

Studii privind dinamica transmisiilor indol-ergice după administrarea unor medicamente active la nivelul sistemului nervos central

STUDIES REGARDING THE DYNAMIC OF INDOLE-ERGIC TRANSMISSION AFTER ACTIVE DRUGS ADMINISTRATION ON CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Cristina Manuela Drăgoi, Alina Crenguța Nicolae, Niculina Mitrea, Andreea Letiția Arsene

Facultatea de Farmacie, Disciplina Biochimie, UMF „Carol Davila”, București

Rezumat

Obiective. Studiul efectuat și-a propus investigarea variațiilor cerebrale ale triptofanului, serotoninei și melatoninei la animale tratate cu medicamente psihoactive.

Materiale și metode. Studiul experimental a fost efectuat în cadrul unei colaborări între Laboratoarele de Biochimie și Chimie Analitică ale Facultății de Farmacie din București și Laboratorul de Toxicologie al Institutului de Diagnostic și Sănătate Animală (IDSA), București. S-au utilizat șoareci albi rasa Albino Swiss, în vârstă de 3 săptămâni (la intrarea în studiu), aceștia fiind randomizați în 4 loturi, după cum urmează: lotul 1 – lotul martor (M), tratat cu ser fiziologic (NaCl 0,9%), 0,2 ml/kgc, i.p; lotul 2 – lotul tratat cu risperidonă (R), 0,5 mg/kgc, i.p; lotul 3 – lotul tratat cu fluoxetină (F), 10 mg/kgc, i.p; lotul 4 – lotul tratat cu litiu (Li), 70 mg/kgc, i.p. Durata tratamentului a fost de 14 zile, iar la sfârșitul acestei etape s-a prelevat țesutul cerebral al animalelor. Concentrația neuronală de serotonină s-a determinat printr-o metodă LC-MS, melatonina cerebrală printr-o metodă chemiluminometrică, iar triptofanul a fost evaluat prin tehnica spectrofluorimetriei.

Rezultate și discuții. În cazul concentrației de serotonină, toți subiecții au manifestat o hiperfuncție serotoninergică, comparativ cu lotul martor. Cea mai importantă variație a nivelului de serotonină este înregistrată după administrarea fluoxetinei 150% efect (medicament ISRS). Litiul, deși nu este încadrat ca medicament cu acțiune specifică pe sistemul serotoninergic, manifestă un efect notabil de 75% față de lotul martor. Conform rezultatelor obținute, valoarea triptofanului este puternic crescută după administrarea fluoxetinei (85,34%). Deși medicamentele administrate nu manifestă acțiune directă la nivel melatoninergic, determinarea concentrației cerebrale a melatoninei a relevat valori crescute: de 57,40% la indivizii tratați cu fluoxetină și de 44% pentru cei tratați cu risperidonă.

Concluzii. Evaluarea concentrațiilor cerebrale de triptofan, serotonină și melatonină s-a realizat după administrarea unor medicamente active la nivel SNC: fluoxetină, risperidonă și litiu. Toate loturile de animale supuse studiului au înregistrat concentrații crescute de indoli comparativ cu lotul martor.

Cuvinte cheie: indoli, serotonină, melatonină, triptofan

Adresa de corespondență:

Alina Crenguța Nicolae, Facultatea de Farmacie, Disciplina Biochimie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, Str. Dionisie Lupu, Nr. 37, București
E-mail: alinanicolae29@gmail.com

Abstract

Objectives. The study investigated the brain variations of tryptophan, serotonin and melatonin in animals treated with psychoactive drugs.

Materials and methods. The experimental study was conducted in collaboration between Biochemistry and Analytical Chemistry Laboratories of the Faculty of Pharmacy, Bucharest and Toxicology Laboratory of the Institute for Diagnosis and Animal Health (IDSA), Bucharest. We used white Albino Swiss mice, aged 3 weeks (at the beginning of the study), which were randomized into 4 groups as follows: group 1 – control (M), treated with saline (NaCl 0.9%), 0.2 ml/kg, ip, group 2 – treated with risperidone (R), 0.5 mg / kg, ip, group 3 – treated with fluoxetine (F), 10 mg/kg, ip, group 4 – treated with lithium (Li), 70 mg/kg, ip. The treatment duration was 14 days and at the end brain tissue was sampled. The concentration of neuronal serotonin was determined by LC-MS, brain melatonin by a chemiluminometric method and tryptophan was measured spectrofluorimetrically.

