



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

**ЕФЕКТИ ХОМОЦИСТЕИНА И СУПСТАНЦИ  
СРОДНИХ ХОМОЦИСТЕИНУ НА  
КАРДИОДИНАМИКУ И КОРОНАРНИ ПРОТОК  
ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА: УЛОГА ГАСНИХ  
ТРАНСМИТЕРА И ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА**

**ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА**

**др Владимир Живковић**

**Крагујевац, 2014**

Докторат који је пред вама поред стручне и научне, за мене носи велику емотивну тежину, толику да ме поменути емотивни `набој` готово онемогућава да (и из десетог покушаја), надам се што краће, изразим свој осећања поводом овог доктората.

Када сам се, 2007. године као студент на почетку треће године студија, придружио лабораторији за Кардиоваскуларну физиологију и први пут сусрео са Проф. др Владимиром Јаковљевићем, било ми је јасно да ће то променити мој лични и професионални живот. Имао сам среће, јер сам захваљујући овом, мало је рећи, људском великану, унапредио себе и као човека и као истраживача и радника овог Факултета.

Зато се неизмерно захваљујем свом ментору, човеку који ме је *створио* у професионалном смислу, Проф. др Владимиру Јаковљевићу, што ми је пружио могућност да радим и да као плод тога завршим овај докторат, а потом и на свој научној и људској помоћи у његовој изради. Могу слободно рећи да сам привилегован што имам част да сарађујем са њим и да тако и даље побољшавам себе у сваком смислу.

Захваљујем се мом великом и доживотном пријатељу, господину Предрагу Равићу, што ме је на његов, *суптилан* и непоновљиво *оригиналан* начин, научио свим чарима рада на Langendorff апарату и непрекидно усмеравао на прави пут као човека и професионалца.

Неизмерно се захваљујем свом ко-ментору Проф. др Драгану Ђурићу, на указаној стручној и пријатељској подршци током целе израде доктората.

Захваљујем се мојим драгим колегама и пријатељима: Душици Ђорђевић, на статистичкој обради и изради резултата, Невени Баруцић и Милени Вулетић на биохемијским анализама и Ивану Срејовићу на помоћи у раду на Langendorff апарату. Они су својим напорним радом и несебичном подршком омогућили да се овај докторат реализује.

Захваљујем се својој драгој пријатељици и колегиници Љиљани Ђоковић за сву професионалну и људску подршку, којом ме непрекидно обасипа.

И на крају, али не и по значају, захваљујем се својој породици (оцу Ивану, мајци Љиљани и брату Душану) што је увек и у свему била и остала моја највећа подршка и мотивација.

*Бабици Нади, дека Мики, баба Дари, дека Иви и бака Анђи,*

*јер су они све ово започели...*

# САДРЖАЈ

<b>1. УВОД</b>	
<b>1.1. РЕГУЛАЦИЈА КАРДИДИНАМИКЕ</b>	2
<b>1.1.1. Регулација инотропних својстава миокарда</b>	3
<b>1.1.2. Регулација лузитропних својстава миокарда</b>	4
<b>1.1.3. Екстрацелуларни фактори раста</b>	5
<b>1.2. РЕГУЛАЦИЈА КОРОНАРНОГ ПРОТОКА</b>	5
1.2.1. Артеријски систем срца	6
1.2.2. Специфичности коронарног крвотока	7
1.2.3. Регулација коронарног базалног тонуса	8
1.2.4. Венски систем срца	9
<b>1.3. ХОМОЦИСТЕИН И ЊЕГОВЕ (ПАТО)ФИЗИОЛОШКЕ УЛОГЕ У ОРГАНИЗМУ</b>	10
1.3.1. Откриће	10
1.3.2. Хемијска структура и одлике	11
1.3.3. Номенклатура	12
1.3.4. Хемијска реактивност хомоцистеина у циркулацији	13
<b>1.3.5. Биосинтеза и физиолошка улога хомоцистеин тиолактона у организму</b>	14
1.3.6. Хемијске карактеристике хомоцистеина	17
<b>1.3.7. Метаболизам хомоцистеина</b>	20
1.3.8. Регулација метаболизма хомоцистеина	23
1.3.9. Поремећаји регулације метаболизма хомоцистеина	24
1.3.9.1. Генетски фактори	25
1.3.9.2. Физиолошки фактори	26
1.3.9.3. Патолофизиолошки фактори (фолна киселина и остали витамини Б групе)	27
1.3.9.4. Фармаколошки активне супстанце	29
1.3.10. Биолошке варијације хомоцистеина	32
1.3.10.1. Време узорковања	32
1.3.10.2. Стабилност хомоцистеина у пуној крви, серуму и плазми	33
1.3.11. Референтне вредности хомоцистеина	34
<b>1.3.12. ХОМОЦИСТИН И ЊЕГОВИ МЕТАБОЛИТИ У КАРДИОВАСКУЛАРНИМ БОЛЕСТИМА</b>	35
<b>1.3.13. ХОМОЦИСТЕИН И (ДИС)ФУНКЦИЈА ЕНДОТЕЛА</b>	37
<b>1.3.14. ХОМОЦИСТЕИН У ПАТОГЕНЕЗИ АТЕРО(ТРОМБО)СКЛЕРОЗЕ</b>	39
1.3.14.1. Историјски преглед	39

1.3.14.2. Главни молекулски механизми	39
1.3.14.2.1. Инфламација	40
1.3.14.2.2. Оксидациони стрес	41
1.3.14.2.3. Поремећаји хемостазе	43
1.3.14.2.4. Пролиферација глатких мишића	46
1.3.14.3. Остали молекулски механизми	46
<b>1.3.15. Специфичности утицаја хомоцистеин тиолактона на атеротромбозу</b>	<b>49</b>
<b>1.3.16. ХОМОЦИСТЕИН У (ПАТО)ФИЗИОЛОГИЈИ МИОКАРДА</b>	<b>51</b>
1.3.16.1. Улога хомоцистеина у морфолошким променама миокарда	51
1.3.16.2. Улога хомоцистеина у развоју срчаних аритимија	53
<b>1.4. ГАСОТРАНСМИТЕРИ И ЊИХОВА ФИЗИОЛОШКА УЛОГА У КАРДИОВАСКУЛАРНОМ СИСТЕМУ</b>	<b>54</b>
1.4.1. Опште одлике	54
<b>1.4.2. Специфичне карактеристике азот монооксида (NO)</b>	<b>55</b>
<b>1.4.3. Специфичне карактеристике угљен монооксида (CO)</b>	<b>59</b>
<b>1.4.4. Специфичне карактеристике водоник сулфида (H<sub>2</sub>S)</b>	<b>60</b>
<b>1.4.5. ИНТЕРАКЦИЈЕ ИЗМЕЂУ ГАСОТРАНСМИТЕРА</b>	<b>62</b>
1.4.5.1. Интеракције између NO и CO система	67
1.4.5.2. Интеракција између H <sub>2</sub> S и NO система	63
1.4.5.3. Интеракција између CO и H <sub>2</sub> S система	65
<b>1.5. СЛОБОДНИ РАДИКАЛИ И АНТИОКСИДАЦИОНА ЗАШТИТА</b>	<b>66</b>
<b>1.5.1. СЛОБОДНИ РАДИКАЛИ</b>	<b>67</b>
<b>1.5.2. РЕАКТИВНЕ ВРСТЕ КИСЕОНИКА (ROS)</b>	<b>70</b>
<b>1.5.2.1. НАСТАНАК И ОСОБИНЕ ПОЈЕДИНИХ ROS</b>	<b>71</b>
1.5.2.1.1. Порекло	71
1.5.2.1.2. Супероксид анјон радикал (O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> )	72
1.5.2.1.3. Водоник пероксид (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	74
1.5.2.1.4. Хидроксил радикал ( <sup>•</sup> HO)	75
1.5.2.1.5. Синглет кисеоник ( <sup>1</sup> O <sub>2</sub> )	76
1.5.2.1.5. Остале реактивне врсте кисеоника	77
<b>1.5.3. ЛИПИДНА ПЕРОКСИДАЦИЈА</b>	<b>77</b>
<b>1.5.4. Реактивне врсте азота (RNS)</b>	<b>79</b>
1.5.4.1. Азот монооксид ( <sup>•</sup> NO)	79
<b>1.5.5. АНТИОКСИДАЦИОНИ ЗАШТИТНИ СИСТЕМ</b>	<b>81</b>
<b>1.5.5.1. ЕНЗИМСКЕ КОМПОНЕНТЕ АНТИОКСИДАЦИОНЕ ОДБРАНЕ</b>	<b>82</b>



<b>1.5.5.2. НЕЕНЗИМСКЕ КОМПОНЕНТЕ АНТИОКСИДАЦИОНЕ ОДБРАНЕ</b>	<b>83</b>
<b>1.5.5.3. ЕКСТРАЦЕЛУЛАРНИ АНТИОКСИДАНСИ</b>	<b>84</b>
<b>1.6. ИНТЕРАКЦИЈЕ ГАСОТРАНСМИТЕРА И СЛОБОДНИХ РАДИКАЛА</b>	<b>85</b>
<b>1.7. ИНТЕРАКЦИЈА ХОМОЦИСТЕИНА, ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА И ГАСОТРАНСМИТЕРА</b>	<b>87</b>
<b>2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА</b>	<b>91</b>
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b>	<b>92</b>
<b>3.1. МАТЕРИЈАЛ</b>	<b>93</b>
3.1.1. Комплет реагенаса за припремање <i>Krebs-Hensenleit</i> -овог перфузионог раствора	93
3.1.2. Комплет реагенаса за детерминацију индекса липидне пероксидације (TBARS)	93
3.1.3. Комплет реагенаса за детерминацију азот монооксида (NO) у облику нитрита	94
3.1.4. Комплет реагенаса за детерминацију супероксид ањонског радикала ( $O_2^-$ )	<b>94</b>
3.1.5. Комплет реагенаса за детерминацију водоник пероксида ( $H_2O_2$ )	<b>94</b>
<b>3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛ</b>	<b>94</b>
<b>3.2.1. Историјат</b>	<b>95</b>
<b>3.2.2. Метод ретроградне перфузије изолованог срца при константном притиску</b>	<b>96</b>
<b>3.2.3. <i>Langendorff</i> апарат <i>LF-01 F-P</i></b>	<b>97</b>
<b>3.3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ</b>	<b>101</b>
<b>3.4. БИОХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ</b>	<b>105</b>
<b>3.4.1. ОДРЕЂИВАЊЕ ИНДЕКСА ЛИПИДНЕ ПЕРОКСИДАЦИЈЕ (TBARS)</b>	<b>105</b>
<b>3.4.2. ОДРЕЂИВАЊЕ НИТРИТА (<math>NO_2^-</math>)</b>	<b>106</b>
<b>3.4.3. ОДРЕЂИВАЊЕ СУПЕРОКСИД АНИОН РАДИКАЛА (<math>O_2^-</math>)</b>	<b>109</b>
<b>3.4.4. ОДРЕЂИВАЊЕ ВОДНИК ПЕРОКСИДА (<math>H_2O_2</math>)</b>	<b>110</b>
<b>3.5. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА</b>	<b>111</b>
<b>4. РЕЗУЛТАТИ</b>	
<b>4.1. ЕФЕКТИ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА</b>	<b>113</b>
4.1.1. УТИЦАЈ DL-ХОМОЦИСТЕИНА ( $10\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	113
4.1.2. УТИЦАЈ DL-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА ( $10\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	115
4.1.3. УТИЦАЈ L-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА ( $10\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	117
<b>4.2. ЕФЕКТИ ИНХИБИТОРА РАЗЛИЧИТИХ ГАСОТРАНСМИТЕРА НА</b>	

<b>КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА</b>	<b>119</b>
4.2.1. УТИЦАЈ ЦИНКПРОТОПОРФИРИНА IX ( $10\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	119
4.2.2. УТИЦАЈ DL-ПРОПАРГИЛГЛИЦИНА ( $10\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	121
<b>4.3. УТИЦАЈ ИНХИБИЦИЈЕ NO НА КАРДИОДИНАМСКЕ ЕФЕКТЕ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА</b>	<b>123</b>
4.3.1. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ DL-ХОМОЦИСТЕИНА ( $10\mu\text{mol/l}$ ) И L-NAME ( $30\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	123
4.3.2. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ DL-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА ( $10\mu\text{mol/l}$ ) И L-NAME ( $30\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	125
4.3.3. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ L-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА ( $10\mu\text{mol/l}$ ) И L-NAME ( $30\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	127
<b>4.4. УТИЦАЈ ИНХИБИЦИЈЕ SO НА КАРДИОДИНАМСКЕ ЕФЕКТЕ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА</b>	<b>129</b>
4.4.1. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ DL-ХОМОЦИСТЕИНА ( $10\mu\text{mol/l}$ ) И ЦИНКПРОТОПОРФИРИНА IX ( $10\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	129
4.4.2. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ DL-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА ( $10\mu\text{mol/l}$ ) И ЦИНКПРОТОПОРФИРИНА IX ( $10\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	131
4.4.3. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ L-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА ( $10\mu\text{mol/l}$ ) И ЦИНКПРОТОПОРФИРИНА IX ( $10\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	133
<b>4.5. УТИЦАЈ ИНХИБИЦИЈЕ H<sub>2</sub>S НА КАРДИОДИНАМСКЕ ЕФЕКТЕ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА</b>	<b>135</b>
4.5.1. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ DL-ХОМОЦИСТЕИНА ( $10\mu\text{mol/l}$ ) И DL-ПРОПАРГИЛГЛИЦИНА ( $10\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	135
4.5.2. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ DL-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА ( $10\mu\text{mol/l}$ ) И DL-ПРОПАРГИЛГЛИЦИНА ( $10\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ	

ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	137
4.5.3. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ L-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu$ mol/l) И DL-ПРОПАРГИЛГЛИЦИНА (10 $\mu$ mol/l) НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	139
<b>4.6. ЕФЕКТИ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА</b>	<b>141</b>
4.6.1. УТИЦАЈ DL-ХОМОЦИСТЕИНА (10 $\mu$ mol/l) НА ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	141
4.6.2. УТИЦАЈ DL-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu$ mol/l) НА ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	142
4.6.3. УТИЦАЈ L-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu$ mol/l) НА ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	143
<b>4.7. ЕФЕКТИ ИНХИБИЦИЈЕ РАЗЛИЧИТИХ ГАСОТРАНСМИТЕРА НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА</b>	<b>144</b>
4.7.1. УТИЦАЈ ЦИНКПРОТОПОРФИРИНА IX (10 $\mu$ mol/l) НА ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	144
4.7.2. УТИЦАЈ DL-ПРОПАРГИЛГЛИЦИНА (10 $\mu$ mol/l) НА ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	145
<b>4.8. УТИЦАЈ ИНХИБИЦИЈЕ NO НА ОКСИДАЦИОНЕ ЕФЕКТЕ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА</b>	<b>146</b>
4.8.1. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ DL-ХОМОЦИСТЕИНА (10 $\mu$ mol/l) И L-NAME (30 $\mu$ mol/l) НА ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	146
4.8.2. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ DL-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu$ mol/l) И L-NAME (30 $\mu$ mol/l) НА ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	147
4.8.3. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ L-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu$ mol/l) И L-NAME (30 $\mu$ mol/l) НА ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	148
<b>4.9. УТИЦАЈ ИНХИБИЦИЈЕ CO НА ОКСИДАЦИОНЕ ЕФЕКТЕ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА</b>	<b>149</b>
4.9.1. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ DL-ХОМОЦИСТЕИНА (10 $\mu$ mol/l) И ЦИНКПРОТОПОРФИРИНА IX (10 $\mu$ mol/l) НА ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	149
4.9.2. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ DL-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА	

(10 $\mu$ mol/l) И ЦИНКПРОТОПОРФИРИНА IX (10 $\mu$ mol/l) НА ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	150
4.9.3. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ L-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu$ mol/l) И ЦИНКПРОТОПОРФИРИНА IX (10 $\mu$ mol/l) НА ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	151
<b>4.10. УТИЦАЈ ИНХИБИЦИЈЕ H<sub>2</sub>S НА ОКСИДАЦИОНЕ ЕФЕКТЕ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА</b>	<b>152</b>
4.10.1. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ DL-ХОМОЦИСТЕИНА (10 $\mu$ mol/l) И DL-ПРОПАРГИЛГЛИЦИНА (10 $\mu$ mol/l) НА ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	152
4.10.2. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ DL-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu$ mol/l) И DL-ПРОПАРГИЛГЛИЦИНА (10 $\mu$ mol/l) НА ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	153
4.10.3. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ L-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu$ mol/l) И DL-ПРОПАРГИЛГЛИЦИНА (10 $\mu$ mol/l) НА ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	154
<b>5. ДИСКУСИЈА</b>	
<b>5.1. ЕФЕКТИ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА</b>	<b>158</b>
<b>5.2. ЕФЕКТИ ИНХИБИТОРА РАЗЛИЧИТИХ ГАСОТРАНСМИТЕРА НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА</b>	<b>169</b>
<b>5.3. УТИЦАЈ ИНХИБИЦИЈЕ NO НА КАРДИОДИНАМСКЕ ЕФЕКТЕ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА</b>	<b>178</b>
<b>5.4. УТИЦАЈ ИНХИБИЦИЈЕ CO НА КАРДИОДИНАМСКЕ ЕФЕКТЕ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА</b>	<b>181</b>
<b>5.5. УТИЦАЈ ИНХИБИЦИЈЕ H<sub>2</sub>S НА КАРДИОДИНАМСКЕ ЕФЕКТЕ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА</b>	<b>185</b>
<b>5.6. ЕФЕКТИ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА</b>	<b>187</b>
<b>5.7. ЕФЕКТИ ИНХИБИЦИЈЕ РАЗЛИЧИТИХ ГАСОТРАНСМИТЕРА НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА</b>	<b>193</b>
<b>5.8. УТИЦАЈ ИНХИБИЦИЈЕ NO НА ОКСИДАЦИОНЕ ЕФЕКТЕ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА</b>	<b>198</b>
<b>5.9. УТИЦАЈ ИНХИБИЦИЈЕ CO НА ОКСИДАЦИОНЕ ЕФЕКТЕ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА</b>	<b>202</b>
<b>5.10. УТИЦАЈ ИНХИБИЦИЈЕ H<sub>2</sub>S НА ОКСИДАЦИОНЕ ЕФЕКТЕ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА</b>	<b>205</b>
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ</b>	<b>209</b>
<b>7. ЛИТЕРАТУРА</b>	<b>213</b>

**I**

**УВОД**

"Љубав је осећај који зрачи из срца и крвљу се шири у све ћелије људског тела."

Alexander Lowen (New York, 1910 -), амерички писац и психотерапеут

### 1.3. РЕГУЛАЦИЈА КАРДИОДИНАМИКЕ

Појам **кардиодинамике** означава динамичке догађаје који су повезани са контракцијом и релаксацијом срца. У том смислу, кардиодинамска дешавања у срцу се најбоље могу представити кроз срчани циклус (1). Срчани циклус подразумева период од почетка једне до почетка друге (следеће) контракције срца. Иако срчани циклус обухвата све срчане шупљине, ради лакшег објашњења, уобичајено је да се описује у `левом` срцу, као доминантном делу срца. Промене волумена, притиска, електрокардиографски и фонокардиографски догађаји се истовремено дешавају за време једног срчаног циклуса и конституишу тзв. полиграфски приказ срчаног циклуса, односно Wiggers-ов дијаграм, које је есенцијалан за разумевање срчане радње.

Срчани циклус се састоји из два раздобља: 1) контракција (систола) и релаксација комора (дијастола). Систола се састоји из следећих подфаза: фаза изоволуметријске контракције, фаза брзог избацивања крви (ејекција) и фаза спорог избацивања крви. Дијастола се састоји из: протодијастоличне фазе, фазе изоволуметријске релаксације, ране фазе брзог пуњења, фазе лаганог пуњења (дијастазе), и пресистоличне фазе (касна фаза брзог пуњења) (1).

Контрактилност миокарда представља способност срчаног мишића да ради при константној енд-дијастолној дужини мишићних влакана, а основа у контроли контрактилности је Starling-ова сила (2). Промене у контрактилности миокарда померају Starling-ову криву, тако да било која од физиолошких, фармаколошких или патолошких интервенција које утичу на ову особеност срца (дужину мишићних влакана), ствара своју нову Starling-ову криву. Дакле, постоји "фамилија Starling-ових кривуља", а свака од њих представља различити степен контрактилности (2).

Лекови са позитивним инотропним дејством повећавају радни капацитет срца при било ком енд-дијастолном волумену, односно при било којој почетној дужини мишићних влакана, али се срчани мишић и даље понаша по Frank- Starling-овом закону. Исто тако, лекови са негативним инотропним дејством доводе до редукције радног капацитета срца и померају Starling-ову криву надесно и надоле.

Концепт *preload*-а и *afterload*-а је од посебног практичног интереса у испитивању и вођењу пацијената са обољењима срца. *Preload* (претходно оптерећење) подразумева растезање мишића у мировању, пре започињања контракције, и остварује се у последње

три фазе дијатолне комора. *Afterload* (накнадно оптерећење) подразумева период од започињања мишићне контракције, а одиграва се током прве фазе систолне комора. У овој фази се развија снажан систолни притисак довољан да се отворе семилунарни записци и савлада притисак у аорти, у складу са Laplas-овим законом. Према овом закону тензија у зиду миокарда се повећањем радијуса кривине вентрикула, и обрнуто при датом интравентрикуларном притиску (3). Енд-дијатолни стрес зида је аналоган *preload*-у и представља силу која доводи до дистензије мишићних влакана. Примена Laplas-овог закона и повезивање *preload*-а као детерминанте волумена коморе и масе њеног зида као и енд-дијатолоног притиска има свој практични значај.

### **1.3.1. Регулација инотропних својстава миокарда**

Регулација срчаног рада може да се посматра кроз три потпуно различита угла контроле: 1) на нивоу физиологије органа, 2) на ћелијском нивоу биохемије и биофизике кардиомиоцита, 3) на нивоу молекуларне биологије и експресије гена. Прва парадигма контроле на нивоу органа је приказана кроз Frank- Starling-ов закон срца. Друга парадигма контроле подразумева биохемијска и биофизичка својства ћелија миокарда, која се могу мењати и прилагођавати на различите услове. Нова сазнања да промена у флуксу калцијума има круцијалну улогу у сталној регулацији повезаности контракције и релаксације миокарда, су изузетно значајна у стратешко-терапијском приступу. Све више информација о трећој парадигми контроле да до алтерације експресије гена и ремоделовања долази при прилагођавању функције срца и дужем трајању различитих поремећаја (митрална стеноза, аортна инсуфицијенција, миокардиопатије), су од есенцијалног значаја у савременој кардиологији.

Постоји много нових научних података о хомеостатским механизмима контрактилности миокарда и адаптационим одговорима на нивоу све три поменуте парадигме (4, 5). Тзв. "фазна регулација" обухвата прве две парадигме. Модификације у контрактилности миокарда на дејство неуротрансмitera и различитих лекова, такође припадају фазној регулацији. Међутим промене контрактилности миокарда, услед алтерације у експресији гена, остварују се знатно спорије, после више недеља или месеци и означавају се као "тоничка регулација".

### **1.3.2. Регулација лизитропних својстава миокарда**

Стање коморе на крају систолне одражава њена инотропна својства, а на крају дијастолне (енд-дијатолни притисак-волумен) одражава њена лизитропна својства.

*Preload* (венски прилив) и лузитропно стање релаксиране коморе детерминишу интравентрикуларни притисак и волумен на крају дијастоле. Релаксација леве коморе и њено пуњење зависи од стања фиброзног скелета срца, перикарда, као и од геометрије и дебљине зидова коморе. Поред тога физиолошко-хемијске варијабле као што су брзина дисоцијације контрактилних протеина, кинетика и афинитет калцијума за тропонин, утичу на лузитропно стање релаксиране коморе у дијастоли (6).

Аналогно фамилији Starling-ових кривуља, промене лузитропних својстава леве коморе могу се такође приказати фамилијом кривуља, праћењем односа волумена и притиска у енд-дијастоли. На тај начин се може сагледати способност пуњења и реституције комора миокарда у дијастоли.

Промене или интервенције које доводе до смањене способности пуњења коморе, померају енд-дијастолну криву улево и нагоре, чиме се манифестује негативни лузитропни ефекат. Хемодинамске промене или интервенције лековима, које фацилитирају пуњење коморе, померају енд-дијастолну криву удесно и надоле, и доводе до пада притиска у дилатирној дијастоли чиме се манифестује позитивни лузитропни ефекат (6).

### 1.3.3. Екстрацелуларни фактори раста

Бројни пептидни фактори раста имају улогу у одговору срца на претходно оптерећење. Међу њима су богато заступљени у ћелијама срца кисели и базни фибрибластни фактори раста (aFGF и bFGF) и трансформишући фактори раста типа  $\beta$  (TGF $\beta$ ). С обзиром на пептидну природу многих фактора раста, њихово дејство започиње везивањем лиганда за специфичне рецепторе ћелијске мембране. Комплекс лиганд-рецептор производи сигналну каскаду стимулацијом тирозин киназе да стимулише резидуе тирозина у бројне протеине. У овој каскади је важна улога  $\Gamma$  протеина који *per se* имају ефекте на раст ћелије кроз садејство са калцијумским каналима и модификацијом синтезе интрацелуларних месенџера, као што су cAMP, диацилглицерол (DAG) и инозитол три фосфат (IP<sub>3</sub>) (6). Екстрацелуларни неуротрансмитери, хормони и фактори раста су могући медијатори и модулатори хипертрофијских сигнала и одговора у прекомерно оптерећеном срцу. Међу њима су идентификовани катехоламини као фактори раста за хипертрофију кардиомиоцита, и  $\alpha_1$ -адренергички рецептори као рецептори фактора раста (6).

Поред тога, показано је да на раст ћелије и њену диференцијацију значајно утичу  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренергички агонисти, ангиотензин II, хормон раста, тирозин, инсулин и глукокортикоиди. Повећање хидролитичких продуката аденозин трифосфата (АТФ) и



креатин фосфата, ADP, AMP, и креатин у условима у условима прекомерног оптерећења и утрошка енергије, такође стимулише раст ћелије. Многи интрацелуларни месенцери, као што су cAMP, cGMP, DAG, инозитол фосфат и калцијум, кроз активирање протеин киназе, имају улогу у стимулацији раста ћелије (6).

#### 1.4. РЕГУЛАЦИЈА КОРОНАРНОГ ПРОТОКА

Како је миокард биолошка пумпа која непрестано ради, од велике је важности да буде стално снабдевена довољном количином крви. Крв која испуњава срчане шупљине припада функционалном крвотоку и не може исхрањивати зидове срца. Зато мишићни систем срца поседује посебан нутритивни крвоток или срчану (коронарну) циркулацију која се састоји од артерија, артериола, капилара, венула и вена. На срчану циркулацију отпада око 5 до 10 посто минутног волумена срца, што резултира протоком кроз срчане крвне судове од 250 до 350 см<sup>3</sup> крви у минути, за време мировања. Ова количина (волумен) крви се назива *коронарни проток*, који у току напораног мишићног рада може да се увећа за 4 до 5 пута (1, 7, 8). Физиолошка функција коронарне циркулације је главни предуслов за правилан и несметан рад срца. Срчану (коронарну) циркулацију чини артеријски и венски систем крвних судова. Ово је тим важније, јер је функционалност коронарне циркулације од великог значаја за функционисање срца као пумпе.

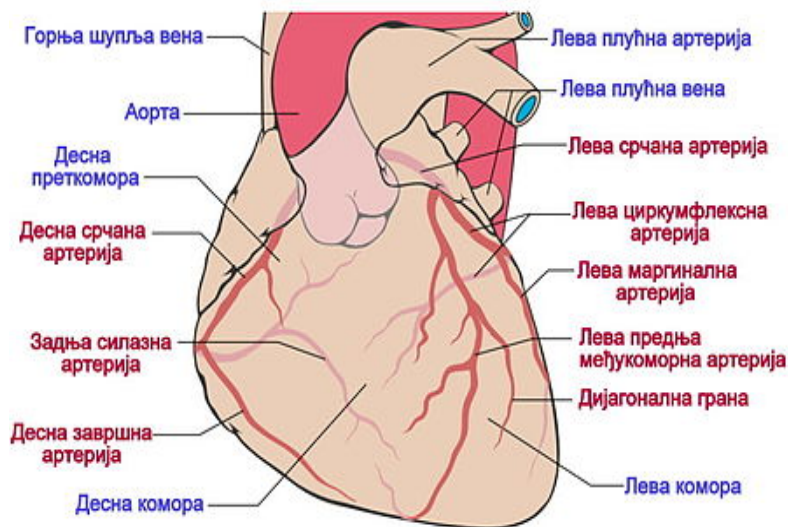
##### 1.4.1. Артеријски систем срца

Обзиром да садашње истраживање између осталог проучава дејство нових биолошких чинилаца на артеријски део коронарне циркулације, нешто већу пажњу ћемо посветити њеним физиолошким карактеристикама. Артеријски систем срца чине десна и лева срчана (коронарна) артерија (лат. а. coronaria dextra et sinistra) (Слика 1). Ове артерије са на својим крајевима гранају у артериоле. Артериоле се затим гранају у велики број капилара. Срчане (коронарне) артерије излазе из почетног дела узлазне аорте, из синуса полумесечастих листића аортних залистак. Број срчаних артерија може изузетно варирати; тако нпр. циркумфлексна грана (лат. ramus circumflexus) леве срчане гране може формирати засебну артерију из левог синуса уз отвор за леву срчану артерију (7-9).

Лева срчана (коронарна) артерија (лат. а. coronaria sinistra) излази из левог синуса аортног ушћа и прошавши субперикардијално између плућне артерије и леве аурикуле се протеже кроз коронарни жљеб према лево и на предњој страни срца дели се на предњу међукоморну грану (лат. ramus interventricularis anterior), која се протеже кроз

истоимену бразду на предњој страни срца, и на циркумфлексну грану (лат. *ramus circumflexus*), која наставља кроз коронарну бразду и пружа се према позади обилазећи плућну површину срца (Слика 1). Лева срчана артерија исхрањује леву преткомору и леву комору, предњи папиларни мишић у десној комори, мали део десне коморе, плућни конус, део срчане преграде и предњи зид десне коморе (7-9).

Десна срчана (коронарна) артерија (лат. *a. coronaria dextra*) излази из десног синуса аортног ушћа, затим прелази субперикардијално кроз коронарни жлеб удесно, обилази десну ивицу срца, између плућне артерије и десне аурикуле, те се на предњој површини срца грана. Највећи огранак је задња међукоморна грана (лат. *ramus interventricularis posterior*) која се протеже кроз задњу међукоморну бразду на задњој страни до врха срца (Слика 1). Десна срчана артерија исхрањује десну преткомору и комору, Кејт-Флак-ов чвор, задњи део срчане преграде, задњи папиларни мишић у левој комори и задњу страну леве коморе, као и булбус аорте (7-9).



Слика 1. Срчана (коронарна) циркулација

#### 1.4.2. Специфичности коронарног крвотока

Мада коронарне артерије спадају у ред терминалних артерија, ипак постоји анастомозна повезаност између различитих грана исте коронарне артерије - *хомоколлатерале*, као и између различитих коронарних артерија (десне и леве) - *хетероколлатерале* (1, 7, 8). Ово постојање коллатералног крвотока може бити изузетно важно у условима опструкције већих крвних судова, па изучавање активације коллатерала у одређеним условима, представља једно од питања које заокупљује пажњу истраживача у последње време.

Друга важна специфичност коронарне циркулације је да она има облик фазног протока крви. Фазни проток крви у коронарним крвним судовима настаје као последица

пулсног аортног притиска и отпора протоку крви због екстраваскуларне компресије коронарних крвних судова у току контракције миокарда. Због тога се највећи део волумена коронарног протока, посебно кроз леву комору, остварује за време дијастоле коморе (1, 7, 8).

Специфичност коронарног крвотока се огледа и у постојању два главна типа артериола. Скоро половина од целокупне резистенције протицања крви лежи у артериолама дијаметра 100-450  $\mu\text{m}$ , док су остале артерије дијаметра мањег од 100  $\mu\text{m}$  и ови крвни судови се називају *ауторегулаторним* (1, 7, 8).

Будући да је срце изузетно метаболички активан орган, симпатички тонус артериола је мали, па се проток крви углавном регулише локалном контролом базалног тонуса. Коронарне артерије имају мали тонус, али поседују велику вазодилаторну резерву, чије коришћење углавном зависи од потребе и снабдевања миокарда кисеоником.

#### **1.4.3. Регулација коронарног базалног тонуса**

Главни фактор за перфузију миокарда је аортни притисак који ствара срце својим радом. Промене у коронарном крвотоку примарно зависе од промене калибра, односно резистенције коронарних крвних судова као одговор на метаболичке потребе и активност срца. Присутна је и *ауторегулација коронарног протока* и *екстракоронарна резистенција*. Коронарни проток је највећим делом регулисан променама у коронарној резистенцији која је дидактички подељена на унутрашњу и спољашњу. Унутрашња је углавном детерминисана тонусом глатким мишићима коронарних артериола, док је спољашња резистенција резултат екстраваскуларне компресије (1, 7, 8).

Постоје барем три есенцијална регулатора коронарног тонуса:

- 1) метаболички вазодилаторни систем,
- 2) неурогени контролни систем (вазоконстрикторни и вазодилаторни),
- 3) васкуларни ендотел (вазоконстрикторни и вазодилаторни).

Метаболички контролни систем је вероватно најважнији, јер се при сваком нескладу између потребе и снабдевања кисеоником, локално ослобађају медијатори коронарног протока. Удовољење срчаног ткива са кисеоником мора да се највећим делом изврши повећањем коронарног протока, обзиром да је коефицијент утилизације кисеоника већ у миру јако висок и износи око 70%. Мада је познато директно дејство кисеоника на васкуларне глатке мишиће или преко хеморецептора, у метаболичкој регулацији коронарне циркулације је доказано учешће бројних вазоактивних супстанци. Међу локалним медијаторима највише је истраживан аденозин, азот моноксид (NO),

хипоксија, а потом и еикосаноиди. Функција еикосаноидног система у коронарној циркулацији је у целини гледано вазодилататорна. Хипоксија доводи до коронарне вазодилатације отварањем АТП-сензитивних калијумових канала (1, 7, 8).

Аденозин чини спону са кисеоником, јер настаје из аденозин трифосфата (АТП). Зато је и логично што се аденозин ствара у кардиомиоцитима као резултат хипоксије, исхемије или појачаног срчаног рада, па је управо у овим стањима и задужен за контролу коронарног тонуса. Главна функција аденозина се огледа у релаксацији глатких мишића коронарних артериола, чиме изазива вазодилатацију и повећање коронарног протока (1, 7, 8). Ензим аденозин деаминаза који је присутан у еритроцитима и зидовима крвних судова разграђује аденозин.

Показано је да у базалним условима L-аргинин/NO систем игра кључну улогу у одржавању тоничке вазодилатације. Механизам снажног вазодилататорног дејства азот монооксида (NO-a) се одвија преко стимулације ензима гуанилил циклазе у глатким васкуларним мишићима и последичним повећањем цикличног гуанозин монофосфата (сGMP-a) (1, 7, 8).

Аутономна контрола коронарног протока се остварује симпатичком стимулацијом обе поткласе алфа-адренергичких рецептора и проузрокује вазоконстрикцију. Са друге стране, стимулација бета-адренергичких рецептора физиолошки доводи до вазодилатације (1, 7, 8).

#### 1.4.4. Венски систем срца

Већим делом се срчане вене (лат. *venae cordis*) уливају у сабирну цистерну (лат. *sinus coronarius*) који се налази у задњем делу срчане (коронарне) бразде. Коронарни синус се улива у десну преткомору. На његовом ушћу налази се залистак (валвула) коронарног синуса. У области тупог срчаног руба у њу се улива велика срчана вена (лат. *v. cordis magna*), као и читав низ притока. Вена магна полази од врха срца и иде кроз предњу међукоморну бразду и улази у област коронарне бразде у коронарном синусу. Са задње стране крв скупља (лат. *v. interventricularis posterior*) која пролази кроз истоимену бразду. У области леве преткоморе формира се (лат. *v. obliqua atrii sinistri Marschall*), остатак Kувие-овог дуктуса. Постоје и читав низ сасвим малих срчаних вена (лат. *vv. cordis minimae Thebesii*) које се директно уливају у десну преткомору и десну комору (7-9). Поремећај (оштећење) функција коронарне циркулације доводи до срчане исхемије, *angine pectoris* и смањених функционалних способности миокарда (10). Најчешће настаје као последица стварања атеросклеротског плака у коронарним артеријама, који стварају регионалне поремећаје протока крви кроз крвне судове срца.

Прецизније, кад год коронарни проток падне испод онога који је потребан да задовољи метаболичке потребе миокарда настаје исхемија срца, најчешће праћена инсуфицијенцијом срца, променама у електричној активности спроводног система срца (нпр. фибрилација комора), инфарктом миокарда итд. За разлику од срчаних артерија срчане вене су обично без атеросклеротских плакова (10).

### 1.3. ХОМОЦИСТЕИН И ЊЕГОВЕ (ПАТО)ФИЗИОЛОШКЕ УЛОГЕ У ОРГАНИЗМУ

#### 1.3.1. Откриће

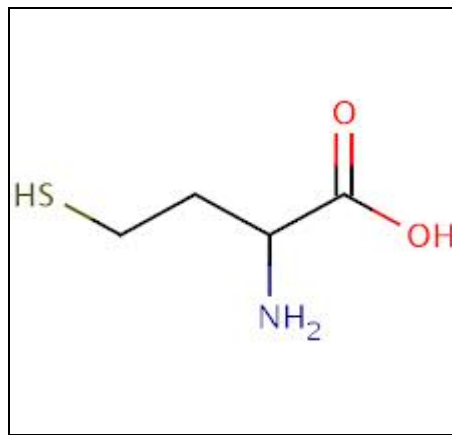
Године 1932 научници Butz и du Vigneaud, са престижног Универзитета Пиноис (11), загревају метионин у сумпорној киселини, и том приликом изолоју супстанцу која је по својим хемијским особинама била врло слична цистеину и цистину. Анализирајући добијене податке и хемијску структуру новоформираног једињења, ови истраживачи закључују да су синтетисали `bis( $\gamma$ -amino- $\gamma$ -carboxypropyl) disulfide`, и предлажу да се новоформирано једињење назове *Хомоцистеин*, будући да поседује хемијску структуру хомологу са цистеином, с тим што садржи још једну метил групу (11). Само две године касније (1934), Ваернстеин (12) изолује хомоцистеин тиолактон, кога касније још детаљније и интензивније испитује група научника окупљена управо око du Vigneaud-а (13). Они откривају да постоји више изоформи хомоцистеина, те да се тако L-хомоцистеин тиолактон (као стабилна изоформа) може конвертовати у L-хомоцистеин, процесом алкалне хидролизе (14).

Након тога је откривена и DL изоформа, чиме хомоцистеин постаје широко доступан и укључује се у бројна *in vivo*, *ex vivo*, *in situ*, и *in vitro* истраживања (14).

#### 1.3.2. Хемијска структура и одлике

Хомоцистеин представља централни интермедијални продукт метаболизма есенцијалне аминокиселине метионина - хемијског циклуса који је својим процесима трансметилације есенцијалан за живот свих живих организама (15). У сисара, хомоцистеин се просецима транс-сулфурације у оквиру метионинског циклуса, може конвертовати у не-есенцијалан аминокиселин цистеин, што чини метионин неопходним прекурсором за синтезу оба једињења. Обзиром да хомоцистеин и цистеин садрже слободну сулфхидрилну (SH) групу, сврставају се у тзв. сулфхидрилна једињења (R-SH), тако да су њихови називи `хомоцистеин` и `цистеин` управо формиран на основу

ових хемијских карактеристика. Ипак, последњих година ови називи добијају ширу (генералну) употребу, поготово у клиничкој литератури где се хомоцистеином називају сви `циркулишући облици хомоцистеина у крви`, што није потпуно прецизно (15).



Слика 2. Хемијска структура хомоцистеина

Познато је да се једињења са слободном SH групом називају тиолима (Слика 2), и да је њихова општа одлика да у присуству, акцептора електрона (као што је молекуларни кисеоник), могу да оксидују, формирајући дисулфиде (-S-S-) (15). На тај начин, хомоцистеин може да се само-оксидује и да формира хомоциститин, односно ауто-оксидацијом цистеина настаје цистин. Глутатион као најзначајнији ендогени (биолошки) тиол нашег организма, током интраћелијског неутралисања реактивних врста кисеоника, а у присуству глутатион пероксидазе, такође подлеже овој реакцији дајући своју оксидовану форму. Наравно, помоћу другог ензима, глутатион редуктазе, глутатион се конвертује у свој пређашњи облик. Хомоцистеин може да се оксидује и са свим поменутиим тиолима (цистеином, глутатионом), формирајући тзв. мешане тиоле или хомоцистеин-глутатион (цистеин)-мешане тиоле (15).

Пептиди и протеини (нпр. серумски албумини) могу да садрже слободне остатке цистеина, који подлежу процесима ауто-оксидације, или да реагују са нискомолекуларним тиолима градећи стабилне дисулфидне комплексе. Тако је више од 70% хомоцистеина и преко 50% цистеина у циркулацији, практично везано за плазма цистеинске резидуе, дисулфидним везама (15).

Хомоцистеин тиолактон је продукт аминоксил тРНА синтетазе, и представља петочлани кондензовани хомоцистеински прстен. Још увек не постоје поуздани подаци о његовом присуству у хуманој плазми, иако за то може бити одговорна неспецифична естеразна активност плазме или васкуларног ендотела (16).

### 1.3.3. Номенклатура

Хомоцистеин и хомоцистин представљају редуковане односно оксидоване облике хомоцистеина. Остале оксидоване форме хомоцистеина обухватају мешане дисулфиде са цистеинским и цистинским остацима пронађеним у протеинима (15). Због тога се обе форме хомоцистеина (редуковани и оксидовани) присутне у циркулацији свеобухватно означавају као укупни плазма (серум) хомоцистеин (15). Реч Хомоцист(е)ин се такође често употребљава у овој хоменклатури, управо означавајућу укупни плазма (серум) хомоцистеин као и све неодређене облике хомоцистеина (17). Ипак, иако ова реч можда и најпрецизније дефинише ово једињење, због постојања заграде је изгубила своју ширу примену.

Иако је коришћење скраћеница које се односе на хомоцистеин већ увелико у употреби, још увек није успостављена званична стандардизација (18). Ипак, у обзир се узимају три, најчешће употребљиване скраћенице: Hcy, Hcy-SH и HSH.

Такође, за означавање тоталног плазма (серум) хомоцистеина се користи скраћеница tHcy. Друга реч која се често користи у објашњавању поремећаја метаболизма хомоцистеина је *хиперхомоцистеинемија*, и означава повећање концентрације свих циркулацијских облика хомоцистеина.

#### 1.3.4. Хемијска реактивност хомоцистеина у циркулацији

У плазми здравих особа се налази ограничена концентрација (редукованог и оксидованог) хомоцистеина, која се увећава са годинама старости. Наиме, референтне вредности, доступне у литератури, за новорођенчад и малу децу износе 3-6  $\mu\text{mol/l}$  (19), за адолесценте 5-8  $\mu\text{mol/l}$  (20), за одрасле 5-13  $\mu\text{mol/l}$  (21), да би код особа изнад 60 година живота обавезно прелазила 10  $\mu\text{mol/l}$  (22). Занимљиво, код стогодишњака вредности хомоцистеина се крећу од 25-27  $\mu\text{mol/l}$  (23).

Количина хомоцистеина испорученог циркулацији зависи од метаболичке активности ћелија и од количине унетог метионина, обзиром да је он неопходан за синтезу хомоцистеина. У ћелијама се може одвијати и супротан процес, деметилација хомоцистеина назад до метионина, уз помоћ кобаламин-зависне метионин синтазе (MS) (15). Ефикасност овог процеса зависи од присуства више фактора: 1) 5 метилентетрахидрифолат редуктазе (5 MTHFR), 2) витамина Б1, Б2 и Б6 и 3) метил-кобаламина (MeCob). У ћелијама бубрега и јетре, метаболизам хомоцистеина обухвата и процес транс-сулфурације и посредован је цистатион  $\beta$  синтазом. Одвијање овог метаболичког пута је делом завистан од присуства пиридоксал 5`фосфата. Такође, ћелије ових органа поседују и другачији процес реметилације у коме бетаин служи као донор метил-групе (15). На тај начин, дефицијенција микронутритијената, нарочито фолне киселине,

витамина Б групе и кобаламина, могу пореметити ћелијски метаболизам хомоцистеина, резултујући у његовом повећаном ослобађању у циркулацију.

Хемијска реактивност хомоцистеина у циркулацији је детерминисана пре свега његовом сулфхидрилном групом. Код здравих особа укупна количина редукованог облика хомоцистеина износи мање од 1% (24). Тако је у једној од ранијих студија забележено да вредности редукованог хомоцистеина износе мање од 0,3  $\mu\text{mol/l}$ , а оксидованог преко 2  $\mu\text{mol/l}$  (24). Иначе, оксидоване форме хомоцистеина обухватају хомоцистеин и његове мешане дисулфидне облике са цистеином. Након ових података нам постаје јасно да огромну већину циркулишућег хомоцистеина чини његов оксидовани облик, док је преко 70% везано за албумине плазме. Особе са хомоцистеинуријом имају неупоредиво веће вредности слободног редукованог хомоцистеина, у односу на физиолошко стање (преко 100  $\mu\text{mol/l}$ ) (25).

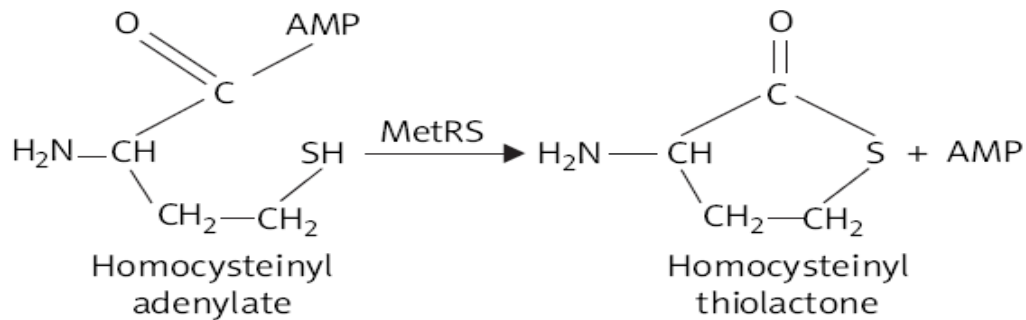
Хемијска реактивност хомоцистеина у плазми има своје особености након оброка богатог метионином. Наиме, орална администрација 100mg/kg (670  $\mu\text{mol/kg}$ ) метионина доводи до пораста концентрације свих облика хомоцистеина у крви (што је свакако очекиван налаз) у току првих осам сати. Нивои редукованог хомоцистеина расту два до три пута током прва 2-3 сата, да би се након 1-2 дана вратиле на почетно стање. Оксидовани хомоцистеин (поред хомоцистеина садржи и мешане дисулфидне облике), такође бележи пораст од неколико пута у току првих 4-6 сати, а онда се враћа на полазне вредности након 24-48 сати (26).

Са друге стране, орална апликација хомоцистеина (67  $\mu\text{mol/kg}$ ) узрокује рапидан пораст редукованог облика за више од 24 пута у току првих 15 минута, да би се након два сата вратио на базалне вредности. Вредности оксидованог облика, међутим, не показују тако драстичне промене, и расту за око 4-5 пута у првих два сата (27).

### **1.3.5. Биосинтеза и физиолошка улога хомоцистеин тиолактона у организму**

Иако је хомоцистеин тиолактон синтетисан још тридесетих година прошлог века (12), прве индикације о његовом биолошком значају су се појавиле педесет година касније, открићем да се хомоцистеин може ензимски конвертовати у свој тиолактон облик током процеса биосинтезе протеина када се хомоцистеин `грешком` селекује од стране ензима метионил-тРНК синтетазе (MetRS) (28-31). На тај начин се најпре формира хомоцистеинил-аденозин-монофосфат (хомоцистеинил-АМП), да би се у наредним реакцијама овом молекулу прикључио бочни ланац тиолата уместо АМП-а, чиме је коначно добијен хомоцистеин тиолактон (Слика 3) (28, 29). Постоји неколико стереохемијских изоформи тиолактона: D-облик, L-облик и D,L-хомоцистеин тиолактон облик (32).





Слика 3. Формирање хомоцистеин тиолактона

Будући да садржи слободну тиоестарску везу, овај облик хомоцистеина је изузетно реактиван у биолошким системима и може врло лако да ацилује било коју амино групу, нарочито лизин групу протеина. Отуда се хомоцистеин тиолактон може дефинисати као кондензовани интрамолекулски тиоестар хомоцистеина (33).

Неколико ААРС-а, од који је метионин тРНК-синтетеза (МетРС) најзначајнија, је укључено у добијање тиолактона. Сматра се да се овај процес одвија у већини ћелија нашег организма. Наиме, биохемијска и генетичка истраживања на културама ћелија су показала да се у биолошким системима хомоцистеин, под утицајем МетРС, конвертује у свој тиолактон облик (30, 31). Тиолактон је тако присутан у свим испитиваним ћелијским културама, од бактеријских (*Eschericia Coli*) (34) до хуманих - ендотелне ћелије (35), фибробласти (36) и друге. Његова продукција се изразито повећава у стањима повишених вредности хомоцистеина у организму.

Хомоцистеин тиолактон-хидрохлорид ( $\text{Hcy tlhc}$ ) представља со хлороводоничне киселине и хомоцистеина. Њена стабилност на собној температурау је неодређена. Под физиолошким условима лако дифундују кроз ћелијске мембране (37, 38).

Време полу-живота егзогено унетог тиолактона у хуманом серуму износи око једног сата (37), што је управо један од разлога због чега га је врло тешко детектовати *in vivo* (38). Након редукције дитиотретиолом, око половине укупног тиолактона везаног за протеине серума се ослобађа као слободни хомоцистеин. Другу половину чини хомоцистеин везан за лизинске остатке протеина (33).

Специфична калцијум-зависна хомоцистеин тиолактоназа (тиолактон хидролаза) је ензим који има вазну улогу у детоксикацији тиолактона из хуманог серума. Тачније, овај ензим ре-конвертује тиолактон у хомоцистеин у хуманом серуму (37). Претпоставља се да се највећи проценат овог ензима налази у ендотелу крвних судова, мада ови подаци нису још увек са сигурношћу доказани (39). У хуманом серуму је поред овог ензима откривен још један ензим за кога се сматра да може имати тиолазну активност (40). Реч је о орвано-фосфатној параоксидази (PON), која је по својим

хемијским особинама и начину деловања врло слична ААРС-ама (40).

Мајоритетини биолошки значај хомоцистеин тиолактона управо потиче од његових хемијских карактеристика (слободна тиоестарске везе) и самим тим израженог афинитета реаговања са многобројним интра и екстра-ћелијским молекулима, што у већини случајева доводи до патофизиолошких стања. Због тога се тиолактон у већини студија дефинише као токсичан облик хомоцистеина. Најранија истраживања из ове области су спровођена на анималним моделима. У једном од истраживања на анималном моделу павијана је показано да инфузија хомоцистеин тиолактона доводи до убрзаног стварања атеросклеротских плакова (41). У сличној студији на зечевима, који еволуцијски имају мању активност тиолактоназе, међутим, развој атеросклерозе није забележен (42).

Доказано је да је L-хомоцистеин тиолактон, али не и његов D-облик, токсичан за ембрионе пацова (43). Поред тога, оба облика су била токсична за ћелије адултних пацова (43). Ова стероспецифична ембриотоксичност може бити последица чињенице да MetRS може да конвертује само L-облик у тиолактон, али не и D-облик (37).

Метаболичка конверзија хомоцистеина у тиолактон такође може бити токсична и за ембрионе пилета, изазивајући дефекте неуралне цеви и конгентилане аномалије срца (44). Ова сазнања су поткрепљена податком да живина садржи веома малу количину тиолактоназе (39).

Хумане генетске студије су дошле до сличних сазнања. У њима је сугерисано да смањена активност PON може бити повезана са убрзаним развојем атеросклерозе (45). Ова сазнања су потврдила претходна истраживања *in vivo*, на PON-1 нокаут мишевима, код којих је дошло до развоја атеросклеротичних промена на крвним судовима, за разлику од *wild-соја* (46).

### 1.3.6. Хемијске карактеристике хомоцистеина

Као што смо већ напоменули хомоцистеин се у организму налази слободан, или у облику дисулфида и протеина. Слободног, или редукованог хомоцистеина, има 1–2% у односу на укупну количину хомоцистеина. Хомоцистин и хомоцистеин-цистин су дисулфидни облици хомоцистеина. Најзаступљенији облик у коме се у организму налази и до 80%, је хомоцистеин везан за протеине, углавном албумин.

И поред очигледне сличности у хемијском саставу аминокиселина, њихова улога у организму је различита. Термин »тиол« се односи на SH групу, која одређује хемијске карактеристике ових аминокиселина, која су таква да омогућују поменутој групи аминокиселина да буду укључена у врло важне метаболичке путеве.

Цистеин и хомоцистеин су мали молекули, молекулске масе 121.2 г/л, односно

135.1 г/л. Хомоцистеин се разликује од цистеина по томе што има једну метиле групу више. Глутатион је трипептид (γ-глутамил-цистеинилглицин) молекулске масе 307.3 г/л, у коме је цистин извор »тио« групе (47).

Физичко-хемијске карактеристике »SH« групе одређују њену: рН вредност, оксидо-редукциони потенцијал, као капацитет за формирање слободних радикала, параметара који са биохемијског аспекта имају за изходиште модулацију у врло сложеним процесима, који могу имати заштитну улогу, или представљати услов за настанак нокси, са каснијим различитим последицама.

Сумпор и кисеоник се налазе у истој групи периодног система, те деле многе сличности када су у питању хемијске особине. Одатле воде порекло бројне сличности у хемијском понашању тиолне (R-SH) и алкохолне групе (R-OH). Разлике у понашању тиолних једињења које постоје у односу на алкохоле, су логична последица евидентних разлика физичко-хемијских константи тиолне и алкохолне групе. Тако је О-Н веза краћа у односу на S-Н везу, чиме се објашњава и већа јачина везе кисеоник-водоник у алкохолној групи у односу на тиолну. И поред мање електронегативности сумпора у односу на кисеоник, енергија дисоцијације тиолне групе је нижа него алкохолне. Зато не чуди изражена појава RS<sup>-</sup>анјона у многим биохемијским процесима (48, 49).

Дисоцијација поменутог типа се повећава са порастом рН. Слабија S-Н веза много лакше подлеже оксидацији у односу на О-Н везу код алкохола, што изазива велику разлику између ове две групе органских једињења када је у питању излагање дејству различитих оксидационих агенаса.

Заједничко за све алкохоле је да оксидациони процес значи промену степена оксидације О-Н групи најближег угљениковог атома, док код тиола процес оксидација изазива различите степене оксидације сумпора S-Н групе. У физиолошким условима тиоли се највећим делом оксидишу до дисулфида (RSSR). Са хемијског аспекта могућа оксидација до сулфеничне (RSOH), сулфиничне (R-CO<sub>2</sub>H) и сулфоничне (RCO<sub>3</sub>H) киселине је врло мала, јер је иста карактеристична за присуство јачих оксидационих агенаса, несвојствених физиолошким условима (50, 51).

Оксидоредукциони потенцијал биолошки значајних тиола и дисулфида је сличан и креће се у распону -0.2 до -0.4 V. Поред реакције типа  $2RS^{\cdot-} \rightarrow 2RSSR + 2e^-$ , у којој је благо фаворизована наградна дисулфида, алифатични тиоли учествују у низу редокс реакција, интереагујући са низом других биолошки активних агенаса, као што су: флавопротеини, цитохроми, аскорбат, као и редуковани кисеонични радикали. Код свих поменутих реакција тиоли се трансформишу у одговарајуће дисулфиде.

Карактеристична је и могућност оксидације тиола у присуству металних јона, као катализатора, која за последицу има наградњу нестабилног тиол радикала (RS<sup>•</sup>), који

настаје из одговарајућег  $RS^-$  интермедијера, који је слободан, или везан за метални катализатор (50).

Реакције тиола са халидима побуђују пажњу, због могућег утицаја на биохемијске процесе васкуларног система. Сигурно је да биолошки активни тиоли у реакцијама са алкил и арил халидима учествују као супституенти, дајући одговарајуће сулфиде ( $RSR^-$ ). Још већа вероватноћа постоји за одвијање нуклеофилне адисије  $RS^-$  анјона на алфа и бета незасићене карбонилне групе ( $C=C=O$ ) у бета позицији. Реакције са витамином К и норепинефрином су примери оваквих реакција. Хемијска интеракција тиола са двогубом везом цијаната ( $C=N$ ), резултира наградњом тиокарбоната ( $NH_2-CO-SR$ ). Ова реакција омогућује адicione процесе на цикличној структури NAD, омогућавајући испољавање кофакторске улоге истог (50).

Још једна од важних разлика у хемијском понашању тиола у односу на алкоhole се односи на реакције са карбонилном групом. Тиоли са тиолном групом блиској амино групи реагују са карбонилним супстратима, дајући релативно стабилан тиазолидин. Са удаљавањем  $SH^-$  и  $NH_2^-$  групе тежња ка наградњи хемимеркаптана расте. Аналогно поменути реакцијама теку са биохемијског аспекта изузетно важне реакције на карбоксилну групу одговарајућих киселина ( $RCO_2H$ ), дајући тио-естре. Најбољи пример је реакција са коензимом А, која резултира наградњом одговарајућег  $RS$ -ацил производа, одговорног за ацилацију у многим биохемијским реакцијама.

Посебну пажњу данас побуђује специфично стварање цикличног хомоцистеин тиолактона, који настаје специфично само из хомоцистеина. Циклизација се убрзава снижавањем  $pH$ , а по најновијим испитивањима значајна је под физиолошким условима (50).

Хомоцистеин и њему сродни биогени тиоли, дају хемијски и физиолошки специфичне производе у реакцијама са азотним оксидима: азот-диоксидом ( $NO_2$ ), диазот-триоксидом ( $N_2O_3$ ) и диазот-тетраоксидом ( $N_2O_4$ ). Изражена је и склоност ка интеракцији са металним нитрозил комплексима ( $M-NO$ ). У оба случаја продукти реакција су  $S$ -нитрозотиол, или тионитритни ( $RS-NO$ ) производи. Ове супстанце јако активирају ензим гуанилил-циклазу и важан су интермедијер у метаболизму азот монооксида ( $NO$ ). Разградња тиолактона такође модулише активност других метало, тиол зависних ензима. У овим случајевима ради се о успостављању  $NO$ -метал и  $S$ -метал веза, у облику кисело резистентних хелатних комплекса са металним јонима (51).

### **1.3.7. Метаболизам хомоцистеина**

Хомоцистеин је само са чисто хемијског аспекта аминокиселина. Ако се у биохемијском погледу појам аминокиселине персонификује са субјединицом у синтези протеина, хомоцистеин то заправо није, јер у поменутом процесу не учествује. Исти се

наједноставније може назвати метаболитом есенцијалне аминокиселине метионина. Настанак хомоцистеина је сложен биохемијски процес, врло фино регулисан, који на свом значају добија, тек онда када се сагледа чињеница да учествује у ре-метилационом циклусу који поново води ка синтези, односно занављању метионина. Метаболизам метионина започиње учешћем метионина у синтези протеина, односно синтези S-аденозил-метионина, који својом декарбоксилацијом партиципира у синтези спермидина, или се понаша као донор метил групе уз издвајање аденизил-хомоцистеина, односно хомоцистеина. Метаболички пут бива у наредним фазама и затворен ресинтезом метионина, или један део хомоцистеина бива неповратно метаболисан до цистеина (Слика 4) (52).

Свака ћелија организма сисара има способност метаболисања метионина. Две реакције су у конкуренцији за расположиву количину метионина: 1) синтеза протеина, или 2) почетна реакција метионин-хомоцистеин-метионин циклуса, награђна S-аденозил-метионина.

Реакција трансформације метионина до S-аденозил-метионина је катализована метионин-аденозил-трансферазом (MAT; EC 2.5.1.6). Ензим има три изоензимске форме. Једна је хепатична, са релативно високом вредношћу  $K_m$ , позитивно модулисана аденозил-метионином. Ова ензимска форма је једина која омогућава јетри да позитивно одговори на повишене вредности метионина у исхрани, односно циркулацији, што резултира скоковитим променама концентрације аденозил-метионина у јетри, а што није случај са другим ткивима и органима, где је концентрација истог релативно константна. Синтетисани аденозил-метионин највећим делом остаје у ћелији где је синтетисан (53).

Аденозил-метионин може своју метил групу предати у некој од транс-метилационих реакција, или бити подвргнут декарбоксилацији у присуству аденозил-метионин декарбоксилазе (EC 4.1.1.50), дајући пропиламинско језгро, потребно за синтезу полиамина, као што је путресцин. Као производ поменуте реакције, 5-метилтиоаденозин се укључује у кружну секвенцу која резултира ресинтезом метионина. Доказано је да на расположиви пут декарбоксилације одлази само око 10% аденозил-метионина, док се остатак усмерава ка синтези хомоцистеина (54). Преосталих 90% аденозил-метионина представља важан извор метил групе, која бива предата различитим донорима, у присуству такође различитих трансфераза, уз издвајање S-аденозил-хомоцистеина.

