ± 2 °C; vlažnost vazduha na 55 ± 5 %, dok je ciklusom svetlo-tama bio podešen na 12 h sa početkom svetlog perioda u 08:00 h. Period aklimatizacije trajao je 7 dana.

U eksperimentalnom radu u potpunosti je poštovan Etički kodeks naučnoistraživačkog rada Medicinskog fakulteta u Beogradu (Dozvola Etičkog komiteta za rad sa eksperimentalnim životinjama br 1371/2 i Rešenje nadležnog Ministarstva Republike Srbije).

3.2. Eksperimentalni protokol

3.2.1. Hipermetioninska dijeta

Tokom 30 dana hrana obogaćena metioninom (7,7 g/kg) ili standardna hrana (Mucedola SLR, Milano, Italija) bila je dostupna pacovima bez ograničenja. Životinje su nasumično raspoređene u kontrolnu i eksperimentalnu grupu. Tokom narednih 30 dana životinje iz *kontrolne grupe* dobijale su standardnu hranu, a životinje iz *eksperimentalne grupe* hranu obogaćenu metioninom (7,7 g/kg, sadržaj metionina duplo veći nego u standardnoj hrani).

Pratili su se sledeći parametri:

-dnevni unos hrane i telesna masa pacova

-ponašanje povezano sa anksioznošću upotrebom testa otvorenog polja i testa svetlost-tama.

-parametri konvulzivnog ponašanja i EEG aktivnost životinja (n=8 po grupi) kojima je tridesetprvog dana administriran D,L homocistein tiolakton u dozi od 5,5 mmol/kg.

Specijalnom giljotinom za pacove 31. dana dijete životinje su žrtvovane (n=16 u grupi) i uzorkovali su se mozak, srce, jetra, aorta i serum pacova.

Određivan je nivo ukupnog homocisteina u serumu, određeni indikatori oksidativnog stresa u strukturama mozga i srcu pacova, aktivnost enzima Na⁺/K⁺-ATPaze, E-NTPDaze i acetilholinesteraze u mozgu, kao i ekspresija markera astrocita, oligodendrocita i neurona u mozgu.

Postojanje morfoloških promena utvrđeno je na histološkim preparatima ovih organa.

3.2.2. Selektivna deprivacija REM spavanja

Selektivna deprivacija REM spavanja realizovana je modifikovanom metodom platforme po Šušić i Marković (1993).

Životinje su boravile na maloj platformi (dijametar 6,0 cm, odnos između površine platforme i mase životinje iznosio je oko 14 cm²/100 g) okruženoj vodom čiji je nivo 1 cm ispod vrha platforme. Kada životinja uđe u REM fazu spavanja nastupa atonija, sledstveni pad u vodu što rezultira buđenjem životinje, tako da je na ovoj platformi bilo moguće sporotalasno, ali ne i paradoksalno spavanje (deprivacija REM spavanja, grupa S).

Korespondentnu stres kontrolnu grupu predstavljale su životinje na velikoj platformi (dijametar 15,0 cm, odnos površina platforme/masa životinje iznosio je oko 60 cm²/100 g) okruženoj vodom, na kojoj je bilo moguće i sporotalasno i REM spavanje (grupa L).

Svi ostali eksperimentalni uslovi su bili isti za životinje sa male i velike platforme. Voda iz bazena je menjana jednom dnevno, a za to vreme životinje su boravile u zasebnim kavezima uz manuelno održavanje u budnom stanju.

Suvu kontrolu činile su životinje čuvane pojedinačno u transparentnim kavezima (55x35x30 cm) sa prostirkom od drvenih strugotina (grupa C) .

Posle selektivne deprivacije REM spavanja u trajanju od 72 h životinje iz C, L i S grupe su prenete u suve kaveze u kojima im je administriran:

1) D,L-homocistein tiolakton (5,5 mmol/kg) i formirane su eksperimentalne grupe CH, LH i SH (n=8 po grupi) ili

2) fiziološki rastvor i formirane su korespondentne kontrolne grupu Cc, Lc i Sc (n=6 po grupi).

Registrovani su parametri konvulzivnog ponašanja i analizirana je EEG aktivnost životinja.

3.2.3. Akutna fizička aktivnost na tredmilu

U eksperimentu je korišćen tredmil aparat za male eksperimentalne životinje (NeuroSciLaBG-Treadmill, Elunit, Beograd, Srbija) koga čini pokretna traka za trčanje sa 4 odvojena mesta. Na startnom kraju trake se nalazi električna (negativna) stimulacija (elektrošok malog intenziteta od 0,2 mA) za životinje koje se ne kreću. Pozitivno potkrepljenje ostvareno je kao zatamnjenje prostora na suprotnom kraju. Životinja, izbegavajući stimulaciju, trči na traci ka suprotnoj, zatamnjenoj strani. Programom se unapred definiše protokol rada trake, kao i nagib trake koji je sve vreme trajanja eksperimenta 0°.

Sve životinje su adaptirane na tredmil i učene da trče na traci tokom 3 uzastopna dana u trajanju od 10 min, pri brzini kretanja trake od 5-10 m/min. Prema ponašanju na traci tredmila izvršena je klasifikacija (5 klasa), a onda i odabir životinja za eksperiment:

1 - odbija da trči;

2 - trči ispod proseka (zaustavlja se, pogrešan pravac);

3 - prosečan trkač;

4 - nadprosečan trkač (povremeni padovi);

5 - dobar trkač (trči u prednjem delu trake) (Dishman et al., 1988).

Životinje koje su pripadale 3 - 5 klasi su uključene u eksperiment dok one koje su odbijale da trče ili trče ispod proseka su isključene iz eksperimenta.

Za ispitivanje efekata akutne fizičke aktivnosti (akutni trening) životinje su nasumično raspoređene u dve grupe:

1) akutno trenirana grupa, n=8 (jednokratno treniranje na tredmilu u trajanju 30 min pri brzini trake od 25 m/min).

2) sedentarna grupa, n=10 (životinje koje isto vreme provode na tredmilu, pri brzini kretanja trake od 0 m/min).

Administracija D,L homocistein tiolaktona (subkonvulzivna doza 5,5 mmol/kg) izvršen je neposredno po završetku treninga životinjama iz ovih grupa.

Registrovali smo parametre konvulzivnog ponašanja životinja, kao i njihovu EEG aktivnost.

3.2.4. Hronična fizička aktivnost na tredmilu

U eksperimentu je korišćen opisani tredmil aparat za male eksperimentalne životinje. Primenjen je isti protokol adaptacije životinja na tredmil i procena ponašanja na traci tredmila (videti poglavlje 3.2.3.).

Za ispitivanje efekata hronične fizičke aktivnosti životinje su nasumično raspoređene u sledeće grupe (n=8):

- 1) trenirana kontrolna
- 2) sedentarna kontrolna
- 3) trenirana + HCT
- 4) sedentarna + HCT

Životinje iz treniranih grupa bile su podvrgnute protokolu treniranja od 30 min dnevno, tokom 30 uzastopnih dana, pri brzini kretanja trake od 20 m/min (hronični trening). Ravnotežna tačka u kojoj je brzina proizvodnje laktata jednaka brzini njegovog uklanjanja, tj. maksimalna stabilizacija laktata u krvi (Maximal

Lactate Steady State - MLSS) se ostvaruje pri brzini trake od 20 m/min, te se iz tih razloga trening pri ovoj brzini smatra aerobnim (Manchado et al., 2005).

Grupe sedentarnih životinja formirane su na prethodno opisani način (videti poglavlje 3.2.3.).

Tridesetprvog dana, tj. 24 h po završetku opisanog protokola životinjama iz HCT grupa administriran je D,L homocistein tiolaktona u pojedinačnoj konvulzivnoj dozi od 8,0 mmol/kg po grupi, dok je životinjama iz kontrolnih grupa umesto D,L homocistein tiolaktona administriran fiziološki rastvor.

Registrovani su parametri konvulzivnog ponašanja životinja, kao i njihova EEG aktivnost. Određeni su pokazatelji oksidativnog stresa u hipokampusu životinja.

3.2.5. Selektivna inhibicija nNOS

Za ispitivanje efekata selektivne inhibicije nNOS korišćen je 7 - nitroindazol u dozama od 25, 50 i 75 mg/kg pola sata pre administracije D,L homocistein tiolaktona (5,5 mmol/kg). Životinje su nasumično raspoređene u sledeće grupe:

- 1) kontrolna (C, 0,9% NaCl, n=6);
- 2) 7 - nitroindazol (75 mg/kg, 7NI₇₅, n=6);
- 3) D,L homocistein tiolakton 5,5 mmol/kg (HT, n=9) i
- 4) 7 - nitroindazol (25, 50 i 75 mg/kg) 30 min pre HT (7NI₂₅HT, 7NI₅₀HT i 7NI₇₅HT, n=8 po grupi).

Registrovani su parametri konvulzivnog ponašanja i analizirana je EEG aktivnost.

3.2.6. Selektivna inhibicija iNOS

Za ispitivanje efekata selektivne inhibicije iNOS korišćen je aminogvanidin u dozama od 50, 75 i 100 mg/kg pola sata pre administracije D,L homocistein tiolaktona (5,5 mmol/kg). Životinje su nasumično raspoređene u sledeće grupe:

- 1) kontrolna (C, 0,9% NaCl, n=6);
- 2) aminogvanidin (100 mg/kg, AG₁₀₀, n=6);
- 3) D,L homocistein tiolakton 5,5 mmol/kg (HT, n=9) i
- 4) aminogvanidin (50, 75 i 100 mg/kg) 30 min pre HT (AG₅₀HT, AG₇₅HT i AG₁₀₀HT, n=8 po grupi).

Registrovani su parametri konvulzivnog ponašanja i analizirana je EEG aktivnost.

3.3. Metode

3.3.1. Registracija parametara konvulzivnog ponašanja

Tokom 90 min od administracije D,L-homocistein tiolaktona opservirani su bihejvioralni parametri konvulzivnih napada:

- *Incidenca napada* definisana kao broj životinja koje bar jednom unutar opservacionog perioda konvulziraju u odnosu na ukupan broj životinja u grupi i izražena je u procentima (%).
- *latentni period* konvulzivnog napada definisan kao vreme do prve konvulzivne epizode. Za životinje koje ne konvulziraju smatrano je da imaju latentni period 90 min.
- *intenzitet konvulzivne epizode* i
- *broj konvulzivnih epizoda po pacovu.*

Za procenu intenziteta konvulzivnih epizoda korišćena je modifikovana deskriptivna skala po Stanojlović et al. (2008) sa gradusima od 0 do 4 koji su definisani shodno vrsti odgovora na sledeći način:

- *gradus 0* - bez konvulzivnog odgovora;
- *gradus 1* - klimanje glavom i grčeviti trzaji donje vilice,
- *gradus 2* - mioklonički trzaji celog tela (reakcija vruće ploče), klonus prednjih i propinjanje na zadnje ekstremitete (pozicija kengura);
- *gradus 3* – progresija u generalizovane kloničke konvulzije praćene toničkom ekstenzijom prednjih i zadnjih ekstremiteta i repa;
- *gradus 4* – status epilepticus.

Letalitet je opserviran posle 90 min i 24 h od administracije D,L homocistein tiolaktona u određenim grupama.

3.3.2. Impantacija elektroda, registracija i analiza EEG aktivnosti

3.3.2.1. Metoda stereotakse

U stereotaksičnom ramu (David Kopff, Tujung, SAD) pozlaćene elektrode za hronično, bipolarno registrovanje EEG-a su implantirane u aseptičnim uslovima prethodno anestetisanim životinjama (nesdonal, 40 mg/kg) prema definisanim koordinatama iz stereološkog atlasa (Paxinos and Watson, 1982) i to iznad:

- frontalnog (2 mm ispred bregme i 2mm lateralno od srednje linije),
- parijetalnog (2 mm ispred lambde i 2mm lateralno od srednje linije) i
- okcipitalnog (2 mm iza lambde) korteksa.

Period oporavka posle operacije trajao je 7 dana.

3.3.2.2. Digitalna akvizicija EEG signala

Korišćen je osmokanalni EEG aparat (RIZ, Zagreb, Hrvatska), čiji izlazni stepen je modifikovan, te su analogni izlazni signali dovedeni na ulazno kolo 8-

kanalne 16-bitne analogno - digitalne (AD) kartice SCB-68 (National Instruments Co, Austin, SAD) koja je instalirana u računar.

Za digitalnu akviziciju i obradu signala EEG-a u našoj Laboratoriji razvijen je odgovarajući originalni programski paket (NeuroSciLaBG, Beograd, Srbija) pomoću koga se signali EEG –a trajno i kontinuirano beleže na hard disku računara.

Vrednosti parametara akvizicije bile su podešene tako da je frekvencija smplovanja bila 512 Hz, granične frekvencije filtriranja signala su bile 0,3 i 80 Hz, dok je ambijetalni električni fon uklonjen pomoću noć filtera od 50 Hz.

3.3.2.3. Analiza EEG-a

Registrovani EEG signali analizirani su najpre vizuelno, a zatim i pomoću pomenutog softvera (NeuroSciLaBG). Ekstrahovane su karakteristične EEG epohe u trajanju od 12 s i izračunate njihove spektralne gustine snage i dominantne frekvence. Spektralna gustina snage reprezentativnih epoha dobijena je brzom Fourier-ovom analizom (FFT) i izražena u funkciji frekvencije ($\mu\text{V}^2/\text{Hz}$).

Određivani su *broj i trajanje* epileptiformnih promena i njihova spektralna gustina snage.

Epileptiformne promene karakteristične za epileptičnu aktivnost izazvanu homocistein tiolaktonom su šiljak-talas pražnjenja (SWD, Stanojlović et al, 2009). Kriterijumi za analizu SWD-a definisani su na sledeći način: paroksizmalno pražnjenje visoko-frekventnih, visoko voltažnih šiljak-talas kompleksa trajanja > 1 s, amplitude dva puta veće od bazalne aktivnosti, sa dominacijom, spektralne gustine snage u opsegu od 5 – 7 Hz, koje su praćene karakterističnim promenama u ponašanju (minimalni mioklonički trzaji facijalne muskulature i odsustvo odgovora na taktilne i auditivne draži).

3.3.3. Test otvorenog polja (eng. open field test)

Za monitoring i registrovanje horizontalne (pređeni put i vreme ambulatornog kretanja) i vertikalne (broj propinjanja na zadnje ekstremitete)

lokomotorne aktivnosti eksperimentalnih životinja korišćen je automatizovani sistem opremljen infracrvenim senzorima (Experimetria Ltd, Budimpešta, Mađarska) sa pripadajućim programskim paketom (Conducta 1.0).

Test arenu čine zidovi crne boje, visine 40 cm koji okružuju zvučno - izolovano polje (48x48 cm) sa crvenim osvetljenjem od 12 luksa. Životinja u središtu opisanog polja, slobodno istražuje prostor tokom 20 minuta, pri čemu se registruje:

- *pređeni put (cm) i vreme (s) ambulatornog kretanja*, kao i
- *broj propinjanja na zadnje ekstremitete*.

U cilju procene prostorne distribucije aktivnosti, celo polje je virtuelno softverski podeljeno na 16 kvadrata od kojih su 4 središnja površine 24x24 cm označena kao centar polja. Uglovi i zidovi, kao i periferne zone koje čine uglovi i zidovi polja, definisani su shodno shemi prikazanoj na slici. Kao pokazatelji ponašanja povezanog sa anksioznošću određivani su:

- *vreme koje životinja provede u centru* i
- *indeks tigmotaksije*.

Indeks tigmotaksije računat je kao odnos pređenog puta u perifernim zonama i ukupnog pređenog puta tokom ambulatornog kretanja i izražen je u procentima (Simon et al., 1994).

3.3.4. Test svetlo- tama (eng. light-dark test)

Test arenu čine dva komportmana: svetli i tamni. Svetli deo test kutije (27x27x27cm, sve bele površine) je sa tamnim delom (27x18x27cm, sve crne površine) povezan otvorom dimenzija 8x8 cm (Elunit, Beograd, Srbija). Životinja se spušta u centar svetlog dela i narednih 5 min video kamerom (Logitech C210, SAD) snima njeno ponašanje. Kao pokazatelj ankisoznosti u ovom testu određivano je:

- *ukupno vreme koje životinja provodi u svetlom delu test kutije*.

3.3.4. Biohemijski parametri

3.3.4.1. Ukupan homocistein u serumu

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

3.3.4.2. Aktivnosti Na⁺/K⁺-ATPaze i E-NTPDaze u mozgu

Nakon žrtvovanja životinja u odgovarajućim grupama izvršena je ekscizija mozga. Izolovanje sinaptičkih plazma membrana (SPM) izvršeno je prema metodi Cohen et al uz modifikacije koje su opisali Towle and Sze (1983).

Ukupna ATPazna aktivnost SPM je određena u standardnom medijumu 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 100 mM NaCl, 20 mM KCl i 5,0 mM MgCl₂ kome je dodato 25 µg SPM proteina. Mešavina je inkubirana 10 min na 37° C. Reakcija je započinjata dodavanjem 2,0 mM ATP do ukupnog volumena od 200 µl, a po isteku 10 min reakcija je prekidata dodavanjem 22 µl rashlađenog 3,0 M HClO₄ i stavljanjem na led. Neorganski fosfat (Pi) koji se oslobadja tokom ATP hidrolize se meri spektrofotometrijski, čitanjem absorbancije na 690 nm.

Aktivnost koja se dobija u odsustvu NaCl i KCl se pripisuje E-NTPDazi. Aktivnost Na⁺/K⁺-ATPaze se izračunava kao razlika ukupne ATPazne aktivnosti (dobijene u prisustvu Na⁺, K⁺ i Mg²⁺ jona) i aktivnosti E-NTPDaze. Rezultati su predstavljaju srednja specifična enzimska aktivnost iz najmanje 5 eksperimenata urađenih u triplikatu. Enzimska aktivnost se izražava kao µM neorganskog fosfata oslobodjenog po mg proteina za 1 čas.

3.3.4.3. Aktivnost acetilholinesteraze (AChE)

Aktivnost AChE je određivan u homogenatu odgovarajućih struktura mozga (korteks, hipokampus, talamus i *nc.caudatus*) i srcu životinja iz odgovarajućih grupa spektrofotometrijski metodom po Ellmanu et al. (1961). Princip ove metode je da acetilholinesteraza razlaže acetilholin jodid čiji se produkt razlaganja vezuje

za DTNB (5,5'-ditiobis-2 nitro benzojeva kiselina), a kao rezultat reakcije nastaje žuto obojeni kompleks. Količina nastalog kompleksa meri se spektrofotometrijski na 412 nm i predstavlja meru aktivnosti acetilholinesteraze.

3.3.4.4. Oksidativni stres

Parametri oksidativnog stresa i antioksidativnih kapaciteta određivani su u strukturama mozga i srcu pacova iz odgovarajućih grupa definisanih eksperimentalnim protokolom (videti poglavlje 3.3.2).

Za izolovanje struktura mozga glave životinja su trenutno zamrzavane u tečnom azotu, a zatim čuvane na -85°C. Moždane strukture i to: korteks, hipokampus, talamus i *nc.caudatus* su preparisani na hladno i homogenizovani u hladnom puferisanom saharoznom medijumu (0,25 M/L saharoze, 10 mmol/K/NaPO₄ pufer pH 7,0 i 1 mmol/L EDTA) nakon čega je izdvojena neprečišćena sinaptozomalna frakcija po metodi Whittaker and Barker (1972). Homogenizacijom usitnjeno tkivo je potom centrifugirano 1000G 15 minuta. Supernatanti su centrifugirani 30 minuta na 20000G. Ovako dobijeni supernatant predstavlja neprečišćenu sinaptozomalnu frakciju koja sadrži membranske vezikule (mikrozome) nastale od glatkog i granulisanog endoplazmatičnog retikuluma, Goldžijevog aparata i plazma membrane kao i sve solubilne komponente citoplazme. Talog je potom resuspendovan u dejonizovanoj vodi i ostavljen 60 minuta na +4°C uz povremeno mešanje. Ovako resuspendovan talog je zatim centrifugiran na 1700G 15 minuta. Dobijeni supernatant predstavlja neprečišćenu mitohondrijalnu frakciju i sadrži mitohondrije, lizosome i peroksizome. Neprečišćena sinaptozomalna frakcija je čuvana na -80 °C.

Nivo lipidne peroksidacije (MDA), aktivnost enzima superoksid dizmutaze (SOD), katalaze (CAT), količina redukovanog glutationa (GSH), aktivnost enzima glutation reduktaze (GR) i glutation peroksidaze (GPx) određeni su spektrofotometrijski u strukturama mozga (korteks, hipokampus, talamus i *nc.caudatus*) pacova, odnosno prema predviđenom protokolu eksperimenta (videti poglavlje 3.2.). U srcu je određen nivo lipidne peroksidacije i aktivnost SOD i CAT.

3.3.4.4.1. Nivo lipidne peroksidacije

Nivo lipidne peroksidacije je određen na osnovu koncentracije malondialdehida (MDA) u sinaptosomalnoj frakciji pomenutih struktura mozga. Naime, tiobarbiturna kiselina nakon stimulacije lipidne peroksidacije reaguje sa MDA oslobođenim iz polinezasićenih masnih kiselina stvarajući obojeni kompleks čija se apsorbanција meri spektrofotometrijski na 533 nm (Rehncrona et al, 1980). Rezultati su izraženi kao nmol MDA po miligramu proteina.

3.3.4.4.2. Aktivnost enzima superoksid dizmutaze (SOD)

Aktivnost SOD je određivana kao procenat inhibicije autooksidacije adrenalina u baznoj sredini (Sun and Zigman, 1978). Aktivnost ukupne SOD određuje se kinetički, kao promena apsorbancije u vremenu (5 min) na talasnoj dužini od 480 nm.

3.3.4.4.3. Aktivnost enzima katalaze (CAT)

Aktivnost CAT je određivana na osnovu stvaranja stabilnih kompleksa vodonik peroksida sa amonijum molibdatom čija je apsorbanција merena spektrofotometrijski na 405 nm (Góth, 1991). Enzimaska aktivnost je izražena u jedinicama po miligramu proteina (U/mg proteina).

Koncentracije proteina su određene metodom po Lowry et al. (1951). Serumski albumin govečeta je korišćen kao standard.

3.3.4.4.3. Sadržaj redukovanog glutationa (GSH)

Sadržaj GSH određivan je spektrofotometrijski upotrebom 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoeve kiseline (DTNB). DTNB reaguje sa alifatičnim tiol jedinjenjima pri pH 8.0 stvarajući p-nitrofenol anjon žute boje (Ellman, 1959). Intenzitet boje se koristi za merenje koncentracije GSH očitavanjem na spektrofotometru pri 412nm.

3.3.4.4.3. Aktivnost enzima glutacion reduktaze (GR)

Određivanje aktivnosti GR vršeno je po metodi Carlberg and Mannervik (1985). Metoda se zasniva na reakciji oksidovanog glutationa sa NADPH u prisustvu GR iz uzorka. Potrošnja NADPH se prati spektrofotometrijski na 340nm i proporcionalna je aktivnosti GR.

3.3.4.4.3. Aktivnost enzima glutation peroksidaze (GPx)

Određivanje aktivnosti GPx vršeno je po metodi koja se zasniva na oksidaciji GSH sa iskorišćavanjem NADPH u reakciji koju katalizuje enzim glutation reduktaza. Meru aktivnosti glutation peroksidaze u kuplovanoj reakciji sa glutation reduktazom, predstavlja promena apsorbancije merena na 340nm kao posledica potrošnje NADPH+H⁺ (Gunzler et al., 1974).

3.3.5.5. Ekspresija markera pojedinih ćelija u mozgu

Ekspresija markera astrocita GFAP (glijalni fibrilarni kiseli protein), oligodendrocita MOG (mijelin oligodendrocitni glikoprotein) i neurona NeuN (neuralni nukleusni antigen) određivana je tehnikom Western blot-a.

Po četiri životinje iz odgovarajućih grupa su žrtvovane, nakon čega su izolovani korteks i hipokampus. Moždane strukture su homogenizovane u puferu za liziranje (50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1% IGEPAL CA-630, 0,25% Na-deoksiholat), koji sadrži proteazne inhibitore (proteaza inhibitor koktel, 100mM PMSF, 200mM Na-ortovanadat i 1M NaF). Nakon centrifugiranja (14000 rpm, 15 minuta na 4°C), odvojeni su supernatanti koji predstavljaju ćelijski lizat. Ukupna koncentracija proteina u homogentu određena je metodom po Bradford-u. Kao standard korišćen je serumski albumin govečeta. Na osnovu utvrđene koncentracije proteina u uzorcima preračunata je zapremina kojoj se dodaje *sample* buffer (Lemli 2x (1m Tris HCl pH6.8, 80% glicerola, 10% SDS, 1% bromfenol plavo) i β-merkaptioetanol) u odnosu 1:1, kako bi u svakom uzorku bilo 50 µg proteina. Ovako pripremljeni uzorci su se kuvali na 100°C tokom 3 minuta, a zatim čuvali u zamrzivaču do daljeg ispitivanja.

Proteini iz uzoraka su razdvojeni na 10% SDS-PAGE (SDS-poliakrilamidnom) gelu elektroforezom, nakon čega je izvršen transfer na nitroceluloznu membranu (Bio-Rad, Hercules, SAD). Membrane su blokirane mlekom (5% mleko u TBS-T puferu) u trajanju od 1h. Nakon blokiranja membrane su inkubirane sa sledećim primarnim antitelima: GFAP (1:2000, zečije poliklonsko, DAKO, Denska), MOG (1:1000, zečje monoklonsko, *Abcam*, UK) i NeuN (1:500, mišje monoklonsko, Chemicon, SAD). Po isteku inkubacije sa primarnim antitelom,

membrane su inkubirane sa odgovarajućim HRP-obeležanim sekundarnim antitelima: anti-mišjim, anti-zečijim ili anti-kozijim antitelom. U foto-komori, rendgen film je bio izložen membrani koja je tretirana sa *Enhanced Chemiluminescence System* i razvijen.

Sve membrane su stripovane (uklonjena su prethodno vezana antitela) i inkubirane su sa anti-aktin antitelom (1:10000, mišije monoklonsko).

Blotovi su skenirani i denzitometrijski analizirani korišćenjem softvera *ImageQuant 5.2*.

3.3.5. Histološka analiza

Srce, aorta, jetra i mozak životinja iz odgovarajućih grupa definisano shodno eksperimentalnom protokolu (videti poglavlje 3.2.) dobijeni nakon dekapitacije su fiksirani u 10% puferisanom rastvoru formalina i kalupljeni u parafinu. Pravljeni su rezovi debljine 5 μm .

Analiza zida aorte je rađena na rezovima bojenim hematoksilinom i eozinom (H/E), orceinom i Masson trihromnim bojenjem, a analiza tkiva srca na preparatima bojenim H/E, Masson trihromnim i PTAH bojenjem.

Za potrebe analize tkiva jetre korišćeno je H/E i Masson trihromno bojenje.

Analiza tkiva mozga rađena je na preparatima bojenim H/E.

Korišćen je svetlosni mikroskop Olympus BX41 sa Olympus C5060-ADU wide zoom kamerom.

3.4. Korišćene supstance

Sve supstance korišćene u ovom istraživanju bile su analitičke čistoće i proizvod su Sigma Aldrich Co., St Louis, SAD ukoliko drugačije nije naznačeno.

Priprema rastvora vršena je *ex tempore*, a kao rastvarač korišćen je sterilni fiziološki rastvor (Hemofarm, Vršac, Srbija). Priprema rastvora D, L homocistein

tiolaktona vršena je pod crvenim osvetljenjem od 3 luksa, a puferovanje do pH = 7,0 je vršeno pomoću 1N NaOH. Supstance su životinjama administrirane intraperitonealno (i.p.) u volumenu 1,0 ml/100 g telesne mase ukoliko drugačije nije naznačeno.

3.5. Statistička analiza

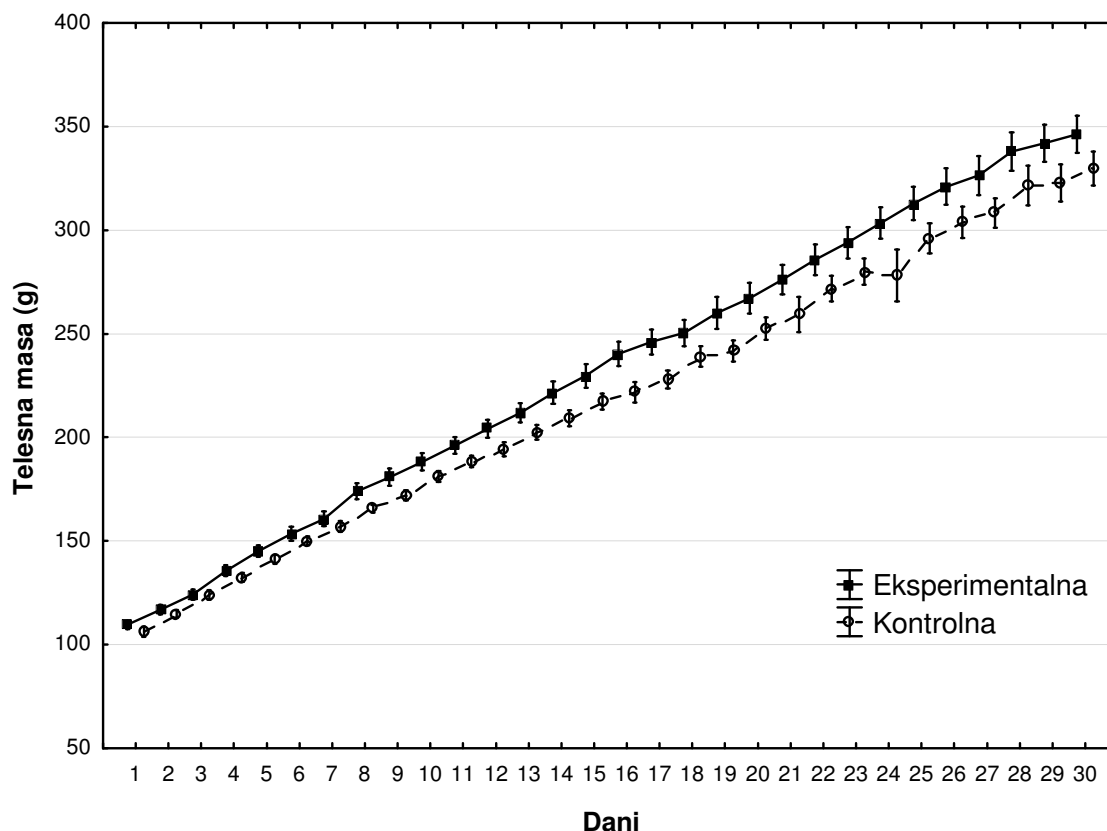
Statistička značajnost razlike u registrovanim parametrima između eksperimentalnih grupa procenjavana je t testom, Fisher-ovim testom tačne verovatnoće, jednostrukom ili dvofaktorskom ANOVA sa odgovarajućim post hoc testom ili Kruskal-Wallis ANOVA i Mann - Whitney U testom u zavisnosti da li je Kolmogorov - Smirnov testom dokazana normalna distribucija njihovih vrednosti ili ne i konkretnih uslova analize, a što je naglašeno pri intepretaciji svake statističke analize. Podaci su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna greška, odnosno standardna devijacija ili medijanom kao ne parametarskom merom centralne tendencije sa 25. i 75. percentilom (prvi i drugi kvartil) kao odgovarajućim merama varijacije.

U svim testovima, prihvaćeni nivo statističke značajnost bio je $p < 0,05$ i $p < 0,01$.

4. REZULTATI

4.1. Efekti hipermetioninske dijete

Tokom 30 dana životinjama iz eksperimentalne grupe koje su bile na režimu ishrane obogaćene metioninom (hipermetioninska dijeta), kao i kontrolnim životinjama koje su imale *ad libitum* pristup standardnoj hrani, merena je telesna masa svakog dana. Rezultati su prikazani na Slici 4.1.1.

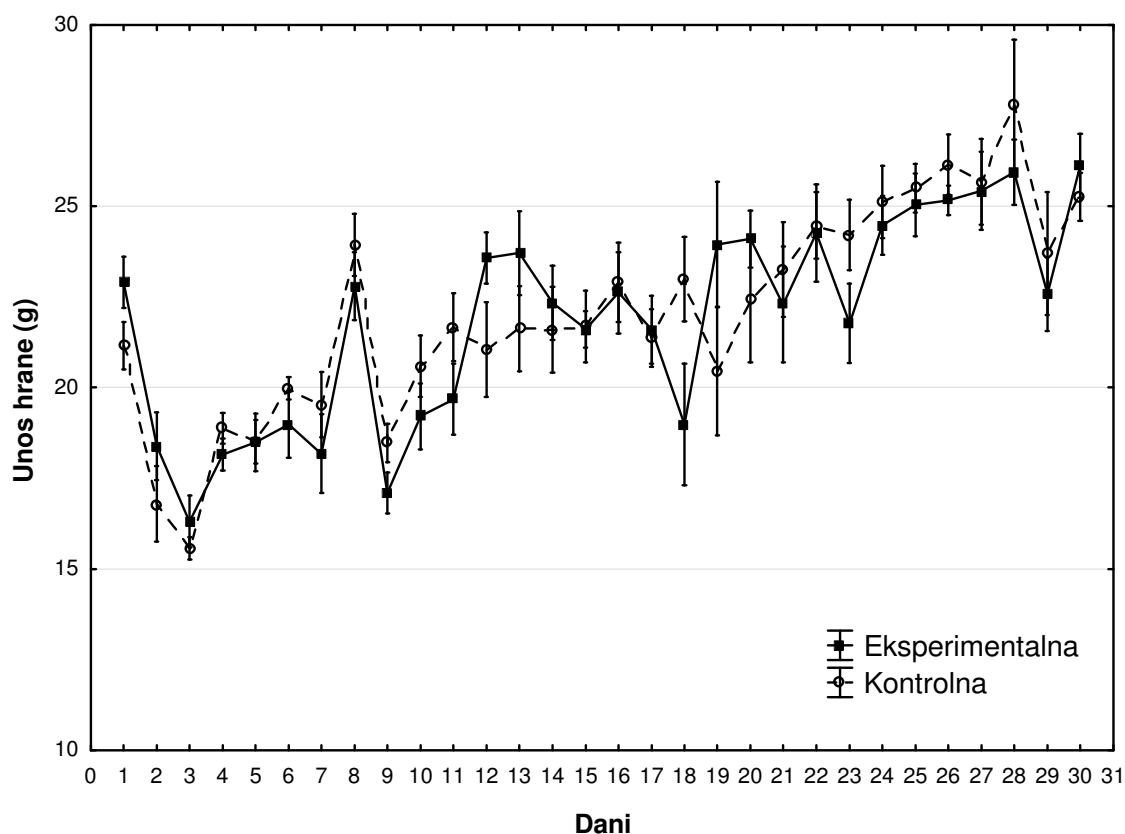


Slika 4.1.1. Telesna masa životinja u kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi. Životinjama je svakodnevno merena telesna masa tokom 30 dana na režimu standardne ishrane (kontrolna grupa) i režimu ishrane sa duplo većim sadržajem metionina u odnosu na standardnu ishranu (hipermetioninska dijeta, eksperimentalna grupa). Podaci su prikazani kao srednja vredost \pm SE. Statistička značajnost razlika utvrđena je t testom.

Uočen je konstantan trend porasta telesne mase životinja u obe grupe. Nije bilo statistički značajne razlike u telesnoj masi životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe ni u jednom ispitivanom danu ($p>0,05$, Slika 4.1.1.).

Tokom ovog perioda praćen je i dnevni unos hrane za životinje iz obe grupe. Rezultati su prikazani na Slici 4.1.2.

Nije bilo statistički značajne razlike u unosu hrane kod životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe ni u jednom ispitivanom danu ($p>0,05$, Slika 4.1.2.).

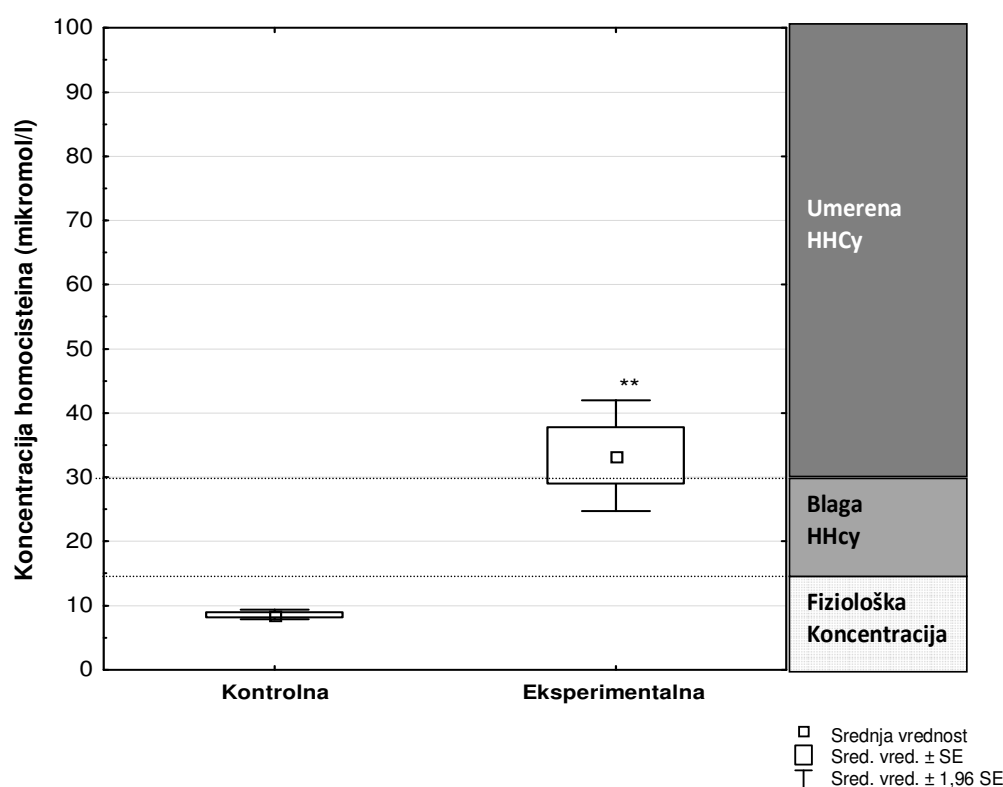


Slika 4.1.2. Masa unete hrane po životinji u kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi tokom 30 dana na režimu standardne, odnosno hipermetioninske ishrane. Hrana je životinjama bila dostupna *ad libitum*. Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm SE. Statistička značajnost razlika utvrđena je t testom.

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.1.2.

4.1.1. Koncentracija ukupnog homocisteina u serumu

Merenje koncentracije ukupnog homocisteina u serumu dobijenom od životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe, pokazalo je da je 30-dnevni režim hipermetioninske ishrane doveo do statistički visoko značajnog povećanja nivoa homocisteina kod eksperimentalnih životinja i razvoja umerene hiperhomocisteinemije (Slika 4.1.1.1., $p < 0,01$).



Slika 4.1.1.1. Koncentracija ukupnog homocisteina u serumu u kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi životinja.

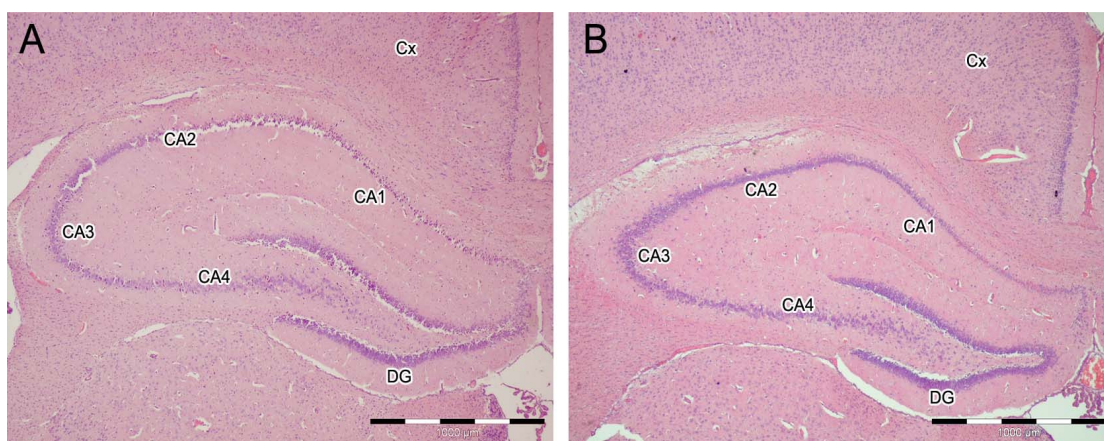
Tokom 30 dana životinje iz kontrolne grupe dobijale su standardnu hranu, a životinje iz eksperimentalne grupe hranu sa duplo većim sadržajem metionina (hipermetioninska dijeta). Koncentracija ukupnog homocisteina u serumu određena je upotrebom komercijalnog kita metodom imunonefelometrije na laserskom nefelometru. HHcy- hiperhomocisteinemija

Statistička značajnost razlika utvrđena je primenom t testa (** $p < 0,01$).

4.1.2. Histološki nalaz

Postojanje morfoloških promena u mozgu, jetri i zidu aorte pacova u kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi pokazalo je sledeće rezultate.

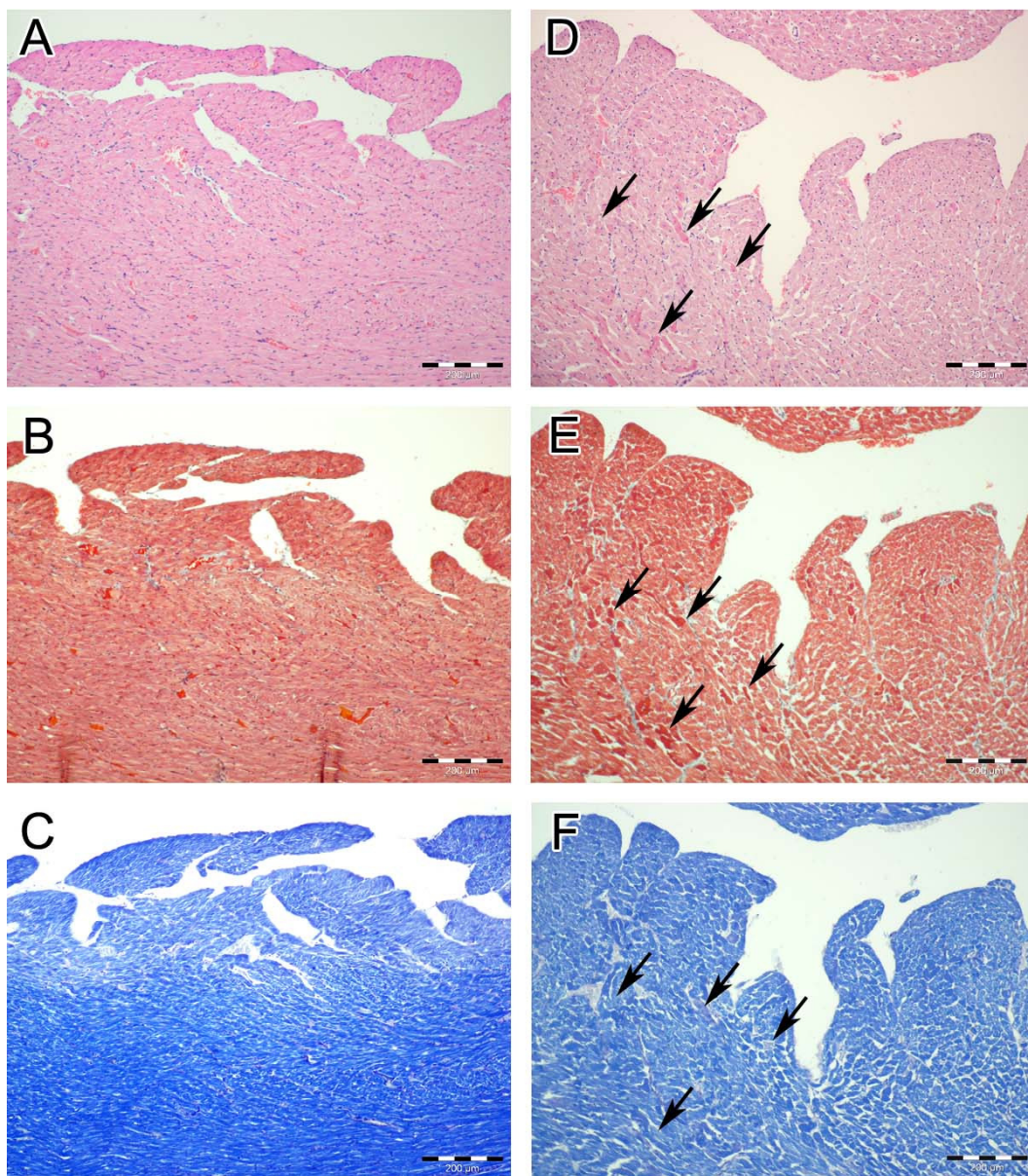
Histološka analiza preparata mozga bojenih H/E je pokazala da nije bilo promena u tkivu mozga životinja koje su bile na hipermetioninskoj dijeti u odnosu na kontrolne životinje (Slika 4.1.2.1).



Slika 4.1.2.1. Reprezentativni preseki tkiva mozga životinje iz kontrolne (A) i eksperimentalne (B) grupe.

Fokus je na hipokampusu. Cornu Ammonis (CA) regioni: CA1, CA2, CA3, CA4; DG – girus dentatus; Cx – korteks (H&E). Mozgovi životinja su fiksirani u 10% pufersanom rastvoru formalina i kalupljeni u parafinu. Pravljeni su rezovi debljine 5 µm. Analiza tkiva mozga radila se na preparatima bojenim hematoksilinom i eozinom (H/E). Za analizu je korišćen svetlosni mikroskop Olympus BX41 sa Olympus C5060-ADU wide zoom kamerom.

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.1.2.1.



Slika 4.1.2.2. Reprezentativni preseki zida leve komore srca životinja iz kontrolne (A, B, C) i eksperimentalne (D, E, F) grupe. Strelice označavaju ćelije sa kompaktnim, homogenom citoplazmom i povećanom acidofilijom (D, E), ili svetliju i homogenu citoplazmu (F).

A, D: H/E; B, E: Masson trihromno; C, F: PTAH bojenje

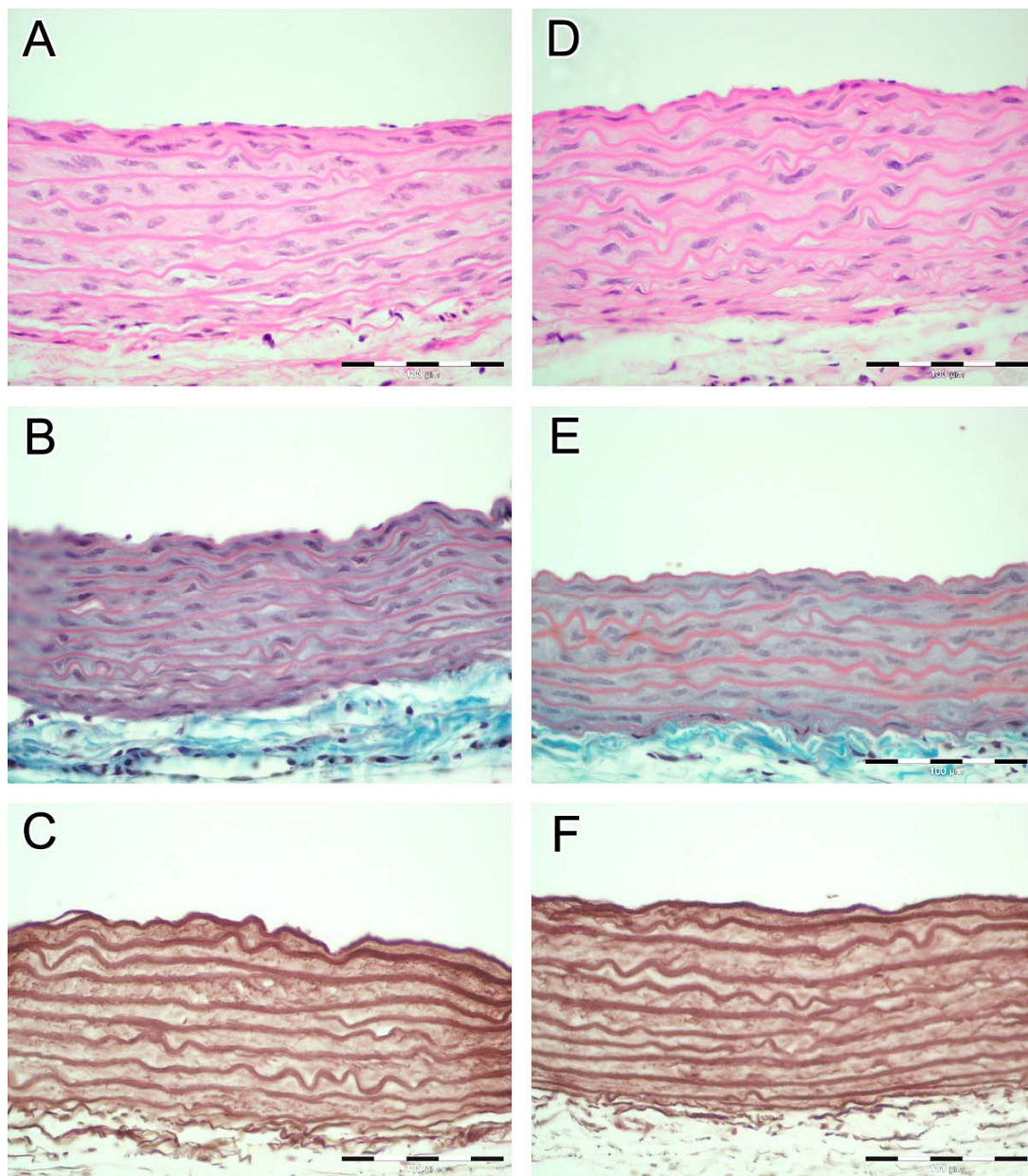
Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.1.1 i Sliku 4.1.2.1.

Mesec dana hipermetioninske dijeta u eksperimentalnoj grupi je prouzrokovalo promene vidljive na svetlosnom mikroskopu prevashodno u subendokardnom regionu srčanog zida. Uočeni su difuzno distribuirani kardiomiociti sa kondenzovanom homogenom citoplazmom i povećanom acidofilijom što je uočeno na preparatima bojenim H/E i Masson trihromnim bojenjem. Iste ćelije, obojene PTAH-om, pokazuju homogen svetloplav izgled bez vidljivih miofibrila. U nekim od ovih ćelija mogla se videti piknoza nukleusa (Slika 4.1.2.2). U okolnim kardiomiocitima uočena je vakuolizacija citoplazme.

Mesec dana hipermetioninske dijeta u eksperimentalnoj grupi nije prouzrokovalo histopatološke promene u zidu aorte koje bi mogle biti vidljive svetlosnom mikroskopijom (Slika 4.1.2.3).

Međutim, u jednom od ispitivanih uzoraka iz eksperimentalne grupe uočeno je zadebljanje zida korena aorte. Ovaj deo zida je bio izmenjen akumulacijom kolagenih vlakana i penastih ćelija u tunica intima (Slika 4.1.2.4). U nekim od penastih ćelija moglo se uočiti piknotično jedro.

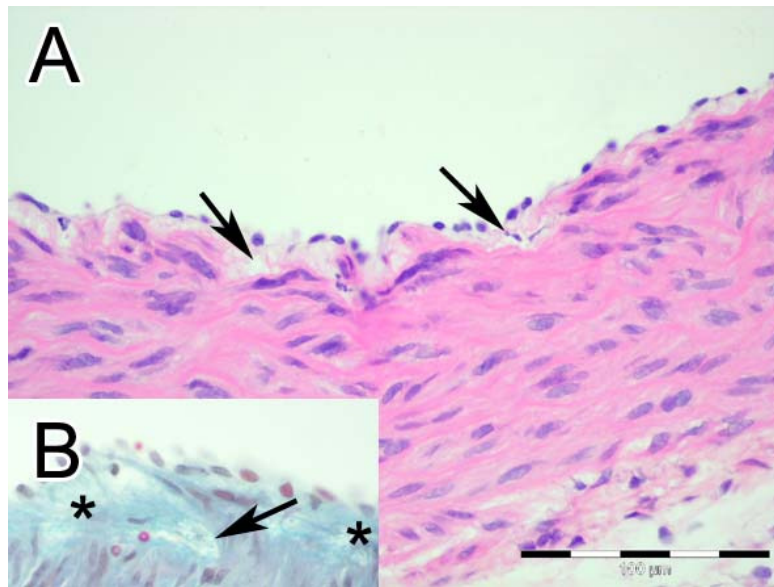
Histopatološka analiza je pokazala normalnu strukturu parenhima jetre, sa radijalnom organizacijom hepatocita koji okružuju centralnu venu i očuvani portalnim areama kako kod životinja iz kontrolne, tako i kod životinja iz eksperimentalne grupe (Slika 4.1.2.5). Međutim u hepatocitima životinja iz eksperimentalne grupe bilo je moguće uočiti mitohondriozu, retke uvećane mitohondrije, poneki balonirani hepatocit i sporadično (manje od 3%) ćelije sa mikrovezikularnom steatozom Slika 4.1.2.6).



Slika 4.1.2.3. Reprezentativni preseki zida aorte životinja iz kontrolne (A, B, C) i eksperimentalne (D, E, F) grupe.

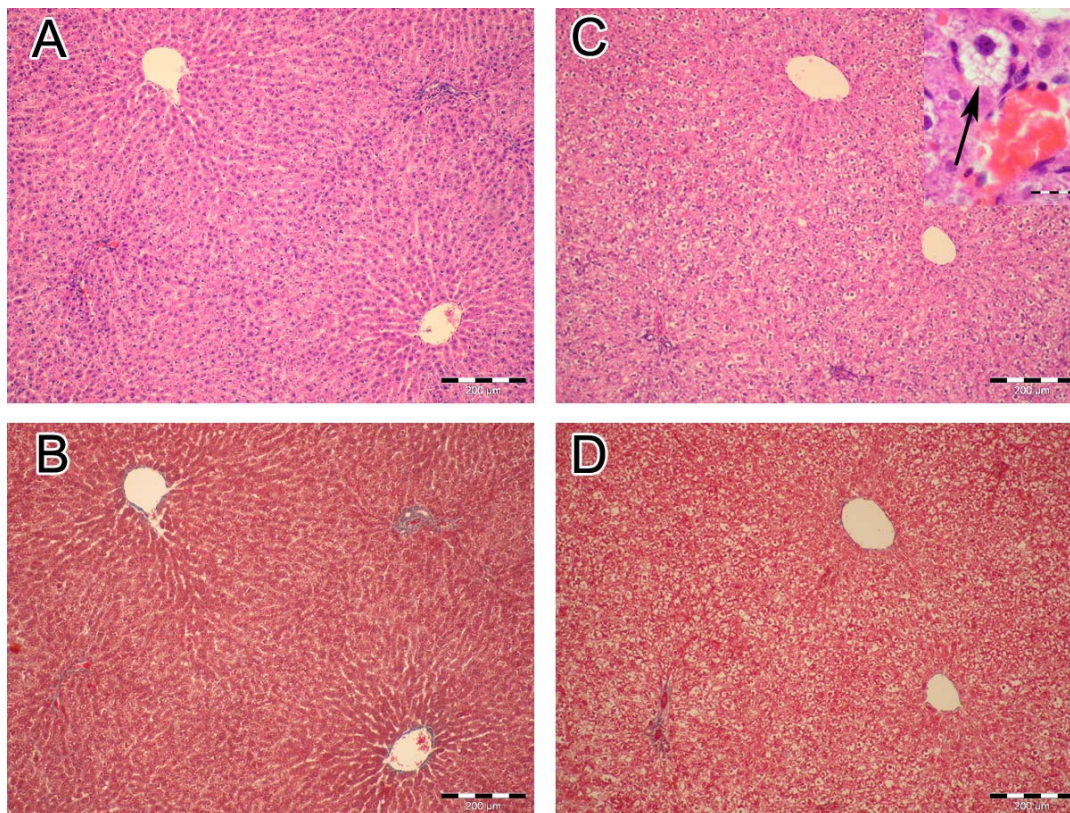
A, D: H/E; B, E: Masson trihromno; C, F: Orcein bojenje

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.1.1 i Sliku 4.1.2.1.



