



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

**ЕФЕКТИ ХИПЕРХОМОЦИСТЕИНЕМИЈЕ НА
ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА
И АКТИВНОСТ ЕНЗИМА АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРАЗЕ
У ПЛАЗМИ И СРЦУ ПАЦОВА: УЛОГА ГАСНИХ
ТРАНСМИТЕРА (NO, H₂S И СО)**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

РАДНА ВЕРЗИЈА

др Душко Корњача

Крагујевац, 2017. године

САДРЖАЈ

1. УВОД	
1.1. ХЕМИЈСКЕ ОДЛИКЕ ХОМОЦИСТЕИНА	2
1.2. МЕТАБОЛИЗАМ ХОМОЦИСТЕИНА	6
1.2.1. Заступљеност ензима укључених у метаболизам хомоцистеина по органима и ткивима	9
1.2.2. Механизми који регулишу метаболизам хомоцистеина	9
1.2.3. Грешке у регулацији метаболизма хомоцистеина-хиперхомоцистеинемија	11
1.2.3.1. Утицај генетских фактора на настанак хиперхомоцистеинемije	12
1.2.3.2. Утицај физиолошких фактора на вредност хомоцистеина	13
1.2.3.3. Утицај патолошких стања на хиперхомоцистеинемiju	14
1.3. Биолошке облици и референтни интервали хомоцистеина	19
1.3.1. Време узорковања	19
1.3.2. Стабилност хомоцистеина у пуној крви	20
1.3.3. Стабилност хомоцистеина у серуму и плазми	21
1.3.4. Референтне вредности хомоцистеина	22
1.4. УЛОГА ХОМОЦИСТЕИНА У ПАТОГЕНЕЗИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ	22
1.4.1. Утицај хомоцистеина на појаву коронарне болести	25
1.5. ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС И АНТИОКСИДАЦИОНА ЗАШТИТА	26
1.5.1. Слободни радикали	26
1.5.2. Оксидациони стрес	30
1.5.3. АНТИОКСИДАЦИОНА ЗАШТИТА	34
1.5.3.1. Ензимска антиоксидациона заштита	35
1.6. АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРАЗА (АChE)	37
1.6.1. Структура и механизам дејства	37
1.6.2. Физиолошки значај ацетилхолинестеразе	38
1.6.3. Терапијски значај ацетилхолинестеразе	39
1.6.4. Улога ацетилхолинестеразе у функцији миокарда	39
1.7. ФИЗИОЛОШКЕ ОДЛИКЕ ГАСОТРАНСМИТЕРА	40
1.7.1. Опште одлике	40
1.7.2. Азот моноксид (NO)	41
1.7.3. Специфичне карактеристике угљен монооксида (CO)	43

1.7.4. Специфичне карактеристике водоник сулфида (H ₂ S)	44
2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	
2.1. ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ	47
2.2. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ	47
2.2.1. Генерални циљ	47
2.2.2. Специфични циљеви	47
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	
3.1. МАТЕРИЈАЛ	49
3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ	49
3.3. БИОХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ	51
3.3.1. Одређивање активности ацетилхолинестеразе (AChE)	52
3.3.2. Одређивање концентрације продукта липидне пероксидације (MDA)	52
3.3.3. Одређивање активности каталазе (CAT)	52
3.3.4. Одређивање активности супероксид дизмутазе (SOD)	53
3.3.5. Одређивање активности глутатион пероксидазе (GPx)	53
3.5. Статистичка обрада података	54
4. РЕЗУЛТАТИ	
4.1. АКУТНА СЕРИЈА ЕКСПЕРИМЕНАТА	56
4.1.1. Акутни ефекти DL-хомоцистеина и DL-хомоцистеин тиолактона на активност ензима ацетилхолинестеразе у ткиву миокарда срца пацова и параметре оксидационог стреса у плазми	56
4.1.2. Акутни ефекти инхибитора синтезе гасотрансмитера (L-NAME, PPR IX и DL-PAG) на активност ензима ацетилхолинестеразе у ткиву миокарда срца пацова и параметре оксидационог стреса у плазми	63
4.1.3. Акутни ефекти комбиноване примене DL-хомоцистеина и инхибитора синтезе гасотрансмитера на активност ензима ацетилхлинестеразе у ткиву миокарда срца пацова и параметре оксидационог стреса у плазми	70
4.2. СУБХРОНИЧНА СЕРИЈА ЕКСПЕРИМЕНАТА	77
4.2.1. Ефекти субхроничне хиперхомоцистеинемije на активност ензима ацетилхлинестеразе у ткиву миокарда срца пацова и параметара оксидационог стреса у плазми	77
5. ДИСКУСИЈА	
5.1. ЕФЕКТИ АКУТНЕ И СУБХРОНИЧНЕ ХИПЕРХОМОЦИСТЕИНЕМИЈЕ НА	

АКТИВНОСТ ЕНЗИМА АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРАЗЕ У СРЧАНОМ МИШИЋУ ПАЦОВА	85
5.2. ЕФЕКТИ АКУТНЕ И СУБХРОНИЧНЕ ХИПЕРХОМОЦИСТЕИНЕМИЈЕ НА ОКСИДАЦИОНИ СТАТУС ПАЦОВА	87
5.3. АКУТНИ ЕФЕКТИ ИНХИБИТОРА СИНТЕЗЕ ГАСОТРАНСМИТЕРА (L- NAME, PPR IX И DL-PAG) НА АКТИВНОСТ ЕНЗИМА АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРАЗЕ У ТКИВУ МИОКАРДА СРЦА ПАЦОВА	93
5.4. АКУТНИ ЕФЕКТИ ИНХИБИТОРА СИНТЕЗЕ ГАСОТРАНСМИТЕРА (L- NAME, PPR IX И DL-PAG) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА У ПЛАЗМИ ПАЦОВА	97
5.5. АКУТНИ ЕФЕКТИ КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ DL-ХОМОЦИСТЕИНА И ИНХИБИТОРА СИНТЕЗЕ ГАСОТРАНСМИТЕРА НА АКТИВНОСТ ЕНЗИМА АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРАЗЕ У ТКИВУ МИОКАРДА СРЦА ПАЦОВА	100
5.6. АКУТНИ ЕФЕКТИ КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ DL-ХОМОЦИСТЕИНА И ИНХИБИТОРА СИНТЕЗЕ ГАСОТРАНСМИТЕРА НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА У ПЛАЗМИ ПАЦОВА	102
6. ЗАКЉУЧЦИ	108
7. ЛИТЕРАТУРА	111

І УВОД

1.1. ХЕМИЈСКЕ ОДЛИКЕ ХОМОЦИСТЕИНА

У процесу разградње метионина долази до стварања његовог главног метаболита хомоцистеина, који уједно представља и његову основну компоненту. Хемијска структура хомоцистеина је откривена средином тридесетих година прошлог века. По свом хемијском саставу хомоцистеин је у основи аминокиселина. Грађа хомоцистеина је најсличнија глутатиону и цистеину и са њима заједно представља најпрепознатљивије аминокиселине једињење, које је присутно код сисара. У организму сисара хомоцистеин се налази у два облика: 1. слободни и у облику 2. дисулфида, везаних за протеине.

Од целокупне вредности хомоцистеина у организму сисара, на слободни хомоцистеин отпада просечно између 1-2%. Остала, већа количина хомоцистеина, (око 80%) се налази везан за протеине и то претежно албумине. Ако површно анализирамо хемијску структуру аминокиселинских једињења, стиче се утисак да су они готово идентични. Међутим, њихова функционална улога у организму је доста различита. Главни елемент који креира различитост ових једињења је појам „тиол” и односи се на присуство S-H групе која одређује основу препознатљивости функције ових једињења.

Основна функционална карактеристика тиолне групе је да омогући укључивање хомоцистеина у веома важне метаболичке процесе. По свом молекуларном саставу цистеин и хомоцистеин представљају мале молекуле, са малом молекуларном масом, која за цистеин износи 121,2 а за хомоцистеин 135,1. Из хемијске структуре се закључује да код хомоцистеина постоји једна метиленска група више. За разлику од њих глутатион представља трипептид (γ - глутамил –цистеинилглицин), чија молекулска маса износи 307,3, а цистеин у овом једињењу представља носиоца „тио“ групе (1).

Са физичко-хемијског аспекта, осим утицаја на рК вредност, S-H група одређује и оксидо-редукциони потенцијал. Поред ове две врло важне улоге, S-H група учествује и у формирању слободних радикала. Слободни радикали су супстанце које значајно утичу и на параметре који са биолошко-хемијског гледишта поседују способност медијације у многим, врло комплексним метаболичким активностима. Са једне стране имају важну улогу заштите ћелија и ткива сисара, док истовремено могу да представљају иницијаторе за настанак отровних једињења, која изазивају многе и различите штетне последице по те исте организме. Важно је напоменути да постоје велике сличности између тиолне (R-SH) и алкохолне (R-OH) групе. Ове сличности су

логичне ако се зна да и сумпор и кисеоник припадају истој групи периодног система. Њихове међусобне разлике су настале као последица специфичних физичко-хемијских константи, тиолне и алкохолне групе. Овако специфичан међусобни однос, тиолне (S-H) и алкохолне (O-H) групе је настао као последица саме дужине њихових веза. Алкохолна O-H веза је краћа у односу на S-H везу. Због овакве разлике у дужини веза, лако је разумети зашто је јачина кисеоник-водоник O-H везе већа у алкохолној у односу на ону која је присутна код S-H групе. Енергија дисоцијације тиолне групе у односу на алкохолну је нижа, и поред тога што је електронегативност сумпора мања него код кисеоника. Након овог сазнања не треба да нас чуди изражена појава RS^- анијона у многим биохемијским процесима (2).

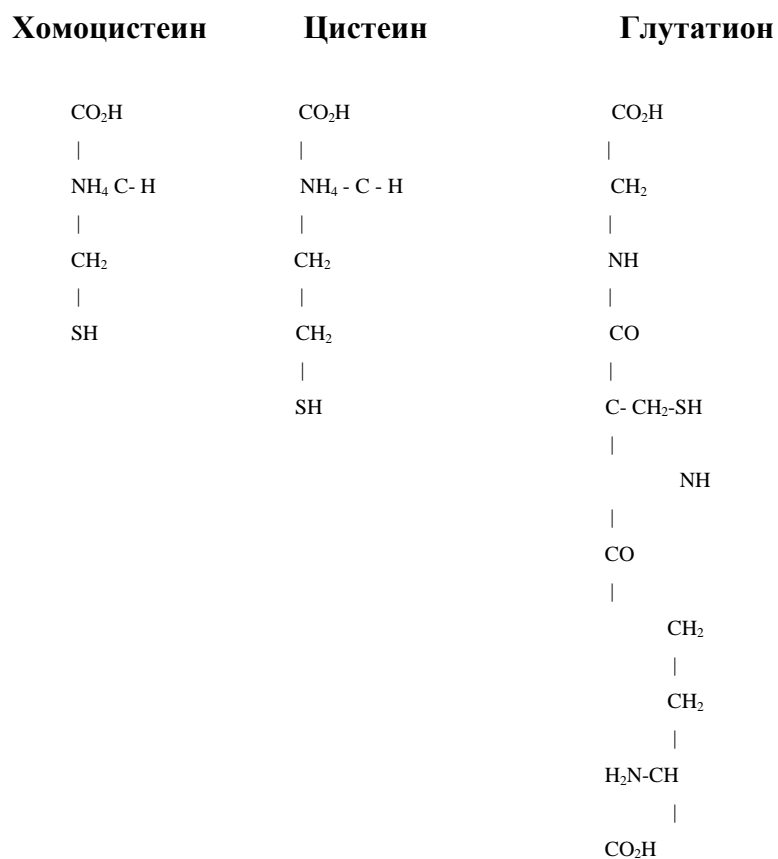
Ако се повећа рН вредност средине, онда се истовремено повећава и дисоцијација тиолне групе. Пошто смо напоменули да је тиолна S-H веза значајно слабија у односу на O-H везу, онда је она уједно подложнија и бржој оксидацији. Ова наведена специфичност ствара велику разлику између ове две велике групе органских једињења, када је у питању изложеност дејству различитих оксидационих агенаса. Значај оксидационог процеса код свих алкохола се огледа у промени степена оксидације O-H групе најближег угљениковог атома. За разлику од оваквог процеса који смо видели код алкохола, процес оксидације код тиола, изазива различите степене оксидације сумпора S-H групе. У нормалним физиолошким процесима, тиоли се углавном оксидишу до сулфида ($RSSR$). Ако процес оксидације посматрамо искључиво са хемијског аспекта, могућност оксидације до сулфеничне ($RSOH$), сулфидне (RSO_2H) и сулфоничне (RSO_3H) киселине је доста занемарљив. Ово се догађа због тога што је оксидација овог типа карактеристична за присуство јачих оксидационих агенаса, који се не могу одвијати у физиолошким условима (3).

Када се говори о вредности оксидационог потенцијала биолошки значајних тиола и дисулфида, он је приближно идентичан и његова вредност се креће у распону од -0,2 до -0,4 V. У биохемијској реакцији по типу $2RS \rightarrow 2RSSR + 2e$ фаворизирана је надградња дисулфида. Алифатични тиоли учествују у процесу спровођења многих редокс реакција, тако што међусобно реагују са великим бројем различитих биолошки активних супстанци, као што су то нпр. (цитохроми, редуковани кисеонички радикали, флавоноиди, аскорбати итд). Код набројаних реакција тиоли се преводе у одговарајуће дисулфиде, док у присуству јона метала као катализатора постоји могућност оксидације тиола. Као последица ове реакције долази до надградње нестабилног тиол радикала (RS) који се формира из одговарајућег RS^- међупреносника, и он налази се као

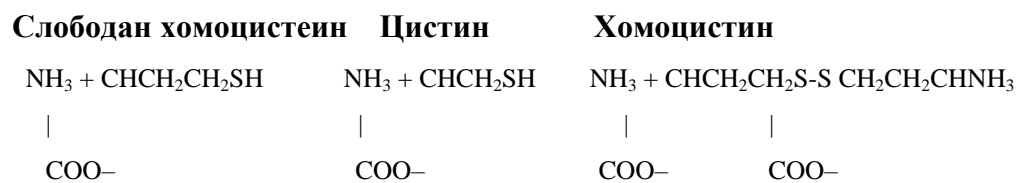
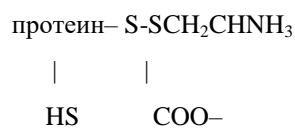
слободан или је везан за метални катализатор (3).

Поменута биохемијска реакција тиола са халидима, захтева да буде пажљивије размотрена, због могућности његовог утицаја на биохемијске процесе, који се одвијају у пределу васкуларног система. Велика је вероватноћа да у реакцијама биолошки активних тиола са алкил и арил халидима, они учествују као супстанце које могу да замене поједине групе, тако да се као крајњи производи добијају одговарајући сулфиди (RSR^-). Можемо претпоставити да постоји још једна значајна могућност да се у овим процесима одвија и нуклеофилна адисија RS^- аниона на алфа и бета незасићене карбонилне групе ($\text{C}=\text{C}=\text{O}$), које се налазе у бета позицији. Као примере ових реакција можемо навести деловање са витамином К и норепинефрином. Када дође до међусобне хемисјке реакције тиола са двогубом везом цијаната ($\text{C}=\text{N}$), тада се као производ овог процеса стварају тиокарбонати ($\text{NH}_2\text{-CO-SR}$). Сам процес одвијања ових реакција пружа могућност да се покрену адисиони процеси на цикличној структури NAD , који ће касније створити предуслове који би довели до испољавања његове кофакторске улоге (3, 4).

Поред горе наведених разлика у хемијском понашању тиола у односу на алкоhole, као пример њихове различитости можемо навести и однос тиола са карбонилном групом. Тиоли чија је тиолна група блиска амино групи, добро реагују са карболнилним материјама и дају релативно стабилан тиазолидин. Ако у биохемијским процесима дође до удаљавања SH - и NH_2 групе, тада се аутоматски надгради хемимеркаптана. Упоредо са спровођењем горе поменутих реакција, одвијају се и други биохемијски важни процеси на карбоксилној групи одговарајућих киселина (RCO_2H), где као коначни продукт добијају тиоестри. Као репрезентативан пример оваквих реакција, можемо навести њихову реакцију са коензимом А. У овој реакцији долази до надградње потребног RS^- ацил продукта, који је одговоран за ацилацију у многим биохемијским реакцијама. У последње време је велика пажња усмерена на процес специфичног стварања хомоцистеин тиолактона, који настаје искључиво из хомоцистеина. Циклизација у овом процесу се убрзава ако се снизи вредност pH . У већем броју нових истраживања сугерише се да је овај процес врло значајан за функционисање организма у физиолошким условима (3, 4).



Слика бр. 1. Биогени аминокиселине

**Протеински везани хомоцистин**

Слика бр. 2. Облици хомоцистеина у организму

Ако хомоцистеин и њему слични биогени тиоли ступе у реакцију са азотним оксидима: азот-диоксидом (NO_2), диазот-триоксидом (N_2O_3) и диазот-тетраоксидом (N_2O_4), онда ће они тежити да остваре међусобну реакцију са металним нитрозил комплексима (M-NO). Као коначни производи у оба ова случаја настају С-нитрозотиол или тионитритни (RS-NO) производи. Овако настале супстанце имају својство да снажно активирају ензим гванилат-циклазу која представља врло важан интермедијер у метаболизму ендотелијумског релаксирајућег фактора.

Само разлагање тиолактона такође доприноси да се спроведе велики број метаболичких процеса и активности важних метало тиол зависних ензима. Као производ ових процеса настаје успостављање NO -метал и S -метал веза, које представљају посебан облик кисело отпорних хелатних комплекса са металним јонима (4).

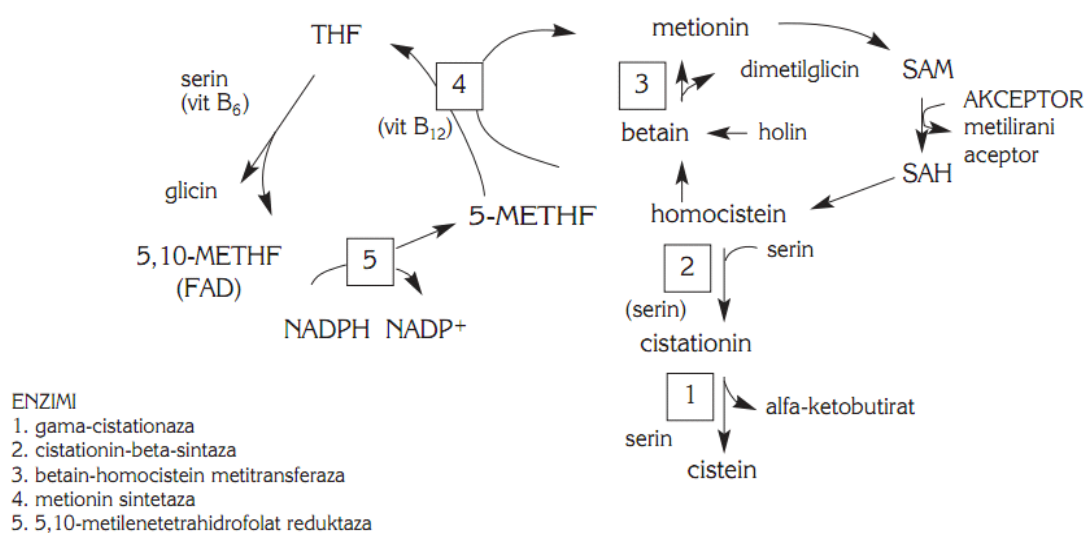
1.2. МЕТАБОЛИЗАМ ХОМОЦИСТЕИНА

Ако бисмо желели да дефинишемо хомоцистеин чисто са хемијског становишта, онда га без неких већих оспоравања можемо сврстати у аминокиселину. Уколико хоћемо да хомоцистеин посматрамо чисто са биохемијског гледишта и ако уважимо правило да се појам аминокиселине представља као субјединица у синтези протеина, онда се за њега не може рећи да је права аминокиселина, јер он не учествује у наведеном процесу. Имајући ово у виду, хомоцистеин би се најпре могао назвати метаболитом есенцијалне аминокиселине метионина.

Сам процес из којег настаје хомоцистеин представља врло сложен биохемијски пут, који је беспрекорно регулисан. Овај процес добија на свом значају тек после сагледавања чињенице да он учествује у реметилационом циклусу, који доводи до поновне синтезе и обнављања метионина. Процес метаболизма метионина започиње његовим укључивањем у синтезу протеина, дакле самом синтезом S -аденозилметионина. S -аденозилметионин процесом декарбоксилације, учествује у синтези спермидина или представља даваоца метил групе уз издвајање аденизилхомоцистеин односно хомоцистеина. У даљем процесу метаболизма хомоцистеина овај метаболички пут бива затворен, тако што наступа фаза ресинтезе метионина, али један део бива неповратно метаболисан до цистеина (5).

У организму сисара свака ћелија је оспособљена да може обавити процес метаболисања метионина. Да би се расположива количина метионина метаболисала, процес мора да се одвија кроз две важне реакције, које се налазе у врло снажној међусобној повезаности. Прва реакција је протеинска синтеза или почетна реакција метионин-хомоцистеин-метионин циклуса. Друга реакција је надградња S-аденозилметионина. Да би се реакција трансформације метионина до S-аденозилметионина одиграла неопходно је да буде катализована ензимом метионин-аденозил-трансферазом (EC 2.5.1.6). Овај ензим је присутан у три изоензимске форме. Једна метионин-аденозил-трансфераза је присутна у јетри и има релативно високу вредност Км и она је позитивно модулисана аденозилметионином. Захваљујући овој ензимској форми, јетра је у могућности да успешно учествује у контроли повишених вредности метионина у исхрани и циркулацији. Способност јетре да учествује у разградњи повишених вредности метионина у исхрани и циркулацији, омогућена је само ако у њој постоји ова ензимска форма (метионин-аденозил-трансфераза).

Приликом метаболизма метионина у јетри у њој долази до великих (скоковитих) промена концентрације аденозилметионина. Овакав буран процес разградње се не догађа у другим ткивима и органима, јер је вредност ензима метионин-аденозил-трансферазе у њима релативно уједначена. Аденозилметионин у највећем делу остаје депонован у ћелијама где је и настао (6).



Слика бр. 3

Метил група из аденозилметионина се може предати у некој од трансметилационих реакција или се може под дејством ензима аденозилметионин

декарбоксилазе даље подвргава процесу декарбоксилације (ЕС 4.1.1.5). У овом процесу декарбоксилације, метил група даје пропиламинско језгро, које је неопходно за синтезу полиамина, као што је на пример путресцин. Декарбоксилацијом настали 5–метилтиоаденозин се укључује даље у кружни процес, из којег као коначни резултат настаје ресинтеза метионина. У великом броју радова је доказано да се на овај пут декарбоксилације утроши свега око 10% аденозилметионина, док се остали део употребљава за даљу синтезу хомоцистеина (7).

Остатак од 90% аденозилметионина представља важан извор метил групе. Он се даље укључује у различите биохемијске процесе и предаје многим донорима у присуству различитих трансфераза уз издвајање S-аденозилхомоцистеина. Један од најважнијих ензима из ове групе трансфераза је глицин-метил-трансфераза.

Највећи капацитет од свих ензима који учествује у катализацији трансметилације без обзира на хемијски састав метил донора је S-аденозилхомоцистеин и он уједно представља и најснажнијег инхибитора овог процеса. Да би се обавила нормална кинетика у трансметилационом циклусу неопходно је да овај процес буде правилно контролисан (благовременим уклањањем S-аденозилхомоцистеина). Да би дошло до уклањања овог метаболита неопходно је да се створе предуслови за правилно функционисање три биохемијска пута (8).

Први од ова три пута је ензимски катализован помоћу ензима аденозинхомоцистеиназе (ЕС 3.3.1.1) и он омогућава да дође до започињања метионин-хомоцистеин-метионин циклуса, из кога ће касније да настане хомоцистеин.

Други пут којим се уклања S-аденозилхомоцистеин је процес у којем се он везује за протеине унутар самих ћелија. Ако је капацитет интраћелијског везивања преоптерећен (успорен) онда се вишак S-аденозилхомоцистеина транспортује изван ћелија. Овако створени метаболити се могу депоновати и у паренхиму бубрега (9). Овај процес је катализован са два карактеристична ензима и то бетаин-хомоцистеин-метилтрансфераза и метилфолат-хомоцистеин метилтрансфераза.

У трећем путу долази до трајног уклањања хомоцистеина из организма. Било који од наведених метаболичких путева може да буде обављен у самој ћелији у којој долази до надградње хомоцистеина или може даље да се транспортује у други орган као што је јетра у којој се катаболички процеси много брже одвијају. Да би се наставио процес ресинтезе хомоцистеина, неопходно је да у организму и ткивима буде присутан ензим бетаин-хомоцистеин-метилтрансфераза (ЕС 2.1.1.5) (10).

Други ензим који учествује у катализацији трансметилационог процеса у готово

свим ткивима сисара је метилфолат-хомоцистеин метилтрансфераза. Као главни метил донор у овој реакцији се појављује 5-метилтетрахидрофолат. Незаменљиви кофактор за функционисање ензима метил-хомоцистеин метилтрансферазе је цијанкобаламин. Поменуте метилазе у процесу ресинтезе хомоцистеина имају и трећег такмаца цистатион- β -синтетазу. Овај ензим започиње уклањање хомоцистеина из метионин-хомоцистеин-метионин циклуса у транссулфурационом метаболичком путу и као његов крајњи продукт настаје цистеин. У овом процесу учествује и ензим с-цистационаза. Оба ензима (цистатион- β -синтаза и с-цистационаза) су зависна од пиридоксал-фосфата (11).

1.2.1. Заступљеност ензима укључених у метаболизам хомоцистеина по органима и ткивима

Ензими који су укључени у метаболизам хомоцистеина нису равномерно заступљени у свим органима и ткивима. Највише ових ензима се налази у јетри. У њој је најзаступљенији изоензимски облик метионин-аденозил трансферазе са највећом вредности Км. Поред тога у јетри свих сисара најраспрострањенији ензим је бетаин-хомоцистеин метилтрансфераза. Од свеукупног броја ензима који су присутни у организму, једини који се налази у свим органима и ткивима сисара је метилфолат-хомоцистеин-метилтрансфераза.

Одређених ензима као што је цистатионин- β -синтаза нема у срцу, плућима, тестисима, надбубрежној жлезди и слезини. Ензим с-цистационаза се не налази у мозгу и адипоцитима. У организму сисара транссулфурациони пут метаболизма хомоцистеина се у потпуности може обавити у само четири органа: јетри, бубрезима, малом интестинуму и панкреасу. Уједно су ово органи који имају и највећу потребу за ресинтезом глутатиона (12).

1.2.2. Механизми који регулишу метаболизам хомоцистеина

Да би се правилно регулисао метаболизам хомоцистеина, неопходно је да у организму дође до обезбеђивања равнотеже у брзини одвијања два метаболичка пута, чија се додирна тачка налази баш на нивоу стварања хомоцистеина. Та два пута чине, циклус ресинтезе метионина с једне и транссулфурациони пут, с друге стране. Основна улога ензима цистатион- β -синтетазе је да омогући започињање транссулфурације и да

узме учешћа у процесу уклањања хомоцистеина из организма. Главна улога ензима глицин-трансферазе је да учествује у елиминацији метил групе метионина. Да би се постигла равнотежа са овим наведеним процесима, неопходно је да се обави метилација хомоцистеина. Процес метилације се обавља са квантитативно најзначајнијом метилфолатхомоцистеин-метилтрансферазом, и мањим делом под дејством бетаин-хомоцистеин метилтрансферазе (13).

Начин расподеле хомоцистеина између ова два наведена пута модулисан је помоћу два механизма. Први механизам расподеле се заснива на потенцирању различитости у афинитетима ових ензима (метилаза) за супстрат. Км вредности за обе метилазе износе 0,6 mmol/L хомоцистеина. Са друге стране, вредности Км за ензим цистатион-синтазу су сто пута веће у односу на обе метилазе. Из ових наведених података се може закључити да је конзервација метионина кроз реметилациону секвенцу значајно фаворизованији метаболички пут. Такође, на основу овог сазнања, можемо да приметимо да ензим цистатион-синтаза може да започне коришћење хомоцистеина тек у условима када је капацитет за метилацију хомоцистеина већ засићен (преостали део).

Други регулациони механизам се у основи заснива на карактеристикама три метаболита: аденозилметионина (AdoMet), аденозилхомоцистеина (AdoHcy) и 5-метилтетрахидрофолата (МТНФ). Улога AdoMet-а је да инхибира синтезу МТНФ-а и инактивира активност бетаин-метилтрансферазу. Повећање концентрације AdoMet, које настаје као логична последица значајнијег уноса метионина храном фаворизује појачану активност трансулфурационог пута, што за коначни резултат има директну инхибицију метилације хомоцистеина, због спречавања синтезе довољне количине МТНФ. Будући да је концентрација AdoMet најизраженија у јетри, онда је и расподела између конкурентских метаболичких путева у њој релативно већа у односу на остале органе (14).

Независна истраживања спроведена са намером да се испита утицај AdoMet на регулацију метаболизма хомоцистеина су потврдила и допунила наша сазнања о инхибицији глицин метил-трансферазе МТНФ-ом. Резултати ових истраживања су открила још један, допунски механизам регулације метаболизма хомоцистеина. Наиме, инхибиција синтезе МТНФ-а помоћу AdoMet-а узрокује редукцију инхибиције глицин трансферазе и самим тим омогућава да се трансулфурациони пут наметне као примарни и доминантни. У случају смањења вредности AdoMet-а очекује се супротан ефекат (15).

Утицај аденозил хомоцистеина (AdoHcy) на регулацију метаболизма хомоцистеина је у потпуној супротности са утицајем AdoMet-a. С обзиром да је његово дејство занемарљиво у јетри, он има важан утицај у нехепатичним ткивима, где му концентрација флукутира много више од AdoMet-a (16).

1.2.3. Грешке у регулацији метаболизма хомоцистеина-хиперхомоцистеинемиа

Досадашња сазнања су показала да повећан унос метионина храном може да иницира одступање од физиолошке регулације метаболизма хомоцистеина односно повећање његових вредности (хиперхомоцистеинемиа). У најчешће факторе који могу да утичу на настанак хиперхомоцистеинемиа спадају: генетски, недовољна количина ко-фактора за ензимски катализоване реакције у метаболичком путу хомоцистеина. Након великог броја обављених научних истраживања, откривене су грешке настале у метаболизму хомоцистеина, које су очигледно биле изазване генетским променама, што се значајно одразило на правилну синтезу ензима цистатион-синтетазу и метилентетрахидрофолат редуктазу (MTHFR). Такође су откривене грешке у синтези бетаин-хомоцистеин метилтрансферазе (BHMT) и метионин-синтазе, али због тога што се ретко догађају слабије су и изучаване (17).

Повећане вредности хомоцистеина у организму-хиперхомоцистеинемиа, у основи значи повећање како слободног тако и везаног хомоцистеина, дакле ради се о повећању концентрација укупног хомоцистеина. Такође долази до повећања концентрације интрацелуларног Аденозилхомоцистеина (AdoHcy), што за последицу има инхибицију AdoMet зависних трансметилационих реакција. Ове промене би могле да представљају главни узрок накнадних биолошких и хемијских ненормалности. Да би се боље и лакше разумела проблематика настанка и последица хиперхомоцистеинемиа, неопходно је да се изврши систематизација фактора, који могу, познатим и непознатим механизмима да доведу до ове појаве. Факторе који могу да изазову настанак хиперхомоцистеинемиа делимо на: генетске, физиолошке, патолошке и фармаколошки активне супстанце.

1.2.3.1. Утицај генетских фактора на настанак хиперхомоцистеинемije

Као што смо навели раније, утицај генетских фактора на појаву настанка хиперхомоцистеинемije је до сада доста проучен. Својом активношћу ензим метилентетрахидрофолат-редуктаза (MTHFR) омогућава конверзију 5, 10 метилентетрахидрофолата у 5-метилентетрахидрофолат, у присуству NADPH. Једињење 5-метилентетрахидрофолат је супстрат за цијанкобаламин зависну метионин синтазу. Метилентетрахидрофолат редуктаза (MTHFR) је флавин зависни ензим, који се састоји од две једнаке 77 кДа субјединице, са N-терминалним каталитичким доменом и с-терминалним регулаторним доменом.

До сада је описано око 50 случајева тешке MTHFR дефицијенције, који су били праћени тешким неуролошким и васкуларним компликацијама. Овај ген, одговоран за синтезу ензима је клониран, и описано је до сада 14 карактеристичних мутација. У најчешће мутације које доводе до појаве води ка термолабилности ензима, су познате као С677Т. Ова мутација је изазвана аланин-валин супституцијом. Оно што карактерише ову мутацију је то да се она јавља доста често али да се разликује по учесталости јављања зависно од етичке припадности. У Канади, код припадника француске популације, она се креће негде око 38%, док код припадника афричког дела америчке популације, износи једва око 10%. У другим научним студијама проценат присуства ових мутација се креће између 25-39%. Питање заступљености појаве ове мутације која доводи до појаве хиперхомоцистеинемije (квантитативна заступљеност) код хомозигота у односу на хетерозиготе није до краја одговорено (18).

Витамин Б12 зависна метионин-синтаза (MS) присутна је у свим ћелијама и ткивима организма сисара. У односу на неке друге генетске малформације учесталост јављања грешака у синтези овог ензима дефинитивно је много мања у односу на MTHFR, али је данас она предмет научних проучавања. Хемијска структура MS сДНК је данас позната и она се састоји од 3798 нуклеотида, који детерминишу секвенцу од 1265 аминокиселина, укупне молекулске масе 140 кДа. Захваљујући истраживању фибробласта пацијената са MS дефицијенцијом, одређена су два типа MS дефицијентне болести. Један тип болести је познат као cblE, док је други познат као cblG тип. Поремећаји код cblE алтернације се односи на редукцију самог MS ензима, док се промене код cblG типа односе на промену MS апоензима (19).

Да би дошло до укључивања у трансулфурациони пут, хомоцистеин мора бити катализован витамин Б6 зависном цистатион-β-синтазом (CBS). Овај ензим има

ограничену ткивну дистрибуцију. До сада су истраживачи успели да опишу неколико стотина случајева CBS дефицијенције. Овај облик поремећаја је уједно и најчешћи узрок јављања хомоцистеинурије. Хумани облик сДНК за CBS располаже са 2554 нуклеотида, који кодирају секвенцу субјединице од 551 аминокиселина молекуларске масе око 63 кДа. На овом CBS гену је откривено око 40 мутација. Претпоставља се да је 0,5-1,5% сваке популације захваћено хетерозиготном формом CBS-дефицијенције. Због немогућности а једним делом и незаинтересованости научних кругова до сада је у највећем броју случајева овој део популације остајао неоткривен. Ензимски дефицит овог типа се због ових разлога до сада водио као асимптоматски. Код ових болесника вредности хомоцистеинемије су благо повишене. Имајући у виду чињеницу да је овај облик генетског поремећаја до сада био третиран као асимптоматски, у научним круговима су у току опсежна испитивања везана за евентуалну повећану осетљивост ових особа на хомоцистеин индуковане ноксе. Код хомозиготних форми асимптоматских болесника, вредности хомоцистеинемије се често крећу и више од 50 $\mu\text{mol/L}$, код њих је такође повећана и концентрација метионина (20).

1.2.3.2. Утицај физиолошких фактора на вредност хомоцистеина

У групу физиолошких фактора који могу да утичу на вредност хомоцистеина убрајамо следеће: старост, пол, и начин живота. Услед процеса старења, може доћи до повећања средње концентрације укупног хомоцистеина. Код особа старијих од 50 година у зависности од припадности одређеној популационој групи, може доћи до повећања вредности хомоцистеинемије просечно и до 1,9 $\mu\text{mol/L}$, него код оне која је млађа од ове критичне старосне границе. За разлику од мушке популације, где се вредност хомоцистеинемије креће око 1,6 $\mu\text{mol/L}$, код жена ова вредност може бити још израженија и износи 2,2 $\mu\text{mol/L}$.

