

Analiza modela metabolizma folata primjenom programskog paketa CellDesigner

Malešić, Elena

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:677606>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-07**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Elena Malešić

7002/N

**ANALIZA MODELA METABOLIZMA FOLATA PRIMJENOM
PROGRAMSKOG PAKETA CELLDISIGNER**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Modeliranje i optimiranje u nutricionizmu

Mentor: doc. dr. sc. *Ana Jurinjak Tušek*

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za procesno inženjerstvo
Laboratorij za mjerenje, regulaciju i automatizaciju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

Analiza modela metabolizma folata primjenom programskog paketa CellDesigner

Elena Malešić, 0058206216

Sažetak: Prehrana i način života imaju vrlo velik utjecaj na metaboličku homeostazu tj. na sve reakcijske procese koji se odvijaju unutar organizma i održavaju pojedinca zdravim. Nutrijenti su aktivne komponente koje se uključuju u metabolizam te u interakciji s drugim komponentama utječu na metaboličku stabilnost. Primjena metodologije matematičkog modeliranja koristan je i jednostavan alat u analiziranju bioloških procesa te omogućuje dobru podlogu za eksperimentalna istraživanja. U ovom radu provedena je analiza modela 1-ugljik metabolizma posredovanog folatom u programskom paketu CellDesigner. Ispitan je utjecaj različitih početnih koncentracija folata te smanjene aktivnosti enzima metionin sintaze na koncentraciju ostalih metabolita. Primjena računalnog programa CellDesigner pokazala se kao dobar temelj za predviđanje promjena metaboličkih koncentracija i brzina reakcija koje vežemo uz pojedina zdravstvena stanja izazvana vitaminskim deficitom.

Ključne riječi: *CellDesigner, homocistein, model metabolizma folata*

Rad sadrži: 29 stranica, 1 tablicu, 11 slika, 69 literaturnih navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek

Pomoć pri izradi: dr. sc. Tamara Jurina

Datum obrane: 19. rujna 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Nutrition**

**Department of Process Engineering
Laboratory for Measurement, Control and Automatisation**

**Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition**

Analysis of the folate metabolism model in the CellDesigner software package

Elena Malešić, 0058206216

Abstract: Diet and life style have significant influence on metabolic homeostasis ie. all reaction processes that take place within the organism and keep the individual healthy. Nutrients are active components that are involved in metabolism and, in the interactions with other components, consequently affect metabolic stability. Mathematical modelling methodology can be usefully and simply applied for analysis of biological processes and provides a good foundation for experimental research. In this paper, analysis of 1-carbon metabolism mediated by folate was carried out in the CellDesigner software package. The effect of different initial folate concentrations and the decreased activity of methionine synthase on the concentration of other metabolites within folate-mediated 1-carbon metabolism have been studied. The application of the CellDesigner software proved to be a good basis for predicting changes in metabolic concentrations and the reaction rate associated with the individual health status caused by the vitamin deficiency.

Keywords: *CellDesigner, folate metabolism, homocysteine*

Thesis contains: 29 pages, 1 table, 11 figures, 69 references, 1 supplement

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD. Ana Jurinjak Tušek, Assistant professor

Technical support and assistance: PhD. Tamara Jurina

Defence date: September 19th 2018

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Sistemska biologija	2
2.2. Personalizirana prehrana	2
2.3. Folat	3
2.3.1. Apsorpcija folata i njegov metabolizam	5
2.4. Folat i zdravlje	7
2.4.1. Defekti neuralne cijevi	7
2.5. Folat, B ₁₂ i homocistein	8
2.5.1. Homocistein – glavni uzročnik bolesti	8
3. MATERIJALI I METODE	10
3.1. Materijali	10
3.1.1. CellDesigner v.4.4	10
3.1.2. Model metabolizma folata	13
3.2. Metode	15
3.2.1. Simulacija modela metabolizma folata u programskom paketu CellDesigner ...	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	16
4.1. Prikaz modela metabolizma folata u programskom paketu CellDesigner	16
4.2. Simulacija modela metabolizma folata u programskom paketu CellDesigner	17
5. ZAKLJUČCI	22
6. LITERATURA	23
PRILOZI	

1. UVOD

Svi stanični procesi od ekspresije gena do sinteze proteina i razgradnje, mogu biti izmijenjeni pod utjecajem prehrambenih i životnih navika. Nutritivne i nenutritivne komponente hrane uključene su u metaboličke funkcije u stanici na vrlo složen način. Slično kao farmaceutici, nutrijenti su aktivne komponente koje su uključene u metaboličku mrežu i utječu na njezinu stabilnost (Subbiah, 2006). Međutim, još uvijek je ograničeno razumijevanje interakcija, regulacije i jačine djelovanja nutrijenata na metabolički put i funkciju što u krajnjem slučaju omogućuje predviđanja kvantitativnih i kvalitativnih odnosa između različitih zdravstvenih ishoda i pojedinih obrazaca unosa nutrijenata (Hood i sur., 2004; Van der Greef i sur., 2007). Složenost ovakvih studija dodatno je potkrijepljena prisutnošću raznih drugih nutrijenata s različitim kemijskim strukturama, afinitetima i specifičnostima prema ciljnim molekulama pa je cilj ovakve problematike raščlaniti istraživanja na manje i izvedivije izazove (Rist i sur., 2006; Stover, 2006). Analizom matematičkog modela metabolizma želi se pokazati kako se naša predviđanja mogu poklapati s eksperimentalno dobivenim podacima te dobiti detaljnije informacije o metaboličkim procesima.

Upravo zbog tih činjenica u novije se vrijeme pojavio znanstveni pristup personalizirane prehrane koji svakog pojedinca promatra kao zasebni sustav i sukladno tomu, svakom je pojedincu potreban drugačiji obrazac prehrane. Gotovo da ne postoje dva ista metabolizma s istim biokemijskim varijablama pa se smatra kako ovakav pristup može biti rješenje u globalnoj borbi protiv raznih kroničnih zdravstvenih stanja čija je pojavnost svakim danom sve veća.

Folat (vitamin B₉) je vrlo važan esencijalni nutrijent koji u našem organizmu ima brojne zadaće pa njegov nedostatak može poremetiti homeostazu metabolizma i uzrokovati mnoge zdravstvene posljedice. Deficit folata usko je povezan sa defektima neuralne cijevi kod novorođenčadi, kardiovaskularnim bolestima, anemijom i brojnim drugim poremećajima (Huang i sur., 2017). S obzirom na složenost samog metaboličkog ciklusa folata koji ulazi u brojne neposredne, ali i posredne interakcije s drugim komponentama metabolizma, ovakav sustav treba promatrati u cjelini. Razina folata indirektno utječe na razinu homocisteina, a povišena razina homocisteina se smatra jednim od glavnih pokretača koronarnih bolesti pa je stoga cilj ovog rada bio ispitati utjecaj različitih početnih koncentracija folata na metabolizam folata i koncentraciju homocisteina u programskom paketu CellDesigner.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Sistemska biologija

Sistemska biologija je alat moderne znanosti i sve se više očituje njena važnost u rješavanju brojnih izazova poput poboljšanja zdravlja, smanjenja pojave bolesti, iskorištenja izvora obnovljive energije, očuvanje ekološke stabilnosti i brojnih drugih (Price i Segal, 2018). Ona koristi matematičke modele za analizu velikih skupova podataka i simulaciju ponašanja nekog sustava.

Sistemska biologija je znanstveno područje s integriranim pristupom za proučavanje bioloških sustava na razini stanice, organa ili organizma te mjeri i integrira informacije genoma, proteomike i metabolizma (Panagiotou i Nelsen, 2009). Cilj primjene sistemske biologije je kvantitativno okarakterizirati genetički, transkripcijski, proteinski, metabolički i signalni odgovor s obzirom na pojedine promjene i stanja u organizmu, procijeniti razinu njihove međusobne interakcije te integrirati dobivene informacije u model prediktivne mreže na temelju koje će se postaviti hipoteza za objašnjenje razne problematike (Van Ommen i Stierum, 2002). U realizaciji ovakvog pristupa neizostavna je i bioinformatika, područje koje u kontekstu sistemske biologije prikuplja veliku količinu podataka i omogućuje uvid u biološke mehanizme koji podupiru eksperimentalna opažanja. Klasični bionformatički pristup započinje s mapiranjem eksperimentalnih rezultata na temelju biokemijskih puteva, od prije poznatih i opisanih u dosadašnjoj literaturi. Analiziraju se rezultati na razini biokemijskih reakcija, a opažanja se pokušavaju uklopiti u poznati reakcijski model. Zatim se dobivene informacije obrađuju empirijski i statistički, na temelju čega se onda stvara nova hipoteza o mehanističkom porijeklu danih zapažanja (Panagiotou i Nelsen, 2009).

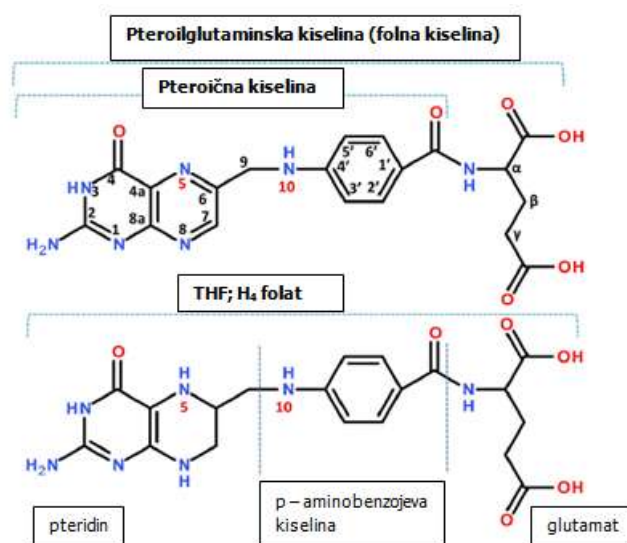
2.2. Personalizirana prehrana

Jedan od najvećih zdravstvenih izazova 21. stoljeća svakako je smanjenje broja smrtnosti uzrokovane nezaraznim bolestima (npr. kardiovaskularne bolesti, kronična opstruktivna bolest pluća, rak, dijabetes). U podlozi ovih zdravstvenih stanja često leži pretilost kao posljedica kombinacije sjedilačkog načina života i nepravilnog nutritivnog unosa koje dovodi do nestabilnosti u metaboličkoj homeostazi. Ta homeostaza pod utjecajem je mnogih parametara, uključujući genetičke i okolišne faktore koji uključuju životni stil tj. prehrambene navike, izloženost ksenobioticima, ali i sastav mikrobiote (Claus i Swann, 2013). Ti su faktori veoma povezani pa tako makroskopski gledano nutrijenti uneseni hranom ulaze u snažnu interakciju sa skupom probavnih enzima i mikrobiotom, dok je mikroskopski gledano

ekspresija gena strogo pod kontrolom signalnih i metaboličkih puteva koji mogu biti uvelike narušeni prisustvom ksenobiotika. Metabolička ravnoteža je stoga pod utjecajem brojnih komponenti od kojih presudnu ulogu ima prehrana (Claus, 2013). Nutritivni pristup u kojem jedna mjera odgovara svima nije učinkovit jer je metabolička varijabilnost među pojedincima veća od varijabilnosti izazvane prehranbenim intervencijama (Heinzmann i sur., 2012). Stoga, svaku osobu moramo promatrati kao metabolički jedinstven uzorak gdje svatko ima svoj "optimalni metabolički prostor", tj. skup reakcija koji rezultira metaboličkom homeostazom i održava pojedinca zdravim. Takav koncept personalizirane prehrane, gdje se pojedincu daju prehranbeni savjeti temeljeni na procjeni njihove metaboličke aktivnosti istaknuo se kao ključni alat u prevenciji nezaraznih bolesti (Stewart-Knox i sur., 2015). Procjena individualnog metaboličkog stanja zahtjeva sveobuhvatnu strategiju koja obuhvaća ukupni metabolički utjecaj okolišnih čimbenika gdje prehrana i crijevna mikrobiota imaju ključnu ulogu (Garcia – Canas i sur., 2012; Capozzi i Bordoni, 2013).