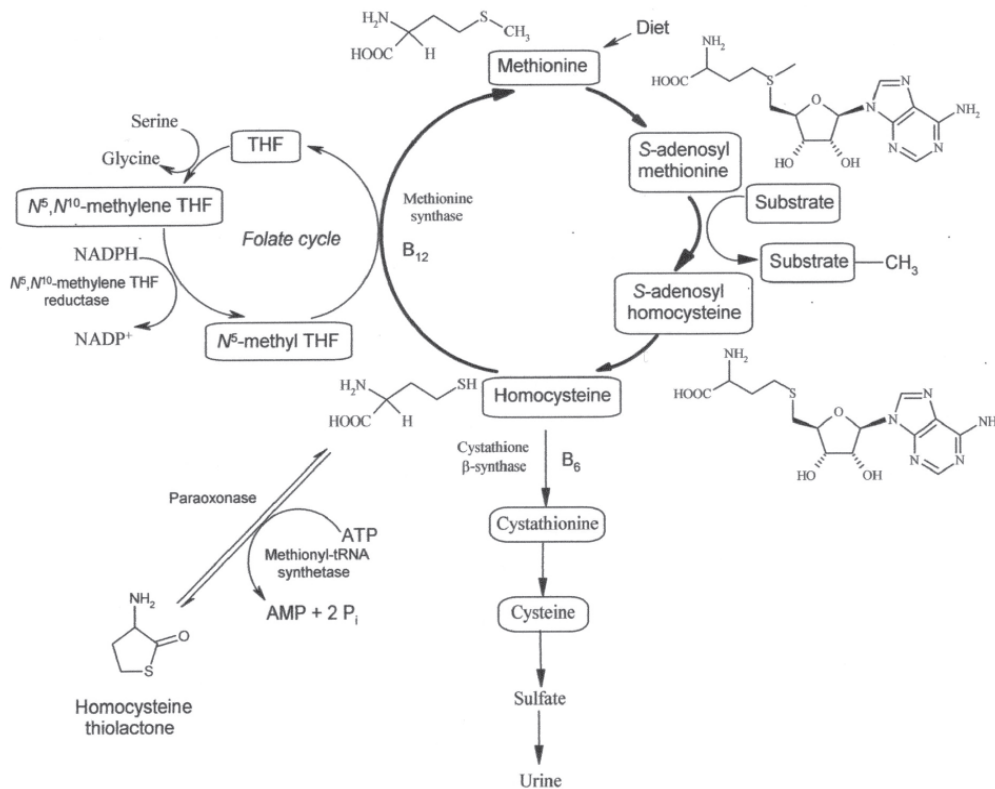


Figure 1. Schematic overview of homocysteine metabolism and its relationship with folic acid and vitamins B<sub>6</sub> and B<sub>12</sub> (modified from Lentz & Haynes, 2004)

Слика 4. Метаболички пут хомоцистеина

Најзначајнији представник ове групе ензима је глицин-метил-трансфераза. Без обзира на хемијски састав метил донора, односно на ензим који процес транс-метилације катализује, S-аденозил-хомоцистеин је најмоћнији инхибитор поменутог процеса. Зато је за нормалну кинетику транс-метилационе секвенце, потребна правилна контрола овог процеса, што подразумева благовремено уклањање S-аденозил-хомоцистеина помоћу три биохемијска пута (55). Један пут је ензимски катализован, аденозин-хомоцистеиназом (EC 3.3.1.1), и омогућава наставак метионин-хомоцистеин-метионин циклуса, јер даје хомоцистеин. Овај ензим се налази у свим ћелијама организма. Други пут уклањања је везивање за протеине унутар ћелије. Када је капацитет интраћелијског везивања превазиђен, вишак S-аденозил-хомоцистеина се транспортује ван ћелије. Доказано је да се овако створени метаболит складишти и у бубрегу (56, 57).

Наставак циклуса значи подржавање ресинтезе метионина, што катализују два карактеристична ензима, док трећи пут значи трајно уклањање хомоцистеина из организма. Одвијање било ког од поменутих метаболичких путева може бити обављено у самој ћелији наградње хомоцистеина, или се транспортује у неки други орган, на пример јетру, у којој је динамика катаболизма бржа.

Бетаин-хомоцистеин-метилтрансфераза (BHMT; EC 2.1.1.5) је ензим који омогућава наставак ресинтезе хомоцистеина. Налази се у јетри свих сисара и користи

бетаин као метил донор (58). Други ензим, метилфолат-хомоцистеин метилтрансфераза (MFMT; EC 2.1.1.13), катализује транс-метилациони процес у свим ткивима сисара. Метил донор је у овом случају 5-метил-тетрахидрофолат, а незаменљиви кофактор MFMT је цијанкобаламин.

Цистатион-β-синтаза (CBS) се такмичи са две напред поменуте метилазе. Овај ензим започиње процес уклањања хомоцистеина из метионин-хомоцистеин-метионин циклуса. Ово је транс-сулфурациони пут, који се завршава стварањем цистеина. У процесу још учествује и ензим С-цистатионаза. Оба ензима су пиридоксал-фосфат зависни (59, 60).

Расподела ензима укључених у метаболизам хомоцистеина није уједначена по органима. У јетри је заступљена изоензимска форма метионин-аденозил-трансферазе, са највећом вредности  $K_m$ . Заступљеност ВНМТ је највећа у јетри свих сисара, а најраспрострањенија је MFMT, које има у свим ткивима.

Познато је да CBS нема у срцу, плућима, тестисима, надбубрежној жлезди и слезини. У мозгу и адипозном ткиву нема С-цистатионазе. Транс-сулфурациони пут метаболизма хомоцистеина је потпун у само 4 органа, јетри, бубрегу, малом интестинуму и панкреасу. То су органи са највећом потребом за ресинтезом глутатиона, те транс-сулфурација овог типа и служи задовољењу ових потреба (60).

### 1.3.8. Регулација метаболизма хомоцистеина

Регулација метаболизма хомоцистеина, најшире гледајући, значи обезбеђивање равнотеже у брзини одвијања два метаболичка пута, који додирну тачку имају баш на нивоу стварања хомоцистеина. То су циклус ресинтезе метионина с једне и транс-сулфурациони пут, с друге стране (Слика 4).

CBS омогућава почетак транс-сулфурације и уклањање хомоцистеина из организма. Глицин-трансфераза елиминише метил групу метионина. У равнотежи са овим процесима је метилација хомоцистеина, квантитативно најзначајније катализована MFMT или метионин синтазе (MS), мањим делом и ВНМТ (61, 62).

Два механизма модулишу расподелу хомоцистеина између ова два компетитивна метаболичка пута. Први укључује разлике у афинитетима ензима за супстрат.  $K_m$  вредности за обе метилазе су реда величине 0.6 mmol/l хомоцистеина. Вредности  $K_m$  за CBS су више од 100 пута. Зато је конзервација метионина, кроз реметилациону

секвенцу фаворизовани метаболички пут. Цистатион-синтаза може да користи хомоцистеин тек онда када је капацитет за метилацију хомоцистеина засићен.

Други регулациони механизам је заснован на ефекторним карактеристикама три метаболита: аденозил-метионина (AdoMet), аденозил-хомоцистеина (AdoHcy) и 5-метилтетрахидрофолата (5 МТНФ). AdoMet инхибира синтезу МТНФ-а и инактивира бетаин-метилтрансферазу, а индукује цистатион-синтазу. Ово наводи на закључак да повећање концентрације AdoMet, као логична последица повећаног уноса метионина храном, фаворизује интензивирање транс-сулфурационог пута и директну инхибицију метилације хомоцистеина, спречавањем синтезе довољне количине МТНФ-а.

Оваква расподела међу конкурентским метаболичким путевима је најизраженија у јетри, због релативно виших концентрација AdoMet у јетри у односу на друге органе (63). Утицај AdoMet на регулацију метаболизма хомоцистеина је независним истраживањем потврђен и допуњен новим сазнањима о инхибицији глицин метил-трансферазе МТНФ-ом. Ово представља још један, допунски механизам регулације.

AdoMet инхибирајући синтезу МТНФ-а, редукује инхибицију глицин трансферазе, омогућавајући да транс-сулфурациони пут буде доминантан. Снижене вредности AdoMet имају супротан ефекат (64, 65).

Утицај AdoHcy на регулацију метаболизма хомоцистеина је супротан дејству AdoMet. Његов утицај је важан у нехепатичним ткивима, где концентрација истог флукутира много више од AdoMet (66, 67).

### 1.3.9. Поремећаји регулације метаболизма хомоцистеина

Евентуални утицај претераног уношења метионина храном, који би могао да доведе до хиперхомоцистеиније, данас се не сматра самосталним могућим узроком настанка ове појаве. Учешће нутриционог фактора овог типа би могло да има значаја у садејству са осталим узроцима одступања од нормалне регулације метаболизма хомоцистеина, као што су генетски, или недовољна количина ко-фактора у ензимски катализованим реакцијама поменутог метаболичког пута.

Евидентне грешке у метаболизму хомоцистеина изазване су генетским алтернацијама, које се одражавају на правилну синтезу CBS и метилентетрахидрофолат-редуктазе (МТНФР). Познате су грешке у синтези ВНМТ и MS, али су слабије проучене, јер су врло ретке (68, 69).

Појава хиперхомоцистеиније значи повећање како слободног тако и везаног хомоцистеина, тако да се ради о повећању концентрација укупног хомоцистеина. Хиперхомоцистеинија води ка повећању концентрација интрацелуларног AdoHcy. Резултујућа инхибиција AdoMet зависних транс-метилационих реакција, могу бити



главни узрок каснијих биолошких и хемијских абнормалности.

Ради лакшег сагледавања проблематике настанка и последица хиперхомоцистеинемije, учињени су покушаји систематизовања фактора који познатим и непознатим механизмима доводе до ове појаве. Једна од таквих подела обухвата следеће факторе: генетске, физиолошке, патолошке и фармаколошки активне супстанце.

#### 1.3.9.1. Генетски фактори

Метилентетрахидрофолат-редуктаза (MTHFR) омогућава конверзију 5,10-метилен-тетрахидрофолата у 5-метилен-тетрахидрофолат, у присуству NADPH. 5-метилен-тетрахидрофолат је супстрат за цијанкобаламин-зависну метионин синтазу. MTHFR флавин зависан ензим, кога чине две индентичне, 77 kDa субјединице, са N-терминалним каталитичким доменом и с-терминалним регулаторним доменом. Описано је око 50 случајева тешке MTHFR дефицијенције, са тешким неуролошким и васкуларним компликацијама. Ген, одговоран за синтезу ензима је клониран, а 14 карактеристичних мутација је такође описано (70).

Најчешћа мутација која води ка испољавању термолабилности ензима, је позната као С677Т. Изазвана је аланин-валин супституцијом. Учесталост јављања ове мутације је у просеку висока, али различита по етничким групама. За француски део канадске популације она износи 38%, код афричког дела америчке популације само 10%, а у осталим студијама проценат је од 25–39%. Да ли је ризик за појаву, односно квантитативни износ хиперхомоцистеинемije већи код хомозигота у односу на хетерозиготне пацијенте, до краја није разјашњено, али је евидентан врло важан утицај фолата на сузбијање негативне експресије tMTHFR (71).

Витамин Б12 зависне метионин-синтазе (MS) има у свим ћелијама и ткивима. Учесталост јављања генетских грешака у синтези овог ензима дефинитивно је много мања у односу на MTHFR, али је данас предмет проучавања. Позната је структура MS сДНК од 3798 нуклеотида, који детерминишу секвенцу од 1265 аминокиселина, укупне молекулске масе 140 kDa. На основу проучавања фибробласта пацијената са MS дефицијенцијом, дефинисана су два типа MS дефицијентне болести, познати као cb1E и cb1G тип. cb1E алтернација се односи на редукцију самог MS ензима, а cb1G на промену MS апоензима (72).

Улазак хомоцистеина у транс-сулфурациони пут је катализован витамин Б6 зависном цистатион-β-синтазом (CBS), која има ограничену ткивну дистрибуцију. Описано је неколико стотина случајева CBS дефицијенције. Ово је најчешћи узрок јављања хомоцистеинурије. Хумани сДНК за CBS има 2554 нуклеотида, кодира

секвенцу субјединице од 551 аминокиселине молекулске масе око 63 kDa.

Око 40 мутација је откривено на CBS гену. Сматра се да је 0.5–1.5% сваке популације захваћено хетерозиготном формом CBS дефицијенције. До сада је у највећем броју случајева овај део популације остајао неоткривен, јер ензимски дефицит овог типа се до сада водио као асимптоматски. Вредности хомоцистеинемије су благо повишене. У току су опсежна испитивања у вези евентуално повећане осетљивости ових особа на хомоцистеин индуковане ноксе. Хомозиготне форме дају вредности хомоцистеинемије, често више од 50 mmol/l, као и повећање концентрације метионина (73-76).

#### 1.3.9.2. Физиолошки фактори

Физиолошки фактори који утичу на ниво хомоцистеина су: старост, пол, и начин живота. Средња концентрација укупног хомоцистеина се повећава са старењем. Особе старије од 50 година имају у зависности од популационе групе, просечно и до 1.9 mmol/l виши ниво хомоцистеинемије, него млађе од ове критичне старосне границе (70).

Код жена је ова разлика још израженија и износи до 2.2 mmol/l, а код мушкараца је 1.6 mmol/l. Концентрација укупног хомоцистеина код мушкараца је за око 25% виша него код пременопаузалних жена. Ова разлика се смањује после менопаузе, али никад не нестаје. Хормонска терапија, на бази естрогена, манифестује се негативном корелацијом у односу на концентрације хомоцистеина, код постменопаузалних жена. У трудноћи се јавља карактеристично смањење хомоцистеина, због смањења концентрације циркулишућег албумина, за који је везан већи део хомоцистеина (70).

Начин исхране је важна детерминанта, која утиче на ниво хомоцистеина. Ниво серумског укупног хомоцистеина код здравих особа варира са уносом метионина храном на начин различит оном код особа са предиспозицијом за хиперхомоцистеинемију пропорционално уносу метионина.

Опште узевши храна животињског порекла је богатија метионином. Месо и риба садрже 2.7 г/100 г, јаја 3.2 г/100 г, кравље млеко 2.9 г/100 ml, а хумано млеко само 1.4 г/100 ml метионина. Воће и поврће садрже 0.9–1.2 г/100 г, са изузетком бресака и грожђа са 3.6 г/100 г. Досадашња испитивања су дала контрадикторне податке о утицају липидног статуса на појаву хиперхомоцистеинемије. Битна су такође истраживања која у *in vitro* условима указују на интеракције липопротеина и хомоцистеина, које у досадашњим проспективним студијама нису препознате (77-79). Пушење и пасиван начин живота, без значајнијег физичког напора су удружени са повећањем нивоа хомоцистеина.

### 1.3.9.3. Патофизиолошки фактори

Обзиром на значај који витамини (нарочито фолна киселина и остали витамини Б комплекса) имају у метаболизму хомоцистеина, јасно је да поремећаји његовог метаболизма могу настати најпре услед мањег или већег дефицита ових витамина у исхрани, што је показано у све већем броју најновијих истраживања (80-85). Витамини делују као кофактори, који потпомажу испољавање каталитичке способности ензима у метионин-хомоцистеин-метионин циклусу. То су цијанкобаламин, пиридоксал фосфат и фолна киселина. Општи став је да некавалитетна исхрана, или малапсорпција ових супстанци повећава ризик за настанак хиперхомоцистеиније (70-73). Чак и код здравих, правилно храњених особа постоји негативна корелација између нивоа ових витамина и хомоцистеина (72). Ова негативна корелација постаје још израженија код старијих особа, када је у питању цијанкобаламин (86). Овакви биохемијски односи су са становишта дијагностике мегалобластне анемије, односно утврђивања мањка фолне киселине, утицали да одређивање нивоа хомоцистеиније постане важан (87), па чак и осетљивији маркер од бројних рутинских хематолошких параметара (87, 88).

Дефицијенција цијанкобаламина се диференцира у односу на дефицијенцију фолата налазом повишених вредности метил-малоничне киселине, који са повишеном вредности укупног хомоцистеина дају слику хиповитаминозе Б12 (86).

Утицај витамина Б6 је најслабије истражен (73, 89, 90). Код пацијената са урођеном смањеном активношћу CBS, узимање пиридоксал-фосфата смањује ниво хомоцистеиније, али никад до нормалних вредности (91). Ефекат зависи и о којој генској алтернацији се ради. Интересантно је да давање витамина Б6 смањује нивое хомоцистеина након теста оптерећења метионином, али не и код хроничне хиперхомоцистеиније. Малапсорпција витамина Б6 је много ређа од раније поменутих, те је и вероватноћа за испољавање исте на концентрацију хомоцистеина много мања (90-93).

Хомоцистеинија директно корелира са серумским креатинином и гломеруларном филтрацијом (94-97). Код уремије редуковани хомоцистеин није повећан, али јесте протеински везан. Суплементациона терапија фолатом даје одређене резултате, али никад вредности хомоцистеиније не враћа на нормалу. Још слабији ефекти се постижу третманом витамином Б6. Одсуство довољно израженог одговора на третман фолном киселином објашњава се присуством инхибитора фолатне коњугазе, недавно откривеног код пацијената на хемодијализи. Активација фолне киселине, иначе значи додатак глутамилног остатка неактивној форми витамина, што резултира

наградњом активног фолил-полиглутамата. Дужина додатог радикала је контролисана равнотежним деловањем фолат-коњугазе, која тежи одвајању глутамилних остатака од полиглутамил-фолата, и фолил-полигамаглутамат-синтетазе која води додавању глутамилних остатака. Највећу биолошку активност имају фолил-полиглутамати кратких ланаца, којих из горе поменутих разлога код уремичних пацијената нема довољно. Хронична уремија такође нарушава екстрареналну активност ензима одговорних за метаболизам хомоцистеина (98, 99).

Како је бубрег значајно место метаболизма хомоцистеина, други механизам који се намеће је оштећење тубуларних ћелија, које више нису у могућности да ефикасно обављају транс-сулфурационе процесе у катаболизму хомоцистеина, код различитих степена бубрежне инсуфицијенције. Трансплантација бубрега и срца води ка повећању хомоцистеинемije, која је у позитивној корелацији са количинама примењених имуносупресива циклоспорином и кортикостероидима (100).

Нарушавање нормалног метаболизма хомоцистеина постоји дефинитивно код пацијената са *diabetes mellitus type 1*. Уобичајен развој болести носи са собом ризик за развој микро и макроангиопатије, са ретинопатијом и нефропатијом, као пратећим компликацијама (101, 102). Поред тога, број студија које указују на повезаност *diabetes mellitus type 2* са повишеним вредностима хомоцистеина у крви је у рапидном порасту у новије време. У већини ових студија се истиче значај хомоцистеина као све поузданијег параметра у (биохемијском) праћењу клиничке слике, терапије и компликација (нарочито кардиоваскуларних) *diabetes mellitus type 2* (103-106).

Хиперхомоцистеинемija која се јавља код дијабетес мелитус-а са макроангиографским компликацијама, између осталог, воде нефропатији. Тачан механизам за убрзавање атеросклерозе у поменутих случајевима није разјашњен, али се доводи у везу са нарушеним метаболизмом хомоцистеина на нивоу бубрега (105, 106).

Повећане вредности хомоцистеина се могу наћи и код пацијената са одмаклим стадијумом ретинопатије. У оквиру ове групе, знаке хиперхомоцистеинемije су имали само они пацијенти, који су поред поменуте компликације испољавали знаке нефропатије. Код пацијената без, или са минималним знацима ретинопатије, нису детектоване повишене вредности хомоцистеина (107).

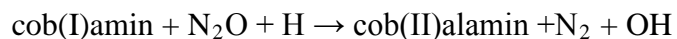
#### 1.3.9.4. Фармаколошки активне супстанце

Низ фармаколошки активних супстанци из неколико фармаколошких група

различитим механизмима утичу на ниво хомоцистеинемије.

*Антифолати.* Метотрексат је инхибитор дихидрофолат редуктазе, која води ка успореној регенерацији и каснијој разградњи редукованих фолата, укључујући и 5-метил-тетраhydrofolat. На овај начин је онемогућена правилна реметилација хомоцистеина у метионин. Ниво укупног хомоцистеина у плазми је стога осетљив индикатор антифолатног дејства метотрексата, пожељног код неоплазми, псоријазе и реуматодног артритиса. Хиперхомоцистеинемија овог типа достиже максимум после два дана при дози од 25 мг дневно, односно за неколико сати код канцера и давања 1–3.6 г на дан (108).

*Азот-моноксид (NO).* Излагање пацијената дејству азот субоксида (N<sub>2</sub>O), као анестетичког агенса, води ка повећању нивоа хомоцистеина. У in vitro условима карактеристична интеракција између азот субоксида и цијанкобаламина може бити следећа (52):



Овај процес тече у току нормалног испољавања каталитичке активности метионин-синтазе, која бива инактивирана, због везивања ослобођених ОН радикала за активно место на ензиму. Истим механизмом се врши и инактивација метилмалонил-СоА, али при дужем деловању азот субоксида. На овај начин се објашњава и нагомлавање (5 МТНР), као и повећан губитак фолата урином. Ниво укупног хомоцистеина у плазми се повећава због нагомилавања истог у ћелији и изласка у екстрацелуларни простор (109). Данас постоје прелиминарни подаци о инактивацији метионин-синтазе деловањем NO-а, у још јачем облику него код дејства азот субоксида. Резултати су добијени на основу испитивања на ћелијама јетре пацова, а због вишеструког значаја азот монооксида у биохемијској регулацији иста се настављају (110). Иначе, група аутора на челу са Sharma M, је последњих година интензивно проучавала интеракцију NO и хомоцистеина и истакла потенцијалну улогу ове интеракције у етиопатогенези атеросклерозе на моделу пацова, која може бити важна за клиничка истраживања из ове области (111, 112).

*Антагонисти витамина Б6.* Азауридин је антимераболит који је коришћен за третман рефрактарне псоријазе. Делујући као антагонист витамина Б6, изазивао је хиперхомоцистеинемију, као и тешке васкуларне поремећаје, чији механизам до 1976. године, када је забрањен за употребу, није до краја разјашњен (113).

*L-допа.* Користи се у третману пацијената са Паркинсоновом болешћу. Повећава концентрацију допамина у мозгу. Најважнији катаболички пут је О-метилација до 3-О-метил-допе. Реакција је катализована катехол-О-метилтрансферазом, а као извор метил групе служи S-аденозилметионин. Доказана је смањена концентрација S-

аденозилметионина, односно повећана концентрација S-аденозилхомоцистеина, како на животињама, тако и код пацијената на терапији L-допом. Појединачна доза L-допе одмах изазива хиперхомоцистеинемiju, а хронично узимање је одржава. У фармаколошкој пракси има још једињења која су супстрати S-аденозил трансметилаза, а чији ефекат на ниво хомоцистеина није испитан (114).

*Хормонска терапија.* Идеја да ниво укупног хомоцистеина зависи од хормонског статуса, потиче од података о нижем нивоу хомоцистеинемije код пременопаузалних жена у односу на постменопаузалне и мушкарце. Ови подаци су касније поткрепљени цињеницама о нижим вредностима хомоцистеина у трудноћи, као код жена у менопаузи са супституционом хормонском терапијом (115-117).

Код узимања контрацептивних средстава на бази естрогена констатовано је повећања нивоа хомоцистеина само у периодима циклуса, са повећаним лучењем хормона. Нису регистроване осцилације концентрације хомоцистеина код одсуства узимања контрацептива. Механизам којим би се објасниле ове појаве нису разјашњене. Има индикација да естрогени смањују нивое кобаламина и фолата, без испољавања клиничких знакова хиповитаминоза. Давање естроген антагониста, типа тамоксифена, смањује ниво укупног хомоцистеина за 30%, у року од 6 до 12 месеци (118).

*Антиепилептици.* Примена фенитоина и карбамазепина повећава хомоцистеинемiju, највероватније услед ремећења хомеостазе фолата (119).

*Деривати жучних киселина.* Примена колестипола и сличних препарата повећава укупни хомоцистеин, због дефицита фолата, а који је изазван поремећеном адсорпцијом (120).

*Алкохол.* Конзумирање алкохола води ка појави различитих типова хиперхомоцистеинемije. Тежак хронични алкохолизам са развијеном болести јетре, прати стална хиперхомоцистеинемija. Пролазна хиперхомоцистеинемija је обавезна код акутне интоксикације алкохолом, код особа без оштећења јетре. Настанак поремећаја метаболизма хомоцистеина се објашњава у оба случаја нарушавањем метаболизма фолата, карактеристичног за ову групу пацијената. У току су испитивања феномена повећане учесталости можданих крварења код алкохоличара, која је евентуално повезана за хиперхомоцистеинемijом (121).

За разлику од горе наведених следеће фармаколошки активне супстанце смањују ниво хомоцистеина:

*Аденозин и сродна једињења* су инактиватори, или инхибитори S-аденозил-хомоцистеин-хидролазе, која је одговорна за хидролизу S-аденозил-хомоцистеина до хомоцистеина. У случају акумулација S-аденозил-хомоцистеина треба користити овакве супстанце, као антивиралне агенсе (122).

*Сулфхидрилне супстанце.* Три фармаколошки активне сулфхидрилне супстанце смањују ниво хомоцистеинемije. То су: диметилцистеин (D-пенициламин), метал измењивачки агенс са применом у третману реуматоидног артритиса, N-ацетилцистеин, и 2-меркамптоетан сулфонат, хемотерапеутски протектор. Сва једињења овог типа имају слободну сулфхидрилну групу и способна су да граде дисулфиде у плазми, те у хемијску интеракцију овог типа ступају и са хомоцистеином, снижавајући концентрацију истог (123). D-пенициламин смањује слободан и протеин везан хомоцистеин за 50 до 90%, код пацијената са хомоцистеинуријом. Иста супстанца смањује ниво протеински везаног хомоцистеина у току чувања узорака серума. Код пацијената са канцером, третман 2-меркам-птоетан сулфонатом, снижава хомоцистеинемiju за више од 50%, после неколико дана примене. N-ацетилцистеин после појединачне пероралне дозе, смањује укупни хомоцистеин за 20 до 50%, за разлику од слободне фракције која расте (123, 124).

### 1.3.10. Биолошке варијације хомоцистеина

#### 1.3.10.1. Време узорковања

Једини извор метионина као есенцијалне аминокиселине, код сисара је протеинима богата исхрана. За очекивати је зато да унос хране повећава ниво хомоцистеина у крви. Након првих испитивања из 1989. године, која су указивала на одсуство разлике у концентрацији хомоцистеина пре и после јела, дошло се до података да се 2–4 сата после доручка богатог протеинима снижавају вредности хомоцистеинемije. Још исцрпнији подаци указују на снижавање вредности нивоа хомоцистеина, у року 1–4 сата после доручка са 15 до 18 г протеина. Хомоцистеин благо расте након три сата, уколико се у току ручка унесе око 50 г протеина, да би концентрациони максимум, од 15 до 20%, наступио после 6–8 сати. Следећег дана ујутру ниво хомоцистеина је и даље виши од оног пре конзумирања протеинима богатог ручка (125).

Хомоцистеин се споро елиминише из организма, са полуживотом 3–4 сата. Само овај податак указује на могућност повећања хомоцистеина 12–20 сати након оброка богатог протеинима. Објашњење за снижавање хомоцистеина после оброка је да се у периоду од неколико сати по истом елиминише хомоцистеин наглађен од метионина унесеног претходног дана. Зато се код узорковања препоручује да оно буде наташте, са посебним нагласком на састав задњег оброка. Препоручује се лаки оброк вече пре узорковања, вађење крви не дуже од 3 сата после лаког доручка, а пре ручка.

Пошто је 80% укупног хомоцистеина везано за протеине плазме, а концентрација хомоцистеина је нижа у лежећем, него у седећем положају, о овоме се мора водити

рачуна код стандардизовања начина вађења крви. У испитивањима на здравим добровољцима, нађено је смањење нивоа хомоцистеина, ако је вађена крв узоркована у лежећем положају у односу на седећи и за 29.9% (3.5 mmol/l), односно средњу вредност снижења од 19% (2.1 mmol/l). Овако драматична разлика није нађена у другом испитивању, исте врсте на 12 здравих жена и исто толико здравих мушкараца. И у овом случају средњи износ смањења хомоцистеина износио је значајних 6.3%, што је у односу на нађену аналитичку варијацију од 3.1%, изузетно много (126).

#### 1.3.10.2. Стабилност хомоцистеина у пуној крви, серуму и плазми

Концентрација укупног хомоцистеина у серуму и плазми је након вађења крви зависна од начина припреме серума и плазме. Метаболизам метионина се интензивно наставља у еритроцитима и после венепункције, те долази до изливања хомоцистеина у екстрацелуларни простор. Због тога је опште правило да после прикупљања крви, исту треба ставити у посуду са ледом и центрифугирати у року од једног сата. Уколико хлађење изостане у току првог сата треба очекивати повећање нивоа укупног хомоцистеина до 10%. У току евентуалног дужег стајања пуне крви на собној температури концентрација хомоцистеина се повећава, које је независно од затечене концентрације у екстрацелуларном простору. Повећање износи око 35% у прва 4 сата, па до 75%, у току 24 сата (52).

Могућа је примена антикоагулантних средстава, који код добијања плазме за одређивање хомоцистеина имају улогу агенаса за инхибицију даљег метаболизма истог. Не постоји консензус о најбољем начину конзервације хомоцистеина, али најбољи резултати су добијени са: натријум-флуоридом, лимунском киселином и 3-дезаденозин. Примена EDTA се често спомиње и нешто ређе користи. EDTA не може директно да инхибира излазак хомоцистеина из еритроцита, већ само да спречава оштећење еритроцита у току коагулације, чиме се процес успорава. Значајан ефекат постоји само при хлађењу на +4 °C, када повећање концентрације хомоцистеина не прелази 5% (52).

Хемолиза практично не утиче на одређивање укупног хомоцистеина. Концентрација овог параметра у еритроцитима је  $0.80 \pm 1.05$  mmol/l, те не може битно да промени ниво хомоцистеина у екстрацелуларном простору (52).

Након одвајања серума, или плазме ниво хомоцистеина је врло стабилан. Може се као правило прихватити да је стабилност на собној температури 4 дана, на 0–2 °C неколико недеља, а на –20 °C неколико година. Узастопна замрзавања и одмрзавања не утичу на концентрацију истог. Венска стаза код вађења крви, услед коришћења повеске у трајању од 3 минута, изазива средње повећање хомоцистеинемije од 2.8%. Интра-



индивидуална варијација код укупног хомоцистеина, утврђена на основу многих студија, је у границама 7–9.4%, те се не сматра великом. Зато поменути подаци о смањењу концентрације хомоцистеина при вађењу крв у лежећем положају добијају на значају. Такође се примећује мали удео грешке због венске стазе (127).

#### 1.3.11. Референтне вредности хомоцистеина

Интер-индивидуална варијација према, различитим изворима, износи у здравој популацији 24 до 34%. Не постоји консензус око горње границе референтних вредности за укупни хомоцистеин. Распон концентрација код здравих испитаника износи од 5 до 15  $\mu\text{mol/l}$ , при чему је дистрибуција померена ка вишим вредностима, а горња граница референтних вредности се од лабораторије до лабораторије битно разликује (128). Повишена вредност хомоцистеина у крви (хиперхомоцистеинемија) се може класификовати као блага (15-30  $\mu\text{mol/l}$ ), умерена (30-100  $\mu\text{mol/l}$ ), и озбиљна (>100  $\mu\text{mol/l}$ ) (129). Вредности хомоцистеина у опсегу 12-15  $\mu\text{mol/l}$  током гладовања и 40-50  $\mu\text{mol/l}$  након теста оптерећења метионином, се према савременим литературним подацима доводе у везу са повећаним ризиком од настанка кардиоваскуларних болести (130).

Варијације у вредностима хомоцистеина настају не само због коришћења различитих метода одређивања, или различитог начина вађења крви, него и због квалитета стандардног узорка. Наиме, примећено је да дистрибуција вредности хомоцистеинемије постаје правилнија након суплементације контролне групе одговарајућим витаминима, одговорним за правилан метаболизам хомоцистеина.

Разноликост података на ову тему се може илустровати и следећим примерима. Опсежно испитивање утицаја хомоцистеина на појаву каротидне стенозе, указало је на горњу границу референтних вредности од 14  $\mu\text{mol/l}$ , и то за контролну групу са проверено коректним нивоима фолне киселине, цијанкобаламина и пиридоксал-фосфата (131). Међутим, Stampfer (132) извештава о толерантним вредностима укупног хомоцистеина од 15.8  $\mu\text{mol/l}$  за условно здраву групу особа без провере нивоа карактеристичних витамина, односно без суплементације истих. Испитивање на 1428 здравих особа пре суплементације витаминима, дало је као средњу вредност референтних вредности 12  $\mu\text{mol/l}$ , са наглашеним померањем ка вишим вредностима, док се након суплементације та вредност значајно снизила, на 8.3  $\mu\text{mol/l}$ , уз нормалну дистрибуцију вредности. На основу овог модела 95% вредности лежи у опсегу референтних вредности од 4.9 до 11.7  $\mu\text{mol/l}$  (132).

Због свега горе наведеног, сигурно је да до скоро генерално помињана гранична

вредност од 15  $\mu\text{mol/l}$  не важи, а да за због разноликости фактора који утичу на ниво хомоцистеинемije за сваку популацију морају бити одређене референтне вредности (133).

### **1.3.12. ХОМОЦИСТИН И ЊЕГОВИ МЕТАБОЛИТИ У КАРДИОВАСКУЛАРНИМ БОЛЕСТИМА**

Кардиоваскуларне болести (КВБ) су још увек водећи узрок морбидитета и морталитета међу свим расним и етничким популацијама човечанства (134). Опште познати, класични фактори ризика за КВБ обухватају породичну склоност, пол, старост, конзумирање дувана, повишен крвни притисак, повишену гликемију, гојазност, недовољну физичку активност, и нарочито повишене вредности холестерола у крви (135, 136). Ипак, већина студија које су проучавале ову проблематику долази до закључка да се само у нешто више од половине случајева КВБ може повезати са присуством неког од поменутих класичних фактора ризика (137, 138). Ово сазнање зато уноси снажну пометњу у научним и медицинским круговима и покреће читаву лавину истраживања усмерених ка утврђивању нових и поузданих фактора ризика за настанак КВБ.

Захваљујући интензивним истраживањима из ове области, у последње две деценије се све већа пажња поклања управо хомоцистеину као новом фактору ризика за развој КВБ. Бројне епидемиолошке студије су показале висок степен повезаности између хиперхомоцистеинемije и повишеног ризика за настанак КВБ, чиме су промовисале хомоцистеин као новог и независног фактора ризика ових болести (139-142). Најновија истраживања, међутим, истичу да се позиција хомоцистеина у етиопатогензи КВБ још увек са сигурношћу не може потврдити, тако да смо склонији да га, бар за сада, посматрамо и као узрочника (141-143), и као последицу (144-146) или све више маркера КВБ (147-149).

Све је почело 1933. године када су доктори Опште болнице у Масачусетсу, САД, представили случај ментално ретардираног дечака са хиперхомоцистеинемijом који је умро од срчаног удара, и публиковали то у часопису *New England Journal of Medicine* (150).

Тридесетак година касније (1964.), Mudd и сарадници проналазе повезаност између тромбоемболиских болести и недостатка CBS, такође код ментално

ретардираних пацијената (151).

Неколико година потом (1969), др Kilmer McCully са Харвард Универзитета, први описује васкуларне поремећаје пацијената са хиперхомоцистеинемом, указујући на појаву пролиферације васкуларних глатких мишићних ћелија, прогресивне артеријске стенозе и хемодинамске поремећаје (152). Сазнања др McCully-ја се и данас сматрају прекретницом и полазном основом у `хомоцистеинској` теорији развоја атеросклерозе.

1976. године Wilcken и Wilcken публикују прву клиничку студију која повезује поремећаје метаболизма хомоцистеина и појаву коронарне артеријске болести, подржавајући McCully-јеве постулате (153).

Након тога, наредних тридесет година почиње интензивно испитивање утицаја хомоцистеина на разноврсне кардиоваскуларне поремећаје, па не чуди да након свих сазнања, недавно бива проглашен за `холестерол 21. века` (154), што довољно говори о његовом значају у поменутиим клиничким ентитетима.

У свим студијама последњих деценија, сазнања о улози хомоцистеина у развоју КВБ добијају нову научну ширину и откривају нова питања. Ипак, у већини од њих се као лајт-мотив провлачи хипотеза да хомоцистеин заиста може, независно од других фактора ризика, указивати на разноврсне кардиоваскуларне поремећаје (155), од којих ћемо се у даљем току излагања задржати на најзначајнијим.

### **1.3.13. ХОМОЦИСТЕИН И (ДИС)ФУНКЦИЈА ЕНДОТЕЛА**

Обзиром да ендотелна дисфункција представља полазни и вероватно кључни догађај у раном развоју КВБ, испитивање утицаја хомоцистеина на васкуларну функцију је свакако први корак у утврђивању комплексне везе између хомоцистеина и КВБ и може бити од суштинског значаја.

Термин `ендотелна дисфункција` се односи на поремећај физиолошке функције васкуларног ендотела, што подразумева ендотел-зависну регулацију васкуларног тонуса, хемостазе и инфламације (156). Управо због тога, немогућност одржавања адекватне дилатације крвних судова је најчешћи начин манифестације ендотелне дисфункције и увод у настанак нежељених кардиоваскуларних догађаја (нпр. инфаркта миокарда) (157).

И заиста, број истраживања која указују на повезаност хиперхомоцистеинемом и поремећене функције ендотела је у константном порасту (158-160). Студије на анималним моделима показују да повишене вредности хомоцистеина доводе до убрзаног развоја ендотелне дисфункције код мишева (161, 162). То потврђују и испитивања на људима где је забележен негативан утицај хиперхомоцистеинемом на

ендотел-зависну вазодилатацију (163), односно побољшање исте након терапије снижења хомоцистеина (164, 165).

Ипак, и поред тога што повезаност *de facto* постоји, тачан механизам насталих промена је још предмет научне дебате и даљих истраживања. Један од најчешће помињаних механизма којим хомоцистеин ремети функцију васкуларног ендотела се односи на продукцију реактивних кисеоничних врста (ROS) током своје оксидације (због високо реактивне SH групе) (166). Наиме, у циркулацији овај тиол подлеже брзој сулфхидрилној аутооксидацији што доводи до генерисања ROS-а, пре свих супероксид анјон радикала и водоник пероксида. Ови молекули потом ступају у интеракцију са азот моноксидом (NO) резултујући у стварању пероксинитрита (ONOO<sup>-</sup>) и тиме смањујући биорасположивост NO. Такође, будући да је пероксинитрит један од најштетнијих ROS, може да изазове директна оштећења ендотела што додатно компромитује ендотелну функцију. На тај начин долази до поремећаја NO-зависног пута вазодилатације крвних судова (167). Ову хипотезу су доказале експерименталне студије *in vitro* на културама ендотелних ћелија (168), као и бројна анимална истраживања користећи фармаколошки (169) или генетски приступ (170).

У прилог овој теорији говоре и студије у којима се истиче значај суплементације фолне киселине у циљу побољшања функције ендотела код пацијената са хиперхомоцистеинемијом и анамнезом КВБ (171). Могуће објашњење овог позитивног утицаја фолне киселине је да њена активна форма, 5-MTHF, поред смањења производње супероксид анјон радикала, има улогу у његовој директној неутрализацији, што све заједно смањује могућност овој штетној кисеоничној врсти да реагује са NO и да му ремети биорасположивост (172).

Други потенцијални механизам којим хиперхомоцистеинемија изазива дисфункцију ендотела подразумева инхибицију стварања NO-а под утицајем асиметричног диметиларгинина (ADMA), ендогеног инхибитора ендотелне азот моноксид синтазе (eNOS) (173). Високи нивои ADMA су забележени на моделу хиперхомоцистеинемије код примата (173). Код људи, нагли пораст концентрације ADMA настаје након акутног оброка метионином, што је повезано са поремећајем NO-зависне релаксације код ових пацијената (174). Узрок пораста вредности ADMA може бити смањење његовог катаболизма од стране диметиларгинин диметиламинохидролазе (DDAH) чија се концентрација увећава током хиперхомоцистеинемије (175).

Као нови и мање проучавани разлози ендотелне дисфункције под утицајем хомоцистеина се наводе и оштећење ендоплазматског ретикулума ендотелних ћелија (176), стимулација проинфламаторних процеса (171) и поремећај метилације регулаторних ћелијских протеина као што је Ras (177). Заједничка одлика свих ових

дејстава хомоцистеина је да резултују у активацији ћелијских процеса који воде у смрт ћелије.

### **1.3.14. ХОМОЦИСТЕИН У ПАТОГЕНЕЗИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ И АТЕРОТРОМБОЗЕ**

#### 1.3.14.1. Историјски преглед

Прва сазнања о потенцијалној улози поремећеног метаболизма аминокиселина у развоју атеросклерозе се јављају двадесетих година прошлог века. 1922. године Newburgh-а и коаутори (178) доказују настанак атеросклеротских промена код зечева третираних храном богатом животињским протеинима и дају прве предлоге о могућој `протеинској` теорији атеросклерозе.

Будући да је хомоцистеин идентификован неких десетак година касније (11), ови истраживачи не успевају да открију која аминокиселина може да буде најзначајнија у овом процесу.

Скоро две деценије након пионирског подухвата Newburgh-а и сарадника, Meeker и Kesten такође на моделу зеца доказују повезаност сојине протеинске исхране и казеина са настанком атеросклерозе (179).

Нешто касније (1966), Lofland и коаутори (180) долазе до сличних сазнања на у истраживањима на голубовима да би коначно 1969. McCully (181) поставио темеље `хомоцистеинске` теорије атеросклерозе на којима се и данас граде сва савремена знања овог просеца. Ова теорија објашњава атерогене и тромбогене утицаје хиперхомоцистеинемичке, узроковане дефицитом витамина Б6 код мајмуна, као и сличне ефекте добијене на пацовима.

Бројне епидемиолошке студије након тога, па до данашњих дана (182-187) потврђују ову теорију и установљавају хомоцистеин као независни фактор ризика за развој атеросклерозе.

#### 1.3.14.2. Главни молекулски механизми

Атеротромбоза представља комплексни и хронични патофизиолошки процес који започиње оштећењем ендотелних ћелија, наставља се пролиферацијом глатких мишићних ћелија и стварањем атеросклеротских плакова, да би кулминирао руптуром истих и формирањем надовезујућег тромба (188-190). Депозити холестерола, инфилтрација моноцита, пролиферација и миграција глатких мишића као и стварање макрофага испуњених холестеролом (пенасте ћелије) су главне карактеристике атеросклеротских лезија (191). Стварање тромба не месту руптурираног атеросклеротског

плака је уводни догађај у оклузију крвног суда и инфаркт ткива (192).

Анималне и хумане студије наводе да је апоптоза ендотелних ћелија главни догађај у настанку атеросклеротских лезија (193-194). Према овим истраживањима, већина апоптотичних ћелија се запажа у и око централног липидног језгра плака (193, 194). Апоптотичне ћелије повећавају ризик од пуцања плака, јер смањују број глатких мишића неопходних за продукцију колагена који има улогу у стабилизацији фиброзне капе плака.

Као што смо раније објаснили сматра се да хиперхомоцистеинемија, већ описаним механизмима (166-170, 173), може довести до апоптозе ендотелних ћелија узрокујући дисфункцију овог метаболички изузетно активног и важног слоја крвног суда, што на крају чини изванредну базу за настанак атеросклеротског плака (195, 196). Директна узрочна повезаност повишеног нивоа хомоцистеина и повећане склоности ка развоју атеро(тромбо)склерозе је показана на моделу аполипопротеин Е нокаут мишева којима је хиперхомоцистеинемија или индукована исхраном или генетски детерминисана (197, 198). Такође, накнадна суплементација ових мишева фолном киселином или витаминима Б комплекса смањује нивоа хомоцистеина и склоност ка атерогенези (198).

Према најновијим литературним подацима, хиперхомоцистеинемија учествује у формирању атеросклеро(тромбо)тских промена крвних судова потенцирајући: 1) инфламацију, 2) оксидациони стрес, 3) поремећај хемостазе, 4) пролиферацију глатких мишића.

#### 1.3.14.2.1. Инфламација

Познато је да инфламација представља један од кључних процеса у отпочињању атеротромботских процеса на зиду крвног суда (188-190). Са друге стране, студије на ћелијским културама су управо показале да хомоцистеин може индуковати продукцију неколико важних про-инфламаторних цитокина. Наиме, културе ендотелних и мишићних васкуларних ћелија, као и моноцита које су третиране хомоцистеином, почињу са експресијом моноцитног хемотаксичног протеина 1 (МХП-1) (200, 201). МХП-1 повећава афинитет везивања моноцита за ендотел, и њихово позиционирање у субендотелни слој, што је круцијални корак у стварању атеросклеротских лезија.

Поред тога доказано је да хомоцистеин може да узрокује повећану продукцију интерлеукина 8 (IL-8), про-инфламаторног цитокина који омогућава хемотаксију Т-лимфоцита и неутрофилних леукоцита за ендотел (200).

Претпоставља се да механизам којим хомоцистеин индукује експресију МХП-1 и IL-8, укључује NF- $\kappa$ B сигнални пут. NF- $\kappa$ B је познат као транскрипциони фактор који стимулише генерисање цитокин, хемокина, леукоцитних адхезионих молекула и

хематопоетских фактора раста - који сви иначе доприносе васкуларном запаљењу и атерогенези (188-190).

Последња истраживања на аполипопротеин Е дефицијентним мишевима, потврђују да NF- $\kappa$ B, у условима хиперхомоцистеинемije, посредује у синтези про-инфламаторних цитокина и започињању инфламације ендотела са последичним развојем атеросклерозе (201, 202).

#### 1.3.14.2.2. Оксидациони стрес

Као што смо раније поменули, обзиром на постојање слободне SH групе, хомоцистеин се сматра вероватно једном од најреактивнијих аминокиселина, што му омогућава да између осталог, врло лако може да оксидује и продукује ROS (203). На тај начин индуковање оксидационог стреса предаставља мајоритетни механизам којим хомоцистеин директно оштећује васкуларни ендотел (166-170).

Наиме, доказана је склоност тиола да својом аутооксидацијом дају кисеонична једињења: супероксид анјон радикал ( $O_2^-$ ), хидроксилни радикал (OH $\cdot$ ) и водоник пероксид ( $H_2O_2$ ) (166, 167). Аутооксидација хомоцистеина у присуству металних јона омогућава транспорт два електрона на молекул кисеоника. Настали супероксид и тиол радикал су интермедијери у овој оксидоредукцији, са крајњим производом, водоник-пероксидом. Директно токсично дејство супероксид анјон радикала, се огледа у његовој склоности ка оксидацији липопотеина мале густине (ЛДЛ), односно утицају на повећано преузимање ЛДЛ честица од стране ћелија »чистача«. Ово је главни предуслов за настанак пенастих (foam) ћелија (168-170).

Ендотелна цитотоксичност хомоцистеина може бити супримирана дејством NO-а, као »релаксирајућег фактора«, кога производи ендотел. Хомоцистеин и NO интерагују под физиолошким условима, дајући S-нитрозохомоцистеин (204). Оба једињења и S-нитрозоцистеин, имају значајна вазодилататорна и антиагрегацијска својства. Показано је да директно, тренутно дејство хомоцистеина нема ефекта на агрегациона својства тромбоцита, али ако је инкубација продужена, агрегациони процес се убрзава. Разлог ове појаве је вероватно у постепеном пражњењу пула NO-а. Уколико процес оштећења ендотела узме маха, на располагању је све мањи број ендотелних ћелија које могу да продукују NO, а то омогућава да цитотоксични ефекат хомоцистеина у функцији времена све више долази до изражаја (204).

Ипак, ова већ добро позната хипотеза не успева да објасни зашто цистеин, који је у плазми присутан у далеко већим концентрацијама од хомоцистеина (и који је такође способан за аутооксидацију), не изазива оштећење ендотелних ћелија и није уврштен међу нове факторе ризика за развој КВБ (205)? Са друге стране, тиолна група омогућава

хомоцистеину да се понаша као антиоксидант, што су и показале неке студије (206). Поред тога, транс-сулфурациони пут метаболизма хомоцистеина игра кључну улогу у одржавању интрацелуларних депоа глутатиона, што је од фундаменталног значаја у функционисању антиоксидационог ендогеног заштитиног система (207, 208). Очигледно је да су за потврду и/или објашњење ових претпоставки потребна даља и свобухватнија истраживања, којих у овом тренутку још увек нема, мада је свакако и већ сада јасно да је умешаност хомоцистеина у процесу атерогенезе веома комплексна и обухвата суптилне поремећаје његовог метаболизма и интеракције са многобројним молекулима.

Ови подаци указују да оксидациони стрес који индукује хомоцистеин не мора да потенцира атерогенезу искључиво путем аутооксидације. Бројне *in vivo* студије, користећи васкуларна ткива, сугеришу да хиперхомоцистеинемича доводи до поремећаја васкуларне релаксације, стварањем  $O_2^-$  (209, 210).  $O_2^-$  потом реагује са ендотелним NO, резултирајући у формирању ONOO<sup>-</sup>, што у крајњем, поред целуларних оштећења, ремети адекватну вазодилатацију (211).  $O_2^-$  и ONOO<sup>-</sup> оштећујући ћелијске мембране, узрокују формирање липидних пероксида и, у случају ONOO<sup>-</sup>, синтезу протеина, путем нитрације тирозина и последичним стварањем 3-нитротирозина.

Хомоцистеин може такође умањити и антиоксидациони потенцијал ендотелних ћелија. Недавна истраживања су показала да ендотелне ћелије третиране хомоцистеином имају оштећену експресију хем-оксигеназе 1 (НО 1) и глутатион преоксидазе (GPx) што битно редукује њихов антиоксидациони капацитет (212). Ова сазнања могу бити изузетно важна управо са становишта развоја атеросклерозе, обзиром да је доказано да: 1) хиперхомоцистеинемича погоршава васкуларну дисфункцију код GPx-нокаут мишева (170), 2) повећана експресија GPx успева да ублажи ендотелну дисфункцију изазвану хомоцистеином (213), и 3) повећана експресија НО 1 инхибира развој атеросклерозе код апоЕ-дефицијентних мишева (214).

Још један од потенцијалних оксидационих механизма путем кога хомоцистеин нарушава грађу и функцију ендотела, подразумева тзв. `оксидациони стрес` или оксидационо оштећење ендоплазматског ретикулима (ЕР). Претходне студије су известиле да повећани интраћелијски нивои хомоцистеина доводе до активације сигналног пута који стимулише производњу ЕР `стресних` гена (GRP78, GRP94, Нерп, и RTP), чиме индукује оштећење ЕР (215, 216). Даље, хомоцистеин може узроковати и повећану експресију про-апоптоличких гена, као што су ДНК оштећујући ген 153 (GADD153) (217) и цитотоксични Т-лимфоцитни ген 51 (TDAG51) (195), који заједно воде у неповратно оштећење ћелије.

Ранија истраживања су поврдила апоптолички ефекат хомоцистеина, путем



индукције тзв. 'unfolded protein response' (UPR) сигналног пута, који је укључен и у оштећење самог ER (218). Хомоцистеин тиолактон као токсични облик хомоцистеина може узроковати апоптозу ендотелних ћелија активацијом фамилије 3 каспаза (219), док још увек нема доступних података о сличном ефекту хомоцистеина.

Поред апоптозе, хомоцистеин може довести и до раздвајања (раслојавања) ендотелних ћелија посредством специфичних процеса (220). Наиме, хомоцистеин, али и цистеин доводи до губитка адхезионих способности ћелија чиме убразава процес апоптозе (221). Слични налази се могу добити третирањем трофобласта патофизиолошким концентрацијама хомоцистеина, где долази до бубрења и вакуолизације ових ћелија (222). Сматра се да раздвајање (губитак адхезије) ендотелних ћелија под утицајем хомоцистеина, може настати индукцијом TDAG51 фамилије гена, што је недавно доказано на АпоЕ-нокаут мишевима код којих је стимулација експресије ове фамилије гена изазвала атеросклеротске промене на терену хиперхомоцистеинемije (195). Међутим, за расветљавање прецизне улоге ове фамилије гена у атерогенези је потребно спровести даља истраживања.

#### 1.3.14.2.3. Поремећаји хемостазе

Васкуларни ендотел у физиолошким условима поседује анти-агрегациона и анти-каогулацион својства, те представља не-тромбогену површину захваљујући гликозоаминогликан-антитромбин III и тромбомодулин-протеин C сигналним путевима (223), затим синтези активатора плазминогена (224), и инхибицији активације тромбоцита од стране простациклина и NO-а (225). Одржавање fine равнотеже између прокоагулатних и антикоагулантних фактора је, дакле кључно у одржавању васуларне хемостазе. Постоје докази да хомоцистеин може да наруши овај баланс и потенцира тромбогенезу.

На моделима ендотелних ћелија хумане умиликалне вене и говеђе аорте је показано да након третмана хомоцистеина долази до повећане активности фактора V коагулације. Сматра се да хомоцистеин може да стимулише ендотелни активатор фактора V и започне каогулацију и независно од присуства тромбина (226). Хомоцистеин остварује своја про-коагулантна својства и инхибицијом физиолошких антикоагулацијских процеса. Третман аортних ендотелних ћелија свиње хомоцистеином редукује експресију гликозоаминогликана сличних хепарину на површини ових ћелија чиме их чини подесним за везивање тромбоцита (227). Ова сазнања су потврдиле и клиничке студије које су забележиле повезаност високог нивоа хомоцистеина и редуковане функције антитромбина III (228).

Поред тога, студије на културама хуманих и говеђих ендотелних ћелија су

показале да излагање хомоцистеину, смањује активност тромбомодулин-протеин С сигналног пута, механизмима који вероватно укључују компетитивну инхибицију хомоцистеина и тромбина према тромбомодулину (229). Други аутори, пак, наводе да хомоцистеин може директно и иреверзибилно да инхибира и тромбомодулин и протеин Ц (230). У прилог овоме иду и *ex vivo* студије на аорти мајмуна, код којих је забележена 35% мања активност тромбомодулин-протеин Ц сигналног пута након хиперхомоцистеинемije изазване исхраном (231).

Још један од начина којима хомоцистеин изазива поремећаје физиолошког стања хемолитичких молекула, се односи на оштећење процеса фибринолизе. Истраживања на ћелијским културама су забележила да инкубација ендотелних ћелија хомоцистеином доводи до дозно-зависног смањења активности активатора ткивног плазминогена (232). Познато је да липопротеин А омета фибринолизу компетитивном инхибицијом са плазминогеном према фибрину. Хомоцистеин индукује везивање липопротеина А за фибрин и тако редукује активацију плазминогена (233).

Хомоцистеин такође може да делује и на екто АДП-азу, ензим који има улогу у разградњи АТП-а, једног од главних медијатора активације тромбоцита. У студијама на ћелијским културама је показано да хомоцистеин инхибира активност поменутог ензима чиме потенцира везивање тромбоцита за ендотел (234). Још један од штетних ефеката хомоцистеина се огледа у инхибицији продукције простациклина (који имају снажна антиагрегациона и антиинфламаторна својства), али само при изразито високим концентрацијама (235). Смањењем биорасположивости ендотелног NO, хомоцистеин олакшава активацију тромбоцита (236), што је један од штетних дејстава која се у организму често среће код особа са повишеним вредностима ове аминокиселине (237). Код ових особа поред антикоагулационе терапије, контрола агрегације је у значајној мери постигнута и суплементацијом витамина А и Ц, што иде у прилог улози хомоцистеина и слободних радикала у васкуларним поремећајима (237).

Са друге стране, директни ефекти хомоцистеина на тромбоците су још увек нејасни и неусаглашени. Иако су прва истраживања на људима и павијанима показала да хомоцистеин може да поремети кинетику тромбоцита (238), касније студије нису добиле такве резултате (239). McDonald и коаутори су пронашли повећану адхезивност тромбоцита код хомоцистеуричних пацијената (240), док *in vitro* истраживања нису забележила значајну разлику између ових пацијената и контролне групе (241). Ипак, да хомоцистеин чешће испољава про-коагулациона својства, показују *in vitro* студије у којима је хомоцистеин довео до пораста синтезе тромбоксана А<sub>2</sub>, про-тромбогеног молекула и најснажнијег вазоконстриктора у организму (242). Даља истраживања ће свакако донети коначан одговор на питање у којим патофизиолошким стањима и при

којим концентрацијама хомоцистеин почиње да испољава про-тромбогени утицај.

#### 1.3.14.2.4. Пролиферација глатких мишића

Познато је да пролиферација васкуларних глатких мишића представља један од незаобилазних процеса у формирању атеросклеротског плака (243). Хомоцистеин може директно да стимулише овај процес или он настаје секундарно, као последица ослобађања фактора раста након оштећења ендотела под утицајем хомоцистеина (244). Tsaі и сарадници су показали на анималном и хуманом моделу, да хомоцистеин на дозно зависан начин повећава синтезу ДНК глатких мишића, што резултира у њиховој пролиферацији (245).

Целуларни путеви којима хомоцистеин стимулише синтезу ДНК глатких мишића укључују активацију циклин-зависних киназа, што последично узрокује ДНК репликацију (246). Истраживања на пацовима су истакла да постоји висок степен корелације између повећања синтезе тРНК и пролиферације глатких мишића након третмана хомоцистеином (247).

Ефекат хомоцистеина на ДНК ендотелних ћелија је, међутим, супротан (248 283), чиме постаје јасно да истовремено, али обрнуто дејство хомоцистеина на деобу две кључне ћелијске линије крвног суда, може бити врло важан механизам за остваривање атеротромботског потенцијала хомоцистеина.

#### 1.3.14.3. Остали молекулски механизми

Патолошке промене на васкуларном систему, праћене хиперхомоцистеинемijом и хомоцистинуријом се битно разликују од истог типа лезија код дефицита витамина Ц, у коме је смањен оксидативни метаболизам хомоцистеина. Недостатак дехидроаскорбата, потребног за успоравање оксидације хомоцистеина у хомоцистеинску киселину, ремети нормалан ток трансформације хомоцистеина у хомоцистеинску киселину. Хомоцистеинска киселина је прекурсор фосфоаденозин-фосфосулфата, који се конвертују у сулфатне естре, а исти су важни у синтези сулфатизованих протеогликана конективног ткива (249)

Поред овог, хомоцистеинска киселина има и улогу у модулацији дејства хормона раста и дејство на N-метил D-аспартат (NMDA), под тип глутаматног рецептора. Према томе, недовољна количина аскорбинске киселине описаним механизмом води ка повећању кртости конективног ткива и смањењу кохезије ендотелних ћелија зида крвних судова (250). Повећана количина хомоцистеинске киселина би према горе изложеном механизму, могла представљати погодан услов за нормалан процес

сулфурисања протеогликана и одржавање нормалног интегритета васкуларног зида. Прво је објашњено да се повећана хомоцистеинурија јавља уз тешке васкуларне поремећаје, без дефицита витамина Ц. Ово се објашњава карактеристично измењеном синтезом сулфуризованих протеогликана. Ова синтеза у случају када је концентрација хомоцистеина повећана није успорена, али постоје експериментални подаци да се уместо фибриларне форме, ствара глобуларна форма сулфуризованих протеогликана.

Такође културе нормалних ендотелних ћелија при *in vitro* изазваној повећаној експозицији хомоцистеина, почињу да синтетишу поменути измењену форму сулфатизованих протеогликана. На овај процес се надовезује и повећано присуство хомоцистеин тиолактона, чија продукција због хиперхомоцистеинемije такође расте.

Хомоцистеин тиолактон по свему судећи поспешује акумулацију сулфат-богатих протеогликана у облику до сада већ регистрованог метахроматичног материјала. Појава појачане сулфатне естерификације у случају појаве глобуларних сулфатизованих протеогликана се са хемијског аспекта доводи у везу са интеракцијом негативно наелектрисаних протеогликанских остатака.

Они успостављају јонске везе са својим епсилон-амино групама изазивајући конформационе промене, које воде ка успостављању кватернерне структуре глобуларног типа. Кватернерне амонијум групе серумских липопротеина и јони калцијума испољавају логичан афинитет према сулфатним групама протеогликана и улазе у састав атеросклеротичног плака. Електростатички набијени протеоглигани такође инхибирају нормалну регулацију миоинтималних ћелија, што води ка миоинтималној пролиферацији (251).

Постоје и претпоставке о деструктивном дејству хомоцистеина на колаген. Два механизма су укључена у овај процес. Један је поново појачана сулфатација протеогликана која води ка појачаној продукцији колагених влакана. Други механизам се односи на реакцију хомоцистеина и алдехидних група проколлагена у форму тиазолидина, чија појачана продукција значи грађење абнормалног коллагена, због немогућности успостављања нормалних попречних веза између колагених влакана (crosslinks).

Патолошка испитивања после смрти пацијената са тешким облицима хомоцистеинурије показала су тешка оштећења артеријског зида, са упадљивом хиперплазијом интимае, вакуолизацијом и фиброзом. Многобројни тромби, затварају и овако сужен лумен крвних судова (252).

За нарушавање интегритета ендотела поред механизма сулфатације протеогликана, постоји по новим сазнањима и директно токсично дејство хомоцистеина. Експериментално изазвана хиперхомоцистеинемija, код нехуманих примата изазива

деендотелизацију и задебљање интима. Орални метионин тест оптерећења код људи, изазива десквацију ендотелних ћелија, доказану циркулишућом ендотелемијом. Културе зида људске умбиликалне артерије и говеђе аорте, ослобађање креатина под утицајем хомоцистеина, одвајање и лизу ћелија, све знаке цитотоксичности. Инхибирање горе наведених појава каталазом, указује на повезаност цитотоксичног дејства хомоцистеина са дејством ROS (253).

Пацијенти са хомозиготном хомоцистеинуријом имају ране знаке јављања, венских и артеријских тромбоза. Доказано је да хомоцистеин мења баланс између прокоагулантних и антикоагулантних фактора. Селективна инхибиција деловања и секреције тромбомодулина, редукција активације протеина Ц и активација протеолитичког активатора фактора V, су нека од карактеристичних дејстава хомоцистеина.

До краја није разјашњен потенцијални утицај на фонВилебрандов фактор и фактор VII. Детектована је смањена активност антитромбина III, код пацијената са хиперхомоцистеинемијом. Смањено везивање за своје рецепторе и смањена протеолитичка активност ткивног плазминоген активатора је доказана код продужене инкубације хомоцистеина *in vitro* (254). У експерименталним условима, при концентрацији хомоцистеина од 2  $\mu\text{mol/l}$  долази до значајног повећања афинитета липопротеина (a) за фибрин. Овај комплекс може да инхибира плазмин и тако фаворизује тромбозу (255).