Са друге стране, концентрација укупног хомоцистеина код мушкараца је за око 25% виша него код пременопаузалних жена. Тек после менопаузе ова разлика се значајно смањује па некад и потпуно нестаје. Током трудноће, због смањења концентрације циркулишућих албумина за који се везује већи део хомоцистеина, долази до карактеристичног смањења хомоцистеинемије. Врста и начин исхране такође спадају у врло важан елемент који може да утиче на вредност хомоцистеина. Код здравих особа, ниво серумског укупног хомоцистеина варира са уносом метионина храном. На основу великог броја истраживања можемо да запазимо да је храна

животињског порекла много богатија метионином од других врста намирница. Као пример заступљености хомоцистеина у појединим намирницама навешћемо неке од њих.

- Месо и риба - 2,7 g/100 g,
- јаја - 3,2 g/100 g,
- кравље млеко - 2,9g/100 ml,
- хумано млеко - 1,4 g/100 ml метионина.
- Воће и поврће - 0,9-1,2 g/100 g, са изузетком бресака и грожђа - 3,6/100 g

На основу нових истраживања, која су обављена у *in vitro* условима није уочена међуреакција између липопротеина и хомоцистеина (21).

Општи услови и начин живота, уз излагање факторима ризика као што су пушење, алкохол, слаба физичка активност, изложеност стресу, су најчешће праћени са појавом хиперхомоцистеинемije.

1.2.3.3. Утицај патолошких стања на хиперхомоцистеинемiju

Из великог броја научних студија може се закључити да се као најчешћи разлог појаве умерене хиперхомоцистеинемije наводи недостатак одређених група витамина. Сама улога витамина у овим стањима је неопходна да би се потпомогло испољавање катаболитичких активности ензима који су укључени у метионин-хомоцистеин-метионин циклус. Од најважнијих витамина који су укључени у овај процес можемо навести следеће; цијанкобаламин, пиридоксал фосфат, фолна киселина. После многобројних истраживања, заузет је општи закључак да су неадекватна исхрана или стање малапсорпције у којима недостају ове супстанце, саме по себи повећавају ризик од појаве хиперхомоцистеинемije. Повишене вредности хомоцистеина у организму се могу јавити и код здравих, правилно храњених особа услед постојања негативне корелације између нивоа ових витамина и хомоцистеина. Овај однос је још израженији посебно код старијих особа, када се ради о витамину Б12 (цијанкобаламин). Сличан однос се јавља и у случају фолне киселине, посебно код старијих особа, мада су истраживања код припадника ове популације доста оскуднија у односу на резултате код припадника млађих популација. Вредност хомоцистеина представља осетљивији параметар за детекцију вредности витамина од хематолошких параметара као нпр. макро-овалоцитозе MCV (>100fL), хиперсегментације полиморфонуклеара, или

директног одређивања серумског витамина Б12, плазматског или еритроцитног фолата (22).

Дијагностиковање смањених вредности цијанкобаламина се дифренцира у односу на смањену вредност фолата тако што се тражи налаз повишених вредности метилмалоничне киселине. Њена повишена вредност заједно са повишеном вредношћу укупног хомоцистеина, дају слику хиповитаминозе Б12.

Од три наведена витаминска кофактора (цијанкобаламин, пиридоксал фосфат, фолна киселина) утицај витамина Б6 на метаболички циклус хомоцистеина је најслабије истражен. Ако се пацијенти, који имају урођено смањење активности цистатион- β -синтазе, третирају редовно са пиридоксал-фосфатом (Б6) може доћи до смањења нивоа хомоцистеина у крви (али не и до физиолошких вредности). Малапсорпција витамин Б6 је много ређа од претходно наведених те је и вероватноћа за утицај исте на концентрацију хомоцистеина много мања. Вредности хомоцистеина у крви се налазе у директном односу са серумским креатинином и гломеруларном филтрацијом. Код повишених вредности уреје у крви, вредност редукованог хомоцистеина није повећана док је вредност протеински везаног хомоцистеина повишена. Ако бисмо спровели суплементациону терапију фолатима дошло би до побољшања резултата, али се вредности хомоцистеиније никада не враћају на нормалу.

Резултати добијени после третмана витамина Б6 у основи су имали још слабији ефекат. Недовољно изражен одговор на третман фолном киселином може да се објасни присуством инхибитора фолатне коњугазе, који је недавно откривен код пацијената на хемодијализи. Да би дошло до активирања фолне киселине неопходно је да се изврши додавање глутамилног остатка неактивној форми витамина, што ће за резултат имати награђу активног фолиполиглутамата. Дужина додатог радикала је контролисана равнотежним деловањем фолат-коњугазе, која тежи одвајању глутамилних остатака од полиглутамил-фолата, и фолил-полигамаглутамат-синтетазе која тежи додавању глутамилних остатака. Најснажнију биолошку активност имају фолилполиглутамати кратких ланаца, којих из горе поменутих разлога, код уремичних пацијената нема довољно. Примећено је и да хронична уремија, такође нарушава екстрареналну активност ензима одговорних за метаболизам хомоцистеина (23).

Поред јетре и бубрег представља значајно место у коме се обавља метаболизам хомоцистеина. Други механизам који се намеће као фактор који може да утиче на његов метаболизам су оштећене тубуларне ћелије, које више нису у могућности да

ефикасно обављају транссулфурационе процесе у катаболизму хомоцистеина. После трансплантација бубрега и срца долази до повећања хомоцистеинемije, која се налази у позитивној корелацији са количинама примењених имуносупресива циклоспорином и кортикостероидима (24).

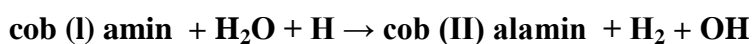
Поремећај нормалног метаболизма хомоцистеина може да буде присутан и код пацијената који болују од шећерне болести (Diabetes mellitus gradus I). Услед развоја болести може доћи до повишеног ризика за појаву микро и макроангиопатије, са ретинопатијом и нефропатијом, које су доста честа последица присуства ове болести. Присуство хиперхомоцистеинемije је евидентирано у пацијената код којих су дијагностиковани одмакли стадијуми ретинопатије. Код припадника ове групе, знаци хиперхомоцистеинемije су се јавили само код оних пацијената који су поред поменуте компликације имали присутне знаке нефропатије. За разлику од њих код пацијената који нису имали, или су били присутни минимални знаци ретинопатије, нису регистроване повишене вредности хомоцистеина (25). Болесници који болују од шећерне болести (Diabetes mellitus) имају често присутне и макроангиографске компликације уз изражену хиперхомоцистеинемiju што скупа доприноси појави нефропатије. Начин на који се одвија процес убрзане појаве атеросклерозе у горе наведеним случајевима није још разјашњен. Многи истраживачи га доводе у везу са поремећеним метаболизмом хомоцистеина на нивоу бубрега.

Велики број научних радова је обављено са циљем да се испита дејство различитих фармаколошки активних супстанци на ниво хомоцистеина у крви. Уочена је могућност да се из неколико фармаколошких група, путем различитих механизма, може извршити деловање на ниво хомоцистеинемije. У најважније супстанце које могу да утичу на њену вредност убрајамо: антифолате, азот моноксид, антагонисте витамина Б6, Л-допу, хормонску терапију, антиепилептике, деривате жучних киселина и алкохол.

Антифолати. Уз помоћ метотрексата, као инхибитора ензима дихидрофолат редуктазе може да дође до успоравања регенерације и одложене разградње редукованих фолата укључујући и 5-метилтетрахидрофолат. Услед овог дејства ствара се могућност обављања правилне реметилације хомоцистеина у метионин. Вредност укупног хомоцистеина у плазми представља осетљиви показатељ антифолатног дејства метотрексата који може бити повољан код одређених болести као што су неоплазме, псоријаза и реуматодни артритис. При дневној дози од 25 mg хиперхомоцистеинемija овог типа ће достићи свој максимум тек након два дана. Ако се примени метотрексат у дневној дози од 1-3,6 g код пацијената оболелих од канцера хиперхомоцистеинемija ће

достигнути свој максимум за свега неколико сати (26).

Азот моноксид. Ако болеснике изложимо дејству азотсубоксида (N_2O), као анестетичког агенса, може доћи до повећања вредности хомоцистеина. Испитивања која су спроведена у (*in vitro*) условима су показала да постоје карактеристичне интеракције између азот субоксида и цијанкобаламина:



Овај интерактивни процес се одвија у условима нормалног испољавања каталитичке активности метионин-синтазе, која бива онемогућена, због везивања ослобођених ОН радикала за активно место на ензиму. Сличан механизам се одвија и у инактивацији метилмалонил-СоА, али само при дужем деловању азот-субоксида. На основу ових механизма деловања се може објаснити и нагомлавање 5-метилтетрахидрофолата, као и повећан губитак фолата урином. Када дође до повећаног нивоа укупног хомоцистеина у плазми почеће процес депоновања у ћелије (27). Услед снажног деловања азот монооксида (NO), може доћи до инактивације ензима метионин-синтазе које се испољава много снажније него што је то случај код дејства азот-субоксида. До ових резултата се дошло на основу испитивања ћелија јетре пацова. Имајући у виду вишеструки значај азот монооксида у биохемијској регулацији ове студије се настављају.

Антагонисти витамина Б6. У терапији рефрактарне псоријазе коришћен је антимаболит Азауридин. Он је својим антагонистичким деловањем на витамин Б6, довео до појаве хиперхомоцистеинемije. Поред тога изазива и тешке промене на васкуларном систему те је његова даља употреба забрањена. Због повлачења из употребе сам механизам његовог деловања никада није до краја разјашњен (28).

Лек Л-допа се користи у лечењу пацијената који болују од Паркинсонове болести. Својим деловањем Л-допа, повећава вредности допамина у мозгу. Пут којим се одвија процес катаболизма је О-метиација до 3-О-метил-допе. Ензим који катализује ову реакцију је катехол-О-метилтрансфераза, а као извор метил групе користи S-аденозилметионин. Утврђено је да у овом процесу долази до смањена концентрација S-аденозилметионина и истовременог повећања концентрације S-аденозилхомоцистеина. Применом појединачних доза Л-допе, долази до развоја хиперхомоцистеинемije. Континуираном (хроничном) применом ове супстанце хиперхомоцистеинемija се одржава. Поред Л-допе, постоји одређен број једињења која представљају супstrate

ензима S-аденозилтрансмeтилазе, чији је утицај на вредност хомоцистеинаније доста добро истражен (29).

Хормонска терапија. Тврдња појединих истраживача да вредност укупног хомоцистеина зависи од хормонског статуса је новијим сазнањима потврђена. Њихово запажање проистекло је на основу праћења вредности хомоцистеинемиије код пременопаузних жена и мушкараца у односу на вредности код постменопаузних жена. Установљено је да су вредности хомоцистеина снижене код прве а повишена код друге групе. Ова запажања су касније потврђена чињеницама да су вредности хомоцистеина код трудница и жена у менопаузи на супституционој терапији биле снижене.

Приликом примене контрацептива, на бази естрогена, само у периодима циклуса, уочено је повећање нивоа хомоцистеинемиије, са повећаним лучењем хормона. У стањима када нису коришћени контрацептиви, промене у вредностима хомоцистеина нису регистроване. Механизам на основу кога би се могле објаснити ове појаве нису до краја разјашњене. На основу радова који су спровођени у овој области постоје основане индиције да естрогени могу смањити нивое кобаламина и фолата, без клиничких знакова хиповитаминоза. Примена антагониста естрогена типа тамоксифена узрокује смањење вредности укупног хомоцистеина за 30% у периоду од 6 до 12 месеци (30).

Антиепилептици. Услед примене антиепилептика из групе фенитоина и карбамазепина тада може доћи до повећања хомоцистеинемиије. Највероватнији механизам који доводи до ове појаве представља поремећај хомеостазе фолата (31).

Терапија дериватима жучних киселина (колестипола и њему сличних препарата), иницира повећање укупне вредности хомоцистеина. Ово повећање се јавља услед дефицита фолата који је најчешће узрокован поремећеном апсорпцијом (71) (32). Претерана употреба алкохола може да доведе до појаве различитих типова хиперхомоцистеинемиије. Стална хиперхомоцистеинемиија се јавља код тешког облика хроничног алкохолизма када је већ дошло до развоја болест јетре. Акутна алкохолисаност је најчешће праћена пролазном хиперхомоцистеинемиијом која се не испољава значајним оштећењем јетре. У оба случаја настаје нарушавање метаболизма фолата који је карактеристичан за ову групу болесника. Због повећане учесталости можданих крварења, регистрованих код особа које претерано конзумирају алкохол, тренутно се спроводи већи број истраживања (33).

За разлику од горе наведених материја, постоје фармаколошки активне супстанце које могу да смање ниво хомоцистеина. У ову групу спадају аденозин и сродна једињења и сулфхидрилне супстанце. Аденозин и њему сродна једињења су

инактиватори или инхибитори ензима S–аденозилхомоцистеин-хидролазе. Овај ензим је одговоран за хидролизу S-аденозилхомоцистеина до хомоцистеина. У случајевима акумулације S-аденозилхомоцистеина корисно је користити ове супстанце као антивиралне агенсе (33).

Из групе сулфхидрилних супстанци које редукују вредности хомоцистеина испитане су диметилцистеин (D-пенициламин) (метал измењивачки агенс са применом у терапији реуматоидног артритиса), N-ацетилцистеин (муколитичко средство) и 2-меркамптоетан сулфонат (хемотерапеутски протектор). Код сва три типа ових једињења присутна је слободна сулфхидрилна група способна да учествују у изградњи дисулфида у плазми. Ова једињења ступају у хемијску интеракцију овог типа и са хомоцистеином, што као крајњи резултат снижава концентрацију истог. Код пацијената са хомоцистеиниуријом D-пенициламин може да смањи слободан и протеин везани хомоцистеин за 50 до 90%. Супстанца 2-меркамсулфонат може да преполови вредност хомоцистеинемije код пацијената који болују од канцера. Ово смањење се постиже након спровођења третмана после свега неколико дана примене. N-ацетилцистеин такође смањује укупни хомоцистеин за 20 до 50% за разлику од слободне фракције која расте (34).

1.3. Биолошке облици и референтни интервали хомоцистеина

1.3.1. Време узорковања

Присуство есенцијалне аминокиселине, метионина у организму сисара, се обезбеђује једино путем хране која је богата протеинима. На основу ове чињенице се може закључити да унос хране која је богата протеинима утиче на ниво хомоцистеина у крви. Прва истраживања која су била везана за одређивање нивоа хомоцистеина у крви су показала да се његова вредност пре и после уноса хране значајно разликује. Мерење хомоцистеинемije 2-4 сата после доручка, који је био богат протеинима, указује на то да се вредност хомоцистеинемije значајно смањује. На основу резултата темељних студија дошло се до закључка да у року од 1-4 сата после доручка са 15 до 18 g протеина, долази до смањења вредности хомоцистеина. Ако се у току ручка унесе око 50 g протеина, тада ће након три сата вредност хомоцистеина почети благо да расте,

док би концентрациони максимум наступио после 6-8 сати. Вредност хомоцистеина ће у првој половини следећег дана бити већа од оне која је измерена пре узимања ручка богатог протеинима (35).

Време полуживота хомоцистеина се креће између 3-4 сата, што говори о томе да се хомоцистеин из организма релативно споро излучује. Спора елиминација хомоцистеина из организма нам указује на могућност његове вредности 12-20 сати након оброка који је био богатог протеинима. Објашњење пада хомоцистеина после оброка се доводи у везу са сазнањем да се у периоду од неколико сати по узимању оброка елиминише хомоцистеин који је био унет претходног дана. На основу овог сазнања се препоручује, да се узорковање обави наташте, и са посебним нагласком на састав задњег оброка. Увече пре узорковања се препоручује лагани оброк. Ујутро се обавља вађење крви не дуже од 3 сата после доручка, а обавезно пре ручка. У плазми је 80% укупног хомоцистеина везано за протеине. У лежећем положају је концентрација хомоцистеина нижа него у седећем положају. О овој чињеници морамо водити рачуна приликом стандардизованог начина вађења крви. Приликом вађења крви, ради испитивања на здравим добровољцима, запажене су смањене вредности нивоа хомоцистеина и то оних особа којима је крв узимана у лежећем положају и за 29,9% (3,5 mmol/L) у односу на оне који су се налазили у седећи положај (36).

1.3.2. Стабилност хомоцистеина у пуној крви

После вађења крви концентрација укупног хомоцистеина у серуму и плазми највише зависи од начина припреме серума и плазме. Пошто се метаболизам метионина интензивно наставља у еритроцитима после венепункције, то доводи до преласка хомоцистеина из еритроцита у екстрацелуларни простор. Да би се ово избегло неопходно је да се после прикупљања крви, иста стави у посуду са ледом и центрифугирати у року од једног сата, ради избегавања повећања укупног хомоцистеина. Ово повећање вредности хомоцистеина је независно од његове затечене концентрације у екстрацелуларном простору.

До сада није постигнут консензус о најбољем начину конзервације хомоцистеина. Најбољи резултати су добијени са натријум-флуоридом, лимунском киселином и 3-де-азааденозином. Доста често се спомињала примена EDTA која не може директно да инхибира излазак хомоцистеина из еритроцита, већ само да спречи оштећење еритроцита у току коагулације, чиме се процес успорава. Ефекат је видљив

само ако се крв или плазма охладе на $+4^{\circ}\text{C}$. Једна од познатих супстанци која такође омогућава парцијалну инхибицију изласка хомоцистеина из еритроцита је натријум-флуорид који одржава приближно константне услове при собној температури. Ако подигнемо хлађење плазме на $+4^{\circ}\text{C}$, инхибиција изласка хомоцистеина из еритроцита је скоро потпуна. И поред ових чињеница до сада није постигнут договор око концентрација погодних за примену. У стањима лимитиране концентрације натријум-флуорида од 100 mmol/L , којом се остварује повећана стабилност у трајању од 2 сата, приметан је излазак воде из еритроцита у екстрацелуларни простор услед осмотских промена, који је управо изазван додатком натријум-флуорида. Услед ових промена долази до значајне дилуције, која за последицу иницира излазак хомоцистеина из еритроцита. Инхибиција трансформације S-аденозил хомоцистеина у хомоцистеин обавља се дејством 3-деаденозина. У *in vitro* условима једињење 3-деаденозин има јачи ефекат на блокаду изласка хомоцистеина из еритроцита од натријум-флуорида. Под дејством овог једињења наступа потпуна инхибиција процеса изласка хомоцистеина у току 72 сата. 3-деаденозин не интерферира код HPLC одређивања хомоцистеина, али због конкуренције са C-аденозинхомоцистеином не може да се користи код имуно-одређивања. Приликом примене лимунске киселине у концентрацији од $0,5\text{ mol/l}$ обезбедљује се потпуна стабилност нивоа хомоцистеина у пуној крви 6 сати на 23°C , али су механизми који то остварују до сада остали непознати. Претпоставља се да до прекида у метаболизму хомоцистеина долази због снижених рН вредности. На основу досадашњих истраживања из ове области претпоставља се да постоји блага "baseline" интерференција код HPLC одређивања, услед којих долази до ниже вредности у односу на коришћење EDTA као конзерванса (37).

1.3.3. Стабилност хомоцистеина у серуму и плазми

Ниво хомоцистеина у серуму и плазми је врло стабилан. Стабилност хомоцистеина на собној температури износи 4 дана, на $0-2^{\circ}\text{C}$ неколико недеља, а на -20°C неколико година. Узастопно замрзавање и одмрзавање плазме или серума не утиче значајно на његову концентрацију. Приликом вађења крви коришћењем повеске (у просеку око 3 минута) наступа процес венске стазе, који изазива повећање хомоцистеинемije од 2,8%. На основу великог броја досадашњих студија, утврђена варијација код укупног хомоцистеина износи 7-9,4% (38).

1.3.4. Референтне вредности хомоцистеина

На основу различитих извора интер-самостална варијација у здравој популацији износи 24 до 34%. До сада није постигнут консензус око тога која је горња граница референтних вредности за укупни хомоцистеин. Код здравих особа распон концентрације се креће од 5-15 mmol/L, при чему је дистрибуција померена према горњим вредностима. Гранична референтна вредност се нажалост битно разликује у зависности од лабораторије у којој се анализа спроводи. Ове наведене варијације нису само последица коришћења различитих метода одређивања или различитог начина вађења крви, већ настају и због различитог квалитета стандардног узорка. Примећено је да дистрибуција вредности хомоцистеина у плазми и серуму постаје правилнија након третирања одговарајућим витаминима (Б комплекса) који су одговорни за правилан метаболизам хомоцистеина.

Ову разноликост података можемо илустровати следећим примерима. Велико и темељно испитивање које је за циљ имало да утврди утицај хомоцистеина на појаву каротидне стенозе показало је да горња граница референтних вредности износи 14 $\mu\text{mol/L}$. Ипак има и података да се толерантним могу сматрати вредности укупног хомоцистеина од 15,8 mmol/L (за условно здраву групу особа без провере нивоа карактеристичних витамина, односно без суплементације истих). Услед свега горе наведеног као и због разноврсности фактора који утичу на ниво хомоцистеинемije, референтне вредности хомоцистеина морају бити одређене појединачно за сваку популацију (39).

1.4. УЛОГА ХОМОЦИСТЕИНА У ПАТОГЕНЕЗИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

Резултати великог броја експерименталних студија указују на могућност постојања повезности између хиперхомоцистеинемije и повећане склоности за појаву атерогенезе. Услед присуства повишених вредности хомоцистеина, у организму могу да се развију значајне патолошке промене, које захватају значајан део васкуларног система. Патолошке промене које су настале као последица хиперхомоцистеинемije се битно разликују од истог типа лезија које су узроковане недостатком витамина Ц. Промене које настају на крвним судовима, услед дефицита витамина Ц, су последица смањења оксидативног метаболизма хомоцистеина. Због недостатака

дехидроаскорбата, који је неопходан у процесу успоравања оксидације хомоцистеина у хомоцистеинску киселину, долази до ремећења нормалног тока трансформације хомоцистеина у хомоцистеинску киселину. Да би дошло до конверзије фосфоаденозинфосфосульфата, у сулфатне естре, који играју врло важну улогу у синтези сулфатизованих протеогликана конективног ткива, неопходно је присуство прекурсора хомоцистеинске киселине (40).

Такође хомоцистеинска киселина има значајну улогу у модулацији деловања хормона раста и активност на N-метил-D аспартата (NMDA). Из напред наведеног се може закључити да недовољно присуство адекватне количине аскорбинске киселине описаним механизмом, може да доведе до повећања кртости конективног ткива и смањења кохезионности ендотелних ћелија у зидовима крвних судова (41).

На тај начин повећано присуство хомоцистеинске киселина би могло представљати погодан услов за нормалан процес сулфатизовања протеогликана. Услед нормализације овог процеса аутоматски би дошло и до одржавања нормалног интегритета васкуларног зида. На основу експерименталних радова потврђено је да синтеза сулфатизованих протеогликана није успорена, иако је концентрација хомоцистеина повећана, због тога што се уместо фибриларне форме ствара глобуларна форма сулфатизованих протеогликана. Приликом извођења *in vitro* огледа у стањима вештачки изазване хиперхомоцистеинемije, културе нормалних ендотелних ћелија, почињу да синтетишу измењену форму сулфатизованих протеогликана. Приликом спровођења овог истраживања, примећено је да се на овај процес надовезује повећано присуство хомоцистеин тиолактона, који се у стањима хиперхомоцистеинемije значајно повећава. Претпоставља се да хомоцистеин тиолактон поспешује акумулацију сулфат-богатих протеогликана у облику до сада већ регистрованог метахроматичног материјала.

Ако бисмо желели ово стање да посматрамо са хемијског аспекта, појачана сулфатна естерификација праћена појавом глобуларних сулфатизованих протеогликана се може довести у везу са интеракцијом негативно наелектрисаних протеогликанских остатака. Ови протеогликански остаци даље успостављају јонске везе са својим епсилон-амино групама. Настала једињења изазивају конформационе промене, које у крајњој линији доводе до успостављања кватернерне структуре глобуларног типа. Јони калцијума заједно са насталим кватернерним амонијум групама серумских липопротеина, испољавају велики афинитет сулфатним групама протеогликана и улазе у састав атеросклеротичног плака. Будући да је код њих присутан ја електростатички

набој, протеоглигани могу да закоче нормалну регулацију миоинтималних ћелија, што ће за крајњи резултат имати минималну пролиферацију атероматозне плоче (42).

Бројни литературни подаци указују на деструктивно деловање повишених нивоа хомоцистеина на сам колаген. Претпоставља се да су у овај процес деструкције укључена два механизма. У првом механизму се тврди да постоји поновна појачана сулфатација протеогликана, која доводи до повећане продукције колагених влакана. Други механизам деструкције се односи на реакцију хомоцистеина и алдехидних група проколагена у форму тиазолидина. Појачана продукција тиазолидина у основи ће да доведе до стварања абнормалног колагена, јер је онемогућена изградња нормалних попречних веза, између колагених влакана (crosslinks).

На основу спроведених патолошких истраживања, на телима умрлих особа које су боловале од тешких облика хомоцистеинурије на зидовима артерија откривена су велика оштећења ендотела. Ове промене су биле најизраженије на туници интими са њеном упадљивом хиперплазијом, вакуолизацијом и фиброзом. Примећено је присуство великог броја тромботичних промена, које су затварале облитерисан лумен крвних судова (43).

Поред процеса сулфатизације протеогликана који у крајњој линији доводи до нарушавања интегритета ендотела, на основу најновијих сазнања постоји и директно токсично дејство хомоцистеина. Експериментално изазвана хиперхомоцистеинемија код нехуманих примата ће довести до деендотелизације и задебљања интима. Код људи орални метионин тест оптерећења може да изазове десквamacију ендотелних ћелија, која се доказује циркулационим ендотелемијом. Сматра се да цитотоксични ефекат хомоцистеина у ендотелу може да буде посредован повећаном продукцијом слободних радикала и смањеном активношћу антиоксидационог система заштите (44).

Током процеса аутооксидације хомоцистеина два електрона се преносе на молекулу кисеоника. Супероксид (O^{2-}) настао у процесу аутооксидације и тиол радикал представљају интермедијере у овој оксидоредукцији, где се као крајњи продукт појављује водоник-пероксид. Непосредно токсично дејство супероксид радикала произилази из његове склоности да оксидује липопротеине мале густине (LDL), односно потпомаже повећано преузимање LDL честица од стране „scavenger“ ћелија. Овај механизам представља главни предуслов за настанак пенастих (foam) ћелија. Захваљујући дејству азот монооксида, као „релаксирајућег фактора“, кога производи ендотел, може се значајно супримирати ендотелна цитотоксичност хомоцистеина. Реакција хомоцистеина и азот-монооксида за резултат има стварање S-

нитрозохомоцистеина. Оба једињења (S-нитрозохомоцистеин и S-нитрозоцистеин), испољавају снажна вазодилаторна и антиагрегацијска својства. У стањима узнапредовалог оштећења ендотела крвним судовима је на располагању све мањи број ендотелних ћелије које су у могућности да стварају азот моноксид. Овако настало стање ће створити услове за повећање цитотоксичног ефекта хомоцистеина у функцији времена (45).

Код особа које болују од хомозиготне хомоцистеинурије јављају се рани знаци, венских и артеријских тромбоза. Ова доказана појава атеротромботичких промена настаје као последица утицаја хомоцистеина на промену баланса између прокоагулантних и антикоагулантних фактора. Поред ових ефеката овде можемо навести још нека од карактеристичних дејстава хомоцистеина као што су: селективна инхибиција деловања и секреције тромбомодулина, редукција активације протеина Ц и активација протеолизног активатора фактора V. До сада још није у потпуности разјашњен утицај хомоцистеина на фон Вилебрандов фактор и фактор VII. У значајном број радова је регистрована смањена активност антитромбина III, посебно код пацијената са хиперхомоцистеинемijом. Услед продужене инкубације хомоцистеина *in vitro*, доказано је његово смањено везивање за своје рецепторе и смањена протеолитичка активност ткивног активатора плазминогена (46, 47).

1.4.1. Утицај хомоцистеина на појаву коронарне болести

Седамдесетих година прошлог века је уочена чешћа појава коронарне болести код пацијената којима је регистрован поремећај метаболизма хомоцистеина. Ипак, још увек нема директних патолошких и анатомских налаза о променама у васкуларном систему код особа које имају више или мање изражену хиперхомоцистеинемijу (48).

Интересовање за ову проблематику почело је значајно да расте деведесетих година прошлог века. Тих година су почели су да се објављују и први радови који су указивали на корелацију повећаног нивоа хомоцистеина и учесталости коронарне болести (1992. и 1993. године) (49).

На основу ових радова и многобројних мета-анализа из 1995. године, које су спроведене на око 4000 особа, хомоцистеин је означан као један од 200 фактора ризика за настанак коронарне болести. Ово је закључено и поред спорадичних негативних налаза по овом питању. На основу оног што смо претходно изнели може се с правом поставити питање, какав је међусобан однос удела појединих фактора ризика за

настанак нежељених последица, у организму, конкретно у овом случају, коронарне болести. Сигурно је да у те најважније факторе ризика спадају; хипертензија, пушење и липидни статус. Та сазнања указују на позитивну корелацију између укупног холестерола, HDL, LDL холестерола и укупне вредности хомоцистеиније. Такође се по први пут спомиње могућност утицаја хомоцистеина као независног фактора ризика за настанак кардиоваскуларних болести (93) (50). Издвајање утицаја хиперхомоцистеиније у односу на хипертензију би представљао значајан проблем. Разлог овоме лежи у чињеници да постоји изузетно изражена позитивна корелација између ова два фактора ризика (51).

Што се тиче утицаја пушења на ниво хомоцистеина сазнања су доста оскудна. Оно што је познато је да само пушење са собом носи опасност смањеног уноса многих нутритивних састојака. Овде се превасходно мисли на његов утицај на витаминске кофакторе метаболизма хомоцистеина, који иначе могу проузроковати појаву хиперхомоцистеиније .

1.5. ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС И АНТИОКСИДАЦИОНА ЗАШТИТА

1.5.1. Слободни радикали

Слободни радикали су атоми, молекули или јони који садрже барем један неспарени електрон у спољном електронском омотачу, због чега су они врло реактивни, нестабилни и имају висок енергетски потенцијал. Један или више неспарених електрона значе слободну и врло нестабилну валенцу, због чега се слободни радикали вежу за молекуле са којима долазе у контакт, посебно за протеине, липиде и њима богате биомолекулске структуре. Притом долази до бурне ланчане реакције и бројних оштећења ћелија које на тај начин брже старе и улазе у дегенеративне процесе (52). У живим организмима, ниво слободних радикала и осталих реактивних врста контролисан је од стране комплексног система антиоксидативне одбране који смањује оштећење биомолекула.

Неспарени електрон се може налазити на атомима различитих елемената, па се слободни радикали могу поделити на: реактивне врсте кисеоника (ROS - reactive oxygen species), реактивне врсте азота (RNS - reactive nitrogen species), реактивне врсте хлора (RCS - reactive chlorine species), реактивне врсте брома (RBS - reactive bromine species) и реактивне врсте сумпора (RSS- reactive sulphur species) (53).

Радикали који потичу од кисеоника представљају најзначајнију класу слободних радикалских врста у живим системима. Термин реактивне кисеоничне врсте (ROS) се често користи у научној литератури и није само заједнички термин који обухвата радикалске кисеоничне врсте, већ и нерадикалске кисеоничне форме као што су водоник-пероксид, синглетни кисеоник и хипохлорна киселина. Поред реактивних кисеоничних врста, реактивне азотне врсте су такође значајне за биолошке системе. Реактивне кисеоничне врсте (ROS), као и реактивне азотне врсте (RNS), продукују се константно у нормалном ћелијском метаболизму. Познато је да и ROS, као и RNS имају двоструку улогу у биолошким системима, тј. да у исто време могу бити штетни и корисни за људски организам (54). Један од парадокса живота је да је O_2 , молекул који је неопходан за живот, уједно и најтоксичнији природни полутант. Неопходан је за респирацију и енергетски метаболизам.

Кисеоник брзо реагује са прелазним металима, радикалима, ензимима који катализују редукцију кисеоника и врло лако може да се побуди апсорпцијом енергије, при чему настају његови реактивни облици. Извори настанка реактивних кисеоничних врста могу бити ендеогеног (ксантин-оксидаза, оксидазе, макрофаге, цитохром П-450 изоензими, флавоензими и др.) или егзогеног порекла (етанол, дувански дим, лекови, пестициди, УВ, радиоактивно зрачење и др.).

Од реактивних облика кисеоника најзначајнији су активирани (синглетни) и редуковани облици (супероксид ањон радикал, хидроксил радикал водоник пероксид) (55).

Синглетни (активирани) облици O_2 настају у фотохемијским или термичким реакцијама премештањем једног неспареног електрона из развезујуће π^* орбитале молекула кисеоника, имају висок садржај енергије и веома лако могу започети слободнорадикалске реакције у организму. Ови облици кисеоника могу да реагују са великом бројем биомолекула (токофероли, аскорбинска киселина, билирубин, ДНК, холестерол, β -каротен, триптофан, метионин, цистеин, NADH и полинезасићене масне киселине). Од биолошког значаја су реакције синглет кисеоника са масним киселинама, као и оне у којима настају диоксани (53).

Супероксид ањон радикал (O_2^-) настаје једноелектронском редукцијом молекула кисеоника или једноелектронском оксидацијом H_2O_2 на различите начине:

- приликом проласка O_2 кроз електрон-транспортни ланац митохондрија, услед „шалтовања“ електрона на нивоу NADH дехидрогеназе и коензима Q;

- под утицајем ензима који директно продукују супероксид радикал оксидујући различите супстанце (ксантин оксидаза, алдехид оксидаза, пероксидаза, триптофан диоксигеназа, индоламин диоксигеназа, моноаминооксидазе, диаминооксидазе, уриказа) (56, 57);
- „пропуштањем“ електрона са NADPH цитохром П-450-редуктазе на кисеоник у ендоплазматичном ретикулуму ћелија јетре (58);
- реакцијом кисеоника са јонима прелазних метала од стране ћелија фагоцита (неутрофили, моноцити, макрофаги, еозинофили) под утицајем ензима NADPH оксидазе (59);
- оксидацијом неких неутралних органских молекула, који имају лако одлазеће водоникове атоме (нпр. допамин, адреналин, рибофлавин, триптофан) у процесу познатом као аутооксидација;
- у току деградације оксихемоглобина, при чему настају $O_2^{\cdot -}$ и неактивни метхемоглобин;
- реакцијом кисеоника са електронима насталим у фотосистему током процеса фотосинтезе.

По хемијским особинама супероксид ањон радикал представља слабу киселину, а правац реактивности зависи да ли се реакција одвија у воденој средини или у органском медијуму где је стабилнији. Овај радикал ретко сам изазива већа оштећења ћелија јер не пролази кроз липиде ћелијске мембране. Међутим, брзо дисмутира, при чему настају веома реактивни OH^{\cdot} и H_2O , који лако дифундују и до других ткива оштећујући их. Више од 90% кисеоника утрошеног у процесу „респираторне експлозије“ у фагоцитима, трансформише у супероксид ањон радикал.

Хидроксил радикал OH^{\cdot} је најактивнији и најтоксичнији редуковани облик кисеоника. Настаје током хемијских реакција у присуству редукованих облика прелазних метала или $O_2^{\cdot -}$ у Фентоновој ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^{\cdot} + OH^- + Fe^{3+}$) и Хабер-Веисовој реакцији ($O_2^{\cdot -} + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$; $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + HO^-$); током фотохемијских реакција разлагања воде дејством јонизујућег зрачења; хомолитичким раскидањем O-O везе под дејством топлотне енергије, а може настати и реакцијом воде и озона у алкалној средини. Овај радикал изазива велика оштећења унутар малог радијуса од места продукције, кратког је полуживота и неспецифично напада и оштећује све ћелијске биомолекуле, иницирајући при томе ланчане, слободнорадикалске процесе и узрокујући разне ћелијске и метаболичке поремећаје (55).