Slika 4.1.2.4. Zadebljanje zida korena aorte. A) Strelice označavaju penaste ćelije u tunica intima, H/E bojenje; B) Jedna od penastih ćelija označena strelicom i akumulacija kolagena u subendotelnom delu zida označeno zvezdicom, Masson trihromno bojenje.

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.1.1 i Sliku 4.1.2.1.



Slika 4.1.2.5. Tkivo jetre u kontrolnoj (A, B) i eksperimentalnoj (C, D) grupi. Uočava se očuvana strukturna organizacija parenhima jetre kod kontrolnih i eksperimentalnih životinja, A,C: H/E. Nije bilo znakova fibroze, što se može videti na presecima bojenim Masson bojenjem (B, D). Strelica-mikrovezikularna steatoza.

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.1.1.

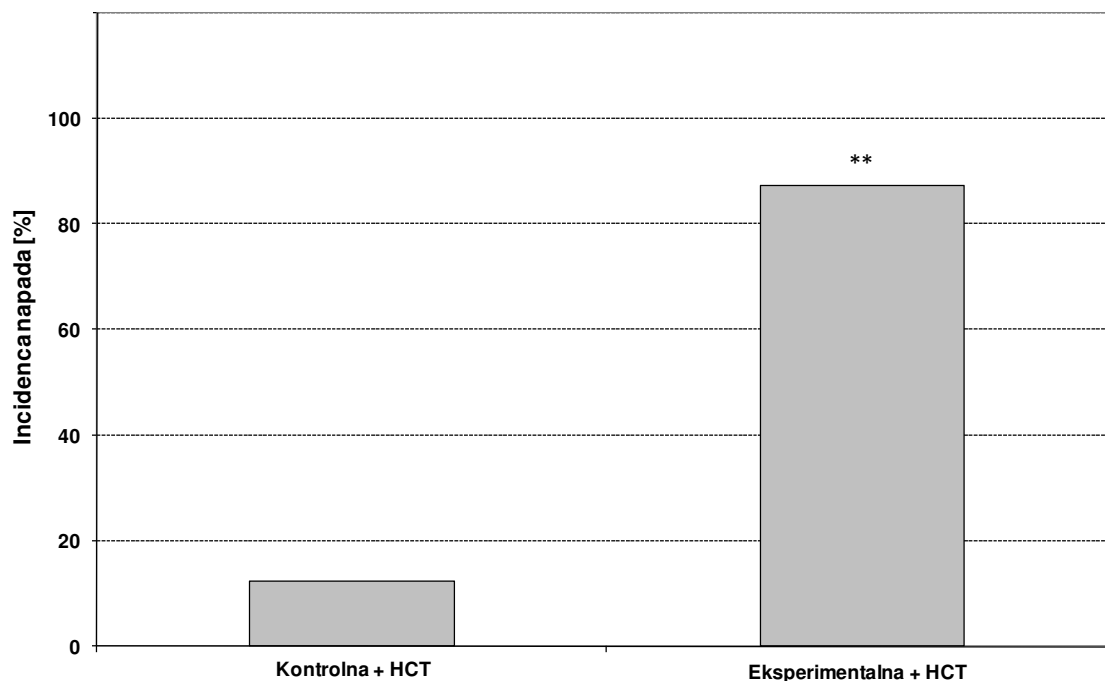
4.1.3. Epileptična aktivnost izazvana homocistein tiolaktonom

U cilju ispitivanja efekata hipermetioninske dijeta na epileptičnu aktivnost izazvanu homocistein tiolaktonom, tj. uticaj ishrane obogaćene metioninom na hiperekscitabilnost centralnog nervnog sistema, životinjama iz kontrolne i eksperimentalne grupe je 31. dana nakon režima standardne i hipermetioninske dijeta administrirana pojedinačna subkonvulzivna doza D, L homocistein tiolaktona (5,5 mmol/kg). Praćeni su parametri konvulzivnog ponašanja i EEG aktivnost tokom 90 min od administracije homocistein tiolaktona.

4.1.3.1. Parametri konvulzivnog ponašanja

Životinje iz kontrolne grupe koje su bile na režimu standardne hrane su nakon administracije subkonvulzivne doze homocistein tiolaktona odgovorile blagim konvulzivnim napadima. Incidenca napada je bila mala (12, 50%), latentni period dug, mali broj konvulzivnih epizoda po pacovu (0 [0-2]), a sam intenzitet napada nije bio veći od gradus 1 (Slika 4.1.3.1.1-2.).

Dalja analiza parametra konvulzivnog ponašanja, pokazala je da je došlo do visoko statistički značajnog povećanja incidence napada u eksperimentalnoj grupi koja je bila na režimu hipermetioninske dijeta u odnosu na kontrolnu grupu nakon administracije homocistein tiolaktona (kontrolna+HCT vs. eksperimentalna+HCT grupa, $p < 0,01$; Slika 4.1.3.1.1.).



Slika 4.1.3.1.1. Uticaj hipermetioninske dijeta na incidencu konvulzivnih napada izazvanih homocistein tiolaktonom. Životinjama je nakon 30 dana na režimu standardne ishrane (kontrolna grupa) ili ishrane obogaćene metioninom (eksperimentalna grupa) administrirana subkonvulzivna doza D,L homocistein tiolaktona od 5,5 mg/kg, i.p. i one su činile redom kontrolnu + HCT i eksperimentalnu + HCT grupu. Incidenca – procenat životinja koje konvulziraju u odnosu na ukupan broj životinja u grupi izražen u procentima. Nije bilo znakova konvulzivnog ponašanja u ovim grupama pre administracije homocistein tiolaktona.

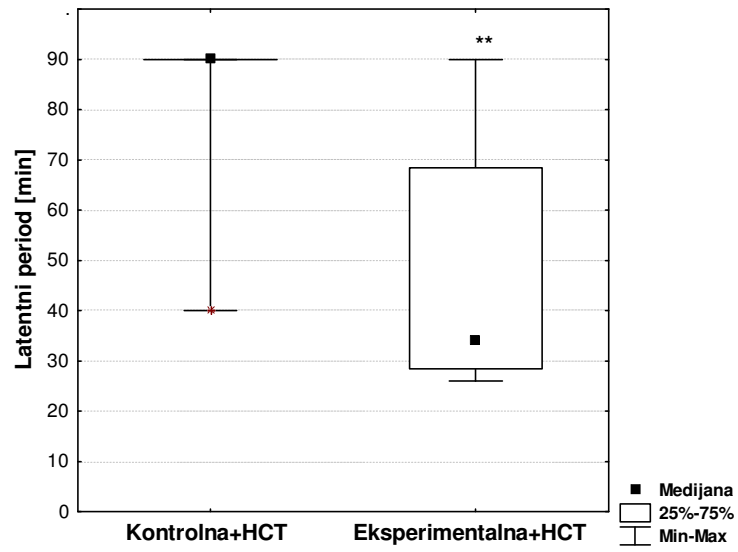
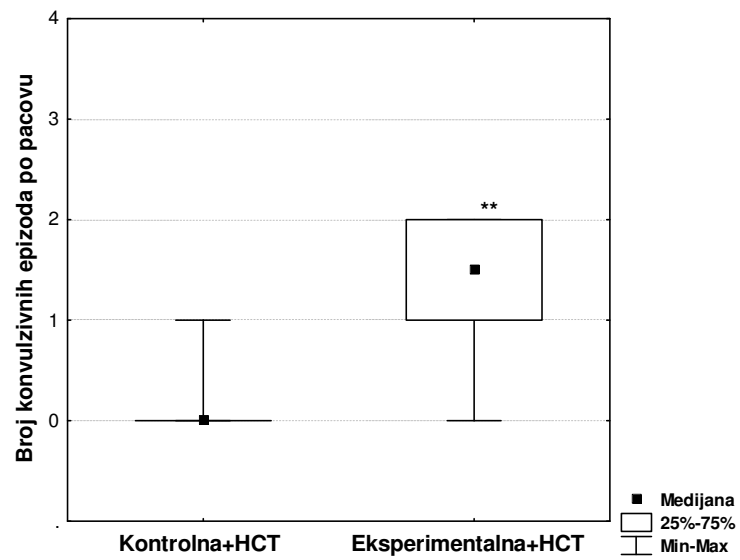
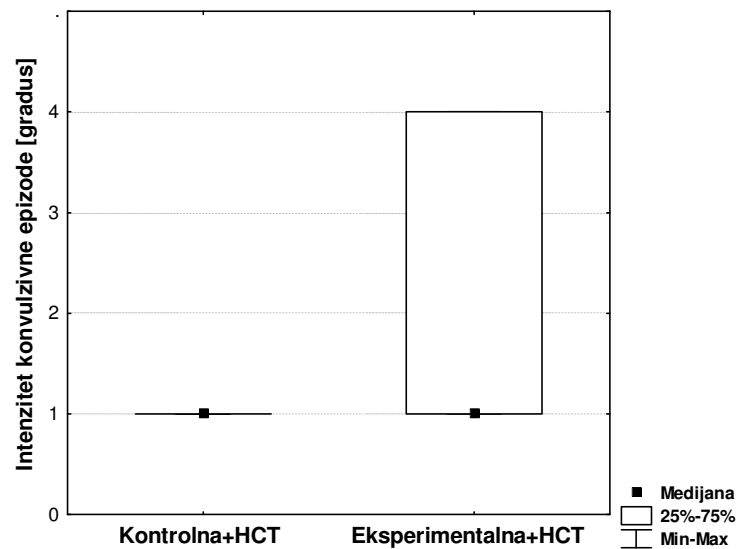
Statistička značajnost razlika u incidenci napada utvrđena je Fišerovim testom tačne verovatnoće (* $p < 0,01$).

Latentni period do prvog konvulzivnog napada statistički je značajno bio kraći kod životinja iz eksperimentalne + HCT grupe u odnosu na kontrolnu + HCT grupu ($p < 0,01$, Slika 4.1.3.1.2A).

Broj konvulzivnih epizoda po pacovu je bio statistički značajno povećan u eksperimentalnoj + HCT grupi u odnosu na kontrolnu + HCT grupu ($p < 0,01$; Slika 4.1.3.1.2B).

Intenzitet konvulzivne epizode nije bio statistički značajno promjenjen u eksperimentalnoj + HCT grupi u odnosu na kontrolnu + HCT grupu ($p > 0,05$; Slika 4.2.1.2C), iako je u eksperimentalnoj + HCT grupi maksimalni intezitet napada bio gradusa 4, a u kontrolnoj + HCT grupi gradusa 1.

Administracija homocistein tiolaktone u dozi od 5,5 mmol/kg nije dovela do letalnog ishoda u kontrolnoj + HCT grupi ni u jednom od dva opservaciona vremenska perioda (90 min i 24h od administracije), dok je pomenuta administracija homocistein tiolaktone u eksperimentalnoj + HCT grupi dovela do pojave letalnog ishoda sa incidencom od 25% u oba opservaciona vremena. Uočena razlika u letalnom ishodu registrovanom u ovim grupama nije bila statistički značajna (Tabela 4.1.3.1.1).

A**B****C**

Slika 4.1.3.1.2. Uticaj hipermetioninske dijetе na latentni period (A), broj konvulzivnih epizoda izazvanih homocistein tiolaktonom po pacovu (B) i njihov intenzitet (C). Latentni period je definisan kao vreme od administracije homocistein tiolaktona do razvoja prvog konvulzivnog odgovora, pri čemu životinje koje ne kovulziraju imaju latencu 90 min. Intenzitet napada procenjivan je na osnovu deskriptivne skale sa gradusima od 0 do 4: 0 - bez konvulzivnog odgovora; 1 -klimanje glavom i grčeviti trzaji donje vilice, 2 -mioklonički trzaji celog tela (reakcija vruće ploče), klonus prednjih i propinjanje na zadnje ekstremitete (pozicija kengura); 3 - progresija u generalizovane kloničke konvulzije praćene toničkom ekstenzijom prednjih i zadnjih ekstremiteta i repa; 4 - status epilepticus.

Statistička značajnost razlika između grupa utvrđena je Kruskall –Wallis ANOVA i Mann – Whitney U testom (**p<0,01, *p<0,05).

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.1.1.1.

Tabela 4.1.3.1.1. Letalitet registrovan u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi 90 min i 24 h nakon administracije homocistein tiolaktona.

Letalitet (%)	Grupe	
	Kontrolna +HCT	Eksperimentalna + HCT
Posle 90 min	0	25,00
Posle 24 h	0	25,00

Letalitet -procenat životinja sa letalnim ishodom u grupi.

Statistička značajnost razlika između grupa utvrđena je Fišerovim testom tačne verovatnoće.

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.1.3.1.1.

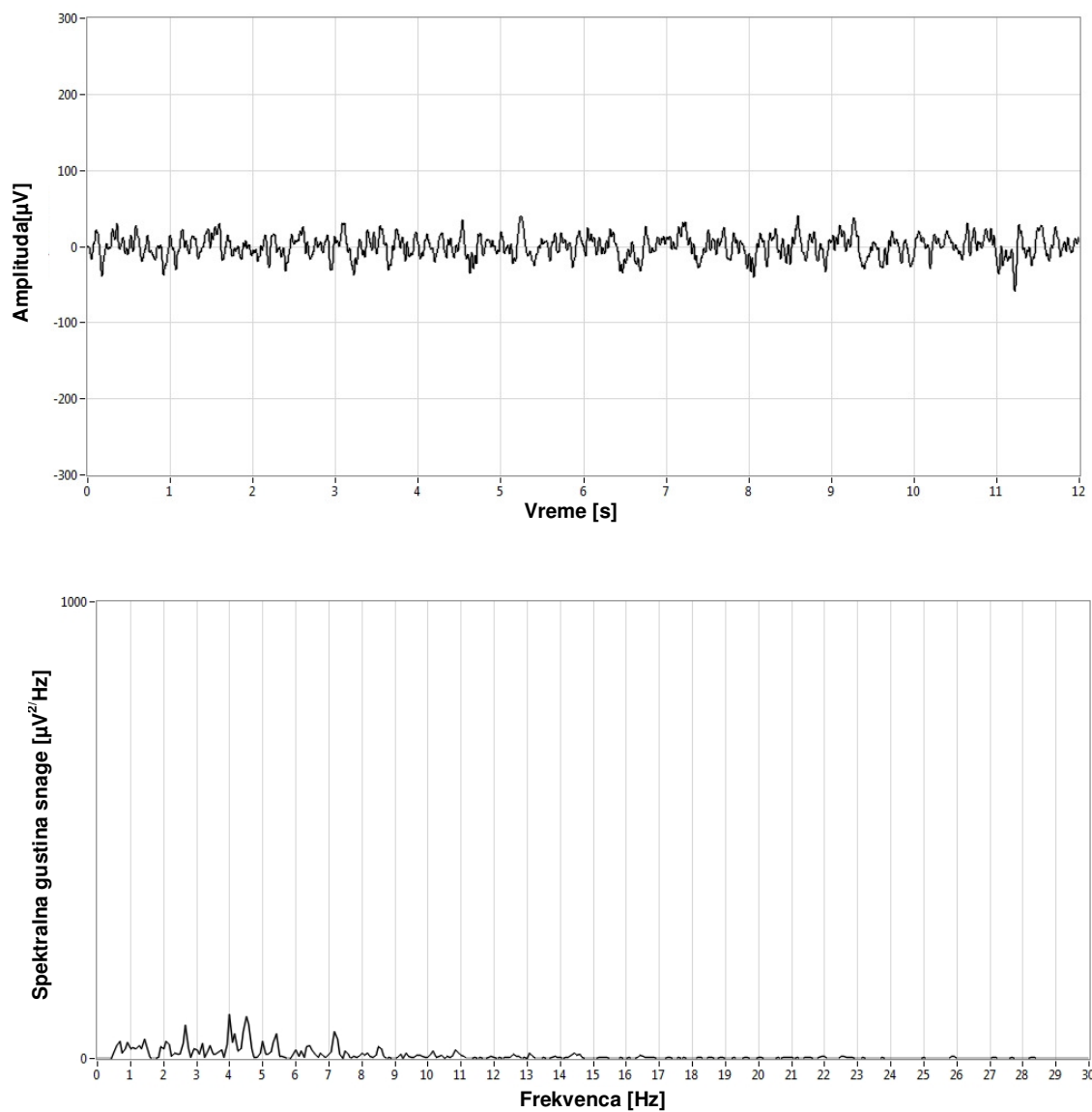
4.1.3.2. EEG nalaz

U EEG zapisima životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe pre administracije homocistein tiolaktona nije bilo znakova iktalne aktivnosti. Životinje su pokazivale normalnu, bazalnu EEG aktivnost u obe grupe (Slika 4.1.3.2.1).

EEG aktivnost ovih životinja po administraciji homocistein tiolaktona karakterisala je sporadična pojava klastera šiljak-talas pražnjenja (SWD). Ova karakteristična iktalna aktivnost registrovana je i u kontrolnoj + HCT i eksperimentalnoj + HCT grupi (Slika 4.1.3.2.2). SWD karakteriše paroksizmalno pražnjenje visoko-frekventnih, visoko voltažnih šiljak-talas kompleksa trajanja minimum 1 s, sa amplitudom dva puta većom od bazalne aktivnosti. Spektralna gustina snage dominantna je u opsegu od 5 – 7 Hz.

Rezultati kvantitativne analize EEG-a sa ciljem utvrđivanja postojanja razlike u iktalnim karakteristikama ispitivanih grupa prikazani su na Slici 4.1.3.2.3.

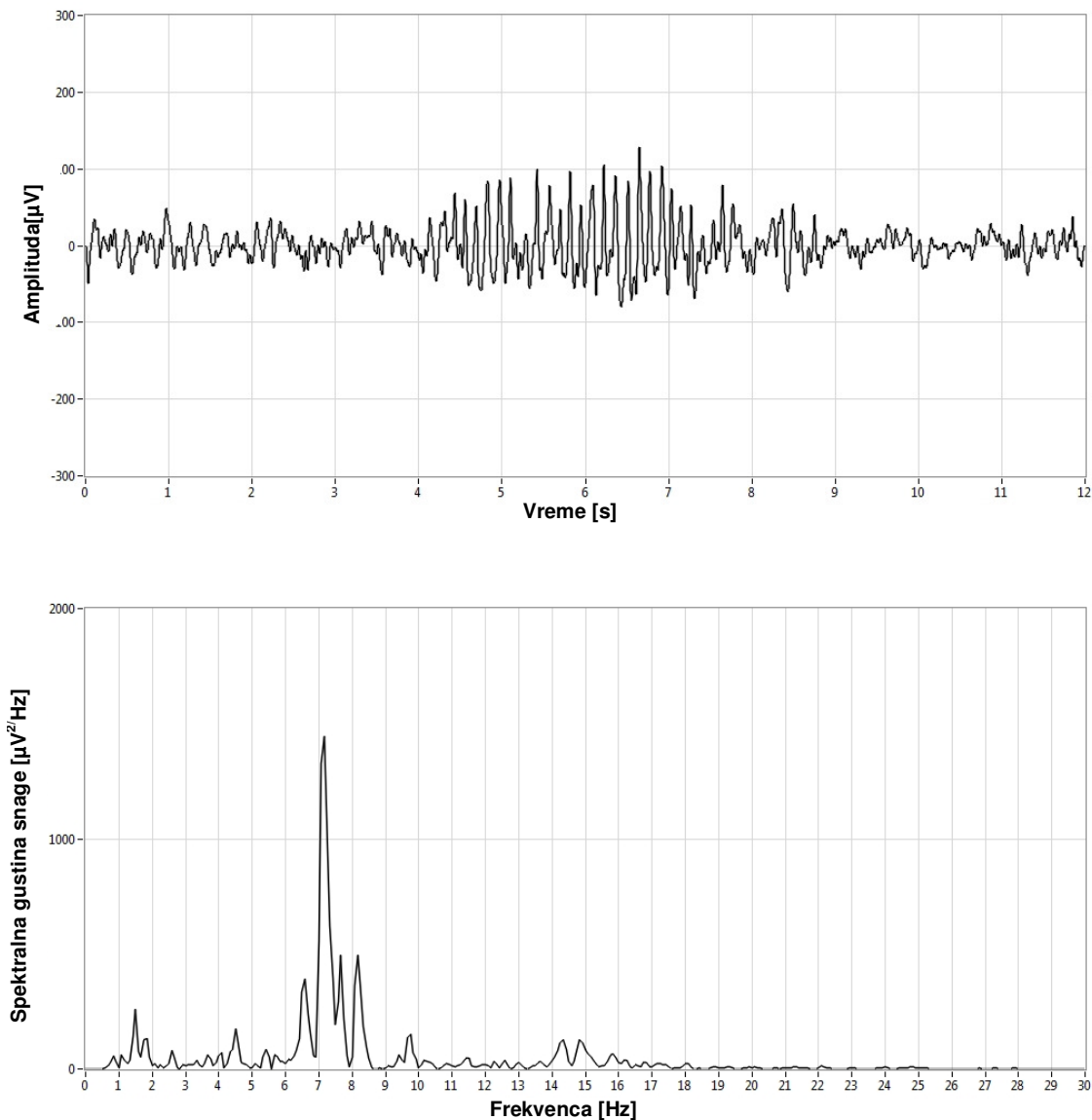
Kao što se može uočiti, medijana broja SWD-a po pacovu je bila statistički značajno veća u eksperimentalnoj + HCT u poređenju sa kontrolnom + HCT grupom ($p < 0,05$, Slika 4.1.2.2A). Takođe, trajanje pojedinačnih SWD po pacovu bilo je veće u eksperimentalnoj + HCT grupi u odnosu na kontrolnu + HCT grupu, a opservirana razlika bila je visoko statistički značajna ($p < 0,01$, Slika 4.1.3.2.2B).



Slika 4.1.3.2.1. Reprezentativni EEG zapisi u eksperimentalnoj grupi životinja (gornji panel) i korespondentna spektralna gustina snage (donji panel) pre administracije homocistein tiolaktona.

Odvodi: levi frontalni – desni parijetalni.

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.1.3.1.1.

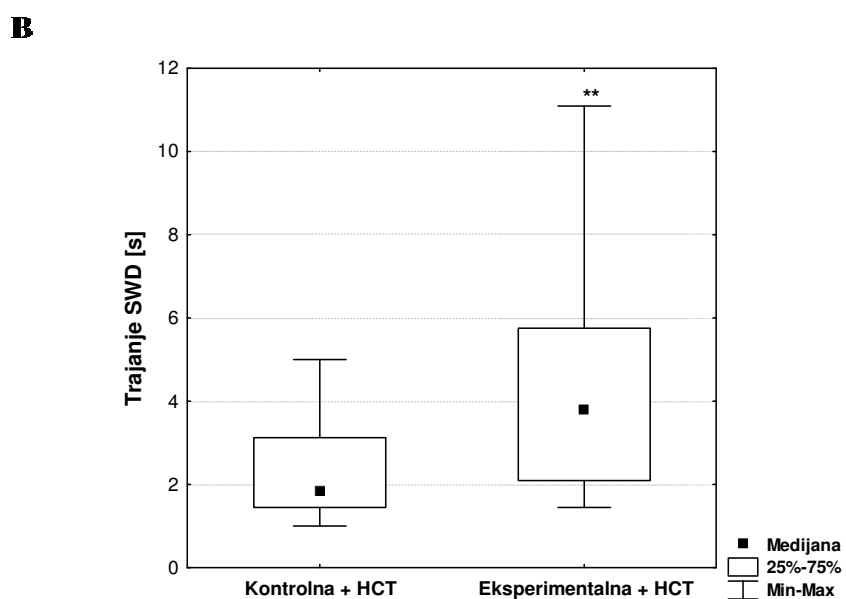
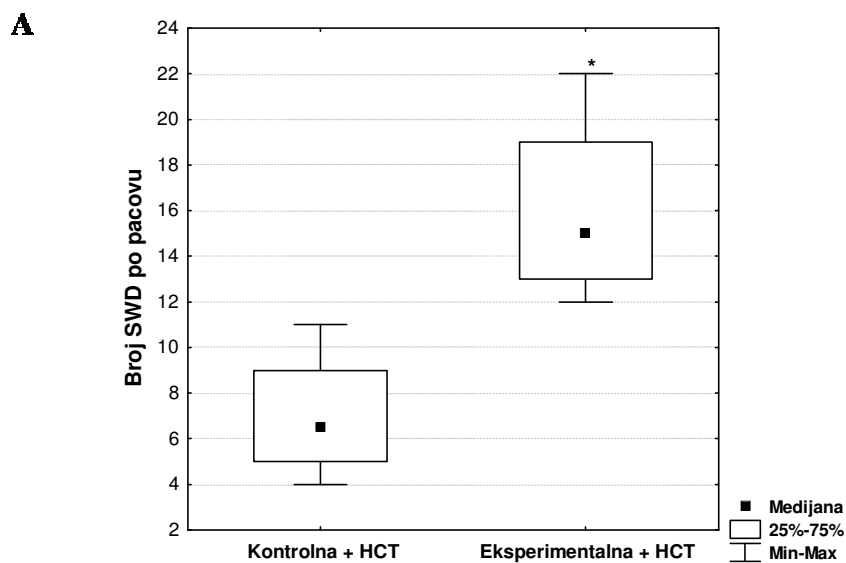


Slika 4.1.3.2.2. Reprezentativni EEG zapis sa karakterističnim SWD u eksperimentalnoj grupi životinja (gornji panel) i korespondentna spektralna gustina snage (donji panel) nakon administracije homocistein tiolaktona.

SWD je definisan na sledeći način: paroksizmalno pražnjenje visoko-frekventnih, visoko voltažnih šiljak-talas kompleksa trajanja > 1 s, amplitude dva puta veće od bazalne aktivnosti, sa dominacijom, spektralne gustine snage u opsegu od 5 – 7 Hz, koje je praćeno karakterističnim promenama u ponašanju.

Odvođi: levi frontalni – desni parijetalni.

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.1.3.1.1.



Slika 4.1.3.2.3. Broj (A) i trajanje (B) SWD-a u kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi tokom 90 min od administracije homocistein tiolaktona.

Statistička značajnost razlika između grupa utvrđena je Kruskal –Wallis ANOVA i Mann – Whitney U testom. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.1.3.1.1. i Sliku 4.1.3.2.1.

4.1.4. Ponašanje povezano sa anksioznošću

U cilju ispitivanja efekata hipermetioninske dijetete na ponašanje povezano sa anksioznošću primenjeni su test otvorenog polja (eng. open field test) i test svetlost tama (eng. light-dark test). Prostorni raspored zona u testu otvorenog polja prikazan je na Slici 4.1.4.1A.

Registrovanjem horizontalne lokomotorne aktivnosti u testu otvorenog polja pokazani su različiti obrasci ponašanja životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe u ovom testu, kao što je prikazano na Slici 4.1.4.1B i Slici 4.1.4.1C.

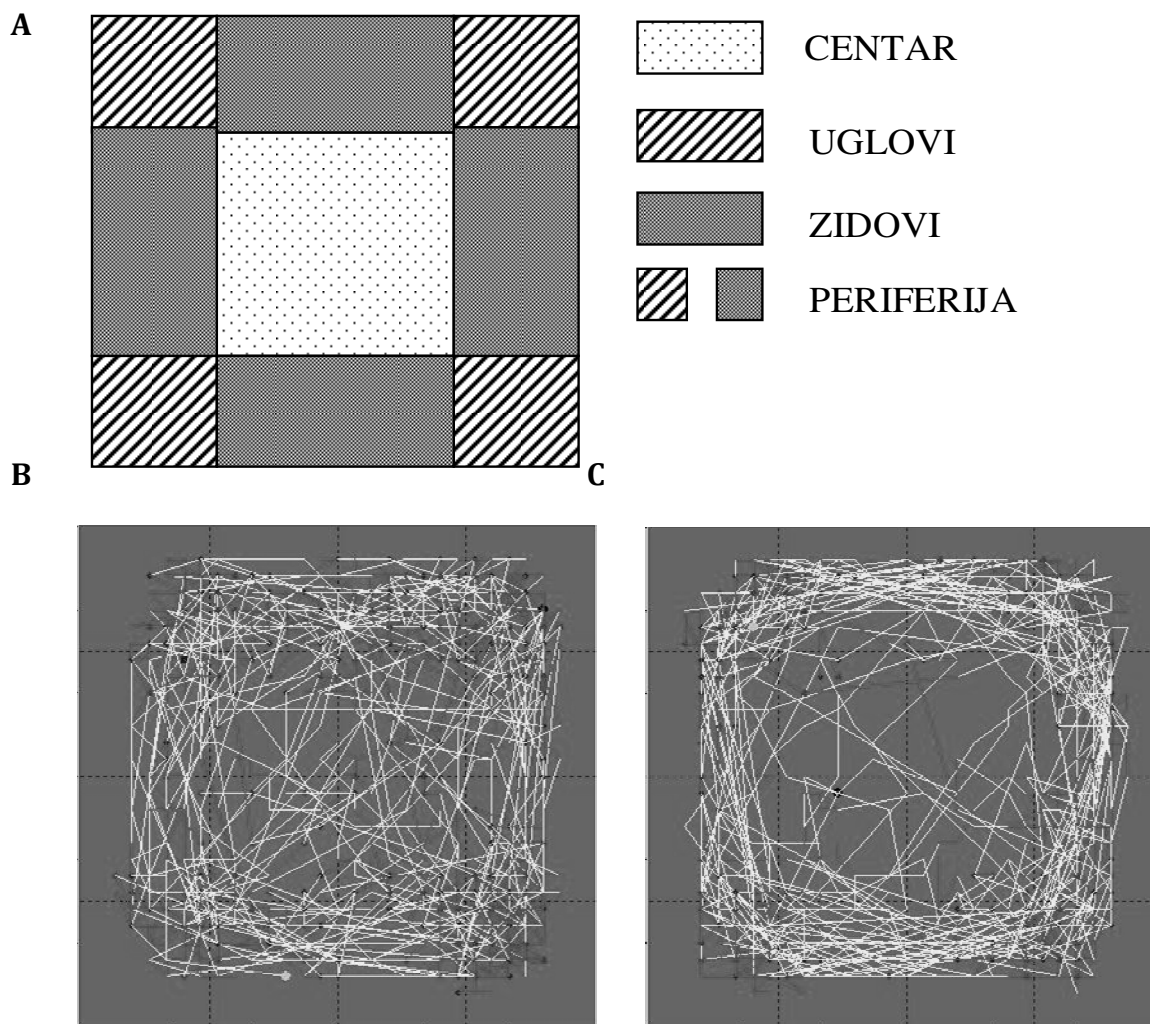
Dalja analiza horizontalne lokomotorne aktivnosti u testu otvorenog polja pokazala je da je pređeni put tokom ambulatornog kretanja bio statistički značajno kraći u grupi eksperimentalnih životinja u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,05$, Slika 4.1.4.2A).

Upoređivanjem vremena ambulatornog kretanja kontrolnih i eksperimentalnih životinja, videlo se da je eksperimentalna grupa pokazivala statistički značajno kraće vreme ambulatornog kretanja ($p < 0,05$, Slika 4.1.4.2B).

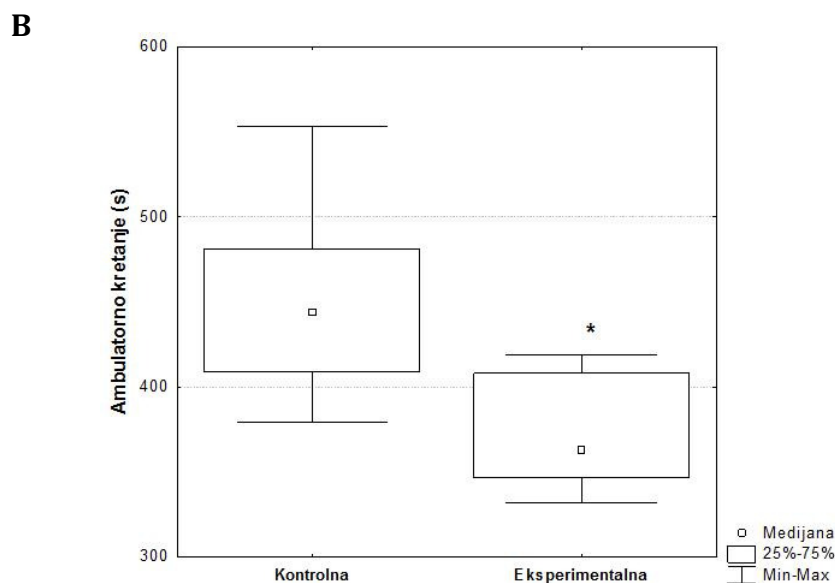
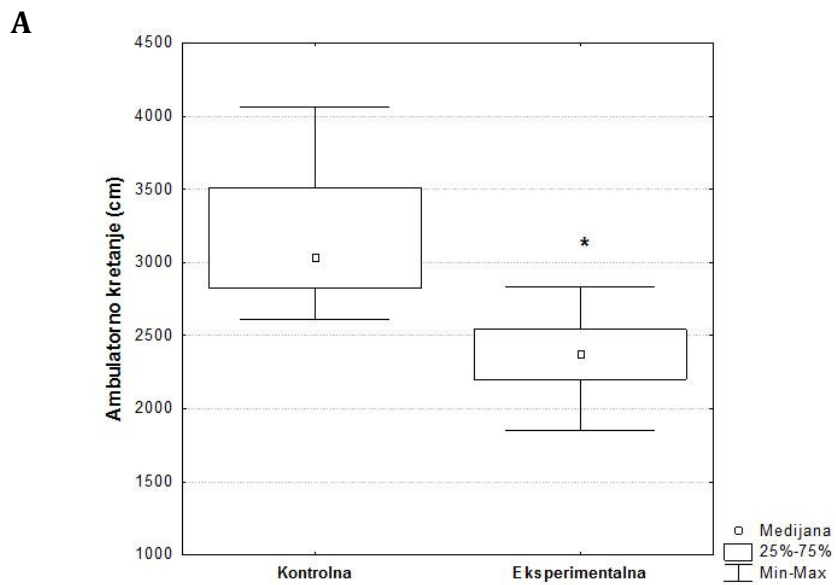
Pored horizontalne, analizirana je i vertikalna aktivnost životinja u testu otvorenog polja. Životinje koje su bile na dijeti obogaćenoj metioninom pokazale su manji broj propinjanja na zadnje ekstremitete u odnosu na životinje iz kontrolne grupe, ali opservirana razlika nije bila statistički značajna ($p > 0,05$, Slika 4.1.4.3).

Osnovni pokazatelji ponašanja povezanog sa anksioznošću koji se mogu izvesti na osnovu rezultata dobijenih u testu otvorenog polja su vreme koje životinje provode u centru polja i indeks tigmotaksije.

Dobijeni rezultati su pokazali da je vreme koje su životinje iz eksperimentalne grupe provele u centru otvorenog polja bilo statistički značajno kraće od istog vremena kod životinja iz kontrolne grupe ($p < 0,05$, Slika 4.1.4.4).



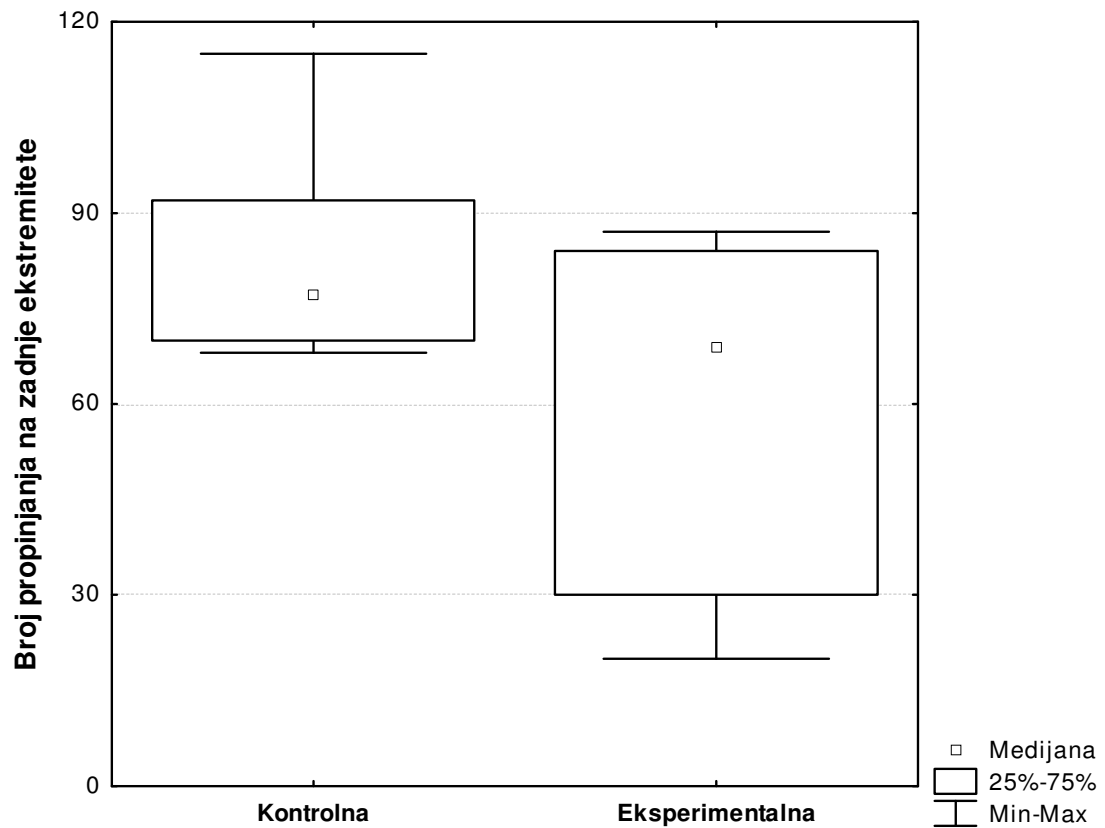
Slika 4.1.4.1. Prostorni raspored zona (nastalih virtuelnom softverskom podelom na 16 kvadrata od kojih su 4 središnja površine 24x24 cm označena kao centar polja) (**A**) i reprezentativni obrazac lokomotorne aktivnosti u testu otvorenog polja za životinju iz kontrolne (**B**) i eksperimentalne grupe (**C**). Životinje su pojedinačno testirane u otvorenom polju nakon 30 dana na režimu standardne ishrane (kontrolna grupa) ili ishrane obogaćene metioninom (eksperimentalna grupa).



Slika 4.1.4.2. Pređeni put (A) i vreme (B) ambulatornog kretanja u otvorenom polju u kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi.

Statistička značajnost razlike utvrđena je Mann - Whitney U testom (* $p < 0,05$).

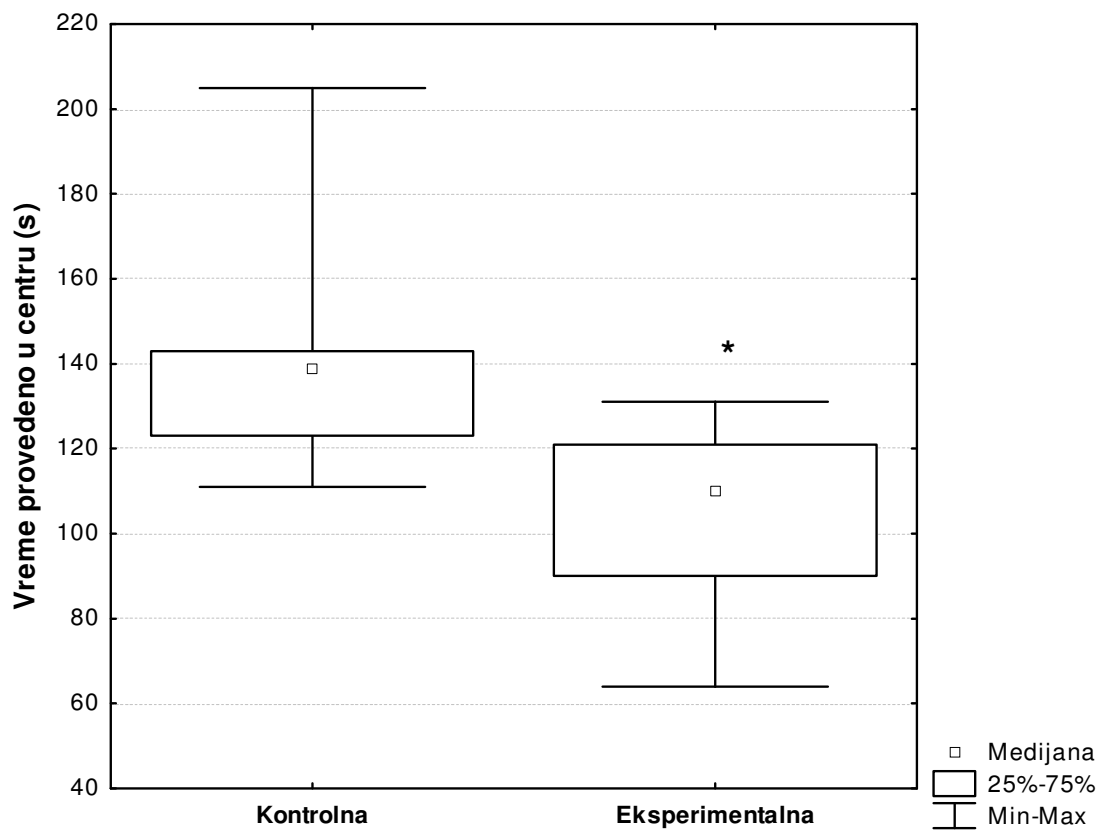
Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.1.4.1.



Slika 4.1.4.3. Broj propinjanja na zadnje ekstremitete u otvorenom polju za životinje iz kontrolne i eksperimentalne grupe.

Statistička značajnost razlike utvrđena je Mann - Whitney U testom.

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.1.4.1.

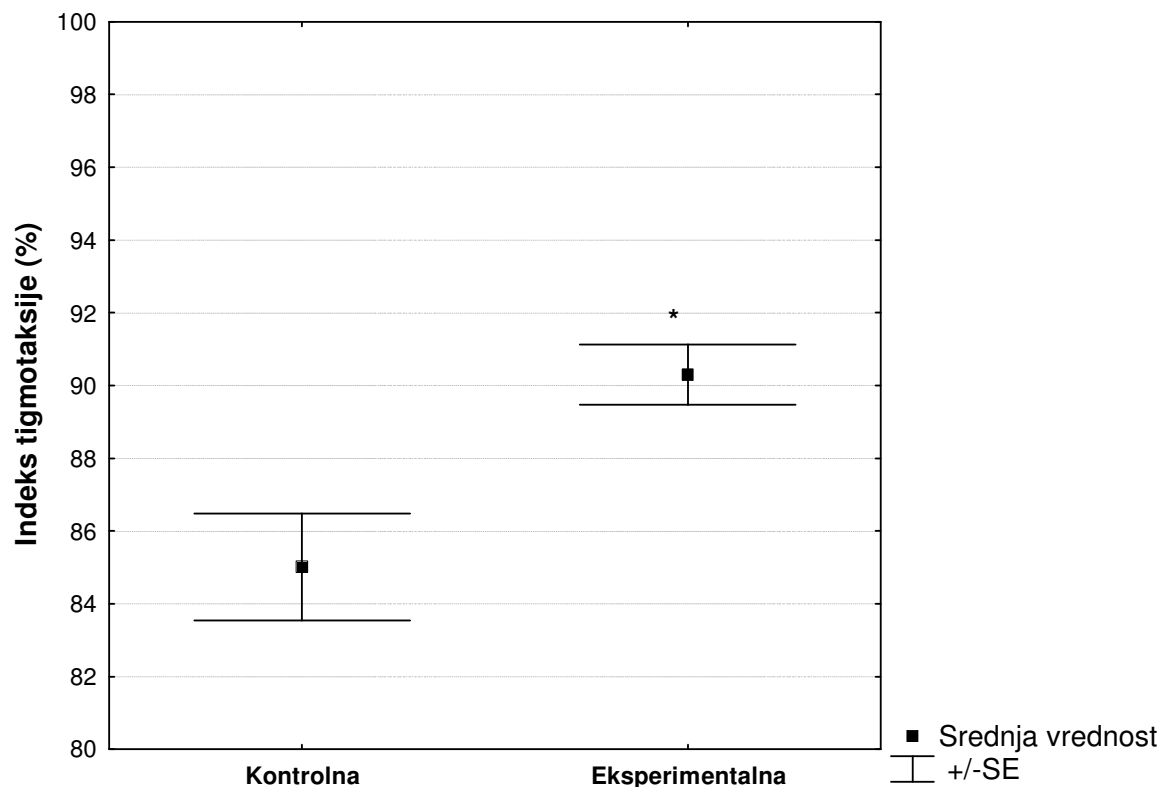


Slika 4.1.4.4. Vreme provedeno u centru otvorenog polja kod životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe.

Statistička značajnost razlike utvrđena je Mann - Whitney U testom (* $p < 0,05$).

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.1.4.1.

Na osnovu pređenog puta tokom ambulatornog kretanja u centru i perifernim zonama, izračunat je indeks tigmotaksije. Dobijeni rezultati pokazali su da je indeks tigmotaksije bio statistički značajno veći u eksperimentalnoj nego u kontrolnoj grupi ($p < 0,05$, Slika 4.1.4.5).



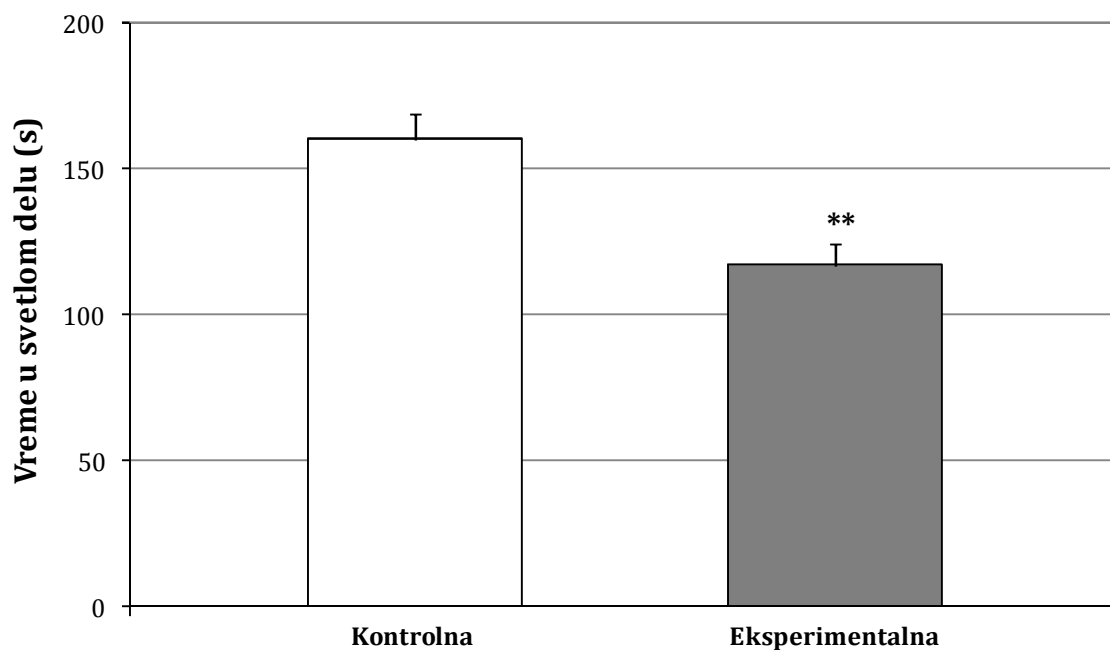
Slika 4.1.4.5. Indeks tigmotaksije u kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi.

Indeks tigmotaksije izračunat je kao odnos pređenog puta u perifernim zonama i ukupnog pređenog puta tokom ambulatornog kretanja u testu otvorenog polja.

Statistička značajnost razlike utvrđena je t testom ($*p < 0,05$).

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.1.4.1.

Rezultati dobijeni u testu svetlost tama (engl. light-dark test) prikazani su na Slici 4.1.4.6. Vreme koje su životinje iz eksperimentalne grupe provodile u svetlom delu kompartmana bilo je visoko statistički značajno kraće u odnosu na isti parametar registrovan kod životinja iz kontrolne grupe (* $p < 0,05$, Slika 4.1.4.6).



Slika 4.1.4.6. Ukupno vreme koje životinja provodi u svetlom delu test kutije u testu svetlost-tama kod životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe.

Svetli kompartman test kutije (27x27x27 cm, sve bele površine) je sa tamnim delom (27x18x27 cm, sve crne površine) povezan otvorom dimenzija 8x8 cm (Elunit, Beograd, Srbija). Životinja se spušta u centar svetlog dela i narednih 5 min video kamerom (Logitech C210, SAD) snima njeno ponašanje. Kao pokazatelj anksioznosti u ovom testu određivano je ukupno vreme koje životinja provodi u svetlom delu test kutije.

Statistička značajnost razlike utvrđena je Mann - Whitney U testom (* $p < 0,05$).

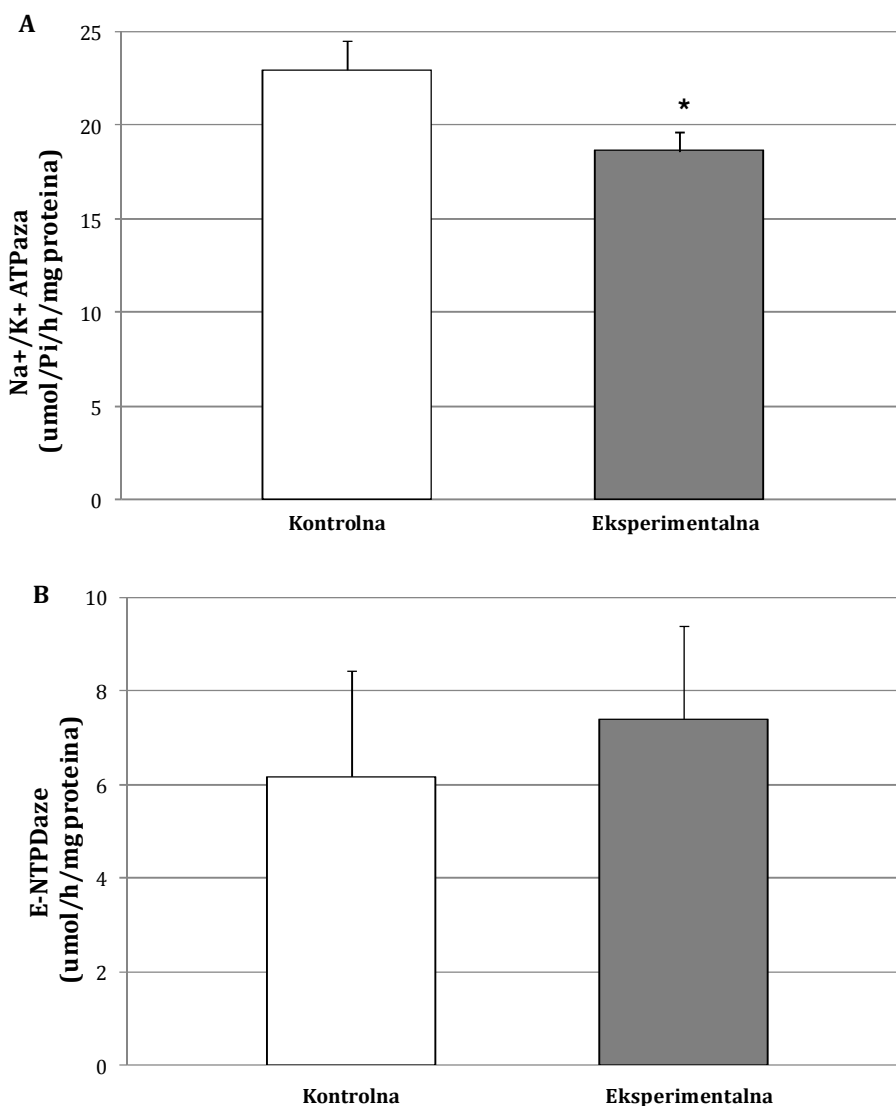
Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.1.4.1.

4.1.5. Biohemijski parametri u mozgu

4.1.5.1. Aktivnost Na⁺/K⁺-ATPaze i E-NTPDaze

Rezultati istraživanja su pokazali statistički značajno smanjenje nivoa aktivnosti Na⁺/K⁺-ATPaze enzima ($p < 0,05$, Slika 4.1.5.1.1A) u mozgu životinja iz eksperimentalne grupe koje su 30 dana bile na režimu ishrane obogaćene metioninom u odnosu na životinje iz kontrolne grupe.

Nije bilo statistički značajne razlike u nivou aktivnosti E-NTPDaze u mozgu životinja u ispitivanim grupama ($p > 0,05$, Slika 4.1.5.1.1B), iako je aktivnost E-NTPDaze bila veća kod životinja iz eksperimentalne, nego kod životinja iz kontrolne grupe.



Slika 4.1.5.1.1. Aktivnost Na⁺/K⁺-ATPaze (**A**) i E-NTPDaze (**B**) u mozgu životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe.

Ukupna ATPazna aktivnost SPM je određena u standardnom medijumu. Neorganski fosfat (Pi) koji se oslobađa tokom ATP hidrolize se meri spektrofotometrijski. Aktivnost koja se dobija u odsustvu NaCl i KCl se pripisuje E-NTPDazi. Aktivnost Na⁺/K⁺-ATPaze se izračunava kao razlika ukupne ATPazne aktivnosti (dobijene u prisustvu Na⁺, K⁺ i Mg²⁺ jona) i aktivnosti E-NTPDaze. Rezultati su izraženi kao srednja specifična enzimaska aktivnost ± SE u jedinicama μmol neorganskog fosfata oslobođenog po mg proteina za 1h.

Statistička značajnost razlika utvrđena je primenom t testa (*p<0,05).