2.3. Folat

Folat (folacin ili vitamin B₉) predstavlja skupinu spojeva (vitamera) koji pripadaju porodici vitamina topljivih u vodi. Kolektivno, vitameri folata igraju važnu ulogu u 1-ugljik metabolizmu, a također sudjeluju i u biosintezi aminokiselina i nukleinskih kiselina što je ključno za replikaciju stanice i posredni metabolizam. Temeljnu kemijsku strukturu folata čini pteridinski prsten koji je putem metilenske grupe povezan s *p*-aminobenzojevom kiselinom na koju je vezana L-glutaminska kiselina (Lavoisier, 2008). Nedostatak folata u organizmu povezuje se s mnoštvom zdravstvenih stanja (Iyer i Tomar, 2009), među kojima su anemija i defekti neuralne cijevi. Animalne stanice imaju mogućnost pretvorbe različitih vitaminskih oblika, ali zato ne posjeduju mogućnost sintetiziranja izvorne molekule folata, pteroilglutaminske kiseline, što znači da se onda moramo osloniti na egzogene izvore ovog važnog nutrijenta (Molloy, 2005). Osim što se folat može unijeti namirnicama u kojima je prirodno prisutan, može se i sintetizirati pomoću mikroorganizama prisutnih u debelom crijevu. Za razliku od prirodnih izvora folata, poliglutamata, postoji i sintetizirani kristalini oblik, monoglutamat folna kiselina koja se nalazi u dodacima prehrani i kojom se danas vrlo često obogaćuju prehranbeni proizvodi zbog svoje veće komercijalne dostupnosti. Takav oblik folata je potpuno oksidiran (pteridinski prsten je oksidiran) i najstabilniji je, no zbog nedostatka koenzimske aktivnosti folna kiselina se u stanici mora metabolizirati do aktivnog tetrahidrofolata (THF) (Wien i sur., 2012).



Slika 1. Kemijska struktura folne kiseline i tetrahidrofolata (monoglutamatni oblik) (Saini i sur., (2016))

U usporedbi s folnom kiselinom, prirodno prisutni spojevi folata iz hrane su reducirani i pojavljuju se u obliku dihidro- ili tetrahidrofolata s različitim C1 supstituentom na poziciji N5 ili N10, po čemu je i cijeli metabolizam dobio naziv (Lavoisier, 2008), a strukturni prikaz dan je na slici 1. Folna kiselina se pokazala vrlo učinkovitom u rješavanju sveopćih javno zdravstvenih problema, uključujući i smanjenu incidenciju pojave defekata neuralne cijevi kod novorođenčadi, no ipak postoji zabrinutost da se zbog pretjeranog obogaćivanja ljudske prehrane mogu povećati rizici od nastanka nekih bolesti poput raka debelog crijeva ili maskiranja deficita vitamina B₁₂ (Kim, 2004). Povećani rizik od nastanka bolesti pretjeranom konzumacijom, vezuje se samo uz sintetizirani oblik folata, tj. folnu kiselinu (Naderi i House, 2018). I folat i folna kiselina moraju se metabolizmom pretvoriti do 5-metiltetrahidrofolata (5-mTHF) koji čini dominantni oblik folata, najčešće pronađen u krvnoj plazmi (Wien i sur., 2012).

Postoji nekoliko čimbenika koji utječu na biodostupnost i bioučinkovitost folata, a oni uključuju:

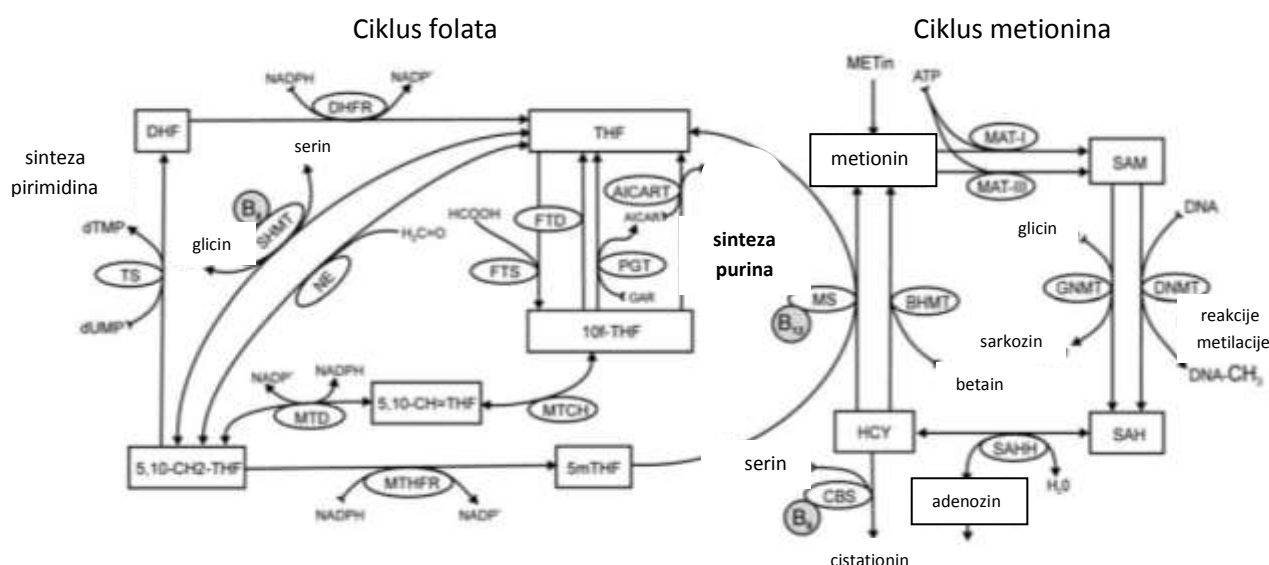
- vrstu folata,
- količinu konzumiranog folata ili folne kiseline,
- prisutost drugih nutrijenata u hrani,
- sveukupni nutritivni status domaćina,
- genetički faktori,

f) faktori povezani sa samim domaćinom (dob, spol, status folata, zdravstveno stanje, gastrointestinalna funkcija, korištenje lijekova i alkohola) (Gregory, 2001; Melse-Boonstra i sur., 2002; Witthöft, 2011).

Procesiranje namirnica također može utjecati na biodostupnost folata iz hrane time što dolazi do oksidacije, mijenja se matriks hrane i stabilnost folata što može dovesti do gubitaka prije samog unosa, a odgovorni čimbenici kod takvih procesa su kisik, svjetlost i temperatura (McKillop i sur., 2003). Stoga, prilikom laboratorijskih analizi folata, ispitivana otopina mora uvijek biti zaštićena od svjetla zatamnjениm staklom ili pokrivena aluminijskom folijom (Indrawati i sur., 2004). Teško je kvantitativno odrediti bioraspoloživost folata iz pojedine namirnice, ali generalno gledano, čini se da folat iz hrane životinjskog porijekla ima veći stupanj apsorpcije od onog iz hrane biljnog porijekla (McKillop i sur., 2003). House i sur. (2003) su proveli istraživanja na glodavcima te su mjereći homocistein i glicin u plazmi (pokazatelji statusa folata) zaključili da folat u obliku 5-mTHF monoglutamata (dobiven hidrolizom poliglutamata) iz kokošnjeg jaja ima jednaku ili neznatno veću biodostupnost od kristalinične folne kiseline.

2.3.1. *Apsorpcija folata i njegov metabolizam*

Nakon konzumacije prirodnih folata – poliglutamata i sintetičkih monoglutamata, proces apsorpcije odvija se u crijevu. Dok folna kiselina može biti direktno apsorbirana, poliglutamatni oblici se najprije moraju pretvoriti do svojih monoglutamatnih oblika, a u ljudskom probavnom traktu ta se reakcija odvija pomoću enzima glutamat karboksipeptidaze II, smještene na četkastoj površini enterocita u tankom crijevu (Visentin i sur., 2014). Nakon transporta unutar enterocita, monoglutamati se reduciraju do di- i tetrahidrofolata (THF) putem enzima reduktaze, a nakon toga se THF konvertira u 5,10 – metilentetrahidrofolat ($5,10 - \text{CH}_2 - \text{THF}$) i 5 – metiltetrahidrofolat (5mTHF). Od tuda se ovi metaboliti prenose portalnom venom do jetre i krvne cirkulacije, kao i do okolnih tkiva (Czeizel i sur., 2011; Visentin i sur., 2014). Glavna funkcija folata u ljudskom tijelu je prijenos 1-C skupina, kao što su metilna i formilna grupa. Enzim 5,10 –metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR) odgovorna je za pretvorbu THF-a do 5-mTHF putem 5,10 – metilentetrahidrofolata. 5 – mTHF je donor metilne skupine potrebne u reakciji remetilacije homocisteina do metionina djelovanjem enzima metionin sintaza (MS). Metionin koji spada pod esencijalne aminokiseline pretvorit će se do S–adenozilmetionina koji je također vrlo važan unutarstanični donor metilne grupe (Fox i Stover, 2008). Shema cijelog metaboličkog procesa prikazana je na slici 2.



Slika 2. Reakcijska shema folatom posredovanog 1-ugljik metabolizma. Supstrati su prikazani u pravokutnim, enzimi u elipsoidnim okvirima, a vitaminski kofaktori su prikazani u osjenčanim krugovima (Reed i sur., 2006) Objašnjenje kratica: 5mTHF, 5-metiltetrahidrofolat; 10fTHF, 10-formiltetrahidrofolat; AICAR(T), aminoimidazolkarboksamid ribonukleotid (transferaza); BET, betain; BHMT, betain-homocistein metiltransferaza; CBS, cistationin β -sintaza; 5,10-CH₂-THF, 5,10-metilentetrahidrofolat; 5,10-CH-THF, 5,10-meteniltetrahidrofolat; DHF, dihidrofolat; DHFR, dihidrofolat reduktaza; DNMT, DNA-metiltransferaza; dTMP, deoksitimidin monofosfat; dUMP, deoksiuridin monofosfat; FTD, 10-formiltetrahidrofolat dehidrogenaza; FTS, 10-formiltetrahidrofolat sintaza; GAR, glicinamid ribonukleotid; GLY, glicin; GNMT, glicin N-metiltransferaza; H₂CO, formaldehid; HCOOH, metanska kiselina; HCY, homocistein; K_i , konstanta inhibicije; K_m , Michaelis-Menten konstanta; MAT, metionin adenzil transferaza; Met, metionin; MS, metionin sintaza; MTCH, 5,10-metilentetrahidrofolat ciklohidrolaza; MTD, 5,10-metilentetrahidrofolat dehidrogenaza; MTHFR, 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaza; NADPH, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat; PGT, fosforibozil glicinamid transformilaza; SAH, S-adenozilhomocistein; SAHH, S-adenozilhomocistein hidrolaza; SAM, S-adenozilmetionin; SER, serin; SHMT, serin hidroksimetiltransferaza; THF, tetrahidrofolat; TS, timidilat sintaza (Reed i sur., 2006).