Водоник пероксид (H_2O_2) није радикал, али врло лако пролази кроз ћелијску мембрану и на тај начин брзо стиже до ткива. Настаје двоелектронском редукцијом молекуларног кисеоника ($2H^+ + O_2 + 2e^- \rightarrow H_2O_2$), једноелектронском редукцијом супероксид ањон радикала ($O_2^{\cdot-} + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$) или реакцијом дисмутације супероксидног радикала ($O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$), као и редукцијом косупстрата различитих ензима. Иако може директно да оксидише интраћелијске биомолекуле, његова токсичност је првенствено последица могућности интеракције са $O_2^{\cdot-}$ у присуству метала са променљивом валенцом ($Fe^{2+/3+}$, $Cu^{+/2+}$), при чему настаје високореактивни OH^{\cdot} (60).

Од реактивних врста азота (RNS) издваја се азот-моноксид радикал (NO^{\cdot}), који је један од најпроучаванијих молекула уопште. Због својих изузетних особина, NO^{\cdot} је 1992. године проглашен молекулом године у научном часопису *Science Magazine* (Koshland, 1992). То је мали, краткоживећи (свега неколико секунди) молекул садржи један неспарени електрон у $2p^*$ развезујућој орбитали. Примарно се синтетише у ендотелним ћелијама, али и у неутрофилима, макрофагама, Купферовим ћелијама, надбубрежној жлезди, као и у нервним ћелијама. Веома је реактиван и има улогу сигналног молекула у разним физиолошким процесима, укључујући неуротрансмисију, регулацију крвног притиска, релаксацију глатке мускулатуре, регулацију имуног система и антимикробну активност (61).

NO^{\cdot} настаје у биолошким ткивима при конверзији L-аргинина у L-цитрулин под дејством азот моноксид синтазе (три изоензима) уз одговарајућу количину кисеоника (61). Са супероксид ањон радикалом, гради високо токсични пероксинитритни ($ONOO^{\cdot-}$) који се у киселој средини може трансформисати у пероксинитритну киселину ($ONOOH$), а даље у OH^{\cdot} радикал, при чему долази до индукције оксидативног стреса. Због тога је токсичност NO^{\cdot} радикала последица његове способности да продукује OH^{\cdot} радикал. Под дејством $ONOOH$ долази до оксидације SH-група протеина, липидне пероксидације, иницирања ланчаних реакција у ДНК ланцу, као и до прекида ДНК ланца. Пошто су NO^{\cdot} и O_2 липофилни молекули, примарно место оксидације NO^{\cdot} је липидни двослој мембране. С обзиром на редуковани садржај H_2O у хидрофобном окружењу, главни продукт оксидације NO^{\cdot} са O_2 је N_2O_3 чији је примарни ефекат нитрозовање тј. нитрозативни стрес. Нитрозовањем амина настају нитрозамини, који су потенцијални канцерогени, док нитрозовањем SH група у протеинима, настају S-нитрозотиоли, при чему може да дође или до инхибиције ензимске активности или до модулације сигналне трансдукције. N_2O_3 може да доведе до дезаминације азотних база

у ДНК, чиме се мења структура ДНК и долази до мутација. Ћелије имуног система генеришу NO и као такав је укључен у неспецифичне одбрамбене механизме.

1.5.2. Оксидациони стрес

Појам *оксидациони стрес* указује на стање у којем долази до озбиљног поремећаја између продукције реактивних врста и система заштите, а може бити последица:

- смањења антиоксиданата или када неки токсични агенси негативно утичу на овај систем (нпр. висока концентрација ксенобиотика смањује GSH).
- повећања продукције ROS/RNS услед бројних токсина и спољних штетних утицаја или од стране ћелија имуног система (код хроничних инфламаторних болести).

Оксидациони стрес може изазвати оштећење свих важних ћелијских биомолекула као што су ДНК, протеини и липиди. Међутим, није разјашњено која је прва мета напада због тога што се механизми настанка оксидативног оштећења преплићу. Рађена су нека истраживања где се водоник-пероксид уводио у многе ћелије сисара и раскидање ДНК ланца је наступило пре него што је детектована липидна пероксидација или оштећење протеина (55). Процењује се да се у молекулу ДНК сваке људске ћелије свакодневно догоди око 10000 оксидационих удара. Овај податак упућује на чињеницу да је Оксидациони стрес присутан и код здравих и код болесних особа (62). Познато је да OH[•] радикал реагује са свим компонентама ДНК молекула, оштећујући и пуринске и пиримидинске базе и раскидајући све везе унутар ланца. Највише истражено оштећење ДНК је формирање 8-хидроксигуанина (8-H-G). Уколико ДНК систем репарације не реагује одмах, долази до погрешног упаривања база током репликације, при чему може доћи до мутагенезе, канцерогенезе и старење (54). Оксидативно оштећења протеина *in vivo* може утицати на функцију рецептора, ензима, транспортних протеина, чак и напродукцију нових антигена који би учествовали у имуно одговору.

Продукти оксидативног оштећења протеина могу да допринесу секундарном оштећењу других биомолекула, као на пример инаktivацији ДНК полимеразе (63). Крајеви ланца свих аминокиселинских остатака и протеина су погодни за оксидацију од стране ROS/RNS (64). Оксидацијом цистинских остатака може доћи до формирања мешовитих дисулфида између тиолних група протеина и тиола мале молекулске масе (нпр. глутатиона). Реактивне врсте нападају аминокиселинске остатке хистидина,

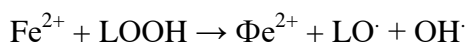
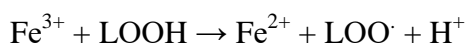
аргинина, лизина и пролина, при чему настају карбонилне функције које могу послужити за мерење оксидативног оштећења (65).

Липидна пероксидација (ЛП) представља оксидативно оштећење које захвата ћелијске мембране, липопротеине и друге молекуле који садрже липиде, под утицајем оксидативног стреса. Најчешће мете оксидативног напада су липиди ћелијских мембрана (фосфолипиди, гликолипиди и холестерол), али и неки протеини, односно ензими (66). Последица липидне пероксидације су промене у активности мембранских ензима, транспорту јона, пермеабилности ћелијске мембране, што доводи до поремећаја функције саме ћелије и бројних патогених стања организма. Она је један од најпроучаванијих процеса оксидативног оштећења ћелијских мембрана. Сам процес липидне пероксидације састоји се из три фазе:

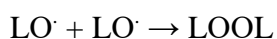
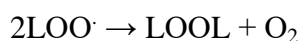
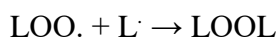
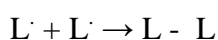
а) Иницијација полинезасићене киселине: $LH \rightarrow L\cdot + H\cdot$. Реакција започиње уклањањем H атома из метил групе ($-CH_2-$) која се налази у α -положају од места двоструке везе у угљоводоничном ланцу незасићене масне киселине при чему настаје слободни алкил радикал $L\cdot$.

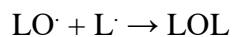
б) Пропагација: долази до интрамолекулског премештања двоструке везе, алкил радикал $L\cdot$ прелази у коњуговани диен који са кисеоником гради перокси радикал $LOO\cdot$. Он продужава реакцију, одузимајући H атом суседне метиленске групе незасићене масне киселине и настаје хидропероксид ($LOOH$) и нови алкил радикал ($L\cdot$) (53). $LOOH$ може циклизацијом прећи у петочлани циклични алкил ендпероксид који даље реагује са кисеоником, а разградњом настају бројни секундарни продукти оксидације. Разградњом $LOOH$ и $L\cdot$ расте број слободних радикала и тако се процес наставља.

Иако је $LOOH$ при физиолошким условима стабилан, у присуству јона прелазних метала брзо се разграђује (реакцијама сличним Фентоновој) редокс механизмом дајући нове слободне радикале:



ц) Терминација: представља завршетак реакције оксидације. Међусобним интеракцијама слободни радикали граде терцијарне продукте оксидације, димере и полимере који су стабилни и неактивни.





Распадањем ових интермедијера (алкил радикали, перокси- и алкокси- радикали, липидни хидропероксиди) настају секундарни производи липидне пероксидације: кратколанчани испарљиви угљоводоници, алдехиди (67). Најтоксичнијим облицима липидне пероксидације сматрају се малонилалдехид (МДА) и 4-хидрокси-2(транс)-ноненал (4-HNE).

Малонилдиалдехид (МДА) као један од крајњих производа липидне пероксидације, може реаговати са тиолним и аминоксидним групама ензима и потпуно их инхибирати, док продукт 4-HNE може инхибирати биосинтезу протеина. Пероксидација може бити завршена реакцијама између поменутих интермедијера и антиоксиданата (витамин Е, биљни полифеноли, глутатион и др.). До данас постоји много метода за одређивање продуката насталих у ЛП (MDA, 4-HNE, кођуговани диени, хидропероксиди). Међутим, највише се користе спектофотометријске методе које се базирају на реакцији ових продуката и тиобарбитурне киселине (ТВА). До пероксидације липида може доћи и директном реакцијом синглет кисеоника са липидима у мембранама. Сматра се да извесна количина синглет кисеоника настаје и у току пероксидације липида што изазива даљу деструкцију мембрана. Пероксидацију липида у микрозомима могу започети и остале кисеоничне врсте (преферил $Fe^{3+} - O_2^-$ и ферил $FeOH^{3+}$ радикал) које настају у реакцији сличној Фентоновој (68).

Оксидациони стрес изазван утицајем реактивних врста се повећава током животног циклуса човека, при чему долази до старење, кардиоваскуларних, неуродегеративних, хроничних болести и канцера. На основу Херманове „слободнорадикалске теорије старења“, све више бива прихватљиво да се продукција слободних радикала и оксидативно оштећење повећавају старењем организма (69). Теорија слободних радикала подржава хипотезу о „брзини живљена“ према којој дужина животног века зависи од брзине метаболизма, а то потврђује да оксидативно оштећење ДНК, липида и протеина расте старењем (70). У западним земљама срчани удар је један од главних разлога смртности људи. Многа научна истраживања указују да је инфаркт повезан са слободним радикалима који потичу од ксантин-оксидазе, циклооксигеназе, инфламаторних ћелија и из митохондрија (71). Митохондријални транспорт електрона се мења за време исхемије и реперфузије, што такође представља један од извора слободнорадикалских врста (72). Доказано је да се у току исхемијског инфаркта повећава оксидативно оштећење ДНК, а и појава липидне пероксидације је забележена код оваквих пацијената (73). Мождани удар је такође повезан са

оксидационим стресом. Повећана продукција слободнорадикалских врста чини мозак прихватљивијим за исте, јер је он способан да троши значајну количину кисеоника, сиромашан је антиоксидантним системом заштите, а богат прооксидантним молекулима и садржи високу концентрацију липида подложних брзој оксидацији (74).

Настанак и развој атеросклерозе зависи од равнотеже између проинфламаторних, антиинфламаторних и антиоксидантних механизма заштите. Слободни радикали играју важну улогу у патологији васкуларних обољења, тако што доводе до оксидације ЛДЛ-а и до стварања плакова (75). Оксидација ЛДЛ-а доводи до ендотелијалне дисфункције, што може резултовати расту и смрћу ћелије и томе изазвати вазоконстрикцију. Многе студије указују на повезаност између продукције слободних радикала и разних неуродегеративних болести као што су Алзхеимерова, Паркинсонова, Хунтингтонова болест и друге.

Алзхеимерова болест спаде у најраспрострањеније из ове групе болести и повезана је са старењем и оксидацијом протеина и липида. Оксидативно оштећење игра значајну улогу у накупљању β -амилоида (који може да изазове „cross-linking“) и других цитоскелетних протеина (76). Липидна пероксидација је такође измерена у мозгу људи оболелих од Алзхеимерове болести и детектован је повећан ниво 4-хидрокси-2-ноненал глутатион коњугата (77). Код оваквих болесника јавља се оштећење ДНК лимфоцита, а забележена је и оксидативна модификација протеина фронталног кортекса (78). Такође, уочено је да оксидацијом допамина настају потенцијално токсични семихинони и да убрзан метаболизма допамин моноамин оксидазе може индуковати формирање водоник-пероксида, супероксид ањон- и хидрокси-радикала, што представља основу у развоју Паркинсонове болести. Даља истраживања показују да је оксидациони стрес одговоран за губитак нигралних допаминских рецептора (79).

Постоје многи научни докази да слободни радикали учествују у развоју инсулин резистенције, дисфункције β -ћелија, смањењу толеранције на глукозу и дијабетес мелиттус-а другог типа. Хипергликемија може индуковати оксидациони стрес који се повећава старењем, преко неколико механизма, укључујући аутооксидацију глукозе, формирање „advanced glutathione product“ (AGP) и активацију пута полиола. Други циркуларни фактори који су повишени у дијабетесу, као што су слободне масне киселине и лептин, такође доприносе повећању ROS-а. Забележено је значајно повећање AGP старењем. Акумулација AGP доводи до повећања микроваскуларних лезија, која се јавља код дијабетичне ретинопатије, а такође је и одговорна за

кардиоваскуларне компликације виђене код дијабетичара (80). Оштећење изазвано ROS доводи до примарног глаукома отвореног угла, који води неповратном слепилу (81).

1.5.3. АНТИОКСИДАЦИОНА ЗАШТИТА

„Антиоксиданс” је често коришћен термин у литератури и, иако се о њему већ пола века интезивно расправља, још увек га је тешко јасно дефинисати. Научници који се баве исхраном људи, користе овај термин код инхибиције липидне пероксидације, процеса који узрокује ужеглост намирница. Кустоси музеја га користе у превенцији органског артефекта. Они који раде са полимерима користе антиоксиданс за контролу полимеризације у производњи гума, пластике, као и за заштиту пластике од УВ зрака. Дакле, сви ови научници имају њихово виђење антиоксиданаса и знају за шта би требали да буду добри у њиховој области. Међутим, код живих организама ситуација је нешто сложенија. Када се реактивне врсте формирају *in vivo*, онда у игру улазе многи системи одбране. Њихов значај зависи које су све врсте формиране, где су формиране и који су циљни биомолекули чије се оштећење мери.

Антиоксиданс је свака супстанца која када је присутна у малој концентрацији, у односу на оксидабилни супстрат, значајно успорава или спречава оксидацију тог супстрата. Термин „оксидабилни супстрат” обухвата сваку врсту молекула нађеног *in vivo*. Нема универзалног „најбољег” антиоксиданса, различити антиоксиданси су потребни да заштите ћелију од разних биомолекула *in vivo* (53). Антиоксидациона заштита представља динамичку равнотежу дејстава ендогених антиоксиданаса (ензима антиоксидативне заштите и неензимских антиоксиданаса) и продукције ROS-а. Антиоксиданси делују као „хватачи“ слободних радикала, комплексирају јоне метала, спречавајући њихову каталитичку функцију у процесима разградње липидних водоник-пероксида и настанка слободних радикала, разграђују хидропероксиде липида, спречавају дејство синглетних кисеоника, инхибирају неке ензиме, итд.

Са функционалног аспекта антиоксидациона заштита организма обухвата 2 нивоа деловања:

1. Системи антиоксидативне заштите који спречавају ендогено стварање слободних радикала.
2. Ангажовање система у условима нормалног и појачаног стварања слободних радикала.

Према природи и начину деловања антиоксиданти се деле на:

- а) ензимске (примарна линија одбране): супероксид-дизмутаза, каталаза, ксантин-оксидаза, пероксидаза, глутатион-пероксидаза, глутатион-редуктаза, глутатион-С-трансфераза
- б) неензимске (секундарна линија одбране):
- липосолубилне (витамин А, витамин Е, β-каротени, коензим Q, флавоноиди и други феноли, итд.). Делују у липидној фази ћелијске мембране и мембрана субцелуларних органела, као и унутар серумских липопротеина.
 - хидросолубилне (витамин С, мокраћна киселина, церулоплазмин, глутатион, трансферин, и др.). Делују у воденој фази, остварујући интеракцију са липосолубилним антиоксидантима на граничној површини мембрана.
- ц) ензимске антиоксиданти који учествују у репарацији насталог оксидативног оштећења липида, протеина, угљених хидрата и нуклеинских киселина. У ову групу ензима спадају: фосфолипаза А2, различити протеински ензими, гликозилазе, ДНК-лигазе, ДНК-полимеразе и др (82).

1.5.3.1. Ензимска антиоксидациона заштита

Супероксид-дизмутаза (SOD) катализује дисмутацију супероксидних радикала ($O_2^{\cdot -}$) у водоник-пероксид и O_2 , при чему се један $O_2^{\cdot -}$ оксидује у O_2 , а други редукује у H_2O_2 :

Прокариоти садрже гвожђе зависну (FeSOD) и манган зависну SOD (MnSOD). Код еукариота укључујући и човека присутне су три изоформе SOD:

- бакар, цинк зависна SOD (Cu, ZnSOD): бакар који улази у активни центар ензима одговоран је за реакцију дисмутације, при чему се овај метал у току катализоване реакције мења своју валенцу, примајући и отпуштајући електроне манган зависна SOD (MnSOD): локализована је у матриксу митохондрија, мада се примарно синтетише у цитосолу. Не налази се у еритроцитима ни у бактеријским ћелијама;
- екстрацелуларна SOD (ecSOD): присутна је у међућелијском простору и екстрацелуларној течности (плазма, лимфа, синовија, ликвор, асцит). Синтетишу је фибробласти, глијалне ћелије, макрофаги, хондроцити и ендотелијалне ћелије (83).

Каталаза (CAT) катализује разградњу токсичног H_2O_2 до воде и молекулског кисеоника. Овај ензим садржи већи број аеробних бактерија и неке анаеробне. Присутна је такође у свим ткивима сисара, а високом активношћу се истиче у јетри и

еритроцитима, док је у мозгу, срцу и скелетним мишићима карактеристична мала активност. У ћелијама су локализовани претежно у пероксизомима (чини 40% протеина) и митохондријама. Каталаза по структури припада групи хемохромопротеида (садржи четири фери-протопорфиринска прстена који улазе у активни центар ензима). Посебан допринос у процени значаја каталазе у детоксикацији ткива од водоник-пероксида представљају резултати добијени испитивањем особа са потпуним одсуством каталазе (акаталазија). Ова наследна ензимопатија је често праћена гингивитисом, стоматитисом и појачаном осетљивошћу еритроцита на јонизовано зрачење (84).

Глутатион-пероксидаза (GSH-Px) катализује реакцију редукције водоник пероксида или органских хидропероксида (ДНК пероксиди, липидни пероксиди) у присуству редукованог глутатиона: $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 (\text{ROOH}) \rightarrow \text{GSSG} + (\text{ROH}) + \text{H}_2\text{O}$.

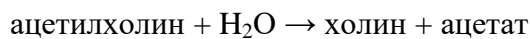
Класична селен зависна *GSH-Px*, изолована из различитих органа (еритроцити, плућа, јетра), представља хомотетрамер, где свака субјединица садржи један атом селена у форми селеноцистеина. Подложна је оксидативној модификацији и инактивацији од стране оксиданаса, посебно водоник-пероксида (85).

Глутатион-редуктаза (GSHR) је флавопротеин који катализује трансформацију оксидативног глутатиона (GSSG) у редуковани (GSH) у присуству NADPH као коензима, као и редукцију других дисулфида који настају реакцијом глутатиона и једињења која садрже –SH групе (коензим Н, цистеин, SH-протеини и др.). Налази се у цитосолу и митохондријама. Најважнија улога овог ензима је одржавање физиолошког нивоа редукованог глутатиона, чиме се обезбеђује неопходна количина GSH за деловање GSPx и глутатион-С-трансферазе (85).

1.6. АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРАЗА (AChE)

1.6.1. Структура и механизам дејства

Ацетилхолинстераза (AChE) - права холинстераза, холинска естераза I, је ензим који катализује следећу хемијску реакцију



Ацетилхолинстераза (AChE) је хидролаза која разлаже холинске естре. Има врло високу каталитичку активност – свака AChE разлаже око 25.000 молекула ацетилхолина (ACh) у секунди (односно 6×10^5 молекула ацетилхолина током једног минута), што се приближава граници дозвољене дифузије ензимске подлоге. Активно место AChE се састоји од 2 поединице – ањонске и естарске. Механизам деловања AChE је расветљен након анализе кристалне структуре ензима. У ањонској појединици налазе се позитивни квартарни амини ацетилхолина, као и друге катјонске подлоге и инхибитори. У ањонским местима, катјонске подлоге нису везане негативно наелектрисаним аминокиселинама, али интеракцијом 14 ароматичних остатка, те линије рачве воде до активног места. Свих 14 аминокиселина у ароматичној рачви су, у различитим врстама, високо конзервиране. Међу ароматичним аминокиселинама, триптофан 84 је критичан и његова супституција аланином резултује у 3000-пута смањеној реактивности. Усек рачве продире на пола пута кроз ензим и дуг је око 20 ангстрема. Активно место се налази 4 ангстрема од дна молекула (86). Естарска подлокација, која хидролизује ацетилхолин на ацетат и холин, садржи каталитичке тријаде од три аминокиселине: 200 серина, 440 хистидина и 327 глутамата. У хидролизној реакцији, карбоксилни естар доводи до формирања ацил-ензима и слободног холина. Ацилирани ензим затим пролази кроз нуклеофилни третман молекула воде, уз помоћ 440 хистидинских група, ослобађајући сирћетну киселину, уз регенерацију слободног ензима.

1.6.2. Физиолошки значај ацетилхолинстеразе

AChE се доминантно налазе у неуромишићној спојници и холинергичким синапсама у мозгу где имају превасходну сврху завршавања синаптичке неуротрансмисије. У току неуротрансмисије ACh се ослобађа у синаптичку пукотину и везује за холинергичке рецепторе на постсинаптичкој мембрани преносећи сигнал из неурона. AChE која се налази на постсинаптичкој мембрани завршава

трансмисију сигнала разграђујући (хидролизирајући) ACh. AchE има два активна места-ањонско и естарско. При интеракцији Ach и AchE долази до хидролизе Ach, ацетиловања естарског места AchE и ослобађање холина. Ацетилована AchE затим реагује с водом, ствара се сир}етна киселина и слободна AchE. Тако ослобођени холин се поново преузима од стране пресинаптичког нерва и користи са поновну синтезу ацетилхолина комбиновањем са ацетил-CoA уз помоћ ензима холин ацетилтрансферазе (87, 88).

Поред AchE, холинестеразама припада и бутирилхолинестераза (неспецифична холинестераза, BchE). Разлика између ацетилхолинестеразе и бутирилхолинестеразе установљена је на основу њиховог различитог афинитета према појединим естрима холина. Брзина којом ацетилхолинестераза разлаже естре холина опада са продужењем угљоводоничног ланца: ацетилхолин, пропионилхолин, бутирилхолин, док код бутирилхолинестеразе брзина хидролизе опада обрнутим редом. Такође, за разлику од бутирилхолинестеразе, ацетилхолинестераза разлаже ацетил- β -метилхолин, али не и бензоилхолин. Насупрот ацетилхолинестеразе, јасна физиолошка функција бутирилхолинестеразе још увек није позната. Међутим, познато је из клиничке праксе да код генетски узрокованог или сте-ченог дефицита бутирилхолинестеразе, примена деполаризујушег мишићног релаксанта суксаметонијума доводи до пролонгиране, по живот опасне, нервно-мишићне парализе (89, 90).

1.6.3. Терапијски значај ацетилхолинестеразе

Да би холинергични неурони добили још један импулс, ACh мора да буде отпуштен са ацетилхолинских рецептора. Ово се догађа само када је концентрација ACh у синаптичкој пукотини врло ниска. Инхибиција ензима AChE доводи до акумулације ACh у синаптичкој пукотина, што узрокује сметње у деловању неуротрансмитера. Неповратна инхибиција AChE може довести до мишићне парализе, конвулзије, бронхоспазма и смрти услед асфиксије. Органофосфати, естери фосфорне киселине, су класа иреверзибилних инхибитора AChE. Иреверзибилни инхибитори AChE се користе као инсектициди (нпр. малатион) и нервни гасовити бојни отрови (нпр. сарин и соман). Карбамати су инхибитори AChE који је хидролизирају сатима; користе се лечење глаукома (нпр, физостигмин). Реверзибилни инхибитори заузимају естарско место за кратко време (секунде до минута) и користе се за лечење низа болести централног нервног система. Тетрахидроаминоакридин (ТХА) се користи за

побољшање когнитивне функције у Алцхајмеровој болести. Екселон се такође користи у терапији Алцхајмерове болести и деменцији Левијевог тела. Пиридостигмин бромид се користи за лечење миастеније гравис (91). Главни активни састојак канабиса, тетрахидроканабинол, делује као компетитивни инхибитор ацетилхолинестеразе (91). Краткорочни реверзибилни инхибитори АСhЕ као што су суривастигмин, донепезил и галантамин се користе у лечењу неурокогнитивне дисфункције у Алцхајмеровој деменцији, а ривастигмин и у лечењу деменције у Паркинсоновој болести, или другим облицима деменције (92, 93).

Одређивање активности ацетилхолинестеразе се користи у токсикологији, у циљу испитивања да ли је особа била изложена органофосфатним пестицидима. У пренаталној дијагностици, мерењем активности изоензима ацетилхолинестеразе у амнионској течности (потиче из мозга или кичмене мождине фетуса) могуће је открити дефект неуралне тубе. Повећана активност ацетилхолинестеразе и повишена концентрација алфа-фетопротеина у амнионској течности потврда су дефекта неуралне тубе код фетуса. Техником електрофорезе на полиакриламидном гелу, могуће је раздвојити изоензиме ацетилхолинестеразе у амнионској течности. Електроферограм амнионске течности нормалног фетуса има само једну фракцију, док су у случају дефекта неуралне тубе присутне две фракције. Амнионске течности које садрже две фракције се поново анализирају уз додатак инхибитора ацетилхолинестеразе. Тест је позитиван ако постоје две фракције на гелу и ако је бржа фракција инхибирана након додатка инхибитора (89, 92, 93).

1.6.4. Улога ацетилхолинестеразе у функцији миокарда

Прва интересовања о улози ацетилхолинестеразе у раду срчаног мишића су се појавила четрдесетих година прошлог века под претпоставком да парасимпатичка контрола миокарда посредством ацетилхолина мора да обухвати активност и ацетилхолинестеразе (94). Истраживања на говеђем срцу су показала да се овај ензим доминантно налази у спроводном систему срца и да је у свим аспектима сличан са АСhЕ у нервном ткиву (94). Њихова количина у Пуркињеовим влакним је готово једнака као у нервном ткиву (94). Касније студије на хуманом срцу су забележиле присуство ацетилхолинестеразе у региону аурикула (95). Уопштено је прихваћено мишљење да у свим наведним деловима срца има улогу у хидролизи ацетилхолина (95)

чиме директно утиче на процесе синаптичке трансмисије. Поред тога, истакнут је значај овог ензима у патогенези атријалне фибрилације (95).

Новије студије су показале да је АСhЕ присутан и у контрактилном ткиву срца сисара, с тим што је већа концентрација овог ензима у коморама (96). Клинички значај ових експерименталних истраживања постаје значајнији последњих година. Наиме, фармакотерапијски приступ овом ензиму доноси нову димензију његове улоге у кардиоваскуларној патофизиологији. У том смислу, указано је да инхибиција АСhЕ пиридостигмином, може да помогне у ублажавању тахикардије у синдрому посттуралне тахикардије (97). Осим тога, студије које су примењивале пиридостигмин или донепезил су сугерисале да блокада разградње ацетихолина остварује анти-инфламаторни ефекат и тиме смањује повишене вредности крвног притиска код хипертензивних пацова (98).

Сумарно посматрано, акумулирани подаци недвосмислено истичу све значајнију улогу овог ензима у (пато)физиологији миокарда и сигурно представља веома актуелан терпијски објекат за велики број надолазећих фармаколошких агенаса. И поред тога остала су бројна отворена питања која још више истичу оправданост интересовања за ову научну проблематику.

1.7. ФИЗИОЛОШКЕ ОДЛИКЕ ГАСОТРАНСМИТЕРА

1.7.1. Опште одлике

Гасотрансмитери су ендогени сигнални молекули који по хемијским карактеристикама припадају гасовима. Физиолошки најважнији ефекат имају азот моноксид (NO), угљен моноксид (CO) и водоник сулфид (H₂S). Сви они остварују своја дејства другачије од класичних сигналних молекула у људском телу. Запажање да гас може да се понаша као сигнални молекул датира из 1981. године испитивањем ефеката NO анлгезије на хроничан бол код мушкараца (99, 100).

Критеријуми по којима гасови могу да се сврстају у категорију сигналних молекула су следећи (101): 1) мала величина молекула гаса, 2) слободна дифузија кроз ћелијске мембране, (ендокрини, паракрини и аутокрини ефекат), 3) ендогена синтеза подложна контролним механизмима, 4) прецизно дефинисани и специфични ефекти у физиолошки релевантним концентрацијама, 5) замена функција егзогено примењеним

аналогом гаса, б) ћелијски ефекти морају имати специфичне ћелијске и молекуларне циљеве.

У 2011. години је формирана Европска асоцијација за гасотрансмитере (European Network on Gasotransmitters, ENOG). Циљ ове асоцијације је да омогући боље разумевање биолошког значаја и улоге ових гасова у здрављу и болестима.

1.7.2. Азот моноксид (NO)

Азот моноксид (NO) је физиолошки најзначајнији гасотрансмитер. Robert-a Furchrott је показао да ацетилхолин стимулише ендотел да синтетише високо дифузибилну супстанцу, која је најпре названа - релаксирајући фактор кога секретује ендотел (endothelial-derived relaxing factor, EDRF), за кога је касније доказано да је гас – NO (102-104). Поред тога, показано да NO може да функционише као медијатор бројних (пато)физиолошких просеца (105).

У избору часописа Science, 1992. године NO је изабран за 'молекул године'. Такође је основано удружење за азот моноксид (Nitric Oxide Society) и њихов званични часопис (Nitric Oxide: Biology and Chemistry). 1998. године, Ferid Murad, Robert Furchrott, и Louis Ignarro су поделили Нобелу Награду за Физиологију и Медицину за откриће NO-а. NO синтетише породица ензима под називом азот моноксид синтазе (Nitric oxide synthases, NOSs), из полу-есенцијалне аминокиселине L-аргинина. До данас су откривене четири изоформе NOS: ендотелна NOS (eNOS), неуронална (nNOS), индуцибилна NOS (iNOS) (106) и бактеријска NOS (bNOS) (107).

eNOS (NOS3) производи NO у ендотелу крвних судова, док nNOS (NOS1) производи NO у централном и периферном нервном систему (106). Конститутивне NOS су зависне од Ca^{2+} -калмодулин система, за разлику од iNOS (NOS2), која учествује у имунском и инфламаторном одговору (макрофаги), и нарочито је активна у стању оксидационог стреса (107). припадају строго контролисаним ензимским врстама. Оксидационе функције NOSs се одвијају посредством FAD (флавин аденин динуклеотида), FMN (флавин моноклеотида), и BH₄ (тетрахидробиоптерина), који се могу фосфорилисати бројним серин-киназама (108).

NO је неизоставни медијатор многобројних процеса у кардиоваскуларном, нервном и имунском систему. Његова фундаментална функција у КВС је вазодилатација, посредством које је овај гасотрансмитер укључен у регулисање екстрацелуларног волумена течности, крвног притиска и ерекције (109).

Вазодилатација настаје стварањем NO од стране eNOS у ендотелу крвног суда, под утицајем ацетил-холина, цитокина и shear stress-a. NO затим дифундије у глатке васкуларне мишићне ћелије, где у реакцији са солубилном гуанилил-циклазом (sGC), ствара cGMP-a. Солубилни cGMP потом активира протеин киназу G (PKG), која изазива фосфорилацију протеина укључених у регулацију Ca²⁺, активност јонских канала и актинских и миозинских филамената, сумарно доводи до релаксације глатког мишића ендотела (109).

Поред тога NO учествује у редокс сигнализацији између нервних ћелија централног и периферног нервног система. Будући да је у гасовитом стању и да дифундује кроз мембране, NO може да преноси информацију и на неуроне који нису у синаптичким везама. Ипак с обзиром да му је време полу-живота кратко, његова активност је временски ограничена. NO-cGMP сигнални пут је укључен у процесе учења и памћења стимулацијом сигналне трансдукције типа продужене потенцијације (110).

NO-a је значајан не-адренергички и не-холинергички неуротрансмитер различитих делова гастроинтестиналног тракта (ГИТ), а његов доминантни ефекат се огледа у релаксацији глатких мишића ГИТ-a (111).

Директни ефекти NO-a на срце су предмет све чешћих испитивања. Претпоставља се да NO редукује контрактилну моћ миокарда и фреквенцу и да има значајно место у патогенези коронарне артеријске болести(112).

Показано је да NO може да утиче и на ћелијске процесе укључен у стварање енергије, молекуласком конкуренцијом са O₂⁻ за цитохром С оксидазу (113).

Поред тога је NO изузетно реактиван према једињењима која садрже слободну SH групу. Наиме, показано је да NO може да изврши нитрозилацију бројних SH протеина (114). Нитрозилацијом аргиназа, NO повећава афинитет овог ензима за аргинин више пута, чиме доприноси повећаној разградњи ове аминокиселине чиме смањује своју биорасположивост (115). Интересантно је да је повећана активност аргиназе пронађена код старих пацова са ендотелном дисфункцијом (115), што потврђује значај овог процеса.

NO такође може директно да утиче на биосинтезу D-серина, који је ко-агонист глутамату за NMDA рецепторе (116). Нитрозилацијом серин рацемазе NO смањује активност.

Нитрозилација рианодинских рецептора (RyR), мења динамику Ca^{2+} поготово током систоле срчаног циклуса, што изазива поремећај ћелијске надражљивости и доводи до појаве аритмија (117).

Нитрозилација микротубул-везаног протеина-1В (MAP1В) се среће у неуролошким поремећајима, као што је `фрагилни X синдром` (118). Осим тога, активацијом iNOS долази до синтезе NO који нитролизацијом гликолитичког GAPDH ензима, индукује апоптозу (119). Нитролизација металопроотеиназа изазива програмирану ћелијску смрт неурона, која се среће код исхемије мозга (120). Такође, посредством нитрозилације COX-2 ензима, NO узима учешће у запаљенским процесима (121). Наиме, током запаљења, азот моноксид кога производи iNOS, повећава активност ових ензима, чиме стимулише производњу простагландина и тиме имунску реакцију (121).

1.7.3. Специфичне карактеристике угљен монооксида (CO)

CO је дуго година био повезиван само са негативним дејствима на људски организам првенствено због добро познатих штетних дејстава његовог егзогенног уноса. Ипак, спознајом да овај гас може да буде ендогено синтетисан у малим концентрацијама и да остварује неуротрансмитерску функцију настаје прави заокрет у медицинској доктрини (122). Прва сазнања да CO може да учествује у сингалним каскадама се појављују деветесетих година двадесетог века и од тада интересовање научне јавности за ефекте овог гаса доживљавају праву (123). Последња истраживања су показала да CO представља све важнији сигнални молекул са бројним функцијама које се још увек истражују и које су јако блиске NO-у.

CO се у организму ствара из хема током процеса разградње хемоглобина, под утицајем ензима хем-оксигеназе 1 и 2 (HO 1, 2). HO могу поседују индуцибилну (HO 1) и конститутивну форму (HO 2). HO 1 разграђује хем до биливердина, продукујући на тај начин CO. Доказано је да HO 1 продукцијом CO испољава антиинфламаторно дејство путем блокирања синтезе про-инфламаторних, и стимулацијом производње анти-инфламаторних цитокина (124).

CO има вазодилататорна својства а може имати и друга корисна дејства у кардиоваскуларном систему (125). Инхибицијом пролиферације глатких мишића, спречава формирање атеросклеротских плакова (125). Осим тога, CO побољшава

ендотелну дисфункцију, путем смањења вазоконстрикције и контролом активности индуцибилног фактора хипоксије 1α (HIF 1α) (126).

Са друге стране, конститутивни NO 2 активира калцијум-калмодулин систем (127, 128). Поред сличности, CO има и бројне функције које су супротне од NO-а. У том смислу, NO 2 је смештен у ендотелу крвних судова, и синтетише CO који индукује вазодилатацију. Међутим, механизми ове вазодилатације још увек нису довољно испитани (129). NO 2 се такође налази у многим неуронским мрежама (130) и у мијентеричном плексусу ГИТ-а, где учествује у нон-адренергичкој и нон-холинергичкој сигнализацији (131).