### **1.3.15. Специфичности утицаја хомоцистеин тиолактона на атеротромбозу**

Обзиром на доказану токсичност тиолактон облика хомоцистеина у биолошким системима, сасвим је логична претпоставка да би ово једињење могло да оствари штетне ефекте и на ендотелне ћелије и тиме докаже свој атеротромбогени потенцијал.

Хипотеза о атеротромбогеном утицају тиолактона које је формулисана 1997. године (36) наводи да биолошка конверзија хомоцистеина у своју тиолактон форму уствари омогућава хомоцистеину да оствари своје патофизиолошке ефекте. Према овој теорији прелазак хомоцистеина у тиолактон облик представља кључни догађај који ову аминокиселину усмерава на патофизиолошко дејство (256). У прилог овој хипотези иду и сазнања да су вредности тиолактона повишене у стањима предиспонираним за настанак атеротромбозе, као што су мутације CBS и MTHFR гена код људи или метионинска дијета код мишева (257).

Као што је познато бројне студије сугеришу да је тиолактон токсичнији од самог

хомоцистеина у *in vitro* условима (258-260). Главни механизам путем кога тиолактон може имати удела у атерогенези подразумева његову интеракцију са аминокиселинским остацима циркулишућих протеина. Тиолактон као изузетно реактивно једињење може лако да изврши N-хомоцистеинилацију протеина, везујући се за лизинске остатке протеина, што у крајњем ремети функцију протеина (261).

Поврђено је да се овај везани облик тиолактона са протеином (N-Нсу-протеин) налази у хуманим ендотелним ћелијама и фибробластима (36, 261) и да се акумулира у атеросклеротским лезијама мишева (262). Инкорпорација хомоцистеина у протеине (N-Нсу-протеин) може бити окидач за настанак аутоимунских (263) и инфламаторних процеса (264) на васкуларном ендотелу, а њихова улога у атерогенези је несумњива (265). То су потврдиле студије на пацовима (266) које су показале да суплементација хомоцистеин-тиолактона доводи до развоја атеросклерозе.

Као што може да се претпостави, ниво N-Нсу-протеина корелира са укупном концентрацијом хомоцистеина у плазми (267). Тиолактон се може на тај начин везати за готово све циркулишуће облике протеина у плазми, укључујући хемоглобин (Hb), албумин, гамаглобулин, ХДЛ и ЛДЛ липопротеине и фибриноген (268). Управо везивање тиолактона за ЛДЛ и фибриноген представља један од могућих механизма којима тиолактон започиње процес атерогенезе (269).

Везивање тиолактона за фибриноген модификује и ремети функцију фибриногена (270) те тако након суплементације тиолактоном, тромбуси спорије лизирају него у одсуству тиолактона (271), што свакако повећава ризик од тромбозе атросклеротског плака.

Показано је да N-Нсу-протеини могу индуковати аутоимунску реакцију што резултира стварањем IgG аутоантитела усмерених према лизинским епитопима ових једињења. Овакав аутоимунски одговор је такође примећен код пацијената са КАБ, чиме се још више продубила сумња о одређеном ефекту тиолактона на развој атеросклерозе код људи (272). Интересантно да суплементација фолним киселином изазива снижење анти-N-Нсу-протеин аутоантитела, само код контролне групе испитаника, али не и код пацијената са КАБ (273). Ова сазнања на тај начин делом успевају да објасне неуспех витаминске терапије у смањењу компликација код пацијената са инфарктом миокарда (274).

Као што можемо да видимо конверзија хомоцистеина у његову тиолактон форму (поготово у стањима хиперхомоцистеиније) представља један од све важнијих механизма којима ова аминокиселина узима учешћа у развоју васкуларних поремећаја. Због тога хомоцистеин тиолактон, очигледно почиње да заузима све значајније место у испитавњима повезаности поремећаја метаболизма хомоцистеина и КВБ, па се

повећање броја студија са овом тематиком тек очекује.

### 1.3.16. ХОМОЦИСТЕИН У (ПАТО)ФИЗИОЛОГИЈИ МИОКАРДА

Након свега до сада изнетог о утицају хомоцистеина на функцију ендотела и васкуларног система уопште, ствара се логична претпоставка да ни срчани мишић не може да остане заобиђен у овим патофизиолошким процесима. Ипак, истраживања која се баве могућим директним или индиректним ефектима хомоцистеина на миокард, тек последњих година почињу да се интензивирају, тако да су до сада прикупљени подаци још увек оскудни и неконзистентни. Узевши у обзир сву актуелност и клинички значај претходно поменутог, један од основних циљева ове студије је управо да помогне у расветљавању ефеката и механизма којима хомоцистеин утиче на функцију миокарда.

Индиректни ефекти хомоцистеина на срчани мишић могу бити локални и системски и најчешће се одвијају путем: 1) индукције настанка атеротромботичких промена у коронарној циркулацији (275), чиме се смањује адекватна перфузија миокарда (локални индиректни ефекат) и 2) настанком системске хипертензије следећим механизмом: ендотелна дисфункција, васкуларна хипертрофија, атеросклеротске лезије и поремећен вазодилаторни одговор (превага вазоконстрикције) који се јављају у условима хроничне хиперхомоцистеинемije (258-261, 276), доводе до пораста крвног притиска, што уколико перзистира дуже време, узрокује оптерећење притиском (повећање afterload-a) миокарда, његову хипертрофију и последичну слабост (инсуфицијенцију). На тај начин хомоцистеин индиректно, током хроничног периода, преко васкуларних промена, оштећује и функцију самог срца (системски индиректни ефекат) (277).

#### 1.3.16.1. Улога хомоцистеина у морфолошким променама миокарда

Директни ефекти хомоцистеина на миокард су неупоредиво сложенији, али и још увек недовољно испитани. Ипак, као што смо већ напоменули, обзиром на утврђене биолошке механизме хиперхомоцистеинемije на развој васкуларних поремећаја (278), оправдана је сумња да се слични процеси могу пренети и на срчано ткиво.

Студије спроведене последњих година (279, 280) показују повезаност између повишених нивоа хомоцистеина у плазми и промена срчане структуре и функције. Главни патохистолошки супстрат тих промена представља реактивна миокардна фиброза, у виду периваскуларне интерстицијалне фиброзе и ремоделовања коронарних артерија. Ове промене које се повезују са хиперхомоцистеинемijом, на тај начин не ремете само функцију миокарда, *de novo*, већ и потенцирају настанак осталих

патофизиолошких процеса, пре свега хипертензије.

Претпоставља се да је оксидациони стрес доминантни молекулски механизам који доводи до настанка фиброзе миокарда. То су потврдиле студије у којима је забележено да хиперхомоцистеинемија, оксидативним механизмима, узрокује смрт кардиомиоцита и последичну дисфункцију миокарда, након исхемијско-реперфузионе повреде (281).

Хронична хиперхомоцистеинемија несумњиво доводи до развоја миокардне фиброзе и дијастолне дисфункције срца пацова (282). Са друге стране, сматра се да таложeње колагена у миокардном ткиву и прогресија дисфункције срчаног мишића, представљају иреверзибилан процес, који наставља да се одвија и након смањења вредности хомоцистеина (282). На тај начин, једном настале, морфо-функционалне промене на срчаном мишићу се одигравају независно од нивоа ове аминокиселине.

И бројне клиничке студије доносе конзистентне податке. Показано је да хомоцистеин може бити изванредан показатељ систолне и дијастолне срчане слабости током осмогодишњег интервала праћења (283). Недавни извештај из опсежне Фрамингамске студије је указао да постоји висок степен корелације између повишених вредности хомоцистеина и маркера убрзаног метаболизма колагена код пацијената са ехокардиографски потврђеним ремоделовањем леве коморе (284).

Још један од начина на који хомоцистеина може остварити своје директне ефекте на миокард, се огледа у индукцији матриксних металопроотеиназа (MMPs). MMPs припадају фамилији цинк ендопептидаза чија је главна улога у разградњи екстрацелуларних матриксних протеина. Доказано је да екстрацелуларно ремоделовање у КВБ умногоме зависи од MMP-2 и MMP-9 (285). У интактном миокарду MMP су неактивне, док се током хиперхомоцистеинемије запажа њихова повећана активност (286). Управо активацијом MMPs, хомоцистеин може да изазове ендокрдну микроваскуларну ендотелну дисфункцију, иако тачан механизам још увек није утврђен (287).

Хомоцистеин такође може да изазове промене у динамици  $Ca^{2+}$  у различитим ћелијским културама (288). Пораст концентрације  $Ca^{2+}$  активира цитосолне калцијум-зависне цистеинске протеазе (calpain), које доводе до оштећења кардиомиоцита (289). Још увек се са сигурношћу не зна да ли и у којој мери постоји интеракција MMPs и calpain-а (290), међутим потенцијално укрштање ових сигналних путева би могло да има значаја у новим терапеутским перспективима усмереним ка кардиоваскуларном ремоделирању.

#### 1.3.16.2. Улога хомоцистеина у развоју срчаних аритимија



Кардиомиоцити су разгранате, мулитнуклеарне, контрактилне ћелије, повезане тзв. путевима ниског отпора (gap junctions). Ови путеви су изграђени од повезујућих тунела познатих под именом конексини. Шест конексина гради један конексон, канал који повезује плазмалеме два суседна кардиомиоцита, омогућавајући брзи и несметани пролаз акционог потенцијала.

Са друге стране, већ смо напоменули да активација MMPs, у условима хиперхомоцистеинемije, изазива штетно дејство на срчано ткиво, оштећујући екстрацелуларни матрикс. На тај начин, оштећујући, између осталог и gap junctions, MMPs, изазивају сметње у спровођењу импулса између кардиомиоцита, последично доводећи до развоја аритмија (277).

Претходне студије су показале повезаност између разградње миокардног екстрацелуларног матрикса, и настанка атријалне фибрилације и других смртоносних аритмија (291). Ова сазнања се темеље на доказима о постојању позитивне корелације између повећане експресије конексина 43 и развоја аритмија, механизмом који је вероватно посредован MMPs (292). Сматра се да хомоцистеин индукцијом повећаног стварања слободних радикала, активира MMPs, који потом доводе до деградације конексина.

Хомоцистеин изазива поремећаје оксидационог метаболизма у митохондријама кардиомиоцита, путем деловања на неке од кључних оксидационих ензима (NOS, NADPH оксидаза (NOH) и тиоредоксин) (293). Доказано је да смањењем активности eNOS, хомоцистеин може да доведе до повећања срчане фреквенце и развоја аритмија (294).

Показано је да однос колаген/еластин у мишићном ткиву може бити важан за спровођење импулса, а самим тим и за величину срчане фреквенце. Што је овај однос већи, срчана фреквенца је мања и обрнуто (295). Хронична администрација хомоцистеина повећава концентracију колагена у левој комори и доприноси развоју ендокардијалне, перикапиларне и интерстицијалне фиброзе (296) и повећава срчану фреквенцу.

Глутамат као најраспрострањенији ексцитаторни неуротрансмитер, већину своји дејстава остварује везивајући се за глутаматне (NMDA) рецепторе. Поред нервног система, откривено је да се ови рецептори (NMDA-R1) налазе и на кардиомиоцитима (297). Доказано је да активација ових рецептора доводи до повећаног стварања митохондријалних слободних радикала и поремећеног спровођења импулса. Према једној од хипотеза хомоцистеин може да се понаша као агониста NMDA рецептора и да тако повећава фреквенцу рада срца (297).

Већина литературних података која описује улоге и механизме којима

хомоцистеин омета физиолошко спровођење импулса у кардиомиоцитима се, за сада, заснива на моделима *in vitro*. Ипак, ови подаци могу бити изузетно драгоцени за будућа клиничка истраживања, која би омогућила евентуалне нове терапијске смернице у лечењу аритмија.

## **1.4. ГАСОТРАНСМИТЕРИ И ЊИХОВА ФИЗИОЛОШКА УЛОГА У КАРДИОВАСКУЛАРНОМ СИСТЕМУ**

### 1.4.1. Опште одлике

Гасотрансммитери представљају породицу сигналних ендогених молекула гасова или гасовитих сигналних молекула, у које спадају азот моноксид (NO), угљен моноксид (CO) и водоник сулфид (H<sub>2</sub>S). Ови гасовити молекули деле многе заједничке карактеристике у свом настанку и функцији, али делују на јединствен начин, који се разликује од класичних сигналних молекула у људском телу. Прво опажање да гас може директно да делује на ћелијске рецепторе и тиме се понаша као неуротрансммитер, се појавило 1981. године у клиничкој студији која је испитивала ефекте NO аналгезије на хроничан бол код мушкараца (298). Неколико година након тога, *in vitro* експерименти су потврдили ово претпоставку (299).

Критеријуми по којима неки гас може да функционише као "гасотрансммитер" су први пут уведени 2002. године. Да би неки молекул гаса могао да се категорише као "гасотрансммитер", сваки од следећих критеријума мора бити испуњен (300):

- 1) да је мали молекул гаса,
- 2) да слободно дифундује кроз ћелијске мембране, при чему може да испољава и ендокрини и паракрини и аутокрини ефекат,
- 3) да је ендогено и ензимски генерисан и да је његова производња подложна контролним механизмима,
- 4) да поседује прецизно дефинисане и специфичне функције у физиолошки релевантним концентрацијама,
- 5) функције овог ендогеног гаса могу бити замењене његовим егзогено примењеним аналогом,
- 6) његови ћелијски ефекти могу или не морају бити посредовани секундарним гласницима, али морају имати специфичне ћелијске и молекуларне циљеве.

У 2011. години је формирана Европска асоцијација за гасотрансммитере (European Network on Gasotransmitters, ENOG). Задатак ове асоцијације је да промовише истраживања на гасотрансммитерима, у циљу бољег разумевања њиховог биолошког значаја и улоге у здрављу и болестима. Штавише, ово удружење тежи да допринесе

увођењу основних сазнања у овој области истраживања у терапеутске или дијагностичке сврхе.

Да бисмо што боље разумели карактеристике гасотрансмитера, у наставку излагања ћемо сваког од њих (NO, CO, H<sub>2</sub>S) представити засебно.

#### **1.4.2. Специфичне карактеристике азот монооксида (NO)**

Азот моноксид (NO) је свакако прво откривени и до сада најиспитиванији гасотрансмитер. Прва сазнања о NO као сигналном молекулу потичу из радова Robert-a Furchgott-a, који је показао да ацетил-холин не изазива вазодилтацију делујући директно на глатке мишиће крвних судова, већ стимулишући ендотелијум да продукује лако дифузибилну супстанцу, која је најпре названа - *релаксирајући фактор кога секретује ендотел* (endothelial-derived relaxing factor, EDRF), да би потом идентификовано да је заправо реч о NO, чиме добија адекватан и трајни назив (301-303). Друга откривена улога NO као медијатора (пато)физиолошких просеца се односи на активацију макрофага, што је доказано на многим *in vitro* студијама (304).

О каквом је круцијалном молекулу реч, довољно говоре подаци да је у избору часописа *Science*, 1992. године изабран за 'молекул године', као и да је основано удружење за азот моноксид (*Nitric Oxide Society*) и њихов званични часопис (*Nitric Oxide: Biology and Chemistry*). 1998. године, Ferid Murad, Robert Furchgott, и Louis Ignarro су поделили Нобелу Награду за Физиологију и Медицину за откриће NO-a. Salvador Moncada такође учествује у најзначајнијим открићима везаним за NO, међутим остаје ускраћен за Нобелову Награду због одлуке Одбора да је максимално три научника могу добити. NO продукује фамилија ензима позната под називом азот моноксид синтазе (Nitric oxide synthases, NOSs), из семи-есенцијалне аминокиселине L-аргинина. До сада су идентификоване три изоформе NOS: две конститутивне, ендотелна NOS (eNOS) и неуронална (nNOS)) и једна индуцибилна NOS (iNOS) (305). Иначе, недавно је откривена и четврта изоформа ових ензима-бактеријска NOS (bNOS), за коју се сматра да се налази у *Bacillus anthracis*-у и *Staphylococcus aureus*-у (306).

eNOS (NOS3) генерише NO у ендотелу крвних судова и кодирана је геном на хромозому број 7 (305). nNOS (NOS1) производи NO у централном и периферном нервном систему, и кодирана је геном на хромозому број 12 (305). Конститутивне NOS су зависне од Ca<sup>2+</sup>-калмодулин система, за разлику од iNOS (NOS2), која учествује у имунском и инфламаторном одговору (макрофаги), и нарочито је активна у 'оксидативном окружењу'. Продукција NO, у тој средини, представља изврстан терен за iNOS је кодирана геном на хромозому број 17 (305). NOSs припадају строго контролисаним ензимским врстама. Њихове оксидационе функције се одвијају

посредством FAD (флавін аденин динуклеотида), FMN (флавін моноклеотида), и BH<sub>4</sub> (тетрахидробиоптерина), који се могу фосфорилисати бројним серин-киназама (307).

NO представља један од најутицајнијих и самим тим најзначајнијих молекула у људском организму, са широким спектром важних физиолошких функција, које се током година проширују и откривају нове. NO је неизоставни медијатор многобројних процеса у кардиоваскуларном, нервном и имунском систему. Његова круцијална функција у КВС, вазодилатација, је основа регулисања васкуларног тонуса, чиме је укључена у одржавање хомеостазе екстрацелуларног волумена течности, крвног притиска, ерекције (308). Процес вазодилатације започиње индукцијом производње NO од стране eNOS у ендотелу крвног суда, под утицајем ацетил-холина, цитокина и shear stress-a. NO потом дифундије у глатке васкуларне мишићне ћелије, где реагујући са солубилном гуанилил-циклазом (sGC), генерише стварање cGMP-a. Солубилни cGMP затим активира протеин киназу G (PKG), која са своје стране фосфорилизује бројне протеине укључене у регулацију Ca<sup>2+</sup>, активност јонских канала и актинских и миозинских филамената, што све заједно резултира у релаксацији глатког мишића односно вазодилатацији (308) (Слика 5).

Са друге стране, неуротрансмитерска улога NO се огледа у његовој улози у редокс сигнализацији између нервних ћелија централног и периферног нервног система. За разлику од већине неуротрансмитера који само преносе информацију са пресинаптичког на постсинаптички нервни завршетак, NO, обзиром да је у гасовитом стању и лако дифундује кроз мембране, може да функционише и у супротном смеру. То значи да може да преноси информацију и на неуроне који нису у синаптичким везама, али пошто му је време полу-живота кратко, његова активност је ипак временски ограничена. Такође је откривено да је NO-cGMP сигнални пут укључен у процесе учења и памћења активацијом посебног типа сигналне трансдукције тзв. продужене потенцијације (309).

Међу осталим значајним физиолошким функцијама NO-а треба поменути да је он изузетно важан не-адренергички и не-холинергички неуротрансмитер различитих делова гастро-интестиналног тракта (ГИТ), а његов доминантни ефекат се огледа у релаксацији глатких мишића ГИТ-а (310).

Све већа пажња се посвећује испитивању директних ефеката NO-а на срце. До сада је откривено да NO смањује контрактилност миокарда и срчану фреквенцу, док је његова улога у настанку КАБ већ одавно позната (311).

Као што је већ напоменуто NO секретован од стране макрофага, представља и врло реактиван слободни радикал, који као такав учествује у оксидационим имунским процесима, што ће бити изложено у наставку Увода.

Поред већ поменутих сигналних путева NO-а, постоје бројни други, изузетно комплексни, који су предмет многобројних истраживања. Показано је да NO, може директно да утиче на ћелијско снабдевање енергијом, молекуласком конкуренцијом са  $O_2^-$  за цитохром C оксидазу, онемогућавајући оксидацију овог ензима и редукујући  $O_2^-$  до воде (312).

Са аспекта нашег истраживања је важно истаћи да је NO изузетно реактиван према једињењима која садрже слободну SH групу. Студија Stamler-а и сарадника је показала да NO може да изврши нитрозилацију бројних SH протеина (313). Нитрозилацијом аргиназа, NO повећава афинитет овог ензима за аргинин преко шест пута, чиме доприноси повећаној разградњи ове аминокиселине (која је неопходна за синтезу NO-а), и последично смањује своју биорасположивост (314). Занимљиво је да је повећана активност аргиназе пронађена код старих пацова са ендотелном дисфункцијом (314), што потврђује значај овог процеса.

NO такође може директно да утиче на биосинтезу D-серина, који је ко-агонист глутамату за NMDA рецепторе (315). Овај ефекат NO се остварује нитрозилацијом серин рацемазе (чиме јој смањује активност) која конвертује L-серин у његову D форму.

Многи ефекти нитрозилације имају све већи клинички значај. Нитрозилација рианодинских рецептора (RyR), који функционишу као калцијумски канали, нарочито у срчаном ткиву, ремети динамику  $Ca^{2+}$  нарочито током систоле срчаног циклуса, што резултира у поремећају ћелијске надражљивости и настанку аритмија (316).

Бројни цитоскелетни протеини су регулисани управо процесом нитрозилације. Нитрозилација микротубул-везаног протеина-1B (MAP1B) који је укључен у процес неуронске миграције, је пронађена у неуролошким поремећајима, као што је `фрагилни X синдром` (317).

Овај процес такође може бити укључен и у одвијање апоптозе. Наиме, активацијом iNOS долази до продукције NO који нитролизацијом гликолитичког GAPDH ензима, серијом каскадних процеса започиње апоптозу (318). Већ смо поменули да MMPs могу да узрокују апоптозу. Управо њиховом нитролизацијом долази до апоптозе нервних ћелија, што је примећено код током церебралне исхемије (319)

Нитрозилацијом COX-2 ензима, NO се укључује и у инфламаторне процесе (320). Током инфламације, NO секретован од стране iNOS, се везује за COX-2 и повећава његову активност, што у крајем, производњом простагландина, појачава имунски одговор (320). Потенцијална супресија интеракције ова два система (iNOS/COX-2) би у перспективи могла да има велику корист у новом терапијском приступу сложених и перзистентних инфламаторних стања.

### 1.4.3. Специфичне карактеристике угљен монооксида (CO)

Открићем да CO може да делује као неуротрансмитер, настаје, слободно се може рећи, права револуција у медицини, обзиром на сва добро позната изузетно штетна дејства овог гаса на људски организам (321). 1993. године се појављује први рад који указује да CO може имати улогу неуротрансмитера и од тада интересовање научне јавности драматично расте ка испитивању биолошких функција овог гаса у организму (322). Најновија открића су доказала да CO представља врло важан сигнални молекул са бројним функцијама које се још увек истражују. Физиолошке карактеристике CO су умногоме сличне NO.

У организму, CO настаје током процеса разградње хемоглобина, из хема дејством ензима хем-оксигеназе 1 и 2 (HO 1, 2). Аналогно NOS-ама, HO такође могу имати индуцибилну (HO 1) и конститутивну форму (HO 2). У физиолошким условима HO 1 разграђује прстен хема до биливердина, при чему се ослобађа CO. Показано је да HO 1 продукцијом CO испољава антиинфламаторни ефекат двоструким антагонистичким дејством, инхибирањем продукције про-инфламаторних, и стимулацијом продукције анти-инфламаторних цитокина (323).

Слично NO-у, CO узрокује вазодилатацију и може имати друга корисна дејства у кардиоваскуларном систему (324). Студије су указале да је овај гас, спречавањем пролиферације глатких мишића, превенира развој атеросклеротских плакова (324). Поред тога, CO може побољшати ендотелну (дис)функцију, редукцијом вазоконстрикције и стабилизацијом индуцибилног фактора хипоксије 1 $\alpha$  (HIF 1 $\alpha$ ), што доводи до цитопротекције (325).

Баш као и конститутивне форме NOS, конститутивни HO 2 је активиран од стране калцијум-калмодулин система (326), док фосфорилацијом повећавају своју активност (327). Уопштено гледано CO има бројне функције које су агонистичке NO-у. Тако је HO 2, аналогно eNOS, локализован у ендотелу крвних судова, и продукује CO који изазива последичну вазодилатацију, механизмима који још увек нису довољно познати (328). HO 2 се такође налази у многим неуронским комплексима (329) и у мијентеричном плексусу ГИТ-а, где посредује у нон-адренергичкој и нон-холинергичкој неуротрансмисији (330).

Сигнални путеви CO-а су слични NO-у, али ипак још увек недовољно истражени. CO такође делује преко гуанилил-циклазе (sGC), узрокује стварање cGMP-а и последичну релаксацију глатких мишића (Слика 5). Међутим у *in vitro* условима NO поседује већу способност активације sGC, у односу на CO (331). Истраживања на мишевима са генетском делецијом HO 2, су показала да је активација cGMP-а смањена у истом проценту као и код мишева са делецијом iNOS (332). Везивање CO-а за хем

групу представља један од битних процеса којим овај гасотрансмитер може да утиче на бројне ћелијске функције, поготово на транскрипцију.

Активација транскрипционих фактора може бити регулисана, везивањем CO-а за хем. Мушице рода *Drosophila*-е на свом једру садрже рецептор под именом E75 који садржи хем простетичку групу. Оксидо-редукција овог рецептора регулише његову транскрипциону активност. Управо везивање CO, али и NO за хем групу поменутог рецептора мења његову активност, а самим тим и процес транскрипције (333).

Неуронални рAS протеин 2 (NPAS2) је још један транскрипциони фактор заступљен у ћелијама сисара који се везује за ДНК. Везивање хем групе за овај фактор регулише везивање истог за ДНК. Показано је да у малим концентрацијама CO, везивањем за хем групу NPAS2, може да инхибира везивање ДНК за наведени фактор и тиме такође утиче на процес транскрипције (334).

#### 1.4.4. Специфичне карактеристике водоник сулфида (H<sub>2</sub>S)

Све док нису откривене његове улоге као сигналног молекула, за H<sub>2</sub>S се као и за CO, дуго времена сматрало да у организму остварује само штетна дејства. Од раније је познато да је овај гас токсичан за многобројне органске системе пре свега за нервни систем. H<sub>2</sub>S се везује за цитохромне ензиме митохондрија, чиме инхибира ћелијску респирацију (335).

У организму се H<sub>2</sub>S ствара транс-сулфурацијом аминокиселина L-цистеина и/или хомоцистеина, дејством три ензима: цистатион-γ-лиазе (CSE), цистатион-β-синтазе (CBS) и 3-меркаптопируват сулфуртрансферазе (3MST) (336). У погледу наше студије, очигледна, али недовољно истражена повезаност између хомоцистеина и H<sub>2</sub>S, свакако постоји и може бити веома значајна за откривање комплексних интеракција за које сумњамо да леже у основи многобројних ендотелних поремећаја.

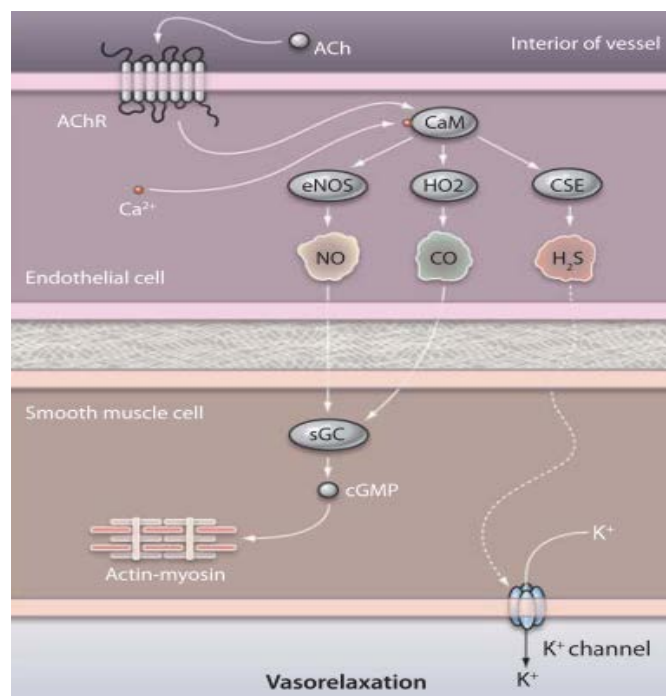
CSE је доминантно активан у КВС (аорти, плућној артерији, мезентеричној артерији, портној вени) (337), док CBS своју активност остварује у нервним ткивима (338). У другим органима, као што су јетра и бубрези, поменути ензими удружено делују у продукцији H<sub>2</sub>S (339).

Сигналне физиолошке функције H<sub>2</sub>S-а се још увек проучавају, али је већ сада познато да су она јако слична CO-у и NO-у. То се пре свега мисли на изражено вазодилататорно дејство H<sub>2</sub>S-а, коме у прилог иду и сазнања о присуству CSE у ендотелу крвних судова (337).

Ипак, студије на анималним моделима су показале да овај гасотрансмитер може узроковати и вазоконстрикцију (340). Сматра се да ефекат H<sub>2</sub>S-а на тонус крвног суда зависи од његове концентрације, на коју може значајно да утиче процес оксидације

коме овај гас у организму подлеже (340). У поменутој студији, егзогено апликовани  $H_2S$ , је изазвао фазични одговор крвног суда у виду почетне констрикције, коју је пратила релаксација (20-30 минута), након чега је дошло до секундарне констрикције (340).

Механизам вазодилаторног дејства  $H_2S$ -а није са сигурношћу познат. Иако постоје сазнања да, као и остала два гасотрансмитера, активира спрегу sGC-cGMP и тако релаксира глатке мишиће крвног суда (341), данас има више присталица мишљења да  $H_2S$  изазива вазодилатацију преко активације АТР-зависних калијумових канала (Слика 5) (342). Претпоставља се да бројна дејства  $H_2S$  остварује процесом сулфхидрације, аналогно нитролизацији NO-а. И док нитролизацијом протеина долази, углавном до њихове инхибиције, сулфхидрација изазива супротан ефекат (343).



Слика 5. Вазорелаксација посредована гасотрансмитерима у физиолошким условима

## 1.4.5. ИНТЕРАКЦИЈЕ ИЗМЕЂУ ГАСОТРАНСМИТЕРА

### 1.4.5.1. Интеракције између NO и CO система

Обзиром на многе подударности у продукцији и функцији NO и CO, логично је очекивати да међу њима постоји интеракција. У васкуларној мрежи, CO изазива вазодилатацију (331), активирајући исти систем секундарних гласника (sGC-cGMP), као и NO (331). NO селективно индукује експресију NO 1 гена и последичну продукцију CO у крвним судовима (344). Способност NO да стимулише генерисање CO-а, представља потенцијални алтернативни механизам којим NO активира sGC и доводи до релаксације васкуларних глатких мишића.

Занимљиво је да CO директно инхибира активност iNOS, везујући се за овај



ензим. То указује да CO може да делује и цитопротективно, тиме што ограничава претерану синтезу NO-a, који укључујући се у реакције са слободним радикалима изазива оксидациона оштећења (344).

Олфакторни неурони не показују NOS активност, али зато посредством NO 2 продукују значајне количине CO (345). Такође, у *in vitro* условима је показано да NO инхибира активност NOS и смањују нивое cGMP у присуству NO-a (345). 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-a и тако да му редукује активност, а самим тим и продукцију NO-a (346). 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 (347). Потенцијално објашњење овог наизглед парадокса може да се пронађе у чињеници да NO као, између осталог, врста слободног радикала, везивањем за цистеинске остатке, индукује NO-1 експресију, док измештањем O<sub>2</sub><sup>-</sup> из хем групе, инактивира NO (346).

Поред тога, забележено је да NO донори селективно повећавају експресију tPHK за NO 1 у васкуларним глатким мишићима пацова (344). Механизам којим NO повећава експресију NO-1 још увек није довољно прецизан, али се претпоставља да укључује cGMP сигнални пут (344).

Студије на културама ћелија су такође показале да егзогено унети CO блокира повећање cGMP активности који је претходно узроковао NO (345), док инхибитори ендогеног CO супротно томе, повећавају cGMP активност индуковану од стране NO. Поређења ради, N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine (L-NAME), неселективни инхибитор NOS, инхибира вазодилатацију изазвану CO на *in vivo* анималним моделима. Каснија апликација NO донора, натријум нитропрусида, поново успоставља CO вазодилатацију (348). Ови налази нам указују да NO може бити веома значајан у остваривању васкуларних ефеката CO.

#### **1.4.5.2. Интеракција између H<sub>2</sub>S и NO система**

Као што смо из претходног излагања могли да запазимо, постоји одрђени степен синергије између вазорелаксативних својстава H<sub>2</sub>S и NO. И заиста, вазодилататорни ефекти H<sub>2</sub>S у васкуларним глатким мишићима могу бити делимично зависни од NO.

То су доказале студије на аорти анималних модела у којима је апликацијом L-NAME, дошло до редукције вазодилататорног потенцијала H<sub>2</sub>S (342). Интересантно да

се до сличних сазнања дошло и скидањем ендотелног слоја са аортних прстена (342). Ова сазнања сугеришу да  $H_2S$  стимулише производњу  $NO$ , што последично утиче на вазорелаксативна својства  $H_2S$ . Иста истраживања су показала да применом селективног инхибитора  $sGC$ , долази до повећања вазодилаторног потенцијала  $H_2S$ , указујући да  $H_2S$  не мора обавезно своје ефекте да остварује преко  $sGC$ .

У другим испитивањима можемо пронаћи да  $L-NAME$  не утиче на васкуларна својства  $H_2S$ -а, док комбинација  $H_2S$  и  $NO$  донора узрокује значајно већу инхибицију васкуларне констрикције у односу на њихову самосталну примену (349) што показује да одређена синергија ова два система ипак постоји.

Подаци о улози  $H_2S$  у васкуларним ефектима  $NO$  су такође контрадикторни. Док једне студије показују да  $H_2S$  повећава вазорелаксацију изазвану  $NO$  (350), у друга наводе пак супротне резултате (351). Контрадикторне податке о овој интеркацији је тешко објаснити. Наиме, уколико  $H_2S$  повећава концентрацију  $sGMP$ , онда би то могло да објасни смањење ефеката  $NO$ , који делује преко овог сигналног пута. Са друге стране, ако  $H_2S$  изазива вазодилатацију независно од  $NO$ , то би могло да образложи повећање  $NO$  зависне вазорелаксације под утицајем  $H_2S$ . Даља истраживања су свакако потребна ради разјашњења који од ових механизма је доминантан и у којим условима.

Истраживања са  $L$ -цистеином ( $H_2S$  донором) су показала да  $H_2S$  инхибира пораст концентрације  $sGMP$  индукован од стране  $NO$ , док супероксид дигмутаза ( $SOD$ ) може да редукује овај инхибиторни ефекат  $L$ -цистеина (352). 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  $H_2S$  (342). Сматра се да механизам којим  $NO$  остварује овај ефекат укључује нисходну регулацију  $sGMP$  (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  $NF-\kappa B$  сигналног система. Још један од начина којим  $NO$  може да повећа продукцију  $H_2S$  подразумева пораст преузимања  $L$ -цистина кога индукује  $NO$  у ендотелним ћелијама. И овај ефекат  $NO$ -а је дозно зависан (353).

### 1.4.5.3. Интеракција између $CO$ и $H_2S$ система

За сада се најмање зна о међусобном дејству  $CO$  и  $H_2S$  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 H<sub>2</sub>S заиста постоји. Најпре је уочено да CO може да утиче на H<sub>2</sub>S/CSE сигнални пут. Наиме, примећено је да након примене Zn протопорфирина (ZnPP), специфичног инхибитора NO, концентрација H<sub>2</sub>S у васкуларном глатком мишићу нагло расте (354). Ови налази указују да ендогено продуковани CO може да редукује синтезу H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S-а (354). На тај начин, изгледа да CO изазива нисходну регулацију H<sub>2</sub>S.

Са друге стране, очигледно је да и H<sub>2</sub>S може да делује на CO сигнални систем. Показано је да апликација пропаргилглицина (PPG), специфичног инхибитора CSE, повећава ослобађање CO-а у васкуларном глатком мишићу (354). Поред тога, егзогени H<sub>2</sub>S узрокује смањење нивоа карбоксиемоглобина (HbCO) у глаткој мишићној ћелији (354). Ови резултати несумњиво указују да H<sub>2</sub>S редукује продукцију CO у физиолошким условима. На тај начин, идентично претходном односу, H<sub>2</sub>S доводи до нисходне регулације CO. Механизам путем кога H<sub>2</sub>S остварује свој ефекат је такође још увек нејасан. Међутим, као једно од потенцијалних објашњења се наводи инхибиција експресије NO 1 у васкуларним глатким мишићним ћелијама. На основу овога можемо увидети да је интеракција CO и H<sub>2</sub>S сигналних система врло занимљивог карактера - оба гасотрансмитера доводе до смањења у синтези другог и за оба се као могући механизми сугеришу инхибиција ензима који су укључени у њихову продукцију. 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.

Сумарно и поједностављено посматрано (Табела 1), за сада можемо уочити негативну интеракцију између NO и CO, као и CO и H<sub>2</sub>S система, а позитивну између NO и H<sub>2</sub>S сигналног система. Ипак, на основу ових иницијалних студија, очигледно је да се дејства сва три гасотрансмитерска система у неким процесима КВС (вазорелаксација), преклапају и остварују синергију. Досадашња сазнања о међусобном дејству гасотрансмитера нам омогућавају да добијемо само обресе комплексног, али несумњиво све важнијег `дружења` ових молекула и њихове улоге у функцији КВС (и осталих система) у организму човека. Треба имати у виду да наша представа о интеракцији ових молекула потиче од студија различитих метода и модела, што неизоставно може бити важно приликом анализе и компарације добијених резултата. Постаје јасно да су претходна истраживања открила `само` врх леденог брега, а да наредне студије требају да послуже у дубљем објашњењу финих и суптилних

интермолекуларних дешавања ових гасова, чија је улога у (пато)физиологији КВС, евидентно све већа. То је и био један од задатака ове студије.

Табела 1. Сумарне одлике гасотрансмитера у васкуларној мрежи

Васкуларна мрежа	NO	CO	H <sub>2</sub> S
Ензими за синтезу	eNOS	HO 2	CSE
Ендотелна локализација	да	да	да
Сигнал за активацију	Ach	Ach	Ach
Ca <sup>2+</sup> -CaM регулација	да	да	да
Сигнална каскада	sГC-сГMP	sГC-сГMP	sГC-сГMP? K <sub>ATP</sub> ?
Циљно ткиво	глатки мишић	глатки мишић	глатки мишић
Вазорелаксација	да	да	да
Хемијске модификације	S-нитрозилација	?	S-сулфхидризаација

## 1.5. СЛОБОДНИ РАДИКАЛИ И АНТИОКСИДАЦИОНА ЗАШТИТА

Слободни радикали су производи сталних биолошких редокс процеса који се одвијају у ћелији током њеног метаболизма. Њихова реактивност доводи до оксидативних промена биогених молекула с врло штетним учинцима, који могу реверзибилно и/или летално деловати на живе ћелије. Аеробни организми су током еволуције развили сложени систем заштите, као одговор на евентуално штетно деловање оксидационих процеса.

Услов за физиолошко функционисање ћелије је постојање контролисане равнотеже између оксидативних и антиоксидативних фактора. **Оксидациони стрес** се, према томе, дефинише као дисбаланс између продукције слободних радикала (реактивних врста кисеоника (ROS) и азота RNS) и антиоксидационог система (AOS) заштите организма (355). *Оксидациони стрес*, дакле, настаје због повећаног стварања слободних радикала и оксиданаса или смањене количине и/или активности фактора AOS. Иако је оксидациони стрес укључен у патогенезу преко двеста акутних и хроничних болести (356), са аспекта кардиоваскуларних истраживања, има још доста неусаглашених података и пуно потенцијалних (пато)физиолошких механизма за које се сумња да укључују оксидациони стрес.

### 1.5.1. СЛОБОДНИ РАДИКАЛИ

У аеробној ћелији је претежно редукована средина која погодује одвијању нормалног ћелијског метаболизма. Баланс редокс потенцијала у живој ћелији представља императив одржавања здравог фенотипа, као и самог преживљавања ћелије. Оксидативно окружење ћелије наметнуло је аеробним организмима потребу за развијањем механизма за одржавање постојећег редокс стања у ћелији, а потом и за

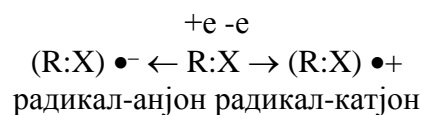
одбрану од оксидационог оштећења. Оксидациони стрес изазван реактивним кисеоничним врстама - ROS (*Reactive oxygen species-ROS*) може озбиљно да наруши ћелијску хомеостазу и утиче на ћелијску пролиферацију и диференцијацију. У ћелијама аеробних организама током нормалног метаболизма, највећи део кисеоника се потпуно редукује до воде у респирационом ланцу или као супстрат у ензимским реакцијама (357). Од преосталих 2-5% молекулског кисеоника настају делимично редуковани облици од којих су неки веома реактивни. У реакцији са биомолекулима они изазивају њихова оштећења што је познато као оксидациони стрес. Читав низ механизма у ћелији је укључен да спречи или умањи штетне последице оксидационог стреса (358).

Слободни радикали (CP) су молекули, јони или атоми који имају неспарене електроне у својој структури, односно налазе се између оксидованог и редукованог стања (359). Добијају се из нерадикала који су по својој природи слабо реактивни јер у својим орбиталама имају паран број електрона – имају спарене електроне супротног спина. У хемијској терминологији је прихваћено да се слободни радикали обележавају великим латиничним словом R са тачком поред, која симболизује неспарени електрон R<sup>•</sup>.

Слободни радикали настају у низу биолошких реакција, те су у организму присутни у ниским концентрацијама ( $10^{-5} - 10^{-9}$  mol). Настају у:

1. оксидативној фосфорилацији у митохондријама,
2. фагоцитози,
3. биотрансформацијама егзогених и ендогених супстанци на мембранама ендоплазмског ретикулума – у процесима аутооксидације и у редокс циклусима,
4. метаболизму етанола,
5. ензимским реакцијама у којима учествују оксигеназе,
6. синтези еикозаноида – биосинтези простагландина, леукотриена,
7. оксидо – редукацијама метала са променљивом валенцом,
8. липидној пероксидацији.

Слободни радикали могу бити неутрални, али и позитивно (радикал-катјон) или негативно наелектрисани (радикал-анјон):

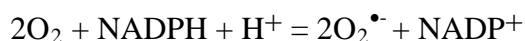


Током свог функционисања слободни радикали пролазе кроз три фазе: фаза иницијације, фаза пропације и фаза терминације.

1. **У фази иницијације**, нерадикали губе или примају један електрон, чиме им се мењају физичке и хемијске особине.

2. **У фази пропагације**, новонастали слободни радикал активира циљни молекул, одузимајући му један електрон. На тај начин се он стабилизује, а циљни молекул постаје слободног радикала. С обзиром на то да су веома реактивни, настали слободни радикали делују даље и за кратко време вишеструко се умножи број слободних радикала. На тај начин, добија се низ ланчаних реакција, чиме је омогућена брза и интензивна пропагација ових хемијских облика.
3. **Фаза терминације**, је период заустављања-неутрализације слободних радикала и њихове пропагације. За ове реакције заслужни су: неензимски оксиданси, ензимски оксиданси и судар два слободна радикала.

Слободни радикали су у организму присутни у ниским концентрацијама ( $10^{-5} - 10^{-9}$  mol). У физиолошким процесима, СР учествују у производњи енергије, важни су за антимикуробну активност фагоцитних ћелија, учествују у процесима преношења сигнала и регулацији ћелијског циклуса, неопходни су за механизам деловања неких ензима. Поред тога, СР су и мутагени, убрзавају старење и стимулишу раст ћелија (356). Кисеонични слободни радикали настају у процесу фагоцитне активности неутрофила, моноцита, макрофага и еозинофила и део су каскадних догађаја у антимикуробној активности фагоцитних ћелија. Фагоцитоване честице у овим ћелијама изложене су великој количини створеног супероксид анјон радикала у процесу тзв. респираторне експлозије која настаје након активације мембранске NADPH оксидазе:



За бактерицидну активност су највероватније одговорни хидропероксил радикал ( $\text{HO}_2^{\bullet}$ ), и водоник пероксид који настаје дисмутацијом супероксид анјон радикала у присуству SOD. Поред тога, лизозомалне мијелопероксидазе фагоцита користе  $\text{H}^+$  као косупстрат и у присуству  $\text{Cl}^-$  стварају хипохлорну киселину и хидроксил-радикал. Хипохлорна киселина може оксидисати многе биолошке молекуле, а нарочито редуковане тиол-групе и остатке метионина (360).

СР могу бити и регулаторни молекули у биохемијским процесима. Лимфоцити и фибробласти непрестано стварају мале количине  $\text{O}_2^-$ , који је регулатор раста. Ендотелне и глатке мишићне ћелије могу бити стимулисане да ослобађају супероксид анјон радикал (361). Стварање ROS је значајно за ћелију и зато што они могу бити и унутарћелијски секундарни гласници (362).

ROS учествују у заустављању ћелијског циклуса индукцијом активације p53 протеина. Промена ка прооксидационом стању зауставља пролиферацију ћелије и изазива апоптозу (363). Оксиданси могу активирати и плејотропни транскрипциони фактор (NF- $\kappa$ B), а промене у нивоу антиоксиданаса активирају и друге транскрипционе факторе: c-myc, c-jun, c-fos и AP1 и тако контролишу експресију гена (364).

Интерлеукин 1 (IL-1),  $H_2O_2$  и фактор некрозе тумора (TNF) делују преко мембранских рецептора тако што стимулишу продукцију ROS у ћелији (365).

Слободни радикали су такође у физиолошким условима укључени у механизам деловања неких ензима, на пример, хем ензима цитохрома P450 и простагландин синтазе, затим FeS-рибонуклеозид дифосфат редуктазе која редукује рибонуклеозид дифосфат у деоксирибонуклеозид, прекурсор ДНК (366). Ензимски каталирана оксидација арахидонске киселине у току биосинтезе еикосаноида праћена је стварањем хидропероксида и кисеоникових слободних радикала као интермедијерних једињења.

Према теорији слободних радикала о развоју организма, метаболички оксиданси (ROS и CP) утичу на развој тако што мењају антиоксидациони капацитет ћелије мењањем продукције глутатиона (GSH). Наиме, GSH и кисеоник утичу на активност ензима одговорних за иницирање и одржавање епигенетске контроле у експресији гена. Повећано стварање GSH утиче на метилацију ДНК и хистона тако што смањује расположивост кофактора, S-аденозилметионина, неопходног за активност ДНК и хистон метилтрансфераза, а кисеник је кофактор хистон деметилазе (367).

Слободни радикали су, као део нормалне метаболичке активности ћелије, укључени у многе функције ћелије *in vivo*, али уколико измакну контроли они постају веома реактивни и штетни за ћелију јер могу оштетити бројне функционалне путеве у њој. Оштећењем ДНК могу довести до малигне трансформације ћелије (368).

### 1.5.2. РЕАКТИВНЕ ВРСТЕ КИСЕОНИКА (ROS)

Реактивне врсте кисеоника, слободни радикали кисеоника, (*Reactive oxygen species*) (ROS), су слободне радикалске честице кисеоника. Састоје се од атома, молекула или јона и ове честице имају један или више неспарених електрона у својој структури. Настају као међупроизвод у току метаболизма кисеоника, јако су нестабилне и веома реактивне, због чега могу изазивати ланчане реакције у организму (369).

У нормалном молекулу, језгро је окружено паром негативно наелектрисаних електрона. Уклањањем једног електрон из пара, процесом који се зове оксидација, молекула постаје нестабилан. Име овако насталог новог молекула је „радикал“ молекула.

Реактивне кисеоничне врсте се у великом броју случајева поистовећују са слободним радикалима. Не представљају само реактивне кисеоничне врсте слободне радикал. Исто тако ни све реактивне кисеоничне врсте не представљају слободне радикале. ROS се деле у 2 групе (370-405) (Табела 2):

- 1) слободни радикали кисеоника
- 2) нерадикалски облици кисеоника

Слободни радикали кисеоника		Нерадикалски облици кисеоника	
Ознака	Назив	Ознака	Назив
$O_2^{\bullet\bullet}$	Супероксид анјон радикал	$H_2O_2$	Водоник пероксид
$\bullet OH$	Хидроксил радикал	$HOCl$	Хипохлорна киселина
$HO_2^{\bullet}$	Хидропероксил радикал	$O_3$	Озон
$RO^{\bullet}$	Алкоксил радикал	$^1O_2$	Синглет кисеоник
$RO_2^{\bullet}$	Пероксил радикал	$ROOH$	Органски хидропероксид

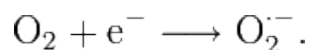
### 1.5.2.1. НАСТАНАК И ОСОБИНЕ ПОЈЕДИНИХ ROS

#### 1.5.2.1.1. Порекло

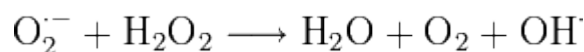
Порекло реактивних врста кисеоника у организму, може бити *ендогено* (у току физиолошких процеса, нпр. ћелијског дисања) и *егзогено* (када је њихова продукција изазвана уносом ксенобиотика и других материја у организам).

ROS се у организму непрекидно стварају у току ћелијске респирације у телу, углавном током процеса преноса електрона у процесу дисања у митохондријама, и најчешће настају као непожељни производи непотпуног ћелијског дисања. У активним митохондријама се око 0,1% до 4% удахнутог кисеоника претвара у реактивна једињења кисеоника.

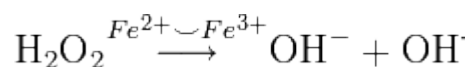
ROS настају углавном у току преношења електрона из убихинон ( $QH_2$ ) из комплекса III до комплекса I на убихинону. Пренос укључује семихинонске радикале ( $QH^{\bullet}$ ), којима може бити придодат електрон кисеоника ( $O_2$ ): (371).



Настали супероксид делују на аконитазу која ослобађа катјон гвожђа у феро облику ( $Fe^{2+}$ ). Супероксид и водороден-пероксид могу да реагују по Haber-Weiss-овој, реакцији при чему су јони гвожђа катализатори реакције. У овој реакцији настаје вода, кисеоник и хидроксил радикал, који је још увек реактивнији од супероксида (371).



Водоник-пероксид се у Fenton-овој реакцији разлаже на хидроксил анјон и хидроксил радикал, а катализатори ове реакције су јони ( $Fe^{2+}$ ) (371).



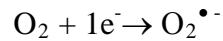
Многобројни радикали могу настати у организму и након уноса различитих супстанци или страних материја (ксенобиотика). Неки од најчешћих ксенобиотика су;



пестициди, катрани, вештачке боје, дувански дим, конзерванси, лекови или радикали настају као последица изложености микроталасном, јонизујућем и другим врстама зрачења, па чак и јачег физичког напрезања (370).

### 1.5.2.1.2. Супероксид анјон радикал ( $O_2^{\bullet-}$ )

Супероксид анјон радикал ( $O_2^{\bullet-}$ ), настаје једноелектронском редукцијом молекуларног кисеоника у електронском транспортном ланцу (372):



Начини настанка супероксид анјон радикала су следећи:

1. при респирацији, фотосинтези и фотореспирацији, непотпуном редукцијом молекуларног кисеоника на мембранама митохондрија, хлоропласта и ендоплазматског ретикулума (373);
2. Аутооксидацијом високореактивних хемијских једињења-првенствено једињења са кондензованим хетероцикличним једињењима у структури: флавина и леукофлавина, хинона и хидрохинона, тиола и катехоламина (374);
3. Оксидацијом миоглобина (Mb) и хемоглобина (Hb) (375)

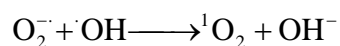
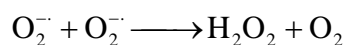


4. Оксидоредукционим процесима, у којима учествују ензими са никотин-аденинским нуклеотидима као кофакторима-NADH, NADPH, алдехид оксидазе, ксантин оксидазе, триптофан оксидазе (376);
5. Дејством зрачења (377);
6. Дејством цитостатика (378)

Супероксид анјон радикал, мада сам релативно нетоксичан, може реаговати са разним биолошким молекулима и учествовати у регулацији раста и преношењу интрацелуларних сигнала (378, 379). Као слободни радикал,  $O_2^{\bullet-}$  лако ступа у интеракцију са другим слободним радикалима, на пример, азот моноксид радикалом ( $NO^{\bullet}$ ), а настали пероксинитрит ( $OONO^-$ ) је такође реактивна кисеонична честица (380).

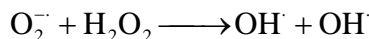
Штетно дејство супероксид анјон радикала може се увидети у следећим реакцијама:

- Формирање других врста ROS (381)

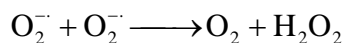


- Може изазвати деполимеризацију полисахарида; оштећење ћелијских мембрана индукцијом липидне пероксидације; оштећење ДНК и РНК приликом процеса репликације и транскрипције (382);

- Учествоје у Haber-Weiss-овој/Fenton-овој реакцији са водоник пероксидом



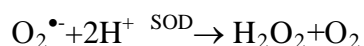
Реакцијом два супероксид анјон радикала долази до разградње  $\text{O}_2^{\cdot-}$  и настанка водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). У киселој средини ово је спонтана реакција, а на физиолошком рН реакција дисмутације је вођена ензимом супероксид дизмутаза (SOD).



$\text{O}_2^{\cdot-}$  који избегне дисмутацију или реагује са  $\cdot\text{NO}$  формирајући пероксинитрит, или реагује на различите начине са транзиционим металима, учествује у Fenton-овој реакцији са водоник пероксидом при чему настаје хидроксил радикал, или бива протонизован у хидропероксил радикал. Иако је количина протонизованог  $\text{O}_2^{\cdot-}$  *in vivo* мала,  $\text{HO}_2^{\cdot}$  може да се инкорпорира у фосфолипидни двослој и иницира липидну пероксидацију (383).

#### 1.5.2.1.3. Водоник пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

Водоник пероксид нема неспарених електрона и није слободни радикал. Најстабилнији је облик ROS. Огроман део продукованог водоник пероксида настаје путем дисмутације супероксид анјон радикала, створеног од стране митохондрија или NADPH оксидаза (384).



Најчешће место на коме настаје водоник пероксид јесу пероксизоми, митохондрије, микрозоми и мембране ендоплазматског ретикулума (385). Низак ниво концентрације ADP у строми митохондрија исто може бити узрок настанка  $\text{H}_2\text{O}_2$  (383).

$\text{H}_2\text{O}_2$  по новим истраживањима има изузетно важну улогу код процеса преношења сигнала у ћелији, првенствено после везивања скоро свих лиганата специфичних за рецепторе тирозин киназе (386).

$\text{H}_2\text{O}_2$  делује као редокс сигнал или реагујући директно са тиолима цистеинских остатака протеина чиме доводи до промене самог протеина или индиректно преко тиоредоксина или глутатиона (384).

Штетни ефекти  $\text{H}_2\text{O}_2$  су дозно зависни. Низак ниво водоник пероксида делује пре пролиферативно него антипролиферативно (387).

Дозно зависни штетни ефекти  $\text{H}_2\text{O}_2$  су (388):

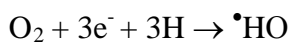
- У ниским концентрацијама оштећује протеине ћелијских мембрана и ремети њихову функцију

- У већим концентрацијама оштећује ДНК у многим типовима ћелија
- Високе концентрације су леталне за скоро све живе организме (због тога се користи и као дезинфекционо средство)

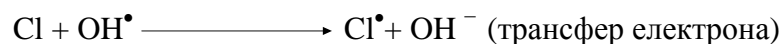
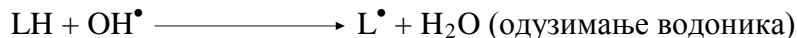
Водоник пероксид је опаснији када делује индиректно у реакцији са супероксид анјон радикалом или јонима метала ( $\text{Fe}^{2+}$ ) када доводи до стварања изузетно реактивног хидроксил радикала ( $\bullet\text{HO}$ ) који је најснажнији активатор пероксидације мембранских липида (388).

#### 1.5.2.1.4. Хидроксил радикал ( $\bullet\text{HO}$ )

Хидроксил радикал ( $\bullet\text{HO}$ ) представља најтоксичнију врсту ROS-а (384).



Реагује са скоро свим биомолекулима: алкохолима, органским киселинама, шећерима, аминокиселинама, фосфолипидима и нуклеотидима при чему настају одговарајући органски радикали. Овим је створена могућност даље пропагације слободно-радикалских процеса и оно што касније следи, даља оштећења биомолекула у реакцијама одузимања водоника, адиције и реакције трансфера електрона.



Висока реактивност  $\bullet\text{OH}$  и мала селективност чине га веома опасним по интегритет и функционалност ћелије. Он је најреактивнији интермедијарни продукт делимичне редукције кисеоника. Као резултат серије реакција може настати и пероксил радикал који даље пропагира слободне радикалске процесе посебно оне на мембранама.

Ако каталаза не уклони водоник пероксид, онда он може да реагује са феро јонима и да формира хидроксил радикал (389).

Хидроксил радикал изазива следеће реакције које су довољне за настанак иреверзибилног оштећења ћелије (390).

- Оштећење мембране митохондрија.
- Оштећење молекула ДНК.
- Оштећење мембране ћелије.
- Поремећај липидне пероксидације.

Стварању  $\text{H}_2\text{O}_2$  предходи реакција два хидроксил радикала. Овим стварањем  $\text{H}_2\text{O}_2$  умањује се штета везана за  $\bullet\text{OH}$ , али ипак је значај ове реакције *in vivo* много мањи него

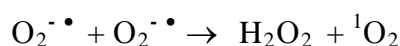
*in vitro* (370).

### 1.5.2.1.5. Синглет кисеоник ( $^1\text{O}_2$ )

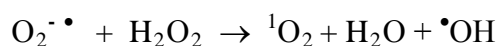
Молекуларни кисеоник је слободни радикал са два неспарена електрона паралелних спинова. Спада у нерадикалске форме ROS али представља врло јак оксидациони агенс. Синглетни кисеоник настаје довођењем енергије у молекул кисеоника, са циљем да се мења спин једног од електрона, што значајно увећава његову реактивност. Такође овај радикал може да испољи и значајну токсичност у различитим биолошким системима. (370, 391).

Синглет кисеоник може да настане у различитим реакцијама (392):

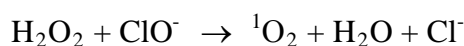
1. Интеракцијом два супероксид анион радикала кисеоника:



2. У Haber-Weiss-овој реакцији:



3. У фотосензитивним реакцијама - осветљавањем фотосензибилних једињења у присуству кисеоника (*биолошки пигменти-хлорофил, флавоноиди, порфирини и очни пигмент ретинол*). Ова једињења способна су да приме квант светлосне енергије, чиме прелазе у нестабилно побуђено стање. Да би се стабилисала, она предају вишак енергије околина, у виду емисије светлости. Уколико се у тој околина налази молекуларни кисеоник, он ће примити емитовану енергију и настаће тзв. синглет стање (381).
4. Метаболичка продукција  $^1\text{O}_2$  догађа се и у стимулираним неутрофилима у којима  $^1\text{O}_2$  настаје у серијама реакција које укључују мијелопероксидазе, које користе  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $(\text{Cl}^-)$  да створе хипохлорне јоне  $(\text{ClO}^-)$  који потом у реакцији са  $\text{H}_2\text{O}_2$  стварају синглет кисеоник (393):



$^1\text{O}_2$  може реаговати са низом биомолекула као што су ДНК, протеини и липиди (370). Ове реакције укључују оксидацију, хидроксилацију и  $\text{O}_2^{\cdot -}$  адитивне реакције (384).

Штетно дејство синглет кисеоника представља се као стварање сулфооксида, фенола, ендопероксида, хидропероксида и хинона. Због способности да реагује са

незасићеним масним киселинама липидних мембрана, може да иницира процес липидне пероксидације, а може лако да се трансформише и у друге облике ROS (381).

### 1.5.2.2. Остале реактивне врсте кисеоника

Повезаност ROS-а са биомолекулима може довести до ланчане реакције, које обавезују продукцију секундарних ROS. Хидроксил радикал одузима атом водоника из хидроксилне групе полинезасићених масних киселина (RH) и тако настају алкоксил радикали (RO<sup>•</sup>). Алкил радикали (R<sup>•</sup>) могу настати одузимањем водоника као у <sup>•</sup>ОН-индукованој липидној пероксидацији, и могу се комбиновати са молекуларним кисеоником до пероксил радикала (RO<sub>2</sub><sup>•</sup>). Они касније могу да реагују и доведу до стварања хидропероксида (ROOH) (384).

### 1.5.3. ЛИПИДНА ПЕРОКСИДАЦИЈА

Липидна пероксидација је термин који описује уградњу молекуларног кисеоника у структуру полинезасићених масних киселина ПУФА (Polyunsaturated Fatty Acids) у биолошким мембранама (370).

Услед пероксидације липида плазна мембрана су:

- Поремећај флуидности ћелијске мембране-могуће цурење садржаја цитосола у ванћелијску средину.
- Појачана пропустљивост за једновалентне и двовалентне јоне. Услед овакве пропустљивости може да дође и до промене осмотског притиска у ћелији, а и ван ње.
- Оштећење система преноса информација са рецептора на мембрани на унутарћелијске системе, с обзиром на то да су неки липиди категоризовани као секундарни гласници.
- Инактивација ензима.

На пероксидацију липида осетљивост су показали и неурони ЦНС-а и ћелије глије због високог садржаја ПУФА у липидима мозга–сфингомијелина, цереброзида и ганглиозида (394).

Овај процес може тећи на два начина:

1. Ензимским путем – дејством липоксигеназе и циклооксигеназе. Ови ензими катализују оксидацију арахидоната, до простагландина и леукотриена, док оксидацију холестерола до хидроксихолестерола катализује цитохром P-450 (395).
2. Неензимским путем – Посредовањем ROS – а на полинезасићене масне киселине из липидног двослоја мембране доводи до појаве изопростана (396).

Радикали који учествују у одузимању водониковог атома полинезасићеним масним киселинама су алкоксил радикали ( $\text{RO}^\bullet$ ), пероксил радикали ( $\text{RO}_2^\bullet$ ), хидропероксил радикали ( $\text{HO}_2^\bullet$ ), неколико гвожђе-кисеоник комплекса и хидроксил радикал ( $^\bullet\text{HO}$ ) (397)

Реактивне кисеоничке врсте одузимају Н-атом из метил-групе у  $\alpha$ -у положају у односу на двогубу везу у молекулу ПУФА. Одудимањем ових атома, који носе по 1 електрон, на С-атому метил-групе ПУФА, остаје 1 неспарени електрон—заправо настаје липидни радикал (L). Да би се стабилизовао новонастали хемијски облик, дешава се премештање електрона дуж угљоводоничног низа ПУФА, што има за последицу премештање двогубих веза и стварање коњугованих диена. Адицијом молекулског кисеоника на овакав радикал, на месту С-атом радикала, настаје пероксил радикал ( $\text{LOO}^\bullet$ ).