Folat ima ključnu ulogu u 1-ugljik metabolizmu, biokemijskim reakcijama koje su povezane s metabolizmom aminokiselina, sintezom nukleotida i brojnim reakcijama metiltransferaze, uključujući DNA metilaciju koja je ključna kod stanične replikacije i pohrane DNA. Folat i drugi nutrijenti uključeni u folatom posredovan 1-ugljik metabolizam sudjeluju u etiologiji

defekata neuralne cijevi (Mitchell, 2005) kolorektalnih i drugih tipova raka (Giovannucci, 2002; Rampersaud i sur., 2002; Little i sur., 2003; Robien i Ulrich, 2003; Ulrich, 2005) te kardiovaskularnih bolesti (Moat i sur. 2004; Stover, 2004; Lewis i sur., 2005). Čak je i kemoterapijskim sredstvima pri liječenju raka cilj djelovanja spomenuti metabolizam. Matematičko modeliranje je posebno koristan pristup u istraživanjima složenih nelinearnih bioloških sustava kao i individualnih komponenata 1-ugljik metabolizma posredovanog folatom (Nijhout i sur., 2004; Reed i sur., 2004; Prudova i sur., 2005).

2.4. Folat i zdravlje

Pored značajne uloge folata u normalnom metabolizmu, njegov status se veže i za razvoj kroničnih bolesti među kojima su kardiovaskularne bolesti kao i bolesti reproduktivnog sustava (Peng i sur., 2016). Nizak unos folata povezan je s nastankom megaloblastične anemije koja može dovesti do većeg rizika od nastanka defekata neuralne cijevi kod novorođenčadi i drugih porođajnih defekata (Iyer i Tomar, 2009). Deficit folata mnogo je češći u populacijama koje imaju visoki unos prerađenih žitarica te nizak unos zelenog lisnatog povrća i voća. Drugi rizični čimbenik za deficit folata je malapsorpcija folne kiseline koja može biti uzrokovana raznim poremećajima koji remete pH crijeva ili sastav jejunalne mukoze kao i genetički defekti. Razina serumskog folata je indikator neposrednog prehrambenog unosa folata, a ujedno i najšire korištena analitička metoda za procjenu statusa folata (Pfeiffer i sur., 2005). Glavni prehrambeni izvori folata su zeleno lisnato povrće, mahunarke, jetra, jaja i obogaćeni žitni proizvodi, pa je uz suplementaciju folnom kiselinom to najbolji način za zadovoljenje nutritivnih potreba za folatom. Povrće i mahunarke se smatraju bogatim izvorom folata u kojima ima 200 – 600 µg na 100 g povrća i mahunarki, citrusno voće dobrim izvorom s količinom od 50 - 100 µg folata na 100 g citrusnog voća, dok jaja također imaju visok udio folata s otprilike 90 µg na 100 g jaja.

2.4.1. Defekti neuralne cijevi

Tijekom fetalnog razvoja čovjeka, neuralna cijev se zatvara do 3. tjedna nakon začeća. Defekti neuralne cijevi (Spina bifida, encefalokela, anencefalija) predstavljaju veliku grupu porođajnih defekata do kojih nastaje nepotpunim zatvaranjem neuralne cijevi (Czeizel i Dudas, 1992). Prijašnja istraživanja pokazala su da je prehrana i postporođajna krv žena koje su rodile novorođenčad s dijagnosticiranim defektom neuralne cijevi bila manjkava nekočinom mikronutrijenta, posebice folnom kiselinom (Huang i sur., 2017). Novija istraživanja pokazuju da suplementiranje s 400 µg folne kiseline dnevno predstavlja 50 %-

tnu prevenciju kod žena koje su već rodile novorođenčad s defektima neuralne cijevi te 70 %-tnu prevenciju kod opće populacije (Berry i Li, 2002; Czeizel i sur., 2011).

2.5. Folat, B₁₂ i homocistein

S prehrambenom politikom obaveznog obogaćivanja žitnih proizvoda folnom kiselinom, u Sjedinjenim Američkim Državama, incidencija defekata neuralne cijevi je smanjena (Mills i Signore, 2004), popravio se status folata i homocisteina u ukupnoj populaciji (Pfeiffer i sur., 2005) te se smanjila incidencija moždanih i srčanih udara (Yang i sur., 2006). Kofaktori folata imaju presudnu ulogu kod sinteze DNA i metilacijskog ciklusa. Konverzijom 5,10 – metilentetrahidrofolata u tetrahidrofolat u ciklusu folata osigurava se metilna skupina potrebna za pretvorbu homocisteina u metionin. Nadalje, kobalamin (vitamin B₁₂) se ponaša kao kofaktor enzima metionin sintaze (MS) koja katalizira upravo tu reakciju nastajanja metionina, pa u slučaju niske koncentracije kobalamina u stanici, folat koji je predodređen za sintezu DNA ostaje zarobljen i usporava se sinteza DNA, dok istovremeno raste koncentracija homocisteina (Reed i sur., 2006).

2.5.1. Homocistein – glavni uzročnik bolesti

Visoka razina homocisteina u organizmu povećava rizik od kardiovaskularnih bolesti i štetnih posljedica trudnoće (Varela–Moreiras i sur., 2009). Procijenjeno je da se porastom od $c_{\text{homocistein}} = 5 \mu\text{mol L}^{-1}$ povećava rizik od kardiovaskularnih bolesti za čak 40 % što se može usporediti s učinkom lipidnih rizičnih faktora, kao što su ukupni i LDL (engl. *Low Density Lipoprotein*, lipoprotein male gustoće) kolesterol (Boushey i sur., 1995). Povišena razina homocisteina češća je kod populacije starije dobi, muškog spola te je usko povezana s koncentracijama kreatinina u krvi (Blom, 1998; Jacques i sur., 2001). Osim toga, na razinu homocisteina utječe stil života kao i prehrambene navike (Nygard i sur., 1998; Varela–Moreiras, 2001) što je uzrok kod većine populacije s povišenom razinom homocisteina u plazmi (Selhub i sur., 1999). Folat i vitamin B₁₂ imaju presudnu ulogu kod snižavanja razine homocisteina u krvi jer služe kao kofaktori u njegovom metaboličkom procesu pa je vitaminska suplementacija jedna od mogućih terapija (Chait i sur. 1999; Garcia i sur., 2002). Huerta i sur. (2004) istaknuli su značaj sinergijskog utjecaja vitamina B₁₂ i folata kod starijih ispitanika bez vitaminske suplementacije. Prosječna razina homocisteina među njihovim ispitanicima iznosila je $c_{\text{homocistein}} = 13,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ što je bilo više u usporedbi s ostalim studijama (Selhub i sur., 1993; Rasmussen i sur., 2000), a razlog tomu je bio manji unos

folata procijenjen upitnikom o učestalosti konzumiranja hrane i pića. Zanimljiva je činjenica da nije pronađena pozitivna korelacija između prehrambenog unosa i serumske koncentracije folata i vitamina B₁₂ što se može objasniti brojnim homeostatskim procesima koji reguliraju njihovu apsorpciju, transport i skladištenje koje ovisi o fiziološkim potrebama i prehrambenom unosu pojedinog organizma (Riboli i sur., 1987). Stoga se ne bi trebao očekivati linearan odziv između količine vitamina unesene hranom i njene količine u plazmi. Unos proteina, alkohola i kofeina također može biti jedan od prehrambenih faktora koji utječu na koncentraciju homocisteina (Stolzenberg-Solomon i sur., 1999; Jacques i sur., 2001).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Od materijala u ovom radu korišten je računalni program CellDesigner verzija 4.4. te program MS Excel 2016.

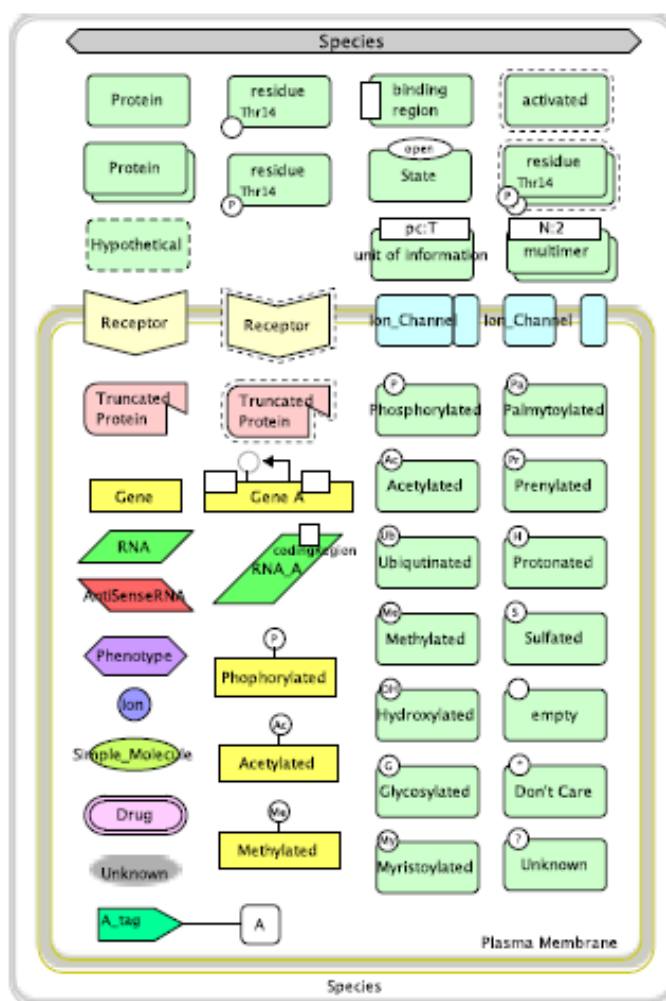
3.1.1. CellDesigner v.4.4.

Sistemska biologiju opisuje sinergistička integracija teorije, računalnog programiranja i eksperimenta (Kitano, 2002) zbog čega je bilo nužno razviti softver koji će realizirati ovakav znanstveni pristup. CellDesigner je računalni program koji služeći se procesnim dijagramom daje prikaz gensko–regulatornih i biokemijskih mreža. Uctane mreže dane su u obliku grafičkog prikaza i pohranjene pomoću SBML-a (engl. *Systems Biology Markup Language*); formata koji predstavlja modele biokemijskih i gensko – regulatornih mreža. Takvim uctanim grafičkim mrežama moguće je provesti simulaciju, kao i druge analize putem SBW-a (engl. *Systems Biology Workbench*). Glavne karakteristike programa uključuju:

- (1) lako razumljiv grafički prikaz, kompatibilan s SBGN (engl. *Systeme Biology Graphical Notation*),
- (2) podržavanje SBML oblik datoteke,
- (3) ugrađen simulator (SBML ODE Solver, Compasi),
- (4) integriranost s analitičkim alatima i simulatorima putem SBW 2.x,
- (5) dobra povezanost s bazama podataka,
- (6) "intuitivno" korisničko sučelje,
- (7) detaljan opis Odjeljaka, Vrsta, Reakcija i Proteina,
- (8) eksport slika u PNG, SVG, JPG i PDF formatima,
- (9) korištenje blok dijagrama (proto – tip) i
- (10) ugrađen razvojni okvir (Anonymous, 2018).