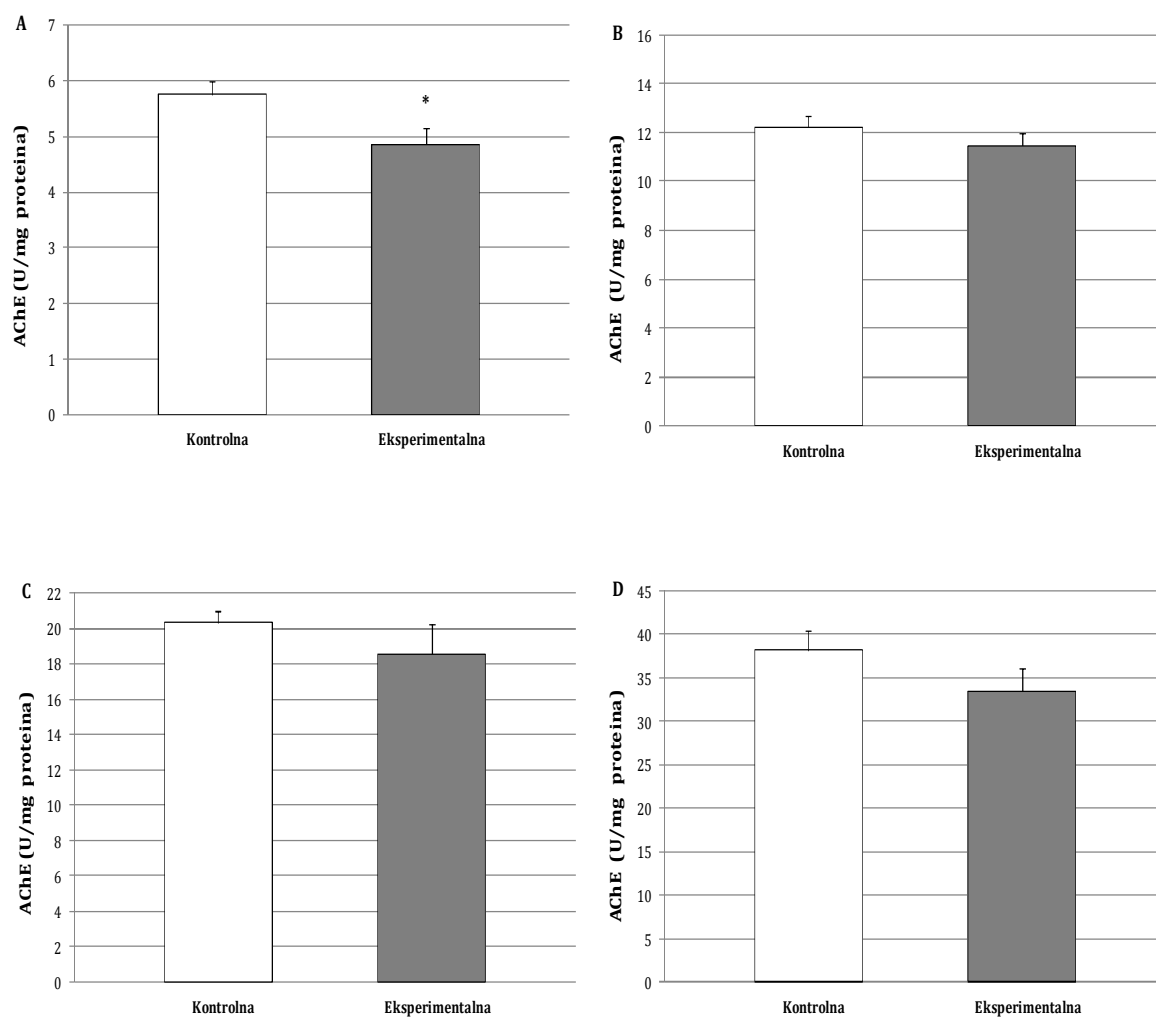
4.1.5.2. Aktivnost acetilholinesteraze

Rezultati istraživanja su pokazali statistički značajno smanjenje nivoa aktivnosti enzima acetilholinesteraze ($p < 0,05$, Slika 4.1.5.2.1A) u korteksu životinja iz eksperimentalne grupe koje su 30 dana bile na režimu ishrane obogaćene metioninom u odnosu na životinje iz kontrolne grupe.

Nije bilo statistički značajne razlike u nivou aktivnosti enzima acetilholinesteraze u hipokampusu životinja u ispitivanim grupama ($p > 0,05$, Slika 4.1.5.2.1B), iako je aktivnost acetilholinesteraze bila manja kod životinja iz eksperimentalne, nego kod životinja iz kontrolne grupe.

Iako je aktivnost acetilholinesteraze bila manja u talamusu kod životinja iz eksperimentalne, nego kod životinja iz kontrolne grupe, nije bilo statistički značajne razlike u nivou aktivnosti ovog enzima u talamusu životinja u ispitivanim grupama ($p > 0,05$, Slika 4.1.5.2.1C),

U nc. caudatusu životinja nije bilo statistički značajne razlike u nivou aktivnosti enzima acetilholinesteraze u ispitivanim grupama ($p > 0,05$, Slika 4.1.5.2.1D), iako je aktivnost acetilholinesteraze bila manja kod životinja iz eksperimentalne, nego kod životinja iz kontrolne grupe.



Slika 4.1.5.2.1. Aktivnost acetilholinesteraze (AChE) u korteksu (A), hipokampusu (B), talamusu (C) i nc. caudatusu (D) životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe.

Tokom 30 dana životinje iz kontrolne grupe dobijale su standardnu hranu, a životinje iz eksperimentalne grupe hranu sa duplo većim sadržajem metionina (hipermetoninska dijeta). Aktivnost AChE je određivana u homogenatu spektrofotometrijski metodom po Ellmanu et al (1961.) čiji princip je da acetilholinesteraza razlaže acetilholin jodid čiji se produkt razlaganja vezuje za DTNB) i nastaje žuto obojeni kompleks.

Statistička značajnost razlika utvrđena je primenom t testa (* $p < 0,05$).

4.1.5.3. Oksidativni stres

Nivo lipidne peroksidacije meren preko nivoa malondialdehida (MDA), aktivnost enzima superoksid dizmutaze (SOD) i katalaze (CAT), količina redukovanog glutationa i aktivnost glutation reduktaze (GR) i glutation peroksidaze (GPx), određeni su u strukturama mozga životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe 31. dana od započinjanja hipermetioninske ishrane. Analizirane su vrednosti ovih parametara u korteksu, hipokampusu, talamusu i nc. caudatusu.

Rezultati istraživanja su pokazali statistički značajno povećanje nivoa lipidne peroksidacije ($p < 0,05$, Slika 4.1.5.3.1A) u korteksu životinja iz eksperimentalne grupe koje su 30 dana bile na režimu ishrane obogaćene metioninom u odnosu na životinje iz kontrolne grupe. Nije bilo statistički značajne razlike u nivou lipidne peroksidacije u hipokampusu životinja u ispitivanim grupama ($p > 0,05$, Slika 4.1.5.3.1B). Takođe, kada je u pitanju talamus, nije bilo statistički značajne razlike u nivou lipidne peroksidacije u ispitivanim grupama ($p > 0,05$, Slika 4.1.5.3.1C). Statistički značajno povećanje ($p < 0,05$) nivoa lipidne peroksidacije nađeno je u nc. caudatusu životinja iz grupe na ishrani obogaćenoj metioninom u odnosu na životinje iz kontrolne grupe (Slika 4.1.5.3.1D).

Aktivnost enzima SOD nije bila statistički značajno različita u korteksu životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe ($p > 0,05$, Slika 4.1.5.3.2A). Režim ishrane obogaćene metioninom primenjen u ovom istraživanju tokom 30 dana je doveo do porasta aktivnosti enzima SOD u hipokampusu, talamusu i nc. caudatusu pacova, ali opservirane razlike nisu bile statistički značajne u poređenju sa vrednostima izmerenim u kontrolnoj grupi životinja ($p > 0,05$, Slika 4.1.5.3.2B-D).

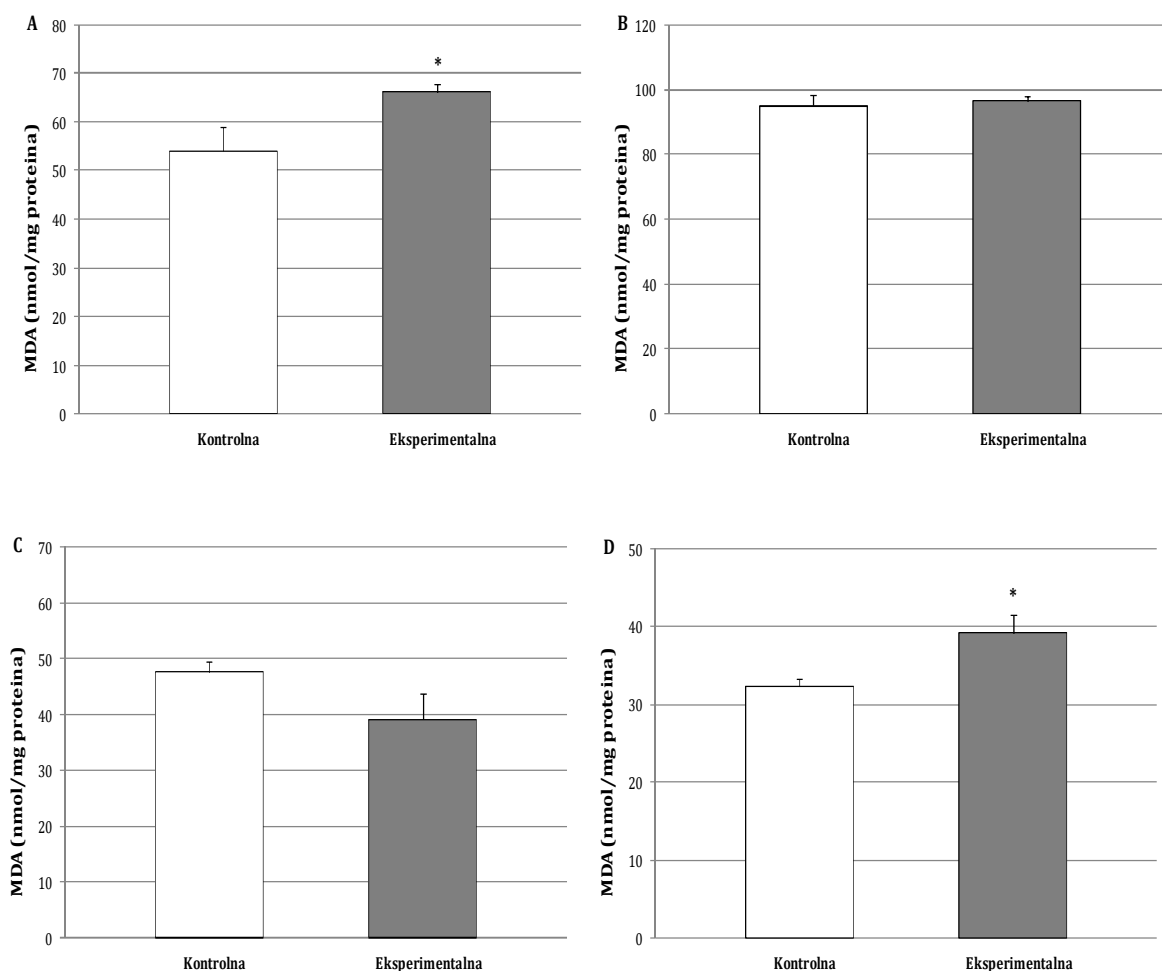
Kada je u pitanju aktivnost enzima CAT u ispitivanim grupama dobijeni su sledeći rezultati. Statistički značajno povećanje aktivnosti katalaze ($p < 0,05$, Slika 4.1.5.3.3A) utvrđeno je u korteksu životinja iz eksperimentalne grupe koje su bile na režimu ishrane obogaćene metioninom u odnosu na životinje iz kontrolne grupe. Aktivnost ovog enzima je bila statistički značajno povećana ($p < 0,05$) u hipokampusu životinja iz grupe na ishrani obogaćenoj metioninom u odnosu na

životinje iz kontrolne grupe (Slika 4.1.5.3.3B). Sem toga, u talamusu životinja iz grupe na hipermetioninskoj ishrani u odnosu na životinje iz kontrolne grupe nađeno je visoko statistički značajno povećanje ($p < 0,01$) aktivnosti CAT (Slika 4.1.5.3.3.C). Međutim, nije bilo statistički značajne razlike u nivou aktivnosti ovog enzima u nc. caudatusu životinja u ispitivanim grupama ($p > 0,05$, Slika 4.1.5.3.4D).

Sadržaj GSH u korteksu je bio veći u eksperimentalnoj u odnosu na kontrolnu grupu životinja, ali opservirana razlika nije bila statistički značajna ($p > 0,05$, Slika 4.1.5.3.4A). Visoko statistički značajno povećanje sadržaja GSH izmereno je u hipokampusu životinja iz eksperimentalne grupe u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,01$, Slika 4.1.5.3.4B). Sem toga, sadržaj GSH bio je statistički značajno veći u talamusu i nc. caudatusu životinja iz eksperimentalne grupe u odnosu na kontrolne životinje ($p < 0,05$, Slika 4.1.5.3.4C i D).

Aktivnost GR nije bila statistički značajno različita u korteksu životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe ($p > 0,05$, Slika 4.1.5.3.5A). Nije bilo statistički značajne razlike u aktivnosti ovog enzima ni u hipokampusu životinja iz ovih grupa ($p > 0,05$, Slika 4.1.5.3.5B). Do smanjenja aktivnosti GR došlo je u talamusu životinja iz eksperimentalne grupe u odnosu na kontrolnu grupu, ali opservirana razlika nije bila statistički značajna ($p > 0,05$, Slika 4.1.5.3.5C). Sa druge strane, uočeno povećanje aktivnosti GR u nc. caudatusu životinja iz eksperimentalne grupe takođe nije bilo statistički značajno ($p > 0,05$, Slika 4.1.5.3.5D).

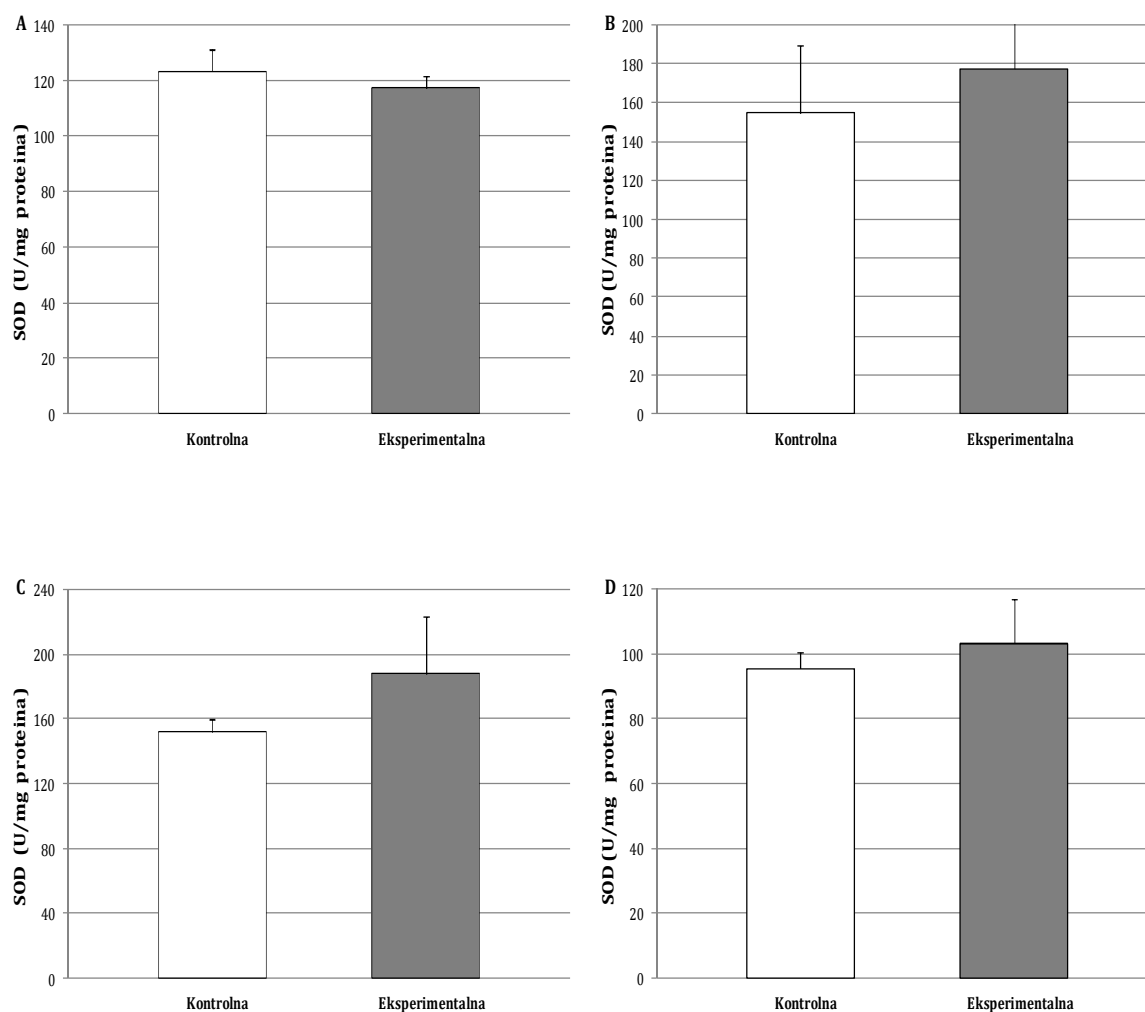
Aktivnost GPx je bila statistički značajno veća u korteksu životinja iz eksperimentalne grupe u odnosu na kontrolnu grupu životinja ($p < 0,05$, Slika 4.1.5.3.6A). Nije bilo statistički značajne razlike u aktivnosti ovog enzima u hipokampusu životinja iz ovih grupa ($p > 0,05$, Slika 4.1.5.3.6B). Uočeno povećanje aktivnosti GR u talamusu životinja iz eksperimentalne grupe je bilo statistički značajno ($p < 0,05$, Slika 4.1.5.3.6C). Međutim, uočeno smanjenje aktivnosti GR u nc. caudatusu životinja iz eksperimentalne grupe nije bilo statistički značajno ($p > 0,05$, Slika 4.1.5.3.6D).



Slika 4.1.5.3.1. Nivo lipidne peroksidacije u korteksu (A), hipokampusu (B), talamusu (C) i nc. caudatusu (D) životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe.

Tokom 30 dana životinje iz kontrolne grupe dobijale su standardnu hranu, a životinje iz eksperimentalne grupe hranu sa duplo većim sadržajem metionina (hipermetioninska dijeta). Nivo lipidne peroksidacije je određen na osnovu koncentracije malondialdehida (MDA) u sinaptosomalnoj frakciji pomenutih struktura mozga. Rezultati su izraženi kao nmol MDA po miligramu proteina.

Statistička značajnost razlika utvrđena je primenom t testa (* $p < 0,05$).

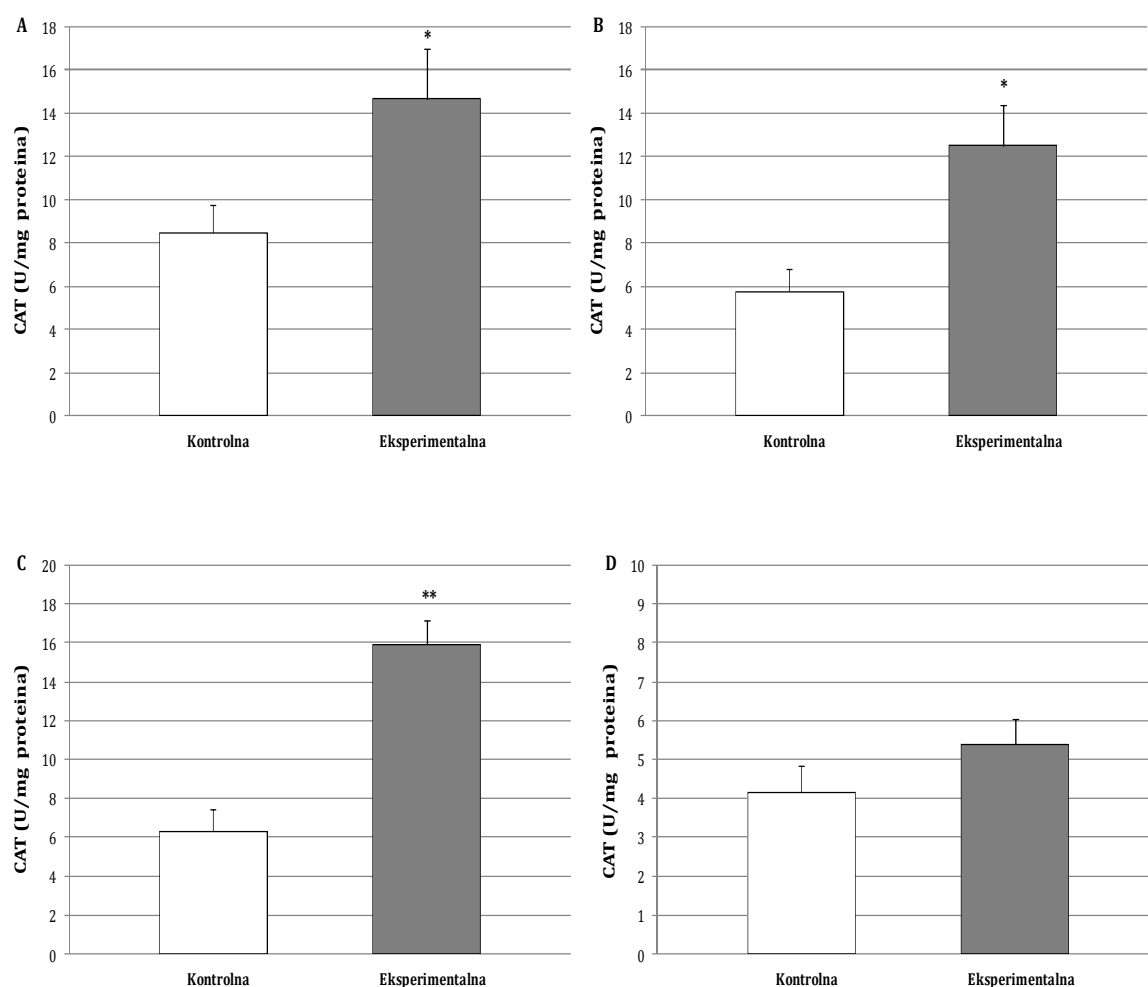


Slika 4.1.5.3.2. Aktivnost enzima superoksid dizmutaze (SOD) u korteksu (A), hipokampusu (B), talamusu (C) i nc. caudatusu (D) životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe.

Aktivnost SOD je određivana kao procenat inhibicije autooksidacije adrenalina u baznoj sredini.

Statistička značajnost razlika utvrđena je primenom t testa (* $p < 0,05$).

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.1.5.3.1.

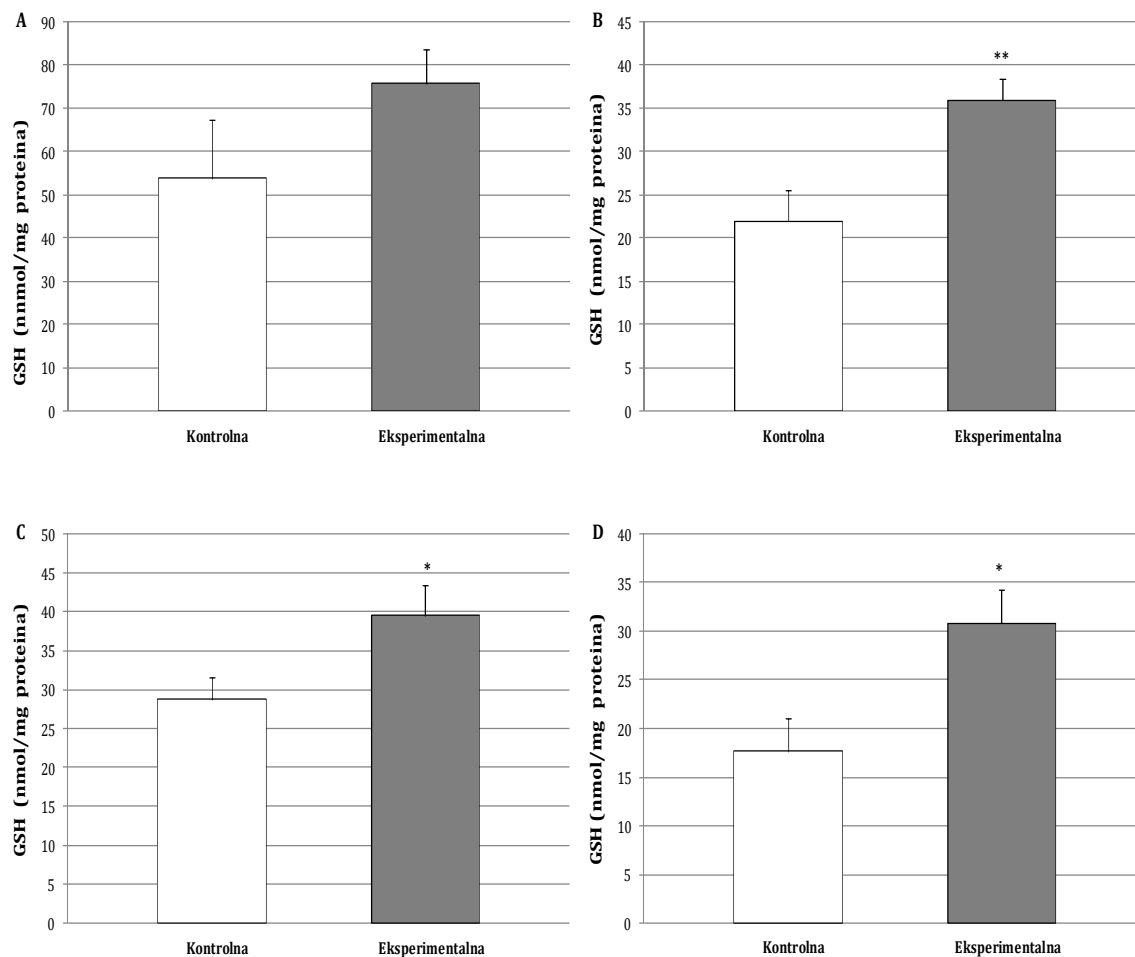


Slika 4.1.5.3.3. Aktivnost enzima katalaze (CAT) u korteksu (A), hipokampusu (B), talamusu (C) i nc. caudatusu (D) životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe.

Aktivnost CAT je određivana na osnovu stvaranja stabilnih kompleksa vodonik peroksida sa amonijum molibdatom čija je apsorbancija merena spektrofotometrijski.

Statistička značajnost razlika utvrđena je primenom t testa (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.1.5.3.1.

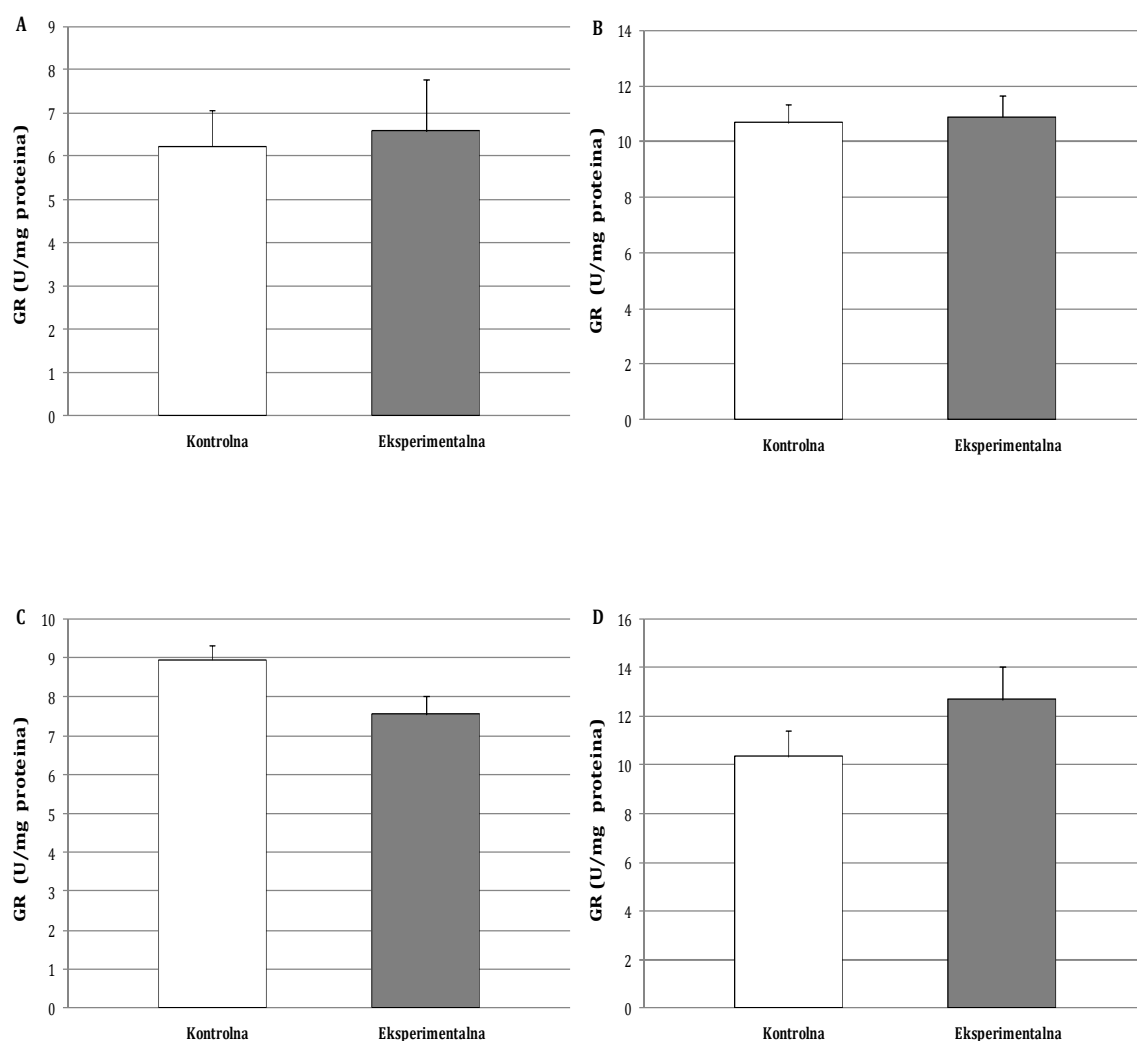


Slika 4.1.5.3.4. Sadržaj redukovanog glutationa (GSH) u korteksu (A), hipokampusu (B), talamusu (C) i nc. caudatusu (D) životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe.

Sadržaj GSH određivan je spektrofotometrijski upotrebom 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoeve kiseline koji reaguje sa alifatičnim tiol jedinjenjima pri pH 8.0 stvarajući p-nitrofenol anjon žute boje.

Statistička značajnost razlika utvrđena je primenom t testa (* $p < 0,05$).

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.1.5.3.1.

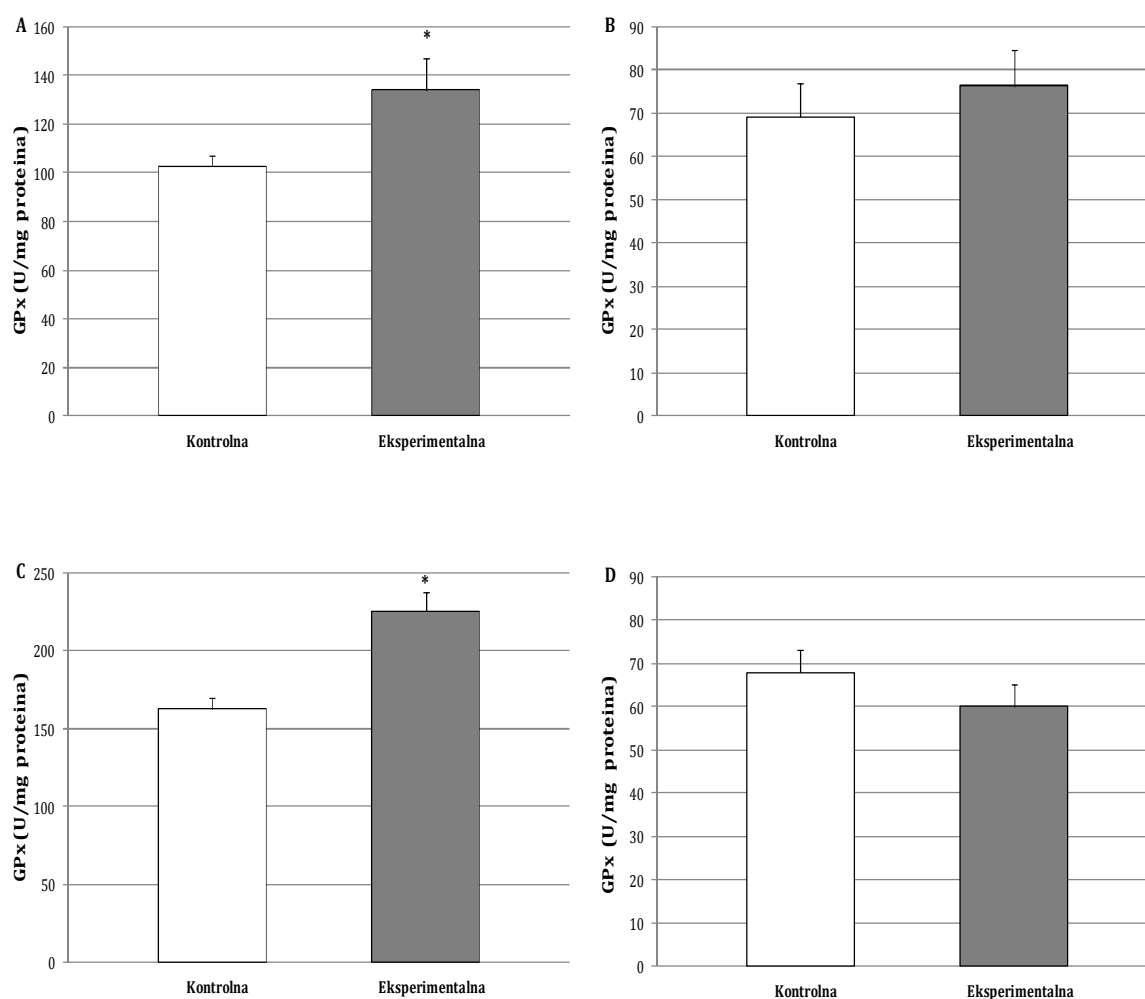


Slika 4.1.5.3.5. Aktivnost enzima glutation reduktaze (GR) u korteksu (A), hipokampusu (B), talamusu (C) i nc. caudatusu (D) životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe.

Određivanje aktivnost GR vršeno je po metodi koja se zasniva na reakciji oksidovanog glutationa sa NADPH u prisustvu GR iz uzorka.

Statistička značajnost razlika utvđena je primenom t testa (* $p < 0,05$).

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.1.5.3.1.



Slika 4.1.5.3.6. Aktivnost enzima glutation peroksidaze (GPx) u korteksu (**A**), hipokampusu (**B**), talamusu (**C**) i nc. caudatusu (**D**) životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe.

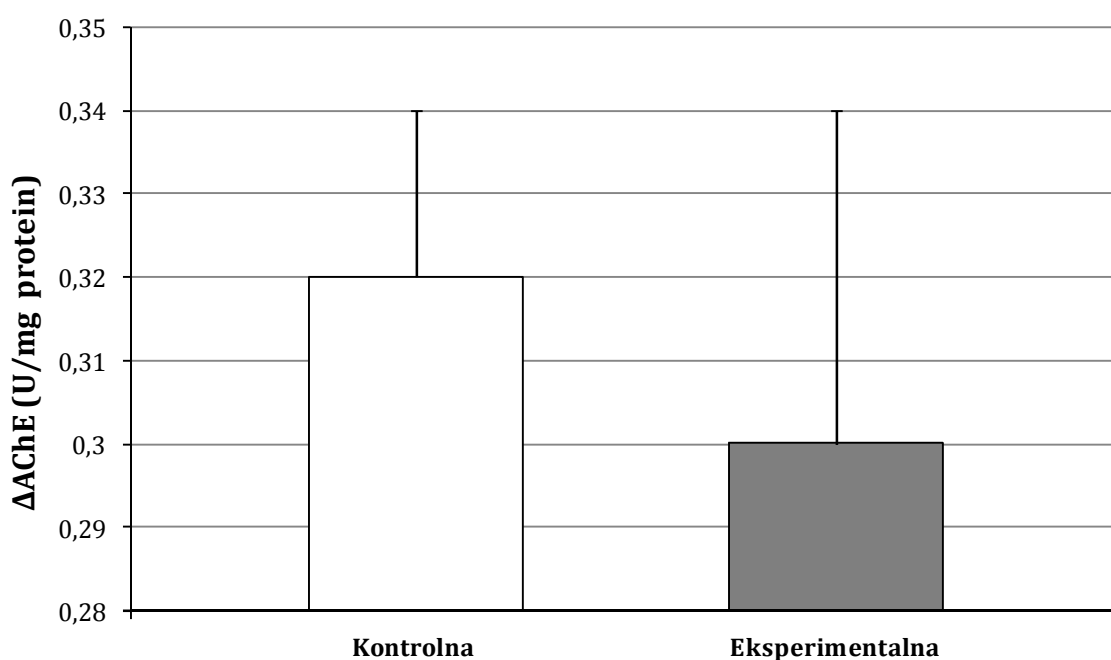
Određivanje aktivnost GPx vršeno je po metodi koja se zasniva na oksidaciji GSH sa iskorišćavanjem NADPH u reakciji koju katalizuje enzim glutation reduktaza.

Statistička značajnost razlika utvrđena je primenom t testa (* $p < 0,05$).

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.1.5.3.1.

4.1.6. Biohemijski parametri u srcu

Iako je aktivnost enzima acetilholinesteraze bila manja u srcu kod životinja iz eksperimentalne grupe, koje su 30 dana bile na režimu ishrane obogaćene metioninom u odnosu na životinje iz kontrolne grupe, opservirana razlika nije bila statistički značajna ($p > 0,05$, Slika 4.1.6.1),



Slika 4.1.6.1. Aktivnost acetilholinesteraze (AChE) u srcu životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe.

Tokom 30 dana životinje iz kontrolne grupe dobijale su standardnu hranu, a životinje iz eksperimentalne grupe hranu sa duplo većim sadržajem metionina (hipermetioninska dijeta). Aktivnost AChE je određivana u homogenatu spektrofotometrijski metodom po Ellmanu et al. (1961.) čiji princip je da acetilholinesteraza razlaže acetilholin jodid čiji se produkt razlaganja vezuje za DTNB) i nastaje žuto obojeni kompleks.

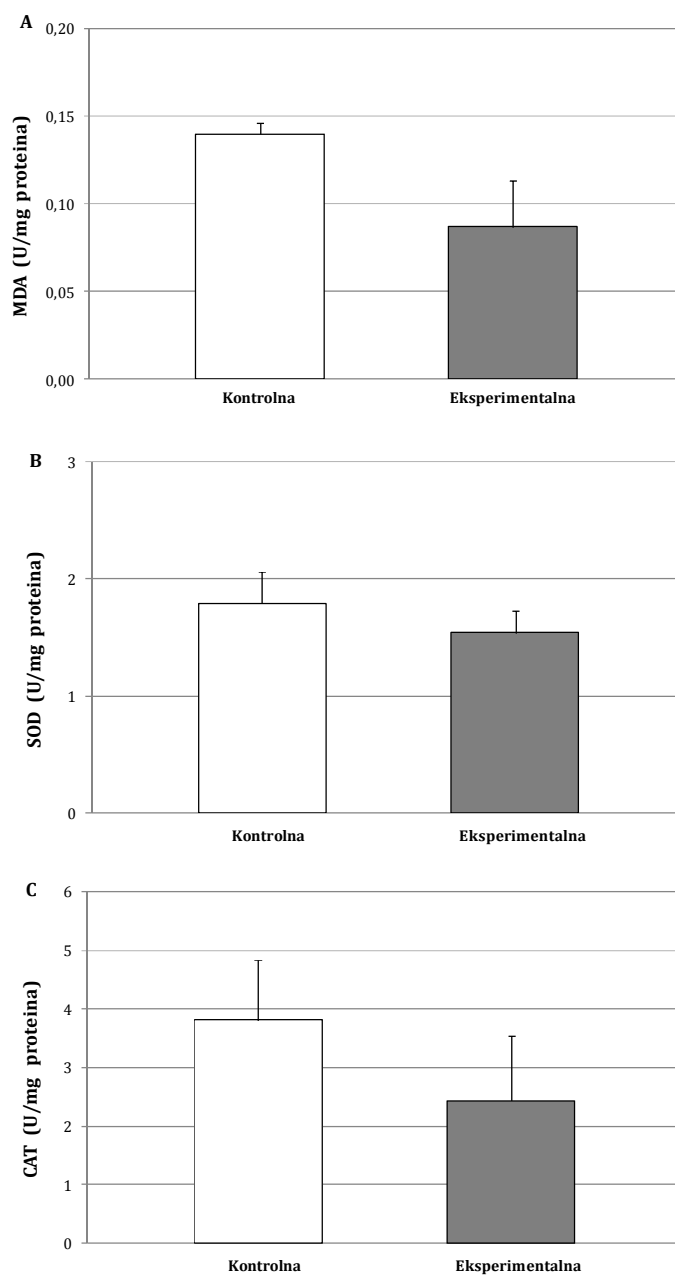
Statistička značajnost razlika utvđena je primenom t testa ($*p < 0,05$).

U cilju procene oksidativnog statusa u srcu nakon hipermetioninske dijeta, određeni su nivo lipidne peroksidacije preko nivoa MDA, aktivnost enzima superoksid dizmutaze (SOD) i katalaze (CAT) u srcu životinja iz ekperimentalne i kontrolne grupe.

Ishrana obogaćena metioninom dovela je do porasta nivoa MDA u eksperimentalnoj grupi životinja u odnosu na kontrolnu grupu, ali uočena razlika nije bila statistički značajna ($p > 0,05$, Slika 4.1.6.2A).

Aktivnost enzima SOD je bila niža u eksperimentalnoj u poređenju sa kontrolnom grupom, ali ovo sniženje aktivnosti nije bilo statistički signifikantno ($p > 0,05$, Slika 4.1.6.2B).

Kada je u pitanju aktivnost enzima CAT konstatuje se sličan trend uticaja hipermetioninske dijeta kao i na aktivnost SOD. Opservirano smanjenje aktivnosti CAT takođe nije bilo statistički značajno ($p > 0,05$, Slika 4.1.6.2C).



Slika 4.1.6.2. Nivo lipidne peroksidacije (A), aktivnost enzima SOD (B) i CAT (C) u srcu životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe.

Nivo lipidne peroksidacije određen je na osnovu koncentracije malondialdehida (MDA). Aktivnost enzima SOD i CAT određene su spektrofotometrijski.

Statistička značajnost razlika utvrđena je primenom t testa (* $p < 0,05$).

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.1.6.1

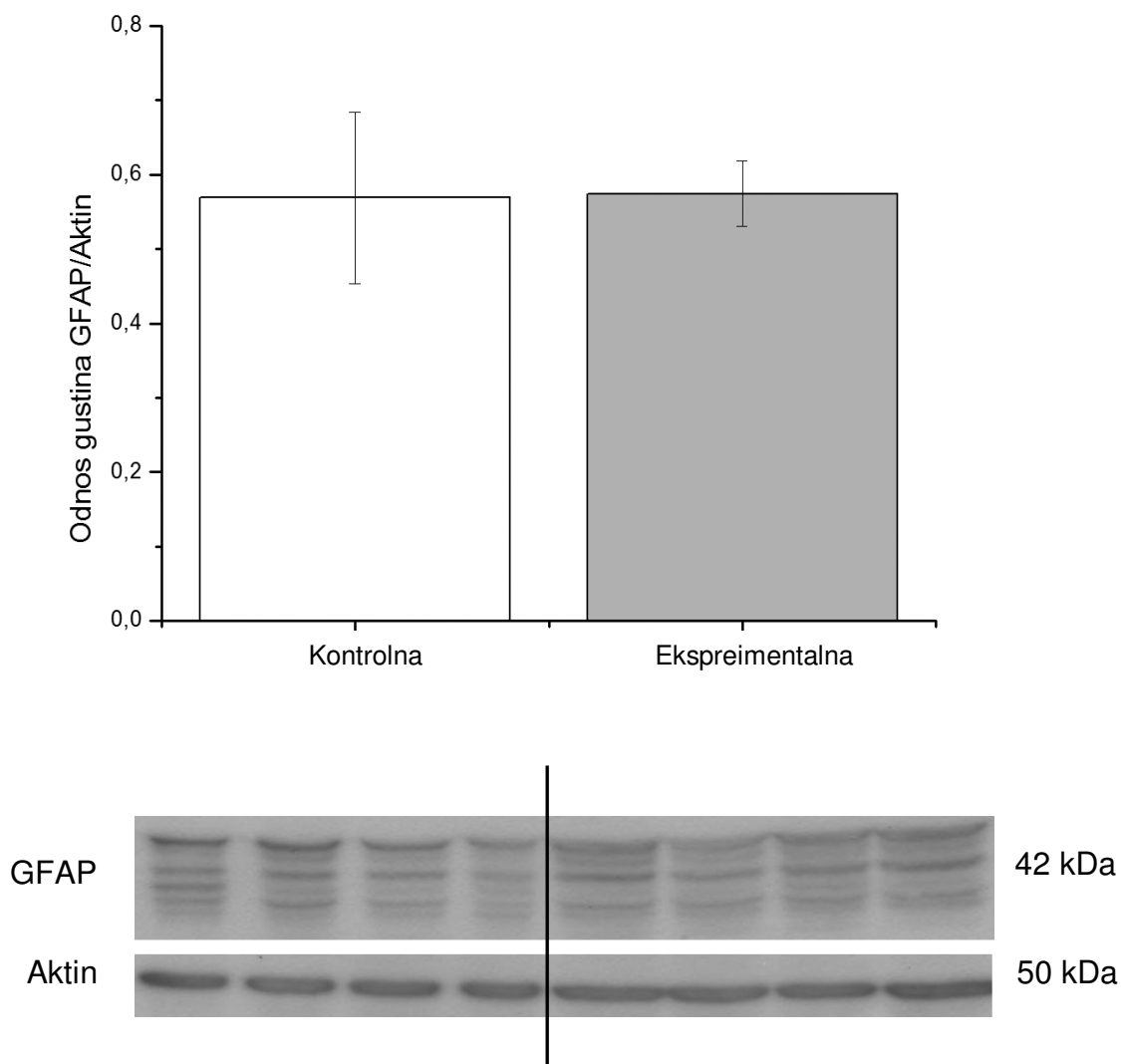
4.1.7. Ekspresija markera pojedinih ćelija u mozgu

Ekspresija glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (GFAP), kao markera astrocita, mijelin oligodendrocitnog glikoproteina (MOG) kao markera oligodendrocita i neuralnog nukleusnog antigena (NeuN) kao markera neurona određivana je tehnikom Western blot-a u korteksu i hipokampusu životinja iz eksperimentalne i kontrolne grupe.

Rezultati kvantitativne analize imunoblotova pokazali su da nije bilo razlike u nivou ekspresije markera astrocita (GFAP) ni u korteksu ($p < 0,05$, Slika 4.1.7.1), ni u hipokampusu ($p < 0,05$, Slika 4.1.7.2) životinja iz eksperimentalne i kontrolne grupe.

Međutim, kvantitativna analize imunoblotova pokazala je da je nivo ekspresije markera oligodendrocita (MOG) bio veći i u korteksu (Slika 4.1.7.3) i u hipokampusu (Slika 4.1.7.4) životinja iz eksperimentalne grupe u odnosu na očitane vrednosti u kontrolnoj grupi životinja, pri čemu je ovo povećanje bilo statistički značajno u korteksu ($p > 0,05$, Slika 4.1.7.3).

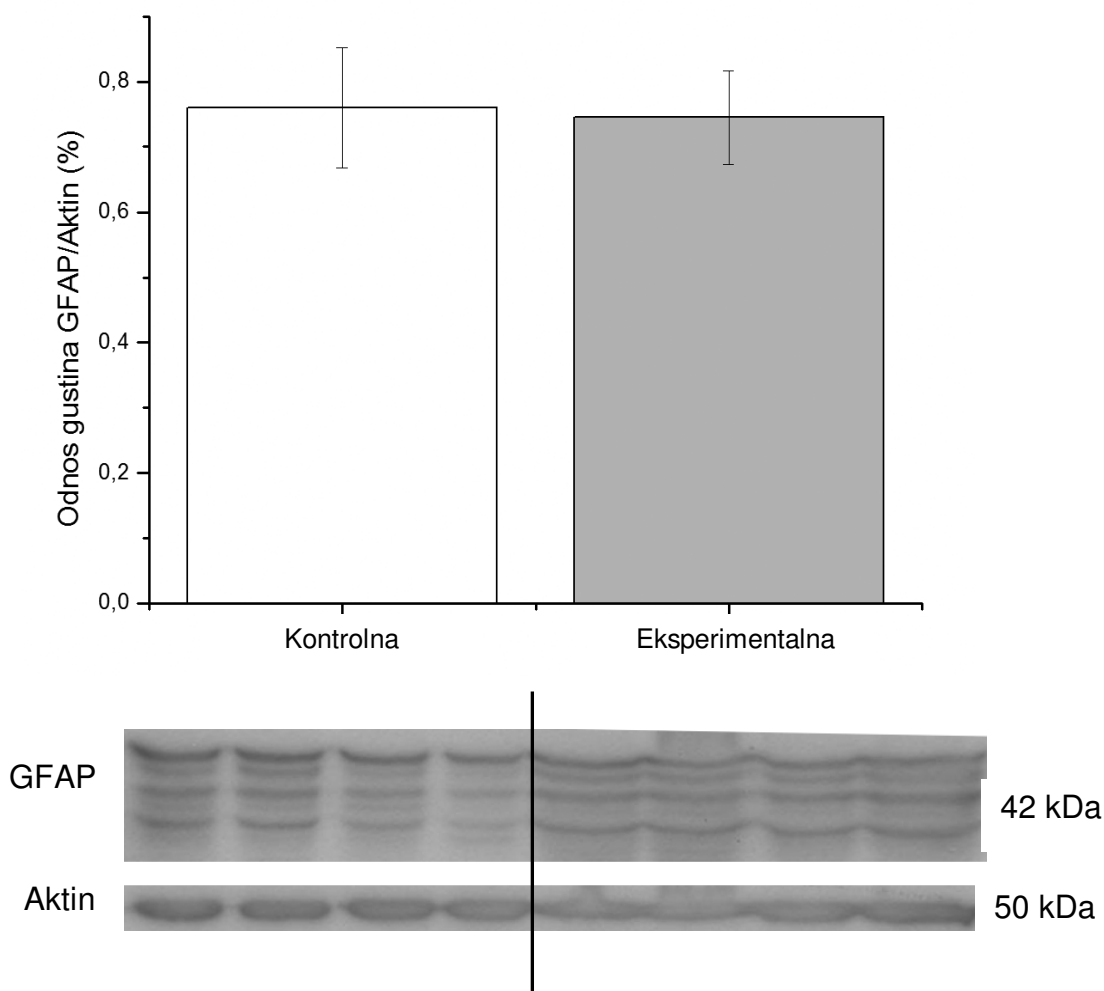
Smanjenje ekspresije markera neurona NeuN u korteksu životinja iz eksperimentalne grupe u odnosu na kontrolnu grupu nije bilo statistički značajno ($p > 0,05$, Slika 4.1.7.5). Međutim, povećanje ekspresije NeuN u hipokampusu životinja iz eksperimentalne grupe u odnosu na kontrolnu grupu je bilo statistički značajno ($p < 0,05$, Slika 4.1.7.6).



Slika 4.1.7.1. Ekspresija glijalnog fibrilarnog kiselog protein (GFAP) u korteksu životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe.

Tokom 30 dana životinje iz kontrolne grupe dobijale su standardnu hranu, a životinje iz eksperimentalne grupe hranu sa duplo većim sadržajem metionina (hipermetoninska dijeta). Nivo ekspresije GFAP određen je primenom tehnike Western blota. Densitometrijska analiza izvršena je korišćenjem softvera *ImageQuant 5.2*. Prikazan je odnos gustine GFAP prema aktinu. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost \pm SD. Gornji panel: rezultati densitometrijske analize. Donji panel: prikaz odgovarajućeg imunoblota.

Statistička značajnost razlika utvrđena je primenom t testa.



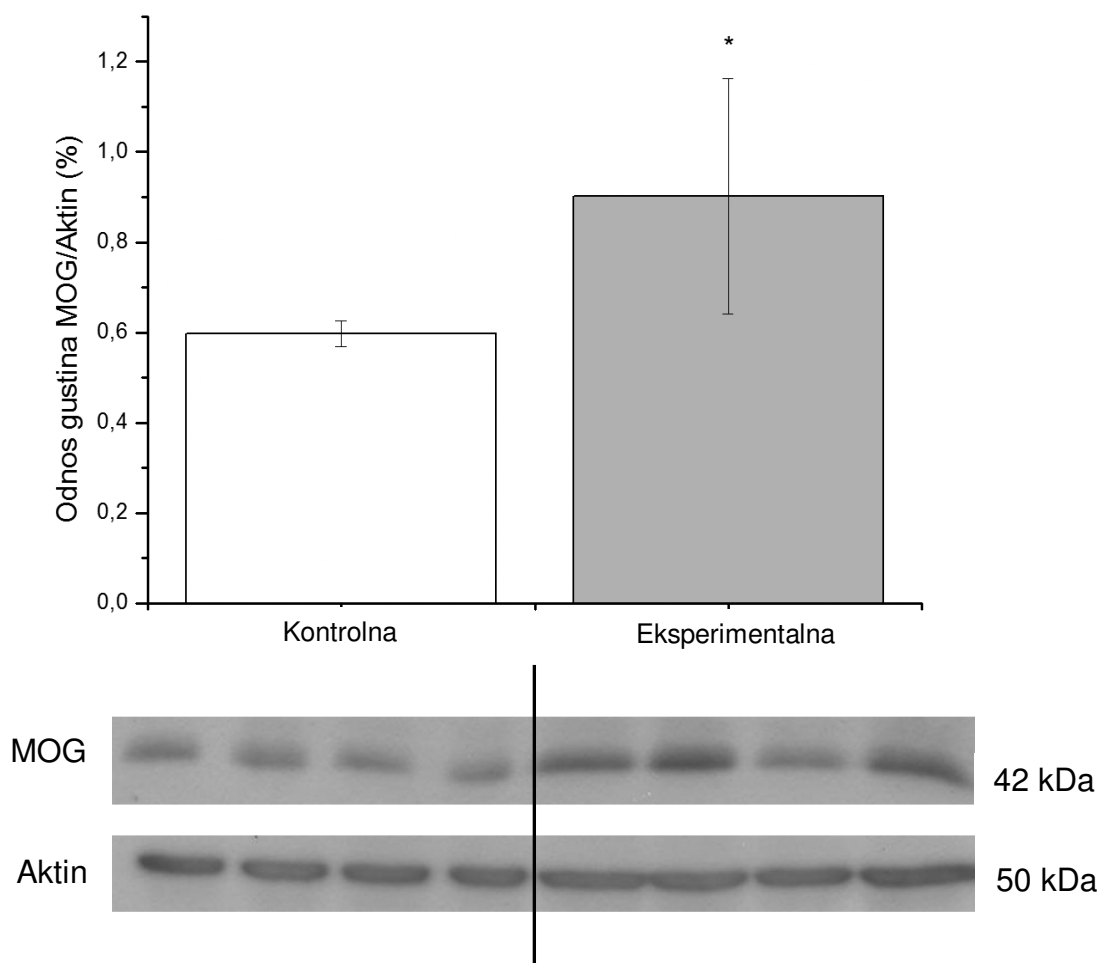
Slika 4.1.7.2. Ekspresija glijalnog fibrilarnog kiselog protein (GFAP) u hipokampusu životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe.

Nivo ekspresije GFAP određen je primenom tehnike Western blota. Densitometrijska analiza izvršena je korišćenjem softvera *ImageQuant 5.2*. Prikazan je odnos gustine GFAP prema aktinu. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost \pm SD.

Gornji panel: rezultati densitometrijske analize. Donji panel: prikaz odgovarajućeg imunoblota.

Statistička značajnost razlika utvrđena je primenom t testa.

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.1.7.1.