Results and discussion. Regarding the cerebral levels of serotonin, all subjects showed a serotonergic hyperfunction compared with controls. The most important change in the level of serotonin was registered as 150% effect after fluoxetine administration. Lithium, although not considered as a drug with specific action on the serotonergic system exhibited a significant effect, 75% compared to the control group. According to our results, tryptophan was strongly increased after administration of fluoxetine (85.34%). Although the studied drugs do not exhibit direct action at melatonergic level, the brain levels of melatonin were elevated: from 57.40% in individuals treated with fluoxetine and 44% for those treated with risperidone.

Conclusions. Evaluation of the brain levels of tryptophan, serotonin and melatonin was performed after the administration of some CNS active drugs: fluoxetine, risperidone and lithium. All groups of animals under study showed elevated levels of indols compared with control.

Key words: indols, serotonin, melatonin, triptophan

INTRODUCERE

Sistemul indol-ergic endogen este considerat în literatura de specialitate ca fiind o rețea informațională proteico-neuro-umoralo-endocrină rezultată prin corelarea chimică și biologică (bio-chimică) a unor biomolecule endogene cu structură indolică, precum triptofan, serotonină, melatonină (1-3).

Una dintre preocupările majore ale cercetării farmaceutice actuale este găsirea unor resurse terapeutice (medicamente) cu eficiență superioară și cu efecte adverse reduse sau absente, iar în acest context potențialul fiziopatologic și farmacologic al bio-indolilor (triptofan, serotonină și melatonină) constituie obiectul cercetărilor moderne privind mecanismele de integrare ale organismelor în marea varietate informațională a mediului exterior. Aceste biomolecule sunt responsabile de coordonarea și sincronizarea expresiei celor mai pregnante efecte fiziologice ale ritmului biologic, ale complexului de procese integratoare ale organismului în mediul înconjurător și mediul social, impun o ordine a funcționalității sistemelor biochimice și determină la nivel global logica moleculară a viului (4,5).

Proprietățile farmacologice și farmaco-toxice ale compusilor indolici se bazează pe coeziunea dintre similaritatea chimică și biologică structurală (imprimată de scheletul indolic bazal) și mecanismul biochimico-terapeutic de acțiune (datorat fixării structurii medicamentoase indolice pe receptorii specifici *indol-sensitive*) (6-9). Un considerent major pentru care structura indolică este intens cercetată în momentul de față este faptul că au fost descoperiți numeroși compuși indolici naturali, atât din regnul vegetal, cât și în regnul animal:

- la speciile animale: triptofan (aminoacid esențial), serotonină (neuromediator), melatonină (principalul hormon pineal), N-acetilserotonina, 6-hidroxi-melatonina, N-acetil-N-formil-5-metoxi kinuramina (AFMK), N-acetil-5-metoxi kinuramina (AMK);
- la speciile vegetale: auxinele (hormoni vegetali-principalul reprezentant fiind acidul indolil 3-acetic), dimetil triptamina (agent psihotrop), psilocina (alcaloid halucinogen), stricnina, reserpina, yohimbina, curara, bufotenina, psilocibina, harmina, harmalina (alcaloizi cu diferite acțiuni la nivelul sistemului nervos central).

Triptofanul, serotonina și melatonina sunt biomolecule endogene cu nucleu indolic cu implicații biologice complexe.

Ca element constitutiv al proteinelor, aminoacidul esențial indolic *triptofan* are cel mai pronunțat caracter hidrofob dintre toți aminoacizii și formează un mediu specific hidrofob care contribuie la stabilizarea structurii proteinelor endogene. De asemenea, triptofanul este unul dintre cei mai importanți precursori indolici endogeni, fiind implicat în biosinteza tuturor compușilor endogeni cu structură indolică (de exemplu, a neuromediatorului serotonină, a hormonului pineal melatonină, neuromodulatorului și neurotransmițătorului triptamina, 5-hidroxitriptofanului, acidului 5-hidroxiindolacetic), precum și în activitatea unor enzime specifice (de exemplu, citocrom C peroxidaza), care au în centrul activ nucleul indolic al triptofanului. Concentrații serice scăzute de triptofan au fost clinic corelate cu apariția proceselor patologice infecțioase, autoimune și, nu în ultimul rând, a celor maligne.