Prednosti CellDesignera pred drugim programskim alatima ovakve vrste su:

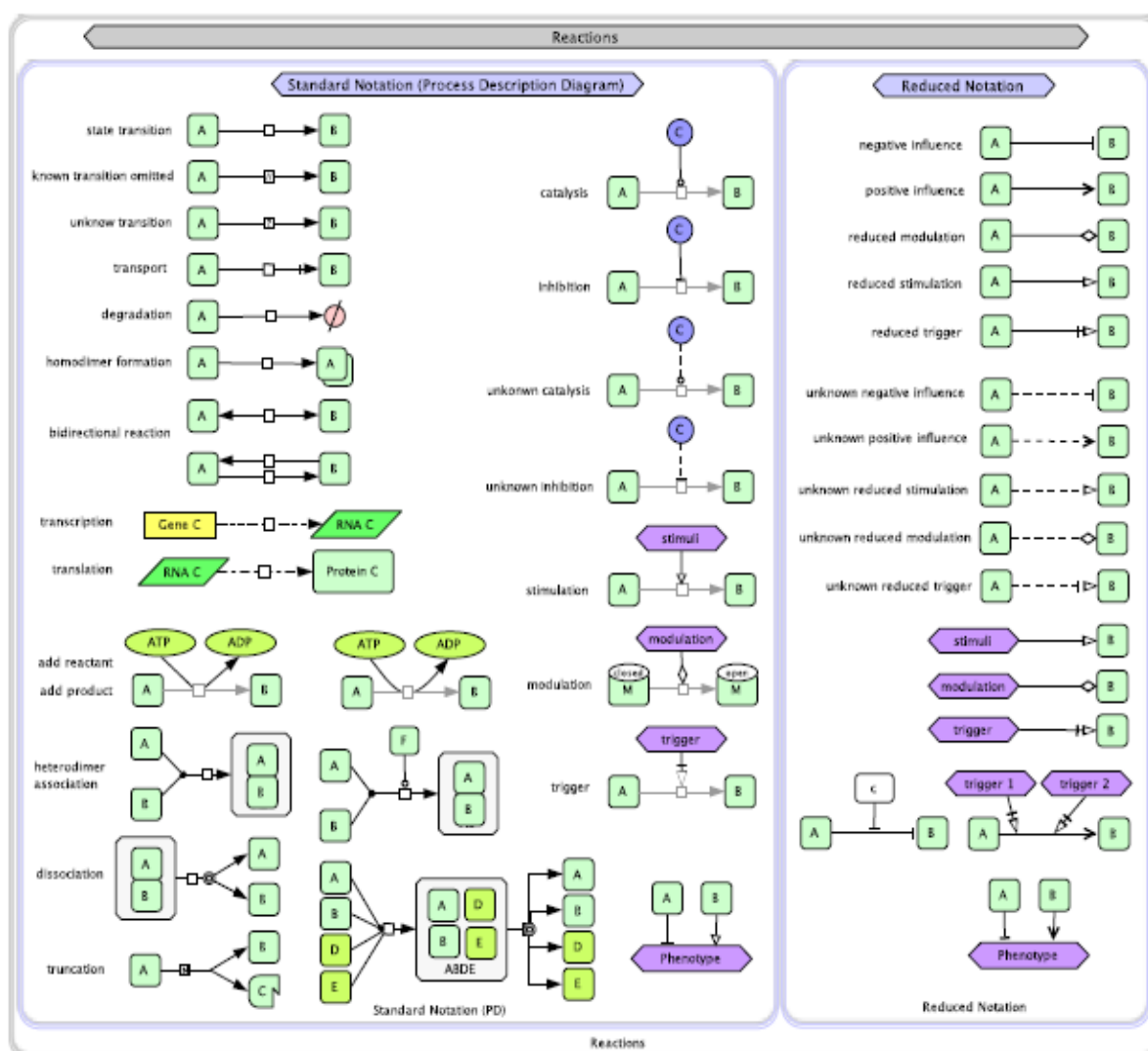
- (1) temeljen je na standardnoj tehnologiji (kompatibilan sa SBML i SBW),
- (2) koristi izražajan i nedvosmislen sustav grafičkog prikaza i
- (3) podržavaju ga mnogi operacijski sustavi (Windows, MacOS X, Linux itd.)



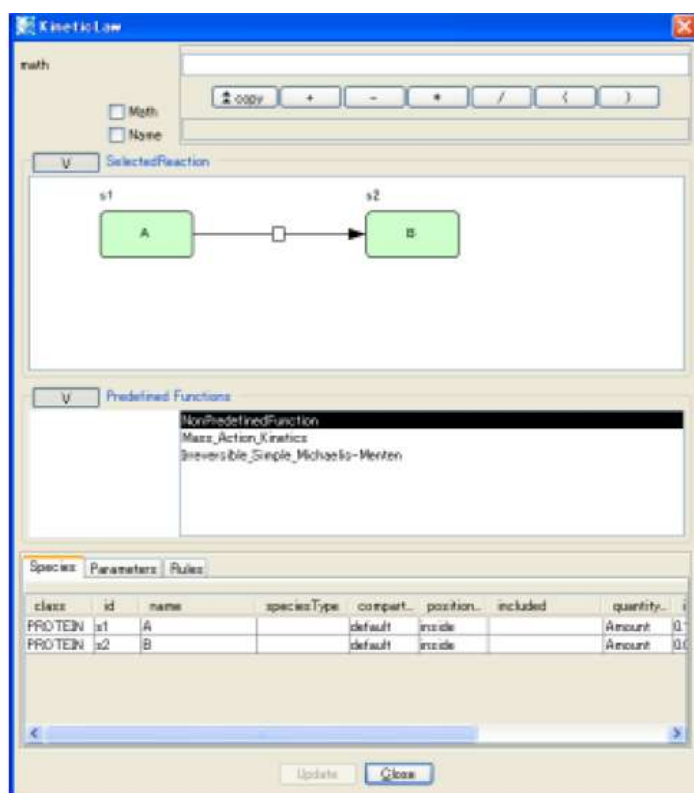
Slika 3. Simboli za vrste molekula u CellDesigner programu (Anonymous, 2018)

Razvijanje modela u CellDesigneru je jednostavno i započinje odabirom [File]→[New] čime se otvara prozor u koji se upiše naziv dokumenta i odabere veličina radnog prozora. Zatim se mogu izabrati odgovarajuće vrste molekula poput proteina, gena, RNA, iona, jednostavnih molekula itd. (slika 3) smještenih unutar alatne trake te im dodijeliti željeni naziv, veličinu i poziciju. Nakon odabira odgovarajućih molekula one se spajaju strelicama koje se također nalaze unutar alatne trake i predstavljaju određeni tip reakcije (kataliza, inhibicija, aktivacija itd.) koje su vidljive na slici 4. (Funahashi i sur., 2003). Na taj se način može izgraditi kompleksna mreža s različitim vrstama interakcija. Kako bi se ovakav model mogao usporediti sa stvarnim biološkim sustavom, CellDesigner nudi mogućnost unosa reakcijske kinetike koja se dodaje desnim klikom pokazivača miša na reakciju [Edit Kinetic Law], čime se otvara novi prozor u koji se upisuju jednačdba i kinetički parametri (slika 5). Početne koncentracije molekula upisuju se prije pokretanja simulacije odabirom [Simulations]→[Control Panel].

Dobiveni modeli se pohranjuju u obliku SBML dokumenta koji sadrži sve potrebne informacije o vrsti molekula, reakcijama, modifikatorima, geometrijskom položaju u dokumentu, kinetici reakcija i dr. (Anonymous, 2018).



Slika 4. Simboli za reakcije u CellDesigner programu (Anonymous, 2018)



Slika 5. Grafički prikaz prozora za unos kinetičkog izraza (Anonymous, 2018)

3.1.2. Model metabolizma folata

U ovom radu analiziran je matematički model folatom (Reed i sur., 2004) posredovanog 1-ugljik metabolizma koji se odvija u staničnom citosolu, a temelji se na informacijama folat – enzimске kinetike i regulatornih mehanizama koji predviđaju utjecaj genetičke i nutritivne varijacije. Model uključuje 19 biokemijskih reakcija, 10 metabolita i 60 kinetičkih parametara. U tablici 1 dan je popis biokemijskih reakcija opisanih korištenim matematičkim modelom za brzinu reakcija 1-ugljik metabolizma posredovanim folatom.

Tablica 1. Popis reakcija 1-ugljik metabolizma posredovanim folatom (Reed i sur., 2006)

V	REAKCIJA	ENZIM
V1	$\text{THF} + \text{Serin} \leftrightarrow 5,10 - \text{CH}_2 - \text{THF} + \text{Glicin}$	Serin hidroksimetil transferaza (SHMT)
V2	$5,10 - \text{CH}_2 - \text{THF} + \text{dUMP} \rightarrow \text{DHF} + \text{dTTP}$	Timidilat sintaza (TS)
V3	$\text{DHF} + \text{NADPH} \rightarrow \text{THF} + \text{NADP}^+$	Dihidrofolat reduktaza (DHFR)
V4	$\text{THF} + \text{HCOOH} \rightarrow 10\text{f} - \text{THF}$	10 – formiltetrahidrofolat sintaza (FTS)
V5	$\text{THF} + \text{CH}_2\text{O} \leftrightarrow 5,10 - \text{CH}_2 - \text{THF}$	/
V6	$5,10 - \text{CH}_2 - \text{THF} + \text{NADP}^+ \leftrightarrow$ $5,10 - \text{CH} = \text{THF} + \text{NADPH}$	5,10 – metilentetrahidrofolat dehidrogenaza (MTD)
V7	$5,10 - \text{CH} = \text{THF} \leftrightarrow 10\text{f} - \text{THF}$	5,10 – metilentetrahidrofolat ciklohidrolaza (MTCH)
V8	$10\text{f} - \text{THF} \rightarrow \text{THF}$	10 – formil tetrahidrofolat dehidrogenaza (FTD)
V9	$10\text{f} - \text{THF} + \text{GAR} \rightarrow \text{THF} + \text{AICAR}$	Fosforibozil glicinamid transformilaza (PGT)
V10	$10\text{f} - \text{THF} + \text{AICAR} \rightarrow \text{THF}$	Aminoimidazol karboksamid ribonukleotid transferaza (AICART)
V11	$5,10 - \text{CH}_2 - \text{THF} + \text{NADPH} \rightarrow 5\text{mTHF} +$ NADP^+	5,10 – metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR)
V12	$\text{Homocistein} + 5\text{mTHF} \rightarrow \text{Metionin} + \text{THF}$	Metionin sintaza (MS)
V13	$\text{Homocistein} + \text{Betain} \rightarrow \text{Metionin}$	Betain homocistein metiltransferaza (BHMT)
V14	$\text{Metionin} + \text{ATP} \rightarrow \text{SAM}$	Metionin adenozil transferaza I

		(MAT - I)
V15	Metionin + ATP $\rightarrow$ SAM	Metionin adenzil transferaza III (MAT - III)
V16	SAM + DNA $\rightarrow$ SAH + DNA – CH ₃	DNA – metiltransferaza (DNMT)
V17	SAM + Glicin $\rightarrow$ SAH + Sarkozin	Glicin N – metil transferaza (GNMT)
V18	SAH + H ₂ O $\leftrightarrow$ Homocistein + Adenozin	S – adenzilhomocistein hidrolaza (SAHH)
V19	Homocistein + Serin $\rightarrow$ Cistation	Cistation β – sintaza (CBS)