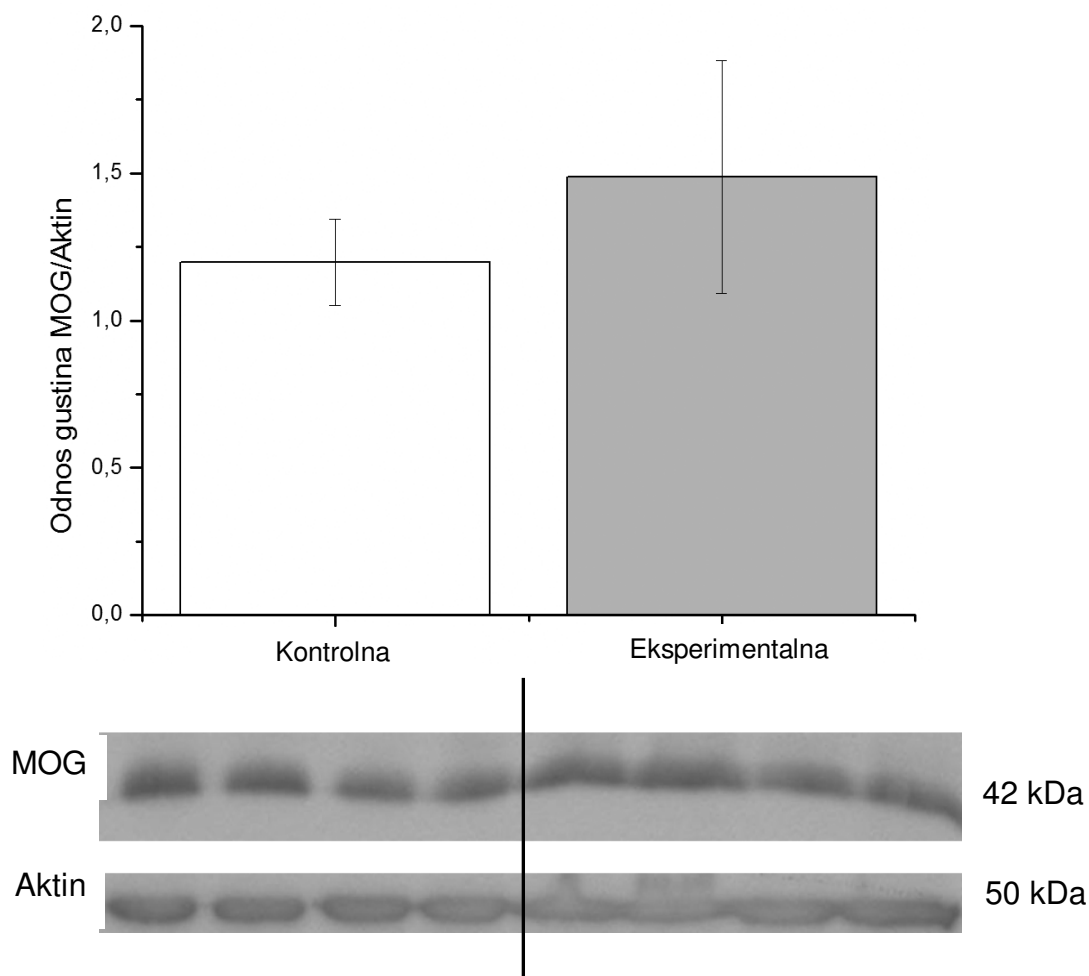
Slika 4.1.7.3. Ekspresija mijelin oligodendrocitnog glikoproteina (MOG) u korteksu životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe.

Nivo ekspresije MOG određen je primenom tehnike Western blota. Denzitometrijska analiza izvršena je korišćenjem softvera *ImageQuant 5.2*. Prikazan je odnos gustine GFAP prema aktinu. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost \pm SD.

Gornji panel: rezultati denzitometrijske analize. Donji panel: prikaz odgovarajućeg imunoblota.

Statistička značajnost razlika utvrđena je primenom t testa (* $p < 0,05$).

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.1.7.1.



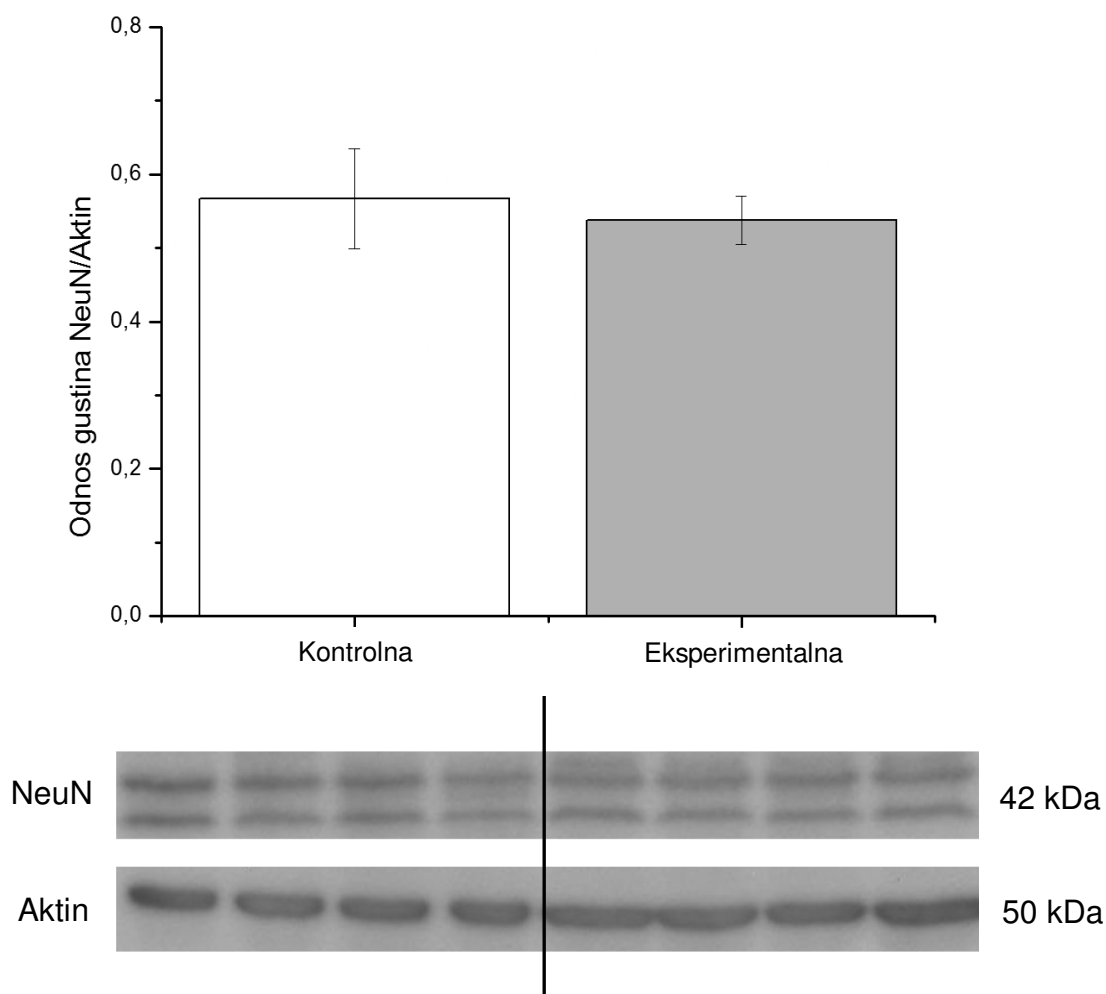
Slika 4.1.7.4. Ekspresija mijelin oligodendrocitnog glikoproteina (MOG) u hipokampusu životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe.

Nivo ekspresije MOG određen je primenom tehnike Western blota. Denzitometrijska analiza izvršena je korišćenjem softvera *ImageQuant 5.2*. Prikazan je odnos gustine GFAP prema aktinu. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost \pm SD.

Gornji panel: rezultati denzitometrijske analize. Donji panel: prikaz odgovarajućeg imunoblota.

Statistička značajnost razlika utvrđena je primenom t testa.

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.1.7.1.



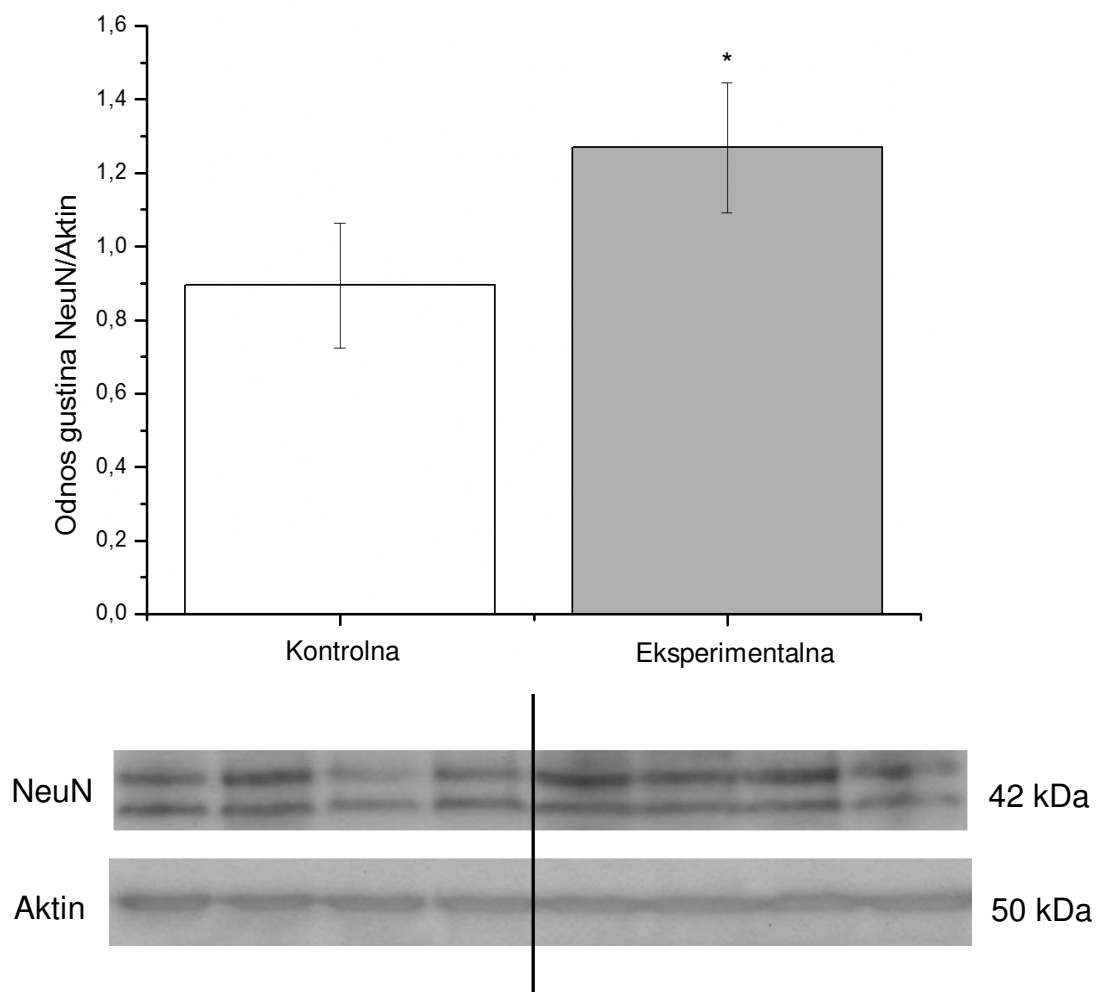
Slika 4.1.7.5. Ekspresija neuralnog nukleusnog antigena (NeuN) u korteksu životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe.

Nivo ekspresije NeuN određen je primenom tehnike Western blota. Denzitometrijska analiza izvršena je korišćenjem softvera *ImageQuant 5.2*. Prikazan je odnos gustine GFAP prema aktinu. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost \pm SD.

Gornji panel: rezultati denzitometrijske analize. Donji panel: prikaz odgovarajućeg imunoblota.

Statistička značajnost razlika utvrđena je primenom t testa.

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.1.7.1.



Slika 4.1.7.6. Ekspresija neuralnog nukleusnog antigena (NeuN) u hipokampusu životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe.

Nivo ekspresije NeuN određen je primenom tehnike Western blota. Densitometrijska analiza izvršena je korišćenjem softvera *ImageQuant 5.2*. Prikazan je odnos gustine GFAP prema aktinu. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost \pm SD.

Gornji panel: rezultati densitometrijske analize. Donji panel: prikaz odgovarajućeg imunoblota.

Statistička značajnost razlika utvrđena je primenom t testa (* $p < 0,05$).

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.1.7.1.

4.2. Efekti selektivne deprivacije REM spavanja

4.2.1. Parametri konvulzivnog ponašanja

Životinje iz CH grupe su nakon administracije subkonvulzivne doze homocistein tiolaktona (5,5 mmol/kg, i.p.) odgovorile blagim konvulzivnim napadima. Pokazale su malu incidencu napada (33, 3%), dug latentni period (90 [46-90] min), mali broj konvulzivnih epizoda po pacovu (0 [0-2]), a sam intenzitet napada nije bio veći od gradus 2 (Slika 4.2.1.1-2.).

Statistički značajno povećanje incidence napada dobijeno je u SH grupi u odnosu na CH grupu ($p < 0,05$; Slika 4.2.1.1.). Takođe, incidenca napada je bila veća u SH (90%) u odnosu na LH grupu (50%), iako razlika nije bila statistički značajna.

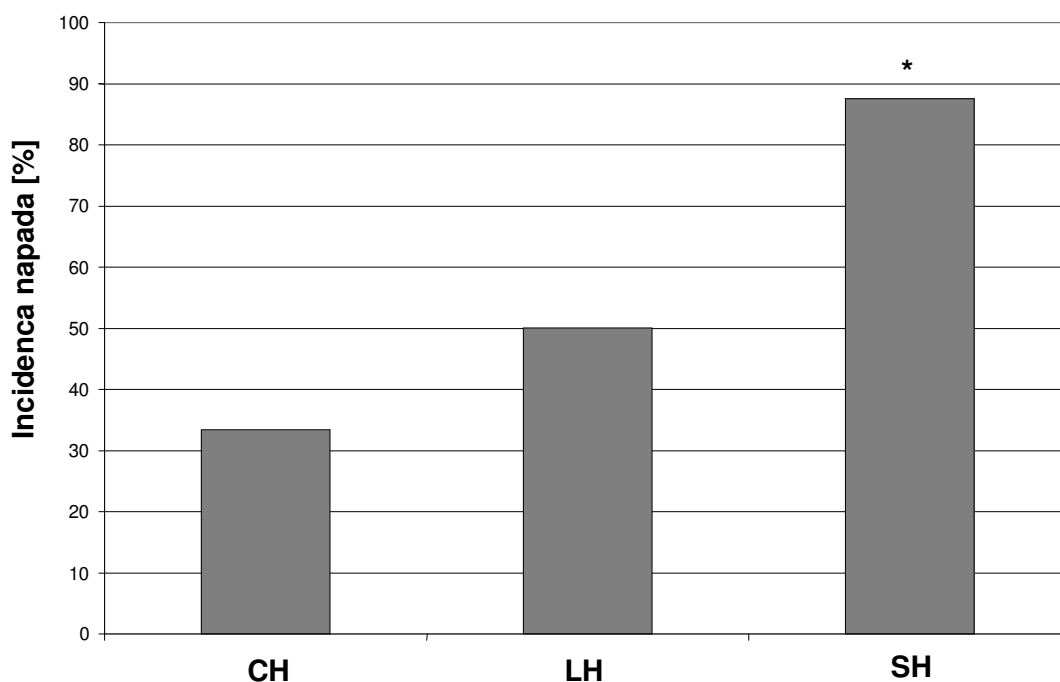
Latentni period do prvog konvulzivnog napada statistički je značajno bio kraći kod životinja iz SH grupe u odnosu na CH grupu ($p < 0,05$, Slika 4.2.1.2A). Životinje iz LH grupe nisu pokazale statistički značajnu promenu dužine latentnog perioda u odnosu na one iz CH grupe. Medijana latentnog perioda za životinje iz SH, LH i CH grupe iznosila je redom 40, 75 i 90 min.

Broj konvulzivnih epizoda po pacovu je bio statistički značajno povećan u grupi SH i u odnosu na CH, i u odnosu na LH grupu ($p < 0,05$; Slika 4.2.1.2B). Za ovaj parametar konvulzivnog ponašanja nije bilo statistički značajne razlike između LH i CH grupe. Medijana broja konvulzivnih epizoda za životinje iz SH grupe iznosila je čak 3, a za životinje iz LH i CH grupe 1, odnosno 0.

Intenzitet konvulzivne epizode nije bio statistički značajno promenjen ni u jednoj grupi u odnosu na CH grupu. Nije postojala statistički značajna razlika ni između SH i LH grupe ($p > 0,05$; Slika 4.2.1.2C), iako je u grupi SH maksimalni intenzitet napada bio gradusa 4, a u grupama LH i CH gradusa 2.

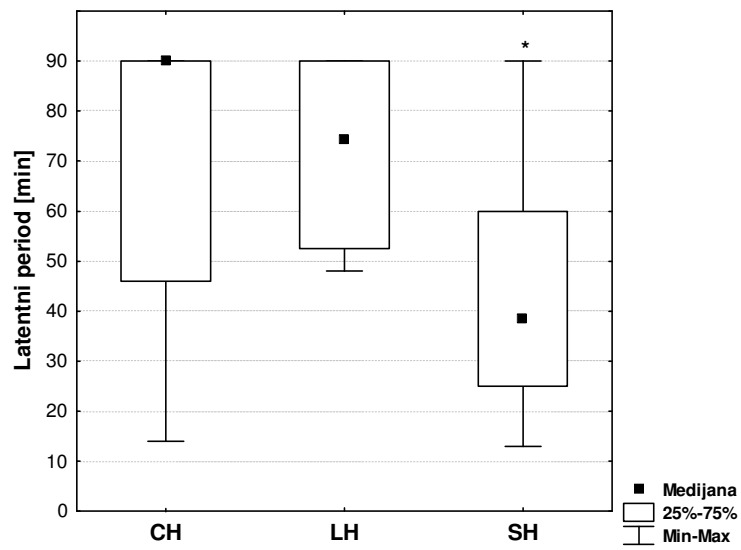
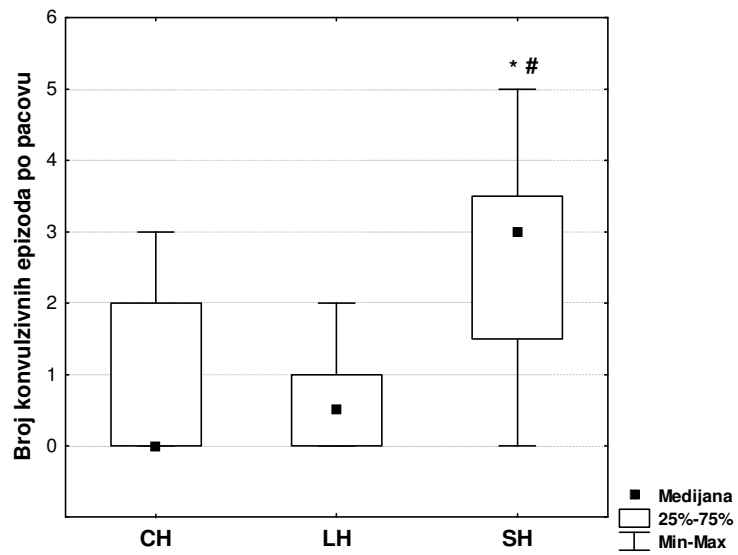
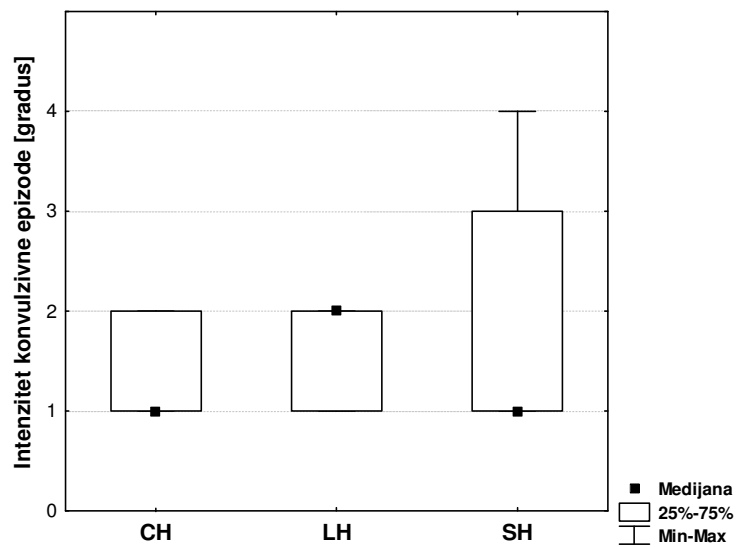
Letalni ishod je opserviran kod više od polovine životinja iz SH grupe (62,5%) i opservirana razlika nakon 90 min i 24h od administracije homocistein tiolaktona je bila statistički značajna u poređenju sa CH (bez letalnog ishoda, $p < 0,05$) i LH grupom (bez letalnog ishoda, $p < 0,05$) (Tabela 4.2.1.1.).

Životinje kojima je nakon ekvivalentnog tretmana u kavezu, velikoj i maloj platformi umesto homocistein tiolaktona administriran 0,9% NaCl (grupe Cc, Lc i Sc) nisu pokazale znake konvulzivnog ponašanja, niti je u ovim grupama bilo letalnog ishoda.



Slika 4.2.1.1. Uticaj selektivne deprivacije REM spavanja na incidencu konvulzivnih napada izazvanih homocistein tiolaktonom. Deprivacija je sprovedena metodom platforme. Životinje su podeljene u grupe: **CH** (suva kontrola); **LH** (velika platforma, stres kontrola); **SH** (mala platforma, deprivacija REM spavanja), Cc, Lc i Sc. Posle 72 h boravka u odgovarajućim eksperimentalnim uslovima svim životinjama iz CH, LH i SH grupe je administrirana subkonvulzivna doza D,L homocistein tiolaktona od 5,5 mg/kg, i.p, a životinjama iz Cc, Lc i Sc 0,9% NaCl, i.p. Incidenca – procenat životinja koje konvulziraju u odnosu na ukupan broj životinja u grupi izražen u procentima.

Statistička značajnost razlika u incidenci napada utvrđena je Fišerovim testom tačne verovatnoće (* $p < 0,05$ vs. CH).

A**B****C**

Slika 4.2.1.2. Uticaj selektivne deprivacije REM spavanja na latentni period (A), broj konvulzivnih epizoda izazvanih homocistein tiolaktonom po pacovu (B) i njihov intenzitet (C). Latentni period je definisan kao vreme od administracije homocistein tiolaktona do razvoja prvog konvulzivnog odgovora, pri čemu životinje koje ne konvulziraju imaju latencu 90 min. Intenzitet napada procenjivan je na osnovu deskriptivne skale sa gradusima od 0 do 4: 0 - bez konvulzivnog odgovora; 1 -klimanje glavom i grčeviti trzaji donje vilice, 2 -mioklonički trzaji celog tela (reakcija vruće ploče), klonus prednjih i propinjanje na zadnje ekstremitete (pozicija kengura); 3 - progresija u generalizovane kloničke konvulzije praćene toničkom ekstenzijom prednjih i zadnjih ekstremiteta i repa; 4 - status epilepticus.

Statistička značajnost razlika između grupa utvrđena je Kruskal –Wallis ANOVA i Mann – Whitney U testom (*p<0.05 vs. CH and #p<0.05 vs. LH).

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.2.1.1.

Tabela 4.2.1.1. Letalitet registrovan u eksperimentalnim grupama 90 min i 24h nakon administracije homocistein tiolaktona.

Letalitet (%)	Eksperimentalne grupe		
	CH	LH	SH
Posle 90 min	0	0	62,50*,#
Posle 24h	0	0	75,00*,#

Letalitet -procenat životinja sa letalnim ishodom u grupi.

Statistička značajnost razlika između grupa utvrđena je Fišerovim testom tačne verovatnoće (*p<0.05 vs. CH i #p<0.05 vs. LH).

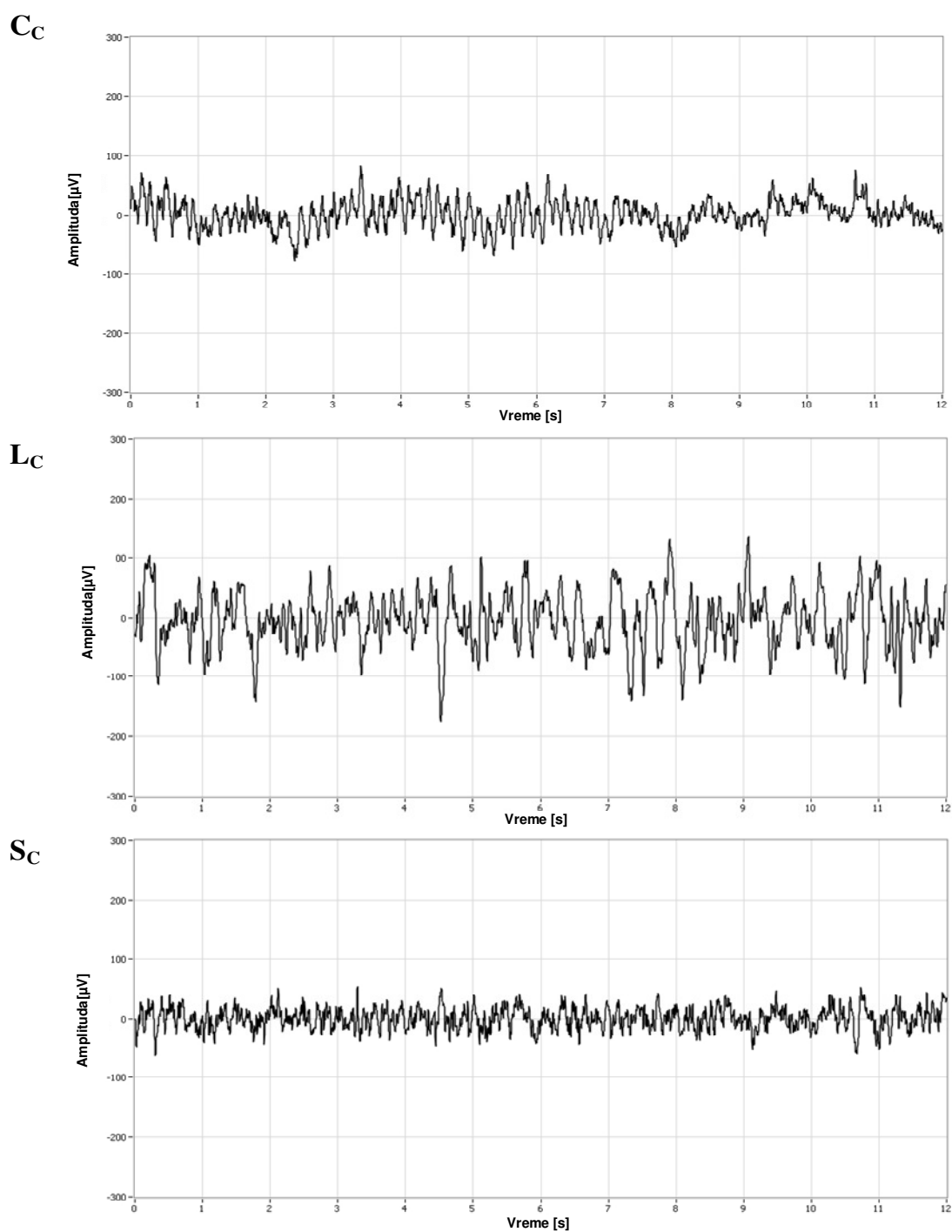
Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.2.1.1.

4.2.2. EEG nalaz

U EEG aktivnosti životinja iz Cc, Lc i Sc grupe nakon administracije 0,9% NaCl nije bilo znakova iktalne aktivnosti. Životinje iz Cc grupe pokazivale su normalnu, bazalnu EEG aktivnost (Slika 4.2.2.1 Cc) koja odgovara eksplorativnom ponašanju, dok su u EEG-u životinja iz Lc i Sc grupe dominirali karakteristični EEG markeri spavanja i to: sporotalasnog (delta aktivnost) u Lc i REM spavanja (desinhronizacija EEG-a) u Sc grupi (Slika 4.2.2.1 Lc i Sc).

EEG aktivnost životinja iz CH grupe po administraciji homocistein tiolaktone karakterisala je sporadična pojava klastera šiljak-talas pražnjenja (SWD). Ova karakteristična iktalna aktivnost registrovana je i u LH i SH grupi životinja (Slika 4.2.2.2).

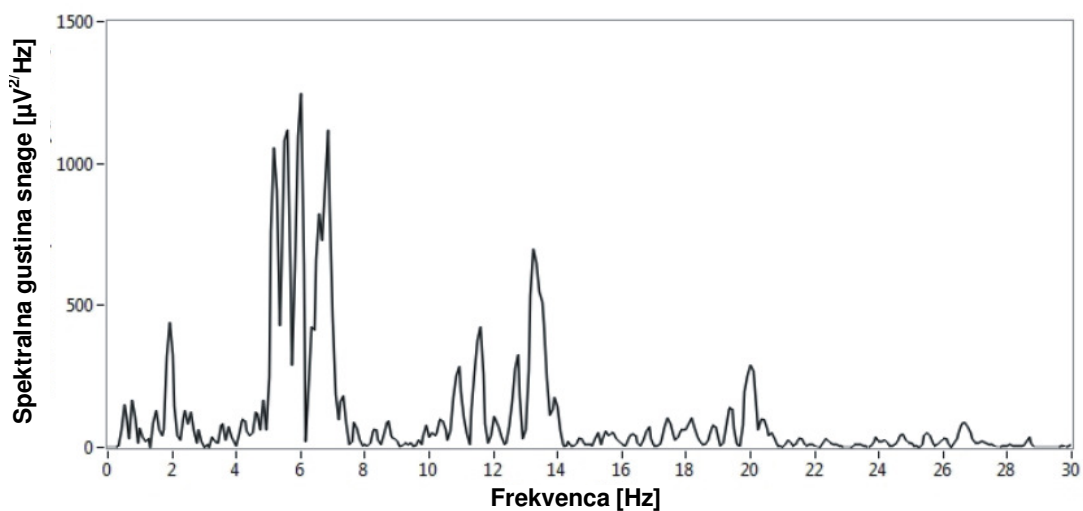
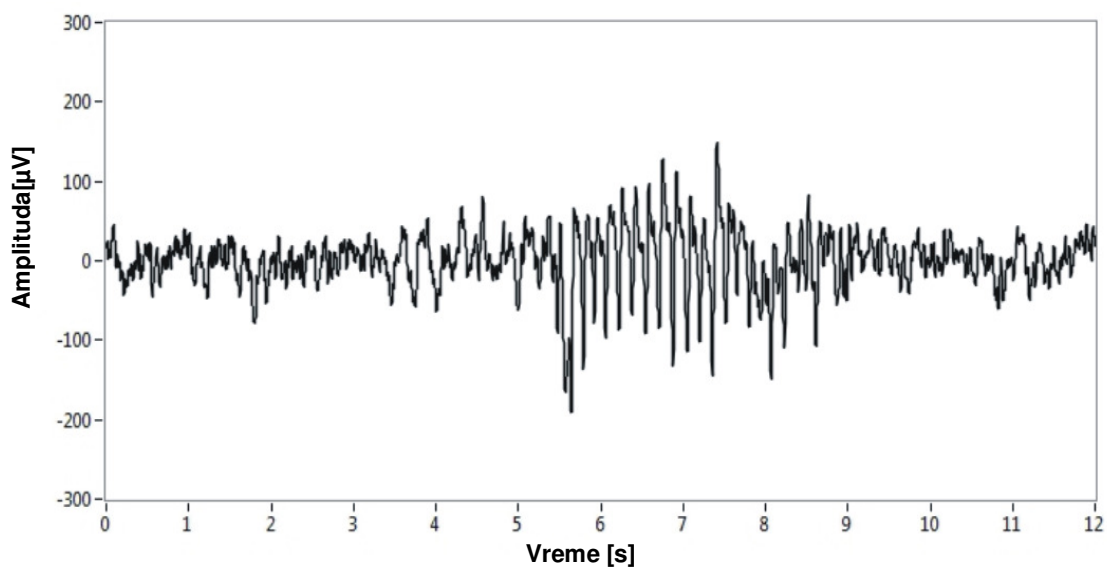
Rezultati kvantitativne analize EEG-a sa ciljem utvrđivanja postojanja razlike u iktalnim karakteristikama ispitivanih grupa prikazani su na Slika 4.2.2.3. Kao što se može uočiti, medijana broja SWD-a po pacovu je bila statistički značajno veća u SH u poređenju sa CH i LH grupama ($p < 0,05$, Slika 4.2.2.3A). Međutim, nije bilo statistički značajne razlike u broju SWD-a po pacovu između CH i LH grupe. Iste razlike uočene su između ovih grupa i kada je u pitanju trajanje pojedinih SWD-a (Slika 4.2.2.3B).



Slika 4.2.2.1. Reprezentativni EEG zapisi u Cc, Lc i Sc grupi životinja.

Odводи: levi frontalni – desni parijetalni.

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.2.1.1.

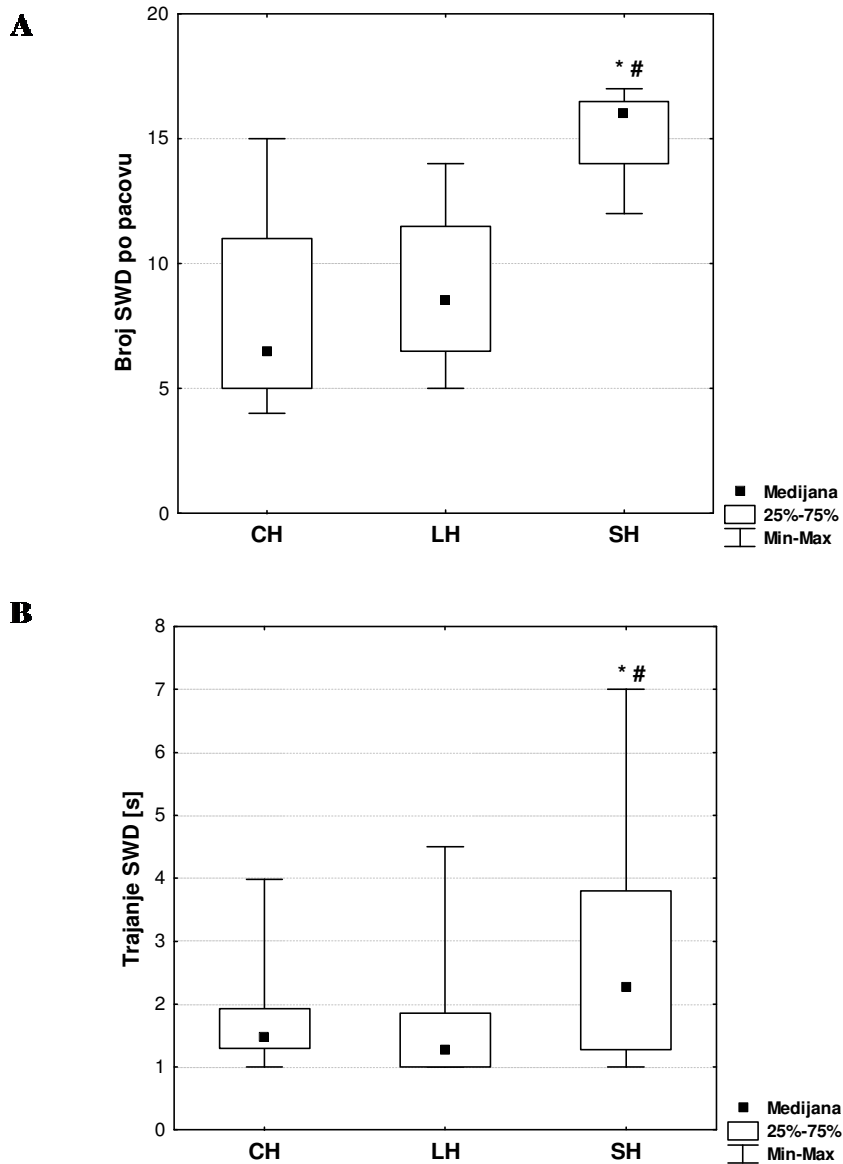


Slika 4.2.2.2. Reprezentativni EEG zapis životinje iz SH grupe (gornji panel) i njegova korespondentna spektralna gustina snage (donji panel).

Uočiti karakterističnu pojavu SWD-a.

Odvod: levi frontalni – desni parijetalni.

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.2.1.1.



Slika 4.2.2.3. Broj (A) i trajanje (B) SWD-a tokom 90 min od administracije homocistein tiolaktona u eksperimentalnim grupama.

Statistička značajnost razlika između grupa utvrđena je Kruskal –Wallis ANOVA i Mann – Whitney U testom. (* $p < 0.05$ vs. CH i # $p < 0.05$ vs. LH).

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.2.1.1. i Sliku 4.2.1.2.

4.3. Efekti akutne fizičke aktivnosti

4.3.1. Parametri konvulzivnog ponašanja

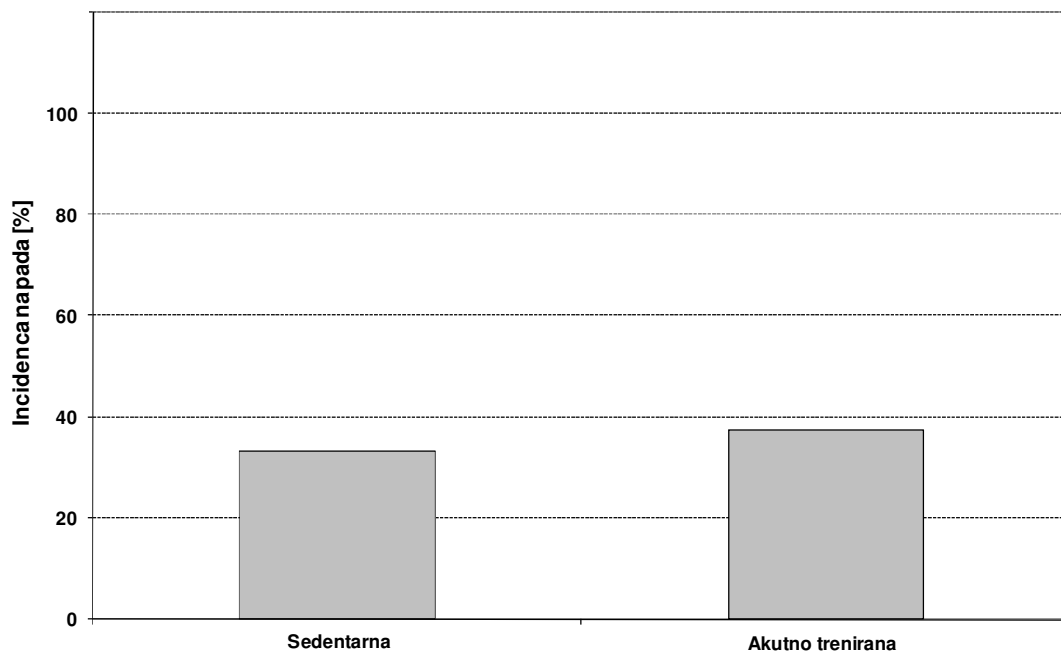
Konvulzivno ponašanje životinja iz akutno trenirane grupe, nakon administracije homocistein tiolaktona (5,5 mmol/kg, i.p.) se dogodilo s incidencijom od 37% sa približno jednakim latentnim periodom kao u sedentarnoj grupi. Incidenca napada nije bila statistički značajno različita između akutno trenirane i sedentarne grupe životinja ($p > 0,05$; Slika 4.3.1.1.).

Latentni period do prvog konvulzivnog napada nije bio statistički značajno produžen u grupi akutno treniranih u odnosu na sedentarnu grupu životinja ($p > 0,05$; Slika 4.3.1.2A).

Broj konvulzivnih epizoda po pacovu (0,2 [0-1]) je bio mali u grupi akutno treniranih pacova i takođe nije pokazivao statistički značajnu razliku u odnosu na sedentarnu grupu ($p > 0,05$; Slika 4.3.1.2B).

Kod akutno trenirane grupe, medijana intenziteta napada je bila gradusa 2 dok je kod sedentarne bila gradusa 1, ali nije pronađena statistički značajna razlika između grupa u pogledu intenziteta napada ($p > 0,05$; Slika 4.3.1.2C).

Administracije homocistein tiolaktona u dozi od 5,5 mmol/kg nije dovela do letalnog ishoda kako u sedentarnoj, tako i u akutno treniranoj grupi životinja (Tabela 4.3.1.1).

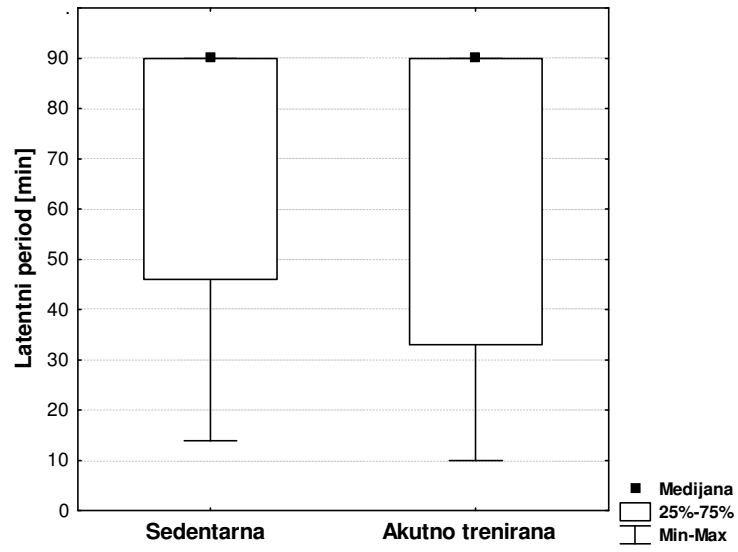
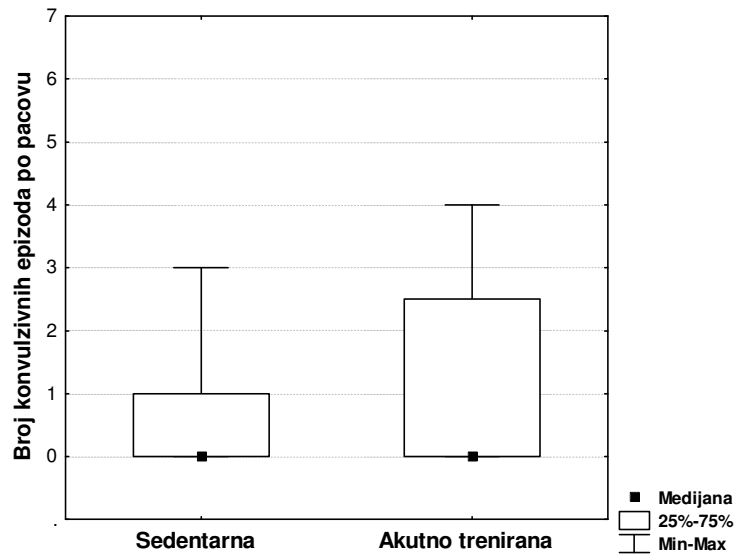
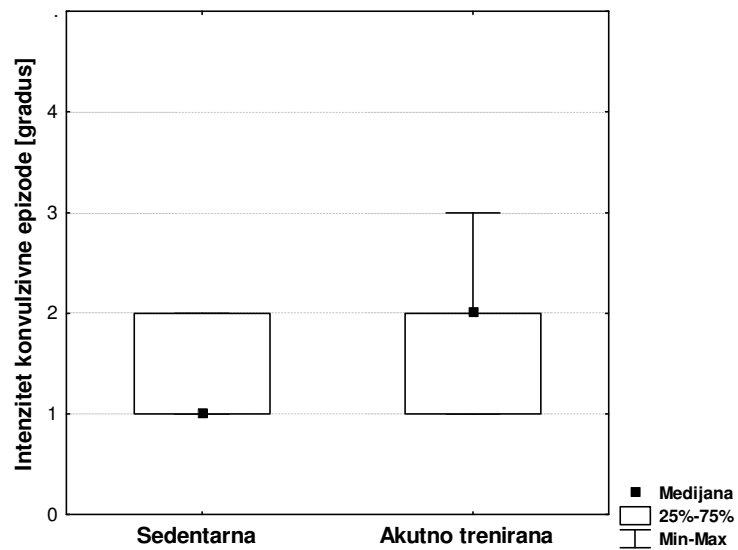


Slika 4.3.1.1. Uticaj akutne fizičke aktivnosti na tredmilu na incidencu konvulzivnih napada izazvanih homocistein tiolaktonom.

Nakon adaptacije na tredmilu (3 dana), životinje su raspoređene u grupu koja je trenirana na tredmilu pri brzini trake od 25 m/min, tokom 30 min (*akutno trenirana grupa*) i grupu životinja koja je isto vreme provodila u tredmilu pri brzini trake od 0 m/min (*sedentarna grupa*). Odmah nakon boravka u tredmilu svim životinjama je administriran homocistein tiolakton u dozi od 5,5 mmol/kg.

Incidenca: procenat životinja koje konvulziraju u odnosu na ukupan broj životinja u grupi.

Statistička značajnost razlika u incidenci napada utvrđena je Fišerovim testom tačne verovatnoće.

A**B****C**

Slika 4.3.1.2. Efekti akutne fizičke aktivnosti na tredmilu na latentni period (A), broj konvulzivnih epizoda izazvanih homocistein tiolaktonom po pacovu (B) i njihov intenzitet (C). Latentni period je definisan kao vreme od administracije homocistein tiolaktona do razvoja prvog konvulzivnog odgovora, pri čemu životinje koje ne konvulziraju imaju latencu 90 min. Intenzitet napada procenjivan je na osnovu deskriptivne skale sa gradusima od 0 do 4: 0 - bez konvulzivnog odgovora; 1 -klimanje glavom i grčeviti trzaji donje vilice, 2 -mioklonički trzaji celog tela (reakcija vruće ploče), klonus prednjih i propinjanje na zadnje ekstremitete (pozicija kengura); 3 - progresija u generalizovane kloničke konvulzije praćene toničkom ekstenzijom prednjih i zadnjih ekstremiteta i repa; 4 - status epilepticus.

Statistička značajnost razlika između grupa utvrđena je Kruskall –Wallis ANOVA i Mann – Whitney U testom.

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.3.1.1.

Tabela 4.3.1.1. Letalitet registrovan u eksperimentalnim grupama 90 min i 24h nakon administracije homocistein tiolaktona.

<i>Letalitet (%)</i>	<i>Eksperimentalne grupe</i>	
	Sedentarna	Akutno trenirana
Posle 90 min	0	0
Posle 24 h	0	0

Letalitet -procenat životinja sa letalnim ishodom u grupi.

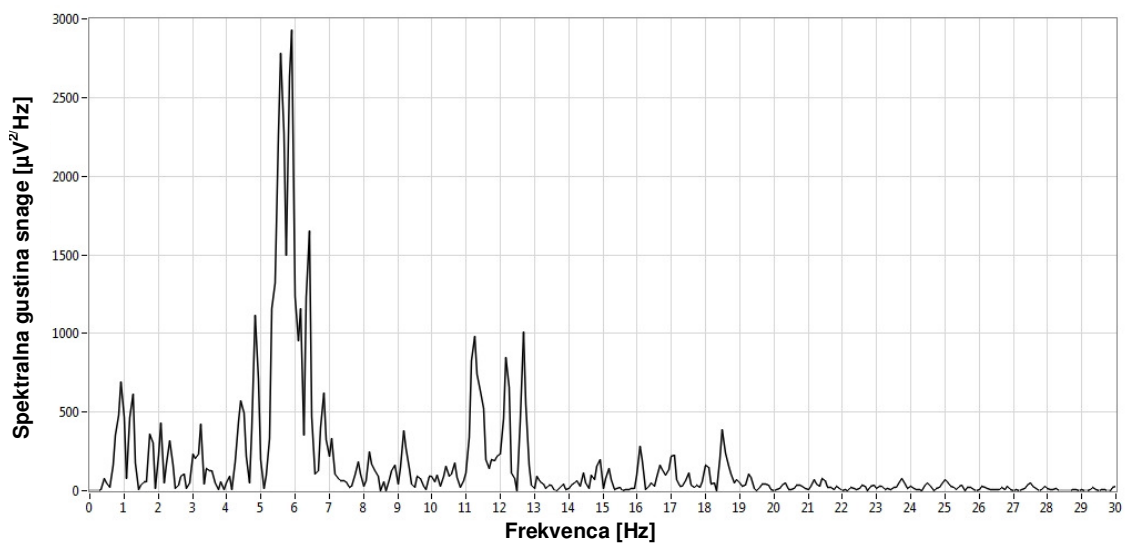
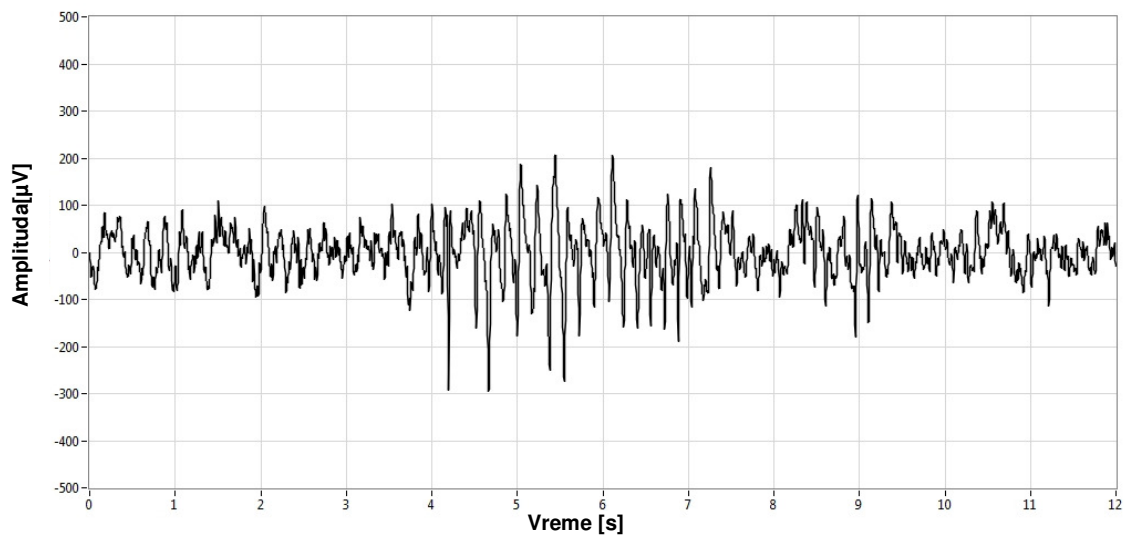
Statistička značajnost razlika između grupa utvrđena je Fišerovim testom tačne verovatnoće.

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.3.1.1.

4.3.2. EEG nalaz

EEG aktivnost životinja nakon administracije homocistein tiolaktona u dozi od 5,5 mmol/kg karakterisala je pojava iktalne aktivnosti u formi karakterističnih SWD-a (Slika 4.3.2.1).

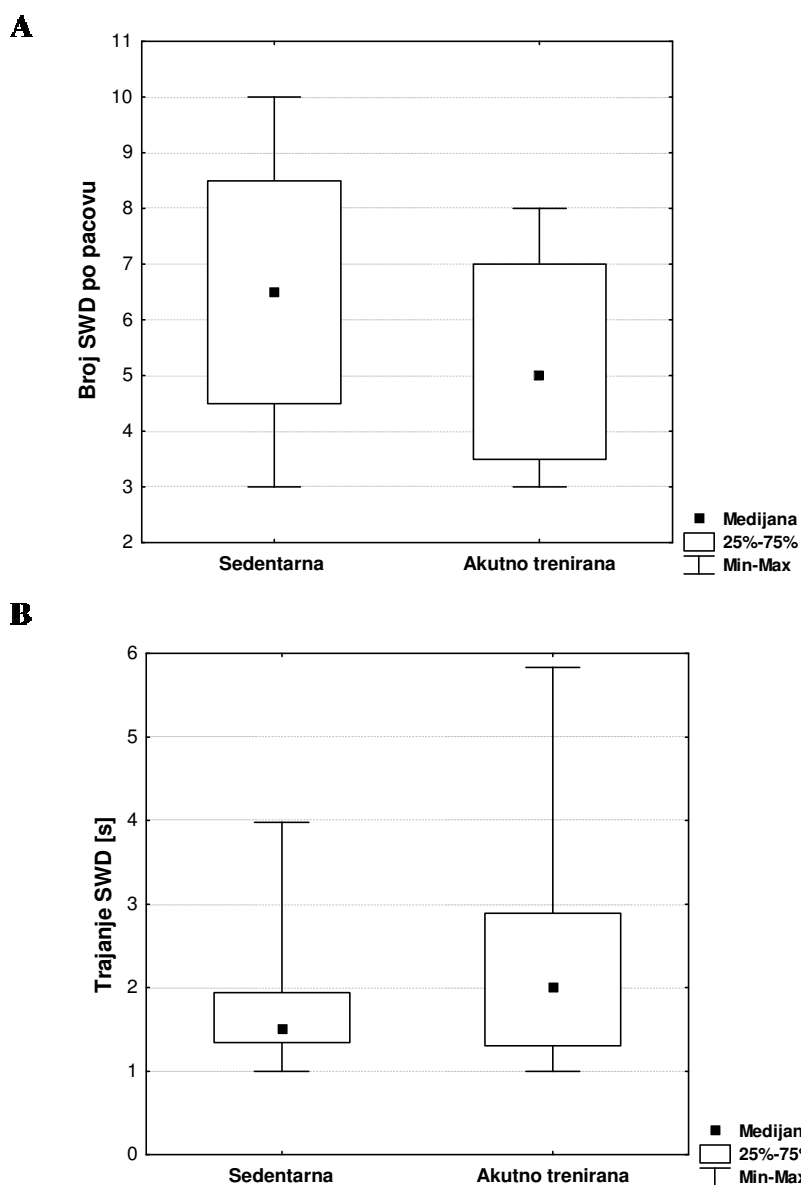
Rezultati kvantitativne analize EEG-a sa ciljem utvrđivanja postojanja razlike u pojavi SWD-a između ispitivanih grupa prikazani su na Slici 4.3.2.2. Uočeno je da medijana broja SWD-a po pacovu nije bila statistički značajno veća tokom 90-min registrovanja nakon administracije homocisteina u sedentarnoj grupi u poređenju sa akutno treniranom grupom (Slika 4.3.2.2A, $p < 0,05$). Takođe, trajanje SWD-a nije bilo statistički značajno različito između ove dve grupe ($p > 0,05$, Slika 4.3.2.2B).



Slika 4.3.2.1. Reprezentativni EEG zapis sa karakterističnim SWD u sedentarnoj grupi životinja nakon administracije homocistein tiolaktona (gornji panel) i njegova korespondentna spektralna gustina snage (donji panel).

Odvodi: levi frontalni – desni parijetalni.

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.3.1.1.



Slika 4.3.2.2. Broj (A) i trajanje (B) SWD-a tokom 90 min od administracije homocistein tiolaktona u eksperimentalnim grupama.

Statistička značajnost razlika između grupa utvrđena je Kruskal –Wallis ANOVA i Mann – Whitney U testom.

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.3.1.1. i Sliku 4.3.2.1.

4.4. Efekti hronične fizičke aktivnosti

4.4.1. Parametri konvulzivnog ponašanja

Sve životinje iz kontrolnih grupa, kako sedentarne, tako i trenirane su pokazale normalnu bihevioralnu aktivnost lišenu bilo kakvih znakova konvulzivnog ponašanja.