Triptofanul este precursorul *serotoninei*, un neurohormon cu structură indolică, cu numeroase efecte biologice majore. Apariția dezechilibrelor în metabolismul serotoninergic determină etiologia și pato-fiziologia tulburărilor neuropsihiatrice și sistemice, inclusiv dezvoltarea tumorilor secretoare de serotonină. Astfel, cunoașterea cât mai completă a biochimiei triptofanului și serotoninei, precum și natura relațiilor/interacțiunilor stabilite de acestea cu alte biomolecule vitale (de exemplu, ADN-ul), poate contribui la înțelegerea și rezolvarea terapeutică a multor afecțiuni psihiatrice, autoimune, precum și a proceselor neoplazice.

În mod particular, *melatonina* este un neurohormon indolic sintetizat la nivelul epifizei în timpul perioadei nocturne. Melatonina nu este sintetizată în exclusivitate de glanda pineală; atât retina, cât și tractul gastrointestinal produc melatonină. Precursorul direct al melatoninei este serotonina, sintetizată în mod natural în pinelaocite din L-triptofan. În ultimul deceniu, s-au făcut multe studii pentru înțelegerea rolului, poziției și mecanismelor de acțiune ale melatoninei (10,11).

Sistemul de reglare a sintezei melatoninergice este complex, utilizând căi centrale sau autonome, astfel că există multe situații patofiziologice în care secreția metoxiindolului este deficitară.

În acest context pato-fiziologic extrem de complex, obiectivul studiului a constat în investigarea variațiilor

cerebrale ale triptofanului, serotoninei și melatoninei la animale tratate cu medicamente psihoactive.

MATERIALE ȘI METODE

Studiul experimental a fost efectuat în cadrul unei colaborări dintre Laboratoarele de Biochimie și Chimie Analitică ale Facultății de Farmacie din București și Laboratorul de Toxicologie al Institutului de Diagnostic și Sănătate Animală (IDSA), București.

Animale de experiență

S-au utilizat șoareci albi rasa Albino Swiss, în vârstă de 3 săptămâni (la intrarea în studiu), proveniți din biobaza Institutului de Diagnostic și Sănătate Animală, București. Aceștia au fost randomizați în 4 loturi (10 animale/lot), după cum urmează:

- Lotul 1: lotul martor (M), tratat cu ser fiziologic (NaCl 0,9%), 0,2 ml/kgc, i.p;
- Lotul 2: lotul tratat cu risperidonă (R), 0,5 mg/kgc, i.p;
- Lotul 3: lotul tratat cu fluoxetină (F), 10 mg/kgc, i.p;
- Lotul 4: lotul tratat cu litium (Li), 70 mg/kgc, i.p;

Durata tratamentului a fost de 14 zile. La sfârșitul acestei etape animalele au fost sacrificate și s-a prelevat țesut cerebral în vederea evaluării concentrației cerebrale de serotonină, melatonină și triptofan.

Determinarea serotoninei din țesutul cerebral prin metoda lichid-cromatografică

Din țesutul cerebral cântărit, se realizează un omogenat constituit dintr-o parte țesut cerebral și patru părți de apă distilată. Extractul apos este diluat cu apă și serotonina este determinată prin lichid-cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă.

Sistemul lichid cromatografic este alcătuit din autosampler (model ACCELA, Thermo Scientific, SUA), lichid cromatograf (model ACCELA, Thermo Scientific, SUA), pompă cuaternară (model ACCELA, Thermo Scientific, SUA), detector spectrometru de masă cu înaltă rezoluție cu trapă ionică și orbitală (model LTQ Orbitrap, Thermo Scientific, SUA) comandat de soft (Xcalibur).