Као финални продукт липидне пероксидације PUFA настаје малонилдиалдехид (MDA). У киселој средини он кондензује са 2 молекула ТБА (тиобарбитурна киселина), дајући производ који апсорбује у видљивом делу спектра, са апсорпционим максимумом на 532 nm. Ово представља и доказну реакцију за липидну пероксидацију у неком биолошком систему и квантитативна мера присуства липидних пероксида у систему.

Продукти липидне пероксидације акивирају путеве ћелијског сигнализирања на више начина, као што су:

- формирање ковалентних веза са протеинима, или
- нековалентно везивање за протеинске рецепторе.

На тај начин липидни пероксиди испољавају низ ефеката у ћелији, од цитотоксичних до стимулаторних. Излагањем великим концентрацијама продуката липидне пероксидације може изазвати низ ћелијских одговора, од акутних токсичних ефеката до инхибиције ћелијске пролиферације (384).

У ниским концентрацијама продукти липидне пероксидације могу стимулирати неколико процеса као што је активност неколико ензима или транскрипциона регулација антиоксидативних гена (398).

#### 1.5.4. Реактивне врсте азота (RNS)

Поред ROS, висок оксидациони потенцијал поседују и реактивне врсте азота (RNS).

Главни представник RNS је азот моноксид ( $^\bullet\text{NO}$ ). Метаболизам  $^\bullet\text{NO}$  и његова реактивност, доводе до постанка много других RNS, пре свега пероксинитрита ( $\text{ONOO}^\bullet$ ), а онда и азот диоксида ( $\text{NO}_2$ ), диазот триоксида ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) и диазот тетоксида ( $\text{N}_2\text{O}_4$ ).

Све ове врсте, а међу њима и реактивне врсте кисеоника, имају велики број функција које нису увек лоше по живу ћелију, али поседују велику биореактивност и потенцијал за нарушавање физиолошке функције протеина, липида, угљених хидрата и нуклеинских киселина (399).

#### 1.5.4.1. Азот моноксид ( $\bullet\text{NO}$ )

Азот моноксид има многобројне улоге у редокс сигнализацији као слободни радикал. Његов настанак је везан за ћелије под дејством ензима који се називају азот моноксид синтазе-NOS (Nitric Oxide Synthases – NOSs) (400).

Продукција  $\bullet\text{NO}$  може бити посредована и молекулима азот монооксида који у ствари представљају врсте које су настале у току ендогеног метаболизма  $\bullet\text{NO}$  и из којих  $\bullet\text{NO}$  може бити рециклиран на местима удаљеним од места првобитне продукције (382).

$\bullet\text{NO}$  има кратак полуживот у ћелијама, око 0.1-2 секунде, али захваљујући својој липофилности слободно дифундује кроз ћелијску мембрану и испољава своје паракрино деловање у радијусу од 100-200  $\mu\text{m}$  од његовог извора (401).

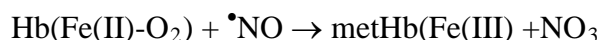
$\bullet\text{NO}$  делује као сигнални молекул и то тако што се реверзибилно везује за одређене транзитне металне јоне као што су протеини који садрже хем као простетичну групу (402).

Други начин деловања  $\bullet\text{NO}$  као сигналног молекула, је модификацијом протеинских тиола. Азот моноксид је сам по себи генерално нереактиван са већином нерадикала у физиолошким концентрацијама (403), али у одређеним условима може нитрозовати тиоле и на тај начин формира S-нитрозотиоле (404).

Азот моноксид учествује директно у сигнализацији, али метаболизам азот монооксида може да доведе до стварања других врста, које исто тако могу учествовати у редокс сигнализацији.

Азот моноксид реагује са многим биомолекулима.  $\bullet\text{NO}$  може да изазове инхибицију активности многих ензима, да изазове липидну пероксидацију, може и да измени структуру ДНК, али може да делује и као антиоксиданс у смислу заштите ћелије од оксидационог стреса (399), што је директно пропорционално продукцији  $\bullet\text{NO}$ . Азот моноксид на овај начин утиче на регулацију многих биолошких одговора, као што су индукција и активација гена, инхибицију агрегације тромбоцита, цитостаза, апоптоза, неуротрансмисија, стимулација имуног одговора, релаксација васкуларне глатке мускулатуре (405).

У ниским концентрацијама, може да реагује са хемоглобином, а ова реакција представља примарни механизам уклањања и детоксификације  $\bullet\text{NO}$  in vivo (406).



$\cdot\text{NO}$  је слободан радикал, и као такав је реактиван према осталим слободним радикалима, у циљу упаривања неспареног електрона. У биологији се за реакцију азот монооксида са супероксид анијон радикалом ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) сматра за једну од најбржих, док су сличне брзине и реакције са алкоксил/пероксил радикалима ( $\text{RO}\cdot$  и  $\text{ROO}\cdot$ ) (384).

Оксидациони стрес представља један од битних фактора са утицајем на ендотелну функцију и биорасположивост  $\cdot\text{NO}$ -а.  $\text{O}_2^{\cdot-}$  умањује функцију eNOS на тај начин што скраћује полуживот азот монооксида и умањујући његову расположивост. При том долази до настајања високотоксичног  $\text{ONOO}^-$  (382). Ова реакција је повезана са мноштвом патофизиолошких стања, док у нормалним условима  $\text{O}_2^{\cdot-}$  бива елиминисана од стране SOD. Реактивне кисеоничне врсте такође регулишу васкуларну функцију модулишући ћелијски раст, апоптозу, миграцију, инфламацију, секрецију и продукцију екстрацелуларног протеинског матрикса (307). Оксидациони стрес и оштећења изазвана њиме представљају медијаторе васкуларних оштећења и инфламације у многим кардиоваскуларним болестима, поготову уколико постоје компликације у виду хипертензије, хиперлипидемије, дијабетеса (356, 370).

### 1.5.5. АНТИОКСИДАЦИОНИ ЗАШТИТНИ СИСТЕМ

Антиоксидациони заштитни систем (AOS) (AOS-antioxidant defence system), настао је током еволуције код свих аеробних организама, како би се спречила, ограничила или "поправила" оштећења настала деловањем реактивних врста кисеоника ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$  и  $^1\text{O}_2$ ) (408).

За систем заштите од оксидационих оштећења изазваних дејством ROS, у овом тексту, ће се као термин користити предлог Cotgrejev-a (408) и то као AOS-антиоксидациони заштитни систем.

Антиоксиданс је супстанца која својим присуством у малим концентрацијама, у односу на оксидабилни супстрат, утиче на смањење, или на спречавање оксидације тог супстрата (370). "Оксидабилни супстрат" је супстанца која може да се нађе у храни, ткивима, код животиња и људи. Ту спадају и протеини, липиди, угљени хидрати и ДНК.

Антиоксиданси су молекули, који могу деловати пре или током реакције CP, у фазама иницијације, пропагације, терминације и декомпозиције CP или током следствених реакција оксидованих продуката са осетљивим циљним молекулима (409). Деловање антиоксиданаса представља способност хватања (scavengers) CP, давања електрона, разграђивања хидропероксида липида, који су настали у фази пропагације, затим неутрализацију деловања синглетних облика кисеоника као и способност инхибиције неких ензима (410).

AOS чине ензими и једињења мале молекулске масе. Овај систем омогућава



заштиту од токсичног дејства ROS. Оштећења, која настају деловањем ROS, тумаче се као последица оксидационог стреса (385). Оксидациони стрес настаје када дође до поремећаја равнотеже између ROS и RNS-а, с једне стране, и заштитног система с друге стране (370). У том случају вишак одбеглих ROS регулише с липидима, протеинима, нуклеинским киселинама и полисахаридима изазивајући значајна оштећења. Сматра се да оксидациони стрес представља важан фактор у патогенези старења, у дегенеративним обољењима као што су: атеросклероза, кардиоваскуларна обољења, diabetes mellitus тип 2 и у развоју тумора (370, 411).

Како би се спречила, оштећења која настају услед деловања слободних радикала кисеоника ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ ,  $^1O_2$ ), развио се антиоксидациони заштитни систем, који представља заштиту биолошких система.

AOS обухвата **примарну** и **секундарну** антиоксидациону заштиту. Примарна антиоксидациона заштита обухвата *ензимске* и *неензимске* компоненте (412). Осим претходне поделе, антиоксиданси могу бити сврстани и у ензимске, неензимске и ванћелијске. Будући да се поменуте поделе преклапају ми ћемо се трудити да у наставку опишемо најважније одлике сваке од њих.

### 1.5.5.1. ЕНЗИМСКЕ КОМПОНЕНТЕ АНТИОКСИДАЦИОНЕ ОДБРАНЕ

Ензимским компонентама примарне антиоксидационе заштите припадају антиоксидациони молекули који неутралишу слободне радикале. То су: супероксид-дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), ензими глутатион редокс циклуса (глутатион пероксидаза, глутатион-S-трансфераза, глутатион-редуктаза и сл.), затим цитохром-оксидазе, као и тиоредоксин и фамилија пероксиредоксин протеина – функционишу као сакупљачи супероксид-анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) и водоник-пероксида (413). Наведени антиоксиданси делују тако што блокирају започињање ланчане реакције слободних радикала и, самим тим, онемогућавају пратећу пероксидацију липида (414), јер сваки од њих детоксикује неког припадника ROS.

*Супероксид-дисмутаза* је металоензим. Код људи су за сада идентификоване њене три изоензимске форме (415): цитосолна (Cu, Zn-SOD), митохондријална (Mn-SOD) и екстрацелуларна (EC-SOD). Све учествују у дисмутацији супероксид-анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) до  $O_2$  и  $H_2O_2$  (каталитички уклањају  $O_2^{\cdot-}$ ). На њихово деловање се наставља активност ензима каталазе и глутатион-пероксидазе.

*Каталаза (CAT)* разлаже водоник-пероксид до воде ( $H_2O$ ) и молекулског кисеоника ( $O_2$ ), док га *глутатион-пероксидазе (GSH-Px; GPx)*, са изузетком хепатоцитне глутатион-S-трансферазе, преводе у  $H_2O$  и оксидовани глутатион (глутатион дисулфид, GSSG) (389, 413). Осим тога, глутатион-пероксидазе уклањају и

органиске хидропероксида и липидне пероксида, уз оксидацију глутатиона као косупстрата ( $2\text{GSH} + \text{ROOH} \rightarrow \text{GSSG} + \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$ ).

*Цитохром-оксидаза* спречавају ослобађање активних кисеоничних врста током редукције  $\text{O}_2$  у  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 1.5.5.2. НЕЕНЗИМСКЕ КОМПОНЕНТЕ АНТИОКСИДАЦИОНЕ ОДБРАНЕ

Неензимске компоненте антиоксидационог заштитног система деле се на супстанце растворљиве у мастима – липосолубилне и на супстанце растворљиве у води – хидросолубилне. Липосолубилне супстанце које учествују у антиоксидационој заштити су: витамин Е (токоферол), провитамин А (каротен) и коензим Q (убихинон).

Хидросолубилни учесници антиоксидативне заштите су: витамин Ц (аскорбинска киселина), редуковани глутатион (GSH), мокраћна киселина, албумин, трансферин, церулоплазмин, феритин, билирубин, биливердин, цистеин, хистидин и лактоферин. Осим њих, у неензимске антиоксидансе спадају још и: мелатонин, пируват, кетоглутарат, естрогени, липонска киселина, дихидролипонска киселина, карнозин, хомокарнозин, ансерин и меланин (413, 416).

*Витамин Е (токоферол)* уклања слободне радикале и учествује у прекидању ланчаних реакција пероксидације мембранских липида зато што реагује са пероксилним радикалима брже него што они успеју да реагују са незасићеним масним киселинама и мембранским протеинима (370, 388).

*Провитамин А ( $\beta$ -каротен)* је антиоксиданс због тога што везује синглетни кисеоник (370, 388), спречава ланчане реакције радикала и инхибира липооксигеназне активности.

*Витамин Ц* директно реагује са супероксид-анјон радикалом, хидроксилним радикалом и хипохлорастом киселином, прекидајући ланчане реакције радикала. Он је и снажан редукујући агенс који прекида ланчане реакције пероксидације липида и сакупља хидрофилне пероксил-радикале (370, 388), регенерише витамин Е (токоферол) и одржава интегритет ЛДЛ молекула.

*Редуковани глутатион (GSH)* је важан у заштити ћелија од водоник-пероксида и хидропероксида, хидроксил-радикала, органичних-радикала и пероксил-радикала. Он је и кофактор глутатион-пероксидаза (GSH-Px) и глутатион-S-трансфераза. Осим тога, глутатион реагује и са токоферил радикалом, како би регенерисао  $\alpha$ -токоферол (370, 417).

*Коензим Q (CoQ)* спречава пероксидацију липида (370) и реагује са супероксид-анјон радикалима, производејући водоник-пероксид.

**Секундарну антиоксидациону заштиту чини систем ензима који се може**

квалификовати у 2 класе (370):

1. репаратори који поправљају оштећења настала пропустима примарног система. У њих спадају ензими ДНК – репарационог система, као што су ДНК гликозилаза, ДНК полимераза, ДНК лигаза, ендонуклеазе;

2. дезинтегратори који уништавају настала оштећења. То су углавном различите протеазе које су активне на оксидационо модификованим протеинима: протеин-специфичне оксидоредуктазе, протеин-АДП-рибозил-трансфераза, АТФ- и  $\text{Ca}^{2+}$  - независна протеаза.

### 1.5.5.3. ЕКСТРАЦЕЛУЛАРНИ АНТИОКСИДАНСИ

Осим антиоксидационе одбране која функционише унутар ћелијских структура, постоји и ванћелијска одбрана од антиоксиданаса, јер се велики број слободних радикала лако разноси са места настанка до осталих ћелија и делова тела. Чиниоци ове одбране су углавном металопротеини који задржавају гвожђе и бакар у нереактивном облику (у нижем оксидационом стању) и тако спречавају њихово деловање са водоник-пероксидом и супероксид анјон-радикалом (377, 388). Ово је важно зато што у присуству јона гвожђа или бакра липидни пероксиди стварају многобројне разградне продукте, па и активне радикале. У ванћелијске антиоксидансе спадају и бројни протеини, којима антиоксидативна одбрана није једина улога, мада уз бројне друге улоге, обављају и њу. То су, на пример: трансферин, лактоферин, хаптоглобин, хемопексин, церулоплазмин, албумини, екстрацелуларна изоформа SOD, екстрацелуларна глутатион-пероксидаза, глукоза, билирубин и урати.

*Трансферин* и *лактоферин* учествују у антиоксидативној одбрани тако што директно везују гвожђе, док *хаптоглобин* везује хемоглобин, а *хемопексин* прикупља хем и тако заправо индиректно везују гвожђе.

*Церулоплазмин* и *албумини* су антиоксиданси јер везују бакар и хем, а уклањају и хипохлорасту киселину (HOCl). *Церулоплазмин* има још и способност уклањања феро-јона ( $\text{Fe}^{2+}$ ) из плазме, уз истовремену редукцију кисеоника у воду. Осим тога, реагује и са супероксидним-радикалом и водоник-пероксидом (418).

*Екстрацелуларна SOD* (EC-SOD) уклања супероксидни-анјон-радикал, *екстрацелуларна глутатион-пероксидаза* (EC-GSH-Px) одстрањује хидропероксиде, док *глукоза* уклања хидроксилни радикал (419).

*Билирубин* нарочито у некоњугованој форми, према најновијом сазнањима представља врло снажан ендогени антиоксидант који учествује у борби против бројних слободних радикала пре свега, пероксилних (420).

## 1.6. ИНТЕРАКЦИЈЕ ГАСОТРАНСМИТЕРА И СЛОБОДНИХ РАДИКАЛА

Интеракција NO са слободним радикалима је добро позната и неколико пута поменута 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<sup>-</sup>), чини се да CO поседује цитопротективна својства. У појединим студијама постоји повезаност између повећане продукције CO и смањеног ћелијског оштећења слободним радикалима (421). CO такође може имати улогу у заштити од оксидационих оштећења приликом акутне фазе инфламације (422).

Показано је да повећање активности NO 1 може бити повезано са побољшањем антиоксидационе заштите усмерене против ONOO<sup>-</sup> (423) и супресије адхезије леукоцита за ендотелне ћелије (424). 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 (425). Истраживања *in vitro* су указала да овај пигмент спречава ћелијска оштећења од стране H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и ONOO<sup>-</sup> (426). 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.

Сматра се да потенцијални механизам путем кога NO 1 остварује своја антиоксидациона својства подразумева супродстављање повећаној производњи NO и RNS (427). 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 (428).

Ипак, механизам којим NO утиче на NO 1 систем није још увек у порпуности расветљен. На основу претходних сазнања је предложено да интеракција NO са O<sub>2</sub><sup>•-</sup> као и конверзија NO у NO<sup>+</sup> или NO<sup>-</sup> могу бити кључни догађаји у повећању експресије гена за NO 1 (429).

Са друге стране, о корелацији H<sub>2</sub>S и слободних радикала се најмање зна. Иако H<sub>2</sub>S није слободни радикал, слично као и •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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S продукује тиолне слободне радикале SH• и S• (430). Ови подаци указују да се H<sub>2</sub>S синтетише локално у високим концентрацијама и да испољава цитотоксични ефекат, слично као и NO. Показано је такође да H<sub>2</sub>S може да утиче на јетрине ензиме укључене у метаболизам ксенобиотика

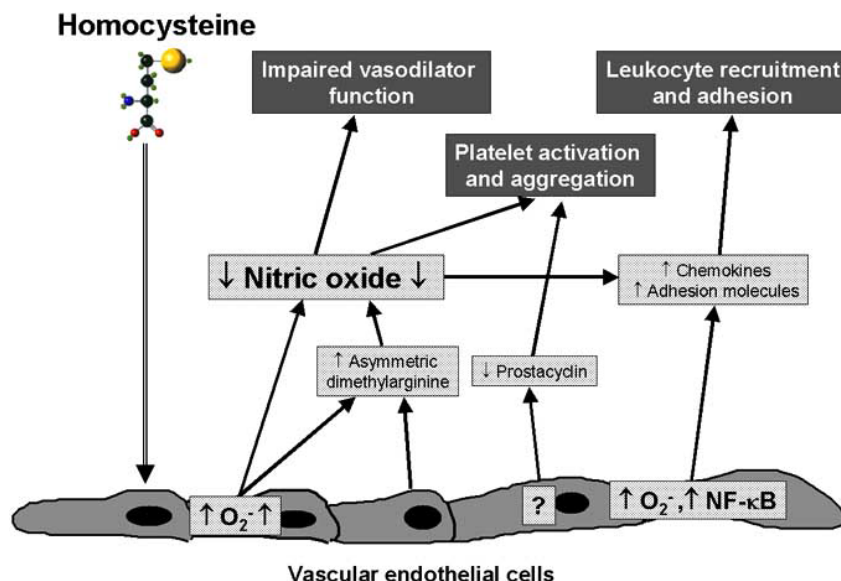
(431), чиме последично утиче и на имунски систем. Ово може бити нарочито изражено у стањима повећане продукције ROS и RNS (432). То даље сугерише да  $H_2S$  може да делује и као инфламаторни медијатор, иако о томе још нема публикованих резултата.

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. Резултат потенцијалне интеракције ових сигналних молекула са слободним радикалима још више допуњује, ионако комплексни мозаик међусобних односа гасотрансмитера, и може бити изузетно важан у етиопатогенези бројних кардиоваскуларних поремећаја. Обзиром да су знања о овим молекуларним интеракцијама скромна, задатак будућих студија, међу којима је и ова, је да нам помогну у њиховом бољем разумевању.

## **1.7. ИНТЕРАКЦИЈА ХОМОЦИСТЕИНА, ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА И ГАСОТРАНСМИТЕРА**

Повезаност метаболизма хомоцистеина, слободних радикала и гасотрансмитера у оквиру кардиоваскуларног система је још увек слабо истражена. Ова трострука молекуларна интеракција је, међутим, најбоље проучена на нивоу васкуларног ендотела (Слика 6). Наиме, сматра се да хомоцистеин своја штетна дејства на ендотел крвних судова остварује највећим делом управо путем стварања слободних радикала: супероксид анијон радикала ( $O_2^-$ ) и водоник пероксида ( $H_2O_2$ ). Овако настали  $O_2^-$  потом може да реагује са азот моноксидом (NO) и да надгради још токсичнији молекул пероксинитрит ( $ONOO^-$ ) који наставља са оштећењем ендотелних ћелија (433). Јасно је да се у реакцији стварања  $ONOO^-$  користи NO чиме се смањује његова биорасположивост и ремети контрола ендотелног васкуларног тонуса, а тиме последично и поспешује ендотелна дисфункција (Слика 6) (434).

Занимљиво да и хомоцистеин тиолактон, као токсични метаболит хомоцистеина, индукује инхибицију синтезе NO од стране iNOS. Ипак, овај ефекат је уочен у нервном систему, приликом генезе епилептичних напада код пацова, тако да паралела са кардиоваскуларним системом захтева нова истраживања (435). Будући да NO делује и као сигнални молекул, можемо увидети да хомоцистеин на овај начин индиректно утиче на концентрацију и активност овог гасотрансмитера, о чему је било речи у претходном делу текста.



Слика 6. Интеракција хомоцистеина и слободних радикала на нивоу васкуларног ендотела

Са друге стране, метаболизам хомоцистеина и гасовитих сигналних молекула могу бити и директно повезани, што се уочава приликом продукције  $H_2S$ . У људском организму (и уопште ткивима свих сисара)  $H_2S$  се највећим делом ствара из хомоцистеина и цистеина у процесу транс-сулфурације под дејством два ензима: цистатион β синтазе (CBS) и цистатион γ лиазе (CSE). У том смислу, концентрација хомоцистеина непосредно може да мења степен продукције и билошке ефекте овог сигналног молекула.

Тек последњих година добијамо више података о интеракцији  $H_2S$  са ROS и RNS. Тако су недавне студије показале да овај гасотрансмитер може да заштити неуроне од оксидационог стреса (436). Претпоставља се да  $H_2S$  може да реагује са различитим RNS као и са  $ONOO^-$  и тако их неутралише (436). Поред тога, новија истраживања су сугерисала да овај гасотрансмитер може да има улогу у заштити бројних ткива од оксидационих оштећења током исхемијско/реперфузионе повреде (437). Митохондријални респираторни ланац је главно место синтезе ROS, поготово током исхемије/реперфузије, тако да  $H_2S$  остварује свој анти-оксидациони ефекат на два начина: инхибицијом транспорта електрона у респираторном ланцу и митохондријалних цитохром оксидаза, као и повећањем активности SOD (437). На тај начин  $H_2S$  представља централну и (најбоље испитану) спону у међусобном садејству хомоцистеина, оксидационог стреса и сигналних гасовитих молекула.

Интеракција хомоцистеина, ROS (и RNS) и CO је, за сада најмање позната. Тек поједине студије су успеле да забележе 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 (438). Егзогена апликација поменутог гасотрансмитера, међутим, спречава експресију тзв. СНОР

протеина чиме зауставља развој ендоплазматског оксидационог стреса и цео апоптотички процес (438).

Иако поседујемо оскудне и недовољно усаглашене информације, на основу свега изнетог можемо уочити да су ове молекулске релације изузетно сложене и веома динамичне, као и да могу имати једну од кључних улога у развоју и одвијању бројних васкуларних патофизиолошких процеса. Упознавање са овим интеракцијама ће неизоставно довести до бољег разумевања ендотелне дисфункције, а самим тим и артериоло- и атеросклеротских промена.

# II

## ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

На основу свега претходно изложеног циљеви наше студије су били следећи:

1. Евалуација ефеката акутне администрације хомоцистеина и супстанци сродних хомоцистеину на функцију миокарда изолованог срца пацова.
2. Испитивање утицаја акутне администрације различитих облика хомоцистеина на коронарну циркулацију изолованог срца пацова.
3. Утврђивање улоге гасних сигналних молекула NO, H<sub>2</sub>S и CO, у одржавању физиолошке функције срчаног мишића и коронарне циркулације.
4. Испитивање ефеката различитих параметара оксидационог стреса (липидних пероксида (TBARS), азот монооксида (NO), супероксид анјон радикала (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), и водоник пероксида (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) на кардиодинамске параметре срчаног рада и коронарну циркулацију.
5. Процена међусобне интеракције хомоцистеина и оксидационог стреса, као и



ефеката исте на функцију миокарда и коронарне циркулације.

6. Испитивање међусобних дејстава хомоцистеина и гасних сигналних молекула, и улоге ове интеракције у функцији миокарда и артеријског система срца.
7. Процена ефеката међусобне интеракције слободних радикала и гасних трансмитера, у присуству хомоцистеина, на функцију срчаног мишића и коронарне васкулатуре.
8. Испитивање механизма путем којих потенцијални међусобни утицај хомоцистеина, гасотрансмитера и слободних радикала учествује у одржавању хомеостазе срчаног рада.

## 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):

#### ***3.1.1. Комплет реагенаса за припремање Krebs-Hensenleit-овог перфузионог раствора:***

Натријум хлорид ( $\text{NaCl}$ , 27.216 g/4L), калијум хлорид ( $\text{KCl}$ , 1.4 g/4L), магнезијум сулфат ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.636 g/4L), калијум дихидроген фосфат ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.0644 g/4L), натријум бикарбонат ( $\text{NaHCO}_3$ , 8.36g/4L), глюкоза ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \times \text{H}_2\text{O}$ , 8.8g/4L) и калцијум хлорид ( $\text{CaCl}_{2(\text{anh.})}$ , 1.117 g/4L).

За испитивање директних утицаја различитих облика хомоцистеина као и ефеката гасних сигналних молекула, на изоловано срце пацова употребљени су комерцијални реагенси *pro analysis* квалитета поменутог произвођача - Sigma–Aldrich Chemie GmbH, (Немачка): DL-хомоцистеин (DL Hcy), Mr 135.18; DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорид (DL Hcy tlhc), Mr 153.63; L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорид (L Hcy tlhc), Mr 153.63; N( $\omega$ )-нитро-L-аргинин метил естар (L-NAME), неселективни инхибитор NOS, Mr 269.69; цинкпротопорфирин IX ((Zn)PPR IX), селективни инхибитор HO 1, Mr 626.03; DL-пропаргилглицин (DL PAG), селективни инхибитор CSE, Mr 113.11.

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

### **3.1.2. Комплет реагенаса за детерминацију индекса липидне пероксидације (TBARS):**

2-тиобарбитурна киселина (ТВА,  $C_4H_4N_2O_2S$ ), Mr 144.15; натријум хидроксид (NaOH) Mr 40.00.

### **3.1.3. Комплет реагенаса за детерминацију азот монооксида (NO) у облику нитрита:**

Сулфанилна киселина (4-амино бензенсулфонска киселина,  $C_6H_7NO_3S$ ), Mr 173.19; N-(1-нафтил)-етилендиамин дихидрохидрат (NEDA,  $C_{12}H_{15}C_{12}N$ ), Mr 259.18; амонијум хлорид ( $NH_4Cl$ ), Mr 53.49; Боракс ( $Na_2B_4O_7 \times 10H_2O$ ), Mr 381.4; 85% орто-фосфорна киселина ( $H_3PO_4$ ),  $\rho=1,685 \text{ gcm}^{-3}$ ; натријум нитрит ( $NaNO_2$ ), Mr 69.00.

### **3.1.4. Комплет реагенаса за детерминацију супероксид ањонског радикала ( $O_2^-$ ):**

TRIS (Трис (хидроксиметил) аминометан,  $C_4H_{11}NO_3$ ), Mr 121.14; 37% хлороводонична киселина (HCl),  $\rho=1,19 \text{ gcm}^{-3}$ , Mr 36.5;  $Na_2EDTA$ , Mr 372.24; Нитро-тетразолијум плаво хлорид (NBT,  $C_{40}H_{30}ClN_{10}O_6$ ), Mr 817.6; Желатин ( $C_{15}H_{11}N_2 NaO_2$ ), Mr 61.5 kDa.

### **3.1.5. Комплет реагенаса за детерминацију водоник пероксида ( $H_2O_2$ ):**

Калијум хидрогенфосфат дихидрат ( $K_2HPO_4 \times 2H_2O$ ) Mr 214.23; калијум дихидрогенфосфат дихидрат ( $KH_2PO_4 \times 2H_2O$ ) Mr 164.09; натријум хлорид (NaCl) Mr 58.44; водоник пероксид ( $H_2O_2$ ), Mr 34.01; D(+)-глукоза монохидрат (декстроза), Mr 198.17; фенол црвено (phenol red,  $C_{19}H_{14}O_5S$ ), Mr 354.4; пероксидаза из коњске ротквице (peroxidase from horse radish – HRPO EC 1.11.1.7), Mr 44 kDa.

## **3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛ**

Родоначелник експерименталне технике испитивања кардиоваскуларне функције изолованог срца пацова, коју смо користили у овој студији је био чувени немачки физиолог Оскар Лангендорф (*Oskar Langendorff* 1853-1908). Ипак, пре детаљног описа овог конкретног експерименталног модела, дужни смо да се на кратко осврнемо на импресивну научну биографију утемељивача овог техничког изума.

### **3.2.1. Историјат**

Познати, али и уобичајени, феномен трагедије генија у конкретном случају манифестовао се чињеницом да је један од највећих кардиоваскуларних физиолога свога времена остао познат по свом техничком изуму, а не по сјајним открићима на пољу кардиоваскуларне медицине (Табела 3):

Табела 3. *Langendorff* -ова открића у кардиоваскуларној физиологији (433)

Година	ОТКРИЋЕ
1878	Вагусна контрола срчане функције
1884	Ендогени аутоматизам срца
1885	Постекстрасистолна потенцијација
1895	<b>Неопходност коронарног протока за контракцију срца сисара</b>

Лангендорф је 1895. године поставио хипотезу да срце сисара не захтева *a priori* присуство крви у својим шупљинама, како би обављало своју функцију. У то време је коронарним артеријама приписивана улога ослобађања миокарда од токсичних метабличких продуката. Лангендорф је, међутим, једним на први поглед компликованим, а заправо невероватно једноставним моделом доказао праву функцију коронарних артерија, као нутритивних крвних судова срца. Наиме он је убризгао нутритивни раствор у срце мачке, које је претходно екстрирпирано из грудног коша, кроз аорту. Подпритиском утиснуте течности, семилунарни записци су се затворили, тако да је једини пут којим је нутритивни раствор могао да прође водио кроз коронарне артерије. Тако изоловано срце могло је да настави са својим радом, уз одржавање притиска течности скоро три часа (439). На тај начин Лангендорф је заправо доказао да срце своје нутритивне потребе задовољава на рачун коронарног протока. У поменутом експерименту, он је забележио следећих десет оригиналних запажања (439):

1. Крв која напушта срце је тамна и сиромашна кисеоником
2. Коронарни перфузиони притисак 90-110 mmHg резултира у коронарном протоку од 4ml/ мин
3. Стабилна контрактилна функција леве коморе може се остварити коронарном перфузијом
4. Вагусна стимулација успорава срце
5. Мускарин успорава, док атропин убрзава срчани рад
6. Калијум хлорид (KCl) доводи до срчаног застоја
7. Нижа температура успорава срце
8. Електростимулација можа довести до фибрилације
9. Прекид коронарног протока доводи до престанка срчаних контракција

10. Поновно успостављање коронарног протока доводи до поновне срчане контрактилне активности

Овакво епохално откриће за кардиоваскуларну физиологију и медицину уопште остало је у сенци великих открића из ове области, која су се догодила исте 1895. године: *Einthoven* је поставио модел електрокардиограма, *Röntgen* је открио X зраке, док је *Frank* поставио модел срчаног рада.

Након овог његовог пионирског подухвата, Лангендорфови сарадници су под његовим стручним руководством наставили усавршавање овог модела, који се принципски (уз логична техничка усавршавања) задржао до данас (440). Оправданост овог модела показује чињеница да се свеке године повећава број научних радова, који користе неку од модификација Лангендорфовог модела у својим истраживањима.

### 3.2.2. Метод ретроградне перфузије изолованог срца при константном притиску

За изучавање функције миокарда и коронарне циркулације определили смо се за модификовани *Langendorff*-ов модел изолованог срца, применљив на изолованом срцу сисара (пас, мачка, зец, заморчић).

Две класичне варијанте *Langendorff*-ове технике које се примењују у експерименталним истраживањима су:

- Перфузија изолованог срца при константном протоку кроз коронарно васкуларно корито;
- Перфузија изолованог срца при константном притиску кроз коронарно васкуларно корито;

при чему је други параметар променљива варијабла. У првој варијанти експерименталног модела променљива варијабла је притисак, који се региструје на писачу посебним системом преносника (трансдјусера), док је у другој варијанти експерименталног модела то проток, који се региструје „*flowmetријски*“, тј. скупљањем венског ефлуента у одређеном временском интервалу или помоћу „*flow-metra*“, који се апликује директно у коронарно артеријско корито.

У оба експериментална модела ради се о средњој вредности променљивог параметра, с обзиром да се апсолутне вредности не могу третирати као поуздане. Узрок томе су специфичности самог срчаног рада: понављање срчаних циклуса, чије радне компоненте (систола и дијастола) не трају исто, фреквенца срца која се сваког тренутка мења, минималне разлике у температури комплексног физиолошког раствора којим се срце перфундује итд. У циљу поузданости се, због тога, одређивање променљивог параметра у функцији задатог параметра региструје у трајању од 5 минута.

Ми смо се определили за другу варијанту модификованог *Langendorff*-овог

модела, који као константну величину има притисак (70 cmH<sub>2</sub>O), док је проток променљива компонента. Однос ових величина постављен је следећом формулом:

$$p = \text{const} / \text{protok} = 1 / \text{radijus}^4$$

Избор овог модела је оправдан, јер коронарна циркулација, као испитивани феномен у нашем истраживању, управо подразумева променљивост протока. Сагледавајући физиолошки аспект, перфузија изолованог срца при константном притиску има предност у односу на другу варијанту експерименталног модела, јер се у интактној циркулацији перфузиони притисак одржава константним (1, 7, 8).

### 3.2.3. *Langendorff* апарат *LF-01 F-P*

Експериментална истраживања у нашој студији су спровођена на *Langendorff* апарату марке *LF-01 F-P* произвођача Experimetria Ltd, Budapest, (Мађарска).

Основне компоненте овог апарата су следеће:

1. Две вертикалне стаклене цеви, исте висине, од којих се цев мањег калибра налази у цеви већег калибра. Између површине ове две цеви циркулише вода, која се убацује у цев већег калибра путем бочних цеви и система црева, а претходно се у воденом купатилу загрева до одређене температуре. У цев мањег калибра се, методом негативног притиска убацује комплексан физиолошки раствор (у нашем случају Krebs-Henseleit-ов раствор), који има сличне перформансе као екстрацелуларна течност. Циркулишућа вода у цеви већег калибра се загрева тако да раствор у цеви мањег калибра на излазу из система има температуру 37 °C тј. оптималну телесну температуру. Цев мањег калибра се завршава излазом, на који се поставља препарат изолованог срца;
2. Резервоара у коме се налази комплексни Krebs-Henseleit-ов раствор, чија је запремина 4 литра, који је спојен са једне стране са унутрашњом цеви мањег калибра, а са друге стране са боцом у којој се налази смеша гасова O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>;
3. Боце са смешом гасова у односу O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>=95%:5%, а која је спојена са резервоаром у коме се налази Krebs-Henseleit-ов раствор. Боца са смешом гасова има двоструки задатак: 1) да постигне физиолошки парцијални притисак кисеоника и угљен диоксида какав егзистира у артеријској крви и 2) да негативним притиском који ствара у резервоару убацује раствор у унутрашњу цев система цеви;
4. Каниле, која спаја изводну цев система цеви и асцедентну аорту изолованог срца

пацова;

5. Воденог купатила које загрева воду у спољашњој цеви и на тај начин индиректно постиже температуру физиолошког раствора од 37 °C (изотермичност);
6. Инфузионе пумпе, којом се жељени агенс адекватном брзином (у зависности од базалног коронарног протока) администрира непосредно на споју каниле и асцедентне аорте,
7. Рачунара са одговарајућим софтвером (*Spel Advanced HaemoSys v3.24*) преко кога се континуирано прате кардиодинамски параметри срчаног рада (Слика 15). Рачунар је повезан са сензорима преко којих добија податке о раду срца.
8. Сензора - трансдјусера који су са једне стране повезани са различитим структурама изолованог срца, а са друге стране са рачунаром. Улога сензора је у континуираном регистровању функције миокарда - леве коморе (промена притисака, систолног и дијастолног притиска, срчане фреквенце, притисака у аорти). На нашем моделу *Langendorff* апарата постоје три врсте сензора: 1) Први сензор (transducer BS4 73-0184) је повезан са лучно савијеном, танком металном цеви на чијем крају се налази балончић (пречника 5mm, latex/ најлон фолија) испуњен дестилованом водом. Овај балончић се након пресецања митралне валвуле убацује у леву комору, надува, и омогућава сензору директно регистровање притисака и срчане фреквенце из ове шупљине срца. На овај начин се региструју следећи параметри функције леве коморе:  $dp/dt \max$  – максимална стопа промене притиска у левој комори, (mmHg/s),  $dp/dt \min$  – минимална стопа промене притиска у левој комори, (mmHg/s), SLVP – систолни притисак у левој комори, (mmHg), DLVP – дијастолни притисак у левој комори, (mmHg), и HR – фреквенца рада срца, (bpm).

Обзиром на морфолошку и функционалну доминантност леве коморе, праћењем ових параметара се може објективно и прецизно испитати функција читавог срца. Чињеница да се сви наведени подаци добијају директно из саме срчане шупљине, доноси овом инвазивном поступку неопходну оригиналност и веродостојност.

2) Други сензор (perfusion pressure transducer) је фиксне позиције и смештен је непосредно уз канилу, односно аорту, чиме омогућава регистровање притисака у аорти. У садашњем истраживању смо преко овог сензора били у могућности да пратимо средњи (артеријски) притисак раствора (крви) у аорти – MBP, (mmHg).

3) Трећи сензор (temperature transducer) је такође фиксне локализације, уз стаклену комору која окружује изоловано срце, и региструје температуру срца.

Комплексни **Krebs Hensenleit**-ов раствор је по свом саставу врло сличан

екстрацелуларној течности. Он се састоји из: NaCl – 118mmol/L, KCl - 4,7 mmol/L, MgSO<sub>4</sub> - 1,66 mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> - 24,88 mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 1,18 mmol/l, глюкоза (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) - 5,55 mmol/L, и CaCl<sub>2</sub> - 2,52 mmol/L. pH раствора износи 7,4. Улога овог раствора је да, захваљујући свом саставу, обезбеди одговарајућу исхрану срца и тиме му омогући несметан рад.

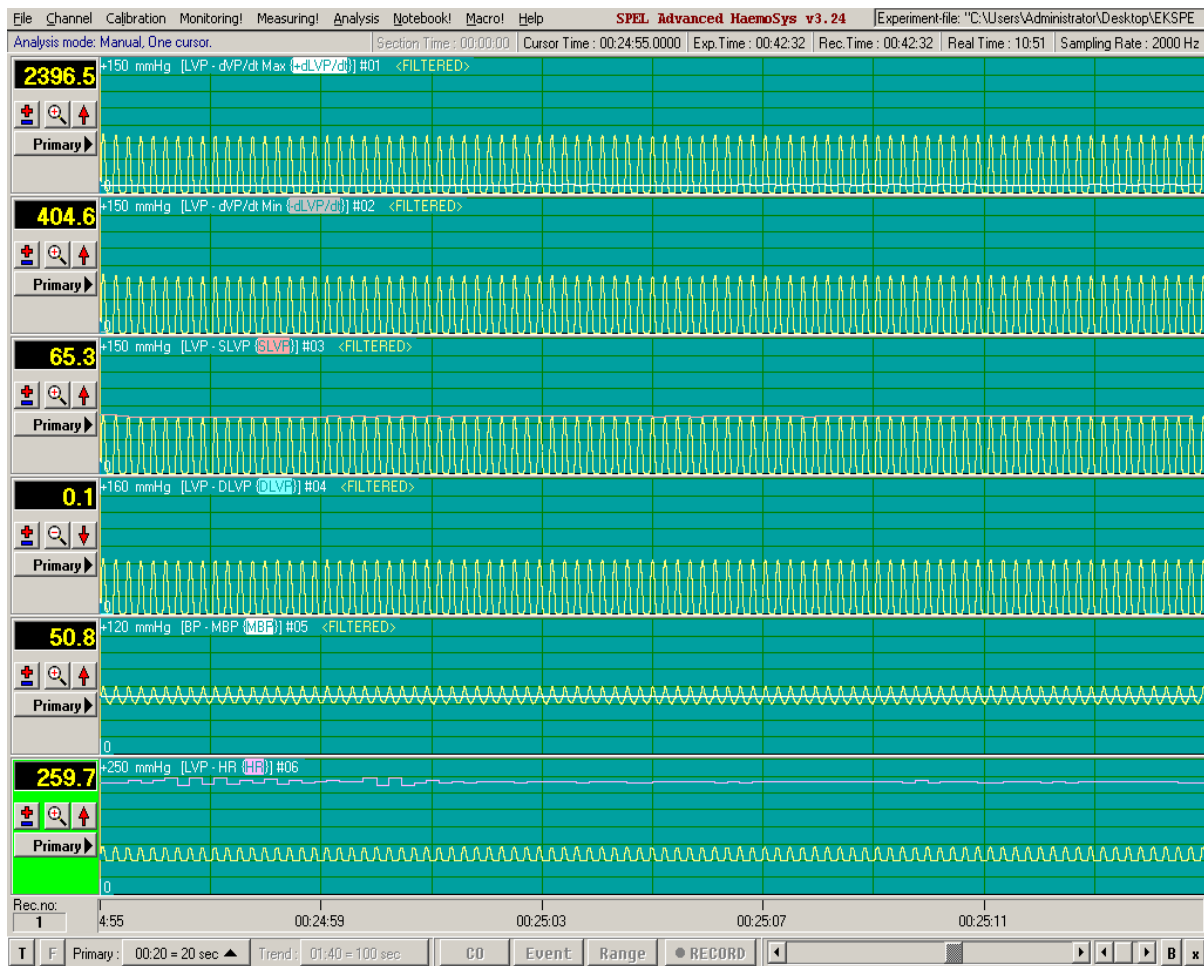
Овакав експериментални модел омогућава регистровање и анализу следећих кардиодиманских параметара (Слика 7):

- $dp/dt \max$  – максимална стопа промене притиска у левој комори, изражава се у mmHg/s,
- $dp/dt \min$  – минимална стопа промене притиска у левој комори, изражава се у mmHg/s,
- SLVP – систолни притисак у левој комори, изражава се у mmHg,
- DLVP – дијастолни притисак у левој комори, изражава се у mmHg, и
- HR – фреквенца рада срца, изражава се као број откуцаја срца у минути (bpm)
- MBP – средњи притисак у аорти, изражава се у mmHg

$dp/dt \max$  је параметар помоћу кога смо индиректно процењивали контрактилну, а  $dp/dt \min$ , релаксантну способност миокарда, као што је поменуто у ранијим радовима (441).

Коронарни проток (CF) је мерен флоуметријски (flowmetrically), и изражен је у ml коронарног венског ефлуента у минути.





Слика 7. Оригинални графички запис једног од експеримената у коме су регистровани сви горе описани параметри

### 3.3. ЕКПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ

Све екперименталне процедуре су се спроводиле у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију Факултета Медицинских Наука у Крагујевцу. У нашем истраживању смо користили модел изолованог срца пацова Wistar albino соја, као најоптималнији за испитивану проблематику. Старосна доб жртвованих пацова је била 8 недеља, пол мушки, а телесна маса  $250 \pm 30$ г грама. Животиње су чуване у стандардним лабораторијским условима (температура ваздуха  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , релативна влажност ваздуха 50%, 12:12 часова циклус светлост:тама, (са почетком светлог периода у 9:00 ч часова) и са слободним приступом води и храни (ad libitum). Животиње су биле подељене у петнаест (15) експерименталних група (12 животиња у групи).

При експерименталном раду су поштоване одредбе прописаних аката (EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC) и принципа етичности. Експериментални протокол је одобрен од стране Етичког одбора за добробит експерименталних животиња Факултета Медицинских Наука Универзитета у Крагујевцу.

Животиње се жртвују након краткотрајне етарске наркозе (дуготрајна би изазвала срчану инсуфицијенцију, што би за наша истраживања било контраиндиковано) цервикалном дислокацијом (Schedule 1 of the Animals/Scientific Procedures, Act 1986, UK). Након тога, уследило је хируршко отварање абдомена, дијафрагма је пресечена лучно, с лева на десно, а затим је грудни кош отворан, брзо, бочно, дуж мамиларне линије.

Да би се одржало у релативној хомеостази, током ових процедура, срце је преливано физиолошким раствором (+4°C). По отварању грудног коша, пресечен је перикард на врху срца и на тај начин срце је било спремно за изоловање. Након пресецања перикарда, крвни судови на бази срца се ресецирају, орган се вади из грудног коша и одмах се ставља у леден физиолошки раствор ((-4) – (-10) °C), чиме се импровизује тзв. „физиолошка клешта“ и метаболички процеси у миокарду се свODE на минимум.

По стављању органа на лед, спроводи се тупа препарација базе срца, са отклањањем свих елемената, изузев асцендентне аорте, јер се кроз њу одвија ретроградна перфузија. Препарисана аорта се, потом, концем причвршћује (везује) за канилу за ретроградну перфузију чиме експеримент почиње. У циљу што поузданијих резултата, односно одржања виталности препарата, потребно је да ова хируршка процедура траје свега 2-3 минута.

Након постављања изолованог срца на апарат по *Langendorff*-у, у пределу леве аурикуле, се пресеца лева преткомора, чиме се приступа митралној валвули. Потом се, пинцетом разарају митрални залистци, што у нашем експерименталном моделу има двоструки значај: 1) на овај начин притисак у левој преткомори је сведен на нулу, чиме се искључује сваки утицај на коронарну циркулацију, који не зависи од функције леве коморе. То омогућава постизање оптималних услова за ретроградну перфузију изолованог срца, јер ток раствора за перфузију има следећи смер: аорта - лева преткомора - лева комора - коронарни синус - коронарне артерије - коронарне вене, што фокусира и простор нашег истраживања на срце и коронарну циркулацију. 2) Прокидањем митралне валвуле се обезбеђује улазак и постављање претходно поменутог сензора у леву комору преко кога се прати функција срчаног мишића (региструју се притисци у левој комори срца:  $dp/dt \max$  – максимална стопа развоја притиска у левој комори, изражава се у mmHg/s,  $dp/dt \min$  – минимална стопа развоја притиска у левој комори, изражава се у mmHg/s, SLVP – систолни притисак у левој комори, изражава се у mmHg, DLVP – дијастолни притисак у левој комори, изражава се у mmHg, и HR – фреквенца рада срца, изражава се као број откуцаја срца у минути).

Као што је већ поменуто, сви параметри функције леве коморе су повезани са

софтверском јединицом и све време трајања експеримената се прате и снимају на монитору рачунара. Проток крви кроз коронарне крвне судове (CF) се изражава у ml/min и мери се скупљањем капи перфузионог раствора који излазе из коронарних крвних судова и срца, флуорометријском методом.

После успостављања стабилног (правилног) срчаног рада (коронарни проток након неколико серија мерења као и сви параметри срчане функције се не мењају значајно), за шта је потребно око пола сата, створени су услови за испитивање функције изолованог срца. Преко инфузионе пумпе се убацује испитивана супстанца (растворена у Krebs Hensenleit-овом), који кроз аорту, заједно са перфузионим раствором, улазе у срце.

Након контролног протокола испитиване су компоненте од значаја за нашу студију. Испитиване супстанце су се апликовале континуираном перфузијом (минимално 5 мин) док се не постигне стабилни коронарни проток.

Истраживање је било подељено у петнаест (15) експерименталних група (12 животиња у групи):

- 1) контролна група (перфузија комплексним Krebs-Hensenleit-овим физиолошким раствором),
- 2) апликација DL-хомоцистеина ( $10\mu\text{mol/l}$ ),
- 3) апликација DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ( $10\mu\text{mol/l}$ ),
- 4) апликација L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ( $10\mu\text{mol/l}$ ),
- 5) апликација цинкпротопорфирина IX – селективног инхибитора HO 1( $10\mu\text{mol/l}$ ), 6) апликација DL-пропаргилглицина - селективног инхибитора CSE ( $10\mu\text{mol/l}$ ),
- 7) ко-апликација DL-хомоцистеина ( $10\mu\text{mol/l}$ ) плус L-NAME ( $30\mu\text{mol/l}$ ),
- 8) ко-апликација DL-хомоцистеина ( $10\mu\text{mol/l}$ ) плус цинкпротопорфирина IX ( $10\mu\text{mol/l}$ ),
- 9) ко-апликација DL-хомоцистеина ( $10\mu\text{mol/l}$ ) плус DL-пропаргилглицина ( $10\mu\text{mol/l}$ ),
- 10) ко-апликација DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ( $10\mu\text{mol/l}$ ) плус L-NAME ( $30\mu\text{mol/l}$ ),
- 11) ко-апликација DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ( $10\mu\text{mol/l}$ ) плус цинкпротопорфирина IX ( $10\mu\text{mol/l}$ ),
- 12) ко-апликација DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ( $10\mu\text{mol/l}$ ) плус DL-пропаргилглицина ( $10\mu\text{mol/l}$ ),
- 13) ко-апликација L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ( $10\mu\text{mol/l}$ ) плус L-NAME ( $30\mu\text{mol/l}$ ),
- 14) ко-апликација L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ( $10\mu\text{mol/l}$ ) плус

цинкпротопорфирина IX ( $10\mu\text{mol/l}$ ),

15) ко-апликација L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ( $10\mu\text{mol/l}$ ) плус DL-пропаргилглицина ( $10\mu\text{mol/l}$ ).

### 3.4. БИОХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ

Биохемијске анализе су одређиване у узорцима коронарног венског ефлуента, који је сакупљан на крају контролног периода и на крају периода апликације испитиване супстанце. Сви реактивни молекули, који су били од интереса за наше истраживање су мерени спектрофотометријском методом на апарату марке Specord S-600 Analytik Jena, Велика Британија.

#### 3.4.1. ОДРЕЂИВАЊЕ ИНДЕКСА ЛИПИДНЕ ПЕРОКСИДАЦИЈЕ (TBARS)

Индекс липидне пероксидације, као један од параметара оксидационог стреса, је одређиван индиректно преко продукта реакције липидне пероксидације са тиобарбитурном киселином, одакле и потиче скраћеница TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances). У нашим истраживањима ниво TBARS-а у коронарном венском ефлуенту смо одређивали спектрофотометријски (442). Метода се заснива на одређивању нивоа липидних пероксида на основу реакције једног од њих, малонилдиалдехида (MDA) са тиобарбитурном киселином (ТВА).

У епрувете ( $12\times 100$ ) пипетирано је  $800\ \mu\text{l}$  коронарног венског ефлуента и  $200\ \mu\text{l}$  1% ТВА у  $0.05\ \text{M}$  NaOH. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћена је еквивалентна количина Krebs-Hensenleitov-ог раствора. Након пипетирања, узорци су инкубирани у воденом купатилу 15 минута на  $100\ ^\circ\text{C}$ . Након инкубације, узорци су прилагођени собној температури, па се приступа детерминисању концентрације ослобођених TBARS у коронарни венски ефлуент спектрофотометријски на таласној дужини од  $\lambda=530\text{nm}$ .

1. Концентрација ослобођених TBARS добијана је на основу следеће једначине:

$$\text{nmol TBARS/ml ефлуента} = \Delta A (A_u - A_{sp}) / 1.56 \times 1.25,$$

при чему је  $A_u$  апсорбанца узорка, док је  $A_{sp}$  апсорбанца слепе пробе, док су 1.56 и 1.25 корекциони фактор за овај есеј.

2. Након тога, *количина* ослобођених TBARS по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин:

$$\text{nmol TBARS/минуту/g wt} = \Delta A / 1.56 \times 1.25 \times \text{CF/m}_{\text{срца}}$$

Важно је напоменути да се, за разлику од свих осталих биохемијских параметара, ниво TBARS изражава у  $\mu\text{M}$ , док је количина осталих молекула изражавана у  $\text{nM}$ . Разлог је у количини TBARS, која је за један ранг величина већа од свих осталих параметара. Овакав наш резултат је последица неспецифичности TBARS, као теста, јер он представља сумацију целог једног начина деловања реактивних кисеоничних и азотних врста, док сви остали параметри везани за појединачне молекуле, имају различите механизме дејства, као појединачне кисеоничне врсте.

### 3.4.2. ОДРЕЂИВАЊЕ НИТРИТА ( $\text{NO}_2^-$ )

Одређивање количине ослобођених нитрита у коронарном венском ефлуенту представљало је за нас најдоступнију индиректну методу за одређивање функционалности ендотелног L-аргинин:NO система у коронарној циркулацији. С обзиром да су методе за директно одређивање азотног монооксида (NO) нама за сада недоступне, спектрофотометријска метода одређивања количине ослобођених нитрита (443) представља доступну и довољно поуздану методу за ову процену. С обзиром да се у реакцији са молекуларним кисеоником:



ствара еквимоларна количина нитрита, можемо са веома великом сигурношћу тврдити да количина ослобођених нитрита у коронарном венском ефлуенту представља количину ослобођеног NO-а. Ова наша хипотеза је до сада потврђена радовима многих аутора (444), иако је наша истраживачка група изнела у претходним годинама једно потпуно ново тумачење, а то је да нитрити могу бити и индикатор разградње азотног монооксида (445). У сваком случају, за овај аспект нашег истраживања, спектрофотометријско одређивање је технички и научно потпуно прихватљиво.

Биохемијски се ова метода заснива на употреби Griess-реагенса, који са нитритима гради диазо-комплекс, који даје љубичасту боју. Griess-ов реагенс се припрема *ex tempore*, непосредно пре аналитичког одређивања, мешањем једнаких запремина (v/v) 1 % сулфанилне киселине, растворене у 5 % орто-фосфорној киселини (може се чувати на собној температури) и 0.1 % воденог раствора: N-(1-нафтил)-етиленамин дихидрохлорида (NEDA), који се чува у тамној бочици на 4 °C, због своје

високе фотохемијске реактивности.

У епрувете (12 x 100) је пипетирано 1 ml коронарног венског ефлуента, 250  $\mu$ l свеже направљеног Griess-ов реагенса и 125  $\mu$ l амонијачног пуфера (pH=9.0), кога сачињавају амонијум хлорид ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) и натријум тетраборат ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ). Амонијачни пуфер, који се у току припеме мора загревати, због изузетно слабе растворљивост натријум тетрабората, има за сврху стабилизацију диазо-комплекса. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћено је 1 ml Krebs-Hensenleitov-ог раствора.

Концентрација ослобођених нитрита у узорцима одређивана је на основу калибрационе криве. Калибрациона крива је конструисана на основу екстинкција узорака, који су у себи садржале познату концентрацију нитрита, након њихове реакције са Griess-овим реагенсом у присуству пуфера. Добијана је пипетирањем различитих количина воденог раствора 1 mM  $\text{NaNO}_2$  у 1 ml Krebs-Hensenleitov-ог раствора и то: 3, 6, 12, 24  $\mu$ l, чиме је добијена концентрација нитрита од: 2.18, 4.37, 8.73 и 17.34 nmol  $\text{NO}_2^-$ /ml. Након стабилизације боје на собној температури 5-10 минута приступа се детерминисању концентрације ослобођених нитрита спектрофотометријски на таласној дужини од  $\lambda=550$  nm. Концентрација, а затим количина ослобођених нитрита добијана је на основу:

1. Одређивања стандардног фактора (F), који се добијао из следеће једначине:

#### **Екстинкција стандарда-екстинкција слепе пробе**

##### **Концентрација $\text{NaNO}_2$ у стандарду**

за сваки појединачни стандард (F1-F4), а затим добијањем њихове аритметичке средине.

2. Дељењем разлике екстинкција узорка и слепе пробе са стандардом F:

$$\text{nmol NO}_2/\text{ml ефлуента} = \Delta E (E_u - E_{sp})/F.$$

3. Након тога, **количина** ослобођених нитрита по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин:

$$\text{nmol NO}_2/\text{минут/g wt} = \Delta E/F \times CF (\text{коронарни проток})/m_{\text{срца}}$$

### **3.4.3. ОДРЕЂИВАЊЕ СУПЕРОКСИД АНИОН РАДИКАЛА ( $\text{O}_2^-$ )**

Одређивање количине супероксид анион радикала ( $\text{O}_2^-$ ) у коронарном венском ефлуенту заснива се на реакцији  $\text{O}_2^-$  са нитро тетразолијум плавим (**Nitro Blue**

**Tetrazolium - NBT**) до нитроформазаан плавог (446). Мерење се врши на таласној дужини максималне апсорпције  $\lambda_{\max}=550\text{nm}$ . Есејна смеша (“assay mixture”) садржи: 50 mM TRIS-HCl пуфера (pH=8.6), 0.1 mM EDTA, 0.1 mg/ml желатина и 0.1 mM NBT. Пре употребе раствор се претходно гасира азотом под притиском у трајању од једног часа.

У епрувете (12x100) је пипетирано 50  $\mu\text{l}$  коронарног венског ефлуента и 950  $\mu\text{l}$  есејне смеше, чиме реакција отпочиње. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћена је адекватна количина Krebs-Hensenleitov-ог раствора. На самом почетку реакције измери се екстинкција смеше и нотира се као екстинкција  $E_1$ . Сваких 60 секунди се врши мешање пластичним штапићем и нотира екстинкција након мешања до своје стабилизације, што подразумева две узастопне приближн о исте екстинкције. Последња екстинксија се означава као  $E_2$ . Исти поступак се примењује и за слепу пробу.

1. Концентрација ослобођеног  $\text{O}_2^-$  добијена је на основу следећих једначина

$$\Delta E_u = E_{2u} - E_{1u} \text{ (за узорак)}$$

$$\Delta E_{sp} = E_{2sp} - E_{1sp} \text{ (за слепу пробу)}$$

$$\Delta E = \Delta E_u - \Delta E_{sp}$$

$$\text{nmol O}_2^-/\text{ml ефлуента} = \Delta E / 0.015 \times 1 / 0.05$$

2. Након тога, **количина** ослобођеног  $\text{O}_2^-$  по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин

$$\text{nmol O}_2^-/\text{минут/g} = \Delta E / 0.015 \times 1 / 0.05 \times \text{CF}/m_{\text{срца}}$$

#### 3.4.4. ОДРЕЂИВАЊЕ ВОДОНИК ПЕРОКСИДА ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

Детерминација количине водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) заснива се на оксидацији фенол црвеног помоћу водоник пероксид реакције која је катализована ензимом пероксидазом из коњске ротквице (*HorserRadishPerOxidase* - HRPO). Ова реакција резултује формирањем једињења чији је максимум апсорпције  $\lambda_{\max}=610\text{nm}$  (447). Линеарна зависност апсорбанце 610nm од концентрациј  $\text{H}_2\text{O}_2$  је постојана за 1-60  $\mu\text{M}$  опсег концентрација (1-60 nmol/ml). Ова метода омогућује детерминацију настајања и ослобађања  $\text{H}_2\text{O}_2$  за временски интервал од 5-60 минута. У епрувете (12x100) пипетирано је 200  $\mu\text{l}$  коронарног венског ефлуента и 800  $\mu\text{l}$  свеже направљеног раствора

фенол црвеног (*Phenol Red Solution-PRS*) који садржи 140 mM NaCl, 10 mM калијум фосфатног пуфера ( $pH=7$ ), 5,5 mM D(+)-глюкозе и 0,28 mM фенол црвеног. Узорцима се затим дода 10  $\mu$ l (1:20) HRPO, припремљен *ex tempore*. Узорци су отављани на собној температури 10 минута, а затим се подеси  $pH \approx 12$ , помоћу 1 M NaOH. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћена је адекватна количина Krebs-Hensenleitov-ог раствора. Концентрација ослобођеног  $H_2O_2$  у коронарном венском ефлуенту израчунавана је на основу калибрационог дијаграма (стандардне криве), одређиваног за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве, користи се стандардни (Stock) раствор  $H_2O_2$ , уз претходну проверу концентрације ( $A_{230}$  за 10 mM  $H_2O_2$  износи 0,810). У 3 епрувете је пипетирано: (уместо коронарног венског ефлуента) 5, 10 и 20  $\mu$ l, 1 mM раствора  $H_2O_2$ , 200  $\mu$ l дестиловане, 800  $\mu$ l раствора фенол црвеног и 10  $\mu$ l (1:20) HRPO. Након инкубације од 10 минута на собној температури, подешена је  $pH \approx 12$  помоћу 1 M NaOH (10  $\mu$ l). Тако је финална концентрација  $H_2O_2$  у 3 узорка стандарда износила: 2,75; 5,49; и 10,99 nmol/  $H_2O_2$ /ml. Мерење апсорбанце (A) спровођене су на таласној дужини максималне апсорпције  $\lambda_{max}=610nm$ , у стакленим киветама, запремина 1 ml на спектрофотометру LKB Biochrom. модел: Ulltrospec 4050. Од добијених апсорбанци одузима се вредност апсорбанце слепе пробе (B), чиме се добија коначна апсорбанца ( $\Delta A$ ). Концентрација, а затим и количина ослобођеног  $H_2O_2$  у коронарном венском ефлуенту израчунавана је на основу:

1. Фактор апсорбанце (F) по једном nmol-у водоник пероксида:

$$F = \Delta A / \text{nmol } H_2O_2 / \text{cuv}$$

2. На основу апсорбанце узорка на  $\lambda_{max}=610nm$  ( $A_u$ ) и њеног упоређивања са слепом пробом ( $A_{sp}$ ) израчунава се финална апсорбанца ( $\Delta A$ ) ( $A = A_u - A_{sp}$ ). Помоћу овако добивене апсорбанце, фактора F и количине коронарног венског ефлуента употребљеног опотребљеног у есеју (200 ml) и израчунавана је концентрација и количина  $H_2O_2$  у коронарном венском ефлуенту по формули:

$$\text{nmol } H_2O_2 / \text{ml ефлуента} = \Delta A / F$$

3. Након тога, **количина** ослобођеног  $H_2O_2$  по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин:

$$\text{nmol } H_2O_2 / \text{ml} / \text{минут/g wt} = \Delta A / F \times CF / m_{\text{срца}}$$



### 3.5. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Статистичка обрада експерименталних података је спроведена на следећи начин:

- 1) За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, користила се: фреквенција, проценти, узорачка средња вредност, узорачка медијана, узорачка стандардна девијација, ранг и 95% интервали поверења.
- 2) За испитивање нормалности расподеле употребљени су тестови *Kolmogorov Smirnov* и *Shapiro Wilk*, и графици: хистограм и *normal QQ plot*.
- 3) За тестирање разлика између параметара, у зависности од њихове природе, користио се Студентов т-тест, *Mann-Whitney* тест, Фишеров тест апсолутне вероватноће, једнофакторска или двофакторска анализа варијансе. Приликом тестирања разлика између параметара, у случају постојања више подгрупа, употребљавао се *Bonferroni* тест.
- 4) Статистичка обрада података је рађена у статистичком пакету *SPSS 19.0 for Windows*.