3.2. Metode

3.2.1. *Simulacija modela metabolizma folata u programskom paketu CellDesigner*

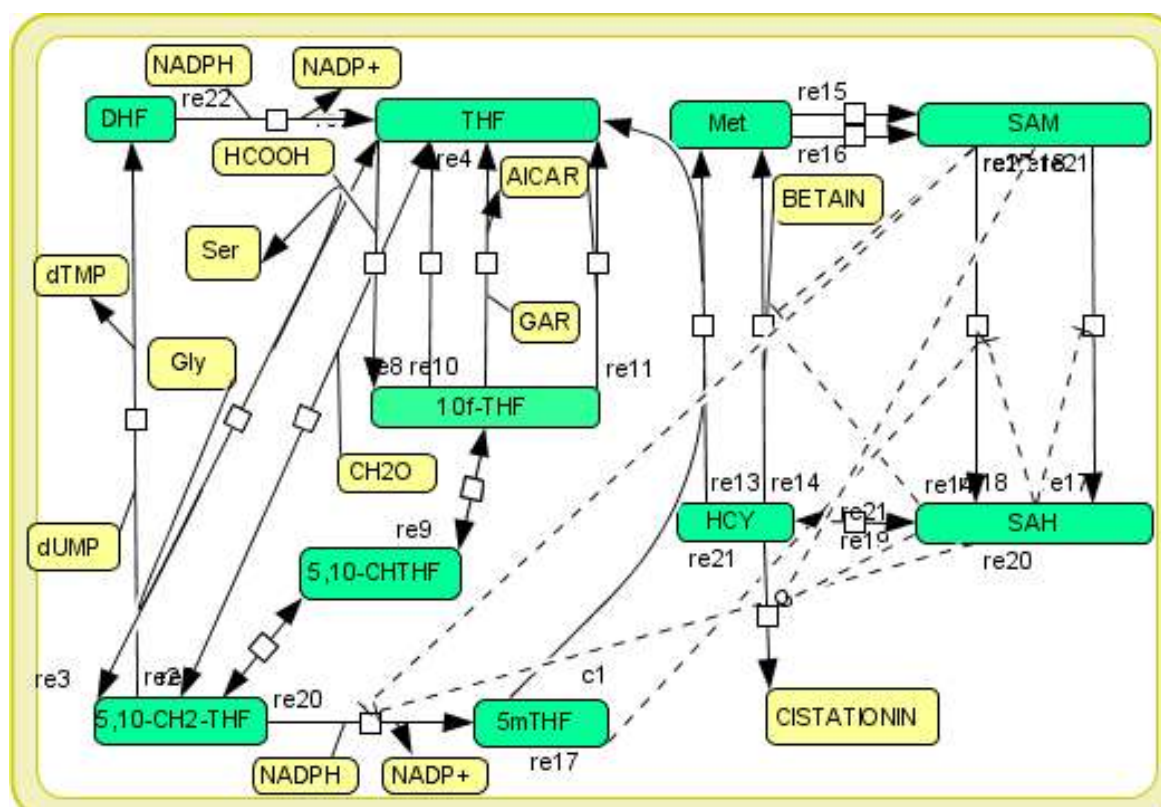
Provedene su simulacije modela 1-ugljik metabolizma posredovanog folatom konstruiranog u programskom paketu CellDesigner. Prilikom eksperimenta, kao ulazni parametar mijenjala se početna koncentracija folata u stanici ($c_{0,FOLAT} = 3, 30 \text{ i } 60 \text{ nmol L}^{-1}$), a zatim se računala promjena koncentracija njegovih ostalih metabolita. Prema literaturi (Reed i sur., 2006) početna koncentracija folata predstavlja fluks folata koji obuhvaća koncentracije THF, SAM i 5mTHF. Ispitan je također utjecaj smanjenja maksimalne brzine reakcije (za 10 %) ključnog enzima metabolizma folata, metionin sintaze na koncentraciju tetrahidrofolata i metionina. Vrijednosti dobivene računalnom simulacijom u CellDesigneru grafički su prikazane pomoću Microsoft Excell 2016 programa.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Prikaz modela metabolizma folata u programskom paketu CellDesigner

U ovom radu prikazan je model 1-ugljik metabolizma posredovanog folatom u staničnom citosolu pomoću programskog paketa CellDesigner v.4.4. Model se sastoji od 19 biokemijskih reakcija koje opisuju promjenu koncentracije metabolita folata tijekom vremena. Popis reakcija prikazan je u tablici 1 dok je popis svih korištenih kinetičkih izraza dan u priložima.

Na slici 6. nalazi se prikaz modela 1-ugljik metabolizma posredovanog folatom u staničnom citosolu izrađenom u računalnom programu CellDesigner.



Slika 6. Prikaz modela 1-ugljik metabolizma posredovanog folatom izrađenog u računalnom programu CellDesigner

4.2. Simulacija modela metabolizma folata u programskom paketu CellDesigner

U ovome istraživanju korišten je računalni program CellDesigner za analizu metabolizma folata koji je posrednik u mnogim drugim ključnim metaboličkim procesima poput sinteze nukleotida, metilacije DNA i njene replikacije, metabolizmu aminokiselina itd. Razina folata usko je povezana s drugim komponentama metabolizma, čija se koncentracija mijenja ovisno o količini folata u stanici te metaboličkoj aktivnosti odgovornih enzima. Također, složenost ovog metabolizma očituje se u prisutnosti alosteričke inhibicije i aktivacije te međusobno isprepletene interakcije dvaju ciklusa (folata i metionina). Naime, mnogi supstrati unutar ova dva ciklusa imaju ulogu inhibitora njihovih metaboličkih enzima unatoč tomu što ne sudjeluju direktno u nekoj kemijskoj reakciji pa zbog toga brzine reakcija i koncentracije supstrata nisu direktno proporcionalne staničnoj koncentraciji folata.

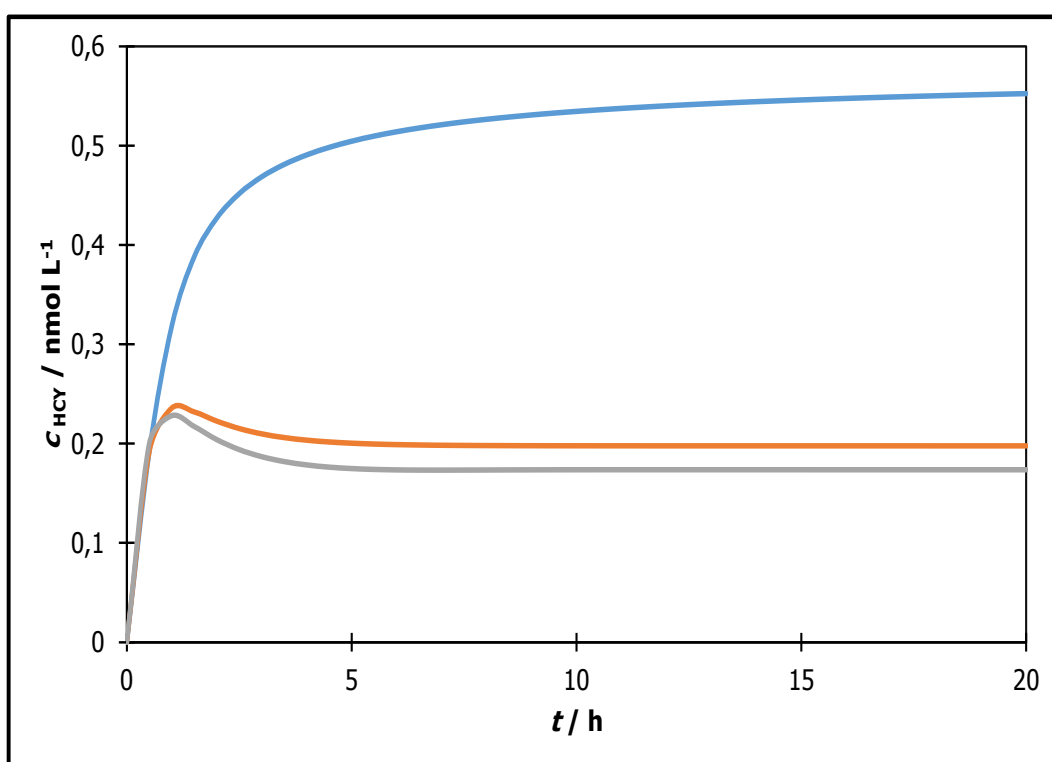
Ispitan je utjecaj različitih početnih koncentracija folata ($c_{0,FOLAT} = 3, 30$ i 60 nmol L^{-1}) na koncentraciju homocisteina, tetrahidrofolata i 5-metiltetrahidrofolata nastalih u metabolizmu folata. Iako je razina serumskog folata varijabilna s obzirom na prehrambeni unos, referentni interval serumskog folata iznosi $c_{0,FOLAT} = 11\text{--}57 \text{ nmol L}^{-1}$ (Pagana i Pagana, 2013) pa su uzete vrijednosti početnih koncentracija folata $c_{0,FOLAT} = 3 \text{ nmol L}^{-1}$ u slučaju ekstremnog deficita folata, $c_{0,FOLAT} = 30 \text{ nmol L}^{-1}$ u slučaju normalne razine folata te $c_{0,FOLAT} = 60 \text{ nmol L}^{-1}$ što odgovara vrijednosti folata u serumu nešto većoj od preporučene.

Na slici 7 nalazi se prikaz promjene koncentracije homocisteina s obzirom na tri različite početne vrijednosti folata. U prvom slučaju ($c_{0,FOLAT} = 3 \text{ nmol L}^{-1}$) koncentracija homocisteina raste do otprilike $c_{HCY} = 0,55 \text{ nmol L}^{-1}$ te nakon vremenskog perioda od $t = 20 \text{ h}$ njegova koncentracija i dalje raste. U drugom ($c_{0,FOLAT} = 30 \text{ nmol L}^{-1}$) i trećem ($c_{0,FOLAT} = 60 \text{ nmol L}^{-1}$) slučaju razina homocisteina dostiže najvišu vrijednost nakon sat vremena nakon čega se smanjuje i dostiže konstantnu vrijednost od $c_{HCY} = 0,198 \text{ nmol L}^{-1}$ i $c_{HCY} = 0,174 \text{ nmol L}^{-1}$.