Determinarea cantitativă a melatoninei serice – metoda chemiluminiscentă

Melatonina a fost determinată din țesut cerebral printr-o metodă chemiluminiscentă. Nucleul indolic al melatoninei este oxidat de către permanganatul de potasiu, în mediu acid. Pe parcursul desfășurării reacției se formează intermediar oxigenul singlet (1O_2), specie

chimică înalt energetică, extrem de instabilă și foarte reactivă (datorită electronilor de spin opus).

Transformarea oxigenului singlet în oxigen triplet (3O_2), specia chimică cea mai stabilă și cu energia cea mai mică a oxigenului, se realizează cu emiterea unei cuante de lumină (semnal luminiscent).

Intensitatea semnalului luminiscent este direct proporțională cu concentrația melatoninei din proba de analizat.

Studiul s-a desfășurat la disciplina de Biochimie a Facultății de Farmacie, București. S-a folosit un chemiluminometru Perkin Elmer model LS 50B, dotat cu sistem extern de termostatare a probelor și sistem de agitare magnetică în cuvă.

Determinarea triptofanului cerebral – metoda fluorimetrică

Aminoacizii aromatici (fenilalanina, tirozina și triptofanul) pot fi detectați prin spectroscopie în domeniul UV (250-300 nm). Fluorescența proteinelor (polimeri care au drept unități structurale aminoacizii) este în general obținută prin excitarea acestor molecule la lungimi de undă mai mari de 280 nm. Maximul de emisie al triptofanului în soluție apoasă este 348 nm (fluorescența este datorată prezenței nucleului indolic).

Determinarea concentrației de triptofan se realizează printr-o metodă fluorimetrică, ce are la bază reacția de condensare a aminoacidului triptofan cu formaldehida la pH 7,3. În urma acestei reacții chimice, se produce scăderea intensității de fluorescență direct proporțional cu concentrația de triptofan prezentă în proba de analizat.

Această metodă de dozare prezintă o selectivitate crescută pentru determinarea concentrației de

triptofan, comparativ cu măsurarea directă a fluorescenței naturale, deoarece în ser se întâlnesc și alți compuși cu nucleu indolic ce emit radiație de fluorescență în condiții normale (5-hidroxi triptamina).

Studiul spectrofluorimetric s-a desfășurat la disciplina de Biochimie a Facultății de Farmacie. S-a folosit un spectrofluorimetru Perkin Elmer model LS 50B.

Pentru exprimarea matematică a efectului biologic indus de către substanțele medicamentoase, am calculat (atât în cercetările pe animale de laborator, cât și în studii clinice) variația procentuală a efectului indus de către medicament, pentru grupul studiat, comparativ cu grupul de control (martor). Această variație procentuală se numește în mod uzual „efect%” și se calculează după formula:

$$\text{efect \%} = \frac{[\text{lot tratat}] - [\text{lot martor}]}{[\text{lot martor}]} * 100$$

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Determinarea serotoninei

În Tabelul 1 sunt prezentate concentrațiile de serotonină determinate la nivel cerebral, pentru cele 4 grupuri de animale studiate.

TABELUL 1. Concentrațiile cerebrale ale serotoninei ($\mu\text{g}/\text{mg}$ țesut umed)

| Loturi de animale | Concentrație de serotonină ($\mu\text{g}/\text{mg}$ țesut umed) |
|-------------------------------------|--|
| Martor (NaCl 0,9%, 0,2 ml/kgc, i.p) | 0,04 \pm 0,009 |
| Risperidona (0,5 mg/kgc,i.p) | 0,08 \pm 0,01 |
| Fluoxetină (10 mg/kgc, i.p) | 0,10 \pm 0,009 |
| Litiu (70 mg/kgc, i.p) | 0,07 \pm 0,01 |

În Figura 1 sunt reprezentate variațiile concentrației de serotonină pentru loturile de animale evaluate, iar