# **IV**

## **РЕЗУЛТАТИ**

### **4.1. ЕФЕКТИ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА**

#### **4.1.1. УТИЦАЈ DL-ХОМОЦИСТЕИНА ( $10\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА**

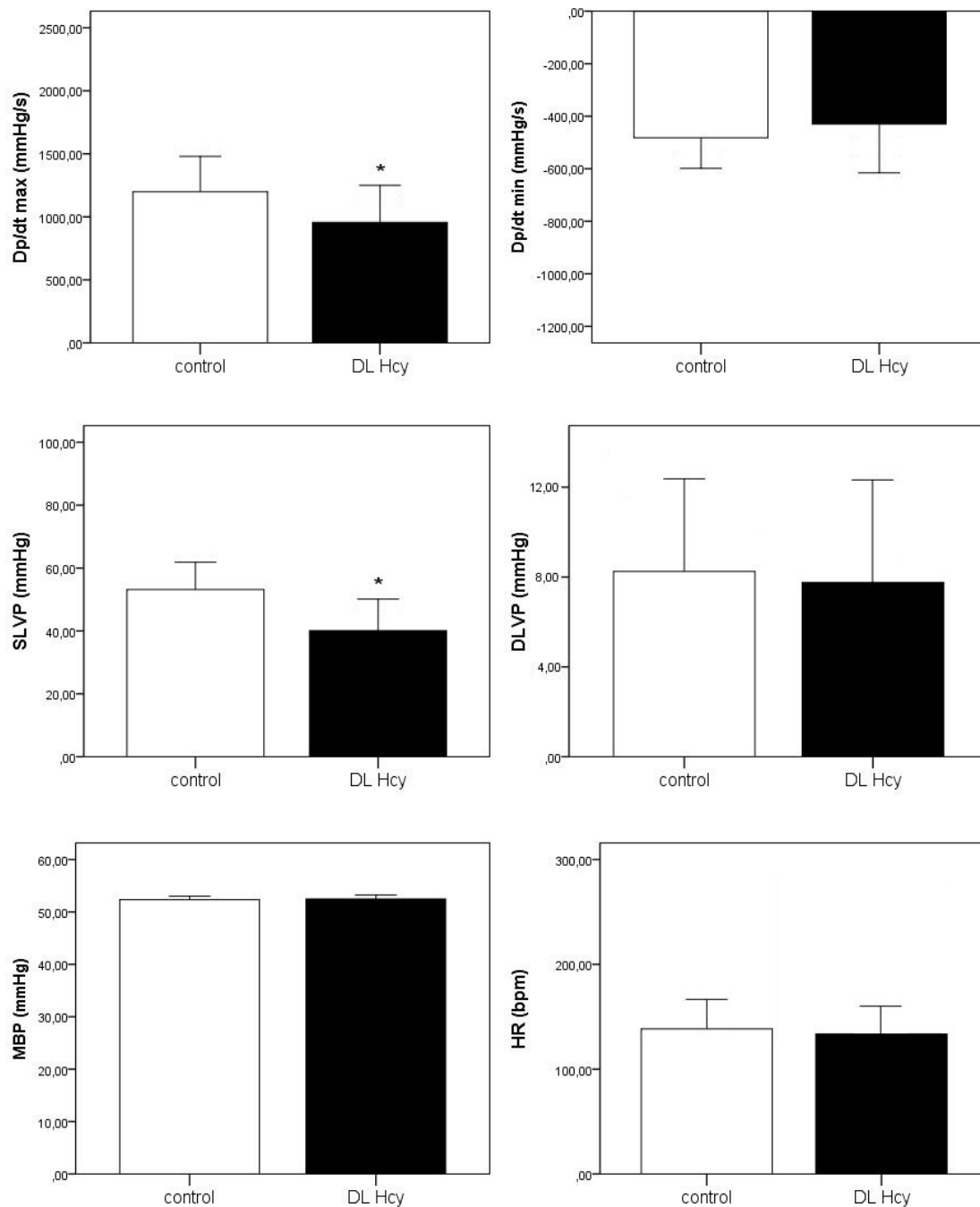
Ефекти апликације DL-хомоцистеина (10 $\mu$ mol/l) на кардиодинамске параметре приказани су у Табели 4 и на Графику 1.

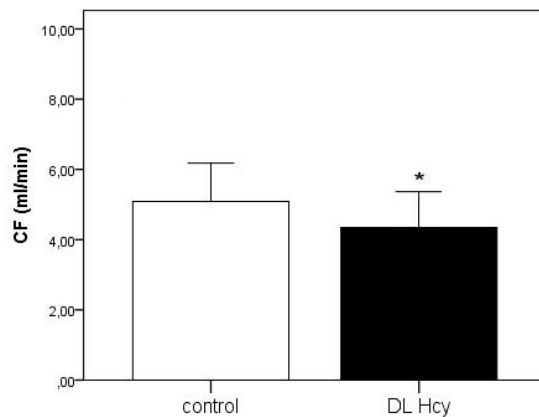
Након апликације DL-хомоцистеина (DL Hcy) је дошло до статистички значајног смањења максималне стопе промене притиска у левој комори (dp/dt max), систолног притиска леве коморе (SLVP), и коронарног протока (CF).

Табела 4. Кардиодинамски параметри пре и након апликације DL-хомоцистеина (10 $\mu$ mol/l).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SD)	DL Hcy (X $\pm$ SD)	Статистичка значајност разлике
<b>dp/dt max</b> (mmHg/s)	1246.5 $\pm$ 233.8	960.5 $\pm$ 258.0	* <i>p</i> < 0.05
<b>dp/dt min</b> (mmHg/s)	-475.2 $\pm$ 143.0	-415.8 $\pm$ 209.1	<i>p</i> > 0.05
<b>SLVP</b> (mmHg)	55.6 $\pm$ 11.2	42.6 $\pm$ 9.6	* <i>p</i> < 0.05
<b>DLVP</b> (mmHg)	8.4 $\pm$ 4.2	7.6 $\pm$ 5.1	<i>p</i> > 0.05
<b>MBP</b> (mmHg)	52.3 $\pm$ 0.3	52.5 $\pm$ 0.4	<i>p</i> > 0.05
<b>HR</b> (bpm)	140.1 $\pm$ 32.9	134.0 $\pm$ 31.6	<i>p</i> > 0.05
<b>CF</b> (ml/min)	5.2 $\pm$ 1.1	4.4 $\pm$ 1.1	* <i>p</i> < 0.05

**График 1.** Разлика у вредностима кардиодинамских параметара ( $X \pm SD$ ) пре и након апликације DL-хомоцистеина ( $10 \mu\text{mol/l}$ ).





#### 4.1.2. УТИЦАЈ DL-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu$ mol/l) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

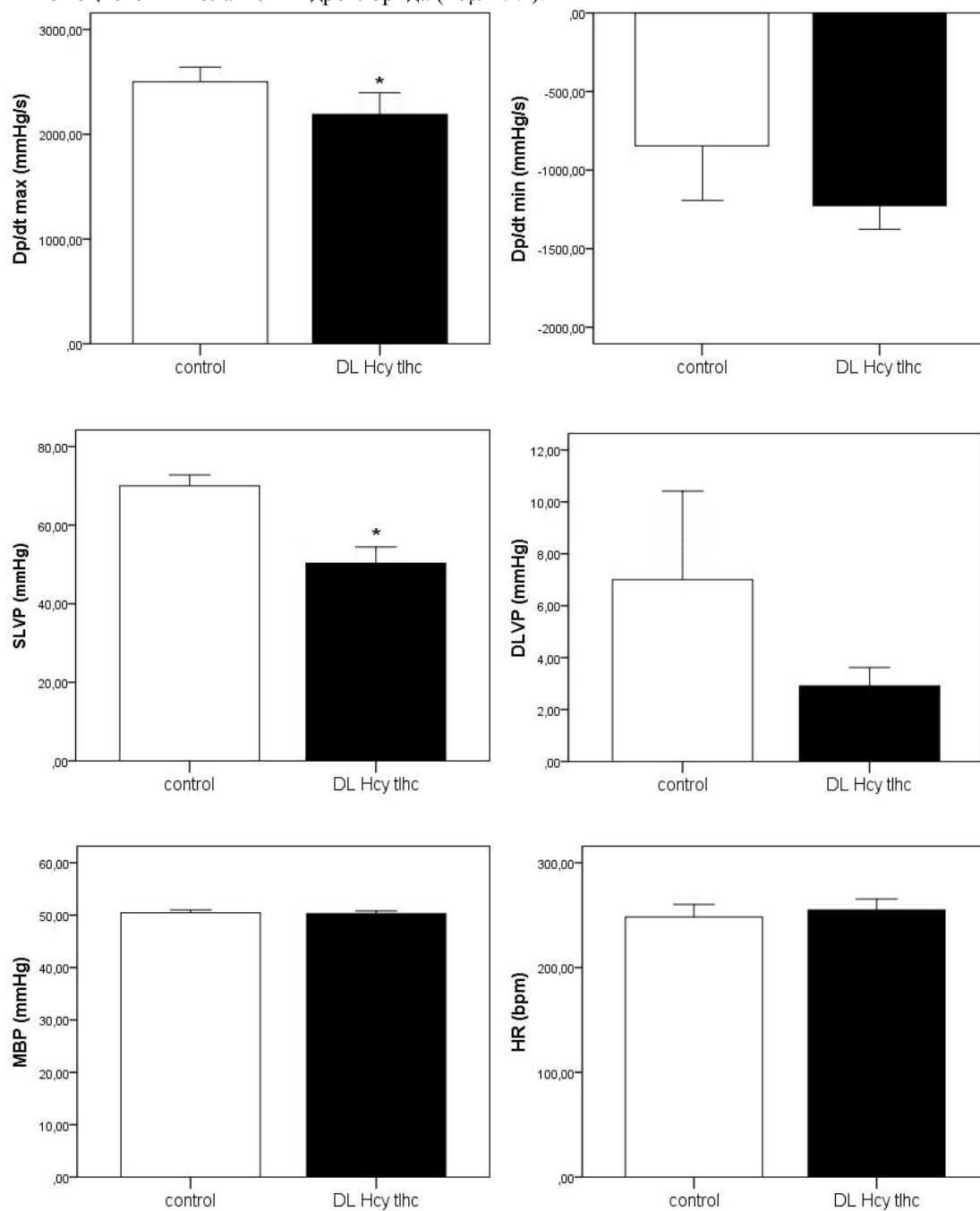
Ефекти апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l) на кардиодинамске параметре приказани су у Табели 5 и на Графику 2.

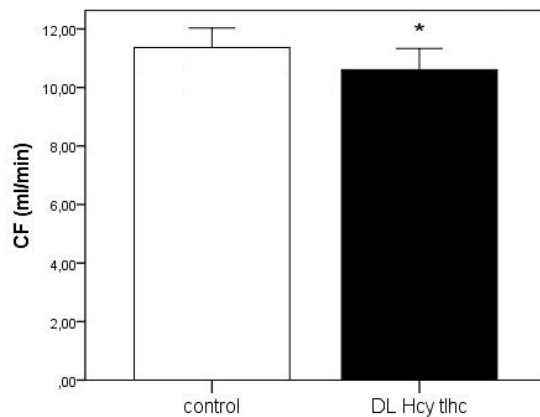
Након апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (DL Hcy tlhc) је дошло, такође, до статистички значајног смањења максималне стопе промене притиска у левој комори (dp/dt max), систолног притиска леве коморе (SLVP), и коронарног протока (CF).

Табела 5. Кардиодинамски параметри пре и након апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SD)	DL Hcy tlhc (X $\pm$ SD)	Статистичка значајност разлике
<b>dp/dt max</b> (mmHg/s)	2590.8 $\pm$ 160.7	2222.8 $\pm$ 231.0	* $p < 0.05$
<b>dp/dt min</b> (mmHg/s)	-836.3 $\pm$ 358.7	-1292.8 $\pm$ 177.9	$p > 0.05$
<b>SLVP</b> (mmHg)	70.1 $\pm$ 3.8	53.9 $\pm$ 4.8	* $p < 0.05$
<b>DLVP</b> (mmHg)	7.1 $\pm$ 3.5	2.9 $\pm$ 0.8	$p > 0.05$
<b>MBP</b> (mmHg)	50.4 $\pm$ 0.3	50.3 $\pm$ 0.2	$p > 0.05$
<b>HR</b> (bpm)	258.2 $\pm$ 16.2	265.9 $\pm$ 15.3	$p > 0.05$
<b>CF</b> (ml/min)	11.5 $\pm$ 0.6	10.7 $\pm$ 0.6	* $p < 0.05$

**График 2.** Разлика у вредностима кардиодинамских параметара ( $X \pm SD$ ) пре и након апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ( $10 \mu\text{mol/l}$ ).





#### 4.1.3. УТИЦАЈ L-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu$ mol/l) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

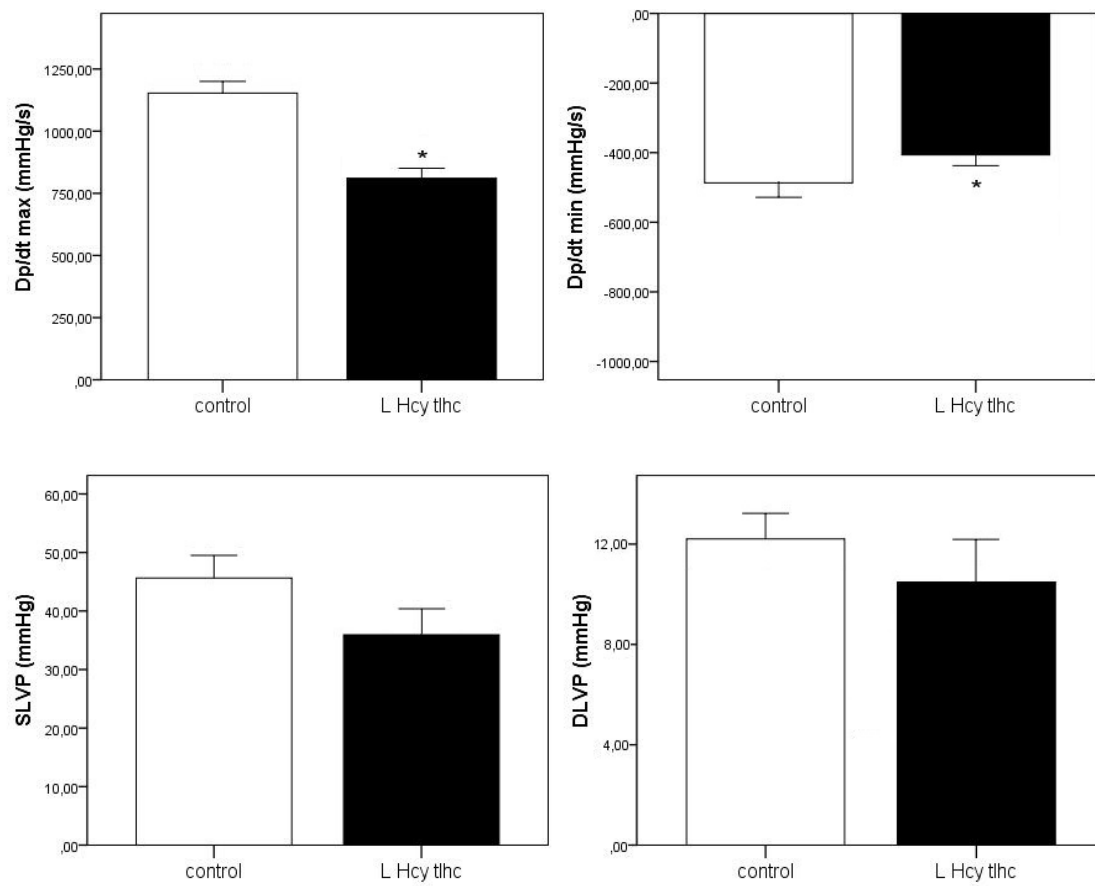
Ефекти апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l) на кардиодинамске параметре приказани су у Табели 6 и на Графику 3.

Након апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (L Hcy tlhc) дошло је, до статистички значајног смањења максималне стопе промене притиска у левој комори (dp/dt max), минималне стопе промене притиска у левој комори (dp/dt min), систолног притиска леве коморе (SLVP), и коронарног протока (CF).

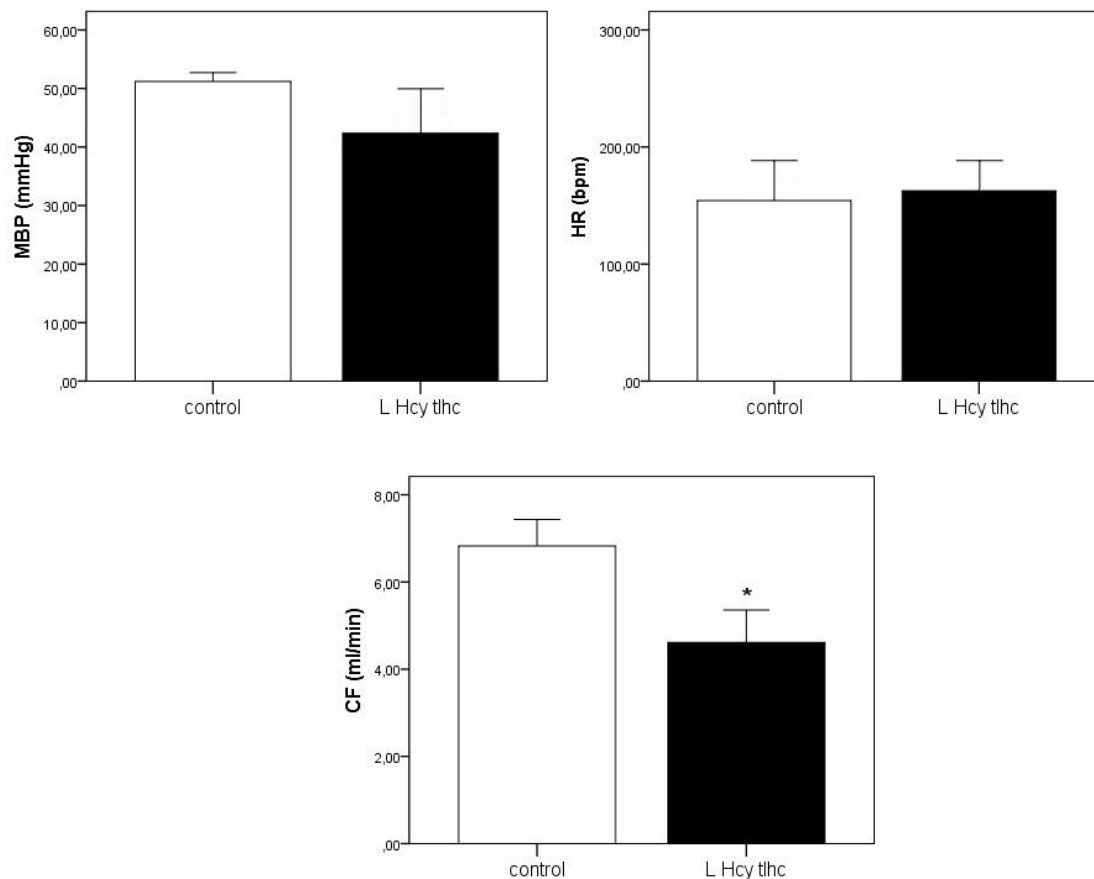
Табела 6. Кардиодинамски параметри пре и након апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SD)	L Hcy tlhc (X $\pm$ SD)	Статистичка значајност разлике
<b>dp/dt max</b> (mmHg/s)	1135.4 $\pm$ 38.0	806.2 $\pm$ 35.9	* <i>p</i> < 0.05
<b>dp/dt min</b> (mmHg/s)	-474.1 $\pm$ 45.4	-400.5 $\pm$ 31.1	* <i>p</i> < 0.05
<b>SLVP</b> (mmHg)	46.0 $\pm$ 3.3	37.2 $\pm$ 4.1	<i>p</i> > 0.05
<b>DLVP</b> (mmHg)	12.3 $\pm$ 1.3	10.3 $\pm$ 2.7	<i>p</i> > 0.05
<b>MBP</b> (mmHg)	50.4 $\pm$ 1.0	43.0 $\pm$ 7.4	<i>p</i> > 0.05
<b>HR</b> (bpm)	158.5 $\pm$ 27.2	169.0 $\pm$ 22.3	<i>p</i> > 0.05
<b>CF</b> (ml/min)	6.7 $\pm$ 0.7	4.8 $\pm$ 0.8	* <i>p</i> < 0.05

**График 3.** Разлика у вредностима кардиодинамских параметара ( $X \pm SD$ ) пре и након апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ( $10 \mu\text{mol/l}$ ).







## 4.2. ЕФЕКТИ ИНХИБИТОРА РАЗЛИЧИТИХ ГАСОТРАНСМИТЕРА НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

### 4.2.1. УТИЦАЈ ЦИНКПРОТОПОРФИРИНА IX ( $10\mu\text{mol/l}$ ) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти апликације инхибитора синтезе CO, цинкпротопорфирина IX ( $10\mu\text{mol/l}$ ), на кардиодинамске параметре приказани су у Табели 7 и на Графику 4.

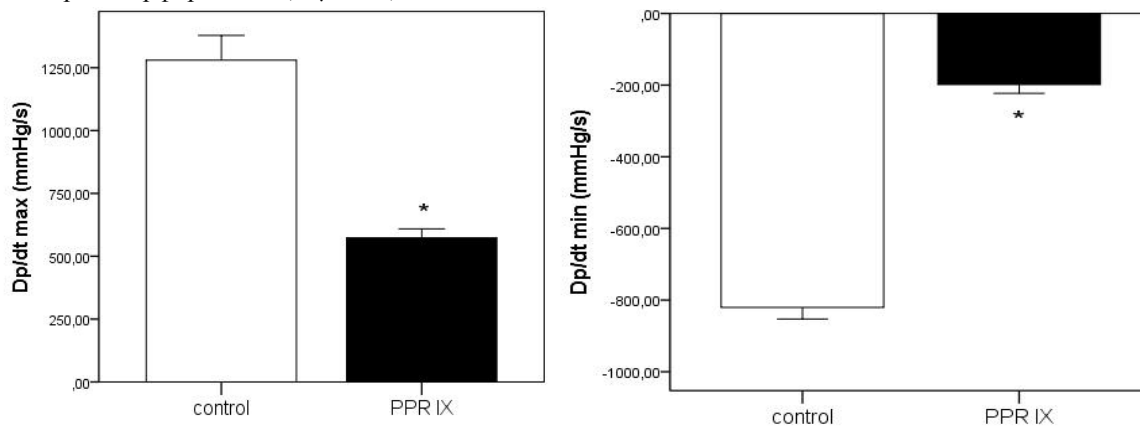
Након апликације цинкпротопорфирина IX (PPR IX) дошло је до статистички значајног смањења вредности свих кардиодинамских параметара.

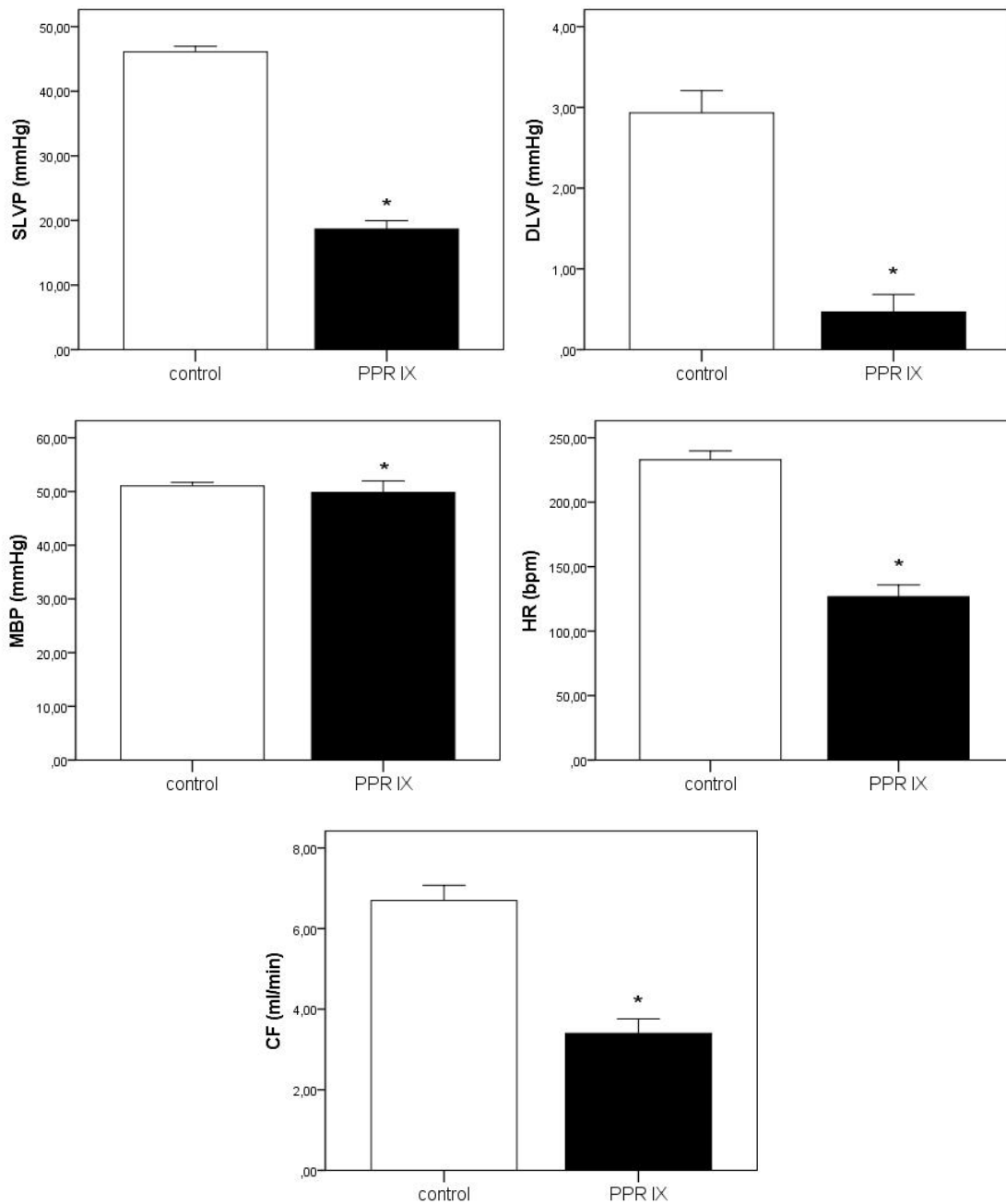
Табела 7. Кардиодинамски параметри пре и након апликације цинкпротопорфирина IX ( $10\mu\text{mol/l}$ ).

Параметар	Контрола ( $X\pm SD$ )	PPR IX ( $X\pm SD$ )	Статистичка значајност разлике
<b>dp/dt max</b> (mmHg/s)	1279.96 $\pm$ 98.49	572.91 $\pm$ 36.23	* $p < 0.05$
<b>dp/dt min</b> (mmHg/s)	-820.33 $\pm$ 32.41	-198.43 $\pm$ 24.74	* $p < 0.05$
<b>SLVP</b> (mmHg)	46.08 $\pm$ 0.86	18.66 $\pm$ 1.28	* $p < 0.05$

<b>DLVP</b> (mmHg)	2.93±0.27	0.46±0.21	* <i>p</i> < 0.05
<b>MBP</b> (mmHg)	51.05±0.61	49.81±2.14	* <i>p</i> < 0.05
<b>HR</b> (bpm)	232.86±6.97	126.75±9.02	* <i>p</i> < 0.05
<b>CF</b> (ml/min)	6.70±0.37	3.40±0.35	* <i>p</i> < 0.05

**График 4.** Разлика у вредностима кардиодинамских параметара ( $X \pm SD$ ) пре и након апликације цинкпротопорфирина IX ( $10 \mu\text{mol/l}$ ).





#### 4.2.2. УТИЦАЈ DL-ПРОПАРГИЛГЛИЦИНА (10 $\mu$ mol/l) НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

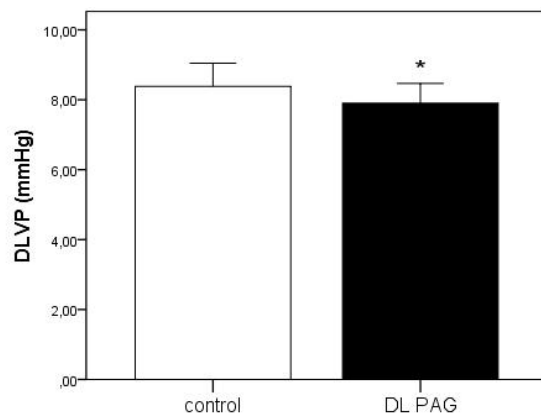
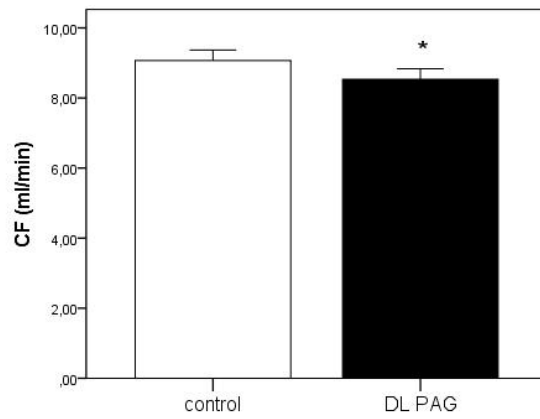
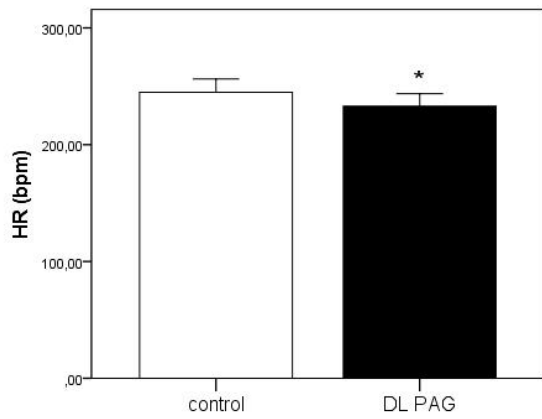
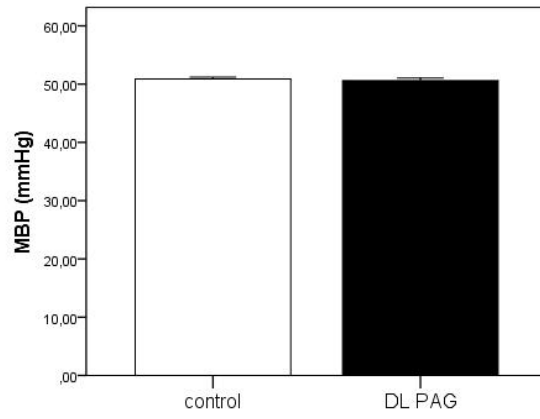
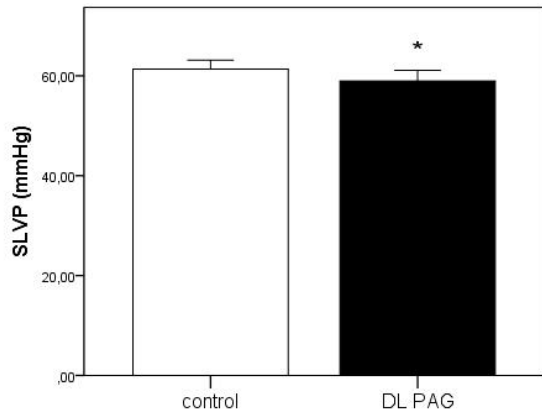
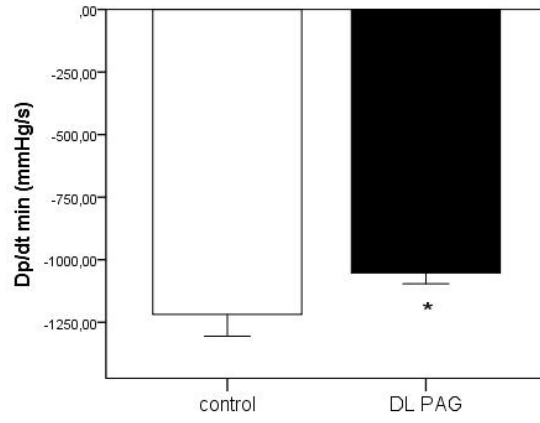
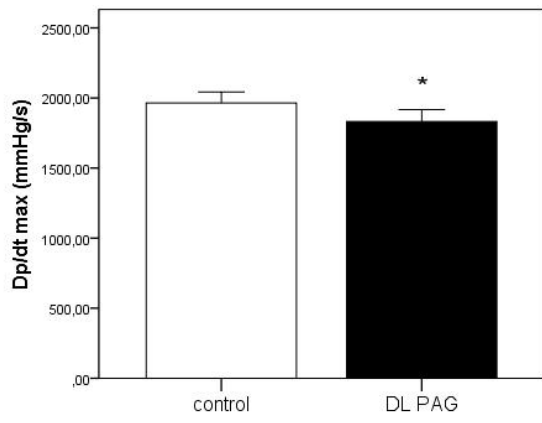
Ефекти апликације инхибитора синтезе H<sub>2</sub>S, DL-пропаргилглицина (10 $\mu$ mol/l), на кардиодинамске параметре приказани су у Табели 8 и на Графику 5.

Након апликације DL-пропаргилглицина (DL PAG) дошло је до статистички значајног смањења вредности свих кардиодинамских параметара, осим средњег притиска у аорти (MBP).

**Табела 8.** Кардиодинамски параметри пре и након апликације DL-пропаргилглицина (10 $\mu$ mol/l).

<b>Параметар</b>	<b>Контрола (X<math>\pm</math>SD)</b>	<b>DL PAG (X<math>\pm</math>SD)</b>	<b>Статистичка значајност разлике</b>
<b>dp/dt max</b> (mmHg/s)	1964.51 $\pm$ 78.51	1831.55 $\pm$ 85.12	* <i>p</i> < 0.05
<b>dp/dt min</b> (mmHg/s)	-1218.16 $\pm$ 87.23	-1052.51 $\pm$ 43.19	* <i>p</i> < 0.05
<b>SLVP</b> (mmHg)	61.33 $\pm$ 1.81	58.96 $\pm$ 2.14	* <i>p</i> < 0.05
<b>DLVP</b> (mmHg)	8.38 $\pm$ 0.66	7.90 $\pm$ 0.56	* <i>p</i> < 0.05
<b>MBP</b> (mmHg)	50.88 $\pm$ 0.31	50.58 $\pm$ 0.44	<i>p</i> > 0.05
<b>HR</b> (bpm)	244.90 $\pm$ 11.35	232.96 $\pm$ 10.72	* <i>p</i> < 0.05
<b>CF</b> (ml/min)	9.06 $\pm$ 0.30	8.53 $\pm$ 0.30	* <i>p</i> < 0.05

**График 5.** Разлика у вредностима кардиодинамских параметара (X $\pm$ SD) пре и након апликације DL-пропаргилглицина (10 $\mu$ mol/l).



### 4.3. УТИЦАЈ ИНХИБИЦИЈЕ NO НА КАРДИДИНАМСКЕ ЕФЕКТЕ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

#### 4.3.1. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ DL-ХОМОЦИСТЕИНА (10 $\mu$ mol/l) И L-NAME (30 $\mu$ mol/l) НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

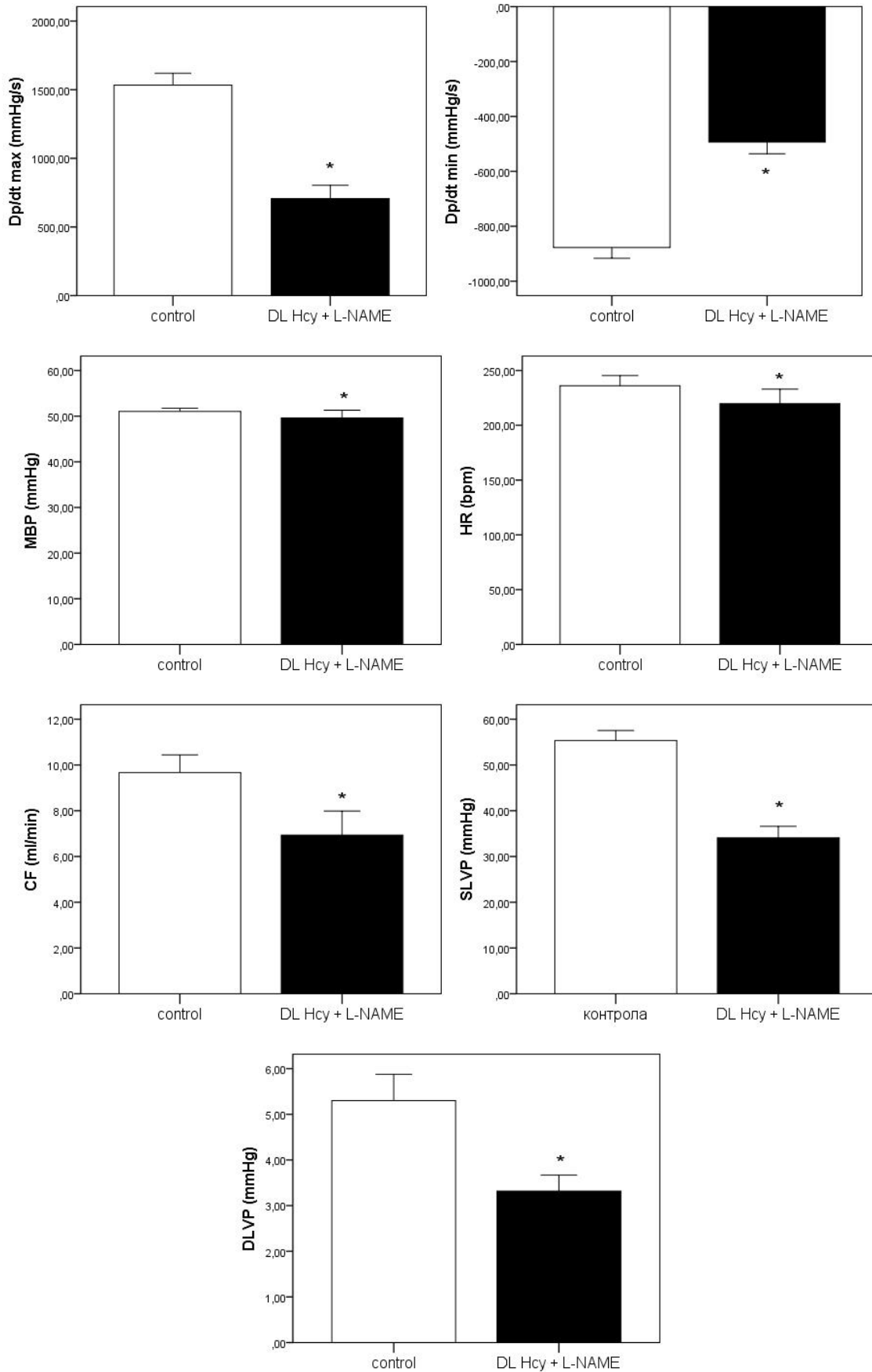
Ефекти ко-апликације DL-хомоцистеина (10 $\mu$ mol/l) и L-NAME (30 $\mu$ mol/l) на кардиодинамске параметре приказани су у Табели 9 и на Графику 6.

Након ко-апликације DL-хомоцистеина (DL Hcy) и L-NAME дошло је до статистички значајног смањења вредности свих испитиваних кардиодинамских параметара.

Табела 9. Кардиодинамски параметри пре и након ко-апликације DL-хомоцистеина (10 $\mu$ mol/l) и L-NAME (30 $\mu$ mol/l).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SD)	DL Hcy + L-NAME (X $\pm$ SD)	Статистичка значајност разлике
<b>dp/dt max</b> (mmHg/s)	1533.35 $\pm$ 87.08	706.38 $\pm$ 97.43	* <i>p</i> < 0.05
<b>dp/dt min</b> (mmHg/s)	-877.45 $\pm$ 39.08	-492.85 $\pm$ 43.06	* <i>p</i> < 0.05
<b>SLVP</b> (mmHg)	55.33 $\pm$ 2.20	34.06 $\pm$ 2.54	* <i>p</i> < 0.05
<b>DLVP</b> (mmHg)	5.30 $\pm$ 0.57	3.31 $\pm$ 0.35	* <i>p</i> < 0.05
<b>MBP</b> (mmHg)	51.03 $\pm$ 0.70	49.60 $\pm$ 1.71	* <i>p</i> < 0.05
<b>HR</b> (bpm)	236.08 $\pm$ 9.24	219.68 $\pm$ 13.33	* <i>p</i> < 0.05
<b>CF</b> (ml/min)	9.66 $\pm$ 0.77	6.93 $\pm$ 1.05	* <i>p</i> < 0.05

**График 6.** Разлика у вредностима кардиодинамских параметара ( $X \pm SD$ ) пре и након ко-апликације DL-хомоцистеина ( $10 \mu\text{mol/l}$ ) и L-NAME ( $30 \mu\text{mol/l}$ ).



**4.3.2. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ DL-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu$ mol/l) И L-NAME (30 $\mu$ mol/l) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА**

Ефекти ко-апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l) и L-NAME (30 $\mu$ mol/l) на кардиодинамске параметре приказани су у Табели 10 и на Графику 7.

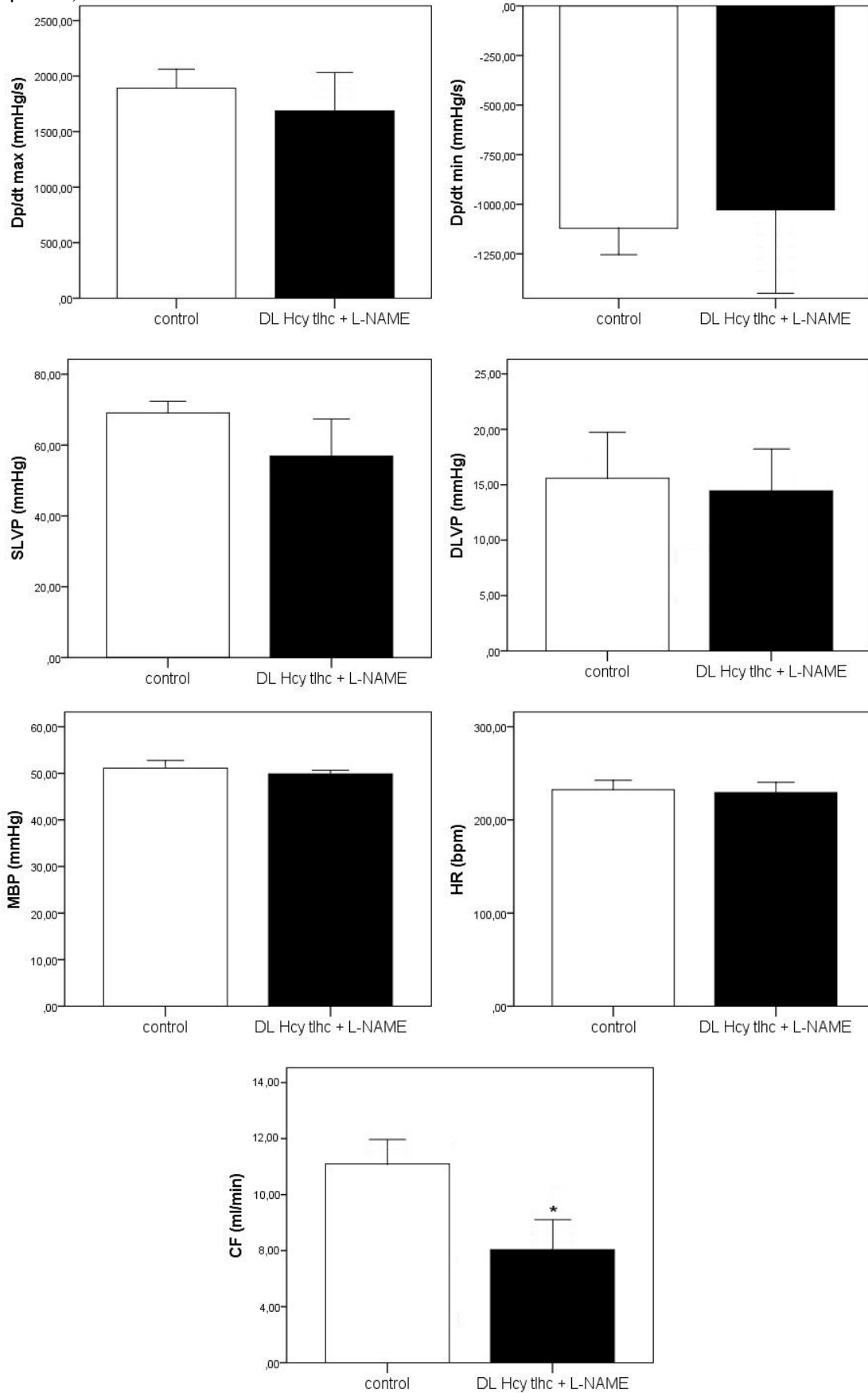
Након ко-апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (DL Hcy tlhc) и L-NAME дошло је до статистичког значајног смањења вредности само коронарног протока (CF).

**Табела 10.** Кардиодинамски параметри пре и након ко-апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l) и L-NAME (30 $\mu$ mol/l).

<b>Параметар</b>	<b>Контрола (X<math>\pm</math>SD)</b>	<b>DL Hcy tlhc + L-NAME (X<math>\pm</math>SD)</b>	<b>Статистичка значајност разлике</b>
<b>dp/dt max (mmHg/s)</b>	1856.33 $\pm$ 259.37	1691.35 $\pm$ 392.89	p>0.05
<b>dp/dt min (mmHg/s)</b>	-1112.63 $\pm$ 161.45	-1104.23 $\pm$ 318.24	p>0.05
<b>SLVP (mmHg)</b>	67.38 $\pm$ 5.23	57.11 $\pm$ 8.21	p>0.05
<b>DLVP (mmHg)</b>	16.10 $\pm$ 4.12	14.50 $\pm$ 3.76	p>0.05
<b>MBP (mmHg)</b>	51.25 $\pm$ 1.78	50.16 $\pm$ 0.69	p>0.05
<b>HR (bpm)</b>	229.65 $\pm$ 7.82	225.56 $\pm$ 7.33	p>0.05
<b>CF (ml/min)</b>	11.10 $\pm$ 0.84	8.10 $\pm$ 1.06	*p<0.05



**График 7.** Разлика у вредностима кардиодинамских параметара ( $X \pm SD$ ) пре и након ко-апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ( $10 \mu\text{mol/l}$ ) и L-NAME ( $30 \mu\text{mol/l}$ ).



### 4.3.3. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ L-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu$ mol/l) И L-NAME (30 $\mu$ mol/l) НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

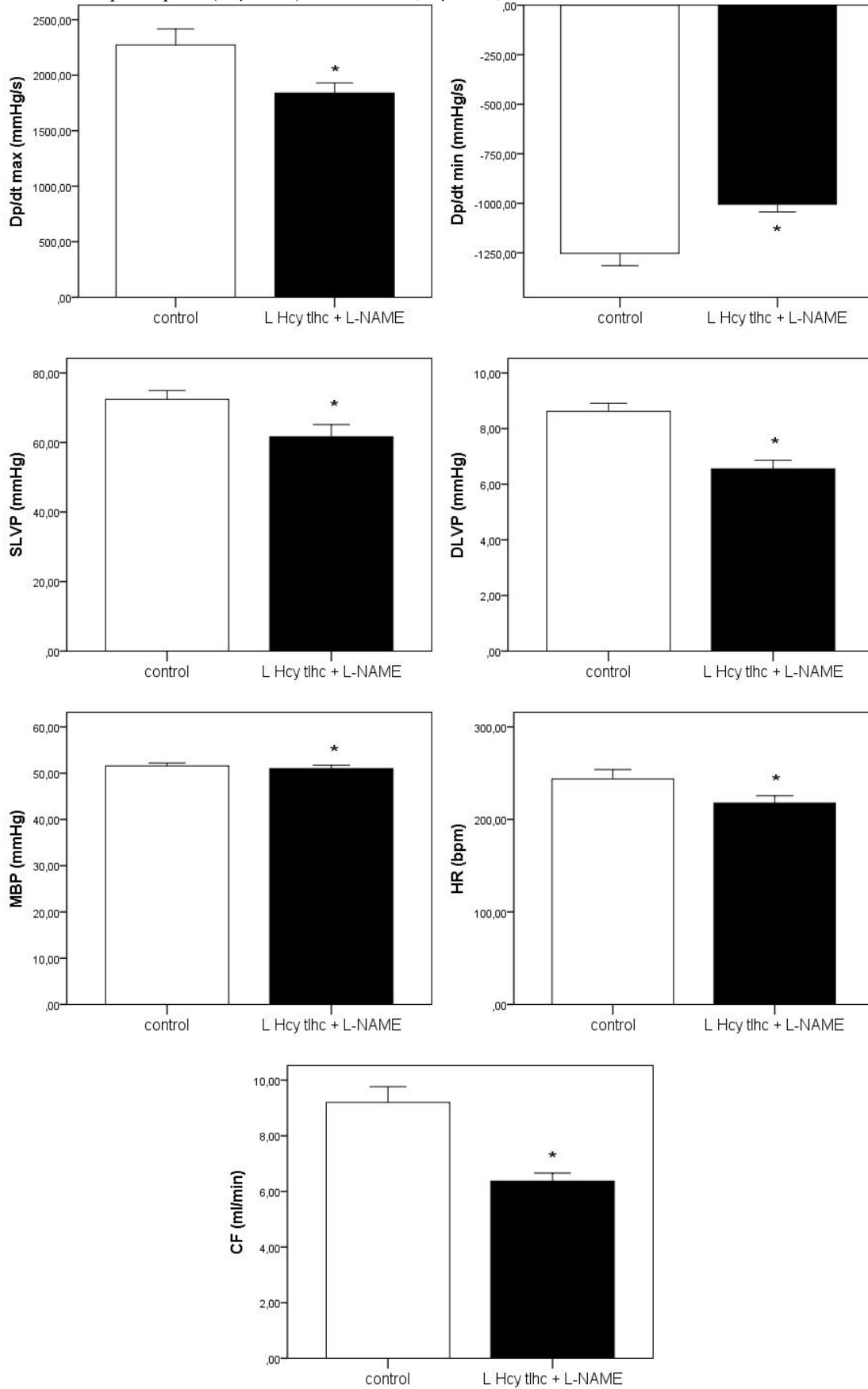
Ефекти ко-апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l) и L-NAME (30 $\mu$ mol/l) на кардиодинамске параметре приказани су у Табели 11 и на Графику 8.

Након ко-апликације L-хомоцистеин тиолактон (L Hcy thc) и L-NAME дошло је до статистички значајног смањења вредности свих испитиваних кардиодинамских параметара.

**Табела 11.** Кардиодинамски параметри пре и након ко-апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l) и L-NAME (30 $\mu$ mol/l).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SD)	L Hcy thc + L-NAME (X $\pm$ SD)	Статистичка значајност разлике
<b>dp/dt max</b> (mmHg/s)	2272.85 $\pm$ 144.61	1839.90 $\pm$ 90.45	* $p < 0.05$
<b>dp/dt min</b> (mmHg/s)	-1252.15 $\pm$ 62.34	-1005.36 $\pm$ 37.99	* $p < 0.05$
<b>SLVP</b> (mmHg)	72.38 $\pm$ 2.57	61.65 $\pm$ 3.50	* $p < 0.05$
<b>DLVP</b> (mmHg)	8.61 $\pm$ 0.29	6.55 $\pm$ 0.30	* $p < 0.05$
<b>MBP</b> (mmHg)	51.58 $\pm$ 0.61	51.00 $\pm$ 0.69	* $p < 0.05$
<b>HR</b> (bpm)	243.71 $\pm$ 10.09	217.65 $\pm$ 7.81	* $p < 0.05$
<b>CF</b> (ml/min)	9.20 $\pm$ 0.56	6.36 $\pm$ 0.29	* $p < 0.05$

**График 8.** Разлика у вредностима кардиодинамских параметара ( $X \pm SD$ ) пре и након L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ( $10 \mu\text{mol/l}$ ) и L-NAME ( $30 \mu\text{mol/l}$ ).



#### 4.4. УТИЦАЈ ИНХИБИЦИЈЕ СО НА КАРДИДИНАМСКЕ ЕФЕКТЕ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

##### 4.4.1. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ DL-ХОМОЦИСТЕИНА (10 $\mu$ mol/l) И ЦИНКПРОТОПОРФИРИНА IX (10 $\mu$ mol/l) НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

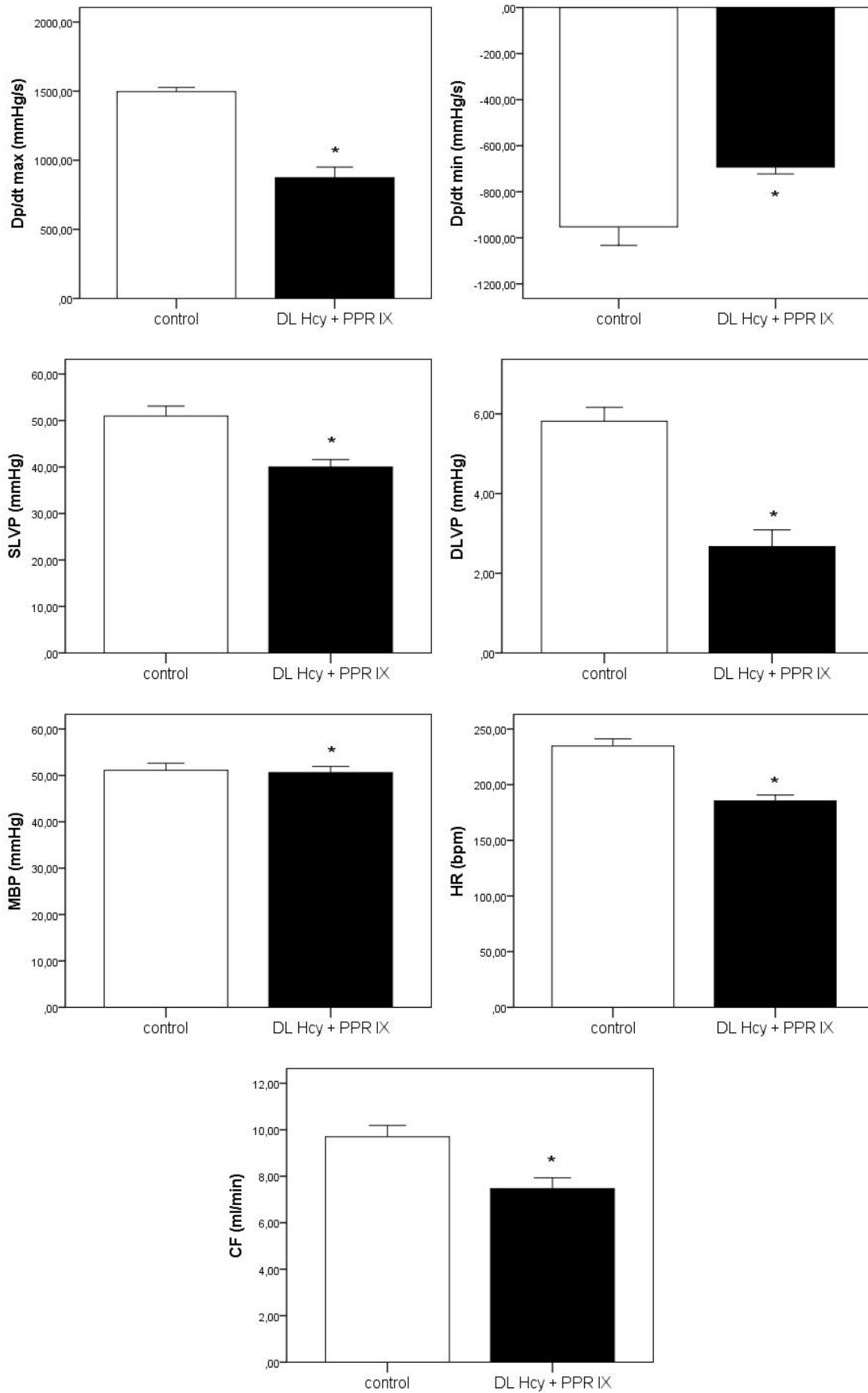
Ефекти ко-апликације DL-хомоцистеина (10 $\mu$ mol/l) и цинкпротопорфирина IX (10 $\mu$ mol/l) на кардиодинамске параметре приказани су у Табели 12 и на Графику 9.

Након ко-апликације DL-хомоцистеина (DL Hcy) и цинкпротопорфирина IX (PPR IX) дошло је до значајног смањења вредности свих испитиваних кардиодинамских параметара.

**Табела 12.** Кардиодинамски параметри пре и након ко-апликације DL-хомоцистеина (10 $\mu$ mol/l) и цинкпротопорфирина IX (10 $\mu$ mol/l).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SD)	DL Hcy + PPR IX (X $\pm$ SD)	Статистичка значајност разлике
<b>dp/dt max</b> (mmHg/s)	1496.10 $\pm$ 31.01	873.55 $\pm$ 76.84	* <i>p</i> < 0.05
<b>dp/dt min</b> (mmHg/s)	-952.18 $\pm$ 80.62	-693.01 $\pm$ 29.59	* <i>p</i> < 0.05
<b>SLVP</b> (mmHg)	50.95 $\pm$ 2.16	39.98 $\pm$ 1.62	* <i>p</i> < 0.05
<b>DLVP</b> (mmHg)	5.81 $\pm$ 0.34	2.66 $\pm$ 0.42	* <i>p</i> < 0.05
<b>MBP</b> (mmHg)	51.11 $\pm$ 1.50	50.58 $\pm$ 1.34	* <i>p</i> < 0.05
<b>HR</b> (bpm)	234.73 $\pm$ 6.38	185.36 $\pm$ 5.36	* <i>p</i> < 0.05
<b>CF</b> (ml/min)	9.70 $\pm$ 0.48	7.46 $\pm$ 0.46	* <i>p</i> < 0.05

**График 9.** Разлика у вредностима кардиодинамских параметара ( $X \pm SD$ ) пре и након ко-апликације DL-хомоцистеина ( $10 \mu\text{mol/l}$ ) и цинкпротопорфина IX ( $10 \mu\text{mol/l}$ ).



**4.4.2. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ DL-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu$ mol/l) И ЦИНКПРОТОПОРФИРИНА IX (10 $\mu$ mol/l) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА**

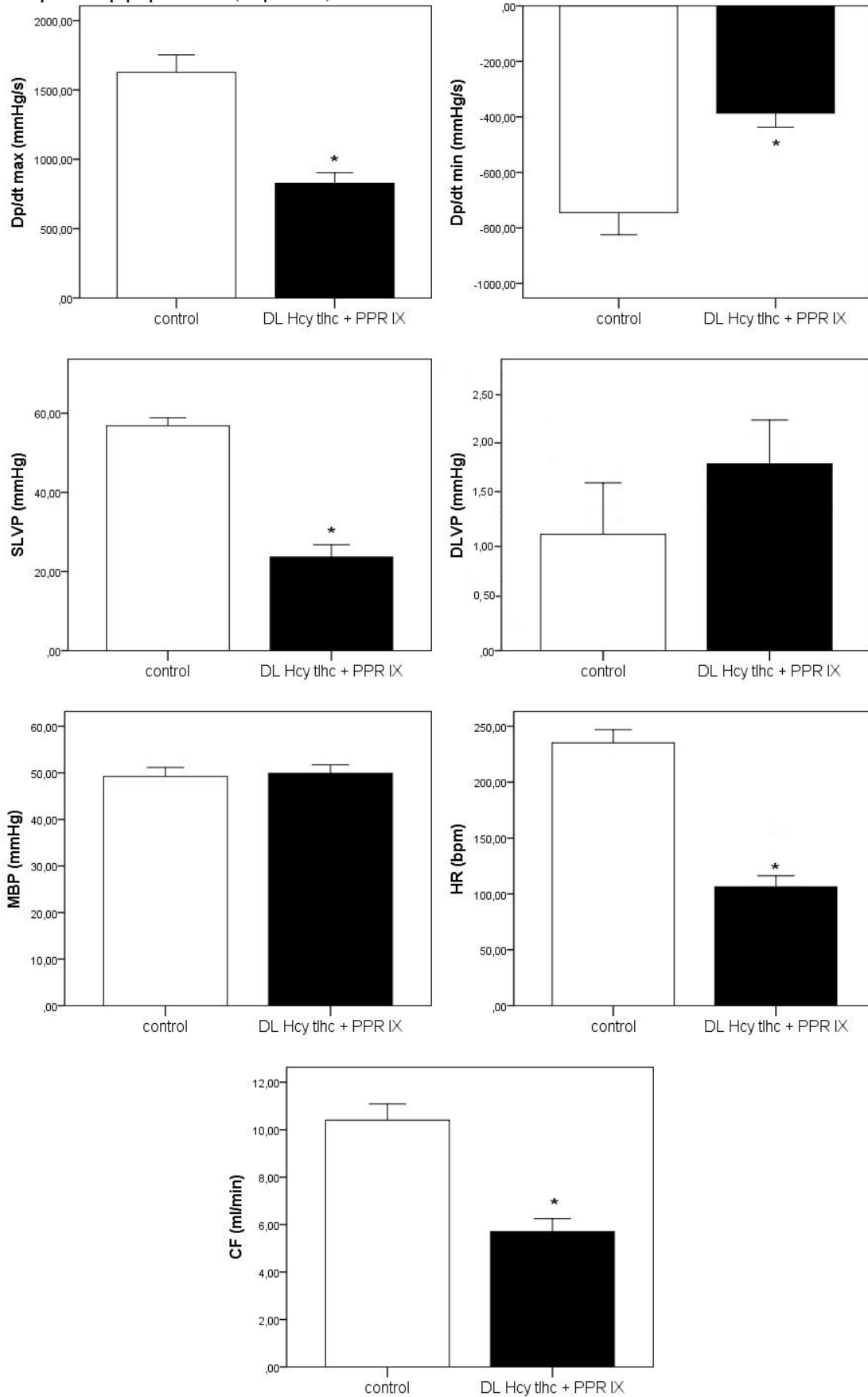
Ефекти ко-апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l) плус цинкпротопорфирина IX (10 $\mu$ mol/l) на кардиодинамске параметре приказани су у Табели 13 и на Графику 10.