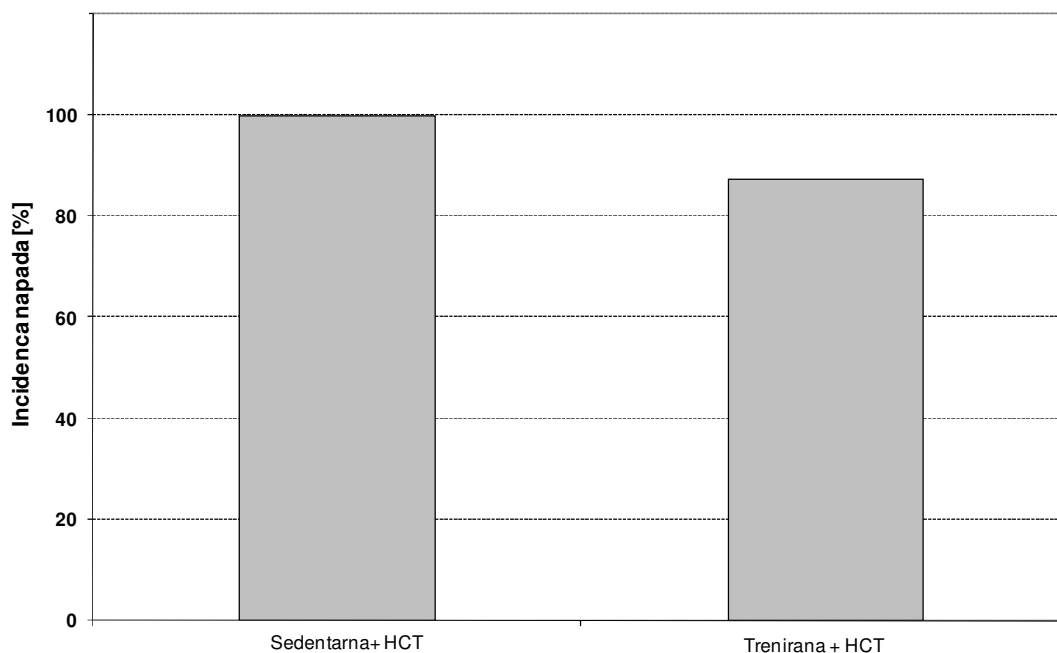
Konvulzivno ponašanje životinja iz trenirane grupe, nakon administracije homocistein tiolaktona (HCT 8,0 mmol/kg, i.p., trenirana + HCT grupa) se dogodilo sa incidencom od 87,50% sa relativno dugim latentnim periodom (50 [40-65] min). Incidenca napada nije bila statistički značajno različita između trenirane i sedentarne grupe životinja koje su bile tretirane homocistein tiolaktonom (sedentarna + HCT vs. trenirana + HCT grupa, $p > 0,05$; Slika 4.4.1.1.).

Latentni period do prvog konvulzivnog napada statistički je bio značajno duži u grupi trenirane + HCT u odnosu na grupu životinja sedentarne + HCT ($p < 0,05$; Slika 4.4.1.2A).

Sa druge strane, broj konvulzivnih epizoda po pacovu je bio statistički značajno snižen u treniranoj + HCT u odnosu na sedentarnu + HCT grupu životinja ($p < 0,05$; Slika 4.4.1.2B)

Medijana intenziteta napada je bila gradusa 2 [2-3] i nije pronađena statistički značajna razlika između ove dve grupe u pogledu intenziteta napada ($p > 0,05$; Slika 4.4.1.2C).

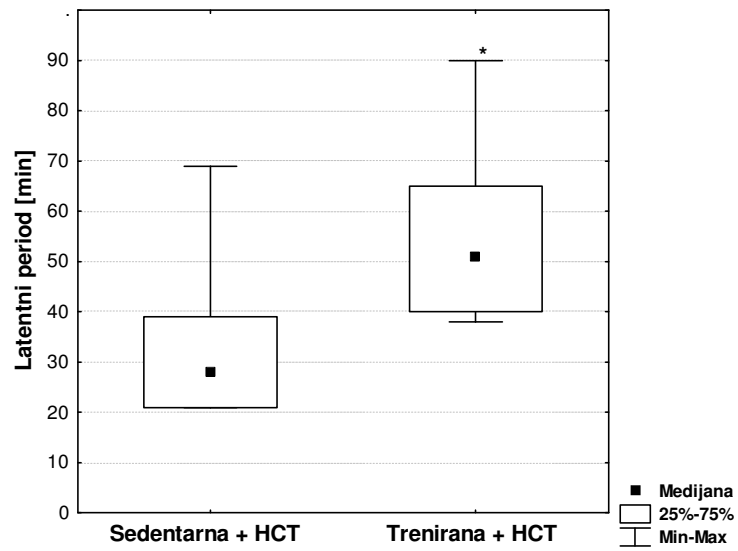
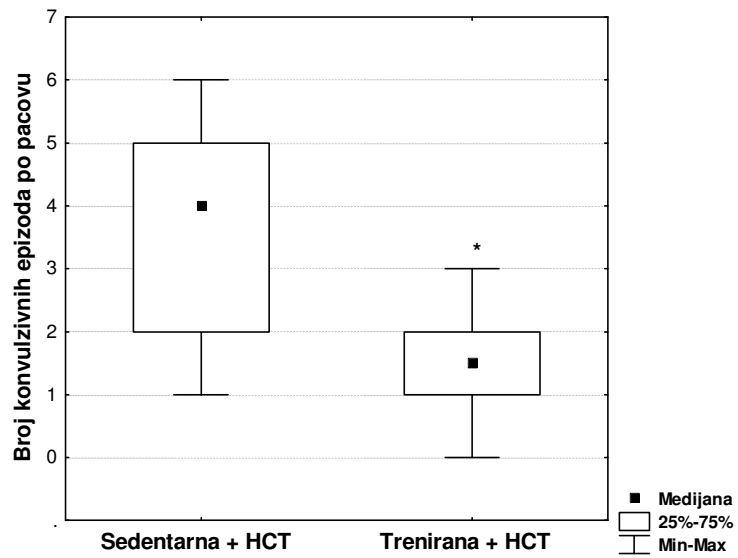
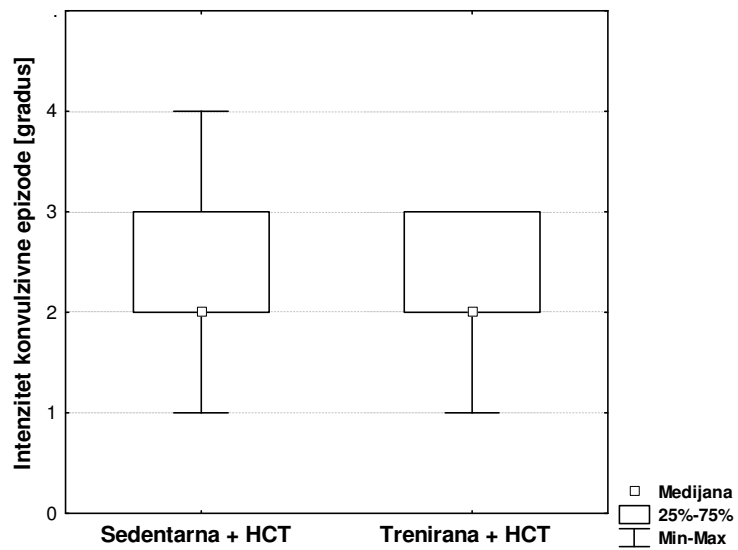
Nije bilo letalnog ishoda kod životinja iz kontrolnih grupa, kako sedentarnih kontrolnih, tako i treniranih kontrolnih. Administracija homocistein tiolaktona u dozi od 8 mmol/kg dovela je do letalnog ishoda kako u sedentarnoj, tako i u treniranoj grupi životinja. Iako je treniranje uticalo na smanjenje letalnog ishoda uzrokovanog administracijom homocistein tiolaktona u oba opservaciona vremena (90 min i 24 h), uočena razlika nije bila statistički značajna (Tabela 4.4.1.1).



Slika 4.4.1.1. Uticaj hronične fizičke aktivnosti na tredmilu na incidencu konvulzivnih napada izazvanih homocistein tiolaktonom.

Životinje su privikavane na tredmil aparat tokom 3 dana. Nakon toga, nasumično su raspoređene u treniranu (protokolu treniranja od 30 min dnevno, tokom 30 uzastopnih dana, pri brzini kretanja trake od 20 m/min) ili sedentarnu grupu (životinje koje isto vreme provode na tredmilu, pri brzini kretanja trake od 0 m/min). Tridesetprvog dana, tj. 24 h po završetku opisanog protokola životinjama iz HCT grupa (sedentarna + HCT i trenirana + HCT) administriran je D,L homocistein tiolakton u pojedinačnoj konvulzivnoj dozi od 8,0 mmol/kg po grupi, dok je životinjama iz kontrolnih grupa (sedentarna kontrolna i trenirana kontrolna) umesto D,L homocistein tiolaktona administriran je fiziološki rastvor (n=8 po grupi). Incidenca napada: broj životinja koje konvulziraju u odnosu na ukupan broj životinja u grupi (%). Nije bilo znakova konvulzivne aktivnosti kod životinja iz sedentarne kontrolne niti kod životinja iz trenirane kontrolne grupe.

Statistička značajnost razlika u incidenci napada utvrđena je Fišerovim testom tačne verovatnoće.

A**B****C**

Slika 4.4.1.2. Efekti hronične fizičke aktivnosti na tredmilu na latentni period (A), broj konvulzivnih epizoda izazvanih homocistein tiolaktonom po pacovu (B) i njihov intenzitet (C). Latentni period je definisan kao vreme od administracije homocistein tiolaktona do razvoja prvog konvulzivnog odgovora, pri čemu životinje koje ne konvulziraju imaju latencu 90 min. Intenzitet napada procenjivan je na osnovu deskriptivne skale sa gradusima od 0 do 4: 0 - bez konvulzivnog odgovora; 1 -klimanje glavom i grčeviti trzaji donje vilice, 2 -mioklonički trzaji celog tela (reakcija vruće ploče), klonus prednjih i propinjanje na zadnje ekstremitete (pozicija kengura); 3 - progresija u generalizovane kloničke konvulzije praćene toničkom ekstenzijom prednjih i zadnjih ekstremiteta i repa; 4 - status epilepticus.

Statistička značajnost razlika između grupa utvrđena je Kruskall –Wallis ANOVA i Mann – Whitney U testom (*p<0,05).

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.4.1.1.

Tabela 4.4.1.1. Letalitet registrovan u eksperimentalnim grupama 90 min i 24 h nakon administracije homocistein tiolaktona.

<i>Letalitet (%)</i>	<i>Eksperimentalne grupe</i>	
	Sedentarna +HCT	Trenirana + HCT
Posle 90 min	37,50	25,00
Posle 24 h	75,00	50,00

Letalitet -procenat životinja sa letalnim ishodom u grupi.

Statistička značajnost razlika između grupa utvrđena je Fišerovim testom tačne verovatnoće.

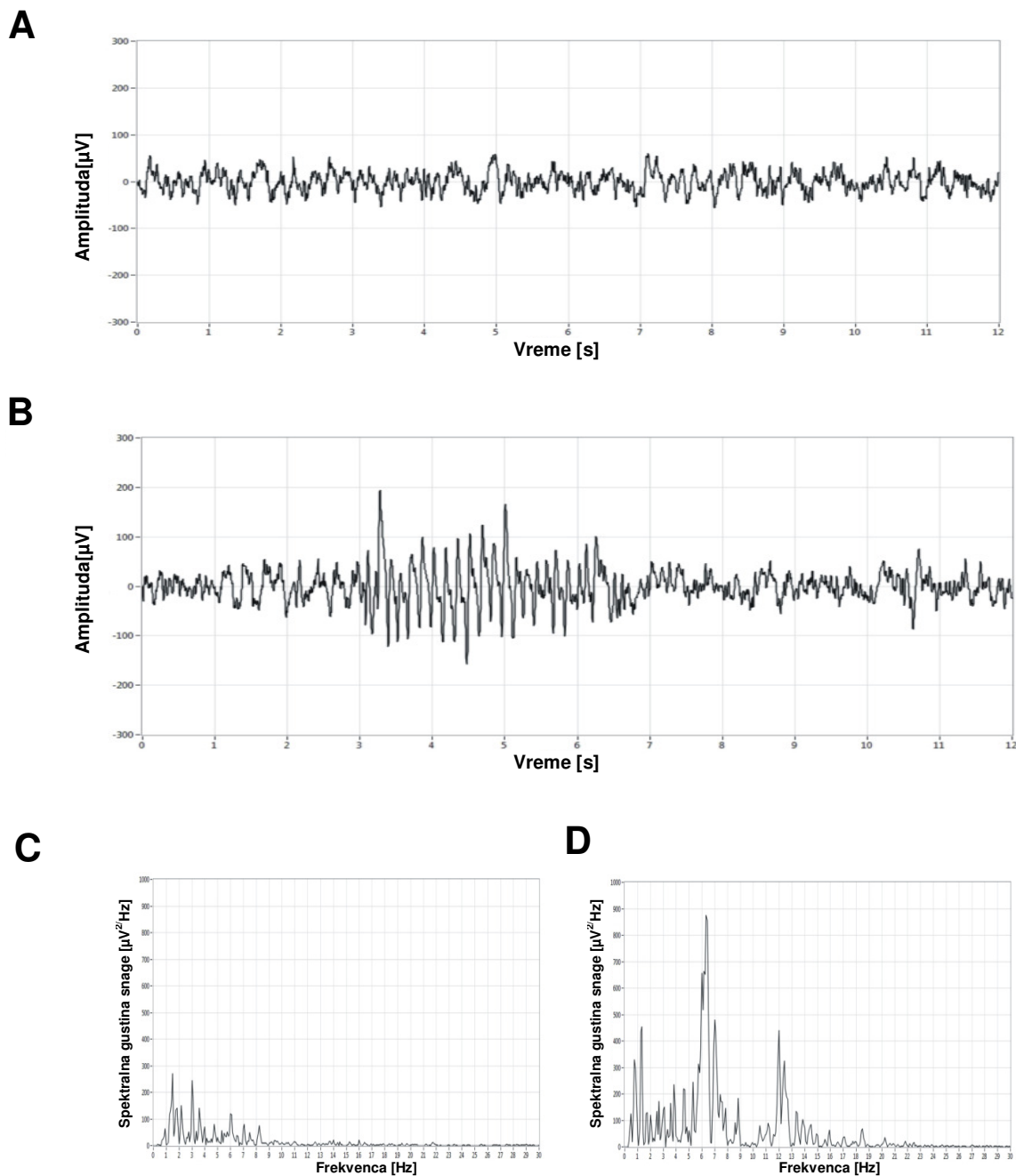
Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.4.1.1.

4.4.2. EEG nalaz

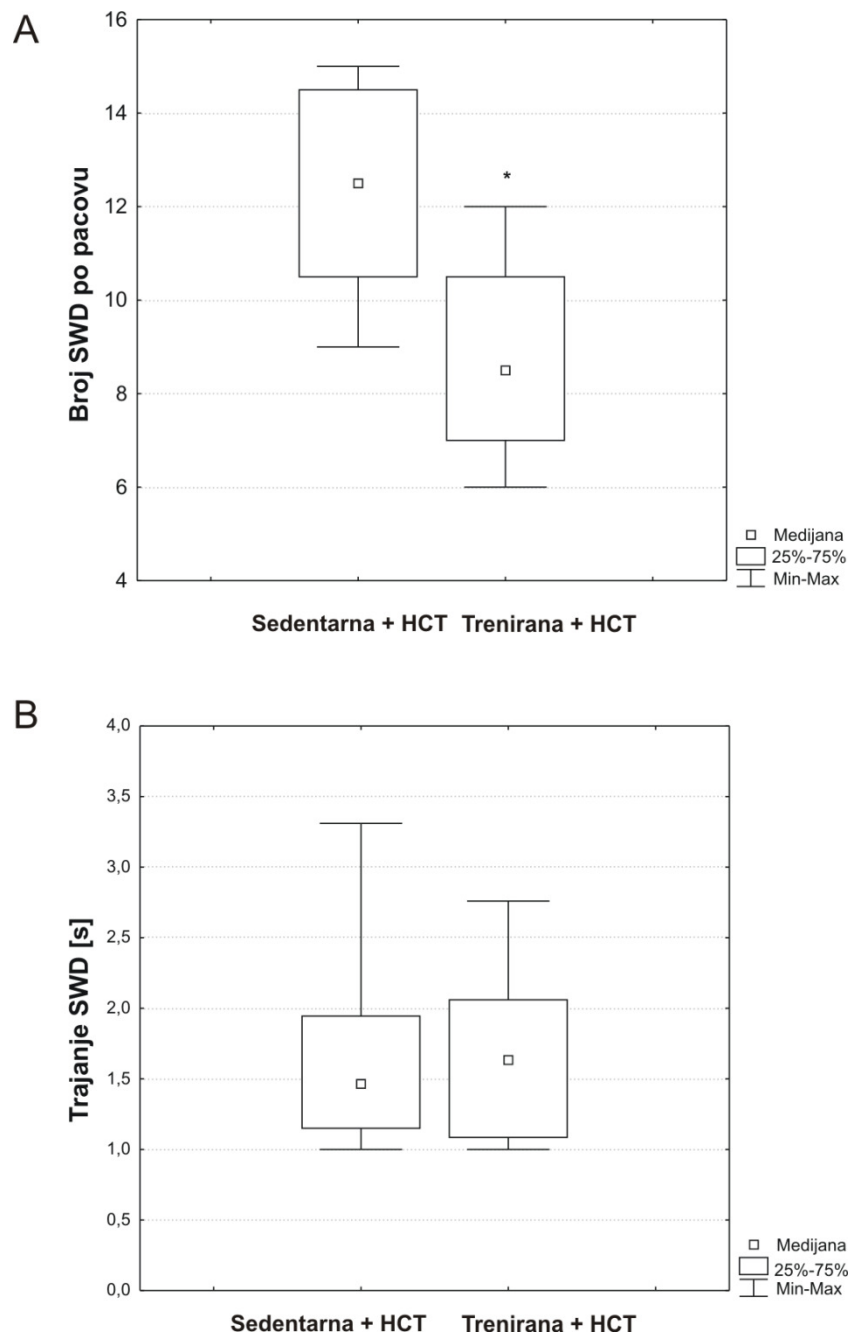
Nisu registrovani grafoelementi koji bi ukazivali na iktalnu aktivnost u EEG-u kako kod životinja iz sedentarne kontrolne, tako i kod životinja iz trenirane kontrolne grupe (Slika 4.4.2.1A).

EEG aktivnost životinja nakon administracije homocistein tiolaktona u dozi od 8 mmol/kg karakterisala je pojava iktalne aktivnosti u formi karakterističnih SWD-a (Slika 4.4.2.1B).

Rezultati kvantitativne analize EEG-a sa ciljem utvrđivanja postojanja razlike u pojavi SWD-a između ispitivanih grupa prikazani su na Slika 4.4.2.2. Uočeno je da je medijana broja SWD-a po pacovu bila statistički značajno manja tokom 90-min registrovanja nakon administracije homocistein tiolaktona u treniranoj + HCT u poređenju sa sedentarnom + HCT grupom (Slika 4.4.2.2A, $p < 0,05$). Međutim, trajanje SWD-a nije bilo statistički značajno različito između ove dve grupe ($p > 0,05$, Slika 4.4.2.2B).



Slika 4.4.2.1. Reprezentativni EEG zapisi registrovani u grupi treniranih životinja (A) 40 min od administracije fiziološkog rastvora sa obrascom bazalne aktivnosti i (B) pojava karakterističnih SWD nakon administracije homocistein tiolaktona. Korespondentne gustine spektralne snage prikazane su na panelu (C) i (D) Odvodi: levi frontalni – desni parijetalni. Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.4.1.1.



Slika 4.4.2.3. Broj (A) i trajanje (B) SWD-a tokom 90 min od administracije homocistein tiolaktona u eksperimentalnim grupama.

Statistička značajnost razlika između grupa utvrđena je Kruskal –Wallis ANOVA i Mann – Whitney U testom (* $p < 0,05$).

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.4.1.1. i Sliku 4.4.1.2.

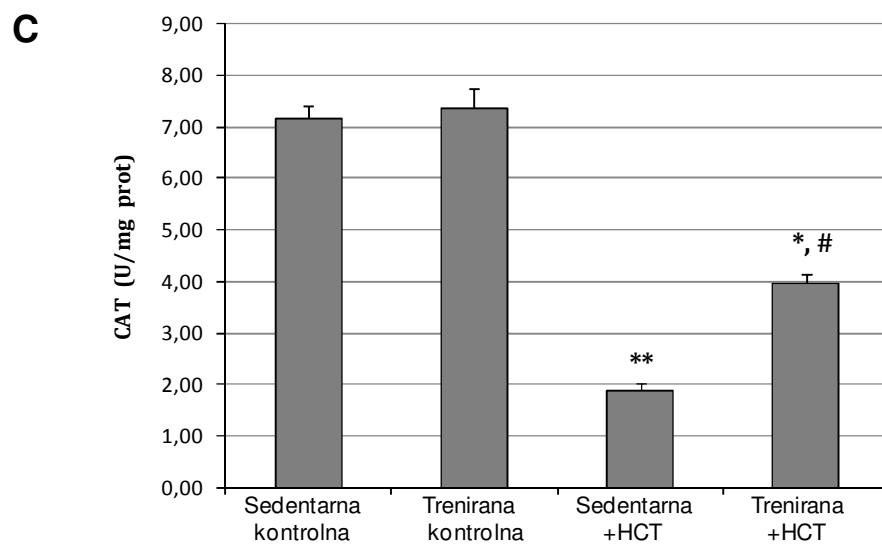
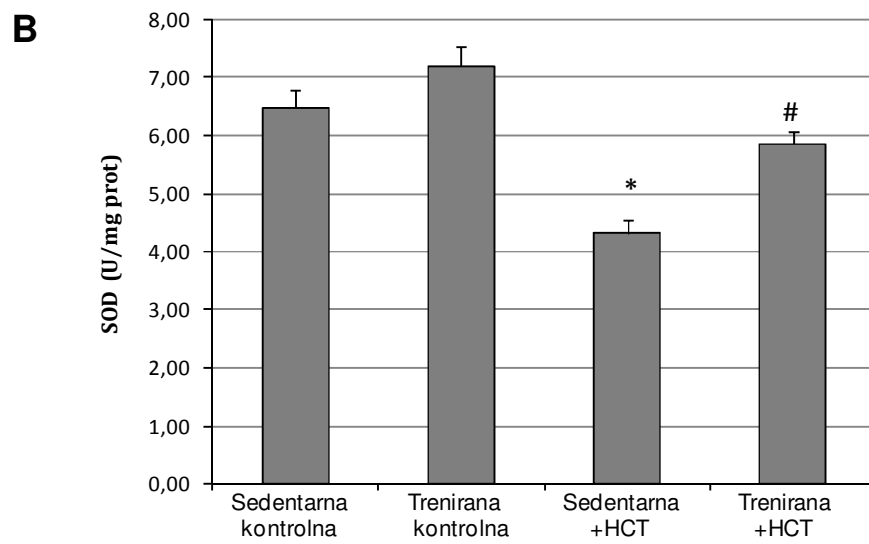
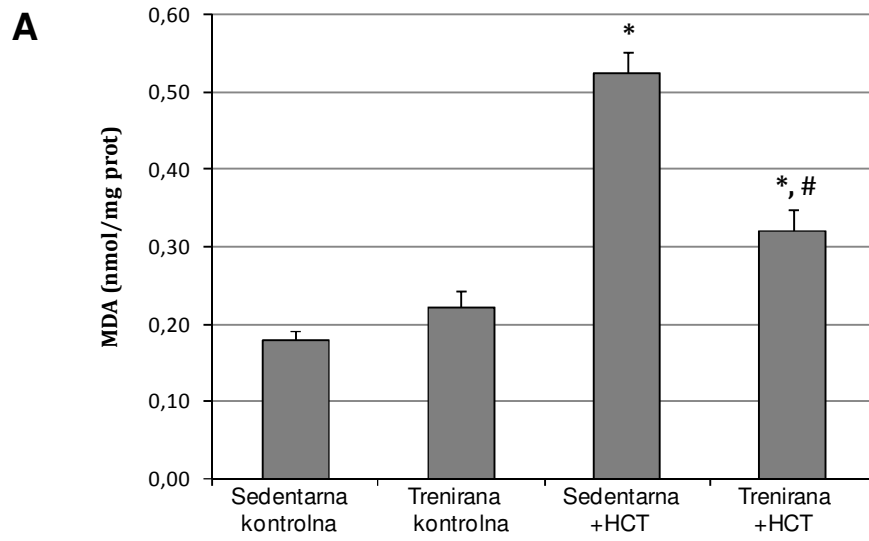
4.4.3. Biohemijske analize

Nije bilo statistički značajne razlike između sedentarnih i treniranih kontrolnih životinja u pogledu nivoa lipidne peroksidacije (mereno preko nivoa MDA) u hipokampusu, kao i u pogledu aktivnosti enzima SOD i CAT u ovom delu mozga ($p > 0,05$, Slika 4.4.3.1A-C).

Administracija homocisteintiolaktona je dovela do značajnog povećanja nivoa MDA kako u sedentarnoj + HCT, tako i u treniranoj + HCT grupi ($p < 0,05$, Slika 4.4.3.1A). Međutim, nivo MDA u hipokampusu životinja iz trenirane + HCT grupe je bio statistički značajno niži u poređenju sa životinjama iz sedentarne + HCT grupe ($p < 0,05$, Slika 4.4.3.1A).

Aktivnost SOD je bila snižena i u sedentarnoj + HCT i treniranoj + HCT grupi u poređenju sa kontrolnim grupama, ali je nivo ovog sniženja bio statistički značajan jedino u sedentarnoj + HCT grupi ($p < 0,05$, Slika 4.4.3.1B). Aktivnost SOD je bila statistički značajno veća u treniranoj + HCT grupi u poređenju sa sedentarnom + HCT grupom ($p < 0,05$, Slika 4.4.3.1B).

Homocistein tiolakton je prouzrokovao sniženje aktivnosti CAT i u sedentarnoj + HCT grupi ($p < 0,01$) i u treniranoj + HCT grupi ($p < 0,05$, Slika 4.4.3.1C). u poređenju sa vrednostima CAT u kontrolnim grupama. Međutim, aktivnost CAT je bila statistički značajno veća u hipokampusu životinja iz trenirane + HCT grupe u poređenju sa ovom vrednošću kod pacova iz sedentarne + HCT grupe ($p < 0,05$, Slika 4.4.3.1C).



Slika 4.4.3.1. Nivo lipidne peroksidacije (A), aktivnost superoksid dizmutaze (B) i katalaze (C) u hipokampusu životinja iz eksperimentalnih grupa.

Nivo lipidne peroksidacije je određen na osnovu koncentracije malondialdehida (MDA) u sinaptosomalnoj frakciji hipokampususa.

Aktivnost SOD je određivana kao procenat inhibicije autooksidacije adrenalina u baznoj sredini. Enzimska aktivnost je izražena u jedinicama po miligramu proteina (U/mg proteina).

Jedna jedinica aktivnosti katalaze (CAT) definisana je kao 1 μmol potrošenog H_2O_2 po min.

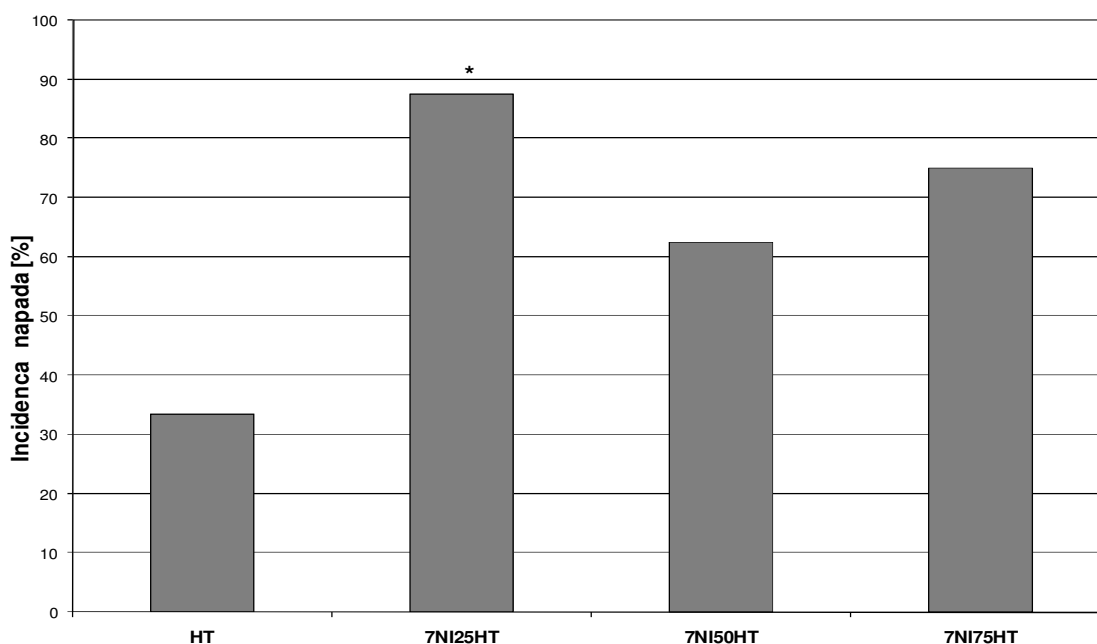
Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.4.1.1.

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SE i analizirani dvofaktorskom ANOVA koristeći Tukey *post hoc* test (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs. kontrolne grupe; # $p < 0.05$ vs. sedentarna + HCT grupa).

4.5. Efekti selektivne inhibicije nNOS

4.5.1. Parametri konvulzivnog ponašanja

Nakon administracije subkonvulzivne doze homocistein tiolaktona (5,5 mmol/kg, i.p.) životinje iz HT grupe su pokazale malu incidencu napada (33, 3%), dug latentni period (90 [46-90] min), mali broj konvulzivnih epizoda po pacovu (0 [0-2]), a sam intenzitet napada bio je maksimalno gradus 2 (Slika 4.5.1.1 i 4.5.1.2).



Slika 4.5.1.1. Uticaj selektivne inhibicije nNOS, ostvarene primenom 7 nitroindazola, na incidencu konvulzivnih napada izazvanih homocistein tiolaktonom.

Incidenca napada (broj životinja koje konvulziraju u odnosu na ukupan broj životinja u grupi, %) je opserviran nakon administracije D,L homocistein tiolaktonu subkonvulzivnoj dozi od 5,5 mmol/kg (HT). 7-nitroindazol (25, 50 i 75 mg/kg, i.p.) administriran je 30 min pre D,L homocistein tiolaktona (7NI₂₅HT, 7NI₅₀HT i 7NI₇₅HT).

Statistička značajnost razlika u incidenci napada utvrđena je Fišerovim testom tačne verovatnoće (* p<0,05 vs. H5.5).

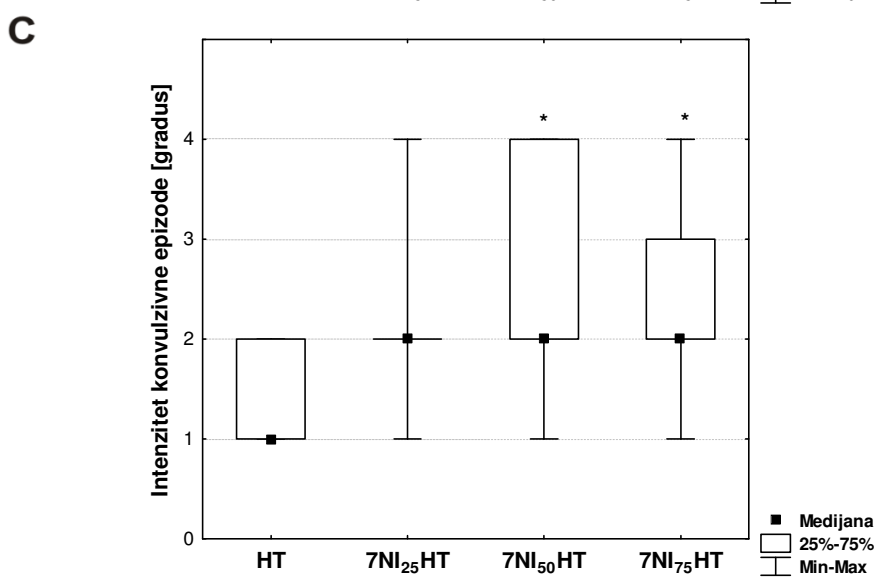
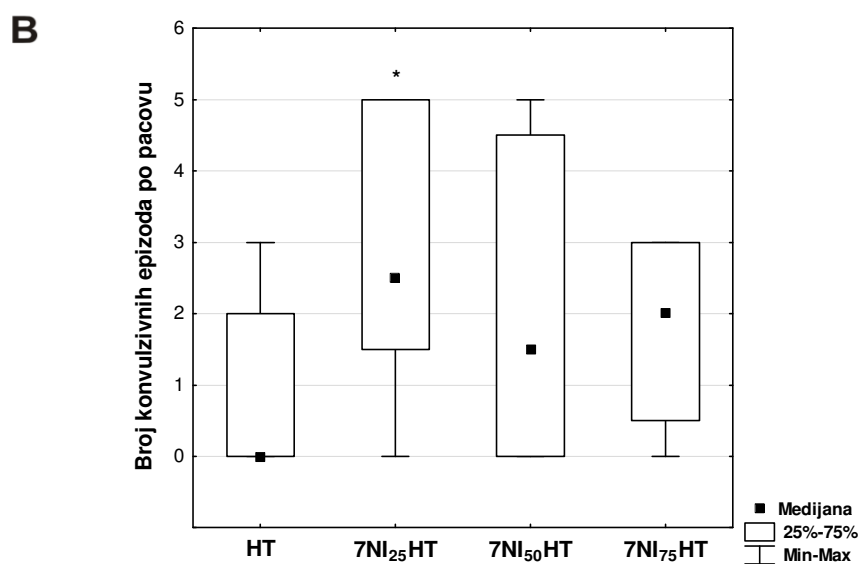
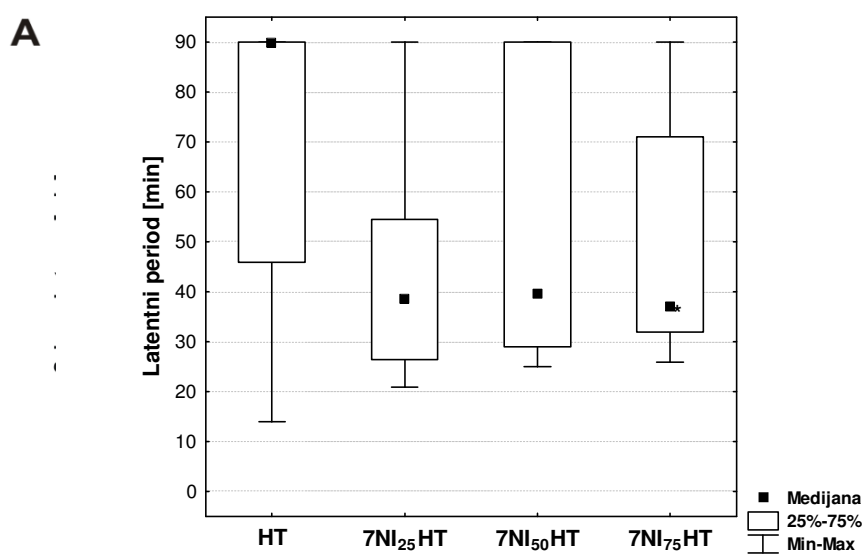
Sve primenjene doze 7-nitroindazola su dovele do povećanja incidence konvulzivnih napada kod eksperimentalnih životinja tretiranih subkonvulzivnom dozom homocisteina. Jedino je u grupi tretiranoj dozom 7-nitroindazola od 25 mg/kg pre homocisteina (7NI₂₅HT) došlo do statistički značajnog povećanja incidence napada u odnosu na HT grupu (Slika 4.5.1.1).

U svim grupama eksperimentalnih životinja tretiranih različitim dozama 7-nitroindazola pre homocistein tiolaktona je došlo do skraćanja latentnog perioda do prve konvulzivne epizode, jednog od najosetljivijih parametara konvulzivnog ponašanja, u odnosu na HT grupu. Međutim, opservirane razlike nisu bile statistički značajne (Slika 4.5.1.2A).

Primena 7-nitroindazola je dovela i do povećanja broja konvulzivnih epizoda po pacovu. Kod životinja tretiranih dozom 7-nitroindazola od 25 mg/kg ovo povećanje je bilo statistički značajno (Slika 4.5.1.2B).

Intenzitet konvulzivnih napada izazvanih subkonvulzivnom dozom homocistein tiolaktona statistički značajno su povećale doze 7-nitroindazola od 50 i 75 mg/kg, dok povećanje izazvano dozom od 25 mg/kg nije bilo statistički značajno (Slika 4.5.1.2C).

Nije bilo letaliteta u HT i 7NI₅₀HT grupi životinja kako 90 min, tako ni 24 h od administracije homocistein tiolaktona. Letalitet je registrovan u 7NI₂₅HT i 7NI₇₅HT grupama u oba opservaciona vremena. Međutim, opservirane razlike nisu bile statistički značajne (Tabela 4.6.1.1.).



Slika 4.5.1.2. Uticaj selektivne inhibicije nNOS na latentni period (A), broj konvulzivnih epizoda izazvanih homocistein tiolaktonom po pacovu (B) i njihov intenzitet (C). Latentni period je definisan kao vreme od administracije homocistein tiolaktona do razvoja prvog konvulzivnog odgovora, pri čemu životinje koje ne konvulziraju imaju latencu 90 min. Intenzitet napada procenjivan je na osnovu deskriptivne skale sa gradusima od 0 do 4: 0 - bez konvulzivnog odgovora; 1 -klimanje glavom i grčeviti trzaji donje vilice, 2 -mioklonički trzaji celog tela (reakcija vruće ploče), klonus prednjih i propinjanje na zadnje ekstremitete (pozicija kengura); 3 - progresija u generalizovane kloničke konvulzije praćene toničkom ekstenzijom prednjih i zadnjih ekstremiteta i repa; 4 - status epilepticus.

Statistička značajnost razlika između grupa utvrđena je Kruskall –Wallis ANOVA i Mann – Whitney U testom (* $p < 0,05$ vs. HT).

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.5.1.1.

Tabela 4.5.1.1. Letalitet registrovan u eksperimentalnim grupama 90 min i 24 h nakon administracije homocistein tiolaktona.

Letalitet [%]	Eksperimentalne grupe			
	HT	7NI₂₅HT	7NI₅₀HT	7NI₇₅HT
<i>posle 90 min</i>	0	25,0	0	12,5
<i>posle 24 h</i>	0	25,0	0	12,5

Letalitet -procenat životinja sa letalnim ishodom u grupi.

Statistička značajnost razlika između grupa utvrđena je Fišerovim testom tačne verovatnoće.

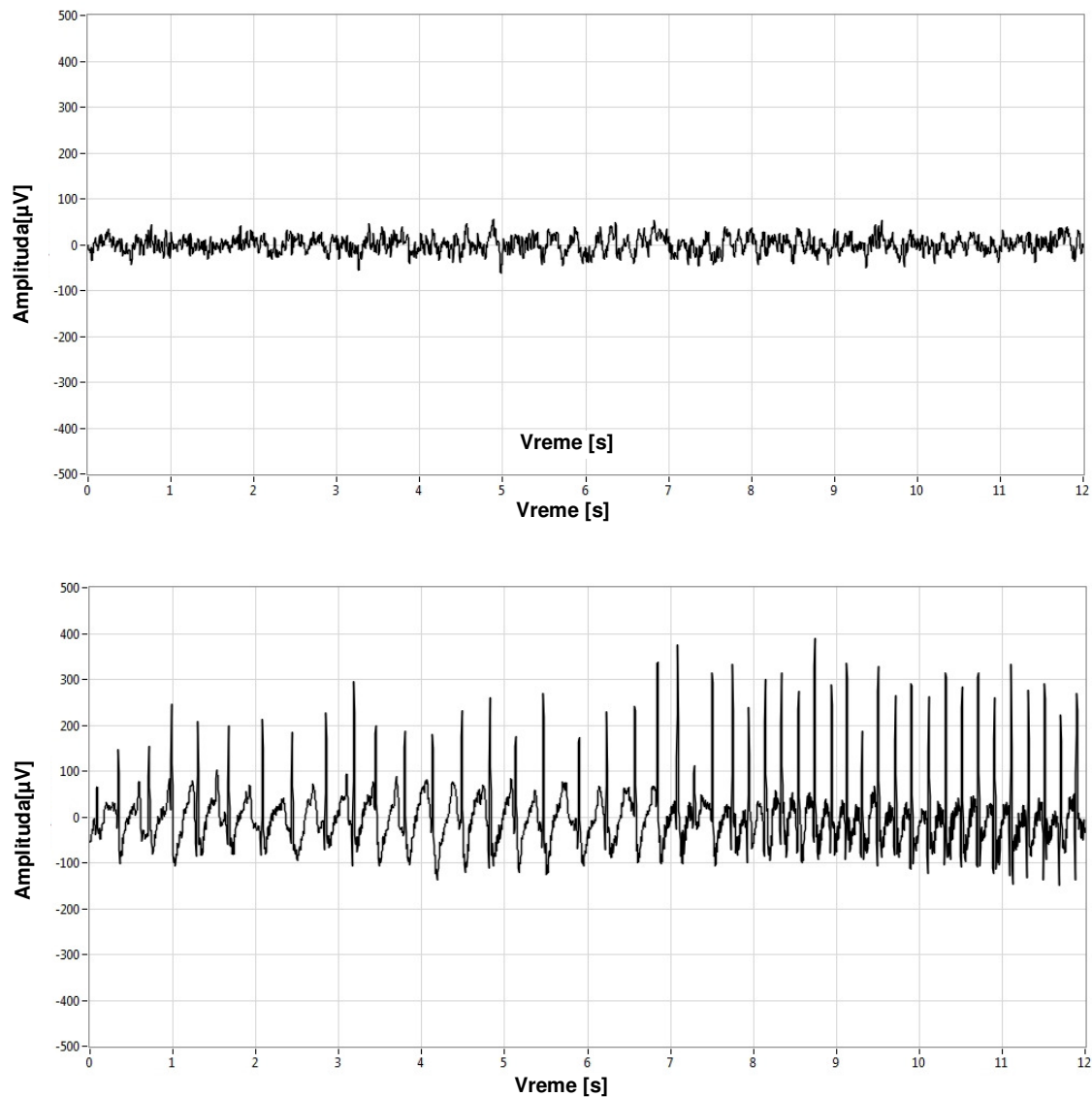
Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.5.1.1.

4.5.2. EEG nalaz

U EEG aktivnosti životinje iz C i 7NI₇₅grupe nisu registrovani nikakvi znaci iktalne aktivnosti. Životinje iz C i 7NI₇₅grupe pokazivale su normalnu, bazalnu EEG aktivnost (Slika 4.5.2.1A) koja odgovara eksplorativnom ponašanju.

EEG aktivnost životinja iz 7NI₇₅HT grupe po administraciji homocistein tiolaktone karakterisala je pojava iktalne aktivnosti u formi salvi šiljaka (Slika 4.5.2.1B).

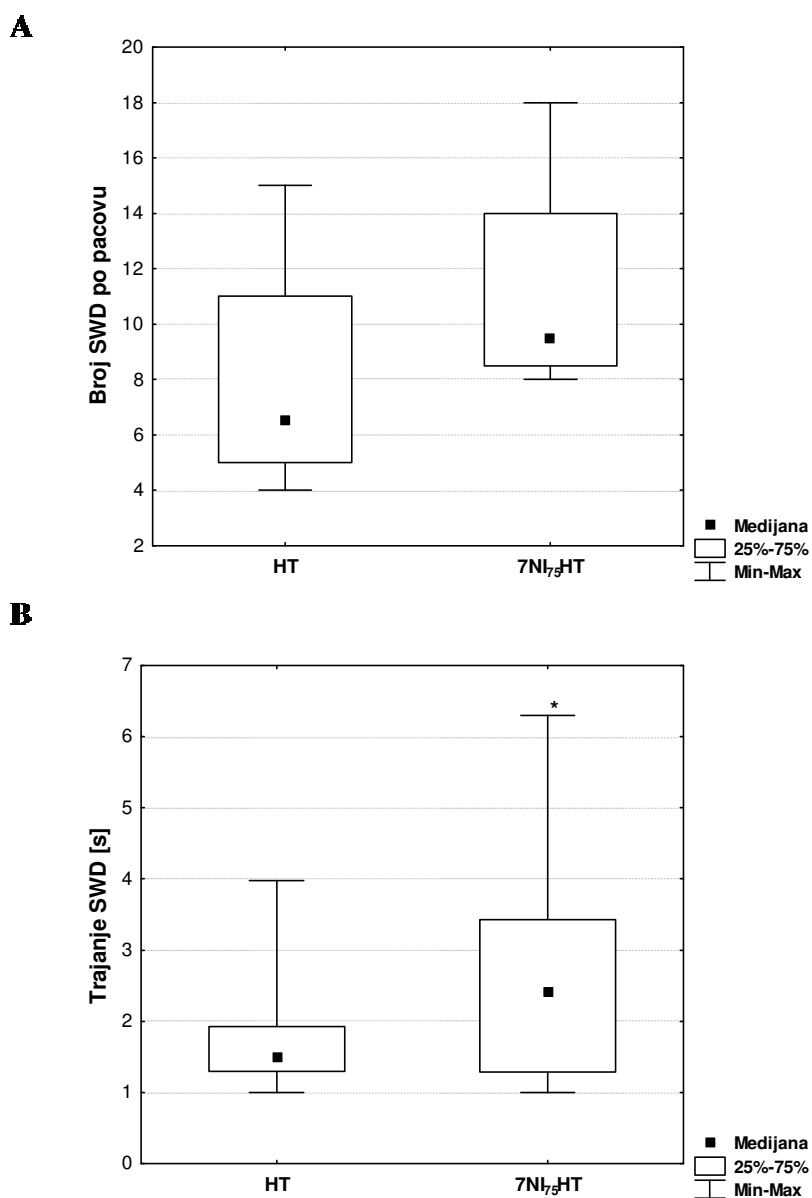
Rezultati kvantitativne analize EEG-a sa ciljem utvrđivanja postojanja razlike u pojavi SWD-a između ispitivanih grupa prikazani su na Slika 4.5.2.2. Uočeno je da je medijana broja SWD-a po pacovu nije bila statistički značajno veća u 7NI₇₅HT u poređenju sa HT grupom (Slika 4.6.2.2A). Trajanje SWD-a je bilo statistički značajno veće u 7NI₇₅HT u poređenju sa HT grupom (Slika 4.6.2.2B).



Slika 4.5.2.1. Reprezentativni EEG zapisi u kontrolnoj grupi životinja (A) i pojava salvi generalizovanih šiljaka u 7NI₇₅HT (B) grupi životinja.

Odводи: levi frontalni – desni parijetalni.

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.5.1.1.



Slika 4.5.2.2. Broj (A) i trajanje (B) SWD-a tokom 90 min od administracije homocistein tiolaktona u eksperimentalnim grupama.

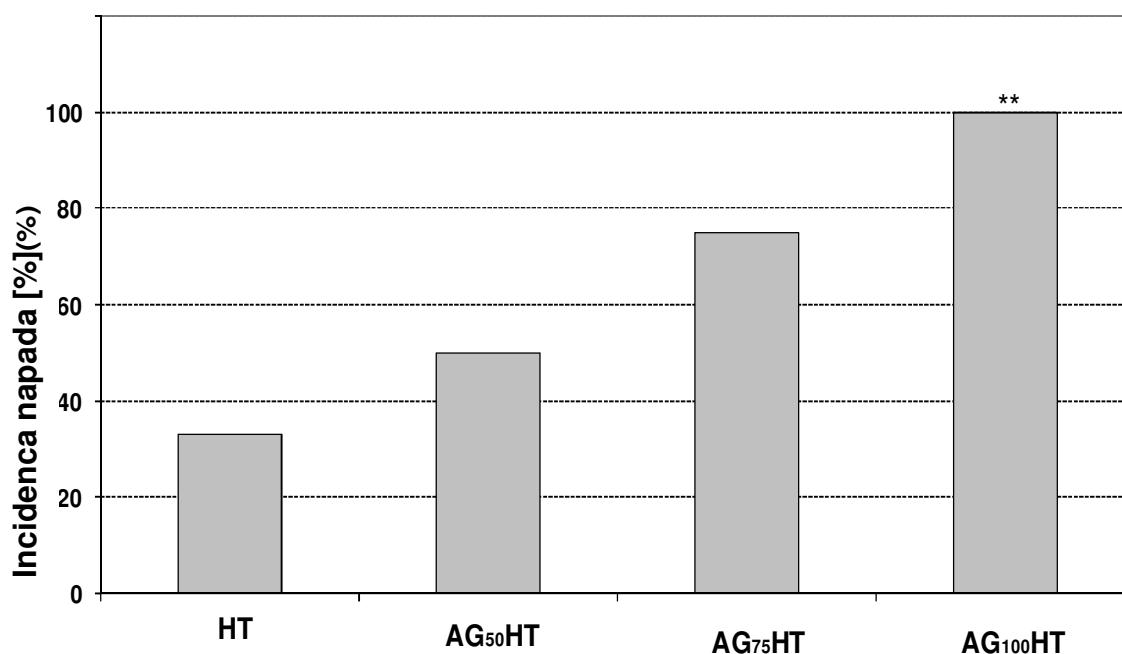
Statistička značajnost razlika između grupa utvrđena je Kruskal –Wallis ANOVA i Mann – Whitney U testom.

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.5.1.1. i Sliku 4.5.2.1.

4.6. Efekti selektivne inhibicije iNOS

4.6.1. Parametri konvulzivnog ponašanja

Životinje iz HT grupe su nakon subkonvulzivne doze homocistein tiolaktona (5,5 mmol/kg, i.p.) pokazale malu incidencu napada (33,3 %), dug latentni period (90 [46-90] min), mali broj konvulzivnih epizoda po pacovu (0 [0-2]), a sam intenzitet napada nije bio veći od gradus 2 (Slika 4.6.1.1 i 4.6.1.2).



Slika 4.6.1.1. Uticaj selektivne inhibicije iNOS, primenom aminogvanidina, na incidencu konvulzivnih napada izazvanih homocistein tiolaktonom.

Aminogvanidin (u dozama 50, 75 and 100 mg/kg) je administriran 30 min pre D, L homocistein tiolaktona (HT) u dozi od 5,5 mmol/kg (grupe AG₅₀HT, AG₇₅HT i AG₁₀₀HT, n=8 po grupi). Incidencija – procenat životinja koje konvulziraju u odnosu na ukupan broj životinja u grupi izražen u procentima.

Statistička značajnost razlika u incidenciji napada utvrđena je Fišerovim testom tačne verovatnoće (* p<0,05 vs. HT).

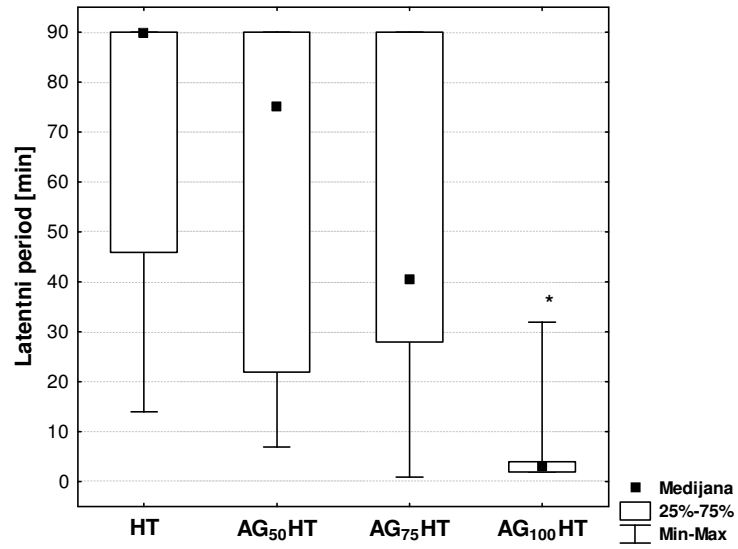
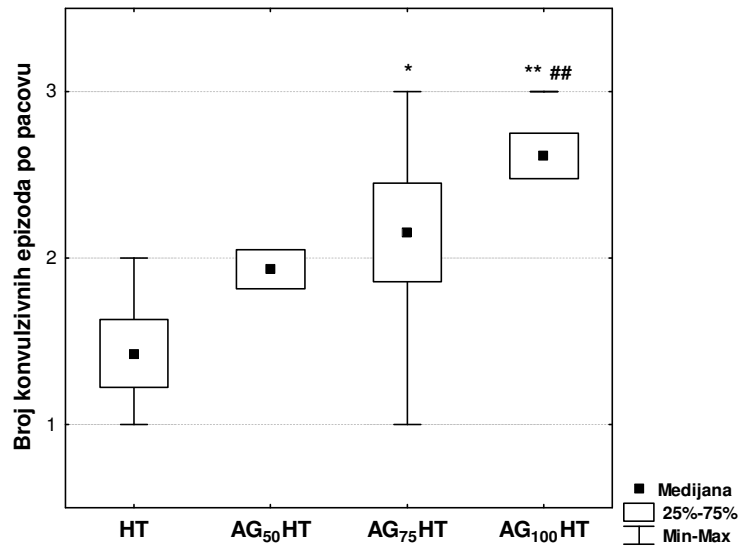
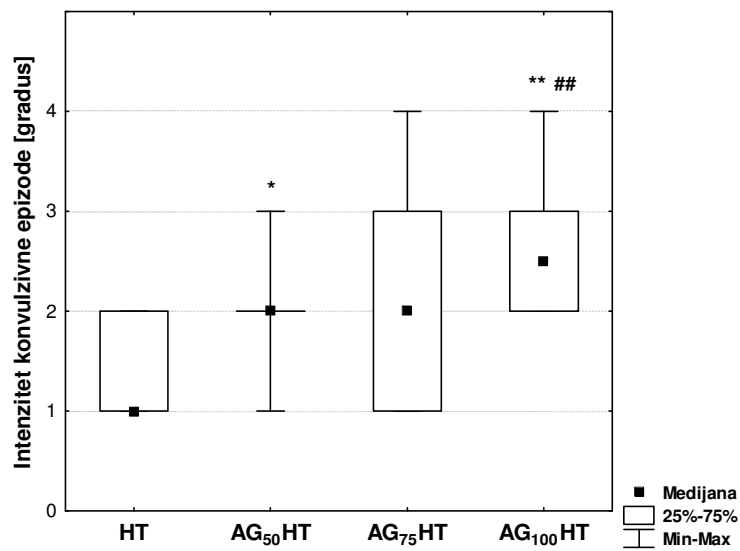
Administracija aminogvanidina je povećala incidencu konvulzivnih napada izazvanih homocistein tiolaktonom u dozno-zavisnom maniru. Incidenca napada je bila statistički značajno veća u AG₁₀₀HT grupi u odnosu na HT grupu (Slika 4.6.1.1).

Vreme do prve konvulzivne epizode (latenca konvulzivnog napada) je bila statistički značajno kraća kod pacova iz AG₁₀₀HT grupe u poređenju sa pacovima iz HT grupe ($p < 0,05$, Slika 4.6.1.2A).

Broj konvulzivnih epizoda po pacovu je bio statistički značajno povećan u grupama AG₇₅HT ($p < 0,05$) i AG₁₀₀HT ($p < 0,01$) u odnosu na HT grupu (Slika 4.6.1.2B). Sem toga, ovaj broj je bio veći u AG₁₀₀HT grupi u poređenju sa AG₅₀HT grupom ($p < 0,01$, Slika 4.6.1.2B).

Isto važi za intenzitet konvulzivnih napada u grupi AG₁₀₀HT u kojoj je intenzitet napada statistički značajno bio veći nego u HT i AG₅₀HT grupi ($p < 0,01$). Takođe, intenzitet napada je bio statistički značajno veći u AG₅₀HT grupi u poređenju sa HT grupom ($p < 0,05$, Slika 4.6.1.2C).