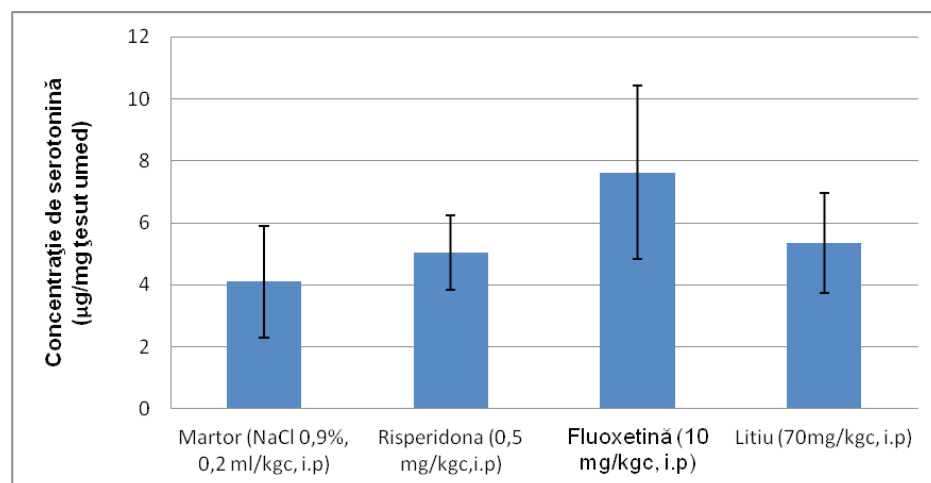


FIGURA 1. Variația concentrației de serotonină la nivel cerebral, pentru cele 4 loturi de animale studiate

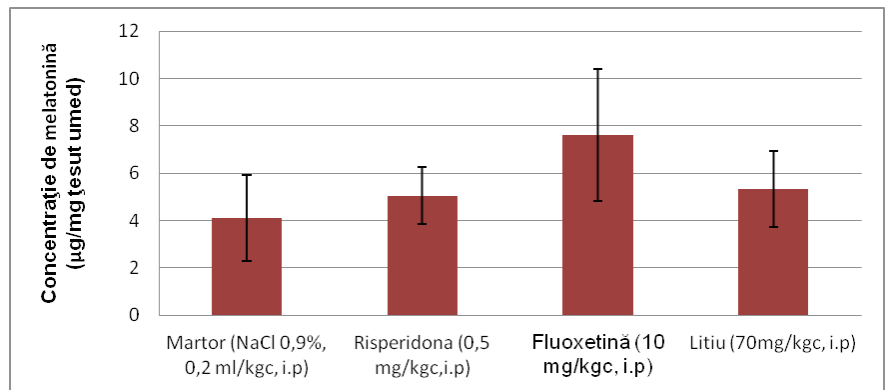


FIGURA 2. Variația concentrației de melatonină la nivel cerebral, pentru cele 4 loturi de animale studiate

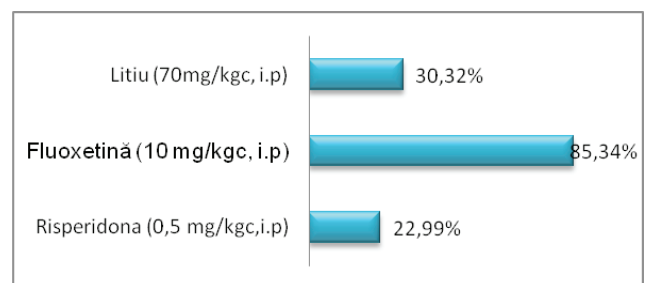


FIGURA 3. Variația procentuală (efect%) a concentrației de melatonină pentru fiecare lot de animale studiat, comparativ cu lotul martor