Сигнални путеви CO-а су недовољно познати. Сматра се да CO делује преко гуанилил-циклазе (sGC), узрокује стварање cGMP-а и последичну релаксацију глатких мишића (132, 133). Други начин остваривања ефеката CO-а подразумева његово везивање за хем групу путем кога овај гас може да утиче на процес транскрипције (134).

pAS протеин 2 (NPAS2) пронађени у неуронима представљају важан транскрипциони фактор. Истраживања су сугерисала да CO, везивањем за хем групу NPAS2, може да спречи везивање ДНК за NPAS2 и тиме онемогући процес транскрипције (135).

1.7.4. Специфичне карактеристике водоник сулфида (H_2S)

Слично као и у случају CO, сви ефекти водоник сулфида на људски оргназим су посматрани кроз призму његових штетних егзогених дејстава, док се ендогеним ефектима овог гаса веома мало знало. Негативна дејства H_2S су пре свега повезивана са централним нервним системом. Молекулси механизма путем кога H_2S остварује своје ефекте подразумева инхибицију ћелијског дусања (136).

У новије време је међутим откривено да се H_2S може синтетисати и у органзиму транс-сулфурацијом аминокиселина L-цистеина и/или хомоцистеина, дејством три ензима: цистатион- γ -лиазе (CSE), цистатион- β -синтазе (CBT) и 3-меркаптопируват сулфуртрансферазе (3MST) (137). Повезаност хомоцистеина и H_2S током продукције овог гаса је била једна од линија водила овог истраживања са циљем прецизнијег објашњења њихове комплексне интеракције.

CSE је мајоритетно активан у аорти, плућној артерији и мезентеричној артерији (138), док CBT своју активност остварује у неуронима (139). У јетри и бубрезима, оба ензима синергистички суделују делују у производњи овог гаса (140).

Трансмитерска дејства H_2S -а могу да буду веома блиска CO-у и NO-у. У том смисли, већина студија је показала да овај гас остварује изразито вазодилаторно дејство, а потврда тога је и постојање CSE у ендотелу крвних судова (141). Ипак, има и података да H_2S може довести до констрикције васкуларних глатких мишића (141). Због тога се претпоставља да дејство H_2S -а на вазомоцију зависе од његове концентрације, на коју може значајно да утиче процес оксидације овог гаса (141).

Механизам вазодилаторног дејства H_2S -а није са сигурношћу познат. Иако се у први мах сматрало да активира осовину sGC-cGMP (142), данас је доминантна хипотеза да H_2S изазива релаксацију васкуларних глатких мишића стимулацијом АТР-зависних калијумових канала (143). Поред тога, многе ефекте H_2S остварује путем сулфхидрације која изазива активацију протеина (144).

II

ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

2.1. ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

1. Повишене вредности хомоцистеина и хомоцистеин тиолактона повећавају липидну пероксидацију (MDA) и/или узорукују смањену активност антиоксидационих ензима заштите (SOD, CAT и GPx) и тиме изазивају системску појаву оксидационог стреса у плазми пацова.
2. Акутна и субхронична хиперхомоцистеинемија могу утицати на активност ензима ацетилхолинестеразе AchE у срчаном мишићу пацова, самостално и/или у садејству са различитим гасотрансмитерима од којих су најзначајнији NO, H₂S и CO.

2.2. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ

2.2.1. Генерални циљ

Евалуација ефеката акутне (индуковане DL-хомоцистеином и DL-хомоцистеин тиолактоном) и субхроничне хиперхомоцистеинемије (индуковане DL-хомоцистеином) на концентрацију прооксидативних и активност антиоксидативних маркера у плазми пацова, као и на активност ензима ацетилхолинестеразе у ткиву миокарда пацова.

2.2.2. Специфични циљеви

1. Испитати утицај акутне и субхроничне хиперхомоцистеинемије на редокс равнотежу пацова преко одређивања различитих параметара оксидативног стреса: малонилдиалдехида (MDA), каталазе (CAT), супероксид дизмутазе (SOD) и глутатион пероксидазе (GPx).
2. Испитати ефекат инхибиције синтезе гасних молекула (NO, H₂S и CO) на параметре оксидационог стреса у плазми и активност ацетилхолинестеразе у срцу пацова у току акутне хиперхомоцистеинемије.
3. Испитати утицај субхроничне хиперхомоцистеинемије на концентрацију прооксидативних и активност антиоксидативних маркера у плазми пацова, као и на активност ензима ацетилхолинестеразе у ткиву миокарда пацова.

III

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. МАТЕРИЈАЛ

За припрему пуфера и перфузионих раствора коришћени су комерцијални реагенси pro analysis квалитета произвођача Sigma–Aldrich Chemie GmbH, (Немачка).

У истраживању су употребљени комерцијални реагенси pro analysis квалитета поменутог произвођача - Sigma–Aldrich Chemie GmbH, (Немачка):

- а) DL-хомоцистеин (DL Hcy), Mr 135.18;
- б) DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорид (DL Hcy tlhc), Mr 153.63;
- в) N(ω)-нитро-L-аргинин метил естар (L-NAME), неселективни инхибитор NOS, Mr 269.69;
- г) цинкпротопорфирин IX ((Zn)PPR IX), селективни инхибитор HO 1, Mr 626.03;
- д) DL-пропаргилглицин (DL PAG), селективни инхибитор CSE, Mr 113.11.

Поред оба облика хомоцистеина употреба осталих супстанци је имала следећу намену:

- а) L-NAME - неселективни инхибитор NOS, за инхибицију синтезе азот монооксида (NO)
- б) ZnPPR IX - селективни инхибитор хемоксигеназе 1 (HO 1), за инхибицију синтезе угљен монооксида (CO)
- в) DL PAG - селективни инхибитор цистатион γ лиаза CSE, за инхибицију синтезе водоник сулфида (H₂S)

За аналитичко одређивање параметара оксидационог статуса, коришћени су комерцијални реагенси pro analysis квалитета произвођача Sigma–Aldrich Chemie GmbH, (Немачка).

3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ

Студија припада експерименталним истраживањима *in vitro*.

Истраживање је спроведено у лабораторији за кардиоваскуларну физиологију Института за медицинску физиологију 'Рихард Буриан' Медицинског Факултета у Београду.

Истраживање је обухватило 140 пацова, Вистар албино соја, мушког пола, старости 10 недеља и телесне масе 250 \pm 30г. Животиње су се чувале у строго контролисаним условима (температура ваздуха 22 \pm 1 °С, релативна влажност ваздуха 50%, циклус светлост:тама 12:12 часова, са почетком светлог периода у 9 часова), и са

слободним приступом води и стандардној храни. Све експерименталне процедуре су спроведене у складу са прописаним актима (EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC) и принципима етичности.

Експериментални протокол је одобрен од стране Етичког одбора за добробит експерименталних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

Истраживање је било подељено у једанаест (11) група (10 животиња у групи):

Акутна серија експеримената (акутна хиперхомоцистеинемија):

- 1) контролна група - апликација физиолошког раствора (1 ml 0.9% NaCl, pH 7.4, i.p.),
- 2) експериментална група - апликација DL-хомоцистеина (8 mmol/kg тм, i.p.),
- 3) експериментална група - апликација DL -хомоцистеин тиолактона (8 mmol/kg тм, i.p.),
- 4) експериментална група - апликација L-NAME (10 mg/kg тм, i.p.),
- 5) експериментална група - апликација цинкпротопорфирина IX (30 μ mol/kg тм, i.p.),
- 6) експериментална група – апликација DL-пропаргилглицина (50 mg/kg тм, i.p.),
- 7) експериментална група – коапликација DL-хомоцистеина (8 mmol/kg тм, i.p.) и L-NAME (10 mg/kg тм, i.p.),
- 8) експериментална група – коапликација DL-хомоцистеина (8 mmol/kg тм, i.p.) и цинкпротопорфирина IX (30 μ mol/kg тм, i.p.),
- 9) експериментална група – коапликација DL-хомоцистеина (8 mmol/kg тм, i.p.) и DL-пропаргилглицина (50 mg/kg тм, i.p.),

Субхронична серија експеримената (субхронична хиперхомоцистеинемија):

- 10) експериментална група – апликација физиолошког раствора (0.45 μ mol/g тм. s.c., два пута дневно у интервалу од 8 сати, у периоду од четрнаест дана)
- 11) експериментална група – апликација DL-хомоцистеина (0.45 μ mol/g тм. s.c., два пута дневно у интервалу од 8 сати, у периоду од четрнаест дана)

У циљу изазивања акутне хиперхомоцистеинемије поменути експерименталним групама је интраперитонеално администрирана једна доза DL-хомоцистеина (8 mmol/kg тм) и DL-хомоцистеин тиолактона (8 mmol/kg тм). Шездесет

(60) минута након апликације, животиње су жртвоване ради прикупљања узорака крви (за мерење маркера оксидационог стреса) и узимања ткива срца у чијем хомогенату је одређивана активност ацетилхолинестеразе (AchE).

Субхронична хиперхомоцистеинија је изазвана апликацијом DL-хомоцистеина (0.45 $\mu\text{mol/g}$ тм. s.c., два пута дневно у интервалу од 8 сати, у периоду од четрнаест дана) (145).

3.3. БИОХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ

Узорци крви пацова, ради анализе биохемијских параметара су сакупљани у вакумске епрувете са цитратом, а основна обрада узорака се састојала се од одвајања еритроцита од плазме центрифугирањем (10 min на 5000 rpm, 4°C). Исталожени еритроцити су ресуспендовани и три пута испрани физиолошким раствором уз центрифугирање 10 min на 5000 rpm, а затим замрзнути на -20°C до анализе.

У прикупљеним узорцима крви спектрофотометријским методама су одређивани:

1. специфична активност ацетилхолинестеразе (AchE)
2. параметри оксидационог стреса:
 - а) ниво малонилдиалдехида (MDA) као индикатора липидне пероксидације,
 - б) активност каталазе (CAT),
 - в) активност супероксид дизмутазе (SOD)
 - г) активност глутатион пероксидазе (GPx).

Мерење је спроведено на спектрофотометру Analytic Jena Specord S 600. Наведени параметри оксидационог стреса су се одређивали у контролним условима, затим у акутној серији експеримената, и након субхроничне апликације DL-хомоцистеина. У циљу потврде постојања хиперхомоцистеиније, у групи која је подвргнута субхроничној апликацији DL-хомоцистеина се поред поменутих маркера мерила и концентрација укупног хомоцистеина у плазми HPLC (*engl. high-performance liquid chromatography*) методом (146).

3.3.1. Одређивање активности ацетилхолинестеразе (AChE)

Специфична активност ацетилхолинестеразе (AChE) у ткивном хомогенату срца је одређивана *in vitro* методом по Ellman-у (147). Метода се заснива на реакцији бојеног реагенса (5,5-дитио-бис-2-нитробензоева киселина, DTNB) са производом хидролизе тиохолинског супстрата, ацетилхолин-јодида (AChI), тиохолином, при чему настаје једињење 5-тио-2-нитро-бензоат-жуте боје, чији је интензитет сразмеран специфичној активности AChE. Одговарајућа запремина хомогената испитиваног ткива се разблажује адекватном запремином фосфатног пуфера рН=8 (40 μ l хомогената ткива срца у 580 μ l фосфатног пуфера) и преинкубирана на температури 37 °C, 10 минута. Након преинкубације се додаје 20 μ l бојеног реагенса DTNB и 10 μ l супстрата AChE, сукцесивно, и припремљена смеша се инкубира на температури 37 °C, 5 минута. Ензимска реакција се зауставља додавањем 50 μ l натријум-додецил-сулфата (SDS). Промена апсорбанце се мери колориметријски на 420 nm таласне дужине. Активност AChE се изражава као $\Delta A/\text{мин} \times \text{mg}$ протеина.

3.3.2. Одређивање концентрације продукта липидне пероксидације (MDA)

Један од продуката липидне пероксидације малонилдиалдехид (MDA) је одређиван у реакцији са тиобарбитуратном киселином (ТВА) (148). Најпре се 500 ml 25% HCl и 500 ml 1% тиобарбитуратне киселине (у 50 mM NaOH) дода у 500 ml узорка плазме. Настала смеша се потом загрева 10 минута у воденом купатилу и затим оставља на собној температури. Потом се дода 3 ml n-butanol-a, меша 30 секунди и центрифугира (10 минута на 2000 \times g). Садржај малонилдиалдехида се одређује спектрофотометријски мерењем апсорбанце горњег слоја узорка који се одвојио на таласној дужини од 532 nm. Слепа проба садржи 50 mM NaOH уместо тиобарбитуратне киселине и припрема се за сваки узорак појединачно. Вредност MDA се изражава у nmol по MDA/ml плазме.

3.3.3. Одређивање активности каталазе (CAT)

Активност каталазе се заснива на методи по Beutler-у која се базира на деградацији H₂O₂ (149). У 50 μ l плазме се дода у 2.975 ml 50 mM фосфатног пуфера (у 0.4 mM EDTA). Ензимска реакција се иницира додавањем 30 μ l H₂O₂. Смањење

абсорбанце услед разградње H_2O_2 се бележи на таласној дужини од 240 nm. Активност каталазе се изражава у U/ml плазме. Једна јединица ензимске активности (U) се дефинише као 1 μ l потрошеног H_2O_2 у једном минути.

3.3.4. Одређивање активности супероксид дисмутазе (SOD)

Активност укупне супероксид дисмутазе (SOD) је мерена према методи Misre Fridovic-a (150). 10-30 μ l плазме се дода у 3 ml 0.5 M EDTA-натријум карбонатног пуфера (pH 10.2). Ензимска реакција започиње додавањем 100 μ l адреналина (30 mM у 0.1 M HCl). Активност супероксид дисмутазе је мерена на абсорбанци таласне дужине од 480 nm. Једна јединица ензимске активности (U) се дефинише као количина ензима која инхибира проценат оксидације адреналина за 50%. Активност супероксид дисмутазе се изражава у U/ml плазме.

3.3.5. Одређивање активности глутатион пероксидазе (GPx)

Процедура мерења активности глутатион пероксидазе започиње припремањем реакционе смеше која садржи 8.9 ml фосфатног пуфера, 50 μ l 200 mM редукованог глутатиона (GSH), 1 mg β -NADPH и 100 μ l 100 units/ml глутатион редукастазе из пекарског квасца (*Saccharomyces cerevisiae*). pH реакционе смеше је подешена на 7 додавањем 50 mM NaH_2PO_4 и 0.40 mM EDTA. Потом се помеша 3 ml реакционог коктела и 0.3 ml плазме и дода 50 μ l 0.042% H_2O_2 како би се започело са ензимском реакцијом. Снижење абсорбанце ($\lambda = 340$ nm) у интервалима од 5 секунди се бележи током 4-5 минута. Активност GPx се изражава као $\Delta A/\text{min}/\text{ml}$ плазме (151).

Све биохемијске анализе су спроведене у лабораторији за кардиоваскуларну физиологију Института за медицинску физиологију `Рихард Буриан` Медицинског Факултета у Београду. Мерење је вршено на спектрофотометру Analytic Jena Specord S 600.

Прорачун укупног узорка је заснован на резултатима претходно публиковане студије да Cunha-e и сарадника (152) у којој је праћен утицај акутне хиперхомоцистеинемije на параметре коагулационог система и маркере оксидационог стреса пацова. За прорачун је коришћен t-тест за везани узорак, двоструко, уз претпоставку алфа грешке од 0.05 и снаге студије 0.8 (бета грешка 0.2) и уз коришћење одговарајућег рачунарског програма (153).

Узимањем у обзир резултата ове студије, укупан број експерименталних животиња је прорачунат на 110 (по 10 у свакој групи). Имајући у виду могућност искључења неких експерименталних животиња из завршне анализе (комплијанса – некомплетни подаци), укупни студијски узорак је утврђен на најмање 140 експерименталних животиња (по 10 у свакој групи).

3.4. Статистичка обрада података

Статистичка обрада података је извршена у статистичком пакету *SPSS 18.0 for Windows*. За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, коришћени су: фреквенција, проценти, узорачка средња вредност, узорачка медијана, узорачка стандардна девијација, ранг и 95% интервали поверења. За испитивање нормалности расподеле коришћени су тестови *Kolmogorov Smirnov* и *Shapiro Wilk*, и графици: хистограм и *normal QQ plot*. За тестирање разлика између параметара, у зависности од њихове природе, коришћени су Студентов т-тест, *Mann-Whitney* тест, Фишеров тест апсолутне вероватноће, једнофакторска или двофакторска анализа варијансе.

IV РЕЗУЛТАТИ

4.1. АКУТНА СЕРИЈА ЕКСПЕРИМЕНАТА

4.1.1. Акутни ефекти DL-хомоцистеина и DL-хомоцистеин тиолактона на активност ензима ацетилхолинестеразе у ткиву миокарда срца пацова и параметре оксидационог стреса у плазми

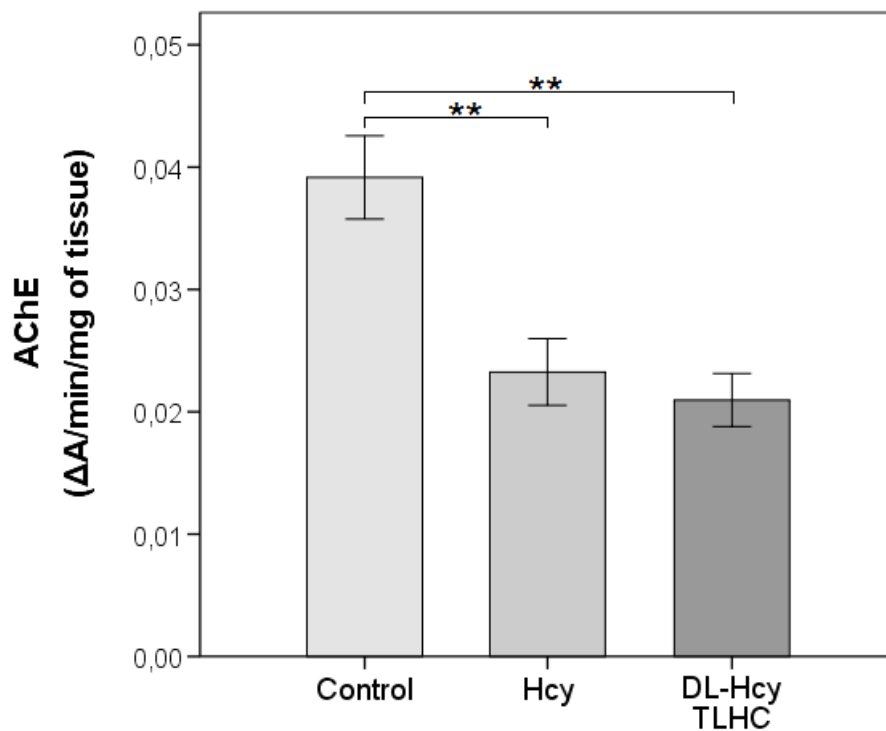
Табела 1. Регистроване вредности ацетилхолинестеразе (AChE) у ткиву миокарда пацова и параметара оксидационог стреса у плазми након акутне апликације DL-хомоцистеина и DL-хомоцистеин тиолактона ($X \pm SD$; X – средња вредност, SD – стандардна девијација)

$X \pm SD$	AChE ($\Delta A/min/mg$ ткива)	MDA ($nmol/ml$ плазме)	CAT (U)	CAT (U/ml плазме)	GPx (U/ml плазме)	SOD (U/ml плазме)
Контрола	0.039 \pm 0.003	15.37 \pm 1.41	0.82 \pm 0.10	16.40 \pm 2.11	1.09 \pm 0.14	25.31 \pm 0.96
Нсу	0.023 \pm 0.002	6.09 \pm 0.85	1.32 \pm 0.21	26.49 \pm 4.22	1.76 \pm 0.28	30.41 \pm 0.71
DL-Нсу TLHC	0.021 \pm 0.002	8.86 \pm 1.84	2.57 \pm 0.33	51.51 \pm 6.79	3.26 \pm 0.31	21.35 \pm 1.98

Табела 2. Резултати статистичке значајности приликом поређења између група (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

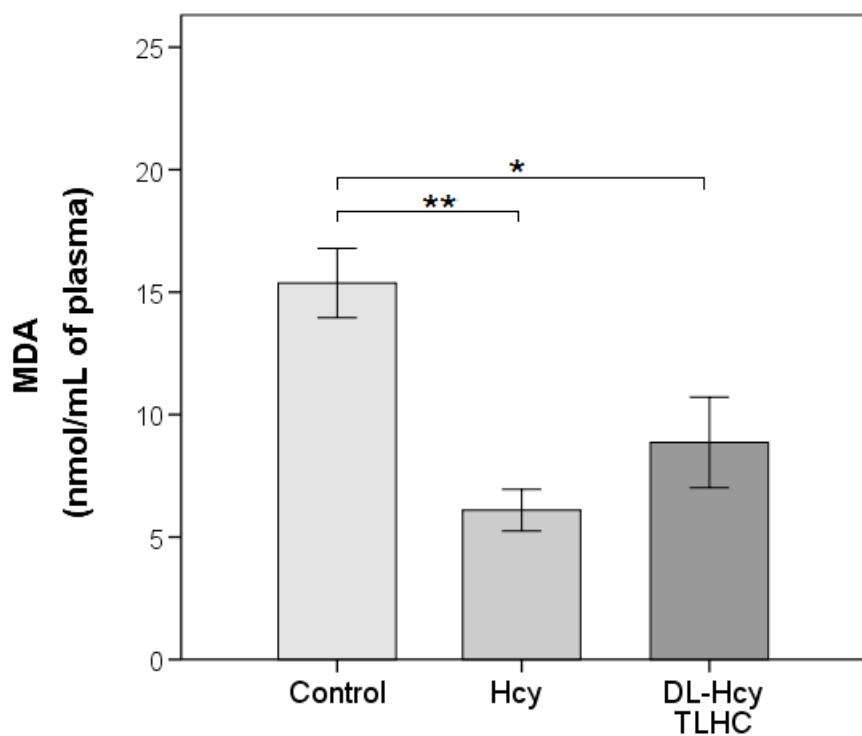
Независни Т-тест	AChE	MDA	CAT	CAT у плазми	GPx	SOD
Контрола / Нсу	**	**	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	**
Контрола / DL-Нсу TLHC	**	*	**	**	**	$p > 0,05$
Нсу / DL-Нсу TLHC	$p > 0,05$	$p > 0,05$	*	*	**	**

Графикон 1. Ефекти DL-хомоцистеина и DL-хомоцистеин тиолактона на активност ацетилхолинестеразе (AChE) у ткиву миокарда пацова



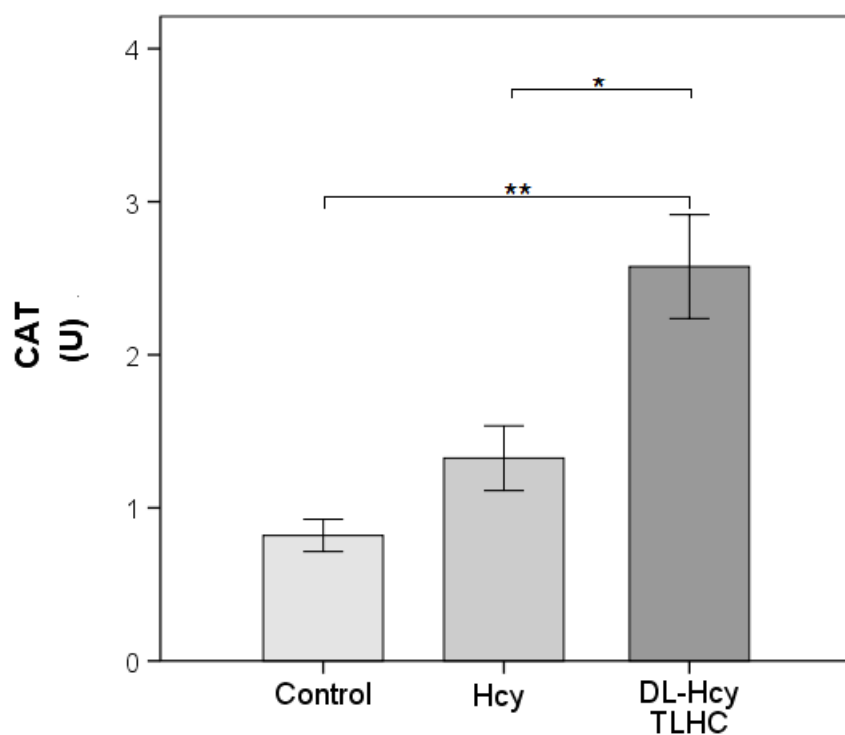
Након апликације DL-хомоцистеина и DL-хомоцистеин тиолактона дошло је до статистички значајног снижења активности AChE у ткиву срца третираних пацова у односу на контролну групу.

Графикон 2. Ефекти DL-хомоцистеина и DL-хомоцистеин тиолактона на вредности малонилдиалдехида (MDA) као реагујуће супстанце тиобарбитурне киселине (TBARS) у плазми пацова



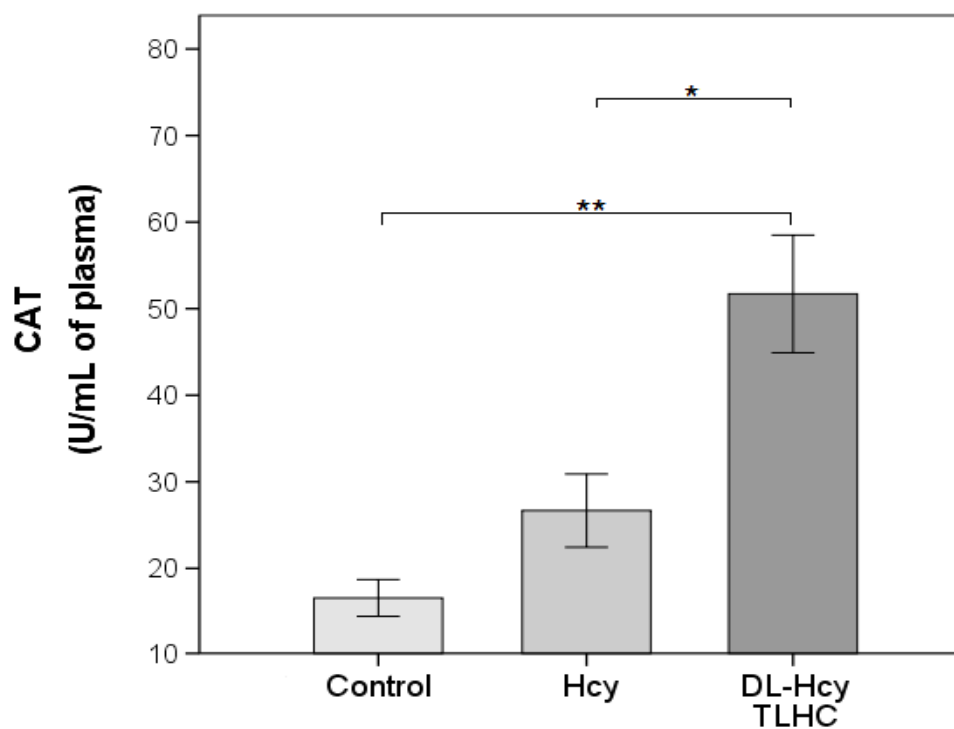
Након апликације DL-хомоцистеина и DL-хомоцистеин тиолактона дошло је до статистички значајног снижења вредности MDA у плазми третираних пацова у односу на контролну групу.

Графикон 3. Ефекти DL-хомоцистеина и DL-хомоцистеин тиолактона на вредности каталазе у урину (CAT/U) пацова



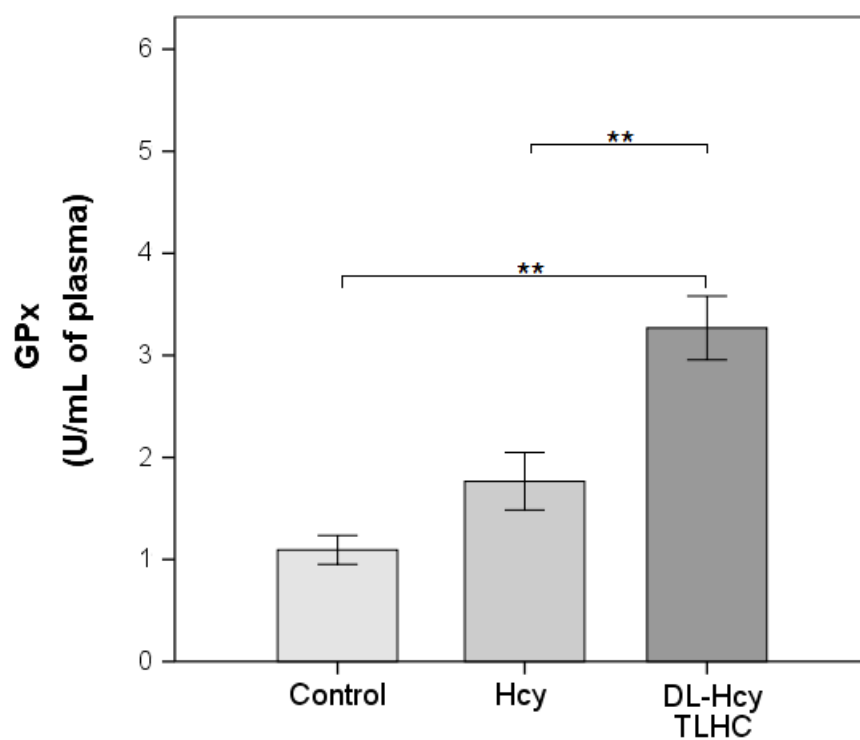
Активност каталазе у урину (CAT/U) статистички значајно је повећана у групи пацова третираних DL-хомоцистеин тиолактоном у односу на контролну групу, као и у односу на групу пацова третираних DL-хомоцистеином.

Графикон 4. Ефекти DL-хомоцистеина и DL-хомоцистеин тиолактона на вредности каталазе у плазми (CAT/плазми) пацова



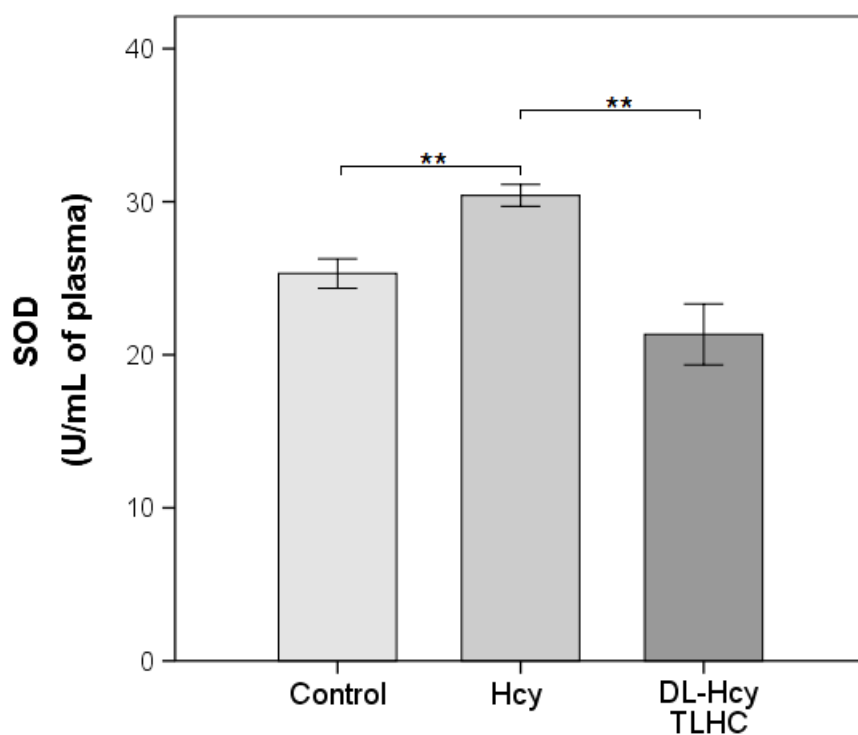
Активност каталазе у плазми (CAT/плазма) статистички значајно је повећана у групи пацова третираних DL-хомоцистеин тиолактоном у односу на контролну групу, као и у односу на групу пацова третираних DL-хомоцистеином.

Графикон 5. Ефекти DL-хомоцистеина и DL-хомоцистеин тиолактона на вредности глутатион пероксидазе (GPx) у плазми пацова



Активност глутатион пероксидазе (GPx) у плазми статистички значајно је повећана у групи пацова третираних DL-хомоцистеин тиолактоном у односу на контролну групу, као и у односу на групу пацова третираних DL-хомоцистеином.

Графикон 6. Ефекти DL-хомоцистеина и DL-хомоцистеин тиолактона на вредности супероксид дисмутазе (SOD) у плазми пацова



Активност SOD у плазми статистички значајно је повећана у групи пацова третираних DL-хомоцистеином у односу на друге две групе пацова (контролну и групу пацова третираних DL-хомоцистеин тиолактоном).