Nije bilo letaliteta u HT i AG₅₀HT grupi životinja kako 90 min, tako ni 24 h od administracije homocistein tiolaktona. Letalitet je registrovan u AG₇₅HT i AG₁₀₀HT grupama u oba opservaciona vremena. Značajne statističke razlike uočene su kada su ove grupe upoređene sa HT i AG₅₀HT grupama u drugom opservacionom periodu, tj. 24 h od administracije homocistein tiolaktona (Tabela 4.6.1.1.).

A**B****C**

Slika 4.6.1.2. Uticaj selektivne inhibicije iNOS na latentni period (A), broj konvulzivnih epizoda izazvanih homocistein tiolaktonom po pacovu (B) i njihov intenzitet (C). Latentni period je definisan kao vreme od administracije homocistein tiolaktona do razvoja prvog konvulzivnog odgovora, pri čemu životinje koje ne konvulziraju imaju latencu 90 min. Intenzitet napada procenjivan je na osnovu deskriptivne skale sa gradusima od 0 do 4: 0 - bez konvulzivnog odgovora; 1 -klimanje glavom i grčeviti trzaji donje vilice, 2 -mioklonički trzaji celog tela (reakcija vruće ploče), klonus prednjih i propinjanje na zadnje ekstremitete (pozicija kengura); 3 - progresija u generalizovane kloničke konvulzije praćene toničkom ekstenzijom prednjih i zadnjih ekstremiteta i repa; 4 - status epilepticus.

Statistička značajnost razlika između grupa utvrđena je Kruskall –Wallis ANOVA i Mann – Whitney U testom (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. HT and # $p < 0,05$, ## $p < 0,05$ vs. AG₅₀HT). Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.6.1.1.

Tabela 4.6.1.1. Letalitet registrovan u eksperimentalnim grupama 90 min i 24 h nakon administracije homocistein tiolaktona.

<i>Letalitet [%]</i>	Eksperimentalne grupe			
	HT	AG₅₀HT	AG₇₅HT	AG₁₀₀HT
<i>posle 90 min</i>	0	0	25.0	37.5
<i>posle 24 h</i>	0	0	50.0*#	62.5**##

Letalitet -procenat životinja sa letalnim ishodom u grupi.

Statistička značajnost razlika između grupa utvrđena je Fišerovim testom tačne verovatnoće (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. HT; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. AG₅₀HT).

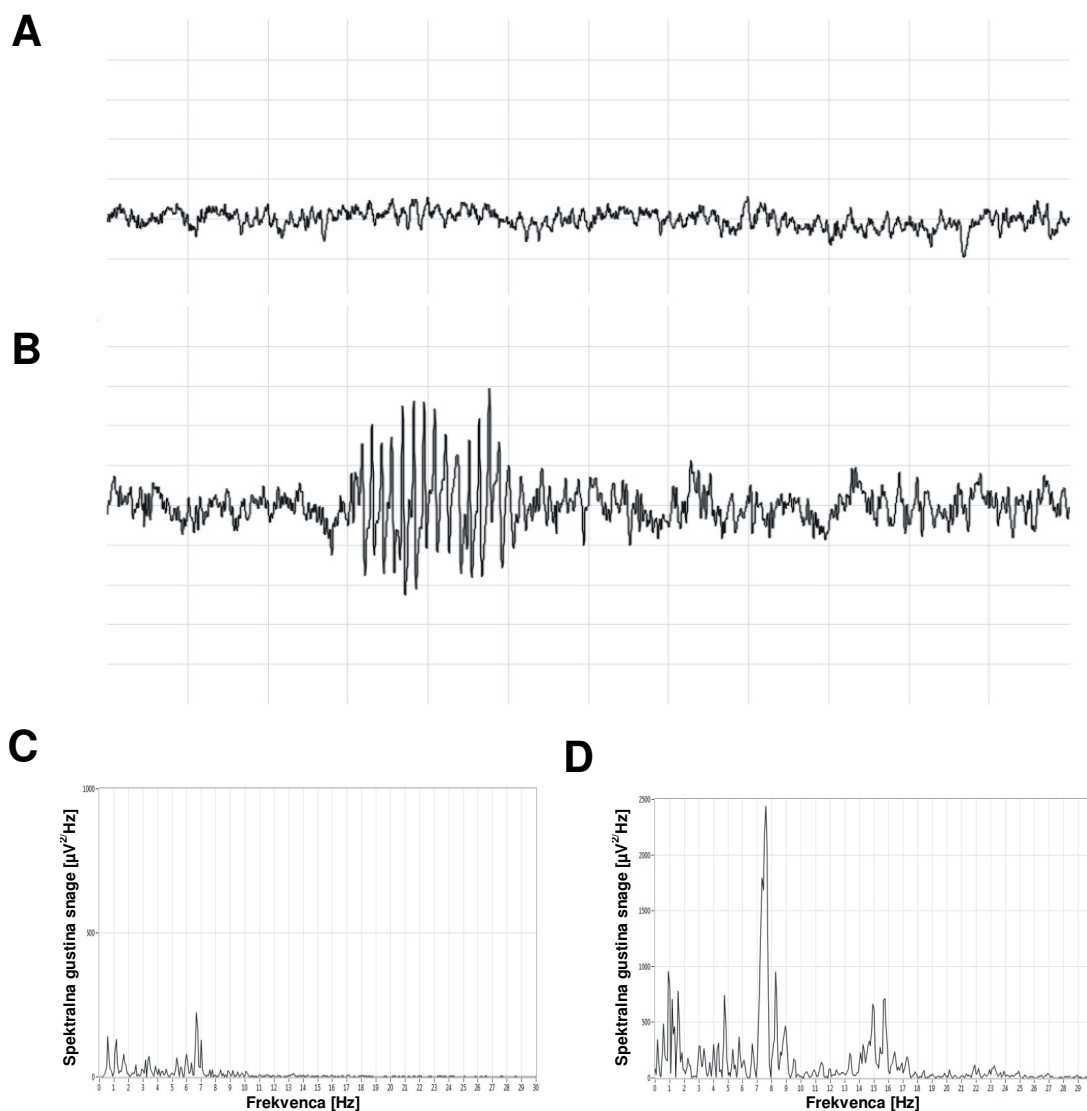
Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.6.1.1.

4.6.2. EEG nalaz

U EEG aktivnosti životinje iz C i AG₁₀₀ grupe nisu registrovani nikakvi znaci iktalne aktivnosti. Životinje iz C i AG₁₀₀ grupe pokazivale su normalnu, bazalnu EEG aktivnost (Slika 4.6.2.1A) koja odgovara eksplorativnom ponašanju.

EEG aktivnost životinja iz AG₁₀₀HT grupe po administraciji homocistein tiolaktona karakterisala je pojava iktalne aktivnosti u formi klastera šiljak-talas pražnjenja (SWD, Slika 4.6.2.1B, levi panel) praćena značajnim povećanjem gustine spektralne snage (Slika 4.6.2.1B, desni panel).

Rezultati kvantitativne analize EEG-a sa ciljem utvrđivanja postojanja razlike u iktalnim karakteristikama ispitivanih grupa prikazani su na Slika 4.6.2.3. Uočeno je da je medijana broja SWD-a po pacovu je bila statistički značajno veća u AG₁₀₀HTu poređenju sa HT grupom ($p < 0,05$, Slika 4.6.2.3A). Takođe, trajanje SWD-a je bila statistički značajno veće u AG₁₀₀HTu poređenju sa HT grupom ($p < 0,05$, Slika 4.6.2.3B).

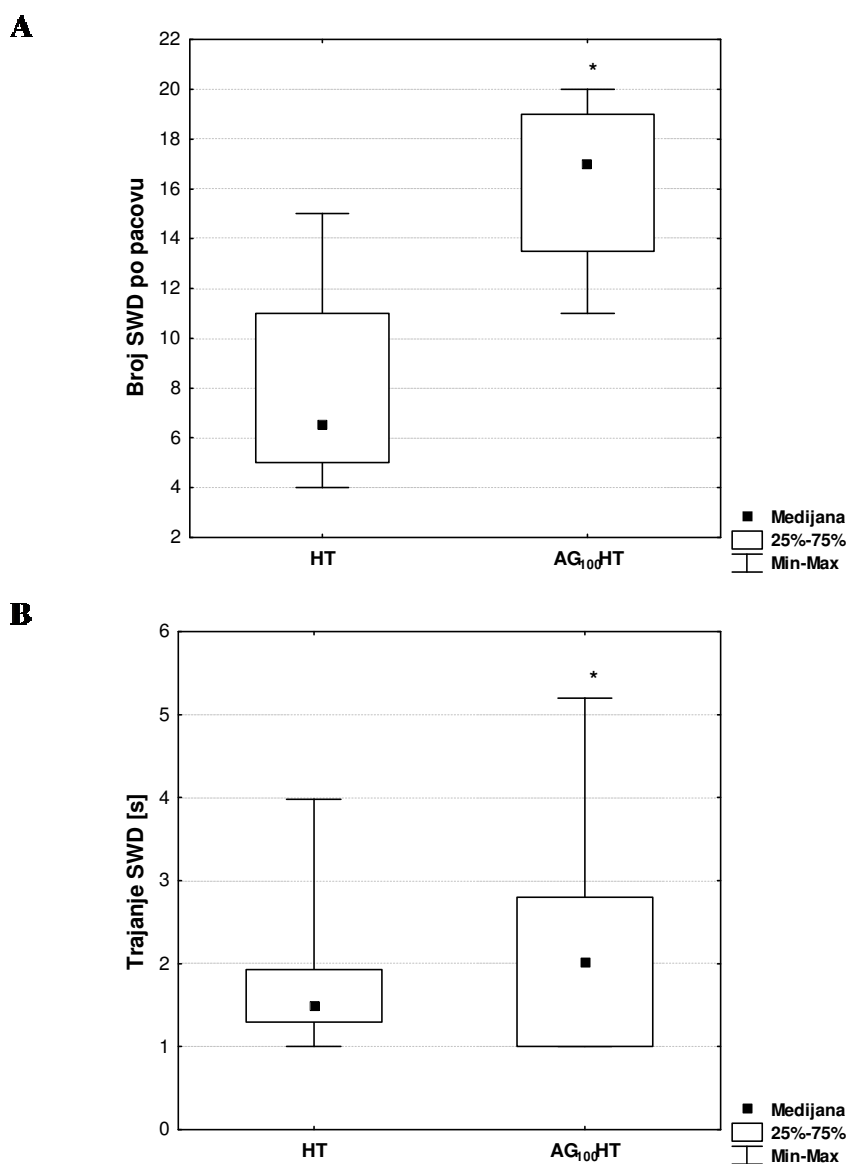


Slika 4.6.2.1. Reprezentativni EEG zapisi u kontrolnoj grupi životinja (A) i pojava SWD u AG₁₀₀HT (B) grupi životinja. Korespondentna gustina spektralne snage prikazana je na panelu (C) i (D).

Odvodi: levi frontalni – desni parijetalni.

Kalibracija vremenske ose 1s, kalibracija amplitudne ose 100 μ V.

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.6.1.1.



Slika 4.6.2.3. Broj (A) i trajanje (B) of SWD-a tokom 90 min od administracije homocistein tiolaktona u eksperimentalnim grupama.

Statistička značajnost razlika između grupa utvrđena je Kruskal –Wallis ANOVA i Mann – Whitney U testom. (* $p < 0.05$).

Za detalje videti objašnjenje uz Sliku 4.6.1.1. i Sliku 4.6.1.2.

5. DISKUSIJA

5.1. Hipermetioninska dijeta i razvoj umerene hiperhomocisteinemije

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da hipermetioninska dijeta (u kojoj je sadržaj metionina bio 7,7 g/kg, odnosno duplo veći nego u standardnoj dijeti) u trajanju od 30 dana dovodi do statistički značajnog porasta nivoa homocisteina u krvi i do razvoja umerene hiperhomocisteinemije kod odraslih pacova.

Fiziološki opseg koncentracije homocisteina u krvi je 5-15 $\mu\text{mol/l}$ i životinje iz kontrolne grupe koje su bile na režimu standardne ishrane imale su nivo homocisteina u krvi u opsegu fizioloških vrednosti ($8,58 \pm 0,38 \mu\text{mol/l}$). Hiperhomocisteinemija postoji kada je ukupan homocistein u krvi veći od 15 $\mu\text{mol/l}$, a može biti uzrokovana bilo abnormalnošću enzima (cistation β -sintaza ili termolabilna metilentetrahidrofolat reduktaza) ili kofaktora (folat, vitamin B-12, vitamin B-6) potrebnih za metabolizam homocisteina. Blaga hiperhomocisteinemija postoji kada je nivo homocisteina u rasponu od 15 do 30 $\mu\text{mol/l}$, umerena u slučaju vrednosti koje se nalaze između 31 i 100 $\mu\text{mol/l}$, a stanje teške hiperhomocisteinemije je definisano kada je nivo homocisteina veći od 100 $\mu\text{mol/l}$ (De Bree et al., 2002; Troen et al., 2008). Blaga hiperhomocisteinemija (15-30 $\mu\text{mol/l}$) je najčešće uzrokovana deficitom folne kiseline, vitamina B-6 i vitamina B-12. Genetski faktori, određeni lekovi i bubrežno oštećenje takođe mogu doprineti nastanku hiperhomocisteinemije (Selhub et al., 1993). Sem toga, pokazano je da blaga (15-30 $\mu\text{mol/l}$) i umerena (31-100 $\mu\text{mol/l}$) hiperhomocisteinemija nastaju kao rezultat promena načina života ili kao posledica bolesti i terapije lekovima. Sa druge strane, teška ($>100 \mu\text{mol/l}$) hiperhomocisteinemija je rezultat homozigotnih genetskih defekata, kao što su nedostatak CBS ili MTHFR (De Bree et al., 2002). Stoga je teška hiperhomocisteinemija retka, dok su blaga i umerena hiperhomocisteinemija znatno prisutnije u različitim populacijama (De Bree et al., 2002).

Brojne epidemiološke i eksperimentalne studije su pokazale da su upravo blaga i umerena hiperhomocisteinemija faktori rizika za razvoj brojnih kardiovaskularnih (Djuric et al., 2008; Sharma et al., 2007), neuroloških i različitih

drugih oboljenja kao što su dijabetes, psorijaza i maligne bolesti (Herrmann and Obeid, 2011). Upravo to implicira značaj proučavanje ovih nivoa hiperhomocisteinemije.

Većina eksperimentalnih modela hronične hiperhomocisteinemije nastaje egzogenom aplikacijom homocisteina (Scherer et al., 2011). Sa druge strane, genetički intaktne životinje na hipermetioninskoj dijeti su ekvivalent bogatoj metioninskoj ishrani u opštoj humanoj populaciji, te je u ovom istraživanju primenjena dijeta sa povećanim sadržajem metionina. Opšte uzevši, hrana životinjskog porekla je bogatija metioninom od hrane biljnog porekla. Tako, meso i riba sadrže 2,7g/100 g, jaja 3,2/100 g, kravlje mleko 2,9 g/100 ml metionina, dok voće i povrće sadrže oko 1 g/100 g.

Razvoj hiperhomocisteinemije u toku ishrane obogaćene metioninom posledica je metaboličke povezanosti metionina i homocisteina. Naime, kao što je već istaknuto, metionin se konvertuje u S-adenozilmetionin (SAM) dejstvom metionin adenziltransferaze. SAM služi kao metil-donor u mnogim metiltransferaznim reakcijama, a on se konvertuje u S-adenozilhomocistein (SAH). Naposletku adenzilhomocisteinaza konvertuje SAH u homocistein. Sudbina homocisteina može biti dvojaka: on može biti iskorišćen za regenerisanje metionina ili za stvaranje cisteina (Lehninger et al., 2000; Djuric et al., 2008).

Ishrana obogaćena metioninom kod pacova u ovom istraživanju rezultirala je razvojem umerene hiperhomocisteinemije, odnosno srednja vrednost koncentracije homocisteina kod pacova iz eksperimentalne grupe iznosila je $33,36 \pm 4,39 \mu\text{mol/l}$. U literaturi je opisano nekoliko eksperimentalnih modela za razvoj hiperhomocisteinemije (Pexa et al., 2009). Teška hiperhomocisteinemija se razvija kod CBS knock out miševa (Dayal et al., 2004). Blaga eksperimentalna hiperhomocisteinemija se najčešće postiže primenom različitih intervencija u režimu ishrane, kao što su dijeta siromašna folatima/vitaminom B12 (Blaise et al., 2007), obogaćena metioninom (Fukada et al., 2006; De Vries et al., 2004) ili kombinacijom deficita vitamina B kompleksa i povećanog sadržaja metionina (De Vries et al., 2004). Međutim, sugerisano je da neki od opserviranih efekata mogu biti posledica samog deficita folata, odnosno vitamina B kompleksa, a ne

povećanog nivoa homocisteina. Egzogeni aplikacija homocisteina ili njegovih metabolita takođe je čest način indukcije hiperhomocisteinemije (Scherer et al., 2011). Animalni modeli hiperhomocisteinemija razlikuju se i u pogledu eksperimentalnih subjekata, tako da se u različitim studijama koriste Wistar pacovi (Scherer et al., 2011; Pexa et al., 2009; Setoue et al., 2008), Spregue-Dawley pacovi (Morita et al., 2001; Hansrani et al., 2008; Guo et al., 2008), bilo muškog (Setoue et al., 2008) ili ženskog (De Vries et al., 2004; Pexa et al., 2009) pola, kao i različite starosti. Eksperimentalni subjekti mogu primiti izmenjenu hranu ili piti vodu u kojoj je rastvorena odgovarajuća supstanca, ili se supstanca aplikuje intraperitonealno ili subkutano (Scherer et al., 2011). Varijabilna je i dužina eksperimentalne intervencije, od 7 dana do preko 3 meseca. Zbog ovakvih razlika u korišćenim modelima, postoje i razlike u opserviranim efektima (Pexa et al., 2009). U ovom istraživanju korišćeni su pacovi soja Wistar albino, muškog pola, kojima je bila dostupna ad libitum hrana obogaćena metionom (7,7 g/kg, duplo veći sadržaj u odnosu na standardnu hranu koju su dobijale kontrolne životinje) u periodu od 30. do 60. postnatalnog dana, što je jedinstvena kombinacija razmatranih eksperimentalnih varijabli u poređenju sa drugim eksperimentalnim modelima.

Režim hipermetioninske ishrane primenjen u ovom istraživanju nije doveo do promena u unosu hrane niti u prirastu mase pacova tokom 30 dana koliko je dijeta bila primenjena, jer nisu opservirane značajne razlike u dnevnom unosu hrane između životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe, a nisu postojale ni značajne razlike u pogledu mase pacova ni u jednom danu. Životinje iz obe grupe imale su konstantan prirast mase.

Histološka analiza preparata mozga, srca, aorte i jetre kod životinja na hipermetioninskoj dijeti nije pokazala razvoj značajnijih patoloških promena. Naime, pokazano je da nije bilo promena u tkivu mozga životinja koje su bile na hipermetioninskoj dijeti u odnosu na kontrolne životinje. Takođe, nije bilo histopatoloških promena u zidu aorte koje bi mogle biti vidljive svetlosnom mikroskopijom, izuzev u vidu zadebljanja samog korena aorte kod jedne od životinja iz eksperimentalne grupe. Histopatološka analiza je pokazala normalnu strukturu parenhima jetre, kako kod životinja iz kontrolne, tako i kod životinja iz

eksperimentalne grupe, s tim da je sporadično moguće bilo uočiti mitohondriozu i mikrovezikularnu steatozu. Promene vidljive na svetlosnom mikroskopu prevashodno su zahvatale subendokardni region srčanog zida. Odsustvo upadljivog histopatološkog nalaza na ispitivanim organima može biti posledica primenjenog trajanja dijeta i postignutog nivoa hiperhomocisteinemije. Incipijentne promene zahvataju subendokardni region srčanog zida što ukazuje na njegovu vulnerabilnost, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih studija (Pexa et al., 2009).

5.2. Proepileptogeni efekti hipermetioninske dijeta

Ispitivanje efekata hipermetioninske dijeta na epileptičnu aktivnost izazvanu homocistein tiolaktonom, tj. uticaj ishrane obogaćene metioninom na hiperekscitabilnost centralnog nervnog sistema, pokazali su da su životinje iz kontrolne grupe koje su bile na režimu standardne ishrane nakon administracije subkonvulzivne doze homocistein tiolaktona odgovorile blagim konvulzivnim napadima. Dalja analiza parametara konvulzivnog ponašanja, pokazala je da je došlo do visoko statistički značajnog povećanja incidence napada u eksperimentalnoj grupi koja je bila na hipermetioninskoj dijeti u odnosu na kontrolnu grupu nakon administracije homocistein tiolaktona, statistički visoko značajnog skraćivanja latentnog perioda, a statistički visoko značajnog povećanja broja konvulzivnih epizoda po pacovu. Međutim, hipermetioninska dijeta nije imala uticaja na intenzitet konvulzivnih epizoda. Analiza iktalne aktivnosti pokazala je da je hipermetioninska dijeta potencirala pojavu epileptiformnih elemenata u formi SWD-a u eksperimentalnoj grupi životinja.

Uprkos postojanju nekoliko teorija, uloga homocisteina i njegovih derivata u razvoju neurotoksičnosti/hiperekscitabilnosti i dalje ostaje nerešena. Rasvetljavanje veze između homocisteina i disfunkcije CNS-a od vitalne je važnosti za unapređenje terapije neuroloških oboljenja čiji mehanizmi uključuju homocistein (Stanojlović et al., 2011). Mozak je posebno osetljiv na visoke nivoe homocisteina zbog insufijentnosti metaboličkih puteva za njegovu degradaciju u

ovom tkivu. Akumulacija homocisteina u mozgu za posledicu ima povećanje intracelularnih nivoa SAH, koji je potentan inhibitor brojnih metilacionih reakcija, uključujući i O-metilaciju biogenih amina. Narušavanje normalnih obrazaca metilacionih procesa za posledicu može imati povećanu propustljivost krvno-moždane barijere (Kamath et al., 2006).

Kada je prisutan u suprafiziološkim koncentracijama, homocistein, kao ekscitatorna amino kiselina, povećava glutamatergičku neurotransmisiju koja dovodi do neurotoksičnosti i ekscitotoksičnosti (Stanojlovic et al., 2011). Homocistein indukuje aktivaciju jonotropnih (Lipton et al., 1997) i grupe I i III metabotropnih glutamatskih receptora (Lazarewicz et al., 2003; Jakubowski, 2004). Sem toga, metabolički produkti homocisteina kao što je homocisteinska kiselina su takođe vrlo potentni neurotoksini koji deluju kao agonisti glutamatskih receptora (Shi et al., 2003). U uslovima povećane koncentracije glicina, čak i male koncentracije homocisteina (10 $\mu\text{mol/L}$) mogu biti ekscitotoksične, jer homocistein ima dvostruko dejstvo na NMDA receptore, zavisno od koncentracije glicina (Lipton et al., 1997; Ho et al., 2002). Naime, pri niskim koncentracijama glicina, homocistein deluje kao parcijalni antagonista glicinskog mesta i inhibira NMDA receptor, te ispoljava neuroprotektivni uticaj (Lipton et al., 1997), što sprečava prekomernu stimulaciju ovog receptora kada je nivo homocisteina u fiziološkim granicama. S druge strane, homocistein može da deluje i kao agonista NMDA receptora, što dovodi do influksa Ca^{2+} i ekscitotoksičnosti. Homocistein ne samo da direktno indukuje neurotoksičnost, već može i da potencira glutamatom izazvanu neurotoksičnost. Naime, inicijalni influks Ca^{2+} kroz NMDA receptore, stimuliše oslobađanje glutamata koji aktivira metabotropne glutamatske receptore i dovodi do sekundarnog influksa jona Ca^{2+} i posledične ekscitotoksičnosti (Ho et al., 2002). Sem toga, aktivacija ovih receptora homocisteinom dovodi do aktivacije protein kinaze C i povećane produkcije inozitol trifosfata, što povećava osetljivost endoplazmatskog retikuluma na intracelularni Ca^{2+} (Sachdev, 2005). Treba istaći i da toksični efekti homocisteina zahvataju i mikrogliju (Zou et al., 2010). Ovakvi efekti homocisteina u CNS-u mogu doprineti objašnjenju povećane ekscitabilnosti kod životinja na režimu

hipermetioninske ishrane pokazane u ovom istraživanju, a što se manifestovalo potencijacijom epileptične aktivnosti izazvane homocistein tiolaktonom.

Stanojlović et al. (2009) su pokazali da intraperitonealna administracija homocistein tiolaktona odraslim pacovima predstavlja pogodan model generalizovanih epilepsija koga karakterišu definisani motorni fenomeni u ponašanju životinja, kao i pojava karakterističnih električnih fenomena u EEG koji po svojim karakteristikama zadovoljavaju kriterijume iktalnih grafoelemenata poznatih kao šiljak talas pražnjenja (SWD), a u ponašanju su korelisani apsansnim tipom bihejvioralnih manifestacija. Promene u neuronskim krugovima do kojih dovodi administracija homocistein tiolaktona karakteriše koegzistencija konvulzivnih i apsansnih napada praćenih slabom elektrokliničkom korelacijom, sa dominacijom motornih fenomena u manifestacijama konvulzivnog ponašanja i SWD obrazaca u EEG. Karakteristike SWD su: a) paroksizmalna pojava, b) dominantna gustina spektralne snage u opsegu 6 – 8 Hz; c) trajanje minimum 1s; d) amplituda bar dvostruko veća od bazalne aktivnosti.

Sener et al. (2006) su uočili da antiepileptici dovode do razvoja hiperhomocisteinemije. Naime, klasični antiepileptici poput fenitoina, karbamazepina i valproata smanjuju koncentraciju folata u plazmi i dovode do povećanja nivoa homocisteina, što dodatno aktuelizuje pitanje odnosa homocisteina i epileptogeneze.

Dakle, rezultati ovog istraživanja pokazuju da hipermetioninska dijeta ima proepileptogeni efekat i potencira pojavu epileptične aktivnosti izazvane homocistein tiolaktonom.

5.3. Proanksiogeni efekti hipermetioninske dijetе

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je ishrana obogaćena metioninom kod životinja dovela do statistički značajnog skraćenja pređenog puta i vremena ambulatornog kretanja (parametara horizontalne lokomotorne aktivnosti) u testu otvorenog polja; smanjenja broja propinjanja na zadnje ekstremitete. Takođe, došlo je do statistički značajnog skraćenja vremena provedenog u centru

otvorenog polja, kao i statistički značajnog povećanja indeksa tigmotaksije. Rezultati dobijeni primenom testa svetlost-tama u ovom istraživanju pokazali su da su životinje iz eksperimentalne grupe koje su bile na hipermetioninskoj dijeti provodile statistički značajno manje vremena u svetlom delu kompartmana tokom ovog testa.

Skraćenje vremena provedenog u centru otvorenog polja, kao i smanjenje broja propinjanja na zadnje ekstremitete, uz smanjenje vremena provedenog u svetlom kompartmanu, pokazatelji su povećane anksioznosti kod životinja (Prut and Belzung, 2003), što je u ovom istraživanju utvrđeno nakon tridesetodnevne dijeta sa povećanim sadržajem metionina. Kao što je već istaknuto, ishrana obogaćena metioninom u ovom istraživanju dovela je do razvoja umerene hiperhomocisteinemije, te može predstavljati eksperimentalni model za ispitivanje efekata hiperhomocisteinemije (Zhang et al., 2004). Sem toga, naši rezultati su pokazali i da dijeta sa povećanim sadržajem metionina povećava indeks tigmotaksije, koji je jedan od značajnih etoloških pokazatelja anksioznosti (Simon et al, 1994).

Prema rezultatima ATTICA studije (Pitsavos et al., 2006), kako kod muškaraca, tako i kod žena, postoji pozitivna korelacija između anksioznosti procenjene Spielbergerovom STAI skalom i povećanih nivoa homocisteina, što je u saglasnosti sa rezultatima ovog istraživanja. Sa druge strane, rezultati Hordaland studije (Bjelland et al., 2003) nisu pokazali povezanost između hiperhomocisteinemije i anksioznosti.

Poznato je da u nastanku anksioznosti učestvuju delovi limbičkog sistema (Charney et al., 1996), a rezultati više različitih studija su pokazali da glutamatergički sistem ovih struktura ima ključnu ulogu u genezi anksioznih poremećaja (Bergink et al., 2004; Garakani et al., 2006; Millan 2003; Vaquero-Lorenzo et al., 2008). Svoje efekte glutamat ostvaruje preko jonotropnih (N-metil-D-aspartat, NMDA i non-NMDA) i metabotropnih receptora. Veliki broj studija je pokazao da izuzev ketamina (nekompetitivni antagonist), čije je dejstvo bilo anksiogeno (Silvestre et al., 1997), nekompetitivni antagonist NMDA receptora (MK 801, fenciklidin, ifenprodil) i naročito kompetitivni (AP5, AP7, CGP 37849)

deluju anksiolitički (Harvey and Shahid, 2012). Slični rezultati dobijeni su ispitivanjem uloge antagonista grupe I metabotropnih receptora u nastanku anksioznosti (Pietraszek et al., 2005; Steckler et al., 2005). Sa druge strane, homocisteina na NMDA i grupu I metabotropnih receptora ispoljava kako direktan ekscitatorni efekat (Troen, 2005), tako i indirektan efekat povećavanjem oslobađanja ekscitatornih aminokiselina (Folbergrova, 1997). Ovi mehanizmi doprinose objašnjenju anksiozenih efekata homocisteina koji su pokazani rezultatima ovog istraživanja.

Jedan od mehanizama uključenih u nastanak anksioznosti, prema skorašnjim shvatanjima, je i oksidativni stres (Bouayed et al., 2009). Naime, utvrđena je pozitivna korelacija između intracelularnog nivoa slobodnih radikala i anksioznog ponašanja kod životinja (Rammal et al., 2008). Takođe, ukazano je na jaku vezu između porasta aktivnosti superoksid dizmutaze (SOD) i pojave anksioznosti kod glodara (Rammal et al., 2008). Nekoliko različitih istraživanja je pokazalo da se kod anksioznosti smanjuje nivo antioksidanasa, poput vitamina C i E (Sarandol et al., 2008; Ersan et al., 2008). Lipidna peroksidacija je jedan od pokazatelja ćelijskog oštećenja vezanog za oksidativni stres. Povećeni nivo lipidne peroksidacije u krvi i urinu ustanovljen je kod pacijenata sa depresijom, opsesivno kompulsivnim poremećajima i anksioznošću (Atmaca et al., 2008). S druge strane, poznato je da homocistein svoje efekte u neurodegeneraciji ostvaruje, između ostalog, i tako što podiže nivo oksidativnog stresa (Obeid and Herrmann, 2006; Ramakrishnan et al., 2006), što je pokazano i rezultatima ovog istraživanja u određenim regionima mozga (za detalje videti u nastavku diskusije). Kliničke studije koje su uključivale pacijente obbolele od vaskularnih bolesti su pokazale da što je nivo homocisteina viši dolazi do većeg porasta SOD aktivnosti (David et al., 2000). Irie et al. (2001) su pokazali da u leukocitima žena sa anksioznošću dolazi do povećanog oksidativnog oštećenja DNK molekula što neminovno vodi ćelijskoj smrti, a brojni ekscitatorni efekti homocisteina se upravo ostvaruju ovim putem. Naime, poznato je da homocistein može da interferira sa proteinskom biosintezom, smanji aktivnost proteina (Chwatko and Jakubowski, 2005), i moduliše membranski transport elektrona što može rezultirati ćelijskom smrću (Perla-Kajan et al., 2007).

Prema brojnim kliničkim studijama postoje dokazi o proinflamatornom i protrombotičnom dejstvu homocisteina (Troen, 2005). S druge strane, ATTICA studijom je pokazano da su simptomi anksioznosti povezani sa porastom inflamacije i koagulacionim procesom kod odraslih ljudi. Tačnije, utvrđen je skok inflamatornih faktora, poput C reaktivnog proteina, kao i porast fibrinogena kako kod muškaraca, tako i kod žena (Pitsavos et al., 2006). To ukazuje da proces zapaljenja i koagulacije može biti jedan od mehanizama kojim homocistein deluje anksiogeno.

Odnos epilepsije i anksioznosti može doprineti razumevanju uloge homocisteina u patogenezi anksioznosti. Naime, kod ljudi je epilepsija često praćena anksioznim poremećajima kao komorbiditetom (Hamid et al., 2011; Vazquez and Devinsky, 2003), Ova povezanost verifikovana je i u različitim animalnim modelima epilepsija (Depaulis et al., 1997; Helfer et al., 1996). S druge strane, kao što je istaknuto, homocistein tiolakton dovodi do dva tipa napada kod eksperimentalnih životinja (Stanojlović et al., 2009), a prema rezultatima ovog istraživanja umerena hiperhomocisteinemija izazvana hipermetioninskom dijetom, deluje proepileptogeno.

Stoga, rezultati ovog istraživanja ukazuju da hipermetioninska dijeta ima proanksiogene efekte.

5.4. Biohemijske promene uzrokovane efektima hipermetioninske dijete

5.4.1. Aktivnosti enzima Na⁺/K⁺-ATPaze i E-NTPDaze

Efeki tridesetodnevne hipermetioninske dijete doveli su do statistički značajnog smanjenja aktivnosti enzima Na⁺/K⁺-ATPaze u ovom istraživanju, a nije bilo značajnog efekta na aktivnost E-NTPDaze u mozgu.

Ovakav efekat hipermetioninske dijete u saglasnosti je sa drugim studijama, ako se uzme u obzir da je ovaj režim ishrane doveo do razvoja

hiperhomocisteinemije u ovom istraživanju. Naime, različite studije su pokazale da homocistein inhibira aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze u sinaptičkim plazma membranama hipokampusa pacova, a nema uticaja na aktivnost E-NTPDaze (Streck et al., 2002; Wyse et al., 2002, Rašić-Marković et al., 2009). Međutim, pokazano je i da hronična hiperhomocisteinemija povećava aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze u prefrontalnom, a smanjuje njenu aktivnostu perijetalnom korteksu, kao i da nema uticaja na aktivnost ovog enzima u cingularnom korteksu (Matte et al., 2004). Sa druge strane, akutna hiperhomocisteinemija izaziva snažnu inhibiciju Na^+/K^+ - ATPaze u parijetalnom korteksu (Matte et al., 2006). Rašić-Marković et al. (2009) su pokazali da je akutna administracija homocistein tiolaktona izazvala snažnu inhibiciju Na^+/K^+ -ATPaze u svim ispitivanim strukturama mozga: korteksu, hipokampusu i moždanom stablu, dok D,L homocistein izaziva umerenu inhibiciju hipokampalne Na^+/K^+ -ATPaze, a ne utiče na aktivnost ovog enzima u korteksu i moždanom stablu. Ove razlike objašnjene su različitom distribucijom pojedinih izoformi ovog enzima u različitim regionima mozga. Hrnčić et al. (2010) su pokazali da primena L-arginina, prekursora NO, sprečava inhibitorni uticaj homocistein tiolaktona na smanjenje aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze i vrši potpunu reverziju inhibicije ENTDPaze izazvane homocistein tiolaktonom.

Sugerisano je da smanjenje aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze dovodi do hiperekscitabilnosti i selektivnog oštećenja neurona, kako kod ljudi, tako i kod pacova (Matte et al., 2006), te opservirano smanjenje aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze u ovom istraživanju nakon hipermetioninske dijeta može doprineti razjašnjenju uočenih proepileptogenih efekata ovog režima ishrane.

Naime, inhibicija aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze dovodi do akumulacije glutamata u sinaptičkoj pukotini, jer su glutamatski transporteri Na^+ - zavisni proteini koji koriste gradijent koji stvara ova pumpa (Streck et al., 2003). Stoga inhibicija pumpe dovodi do narušavanja elektrohemijskog gradijenta i poremećaja u preuzimanju glutamata, kao ekscitatornog neurotransmitera.

5.4.2. Aktivnost enzima acetilholinesteraze

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je tridesetodnevna hipermetioninska dijeta dovela do smanjenja aktivnosti enzima acetilholinesteraze u svim ispitivanim moždanim regionima (korteks, hipokampus, talamus i nc. caudatus), ali je uočena inhibicija bila statistički značajna samo u korteksu. Takođe, aktivnost acetilholinesteraze je bila smanjena i u srcu životinja na hipermetioninskom režimu ishrane, ali opservirano smanjenje nije bilo statistički značajno.

Acetilholinesteraza je odgovorna za hidrolizu acetilholina u holinergičkim sinapsama, te dejstvo acetilholina u sinaptičkim pukotinama zavisi od aktivnosti ovog enzima (Prado et al., 2002). Iako se transkribuje sa samo jednog gena, zahvaljujući postranslacionim modifikacijama, acetilholinesteraza postoji u različitim izoformama, što može objasniti selektivnu vulnerabilnost različitih regiona mozga koja je utvrđena u ovom istraživanju, pri čemu je najveća osetljivost pokazana u korteksu. Kada su u pitanju efekti hiperhomocisteinemije na aktivnost holinesteraza, malobrojne in vitro studije koje su se bavile ovom problematikom pokazale su različite rezultate. Do sada su ispitani efekti homocisteina na aktivnost holinesteraza u in vitro uslovima i pokazano je da hiperhomocisteinemija dovodi do smanjenja aktivnosti acetilholinesteraze (Schulpis et al., 2006). Sugerisano je da je dobijena inhibicija acetilholinesteraze posredovana oksidativnim stresom (Schulpis et al., 2006). In vitro studije su pokazale da metionin nema efekta, a homocistein inhibira aktivnost butirliholinesteraze (Stefanello et al., 2003) i da je ostvarena inhibicija bila po tipu kompetitivne inhibicije. In vivo i in vitro studijom, Scherer et al (2007) su pokazali da akutna hiperhomocisteinemija inhibira aktivnost holinesteraza u serumu ljudi i pacova. Rezultati Petrovića et al. (2010) su pokazali da akutna aplikacija homocistein tiolaktona u dozi od 5,5 mmol/kg dovodi do značajnog smanjenja aktivnosti acetilholinesteraze u homogenatu tkiva mozga i naročito srca, a da nije bilo statistički značajnih efekata na aktivnost ovog enzima u krvi pacova. Time je naznačena uloga metabolita homocisteina, homocistein tiolaktona, kao medijatora ovih efekata. Međutim, Darvesh et al. (2007) su pokazali

da homocistein povećava aktivnost butirilholinesteraze, da homocistein nije imao značajnog efekta na aktivnost acetilholinesteraze, dok je homocistein tiolakton smanjio njenu aktivnost.

Funkcije holinergetičnog sistema u nervnom sistemu su brojne. Selektivna degeneracija holinergetičkih neurona postoji u demencijama, dok acetilholin učestvuje i u regulaciji bioloških ritmova. Takođe, inhibicija aktivnosti acetilholinesteraze se smatra delom odgovornom i za ispoljavanje neurotoksičnih efekata lindana (Vučević et al., 2009), ali i brojnih drugih pesticida. Sem toga, acetilholin je uključen i u genezu epileptičnih napada (Turski et al. 1989; Li et al., 2003). Mikroulis and Psarro (2012) su pokazali da acetilholin, delujući preko muskarinskih receptora, potencira frekvencu NMDA-uzrokovanih interiktalnih pražnjenja u hipokampusu. Poznat je model epileptične aktivnosti izazvane somanom, koja nastaje kao posledica ireverzibilne inhibicije acetilholinesteraze sa posledičnom hiperaktivnošću holinergetičkog sistema (de Araujo Furtado et al., 2012). I druge skorašnje studije potenciraju ulogu disregulacije holinergetičkog sistema u mehanizmima epileptogeneze, ukazujući na značaj odnosa sa imunskim sistemom (Gnatek et al., 2012). Stoga, u ovom istraživanju uočena inhibicija aktivnosti acetilholinesteraze u korteksu životinja koje su bile na režimu hipermetioninske ishrane i razvile umerenu hiperhomocisteinemiju, može biti, bar delom, odgovorna za razvoj hiperekscitabilnosti kod ovih životinja.

5.4.3. Modulacija pokazatelja oksidativnog stresa

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je tridesetodnevna hipermetioninska dijeta dovela do statistički značajnog povećanja lipidne peroksidacije u korteksu i nc. caudatusu životinja, dok opservirane razlike u nivou lipidne peroksidacije u hipokampusu i talamusu nisu bile statistički značajne.

Oksidativni stres, uzrokovan neravnotežom između stvaranja i detoksikacije ROS, igra važnu ulogu u starenju mozga, neurodegenerativnim oboljenjima, i drugim povezanim poremećajima, kao što je ishemija (Wang et al., 2010). Dok su u fiziološkim nivoima ROS služe kao signalni molekuli, ali ekscesivna

količina ovih molekula dovodi do oksidativne modifikacije i sledstvene disfunkcije proteina, nukleinskih kiselina i lipida (Wang et al., 2010). Jedna od posledica oksidativnog stresa u mozgu je i lipidna peroksidacija. Ona je u ovom istraživanju ispitivana pomoću koncentracije MDA, a koja je, kao što je istaknuto, bila statistički značajno povišena u korteksu i nc. caudatusu. Povećanje oksidativnog stresa u mozgu nastalog usled povećane koncentracije homocisteina u plazmi sugerisale su i druge studije (Boldyrev et al., 2005; Makhro et al., 2008).

Treba istaći da je mozak posebno osetljiv na oksidativni stres iz nekoliko razloga (Matté et al., 2009): potrošnja kiseonika je velika, ekstenzivno prisustvo glutamata kao neurotransmitera, visok sadržaj gvožđa i polinezasićenih masnih kiselina, nizak antioksidativni kapacitet u poređenju sa drugim organima, kao i prisustvo mikroglije.

Ukazano je da se toksični efekti homocisteina i njegovih derivata, uočeni na određenim ćelijama, dešavaju putem receptora za glutamat (Shi et al., 2003), odnosno da su ovi efekti posredovani aktivacijom NMDA receptora. Njihova aktivacija rezultuje intracelularnim povećanjem koncentracije jona kalcijuma i velikim nakupljanjem ROS unutar neurona (Boldyrev et al., 2004). Povećanje nivoa ROS može biti trenutni razlog toksičnih dejstava, a pokazano je da SOD i CAT imaju protektivne efekte na oba ova stanja (Kim and Pae, 1996). Nađeno je da je jedna od posledica inkubacije preparata hipokampusu sa homocisteinom inaktivacija intracelularnih proteinskih fosfataza i posledična hiperfosforilacija neurofilamenata koja rezultuje oštećenjem citoskeleta (Loureiro et al., 2008). Međutim, homocistein treba biti posmatran kao slab neurotoksin, dok se neki njegovi derivati, kao što je homocisteinična kiselina i naročito homocistein tiolakton, mogu smatrati endogenim neurotoksinima i mogu imati mnogo neurotoksičniji efekat od samog homocisteina (Do et al. 2004; Stanojlović et al. 2009, 2011; Hrnčić et al., 2012). Homocistein i njegovi derivati pokazuju slične efekte na povećanje nivoa Ca^{2+} i ROS unutar neurona, indukcijom Ca^{2+} signalne kaskade koja prethodi akumulaciji ROS, što može odgovarati inicijaciji apoptotskog procesa (Boldyrev, 2009).

Ukazano je da oksidativni stres može predstavlјati јedan od značajnih mehanizama neurotoksičnosti izazvane homocisteinom. Naime, homocistein indukuje lipidnu peroksidaciju mozga putem NMDA receptora, te tokom hiperhomocisteinemije dolazi do povećanog stvaranja ROS, a predloženi mehanizmi ove akumulacije ROS uključuju:

a) oksidaciju homocisteina: Naime, homocistein se neprekidno oksiduje i tokom oksidacije sulfhidrilnih grupa homocistena i SH-grupa drugih јedinjenja, formiraju se ROS, prevashodno superoksid anjon, vodonik peroksid i hidroksilni slobodni radikali (Ramakrishnan, 2006);

b) intracelularno nakupljanje jona Ca^{2+} : Sugerisano je da su ekscitotoksičnost i oksidativni stres posledica homocisteinom-indukovanog influksa Ca^{2+} (Doherty, 2007; Ermak and Davies, 2002)

c) smanjene koncentracije SAM: U toku hiperhomocisteinemije može doći do povećanja koncentracije SAH i smanjenja SAM u tkivu mozga (Gharib et al., 1983), a upravo je za SAM pokazano da ima antioksidativnu ulogu jer stimuliše produkciju glutationa i smanjuje nivo lipidne peroksidacije (Villalobos et al., 2000).

Znaјуći, dakle, da hiperhomocisteinemija povećava produkciju ROS, u prvom redu vodonik peroksida i superoksid anjona, može se pretpostaviti da oksidativni stres ima ulogu u oštećenju CNS-a izazvanom homocisteinom i homocistein tiolaktonom (Ho et al., 2002; Obeid and Herrmann 2006; Streck et al., 2002), odnosno doprineti razvoju hiperekscitabilnosti i sledstvenim proepileptogenim efektima hipermetioninske diјete koji su pokazani u ovom istraživanju.

Međutim, različiti regioni mozga pokazali su različit odgovor na oksidativni stres indukovan diјetom obogaćenom metioninom u ovom istraživanju. Na to ukazuje činjenica da vrednosti MDA nisu bile značajno povećane u svim ispitivanim regionima mozga. Naime, korteks i nc. caudatus su pokazali veću osetljivost u odnosu na hipokampus i talamus.

Hipermetioninska diјeta je dovela da povećanja aktivnosti enzima SOD u hipokampusu, talamusu i nc. caudatusu pacova, a smanjenja aktivnosti SOD u korteksu, međutim opservirane razlike nisu bile statistički značajne. Sa druge

strane, aktivnost enzima CAT je bila značajno povećana u korteksu, hipokampusu i talamusu životinja koje su bile na hipermetioninskoj dijeti. Nivo redukovano glutaciona bio je značajno veći u hipokampusu, talamusu i nc. caudatusu kod životinja na hipermetioninskoj dijeti. Opserivirane razlike u aktivnosti GR nisu bile statistički značajne ni u jednoj od ovih struktura. Aktivnost enzima GPx je bila povećana u korteksu i talamusu, a bez značajne promene u hipokampusu i nc. caudatusu.

Povećanje aktivnosti pojedinih enzimskih antioksidativnih sistema i redukovano glutaciona u određenim strukturama, koje je pokazano rezultatima ovog istraživanja, može predstavljati odgovor na povećan oksidativni stres, tj. biti posledica razvoja adaptivnih mehanizama usmerenih protiv lipidne peroksidacije u ovim regionima mozga uzrokovane ekscesivnom produkcijom ROS. Rezultati istraživanja sprovedenog na drugačijem modelu indukcije hiperhomocisteinemije, u kom je pacovima administriran rastvor homocisteina subkutano (Matté et al., 2009), pokazali su da je hronična administracija homocisteina poremetila mehanizme antioksidativne odbrane u parijetalnom korteksu mozga pacova. Međutim, aktivnost CAT u ovom istraživanju bila je snižena u parijetalnom korteksu pacova, a povećana u serumu. Ova razlika se može objasniti procesom u kom dolazi do stvaranja ROS usled autooksidacije homocisteina (Pratt et al., 2011), što može biti slučaj u našem istraživanju. Takođe, ova uočena razlika može biti posledica različite osetljivosti neurona u različitim regionima mozga, s obzirom na to da je u našem istraživanju ispitivan dorzolateralni frontalni korteks, a u navedenom istraživanju parijetalni korteks.

Prema dostupnim literaturnim podacima, uticaj hiperhomocisteinemije na oksidativni stres i antioksidativne kapacitete je kontradiktoran, i zavisi, u prvom redu, od upotrebljenog modela hiperhomocisteinemije, ali i drugih faktora. Hronična hiperhomocisteinemija dovodi do oštećenja DNK u parijetalnom korteksu (Matté et al., 2009) i promena na nivou nuklearnih transportera i remećenja ćelijske funkcije (Patel et al., 2011). Takođe, razvoj hronične hiperhomocisteinemije postignut egzogenom aplikacijom homocisteina doveo je do povećanja TBARS (Matté et al., 2004) i produkcije ROS (Scherer et al., 2011,

Machado et al., 2011). Kada su u pitanju efekti hronične hiperhomocisteinemije na anitoksidativne enzime u CNS-u, određene studije pokazale su smanjenje aktivnosti CAT i GPx u parijetalnom korteksu (Matté et al., 2009, o čemu je već diskutovano); smanjenje CAT i SOD u hipokampusu (Matté et al., 2009), a opisano je i povećanje aktivnosti SOD u parijetalnom korteksu (Matté et al., 2009) i ne postojanje efekata na aktivnost antioksidativnih enzima u hipokampusu (Streck et al., 2003).

Na osnovu rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da je hipermetioninska dijeta indukovala pojavu oksidativnog stresa u mozgu pacova. Odgovor na oksidativni stres u mozgu pacova nije bio uniforman, već se razlikovao među određenim regionima mozga, pri čemu su korteks i nc. caudatus pokazali veću osetljivost u odnosu na hipokampus i talamus.

Rezultati ovog istraživanja nisu pokazali statistički značajan uticaj hipermetioninske dijetete na parametre oksidativnog stresa u srcu pacova, iako je opservirano smanjenje aktivnosti SOD i CAT u srcu.

5.4.4. Modulacija ekspresije ćelijskih markera

Rezultati kvantitativne analize nivoa ekspresije GFAP, kao markera astrocита i MOG kao markera oligodendrocita u korteksu i hipokampusu životinja, pokazali su da tridesetodnevna hipermetioninska dijeta dovodi do značajnog povećanja ekspresije MOG u korteksu životinja, odnosno povećanja oligodendrocita u korteksu ovih životinja.

Uloga glije u mehanizmima epileptogeneze postaje sve interesantnija za istraživače, s obzirom na otkrivanje sve brojnih uloga koje ove ćelije imaju u CNS-u. Oligodendroglijoza u različitim delovima korteksa pokazana je skorašnjom studijom (Stefanitis et al., 2012) kod pacijenata sa epilepsijom temporalnog režnja. Pretpostavlja se da ove promene mogu biti odgovorne za generalizaciju napada (Stefanitis et al., 2012; Kendal et al., 1999)

Ekspresija NeuN, kao markera neurona, je bila smanjena u korteksu, ali ne statistički značajno, dok je ekspresija ovog markera bila statistički značajno povećana u hipokampusu životinja koje su bile na hipermetioninskoj dijeti. Ovakav nalaz može biti protumačen u svjetlu novijih saznanja o hipokampalnoj neurogenezi i njenoj ulozi u procesu epileptogeneze (Kuruba et al., 2009; Parent 2002). Naime, pokazano je da hipokampalna neurogeneza može biti uključena u mehanizme epileptogeneze (Shetty et al., 2012; Kuruba et al., 2009). Hipokampalna neurogeneza može biti odgovor na kindling, naročito tokom mlađeg životnog perioda kod pacova (Shetty et al., 2012), te imajući u vidu protokol hipermetioninske dijete i ostvareni nivo umerene hiperhomocisteinemije to može biti jedno od objašnjenja efekata ove dijete.

5.5. Modulatorni efekat deprivacije spavanja na epileptičnu aktivnost izazvanu homocistein tiolaktonom

Efekti selektivne deprivacije REM spavanja na epileptičnu aktivnost izazvanu homocistein tiolaktonom ispitani su u ovom istraživanju primenom metode platforme. Dobijeni rezultati su pokazali da su incidenca konvulzivija izazvanih homocistein tiolaktonom i broj konvulzivnih epizoda po pacovu statistički značajno povećani, kao i da je latentni period do prve konvulzivne epizode statistički značajno skraćen u SH (mala platforma, deprivacija REM spavanja) grupi u odnosu na CH grupu, a da je broj konvulzivnih epizoda po pacovu statistički značajno povećan i u odnosu na LH (velika platforma, stres kontrola) grupu. Intenzitet konvulzivnih epizoda se nije značajno razlikovao u ovim grupama i pored toga što je u grupi SH maksimalni intezitet napada bio gradusa 4, a u grupama LH i CH gradusa 2. Sem toga, kvantitativna analiza EEG-a je pokazala da je selektivna deprivacija REM spavanja dovela i do statistički značajnog porasta broja SWD i njihovog trajanja u EEG-u.

Iz rezultata ovog istraživanja se vidi da su prokonvulzivna svojstva subkonvulzivne doze homocistein tiolaktona bila potencirana u grupi životinja koje

su prethodno bile podvrgnute deprivaciji REM spavanja. Međutim, otkriveno je da višednevna REM deprivacija dovodi do smanjenja koncentracije homocisteina u plazmi, a i onda kada im je dozvoljeno da spavaju koncentracija ne raste u toku prvih 48 h (Oliveira et al, 2002). Oliveira et al. (2002) su sugerisali da bi to mogao biti autoregulatorni odgovor na smanjenje količine glutationa u organizmu, koje nastaje zbog akumulacije slobodnih radikala usled deprivacije spavanja. Poznato je da spavanje doprinosi antioksidativnim snagama (Reimund, 1994). S druge strane, metoda deprivacije REM spavanja metodom platforme je poznata kao procedura povezana sa stresom, a izlaganje stresu je praćeno hiperhomocisteinijom (Stoney and Engebretson, 2000).

Iako mehanizmi konvulzivnog i neurotoksičnog dejstva homocisteina još nisu potpuno razjašnjeni, postoje dokazi da su brojni ekscitatorni efekti homocisteina i njegovih metabolita posledica prekomerne stimulacije jonotropnih i metabotropnih glutamatskih receptora, promocije oksidativnog stresa, indukcije oštećenja DNK i apoptoze (Troen, 2005; Djurić et al., 2008; Stanojlović et al., 2009), kao i inhibicije aktivnosti Na^+/K^+ ATP-aze (Rašić-Marković et al., 2009), kao što je već istaknuto, a delom i pokazano rezultatima iz ove studije. Hrnčić et al. (2010) su ispitivali funkcionalno učešće NO u epileptičnoj aktivnosti homocistein tiolaktonakod adultnih pacova i zaključili da sistemska administracija rastućih doza NO prekursora L-arginina smanjuje incidencu i broj konvulzivnih epizoda po pacovu, i produžava latentni period do prvog napada na dozno zavisani način. Naime, NO ostvaruje neuroprotektivnu i antioksidativnu ulogu gradeći S-nitroso-L-glutation (Rauhala et., 1998), dok homocistein i njegovi metaboliti mogu da povećaju oksidativni stres (Ramakrishnan et al., 2006). Nakon deprivacije REM spavanja dolazi do povećanja oksidativnog stresa (Reimund, 1994), što dodatno iscrpljuje antioksidativne kapacitete organizma i smanjuje nivoe NO-a. Na taj način umanjuju se i antikonvulzivni efekti NO-a. To bi moglo biti jedno od objašnjenja za potencijaciju efekata subkonvulzivne doze homocistein tiolaktona procesom selektivne deprivacije REM spavanja, koje je pokazano rezultatim ovog istraživanja.

Postoje dokazi da deprivacija spavanja facilitira epileptične napade modulacijom GABA-ergičkih funkcija (Jones, 2009), te bi i GABA sistem mogao biti tačka ukrštanja sa neurofiziološkim efektima deprivacije REM spavanja. Pored toga, otkriveno je da pri bazalnim nivoima NO-a postoji smanjeno, a pri povećanim povećano oslobađanje GABA-e (Getting et al., 2009). S tim u vezi, moguće je da smanjenje nivoa NO-a dovodi do depresije GABA-ergičkih funkcija i posledičnog povećanja hiperekscitabilnosti.