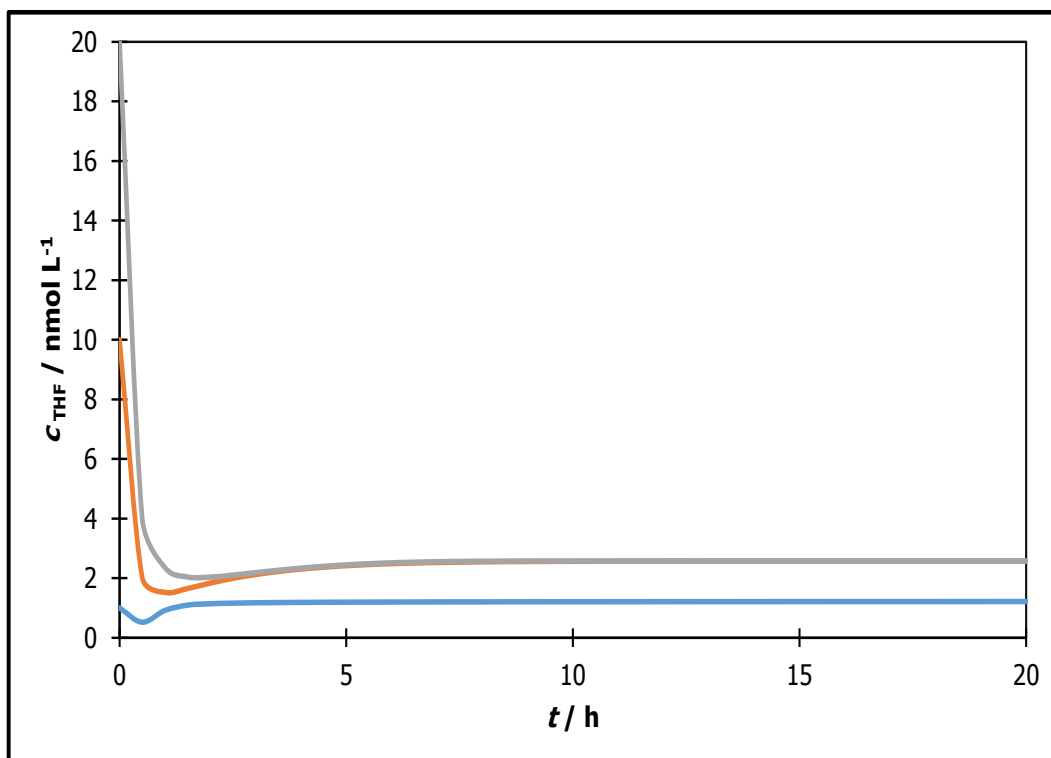
Na slici 8 nalazi se prikaz promjene koncentracije tetrahidrofolata s obzirom na tri različite početne vrijednosti folata. U prvom slučaju ($c_{0,FOLAT} = 3 \text{ nmol L}^{-1}$) koncentracija tetrahidrofolata raste do otprilike $c_{THF} = 1,2 \text{ nmol L}^{-1}$, dok u drugom ($c_{0,FOLAT} = 30 \text{ nmol L}^{-1}$) i trećem ($c_{0,FOLAT} = 60 \text{ nmol L}^{-1}$) slučaju razina tetrahidrofolata dostiže otprilike jednaku vrijednost od $2,6 \text{ nmol L}^{-1}$ pa možemo zaključiti da pri višim početnim koncentracijama folata razina tetrahidrofolata nije ovisna o folatu. Na ovom primjeru možemo vidjeti utjecaj enzimske inhibicije unutar metabolizma do koje dolazi kada su razine folata u stanici

previsoke. Tada se smanjuje brzina enzimske reakcije, čime se opet postiže stanična ravnoteža metaboličkih koncentracija.

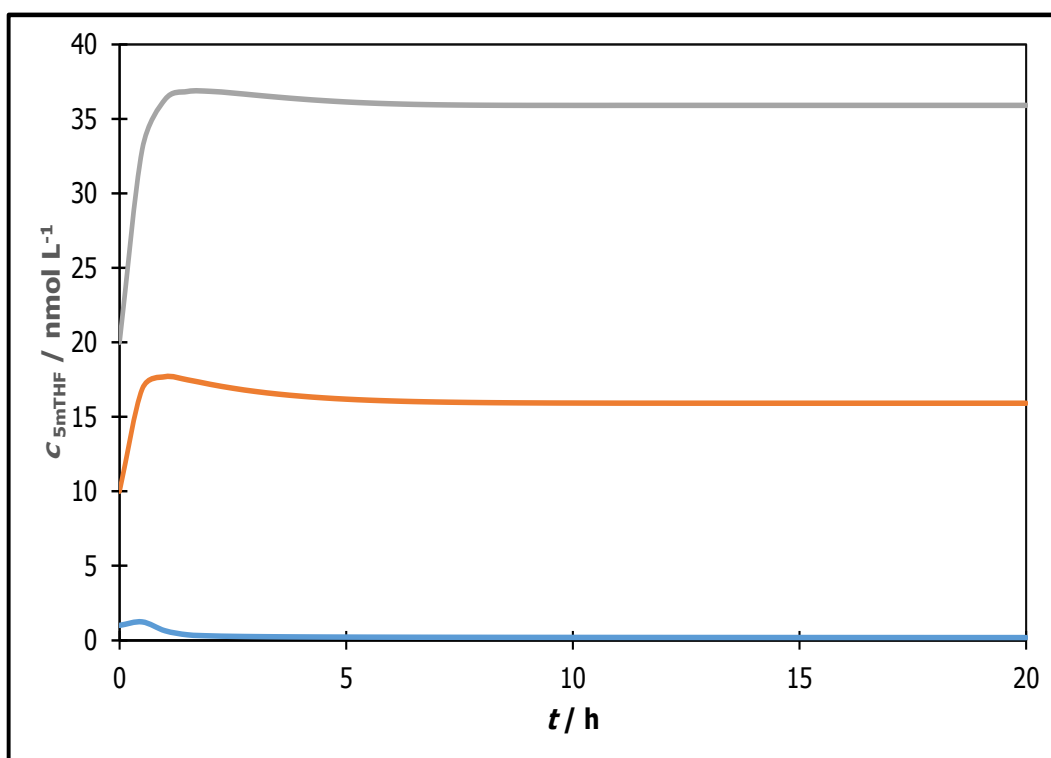
Na slici 9 nalazi se prikaz promjene koncentracije 5-metiltetrahidrofolata s obzirom na tri različite početne vrijednosti folata. U prvom slučaju ($c_{0,\text{FOLAT}} = 3 \text{ nmol L}^{-1}$) koncentracija 5-metiltetrahidrofolata dostiže $c_{5\text{mTHF}} = 0,18 \text{ nmol L}^{-1}$, u drugom slučaju ($c_{0,\text{FOLAT}} = 30 \text{ nmol L}^{-1}$) razina 5-metiltetrahidrofolata dostiže vrijednost od $c_{5\text{mTHF}} = 15,9 \text{ nmol L}^{-1}$, a u trećem slučaju ($c_{0,\text{FOLAT}} = 60 \text{ nmol L}^{-1}$) razina 5-metiltetrahidrofolata dostiže vrijednost od $c_{5\text{mTHF}} = 35,9 \text{ nmol L}^{-1}$. Prema ovim rezultatima je vidljivo da je 5-metiltetrahidrofolat, kao vrlo važan donor metilne skupine, direktno ovisan o koncentraciji dostupnog folata.



Slika 7. Utjecaj promjene koncentracije folata na razinu homocisteina (plavo-početna koncentracija folata: $c_{0,\text{FOLAT}} = 3 \text{ nmol L}^{-1}$, narančasto-početna koncentracija folata: $c_{0,\text{FOLAT}} = 30 \text{ nmol L}^{-1}$, sivo-početna koncentracija folata: $c_{0,\text{FOLAT}} = 60 \text{ nmol L}^{-1}$)



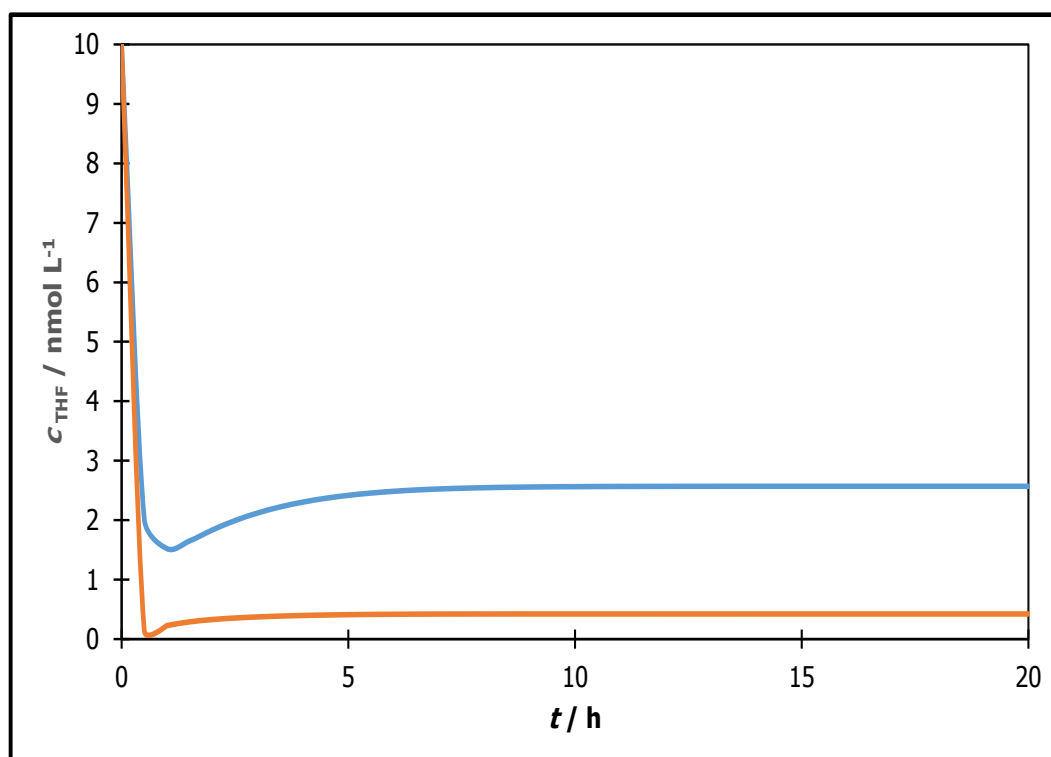
Slika 8. Utjecaj promjene koncentracije folata na razinu tetrahidrofolata (plavo-početna koncentracija folata: $c_{0,\text{FOLAT}} = 3 \text{ nmol L}^{-1}$, narančasto-početna koncentracija folata: $c_{0,\text{FOLAT}} = 30 \text{ nmol L}^{-1}$, sivo-početna koncentracija folata: $c_{0,\text{FOLAT}} = 60 \text{ nmol L}^{-1}$)



Slika 9. Utjecaj promjene koncentracije folata na razinu 5-metiltetrahidrofolata (plavo-početna koncentracija folata: $c_{0,\text{FOLAT}} = 3 \text{ nmol L}^{-1}$, narančasto-početna koncentracija folata: $c_{0,\text{FOLAT}} = 30 \text{ nmol L}^{-1}$, sivo-početna koncentracija folata: $c_{0,\text{FOLAT}} = 60 \text{ nmol L}^{-1}$)