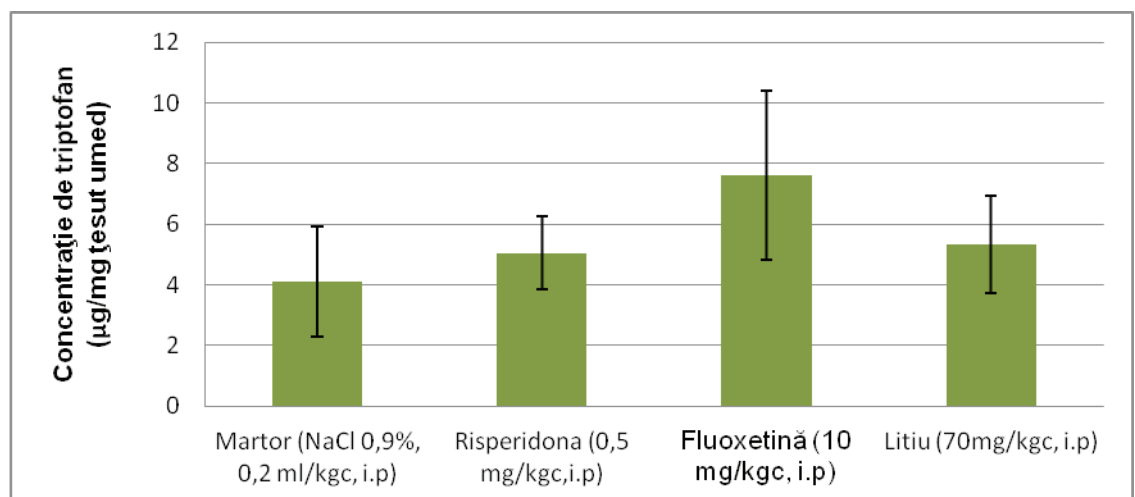


FIGURA 4. Variația concentrației de triptofan, pentru cele 4 loturi de animale studiate

Figura 2 ilustrează variația procentuală (efect%) a serotoninei pentru fiecare lot de animale studiat, comparativ cu lotul martor.

După cum se poate observa, toate medicamentele au determinat o creștere a concentrației de serotonină (hiperfuncție serotoninergică) semnificativă statistic, comparativ cu grupul martor. Acest aspect este important din punct de vedere clinic, deoarece litiul

înregistrează influențe majore asupra funcției serotoninergice (efect de 75% față de martor).

Determinarea melatoninei

În Tabelul 2 sunt înregistrate valorile medii ale parametrilor investigați, pentru cele 4 loturi de animale.

TABELUL 2. Concentrațiile melatoninei cerebrale ($\mu\text{g}/\text{mg}$ țesut umed)

| Lot | Concentrație de melatonină ($\mu\text{g}/\text{mg}$ țesut umed) |
|------------------------------------|--|
| Martor (ser fiziologic 0,2 ml/kgc) | 0,54 \pm 0,15 |
| Risperidonă (0,5 mg/kgc) | 0,78 \pm 0,27 |
| Fluoxetină (10 mg/kgc) | 0,85 \pm 0,37 |
| Litiu (70 mg/kgc) | 0,61 \pm 0,21 |

Din Figura 2 se observă că toate loturile de animale dezvoltă concentrații neuronale de melatonină mai mari, comparativ cu martorul.

Analizând datele obținute în urma studiului desfășurat, am calculat variația procentuală (efect%) a concentrației de melatonină eliberată de animalele tratate medicamentos, comparativ cu lotul martor (Figura 3).

Determinarea cantitativă a triptofanului cerebral

În Tabelul 3 sunt redată valorile obținute la dozarea triptofanului prin metoda fluorimetrică, pentru cele 4 loturi studiate.

TABELUL 3. Concentrațiile cerebrale ale triptofanului ($\mu\text{g}/\text{mg}$ țesut umed)

| Lot | Concentrație de triptofan ($\mu\text{g}/\text{mg}$ țesut umed triptofan) |
|------------------------------------|---|
| Martor (ser fiziologic 0,2 ml/kgc) | 4,11 \pm 1,8 |
| Risperidonă (0,5 mg/kgc) | 5,05 \pm 1,2 |
| Fluoxetina (10 mg/kgc) | 7,62 \pm 2,8 |
| Litiu (70 mg/kgc) | 5,35 \pm 1,6 |

În Figura 4 se poate remarca variația concentrației de triptofan, în funcție de tratamentul administrat la cele 4 loturi de șoareci.

Rezultatele experimentale înregistrate au arătat că toate medicamentele administrate la animalele de experiență au determinat o creștere a concentrației neuronale de triptofan, în proporții variabile.