Generalizovana pojava SWD u EEG tokom apsansnog tipa napada izazvanih homocistein tiolaktonom, karakteristična je iktalna manifestacija uočena u ovom modelu epileptične aktivnosti (Stanojlović et al., 2009). Jedna od hipoteza o nastanku SWD smatra da ove promene pripadaju istoj grupi fenomena kao i vretena spavanja i da neuronske mreže koje stvaraju vretena spavanja mogu i da izvrše transformaciju vretena u šiljke karakteristične za SWD (Kostopoulos, 2000). Međutim, EEG karakteristike SWD se razlikuju od vretena spavanja, po frekvenci (10-16 Hz), trajanju, morfologiji i vremenu nastanka; SWD se javlja tokom pasivnog budnog stanja za koje je karakteristična dominantna alfa aktivnost, dok vretena spavanja nastaju tokom delta aktivnosti visokih amplituda (Kuznetsova et al., 1996; Pinault et al., 2001). Kortikotalamičke projekcije u GABAergičko retikularno talamičko jedro su odgovorne za generisanje sinhronizovane aktivnosti talamusa, a retikularno talamičko jedro ima ulogu pejsmejкера talamičkih oscilacija (Pinault et al., 2001; Coenen and van Luijtelaar, 2003). Poznato je da ekscitatorne amino kiseline, u prvom redu glutamat i aspartat utiču na pojavu i karakteristike SWD kod životina (Schridde and van Luijtelaar, 2004; Obeid and Herrmann, 2006). U ovom istraživanju opservirano je statistički značajno povećanje broja i trajanja SWD-a u EEG-u REM-deprivisanih životinja nakon administracije subkonvulzivne doze homocistein tiolaktona (SH vs. CH i LH). Nisu registrovani znaci iktalne aktivnosti, niti SWD u EEG životinja koje su umesto homocistein tiolaktona primile fiziološki rastvor, a prethodno su bile podvrgnute istom eksperimentlanom protokolu (Cc, Lc i Sc grupa). To ukazuje da selektivna deprivacija REM spavanja potencira EEG manifestacije epileptične aktivnosti izazvane homocistein tiolaktonom kod pacova.

Izmene ponašanja nakon deprivacije REM spavanja uglavnom su posledica poremećene ravnoteže u okviru neurotransmiterskih sistema mozga (Tufik et al., 2009). Smatra se da su ključne promene u okviru dopaminskih neuronskih krugova: REM deprivacija indukuje ushodnu regulaciju i supersenzitivnost dopaminskih post-sinaptičkih receptora (Tufik et al., 1987), najverovatnije D₂ tip receptora. Takođe, autoradiografske analize su pokazale i da deprivacija REM spavanja dovodi do generalizovane nishodne regulacije M₂ tipa muskarinskih receptora (Nunes et al., 1994) i da potencira serotonergičku transmisiju (Tufik et al., 2009). To je u skladu sa rezultatima studija u kojima se navodi da REM-ON neuroni pripadaju upravo holingeričkom sistemu koji je važan za inicijaciju i koordinaciju REM spavanja (Mc Carly, 2007).

Rezultatima ovog istraživanja pokazan je značajan stepen mortaliteta kod životinja iz SH grupe (životinje koje su nakon REM deprivacije tretirane homocistein tiolaktonom) u poređenju sa CH i LH grupom, kod kojih nije bilo letalnog ishoda. Treba istaći da nije bilo letaliteta u Sc grupi životinja koje su umesto homocistein tiolaktonom, nakon selektivne deprivacije REM spavanja, bile tretirane fiziološkim rastvorom. Takođe, letalitet nije opserviran ni nakon same administracije homocisteina u primenjenoj subkonvulzivnoj dozi. Selektivna REM deprivacija je praćena i hiperkatabolizmom koji rezultira negativnim energetskim balansom (Everson, 1997). Takođe, ona utiče i na sistem oreksina, klasu neuropeptida koji su prvobitno bili prepoznati kao regulatori ishrane, ali danas se zna da su povezani i sa spavanjem i kardiovaskularnom funkcijom. U REM deprivaciji spavanja dolazi do povišenja nivoa oreksina, što može biti važno za neke efekte REM deprivacije kao što su hiperfagija i povećana simpatička aktivnost (Pedrazzoli et al., 2004). Ove promene, uz druge do kojih dovodi deprivacija REM spavanja, mogu doprineti visokom letalitetu koji je opserviran u SH grupi u ovom istraživanju.

Većina studija o složenoj i bidirekcionoj vezi između poremećaja spavanja i epilepsije se zasniva na kliničkim ispitivanjima. Zbog brojnih ograničenja (primena antiepileptika, stres, druge bolesti, navike pacijenata) eksperimentalna istraživanja i animalni modeli ipak imaju najveći značaj (Matos et al., 2010). Uloga REM

deprivacije kao facilitatora za epileptične napade potvrđena je i u kliničkim (Méndez et al., 2001) i eksperimentalnim istraživanjima. Šušić i Marković (1993) su dokazali potencirajuće dejstvo REM deprivacije na audiogene epilepsije izazvane metafitom kod pacova, što je u saglasnosti sa rezultatima ovog istraživanja.

Na osnovu rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da selektivna deprivacija REM spavanja kod adultnih pacova potencira kako bihevioralne, tako i EEG manifestacije epileptične aktivnosti izazvane homocistein tiolaktonom.

5.6. Akutna fizička aktivnost ne potencira epileptičnu aktivnost izazvanu homocistein tiolaktonom

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da akutna fizička aktivnost nije statistički značajno uticala ni na jedan od parametara konvulzivnog ponašanja, kao ni na pojavu SWD-a u EEG-u, što znači da akutna fizička aktivnost nema proekscitabilnu ulogu, kako se ranije pretpostavljalo. Iako je došlo do blagih promena kako u incidenci, tako i u broju napada između ekperimentalne i kontrolne grupe, one nisu bile statistički značajne.

Uloga fizičke aktivnosti u epilepsiji je kompleksna, i još uvek ne postoji dovoljno podataka o svim njenim dejstvima. Ipak, sa povećanom učestalošću istraživanja u ovom polju, uverenje da je fizička aktivnost negativna za pacijente sa epilepsijom polako blede, a njegovo mesto zauzima činjenica da fizička aktivnost ima brojne pozitivne efekte počev od kardioprotektivnog i pozitivnog psihosocijalnog, pa sve do antiepileptičkog dejstva (Hu et al., 2001).

Određene studije su pokazale da pacijenti koji se bave fizičkom aktivnošću, ili neće uopšte imati promene u frekvenci napada, ili će se njihova frekvencija smanjiti (Eriksen et al., 1994; Nakken et al., 1990). Ovo je takođe potvrđeno i na pacijentima koji su imali smanjenu epileptiformnu aktivnost na EEGu tokom fizičke aktivnosti (Arida et al., 2010).

Najveći broj istraživača u eksperimentalnim studijama koristi trčanje na tredmilu kao paradigmu fizičke aktivnosti (Arida et al., 2007), ali postoje i oni koji modele fizičke aktivnosti malih eksperimentalnih životinja nisu ograničili samo na tredmil, već su koristili plivanje kao model fizičke aktivnosti (Souza et al., 2009; Tutkun et al., 2010; Lai et al., 1997). Oba pristupa imaju svoje prednosti i mane (Carvalho et al., 2005). Naime, kod tredmila se može podešavati stepen fizičkog opterećenja i napora kome je životinja izložena. Sa druge strane, plivanje je urođen oblik ponašanja životinja, ali je povezano sa faktorom stresa kao konfaunding varijablom (Carvalho et al., 2005). Treba naglasiti da su eksperimentalne studije koje su koristile plivanje kao oblik fizičke aktivnosti pokazale rezultate koji su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim trčanjem na tredmilu. Stoga je u ovom istraživanju korišćeno trčanje na tredmilu kao paradigma fizičke aktivnosti kod eksperimentalnih životinja.

Akutna fizička aktivnost u pojedinim situacijama može biti praćena stresom i hipoksemijom koje mogu da potenciraju napad (La Plante et al., 2000), i pored brojnih pozitivnih efekata. Sama činjenica da naše telo treba da izvede neku fizičku aktivnost izaziva stres, koji može direktno ili indirektno da vodi do hiperekscitabilnosti (Lai et al., 1997). Naime, istaknuto je da su stres i depresija glavni faktori za potencijaciju napada (Spector et al., 2000), dok je jedna klinička studija identifikovala stres kao osnovni uzrok konvulzivnih napada (Spatt et al., 1998). Štaviše, dokazano je da stres prouzrokuje strukturne promene u pojedinim regionima mozga koje mogu biti odgovorne za nastanak hiperekscitabilnosti (Magarinos et al., 1997). Poznato je da odgovarajući, nizak nivo opterećenja tokom trčanja ili vožnje bicikla, obično izaziva zanemarljiv nivo stresa na kardiopulmonalni sistem. Međutim, prekoračenje fizičkih limita može da dovede do ozbiljnijih sekvela. Tako npr., određen nivo opterećenja tokom trčanja kod nekih osoba može da bude sasvim ugodan, kod drugih on može da izazove profuzno znojenje i poremećaje srčanog ritma koji posledično uzrokuju hipoksiju (Möhlenkamp et al., 2008; Benito et al., 2011). Očigledno je da se granica kada fizička aktivnost postaje intezivna razlikuje od osobe do osobe. S obzirom da i najmanje prevazilaženje limita može snažno potencirati napade, procena ove granice je od ključne važnosti za pacijente sa epilepsijom (Krivoshchekov et al.,

2011). Na kontrolu napada negativno može uticati i naglo započinjanje fizičke aktivnosti, nakon perioda mirovanja.

S obzirom na rezultate ovog istraživanja, kao i predhodna istraživanja u ovoj oblasti, može se pretpostaviti da akutna fizička aktivnost neće potencirati pojavu konvulzivnih napada, sve dok se ona nalazi u granicama fizioloških mogućnosti i kapaciteta, međutim ukoliko je fizička aktivnost preterana za trenutno stanje organizma, hiperekscitabilnost je moguća, u prvom redu kao posledica stresa i hipoksije koje ono izaziva. To je od posebne važnosti imajući u vidu odnos antiepileptičke terapije i nivoa homocisteina. Naime, uspešna kontrola konvulzija zahteva obično dugotrajnu terapiju antiepilepticima, vrlo često i primenu kombinovane antiepileptičke terapije u slučajevima refraktornih napada. Neke od studija su pokazale da pojedini klasični antiepileptici, kao što su fenitoin, karbamazepin i valproat mogu dovesti do povećanja nivoa homocisteina u plazmi, koji je ekscitatorna supstanca (Sener et al., 2006). Sa druge strane, prema skorašnjim rezultatima HERITAGE studije fizička aktivnost može redukovati povišen nivo homocisteina (Okura et al., 2006) i zbog toga može imati višestruke pozitivne efekte kod pacijenata sa epilepsijama. Imajući ovo u vidu, sedentaran način života kod ovih pacijenata može biti dodatni faktor rizika za prognozu konvulzivnih napada.

Na osnovu rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da akutna fizička aktivnost ne potencira manifestacije epileptične aktivnosti izazvane homocistein tiolaktonom kod pacova.

5.7. Hronična fizička aktivnosti smanjuje osetljivost na epileptičnu aktivnost izazvanu homocistein tiolaktonom

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da su životinje uključene tokom 30 dana u program hronične (redovne) fizičke aktivnosti (trčanje) na tredmilu imale statistički značajno produžen latentni period do prvog konvulzivnog napada, kao i značajno manji broj konvulzivnih epizoda po pacovu izazvanih homocistein

tiolaktonom (8,0 mmol/kg) u odnosu na sedentarnu grupu životinja. Međutim, nije dobijena statistički značajna razlika između ovih grupa kada su u pitanju parametri incidencai intenzitet konvulzivne epizode.

Kvantitativna analiza pojave SWD-a u EEG-u, kao karakterističnih markera iktalne aktivnosti indukovane homocistein tiolaktonom, pokazala je da je broj SWD-a kod pacova koji su prošli protokol hroničnog trčanja na tredmilu bio statistički značajno manji nego kod sedentarnih životinja. Međutim, nije bilo značajne razlike u pogledu trajanja SWD između ovih grupa. Na taj način je ovakav oblik fizičke aktivnosti delovao u smislu smanjenja osetljivosti životinja na razvoj epileptične aktivnosti izazvane homocistein tiolaktonom.

Neurofiziološki mehanizmi putem kojih fizička aktivnost interferira sa procesom epileptogene nisu u potpunosti poznati. Arida et al. (1998) su pokazali da hronična fizička aktivnost adultnih pacova na tredmilu (40 min tokom 45 uzastopnih dana, pri brzini trake od 20 m/min) podiže prag za konvulzivne napade u amigdala kindling modelu epilepsije, kao i da se, pri istom protokolu treninga, značajno smanjuje incidenca napada u epilepsiji temporalnog režnja (Arida et al., 1999). Pokazan je uticaj fizičke aktivnosti i na smanjenje ekscitabilnosti CA1 regiona hipokampusa i modifikaciju sinaptičke plastičnosti u pilokarpinskom modelu limbičke epilepsije (Arida et al., 2004). Souza et al. (2009) su pokazali da plivanje kao fizička aktivnost dovodi do skraćanja latentnog perioda i trajanja generalizovanih napada izazvanih pentilentetrazolom i smanjenja amplitude iktalne aktivnosti na EEG zapisu. Povoljan efekat fizičke aktivnosti na epilepsiju dokazan je i primenom metaboličkih, elektrofizioloških i imunohistohemijskih studija na eksperimentalnim modelima epilepsija kod pacova (Arida et al., 2007).

Uloga fizičke aktivnosti kao modulatora epileptogene aktivnosti potvrđena je i u nekim kliničkim istraživanjima. Naime, petnaest nedelja dug program vežbanja uticao je na smanjenja učestalosti napada kod pacijentkinja koje prethodno nisu pokazale odgovor na farmakoterapiju (Eriksen et al., 1994). Epileptiformna EEG pražnjenja (Nakken et al., 1997) nakon četiri nedelje intenzivnog treninga su bila redukovana kod ljudi sa epilepsijom. Rezultati ovog

istraživanja na modelu epileptične aktivnosti izazvane homocistein tiolaktonom u saglasnosti su sa ovim studijama.

Međutim, postoje i oprečni rezultati po kojima se nakon fizičke aktivnosti beleži pojačanje epileptiformne EEG abnormalnosti (Kuijer et al., 1980; Ogunyemi et al., 1988). Takođe, u eksperimentalnom modelu konvulzija izazvanih kainatom kod pacova pokazano je da fizička aktivnost potencira oštećenje neurona (Ramsden et al., 2003). Zbog zastarelog mišljenja da pacijenti treba da izbegavaju fizičke i sportske aktivnosti i u skorašnjim populacionim studijama (Dubow and Kelly, 2003) je pokazano da pacijenti sa epilepsijom vode više sedentaran način života.

Postoje dokazi da fizička aktivnost pokreće adaptivni odgovor neurona u CNS-u, kao što je povećanje sinaptičke plastičnosti, neurogeneza (Cotman et al., 2002; Molteni et al., 2002) i povećano stvaranje neurotrofičkih faktora, od kojih je najpoznatiji BDNF (Brain - Derived Neurotrophic Factor). Za njega se smatra da deluju neuroprotektivno (Aguiar et al., 2008). Međutim, BDNF pojačava glutamatergičku transmisiju i tako narušava neurotransmittersku ravnotežu u CNS-u u pravcu hiperekscitabilnosti (Lahtinen et al., 2004). Ipak, potencijalni prokonvulzivni efekat BDNF-a se poništava povećanjem nivoa neuropeptida Y koji, po principu negativne povratne sprege, prati koncentracije BDNF-a koji i indukuje njegovo stvaranje (Vezzani et al., 1999).

Fizička aktivnost povećava nivo melatonina, hormona pinealne žlezde koji učestvuje u regulaciji cirkadijalnog ritma (Carr et al., 1981), a koji ima i neuroprotektivno i antikonvulzivno dejstvo (Giusti et al., 1996; Lima et al., 2005; Stewart et al., 2005).

Kao što je istaknuto, postoje dokazi da su brojni ekscitatorni efekti homocisteina i njegovih metabolita posledica prekomerne stimulacije jonotropnih i metabotropnih glutamatskih receptora, oksidativnog stresa, indukcije oštećenja DNK i apoptoze (Troen et al., 2005), kao i inhibicije aktivnosti Na⁺/K⁺ ATP-aze (Rašić-Marković et al., 2009, rezultati ovog istraživanja). Hrnčić et al. (2010) su pokazali funkcionalno učešće NO u konvulzivnoj aktivnosti homocistein tiolaktona kod adultnih pacova. Postoje dokazi da fizička aktivnost povećava ekspresiju NO sintaze u raznim tkivima uključujući i hipokampus regulišući na taj način

produkciju NO-a (Lee et al., 2005). Povećanje nivoa NO-a omogućava i jačanje njegovog antikonvulzivnog dejstva. To bi moglo biti jedno od objašnjenja za supresiju konvulzivne aktivnosti izazvane homocistein tiolaktonom u treniranoj grupi životinja koje je pokazano rezultatima ovog istraživanja.

Pri bazalnim nivoima NO-a postoji smanjeno, a pri povećanim povećano oslobađanje GABA-e (Getting et al., 1996). S tim u vezi, moguće je da povećanje nivoa NO-a potencira GABA-ergičke funkcije i hipoekscitabilnost. GABA sistem bi mogao biti i tačka ukrštanja sa neurofiziološkim efektima fizičke aktivnosti, jer postoje naznake da se tokom fizičke aktivnosti, pri porastu produkcije laktata i metaboličke acidoze, oslobađa GABA (Gotze et al., 1967).

Neki efekti homocisteina i njegovog metabolita homocistein tiolaktona, o čemu je već diskutovano, mogu biti posledica indukcije oksidativnog stresa. U ovom istraživanju, mi smo opservirali povećanje nivoa lipidne peroksidacije u hipokampusu nakon administracije homocistein tiolaktona i kod sedentarnih i kod treniranih životinja, pri čemu je ovo povećanje bilo izraženije kod sedentarnih životinja. Takođe, administracija homocistein tiolaktona je smanjila aktivnost SOD i CAT u hipokampusu. Međutim, u ovom istraživanju primenjeni protokol fizičke aktivnosti delom je sprečio povećanje lipidne peroksidacije uzrokovane homocistein tiolaktonom, kao i sprečio smanjenje aktivnosti SOD i CAT. Nedavno, da Cunha et al. (2012) su pokazali protektivne efekte fizičke aktivnosti kada su u pitanju neki parametri oksidativnog stresa u mozgu koristeći model hronične hiperhomocisteinemije. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih studija koje su pokazale da fizička aktivnost prevenira pojavu oksidativnog stresa u mozgu (Cechetti et al., 2012; Coskun et al., 2005). U drugim studijama koje su se bavile uticajem fizičke aktivnosti na oksidativne stres, povećanje antioksidativnih kapaciteta i porast aktivnosti antioksidativnih enzima je označeno kao jedan od mehanizama povoljnog dejstva fizičke aktivnosti (Radak et al., 2008). Sličan obrazac modulacije enzima antioksidativne zaštite fizičkom aktivnošću pokazan je i rezultatima ovog istraživanja. Međutim, u nekim studijama fizička aktivnost nije povećala antioksidativne kapacitete (Ozkaza et al., 2002).

Na osnovu ovih rezultata, nakon tridesetodnevnog hroničnog fizičkog vežbanja na tredmilu dobijeno je značajno smanjenje osetljivosti adultnih pacova na epileptogenu aktivnost homocistein tiolaktona. Ovi rezultati, bar delom, mogu biti posledica povećane aktivnosti enzima antioksidativne zaštite. Stoga, fizičku aktivnost treba razmotriti kao komponentu terapijskog pristupa u tretmanu epilepsija.

5.8. Uloga nNOS u razvoju epileptične aktivnosti izazvane homocistein tiolaktonom

U ovom istraživanju primena 7-nitroindazola, selektivnog inhibitora neuralne NO sintaze, dovela je do povećanja incidence, skraćanja latence, povećanja broja konvulzivnih epizoda po pacovu, kao i do povećanja intenziteta konvulzivnih napada izazvanih homocistein tiolaktonom kod pacova. Primena 7-nitroindazola nije dovela do povećanja broja, ali je produžila trajanje SWD-a, kao karakterističnih markera iktalnih zbivanja u EEGu nakon administracije homocistein tiolaktona.

Nedavno je pokazano da sistemska administracija rastućih doza L-arginina, kao prekursora NO, na dozno zavisani način dovodi do značajnog smanjenja incidence napada i broja konvulzivnih epizoda po pacovu, a produženja latentnog perioda do prvog konvulzivnog napada uzrokovanog homocistein tiolaktonom (Hrnčić et al., 2010). Sa druge strane, L-NAME, neselektivni NOS inhibitor, je povećao incidencu i intenzitet, a skratio latentni period do pojave prve konvulzivne epizode izazvane homocistein tiolaktonom. Prema rezultatima iste studije, L-arginin je smanjio, a L-NAME povećao broj SWD-a po pacovu, dok trajanje pojedinačnih SWD nije bilo izmenjeno. Ovi rezultati (Hrnčić et al., 2010) su ukazali na funkcionalnu ulogu NO u mehanizmima epileptične aktivnosti izazvane homocistein tiolaktonom, ali su pitanja uloge nNOS i iNOS u ovim mehanizmima ostala nerazjašnjena.

Uloga NO kao signalnog molekula u CNS-u je još uvek nejasna: u zavisnosti od eksperimentalnog modela epilepsije NO se ponaša kao prokonvulziv ili kao antikonvulziv. Naime, brojne studije su ukazale na antikonvulzivnu ulogu NO u različitim eksperimentalnim modelima epilepsija. NOS inhibitori povećavaju intenzitet konvulzivnih napada izazvanih injekcijom kainata u amigdale, kao proces amigdala kindlinga (Rondouin et al., 1992, 1993). Primena L-arginina (150-600 mg/kg, i.p.) dovela je do povećanja doze kainata potrebne da izazove kloničke konvulzije kod 50% životinja (Przegalinski et al., 1994). Rezultati dobijeni na modelu statusa epilepticusa izazvanog kainičnom kiselinom u saglasnosti su sa prethodno iznetim (Alabadi et al., 1999). L-NAME je prouzrokovao povećanje kako trajanja, tako i intenziteta napada u modelu generalizovane epilepsije izazvane intracerebroventrikularnom (i.c.v.) administracijom NMDA (Buisson et al., 1993), a inhibicija NOS je takođe potencirala konvulzivne napade izazvane i.c.v. primenom kvinolinata kod pacova (Haberny et al., 1992). NOS inhibitori su takođe potencirali fokalne napade indukovane aminopiridinom kod pacova (Boda and Szente, 1996). Antikonvulzivna uloga NO-a pokazana je i u pikrotoksinom- izazvanim konvulzijama (Paul and Ekambaram, 2003; Paul and Ekambaram, 2005), penicilinom-izazvanoj epileptiformnoj aktivnosti kod pacova (Marangoz and Bagirici, 2001; Ayyildiz et al., 2007), kao i konvulzivnim napadima izazvanim nikotinom kod miševa (Tutka et al., 2007). Primena L-arginina delovala je protektivno kod DBA/2 miševa na pojavu audiogenih konvulzija (Smith et al., 1996).

Kada je u pitanju pentilentetrazol, NOS inhibitori mogu inhibirati napade izazvane ovim konvulzivom (Osonoe et al., 1994; Hara et al., 1996; Kaputlu and Uzbay, 1997; Bashkatova et al., 2000; Han et al., 2000), iako postoje studije koje ukazuju da NOS inhibitori nemaju efekta na konvulzije izazvane pentilentetrazolom (Przegaliński et al., 1996; Urbanska et al., 1996; Han et al., 2000). Takođe, NOS inhibitori mogu da potenciraju (Del – Bel et al., 1997; Starr and Starr, 1993), inhibiraju (Van Leeuwen et al. 1995) ili budu bez efekta (Noyan et al., 2007) na epileptičnu aktivnost izazvanu pilokarpinom.

Međutim, rezultati nekoliko studija ukazuju na prokonvulzivnu ulogu NO-a (Bagetta et al., 1992; De Sarro et al., 1991, 1993; Mollace et al., 1991; Urbanska et al., 1996; Proctor et al., 1997; Lu et al. 1998; Borowicz et al., 2000; Yasuda et al., 2001; Sardo et al., 2006, Ferraro et al., 2004).

Efekti selektivnih nNOS inhibitora na konvulzije su ispitivani na mnogim animalnim modelima epilepsija. Rezultati slični našim, odnosno, prokonvulzivan efekat 7-NI je pokazan na tipu epilepsija izazvanih somanom (Lallement et., 1996), dok je 7-NI imao antikonvulzivan efekat u konvulzijama izazvanim enoksacinom (Masukawa et al., 1998), kainatom (Jones et al., 1998), pentilentetrazolom, pikrotoksinom i pilokarpinom (Van Leeuwen et al., 1995).

NO se smatra retrogradnim transmitterom uključenim u glutamatergičku neurotransmisiju u CNS-u. Glutamat je ekscitatorni neurotransmitter koji ima kritičnu ulogu u epileptogenezi (Ferraro et al., 1999). Inhibitorna uloga NO na epileptičnu aktivnost može da se odvija preko više različitih mehanizama. Jedan od mehanizama je kompetitivna inhibicija NMDA receptora. Kao što je poznato, aktivacija NMDA receptora uzrokuje proizvodnju NO i u fiziološkim uslovima NO inhibira NMDA receptore putem negativne povratne sprege (Lei et al., 1992). NO može da vrši svoju neuroprotektivnu i antikonvulzivnu ulogu interakcijom sa redoks regulatornim domenom NMDA receptora. Iako reakcija između redukovanog oblika NO i superoksidnog jona dovodi do formiranja peroksinitrita, što može dovesti do smrti ćelije, oksidovani oblik NO reaguje sa tiolnim grupama u redoks regulatornom domenu NMDA receptora i ispoljava neuroprotektivni efekat (Getting et al., 1996). Takođe, rezultati in vitro studija su pokazali da guanin nukleotidi (cGMP) uzrokuju inhibiciju NMDA receptora (Getting et al., 1996). Nedavni dokazi ukazuju i na interakcije između NO i γ -aminobuterne kiseline (GABA). U pojedinim istraživanjima pokazano je da visoke koncentracije NO potenciraju oslobađanje GABA (Moore et al., 1993). Svi ovi nalazi mogu da objasne antikonvulzivne efekte NO.

Postoji mogućnost i da mehanizam kojim 7-NI deluje na konvulzivne napade nije povezan sa nNOS inhibicijom. Iako 7-NI, za razliku od neselektivnih NOS inhibitora, ne utiče na krvni pritisak (Faraci and Brian, 1995), nekoliko

istraživača je pokazalo da 7-NI može da izmeni protok krvi u mozgu (Han et al., 2000). Izmenjen krvni protok mogao bi da doprinese efektima 7-NI na konvulzivne napade. Takođe, ne možemo da isključimo ni inhibitorni efekat 7-NI na monoamino oksidazu B (MAO B) (Castagnoli et al., 1997) kao mogući mehanizam kojim 7-NI deluje na konvulzivne napade, jer je pokazano da prilikom napada, i kod ljudi i kod životinja, dolazi do promene aktivnosti ovog enzima.

Homocistein i njegovi derivati vrše direktan ekscitatorni efekat na NMDA receptore i na grupu I metabotropnih receptora za glutamat. Dejstvo homocistein tiolaktona na ove receptore dovodi do influksa jona Ca^{2+} , a porast intracelularnog nivoa Ca^{2+} utiče na enzimsku aktivnost i dovodi do dosezanja konvulzivnog praga i do nastanka konvulzija. Inhibitorni efekat koji NO ostvaruje na NMDA receptore može da bude glavni mehanizam njegovog antikonvulzivnog dejstva na modelu napada izazvanih homocistein tiolaktonom.

Na osnovu rezultata prikazanih u ovom istraživanju može se zaključiti da 7-nitroindazol, selektivni inhibitor nNOS, potencira bihevioralne i EEG manifestacije konvulzivnih napada izazvanih homocistein tiolaktonom kod odraslih pacova.

5.9. Uloga iNOS u razvoju epileptične aktivnosti izazvane homocistein tiolaktonom

U ovom radu sistemska administracija selektivnog iNOS inhibitora aminogvanidina dovela je do povećanja incidence konvulzivnih napada, broja konvulzija po pacovu i njihovog intenziteta, a sa druge strane skraćenja latentnog perioda. Primena aminogvanidina dovela je do povećanja broja i trajanja SWD-a, kao karakterističnih markera iktalnih zbivanja u EEG-u nakon administracije homocistein tiolaktona.

Na mnogim animalnim modelima epilepsija ispitivani su efekti selektivne iNOS inhibicije i dobijeni kontradiktorni rezultati. Pokazano je da aminogvanidin, blokirajući iNOS, usporava razvoj napada indukovanih pentilentetrazolom i pilokarpinom kod miševa (Rehni et al., 2009). Između ostalog, pokazano je da se za

vreme konvulzivnih napada u CNS-u indukuje transkripcija i porast nivoa iNOS u različitim delovima mozga (González-Hernández et al., 2000; Murashima et al., 200). Miševi sa kongenitalnom mutacijom i nefunkcionalnim genom za iNOS imaju smanjenu osetljivost na konvulzije izazvane metilmalonatom (Ribeiro et al., 2009). Ovaj slučaj nedostatka gena za iNOS je ekvivalentan blokadi enzima aminogvanidinom. Kao što je već istaknuto, tretiranje pacova L-NAME-om, neselektivnim NOS inhibitorom, na dozno-zavisani način, pre administracije homocistein tiolaktona, povećalo je incidencu konvulzija i skratilo latentni period do prvog konvulzivnog napada (Hrnčić et al., 2010).

Pored toga što NO ima različite uloge u pojedinim modelima epilepsija, sugerisano je da doprinos signalnih mehanizama u koje je uključen NO procesu epileptogeneze zavisi i od izvora produkcije NO, tj. da li je nastao kao rezultat aktivnosti nNOS ili iNOS (Royes et al., 2005, 2007). Takođe, nedavno je pokazana zavisnost uloge NO od antero-posteriorne spacijalne distribucije NOS (Prieto - Martin et al., 2012).

Imajući u vidu potencijalnu terapijsku primenu, brojni pokušaji su napravljeni u nameri da se utvrde efekti NOS inhibitora na aktivnost pojedinih antiepileptika. Nedavno su Adabi-Mohazabe et al. (2012) utvrdili da koadministracija aminogvanidina (100 mg/kg) značajno smanjuje povoljne efekte pioglitazona na epileptičnu aktivnost izazvanu pentilentetrazolom kod miševa. Bahremand et al. (2010), takođe koristeći pentilentetrazolski model epilepsije, su pokazali da konstitutivne izoforme NOS, ali ne i iNOS, učestvuju u antikonvulzivnom efektu litijuma u ovom modelu.

Većina farmakoloških studija o funkcionalnoj ulozi NO u razvoju epileptične aktivnosti bazirana je na analizi njenih bihejvioralnih fenomena, dok je značajno manji broj fokusiran na EEG aktivnost. U ovom istraživanju mi smo primenili oba pristupa. Procena konvulzivnog ponašanja, kao i kvantitativna analiza EEG-a pokazala je kongruentne rezultate u ovom istraživanju. Naime, prethodni tretman aminogvanidinom značajno je povećao broj i trajanje SWD-a indukovanih homocistein tiolaktonom u ovom istraživanju, ukazujući na povećanu hiperekscitabilnost izazvanu inhibicijom iNOS.

Iako postoji hipoteza da visok nivo NO nastao hiperstimulacijom iNOS doprinosi inflamatornom odgovoru, koji je jedan od novo prepoznatih mehanizama epileptogeneze, naši rezultati su pokazali da selektivna inhibicija iNOS povećava osetljivost životinja na epileptičnu aktivnost izazvanu homocistein tiolaktonom.

Postoji nekoliko mehanizama koji mogu doprineti potencijaciji konvulzija izazvanih homocistein tiolaktonom putem iNOS inhibicije aminogvanidinom. Nizak nivo NO redukuje, dok visok nivo NO povećava oslobađanje GABA-e, inhibitornog neurotransmitera (Getting et al., 1996). Sa druge strane, NO redukuje glutamat, ekscitatorni neurotransmiter, aktiviranjem glija ćelija (Nanri et al., 1996) i interreaguje sa jednim od alosteričnih mesta na NMDA receptoru. Vezujući se za NMDA receptor nishodno reguliše receptorski kompleks (Lipton et al., 1993) za kojise vezuje i homocistein. Homocistein povećava oksidativni stres produkovanjem reaktivnih oblika kiseonika (Ramakrishnan et al., 2006, kao i rezultati ovog istraživanja). Učešćem u formiranju S-nitrozo-L-glutaciona (antioksidant), NO može da ima neuroprotektivno i aktikancersko dejstvo (Rauhalaet al., 1998). Treba naglastiti i da su nivoi glutamata mnogo viši u korteksu, hipokampusu i moždanom stablu iNOS^{-/-} miševa u poređenju sa iNOS^{+/+} miševima (De Luca et al., 2006). Blokiranjem iNOS-a aminogvanidinom i smanjenjem količine NO, stvaraju se preduslovi za prokonvulzivno dejstvo homocisteina.

Sumarno, efekti aminogvanidina se vide na svim ispitivanim parametrima bihejvioralnih i EEG karkteristika. Prateći bihejvioralne i EEG parametre, pokazano je da aminogvanidin, selektivni iNOS inhibitor potencira epileptičnu aktivnost izazvanu homocistein tiolaktonom kod odraslih pacova. Na ovaj način je pokazano da postoji funkcionalna veza između iNOS i prokonvulzivnih efekata homocistein tiolaktona.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije može se zaključiti sledeće:

1. Hronična hipermetioninska dijeta u trajanju od 30 dana dovela je do pojave umerene hiperhomocisteinemije kod pacova i povećanja osetljivosti pacova na epileptogenu aktivnost homocistein tiolaktona što se manifestovalo potencijacijom bihevioralnih i EEG karakteristika epileptične aktivnosti izazvane ovim tiestrom homocisteina.
2. Ponašanje pacova koji su 30 dana bili na režimu hipermetioninske ishrane bilo je izmenjeno u primenjenim etološkim testovima i ukazivalo je na povećanu anksioznost ovih životinja, što ukazuje da hipermetioninska dijeta deluje proanksiogeno.
3. Efekti tridesetodnevne hipermetioninske dijete doveli su do značajnog smanjenja aktivnosti enzima Na^+/K^+ -ATPaze u mozgu. Hipermetioninska dijeta dovela je do značajnog smanjenja aktivnosti enzima acetilholinesteraze u korteksu, a povećanja ekspresije markera oligodendrocita u korteksu.
4. Hipermetioninska dijeta je indukovala pojavu oksidativnog stresa u mozgu pacova. Odgovor na oksidativni stres u mozgu pacova nije bio uniforman, već se razlikovao među određenim regionima mozga, pri čemu su korteks i nc. caudatus pokazali najveću osetljivost.
5. Selektivna deprivacija REM spavanja postignuta metodom platforme kod adultnih pacova potencirala je bihevioralne i EEG manifestacije epileptične aktivnosti izazvane subkonvulzivnom dozom homocistein tiolaktona.
6. Akutna fizička aktivnost na tredmilu nije potencirala konvulzivne napade izazvane homocistein tiolaktonom kod pacova.

7. Hronična fizička aktivnost na trenažeru u trajanju od 30 dana dovela je do značajnog smanjenja osetljivosti adultnih pacova na epileptogenu aktivnost homocistein tiolaktona i povećane aktivnosti enzima antioksidativne zaštite.
8. Selektivni inhibitor nNOS, 7-nitroindazol, potencirao je pojavu bihevioralnih i EEG manifestacija epileptične aktivnosti izazvane homocistein tiolaktonom kod odraslih pacova, što znači da postoji funkcionalna uloga nNOS u proepileptogenim efektima homocistein tiolaktona.
9. Aminogvanidin, selektivni iNOS inhibitor potencirao je epileptičnu aktivnost izazvanu homocistein tiolaktonom kod odraslih pacova. Na ovaj način je pokazano da postoji funkcionalna veza između iNOS i prokonvulzivnih efekata homocistein tiolaktona.

7. LITERATURA

A

Ablah E, Haug A, Konda K, Tinius AM, Ram S, Sadler T, Liow K. Exercise and epilepsy: a survey of Midwest epilepsy patients. *Epilepsy Behav* 2009;14:162–66.

Adabi Mohazab R, Javadi-Paydar M, Delfan B, Dehpour AR. Possible involvement of PPAR-gamma receptor and nitric oxide pathway in the anticonvulsant effect of acute pioglitazone on pentylenetetrazole-induced seizures in mice. *Epilepsy Res.* 2012;101(1-2):28-35.

Aguiar Jr, Speck AE, Prediger, RD et al. Downhill training upregulates mice hippocampal and striatal brain-derived neurotrophic factor levels. *J Neural Transm* 2008;115:1251–5.

Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences* 2004; 75:639-53.

Alabadí JA, Thibault JL, Pinard E, Seylaz J, Lasbennes F. 7-Nitroindazole, a selective inhibitor of nNOS, increases hippocampal extracellular glutamate concentration in status epilepticus induced by kainic acid in rats. *Brain Res.* 1999; 839: 305–12.

Andersen ML, Martins PJF, D’Almeida V et al. Effects of paradoxical sleep deprivation on blood parameters associated with cardiovascular risk in aged rats. *Experimental Gerontol* 2004;39: 817-24.

Arida M, Cavalheiro EA, da Silva AC; Scorza FA . Physical Activity and Epilepsy: Proven and Predicted Benefits. *Sports Med* 2008;38(7):607-15.

Arida RM, de Jesus Vieira A, Cavalheiro EA. Effect of physical exercise on kindling development. *Epilepsy Res* 1998;30:127–32.

Arida RM, Sanabria ER, da Silva AC, Faria LC, Scorza FA, Cavalheiro EA. Physical training reverts hippocampal electrophysiological changes in rats submitted to the pilocarpine model of epilepsy. *Physiol Behav.* 2004;83(1):165-71.

Arida RM, Scorza CA, Scorza FA, Gomes da Silva S, da Graça Naffah-Mazzacoratti M, Cavalheiro EA. Effects of different types of physical exercise on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation of rats with epilepsy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007;31(4):814-22.

Arida RM, Scorza FA, de Albuquerque M, Cysneiros RM, de Oliveira RJ, Cavalheiro EA. Evaluation of physical exercise habits in Brazilian patients with epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2003;4(5):507-10.

Arida RM, Scorza FA, dos Santos NF, Peres CA, Cavalheiro EA. Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. *Epilepsy Res* 1999; 37:45–52.

Arida RM, Scorza FA, Gomes da Silva S, Schachter SC, Cavalheiro EA. The potential role of physical exercise in the treatment of epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2010;17(4):432-5.

Atmaca M, Kuloglu M, Tezcan E, Ustundag B. Antioxidant enzyme and malondialdehyde levels in patients with social phobia. *Psychiatry Res*. 2008; 159:95-100.

Ayyildiz M, Yildirim M, Agar E. The involvement of nitric oxide in the anticonvulsant effects of alpha-tocopherol on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Epilepsy Res* 2007;73:166-72.

B

Babbedge RC, Bland-Ward PA, Hart SL, Moore PK. Inhibition of rat cerebellar nitric oxide synthase by 7-nitro indazole and related substituted indazoles. *Br J Pharmacol*. 1993;110(1):225-8.

Bagetta G, Iannone M, Scorsa AM, Nisticò G. Tacrine-induced seizures and brain damage in LiCl-treated rats can be prevented by N omega-nitro-L-arginine methyl ester. *Eur J Pharmacol*. 1992;213(2):301-4.

Bahreman A, Nasrabady SE, Ziai P, Rahimian R, Hedayat T, Payandemehr B, Dehpour AR. Involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the anticonvulsant effects of lithium chloride on PTZ-induced seizure in mice. *Epilepsy Res.* 2010;89(2-3):295-302.

Bashkatova V, Vitskova G, Narkevich V, Vanin A, Mikoyan V, Rayevsky K. Nitric oxide content measured by ESR-spectroscopy in the rat brain is increased during pentylenetetrazole-induced seizures. *J Mol Neurosci.* 2000;14(3):183-90.

Baydas G, Koz ST, Tuzcu M, Nedzvetsky VS, Etem E. Effects of maternal hyperhomocysteinemia induced by high methionine diet on the learning and memory performance in offspring. *Int J Dev Neurosci.* 2007;25(3):133-9.

Bazil CW, Walczak TS. Effects of sleep and sleep stage on epileptic and nonepileptic seizures. *Epilepsia* 1997;38(1):56-62.

Benito B, Gay-Jordi G, Serrano-Mollar A, Guasch E, Shi Y, Tardif JC, Brugada J, Nattel S, Mont L. Cardiac arrhythmogenic remodeling in a rat model of long-term intensive exercise training. *Circulation.* 2011 Jan 4;123(1):13-22.

Bergink V, Megen HJ, Westenberg HG. Glutamate and anxiety. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2004;14:175-83.

Bjelland I, Tell G, Vollset S, Refsum H, Ueland P. Folate, Vitamin B12, Homocysteine, and the *MTHFR* 677C>T Polymorphism in Anxiety and Depression, The Hordaland Homocysteine Study. *Arch Gen Psychiatry.* 2003;60:618-26.

Bjorholt PG, Nakken KO, Rohme K, Hansen H. Leisure habits and physical fitness in adults with epilepsy. *Epilepsia.* 1990;31:83-87.

Blaise SA, Nédélec E, Schroeder H, Alberto JM, Bossenmeyer-Pourié C, Guéant JL, Daval JL. Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. *Am J Pathol.* 2007;170(2):667-79.

Blaszczak P, Turski WA. Excitatory amino acid antagonists alleviate convulsive and toxic properties of lindane in mice. *Pharmacol Toxicol.* 1998;82:137-41.

Bleich S, Degner D, Sperling W, Bönsch D, Thürauf N, Kornhuber J. Homocysteine as a neurotoxin in chronic alcoholism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2004; 28:453–64.

Boda B, Szenté M. Nitric oxide synthase inhibitor facilitates focal seizures induced by aminopyridine in rat. *Neurosci Lett.* 1996;209:37-40.

Boldyrev A, Bulygina E, Makhro A. Glutamate receptors modulate oxidative stress in neuronal cells. A mini-review. *Neurotox Res.* 2004; 6:581-587.

Boldyrev AA, Carpenter DO, Johnson P. Emerging evidence for a similar role of glutamate receptors in the nervous and immune systems. *J Neurochem.* 2005; 95:913-918.

Boldyrev AA. Molecular mechanisms of homocysteine toxicity. *Biochemistry (Mosc).* 2009;74:589-598.

Borowicz KK, Luszczki J, Kleinrok Z, Czuczwar SJ. 7- Nitroindazole, a nitric oxide synthase inhibitor, enhances the anticonvulsive action of ethosuximide and clonazepam against pentylenetetrazol-induced convulsions. *J Neural Transm.* 2000;107:1117-26.

Bottiglieri T, Laudy M, Crellin R. Homocysteine, folate, methylation, and monoamine metabolism in depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2000;69:228-32.

Bouayed J, Rammal H, Soulimani R. Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. *Oxid Med Cell Longev.* 2009; 2:63-7.

Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin- requiring enzyme. *Proceedings of National Academy of Sciences of U.S.A.* 1990; 87:682-85.

Buck ED, Pesasah IN. Mechanisms of d-Hexachlorocyclohexane Toxicity: II. Evidence for Ca²⁺-Dependent K⁺-Selective Ionophore Activity. *JPET*. 1999; 289:486–93.

Buisson A, Lakhmeche N, Verrecchia C, Plotkine M, Boulu RG. Nitric oxide: and endogenous anticonvulsant substance. *Neuroreport*. 1993;4:444-46.

C

Cardenas-Rodriguez N, Huerta-Gertrudis B, Rivera-Espinosa L, Montesinos-Correa H, Bandala C, Carmona-Aparicio L, Coballase-Urrutia E. Role of oxidative stress in refractory epilepsy: evidence in patients and experimental models. *Int J Mol Sci*. 2013 14;14(1):1455-76.

Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 1985;113:484-90.

Carr DB, Reppert SM, Bullen B. et al. Plasma melatonin increases during exercise in women. *Clin Endocrinol Metab*. 1981;53:224–5.

Carvalho JF, Masuda MO, Pompeu FA. Method for diagnosis and control of aerobic training in rats based on lactate threshold. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2005;140(4):409-13.

Cechetti F, Worm PV, Elsner VR, Bertoldi K, Sanches E, Ben J, Siqueira IR, Netto CA. Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Neurobiol Learn Mem*. 2012;97:90-6.

Chang BS, Lowenstein DH . *Epilepsy*. *N Engl J Med*. 2003;349(13):1257–66.

Charney DS, Deutch A. A functional neuroanatomy of anxiety and fear: implications for the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. *Crit Rev Neurobiol* 1996; 10:419-446.

Cheng A, Wang S, Cai J, Rao MS, Mattson MP. Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. *Dev Biol.* 2003; 258:319–33.

Chwatko G, Jakubowski H. The determination of homocysteine-thiolactone in human plasma. *Anal Biochem.* 2005;337:271-7.

Coenen AML, van Luijtelaar ELJM. Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. *Behav Genet.* 2003; 33:635–55.

Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. Acetylcholine. *The Biochemical Basis of Neuropharmacology.* Oxford University Press, New York, 2003

Coşkun S, Gönül B, Güzel NA, Balabanlı B. The effects of vitamin C supplementation on oxidative stress and antioxidant content in the brains of chronically exercised rats. *Mol Cell Biochem* 2005;280:135-38.

Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 2002;25:295–301.

D

da Cunha MJ, da Cunha AA, Ferreira AG, Machado FR, Schmitz F, Lima DD, Delwing D, Mussulini BH, Wofchuk S, Netto CA, Wyse AT. Physical exercise reverses glutamate uptake and oxidative stress effects of chronic homocysteine administration in the rat. *Int J Dev Neurosci.* 2012 Apr;30(2):69-74.

Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem.* 2006;52(4):601-23.

Darvesh S, Walsh R, Martin E. Homocysteine thiolactone and human cholinesterases. *Cell Mol Neurobiol.* 2007;27(1):33-48.

Dawson VL, Dawson TM, London ED, Brecht DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1991;88:6368–71.

Dayal S, Arning E, Bottiglieri T, Böger RH, Sigmund CD, Faraci FM, Lentz SR. Cerebral vascular dysfunction mediated by superoxide in hyperhomocysteinemic mice. *Stroke*. 2004;35(8):1957-62.

de Araujo Furtado M, Rossetti F, Chanda S, Yourick D. Exposure to nerve agents: from status epilepticus to neuroinflammation, brain damage, neurogenesis and epilepsy. *Neurotoxicology*. 2012 ;33(6):1476-90

De Bree A, Verschuren WM, Kromhout D, Kluijtmans LA, Blom HJ. Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. *Pharmacol Rev*. 2002;54(4):599-618.

de Lima E, Soares JM Jr, del Carmen Sanabria Garrido Y, Gomes Valente S, Priel MR, Chada Baracat E, Abrão Cavalheiro E, da Graça Naffah-Mazzacoratti M, Amado D. Effects of pinealectomy and the treatment with melatonin on the temporal lobe epilepsy in rats. *Brain Res*. 2005; 1043(1-2):24-31.

De Luca G, Di Giorgio RM, Macaione S, Calpona PR, Di Paola ED, Costa N, Cuzzocrea S, Citraro R, Russo E, De Sarro G. Amino acid levels in some brain areas of inducible nitric oxide synthase knock out mouse (iNOS^{-/-}) before and after pentylentetrazole kindling. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006;85(4):804-12.

de Oliveira AC, D'Almeida V, Hipólido DC, Nobrega JN, Tufik S. Sleep deprivation reduces total plasma homocysteine levels in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2002;80(3):193-7.

De Sarro G, Di Paola ED, De Sarro A, Vidal MJ. L-arginine potentiates excitatory amino acid-induced seizures elicited in the deep prepiriform cortex. *Eur J Pharmacol*. 1993;230(2):151-8.

De Sarro GB, Donato Di Paola E, De Sarro A, Vidal MJ. Role of nitric oxide in the genesis of excitatory amino acid-induced seizures from the deep prepiriform cortex. *Fundam Clin Pharmacol*. 1991;5(6):503-11.

De Vriese AS, Blom HJ, Heil SG, Mortier S, Kluijtmans LA, Van de Voorde J, Lameire NH. Endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated renal vasodilatory response is impaired during acute and chronic hyperhomocysteinemia. *Circulation*. 2004;109(19):2331-6.

Debler EA, Lipovac MN, Lajtha A, Zlokovic BV, Dunlop DS, Jacobson AE, Rice KC, de Costa B, Reith ME. Metaphit-induced audiogenic seizures in mice: I. Pharmacologic characterization. *Epilepsia*. 1993;34(2):201-10.

Del-Bel EA, Oliveira PR, Oliveira JA, Mishra PK, Jobe PC, Garcia-Cairasco N. Anticonvulsant and proconvulsant roles of nitric oxide in experimental epilepsy models. *Braz J Med Biol Res*. 1997;30(8):971-9.

Depaulis A, Helfer V, Deransart C, Marescaux C. Anxiogenic-like consequences in animal models of complex partial seizures. *Neurosci Biobehav Rev*. 1997;21:767-74.

Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens*. 2000;18(6):655-73.

Dishman RK, Armstrong RB, Delp MD, Graham RE, Dunn AL. Open-field behavior is not related to treadmill performance in exercising rats. *Physiol Behav*. 1988;43(5):541-6.

Do KQ, Grima G, Benz B, Salt TE. Glial-neuronal transfer of arginine and S-nitrosothiols in nitric oxide transmission. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;962:81-92.

Doherty GH. Homocysteine: more than just a matter of life and death. *Exp Neurol*. 2007; 205:5-8.

Dubow JS, Kelly JP. Epilepsy in sports and recreation. *Sports Med*. 2003;33:99-516.

Dudman NP, Hicks C, Lynch JF, Wilcken DE, Wang J. Homocysteine thiolactone disposal by human arterial endothelial cells and serum in vitro. *Arterioscler Thromb*. 1991;11(3):663-70.

Đurić D, Jakovljević V, Rašić-Marković A, Đurić A, Stanojlović A. Homocysteine, folic acid and coronary artery disease: possible impact on prognosis and therapy. *Indian J Chest Di Allied Sci.* 2008;50:39-48.

E

Ebadi M, Sharma SK. Peroxynitrite and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* 2003; 5:319–335.

Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2002; 277:38079–86.

Elliott JO, Jacobson MP, Seals BF. Self-efficacy, knowledge, health beliefs, quality of life, and stigma in relation to osteoprotective behaviors in epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2006;9:478–91.

Elliott JO, Lu B, Moore JL, McAuley JW, Long L. Exercise, diet, health behaviors, and risk factors among persons with epilepsy based on the California Health Interview Survey, 2005. *Epilepsy Behav.* 2008;13:307–15.

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

Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959 ;82(1):70-7.

Epilepsy - Fact sheet N°999. 2009. World Health Organization.

Eriksen HR, Ellertsen B, Grønningsaeter H, Nakken KO, Løyning Y, Ursin H Physical exercise in women with intractable epilepsy. *Epilepsia* 1994;35:1256-64.

Ermak G, Davies KJ. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol Immunol.* 2002, 38:713–21.

Ersan S, Bakir S, Erdal Ersan E, Dogan O. Examination of free radical metabolism and antioxidant defence system elements in patients with obsessive-compulsive disorder. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2008;30:1039-42.

Everson CA. Clinical manifestations of prolonged sleep deprivation. In: SCHWARTZ WJ (Ed), *Sleep science: integrating basic research and clinical practice. Monogr Clin Neurosci.* Basel, Karger 1997;15: 34-59.

F

FDA Public Health Advisory: Safety of Topical Lindane Products for the Treatment of Scabies and Lice 2003. U.S. Food and Drug Administration

Feldman S, Weidenfeld J. Involvement of endogenous glutamate in the stimulatory effect of norepinephrine and serotonin on the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Neuroendocrinol.* 2004; 79:43–53.

Ferraro G, Montalbano ME, La Grutta V. Nitric oxide and glutamate interaction in the control of cortical and hippocampal excitability. *Epilepsia.* 1999;40(7):830-6.

Ferraro G, Sardo P, Di Giovanni G, Fileccia R, La Grutta V. CCK-8S systemic administration blocks the 7-nitroindazole-induced effects on the EEG of striatum and globus pallidus: a FFT analysis in the rat. *In Vivo.* 2004;18(3):317-23.

Fischer W, Kittner H. Influence of ethanol on the pentylenetetrazol-induced kindling in rats. *J Neural Transm.* 1998;105(10-12):1129-42.

Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J Jr. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia.* 2005;46(4):470-2.

Fisher RS. Animal models of the epilepsies. *Brain Res Rev.* 1989; 14:245–78

Folbergrova J. Anticonvulsant action of both NMDA and non-NMDA receptor antagonists against seizures induced by homocysteine in immature rats. *Exp Neurol* 1997;145:442-50.

Fountain NB, May AC. Epilepsy and athletics. *Clin Sports Med*. 2003;22:605–16.

Fukada S, Shimada Y, Morita T, Sugiyama K. Suppression of methionine-induced hyperhomocysteinemia by glycine and serine in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006;70(10):2403-9

G

Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:428010.

Garakani A, Mathew SJ, Charney DS. Neurobiology of anxiety disorders and implications for treatment. *Mt Sinai J Med*. 2006;73:941-49.

Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 1988;336:385–88.

Getting SJ, Segieth J, Ahmad S, Biggs CS, Whitton PS. Biphasic modulation of GABA release by nitric oxide in the hippocampus of freely moving rats in vivo. *Brain Res*. 1996 Apr 22;717(1-2):196-9.

Gharib A, Chabennes B, Sarda N, Pacheco H. In vivo elevation of mouse brain S-adenosyl-L-homocysteine after treatment with L-homocysteine. *J Neurochem*. 1983; 40:1110–2.

Giusti P, Lipartiti M, Franceschini D, Schiavo N, Floreani M, Manev H. Neuroprotection by melatonin from kainate-induced excitotoxicity in rats. *FASEB J*. 1996;10(8):891-6.

Gnatek Y, Zimmerman G, Goll Y, Najami N, Soreq H, Friedman A. Acetylcholinesterase loosens the brain's cholinergic anti-inflammatory response and promotes epileptogenesis. *Front Mol Neurosci.* 2012;5:66

González-Hernández T, García-Marín V, Pérez-Delgado MM, González-González ML, Rancel-Torres N, González-Feria L. Nitric oxide synthase expression in the cerebral cortex of patients with epilepsy. *Epilepsia* 2000; 41: 1259-1268.

Gordon KE, Dooley JM, Brna PM. Epilepsy and activity- A population based study. *Epilepsia* 2010;51:2254-59.

Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta* 1991;196:143-51.

Götze W, Kubicki S, Munter M, Teichmann J. Effect of physical exercise on seizure threshold (investigated by electroencephalographic telemetry). *Dis Nerv Syst.* 1967;28(10):664-7.

Gralewicz S. Possible consequences of acetylcholinesterase inhibition in organophosphate poisoning. Discussion continued. *Med Pr.* 2006;57(3):291-302.

Griffiths MJ, Messent M, MacAllister RJ, Evans TW. Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. *British Journal of Pharmacology* 1993;110:963-68.

Grisaru D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur J Biochem.* 1999;264(3):672-86

Günzler WA, Kremers H, Flohé L. An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase (EC 1-11-1-9-) in blood. *Z Klin Chem Klin Biochem.* 1974;12(10):444-8.

Guo YH, Chen FY, Wang GS, Chen L, Gao W. Diet-induced hyperhomocysteinemia exacerbates vascular reverse remodeling of balloon-injured arteries in rat. *Chin Med J (Engl).* 2008;121(22):2265-71.