4.1.2. Акутни ефекти инхибитора синтезе гасотрансмитера (L-NAME, PPR IX и DL-PAG) на активност ензима ацетилхолинестеразе у ткиву миокарда срца пацова и параметре оксидационог стреса у плазми

Табела 3. Регистроване вредности ацетилхолинестеразе (AChE) у ткиву миокарда пацова и параметара оксидационог стреса у плазми након акутне апликације инхибитора синтезе гасотрансмитера (L-NAME, PPR IX и DL-PAG) ($X \pm SD$; X – средња вредност, SD – стандардна девијација)

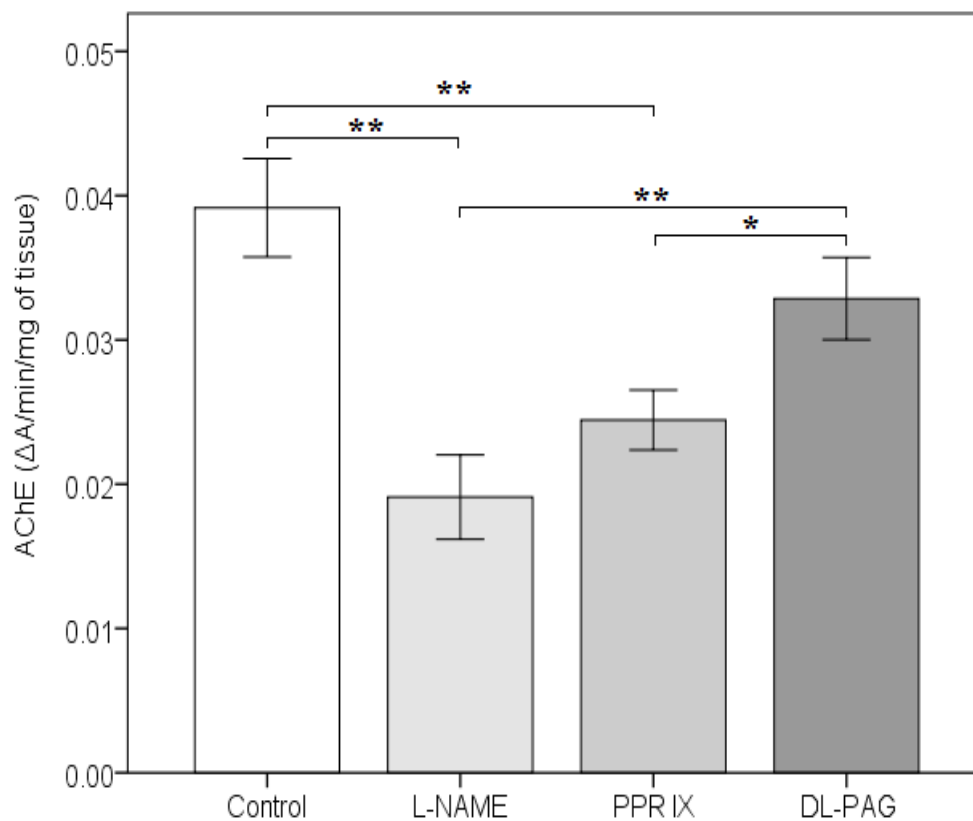
$X \pm SD$	AChE ($\Delta A/min/mg$ ткива)	MDA ($nmol/ml$ плазме)	CAT (U)	CAT (U/ml плазме)	GPx (U/ml плазме)	SOD (U/ml плазме)
Контрола	0.039 \pm 0.003	15.37 \pm 1.41	0.82 \pm 0.10	16.40 \pm 2.11	1.09 \pm 0.14	25.31 \pm 0.96
L-NAME	0.019 \pm 0.002	5.63 \pm 0.85	2.58 \pm 0.17	50.59 \pm 3.58	3.37 \pm 0.23	31.07 \pm 0.40
PPR IX	0.024 \pm 0.002	17.30 \pm 4.74	3.37 \pm 0.10	67.54 \pm 2.08	4.50 \pm 0.13	26.46 \pm 2.65
DL-PAG	0.032 \pm 0.002	5.28 \pm 1.37	5.93 \pm 0.60	118.69 \pm 12.13	7.91 \pm 0.80	30.25 \pm 0.54

Табела 4. Резултати статистичке значајности приликом поређења између група (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

Независни Т-тест	AChE	MDA	CAT	CAT у плазми	GPX	SOD
Контрола / L-NAME	**	**	**	**	**	**
Контрола / PPR IX	**	$p > 0,05$	**	**	**	$p > 0,05$
Контрола / DL-PAG	$p > 0,05$	**	**	**	**	**
L-NAME / PPR IX	$p > 0,05$	$p > 0,05$	**	**	**	$p > 0,05$
L-NAME / DL-PAG	**	$p > 0,05$	**	**	**	$p > 0,05$
PPR IX / DL-PAG	*	*	**	**	**	$p > 0,05$

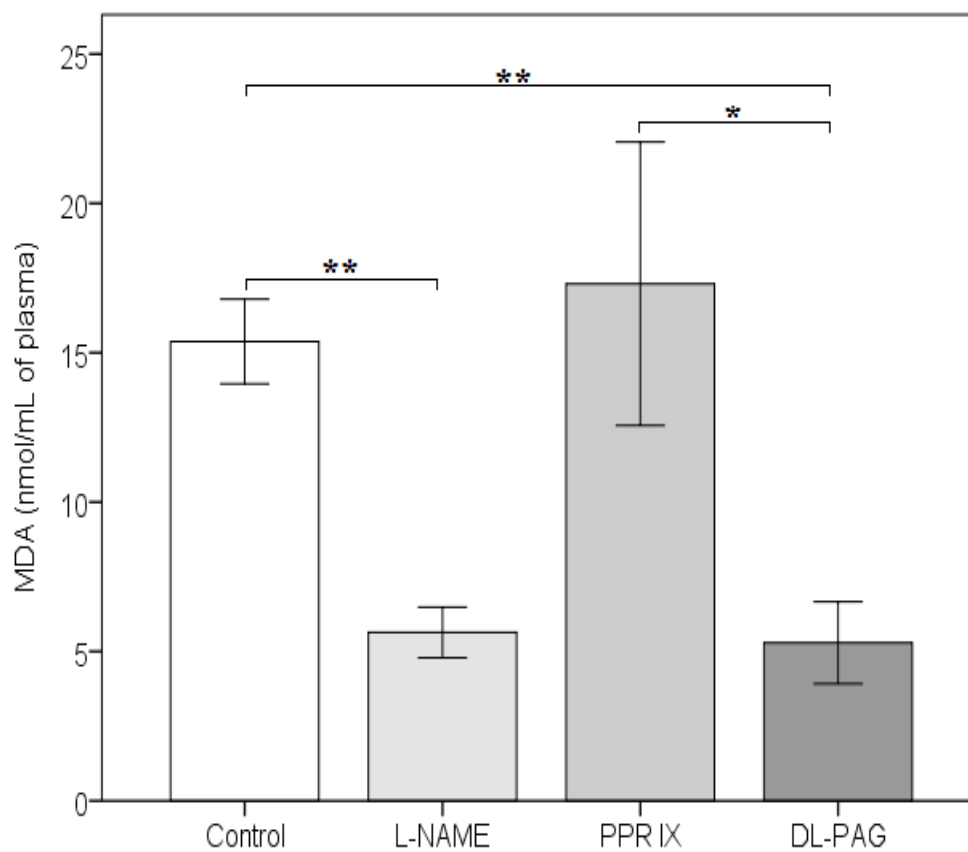
Графикон 7. Ефекти инхибитора синтезе гасотрансмитера на активност

ацетилхолинестеразе (AChE) у ткиву миокарда пацова



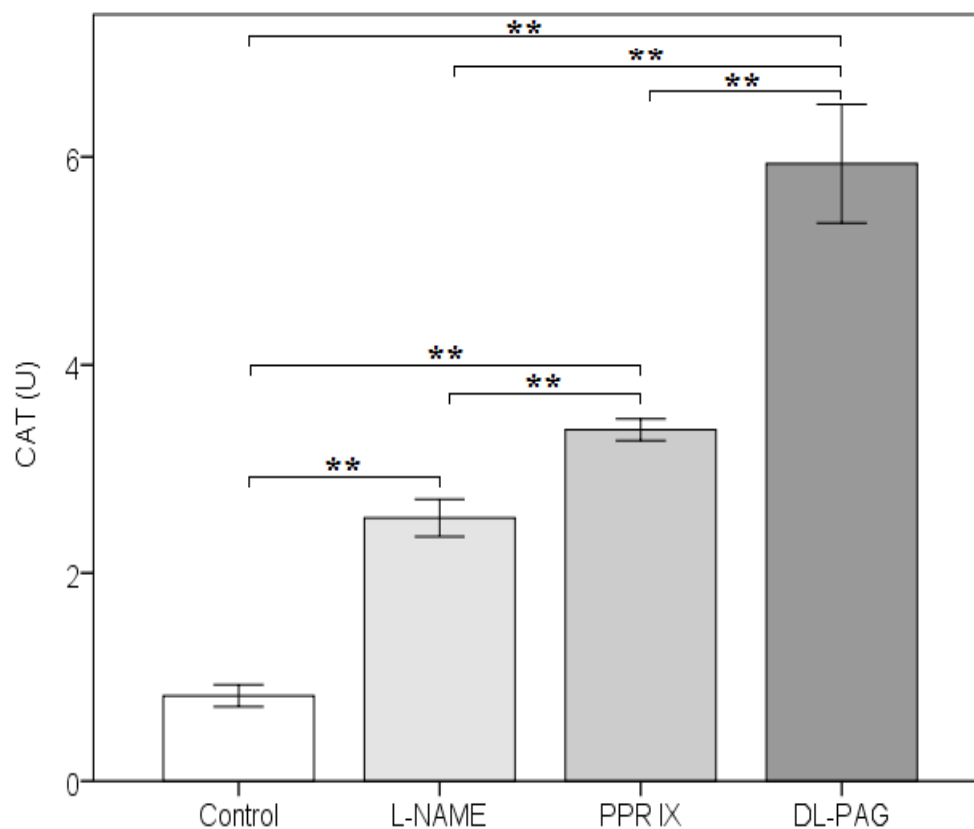
У ткиву миокарда пацова, након апликације L-NAME и PPR IX дошло је до статистички значајног снижења AChE у односу на контролну групу и групу којој је апликован DL-PAG.

Графикон 8. Ефекти инхибитора синтезе гасотрансмитера (L-NAME, PPR IX и DL-PAG) на активност липидне пероксидације (MDA) у плазми пацова



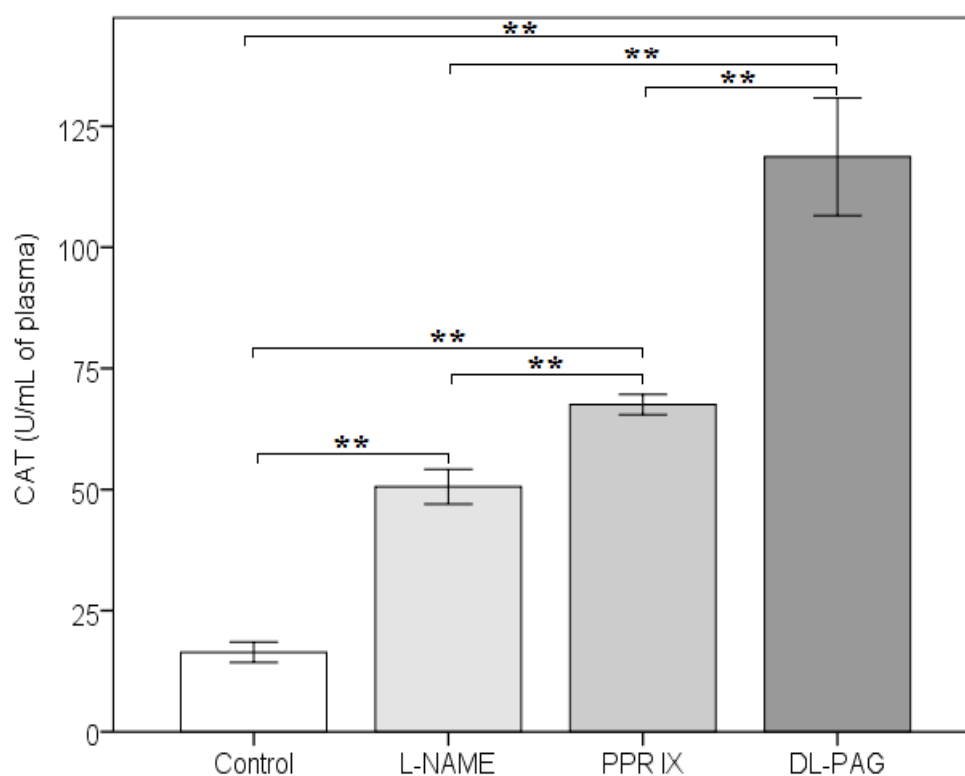
Након апликације L-NAME и DL-PAG дошло је до статистички значајног снижења MDA у плазми у односу на контролну групу и групу пацова третираних PPR IX.

Графикон 9. Ефекти инхибитора синтезе гасотрансмитера (L-NAME, PPR IX и DL-PAG) на активност каталазе у урину (CAT/U) пацова



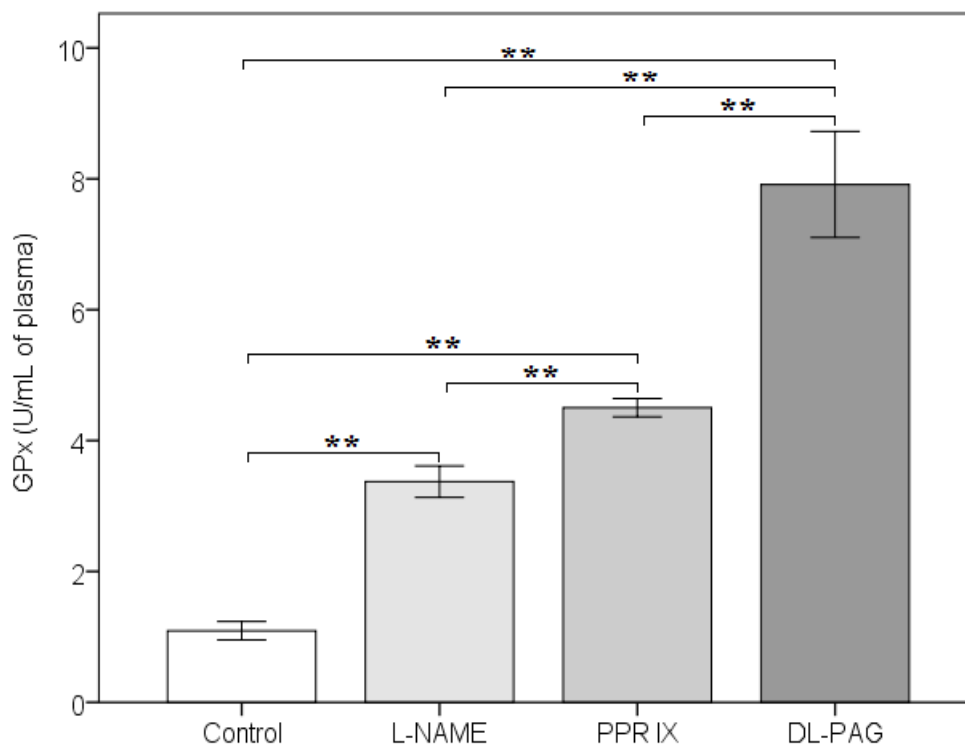
Након апликације свих испитиваних инхибитора синтезе гасотрансмитера дошло је до статистички значајног повећања активности каталазе у урину у односу на контролну групу пацова. Такође, забележене су и статистички значајне разлике у вредностима овог параметра између испитиваних група при чему су највише вредности биле након апликације DL-PAG, а најниже након апликације L-NAME.

Графикон 10. Ефекти инхибитора синтезе гасотрансмитера (L-NAME, PPR IX и DL-PAG) на активност каталазе у плазми (CAT/плазми) пацова



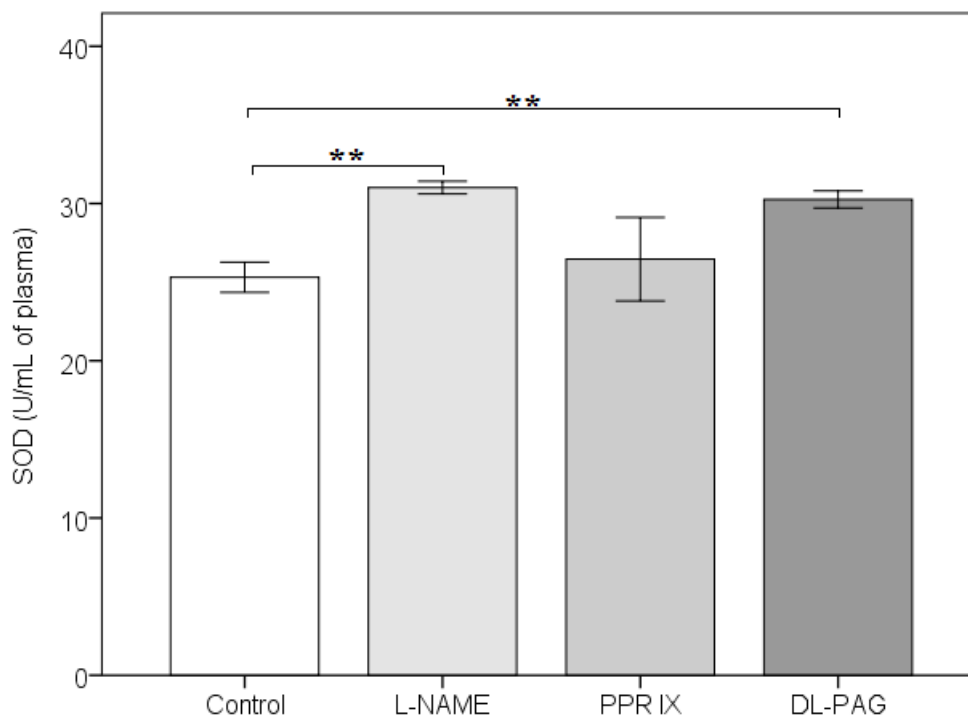
Након апликације свих испитиваних инхибитора синтезе гасотрансмитера дошло је до статистички значајног повећања активности каталазе у плазми у односу на контролну групу пацова. Такође, забележене су и статистички значајне разлике у вредностима овог параметра између испитиваних група, при чему су највише вредности биле након апликације DL-PAG, а најниже након апликације L-NAME.

Графикон 11. Ефекти инхибитора синтезе гасотрансмитера на вредности глутатион пероксидазе (GPx) у плазми пацова



Сви испитивани инхибитори синтезе гасотрансмитера (L-NAME, PPR IX и DL-PAG) довели су до статистички значајног повећања глутатион пероксидазе у односу на контролну групу пацова. Такође, статистички значајне разлике забележене су и приликом поређења испитиваних група, при чему су највише вредности биле након апликације DL-PAG, а најниже након апликације L-NAME.

Графикон 12. Ефекти L-NAME, PPR IX и DL-PAG на вредности супероксид дисмугазе (SOD) у плазми пацова



Након апликације L-NAME и DL-PAG дошло је до статистички значајног повећања вредности SOD у плазми, у односу на контролну групу пацова.

4.1.3. Акутни ефекти комбиноване примене DL-хомоцистеина и инхибитора синтезе гасотрансмитера на активност ензима ацетилхлинестеразе у ткиву миокарда срца пацова и параметре оксидационог стреса у плазми

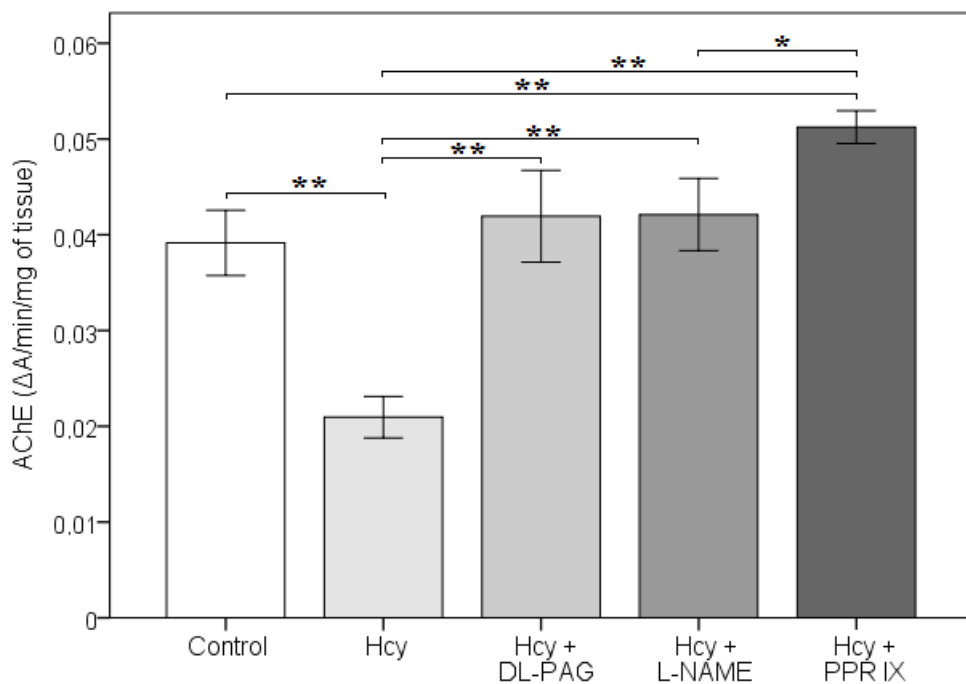
Табела 5. Регистроване вредности ацетилхолинестеразе (АChE) у ткиву миокарда и параметара оксидационог стреса у плазми пацова након комбиноване акутне апликације DL-хомоцистеина и инхибитора синтезе гасотрансмитера ($X \pm SD$; X – средња вредност, SD – стандардна девијација)

$X \pm SD$	AChE ($\Delta A/min/mg$ ткива)	MDA ($nmol/ml$ плазме)	CAT (U)	CAT (U/ml плазме)	GPx (U/ml плазме)	SOD (U/ml плазме)
Контрол а	0.039 \pm 0.00 3	15.37 \pm 1.4 1	0.82 \pm 0.1 0	16.40 \pm 2.11	1.09 \pm 0.14	25.31 \pm 0.9 6
Нсу	0.023 \pm 0.00 2	6.09 \pm 0.85	1.32 \pm 0.2 1	26.49 \pm 4.22	1.76 \pm 0.28	30.41 \pm 0.7 1
Нсу+DL- PAG	0.041 \pm 0.00 4	9.90 \pm 0.94	5.47 \pm 1.1 2	109.58 \pm 22.4 3	6.37 \pm 0.72	32.66 \pm 1.2 0
Нсу+L- NAME	0.042 \pm 0.00 3	4.10 \pm 0.74	6.39 \pm 0.9 5	127.87 \pm 19.1 7	7.60 \pm 0.77	32.98 \pm 0.9 4
Нсу+PPR IX	0.051 \pm 0.00 1	4.28 \pm 0.59	9.05 \pm 0.8 3	181.19 \pm 16.6 4	12.59 \pm 0.6 9	33.36 \pm 0.4 3

Табела 6. Резултати статистичке значајности приликом поређења између група (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

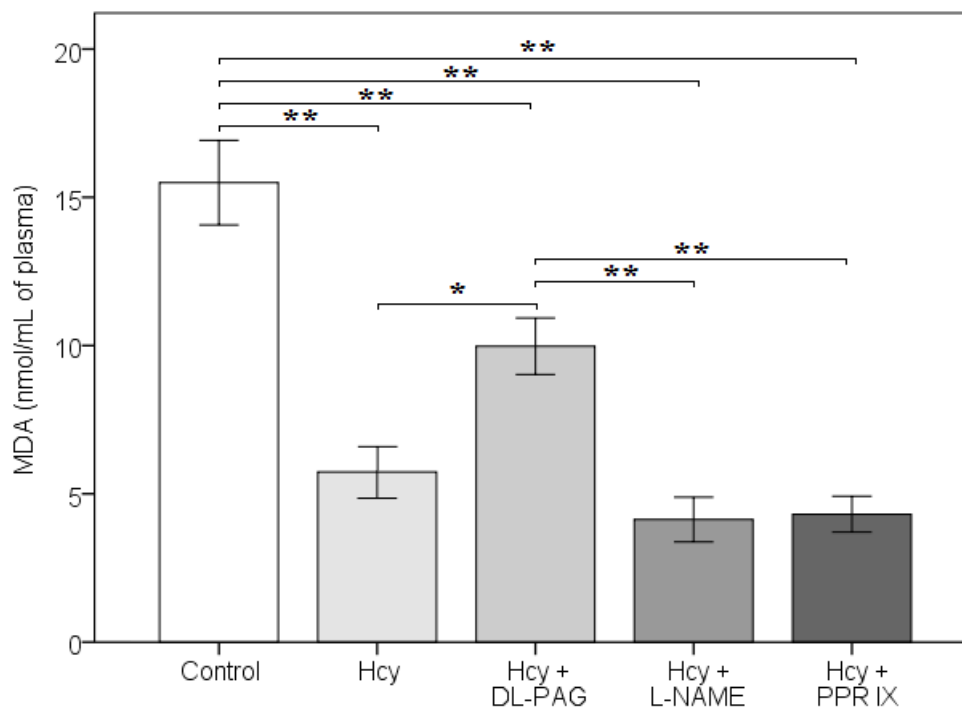
Независни Т-тест	AChE	MDA	CAT	CAT у плазми	GPX	SOD
Контрола / Нсу+DL-PAG	$p > 0,05$	*	**	**	**	**
Контрола / Нсу+L-NAME	$p > 0,05$	**	**	**	**	**
Контрола / Нсу+PPR IX	**	**	**	**	**	**
Нсу / Нсу+DL-PAG	**	*	**	**	**	$p > 0,05$
Нсу / Нсу+L-NAME	**	$p > 0,05$	**	**	**	$p > 0,05$
Нсу / Нсу+PPR IX	**	$p > 0,05$	**	**	**	**
Нсу+DL-PAG / Нсу+L-NAME	$p > 0,05$	**	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Нсу+DL-PAG / Нсу+PPR IX	$p > 0,05$	**	*	*	**	$p > 0,05$
Нсу+L-NAME / Нсу+PPR IX	*	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	**	$p > 0,05$

Графикон 13. Ефекти комбиноване примене Нсу и DL PAG, Нсу и L-NAME, Нсу и PPR IX на активност ацетилхолинестеразе (AChE) у ткиву миокарда срца пацова



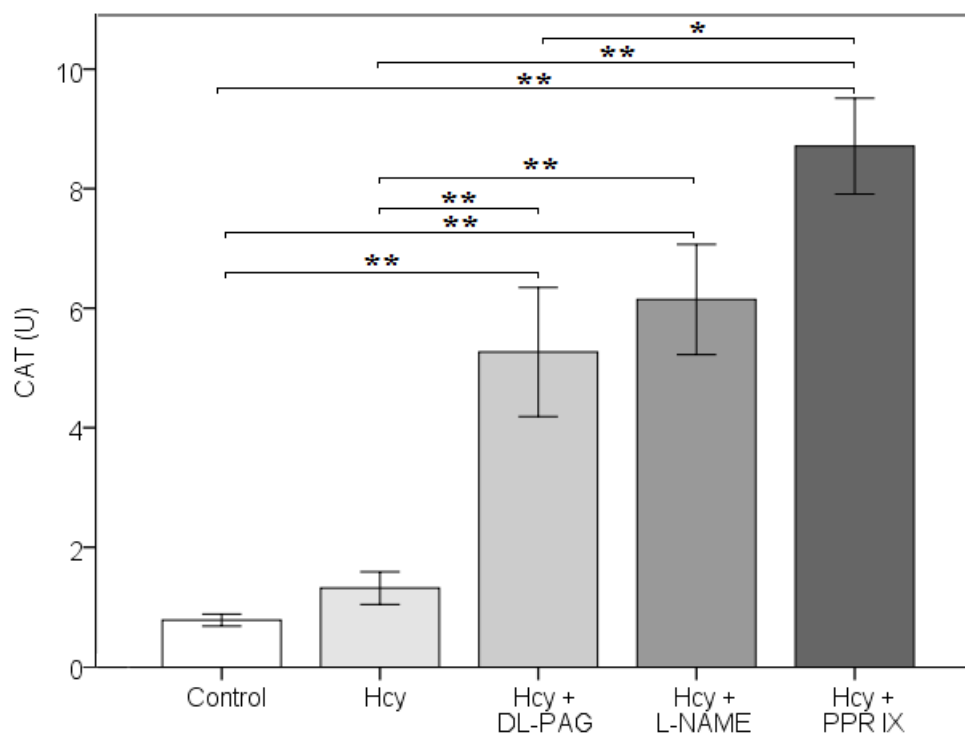
Након комбиноване примене DL-хомоцистеина и инхибитора синтезе гасотрансмитера дошло је до статистички значајног повећања активности AChE у односу на групу пацова којој је апликован само DL-хомоцистеин. Такође, вредности AChE биле су значајно повишене у групи пацова којој је апликована комбинација Нсу+PPR IX у односу на контролну групу, али и у односу на групу којој је апликована комбинација Нсу+L-NAME.

Графикон 14. Ефекти комбиноване примене Нсу и DL PAG, Нсу и L-NAME, Нсу и PPR IX на активност липидне пероксидације (MDA/плазма) у плазми пацова



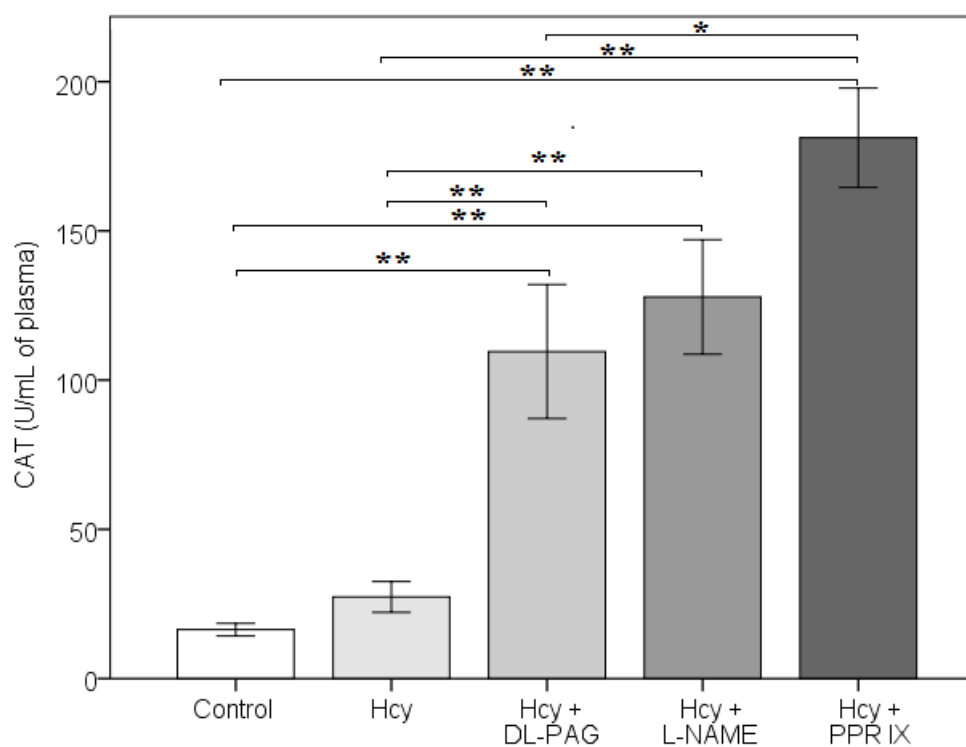
Након комбиноване апликације DL-хомоцистеина и инхибитора синтезе гасотрансмитера, у свим испитиваним групама је дошло до статистички значајног снижења вредности липидне пероксидације у плазми пацова у односу на контролну групу. Свакако, треба напоменути и да су значајно више вредности овог параметра забележене у групи пацова којој је апликована комбинација Нсу+DL PAG у односу на преостале испитиване комбинације (Нсу + L-NAME и Нсу +PPR IX), као и у односу на групу пацова третираних само DL-хомоцистеином.

Графикон 15. Ефекти комбиноване примене Нсу и DL PAG, Нсу и L-NAME, Нсу и PPR IX на активност каталазе у урину (CAT/U) пацова



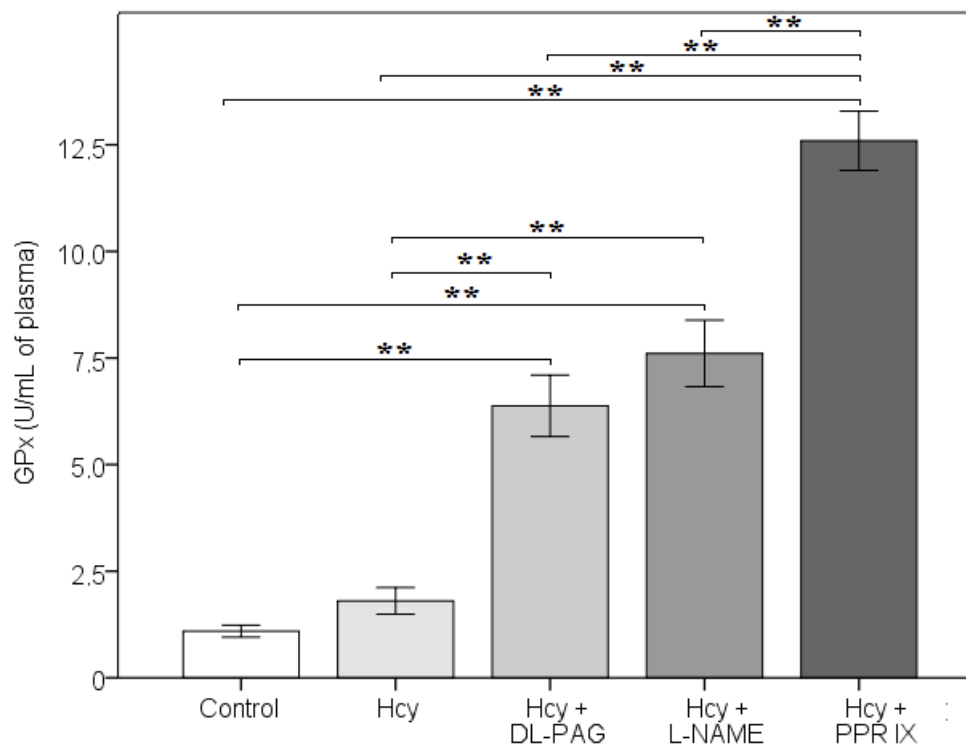
Вредности каталазе у урину пацова биле су статистички више у групама које су третиране комбинацијом Нсу+DL PAG, Нсу+L-NAME, Нсу+PPR IX у односу на контролну групу пацова, као и у односу на групу којој је апликован само Нсу. Значајно већа активност овог параметра такође је забележена у Нсу+PPR IX групи пацова у односу на Нсу+DL-PAG.

Графикон 16. Ефекти комбиноване примене Нсу и DL PAG, Нсу и L-NAME, Нсу и PPR IX на активност каталазе у плазми (CAT/плазма) пацова



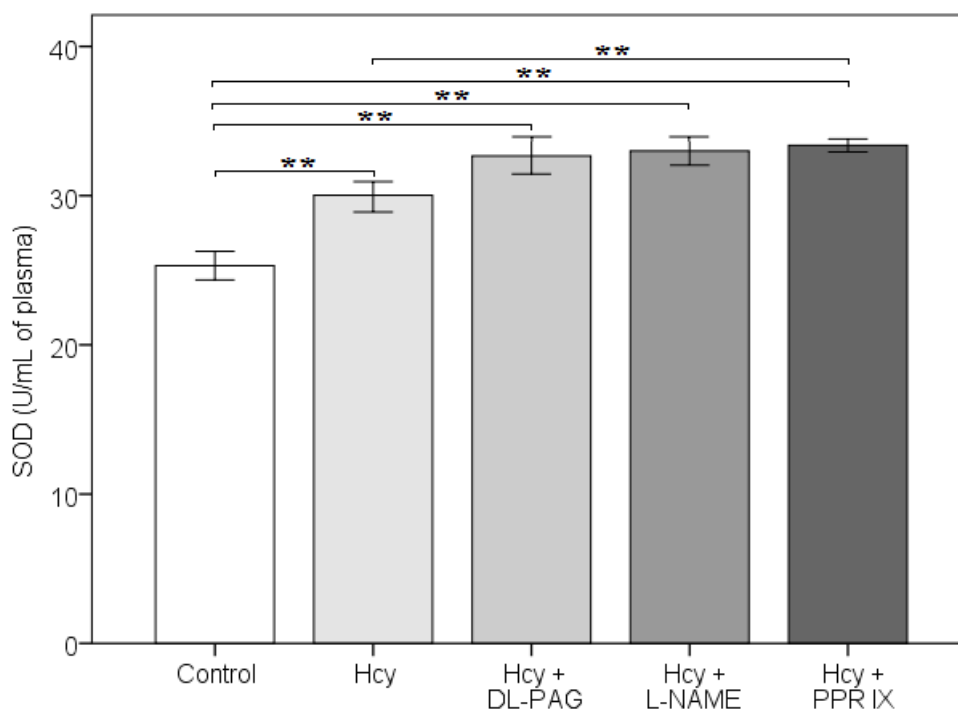
Комбинованом применом Нсу+DL PAG, Нсу+L-NAME, Нсу+PPR IX дошло је до значајног повећања активности CAT/U у поређењу са контролном и групом пацова којој је примењиван DL-хомоцистеин. Такође, значајно већа активност забележена је у групи Нсу+PPR IX у односу на Нсу+DL PAG групу пацова.

Графикон 17. Ефекти комбиноване примене Нсу и DL PAG, Нсу и L-NAME, Нсу и PPR IX на активност глутатион пероксидазе у плазми (GPx/плазми) пацова



Активност глутатион пероксидазе у плазми пацова била је статистички већа у групама третираних Нсу+DL PAG, Нсу+L-NAME, Нсу+PPR IX у односу на контролну групу пацова, као и у односу на групу којој је апликован само Нсу. Значајно већа активност овог параметра такође је забележена у Нсу+PPR IX групи пацова у односу на Нсу+DL-PAG.

Графикон 18. Ефекти комбиноване примене Нсу и DL PAG, Нсу и L-NAME, Нсу и PPR IX на активност супероксид дисмутазе у плазми (SOD/плазма) пацова



Комбинованом применом Нсу+DL PAG, Нсу+L-NAME, Нсу+PPR IX дошло је до значајног повећања супероксид дисмутазе у односу на контролну групу пацова. Значајно више вредности овог антиоксидационог ензима забележене комбинованом применом Нсу и PPR IX у односу на групу пацова којој је примењиван само Нсу.