Након апликације ко-апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (DL Hcy thc) и цинкпротопорфирина IX (PPR IX) дошло је до статистички значајног смањења максималне стопе промене притиска у левој комори (dp/dt max), минималне стопе промене притиска у левој комори (dp/dt min), систолног притиска леве коморе (SLVP), фреквенце срца (HR) и коронарног протока (CF).

**Табела 13.** Кардиодинамски параметри пре и након ко-апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l) и цинкпротопорфирина IX (10 $\mu$ mol/l).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SD)	DL Hcy thc + PPR IX (X $\pm$ SD)	Статистичка значајност разлике
<b>dp/dt max</b> (mmHg/s)	1671.76 $\pm$ 94.89	819.91 $\pm$ 31.26	* <i>p</i> < 0.05
<b>dp/dt min</b> (mmHg/s)	-748.85 $\pm$ 67.71	-396.76 $\pm$ 29.62	* <i>p</i> < 0.05
<b>SLVP</b> (mmHg)	57.30 $\pm$ 0.87	22.26 $\pm$ 2.48	* <i>p</i> < 0.05
<b>DLVP</b> (mmHg)	1.15 $\pm$ 0.45	1.86 $\pm$ 0.44	<i>p</i> > 0.05
<b>MBP</b> (mmHg)	49.70 $\pm$ 0.73	50.05 $\pm$ 0.72	<i>p</i> > 0.05
<b>HR</b> (bpm)	237.01 $\pm$ 8.13	107.50 $\pm$ 7.20	* <i>p</i> < 0.05
<b>CF</b> (ml/min)	10.50 $\pm$ 0.39	5.63 $\pm$ 0.38	* <i>p</i> < 0.05

**График 10.** Разлика у вредностима кардиодинамских параметара ( $X \pm SD$ ) пре и након ко-апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ( $10 \mu\text{mol/l}$ ) и цинкпротопорфина IX ( $10 \mu\text{mol/l}$ ).



#### 4.4.3. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ L-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu$ mol/l) И ЦИНКПРОТОПОРФИРИНА IX (10 $\mu$ mol/l) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти ко-апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l) и цинкпротопорфирина IX (10 $\mu$ mol/l) на кардиодинамске параметре приказани су у Табели 14 и на Графику 11.

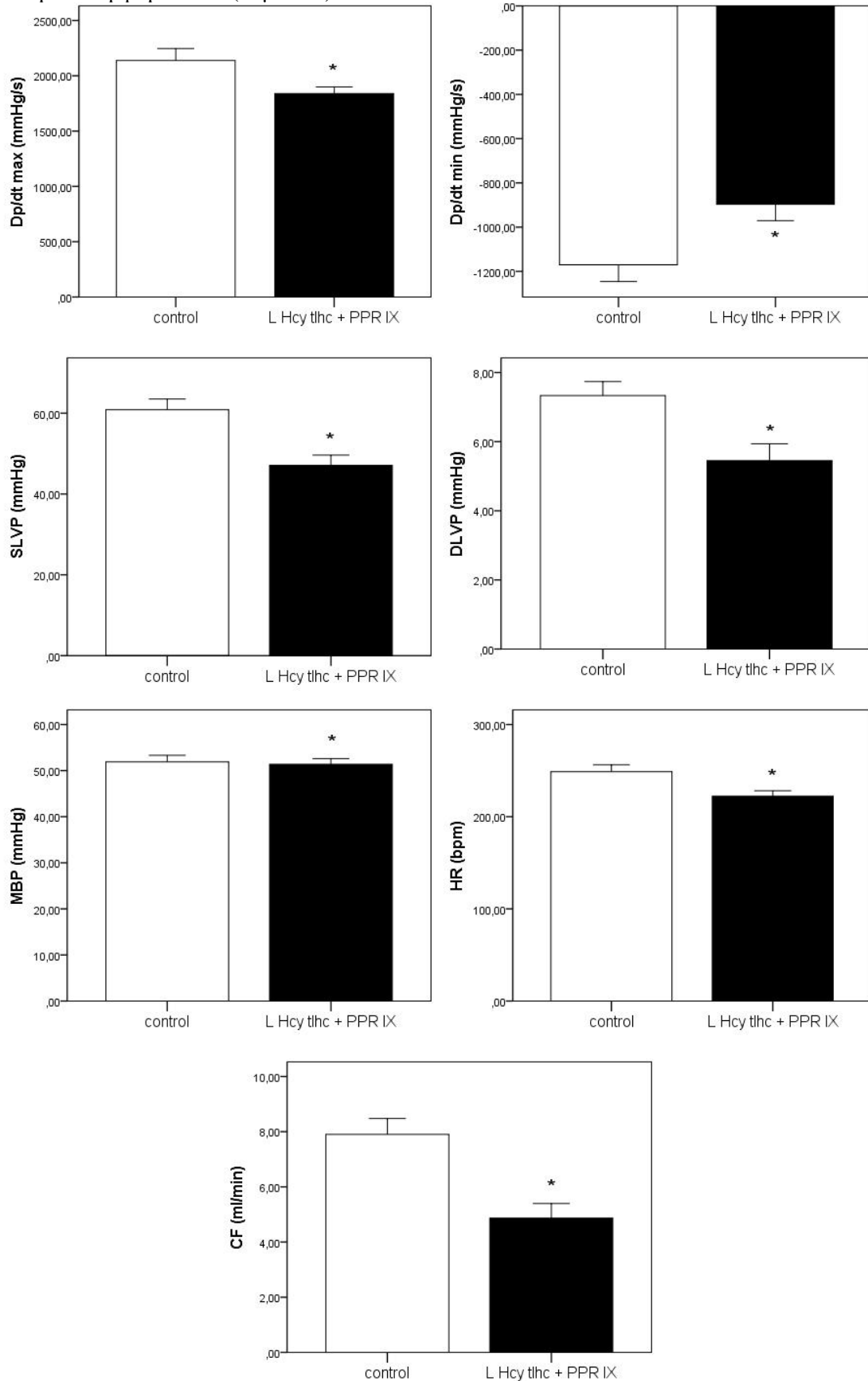
Након ко-апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (L Hcy tlhc) и цинкпротопорфирина IX (PPR IX) дошло је до статистички значајног смањења вредности свих кардиодинамских параметара.

**Табела 14.** Кардиодинамски параметри пре и након ко-апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l) и цинкпротопорфирина IX (10 $\mu$ mol/l).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SD)	L Hcy tlhc + PPR IX (X $\pm$ SD)	Статистичка значајност разлике
<b>dp/dt max</b> (mmHg/s)	2138.91 $\pm$ 107.44	1839.58 $\pm$ 59.40	* <i>p</i> < 0.05
<b>dp/dt min</b> (mmHg/s)	-1169.93 $\pm$ 75.83	-896.75 $\pm$ 74.08	* <i>p</i> < 0.05
<b>SLVP</b> (mmHg)	60.86 $\pm$ 2.65	47.10 $\pm$ 2.53	* <i>p</i> < 0.05
<b>DLVP</b> (mmHg)	7.33 $\pm$ 0.40	5.45 $\pm$ 0.48	* <i>p</i> < 0.05
<b>MBP</b> (mmHg)	51.90 $\pm$ 1.41	51.38 $\pm$ 1.21	* <i>p</i> < 0.05
<b>HR</b> (bpm)	248.80 $\pm$ 7.42	222.26 $\pm$ 5.89	* <i>p</i> < 0.05
<b>CF</b> (ml/min)	7.90 $\pm$ 0.57	4.86 $\pm$ 0.53	* <i>p</i> < 0.05



**График 11.** Разлика у вредностима кардиодинамских параметара ( $X \pm SD$ ) пре и након ко-апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ( $10 \mu\text{mol/l}$ ) и цинкпротопорфина IX ( $10 \mu\text{mol/l}$ ).



## 4.5. УТИЦАЈ ИНХИБИЦИЈЕ H<sub>2</sub>S НА КАРДИДИНАМСКЕ ЕФЕКТЕ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

### 4.5.1. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ DL-ХОМОЦИСТЕИНА (10µmol/l) И DL-ПРОПАРГИЛГЛИЦИНА (10µmol/l) НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

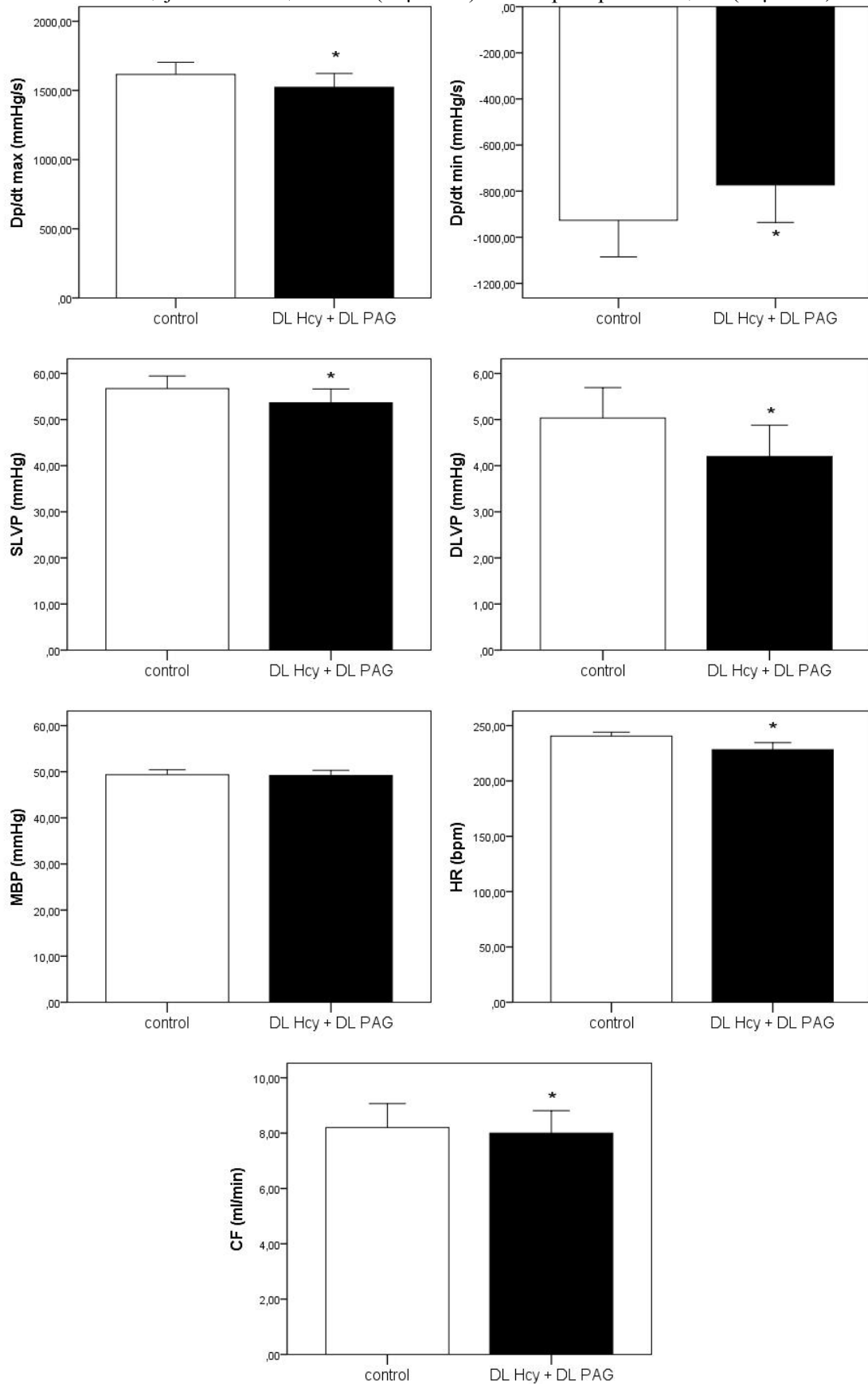
Ефекти ко-апликације DL-хомоцистеина (10µmol/l) и DL-пропаргилглицина (10µmol/l) на кардиодинамске параметре приказани су у Табели 15 и на Графику 12.

Након апликације ко-апликације DL-хомоцистеина (DL Hcy) и DL-пропаргилглицина (DL PAG) дошло је до статистички значајног смањења вредности свих кардиодинамских параметара, осим средњег притиска у аорти (MBP).

Табела 15. Кардиодинамски параметри пре и након ко-апликације DL-хомоцистеина (10µmol/l) и DL-пропаргилглицина (10µmol/l).

Параметар	Контрола (X±SD)	DL Hcy + DL PAG (X±SD)	Статистичка значајност разлике
<b>dp/dt max</b> (mmHg/s)	1615.68±87.03	1523.100±99.89	* <i>p</i> < 0.05
<b>dp/dt min</b> (mmHg/s)	-926.10±158.90	-773.13±162.38	* <i>p</i> < 0.05
<b>SLVP</b> (mmHg)	56.71±2.73	53.65±2.98	* <i>p</i> < 0.05
<b>DLVP</b> (mmHg)	5.03±0.65	4.20±0.67	* <i>p</i> < 0.05
<b>MBP</b> (mmHg)	49.33±1.09	49.18±1.10	<i>p</i> > 0.05
<b>HR</b> (bpm)	240.55±3.47	228.26±6.34	* <i>p</i> < 0.05
<b>CF</b> (ml/min)	8.20±0.86	8.00±0.80	* <i>p</i> < 0.05

**График 12.** Разлика у вредностима кардиодинамских параметара ( $X \pm SD$ ) пре и након ко-апликације DL-хомоцистеина ( $10 \mu\text{mol/l}$ ) и DL-пропаргилглицина ( $10 \mu\text{mol/l}$ ).



#### 4.5.2. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ DL-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu$ mol/l) И DL-ПРОПАРГИЛГЛИЦИНА (10 $\mu$ mol/l) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

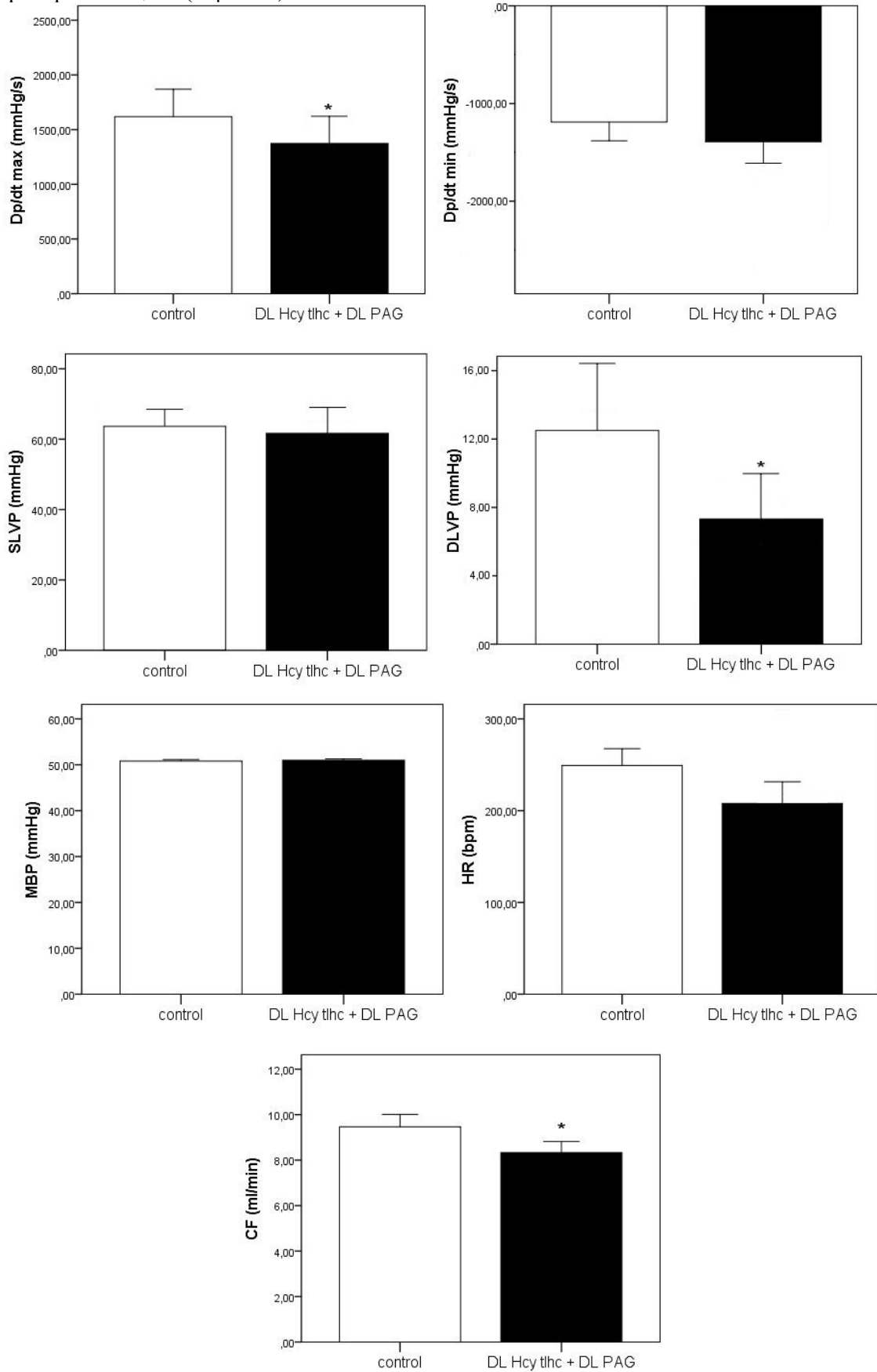
Ефекти ко-апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l) и DL-пропаргилглицина (10 $\mu$ mol/l) на кардиодинамске параметре приказани су у Табели 16 и на Графику 13.

Након ко-апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (DL Hcy tlhc) и DL-пропаргилглицина (DL PAG) је дошло до статистички значајног смањења вредности максималне стопе промене притиска у левој комори (dp/dt max), дијастолног притиска леве коморе (DLVP) и коронарног протока (CF).

**Табела 16.** Кардиодинамски параметри пре и након ко-апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l) и DL-пропаргилглицина (10 $\mu$ mol/l).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SD)	DL Hcy tlhc + DL PAG (X $\pm$ SD)	Статистичка значајност разлике
<b>dp/dt max</b> (mmHg/s)	1660.81 $\pm$ 214.11	1989.60 $\pm$ 230.29	* <i>p</i> < 0.05
<b>dp/dt min</b> (mmHg/s)	-1193.98 $\pm$ 192.70	-1356.66 $\pm$ 219.02	<i>p</i> > 0.05
<b>SLVP</b> (mmHg)	63.73 $\pm$ 3.86	62.65 $\pm$ 6.08	<i>p</i> > 0.05
<b>DLVP</b> (mmHg)	12.63 $\pm$ 3.77	7.21 $\pm$ 2.64	* <i>p</i> < 0.05
<b>MBP</b> (mmHg)	50.55 $\pm$ 0.14	50.76 $\pm$ 0.14	<i>p</i> > 0.05
<b>HR</b> (bpm)	241.38 $\pm$ 20	205.46 $\pm$ 34.4	<i>p</i> > 0.05
<b>CF</b> (ml/min)	9.67 $\pm$ 0.40	8.56 $\pm$ 0.34	* <i>p</i> < 0.05

**График 13.** Разлика у вредностима кардиодинамских параметара ( $X \pm SD$ ) пре и након ко-апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ( $10 \mu\text{mol/l}$ ) и DL-пропаргилглицина ( $10 \mu\text{mol/l}$ ).



**4.5.3. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ L-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu$ mol/l) И DL-ПРОПАРГИЛГЛИЦИНА (10 $\mu$ mol/l) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА**

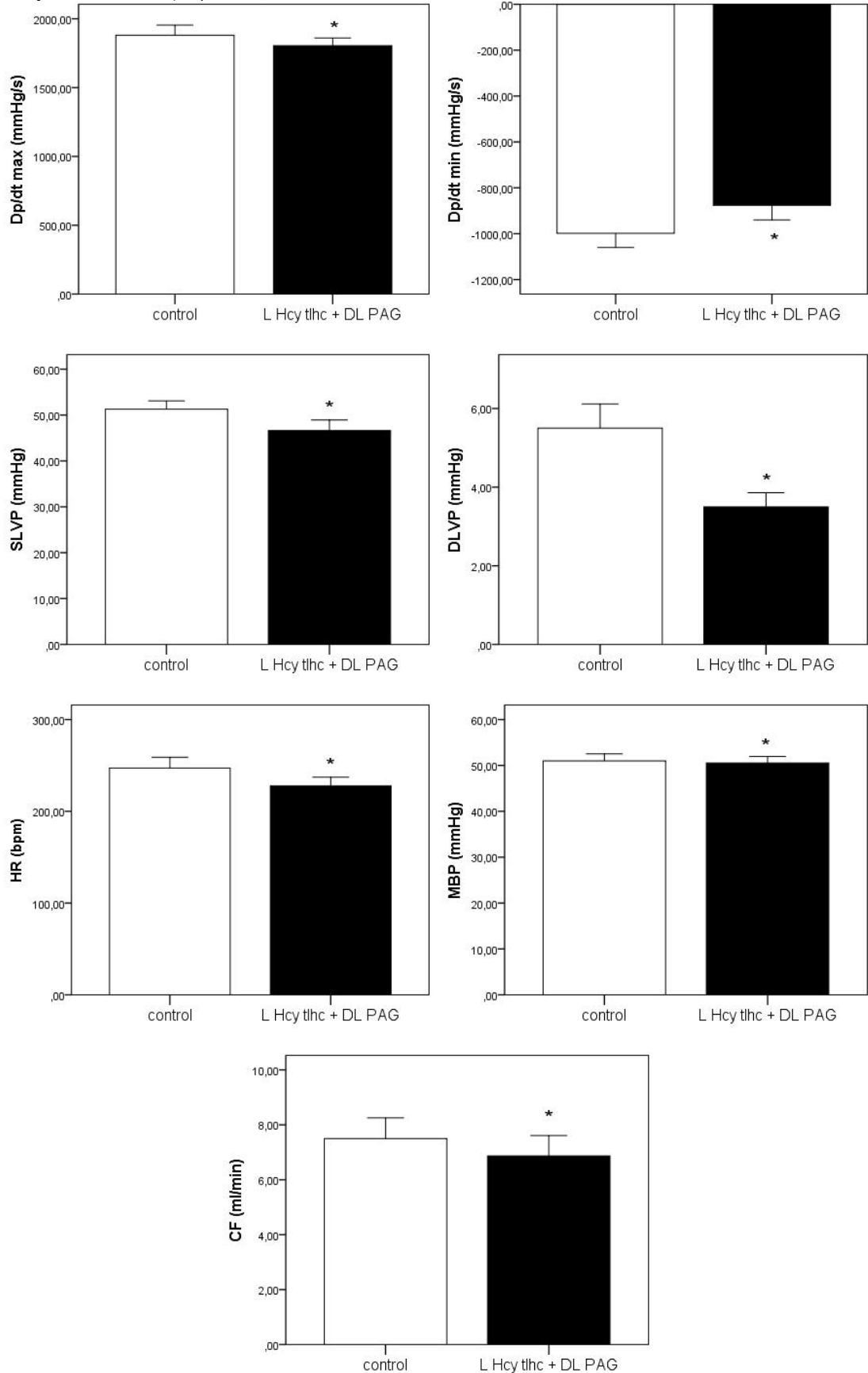
Ефекти ко-апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l) и DL-пропаргилглицина (10 $\mu$ mol/l) на кардиодинамске параметре приказани су у Табели 17 и на Графику 14.

Након ко-апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (L Hcy tlhc) и DL-пропаргилглицина (DL PAG) дошло је до статистички значајног смањења вредности свих кардиодинамских параметара.

**Табела 17.** Кардиодинамски параметри пре и након ко-апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l) и DL-пропаргилглицина (10 $\mu$ mol/l).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SD)	L Hcy tlhc + DL PAG (X $\pm$ SD)	Статистичка значајност разлике
<b>dp/dt max</b> (mmHg/s)	1880.76 $\pm$ 73.58	1804.30 $\pm$ 56.15	* <i>p</i> < 0.05
<b>dp/dt min</b> (mmHg/s)	-998.36 $\pm$ 62.07	-876.26 $\pm$ 63.55	* <i>p</i> < 0.05
<b>SLVP</b> (mmHg)	51.26 $\pm$ 1.81	46.65 $\pm$ 2.27	* <i>p</i> < 0.05
<b>DLVP</b> (mmHg)	5.50 $\pm$ 0.61	3.50 $\pm$ 0.35	* <i>p</i> < 0.05
<b>MBP</b> (mmHg)	50.98 $\pm$ 1.54	50.53 $\pm$ 1.41	* <i>p</i> < 0.05
<b>HR</b> (bpm)	247.16 $\pm$ 11.76	227.58 $\pm$ 9.57	* <i>p</i> < 0.05
<b>CF</b> (ml/min)	7.50 $\pm$ 0.75	6.86 $\pm$ 0.74	* <i>p</i> < 0.05

**График 14.** Разлика у вредностима кардиодинамских параметара ( $X \pm SD$ ) пре и након ко-апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ( $10 \mu\text{mol/l}$ ) и DL-пропаргилглицина ( $10 \mu\text{mol/l}$ ).



## 4.6. ЕФЕКТИ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

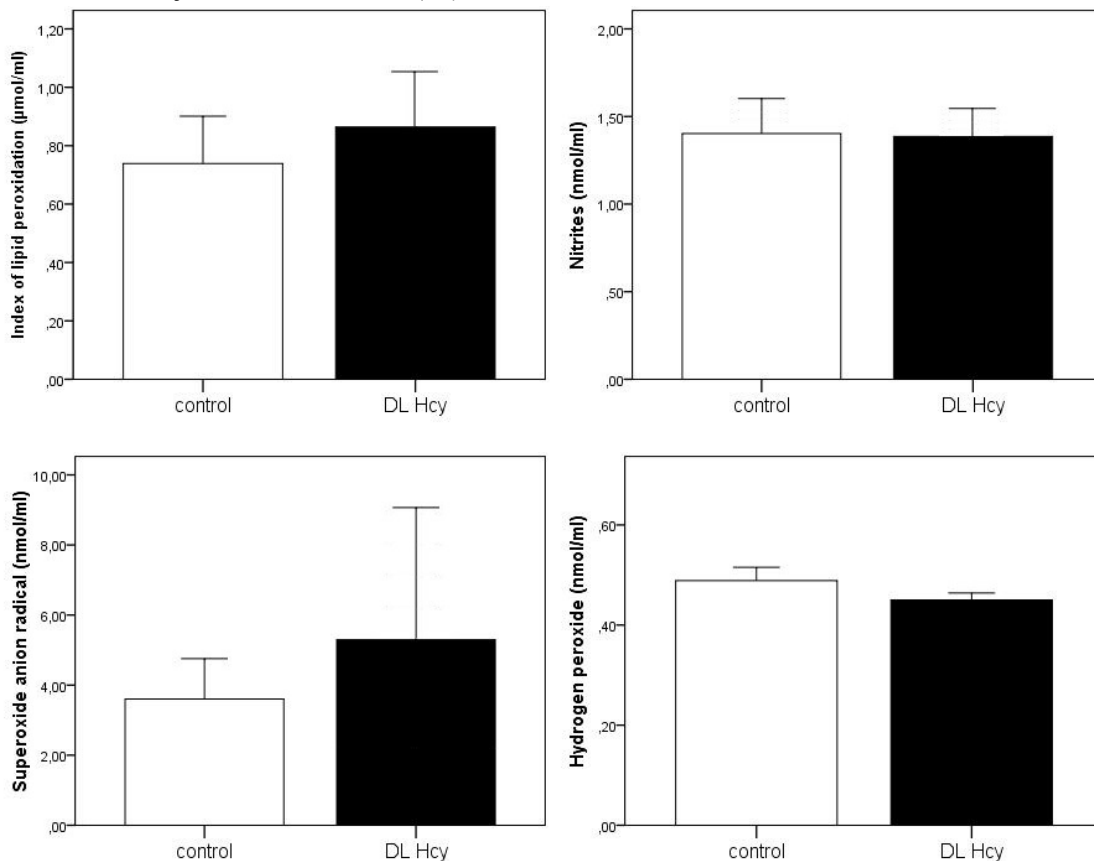
### 4.6.1. УТИЦАЈ DL-ХОМОЦИСТЕИНА (10 $\mu$ mol/l) НА ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти апликације DL-хомоцистеина (10 $\mu$ mol/l) на параметре оксидационог стреса приказани су у Табели 18 и на Графику 15. Након апликације DL-хомоцистеина (DL Hcy) није дошло до статистички значајних промена у нивоима испитиваних параметара оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту.

**Табела 18.** Нивои прооксиданата у коронарном венском ефлуенту пре и након апликације DL-хомоцистеина (10 $\mu$ mol/l).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SD)	DL Hcy (X $\pm$ SD)	Статистичка значајност разлике
TBARS ( $\mu$ mol/ml)	0.75 $\pm$ 0.17	0.86 $\pm$ 0.21	p>0.05
NO <sub>2</sub> (nmol/ml)	1.43 $\pm$ 0.24	1.40 $\pm$ 0.20	p>0.05
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/ml)	3.84 $\pm$ 0.83	5.21 $\pm$ 3.84	p>0.05
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol/ml)	0.48 $\pm$ 0.05	0.45 $\pm$ 0.02	p>0.05

**График 15.** Разлика у нивоима прооксиданата (X $\pm$ SD) у коронарном венском ефлуенту пре и након апликације DL-хомоцистеина (10 $\mu$ mol/l).





#### 4.6.2. УТИЦАЈ DL-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu$ mol/l) НА ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

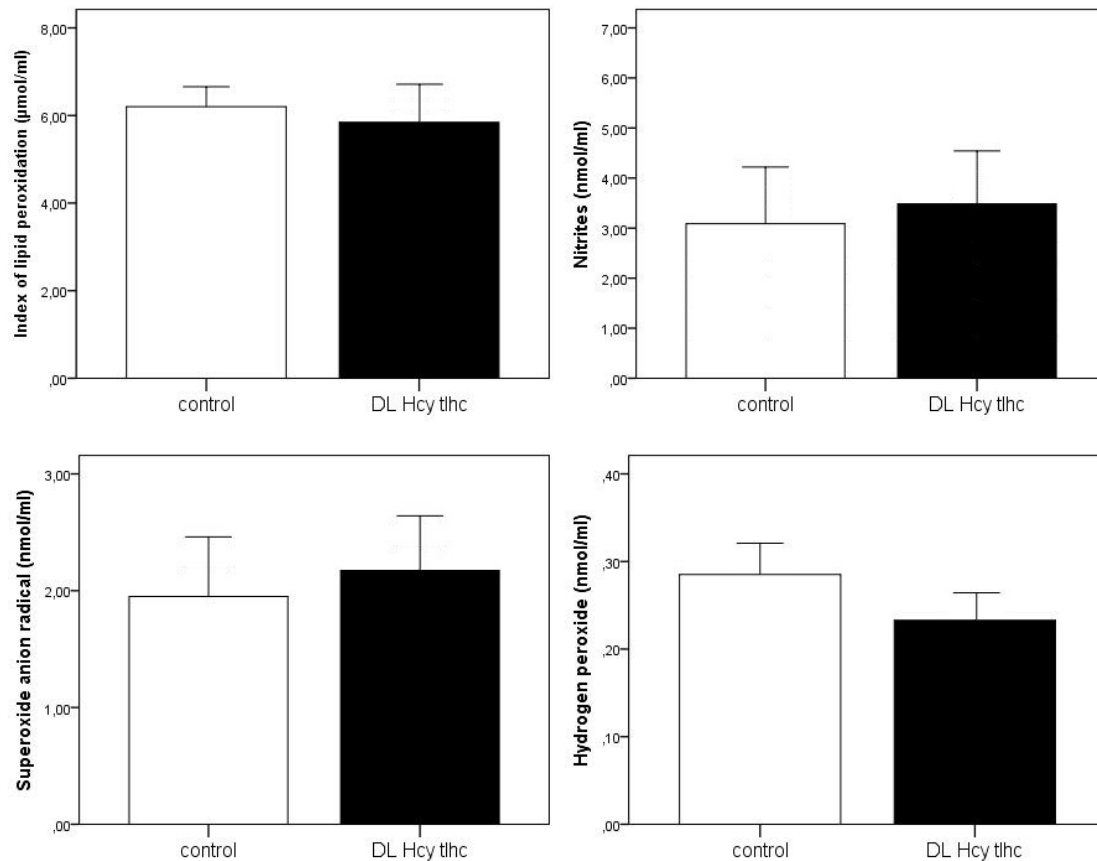
Ефекти апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l) на параметре оксидационог стреса приказани су у Табели 19 и на Графику 16.

Након апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (DL Hcy thc) није дошло, такође, до статистички значајних промена у нивоима испитиваних параметара оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту.

**Табела 19.** Нивои прооксиданата у коронарном венском ефлуенту пре и након апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SD)	DL Hcy thc (X $\pm$ SD)	Статистичка значајност разлике
TBARS ( $\mu$ mol/ml)	6.20 $\pm$ 0.38	5.88 $\pm$ 0.91	p>0.05
NO <sub>2</sub> (nmol/ml)	3.14 $\pm$ 1.17	3.52 $\pm$ 1.13	p>0.05
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/ml)	1.97 $\pm$ 0.45	2.19 $\pm$ 0.47	p>0.05
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol/ml)	0.28 $\pm$ 0.04	0.23 $\pm$ 0.03	p>0.05

**График 16.** Разлика у нивоима прооксиданата (X $\pm$ SD) у коронарном венском ефлуенту пре и након апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l).



### 4.6.3. УТИЦАЈ L-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu$ mol/l) НА ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

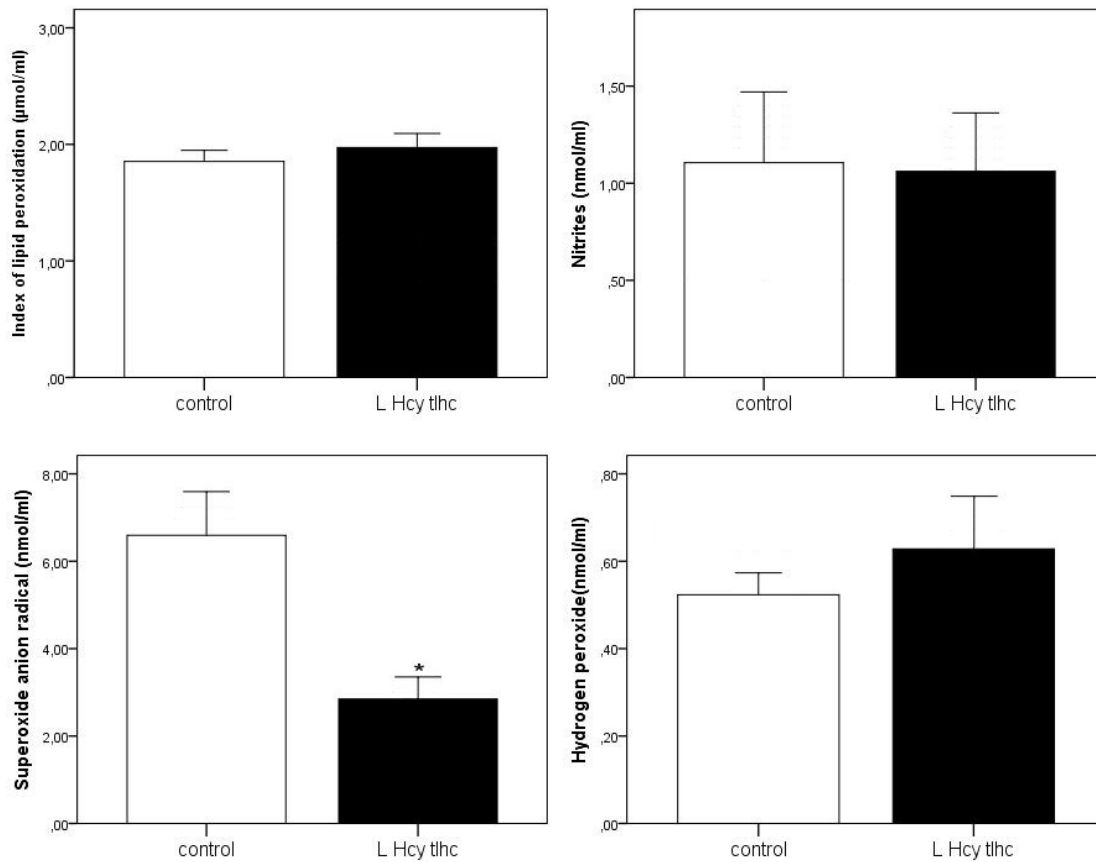
Ефекти апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l) на параметре оксидационог стреса приказани су у Табели 20 и на Графику 17.

Након апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (L Hcy thc) нивои супероксид анјон радикала (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) су се статистички значајно смањили.

**Табела 20.** Нивои прооксиданата у коронарном венском ефлуенту пре и након апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SD)	L Hcy thc (X $\pm$ SD)	Статистичка значајност разлике
TBARS ( $\mu$ mol/ml)	1.86 $\pm$ 0.40	2.04 $\pm$ 0.47	p>0.05
NO <sub>2</sub> (nmol/ml)	1.10 $\pm$ 0.42	1.05 $\pm$ 0.31	p>0.05
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/ml)	6.64 $\pm$ 1.01	2.96 $\pm$ 0.40	*p<0.05
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol/ml)	0.53 $\pm$ 0.03	0.63 $\pm$ 0.08	p>0.05

**График 17.** Разлика у нивоима прооксиданата (X $\pm$ SD) у коронарном венском ефлуенту пре и након апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l).



## 4.7. ЕФЕКТИ ИНХИБИЦИЈЕ РАЗЛИЧИТИХ ГАСОТРАНСМИТЕРА НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

### 4.7.1. УТИЦАЈ ЦИНКПРОТОПОРФИРИНА IX ( $10\mu\text{mol/l}$ ) НА ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

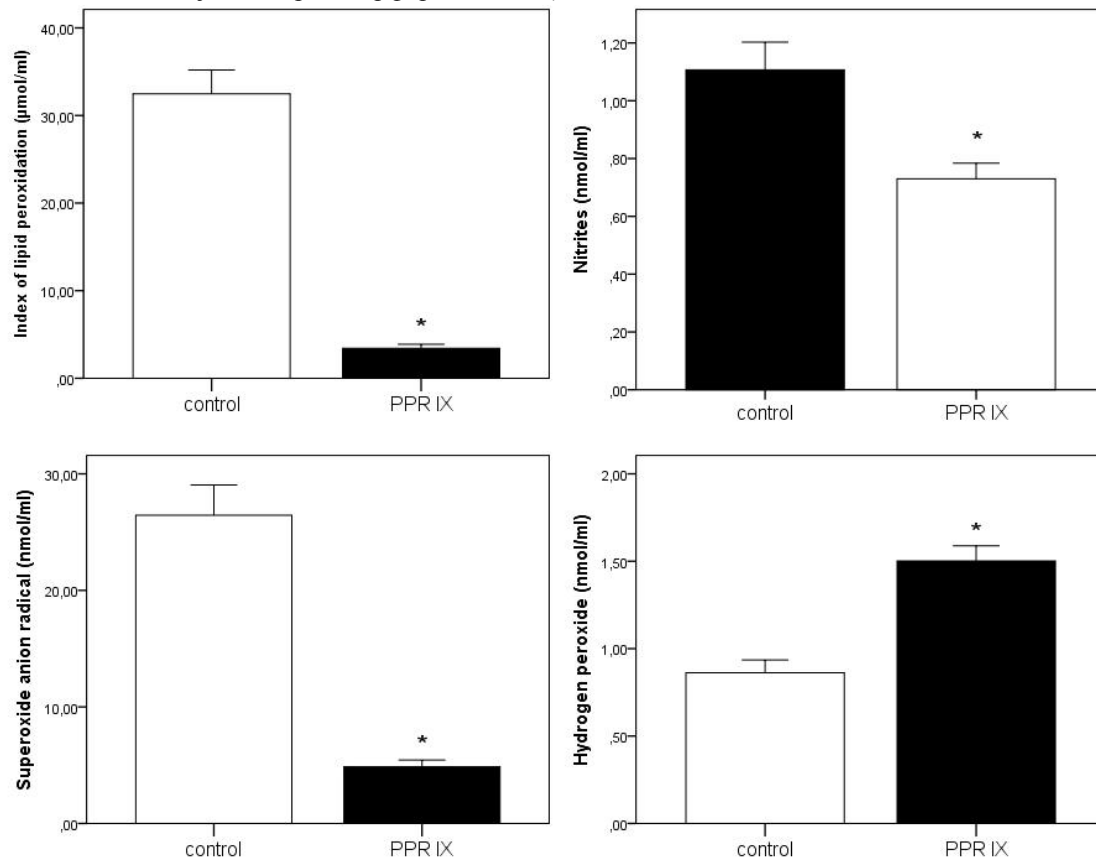
Ефекти апликације цинкпротопорфирина IX ( $10\mu\text{mol/l}$ ) на параметре оксидационог стреса приказани су у Табели 21 и на Графику 18.

Након апликације цинкпротопорфирина IX (PPR IX) нивои индекса липидне пероксидације (TBARS), нитрита ( $\text{NO}_2$ ), и супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ ) су статистички значајно опали, док су нивои водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) порасли.

**Табела 21.** Нивои прооксиданата у коронарном венском ефлуенту пре и након апликације цинкпротопорфирина IX ( $10\mu\text{mol/l}$ ).

Параметар	Контрола ( $X\pm SD$ )	PPR IX ( $X\pm SD$ )	Статистичка значајност разлике
TBARS ( $\mu\text{mol/ml}$ )	$32.47\pm 2.71$	$3.42\pm 0.46$	$*p < 0.05$
$\text{NO}_2$ (nmol/ml)	$1.10\pm 0.09$	$0.73\pm 0.05$	$*p < 0.05$
$\text{O}_2^-$ (nmol/ml)	$26.45\pm 2.59$	$4.86\pm 0.58$	$*p < 0.05$
$\text{H}_2\text{O}_2$ (nmol/ml)	$0.86\pm 0.07$	$1.50\pm 0.08$	$*p < 0.05$

**График 18.** Разлика у нивоима прооксиданата ( $X\pm SD$ ) у коронарном венском ефлуенту пре и након апликације цинкпротопорфирина IX ( $10\mu\text{mol/l}$ ).



#### 4.7.2. УТИЦАЈ DL-ПРОПАРГИЛГЛИЦИНА ( $10\mu\text{mol/l}$ ) НА ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

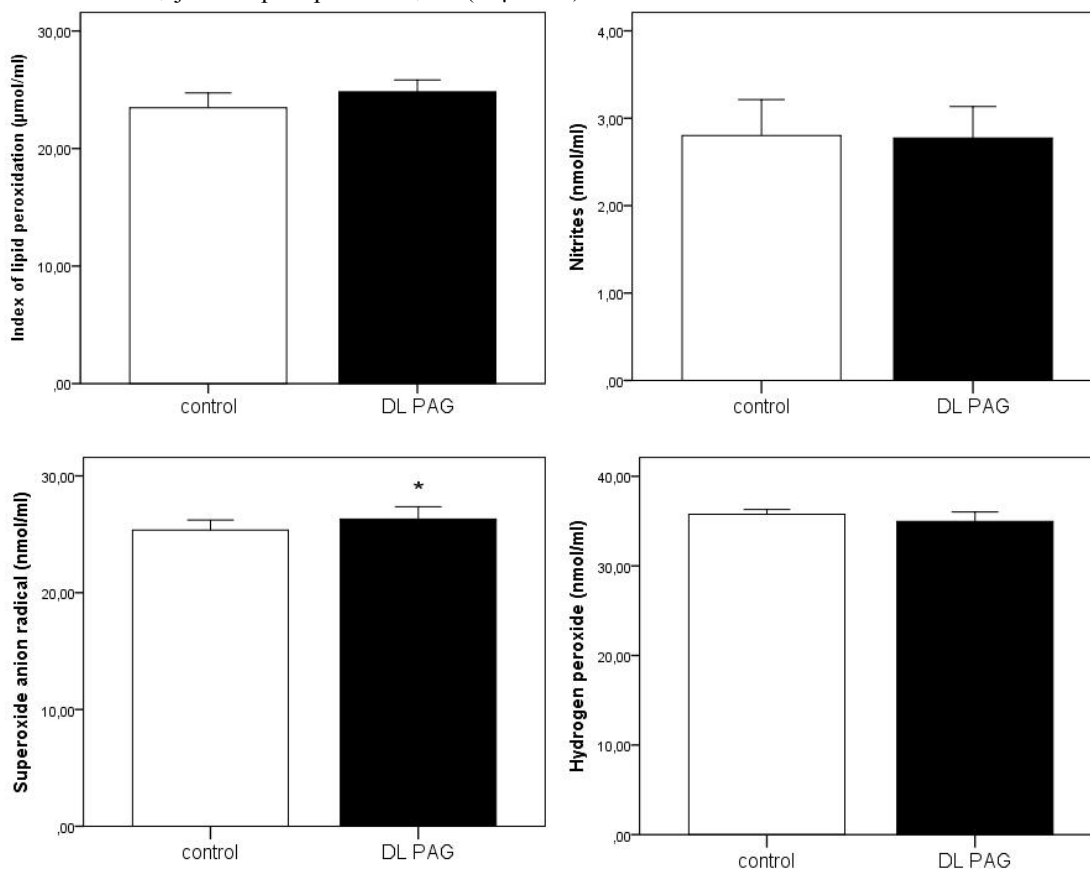
Ефекти апликације DL-пропаргилглицина ( $10\mu\text{mol/l}$ ) на параметре оксидационог стреса приказани су у Табели 22 и на Графику 19.

Након апликације DL-пропаргилглицина (DL PAG), нивои супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ ) у коронарном венском ефлуенту су се статистички значајно повећали.

Табела 22. Нивои прооксиданата у коронарном венском ефлуенту пре и након апликације DL-пропаргилглицина ( $10\mu\text{mol/l}$ ).

Параметар	Контрола ( $X\pm SD$ )	DL PAG ( $X\pm SD$ )	Статистичка значајност разлике
TBARS ( $\mu\text{mol/ml}$ )	$23.46\pm 1.26$	$24.82\pm 1.00$	$p>0.05$
$\text{NO}_2$ (nmol/ml)	$2.80\pm 0.41$	$2.77\pm 0.36$	$p>0.05$
$\text{O}_2^-$ (nmol/ml)	$25.35\pm 0.86$	$26.30\pm 1.05$	$*p<0.05$
$\text{H}_2\text{O}_2$ (nmol/ml)	$35.76\pm 0.52$	$34.95\pm 1.05$	$p>0.05$

График 19. Разлика у нивоима прооксиданата ( $X\pm SD$ ) у коронарном венском ефлуенту пре и након апликације DL-пропаргилглицина ( $10\mu\text{mol/l}$ ).



## 4.8. УТИЦАЈ ИНХИБИЦИЈЕ NO НА ОКСИДАЦИОНЕ ЕФЕКТЕ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

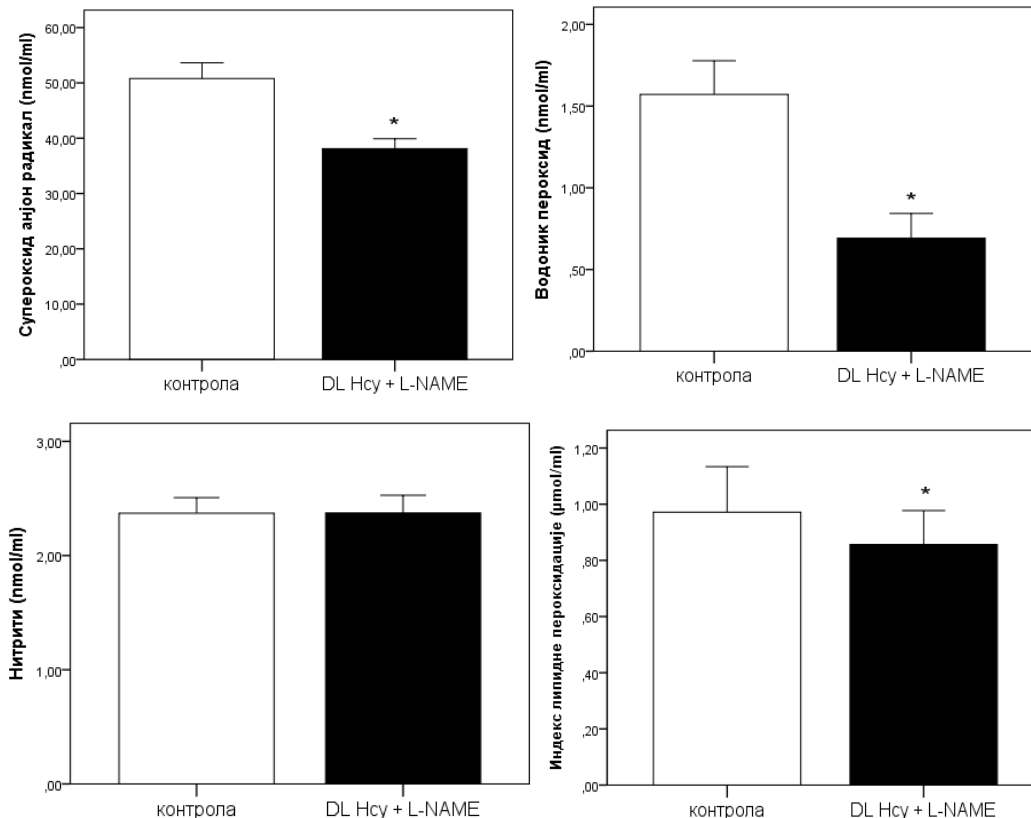
### 4.8.1. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ DL-ХОМОЦИСТЕИНА (10 $\mu$ mol/l) И L-NAME (30 $\mu$ mol/l) НА ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти ко-апликације DL-хомоцистеина (10 $\mu$ mol/l) и L-NAME (30 $\mu$ mol/l) на параметре оксидационог стреса приказани су у Табели 23 и на Графику 20. Након ко-апликације DL-хомоцистеина (DL Hcy) и L-NAME, нивои индекса липидне пероксидације (TBARS), супероксид анјон радикала (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) и водоник пероксида (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) су се статистички значајно смањили.

Табела 23. Нивои прооксиданата у коронарном венском ефлуенту пре и након ко-апликације DL-хомоцистеина (10 $\mu$ mol/l) и L-NAME (30 $\mu$ mol/l).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SD)	DL Hcy + L-NAME (X $\pm$ SD)	Статистичка значајност разлике
TBARS ( $\mu$ mol/ml)	0.97 $\pm$ 0.16	0.85 $\pm$ 0.12	* $p$ <0.05
NO <sub>2</sub> (nmol/ml)	2.37 $\pm$ 0.13	2.37 $\pm$ 0.15	$p$ >0.05
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/ml)	50.78 $\pm$ 2.85	38.12 $\pm$ 1.79	* $p$ <0.05
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol/ml)	1.57 $\pm$ 0.20	0.69 $\pm$ 0.15	* $p$ <0.05

График 20. Разлика у нивоима прооксиданата (X $\pm$ SD) у коронарном венском ефлуенту пре и након ко-апликације DL-хомоцистеина (10 $\mu$ mol/l) и L-NAME (30 $\mu$ mol/l).



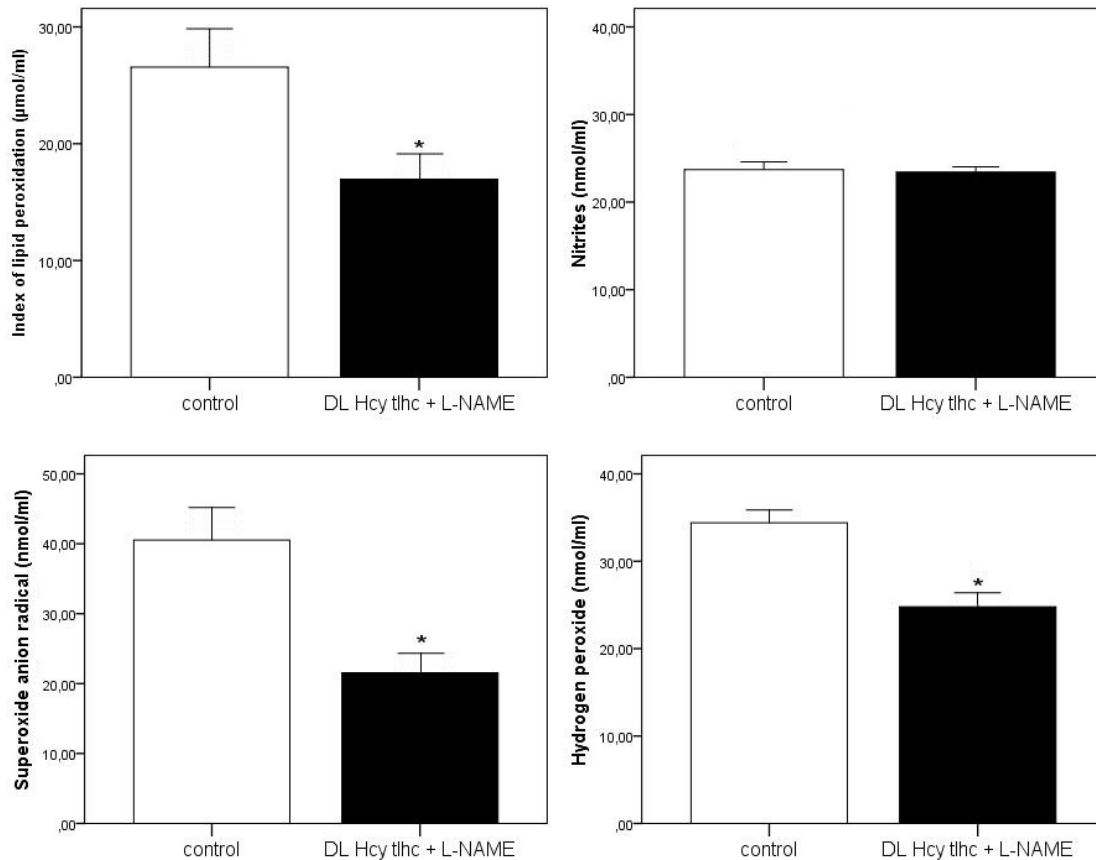
### 4.8.2. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ DL-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu$ mol/l) И L-NAME (30 $\mu$ mol/l) НА ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти ко-апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ( $10\mu\text{mol/l}$ ) и L-NAME ( $30\mu\text{mol/l}$ ) на параметре оксидационог стреса приказани су у Табели 24 и на Графику 21. Након ко-апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (DL Hcy thc) и L-NAME, нивои индекса липидне пероксидације (TBARS), супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ ) и водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) су се статистички значајно смањили.

**Табела 24.** Нивои прооксиданата у коронарном венском ефлуенту пре и након ко-апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ( $10\mu\text{mol/l}$ ) и L-NAME ( $30\mu\text{mol/l}$ ).

Параметар	Контрола (X±SD)	DL Hcy thc + L-NAME (X±SD)	Статистичка значајност разлике
TBARS ( $\mu\text{mol/ml}$ )	27.02±3.04	17.46±2.63	* $p<0.05$
$\text{NO}_2$ (nmol/ml)	23.74±1.00	23.30±0.51	$p>0.05$
$\text{O}_2^-$ (nmol/ml)	40.70±6.24	23.33±4.45	* $p<0.05$
$\text{H}_2\text{O}_2$ (nmol/ml)	34.55±2.45	24.70±3.03	* $p<0.05$

**График 21.** Разлика у нивоима прооксиданата (X±SD) у коронарном венском ефлуенту пре и након ко-апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ( $10\mu\text{mol/l}$ ) и L-NAME ( $30\mu\text{mol/l}$ ).



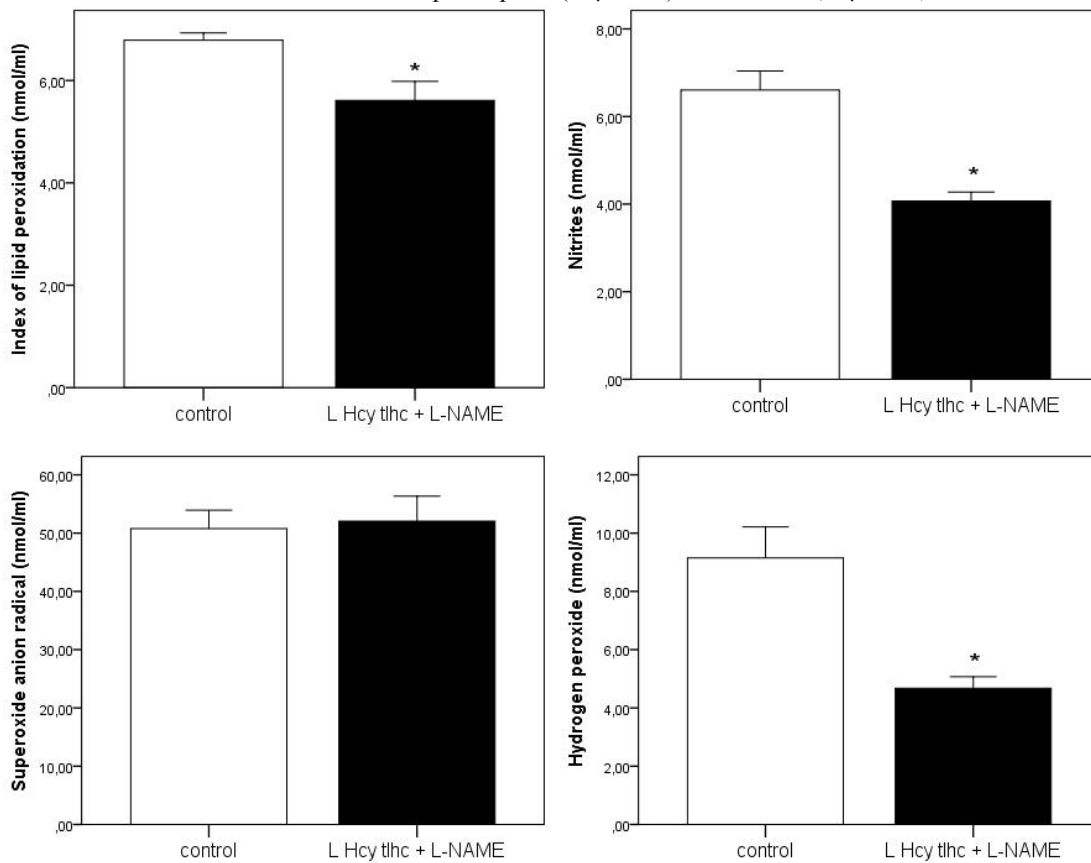
### 4.8.3. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ L-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu$ mol/l) И L-NAME (30 $\mu$ mol/l) НА ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти ко-апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l) и L-NAME (30 $\mu$ mol/l) на параметре оксидационог стреса приказани су у Табели 25 и на Графику 22. Након ко-апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (L Hcy thc) и L-NAME, нивои индекса липидне пероксидације (TBARS), нитрита ( $\text{NO}_2$ ), и воденик пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) су се статистички значајно смањили.

**Табела 25.** Нивои прооксиданата у коронарном венском ефлуенту пре и L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l) и L-NAME (30 $\mu$ mol/l).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SD)	L Hcy thc + L-NAME (X $\pm$ SD)	Статистичка значајност разлике
TBARS ( $\mu$ mol/ml)	6.78 $\pm$ 0.14	5.61 $\pm$ 0.37	* $p$ <0.05
$\text{NO}_2$ (nmol/ml)	6.60 $\pm$ 0.43	4.08 $\pm$ 0.20	* $p$ <0.05
$\text{O}_2^-$ (nmol/ml)	50.78 $\pm$ 3.13	52.04 $\pm$ 4.30	$p$ >0.05
$\text{H}_2\text{O}_2$ (nmol/ml)	9.15 $\pm$ 1.06	4.67 $\pm$ 0.39	* $p$ <0.05

**График 22.** Разлика у нивоима прооксиданата (X $\pm$ SD) у коронарном венском ефлуенту пре и након L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l) и L-NAME (30 $\mu$ mol/l).