H

Haberny KA, Pou S, Eccles CU. Potentiation of quinolinate-induced hippocampal lesions by inhibition of NO synthesis. *Neurosci Lett.* 1992;146:187-90.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine* (3rd ed.). Oxford University Press, 1999

Hamid H, Ettinger AB, Mula M. Anxiety symptoms in epilepsy: salient issues for future research. *Epilepsy Behav.* 2011;22(1):63-8.

Han D, Yamada K, Senzaki K, Xiong H, Nawa H, Nabeshima T. Involvement of nitric oxide in pentylenetetrazole-induced kindling in rats. *J Neurochem.* 2002; 74:792-98.

Hansrani M, Stansby G. The use of an in vivo model to study the effects of hyperhomocysteinaemia on vascular function. *J Surg Res.* 2008;145(1):13-8.

Hara MR, Agrawal N, Kim SF, Cascio MB, Fujimuro M, Ozeki Y, Takahashi M, Cheah JH, Tankou SK, Hester LD, Ferris CD, Hayward SD, Snyder SH, Sawa A. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat Cell Biol.* 2005;7:665-74.

Harvey B, Shahid M. Metabotropic and ionotropic glutamate receptors as neurobiological targets in anxiety and stress-related disorders: Focus on pharmacology and preclinical translational models. *Pharmacol Biochem Behav.* 2012;100:775-800.

Helfer V, Deransart C, Marescaux C, Depaulis A. Amygdala kindling in the rat: anxiogenic-like consequences. *Neuroscience* 1996;73:971-78.

Hemmens B, Mayer B. Enzymology of nitric oxide synthases. *Methods Mol Biol.* 1998;100:1-32.

Herrmann W, Obeid R. Homocysteine: a biomarker in neurodegenerative diseases. *Clin Chem Lab Med.* 2011;49(3):435-41.

Ho PI, Ortiz D, Rogers E, She TB. Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage. *J Neurosci. Res.* 2002; 70:694–702.

Hoffer LJ. Homocysteine remethylation and trans-sulfuration. *Metabolism* 2004;53(11):1480-3.

Horn TFW, Wolf G, Duffy S, Weiss S, Keilhoff G, MacVicar BA. Nitric oxide promotes intracellular calcium release from mitochondria in striatal neurons. *FASEB J* 2002;16:1611–1622.

Hovatta I, Juhila J, Donner J. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. *Neurosci Res* 2010; 68:261-275.

Hrnčić D, Rašić-Marković A, Djuric D, Šušić V, Stanojlović O. The role of nitric oxide in convulsions induced by lindane in rats. *Food Chem Toxicol* 2011;49(4):947-54.

Hrnčić D, Rašić-Marković A, Krstić D, Bjekić-Macut J, Šušić V, Mladenović D, Djurić D, Stanojlović O. Gaseous neurotransmitter nitric oxide: its role in experimental models of epilepsy. *Arch Biol Sci.* 2012;64(3):1207-16.

Hrnčić D, Rašić-Marković A, Krstić D, Macut D, Djuric D, Stanojlović O. The Role of Nitric Oxide in Homocysteine Thiolactone-Induced Seizures in Adult Rats. *Cell Mol Neurobiol.* 2010;30:219-31.

Hrnčić D, Rašić-Marković A, Krstić D, Macut Dj, Šušić V Djuric D, Stanojlović O. Inhibition of the neuronal nitric oxide synthase potentiates homocysteine thiolactone – induced seizures in adult rats. *Med Chem.* 2012;8(1):59-64.

Hrnčić D, Rašić-Marković A, Sušić V, Djurić D, Stanojlović O. Influence of NR2B-Selective NMDA Antagonist on Lindane-Induced Seizures in Rats. *Pharmacol.* 2009;84:234-9.

Hrnčić D, Rašić-Marković, Macut Đ, Šušić V, Djurić D, Stanojlović O. Significance of positive stimulation for successful rat treadmill training. *Perfusion* 2012; 25:32-33.

Hrnčić D, Stanojlović O, Živanović D, Šušić V. Delta sleep – inducing peptide potentiates anticonvulsive activity of valproate against metaphit – provoked audiogenic seizures in rats. *Pharmacol.* 2006; 77:78-84

Hrnčić D, Vučević D, Rašić A, Radosavljević T, Mladenović D, Šušić V, Djurić D, Stanojlović O. Moderate body hypothermia alleviates behavioral and EEG manifestations of audiogenic seizures in metaphit – treated rats. *Canad J PhysiolPharmacol* 2007;85:1032-37.

Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz G, Liu S, Solomon CG, Willett WC. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med.* 2001;345(11):790-7.

Huerta JM, González S, Fernández S, Patterson AM, Lasheras C. No evidence for oxidative stress as a mechanism of action of hyperhomocysteinemia in humans. *Free Radic Res.* 2004;38(11):1215-21.

I

Ignarro LJ. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem Pharmacol.* 1991;41:485–90.

Irie M, Asami S, Nagata S, Ikeda M, Miyata M, Kasai H. Psychosocial factors as a potential trigger of oxidative DNA damage in human leukocytes. *Jpn. J. Cancer Res.* 2001;92:367-76.

J

Jacoby A, Snape D, Baker GA. Epilepsy and social identity: the stigma of a chronic neurological disorder. *Lancet Neurol.* 2005;4(3):171-8.

Jakubowski H, Głowacki R. Chemical biology of homocysteine thiolactone and related metabolites. *Adv Clin Chem.* 2011;55:81-103.

Jakubowski H. Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61:470–87.

Jakubowski H. Homocysteine Thiolactone: Metabolic Origin and Protein Homocysteinylation in Humans. *J Nutr.* 2000; 130(2S Suppl):377S-81S.

Jalava M, Sillanpää M. Physical activity, health-related fitness, and health experience in adults with childhood-onset epilepsy: a controlled study. *Epilepsia* 1997;38:424-29.

Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2003;53 Suppl 3:S26-36; discussion S36-8.

Jones BE. Glia, adenosine, and sleep. *Neuron* 2009;61(2):156-7.

Jones PA, Smith RA, Stone TW. Nitric oxide synthase inhibitors L-NAME and 7-nitroindazole protect rat hippocampus against kainate-induced excitotoxicity. *Neurosci Lett.* 1998 Jun 19;249(2-3):75-8.

Jouvet D, Vilmon P, Delorme F. Etude de la privation selective de la phase paradoxale de sommeil chez le chat. *Compt Rend soc Biol* 1964;158:756-9.

Jouvet M. Paradoxical sleep as a programming system. *J Sleep Res.* 1998;7:1-5.

K

Kamath AF, Chauhan AK, Kisucka J, Dole VS, Loscalzo J, Handy DE, Wagner DD. Elevated levels of homocysteine compromise blood-brain barrier integrity in mice. *Blood.* 2006;107(2):591-3.

Kaputlu I, Uzbay T. L-NAME inhibits pentylenetetrazole and strychnine-induced seizures in mice. *Brain Res.* 1997;753(1):98-101.

Kendal C, Everall I, Polkey C, Al-Sarraj S. Glial cell changes in the white matter in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 1999;36(1):43-51.

Khalidi A, Chiueh CC, Bullock MR, Woodward JJ. The significance of nitric oxide production in the brain after injury. *Ann NY Acad Sci.* 2002;962:53-59.

Kim WK, Pae YS. Involvement of N-methyl-d-aspartate receptor and free radical in homocysteine-mediated toxicity on rat cerebellar granule cells in culture. *Neurosci Lett.* 1996; 216:117-120.

Kim YB, Hur GH, Lee YS, Han BG, Shin S. A role of nitric oxide in organophosphate-induced convulsions. *Environ Toxicol Pharmacol* 1997;3(1):53-56.

Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1994;298 (Pt 2):249-58.

Kolo LL, Westfall TC, Macarthur H. Nitric oxide decreases the biological activity of norepinephrine resulting in altered vascular tone in the rat mesenteric arterial bed. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286:H296–H303.

Kostopoulos GK. Spike-and-wave discharges of absence seizures as a transformation of sleep spindles: the continuing development of a hypothesis. *Clin Neurophysiol.* 2000; 111 (Suppl 2): S27–38.

Kovacic P, Jacintho JD. Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer. *Curr Med Chem.* 2001;8(7):773-96

Krivoshchekov SG, Lushnikov ON. Psychophysiology of sports addiction (exercises addiction). *Fiziol Chelov* 2011; 37(4):135–40.

Kuijjer A. Epilepsy and exercise, electroencephalographical and biochemical studies. *Advances in Epileptology: The 10th Epilepsy International Symposium.* Raven Press 1980; 543.

Kuruba R, Hattiangady B, Shetty AK. Hippocampal neurogenesis and neural stem cells in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2009;14 Suppl 1:65-73.

Kuznetsova GD, Petrova EV, Coenen AM, Van Luijtelaar EL. Generalized absence epilepsy and catalepsy in rats. *Physiol Behav.* 1996; 60:1165–9.

L

La Plante E. Seized: Temporal lobe epilepsy as a medical, historical, and artistic phenomenon. New York: Harper Collins Publishers, 2000.

Lähteinen S, Pitkänen A, Knuutila J, Törönen P, Castrén E. Brain-derived neurotrophic factor signaling modifies hippocampal gene expression during epileptogenesis in transgenic mice. *Eur J Neurosci.* 2004 Jun;19(12):3245-54.

Lai CW, Trimble MR. Stress and epilepsy. *Epilepsia* 1997;10:177-86.

Lallement G, Shih TM, Pernot-Marino I, Baubichon D, Foquin A, McDonough JH. The role of nitric oxide in soman-induced seizures, neuropathology, and lethality. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996;54(4):731-7.

Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1992;89:6348-52.

Lau KL, Kong SK, Ko WH, Kwan HY, Huang Y, Yao X. cGMP stimulates endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in vascular endothelial cells. *Life Sci.* 2003;73:2019-28.

Lazarewicz JW, Ziembowicz A, Matyja E, Stafiej A, Ziemska E. Homocysteine-evoked ⁴⁵Ca release in the rabbit hippocampus is mediated by both NMDA and group I metabotropic glutamate receptors: in vivo microdialysis study. *Neurochem Res.* 2003; 28:259-69.

Lee MH, Shin MS, Sim YJ. Treadmill exercise enhances nitric oxide synthase expression in the hippocampus of food-deprived rats. *Nutrition Res.* 2005; 25:771-9.

Lehninger, AL., Nelson DL., Cox MM. Principles of Biochemistry (3rd ed.). New York; W. H. Freeman; 2000.

Lewko B, Stepinski J. Cyclic GMP signaling in podocytes. *Microsc. Res. Tech.* 2002;57:232-5.

Li B, Duysen EG, Volpicelli-Daley LA, Levey AI, Lockridge O. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor function in acetylcholinesterase knockout mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2003;74(4):977-86

Lipovac MN, Debler EA, Zlokovic BV, Jacobson AE, Rice KC, de Costa B, Selmeçi G, Chi L, Reith ME. Metaphit-induced audiogenic seizures in mice: II. Studies on N-methyl-D-aspartic acid, GABA, and sodium channel receptors and on the disposition of metaphit in the brain. *Epilepsia.* 1993;34(2):211-9.

Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature.* 1993; 364:626–32.

Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D’Emilia DM, Rayudy PV, Arnelle DR, Stamler JS. Neurotoxicity associated with dual actions of Homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:5923–8.

Loscher W, Brandt C. Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: Experimental approaches and translational research. *Pharmacol Rev.* 2010;62:668-700.

Loureiro SO, Heimfarth L, Pelaez Pde L, Vanzin CS, Viana L, Wyse AT, Pessoa-Pureur R. Homocysteine activates calcium-mediated cell signaling mechanisms targeting the cytoskeleton in rat hippocampus. *Int J Dev Neurosci.* 2008;26(5):447-55.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.

Lu W, Chen G, Cheng JS. NMDA antagonist displays anticonvulsant effect via NO synthesis inhibition penicillintreated rat hippocampal slices. *Neuroreport* 1998;9: 4045-4049.

Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev.* 2000;52(3):375-414.

M

Magarinos AM, Verdugo JM, McEwen BS. Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94(25):14003-8.

Makhro AV, Mashkina AP, Solenaya OA et al. Prenatal hyperhomocysteinemia as a model of oxidative stress of the brain. *Bull Exp Biol Med.* 2008;146:33-5.

Malow B. Sleep and epilepsy. *Neurol Clin.* 1996;14(4):765-89.

Manchado FDB, Gobatto CA, Mello MARD . The maximal lactate steady state in running rats. *J Exercise Physiol.* 2005; 8(4): 29-35.

Marangoz C, Bağirici F. Effects of L-arginine on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Jpn J Pharmacol.* 2001;86:297-301

Marcoli M, Cervetto C, Paluzzi P, Guarnieri S, Raiteri M, Maura G. Nitric oxide-evoked glutamate release and cGMP production in cerebellar slices: Control by presynaptic 5-HT_{1D} receptors. *Neurochem Internat.* 2006; 49(1):12-19.

Martins RC, Andersen ML, Tufik S. The reciprocal interaction between sleep and type 2 diabetes mellitus: facts and perspectives. *Braz J Med Biol Res.* 2008;41:180-7.

Masukawa T, Nakanishi K, Natsuki R. Role of nitric oxide in the convulsions following the coadministration of enoxacin with fenbufen in mice. *Jpn J Pharmacol.* 1998;76(4):425-9.

Matos G, Andersen ML, do Valle AC, Tufik S. The relationship between sleep and epilepsy: evidence from clinical trials and animal models. *J Neurol Sci.* 2010;295(1-2):1-7.

Matte C, Durigon E, Stefanello FM, Cipriani F, Wajner M, Wyse AT. Folic acid pretreatment prevents the reduction of Na⁺,K⁺-ATPase and butyrylcholinesterase activities in rats subjected to acute hyperhomocysteinemia. *Int J Devl Neurosci* 2006; 24:3–8.

Matté C, Mackedanz V, Stefanello FM, Scherer EB, Andreazza AC, Zanotto C, Moro AM, Garcia SC, Gonçalves CA, Erdtmann B, Salvador M, Wyse AT. Chronic hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increases DNA damage in brain and blood of rats: protective effect of folic acid. *Neurochem Int.* 2009;54(1):7-13.

Matte C, Monteiro SC, Calcagnotto T, Bavaresco CS, Netto CA, Wyse AT. In vivo and in vitro effects of homocysteine on Na⁺,K⁺-ATPase activity in parietal, prefrontal and cingulate cortex of young rats. *Int J Devl Neurosci* 2004; 22: 185–90.

McCarley RW. Neurobiology of REM and NREM sleep. *Sleep Med.* 2007;8(4):302-30.

McEwan MJ, Espie CA, Metcalfe J, Brodie MJ, Wilson MT. Quality of life and psychosocial development in adolescents with epilepsy: a qualitative investigation using focus group methods. *Seizure.* 2004 Jan;13(1):15-31.

Meldrum BS. Neurotransmission in epilepsy. *Epilepsia* 1995;35:S4 - S11.

Méndez M, Radtke RA. Interactions between sleep and epilepsy. *J Clin Neurophysiol.* 2001;18:106-27.

Mikroulis AV, Psarropoulou C. Endogenous ACh effects on NMDA-induced interictal-like discharges along the septotemporal hippocampal axis of adult rats and their modulation by an early life generalized seizure. *Epilepsia.* 2012;53(5):879-87.

Millan MJ. The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol* 2003;70:83-244.

Mladenović D, Djuric D, Petronijević N, Radosavljević T, Radonjić N, Matić D, Hrnčić D, Rašić-Marković A, Vučević D, Dekanski D, Stanojlović O. The correlation between

lipid peroxidation in different brain regions and the severity of lindane-induced seizures in rats. *Mol Cell Biochem* 2010;333:243-50.

Mladenović D, Hrnčić D, Vučević D, Radosavljević T, Lončar – Stevanović H, Petrović J, Šušić V, Djurić D, Stanojlović O. Ethanol suppressed seizures in lindane-treated rats. Electroencephalographic and behavioral studies. *J Physiol Pharmacol* 2007;58:641-54.

Möhlenkamp S, Lehmann N, Breuckmann F, Bröcker-Preuss M, Nassenstein K, Halle M, Budde T, Mann K, Barkhausen J, Heusch G, Jöckel KH, Erbel R; Marathon Study Investigators; Heinz Nixdorf Recall Study Investigators. Running: the risk of coronary events : Prevalence and prognostic relevance of coronary atherosclerosis in marathon runners. *Eur Heart J*. 2008;29(15):1903-10.

Mollace V, Bagetta G, Nisticò G. Evidence that L-arginine possesses proconvulsant effects mediated through nitric oxide. *Neuroreport*. 1991;2(5):269-72.

Molteni R, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. *Eur J Neurosci*. 2002;16:1107–16.

Monti JM, Jantos H. Effects of L-arginine and SIN-1 on sleep and waking in the rat during both phases of the light–dark cycle. *Life Sci*. 2004;75:2027–34.

Morita H, Kurihara H, Yoshida S, Saito Y, Shindo T, Oh-Hashi Y, Kurihara Y, Yazaki Y, Nagai R. Diet-induced hyperhomocysteinemia exacerbates neointima formation in rat carotid arteries after balloon injury. *Circulation*. 2001;103(1):133-9.

Mülsch A, Busse R, Mordvintcev PI, Vanin AF, Nielsen EO, Scheel-Krüger J, Olesen SP. Nitric oxide promotes seizure activity in kainate-treated rats. *Neuroreport*. 1994;5(17):2325-8.

Munchau A, Valente EM, Shahidi GM, Eunson LH, Hanna MG, Quinn NP, Shapira AHV, Wood NW, Bhatia KP. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;68:609-14.

Mungrue IN, Breddt DS, Stewart DJ, Husain M. From molecules to mammals: what's NOS got to do with it? *Acta Physiol Scand.* 2003;179:123–135.

Murashima YL, Yoshii M, Suzuki J. Role of nitric oxide in the epileptogenesis of EL mice. *Epilepsia* 2000;41:195-99.

N

Nakken KO, Bjorholt PG, Johannessen SI, Loyring T, Lind E. Effect of physical training on aerobic capacity, seizure occurrence, and serum level of antiepileptic drugs in adults with epilepsy. *Epilepsia* 1990;31:88–94.

Nakken KO, Loyning A, Loyning T et al. Does physical exercise influence the occurrence of epileptiform EEG discharges in children? *Epilepsia* 1997; 38: 279–84.

Nakken KO, Løyning A, Løyning T, Gløersen G, Larsson PG. Does physical exercise influence the occurrence of epileptiform EEG discharges in children? *Epilepsia.* 1997 Mar;38(3):279-84. Erratum in: *Epilepsia* 1997;38(8):956.

Nakken KO, Taubolle E. Drug – resistant epilepsy. *Tidsskr Nor Leagerforen* 2009;129(19):1986-9.

Nakken KO. Physical exercise in outpatients with epilepsy. *Epilepsia* 1999;40:643–51.

Nanri K, Takizawa S, Fujita H, Ogawa S, Shinohara Y. Modulation of extracellular glutamate concentration by nitric oxide synthase inhibitor in rat transient forebrain ischemia. *Brain Res.* 1996;738(2):243-8.

Noyan B, Jensen MS, Danscher G. The lack of effects of zinc and nitric oxide in initial state of pilocarpine-induced seizures. *Seizure* 2007;16:410-6.

Nunes JR GP, Tufik S, Nobrega JN. Decreased muscarinic receptor binding in rat brain after paradoxical sleep deprivation: an autoradiographic study. *Brain Res.* 1994;645:247-52.

O

Obeid R, Herrmann W. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Lett.* 2006;580:2994-05.

Ogunyemi AO, Gomez MR, Klass DW. Seizures induced by exercise. *Neurology* 1988;38: 633-4.

Ohkuma S, Katsura M, Chen DZ, Narihara H, Kuriyama K. Nitric oxide-evoked [3H] gamma-aminobutyric acid release is mediated by two distinct release mechanisms. *Mol Brain Res.* 1996;36:137-44.

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.

Ono T, Galanopoulou AS. Epilepsy and epileptic syndrome. *Adv Exp Med Biol.* 2012;724:99-113.

Osonoe K, Mori N, Suzuki K, Osonoe M. Antiepileptic effects of inhibitors of nitric oxide synthase examined in pentylenetetrazol-induced seizures in rats. *Brain Res.* 1994;663(2):338-340.

Ozkaya YG, Agar A, Yargıçođlu P, Hacıođlu G, Bilmen-Sarıkođlu S, Ozen I, Alicigüzel Y. The effect of exercise on brain antioxidant status of diabetic rats. *Diabetes Metab* 2002;28:377- 84.

P

Parent JM. The role of seizure-induced neurogenesis in epileptogenesis and brain repair. *Epilepsy Res.* 2002;50(1-2):179-89.

Patel VP, Chu CT. Nuclear transport, oxidative stress, and neurodegeneration. *Int J Clin Exp Pathol.* 2011;4(3):215-29.

Paul V, Ekambaram P. Effects of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on γ -aminobutyric acid concentration in the brain and on picrotoxin-induced convulsions in combination with phenobarbitone in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005;80:363-70.

Paxinos G, Watson C, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press. 1982.

Pedrazzoli M, D'Almeida V, Martins PJF. Increased hypocretin-1 levels in cerebrospinalfluid after REM sleep deprivation. *Brain Res.* 2004;995: 1-6.

Perła-Kaján J, Jakubowski H. Paraoxonase 1 and homocysteine metabolism. *Amino Acids.* 2012;43(4):1405-17.

Perla-Kajan J, Twardowski T, Jakubowski H. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids* 2007;32:561–72.

Perrier NA, Salani M, Falasca C, Bon S, Augusti-Tocco G, Massoulié J. The readthrough variant of acetylcholinesterase remains very minor after heat shock, organophosphate inhibition and stress, in cell culture and in vivo. *J Neurochem.* 2005;94(3):629-38.

Petrović M, Fufanović I, Elezović I, Čolović M, Krstić D, Jakovljević V, Đurić D. Efekti homocistein tiolaktona na aktivnost acetilholinesteraze u mozgu, krvi i srcu pacova. *Serb J Exp Clin Res.* 2010; 11(1):19-22.

Pexa A, Herrmann M, Taban-Shomal O, Henle T, Deussen A. Experimental hyperhomocysteinaemia: differences in tissue metabolites between homocystine and methionine feeding in a rat model. *Acta Physiol (Oxf).* 2009;197(1):27-34.

Pierre SV, Xie Z. The Na,K-ATPase receptor complex: its organization and membership. *Cell Biochem Biophys.* 2006;46(3):303-16.

Pietraszek M, Sukhanov I, Maciejak P, Szyndler J, Gravius A, Wisłowska A, Płaźnik A, Bernalov AY, Danysz W. Anxiolytic-like effects of mGlu1 and mGlu5 receptor antagonists in rats. *Eur J Pharmacol.* 2005; 514(1):25-34.

Pinault D, Vergnes M, Marescaux C. Medium-voltage 5-9 Hz oscillations give rise to spike-and-wave discharges in a genetic model of absence epilepsy: in vivo dual extracellular recording of thalamic relay and reticular neurons. *Neurosci.* 2001; 105:181–201.

Pitler TA, Alger BE. Cholinergic excitation of GABAergic interneurons in the rat hippocampal slice. *J Physiol.* 1992;450:127-42.

Pitsavos C, Panagiotakos D, Papageorgiou C. Anxiety in relation to inflammation and coagulation markers, among healthy adults: The ATTICA Study. *Atherosclerosis* 2006;320-6.

Prado MA, Reis RA, Prado VF, de Mello MC, Gomez MV, de Mello FG. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochem Int.* 2002;41(5):291-9.

Prast H, PhilippuA. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol.* 2001;64:51–68.

Pratt DA, Tallman KA, Porter NA. Free radical oxidation of polyunsaturated lipids: New mechanistic insights and the development of peroxy radical clocks. *Acc Chem Res.* 2011; 44:458-67.

Prieto-Martín AI, Llorens S, Pardal-Fernández JM, Muñoz LJ, López DE, Escribano J, Nava E, de Cabo C. Opposite caudal versus rostral brain nitric oxide synthase response to generalized seizures in a novel rodent model of reflex epilepsy. *Life Sci.* 2012;90(13-14):531-7.

Proctor MR, Fornai F, Afshar JK, Gale K. The role of nitric oxide in focally-evoked limbic seizures. *Neurosci.* 1997;76:1231-6.

Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol.* 2003; 463:3-33.

Przegalinski E, Baran L, Siwanowicz J. The role of nitric oxide in chemically- and electrically-induced seizures in mice. *Neurosci Lett.* 1996; 217:145–8.

R

Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med* 2008;44:153-59.

Rafferty MF, Mattson M, Jacobson AE, Rice KC. A specific acylating agent for the [3H]phencyclidine receptors in rat brain. *FEBS Lett.* 1985 25;181(2):318-22

Ramakrishnan S, Sulochana KN, Lakshmi S, Selvi R, Angayarkanni N. Biochemistry of homocysteine in health and diseases. *Ind J Biochem Biophys.* 2006;43:275-83.

Rammal H, Bouayed J, Younos C, Soulimani R. Evidence that oxidative stress is linked to anxiety-related behaviour in mice. *Brain Behav Immun.* 2008;22:1156-9.

Ramos A, Correia EC, Izidio GS, Bruske GR. Genetic selection of two new rat lines displaying different levels of anxiety-related behaviors. *Behav Genet.* 2003;33:657-68.

Ramsden M, Berchtold NC, Patrick Kesslak J, Cotman CW, Pike CJ. Exercise increases the vulnerability of rat hippocampal neurons to kainate lesion. *Brain Res.* 2003;971(2):239-44.

Rašić-Marković A, Djuric D, Hrnčić D, Lončar-Stevanović H, Vučević D, Mladenović D, Brkic P, Macut Dj, Stanojevic I, Stanojlović O. High dose of ethanol decreases total spectral power density in seizures induced by D,L – homocysteine thiolactone in adult rats. *Gen Physiol Bioph* 2009;28:25-33.

Rašić-Marković A, Hrnčić D, Djurić D, Macut D, Lončar-Stevanović H, Stanojlović O. The effect of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists on D, L-homocysteine thiolactone induced seizures in adult rats. *Acta Physiol Hung* 2011;98(1):17-26.

Rašić-Marković A, Hrnčić D, Macut D, Stanojlović O, Djuric D. Anticonvulsive Effect of Folic Acid in Homocysteine Thiolactone-Induced Seizures. *Cell Mol Neurobiol.* 2011;31(8):1221-28.

Rasić-Marković A, Stanojlović O, Hrnčić D, Krstić D, Čolović M, Šusić V, Radosavljević T, Djuric D. The activity of erythrocyte and brain Na⁺/K⁺ and Mg²⁺-ATPases in rats subjected to acute homocysteine and homocysteine thiolactone administration. *Mol Cell Biochem* 2009; 327:39-45

Rauhala P, Lin AM, Chiueh CC. Neuroprotection by S-nitrosoglutathione of brain dopamine neurons from oxidative stress. *FASEB J* 1998;12:165-73.

Rechtschaffen A, Gilliland MA, Bergmann BM, Winter JB. Physiological correlates of prolonged sleep deprivation in rats. *Science*. 1983;221(4606):182-4.

Rehncrona S., Smith D.S., Akesson B., Westerberg, E., Siesjö, B.K., Peroxidative changes in brain cortical fatty acids and phospholipids, as characterized during Fe²⁺- and ascorbic acid-stimulated lipid peroxidation in vitro. *J Neurochem*. 1980;34:1630-8.

Rehni AK, Singh TG, Kalra R, Singh N. Pharmacological inhibition of inducible nitric oxide synthase attenuates the development of seizures in mice. *Nitric Oxide*. 2009;21(2):120-5.

Reimund E. The free radical flux theory of sleep. *Med Hypotheses*. 1994;43:231-3.

Reinhard L, Tidow H, Clausen MJ, Nissen P. Na⁽⁺⁾,K⁽⁺⁾-ATPase as a dockingstation: protein-protein complexes of the Na⁽⁺⁾,K⁽⁺⁾-ATPase. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(2):205-22.

Ribeiro LR, Figuera MR, Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ferreira AP, Saraiva AL, Souza MA, Lima FD, Magni DV, Dezengrini R, Flores EF, Butterfield DA, Ferreira J, dos Santos AR, Mello CF, Royes LF. Methylmalonate-induced seizures are attenuated in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Int J Dev Neurosci*. 2009;27(2):157-63.

Ridnour LA, Isenberg JS, Espey MG, Thomas DD, Roberts DD, Wink DA. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(37):13147-52

Robello M, Amico C, Bucossi G, Cupello A, Rapallino MV, Thellung S. Nitric oxide and GABAA receptor function in the rat cerebral cortex and cerebellar granule cells. *Neurosci*. 1996;74(1):99-106.

Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal*. 2006;2(2):409-30

Rodin E, Luby ED, Gottlieb JS. The electroencephalogram during prolonged experimental sleep deprivation. *EEG Clin Neurophysiol*. 1962;14:544-51.

Rondouin G, Bockaert J, Lerner-Natoli M. L-Nitroarginine, an inhibitor of NO synthase, dramatically worsens limbic epilepsy in rats. *NeuroReport*. 1993;4:1187-90.

Rondouin G, Lerner-Natoli M, Manzoni O, Lafon-Cazal M, Bockaert J. A nitric oxide (NO) synthase inhibitor accelerates amygdala kindling. *NeuroReport*. 1992;3:805-56.

Rosa R, Sanfeliu C, Sunol C, Pomes A et al.. The mechanism for hexachlorocyclohexane-induced cytotoxicity and changes in intracellular Ca²⁺ homeostasis in cultured cerebellar granule neurons is different from the gamma- and delta-isomers. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997;142:31-9.

Royes LF, Figuera MR, Furian AF, Oliveira MS, Fiorenza NG, de Carvalho Myskiw J, Frussa-Filho R, Mello CF. Involvement of NO in the convulsive behavior and oxidative damage induced by the intrastriatal injection of methylmalonate. *Neurosci Lett*. 2005;376(2):116-20.

Royes LF, Figuera MR, Furian AF, Oliveira MS, Fiorenza NG, Petry JC, Coelho RC, Mello CF. The role of nitric oxide on the convulsive behavior and oxidative stress induced by methylmalonate: an electroencephalographic and neurochemical study. *Epilepsy Res*. 2007;73(3):228-37.

S

Sachdev PS. Homocysteine and brain atrophy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005;29:1152-61.

Sarandol A, Sarandol E, Eker S, Erdinc S, Vatansever E, Kirli S. Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: shortterm antidepressant treatment does not alter oxidative-antioxidative systems. *Hum Psychopharmacol*. 2008;22:67-73.

Sardo P, Carletti F, D'Agostino S, Rizzo V, Ferraro G. Involvement of nitric oxide-soluble guanylyl cyclase pathway in the control of maximal dentate gyrus activation in the rat. *J Neural Transm*. 2006;113(12):1855-61.

Sauvit MP, Pages N. Cardiotoxicity of lindane, a gamma isomer of hexachlorocyclohexane. *J Soc Biol*. 2002;196(4):339-48.

Sayre LM, Smith MA, Perry G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr Med Chem*. 2001;8(7):721-38.

Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*. 2001;30(11):1191-212.

Scherer EB, da Cunha AA, Kolling J, da Cunha MJ, Schmitz F, Sitta A, Lima DD, Delwing D, Vargas CR, Wyse AT. Development of an animal model for chronic mild hyperhomocysteinemia and its response to oxidative damage. *Int J Dev Neurosci*. 2011;29(7):693-9.

Schridde U, van Luijtelaar G. The influence of strain and housing on two types of spike-wave discharges in rats. *Genes Brain Behav*. 2004; 3:1-7

Schulpis K, Kalimeris K, Bakogiannis C, Tsakiris T, Tsakiris S. The effect of in vitro homocystinuria on the suckling rat hippocampal acetylcholinesterase. *Metab Brain Dis* 2006; 21(1):21-28.

Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA*. 1993;270(22):2693-8.

Sener U, Zorlu Y, Karaguzel O, Ozdamar O, Coker I, Topbas M. Effects of common anti-epileptic drug monotherapy on serum levels of homocysteine, vitamin B12, folic acid and vitamin B6. *Seizure*. 2006;15(2):79-85.

Sequeira SM, Ambrósio AF, Malva JO, Carvalho AP, Carvalho CM. Modulation of glutamate release from rat hippocampal synaptosomes by nitric oxide. *Nitric Oxide*. 1997;1(4):315-29.

Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, Wilson PW, Wolf PA. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2002; 346: 476–83.

Setkowicz Z, Mazur A . Physical training decreases susceptibility to subsequent pilocarpine-induced seizures in the rat. *Epilepsy Res* 2006;71:142–8.

Setoue M, Ohuchi S, Morita T, Sugiyama K. Hyperhomocysteinemia induced by guanidinoacetic acid is effectively suppressed by choline and betaine in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008 Jul;72(7):1696-703.

Sharma M, Rai SK, Tiwari M, Chandra R. Effect of hyperhomocysteinemia on cardiovascular risk factors and initiation of atherosclerosis in Wistar rats. *Eur J Pharmacol*. 2007;574(1):49-60.

Sharma P, Senthilkumar RD, Brahmachari V, Sundaramoorthy E, Mahajan A, Sharma A, Sengupta S. Mining literature for a comprehensive pathway analysis: A case study for retrieval of homocysteine related genes for genetic and epigenetic studies. *Lipids Health Dis*. 2006; 23:5:1.

Shelkovnikov S, Merlic CA, Gonick HC. Influence of nitric oxide donors and peroxyxynitrite on the contractile effect and concentration of norepinephrine. *Life Sci*. 2004;74:2919–28.

Shetty AK, Hattiangady B, Rao MS, Shuai B. Neurogenesis response of middle-aged hippocampus to acute seizure activity. *PLoS One*. 2012;7(8):e43286.

Shi QS, Savage JE, Hufeisen SJ, Rauser L, Grajkowska E, Ernsberger P. L-Homocysteine sulfinic acid and other acidic homocysteine derivatives are potent and selective metabotropic glutamate receptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 305:131–42.

Silvestre JS, Nadal R, Pallares M, Ferre N. Acute effects of ketamine in the holeboard, the elevated-plus maze, and the social interaction test in Wistar rats. *Depress Anxiety* 1997;5:29-33.

Simon P, Dupuis R, Costentin J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions, *Behavioural Brain Res*. 1994;61:59-64.

Souza MA, Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Lima FD, Dalla Corte LC, Silva LF, Retamoso LT, Dalla Corte CL, Puntel GO, de Avila DS, Soares FA, Figuera MR, de Mello CF, Royes LF. Swimming training prevents pentylentetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. *Epilepsia* 2009;50:811–23.

Spatt J, Langbauer G, Mamoli B. Subjective perception of seizure precipitants: results of questionnaire study. *Seizure* 1998;7(5):391-5.

Spector S, Cull C, Goldstein LH. Seizure precipitants and perceived self-control of seizures in adults with poorly-controlled epilepsy. *Epilepsy Res*. 2000;38(2-3):207-16.

Spence AM, Rasey JS, Dwyer-Hansen L, Grunbaum Z, Livesey J, Chin L, Nelson N, Stein D, Krohn KA, Ali-Osman F. Toxicity, biodistribution and radioprotective capacity of L-homocysteine thiolactone in CNS tissues and tumors in rodents: comparison with prior results with phosphorothioates. *Radiother Oncol*. 1995; 35:216–26.

Sperling MR, Schilling CA, Glosser D, Tracy JI, Asadi-Pooya AA. Self-perception of seizure precipitants and their relation to anxiety level, depression, and health locus of control in epilepsy. *Seizure*. 2008;17(4):302-7.

Stadtman ER. Role of oxidant species in aging. *Curr Med Chem*. 2004;11(9):1105-12.

Stanojlović O, Hrnčić D, Rašić A, Lončar–Stevanović H, Djurić D, Šušić V. Interaction of delta – sleep inducing peptide and valproate on metaphit audiogenic seizure model in rats. *Cell Mol Neurobiol* 2007;27:923- 32.

Stanojlović O, Hrnčić D, Rašić A, Šušić V, Živanović D. Beneficial effects of delta sleep inducing peptide on metaphit seizures. *Acta Vet (Beograd)* 2007;57:89-101

Stanojlović O, Hrnčić D, Rašić-Marković A, Macut Dj, Djurić D, Šušić V. Sleep peptides in experimental models of epilepsy. *Glas Srp Akad Nauka Med*.2011;(51):141-9.

Stanojlović O, Hrnčić D, Živanović D, Šušić V. Anticonvulsant, but not antiepileptic action of valproate on audiogenic seizure in metaphit – treated rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34:1010-5.

Stanojlović O, Rašić–Marković A, Hrnčić D, Šušić V, Macut Dj, Radosavljević T, Djurić D. Two types of seizures in homocysteine thiolactone – treated adult rats, behavioral and encephalographic study. *Cell Mol Neurobiol* 2009;29:329-39.

Stanojlović O, Zivanović D, Susić V. N-Methyl-D-aspartic acid- and metaphit-induced audiogenic seizures in rat model of seizures. *Pharmacol Res*. 2000;42:247-53.

Stanojlović OP, Zivanović DP. Experimental models of epilepsy. *Med Pregl*. 2004;57(7-8):359-62.

Starr MS, Starr BS. Paradoxical facilitation of pilocarpine-induced seizures in the mouse by MK-801 and the nitric oxide synthesis inhibitor L-NAME. *Pharmacol Biochem Behav*. 1993; 45(2):321-5.

Steckler T, Lavreysen H, Oliveira AM, Aerts N, Van Craenendonck H, Prickaerts J, Megens A, Lesage AS. Effects of mGlu1 receptor blockade on anxiety-related behaviour in the rat lick suppression test. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005;179(1):198-206.

Stefanello FM, Zugno AI, Wannmacher CM, Wajner M, Wyse AT. Homocysteine inhibits butyrylcholinesterase activity in rat serum. *Metab Brain Dis*. 2003;18(3):187-94.

Stefanits H, Czech T, Patariaia E, Baumgartner C, Derhaschnig N, Slana A, Kovacs GG. Prominent oligodendroglial response in surgical specimens of patients with temporal lobe epilepsy. *Clin Neuropathol*. 2012;31(6):409-17.

Steimer T. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. *Dialogues Clin Neurosci*. 2011;13:495-506.

Stewart LS, Leung LS. Hippocampal melatonin receptors modulate seizure threshold. *Epilepsia* 2005;46(4):473-80.

Stoney CM, Engebretson TO. Plasma homocysteine concentrations are positively associated with hostility and anger. *Life Sci*. 2000; 66(3):2267-75.

Streck EL, Zugno AI, Tagliari B, Wannmacher C, Wajner M, Wyse AT. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity by the metabolites accumulating in homocystinuria. *Metabol Brain Dis*. 2002;17: 83-91.

Strine TW, Chapman DP. Associations of frequent sleep insufficiency with health-related quality of life and health behaviors. *Sleep Med*. 2005;6(1): 23-7.

Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1411(2-3):217-30.

Sun M, Zigman S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal Biochem*. 1978;90(1):81-9.

Susic V and Markovic O. Potentiation of metaphite – induced audiogenic seizures by REM sleep deprivation in rats. *Physiol Behav.* 1993;54:331-8.

Šušić V, Reith ME, Zlokovic BV, Lajtha A, Jacobson AE, Rice KC, Lipovac MN. Electroencephalographic characteristics of audiogenic seizures induced in metaphit-treated small rodents. *Epilepsia.* 1991; 32(6):783-90.

T

The College of Family Physicians of Canada. The miracle drug. *Can Fam Physician.* 2010;56(5):407.

Towle AC, Sze PY. Inactivation by Na⁺,K⁺-ATPase of cytosol glucocorticoid receptors from rat brain and liver. *Mol Cell Biochem.* 1983;52(2):145-51.

Trabace L, Cassano T, Tucci P, Steardo L, Kendrick KM, Cuomo V. The effects of nitric oxide on striatal serotonergic transmission involve multiple targets: an in vivo microdialysis study in the awake rat. *Brain Res.* 2004;1008:293–8.

Troen AM, Shea-Budgell M, Shukitt-Hale B, Smith DE, Selhub J, Rosenberg IH. B-vitamin deficiency causes hyperhomocysteinemia and vascular cognitive impairment in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 26;105(34):12474-9

Troen AM. The central nervous system in animal models of hyperhomocysteinemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2005; 29:1140-51.

Tufik S, Andersen ML, Bittencourt LR, Mello MT. Paradoxical sleep deprivation: neurochemical, hormonal and behavioral alterations. Evidence from 30 years of research. *An Acad Bras Cienc.* 2009;81(3):521-38.

Tufik S, Troncone LRP, Braz S. Does REM sleep deprivation induce subsensitivity of presynaptic dopamine or postsynaptic acetylcholine receptors in the rat brain? *EurJPharmacol.* 1987;140:215-19.

Turski L, Ikonomidou C, Turski WA, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse*. 1989;3(2):154-71.

Tutka P, Barczyński B, Arent K, Mosiewicz J, Mróz T, Wielosz M. Different effects of nitric oxide synthase inhibitors on convulsions induced by nicotine in mice. *Pharmacol Rep*. 2007;59:259-67.

Tutkun E, Ayyildiz M, Agar E . Short duration swimming exercises decreases penicillin induced epileptiform ECoG activities in rats. *Acta Neurobiol Exp*. 2010;70:382-9.

U

Urbanska EM, Drelewska E, Borowicz KK, Blaszcak P, Kleinrok Z, Czuczwar SJ. NG-nitro-L-arginine, a nitric oxide synthase inhibitor, and seizure susceptibility in four seizure models in mice. *J Neural Transm*. 1996;103:1145-52.

V

Vaillend C, Mason SE, Cuttle MF, Alger BE. Mechanisms of neuronal hyperexcitability caused by partial inhibition of Na⁺-K⁺-ATPases in the rat CA1 hippocampal region. *J Neurophysiol*. 2002;88(6):2963-78.

Valko M, Morris H, Mazúr M, Raptá P, Bilton RF. Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: do the semiquinones of vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer? *Biochim Biophys Acta*. 2001;1527(3):161-6.

Van den Berg M, van der Knaap MS, Boers GH. Hyperhomocysteinemia; with reference to its neuroradiological aspects. *Neuroradiol* 1995;37:403-11.

Van Leeuwen R, De Vries R, Dzoljic MR. 7-Nitro indazole, an inhibitor of neuronal nitric oxide synthase, attenuates pilocarpine- induced seizures. *Eur J Pharmacol*. 1995; 28:7211—13.

Vaquero-Lorenzo C, Riaza Bermudo-Soriano C, Perez-Rodriguez MM, Diaz-Hernandez M, López-Castromán J, Fernandez-Piqueras J, Saiz-Ruiz J, Baca-Garcia E. Positive association between SAT-1 -1415T/C polymorphism and anxiety. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2009;150B(4):515-9.

Vazquez B, Devinsky O. Epilepsy and anxiety. *Epilepsy Behav.* 2003; 4:S20-S25.

Vezzani A, Ravizza T, Moneta D, Conti M, Borroni A, Rizzi M, Samanin R, Maj R. Brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity in the limbic system of rats after acute seizures and during spontaneous convulsions: temporal evolution of changes as compared to neuropeptide Y. *Neuroscience.* 1999;90(4):1445-61.

Villalobos MA, De La Cruz JP, Cuerda MA, Ortiz P, Smith-Agreda JM, Sanchez DLS. Effect of S-adenosyl-L-methionine on rat brain oxidative stress damage in a combined model of permanent focal ischemia and global ischemia-reperfusion. *Brain Res.* 2000; 883:31–40.

Viola MS, Rodríguez de Lores Arnaiz G. Brain Na⁺, K⁺-ATPase isoforms: different hypothalamus and mesencephalon response to acute desipramine treatment. *Life Sci.* 2007; 81:228–33.

Vučević D, Hrnčić D, Radosavljević T, Mladenović D, Đurić D, Rašić- Marković A, Lončar-Stevanović H, Macut Dj. Šušić V, Stanojlović O. Correlation between electrocorticographic and motor phenomena in lindane-induced experimental epilepsy in rats. *Canad J Physiol Pharmacol.* 2008;86:173-9.

Vučević D, Petronijević N, Radonjić N, Rašić-Marković A, Mladenović D, Radosavljević T, Hrnčić D, Djuric D, Sušić V, Macut Dj, Stanojlović O. Acetylcholinesterase as a potential target of acute neurotoxic effects of lindane in rats. *Gen Physiol Bioph* 2009;28:18-24.

W

Wang X, Michaelis EK. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front Aging Neurosci.* 2010; 2:12.

Whittaker VP, Barker LA. The subcellular fractionation of brain tissue with special reference to the preparation of synaptosomes and their component organelles. *Method Neurochem.* 1972;2:1-52.

Wilcken DE, Wang XL, Adachi T, Hara H, Duarte N, Green K, Wilcken B. Relationship between homocysteine and superoxide dismutase in homocystinuria: possible relevance to cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(5):1199-202.

Willmott NJ, Wong K, Strong AJ. A fundamental role for the nitric oxide-G-kinase signaling pathway in mediating intercellular Ca²⁺ waves in glia. *J Neurosci.* 2000;20:1767-79.

Wirrell EC. Epilepsy-related injuries. *Epilepsia* 2006; 47(suppl 1):79–86.

Wong J, Wirrell E. Physical activity in children/teens with epilepsy compared with that in their siblings without epilepsy. *Epilepsia* 2006;47(3):631-9.

Wyse AT, Zugno AI, Streck EL et al. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment. *Neurochem Res.* 2002; 27:1685–9.

X

Xia C, Bao Z, Yue C, Sanborn BM, Liu M. Phosphorylation and regulation of G-protein-activated phospholipase C-beta 3 by cGMPdependent protein kinases. *J Biol Chem.* 2001;276:19770–7.

Y

Yasuda H, Fujii M, Fujisawa H, Ito H, Suzuki M. Changes in nitric oxide synthesis and epileptic activity in the contralateral hippocampus of rats following intrahippocampal kainate injection. *Epilepsia* 2001;42:13-20.

Z

Zhang R, Ma J, Xia M, Zhu H, Ling W. Mild hyperhomocysteinemia induced by feeding rats diets rich in methionine or deficient in folate promotes early atherosclerotic inflammatory processes. *J Nutr.* 2004;134(4):825-30.

Zhou L, Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide.* 2009;20(4):223-30.

Živanovič D, Stanojlović O, Stojanović J, Šušić V. Induction of audiogenic seizures in imipenem/cilastatin-treated rats. *Epilepsy Behav.* 2004;5(2):151-8.

Zou CG, Zhao YS, Gao SY, Li SD, Cao XZ, Zhang M, Zhang KQ. Homocysteine promotes proliferation and activation of microglia. *Neurobiol Aging.* 2010;31(12):2069-79.

Zucchini-Pascal N, De Sousa G, Rahmani R. Lindane and cell death: at the crossroads between apoptosis, necrosis and autophagy. *Toxicol.* 2009;256:32-41.

PRILOZI

BIOGRAFIJA AUTORA

Dragan Hrnčić rođen je 18.08.1983. god.u V. Kladuši. Osnovnu školu i Treću beogradsku gimnaziju završio je kao đak generacije. Medicinski fakultet u Beogradu upisao je 2002. god, a završio 2008. god. sa prosečnom ocenom 9,83. Specijalističke akademske studije iz Eksperimentalne fiziologije i patološke fiziologije završio je 2009 god. Doktorske studije iz Fizioloških nauka upisao je 2009. god na Medicinskom fakultetu u Beogradu. Zaposlen je na Institutu za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan” Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu od 2009. god, najpre kao saradnik u nastavi, a od 2010. u zvanju asistenta. Saradnik je (istraživač kategorije A1) na Projektu Ministarstva za nauku i prosvetu Srbije „Razvoj animalnih modela epilepsija i testiranje konvulzivnih i antikonvulzivnih supstanci“ čiji rukovodilac je Prof. dr O. Stanojlović i na Projektu Fonda za nauku SANU „Eksperimentalna i klinička istraživanja bioloških aktivnih supstanci (konvulzanti, antikonvulzanti, peptid spavanja i njegovi analozi) na ekscitabilnost centralnog nervnog sistema“ čiji rukovodilac je Akademik V. Šušić. Učesnik je na COST Akciji 15005 „European Network on Gasotransmitters“ čiji MC Member je Prof. dr D. Đurić. Za svoj stručni i naučni rad više puta je nagrađivan i stipendiran u zemlji i inostranstvu. Na različitim vidovima usavršavanja bio u Nemačkoj, Mađarskoj, Francuskoj, Italiji, Rusiji, Španiji, Sloveniji. Član je više domaćih i međunarodnih organizacija među kojima i Srpskog lekarskog društva, Društva fiziologa Srbije, Udruženja za kliničku neurofiziologiju Srbije, Društva za neuronauke Srbije, kao i European Brain and Behavior Society, IBRO, FENS.

OBJAVLJENI REZULTATI

Na osnovu rezultata istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije do sada su objavljeni sledeći in extenso radovi i referati:

Radovi in extenso

1. **Hrnčić D**, Rašić-Marković A, Macut-Bjekic J, Šušić V, Djuric D, Stanojlović O. Paradoxical sleep deprivation potentiates epilepsy induced by homocysteine thiolactone in rats. *Experimental Biology and Medicine* 2013;238(1):77-83.
2. **Hrnčić D**, Rašić-Marković A, Macut D, Šušić V, Djuric D, Stanojlović O. Homocysteine thiolactone - induced seizures in adult rats are aggravated by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Human and Experimental Toxicology* 2013, in press
3. **Hrnčić D**, Rašić-Marković A, Krstić D, Macut Dj, Šušić V Djuric D, Stanojlović O. Inhibition of the neuronal nitric oxide synthase potentiates homocysteine thiolactone – induced seizures in adult rats. *Medicinal Chemistry* 2012; 8(1):59-64.
4. **Hrnčić D**, Rašić-Marković A, Krstić D, Bjekić-Macut J, Šušić V, Mladenović D, Djurić D, Stanojlović O. Gaseous neurotransmitter nitric oxide: its role in experimental models of epilepsy. *Archives of Biological Sciences* 2012; 64(3):1207-16.
5. Stanojlović O, **Hrnčić D**, Rašić-Marković A, Djurić D. Homocysteine: neurotoxicity and mechanisms of induced hyperexcitability. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research* 2011; 12:3-9.

6. Stanojlović O, **Hrnčić D**, Rašić-Marković A, Macut Dj, Đurić D, Šušić V. Peptidi spavanja u eksperimentalnim modelima epilepsije. *Glas SANU* 2011, CDXVII, knjiga 51:141-149.

Izvodi u zborniku međunarodnog naučnog skupa

1. **Hrnčić D**, Rašić-Marković A, Sarhan R, Šušić V, Macut D, Djuric D, Stanojlović O. Benefits of aerobic exercise for adult rats with seizures induced by homocysteine thiolactone. 10th European Congress on Epileptology, London, UK, September 30- October 4, 2012, *Epilepsia* 2012; S5:104
2. **Hrnčić D**, Rašić-Marković A, Leković J, Macut - Bjekić J, Šušić V, Djuric D, Stanojlović O. Homocysteine-thiolactone induced seizures following acute exercise training in adult rats. The Fourth International Symposium on Neurocardiology NEUROCARD 2012, Belgrade, Serbia, September 27-29, 2012, Abstract Book, p90
3. **Hrnčić D**, Rašić-Marković A, Šušić V, Macut D, Djuric D, Stanojlović O. Nitric oxide - mediated neurotransmission in mechanisms of epilepsy: behavioral and EEG study. International Summer School Neurogenetics. Unraveling behavior and brain mechanisms using modern technologies. Zvenigorod, Moscow r., Russia, August 20-25, 2012, Abstracts, p9,10
4. **Hrnčić D**, Rašić-Marković A, Šušić V, Macut D, Djuric D, Stanojlović O. Relationship between homocysteine-induced seizures and paradoxal sleep deprivation. 8th FENS Forum of Neuroscience. Barcelona, Spain, Abstract e-book, 2644.
5. **Hrnčić D**, Rašić-Marković A, Šušić V, Bjekić-Macut J, Djuric D, Stanojlović O. Homocysteine-induced seizures: aggravation by iNOS inhibition.

Advances and controversies in B-vitamine and Choline; Leipzig, Germany, Clin Chem Lab Med 2012; 60(2): A54.

6. **Hrnčić D**, Rašić-Marković A, Šušić V, Djurić D, Stanojlović O. Significance of positive stimulation for successful rat treadmill training, 26 DGAF Meeting, 2012, Blaubeuren, Germany, Perfusion, 2012: 25(1): 32.
7. **Hrnčić D**, Rašić - Marković A, Šušić V, Djurić D, Stanojlović O. Inhibition of neural nitric oxide synthase potentiates seizures induced by homocysteine in adult rats. 8th IBRO World Congress of Neurosciences, Florence, Italy, July 14-18, 2011, CD Abstract Book, B396
8. **Hrnčić D**, Rašić - Marković A, Šušić V, Macut Dj, Djurić D, Stanojlović O. Blockade of iNOS provokes lethal outcome in homocysteine-treated adult rats. The Third International Symposium on Neurocardiology NEUROCARD 2011, Belgrade, Serbia, October 6-8, 2011, Abstract Book, p73

Izvodi u zborniku nacionalnog naučnog skupa

1. **Hrnčić D**, Rašić - Marković A, Mikić J, Demchuk G, Leković J, Šušić V, Macut Dj, Djurić D, Stanojlović O. Anxiety-related behavior in adult rats after acute homocysteine thiolactone treatment. Symposium of Clinical Neurophysiology with International Participation. Belgrade, Serbia, November 02-03,2012, Abstract Book, p42-43
2. **Hrnčić D**. Uloga gasotransmitera u homocisteinom-indukovanim konvulzijama kod pacova. Mini simpozijum Homocistein, folna kiselina i oksidativni stres: efekti na kardiovaskularni i centralni nervni sistem. Simpozijum Stremljenja i novine u medicini, Beograd, Decembar 5-9, 2011. Medicinska istraživanja 2011; 45:14

3. **Hrnčić D**, Rašić - Marković A, Šušić V, Djurić D, Stanojlović O. The role of gasotransmitter NO in homocysteine - and lindane - induced neurotoxicity. Scientific conference with international participation Preclinical testing of active substances and cancer research with international symposium on Anti-cancer agents, cardiotoxicity and neurotoxicity, Kragujevac, March 16-18, 2011, Abstract Book, p24.

ОБАВЕЗНИ ПРИЛОЗИ

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Драган Хрнчић

број уписа 09-ФН-01

Изјављујем

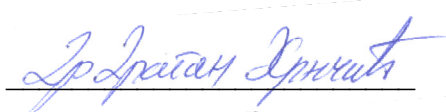
да је докторска дисертација под насловом

Модулација епилептичне активности изазване хомоцистеин тиолактоном код пацова:
улога хиперметионинске дијете, спавања, физичке активности и азот монооксида

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

Потпис докторанда

У Београду, 12.04.2013.



Драган Хрнчић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Драган Хрнчић

Број уписа _____

Студијски програм Докторске студије из Медицинских наука - смер Физиолошке науке

Наслов рада Модулација епилептичне активности изазване хомоцистеин тиолактоном код пацова: улога хиперметионинске дијете, спавања, физичке активности и азот монооксида

Ментор Проф. др Оливера Станојловић

Потписани Драга Хрнчић

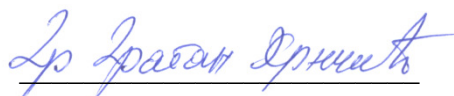
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 12.04.2013.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Модулација епилептичне активности изазване хомоцистеин тиолактоном код пацова: улога хиперметионинске дијете, спавања, физичке активности и азот монооксида

која је моје ауторско дело.

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

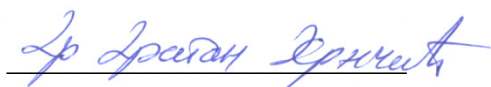
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 12.04.2013.



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.