4.2. СУБХРОНИЧНА СЕРИЈА ЕКСПЕРИМЕНАТА

4.2.1. Ефекти субхроничне хиперхомоцистеиније на активност ензима ацетилхолинестеразе у ткиву миокарда срца пацова и параметара оксидационог стреса у плазми

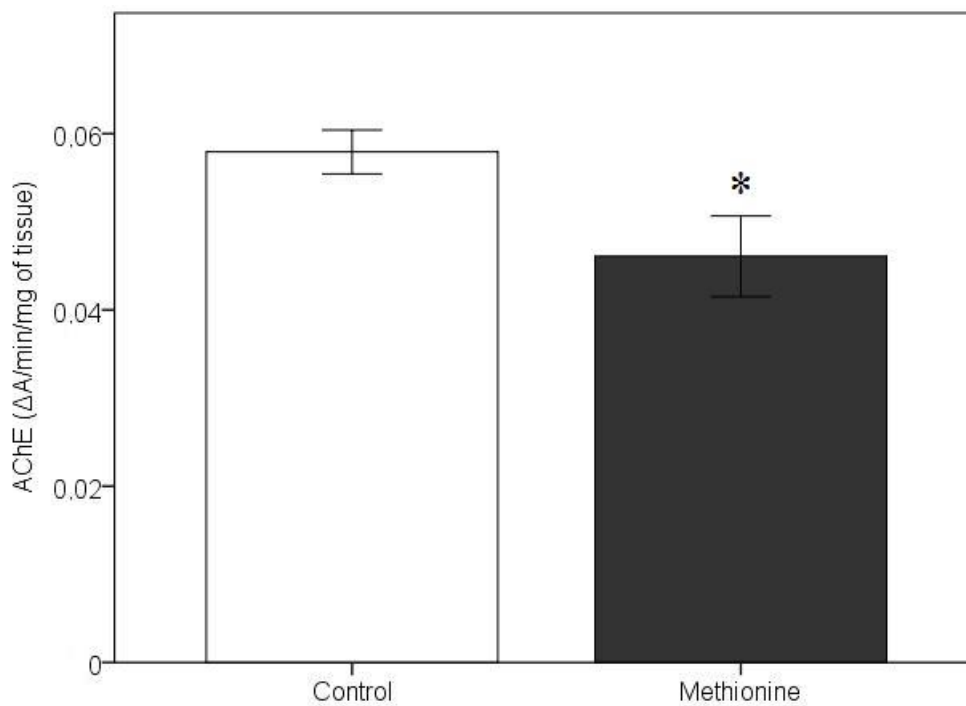
Табела 7. Регистроване вредности ацетилхолинестеразе (АChE) и параметара оксидационог стреса у плазми пацова након изазивања субхроничне хиперхомоцистеиније

X±SD	AChE (ΔA/min/mg тквива)	MDA (nmol/ml плазме)	CAT (U)	CAT (U/ml плазме)	GPx (U/ml плазме)	SOD (U/ml плазме)
Контрола	0.057±0.00 2	12.56±1.3 8	6.61±0.5 1	132.22±10.3 7	8.81±0.69	30.09±0.8 2
Метионин	0.046±0.00 4	15.03±1.3 9	8.17±1.0 6	163.53±21.2 3	10.90±1.4 1	29.92±0.4 4

Табела 8. Резултати статистичке значајности приликом поређења између група (*p<0,05; **p<0,01)

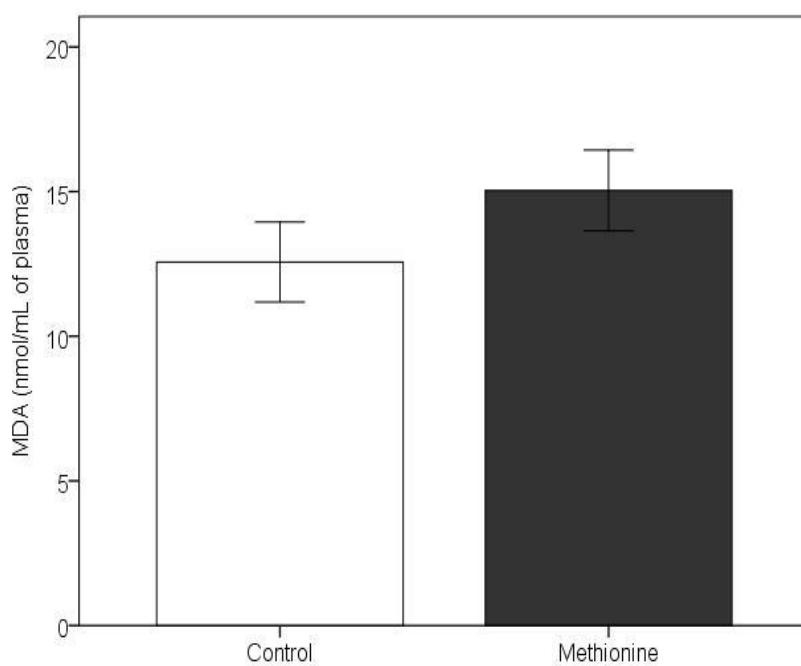
Независни Т-тест	AChE	MDA	CAT	CAT у плазми	GPX	SOD
Контрола / Метионин	*	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

Графикон 19. Ефекти субхроничне хиперхомоцистеиније (метионина) на активност ацетилхолинестеразе (AChE) у ткиву миокарда пацова



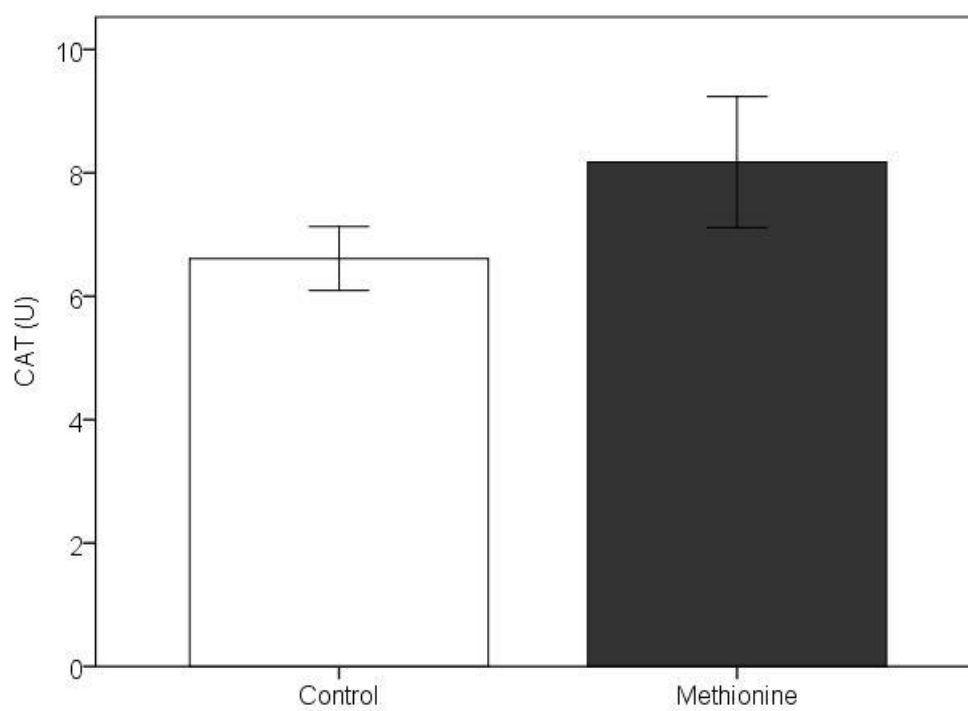
Субхронична хиперхомоцистеинија довела је до статистички значајно снижене активности AChE у ткиву срца пацова у односу на контролну групу.

Графикон 20. Ефекти субхроничне хиперхомоцистеиније (метионина) на активност липидне пероксидације у плазми (MDA/плазма) пацова



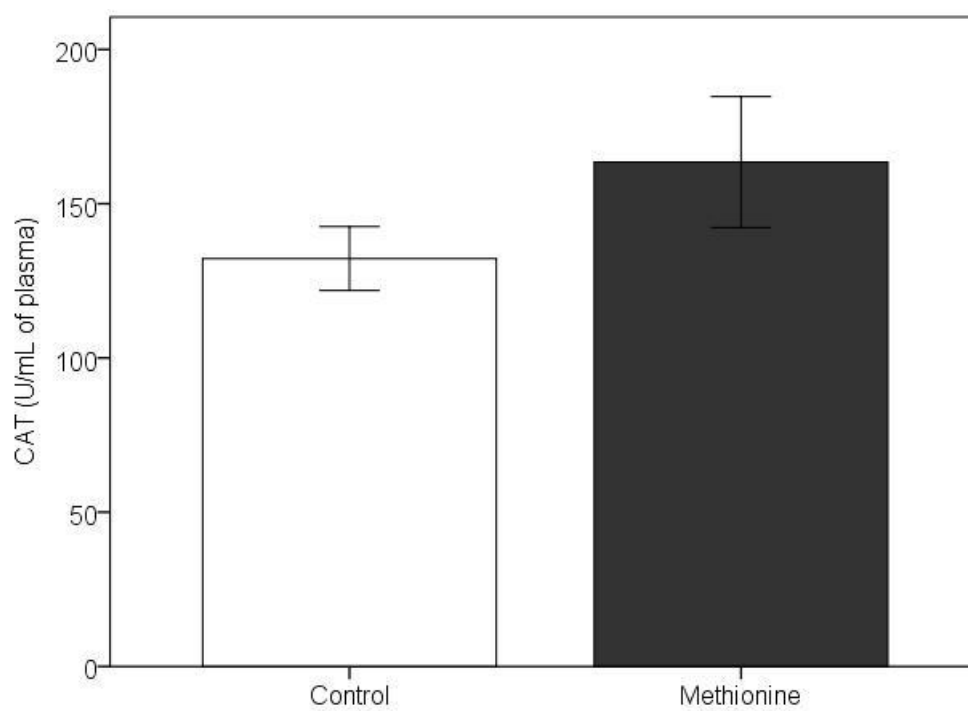
Након изазивања субхроничне хиперхомоцистеиније код пацова, није дошло до статистички значајних разлика у активности липидне пероксидације у односу на контролну групу пацова.

Графикон 21. Ефекти субхроничне хиперхомоцистеиније (метионина) на активност каталазе у урину (CAT/U) пацова



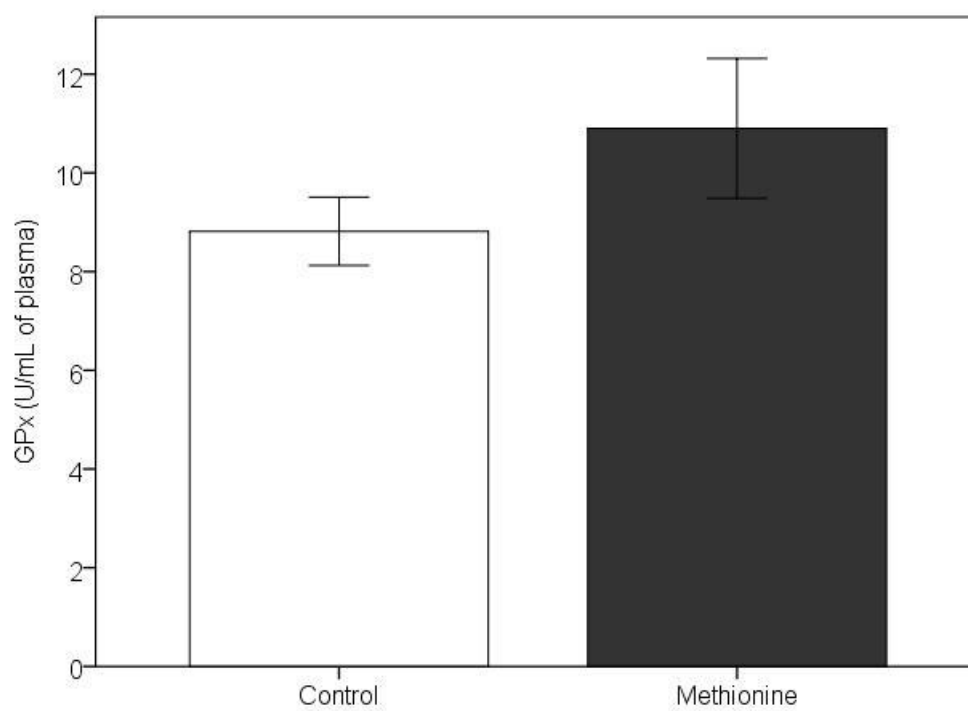
Активност каталазе у урину пацова којима је метионином изазвана субхронична хиперхомоцистеинија статистички се не разликује у односу на контролну групу пацова.

Графикон 22. Ефекти субхроничне хиперхомоцистеиније (метионина) на активност каталазе у плазми (CAT/плазма) пацова



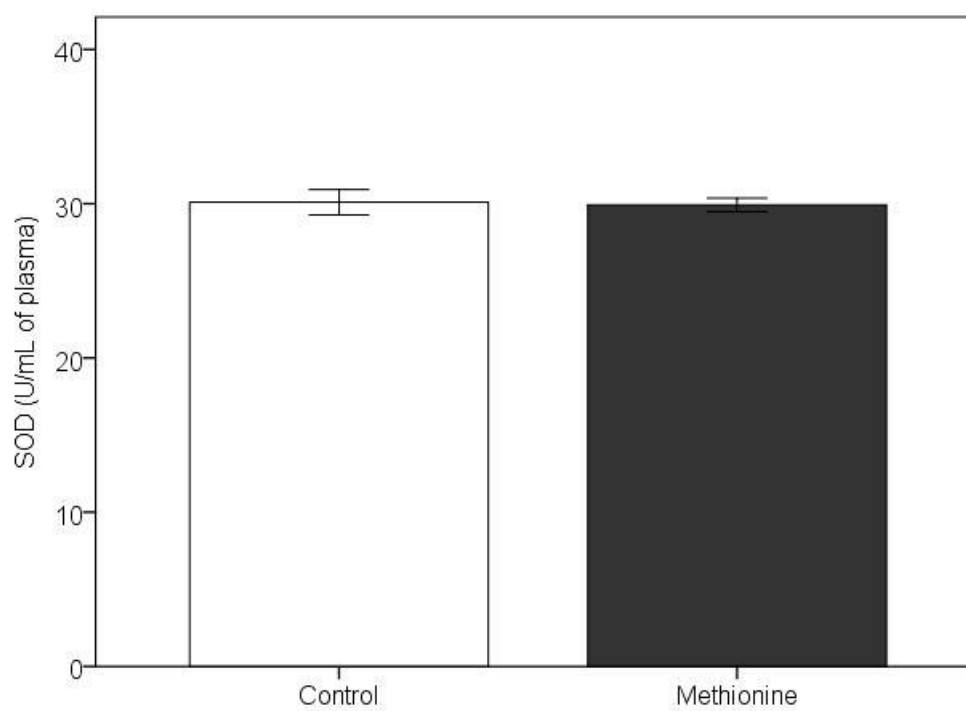
Активност каталазе у плазми код групе пацова са субхроничном хиперхомоцистеинијом није значајно промењена у односу на контролну групу.

Графикон 23. Ефекти субхроничне хиперхомоцистеинемije (метионина) на активност глутатион пероксидазе у плазми (GPx/плазми) пацова



Апликација метионина није довела до статистички значајних промена у вредности глутатион пероксидазе у плазми у односу на контролну групу пацова.

Графикон 24. Ефекти субхроничне хиперхомоцистеиније (метионина) на активност супероксид дисмутазе у плазми (SOD/плазма) пацова



Субхронична хиперхомоцистеинија није довела до значајних разлика активности SOD у плазми у поређењу са контролном групом.

V
ДИСКУСИЈА

5.1. ЕФЕКТИ АКУТНЕ И СУБХРОНИЧНЕ ХИПЕРХОМОЦИСТЕИНЕМИЈЕ НА АКТИВНОСТ ЕНЗИМА АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРАZE У СРЧАНОМ МИШИЋУ ПАЦОВА

Садашње истраживање је усмерено ка утврђивању ефеката акутне и субхроничне хиперхомоцистеинемije на редокс равнотежу и активност ацетилхолинестеразе миокарда пацова са посебним акцентом на могући значај гасотрансмитера у добијеним ефектима. У складу са тим, задатак ове студије је био да испита утицај акутно и субхронично повишених вредности хомоцистеина на оксидациони статус и активност ацетилхолинестеразе у ткиву миокарда. Поред тога, желели смо да утврдимо улогу сигналних гасовитих молекула (NO, H₂S и CO) у поменутих ефектима хомоцистеина, са циљем разумевања комплексне интеракције ових молекула која се годинама уназад наслућује као неизбежна и значајна у потпуном сагледавању дејства хомоцистеина на различите органске системе сисара.

Као што је напоменуто један од мајоритетних циљева студије је био утврђивање утицаја акутне и субхроничне хиперхомоцистеинемije на активност ензима ацетилхолинестеразе (AChE) у срчаном мишићу пацова.

Ацетилхолинестераза припада групи серин протеаза и један је од најефикаснијих познатих ензима код сисара, јер се зна да један молекул ацетилхолинестеразе у току једног минута може да хидролизује 6×10^5 молекула ацетилхолина (154). Физиолошка улога овог ензима, остварена у првом реду хидролизом ацетилхолина, је представљена прекидом агонистичког деловања ацетилхолина на мускаринске и никотинске рецепторе. Активни центар ацетилхолинестеразе чине ањонско и естарско место који су дефинисани одређеном аминокиселинском секвенцом, при чему ањонско место учествује у правилној оријентацији супстрата, тј, ацетилхолина. После формирања реверзибилног комплекса, долази до реакције између ацетил групе ацетилхолина и хидроксилне групе серина.

Ацетилхолинестераза постоји у неколико изоформи (AChET, AchER и AchEH), без обзира што је код сисара продукт само једног гена, захваљујући различитим посттранслационим модификацијама и удруживању са структурним протеинима. Поред каталитичке улоге везане за ацетилхолин, показано је да овај ензим може имати и друге неензимске функције, укључујући трофичке утицаје, ефекте на ћелијску пролиферацију и диференцијацију, као и одговор на различите стимулусе, укључујући стрес. С обзиром да је ацетилхолинестераза одговорна за хидролизу ацетилхолина у

холинергичким синапсама, дејство ацетилхолина у синаптичким пукотинама зависи од активности овог ензима (155).

За разлику од možданог ткива, присуство и улога ацетилхолинестеразе у срцу сисара је много мање изучавана и позната. Експерименталне хистохемијске и биохемијске студије су утврдиле присуство ацетилхолинестеразе у ткиву срца сисара. Ове студије су откриле да је концентрација AchE већа у преткоморама у односу на коморе што може бити важно у вагусној контроли спроводног система срца (156). Са друге стране присуство ацетилхолинестеразе у вентрикулумима потврђује негативан инотропни ефекат холинергичког нервног система. Концентрација овог ензима у ткиву срца сисара је нарочито велика у региону СА чвора десне преткоморе и базе десне коморе. Осим тога, заступљеност AchE у десној преткомори је много већа него у левој. Оваква локализација ацетилхолинестеразе је у корелацији са негативним хронотропним и дромотропним утицајем вагуса.

Већина сазнања о утицају хиперхомоцистеинемије на активност холинестераза је добијена на основу малобројних *in vitro* студијама које су проучавале ову проблематику у ткиву мозга. У *in vitro* условима је показано да хиперхомоцистеинемија изазива смањену активност ацетилхолинестеразе (157). Сугерисано је да је добијена инхибиција ацетилхолинестеразе посредована оксидационим стресом (158).

Друго истраживање је показало да метионин нема ефекта, док хомоцистеин инхибира активност бутирлихолинестеразе (159). Остварена инхибиција је била по типу компетитивне инхибиције. Ин виво и ин витро студијом, Scherer и сарадници су указали да акутна хиперхомоцистеинемија инхибира активност холинестераза у серуму људи и пацова (160). Резултати домаћих аутора су сугерисали да акутна апликација хомоцистеин тиолактона у дози од 5,5 mmol/kg изазива значајно смањење активности ацетилхолинестеразе у хомогенату ткива срца, без статистички значајних ефеката на активност овог ензима у крви пацова (161). Тиме је назначена улога метаболита хомоцистеина, хомоцистеин тиолактона, као медијатора ових ефеката.

Резултати садашње студије су у сагласности са литературним подацима и показују да и акутна и субхронична хиперхомоцистеинемија изазива снижење активности ацетилхолинестеразе у срцу пацова. Такође, уочљиво је да као и у претходним анализама, не постоји разлика у добијеним ефектима између форми хомоцистеина у случају акутно повишених вредности хомоцистеина. Ови налази сугеришу да хомоцистеин путем дејства на AchE може да мења холинергичку контролу срчане функције односно да инхибицијом разградње ацетилхолина стимулише

снажнији и дуготрајнији негативни холинергички ефекат на срце (негативни хронотропни, дромотропни и инотрони). На овај начин се може дати допринос у објашњењу штетних функционалних дејстава које хомоцистеин испољава на миокард (161). У том смислу, сазнања ове студије могу да буду од интереса за будућа базична истраживања из ове области, али и изванредна основа за велике клиничке студије које су неопходне како би садашња тема добила примењену димензију.

5.2. ЕФЕКТИ АКУТНЕ И СУБХРОНИЧНЕ ХИПЕРХОМОЦИСТЕИНЕМИЈЕ НА ОКСИДАЦИОНИ СТАТУС ПАЦОВА

Један од главних циљева студије је био да испита оксидациони статус пацова у условима акутне и субхроничне хиперхомоцистеинемije. Као што је већ поменуто подаци о утицају повишених вредности хомоцистеина на развој системског оксидациони стреса како у анималним тако и хуманим моделима су неусаглашени. Ипак, већина истраживача се слаже да хомоцистеин узрокује оксидативни стрес преко више механизма:

1. повећаном продукцијом слободних реактивних радикала,
2. атенуацијом антиоксидативних система,
3. директним цитотоксичним деловањем на ендотел и проинфламаторним деловањем.

У стању хиперхомоцистеинемije слободне реактивне врсте настају услед аутооксидације хомоцистеина, продукције H_2O_2 у катаболизму хомоцистеина (162). Хомоцистеин $COONCH(CH_2CH_2CH)NH_2$ као слободна аминокиселина може бити у редукованом (као тиол SH) или оксидованом облику (као симетрични дисулфид хомоцистин RSSR). У плазми доминира тиолни, тј. редуковани облик хомоцистеина који лако подлеже оксидацији, при чему два редукована молекула дају дисулфид, два водоникова јона (H^+) и два електрона ($2e^-$) (162): $2RSH = RSSR + 2H^+ + 2e^-$

У присуству јона метала и кисеоника може доћи до аутооксидације хомоцистеина при чему настају супероксидни и хидроксилни ањони, водоник-пероксид и тиолни слободни радикали као нпр. хомоцистеин тионолактон (циклизовани облик хомоцистеина). Тиоли у присуству јона гвожђа иницирају липидну пероксидацију, продукцију хидроксилног радикала и оксидативно модификованих протеина. Хидроксил радикали (OH^- , OH^\bullet) и супероксидни ањон ($O_2^{\bullet-}$), под дејством суперосид дисмутазе или спонтано, конвертују се у H_2O_2 (163). Ефекти наведеног процеса су

фаворизовани ихивибућим деловањем хомоцистеина на експресију глутатион пероксидазе (GPx-1) антиоксидативног ензима који редукује водоник-пероксид до воде. Регулација оксидације сумпорних аминокиселина важна је за заштиту интегритета ћелије. Наведени радикали могу редуковати Cu^{2+} церулоплазмина у Cu^+ , што доводи до оксидације LDL јер изостаје протективни ефекат Cu^{2+} . Хиперхомоцистеинија ($> 100 \mu\text{mol/l}$) стимулише оксидацију LDL-а преко оксидације Cu^{2+} церулоплазмина (163).

Резултати наше студије показују да су акутно повишене вредности обе форме хомоцистеина (основног и тиолактон облика) повезане са нижим степеном липидне пероксидације мембране. Са друге стране, субхронична хиперхомоцистеинија узрокована метионином је изазвала (иако несигнификантан) повећан степен липидног оштећења.

Липидна пероксидација настаје реакцијом слободних радикала и полинезасићених масних киселина при чему настаје липопероксил слободни радикал који напада суседну слободну масну киселину и тиме започне ланчану реакцију на нивоу целе ћелијске мембране (163). Липидну пероксидацију најчешће узрокује хидроксил радикал (OH^\bullet), иако и други радикали могу да покрену процес пероксидације. Овакво оштећење ћелијске мембране се одвија кроз три нивоа: иницијација, пропација и терминација. Реакција молекуларног кисеоника са полинезасићеним масним киселинама (ПУФА) је спински немогућа. Због тога пероксидација започиње механизмом који укључује слободне радикале чиме се премошћује спинска препрека између кисеоника и ПУФА-е. Пероксидација липидног двослоја започиње дејством реактивних кисеоничних радикала на ПУФА путем издвајања атома H^\bullet из метиленске групе. Најчешћи слободни радикали који могу да оксидују ПУФА мембране поред OH^\bullet су HO_2^\bullet , RO^\bullet и RO_2^\bullet (163).

У аеробним условима коњуговани диени могу да се спооје са O_2 , и формирају пероксилне радикале LOO^\bullet који даље елиминишу H^\bullet из других ПУФА, при чему долази до настанка липидних хидропероксида (укључујући цикличке пероксиде) - фаза пропације. Супероксид анион радикал ($\text{O}_2^{\bullet-}$) је негативног набоја и нема способност уласка у унутрашњост ћелијске мембране (изузетак је улазак анионским каналима, али на свом путу не реагује са ПУФА), што објашњава његово неучествовање у липидној пероксидацији. Интензивна липидна пероксидација мембрана доводи до губитка њене флуидности, снижавања вредности мембранског потенцијала, повећања пермеабилности за H^+ и друге јоне, и у крајњем дезинтеграције ћелије (163).

Липидни пероксиди стварају многобројне разградне продукте – од алдехида, кетона, угљенводоника (етана, етена, пентана), еоксида, до активних радикала. Малондиалдехид (MDA) који је одређиван у овој студији се сматра поузданим показатељем пероксидације. MDA постоји у различитим облицима и у физиолошким условима се налази у облику енолатног јона који реагује са протеинима, показујући изразити афинитет према лизинском аминокиселинском остатку. Гуанин у молекулу DNK такође може бити циљно место напада малондиалдехида што изазива мутагене промене. У организму MDA се метаболише до малонатне киселине која је компетитивни инхибитор митохондријске сукцинат дехидрогеназе (163).

Из претходног излагања и на основу резултата наше студије се уочава следеће:

1. дуже трајање хиперхомоцистеиније је повезано са већим степеном липидног оштећења; 2. могуће је да због акутног карактера повећања хомоцистеина није било времена за пораст концентрације оних слободних радикала који би се укључили у интеракцију са ПУФА и изазвали њихову пероксидацију. Поред тога, мањи степен липидног оштећења у условима акутне хиперхомоцистеиније указује и да је активност антиоксидационих ензима заштите јача на почетку односно да се током дуже експозиције повишеним вредностима хомоцистеина она исцрпљује (што је и показала већина ензима у нашем истраживању у оба случаја).

Недавни резултати наше истраживачке групе су показали да хронична хиперхомоцистеинија поготово тешког степена ($> 60 \mu\text{mol/L}$) узрокује значајно повећање липидне пероксидације код пацова третираних метионинском дијетом (са или без витамина Б комплекса) током 4 недеље (164). Међутим, приликом нашег претходног истраживања у коме су различите форме хомоцистеина акутно апликоване у сам срчани мишић забележили смо да и основни и тиолактон облик хомоцистеина нису изазвале липидну пероксидацију мембрана кардиомиоцита (165).

Резултати других аутора су такође слични. У једној од претходно публикованих студија пацови су третиран хомоцистеином током тридесет дана у дози од 1 mg/kg . Запажено је да хронична хиперхомоцистеинија индукује значајно повећање системске липидне пероксидације (166) што је у складу са горе наведеним закључцима.

Други сегмент праћења оксидационог статуса пацова у садашњем истраживању се огледао у одређивању плазма активности антиоксидационих ензима заштите супероксид дизмутазе, каталазе и глутатион пероксидазе (SOD, CAT и GPx). Однос хомоцистеина и ензимских компоненти антиоксидационе заштите је недовољно изучаван док су информације инконзистентне.

Преовладава мишљење да хомоцистеин може да утиче на ендогени антиоксидациони ензимски систем заштите путем два механизма који се често преклапају: 1. директна инхибиција синтезе и активности већине интраћелијских антиоксидационих ензима; 2. повећаном продукцијом слободних реактивних радикала који исцрпљују антиоксидациону активност.

Директно негативно дејство хомоцистеина на продукцију и активност антиоксидационих ензима се најлакше испољава (и најбоље је проучена) на примеру глутатионског циклуса односно глутатион пероксидазе. Хомоцистеин улази у интеракцију са глутатионом током свог метаболизма тј. транссулфурацијског пута. Поремећаји одвијања овог пута изазивају смањену продукцију глутатиона из цистеина. Поред тога, експериментални подаци су указали да хомоцистеин може да супримира експресију глутатион пероксидазе (GPx-1) директним дејством на процес транслације (167).

Исцрпљивање антиоксидационих механизма заштите може настати у случају прекомерног генерисања слободних радикала под утицајем хомоцистеина. Биохемијска основа повећане продукције про-оксиданаса током хиперхомоцистеинемije се налази у објашњењу да хомоцистеин подлеже аутооксидацији. Токсичност хомоцистеина је последица ковалентног везивања хомоцистеина за протеине које је праћено модификацијом њихове функције. Тај процес се зове хомоцистеинилација и представља посттранслациону модификацију протеина. Степен протеинске хомоцистеинилације је пропорционалан повећаном нивоу хомоцистеина у плазми. S-хомоцистеинилација је процес везивања хомоцистеина помоћу слободне тиол групе за другу слободну тиол групу која је заправо Cys остатак у протеинском молекулу при чему се формира дисулфидна веза, што значајно утиче на тиол-зависни редокс статус протеина. аутооксидацијом хомоцистеина настају кисеонична једињења: супероксид анион радикал (O_2^-), хидроксилини радикал ($OH\cdot$) и водоник пероксид (H_2O_2). Настали супероксид и тиол радикал су интермедијери у овој оксидоредукцији, са крајњим производом, водоник-пероксидом (167, 168).

Осим тога, сматра се да хомоцистеин индукује повећано стварање бројних оксидаза (нарочито NADPH оксидаза) у коронарном ендотелу, које су богат васкуларни извор O_2^- . Ова ROS, као изузетно токсична и реактивна, лако ступа у интеракцију са NO, што узрокује стварање још токсичнијег $ONOO^-$ (који са своје стране оштећује ендотел) и тако смањује биорасположивост NO (167, 168).

Главне компоненте ензимског антиоксидационог система заштите чине каталаза (CAT), супероксид дизмутаза (SOD) и глутатион пероксидаза (GPx). Супероксид дизмутаза представља главну линију одбране од токсичности коју ствара кисеоник у живим ћелијама. SOD је металопротеин који катализује конверзију супероксид ањон радикала у молекулски кисеоник и водоник-пероксид. Постоје четири врсте овог ензима у зависности од метала који се налази у центру: 1. SOD која садржи гвожђе - FeSOD, 2. SOD која садржи манган - MnSOD, 3. SOD која садржи бакар и цинк - CuZnSOD и екстрацелуларна EC SOD. У ћелијама су заступљене CuZnSOD (у цитоплазми) и MnSOD (у митохондријама). У еритроцитима је присутна CuZnSOD која има функцију да uklони супероксид настао аутооксидацијом оксигемоглобина. У ендотелу, овај ензим игра веома важну улогу у заштити NO од деструкције од стране супероксида, чиме спречава и настанак ONOO⁻ (169).

Каталаза катализује редукцију водоник пероксида у воду и молекулски кисеоник. Каталаза може да оксидује H-донора уз утршак једног молекула водоник пероксида. Да ли ће каталаза катализовати брзу (каталазну) или спору (пероксидазну) реакцију, зависи од брзине настајање водоник пероксида као и од концентрације донора водоника (170, 171).

CAT је кључни ензим у еритроцитима одговоран за уклањање како егзогеног H₂O₂ (нпр. пореклом из дисфункционалног ендотела, ћелија укључених у инфламацију), тако и ендогеног H₂O₂ (произведеног кроз аутооксидацију оксигемоглобина). Околно ткиво може остварити ефекат на каталазну активност у еритроцитима кроз појачану емисију NO, који је инхибитор овог ензима (170, 171).

Глутатион редокс циклус представља главни пут редукције органских хидропероксида у коме централно место заузима ензим глутатион пероксидаза. Овај ензим је присутан је у свим ћелијама сисара. Постоји неколико облика овог ензима: 1. селен-зависна глутатион пероксидаза (SeGSH-Px), која редукује H₂O₂ до воде и органских хидропероксида уз присуство GSH као другог супстрата; 2. селен-независна форма која користи само органске хидропероксиде као супстрат и припада фамилији ензима глутатион-S-трансфераза (GST), која катализује реакцију коњугације GSH са разним органским једињењима, као и ензим фосфолипидхидрокси пероксид глутатион пероксидаза (PH GSH-Px), која реагује само са фосфолипидним хидропероксидима (172, 173).

У еритроцитима GSH-Px има специфичну улогу да заштити ћелиску мембрану пре свега, али и хемоглобин од оксидативних оштећења. Она уклања H₂O₂ који улази

кроз мембрану (егзогени), као и H_2O_2 који настаје кроз аутооксидацију хемоглобина везаног за мембрану. Такође, за заштиту мембране је есенцијална способност GSH-Px да уклања липидне хидропероксиде, чиме се зауставља ланчана реакција липидне пероксидације (172, 173).

У нашој студији смо уочили да акутно примењени основни облик хомоцистеина изазива несигнификатно повећање активности CAT и GPx, док тиолактон евидентно и снажно стимулише појачану мобилност оба поменута ензима. Поред тога, ови налази потврђују претходно наведене литературне информације о повезаности хомоцистеина и ензима глутатионског циклуса односно ензима који имају заједнички субстрат као и GPx – CAT. Са друге стране, субхронична хиперхомоцистеинија је изазвала такође промене у активности свих испитиваних ензима антиоксидационе заштите али без статистичке потврде. Очигледно да је као и у случају липидне пероксидације дужина експозиције повишеним вредностима хомоцистеина била одлучујућа у разлици међу добијеним резултатима. Ови резултати могу бити последица постигнуте антиоксидационе компензације тј. засићења или исцрпљења њене активности у односу на акутну хиперхомоцистеинију.

Налази наше претходне студије у којој је пацовима индукована умерена и тешка хронична хиперхомоцистеинија четворонедељном метионинском дијетом (са или без присуства витамина Б комплекса) сугеришу да високе вредности хомоцистеина у дужем временском периоду узрокују снижење активности антиоксидационих ензима (SOD, CAT, GSH) (174).

Сазнања других студија корелирају са претпостављеном динамиком дејства хомоцистеина у односу на дужину експозиције његовим повишеним вредностима. Тако су Akgullu и сарадници између осталог испитивали утицај хроничне хиперхомоцистеиније након четворонедељног третмана метионином на активност SOD и CAT у срчаном мишићу пацова. Запажено је да хронично повишена концентрација овог тиола индукује значајно снижење активности поменутих ензима у срцу пацова (175). На овај начин су још једном потврђени литературни подаци који су доказали да хомоцистеин (у високој концентрацији и током пролонгираног дејства) може да инхибира синтезу и активност антиоксидационих ензима.

У том смислу, може се запазити да се акутни одговор антиоксидационог ензимског система заштите на хиперхомоцистеинију огледа у порасту активности већине антиоксидационих ензима, док током дужег временског интервала повишени хомоцистеин остварује негативни ефекат на генезу и активност поменутих ензима.

5.3. АКУТНИ ЕФЕКТИ ИНХИБИТОРА СИНТЕЗЕ ГАСОТРАНСМИТЕРА (L-NAME, PPR IX И DL-PAG) НА АКТИВНОСТ ЕНЗИМА АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРАЗЕ У ТКИВУ МИОКАРДА СРЦА ПАЦОВА

Циљ овог дела студије је био да истражимо интеракцију гасовитих сигналних молекула (NO, CO и H₂S) и ацетилхолинестеразе односно да утврдимо потенцијални утицај ових сигналних гасова на активност AChE у срцу пацова. У том смислу, спроведена је акутна интраперитонеална апликација инхибитора сваког од гасотрансмitera (L-NAME, PPR IX и DL-PAG) како би смо испитали ефекте њихове ендogene производње тј. активност ацетилхолинестеразе у условима одсуства ових молекула.