## 4.9. УТИЦАЈ ИНХИБИЦИЈЕ СО НА ОКСИДАЦИОНЕ ЕФЕКТЕ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

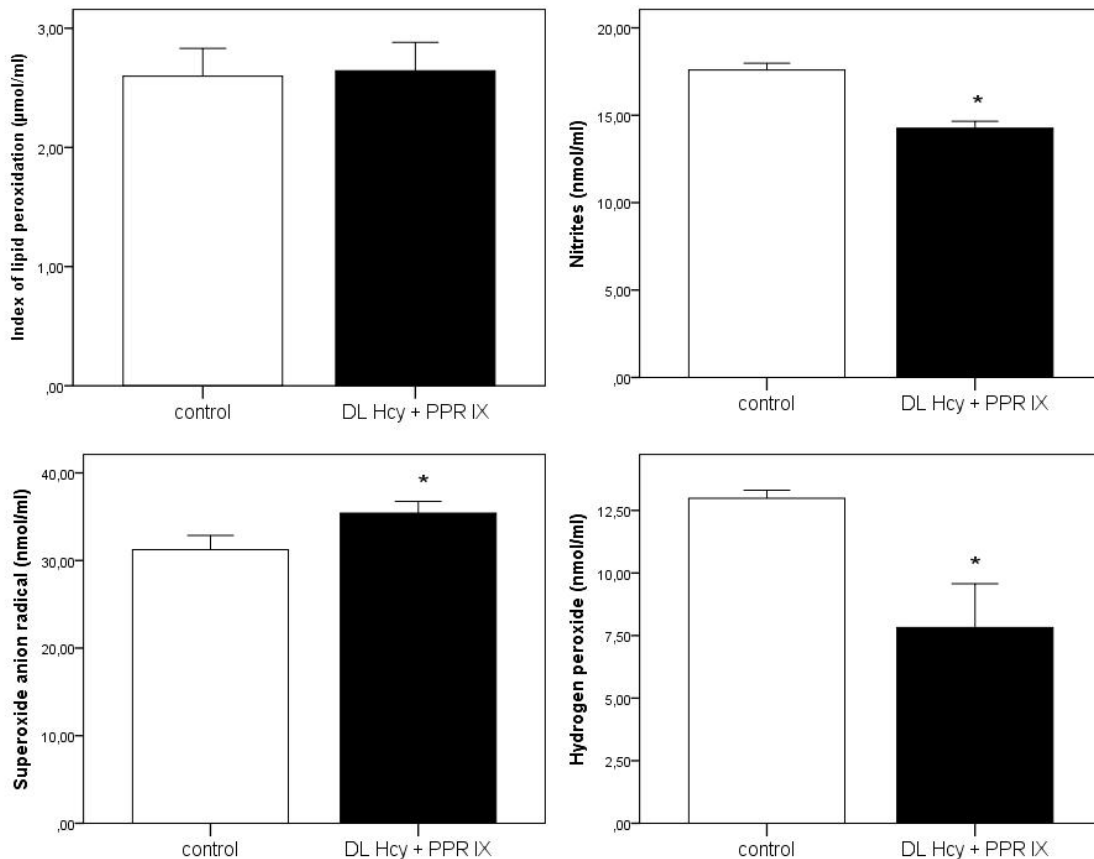
### 4.9.1. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ DL-ХОМОЦИСТЕИНА (10 $\mu$ mol/l) И ЦИНКПРОТОПОРФИРИНА IX (10 $\mu$ mol/l) НА ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти ко-апликације DL-хомоцистеина (10 $\mu$ mol/l) и цинкпротопорфирина IX (10 $\mu$ mol/l) на параметре оксидационог стреса приказани су у Табели 26 и на Графику 23. Након ко-апликације DL-хомоцистеина (DL Hcy) и цинкпротопорфирина IX (PPR IX), нивои супероксид анјон радикала ( $O_2^-$ ) су се статистички значајно повећали, док су нивои нитрита ( $NO_2$ ) и водоник пероксида ( $H_2O_2$ ) опали.

Табела 26. Нивои прооксиданата у коронарном венском ефлуенту пре и након ко-апликације DL-хомоцистеина (10 $\mu$ mol/l) и цинкпротопорфирина IX (10 $\mu$ mol/l).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SD)	DL Hcy + PPR IX (X $\pm$ SD)	Статистичка значајност разлике
TBARS ( $\mu$ mol/ml)	2.59 $\pm$ 0.23	2.64 $\pm$ 0.23	p>0.05
NO <sub>2</sub> (nmol/ml)	17.59 $\pm$ 0.38	14.25 $\pm$ 0.39	*p<0.05
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/ml)	31.23 $\pm$ 1.62	35.41 $\pm$ 1.32	*p<0.05
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol/ml)	12.98 $\pm$ 0.31	7.82 $\pm$ 1.74	*p<0.05

График 23. Разлика у нивоима прооксиданата (X $\pm$ SD) у коронарном венском ефлуенту пре и након ко-апликације DL-хомоцистеина (10 $\mu$ mol/l) и цинкпротопорфирина IX (10 $\mu$ mol/l).



### 4.9.2. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ DL-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu$ mol/l) И ЦИНКПРОТОПОРФИРИНА IX (10 $\mu$ mol/l) НА



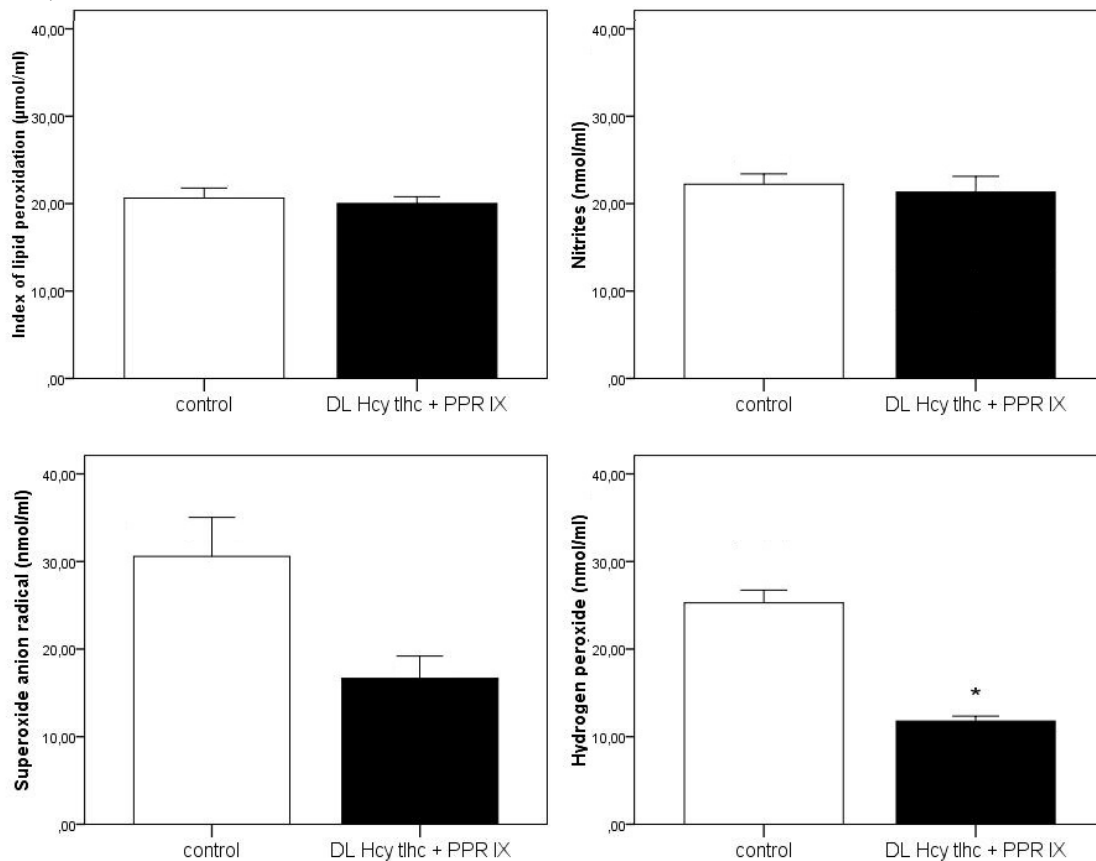
## ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти ко-апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ( $10\mu\text{mol/l}$ ) и цинкпротопорфирина IX ( $10\mu\text{mol/l}$ ) на параметре оксидационог стреса приказани су у Табели 27 и на Графику 24. Након ко-апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (DL Hcy thc) и цинкпротопорфирина IX (PPR IX), нивои водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) су се статистички значајно смањили.

**Табела 27.** Нивои прооксиданата у коронарном венском ефлуенту пре и након ко-апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ( $10\mu\text{mol/l}$ ) и цинкпротопорфирина IX ( $10\mu\text{mol/l}$ ).

Параметар	Контрола ( $X\pm SD$ )	DL Hcy thc + PPR IX ( $X\pm SD$ )	Статистичка значајност разлике
TBARS ( $\mu\text{mol/ml}$ )	$21.54\pm 0.46$	$20.96\pm 0.23$	$p>0.05$
$\text{NO}_2$ (nmol/ml)	$23.62\pm 0.53$	$22.31\pm 0.80$	$p>0.05$
$\text{O}_2^-$ (nmol/ml)	$30.69\pm 4.97$	$16.84\pm 2.58$	$p>0.05$
$\text{H}_2\text{O}_2$ (nmol/ml)	$25.28\pm 1.12$	$11.42\pm 0.26$	$*p<0.05$

**График 24.** Разлика у нивоима прооксиданата ( $X\pm SD$ ) у коронарном венском ефлуенту пре и након ко-апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ( $10\mu\text{mol/l}$ ) и цинкпротопорфирина IX ( $10\mu\text{mol/l}$ ).



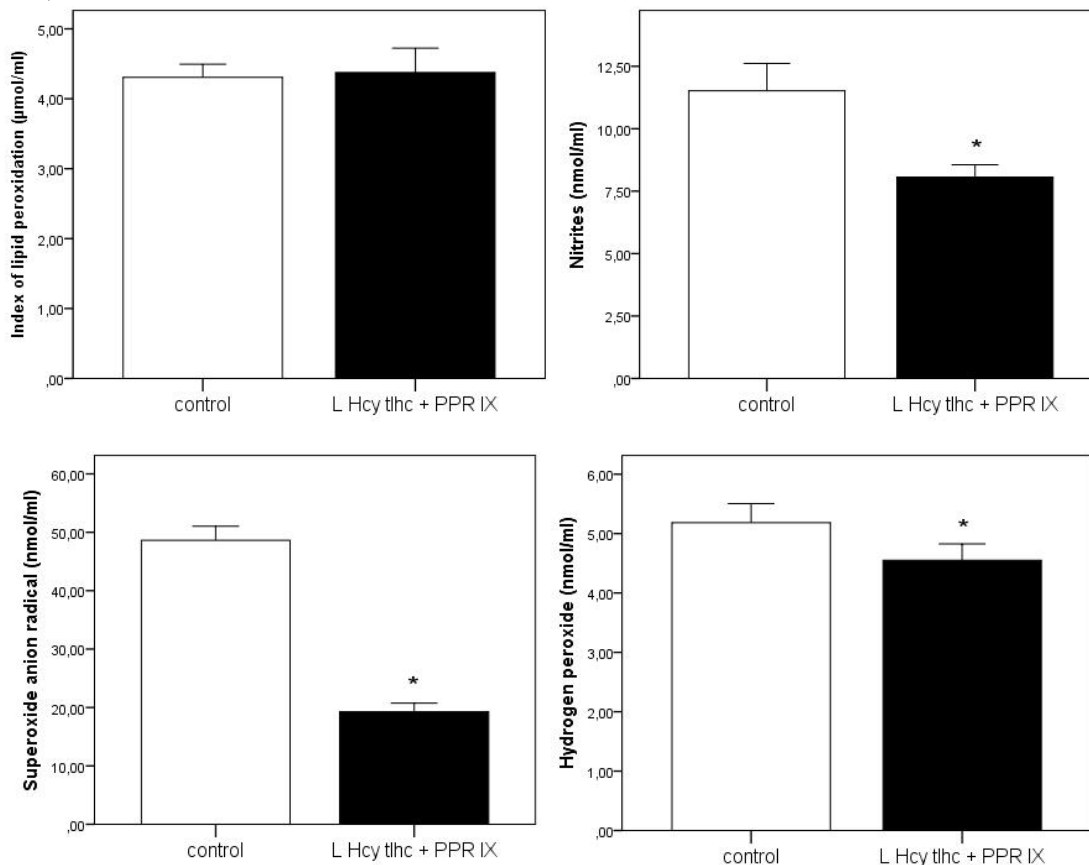
#### 4.9.3. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ L-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu$ mol/l) И ЦИНКПРОТОПОРФИРИНА IX (10 $\mu$ mol/l) НА ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти ко-апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l) и цинкпротопорфирина IX (10 $\mu$ mol/l) на параметре оксидационог стреса приказани су у Табели 28 и на Графику 25. Након ко-апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (L Hcy thc) и цинкпротопорфирина IX (PPR IX), нивои нитрита (NO<sub>2</sub>), супероксид анјон радикала (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), и водоник пероксида (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) су се статистички значајно смањили.

**Табела 28.** Нивои прооксиданата у коронарном венском ефлуенту пре и након ко-апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l) и цинкпротопорфирина IX (10 $\mu$ mol/l).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SD)	L Hcy thc + PPR IX (X $\pm$ SD)	Статистичка значајност разлике
TBARS ( $\mu$ mol/ml)	4.30 $\pm$ 0.18	4.37 $\pm$ 0.34	p>0.05
NO <sub>2</sub> (nmol/ml)	11.52 $\pm$ 1.09	8.06 $\pm$ 0.49	*p<0.05
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/ml)	48.62 $\pm$ 2.42	19.26 $\pm$ 1.47	*p<0.05
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol/ml)	5.18 $\pm$ 0.31	4.55 $\pm$ 0.27	*p<0.05

**График 25.** Разлика у нивоима прооксиданата (X $\pm$ SD) у коронарном венском ефлуенту пре и након ко-апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l) и цинкпротопорфирина IX (10 $\mu$ mol/l).



#### 4.10. УТИЦАЈ ИНХИБИЦИЈЕ H<sub>2</sub>S НА ОКСИДАЦИОНЕ ЕФЕКТЕ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

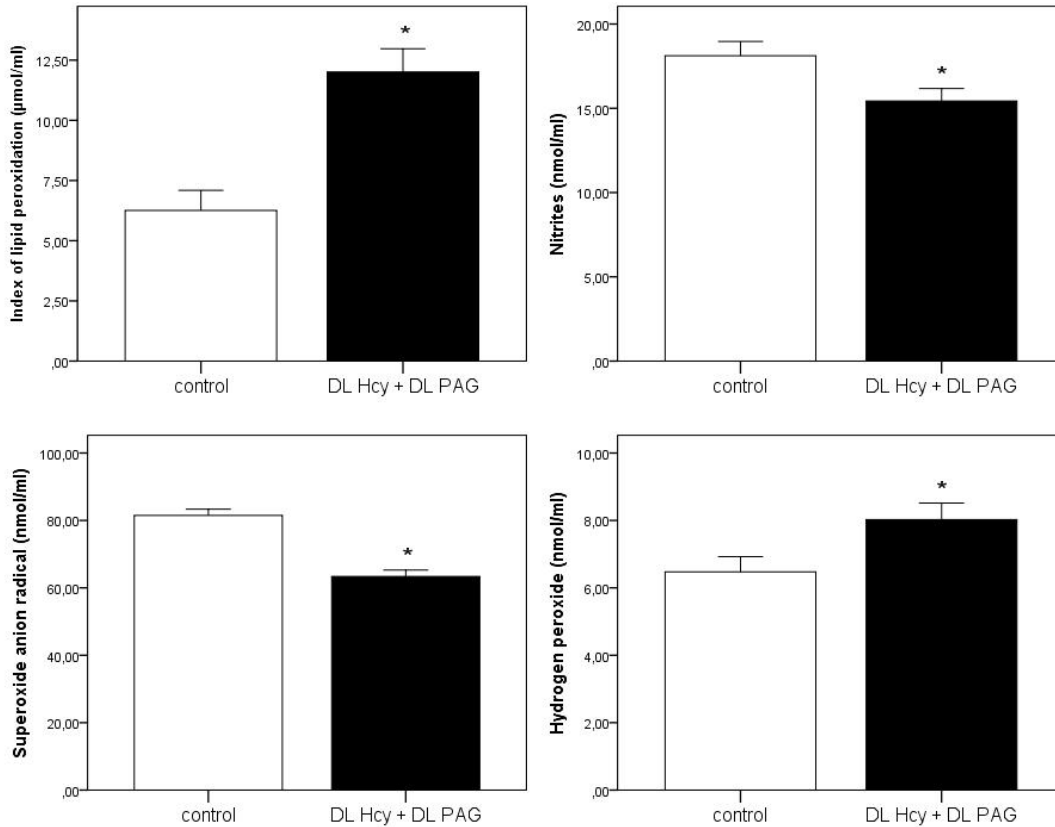
#### 4.10.1. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ DL-ХОМОЦИСТЕИНА (10 $\mu\text{mol/l}$ ) И DL-ПРОПАРГИЛГЛИЦИНА (10 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти ко-апликације DL-хомоцистеина (10 $\mu\text{mol/l}$ ) и DL-пропаргилглицина (10 $\mu\text{mol/l}$ ) на параметре оксидационог стреса приказани су у Табели 29 и на Графику 26. Након апликације ко-апликације DL-хомоцистеина (DL Hcy) и DL-пропаргилглицина (DL PAG), нивои нитрита ( $\text{NO}_2$ ) и супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ ) су се статистички значајно смањили, а индекса липидне пероксидације (TBARS) и водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) порасли.

**Табела 29.** Нивои прооксиданата у коронарном венском ефлуенту пре и након ко-апликације DL-хомоцистеина (10 $\mu\text{mol/l}$ ) и DL-пропаргилглицина (10 $\mu\text{mol/l}$ ).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SD)	DL Hcy + DL PAG (X $\pm$ SD)	Статистичка значајност разлике
TBARS ( $\mu\text{mol/ml}$ )	6.25 $\pm$ 0.83	12.01 $\pm$ 0.96	* $p < 0.05$
$\text{NO}_2$ (nmol/ml)	18.11 $\pm$ 0.85	15.43 $\pm$ 0.74	* $p < 0.05$
$\text{O}_2^-$ (nmol/ml)	81.46 $\pm$ 1.85	63.36 $\pm$ 1.89	* $p < 0.05$
$\text{H}_2\text{O}_2$ (nmol/ml)	6.47 $\pm$ 0.45	8.02 $\pm$ 0.49	* $p < 0.05$

**График 26.** Разлика у нивоима прооксиданата (X $\pm$ SD) у коронарном венском ефлуенту пре и након ко-апликације DL-хомоцистеина (10 $\mu\text{mol/l}$ ) и DL-пропаргилглицина (10 $\mu\text{mol/l}$ ).



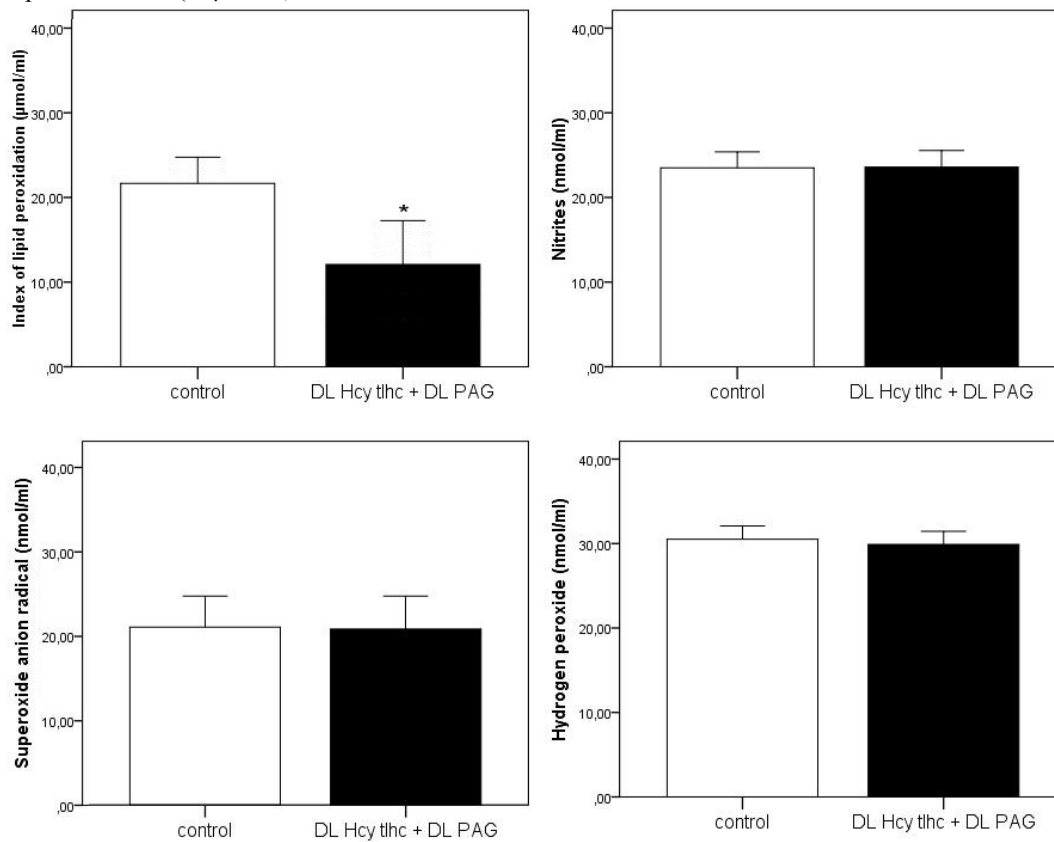
#### 4.10.2. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ DL-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu\text{mol/l}$ ) И DL-ПРОПАРГИЛГЛИЦИНА (10 $\mu\text{mol/l}$ ) НА ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Ефекти ко-апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu\text{mol/l}$ ) и DL-пропаргилглицина (10 $\mu\text{mol/l}$ ) на параметре оксидационог стреса приказани су у Табели 30 и на Графику 27. Након ко-апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (DL Hcy thc) и DL-пропаргилглицина (DL PAG), нивои индекса липидне пероксидације (TBARS) су се статистички значајно смањили.

**Табела 30.** Нивои прооксиданата у коронарном венском ефлуенту пре и након ко-апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu\text{mol/l}$ ) и DL-пропаргилглицина (10 $\mu\text{mol/l}$ ).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SD)	DL Hcy thc + DL PAG (X $\pm$ SD)	Статистичка значајност разлике
TBARS ( $\mu\text{mol/ml}$ )	22.50 $\pm$ 3.00	11.97 $\pm$ 7.42	* $p < 0.05$
NO <sub>2</sub> (nmol/ml)	23.88 $\pm$ 1.61	23.75 $\pm$ 1.40	$p > 0.05$
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/ml)	21.53 $\pm$ 3.74	21.55 $\pm$ 4.18	$p > 0.05$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol/ml)	30.78 $\pm$ 1.52	29.89 $\pm$ 1.05	$p > 0.05$

**График 27.** Разлика у нивоима прооксиданата (X $\pm$ SD) у коронарном венском ефлуенту пре и након ко-апликације DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu\text{mol/l}$ ) и DL-пропаргилглицина (10 $\mu\text{mol/l}$ ).



#### 4.10.3. УТИЦАЈ КО-АПЛИКАЦИЈЕ L-ХОМОЦИСТЕИН ТИОЛАКТОН ХИДРОХЛОРИДА (10 $\mu$ mol/l) И DL-ПРОПАРГИЛГЛИЦИНА (10 $\mu$ mol/l) НА ДИНАМИКУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

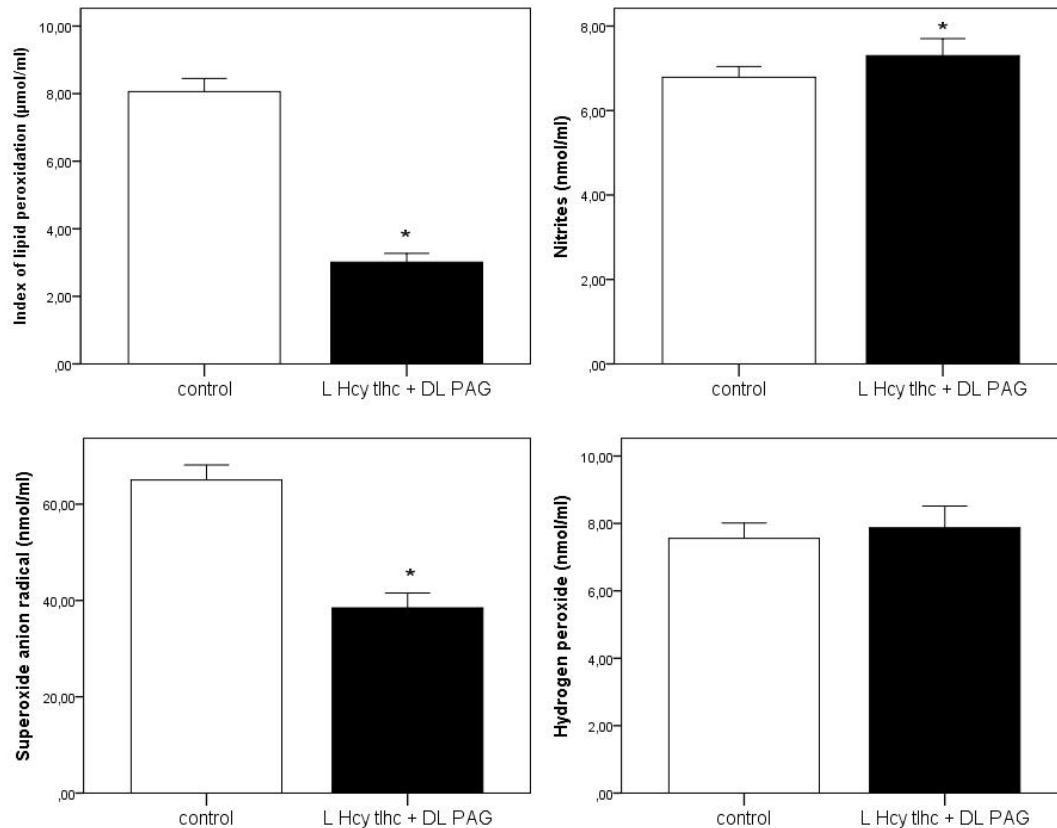
Ефекти ко-апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l) и DL-пропаргилглицина (10 $\mu$ mol/l) на параметре оксидационог стреса приказани су у Табели 31 и на Графику 28.

Након ко-апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (L Hcy thc) и DL-пропаргилглицина (DL PAG), нивои индекса липидне пероксидације (TBARS) и супероксид анјон радикала ( $O_2^-$ ) су се значајно смањили, док су нивои нитрита ( $NO_2$ ) порасли.

**Табела 31.** Нивои прооксиданата у коронарном венском ефлуенту пре и након ко-апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l) и DL-пропаргилглицина (10 $\mu$ mol/l).

Параметар	Контрола (X $\pm$ SD)	L Hcy thc + DL PAG (X $\pm$ SD)	Статистичка значајност разлике
TBARS ( $\mu$ mol/ml)	8.06 $\pm$ 0.38	3.01 $\pm$ 0.25	* $p$ <0.05
$NO_2$ (nmol/ml)	6.78 $\pm$ 0.25	7.30 $\pm$ 0.40	* $p$ <0.05
$O_2^-$ (nmol/ml)	65.02 $\pm$ 3.13	38.46 $\pm$ 3.06	* $p$ <0.05
$H_2O_2$ (nmol/ml)	7.55 $\pm$ 0.45	7.87 $\pm$ 0.64	$p$ >0.05

**График 28.** Разлика у нивоима прооксиданата (X $\pm$ SD) у коронарном венском ефлуенту пре и након ко-апликације L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10 $\mu$ mol/l) и DL-пропаргилглицина (10 $\mu$ mol/l).



**V**

**ДИСКУСИЈА**

Главни циљ ове студије је био да на експерименталном моделу изолованог срца пацова испита директне ефекте хомоцистеина и његових метаболита на миокард и коронарну циркулацију. Иако је до сада добро познато да хомоцистеин и њему сродне супстанце имају све значајнију улогу у патофизиологији КВБ, и као узрочници или све више биомаркери новонасталих поремећаја КВС или компликација истих (448-452), већина, па чак и најновијих истраживања, било експерименталних (453, 454), било клиничких (455-459), углавном проучава утицај хомоцистеина на васкуларни систем, док се о ефектима ове аминокиселине и њених метаболита на срчани мишић и коронарну циркулацију, врло мало зна.

Ради комплетне слике о улози хомоцистеина у (пато)физиологији миокарда и коронарне циркулације, у студији смо испитивали три најчешћа облика хомоцистеина, преко којих он може остварити своје ефекте у организму. Тачније, применили смо хомоцистеин у свом основном облику (DL Hcy) и у форми његовог потенцијално токсичног облика - тиолактона (DL Hcy tlhc и L Hcy tlhc).

Будући на, све морфо-функционалне сличности срца пацова са хуманим срцем, сматрамо да је модел ретроградно перфундованог изолованог срца пацова вероватно најоптималнији, за овакву врсту истраживања. Такође, у жељи да покушамо да објаснимо механизме којима хомоцистеин и његове изоформе делују на миокард и коронарну циркулацију, одлучили смо се да истраживање оплеменимо потпуно новом и у нашим научним круговима мало познатом тематиком улоге гасотрансмитера (NO, CO и H<sub>2</sub>S) и оксидационог стреса у овим ефектима хомоцистеина. Пошто се на основу литературних информација и свега изнетог у Уводу, наслућује комплексна трострука интеракција хомоцистеина са гасотрансмитерима и параметрима оксидационог стреса, наша хипотеза је била да ће, и у случају ове студије, до поменутог интермолекуларног деловања доћи, што свакако може бити значајно у објашњењу и разумевању механизма добијених ефеката.

У том смислу, а према нашим сазнањима и доступним литературним базама података, експериментални дизајн нашег истраживања представља пионирски подухват овакве врсте и прву студију која испитује ову или сличну проблематику у нашој замљи и шире.

Обзиром да је очигледно да ова проблематика има и примарно клиничко полазиште и изразиту клиничку примену, јасно је да садашња експериментална студија може бити добра полазна основа будућих озбиљних, мултицентричних

клиничких испитивања овакве тематике у нашој земљи, а све са циљем смањења КВС ризика и компликација код пацијената са КВБ.

У нашем експерименталном моделу, рад срца је процењиван на основу праћења и анализе кардиодинамике леве коморе као морфолошки и функционално доминантне срчане шупљине. Сви кардиодинамски параметри, осим МБР, су регистровани директно, пласирањем сензора (transducer BS4 73-0184) у леву комору срца. Ова инвазивна процедура је тако омогућила крајње прецизно и валидно мерење свих доступних и за нашу студију релевантних показатеља функције миокарда – максималну ( $dp/dt \max$ ) и минималну ( $dp/dt \min$ ) стопу промене притиска у левој комори, систолни (SLVP) и дијатолни притисак (DLVP) леве коморе, и срчану фреквенцу (HR). Средњи притисак у аорти (МБР) је регистрован преко сензора (perfusion pressure transducer) локализованог уз исходиште аорте.

И док су остали параметри (SLVP, DLVP, HR) добро познати, у наредном делу ћемо се кратко задржати на објашњењу првопоменутих кардиодинамских показатеља  $dp/dt \max$  и  $dp/dt \min$ . Ови параметри означавају величину (стопу) промене притиска (mmHg) у левој комори у функцији времена (током једне секунде). У зависности од фазе срчаног циклуса, ове варијације притисака су на нашем апарату представљене као максималне ( $dp/dt \max$ ), током систоле, и минималне ( $dp/dt \min$ ), (увек има предзнак минус, (-)), промене притисака током дијастоле.

Јасно је да, ефикасност и квалитет рада срчаног мишића, директно диктирају вредности ових параметара, те се тако они, и у клиничкој употреби (460), користе за индиректну процену снаге срчане контракције, тј. контрактилности ( $dp/dt \max$ ), односно адекватну релаксацију срца ( $dp/dt \min$ ). У складу са тим, у садашњој студији смо били у могућности да пратимо комплетну кардиодинамику срчаног рада, тј. како период систоле ( $dp/dt \max$ ) тако и период дијастоле ( $dp/dt \min$ ) миокарда. Смањење контрактилне снаге срца, у овом случају (поред осталих показатеља), уочавамо смањењем вредности  $dp/dt \max$ , односно, губитак релаксантне активности срца повећањем  $dp/dt \min$  ка позитивним вредностима (обзиром да има предзнак минус (-)), и обрнуто. У кардиодиманском смислу ови параметри су изузетно важни показатељи функционалних процеса у самом срцу (ефикасности фаза срчаног циклуса) –  $dp/dt \max$  показује очуваност фазе систоле, способност контракције леве коморе (инотропно својство), док  $dp/dt \min$  може бити користан у процени дијастоле, очуваности процеса релаксације леве коморе (луситропно својство).



На тај начин, поремећај систоле миокарда, региструјемо снижењем вредности  $dp/dt \max$ , док дијастолну дисфункцију уочавамо порастом  $dp/dt \min$  (постаје још негативнији).

## **5.1. ЕФЕКТИ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА**

О значају овог експерименталног модела довољно говори већ добро позната и изнова утврђена повезаност хомоцистеина и различитих болести срца (461-463). Занимљиво је да, иако су бројне клиничке студије несумњиво доказале да хомоцистеин представља маркер и/или независни фактор ризика за развој срчане инсуфицијенције и њених компликација, у готово свакој се сумарно истиче да ова аминокиселина вероватно остварује и директан штетни ефекат на миокард, али још увек нејасним механизмима (461-464).

И у клиничком смислу, веза хиперхомоцистеинемике и дисфункције леве коморе заиста постоји. Повишени нивои хомоцистеина су нађени код пацијената са оштећеном систолном функцијом леве коморе (464), а механизми укључени у ово патофизиолошко стање су још увек непознати. Ипак, ови аутори, такође сумњају да хомоцистеин, на нејасан начин, може директно да негативно делује на миокард (464). Готово идентични подаци су добијени и у извештају чувене Фрамингамске студије, где се такође наводи утицај хомоцистеина на настанак поремећене морфологије и функције леве коморе (463).

Будући да су се о карактеристикама основног облика хомоцистеина, последњих година акумулирала бројна сазнања, и да су она детаљно описана у уводном излагању, у овом делу текста ћемо нешто више рећи о најновијим подацима везаним за особености хомоцистеин тиолактона и његовом значају у патофизиологији КВБ. Особине и улога овог облика хомоцистеина у етиопатогенези КВБ, су још увек недовољно познати, а постојећи подаци су оскудни у неусаглашени, нарочито са становишта његових директних ефеката на миокард и ендотел коронарне циркулације.

Хомоцистеин тиолактон (Hcy tlhc) је метаболит хомоцистеина који настаје током биосинтезе протеина када ензим MetRS `грешком` селектује хомоцистеин уместо метионина (465). Метаболички пут синтезе тиолактона постаје доминантан у ситуацијама када су процеси ре-метилације или транс-сулфурације у метаболизму хомоцистеина нарушени услед генетских поремећаја ензима CBS, MS или MTHFR,

као и недовољног уноса фолата и витамина Б12 и Б6. Занимљиво је да су ћелије нашег организма способне да елиминишу Нсу тиолактон у екстрецелуларни матрикс. Ипак тиолактон није поуздан маркер укупне концентрације хомоцистеина у плазми (tHcy). Његов удео у tHcy износи свега око 0.14-0.28%, и са полу-временом живота од 1 сата, не чуди што су код неких људи његови нивои на граници детектабилности. Физиолошки се његова екскреција из организма одвија путем бубрега, док су његове концентрације у мокраћи и до 100 пута веће него у плазми (466).

Обзиром да је веома реактиван, тиолактон са лакоћом формира амидне везе са аминокиселинским остацима протеина, изазивајући тако Н-хомоцистеинилацију протеина, што у крајњем доводи до губитка биолошке структурне и функције протеина (467). Н-хомоцистеинилацијом, протеин губи нето позитивно наелектрисање, услед замене високо базне аминокиселине лизина (pKa 10.5), са мање базном алфа аминокиселином хомоцистеина (pKa 7), узрокујући структурне и функцијске промене протеина.

Конкретно, хомоцистеинилацијом LDL-а се повећава њихова склоност ка оксидацији и олакшава његово преузимање од стране макрофага, што за последицу има формирање пенастих ћелија (255). Овако измењени LDL изазива и морфо-функцијске промене ендотелних ћелија, односно њихово оштећење, механизмом који највероватније укључује поремећај активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  пумпе, услед чега долази до претераног накупљања  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  у ћелији. Ово све ремети или зауставља ендотелну продукцију NO-а и промовише производњу пероксинитрита и осталих ROS. Сума свих ових процеса води ка ендотелној дисфункцији, полазној основи атеросклерозе.

Осим тога, LDL након везе са тиолактоном изазива аутоимунски одговор и повећава степен васкуларне инфламације, који воде ка развоју атеросклерозе. Такође, угрушци формиран од фибриногена који је подлегао хомоцистеинилацији, су отпорнији на процес лизирања, што свакако повећава ризик од тромбозе крвних судова (468).

Поред ових ефеката тиолактон задобија све већу пажњу научне јавности због сумње да поседује и цитотоксична својства у КВС (461). Сматра се да је овај метаболит хомоцистеина штетнији за морфо-функционалне карактеристике ћелије КВС од самог хомоцистеина. Показано је да Нсу тиолактон доводи до апоптозе хуманих ендотелних ћелија (469, 470). Са становишта поређења, хомоцистеин, у свом основном облику, такође може да узрокује апоптозу поменутих ћелија, али у неупоредиво већим концентрацијама (469, 470).

Управо због тога смо се одлучили да у нашој студији испитамо и упоредимо дејства хомоцистеина у својој базичној форми (DL Hcy) и његових тиолактон облика (DL и L Hcy tlhc).

У садашњој студији, резултати које смо добили показују да су све три примењене изоформе хомоцистеина, довеле до значајног смањења најважнијих кардиодинамских параметара: DL Hcy и DL Hcy tlhc су индуковали значајно смањење  $dp/dt \max$ , и SLVP (Табела 4, 5, и Графици 1, 2), док је L облик хомоцистеин тиолактона (L Hcy tlhc) смањењем вредности  $dp/dt \max$ , и  $dp/dt \min$ , потпуно супримирао и систолну и дијастолну функцију миокарда (Табела 6 и График 3). На основу ових резултата можемо увидети да хомоцистеин, генерално (а нарочито његова L изоформа) негативно утиче на целокупан срчани циклус, тј. смањењем  $dp/dt \max$ , негативно утиче на контрактилну способност миокарда (систолу), док порастом негативних вредности  $dp/dt \min$ , ремети релаксацију (дијастолу) срца.

Једно од потенцијалних објашњења ових резултата може бити податак да DL Hcy и L Hcy, још увек непознатим механизмима, делују кардиотоксично на културе изолованих кардиомиоцита, што може бити једно од објашњења за наше резултате (471). Ипак, у погледу величине статистичке значајности разлике, тј. тежине функционалног оштећења, из табела и графика (Табеле 4-6, Графици 1-3) се јасно уочава да су тиолактони (нарочито L облик) изазвали значајније смањење испитиваних параметара у односу на основни хомоцистеин.

У овом истраживању ниједан од коришћених облика хомоцистеина није изазвао снижење вредности МВР, што је био очекиван налаз. Наиме, МВР (mean blood pressure) представља ознаку за средњи артеријски притисак крви у аорти, и као што смо поменули, сензор који региструје овај притисак се налази непосредно уз аорту. Међутим, како у нашем експерименталном моделу, кроз срце, а самим тим и кроз аорту не протиче крв, већ комплексни Krebs-Henseleit-ов раствор (који је по свом саставу сличан крви односно екстрацелуларној течности), МВР, у овом случају представља притисак перфузионог раствора на почетку аорте. Обзиром да перфузиони раствор пролази ретроградно, за разлику од физиолошких услова када крв улази у аорту односно илзали из ње, није ни могла да се очекује значајнија промена у вредностима овог параметра.

Сумарно, очигледно да хомоцистеин тиолактон показује негативније дејство на функцију миокарда, што може бити логичан резултат, обзиром на његову потврђену токсичност, доказану у бројним клиничким и претклиничким радовима (467-470). Израженије негативно дејство L-форме хомоцистеина може бити последица његових стереоизоменрих (енантиомерних) карактеристика (472).

На жалост, вероватно због актуелности теме, постоји јако мало релевантних експерименталних студија које би могле да послуже за компарацију наших резултата. Највећи број ових испитивања потиче од истраживачке групе предвођене Kennedy и Joseph-ом (473, 474). Ова група аутора је у својим истраживањима, уско фокусирана на испитивање хроничних, али и акутних ефеката хомоцистеина на изоловано срце пацова.

У њиховом првом анималном моделу, су током 10 недеља третирани спонтано хипертензивне пацове хомоцистеинском дијетом у циљу изазивања хиперхомоцистеиније. Након експерименталног периода, на препаратима срца је примећено присуство накупина мастоцита и колагена, сигурних показатеља измењене структуре срца. Ове морфолошке промене су биле поткрепљене логичним оштећењем функције миокарда, у смислу повећања дијастолног притиска срца и дијастолне дисфункције (473). У следећем, потпуно идентичном експерименталном моделу су користили нормотензивне животиње и потврдили претходне резултате (474).

Оба експериментална модела су на крају обухватила и перфузију срца на Langendorff апарату, што је за нас посебно значајно. Резултати које су добили недвосмислено показују дијастолну дисфункцију леве коморе, док промена у контрактилној способности, срчаној фреквенци и систолној функцији није било (473, 474). Налази ових експерименталних модела у први план стављају два показатеља: прво, хомоцистеин директно оштећује структуру и функцију срца, и друго, свој негативан утицај на рад срца остварује независно од осталих фактора ризика (у овом случају хипертензије).

Са аспекта нашег истраживања још је значајнија наредна студија поменуте групе аутора (475), која се тиче испитивања акутних ефеката хомоцистеина на изолованом срцу пацова. Обзиром на сву сличност са нашим експерименталним моделом, ово је вероватно најподеснија студија за поређење са резултатима које смо добили.

У овој студији Kennedy и Joseph (475) су користећи експериментални модел врло сличан нашем (ретроградна перфузија срца по Langendorff-у, при константном перфузионом притиску од 70 cmH<sub>2</sub>O) проучавали акутна дејства хомоцистина (10-300μM) на систолну функцију и контрактилност миокарда. Такође, у истом истраживању, своја сазнања су допунили и испитивањем утицаја хомоцистеина на изоловане папиларне мишиће у медијуму коронарног ефлуента, у жељи да, између осталог, утврде да ли је за испољавање ефеката хомоцистеина битан утицај коронарног ендотела (475).

Резултати које су добили су веома интересантни и показују да је хомоцистеин (при дози од 30 μM и дозама већим од 100μM) довео да значајног смањења систолне функције и контрактилне способности (dp/dt max) изолованог срца пацова, такође без промена у дијстолној функцији. Испитивања на папиларном мишићу су указала, да без присуства коронарног ефлуента, додавање хомоцистеина медијуму у коме се налази папиларни мишић, није узроковао никакве промене у контрактилности истог, док у случају апликације хомоцистеина заједно са ефлуентом долази до дозно зависног смањења контракције поменутих мишића (475).

Будући да се из овога може увидети да је за дејство хомоцистеина на миокард, неопходно присуство коронарног ефлуента, логично се претпоставило да коронарни ендотел може да има кључну улогу у читавом процесу. Апликацијом Triton X-100 (инхибитора функције комплетног ендотелног слоја крвног суда), негативни ефекти хомоцистеина су били елиминисани (475). Пошто су доказали значај ендотела у посредовању ефеката хомоцистеина на срце, аутори су, узевши у обзир познати негативни инотропни ефекат спреге NO-деривати арахидонске киселине (476), додатном администрацијом L-NNA (инхибитора NOS), и индометацина (инхибитора циклооксигеназе, COX), покушали да утврде утицај интеракције ових молекула на дејства хомоцистеина у овом експерименталном моделу. Међутим, након перфузије срца поменутих инхибиторима, није дошло до неутрализације постигнутих штетних дејстава хомоцистеина на миокард (475), што указује да механизми којима ова аминокиселина делује на срце могу бити посредовани факторима које секретује ендотел, али, макар у овој студији, то нису наведени молекули.

Сазнања ових еминентних студија су умногоме у корелацији са нашим резултатима (смањење контрактилности и систолне функције миокарда), упркос разлици у дози и врсти хомоцистеина. Наиме, у нашим експериментима је, у односу на поменута истраживања, примењена најмања доза хомоцистеина (10  $\mu\text{mol}$ ), и он коришћен и три различита облика, ради потпунијег увида у ефекте истог. У складу с тим, садашње истраживање је такође доказало да хомоцистеин и његови метаболити, и на акутан начин имају директно штетно дејство на функцију миокарда (леве коморе). Иако су наши препарати срца припремљени за будућа морфолошка (пато-и имуно-хистолошка) испитивања, због обимности теме, нисмо испитивањем обухватили и евентуалне структурне промене на срцу, што са овог становишта може бити недостатак нашег истраживања.

Поред студија поменуте групе аутора, наши резултати су делом у сагласности и са налазима Wan-а и сарадника (477) који су испитивали ефекте хомоцистеина на моделу исхемије срца. Ово истраживање је показало да и на моделу исхемичног срца хомоцистеин смањује контрактилну способност срца ( $dp/dt \max$ ), али без утицаја на систолни (SLVP), дијастолни (DLVP), средњи артеријски притисак (MBP) и срчану фреквенцу (HR) (477), што је врло слично нашим налазима. Иако је у нашем случају испитавање спроведено на здравом срцу, очигледно да хомоцистеин у и нормоксичним и хипоксичним условима, акутно или хронично примењен, директно негативно делује на рад срца. У клиничком смислу, ова сазнања могу бити нарочито важна са прогностичког становишта код особа са повећаним ризиком за развој КВБ, код којих се утврде високе вредности хомоцистеина, а још увек немају евиденте патолошке промене на срцу и/или поремећаје његове функције.

Механизми којима хомоцистеин изазива директна оштећења срчаног мишића и последични поремећај функције још увек нису расветљени, и умногоме зависе од времена потребног за испољавање његових ефеката, односно начина деловања – акутно или хронично дејство. У студијама, које се базирају на хроничној апликацији хомоцистеина, са циљем изазивања хиперхомоцистеинемije, највероватније долази до ремоделовања срца. Наиме, овај тиол стимулише накупљање мастоцита и интерстицијалног колагена, чиме доводи до интерстицијалне и периваскуларне фиброзе и ремети однос колагених/еластичних влакана који је од великог значаја за контрактилну способност миокарда (262). Мењањем структуре миокарда, хомоцистеин на овај начин слаби његову радну ефикасност.

Молекуларни механизми који започињу читав процес измене грађе миокарда су такође нејасни, али према неким ауторима, укључују активацију матриксних металопроотеиназа (MMPs) (478, 479), и слободних радикала (480). Потенцијална улога оксидационог стреса у поменутим механизмима је била управо једна од хипотеза и ове студије, и биће обрађена у наредним одељцима дискусије, са освртом на везу са резултатима кардиодинамиских параметара.

За разлику од хроничног ефекта, акутни утицаји хомоцистеина на срчани мишић су много мање испитивани, а механизми који стоје у позадини ових утицаја, још мање познати. И док код хроничне примене ова аминокиселина има довољно времена да изазове структурне промене срца и тако му умањи функционалну ефикасност, у случају акутне апликације молекуларни процеси су деликатнији. У доступним базама података постоје само неколико студија (од којих су неке поменуте у претходном делу текста) које су користиле приближно слични експериментални модел нашем, односно акутну апликацију хомоцистеина у склопу перфузије Krebs-Henseleit-овим раствором на препарату изолованог срца пацова по Langendorff-у.

У првој од студија, Panagia и коаутори (481) су испитивали утицај L хомоцистеин тиолактона на функцију миокарда у случају са и без претходне апликације метионина. Показано је да примена овог метаболита хомоцистеина поништава позитивно инотропно дејство метионина. Другим речима, хомоцистеин тиолактон не само да неутрализује ефекат свог прекурсора, већ и у наставку перфузије редукује контрактилну способност миокарда ( $dp/dt \max$ ), оштећујући тако његову функцију. Супротно томе, у групи која није била третирана метионином, L хомоцистеин тиолактон није изазвао значајније промене контрактилности (481). И поред поменутих сличности, неопходно је истаћи да је у овој студији доза хомоцистеин тиолактона била неупоредиво већа ( $230 \mu\text{mol/l}$ ) и да је он апликован у комбинацији са друге две супстанце аденозина и EHNA. Такође, за разлику од наше студије, коронарни проток је био подешен на константну вредност –  $7.8 \text{ ml/min}$ . Као једно од могућих објашењења акутног негативног ефекта ове аминокиселине, (а поготово њеног тиолактон облика), се наводи стварање S-аденозил-хомоцистеина у срцу, који инхибира метилацију фосолипида ћелијске мембране (од стране метионина), за коју се показало да још увек на нејасан начин повећава синтезу преклапања актина и миозина, тј. снагу контракције (481).

У другој студији, Shackebaei и сарадници (482) су испитивали директне ефекте акутне администрације хомоцистеина на срце (0.5 mM), 30 минута пре и током исхемије (45 минута) и првих 10 минута реперфузије. Ови аутори су указали да, и након исхемије, хомоцистеин смањује срчану фреквенцу (HR) и контрактилност миокарда (dp/dt max), те да срца третирана хомоцистеином имају слабији функционални опоравак након исхемије у односу на контролну групу (482). У смислу поређења са нашим истраживањем, иако је начин апликације хомоцистеина исти, његова доза је неупоредиво већа, док је испитивани модел срца различит (исхемија/реперфузија), те се наши резултати делом подударају. Занимљиво је да су ови ефекти хомоцистеина истоветни као и приликом његовог хроничног третмана на истом моделу исхемије срца (477).

Поред ових механизма, постоје претпоставке да акутна негативна дејства хомоцистеина на миокард могу бити последица поремећаја функције брзих  $\text{Na}^+$  канала (483). Наиме, хомоцистеин може изазвати смањење трајања деполаризације и амплитуде акционог потенцијала изолованих папиларних мишића миокарда (483). Ипак, ова сазнања нису обухватила испитивање кардиомиоцитима (што би било сврсисходније), и као и претходна, представљају не потврђене резултате.

На основу свега изнетог постаје нам јасније да: 1) хронични ефекти хомоцистеина на срчани мишић доводе до измене његове структуре (периваскуларна и интерстицијална фиброза), што се негативно одражава на функцију миокарда; 2) акутни ефекти хомоцистеина на срце су, као и хронични, такође негативни (оштећење систолне и дијастолне функције миокарда) и могу бити: а) посредовани ендотелним факторима који не обухватају NO или продукте COX (простациклине, тромбоксане, леукотријене), б) делом последица поремећаја  $\text{Na}^+$  канала, односно акционог потенцијала, и в) узроковани инхибицијом метилације фосфолипида ћелијске мембране, што на још увек нејасан начин, смањује способност кардиомиоцита да се адекватно контрахују. У сваком случају, механизми укључени у штетно дејство хомоцистеина на миокард су комплексни, и даље неразјашњени и сигурно подразумевају улогу бројних молекула, међу којима, врло вероватно осталих гасотрансмитера (CO,  $\text{H}_2\text{S}$ ), слободних радикала и других.



На крају, можемо запазити да без обзира на тип апликације (акутна или хронична) и/или величину примењене дозе, хомоцистеин у већини до сада изведених (различитих) експерименталних модела, негативно утиче на функцију миокарда. Ипак, механизми ових ефеката се итекако разликују. Док су код хроничне примене, рекло би се, једноставнији и боље изучени, у случају акутне (тренутне) апликације, они су разноврснији, сложенији и недовољно познати.

Ефекти хомоцистеина на коронарну циркулацију су мало испитивани. Иако о његовом утицају на ендотел системске васкуларне мреже има доста података, још увек се мало зна о ефектима ове аминокиселине на срчану васкуларну мрежу, а који обзиром на све њене специфичности, могу такође бити јединствени. Клиничке студије су показале да су повишене вредности хомоцистеина у плазми повезане са КАБ, те да хомоцистеин може бити независни фактор ризика за ову КВБ (484).

Ендотелна дисфункција представља основни патофизиолошки супстрат ефеката хомоцистеина у коронарној васкулатури. Као што је поменуто у уводном излагању, коронарни ендотел, захваљујући продукцији ендогених контролних молекула (пре свега NO и аденозина), има есенцијалну улогу у контроли коронарног васкуларног тонуса, односно адекватне перфузије срца. Поремећаји функције ендотела у коронарној васкуларној мрежи, на тај начин воде у губитак физиолошке перфузије миокарда и самим тим повећавају ризик од настанка инфаркта. Основни механизам оштећења коронарног ендотела представља међусобна зависност повећане продукције слободних радикала и/или смањене биорасположивости NO (485).

У једној од студија на пацовима је показано да хомоцистеин може довести до повећане продукције ROS и последичног смањења NO, што узрокује редукцију коронарног протока и поремећај функције миокарда (169). Наиме, сматра се 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 доводи до стварања још токсичнијег ONOO<sup>-</sup> (који са своје стране оштећује ендотел) и тако смањене биорасположивости NO (169, 204). Последица свих ових процеса представља оштећење ендотела, поремећај његовог вазодилаторног одговора (смањење протока) и ендотелну дисфункцију. Занимљиво је да и у хуманој популацији хомоцистеин смањује CF описаним механизмима (486, 487).

Најновије студије указују да дисфункција коронарног ендотела може да буде повезана са смањеним нивоима тетрахидробиоптерина (BH4) (488). Мада узрочна повезаност смањене концентracије овог ензима и поремећаја ендотелне функције, није позната, запажено је да у овим условима долази до смањене продукције NO, односно повећане ROS. Врло је интересно да хомоцистеин тиолактон изазива смањење CF и поремећај срчане функције и у раном периоду ембрионалног развоја, што су показала истраживања на ембрионима пилета (489). Ова сазнања могу бити изузетно важна у предикцији КВБ код трудница са хиперхомоцистеинемijом.

Утицај различитих форми хомоцистеина на коронару циркулацију у нашој студији је у сагласности са претходним малобројним истраживањима које су проучавале ову проблематику. Наши резултати показују да је хомоцистеин у свим испитиваним облицима довео до значајног пада CF (Табеле 4-6, Графици 1-3). Овакав ефекат може бити вероватно последица поремећене коронарне вазодилатације услед негативног дејства хомоцистеина (и/или његових метаболита) на биорасположивост NO. У погледу степена редукције коронарног протока, као и у случају осталих кардиодинамских показатеља, најјачи ефекат остварују тиолактон облици хомоцистеина, поготово L облик (Табеле 4-6, Графици 1-3), што евидентно указује на стереоизомерну специфичност добијених ефеката (472). Ипак, као што ћемо објаснити у даљем делу текста, занимљиво је да, у нашој студији, осим у случају основног облика хомоцистеина (Табеле 20-22, Графици 17-19) није дошло да смањења нивоа NO у коронарном венском ефлуенту. То значи да, макар теоретски, тиолактон, иако реактивнија форма хомоцистеина који би требало да лакше и ефикасније активира производњу ROS, односно смањи синтезу NO, у нашем експерименталном моделу, није имао таква својства. Међутим, за разлику од наше студије, истраживања која су поставила овакву хипотезу се базирају на моделу хиперхомоцистеинемije, односно хроничним ефектима хомоцистеина.

Поред тога, потенцијално објашњење ових резултата може бити чињеница да је доза тиолактона неопходна да `покрене` активност оксидаза, тј. стварање ROS, у нашој студији била недовољна (мала), што би требало потврдити наредним студијама. У сваком случају, ови резултати сугеришу да акутни ефекти основног облика хомоцистеина у коронарној циркулацији, могу бити посредовани NO, док стереоизомери тиолактона своја дејства остварују механизмима независним од NO.

Да бисмо потврдили улогу NO у ефектима хомоцистеина и његових метаболита у коронарној циркулацији, у наставку истраживања смо применили комбиновану апликацију сваког од облика хомоцистеина и L-NAME (инхибитора NOS). Резултати које смо добили су такође интересантни и показују да у случају комбинације оба DL облика хомоцистеина (DL Hcy и DL Hcy tlhc) са инхибитором NOS није било промене у динамици ослобађања NO (Табеле 23, 24, Графици 20, 24), док је удружена примена L тиолактона (L Hcy tlhc) са L-NAME-ом довела до смањеног ослобађања NO (Табела 29, График 26).

Ови резултати се битно разликују у односу на ефекте самосталне администрације свих облика хомоцистеина, на степен ослобађања NO (Табеле, 18-12, Графици 15-17). Мада би са своје стране L-NAME требао да редукује производњу NO, још увек нејасним механизмима, овај NOS инхибитор у случају комбинације са DL облицима хомоцистеина (DL Hcy и DL Hcy tlhc) не изазива значајније смањење у продукцији NO-а. Када је реч о L-облику хомоцистеина, редукација у производњи NO-а може бити последица интеракције ове изоформе хомоцистеина са L-NAME-ом током њихове заједничке апликације (у којој очигледно до изражаја долазе његове енантимерне специфичности) и представља потврду најизразитијег пада CF у групи третираној овим обликом хомоцистеина. Овај налаз такође може послужити и као објашњење потенцијалног механизма којим L Hcy tlhc делује на коронарни ендотел, што су показале и претходне студије (485-487).

Ипак, ма колико били изненађујући ови резултати сугеришу да се акутни ефекти хомоцистеина и његових метаболита на коронарни ендотел не могу са сигурношћу довести у везу са NO.

## **5.2. ЕФЕКТИ ИНХИБИТОРА РАЗЛИЧИТИХ ГАСОТРАНСМИТЕРА НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА**

Апликацијом инхибитора ензима који имају улогу у синтези CO и H<sub>2</sub>S смо желели да испитамо директну улогу ових нових гасотрансмitera у функцијама миокарда и регулацији коронарне циркулације. Значај NO у овој тематици, као трећег познатог гасотрансмitera нисмо проучавали преко самосталне инхибиције применом L-NAME из два основна разлога: 1) обзиром да су његови ефекти на миокард и коронарну циркулацију већ добро познати (476, 490), 2) јер се наша истраживачка група претходних година интензивно бавила овом проблематиком и

публиковала већ неколико радова из ове области (491-493), што ће бити објашњено у даљем делу текста. Ипак, будући да се о улози NO у ефектима хомоцистеина на рад срца и коронарну васкулатуру веома мало зна, у наставку истраживања смо испитивали комбиновану апликацију применом инхибитора синтезе овог молекула (L-NAME) са различитим изоформама хомоцистеина.

О ефектима поменутих гасних сигналних молекула (поготово NO-а), генерално, на КВС, последњих година има све више података. Ипак њихови директни ефекти на срце (нарочито CO и H<sub>2</sub>S) као и коронарну циркулацију су још увек нејасни. Међутим, већ на основу претходних скромних сазнања се наслућује да би CO и H<sub>2</sub>S могли да имају важну улогу у функцији и перфузији миокарда.

Добро је утврђено да је NO неуротрансмитер и у централном и у периферном нервном систему, да изазива релаксацију васкуларних глатких мишића, и да има својства инфламаторног посредника (464). Главни сигнални пут NO-а укључује ензим гуанилил циклазу (sGC), који конвертује cGTP до cGMP-а (464). Пошто је NO и слободни радикал (<sup>•</sup>NO) може да реагује са кисеоником и продукује пероксинитрит (ONOO<sup>-</sup>) (464). CO се у организму производи углавном као последица разградње хемоглобина (494, 495). Ову деградацију катализују ензими из групе хем-оксигеназа (HOs) који из порфиринског прстена хема издвајају CO и биливердин. Слично NO-у, CO такође доводи до вазодилатације (496) и може да инхибира агрегацију тромбоцита, вероватно повећањем интрацелуларног cGMP-а (497). Алтернативно, CO може да шири крвне судове посредством цитохрома P-450 (498). Сосеани и његов истраживачки тим су показали да васкуларна релаксација под утицајем CO-а остаје непромењена и после третмана метилен плавим (инхибитором sGC) што сугерише да sGC сигнални пут није имао, бар у овом експерименталном моделу, улогу у релаксацији (498).

Механизам дејства H<sub>2</sub>S још увек није са сигурношћу познат. Постоје подаци да поједине ефекте овај молекул остварује активацијом cAMP протеин киназа А сигналног пута, што може имати удела у вазорелаксацији (499).

Са друге стране, K<sup>+</sup> канали могу бити мета деловања и CO и NO. Ипак, механизам којим ови трансмитери утичу на помеху канале није сасвим јасан. Новија сазнања указују да CO делује на алфа-, а NO на бета-субјединицу протеина канала (500). Везивањем за ове канале, оба молекула доводе до њиховог отварања, чиме долази до повећане пропустљивости ћелијске мембране за K<sup>+</sup>, што изазива хиперполаризацију глатких мишића и последичну вазорелаксацију.

У објашњењу и правилном тумачењу ефеката ових сигналних молекула је важно истаћи њихово време биолошког деловања (полуживота). У том смислу CO је најстабилнији, и његови ефекти су најдужи, док се преостала два трансмитера брзо метаболишу. Такође, везивање H<sub>2</sub>S за поједина једињења (хем групе), додатно умањује његову активност.

Куриозитет, али и јединственост NO-а у односу на остале сигналне молекуле је што редокс стање битно мења његове биолошке ефекте (501). Различити NO донори доводе до стварања различитих редокс форми NO-а. Тако, S-нитрозо-N-ацетилпенициламин, отпушта NO у форми слободног радикала (<sup>•</sup>NO), 3-морфолино-сидноним, ствара NO и O<sub>2</sub><sup>-</sup>, док натријум нитропрусид продукује NO<sup>+</sup>. Додатну компликацију овој проблематици уноси чињеница да NO поседује могућност да се трансформише из једног редокс стања у друго, у зависности од услова биолошке средине (502).

H<sub>2</sub>S је гасотрансмитер о чијим се ефектима и механизмима истих најмање зна. Утицаји ендогеног и екзогеног H<sub>2</sub>S на КВС се последњих година интензивно испитују, али су добијени подаци још увек неусаглашени и без прецизних закључака. Најпре се сматрало да овај молекул свој доминантни ефекат у КВС остварује секундарно као последица аноксије, а не директно на васкуларни глатки мишић (503). Потом је откривено да је CBS, ензим задужен за продукцију H<sub>2</sub>S, локализован у васкуларном мишићу, али не и ендотелу крвног суда (503). Интравенска апликација овог молекула код пацова доводи до пролазног пада крвног притиска, док се овај ефекат може неутралисати глибенкламидом (блокатором K<sub>ATP</sub> канала) (504).