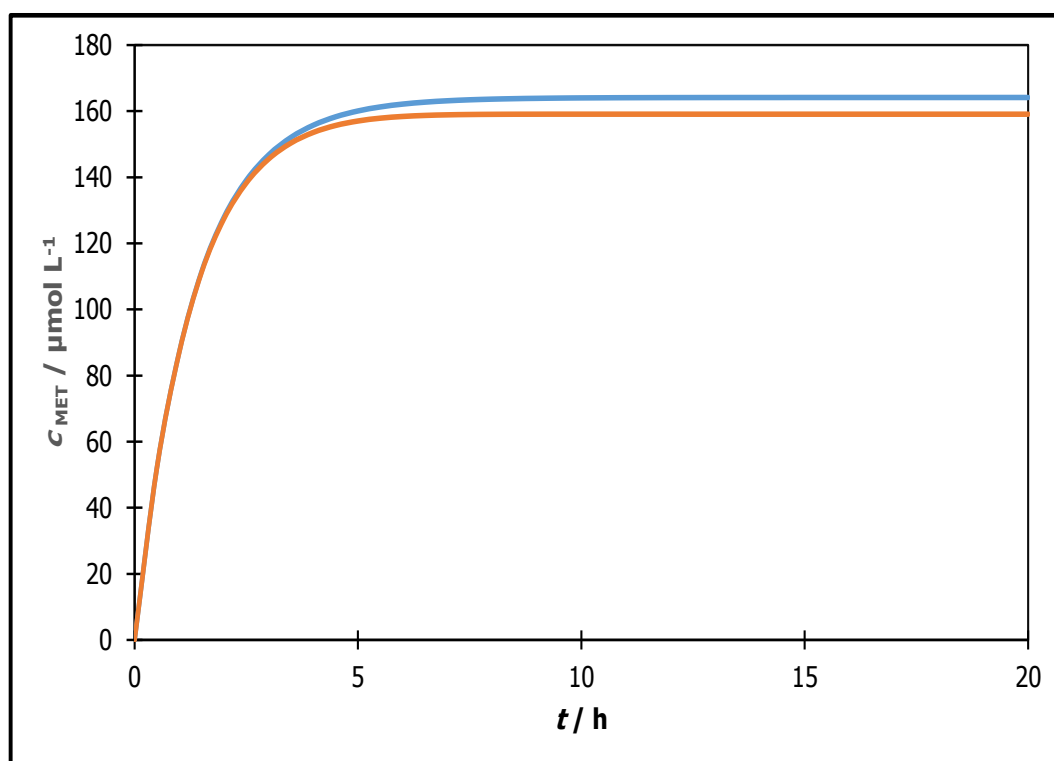
S obzirom da je vitamin B₁₂ kritični kofaktor enzima metionin sintaze, analizirao se utjecaj deficita B₁₂ na brzinu metabolizma i nastalu količinu njegovih metabolita smanjenjem aktivnosti metionin sintaze za 10 % što je dosljedno pacijentima s ozbiljnim nedostatkom vitamina B₁₂. Prikazan je utjecaj smanjenja maksimalne brzine reakcije metionin sintaze (za 10 %) na promjenu koncentracije nastalog tetrahidrofolata i metionina.

Kao što je vidljivo na slici 10, nakon vremenskog perioda $t = 20$ h koncentracija nastalog tetrahidrofolata 84 % je manja u odnosu na koncentraciju tetrahidrofolata u normalnim uvjetima, što se može usporediti s promjenom od 73 % (Reed i sur., 2006).



Slika 10. Utjecaj smanjenja maksimalne brzine reakcije metionin sintaze na koncentraciju THF-a (plavo–smanjena aktivnost metionin sintaze za 10 %, narančasto-normalna aktivnost metionin sintaze)

Na slici 11 je vidljivo da je nakon vremenskog perioda $t = 20$ h koncentracija nastalog metionina pri uvjetima smanjene aktivnosti metionin sintaze 0,03 % niža u odnosu na koncentraciju metionina nastalog u normalnim uvjetima što je mnogo manja vrijednost dobivena u prijašnjem istraživanju (Reed i sur., 2006). Zbog slabije enzimске aktivnosti metionin sintaze uzrokovane mutacijom ili deficitom vitamina B₁₂ manje se metilnih skupina sa 5mTHF-a donira toj reakciji zbog čega dolazi do ovakvog blagog smanjenja koncentracije metionina.



Slika 11. Utjecaj smanjenja maksimalne brzine reakcije metionin sintaze na koncentraciju metionina (plavo–normalna aktivnost metionin sintaze, narančasto–smanjena aktivnost metionin sintaze za 10 %)

5. ZAKLJUČCI

Na temelju prikazanih rezultata i provedene rasprave mogu se donijeti slijedeći zaključci:

1. Pri koncentracijama serumskog folata nižim od referentnog intervala, koncentracija homocisteina naglo se povećava te nakon vremenskog perioda $t = 20$ h u konstantnom je porastu.
2. Pri višim početnim koncentracijama folata razina tetrahidrofolata nije ovisna o folatu jer se javlja utjecaj enzimske alosteričke inhibicije.
3. U slučaju deficita vitamina B₁₂, smanjuje se enzimsko aktivnost metionin sintaze zbog čega u metabolizmu folata nastaje manje tetrahidrofolata i metionina koji je esencijalna aminokiselina.
4. Računalni program CellDesigner pokazao se kao vrlo koristan alat za razumijevanje regulacija složenih metaboličkih reakcija koje vežemo uz pojedina zdravstvena stanja izazvana vitaminskim deficitom.

6. LITERATURA

Anonymus (2018) CellDesigner, <<http://www.celldesigner.org/>> Pristupljeno 3. rujna 2018.

Berry R. J., Li Z. (2002) Folic acid alone prevents neural tube defects: Evidence from the China study. *Epidemiology* **13**: 114 – 116.

Blom H. J. (1998) Determinants of plasma homocysteine. *The American Journal of Clinical nutrition* **67**: 188 – 189.

Boushey C. J., Beresford S. A., Omenn G. S., Motulsky A. G. (1995) A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *The Journal of the American Medical Association* **274**: 1049 – 1057.

Capozzi F., Bordoni A. (2013) Foodomics: A new comprehensive approach to food and nutrition. *Genes & Nutrition* **8**: 1 - 4.

Chait A., Malinow M. R., Nevin D. N., Morris C. D., Eastgard R. L., Kris-Etherton P., Pi-Sunyer F. X., Oparil S., Resnick L. M., Stern J. S., Haynes R. B., Hatton D. C., Metz J. A., Clark S., McMahon M., Holcomb S., Reusser M. E., Snyder G. W., McCarron D. A. (1999) Increased dietary micronutrients decrease serum homocysteine concentrations in patients at high risk of cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition* **70**: 881 – 887.

Claus S. P. (2013) Fighting undernutrition: don't forget the bugs. *Cell Host & Microbe* **13**: 239 – 240.

Claus S. P., Swann J. R. (2013) Nutrimetabonomics: applications for nutritional sciences, with specific reference to gut microbial interactions. *Annual Review of Food Science and Technology* **4**: 381 - 399.

Czeizel A. E., Dudás I. (1992) Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *New England Journal of Medicine* **327**: 1832 – 1835

Czeizel A. E., Dudás I., Paput L., Bánhidý F. (2011) Prevention of neural-tube defects with periconceptional folic acid, methylfolate, or multivitamins? *Annals of Nutrition & Metabolism* **58**: 263 – 271.

Fox J. T., Stover P. J. (2008) Folate-mediated one-carbon metabolism. *Vitamins & Hormones* **79**: 1 – 44.

Funahashi A., Morohashi M., Kitano H. (2003) CellDesigner: A process diagram editor for gene-regulatory and biochemical networks. *Biosilico* **1**:159 – 162.

Garcia - Canas V., Simo C., Herrero M., Ibanez E., Cifuentes A. (2012) Present and future challenges in food analysis: foodomics. *Analytical Chemistry* **84**: 10150 - 10159.

García A., Paris – Pombo A., Evans L., Day A., Freedman M. (2002) Is low – dose oral cobalamin enough to normalize cobalamin function in older people? *Journal of the American Geriatrics Society* **50**: 1401 – 1404.

Giovannucci E. (2002) Epidemiologic studies of folate and colorectal neoplasia: a review. *Journal of Nutrition* **132**: 2350 – 2355.

Gregory J. F. (2001) Case study: Folate bioavailability. *Journal of Nutrition* **131**: 1376 – 1382.

Heinzmann S. S., Merrifield C. A., Rezzi S., Kochhar S., Lindon J. C., Holmes E., Nicholson J. K. (2012) Stability and robustness of human metabolic phenotypes in response to sequential food challenges. *Journal of Proteome Research* **11**: 643 – 655.

Hood L., Health J. R., Phelps M. E., Lin B. (2004) Systems biology and new technologies enable predictive and preventative medicine. *Science* **306**: 640 – 643.

House J. D., O'Connor C. P., Guenter W. (2003) Plasma homocysteine and glycine are sensitive indices of folate status in a rodent model of folate depletion and repletion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 4461 – 4467.

Huang H. Y., Chen H. L., Feng L. P. (2017) Maternal obesity and the risk of neural tube defects in offspring: A meta-analysis. *Obesity Research & Clinical Practice* **11**: 188 – 197.

Huerta J. M., González S., Vigil E., Prada M., San Martin J., Fernández S., Patterson A. M., Lasheras C. (2004) Folate and cobalamin synergistically decrease the risk of high plasma homocysteine in a nonsupplemented elderly institutionalized population. *Clinical Biochemistry* **37**: 904 – 910.

Indrawati C., Arroqui I., Messagie M., Nguyen T., Van Loey A., Hendrickx M. (2004) Comparative study on pressure and temperature stability of 5-methyltetrahydrofolic acid in model systems and in food products. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* **52**: 485 – 492.

Iyer R., Tomar S. K. (2009) Folate: A functional food constituent. *Journal of Food Science*, **74**: 114 – 122.

Jacques P. F., Bostom A. G., Wilson P. W., Rich S., Rosenberg I. H., Selhub J. (2001) Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *The American Journal of Clinical nutrition* **73**: 613 – 621.

Kim Y. (2004) Folate, colorectal carcinogenesis, and DNA methylation: Lessons from animal studies. *Environmental & Molecular Mutagenesis* **44**: 10 – 25.

Kitano H. (2002) Systems biology: A brief overview. *Science* **295**: 1662 – 1664.

Lavoisier A. L. (2008) Chemical and physiological properties of vitamins. U: The Vitamins, Fundamental Aspects in Nutrition and Health, 3.izd., Combs G. F., ur., Academic Press. str. 35 – 74.

Lewis S. J., Ebrahim S., Davey Smith G. (2005) Meta-analysis of MTHFR 677C/T polymorphism and coronary heart disease: Does totality of evidence support causal role for homocysteine and preventive potential of folate? *The British Medical Journal* **331**: 1053 - 1059.

Little J., Sharp L., Duthie S., Narayanan S. (2003) Colon cancer and genetic variation in folate metabolism: The clinical bottom line. *Journal of Nutrition* **133**: 3758 – 3766.

McKillop D. J., Pentieva K. D., Scott J. M., Strain J. J., McCreedy R., Alexander J., Patterson K., Hughes J., McNulty H. (2003) Protocol for the production of concentrated extracts of food folate for use in human bioavailability studies. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* **51**: 4382 – 4388.

Melse-Boonstra A., Verhoef P., Konings E. J. M., van Dusseldorp M., Matser A., Hollman P. C., Meyboom S., Kok F. J., West C. E. (2002) Influence of processing on total, monoglutamate and polyglutamate folate contents of leeks, cauliflower, and green beans. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* **50**: 3473 – 3478.

Mills J. L., Signore C. (2004) Neural tube defect rates before and after food fortification with folic acid. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* **70**: 844 – 845.

Mitchell L. E. (2005) Epidemiology of neural tube defects. *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics* **135**: 88 – 94.

Moat S. J., Lang D., McDowell I. F., Clarke Z. L., Madhavan A. K., Lewis M. J., Goodfellow J. (2004) Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **15**: 64 – 79.

Moat S. J., Lang D., McDowell I. F., Clarke Z. L., Madhavan A.K., Lewis M. J., Goodfellow J. (2004) Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **15**:64 – 79.

Molloy A. M. (2005) The role of folic acid in the prevention of neural tube defects. *Trends in Food Science & Technology* **16**: 241 – 245.

Naderi N., House J. D. (2018) Recent Developments in Folate Nutrition. *Advances in Food and Nutrition Research* **83**: 195 – 213.