Узајамно дејство гасотрансмitera је недовољно познато и завређује пажњу с обзиром да је током последње две деценије примећен њихов све већи значај у одржавању кардиоваскуларне хомеостазе.

У васкуларној мрежи CO изазива вазодилатацију (176), активирајући исти систем секундарних гласника (sGC-cGMP), као и NO (176). NO селективно индукује експресију NO 1 гена и последичну продукцију CO у крвним судовима (177). Способност NO да стимулише генерисање CO-а, представља потенцијални алтернативни механизам којим NO активира sGC и изазива релаксацију васкуларних глатких мишића. CO директно инхибира активност iNOS, чиме ограничава претерану синтезу NO-а, који укључујући се у реакције са слободним радикалима потенцира оксидациона оштећења (177).

У *in vitro* условима је показано да NO инхибира активност NOS и смањују нивое cGMP у присуству NO-а (178). Сматра се да CO смањује активност cGMP везивањем за sGC, чиме доводи до конформационе промене овог ензима и ремети његову спрегу са NO. Што се тиче директне инхибиције активности NOS од стране NO, претпоставља се да је NO способан да се веже за хем групу NOS-а и тако да му редукује активност, а самим тим и продукцију NO-а (179). Ова сазнања сугеришу да CO може се понаша као инхибиторни модулатор NO-cGMP сигналног система.

Са друге стране, показано је да NO двојачко делује на активност NO, и инхибиторно и стимулаторно (180). Потенцијално објашњење овог наизглед парадокса може да се пронађе у чињеници да NO као врста слободног радикала, везивањем за цистеинске остатке, индукује NO-1 експресију, док измештањем O₂⁻ из хем групе, инактивира NO (178). Поред тога, забележено је да NO донори селективно повећавају

експресију tРНК за NO 1 у васкуларним глатким мишићима пацова (177). Механизам којим NO повећава експресију NO-1 још увек није довољно прецизан, али се претпоставља да укључује cGMP сигнални пут (177).

Студије на културама ћелија су такође показале да егзогено унети CO блокира повећање cGMP активности који је претходно узроковао NO (178), док инхибитори ендогеног CO супротно томе, повећавају cGMP активност индуковану од стране NO. Поређења ради, N ω -nitro-L-arginine (L-NAME), неселективни инхибитор NOS, инхибира вазодилатацију изазвану CO на *in vivo* анималним моделима. Каснија апликација NO донора, натријум нитроприсида, поново успоставља CO вазодилатацију (181). Ови налази нам указују да NO може бити веома значајан у остваривању васкуларних ефеката CO.

NO такође може да ступи у интеракцију и са H₂S сигналним системом. Тако на пример, вазодилаторни ефекти H₂S у васкуларним глатким мишићима могу бити делимично зависни од NO. То су доказале студије на аорти анималних модела у којима је апликацијом L-NAME, смањен вазодилаторни потенцијал H₂S (182). Интересантно да се до сличних сазнања дошло и скидањем ендотелног слоја са аортних прстена (182). Ова сазнања сугеришу да H₂S стимулише производњу NO, што последично утиче на вазорелаксативна својства H₂S. Иста истраживања су показала да применом селективног инхибитора sGC, долази до повећања вазодилаторног потенцијала H₂S, указујући да H₂S не мора обавезно своје ефекте да остварује преко sG (182).

У другим испитивањима можемо пронаћи да L-NAME не утиче на васкуларна својства H₂S-а, док комбинација H₂S и NO донора узрокује значајно већу инхибицију васкуларне констрикције у односу на њихову самосталну примену (183) што показује да одређена синергија ова два система ипак постоји.

Подаци о улози H₂S у васкуларним ефектима NO су такође контрадикторни. Док једне студије показују да H₂S повећава вазорелаксацију изазвану NO (184), у друга наводе пак супротне резултате (185). Контрадикторне податке о овој интеркацији је тешко објаснити. Наиме, уколико H₂S повећава концентрацију cGMP, онда би то могло да објасни смањење ефеката NO, који делује преко овог сигналног пута. Са друге стране, ако H₂S изазива вазодилатацију независно од NO, то би могло да образложи повећање NO зависне вазорелаксације под утицајем H₂S. Даља истраживања су свакако потребна ради разјашњења који од ових механизма је доминантан и у којим условима.

Истраживања са L-цистеином (H₂S донором) су показала да H₂S инхибира пораст концентрације cGMP индукован од стране NO, док супероксид дизмутаза (SOD)

може да редукује овај инхибиторни ефекат L-цистеина (186). То значи да инхибиторни ефекат L-цистеина делом настаје као последица његове аутооксидације SOD-ом, а делом услед директне интеракције SH група са NO.

Студије на аорти пацова су забележиле да NO, на дозно зависан начин, повећава активност CBS и CSE тиме продукцију H₂S (183). Сматра се да механизам којим NO остварује овај ефекат укључује нисходну регулацију cGMP (стимулацијом GMP-зависних киназа) или директном нитролизацијом CBS и CSE. NO такође може да узрокује повећање tPHK за CSE, на начин који још увек није прецизно утврђен, али је могуће да се одвија путем NF-κB сигналног система. Још један од начина којим NO може да повећа продукцију H₂S подразумева пораст преузимања L-цистеина кога индукује NO у ендотелним ћелијама (187).

За сада се најмање зна о међусобном дејству CO и H₂S система. У доступним базама података се може пронаћи само неколико студија које проучавају ову проблематику. Већина информација о интеракција ова два система се односи на дешавања у васкуларним глатким мишићима. Студије на васкуларним глатким мишићима су показале да интеракција између CO и H₂S заиста постоји. Најпре је уочено да CO може да утиче на H₂S/CSE сигнални пут. Наиме, примећено је да након примене Zn протопорфирина (ZnPP), специфичног инхибитора HO, концентрација H₂S у васкуларном глатком мишићу нагло расте (188). Ови налази указују да ендогено продуковани CO може да редукује синтезу H₂S под физиолошким условима. Механизам којим CO остварује овај ефекат још увек није познат. Једна од хипотеза је да ендогени CO смањује експресију CSE у васкуларном мишићу и тиме производњу H₂S-а (188). На тај начин, изгледа да CO изазива нисходну регулацију H₂S.

Са друге стране, очигледно је да и H₂S може да делује на CO сигнални систем. Показано је да апликација пропаргилглицина (PAG), специфичног инхибитора CSE, повећава ослобађање CO-а у васкуларном глатком мишићу (188). Поред тога, егзогени H₂S узрокује смањење нивоа карбоксихемоглобина (HbCO) у глаткој мишићној ћелији (188). Ови резултати несумњиво указују да H₂S редукује продукцију CO у физиолошким условима. На тај начин, идентично претходном односу, H₂S доводи до нисходне регулације CO. Механизам путем кога H₂S остварује свој ефекат је такође још увек нејасан. Међутим, као једно од потенцијалних објашњења се наводи инхибиција експресије HO 1 у васкуларним глатким мишићним ћелијама. На основу овога можемо увидети да оба гасотрансмитера доводе до смањења у синтези другог и за оба се као могући механизми сугеришу инхибиција ензима који су укључени у њихову

продукцију. С обзиром на скромне податке којима располажемо још увек са сигурношћу не можемо донети ни један закључак о међусобним односима ова два сигнална система, за чије разумевање је потребно спровести нова и методолошки комплекснија истраживања.

Утицај гасних неуротрансмитера на функцију ацетилхолинестеразе је веома мало проучаван док су добијени подаци неусаглашени. Највише сазнања из ове тематике потиче из повезаности AchE и NO сингалног пута. До сада је познато да NO сигнални систем и AchE/Ach систем могу да остваре интеракцију. Тако је доказано да донор азот моноксид (спермин NONO-ат) изазива инхибицију кортикалне AchE активности (189). Поред тога, у мишићним ткивима апликација NO донорима (S-нитрозо-N-ацетил-DL-пенициламин, SNAP) такође изазива супресију AchE активности (190).

Други аутори су указали да активација NMDA рецептора од стране глутамата и глицина путем инфлукса јона калцијума стимулише NOS на нивоу неуромускуларне спојнице. На овај начин продуковани азот моноксид потом може да модулира синаптичку активност AchE у смислу парцијалне инхибиције (191).

Интересантан је податак да AchE посредством AC/cAMP/PKC сигнализације може да мења излазак NO из ћелије и самим тим да ремети његове биолошке ефекте у физиолошким и патофизиолошким стањима (192).

Наши резултати показују да је блокада продукције NO и CO гасотрансмитера повезана са снижењем активности ацетилхолинестеразе. Ова сазнања индикују да за разлику од H₂S, NO и CO сигнални путеви могу да имају улогу у модулацији активности овог ензима. На основу наших налаза се уочава да је овај ефекат био најизраженији у случају NO сигнализације.

5.4. АКУТНИ ЕФЕКТИ ИНХИБИТОРА СИНТЕЗЕ ГАСОТРАНСМИТЕРА (L-NAME, PPR IX И DL-PAG) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА У ПЛАЗМИ ПАЦОВА

Интеракција гасотрансмitera и слободних радикала може да буде од великог значаја у разумевању молекулских догађаја који учествују у одржавању физиолошких функција срца и крвних судова али и претходе развоју многих патофизиолошких процеса у кардиоваскуларном систему сисара. Управо зато смо желели да испитамо на који начин спречавање синтезе ових сигналних гасова може да модулира ослобађање испитиваних биомаркера оксидационог стреса у плазми пацова.

Узајамно дејство NO са слободним радикалима је добро познато и неколико пута поменуто у претходном делу текста. Обзиром да се о повезаности остала два гасотрансмitera и слободних радикала мало зна, покушаћемо да мало детаљније анализирамо њихове односе. За разлику од NO-а који се лако везује за слободне радикале и ствара још штетније продукте (ONOO^-), CO може да поседује и цитопротективна својства. У појединим студијама постоји повезаност између повећане продукције CO и смањеног ћелијског оштећења слободним радикалима (193). CO такође може имати улогу у заштити од оксидационих оштећења приликом акутне фазе инфламације (194).

Показано је да повећање активности NO 1 може бити повезано са побољшањем антиоксидационе заштите усмерене против ONOO^- (195) и супресије адхезије леукоцита за ендотелне ћелије (196). Антиоксидациона својства NO 1 се пре свега приписују настанку билирубина, који се ствара заједно са CO током процеса разградње хема. Повећана продукција билирубина под утицајем хиперекспресије NO 1 знатно побољшава резистентност ћелија на оксидациона оштећења (197). Истраживања *in vitro* су указала да овај пигмент спречава ћелијска оштећења од стране H_2O_2 и ONOO^- (198). Обзиром да је оксидациони стрес укључен у патогенезу бројних васкуларних поремећаја ова својства NO 1 могу бити изузетно корисна у одржавању физиолошке морфологије и функције ендотела.

Претпоставља се да потенцијални механизам путем кога NO 1 остварује своја антиоксидациона својства подразумева супродстављање повећаној производњи NO и RNS (199). NO детектује повишене концентрације RNS и, на још увек непознат начин, их неутралише. То су потврдиле студије на културама ћелија аорте у којима је примећено да акумулирање NO и RNS узрокује пораст експресије и активности NO 1 (200).

Ипак, механизам којим NO утиче на HO 1 систем није још увек у потпуности расветљен. На основу претходних сазнања је предложено да интеракција NO са $O_2^{\cdot-}$ као и конверзија NO у NO^+ или NO^- могу бити кључни догађаји у повећању експресије гена за HO 1 (201).

Са друге стране, о корелацији H_2S и слободних радикала се најмање зна. Иако H_2S није слободни радикал, слично као и $\cdot NO$, у воденом раствору се понаша као редукујући агенс, што значи да би требало да поседује антиоксидациона својства. Међутим, постоје подаци да у присуству H_2O_2 , H_2S продукује тиолне слободне радикале $SH\cdot$ и $S\cdot$ (202). Ови подаци указују да се H_2S синтетише локално у високим концентрацијама и да испољава цитотоксични ефекат, слично као и NO. Показано је такође да H_2S може да утиче на јетрине ензиме укључене у метаболизам ксенобиотика (203), чиме последично утиче и на имунски систем. Ово може бити нарочито изражено у стањима повећане продукције ROS и RNS (204). То даље сугерише да H_2S може да делује и као инфламаторни медијатор, иако о томе још нема публикованих резултата.

Очигледно да повезаност гасотрансмитерских система и слободних радикала свакако постоји. Евидентне су и разлике у ефектима гасотрансмитера на оксидациони стрес. Док CO систем изгледа да делује антиоксидационо, остала два система лако ступају у реакције са слободним радикалима и делују супротно.

Садашњи резултати сугеришу да је акутна блокада ендogene продукције NO и H_2S повезана са смањењем липидне пероксидације. Сnižено оштећење ћелијске мембране се може објаснити снажним порастом активности испитиваних ензима антиоксидационе заштите који је примећен у условима ове блокаде. На тај начин очигледно је да током супресије синтезе гасотрансмитера настаје повећана ензимска заштита од оксидационог стреса. Будући да се најјачи ефекат постиже инхибицијом синтезе H_2S , чини се да сигнални пут овог гасотрансмитера има доминантну улогу у модулацији активности антиоксидационог система заштите. Ови налази показују да приликом одсуства дејства сигналних гасова настаје појачана мобилност ензимских антиоксиданаса.

У ранијем истраживању наше истраживачке групе су изолована срца пацова акутно третирана инхибиторима синтезе сва три гасотрансмитера. Забележено је да инхибиција синтезе CO изазвала смањење вредности индекса липидне пероксидације што је у корелацији са садашњим резултатима. За разлику од тога, блокада продукције H_2S није изазвала битније промене у вредностима овог параметра (205).

Гао-а и сарадници су користећи модел исхемијско-реперфузионог оштећења на срцима пацова са стрептозоцином-изазваним дијабетесом, испитивали утицај егзогеног (NaHS) и ендогеног H₂S (DL PAG) на развој оксидационог стреса током исхемије и реперфузије миокарда. Они су показали да H₂S донор, NaHS, смањује липидну пероксидацију (206).

Са друге стране, Ху је са својом истраживачком групом између осталог проучавао утицај хроничне блокаде (L-NAME) или стимулације производње NO-а (L-аргинин) на синтезу SOD-а и CAT у коморном миокарду пацова. У истраживању је закључено да инхибиција продукције азот монооксида може бити повезана са смањеном продукцијом оба ензима, док је примена L-аргинина остала без ефекта (207). Супротно овим сазнањима, Узун и коаутори су нешто раније показали да примена L-NAME-а изазива велики пораст активности антиоксидационих ензима (SOD, CAT и GSH) (208). Ипак они су применили L-NAME у 50 пута већој дози од оне у претходној студији, а ензими су одређивани у ткиву јетре (208).

Недавно истраживање на ткиву миокарда пацова је указало да H₂S сингални пут може да буде од значаја у контролисању локалног оксидационог статуса. Тако је донор поменутог гасотрансмитера NaHS након хроничне примене подигао активност SOD, CAT и GSH а снизио концентрацију MDA (209). За разлику од услова примене егзогеног H₂S, након хроничне блокаде ендogene продукције овог сигналног молекула (хидроксиламин) добијен је потпуно супротан ефекат у смислу потенцирања оксидационог оштећења срца услед повећаног ослобађања про-оксиданаса и/или пада активности антиоксиданаса (209).

Без обзира на разлике у налазима свих наведених студија (које потичу пре свега од другачијег дизајна) јасно је да сигнални гасовити молекули могу да утичу на оксидациону хомеостазу у срцу сисара и да делују на оба фактора овог динамичког еквилибријума: про- и анти-оксидансе.

5.5. АКУТНИ ЕФЕКТИ КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ DL-ХОМОЦИСТЕИНА И ИНХИБИТОРА СИНТЕЗЕ ГАСОТРАНСМИТЕРА НА АКТИВНОСТ ЕНЗИМА АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРАЗЕ У ТКИВУ МИОКАРДА СРЦА ПАЦОВА

Ради утврђивања улоге гасотрансмitera у ефектима које хомоцистеин остварује на активност ацетилхолинестеразе у срцу пацова, DL-хомоцистеин је акутно апликован са инхибиторима сваког од три испитивана сигнална гасовита молекула (L-NAME, PPR IX и DL-PAG). Утицај интеракције хомоцистеина и NO, CO и H₂S, је мало изучаван и тиме познат, поготово на нивоу срчаног мишића.

У доступним базама података готово да нема релевантних студија које су проучавале активност AchE приликом комбинације акутну или хроничну хиперхомоцистеинију са блокадом синтезе неког од гасотрансмitera. Ова чињеница свакако потврђује оригиналност садашње студије али и отежава коментарисање резултата у смислу међусобне компарације. Једно од ретких истраживање које је имало сличан дизајн су спровели Kumar и коаутори. Они су показали да хронична хиперхомоцистеинија изазива снижење активности ацетилхолинестеразе у ткиву мозга пацова (210).

Од свих гасотрансмitera азот моноксид најлакше реагује са хомоцистеином и то у условима повишене концентрације овог тиола. Доказано је да хиперхомоцистеинија негативно делује на азот моноксид синтазу (NOS) и тиме умањује производњу NO-а. Редукцијом биорасположивости азот монооксида стимулишу се процеси који за последицу имају развој ендотелне дисфункције (210). Поред овог дејства хомоцистеин може директно да снизи концентрацију азот монооксида путем реакције тиолних група са овим гасом (210).

У садашњој студији смо забележили да је приликом блокаде синтезе сва три гасотрансмitera хомоцистеин значајно повећао активност ацетилхолинестеразе у односу на услове када је био апликован *per se*. Најевидентији пораст активности овог ензима је уочен у случају одсуства дејства CO. Ови резултати сугеришу да сигнални гасови могу да мењају ефекте хомоцистеина на холинергичку контролу унутар срца. Поред тога, изгледа да угљен моноксид може да буде најважнији гасотрансмтер који има улогу у модулацији дејстава хомоцистеина на срчану активност AchE.

Као што је већ напоменуто, осим азот монооксида, водоник сулфид представља други гасотрансмитер са којим хомоцистеин може бити повезан и то управо током свог метаболизма када транссулфурацијским путем из цистеина настаје водоник сулфид. Због тога је у овом истраживању коришћен PPR IX као инхибитор ензима цистатион гама лиазе (cystathionine γ -lyase (GCL) који заједно са цистатион бета синтазом и 3-меркаптопируват сулфотрансферазом у транссулфурацијском путу продукују H_2S .

У литератури се налази на истраживање у коме је испитивана улога егзогеног водоник сулфида ($NaHS$) у ефектима хомоцистеина на ацетилхолинестеразну активност у мозданом ткиву миша (211). Хомоцистеин и донор водоник сулфида су апликовани у дози од $0.5\mu\text{m}/\mu\text{l}$ и $30\mu\text{M}/\text{kg}/\text{дан}$ током седам дана. Аутори су показали да је овако изазвана хиперхомоцистеинија узроковала повећану моздану активност AchE, док примена H_2S није успела да промени овај ефекат хомоцистеина односно да утиче на остварено дејство овог тиола.

Сумарно посматрано, налази садашње студије указују да редукција срчане AchE активности под утицајем хомоцистеина прелази у значајн пораст приликом заједничке апликације са инхибиторима H_2S али и осталих испитиваних гасотрансмитера. Ова сазнања индикују да потенцирање холинергичких дејстава хомоцистеина у срцу не само да престаје у условима одсуства деловања гасотрансмитера, већ постаје неутралисано односно смањено захваљујући појачаној разградњи ацетилхолина.

На овај начин је још једном потврђена улога гасотрансмитера у ефектима хомоцистеина на срце. На основу наших сазнања можемо да претпоставимо да ендогено продуковани сигнални гаосовити молекули не представљају заштитни фактор у негативним дејствима које повишени хомоцистеин остварује на срце пацова.

5.6. АКУТНИ ЕФЕКТИ КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ DL-ХОМОЦИСТЕИНА И ИНХИБИТОРА СИНТЕЗЕ ГАСОТРАНСМИТЕРА НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА У ПЛАЗМИ ПАЦОВА

Последњи задатак овог истраживања је био утврђивање улоге гасотрансмitera у дејствима акутно повишеног хомоцистеина на редокс равнотежу пацова. Као и у претходном случају, од интереса је било испитивање ендогено синтетисаних сигналних молекула због чега су примењени инхибитори њихове продукције (L-NAME, PPR IX и DL-PAG).

Интеракција про-оксидационих маркера, сигналних гасовитих молекула и хомоцистеина, у оквиру срчаног ткива је још увек недовољно истражена. Ова међусобна дејства су још увек најбоље проучена на нивоу васкуларног ендотела. Претпоставља се да негативни ефекат на ендотел крвних судова хомоцистеина остварује кроз генерисање супероксид анјон радикала (O_2^-) и водоник пероксида (H_2O_2). Након генерисања O_2^- да реагује са NO и да формира један од најтоксичнијих ROS - пероксинитрит ($ONOO^-$) (212). С обзиром да се приликом продукције $ONOO^-$ троши NO, редукује се његова концентрација што у крајњем изазива ендотелну дисфункцију (213). Поред тога, токсични облик хомоцистеина - тиолактон може да блокира активност iNOS у нервном систему (214).

Повезаност H_2S са ROS је позната тек одавно. Истраживања су показала да овај сигнални гас може да има неуропротективна дејства од оксидационог оштећења (215). путем интеракције са различитим RNS и са $ONOO^-$ (216). Такође, недавно је уочено да овај гасотрансмитер штити различита ткива од оксидационих оштећења током исхемијско/реперфузионе повреде (216). Анти-оксидациони ефекат H_2S постиже на два начина: 1. блокадом транспорта електрона у респираторном ланцу митохондрија, 2. повећањем активности SOD (216).

Мали је број студија које су успеле да испитају међусобни утицај CO и оксидационог стреса у условима хиперхомоцистеинемije. Показано је да хомоцистеин има способност да изазове повећано стварање ROS у ендоплазматском ретикулуму (ER) ендотелних ћелија умбиликалне вене, што у крајњем доводи до апоптозе ових ћелија (217). Егзогена апликација поменутог гасотрансмitera, међутим, спречава експресију тзв. SNOР протеина чиме зауставља развој ендоплазматског оксидационог стреса и цео апоптотички процес (217).

Познато је да хомоцистеин ван ћелије може да подлегне процесу ауто-оксидације стимулише породукцију различитих ROS (O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot) (218), тако да функционише као екстрацелуларни оксиданс. Ипак, постоје докази да овај тиол и у ћелијама такође може да изазове стварање ROS активацијом мембранских NADPH оксидаза. Појачан активност овог ензима што узрокује веће стварање O_2^- , (219).

Са друге стране, ендотелна NOS (eNOS), може да буде значајан генератор продукције ROS. NOS функционише као катализатор транспорта електрона са Н-терминалног везујућег места NADPH донора редукујућег домена, на С-терминалну простетичку хем групу оксидујућег домена. Неопходан кофактор за транспорт електрона од стране NOS је тетрахидробиоптерин (BH4). Гвожђе из хем групе и BH4 катализују реакцију кисеоника са L-аргинином, као последица чега настаје NO (220).

Један од начина на који настаје O_2^- је поремећај поменутог транспорта електрона и њихово усмеравање ка директној редукацији молекуларног кисеоника. Дефицијентна количина BH4 и/или L-аргинина могу да буду одговорни за поремећену синтезу NO и појачану производњу O_2^- . Пероксинитрит може да оксидује BH4, што мења редокс стање eNOS, који почиње са производњом O_2^- . Када нема довољно L-аргинина, NOSs као субстрат користи молекуларни кисеоник чиме се стимулише производња O_2^- (220).

Промену активности азот моноксид синтазе и последичну продукцију O_2^- може да изазове и хомоцистеин. Оксидација BH4 коју стимулише хомоцистеин узрокује поремећај активности eNOS који са своје стране опет генерише појчану производњу слободних радикала (221). Други механизам путем кога хомоцистеин утиче на eNOS да продукује O_2^- подразумева оксидацију протеинских транспортера што редукује улазак L-аргинина у ћелије (222). Следећи механизам деловања хомоцистеина на NOS представља инхибицију диметиларгинин диметил-аминохидролазе (DDAH) од стране овог тиола. DDAH блокира разградњу ADMA-у која је ендогени инхибитор NOS. Након тога због повећане концентрације ADMA може да се веже за L-аргинин везујућа места NOSs, чиме се снижава синтеза азот монооксида (223). Иако азот моноксид углавном остварује корисна дејства у кардиоваскуларном систему, приликом повећане концентрације O_2^- , овај гасотрансмитер заједно са њим ствара поменути ONOO $^-$, који наставља оксидациона оштећења (223). Интереференцијом са NF κ B сигналним путем хомоцистеин повећава експресију iNOS и тиме синтезу NO у васкуларним глатким мишићима. Овако настали NO ипак не делује протективно и учествује у процесима који стимулишу генерисање слободних радикала (224).

Због својих карактеристика и могућности интеракције са SH групама хомоцистеина, азот моноксид може да утиче на дејства овог тиола. Повећано ослобађање NO представља заштитни одговор ендотелних ћелија који је усмерен против хомоцистеина. Азот моноксид је у стању да се веже за хомоцистеин и измени његов механизам дејства. Настали S-нитрозо-хомоцистеин поседује снажни релаксантни ефекат на глатке мишиће крвних судова (220).

Мали је број истраживања која су се бавила проблематиком улоге NOS у дејствима хомоцистеина на оксидациони статус у кардиоваскуларном систему. У једној од студија је проучаван значај NOS у оксидационим оштећењима ендотелних ћелија које је индуковао хомоцистеин. Забележено је да L-хомоцистеин изазива пораст липидне пероксидације и повећану продукцију O_2^- , док вредности H_2O_2 нису биле промењене. Ов ефекти су били неутралисани апликацијом L-NAME-а, што је ауторе навело на претпоставку да NOS може да има улогу у прооксидационим механизмима хомоцистеина (225).

Резултати садашње студије су показали да инхибиција синтезе NO-а није променила ефекте акутне хиперхомоцистеинмије на липидну пероксидацију срца пацова. У условима одсуства деловања азот монооксида повишени хомоцистеин се повезује са још нижим степеном липидне пероксидације у односу на контролне услове. Осим тога, у случају блокаде функције NO система, акутно повишени хомоцистеин још јаче повећава активност свих антиоксидационих ензима заштите (SOD-а не значајно). Ова сазнања сугеришу да у случају престанка дејства NO акутно повишени хомоцистеин наставља да још интензивније испољава своје ефекте, што сугерише да сигнални пут овог гасотрансмитера може да има улогу у ефектима хомоцистеина на редокс равнотежу срца пацова.

Студија Живковића и коаутора сугерише да акутна примена више облика хомоцистеина (DL-Нсу, L-Нсу, DL- Нсу TLHC) са L-NAME-ом узрокује смањену продукцију про-оксиданата у изолованом срцу пацова и тиме липидну пероксидацију (205).

Као што је претходно поменуто интеракција хомоцистеина и угљен монооксида је најмање позната. Једно од истраживања које се бавило овом тематиком је испитивало дејство угљен монооксида на интраћелијски оксидациони стрес културе ендотелних ћелија који је индуковао хомоцистеин ($50 \mu\text{mol/l}$) (217). Аутори су закључили да егзогени угљен моноксид услед стимулације активности NO 1 изазива генезу ћелијског CO што је у наставку спречило унутарћелијска оксидациона оштећења изазавана

хомоцистеином. На овај начин ћелија не покреће отпочињање програмиране ћелијске смрти чиме се објашњава заштитни утицај CO (217).

NADPH оксидаза представља ензим ћелијске мембране који дејством многобројних фактора може да произведе велике количине слободних радикала, нарочито O_2^- (226). Стимулуси за појачану активност NADPH оксидаза могу да буду управо хомоцистеин и угљен моноксид (226, 219). Ово нас наводи на претпоставку да NADPH оксидаза може да буде синергистички активирана уколико постоје повишене концентрације хомоцистеина и CO. Последица овако удружене стимулације NADPH оксидазе је снажна производња ROS. С обзиром на сва сазнања изгледа да HO/CO сигнални систем може да има значај у дејствима хомоцистеина на редокс равнотежу.

Налази нашег претходног истраживања су показали да акутна хиперхомоцистеинија у условима одсуства CO није мењала вредности TBARS-а у изолованом срцу пацова (205). Такође смо уочили да је приликом инхибиције синтезе CO, продукција већине про-оксидационих маркера била снижена, што истиче његова потенцијална про-оксидациона својства.

Резултати садашње студије су показали да приликом блокаде функције HO 1/CO сигналног система, акутна хиперхомоцистеинија још више снижава липидну пероксидацију са једне стране, док са друге стране снажније мобилише активност ензима антиоксидационе заштите. На тај начин, изгледа да у одсуству деловања угљен моноксида акутно повишени хомоцистеин испољава још јача дејства на редокс равнотежу пацова.

Као и у претходним случајевима, резултати међусобно корелирају односно смањење липидне пероксидације се може објаснити повећаном активношћу антиоксидационог система заштите и обрнуто.

На крају како је метаболичка повезаност водоник сулфида и хомоцистеина већ доказана, очекује се да и овај гас може да модулира дејства хомоцистеина на редокс равнотежу у срцу сисара. Осим тога, забележено је да ендотелне ћелије могу да продукују CBS и CSE ензиме који синтетишу H_2S из хомоцистеина (227). Ова синтеза је нарочито изражена у условима хиперхомоцистеиније што представља заштитни механизам путем кога се ендотел супротставља оксидационим оштећењима под утицајем повишеног хомоцистеина (227).

Резултати нашег ранијег истраживања су показали да заједничка админитрација DL Нсу и DL PAG узрокује пораст концентрације TBARS. Такође, H₂S не доприноси развоју оксидационог стреса у миокарду и коронарној циркулацији, већ изгледа да поседује одређени антиоксидациони капацитет (205).

На основу налаза ове студије се уочава да је за разлику од претходна два случаја, акутно примењени хомоцистеин је у условима блокаде синтезе водоник сулфида изазвао пораст липидне пероксидације у односу на његову самосталну примену која ипак није прешла контролне вредности. У том смислу, изгледа да одсуство дејства H₂S може да мења ефекте хомоцистеина на начин супротан од NO и CO. За разлику од овога, утицај акутне хомоцистеинемije на испитиване антиоксидационе ензиме је приликом блокаде CSE/H₂S сигналног пута била такође још израженији (у односу на његов ефекат *per se*) у смислу веће активности ових ензима.

Сумарно посматрано ова сазнања сугеришу да сва три сигнална молекула могу да имају улогу у ефектима хомоцистеина на редокс равнотежу пацова. Поред тога, уколико узмемо у обзир величину промене ефекта примећује се да блокада NO /CO сигналног пута у нашем експерименталном протоколу може да има најизраженију улогу у оствареним дејствима хомоцистеина.

VI
ЗАКЉУЧЦИ

На основу свега изложеног у овој студији можемо извести следеће закључке:

1. Акутна и субхронична хиперхомоцистеинемија су биле повезане са снижењем активности ацетилхолинестеразе у срцу пацова. Ови налази сугеришу да хомоцистеин путем дејства на AchE може да мења холинергичку контролу срчане функције односно да инхибицијом разградње ацетилхолина потенцира снажнији и дуготрајнији негативни холинергички ефекат на срце.
2. Акутно повишене вредности обе форме хомоцистеина (основног и тиолактон облика) нису изазвале оштећења ћелијских мембрана већ су повезане са нижим степеном липидне пероксидације.
3. Субхронична хиперхомоцистеинемија узрокована метионином је изазвала несигнификантно повећан степен липидног оштећења.
4. Акутно примењени основни облик хомоцистеина изазива несигнификатно повећање активности CAT и GPx, док токсични тиолактон облик евидентно и снажно стимулише појачану мобилност оба поменута ензима.
5. Блокада продукције NO и CO гасотрансмитера је била повезана са снижењем активности ацетилхолинестеразе. Ова сазнања индикују NO и CO сигнални путеви могу да имају улогу у модулацији активности овог ензима. На основу наших налаза се уочава да је овај ефекат био најизраженији у случају NO сигнализације.
6. Акутна блокада синтезе NO и H₂S је повезана са смањењем липидне пероксидације и повећањем активности испитиваних ензима антиоксидационе заштите. На тај начин очигледно је да током супресије синтезе гасотрансмитера настаје повећана ензимска заштита од оксидационог стреса. Будући да се најјачи ефекат постиже инхибицијом синтезе H₂S, чини се да сигнални пут овог гасотрансмитера има доминантну улогу у модулацији активности антиоксидационог система заштите.
7. Редукција срчане AchE активности под утицајем хомоцистеина прелази у значајн пораст приликом заједничке апликације са инхибиторима производње гасотрансмитера. Ова сазнања индикују да потенцирање холинергичких дејстава хомоцистеина у срцу не само да престаје у условима одсуства деловања гасотрансмитера, већ постаје смањено захваљујући појачаној разградњи ацетилхолина.
8. У условима одсуства деловања азот монооксида повишени хомоцистеин се повезује са још нижим степеном липидне пероксидације у односу на контролне

услове. Осим тога, у случају блокаде функције NO система, акутно повишени хомоцистеин још јаче повећава активност свих антиоксидационих ензима заштите (SOD-а не значајно).

9. Приликом блокаде функције NO /CO сигналног система, акутна хиперхомоцистеинија још више снижава липидну пероксидацију са једне стране, док са друге стране снажније мобилише активност ензима антиоксидационе заштите. На тај начин, изгледа да у одсуству деловања углен монооксида акутно повишени хомоцистеин испољава израженија дејства на редокс равнотежу пацова.
10. Акутно примењени хомоцистеин је у условима блокаде синтезе водоник сулфида изазвао пораст липидне пероксидације у односу на његову самосталну примену. У том смислу, изгледа да одсуство дејства H₂S може да мења ефекте хомоцистеина на начин супротан од NO и CO. За разлику од овога, утицај акутне хомоцистеиније на испитиване антиоксидационе ензиме је приликом блокаде CSE/H₂S сигналног пута била такође још израженији (у односу на његов ефекат *per se*) у смислу веће активности ових ензима.