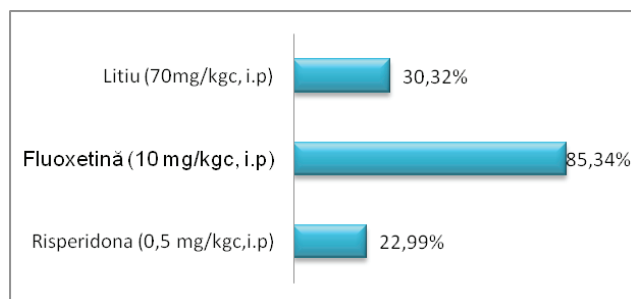


FIGURA 5. Variația procentuală (efect%) a triptofanului pentru fiecare lot de animale studiat, comparativ cu lotul martor

Astfel, după cum se poate observa, toate medicamentele imprimă o creștere a concentrației de triptofan, cele mai importante efecte înregistrându-se

pentru grupul de animale tratate cu fluoxetină (85,34%).

Rezultatele experimentale obținute pentru concentrația de triptofan și nivelul neuronal de serotonină se corelează pozitiv (Figura 6) – coeficient Pearson $r = 0,901$, pentru loturile de animale luate în lucru, ceea ce demonstrează corelația indolergică a mecanismelor biochimice implicate în răspunsul terapeutic al medicamentelor implicate.

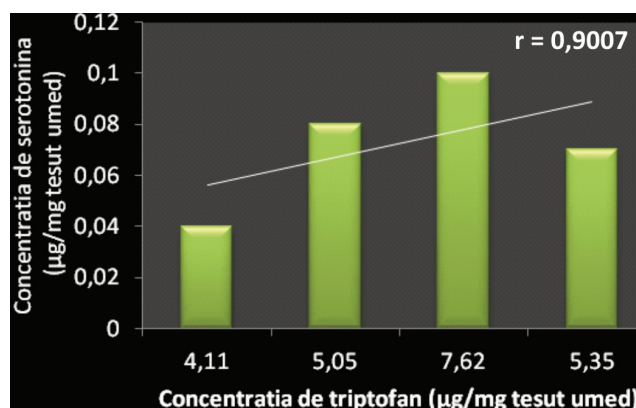


FIGURA 6. Corelația Pearson între concentrația neuronală de serotonină și concentrația serică de triptofan, pentru cele 4 loturi de animale luate în lucru

De asemenea, datele experimentale s-au corelat pozitiv și pentru concentrațiile de triptofan și melatonină (Figura 7) având un coeficient Pearson $r = 0,804$, pentru loturile de animale studiate.

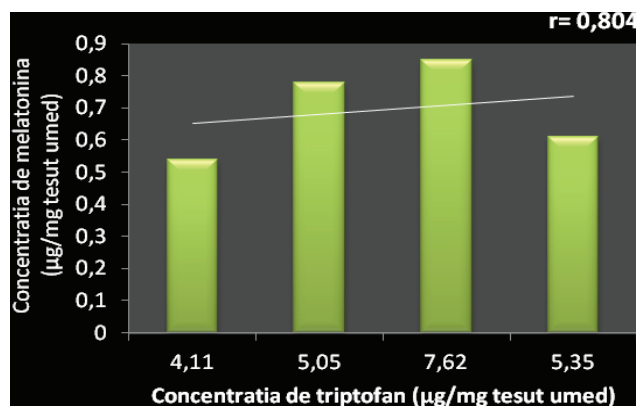


FIGURA 7. Corelația Pearson pentru concentrația neuronală de melatonină și concentrația serică de triptofan, pentru cele 4 loturi de animale studiate

CONCLUZII

Evaluarea concentrațiilor cerebrale de triptofan, serotonină și melatonină s-a realizat după administrarea unor medicamente active la nivel SNC: fluoxetină, risperidonă și litiu. Toate loturile de animale supuse studiului au înregistrat concentrații crescute de indoli comparativ cu lotul martor.

În cazul concentrației de serotonină, toți subiecții au manifestat o hiperfuncție serotoninergică, comparativ cu lotul martor. Cea mai importantă variație a nivelului de serotonină este înregistrată după administrarea fluoxetinei 150% efect (medicament ISRS). Litiul, deși nu este încadrat ca medicament cu acțiune specifică pe sistemul serotoninergic, manifestă un efect notabil de 75% față de lotul martor.