Nijhout H. F., Reed M. C., Budu P., Ulrich C. M. (2004) A mathematical model of the folate cycle: New insights into folate homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 55008 – 55016.

Nijhout H. F., Reed M., Anderson D., Mattingly J., James S. J., Ulrich C. M. (2006) Long-range allosteric interactions between the folate and methionine cycles stabilize DNA methylation rate. *Epigenetics* **1**: 81 – 87.

Nygard O., Refsum H., Ueland P. M., Vollset S. E. (1998) Major lifestyle determinants of plasma total homocysteine distribution: The Hordaland homocysteine study. *The American Journal of Clinical nutrition* **67**: 263 – 270.

Pagana K. D., Pagana T. J. (2013) Mosby's Manual of Diagnostic and Laboratory Tests, 5.izd., Elsevier, str. 445.

Panagiotou G., Nielsen J. (2009) Nutritional Systems Biology: Definitions and Approaches. *Annual Review of Nutrition* **29**: 329 – 339.

Peng Y., Dong B., Wang Z. (2016) Serum folate concentrations and all-cause, cardiovascular disease and cancer mortality: A cohort study based on 1999–2010 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *International Journal of Cardiology* **219**: 136 – 142.

Pfeiffer C. M., Caudill S. P., Gunter E. W., Osterloh J., Sampson E. J. (2005) Biochemical indicators of B vitamin status in the US population after folic acid fortification: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2000. *The American Journal of Clinical Nutrition* **82**: 442 – 450.

Price N. D., Segal E. (2018) Editorial overview: Systems biology: Data, discovery, delivery. *Current Opinion in Biotechnology* **51**: vii – viii.

Prudova A., Martinov M. V., Vitvitsky V. M., Ataullakhanov F. I., Banerjee R. (2005) Analysis of pathological defects in methionine metabolism using a simple mathematical model. *Biochimica et Biophysica Acta* **1741**: 331 – 338.

Rampersaud G. C., Bailey L. B., Kauwell G. P. (2002) Relationship of folate to colorectal and cervical cancer: Review and recommendations for practitioners. *Journal of the American Dietetic Association* **102**: 1273 – 1282.

Rasmussen L. B., Ovesen L., Bulow I., Knudsen N., Laurberg P., Perrild H. (2000) Folate intake, lifestyle factors, and homocysteine concentrations in younger and older women. *The American Journal of Clinical nutrition* **72**: 1156 – 1163.

Reed M. C., Nijhout H. F., Neuhouwer M. L., Gregory J. F., Shane B., James S. J., Boynton A., Ulrich C. M. (2006) A mathematical model gives insights into nutritional and genetic aspects of folate-mediated one-carbon metabolism. *The Journal of Nutrition* **136**: 2653 – 2661.

Reed M. C., Nijhout H. F., Sparks R., Ulrich C. M. (2004) A mathematical model of the methionine cycle. *Journal of Theoretical Biology* **226**: 33 – 43.

Riboli E., Ronnholm H., Saracci R. (1987) Biological markers of diet. *Journal of Cancer Survivorship* **6**: 685 – 718.

Rist M. J., Wenzel U., Daniel H. (2006) Nutrition and food science go genomic. *Trends in Biotechnology* **24**: 1 – 7.

Robien K., Ulrich C. M. (2003) 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk. *American Journal of Epidemiology* **157**: 571 – 582.

Saini R.K., Nile S. H., Keum Y. S. (2016) Folates: Chemistry, analysis, occurrence, biofortification and bioavailability. *Food Research International* **89**: 1 – 13.

Selhub J., Jacques P. F., Rosenberg I. H., Rogers G., Bowman B. A., Gunter E. W., Wright J. D., Johnson C. L. (1999) Serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey (1991–1994): Population reference ranges and contribution of vitamin status to high serum concentrations. *Annals of Internal Medicine* **131**: 331 – 339.

Selhub J., Jacques P. F., Wilson P. W., Rush D., Rosenberg I. H. (1993) Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *The Journal of the American Medical Association* **270**: 2693 - 2698.

Stewart-Knox B., Rankin A., Kuznesof S., Poínhos R., Vaz de Almeida M. D., Fischer A., Frewer L. J. (2015) Promoting healthy dietary behaviour through personalised nutrition: technology push or technology pull? *Proceedings of the Nutrition Society* **74**: 171 - 176.

Stolzenberg-Solomon R. Z., Miller E. R. III, Maguire M. G., Selhub J., Appel L. J. (1999) Association of dietary protein intake and coffee consumption with serum homocysteine concentrations in an older population. *The American Journal of Clinical Nutrition* **69**: 467 – 475.

Stover P. J. (2004) Physiology of folate and vitamin B12 in health and disease. *Nutrition Reviews* **62**: 3 – 12.

Stover P. J. (2006) Nutrition and developmental biology—implications for public health. *Nutrition Reviews* **64**: 60 – 70.

Subbiah M. T. R. (2006) Nutrigenetics and nutraceuticals: the next wave riding on personalized medicine. *Translational Research* **149**: 55 – 61.

Ulrich C. M. (2005) Nutrigenetics in cancer research—folate metabolism and colorectal cancer. *Journal of Nutrition* **135**: 2698 – 2702.

Van der Greef J., Martin S., Juhasz P., Adourian A., Plasterer T., Verheij E. R., McBurney R. N. (2007) The art and practice of systems biology in medicine: mapping patterns of relationships. *Journal of Proteome Research* **6**: 1540 – 1559.

Van Ommen B., Stierum R. (2002) Nutrigenomics: exploiting systems biology in the nutrition and health arena. *Current Opinion in Biotechnology* **13**: 517 – 21.

Varela - Moreiras G., Murphy M. M., Scot J. M. (2009) Cobalamin, folic acid, and homocysteine. *Nutrition Reviews* **67**(1): 69 – 72.

Varela-Moreiras G. (2001) Nutritional regulation of homocysteine: Effects of drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **55**: 448 – 453.

Visentin M., Diop-Bove N., Zhao R., Goldman I.D. (2014) The intestinal absorption of folates. *Annual Review of Physiology* **76**: 251 – 274.

Wien T. N., Pike E., Wisløff T., Staff A., Smeland S., Klemp M. (2012) Cancer risk with folic acid supplements: A systematic review and meta-analysis. *The British Medical Journal* **2**: 1 – 13.

Witthöft C. M. (2011). Analytical methods to assess the bioavailability of water-soluble vitamins in food—Exemplified by folate. U: Fortified Foods with Vitamins: Analytical

Concepts to Assure Better and Safer Products, 3. Izd., Rychlik M., ur., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. str. 21 – 36.

Yang Q., Botto L. D., Erickson J. D., Berry R. J., Sambell C., Johansen H., Friedman J. M. (2006) Improvement in stroke mortality in Canada and the United States, 1990 to 2002. *Circulation* **113**: 1335 – 1343.

PRILOZI

1. Serin hidroksimetil transferaza (SHMT)

$$V1 = \frac{V_{max}[THF][Ser]}{(K_mTHF + [THF])(K_mSer + [Ser])}$$

2. Timidilat sintaza (TS)

$$V2 = \frac{V_{max}[dUMP][CH_2THF]}{(K_mdUMP + [dUMP])(K_mCH_2THF + [CH_2THF])}$$

3. Dihidrofolat reduktaza (DHFR)

$$V3 = \frac{V_{max}[DHF][NADPH]}{(K_mDHF + [DHF])(K_mNADPH + [NADPH])}$$

4. 10 – formiltetrahidrofolat sintaza (FTS)

$$V4 = \frac{V_{max}[THF][HCOOH]}{(K_mTHF + [THF])(K_mHCOOH + [HCOOH])}$$

5. Neenzimska reakcija

$$V5 = k_1[THF][CH_2O] - k_2[CH_2THF]$$

6. 5,10 – metilentetrahidrofolat dehidrogenaza (MTD)

$$V6 = \frac{V_{max1}[CH_2THF]}{K_mCH_2THF + [CH_2THF]} - \frac{V_{max2}[CHTHF]}{K_mCHTHF + [CHTHF]}$$

7. 5,10 – metilentetrahidrofolat ciklohidrolaza (MTCH)

$$V7 = \frac{V_{max1}[CHTHF]}{K_mCHTHF + [CHTHF]} - \frac{V_{max2}[10fTHF]}{K_m10fTHF + [10fTHF]}$$

8. 10 – formil tetrahidrofolat dehidrogenaza (FTD)

$$V8 = \frac{V_{max}[10fTHF]}{K_m10fTHF + [10fTHF]}$$

9. Fosforibozil glicinamid transformilaza (PGT)

$$V9 = \frac{V_{max}[10fTHF][GAR]}{(K_m10fTHF + [10fTHF])(K_mGAR + [GAR])}$$

10. Aminoimidazol karboksamid ribonukleotid transferaza (AICART)

$$V_{10} = \frac{V_{max}[10fTHF][AICAR]}{(K_m10fTHF + [10fTHF])(K_mAICAR + [AICAR])}$$

11. 5,10 – metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR)

$$V_{11} = \left(\frac{V_{max}[CH2THF][NADPH]}{(K_mCH2THF + [CH2THF])(K_mNADPH + [NADPH])} \right) \left(\frac{6,1 \cdot 10}{10 + [SAM] - [SAH]} \right)$$

12. Metionin sintaza (MS)

$$V_{12} = \frac{V_{max}[HCY][5mTHF]}{(K_mHCY + [HCY])(K_m5mTHF + [5mTHF])}$$

13. Betain homocistein metiltransferaza (BHMT)

$$V_{13} = e^{-0,0021([SAM]+[SAH])} \cdot e^{0,0021 \cdot 77,2} \left(\frac{V_{max}[HCY][BET]}{(K_mHCY + [HCY])(K_mBET + [BET])} \right)$$

14. Metionin adenozil transferaza I (MAT - I)

$$V_{14} = \left(\frac{V_{max}[Met]}{K_mMet + [Met]} \right) (0,23 + 0,8 \cdot e^{-0,0026[SAM]})$$

15. Metionin adenozil transferaza III (MAT - III)

$$V_{15} = \left(\frac{V_{max}[Met]^{1,21}}{K_mMet + [Met]^{1,21}} \right) \left(1 + \frac{7,2 \cdot [SAM]^2}{K_a^2 + [SAM]^2} \right)$$

16. DNA – metiltransferaza (DNMT)

$$V_{16} = \frac{V_{max}[SAM]}{K_mSAM \left(1 + \frac{[SAH]}{K_iSAH} \right) + [SAM]}$$

17. Glicin N – metil transferaza (GNMT)

$$V_{17} = \left(\frac{V_{max}[SAM]}{K_mSAM + [SAM]} \right) \left(\frac{1}{1 + \frac{[SAH]}{K_iSAH}} \right) \left(\frac{4,38}{0,35 + [5mTHF]} \right)$$

18. S – adenozilhomocistein hidrolaza (SAHH)

$$V_{18} = \frac{V_{max1}[SAH]}{K_mSAH + [SAH]} - \frac{V_{max2}[HCY]}{K_mHCY + [HCY]}$$

19. Cistation β – sintaza (CBS)

$$v_{19} = \left(\frac{V_{max}[HCY]}{K_mHCY + [HCY]} \right) \left(\frac{1,2 \cdot ([SAM] + [SAH])^2}{30^2 + ([SAM] + [SAH])^2} \right)$$

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

E. Mlešić

ime i prezime studenta