VII ЛИТЕРАТУРА

1. Roberts JT, Caserio MC. Basic Principals of Organic Chemistry. New York and Amsterdam: WA. Benjamen, Inc., 1965; 747–58.
2. Streitweisser A, Heathcock CH. Introduction to Organic Chemistry. New York: Macmillan Publishing Co., 1985; 756–60.
3. Jocelyn PC. The Biochemistry of the SH Group. London: Academic Press, 1972.
4. Friedman M. The Chemistry and Biochemistry of the Sulfhydryl Group in Amino Acids, Peptids, and Proteins. Pergamon Press, 1973.
5. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990; 1; 228 – 37.
6. Ueland PM, Refsum H, Brattstrom L. Atherosclerotic Cardiovascular Disease, Hemostasis and Endothelial Function. New York: Marcel Decker, 1992; 183–96.
7. Mudd SH, Levy HL, Skovby F. The Metabolic Basis of Inherited Diseases. New York: Mc-Graw-Hill, 1989; 693–734.
8. Mudd SH, Pool JR. Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. *Metabolism* 1975; 24: 721–35.
9. Backlund PS, Smith RA. Methionine Synthesis from 5--methylthioadenosine in rat liver. *J Biol Chem* 1981; 256: 1533–35.
10. Malinow MR, Axthelm MK, Meredith MJ, Macdonald NA, Upson BM. Synthesis and transsulfuration of homocysteine in blood. *J Lab Clin Med* 1994; 123; 421–9.
11. Wang J, Dudman NPM, Wilcken DEL, Lynch JF. Homocysteine catabolism: Levels of 3 enzymes in cultured human vascular endothelium and their relevance to vascular disease. *Arteriosclerosis* 1992; 97: 97–106.
12. McCully KS. Homocysteine theory of arteriosclerosis: Development and current status. *Atheroscler rev* 1983; 11: 157–246.
13. Wagner C, Briggs WY, Cook RJ. Inhibition of glycine N-methyltransferase by folate derivatives: Implications for the regulation of methyl group metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 127: 746–52.
14. McKeever MP, Weir DG, Molloy A, Scott JM. Betaine homocysteine methyltransferase: organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat. *Clin Sci* 1991; 81: 551–6.
15. Goyette P, Summer JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt DS, Matthews RG, Rozen R. Human methylenetetrahydrofolate reductase; isolation of c-DNA mapping and mutation identification. *Nature Genet* 1994; 7: 195–200.
16. Refsum H, Guttormsen AB, Fiskerstrand T, Ueland PM. On the formation and fate of

- total plasma homocysteine. In: Graham I, Refsum H, Rosenberg IH, Ueland PM, eds. *Homocysteine Metabolism: From Basic Science to Clinical Medicine*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1997; 23–9.
17. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA. A candidate genetic risk factor vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics* 1995; 10: 111–3.
 18. Mudd SH, Levy HL, Skovby F. Disorders of Transsulfuration. In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 6th edition, Scriver CR, Beaudet AT, Sly WS, and Valle D, eds, McGraw-Hill, 1989; 2049–64.
 19. McDonald MC, Dempsey GI, Nassar BA. Relation of a Common Mutation in Methylenetetrahydrofolate Reductase to Plasma Homocysteine and Early Onset Coronary Artery Disease. *Clin Biochem* 1998; 31: 95 – 100.
 20. Kang SS, Wong PWK, Zhou J, Sora J, Ruggie N, Grevich G. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in patients with coronary artery disease. *Metabolism* 1991; 37: 611–13.
 21. Ubbink JB, Vermaak WJ, van der Merwe, Becker PJ. The effect of the blood sample, aging and food consumption on plasma total homocysteine levels. *Clin Chem Acta* 1992; 207: 119 – 28.
 22. Brattstrom LE, Israelsson B, Jeppsson JO, Hultberg BL. Folic acid—an innocuous means to reduce plasma homocysteine. *Scand J Clin Lab Invest* 1998; 48: 215–21.
 23. Hultberg B, Agardh CD, Agardh E, Lovestami-Adrian M. Poor metabolic folate deficiency are associated with increasing levels of plasma homocysteine in insulin dependent diabetes mellitus. A five-year follow-up study. *Scand J Clin Lab Invest* 1997; 57: 595–600.
 24. Jacobsen DW, Gatautis VJ, Green R, Robinson K, Savon SR, Secic M, Ji J, Otto MJ, Taylor ML. Rapid HPLC Determination of Total Homocysteine and Other Thiols in Serum and Plasma: Sex Differences and Correlation with and Folate Concentrations in Healthy Subjects. *Clin Chem* 1994; 40: 873–81.
 25. Hulberg B, Agardh E, Andersson A. Increased levels of plasma homocysteine are associated with nephropathy, but not severe retinopathy in type 1 diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 1991; 51: 277–82.
 26. Bertino JR. Ode de methotrxate. *J Cli Oncol*. 1993; 11: 5-14. Allegrac CH, Fine RL, Drake JC, Chabner BA. The effect of metotrexate on intracellular folate pools in human MCF-7 breast cancer cells. Evidence for direct inhibition of purine synthesis.

- J Biol Chem 1987; 261:6478 – 85.
27. Kobblin DD. Toxicity of nitrous oxide. In: Rice SA, Fish KJ. Anesthetic Toxicity. Raven Press 1994, 135 – 55.
 28. Rasmussen K, Moller J. Total homocysteine in clinical practice. Ann Clin Biochem 2000; 37: 627–48.
 29. Daly D, Miller LW, Nadeau MR, Selhud J. The effect of acute L-dopa administration on plasma homocysteine levels in folate repleted and depleted rats. FASEB J 1989; 43: 77–90.
 30. Milatovic B and van der Mooren MJ. Homocysteine in Postmenopausal Women and the Importance of Hormone Replacement Therapy. Clin Chem Lab Med 2001; 39 (8): 764–7.
 31. Dastur DK, Dave UP. Effect of prolonged anticonvulsant medication in epileptic patients: serum lipids, vitamins B6, B12 and folic acid, proteins and fine structure of the liver. Epilepsia 1987; 28: 147–59.
 32. Blankenhorn DH, Malinow MR, Mack WJ. Colestipol plus niacin therapy elevates plasma homocysteine levels. Coron Art Dis 1991; 2: 357–60.
 33. Hultberg B, Berglund M, Andersson A, Frank A. Elevated plasma homocysteine in alcoholics. Alcohol Clin Exp Res 1993; 17: 687–9.
 34. Hultberg B, Andersson A, Masson P, Larson M, Tunek A. Plasma homocysteine and thiol compound fractions after oral administration of n-acetylcysteine. Scand J Clin Lab Invest 1994; 54: 417–22.
 35. Clarke R, Woodhouse P, Ulvik A, Frost C, Sherliker P, Refsum H, Ueland PM, Khaw KT. Variability and determinants of total homocysteine concentrations in plasma in an elderly population. Clin Chem 1998; 44: 102–7.
 36. Bostom AG, Jacques PF, Nadeau MR, Williams RR, Ellison RC, Selhub J. Post-methionine load hyperhomocysteinemia in persons with normal fasting total plasma homocysteine: initial results from the NHLBI Family Heart Study. Atherosclerosis 1995; 116: 147–51.
 37. Moller J, Rasmussen K. Homocysteine in plasma: stabilisation of blood samples with fluoride. Clin Chem 1995; 41: 759–68.
 38. Probst R, Brtandl R, Blumke M, Neumeier D. Stabilization of homocysteine concentration in whole blood. Clin Chem 1998; 44: 1567–9.
 39. Michel G, Staub U, Schroeder G, Shih J, and the International Hcy group. Determination of Homocysteine Reference Intervals: Data From the European

- Automated FPIA Study. Clin Lab 1999; 45: 651–6.
40. Graeme J Hankey, John W Eikelboom. Homocysteine and vascular disease. The Lancet 1999; 354: 407–13.
 41. Kang SS, Wong PW, Malinow MR. Hyperhomocysteinemia as risk factor for occlusive vascular disease. Annu Rev Nutr 1992; 43: 1279–98.
 42. Pietrzik K, Bronstrup A. Causes and consequences of hyperhomocysteinemia. Int J vitam Nutr Res 1997; 67:389–95.
 43. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. Annu Rev Med 1998; 49: 31–62.
 44. Wu LL, Wu J, Hunt Sc, James BC, Vincent GM, Williamss RR. Plasma homocysteine as a risk factor for early familial coronary artery disease. Clin Chem 1994;40: 552–61.
 45. Israelsson B, Brattstrom LE, Hultberg BL. Homocysteine and myocardial infarction. Atherosclerosis 1988;71: 227–33.
 46. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. Lancet 1999; 354: 407–13.
 47. Jacobsen DW, Gatautis VJ, Green R, Robinson K, Savon SR, Secic M, Sylvia de Jong. Hyperhomocysteinemia in Patients with Peripheral Arterial Occlusive Disease. Clin Che Lab Med 2001; 39: 714–6.
 48. Ubbink JB, Vermaak WJ, Delpont R, van der Merwe, Becker PJ, Potgieter H. Effective homocysteine metabolism may protect South African black against coronary heart disease. Am J Clin Nutr 1995; 62: 802–8.
 49. Vermaak WJ, Ubbink JB, Delpont R, Becker PJ, Bissport SH, Ungerer JP. Ethnic Immunity to coronary Heart Disease. Atherosclerosis 1991; 89: 155–62.
 50. Obeid OA, Mannan N, Perry G, Iles RA, Boucher BJ. Homocysteine in healty east London Bangladeshis. Lancet 1998; 352: 1829–30.
 51. den Heijer M. Hyperhomocysteinaemia as a risk factor for venous thrombosis: an update of the current evidence. Clin Chem Lab Med. 2003;41(11):1404-7.
 52. McCord JM. The evolution of free radicals and oxydative stress. American Journal of Medicine, 2000; 108:652-659.
 53. Halliwell B, Gutteridge, JMC. (2007) Free radicals in biology and medicine 4th edition. Oxford University Press Inc, New York, USA.
 54. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem. Biol. Interact 2006; 160: 1–40.
 55. Halliwell B. Free Radicals and other reactive species in Disease. (2001). Encyclopedia

- of life sciences, National University of Singapore, Singapore.
56. Linas SL, Whittenburg D, Repine JF. Role of xanthine oxidase in ischemia/reperfusion injury. *American Journal of Physiology*, 1990; 258:711-716.
 57. Shaw S, Jayatilleke E. The role of aldehyde oxidase in ethanol-induced hepatic lipid peroxidation in the rat. *Biochemical Journal*, 1990; 268:579-583.
 58. Fleury C, Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochemistry*, 2002; 84:131-141.
 59. Babior BM, Lamberth JD, Nauseff W. The neutrophil NADH oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2002; 397: 242-344.
 60. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology Medicine*, 2001; 3: 1287-1312.
 61. Ghafourifar P, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends in Pharmacological Science*, 2005; 26:190–195.
 62. Zhao J, Liu XJ, Ma JW, Zheng RL. DNA damage in healthy term neonate. *Early Human Development*, 2004; 77:89-98.
 63. Auroma OI. Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. *JAACS*, 1998; 75 (2).
 64. Stadtman ER. Role of oxidant species in aging. *Currents in Medical Chemistry*, 2004; 11: 1105–1112.
 65. Marshall TA, Roberts RJ. In vitro and in vivo assessment of lipid peroxidation of infant nutrient preparations; effect of nutrition on oxygen toxicity. *Journal of American College of Nutrition*, 1990; 9:190-199.
 66. Anderson E, Katunga L, Willis M. Mitochondria as a Source and Target of Lipid Peroxidation Products in Healthy and Diseased Heart. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2012; 39: 1440-1681.
 67. Parola M, Leonarduzzi G, Robino G, Albano E, Poli G, Dianzani MU. On the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by longstanding cholestasis. *Free Radical Biology and Medicine*, 1996; 20:351-357.
 68. Devasagayam TPA, Tilak JC, Bloor KK. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Journal of the Association of Physicians of India*, 2004; 52:794–804.
 69. Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC. Mechanisms of Aging: An appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radical Biological Medicine*, 2002; 33:575–86.
 70. Ku HH, Brunk UT, Sohal RS. Relationship between mitochondrial superoxide and

- hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Radical Biology Medicine*, 1993; 15:621–627.
71. Piantadosi CA, Zhang J. Mitochondrial generation of reactive oxygen species after brain ischemia in the rat. *Stroke*, 1996; 27:327–32.
72. Simms NR, Anderson MF. Mitochondrial contributions to tissue damage in stroke. *Neurochemistry International*, 2002; 40:511–26.
73. Mariani E, Polidori MC, Cherubini A., Mecocci P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. *Journal Chromatography B*, 2005; 827:65–75.
74. Cherubini A, Vigna GB, Zuliani G, Ruggiero C, Senin U, Fellin R. Role of antioxidants in atherosclerosis: epidemiological and clinical update. *Current Pharmaceutical Design*, 2005; 11:2017–2032.
75. Galle J, Hansen-Hagge T, Wanner C, Seibold S. Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. *Atherosclerosis*, 2006; 185:219–26.
76. Bellomo G, Mirabelli F. Oxidative stress and cytoskeletal alterations. *Annual NY Academy Science*, 1992; 663:97–109.
77. Völkel W, Sicilia T, Pähler A, Gsell W, Tatschner T, Jellinger K, Leblhuber F, Riederer P, Lutz WK, Gotz ME. Increased brain levels of 4-hydroxy-2-nonenal glutathione conjugates in severe Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 2006; 48:679–686.
78. Korolainen MA, Goldsteins G, Tuula A, Alafuzoff I, Koistinaho J, Pirttila T. Oxidative modification of proteins in the frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neurobiology of Aging*, 2006; 27:42–53.
79. Wersinger C, Sidhu A. Inflammation and Parkinson's disease. *Current Drug Targets Inflammation and Allergy*, 2002; 1:221–242.
80. Jay D, Hitomi H, Griendling KK. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radical Biology Medicine*, 2006; 40:183–92.
81. Izzotti A, Bagnis A, Saccà SC. The role of oxidative stress in glaucoma. *Mutation Research*, 2006; 612:105–114.
82. Đorđević VB, Pavlović DD, Kocić GM. (2000): *Biohemija Slobodnih Radikala*. Niš: Medicinski fakultet.
83. Nozaik-Grayck E, Suliman HB, Piantadosi CA. Extracellular superoxide dismutase. *International Journal of Biochem and Cell Biology*, 2005; 37:2466-2471.
84. Yan H, Harding JJ. Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase

- and superoxide dismutase. *Biochemical Journal*, 1997; 328:599-605.
85. Arnao MB, Acosta M, del Rio JA, Varon R, Garcia-Canovas F. Inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide and its protection by a reductant agent. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1990; 1038:85-89.
86. Harel M, Schalk I, Ehret-Sabatier L, Bouet F, Goeldner M, Hirth C, Axelsen PH, Silman I, Sussman JL. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(19):9031-5.
87. Quinn DM. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Review* 1989; 87 (5): 955–79.
88. Tripathi A. Acetylcholinesterase: A Versatile Enzyme of Nervous System. *Annals of Neuroscience* 2008; 15 (4).
89. Barton L, Parker K, Blumenthal D, Buxton I, Goodman and Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics, The McGraw Hill Companies, New York, 2008
90. Katzung B, Masters S, Trevor A, Basic and clinical pharmacology, 12th Edition, The McGraw Hill Companies, New York, 2012.
91. Drachman D, Isselbacher, K.J., Braunwald, E., Wilson, J.D., Martin, J.B., Fauci, A.S. Kasper, D.L., eds (1998). *Harrison's Principles of Internal Medicine* (14th ed.). The McCraw-Hill Companies. pp: 2469–2472.
92. Pohanka. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers Olomouc* 2011; 155 (3): 219–229.
93. Massoulié J, Perrier N, Noureddine H, Liang D, Bon S. Old and new questions about cholinesterases. *Chem Biol Interact* 2008; 175 (1–3): 30–44.
94. Shepherd JT and Vanhoutte PM. *The Human Cardiovascular System*. New York: Raven, 1979.
95. González R, Campos EO, Morán S, Inestrosa NC. Characterization of acetylcholinesterase from human heart auricles: Evidence for the presence of a G-form sensitive to phosphatidylinositol-specific phospholipase c. 1991; 22 (1): 30–44.
96. Hancock JC, Hoover DB, Houglund MW. Distribution of muscarinic receptors and acetylcholinesterase in the rat heart. *Auton Nerv Sys J* 1987; 19(1); 59-66.
97. Raj SR, Black BK, Biaggioni I, Harris PA, Robertson D. Acetylcholinesterase inhibition improves tachycardia in postural tachycardia syndrome. *Circulation*. 2005; 111(21):2734-40.

98. Lataro RM, Silva CA, Tefé-Silva C, Prado CM, Salgado HC. Acetylcholinesterase Inhibition Attenuates the Development of Hypertension and Inflammation in Spontaneously Hypertensive Rats. *Am J Hypertens.* 2015;28(10):1201-8.
99. Gillman MA, Lichtigfeld FJ. A comparison of the effects of morphine sulphate and nitrous oxide analgesia on chronic pain states in man. *J. Neurol. Sci.* 1981; 49 (1): 41–5.
100. Ori C., Ford-Rice F and London E.D. Effects of nitrous oxide and halothane on mu and kappa opioid receptors in guinea-pig brain. *Anesthesiology* 1989; 70: 541-544.
101. Wang R (ed). *Signal Transduction and the Gasotransmitters: NO, CO and H₂S in Biology and Medicine.* 2004, Humana Press, New Jersey, USA.
102. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373–376.
103. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br. J. Pharmacol* 2006;147:S193–S201.
104. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1987;84:9265–9269.
105. Bredt DS. Nitric oxide signaling specificity—the heart of the problem. *J. Cell Sci* 2003;116:9–15.
106. Knowles, R. G.; Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *The Biochemical journal.* 298 (Pt 2) (Pt 2): 249–258.
107. Gusarov I, Starodubtseva M, Wang ZQ, McQuade L, Lippard SJ, Stuehr DJ, Nudler E (May 2008). Bacterial Nitric-oxide Synthases Operate without a Dedicated Redox Partner. *J. Biol. Chem.* 283 (19): 13140–7.
108. Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 2006;46:235–276.
109. Ignarro L.J. (2001): Nitric Oxide. A Novel Signal Transduction Mechanism For Transcellular Communication; 16: 477- 483.
110. Taqatqeh, F; Mergia, E; Neitz, A; Eysel, UT; Koesling, D; Mittmann, T (2009). "More than a retrograde messenger: nitric oxide needs two cGMP pathways to induce hippocampal long-term potentiation.". *Journal of Neuroscience* 29 (29): 9344–50.
111. Groneberg D, König P, Lies B, et al. Cell-Specific Deletion of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Reveals a Dual Pathway for Nitrergic Neuromuscular Transmission in the Murine Fundus. *Gastroenterology.* 2013 Mar 22. doi:pii: S0016-

- 5085(13)00420-4. 10.1053/j.gastro.2013.03.042. [Epub ahead of print].
112. Tiurenkov IN, Perfilova VN, Arsenova NV. Effect of immobilization-painful stress on cardiac ino- and chronotropic functions of animals under the conditions of nitric oxide synthesis suppression. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*. 2012 Sep;98(9):1131-9.
113. Moncada S, Erusalimsky JD. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2002;3:214–220.
114. Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. Protein S-nitrosylation: Purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2005;6:150–166.
115. Santhanam L, Lim HK, Lim HK, et al. Inducible NO synthase dependent S-nitrosylation and activation of arginase1 contribute to age-related endothelial dysfunction. *Circ. Res* 2007;101:692–702.
116. Wolosker H, Dumin E, Balan L, Foltyn VN. D-amino acids in the brain: D-serine in neurotransmission and neurodegeneration. *FEBS J* 2008;275:3514–3526.
117. Durham WJ, Aracena-Parks P, Long C, et al. RyR1 S-Nitrosylation underlies environmental heat stroke and sudden death in Y522S RyR1 knockin mice. *Cell* 2008;133:53–65.
118. Stroissnigg H, Trancíková A, Descovich L, et al. S-Nitrosylation of micro-tubule-associated protein 1B mediates nitric-oxide-induced axon retraction. *Nat. Cell Biol* 2007; 9:1035–1045.
119. Hara MR, Agrawal N, Kim SF, et al. S-Nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat. Cell Biol* 2005;7:665–674.
120. Yoshida T, Inoue R, Morii T, et al. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-Nitrosylation. *Nat. Chem. Biol* 2006;2:596–607.
121. Kim SF, Huri DA, Snyder SH. Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2. *Science* 2005;310:1966–1970.
122. Blumenthal Ivan (2001). Carbon monoxide poisoning. *J R Soc Med (The Royal Society of Medicine)* 94 (6): 270–272.
123. Verma A, Hirsch D, Glatt C, Ronnett G, Snyder S. Carbon monoxide: A putative neural messenger. *Science* 1993; 259 (5093): 381–4.
124. Otterbein LE, Bach FH, Alam Jet al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat. Med* 2000;6:422–428.
125. Otterbein LE, Zuckerbraun BS, Haga M, et al. Carbon monoxide suppresses

- arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury. *Nat. Med* 2003;9:183–190.
126. Chin BY, Jiang G, Wegiel B, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α stabilization by carbon monoxide results in cytoprotective preconditioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2007;104:5109–5114.
127. Boehning D, Sedaghat L, Sedlak TW, Snyder SH. Heme oxygenase-2 is activated by calcium-calmodulin. *J. Biol. Chem* 2004;279:30927–30930.
128. Boehning D, Moon C, Sharma S, et al. Carbon monoxide neurotransmission activated by CK2 phosphorylation of heme oxygenase-2. *Neuron* 2003;40:129–137.
129. Zakhary R, Gaine SP, Dinerman JL, Ruat M, Flavahan NA, Snyder SH. Heme oxygenase 2: Endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1996;93:795–798.
130. Boehning D, Snyder SH. Novel neural modulators. *Annu. Rev. Neurosci* 2003;26:105–131.
131. Battish R, Cao GY, Lynn RB, Chakder S, Rattan S. Heme oxygenase-2 distribution in anorectum: Colocalization with neuronal nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 2000;278:G148–G155.
132. Lee YC, Martin E, Murad F. Human recombinant soluble guanylyl cyclase: Expression, purification, and regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2000;97:10763–10768.
133. Zakhary R, Poss KD, Jaffrey SR, Ferris CD, Tonegawa S, Snyder SH. Targeted gene deletion of heme oxygenase 2 reveals neural role for carbon monoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1997;94:14848–14853.
134. Reinking J, Lam MM, Pardee K, et al. The *Drosophila* nuclear receptor E75 contains heme and is gas responsive. *Cell* 2005;122:195–207.
135. Dioum EM, Rutter J, Tuckerman JR, Gonzalez G, Gilles-Gonzalez MA, McKnight SL. NPAS2: A gas-responsive transcription factor. *Science* 2002; 298:2385–2387.
136. Sastre C, Baillif-Couniou V, Kintz P, et al. Fatal accidental hydrogen sulfide poisoning: a domestic case. *J Forensic Sci.* 2013 Jan;58 Suppl 1:S280-4.
137. Kabil O, Banerjee R. Redox biochemistry of hydrogen sulfide. *J Biol Chem* 2010; 285: 21903-21907.
138. Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, et al. H₂S as a Physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science* 2008; 322: 587-590.

139. Eto K, Ogasawara M, Umemura K, Nagai Y, Kimura H. Hydrogen sulfide is produced in response to neuronal excitation. *J Neurosci* 2002; 22: 3386-3391.
140. Łowicka E, Bełtowski J. Hydrogen sulfide (H₂S) - the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacol Rep* 2007; 59: 4-24.
141. Olson KR, Dombkowski RA, Russell MJ, et al. Hydrogen sulfide as an oxygen sensor/transducer in vertebrate hypoxic vasoconstriction and hypoxic vasodilation. *J Exp Biol* 2006; 209: 4011-4023.
142. Wang R. Two's company, three's a crowd: Can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J* 2002;16:1792–1798.
143. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener. *EMBO J* 2001;20:6008–6016.
144. Mustafa AK, Gadalla MM, Snyder SH. Signaling by gasotransmitters. *Sci Signal*. 2009 Apr 28;2(68):re2.
145. Pavlikova M, Kovalska M, Tatarkova Z, Sivonova-Kmetova M, Kaplan P, Lehotsky J. Response of secretory pathways Ca²⁺ ATPase gene expression to hyperhomocysteinemia and/or ischemic preconditioning in rat cerebral cortex and hippocampus. *Gen Physiol Biophys*. 2011;30 Spec No:S61-9.
146. Ningjun Li, Li Chen, Rachel W. Muh, Pin-Lan Li. Hyperhomocysteinemia Associated With Decreased Renal Transsulfuration Activity in Dahl S Rats. *Hypertension*. 2006; 47: 1094-1100
147. Ellman GL, Courtney KD, Andres VJr, Feather-Stone RM (1961): A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol*. 7, 88–95.
148. Aruoma OI, Halliwell B, Laughton MJ, Quinlan GJ, Gutteridge JMC. The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron (II)- iron (III) complex. *Biochem J*. 1989;258:617-20.
149. Beutler E. *Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods*. 3rd ed. New York: Grune Startton; 1984. 133 p.
150. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide-anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972;247:3170-5.
151. Wendel A. *Enzymatic basis of detoxication*. 1st ed. New York: Academic Press; 1980. 333 p.

152. da Cunha AA, Scherer E, da Cunha MJ, Schmitz F, Machado FR, Lima DD, Delwing D, Wyse AT. Acute hyperhomocysteinemia alters the coagulation system and oxidative status in the blood of rats. *Mol Cell Biochem.* 2012; 360(1-2): 205-14.
153. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods* 2007; 39: 175-91.
154. Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. Acetylcholine. *The Biochemical Basis of Neuropharmacology.* Oxford University Press, New York, 2003.
155. 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.
156. Hancock JC, Hoover DB, Hougland MW. Distribution of muscarinic receptors and acetylcholinesterase in the rat heart. *Autonon Nerv Sys J,* 1987; 19: 59-66.
157. 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.
158. 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.
159. 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.
160. 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.
161. Zivkovic V, Jakovljevic V, Pechanova O, Srejovic I, Joksimovic J, Selakovic D, Barudzic N, Djuric DM. Effects of DL-homocysteine thiolactone on cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers in the isolated rat heart: the role of different gasotransmitters. *Biomed Res Int.* 2013;2013:318471.
162. Vučinić B, Radovanović D, Čanović D, Pavlović M, Lazić D, Spasić M, Milošević B, Dimić S, Mitrović B. The role of hyperhomocysteinemia in the development of postoperative vascular complications. *Med J* 2016; 50(2):54-62.
163. Štefan L, Tepšić T, Zavidčić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipid peroxidation - causes and consequences. *Medicina* 2007;43:84-93.

164. Nikolic T, Zivkovic V, Srejovic I, Stojic I, Jeremic N, Jeremic J, Radonjic K, Stankovic S, Obrenovic R, Djuric D, Jakovljevic V. Effects of atorvastatin and simvastatin on oxidative stress in diet-induced hyperhomocysteinemia in Wistar albino rats: a comparative study. *Mol Cell Biochem.* 2017 Jun 15. doi: 10.1007/s11010-017-3099-5. [Epub ahead of print]
165. Zivkovic V, Jakovljevic V, Djordjevic D, Vuletic M, Barudzic N, Djuric D. The effects of homocysteine-related compounds on cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers in isolated rat heart. *Mol Cell Biochem.* 2012;370(1-2):59-67.
166. Çelik N, Vurmaz A, Kahraman A. Protective effect of quercetin on homocysteine-induced oxidative stress. *Nutrition.* 2017;33:291-296.
167. Handy DE, Zhang Y, Loscalzo J. Homocysteine downregulates cellular glutathione peroxidase (GPx1) by decreasing translation. *J Biol Chem* 2005; 280:15518–25.
168. Kanani PM, Sinkey CA, Browning RL, Allaman M, Knapp HR, Haynes WG. Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans. *Circulation.* 1999;100:1161–1168.
169. Nappo F, De Rosa N, Marfella R, De Lucia D, Ingrosso D, Perna AF, Farzati B, Giugliano D. Impairment of endothelial functions by acute hyperhomocysteinemia and reversal by antioxidant vitamins. *JAMA.* 1999;281:2113–2118.
170. Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, Zachary MD, Remacle J. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev* 1990;51:283-97.
171. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61:192-208.
172. Nagababu E, Chrest FJ and Rifkind JM. Hydrogen peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1620:211-7.
173. Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *FEBS J.* 2008;275:3959-70.
174. Тамара Николић. Ефекти хиперхомоцистеиније на функцију миокарда, коронарну циркулацију и редокс статус изолованог срца пацова: улога инхибитора хидроксиметил-глутарил коензим-А (HMG-CoA) редуктазе. Докторска дисертација. Факултет медицинских наука Крагујевац, 2015.

175. Akgullu C, Huyut MA, Boyacioglu M, Guleş O, Eryilmaz U, Hekim T, Dogan E, Zencir C, Güngör H. Nebivolol to attenuate the effects of hyper-homocysteinaemia in rats. *Atherosclerosis*. 2015;240(1):33-9.
176. Lee YC, Martin E, Murad F. Human recombinant soluble guanylyl cyclase: Expression, purification, and regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2000;97:10763–10768.
177. Durante W, Kroll MH, Christodoulides N, et al. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1997;80:557–564.
178. Ingi T, Cheng J, Ronnett GV. Carbon monoxide: an endogenous modulator of the nitric oxide-cyclic GMP signalling system. *Neuron* 1996;6:835–842.
179. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:517–554.
180. Motterlini R, Foresti R, Intaglietta M, et al. NO-mediated activation of heme oxygenase: endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium. *Am J Physiol* 1996;270:H107–H114.
181. Leffler CW, Nasjletti A, Johnson RA, et al. Contributions of prostacyclin and nitric oxide to carbon monoxide-induced cerebrovascular dilation in piglets. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H1490–H1495.
182. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener. *EMBO J* 2001;20:6008–6016.
183. Teague B, Asiedu S, Moore PK. The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility. *Br J Pharmacol* 2002;137: 139–145.
184. Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;237:527–531.
185. Zhao W, Wang R. H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H474–H480.
186. Li J, Liu XJ, Furchgott RF. Blockade of nitric oxide-induced relaxation of rabbit aorta by cysteine and homocysteine. *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao* 1997;18:11–20.
187. Li H, Marshall ZM, Whorton AR. Stimulation of cystine uptake by nitric oxide: regulation of endothelial cell glutathione levels. *Am J Physiol* 1999;276:C803–C811.
188. Jin HF, Du JB, Li XH, Wang YF, Liang YF, Tang CS. Interaction between hydrogen

- sulfide/cystathionine gamma-lyase and carbon monoxide/heme oxygenase pathways in aortic smooth muscle cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2006 Dec;27(12):1561-6.
189. Udayabanu, M., Kumaran, D., Nair, R.U., Srinivas, P., Bhagat, N., Aneja, R., Katyal, A. Nitric oxide associated with iNOS expression inhibits acetylcholinesterase activity and induces memory impairment during acute hypobaric hypoxia. *Brain Res.*, 2008; 1230, 138–149.
190. Kapur, S., Bedard, S., Marcotte, B., Cote, C.H. & Marette, A. Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action. *Diabetes*, 1997; 46, 1691–1700.
191. Petrov, K. A., Malomouzh, A. I., Kovyazina, I. V., Krejci, E., Nikitashina, A. D., Proskurina, S. E., Zobov, V. V. and Nikolsky, E. E. Regulation of acetylcholinesterase activity by nitric oxide in rat neuromuscular junction via *N*-methyl-D-aspartate receptor activation. *Eur J Neurosci*, 2013; 37: 181–189.
192. Saldanha C. Human Erythrocyte Acetylcholinesterase in Health and Disease. *Molecules* 2017; 22: 1499.
193. Willis D, Moore AR, Frederick R, et al. Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med* 1996;2:87–90.
194. Willis D. Expression and modulatory effects of heme oxygenase in acute inflammation in the rat. *Inflamm Res* 1995;44:S218–S220.
195. Foresti R, Sarathchandra P, Clark JE, et al. Peroxynitrite induces haem oxygenase-1 in vascular endothelial cells: a link to apoptosis. *Biochem J* 1999;339:729–736.
196. Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, et al. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ Res* 1999;85:663–671.
197. Foresti R, Goatly H, Green CJ, et al. Role of heme oxygenase-1 in hypoxia-reoxygenation: requirement of substrate heme to promote cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281: H1976–H1984.
198. Clark JE, Foresti R, Green CJ, et al. Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress. *Biochem J* 2000;348:615–619.
199. Foresti R, Motterlini R. The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeo-stasis. *Free Radic Res* 1999;31:459–75.
200. Sammut IA, Foresti R, Clark JE, et al. Carbon monoxide is a major contributor to the regulation of vascular tone in aortas expressing high levels of haeme oxygenase-1. *Br*

- J Pharmacol 1998;125:1437–1444.
201. Motterlini R, Green CJ, Foresti R. Regulation of heme oxygenase-1 by redox signals involving nitric oxide. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:615–624.
202. Nauser T, Koppenol WH, Schöneich C. Reversible hydrogen transfer reactions in thiyl radicals from cysteine and related molecules: absolute kinetics and equilibrium constants determined by pulse radiolysis. *J Phys Chem B*. 2012 May 10;116(18):5329-41.
203. Boev VM, Nikonorov AA, Perepelkin SV, et al. Effects of hydrogen sulfide containing gas condensate on the hepatic microsomal monooxygenase system. *Gigiena Sanitariia* 1997;5:5–6.
204. McLaren GW, Macdonald DW, Georgiou C, et al. Leukocyte coping capacity: a novel technique for measuring the stress response in vertebrates. *Exp Physiol* 2003;88:541–546.
205. Живковић Владимир. Ефекти хомоцистеина и супстанци сродних хомоцистеину на кардиодинамику и коронарни проток изолованог срца пацова: улога гасних трансмитера и оксидационог стреса. Докторска дисертација. Факултет медицинских наука, Крагујевац, 2013.
206. Gao Y, Yao X, Zhang Y, Li W, Kang K, Sun L, Sun X. The protective role of hydrogen sulfide in myocardial ischemia-reperfusion-induced injury in diabetic rats. *Int J Cardiol*. 2011; 152(2):177-83.
207. Xu X, Zhao W, Lao S, Wilson BS, Erikson JM, Zhang JQ. Effects of exercise and L-arginine on ventricular remodeling and oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc*. 2010;42(2):346-54.
208. Uzun H, Simsek G, Aydin S, Unal E, Karter Y, Yelmen NK, Vehid S, Curgunlu A, Kaya S. Potential effects of L-NAME on alcohol-induced oxidative stress. *World J Gastroenterol*. 2005;11(4):600-4.
209. Huang P, Shen Z, Yu W, Huang Y, Tang C, Du J, Jin H. Hydrogen Sulfide Inhibits High-Salt Diet-Induced Myocardial Oxidative Stress and Myocardial Hypertrophy in Dahl Rats. *Front Pharmacol*. 2017;8:128.
210. Hemanth Kumar B, Arun Reddy R, Mahesh Kumar J, Dinesh Kumar B, Diwan PV. Effects of fisetin on hyperhomocysteinemia-induced experimental endothelial dysfunction and vascular dementia. *Can J Physiol Pharmacol*. 2017;95(1):32-42.

211. Kamat PK, Kalani A, Givvimani S, Sathnur PB, Tyagi SC, Tyagi N. Hydrogen sulfide attenuates neurodegeneration and neurovascular dysfunction induced by intracerebral-administered homocysteine in mice. *Neuroscience*. 2013;252:302-19.
212. Heinecke JW, Rosen H, Suzuki LA, Chait A. The role of sulfur-containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells, *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 10098–10103.
213. Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, Rabbani LE, Mullins M, Singel D, Loscalzo J. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen, *J. Clin. Invest.* 1993; 91: 308–318.
214. Hrcic D, Rasic-Markovic A, Macut D, Susic V, Djuric D, Stanojlovic O. Homocysteine thiolactone-induced seizures in adult rats are aggravated by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Hum Exp Toxicol.* 2014;33(5):496-503.
215. Kimura Y, Kimura H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress, *FASEB J.* 2004; 18: 1165–1167.
216. Guo W, Kan JT, Cheng ZY, Chen JF, Shen YQ, Xu J, Wu D, and Zhu YZ. Hydrogen sulfide as an endogenous modulator in mitochondria and mitochondria dysfunction. *Oxid Med Cell Longev.* 2012; 2012: 878052.
217. Kim KM, Pae HO, Zheng M, Park R, Kim YM, Chung HT. Carbon monoxide induces heme oxygenase-1 via activation of protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase and inhibits endothelial cell apoptosis triggered by endoplasmic reticulum stress. *Circ Res.* 2007;101(9):919-27.
218. Loscalzo J. The Oxidant Stress of Hyperhomocyst(e)inemia. *J. Clin. Invest.* 1996; 98: 5–7.
219. Tyagi N, Sedoris KC, Steed M, Ovechkin AV, Moshal KS, Tyagi SC. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Dec;289(6):H2649-56.
220. Steed MM and Tyagi SC. Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia. *Antioxid. Redox Signal.* 2011; 15: 1927–1943.
221. Zhang X, Li H, Jin H, Ebin Z, Brodsky S, and Goligorsky MS. Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: 671–678.
222. Jin L, Caldwell RB, Li-Masters T, and Caldwell RW. Homocysteine induces endothelial dysfunction via inhibition of arginine transport. *J Physiol Pharmacol* 2007; 58: 191–206.

223. Stuhlinger MC, Tsao PS, Her J, Kimoto M, Balint RF, and Cooke JP. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway, role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2001; 104: 2569–2575.
224. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 2004; 75: 639–653.
225. Heydrick SJ, Weiss N, Thomas SR, et al. L-homocysteine and L-homocystine stereospecifically induce endothelial nitric oxide synthase-dependent lipid peroxidation in endothelial cells. *Free radical biology & medicine* 2004; 36(5):pp. 632-640.
226. Ushio-Fukai M. VEGF signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2007; 9: pp. 731–739.
227. Bearden SE, Beard RS Jr, Pfau JC. Extracellular transsulfuration generates hydrogen sulfide from homocysteine and protects endothelium from redox stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Nov;299(5):H1568-76.