Conform rezultatelor obținute, valoarea triptofanului este puternic crescută după administrarea fluoxetinei (85,34%). Deși medicamentele administrate nu

manifestă acțiune directă la nivel melatoninergic, determinarea concentrației cerebrale a melatoninei a relevat valori crescute: de 57,40% la indivizii tratați cu fluoxetină și de 44% pentru cei tratați cu risperidonă.

Datele experimentale s-au corelat pozitiv și pentru concentrațiile de triptofan și melatonină (coeficient Pearson $r = 0,804$), precum și pentru triptofan și serotonină ($r = 0,901$), ceea ce demonstrează corelația indolergică a mecanismelor biochimice implicate în răspunsul terapeutic al medicamentelor implicate.

BIBLIOGRAFIE

1. Cross S., Kim S.J., Weiss L.A., Delahanty R.J., Sutcliffe J.S., Leventhal B.L. – Molecular genetics of the platelet serotonin system in first-degree relatives of patients with autism. *Neuropsychopharmacology* 2008; 33:353-60
2. Alwan S., Friedman J.M. – Safety of selective serotonin reuptake inhibitors in pregnancy. *CNS Drugs* 2009; 23:493-509
3. Alina Crenguța Nicolae, Niculina Mitrea, Andreea Letiția Arsene, Maria Zinaida Constantinescu, Vlad Vuță, Cristina Manuela Drăgoi – In vitro P-glycoprotein inhibition assay on N2a murine cell line, *Farmacia*, 2013, Vol. 61 (3), 481-491
4. Cristina Manuela Drăgoi, Niculina Mitrea, Andreea Letiția Arsene, Mihaela Ilie, Alina Crenguța Nicolae – Jurkat E6.1 cell line studies regarding the effects of some bio-indols on the membrane fluidity, *Farmacia*, 2012, Vol. 60(1), 13-20
5. Firk C.M.C. – Mood and cortisol responses following tryptophan-rich hydrolyzed protein and acute stress in healthy subjects with high and low cognitive reactivity to depression. *Clin Nutrition* 2009; 28:266-71
6. Gaspar Diana, Lúcio Marlene, Rocha Sandra, Costa Lima J.L.F., Reis Salette – Changes in PLA2 activity after interacting with anti-inflammatory drugs and model membranes: evidence for the involvement of tryptophan residues. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2011, 164, 4, 292-299
7. Henry W. Chase, Molly J. Crockett, Rachel M. Msetfi, Robin A. Murphy, Luke Clark, Barbara J. Sahakian, Trevor W. Robbins – 5-HT modulation by acute tryptophan depletion of human instrumental contingency judgements, *Psychopharmacology*, 2011, 213:615-623
8. Alina Crenguța Nicolae, Niculina Mitrea, Cristina Manuela Drăgoi, Maria Zinaida Constantinescu, Cristina Ciofrânceanu, Gheorghe Bărboi, Andreea Letiția Arsene – Murine studies regarding the variation of oxidative status in serum, hepatic and brain samples, after administration of some CNS active drugs, *Farmacia*, 2013, Vol 61 (4), 658-669
9. Omar S.H., Nabi S. – Melatonin, Receptors, Mechanism, and Uses. *Syst Rev Pharm*, 2010; 1:158-71
10. Cristina Manuela Drăgoi, Niculina Mitrea, Andreea Letiția Arsene, Alina Crenguța Nicolae, Mihaela Ilie – In vitro effects of some bio-indoles on the transmembrane potential of Jurkat E6.1 lymphoblasts, *Farmacia*, 2012, Vol.60(2), 240-248
11. Ortega-Gutiérrez, S., Fuentes-Broto, L., García, J.J., López-Vicente, M., Martínez-Ballarín, E., Miana-Mena, F.J., Millán-Plano, S., Reiter, R.J. – Melatonin reduces protein and lipid oxidative damage induced by homocysteine in rat brain homogenates. *J. Cell Biochem*. 2007, 102, 729-735