Као што смо већ напоменули, за синтезу CO су задужени ензими из фамилије хем оксигеназа (CO). Од три до сада откривене изоформе ових ензима (НО 1, НО 2, и НО 3), најзначајнију улогу у КВС има индуцибилна НО 1. Утицај CO на (пато)физиолошка дешавања у КВС зависе пре свега од његове концентрације (или примењене дозе). У високим концентрацијама је показано да има изразито штетан ефекат, док у ниским нису забележена његова негативна дејства (505). Ипак већина аутора се слаже да се најзначајнији ефекти CO очекују у ситуацијама повећаног оксидационог стреса, када своју експресију и активност повећава управо НО 1 (506). Повећана експресија овог ензима и продукција CO је запажена код срца (АВ чвор и миоцити) која су у стањима оксидационог стреса (миокардне исхемије) (506), код којих овако секретовани CO контролише производњу cGMP-а.

Сматра се да у стању исхемије миокарда, настала повећана продукција CO, може бити корисна у остваривању цитопротекције кардиомиоцита. Свој цитопротективни ефекат у овом случају CO испољава преко NF-κB сигналног пута (507). Овакав анти-апопточки ефекат је свакако обећавајући и намеће потребу спровођења нових студија у овом смеру ради дефинитивног разјашњења потенцијалне позитивне улоге CO у стањима исхемијско-реперфузионе повреде.

Иако су његова вазорелаксатна дејства већ добро позната (324), постоје и подаци да CO може да генерише и снажне вазоконстрикторне супстанце, као што је ендотелин 1 (ET-1) који могу бити значајни у неутралисању хроничне хипоксије (508). Супротно томе, Motterlini и сарадници (509) су указали да CO у *in vivo* условима смањује акутни хипертензивни одговор.

Улоге NO у КВС су до сада најбоље проучене и са сигурношћу је утврђено да NO представља један од најважнијих медијатора одражавања КВС хомеостазе (302). Зато су и његови, вазодилататорни, антипролиферациони, антиагергациони, и антиинфламаторни ефекти (302), добро познати и у претходном тексту више пута помињани.

Међутим, његова антиапоптотичка дејства су још увек нејасна. Наиме, показано је да овај молекул остварује и про- и анти-апоптотички ефекат у миокарду (510). И док се тачан механизам анти-апоптотичког ефекта још увек не зна, сматра се да NO доводи до апоптозе захваљујући његовим карактеристикама слободног радикала, односно спонтаној интеракцији са кисеоником и другим слободним радикалима, чиме изазива ћелијска оштећења (511). Наравно, концентрација NO је и у овом случају кључна у формирању једног од ефеката.

Поред ефеката самих молекула NO и CO, и ензими који су задужени за њихову синтезу (NOS и HOs) показују велики степен сличности у својој активности и регулацији (512). Оба ензимска система поседују конститутивне (eNOS, nNOS, и HO 2, HO 3) и индуцибилне форме (iNOS, HO 1), оба за своју несметану активност захтевају присуство молекулског кисеоника и редукованог NADPH. Разлика међу овим системима се огледа у томе што је за NOSs неопходно присуство додатних кофактора (BH<sub>4</sub>, FAD и FMN), и што су конститутивни облици NOS калцијум/калмодулин зависни (302).

Zakharу и коаутори (513) су показали да се поменути ензимски системи налазе на врло сличним, односно блиским местима унутар ендотелних ћелија, што може указати да међу њима постоји интеракција. И заиста, у појединим патофизиолошким стањима, као што је хипоксија, је забележена смањена активност eNOS, и пролазно повећање активности NO 1, што сугерише потенцијалну компензаторну регулацију између ових система (514).

Са становишта садашњег истраживања, улога NO и CO у одржавању коронарног васкуларног тонуса, последичне коронарне перфузије, и самим тим физиолошке функције миокарда, може бити изузетно важна. Улога NO у коронарној ауторегулацији и коронарном протоку је већ показана од стране наше истраживачке групе (487). Применом L-NAME (неселективног инхибитора NOS), који је индуковао редукцију коронарног протока, смо потврдили несумњиву улогу L аргинин/NO система у регулацији коронарне циркулације (491).

Што се тиче CO, новије студије су сугерисале све већи значај овог сигналног молекула у контроли васкуларне мреже, као и могућу интеракцију са NO системом у остваривању ових ефеката. Тако су Sammut и коаутори (515) доказали да у случају високе експресије NO 1 у ендотелу аорте, CO преузима улогу доминантног контролора васкуларног тонуса. На овом експерименталном моделу је показано да (егзогени) NO може да индукује повећану експресију NO, а самим тим и CO, што последично смањује вазоконстрикцију аорте, механизмима који вероватно укључују cGMP сигнални пут. Инхибиција NO, у оквиру истог експеримента, је поништила претходни ефекат (515). Сличне резултате су добили Motterlini и сарадници (509), који су забележили да претретман NO 1 донором, смањује средњи артеријски притисак, изазаван претходном апликацијом L-NAME. Такође, апликација PPR IX (инхибитора NO) кога смо и ми користили у нашој студији је узроковало поновну вазоконстрикцију (509).

Интеракција NO и CO у срцу очигледно постоји и може бити важна за функцију миокарда, поготово у стањима исхемије. Истраживачка група на челу са Maulik-ом (516) је на моделу исхемије изолованог срца пацова, утврдила да перфузија NO донором, стимулише активност NO, односно продукцију CO, који смањује степен исхемије и има позитивне ефекте у исхемијском прекондиционирању.

Међумолекулска дејства ова два гасотрансмитера на нивоу ендотела и васкуларног глатког мишића показују одређене специфичности у зависности од (пато)физиолошког стања. У физиолошким условима оба молекула остварују врло често удружени ефекат у вазорелаксацији, активацијом sGC-cGMP сигналног пута (517). Ипак, у условима ендотелне дисфункције, CO сигнални пут постаје доминантнији, углавном због смањене производње NO од стране оштећеног ендотела (518). Siow и сарадници (518) су показали да у ситуацијама када је функција ендотела компромитована и када је већ дошло до настанка атеросклеротских плакова, одлучујућу улогу у одржавању колико-толико адекватног протока, има управо CO.

О директним ефектима CO на миокардну функцију и перфузију се мало зна и сазнања су углавном неусаглашена. Иако има појединих студија које указују на његов негативни инотропни ефекат (519), у последњих неколико година преовладава став да овај молекул остварује позитиван утицај на рад срца (520).

Резултати наше студије показују да применом цинкпротопорфирина IX (PPR IX), долази до изразитог снижења вредности свих испитиваних кардиодинамских параметара (Табела 7, Графика 4). Другим речима, блокадом синтезе CO-а смо, у нашем експерименталном моделу, индуковали потпуни поремећај срчаног циклуса, који се огледа у систолној и дијастолној дисфункцији, који је пратило (коме је претходио) и логично готово дупло смањење коронарног протока (CF) (Табела 7, Графика 4). Ови резултати су потврда ендогене продукције CO-а у срцу, јер PPR IX као неселективни NO инхибитор, супресијом активности NO 1 у коронарном ендотелу, и/или NO 2 у кардиомиоцитима, спречава ефекте CO, у миокарду и његовој васкуларној мрежи.

У студији Abramochkin-а и коаутора (521) је испитиван утицај егзогеног CO на контрактилну и електричну активност изолованих мишићних влакана комора и преткомора пацова и добијени су потпуно другачији резултати. Наиме, показано је да егзогено апликовани CO смањује снагу мишићне контракције и продужава акциони потенцијал, док примена PPR IX изазива супротан ефекат. Супротност резултата у односу на нашу студију је врло вероватно последица различитог експерименталног модела, као и знатно веће примењене дозе CO (100 $\mu$ M-1mM). И поред тога, обе студије су потврдиле несумњиву важност овог гасотрансмитера (ендогеног или егзогеног), у електричним и контрактилним активностима срца.



Ипак, претходна група аутора је, у истраживању на моделу срца по Langendorff-у, показала да егзогено примењени CO у нижим концентрацијама има значајно позитивно инотропно и хронотропно дејство (522), што је у складу са садашњим резултатима. И друге студије које су користиле сличан експериментални модел, су добила резултате сагласне нашим. Musameh и сарадници (523) су испитивали ефекте CO донора на функцију здравог миокарда и коронарну циркулацију и показали да егзогени CO (5  $\mu\text{M}$ ) индукује повећање контрактилности, срчане фреквенце (HR) и CF, што потврђује позитивни инотропни и хронотропни ефекат као и способност овог сигналног молекула да изазове вазодилатацију. Поред овог утицаја на функцију срца у физиолошким условима, уочено је да CO може имати позитиван ефекат у исхемијском прекондиционарању миокарда. Група аутора на челу са Soni-јем (524) је у свом истраживању проучавала дејство CO на исхемијско-реперфузионо оштећење срца и указала да овај гасотрансмитер (50  $\mu\text{M}$ ) уколико се апликује срцу (10 мин) пре настанка глобалне исхемије, значајно побољшава комплетан функционални опоравак срца, као и коронарну перфузију.

Механизми којима можемо објаснити ефекте CO у нашој и поменутиим студијама су различити и још увек у домену хипотеза. Један од могућих начина преко кога CO остварује свој позитиван инотропни и хронотропни ефекат је повећањем активности  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  контратранспорта, што подиже интрацелуларну концентрацију  $\text{Na}^+$ , и последично повећава  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  размену и улазак  $\text{Ca}^{2+}$  у ћелију, а тиме и снагу контракције (523). Позитиван ефекат CO на постисхемијски опоравак се одвија вероватно путем активације различитих протеин киназа и њихових сигналних путева. Сматра се да у току прекондиционарања CO активира р38 митоген-активирани протеин киназу  $\beta$  и протеин киназу Ц, а током реперфузије фосфатидил-инозитол киназу 3 (524). Што се тиче коронарне циркулације, слично као и у системској васкуларној мрежи, изгледа да је вазодилататорно својство CO-а на коронарни ендотел посредовано sGC-cGMP сигналним путем (523), али за разлику од NO, не укључује стимулацију хипоксијом, аденозином или простагландинима (525).

На основу налаза наших, али и резултата других студија можемо увидети следеће: 1) апликација неселективног инхибитора обе HO изоформе (PPR IX) показује да се CO заиста, у физиолошким условима може синтетисати у миокарду (HO 2) и/или коронарном ендотелу (HO 1); 2) продукција овог гасотрансмитера може постојати и током исхемије миокарда; 3) ендогени или егзогени CO,

очигледно има све значајнију улогу у контракцији кардиомиоцита, и контроли коронарног тонуса, како у физиолошким, тако и у патофизиолошким условима (исхемија); 4) механизми кардиогених ефеката CO су комплексни, а укључују активацију неколико протеинских канала, и различитих интрацелуларних сигналних путева, и свакако захтевају даља молекуларна испитивања.

Са друге стране о ефектима H<sub>2</sub>S на миокард и коронарну циркулацију се још мање зна. У циљу испитивања улоге овог сигналног молекула на функцију срца и коронарне васкулатуре, одлучили смо се да апликацијом DL-пропаргилглицина (DL PAG), инхибирамо ензим цистатион γ-лиазу (CSE) за кога се претпоставља да је ендогени извор H<sub>2</sub>S у срцу (526). Резултати које смо ми добили показују да након администрације DL PAG, долази до значајног смањења свих испитиваних кардиодинамских параметара осим MBP (Табела 8, График 5). Иако је ово смањење било статистички манифестно, упоређивањем са ефектима PPR IX (Табела 7, График 4), можемо јасно приметити, да је утицај инхибиције синтезе H<sub>2</sub>S оставио мање негативан утицај на рад срца и коронарну циркулацију у односу на инхибицију CO-а. Даље, из ових резултата запажамо да, иако је функција и перфузија миокарда била ослабљена, степен дисфункције није био толики да би редуковао средњи притисак у аорти (MBP). Ипак, и поред тога, најсигурнији показатељ овог резултата је да H<sub>2</sub>S такође може имати улогу у кардиодинамици миокарда и регулацији коронарног тонуса.

Постојање синтезе овог сигналног молекула у срцу под утицајем CSE наводе и други аутори. Vian и сарадници (527) су спровели опсежну студију са циљем да испитају улогу ендогеног или егзогенног H<sub>2</sub>S на исхемијско прекодиционарање изолованог срца пацова и ћелијску културу кардиомиоцита. Применом H<sub>2</sub>S донора (NaHS), али и DL PAG (инхибитора CSE) су указали да, слично као и CO, и егзогени и ендогени H<sub>2</sub>S може да оствари позитиван утицај на функционални опоравак миокарда и редукацију морфолошких оштећења након инфаркта. На тај начин, овај гасотрансмитер, аналогно са CO, очигледно има своје место у функцији миокарда како у физиолошким тако и у исхемијским условима.

Са аспекта компарације са нашом студијом, треба поменути рад истраживачке групе Carson-а и сарадника (528), који су на истом експерименталном моделу (ретроградна перфузија по Langendorff-у) проучавали ефекте овог гасотрансмитера на миокард и коронарну перфузију. Ова истраживачка група је у више наврата показала да егзогено примењени H<sub>2</sub>S изазива дозно-зависно снижење dp/dt max и min као и HR изолованог срца пацова, док парадоксално повећава CF (528).

Разлика у резултатима у односу на наше истраживање може бити последица другачијег експерименталног приступа, јер је у поменутој студији испитиван ефекат егзогено унетог, док смо ми испитивали улогу ендогено присутног  $\text{H}_2\text{S}$ -а. Занимљиво је да иста група аутора (522), која је показала позитиван инотропни ефекат  $\text{CO}$ , у раније поменутој студији (522), забележила да егзогени  $\text{H}_2\text{S}$  има негативно инотропно дејство, али тај резултат може бити више последица токсичног ефекта самог гаса, него његовог стварног дејства.

Механизми којима  $\text{H}_2\text{S}$  делује на срце и коронарану циркулацију, мада још увек нејасни, вероватно подразумевају активацију  $\text{K}_{\text{ATP}}$  канала како у кардиомиоцитима (529), тако и у коронарним глатким мишићима (530). Поред овога, у последње време се сматра да овај молекул преко активације  $\text{Cl}/\text{HCO}_3^-$  канала може да мења рН васкуларног глатког мишића и тако регулише његову контракцију (531).

Иако још увек не постоји довољно сазнања о улози  $\text{H}_2\text{S}$  у функцији срца и коронарној циркулацији и упркос неусаглашеностима међу постојећим подацима, очигледно је да овај гасотрансмитер, може бити ендогено синтетисан у срцу и поред  $\text{NO}$  и  $\text{CO}$ , може имати значаја у (пато)физиологији срца. Ипак, наше је мишљење да је, са физиолошког становишта, потребно више студија које ће разјаснити улогу ендогеног  $\text{H}_2\text{S}$  у миокарду и коронарној васкуларној мрежи, а тиме потврдити/оповргнути претходна сазнања.

### **5.3. УТИЦАЈ ИНХИБИЦИЈЕ $\text{NO}$ НА КАРДИДИНАМСКЕ ЕФЕКТЕ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА**

Пошто смо показали ефекте самосталне апликације хомоцистеина и њему сродних супстанци, као и утицај самостално примењених инхибитора  $\text{CO}$  и  $\text{H}_2\text{S}$  на изоловано срце пацова, сматрали смо, да би ради расветљавања потенцијалне улоге гасотрансмитера у кардиодинамским ефектима хомоцистеина, било оправдано да испитамо комбиновану администрацију сваког од облика хомоцистеина са инхибиторима сва три гасотрансмитера. Дакле, основни циљ овог дела истраживања, је био да испитамо могући утицај  $\text{NO}$  на ефекте које хомоцистеин и његови метаболити остварују на срце и коронарну циркулацију.

Повезаност хиперхомоцистеинемije и NO у КВС, односно улога коју NO може имати у кардиоваскуларним ефектима хомоцистеина, се пре свега односи на оксидационе способности ове аминокиселине. Наиме, доказано је да хомоцистеин, када се налази у повишеним концентрацијама, подлеже процесима ауто-оксидације, чиме доводи до, активације NADPH оксидаза, те продукције различитих слободних радикала, између осталих и  $O_2^-$  (210).  $O_2^-$  може да реагује са ендотелним NO, и продукује ONOO<sup>-</sup>, што поред целуларних оштећења од стране новоформираног слободног радикала, смањује биорасположивост NO и адекватну вазорелаксацију (211). На тај начин хомоцистеин има могућност да директно утиче на концентрацију и функцију овог гасотрансмитера.

Међутим, ова интеракција може да се одвија и у супротном смеру, односно да NO модулира нивое, а самим тим и дејства хомоцистеина. Овај утицај NO остварује директно инхибицијом метионин синтазе (MTS) (532), или индиректно инхибирањем синтезе феритина, чиме утиче на катаболизам фолата и посредно хомоцистеина (533). Такође, постоје подаци да особе са специфичним eNOS генотипом, имају повишене вредности хомоцистеина у плазми (534).

Већина студија које је проучавала међусобну повезаност хомоцистеина и NO, се ограничила на васкуларне ефекте ове интеракције, што је и разумљиво, узевши у обзир значај NO у одржавању васкуларне хомеостазе. У њима је, базирано на горе описаном међудејству, истакнуто, да хомоцистеин негативно утиче како на васкуларне ефекте, како егзогено унетог, тако и ендогено синтетисаног NO (535). Ипак, њихова интеракција у миокарду и коронарној циркулацији је готово непозната.

Бескер и сарадници (536) су спровели једну од ретких студија које је проучавала улогу NO у ефектима хомоцистеина на миокард. Тачније, ови аутори су поставили хипотезу да поменути гасотрансмитер утиче на функцију миокарда, регулацијом потрошње кисеоника у срчаном ткиву. Крајње поједностављено, њихови резултати указују да хиперхомоцистеинемија заиста доводи до повећања активности NADPH оксидазе у миокарду леве коморе пацова и миша. То за последицу повећава продукцију  $O_2^-$  који је, реагујући са NO, смањивао његову концентрацију, и супримирао способност NO да регулише потрошњу кисеоника у миокарду. Улога NO у смањеној потрошњи кисеоника у миокарду је забележена и употребом NO донора (SNAP) и применом NOS инхибитора L-NAME (536).

Иако ова студија није испитивала механичку или електричну функцију срца, на основу смањене потрошње кисеоника можемо претпоставити да би и кардиодинамика срца, односно срчани рад били мање ефикасни. Ипак, ова сазнања нам сугеришу да било егзогени или ендогени, NO може посредовати у ефектима хомоцистеина на функцију миокарда.

Резултати наше студије показују да у случају додатка инхибитора синтезе NO (L-NAME) основном облику хомоцистеина (DL Нсу) долази до статистички значајног смањења вредности свих испитиваних кардиодинамских параметара (Табела 9, График 6). DL тиолактон облик хомоцистеина у комбинацији са L-NAME, међутим, осим пада коронарног протока (CF), није изазвао значајније промене вредности осталих испитиваних кардиодинамских параметера (Табела 10, График 7). Овај резултат показује да приликом блокаде NO система, ефекти DL Нсу тlhc на функцију срчаног мишића постају мање негативни, него приликом његовог самосталног деловања (Табела 4, график 1), односно да овај облик хомоцистеина свој штетан ефекат остварује уз садејство са поменутиим системом. Редукција коронарног протока представља логичан налаз, будући да је дошло до блокаде продукције NO. Постигнуто смањење CF је израженије него у случају самосталне апликације DL Нсу тlhc, што једном потврђује значај и хомоцистеина и L-аргинин/NO система у функцији коронарног ендотела. Ипак, очигледно да перфузија није била довољно угрожена да би значајније пореметила функцију миокарда. На тај начин изгледа да у одсуству дејства NO система, овај облик хомоцистеина свој штетан ефекат ограничава само на коронарну циркулацију, али не и на срчани мишић.

Администрација L Нсу тlhc са L-NAME је индуковала значајну редукцију свих кардиодинамских показатеља (Табела 11, График 8), и овај ефекат је био најизраженији у односу на све остале примењене комбинације. Упоредивањем величине снижења вредности свих кардиодинамских параметара (величине статистичке значајности промене), између испитиваних облика хомоцистеина, увиђамо да је у комбинацији са L-NAME, најтоксичнији ефекат на срце остварио L Нсу тlhc, док је најмање штетан утицај имао DL Нсу тlhc. Као и у претходним случајевима, разлика у ефектима испитиваних облика хомоцистеина могу вероватно бити последица стероизмерних карактеристика ових молекула.

Једно од ретких истраживања које је, у одређеном проценту, погодно за компарацију са нашим резултатима су извели Sood и коаутори (537). Они су забележили да хиперхомоцистеинија код пацова доводи до повећане продукције нитротирозина, маркера продукције NO. У њиховом експерименталном моделу хомоцистеин је индуковао смањење притисака у левој комори, као и поремећај дијастолне функције (dp/dt min), али то није било праћено променама у нивоу нитротирозина (продукцији NO). Мада овај модел има различит методолошки приступ у односу на наш, очигледно је да NO није имао значајну улогу у насталим кардиодинамским променама изазваним хомоцистеином.

На основу свега горе поменутог можемо уочити да интеракција хомоцистеина и NO у изолованом срцу пацова *de facto* постоји, али је и даље недовољно јасна. Ради бољег сагледавања међусобне зависности треба разликовати ефекат хомоцистеина на продукцију NO (који је боље изучен), од укључености овог гасотрансмитера у дејства поменутог тиола на КВС. У томе би могли да помогну хронични експерименти на овом моделу, које намервамо да спроведемо у ближој будућности. Када је у питању срце и његова васкуларизација, изгледа да улога NO-а у ефектима хомоцистеина зависи од присутног облика хомоцистеина, и најпозданији значај има у коронарној циркулацији, док на нивоу самог миокарда захтева даља и комплекснија истраживања.

#### **5.4. УТИЦАЈ ИНХИБИЦИЈЕ СО НА КАРДИОДИНАМСКЕ ЕФЕКТЕ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА**

Угљен моноксид (CO) је други гасни сигнални молекул чија се потенцијална улога у (пато)физиологији КВС током последње деценије све више истиче. Ипак, већина сазнања о улози CO у КВС се односи на његове ефекте у одржавању васкуларне хомеостазе (538-540). Многе студије су откриле да CO поседује снажно вазорелаксантно и антиагрегационо својство (538), да спречава апоптозу васкуларних глатких мишића (539), и ихибира стварање атеросклеротских лезија на анималним моделима (540).

Са друге стране, утицаји овог сигналног молекула на функцију миокарда и коронарни ендотел, су мало изучавани и недовољно познати, мада постојеће информације наводе на сумњу, да овај ефекат може бити итекако значајан. Dallas и сарадници (541) су испитивали потенцијалну улогу CO на електрфизиолошке и морфолошке карактеристике кардиомиоцита комора.

Користећи `печ-кламп` (patch-clamp) методу, дошли су до закључка да CO доводи до касне активације  $\text{Na}^+$  канала, што за последицу има продужење акционог потенцијала и може да изазове настанак аритмија. Интересантно да је про-аритмогени ефекат CO заправо индиректан, јер CO стимулише продукцију NO, који процесом S-нитрозилације ремети функцију поменутих канала и омогућава додатни улазак  $\text{Na}^+$  (541).

У истраживању Andre-a и коаутора (542), пацови су 4 недеље удисали ваздух `обогаћен` CO, након чега је испитиван ефекат овог гаса на ехокардиографски и ЕКГ налаз, као и на контрактилно-релаксатна својства кардиомиоцита. Аутори су показали да хронично примењен, CO доводи до периваскуларне и интерстицијалне фиброзе, што за последицу има смањену ефикасност срчаног рада. Овај резултат је потврђен поремећеном контракцијом и релаксацијом мишићних ћелија срца. Такође, запажен је и про-аритмогени утицај, услед оштећења  $\text{Ca}^{2+}$  саркоплазматских канала, и претеране акумулације овог јона у ћелији (542).

Међутим, највећи број студије показују да CO, може да буде кардиопротективан. У студији објављеној прошле године (543), на моделу изолованог срца пацова, је показано да прекондиционарање са CO-ом побољшава структурни и функционални (контрактилно) опоравак миокарда након исхемије и умањује величину ткива захваћеног инфарктом (543). Један од могућих механизма ових позитивних дејстава CO може да буде његова способност да стимулише продукцију антиоксиданата у срцу, пре свега супероксид дизмутазе (SOD) (543). До сличних сазнања на истом експерименталном моделу су дошли Clark и сарадници, који су показали да CO донори (10-50 $\mu\text{mol}$ ) могу бити изузетно корисни у исхемијском прекондиционарању срца пацова (544).

Узевши у обзир поменуте ефекте CO, као и добор познате улоге хомоцистеина у етиопатогенези КВБ, развија се оправдана научна сумња да у КВС може постојати интеракција метаболизма хомоцистеина и NO/CO система. И заиста, постоје претпоставке да хомоцистеин са своје стране може да умањи експресију и активност ендотелне NO 1, а самим тим и продукцију CO, чиме ремети адекватно одржавање васкуларног тонуса (545). Будући да у физиолошким условима NO може да активира NO 1, потенцијални механизам оваквог дејства хомоцистеина се односи на добро познато смањење биорасположивости ендотелног NO (545).

Ипак, још увек је нејасно, да ли ефекти хомоцистеина на срце могу бити посредовани овим сигналним молекулом? Такође, број студија које се баве овим питањем је веома оскудан. Повезаност CO и хомоцистеина је, за сада најбоље изучена на нивоу ендотелних ћелија васкуларне мреже. Kim и сарадници (546) су тако спровели једно од ретких истраживања у коме су проучава утицај CO на васкуларне ефекте хомоцистеина. Они су забележили да (егзогени и ендогени) CO, фосфорилацијом специфичних ендоплазматских PERK протеин киназа, може да супримира апоптозу ендотелних ћелија изазвану ендоплазматским оштећењима од стране хомоцистеина (546).

Што се тиче испитивања улоге NO/CO система у ефектима хомоцистеина на миокард, у доступним базама података нема ниједног релевантног истраживања које се бавило овом тематиком. Са овог аспекта, наше истраживање заиста представља пионирски подухват у ширим научним круговима, што је несумњива потврда његове оригиналности.

У нашој студији смо додавањем, инхибитора NO 1/CO система (PPR IX), базичном раствору сваког од примењених облика хомоцистеина, желели да испитамо евентулану значајност CO у дејствима хомоцистеина и његових метаболита на миокард. Ко-апликација основног облика хомоцистеина (DL Hcy) са PPR IX је индуковала статистички значајно смењење свих испитиваних кардиодинамских параметара и CF (Табела 12, График 9), баш као и удружена примена оба хомоцистеин тиолактона (DL Hcy thc и L Hcy thc) са поменутиим инхибитором (Табеле 13, 14, Графици 10, 11). Упоредивањем статистичке значајности разлике међу испитиваним групама, можемо запазити да је овај негативни ефекат био најизраженији у случају оба облика тиолактона, поготово DL Hcy thc, код кога је дошло до редукције вредности већине параметра за готово 50% у односу на контролне вредности (Табела 13, График 10). Ово се може, као и у претходним експериментима, објаснити његовим стереоизомерним карактеристикама, али и познатим токсичним дејством ових метаболита хомоцистеина. Дакле, комбинована употреба испитиваних форми хомоцистеина и инхибитора NO 1, је довела до потпуне систолне и дијастолне дисфункције срца, пореметила комплетан срчани циклус (кардиодинамику) и узроковала изразито смањење HR и CF.



Могуће је да, услед неадекватне контроле коронарног васкуларног тонуса од стране CO, доминира вазоконстрикциона компонента, чиме се смањује жељено снабдевање миокарда кисеоником, што удружено са штетним дејствима апликоване комбинације на саме кардиомиоците, доводи до готово потпуног престанка срчаног рада.

Да би смо јасније уочили могућу интеракцију CO и хомоцистеина, пре ове комбинације супстанци, спровели смо раније описане експерименте са самосталном администрацијом PPR IX или различитих изоформи ове аминокиселине. На тај начин, упоредном анализом статистичке значајности разлике постигнутих ефеката свих експерименталних група и комбинација супстанци, уочавамо да је удружена апликација поменутог инхибитора и различитих форми хомоцистеина (Табеле 12-14, Графици 9-11) имала негативнији ефекат на функцију миокарда и коронарну циркулацију од самосталне примене сваког од хомоцистеина (Табеле 4-6, Графици 1-3), као и да инхибиција синтезе CO има штетнији утицај на срце у односу на заједничку администрацију са хомоцистеином (Табела 7, График 4). Изгледа да иако је комбинација испитиваних хомоцистеина и CO јако кардиотоксична, хомоцистеин, још увек непознатим механизмима умањује штетно дејство PPR IX на срце и коронарну васкуларну мрежу.

Ови резултати су крајње занимљиви и показују да приликом инхибиције активности обе форме NO, односно одсуства CO из миокарда и коронарног ендотела, хомоцистеин испољава још снажнији негативни инотропни, луситропни и хронотропни ефекат, као и већу редукцију CF. Поред тога, комбинација свих облика хомоцистеина са PPR IX је имала још штетније дејство на функцију срца, него ко-апликација испитиваних хомоцистеина са L-NAME. То значи да је, у нашем експерименталном моделу, кардиодепресивни ефекат хомоцистеина у случају инхибиције NO/CO система, био знатно изразитији у односу на утицај хомоцистеина приликом инхибиције L аргинин/NO система.

Уколико сагледамо све ове резултате увиђамо да: 1) CO може бити изузетно важан сигнални молекул у функционисању миокарда и одржавању коронарне васкуларне хомеостазе, 2) у нашој студији, ефекти самог CO на срце и коронарни ендотел, као и његова улога у дејствима хомоцистеина на поменуте структуре, може бити далеко значајнија у односу на NO, 3) иако изгледа да CO има све битније место у КВС, обзиром да је овај налаз још увек `усамљен`, потребна су

нова истраживања у циљу разјашњења наведених ефеката и бољег разумевања ове интеракције.

## **5.5. УТИЦАЈ ИНХИБИЦИЈЕ H<sub>2</sub>S НА КАРДИОДИНАМСКЕ ЕФЕКТЕ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА**

Водоник сулфид (H<sub>2</sub>S) је трећи и последњи гасотрансмитер чију смо улогу, у ефектима хомоцистеина и његових метаболита на срце, желели да испитамо. Ова хипотеза се базира на повезаности H<sub>2</sub>S са метаболизмом хомоцистеина. Наиме, у условима када има довољно метионина и хомоцистеина, хомоцистеин подлеже процесу транс-сулфурације, када се помоћу ензима цистатион β синтазе (CBS) и у присуству серина, конвертује до цистатиона. Потом се под утицајем другог ензима цистатион γ-лиазе (CSE), цистатион метаболише до L-цистеина, да би се у крајњем кораку формирао H<sub>2</sub>S, α кетобарбитурати и амонијак (547). То значи да када се хомоцистеин налази у вишку (хиперхомоцистеинемична), можемо очекивати повећану продукцију H<sub>2</sub>S, односно да овај сигнални молекул може да има утицај на ефекте хомоцистеина у КВС.

С обзиром да се иначе о улози самог H<sub>2</sub>S у КВС најмање зна у поређењу са NO и CO, логично је и да је улога овог гасотрансмитера у дејствима хомоцистеина у КВС, а поготово миокарду и коронарној циркулацији, мало изучавана. Оно што за сада знамо је да хомоцистеин и H<sub>2</sub>S, имају углавном антагонистичка својства: хомоцистеин стимулише, док H<sub>2</sub>S инхибира пролиферацију васкуларних глатких мишића; хомоцистеин ремети, а H<sub>2</sub>S потенцира вазодилатацију; хомоцистеин генерише, док H<sub>2</sub>S инхибира продукцију ROS (548).

У једној од студија која је користила сличан експериментални модел нашем, је испитиван утицај H<sub>2</sub>S на инфаркт миокарда у хиперхомоцистеинемичних пацова (548). Ово истраживање је показало да у случају развоја хиперхомоцистеинемичне, миокардна експерсија и активност CSE, а самим тим и H<sub>2</sub>S су биле значајно снижене. Са друге стране, и поменути гасотрансмитер је такође модулисао ефекте хомоцистеина на срце. Тако је апликација H<sub>2</sub>S у периоду пре исхемије побољшала функционални опоравак срца и редуковала величину инфаркта, чиме се скренула пажња, да као и CO, и H<sub>2</sub>S може бити важан у исхемијском прекондиционирању и реперфузионом периоду (548).

Ипак, осим сличности у коришћењу модела ретроградне перфузије по Langendorff-у, разлика садашњег истраживања у односу на поменута, се огледа у испитивању здравог срца, без изазивања исхемијско-реперфузионе `повреде`, као и у акутној апликацији хомоцистеина. Треба напоменути да смо ми проучавали значај ендогеног  $H_2S$  у дејствима хомоцистеина, што у физиолошком смислу може имати већу важност и бити сврсисходније.

Потенцијална улога  $H_2S$  у дејствима хомоцистеина на миокард и коронарни васкуларни тонус, је у нашој студији испитивана заједничком апликацијом сваког од облика хомоцистеина са CSE инхибитором (DL PAG). Разлог употребе DL PAG је чињеница да се већина синтезе  $H_2S$  у КВС одиграва посредством CSE ензима (549). Применом DL PAG са базичном формом хомоцистеина (DL Hcy) је дошло до статистички значајног смањења вредности свих кардиодинамских параметара, осим МВР (Табела 15, График 12), док је комбинована администрација DL PAG са тиолактон облицима хомоцистеина узроковала значајно смањење свих (L Hcy tlhc) или појединих (DL Hcy tlhc) испитиваних кардиодинамских параметара (Табеле 16, 17, Графици 13, 14). Ови резултати још једном показују да L Hcy tlhc може бити потенцијално натоксичнији облик хомоцистеина. Упоређивањем постигнутих ефеката приликом самосталне апликације различитих форми хомоцистеина (Табеле 4-6, Графици 1-3) и ефеката добијених комбинованом применом ових супстанци са DL PAG можемо у прочити да у одсуству  $H_2S$ , хомоцистеин, генерално, испољава негативније дејство на функцију срца и коронарне циркулације, што потврђује његову протективну улогу у срцу.

Један од могућих механизма удруженог дејства хомоцистеина и DL PAG, тј. деловања хомоцистеина на срце у условима одсуства  $H_2S$ , је антагонистички утицај поменутог гасотрансмitera и хомоцистеина на регулацију нивоа  $Ca^{2+}$  у кардиомиоцитима. Наиме, запажено је да, за разлику од хомоцистеина (550),  $H_2S$  има позитивно дејство на контролу концентрације наведеног јона у цитоплазми: путем повећаног преузимања  $Ca^{2+}$  од стране саркоплазматског ретикулума, или стимулацијом  $Na^+/Ca^{2+}$  измењивачке пумпе (551). Последица оба процеса је побољшан проток  $Ca^{2+}$  у ћелији, што омогућава ефикаснију и лакшу контракцију. Јасно је да у присуству хомоцистеина и одсуству ендогеног  $H_2S$ , читав процес може да буде обрнут, те је поремећено започињање је и одвијање контракције кардиомиоцита, чиме долази да смањене функције снопова срчаног мишића.

Сличан механизам може бити одговоран и за поремећај контракције коронарног васкуларног глатког мишића (551), а тиме и адекватног васкуларног тонуса, односно редукције CF.

## **5.6. ЕФЕКТИ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА**

Примарни циљ овог дела истраживања је био испитивање улоге оксидационог стреса у ефектима хомоцистеина и његових метаболита на функцију миокарда и коронарну циркулацију. Одређивањем нивоа про-оксидантних молекула (азот монооксида у форми нитрита ( $\text{NO}_2$ ), супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ ), и водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )) и маркера оксидационих оштећења (индекса липидне пероксидације мереног као (TBARS)) у коронарном венском ефлуенту, смо желели да утврдимо да ли примењени облици хомоцистеина изазивају негативна дејства на срце путем повећане продукције слободних радикала или је реч о неким другим механизмима?

Повезаност метаболизма хомоцистеина (поготово у условима хиперхомоцистеинемије) и оксидационог стреса је позната од раније. Хомоцистеин као и сви тиоли, у плазми лако подлеже просецима оксидације, односно ауто-оксидације, чиме ствара дисулфиде, хомоцистин, и хомоцистеин тиолактон (552). Током оксидације сулфхидрилне (SH) групе хомоцистин долази до продукције различитих ROS, пре свих  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{OH}^\cdot$ . Ови ROS потом иницирају липидну пероксидацију васкуларних ендотелних ћелија и њихов морфо-функционални поремећај (553). Поред директног оштећења ендотелних ћелија,  $\text{O}_2^-$  створен ауто-оксидацијом хомоцистеина ступа у интеракцију са NO продукованим од стране истих ћелија, што за последицу има стварање још токсичније RNS –  $\text{ONOO}^-$  (547). Тиме се наставља оштећење ендотелних ћелија, под утицајем  $\text{ONOO}^-$  и смањује биорасположивост NO, што ремети контролу васкуларног тонуса, односно физиолошку вазодилатацију. Тако се ствара тзв. `зачарани круг` (circulus vitiosus) у коме је ендотел структурно оштећен, производи мање NO, чија се концентracија додатно смањује у реакцији са  $\text{O}_2^-$ . Сви наведени процеси заједно, механизмом позитивне повратне спреге, на крају доводе до настанка ендотелне дисфункције (552, 553).

Да би могао да продукује слободне радикале, хомоцистеин је развио механизме којима доводи до поремећаја ендотелних антиоксидационих ензима, нарочито глутатион пероксидазе (GPx-1) и супероксид дизмутазе (SOD). *In vitro* и *in vivo* студије су показале да, за разлику од других тиола, хомоцистеин смањује експресију и активност GPx-1 (554, 555). GPx-1 представља кључни интрацелуларни ензим у неутрализацији оксидационог стреса. Користећи глутатион, овај ензим има улогу у разградњи (редукцији)  $H_2O_2$  и липидних пероксида, до одговарајућих алкохола (556), а у мањој мери може бити ефикасан и у редукцији пероксинитрита  $ONOO^-$  (557). Хипотетичка повезаност између недостатка експресије и/или активности GPx-1 и ендотелне дисфункције се базира на општим хемијским законитостима оксидо-редукционих реакција. Разградњом  $H_2O_2$  под утицајем јона бакра и гвожђа, се формирају хидроксил радикал ( $\cdot OH$ ) и хидроксидни ањон ( $OH^-$ ). Оба слободна радикала су изузетно реактивна и изазивају липидну пероксидацију ( $\cdot OH$ ), односно алкална оштећења ткива ( $OH^-$ ). У физиолошким условима, претходни процес може да се спречи деловањем GPx-1 и каталазе (CAT), који редукују  $H_2O_2$  до воде, уместо до поменутих слободних радикала. Отпочињањем липидне пероксидације долази до стварања пероксил радикала који опет кроз производњу  $ONOO^-$  смањују биорасположивост NO. На тај начин, одсуство активности GPx-1 од стране хомоцистеина убрзава генерисање слободних радикала, оштећење ендотела и његову дисфункцију (558).

SOD је локализован на површини ендотелних ћелија у додиру са циркулишућом плазмом и има улогу у отклањању екстрацелуларног  $O_2^-$  (559). Нивои SOD могу директно да зависе од концентracије хомоцистеина у плазми. Запажено је да хомоцистеин снижава ниво SOD, захваљујући промени структуре ендотелних протеогликана за које се SOD везује на површини ендотела (560). Тиме је смањена способност SOD да неутралише  $O_2^-$  и остале слободне радикале, који се у условима хиперхомоцистеинемije појачано стварају.

Иако изгледа да хомоцистеин може да поремети редокс равнотежу (стимулација продукције слободних радикала и инактивација антиоксидационих ензима) и тако оштети ендотел, претходно изнета хипотеза је заснована на прелиминарним и непотврђеним подацима, те још увек не постоји консензус о улози оксидационог стреса у кардиоваскуларним ефектима хомоцистеина. Иако показана у експерименталним студијама (561), ова хипотеза се у реалним билошким условима какви владају у организму, може оспорити.

Наиме, у плазми постоје тиоли, као што је цистеин, који такође изузетно лако подлежу оксидацији, а чија је концентрација 20-30 пута виша у односу на концентрацију хомоцистеина. Штавише, способност SH групе цистеина да оксидује је још већа у односу на хомоцистеин (562). Занимљиво је, међутим, да се повишене вредности цистеина не доводе у везу са повећаним ризиком од развоја КВБ (563).

Оксидациона оштећења срчаног мишића и поремећај коронарне циркулације под утицајем хомоцистеина, нису до сада много изучавани. У једној од најновијих студија је забележено да у срцу пацова хомоцистеин повећава продукцију про-оксидационих маркера (TBARS) и смањује активност антиоксидационих ензима заштите (GPx-1, SOD и CAT) (564). Резултати наше студије показују да (осим L Hcy tlhc, који је узроковао смањено ослобађање  $O_2^-$ ) (Табела 19, График 16), апликацијом основног облика хомоцистеина (DL Hcy) (Табела 18, График 15) и DL Hcy tlhc (Табела 20, График 17) није дошло до битнијих промена у вредностима свих испитиваних маркера оксидационог стреса. У садашњем истраживању, дакле, ниједан од поменутих облика хомоцистеина није изазвао оштећење ћелијских мембрана кардиомиоцита и/или коронарних ендотелних ћелија, већ је напротив, довео до појединачног снижења у продукцији ( $O_2^-$ ) у односу на контролне услове (L Hcy tlhc).

Објашњење разлике у нашим налазима у односу на поменуту студију (564) треба потражити у потпуно другачијем експерименталном приступу. Док су у нашем случају испитивани ефекти акутно примењеног хомоцистеина, у претходној студији је било реч о хроничном утицају (564). Поред тога, доза хомоцистеина у садашњој студији је била неупоредиво мања да би довела до евентуалних оштећења. Такође, не треба заборавити да је наш модел базиран на физиолошким условима срца које ради, за разлику од наведеног истраживања које није испитивало функционалне карактеристике миокарда.

Већ више пута смо објаснили на који начин хомоцистеин смањује ендотелну продукцију NO у срцу. Неопходно је истаћи да редукција биорасположивог NO може да настане тројако: услед његове смањене синтезе, поремећаја активности биолошки активног NO, или његове повећане инактивације. Међутим, смањење биорасположивости NO не мора да буде последица снижене експерсије eNOS под директним утицајем хомоцистеина (565), већ повећане активности ADMA (ендохени инхибитор NOS), која се јавља у условима хиперхомоцистеиније (566).

Значај повећаног стварања слободних радикала у снижењу нивоа NO су показале *in vitro* студије на ендотелним ћелијама, у којима је снижење нивоа слободних радикала било праћено поновним враћањем биорасположивог NO на физиолошке вредности (555).

Поједине експерименталне студије су показале да хомоцистеин већ описаним механизмима (551, 552) смањује ендотелну продукцију NO и ремети адекватно одржавање васкуларног тонуса. У истраживању Ungvari-ја и сарадника (567) на моделу изоловане аорте пацова је сугерисано да хиперхомоцистеинија доводи до редуковане производње NO, што је повезано са поремећајем релаксације васкуларних глатких мишића, односно смањењем вазорелаксативног одговора на ацетил-холин и хистамин (567).

Са друге стране, има и студија које су добиле другачије резултате. У истраживању Tuagi-а и коаутора (568) на моделу ћелијске културе микроваскуларних ендотелних ћелија срца пацова је указано да третман хомоцистеином (0–100  $\mu\text{M}$ ) током 24 часа није довео до значајних промена нивоа NO (568), коришћењем готово исте методе као у нашој студији (443).

Резултати које смо ми добили показују да тиолактони, који се теоретски сматрају токсичнијима, нису утицали на динамику NO, баш као и базични облик хомоцистеина.

Компарацијом са претходним студијама, уочавамо да ови резултати могу бити у корелацији са поменутом студијом Tuagi-а и коаутора (568) који није забележио промене у динамици ослобађања NO. Корелација са поменутом студијом (568) може бити посебно значајно обзиром да је једна од коришћених доза у поменутој студији иста као и она коју смо ми апликовали (10  $\mu\text{M}$ ), али и да је методологија одређивања NO била готово идентична. На тај начин сазнања ове студије само потврђују општи став, да ефекти хомоцистеина на продукцију NO, зависе од дозе, типа ефекта (акутни или хронични) и методолошког приступа, те да у том смислу захтевају наставак у истраживањима.

Са друге стране, према литературним подацима, потенцијална индукција оксидационог стреса у КВС под утицајем хомоцистеина, настаје најчешће услед способности овог тиола да током ауто-оксидације продукује  $\text{O}_2^-$ , и  $\text{H}_2\text{O}_2$  (553). Претпоставља се да су управо ове ROS највише одговорне за ендотелну цитотоксичност коју хомоцистеин може да изазове, тако да смо се због тога определили да у овој студији, поред TBARS и NO, испитамо динамику ослобађања  $\text{O}_2^-$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , као одговор на акутну примену хомоцистеина.

Наши резултати показују да је након апликације L Hcy tlhc (Табела 20, График 17), дошло до статистички значајног смањење нивоа  $O_2^-$ . Обзиром да  $O_2^-$  (као и  $H_2O_2$ ) доводи до липидне пероксидације мембрана ендотелних ћелија (553), смањење нивоа  $O_2^-$ , од стране L Hcy tlhc, је у сагласности са неповећањем липидне проксидације (TBARS) након апликације овог облика хомоцистеина (Табела 20, График 17), што се исто може рећи и за групу третирану DL Hcy tlhc, где није било промена у нивоима TBARS, као и динамици  $O_2^-$  (Табела 19, График 16). Ипак, начин на који поменута форма хомоцистеина (L Hcy tlhc) смањују продукцију  $O_2^-$  у односу на контролне услове, који би требало да су физиолошки, нам није познат, док у доступним базама података такође нема сазнања о овим механизмима.

Када је реч о другом важном про-оксиданту -  $H_2O_2$ , уочавамо да након апликације основног облика хомоцистеина (DL Hcy) (Табела 18, График 15) као и тиолактона (DL Hcy tlhc и L Hcy tlhc (Табела 19, 20 График 16, 17) није дошло до промене у динамици ослобађања  $H_2O_2$ . У случају DL Hcy и DL Hcy tlhc, оваква динамика  $H_2O_2$  потврђује резултате осталих про-оксидационих маркера у овим експерименталним групама, тако да примећујемо да поменути облици хомоцистеина нису повећали продукцију слободних радикала односно нису узроковали оксидациони стрес. L Hcy tlhc, иако није стимулисао повећану продукцију TBARS, довео је до смањења нивоа  $O_2^-$ , што вероватно може бити последица стереизомерних одлика ове форме метаболита хомоцистеина. Такође, будући да су многи кардиодимаски ефекти L Hcy tlhc били негативнији у односу на друга два облика хомоцистеина, можемо претпоставити да ефекти овог облика хомоцистеина на срце нису били посредовани оксидационим оштећењима већ другим механизмима, чије расветљење захтева дања истраживања.

Наше истраживање се може упоредити са студијом Chang-а и коаутора (569) који су испитивали ефекте хомоцистеина (0.1, 0.5 и 1 mmol/l) на продукцију  $O_2^-$ , и  $H_2O_2$  у митохондријама кардиомиоцита пацова и дошли до закључка да хомоцистеин индукује повећање продукције и  $O_2^-$ , и  $H_2O_2$  (569). Ипак, треба узети у обзир све различитости између студија у погледу експерименталниг модела, врсте примењеног хомоцистеина и апликоване дозе. Ради комплетнијег и бољег сагледавања наших резултата, било бо корисно одредити и активност антиоксидационих ензима, нарочито SOD и CAT, обзиром на њихову улогу у неутралисању  $O_2^-$  и  $H_2O_2$ , међутим, тренутни недостатак методолошке технике за одређивање активности поменутих ензима у коронарном венском ефлуенту, нас је онемогућио да спроведемо и ове анализе.



На основу свега изнетог можемо увидети да, генерално гледано, сви испитивани облици хомоцистеина нису индуковали оксидациони стрес, односно не утичу на продукцију различитих слободних радикала у срцу. У том смислу, чини се да је L Нсу tlhc најмање штетан, тј. да, на још увек нејасан начин, може да има потенцијалан анти-оксидациони ефекат. На крају, са аспекта постигнутих кардиодинамских ефеката апликованих облика хомоцистеина (Табеле 4-6, Графици 1-3), резултати маркера оксидационог стреса сугеришу, да дејства хомоцистеина и његових метаболита на срце, не укључују повећану продукцију слободних радикала, тј. нису посредовани оксидационим стресом, већ другим предложеним механизмима (483), за чију потврду су потребна даља истраживања.

## **5.7. ЕФЕКТИ ИНХИБИЦИЈЕ РАЗЛИЧИТИХ ГАСОТРАНСМИТЕРА НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА**

Иако, традиционално и оправдано познати као штетни нус-продукти ћелијског метаболизма, способни да изазову оштећења различитих ћелијских струкура, слободни радикали могу да буду и изузетно важни интра- и интерцелуларни сигнални молекули (570). Управо због ове функције, претпоставља се да слободни радикали током ћелијске сигнализације могу на одређеном нивоу да реагују са гасотрансмитерима (528). Поред NO, који и сам показује одлике слободног радикала, и чија су оксидациона својства већ добро позната (384, 404, 561), и друга два, новија сигнална молекула (CO и H<sub>2</sub>S) се у последње време доводе у везу са редокс равнотежом у организму.

НО/СО систем на различите начине може да буде укључен у интрацелуларну редокс равнотежу. Свој ефекат у модулацији ћелијског редокс стања, СО остварује на нивоу митохондрија, као примарном месту синтезе АТП-а, и на нивоу ћелијске мембране. У митохондријама овај сигнални молекул делује на нивоу респираторног ланца, тако што се везује и ремети функцију различитих комплекса током преноса електрона. СО продукован од стане НО-1, утиче на митохондријалну потрошњу O<sub>2</sub> у склопу оксидативне фосфорилације, делујући као реверзиблини инхибитор цитохром *c* оксидазе, последњег примаоца електрона у респираторном ланцу (572). Супресијом ћелијског `дисања`, СО, смањује продукцију АТП-а и ћелијско снабдевање енергијом. Поред тога, везујући се за цитохром *a*, *a*<sub>3</sub> (комплекс IV) респираторног ланца, СО је у стању да продукује O<sub>2</sub><sup>-</sup> и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> из митохондријалног комплекса III (572).

Ван митохондрија, CO регулише производњу ROS, делујући на мембранске хемопротеине типа NADPH оксидазе (573). Познато је да NADPH оксидазе представљају један од главних извора ROS у ћелији, пре свега  $O_2^-$  (573). У васкуларним глатким мишићним ћелијама, везивање CO за хем домен NADPH оксидаза, инхибира каталитичку активност ових оксидаза и доводи до смањења производње ROS (574). Као што може да се увиди, утицај CO на продукцију ROS у митохондријама и ван ње је антагонистички, односно док у митохондријама стимулише стварање ROS, на нивоу ћелијске мембране CO спречава генерисање слободних радикала инхибирајући активност NADPH оксидаза.

Упркос различитом ефекту CO на интрацелуларну производњу ROS, интеракција између ова два ћелијска система у којима слободни радикали могу да се стварају, се наслућује. Последње студије на васкуларним глатким мишићима, су показале да митохондријални ROS, могу да стимулишу активност NADPH оксидаза, чиме долази до накнадног повећања продукције ROS (575). Могуће је и да NADPH под утицајем CO, са своје стране, регулише митохондријалну производњу ROS. Lamou и сарадници (576) су указали да ендогени и егзогени CO индукује вазоконстрикцију артерија, активирајући митохондријално старање  $O_2^-$ , који смањује биорасположивост NO. Са аспекта претходне хипотезе је важно да су ови аутори приметили да инхибитори NADPH поништавају добијене ефекте (продукција  $O_2^-$ ), што је изменило ефекат CO у вазодилаторни. Ова сазнања нам сугеришу да ефекти CO на одржавање васкуларног тонуса могу зависити од редокс равнотеже.

Експерименталне студије које проучавају утицај CO на продукцију ROS у срцу су малобројне и у базиране на моделу култура изолованих кардиомиоцита или ендотелних ћелија. У већини од њих се истиче да егзогено примењени CO стимулише продукцију слободних радикала у митохондријама (577) или дејством на NADPH ћелијских култура срца (578). Ипак има истраживања која су користила другачије моделе. Студија André-а и коаутора (573) је била осмишљена да испита утицај тронедељног третмана CO на настанак срчаних аритмија пацова *in vivo*. Ови аутори су показали да CO доводи од повећања липидне пероксидације (MDA) као одговор на повећано стварање ROS у срцу, што може да буде узрок аритмогеног ефекта CO (579).

У нашој студији смо, применом селективног НО 1 инхибитора (PPR IX) испитивали ефекат ендогеног СО на продукцију слободних радикала, односно индукцију оксидационог стреса у срцу пацова. Резултати које смо добили показују да су након адимистрације PPR IX нивои индекса липидне пероксидације, мереног као (TBARS), азот монооксида у форми нитрита ( $\text{NO}_2$ ), и супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ ) статистички значајно опали, док су нивои водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) порасли (Табела 21, График 18). Ови резултати су корелацији са претходним литературним подацима по којима у срцу СО стимулише липидну пероксидацију, тј. производњу слободних радикала ( $\text{O}_2^-$  и  $\text{NO}$ ). То значи да у ситуацији када нема ендогено присутног СО, који и у физиолошким условима може да буде одговоран за стимулацију оксидационог стреса, стварање слободних радикала ће бити умањено. Поред тога, обзиром да је дошло до смањеног ослобађања  $\text{O}_2^-$ , као главног изазивача липидне пероксидације, и нивои TBARS-а су такође смањени. Мада се  $\text{NO}$  може посматрати и као прооксиданс, његове снижене вредности иду у прилог изразитој редукцији CF коју смо регистровали након апликације PPR IX (Табела 7, График 4). Једно од објашњења за повећану производњу  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Табела 21, График 18) је да  $\text{NO}$  1 може да стимулише активност CAT (580), која разградњом  $\text{H}_2\text{O}_2$ , смањује ниво ове ROS. Дакле, блокадом  $\text{NO}$  1, могуће је да смо супримирали активност CAT, што је за последицу имало пораст концентрације  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Са становишта кардиодинамских ефеката инхибиције СО (Табела 7, График 4), можемо уочити да утицај СО на функцију срца и коронарне циркулације, у нашем експерименталном моделу (изузев динамике  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) може да буде посредован кроз интеракцију СО са слободним радикалима.

$\text{H}_2\text{S}$  је други сигнални молекул чију смо потенцијалну улогу у стимулацији оксидационог стреса желели да испитамо, односно да уочимо да ли ефекти  $\text{H}_2\text{S}$  на срце пацова могу бити последица интеракције овог гасотрансмитера са слободним радикалима. О утицају CSE/ $\text{H}_2\text{S}$  система на редокс равнотежу се најмање зна у односу на остала два гасотрансмитерска система. Већина доступних података указује да у КВС,  $\text{H}_2\text{S}$  углавном смањује производњу ROS, тј. има антиоксидациони карактер (252, 581, 582). Егзогени  $\text{H}_2\text{S}$ , слично као и СО, може да регулише митохондријалну производњу ROS, инхибицијом цитохром *c* оксидазе (581).

Међутим, ефекат  $H_2S$  на митохондријалну продукцију ROS је потпуно супротан у односу на CO. Наиме, ова сазнања су потичу из студија на исхемијском моделу срца пацова, тако да инхибиција ћелијске респирације од стране  $H_2S$  смањује продукцију ROS током реперфузије и олакшава морфо-функционални опоравак срца (581).

Антиоксидациони ефекат  $H_2S$  се огледа и у повећању концентрације глутатиона, који се јавља након третмана овим сигналним молекулом (582). Поред тога,  $H_2S$ , као и CO, спречава активност NADPH оксидаза и самим тим његову продукцију ROS (583). Обзиром да је уочен позитиван ефект  $H_2S$  на спречавање оксидационих оштећења током реперфузије срца, најновије студије се углавном баве овом тематиком. Тако је Szabo са својим истраживачким тимом (584), указао да егзогени  $H_2S$  смањује ослобађање  $O_2^-$  и  $H_2O_2$ , а тиме и липидну пероксидацију током миокардног оштећења изазваног изопротеренолом (584).

Као што се види највећи проценат експерименталних студија које се баве утицајем  $H_2S$  на оксидациони стрес у KBC се заснивају на испитивању егзогеног ефекта овог сигналног молекула, и то у оквиру исхемијско/реперфузионих оштећења срца. Ипак, мишљења смо, да је за разумевање оксидационих ефеката  $H_2S$  у болестима срца, неопходно испитати утицај овог гасотрансмitera на одвијање оксидо-редукционих процеса у физиолошким условима рада миокарда. Због тога је наша студија имала за циљ, да поред CO, испита значај ендогеног  $H_2S$  у одржавању редокс равнотеже на моделу здравог срца, као и да открије да ли и у којој мери кардиодинамски ефекти поменутог сигналног молекула могу да буду последица промене ове равнотеже?

У нашој студији, апликација инхибитора CSE/ $H_2S$  система (DL PAG) је индуковала повећано ослобађање супероксид анјон радикала ( $O_2^-$ ) у коронарном венском ефлуенту, док се нивои осталих параметара оксидационог стреса нису статистички значајно мењали у односу на контролне услове (Табела 22, График 19). Ови резултати су изузетно интересантни и сугеришу да у условима одсуства ендогено синтетисаног  $H_2S$ , нема битније промене у динамици ослобађања испитиваних прооксиданаса, изузев повећаног ослобађања  $O_2^-$ . Пораст нивоа  $O_2^-$ , нам потврђује претходна сазнања да  $H_2S$  када се физиолошки синтетише, редукује производњу овог токсичног слободног радикала, односно поседује изван антиоксидациони потенцијал (584).

Са становишта утицаја ендогеног  $H_2S$  на функцију срца и коронарну васкулатуру (Табела 8, График 5), можемо приметити да добијени кардиодинамских ефекти  $H_2S$ , за разлику од  $CO$ , не укључују промене редокс равнотеже у кардиомиоцитима и коронарном ендотелу, већ су посредовани другим механизмима (528-531).

Мада је реч о другачијем експерименталном приступу, наши резултати су у сагласности са студијом Гао-а и сарадника (585). Наиме, користећи модел исхемијско-реперфузионог оштећења на срцима пацова са стрептозоцином-изазваним дијабетесом, ови аутори су испитивали утицај егзогеног ( $NaHS$ ) и ендогеног  $H_2S$  (DL PAG) на развој оксидационог стреса током исхемије и реперфузије миокарда. Они су показали да  $H_2S$  донор,  $NaHS$ , повећава ниво овог гасотрансмитера у срцу, што је било повезано са смањеном липидном пероксидацијом, продукцијом ROS, и последичним смањењем величине инфаркта. Са друге стране, блокада синтезе ендогеног  $H_2S$  помоћу DL PAG је изазвала супротне ефекте (585). Ови налази указују да  $H_2S$  може да поседује кардиопротективни ефекат, и да својим антиоксидационим потенцијалом ублажи оксидациона оштећења током реперфузионог периода након исхемије срца.

На основу резултата нашег и поменутих истраживања, можемо увидети да, за разлику од  $CO$ ,  $H_2S$  било егзогени, било ендогени, у физиолошким као и патофизиолошким условима, не доприноси развоју оксидационог стреса у миокарду и коронарној циркулацији, односно изгледа да поседује одређени антиоксидациони капацитет, који би наредним студијама морао да буде дефинитивно потврђен. Такође, обзиром да је, већина до сада спроведених студија користила одређене дозе донора или инхибитора  $H_2S$ , будућа испитивања би требало проширити и у погледу коришћења ширег опсега примењених доза, са циљем утврђивања евентуалне дозне зависности добијених ефеката.

## 5.8. УТИЦАЈ ИНХИБИЦИЈЕ NO НА ОКСИДАЦИОНЕ ЕФЕКТЕ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Овај део истраживања је осмишљен са циљем да се испита да ли ефекти хомоцистеина на продукцију ROS у срцу могу бити измењени након блокаде синтезе NO, односно да ли NO, у присуству хомоцистеина има утицаја на одржавање редокс равнотеже у срцу, и у каквом је то односу са кардиодинамским дејствим хомоцистеина?

Постоје подаци о потенцијалној повезаности хомоцистеина и NO са одвијањем оксидо-редукционих процеса у ендотелним, васкуларним глатким, а вероватно и мишићним ћелијама срца. Као што смо већ раније истакли, досадашња истраживања су сугерисала да хомоцистеин у плазми ауто-оксидацијом доводи до стварања различитих ROS ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^\cdot$ ) (553), те се сматра доминантно екстрацелуларним оксидансом. Међутим, претпоставља се да у свим претходно поменутих ћелијама хомоцистеин такође може да продукује ROS и то пре свега активацијом мембранских NADPH оксидаза, што резултује у генерисању  $O_2^-$ , изузетно токсичне ROS (568). Са друге стране, познато је да ензими задужени за синтезу NO (NOSs), а поготово eNOS, могу да представљају важан извор ROS *in vivo*. Наиме, активни NOSs су хомодимери. Сваки мономер NOS катализује транспорт електрона са Н-терминалног везујућег места NADPH донора редукујућег домена, на С-терминалну простетичку хем групу оксидујућег домена другог мономера. За транспорта електрона, NOSs, захтевају присуство  $BH_4$ , ради измене редокс стања. Управо гвожђе из хем групе и  $BH_4$ , катализују реакцију кисеоника са L-аргинином, као последица чега настаје NO (586).

Јасно је да поремећаји овог транспорта електрона од стране NOSs, могу да усмере електроне ка директној редукацији молекуларног кисеоника и последичној продукцији  $O_2^-$ . Међу потенцијалним узроцима поремећеног одвијања синтезе NO и стварања  $O_2^-$ , се наводе недовољна концентрација  $BH_4$  и/или L-аргинина. Тако је, биопродукт реакције између NO и  $O_2^-$ ,  $ONOO^-$ , у стању да оксидује  $BH_4$ , што ремети редокс стање eNOS, који почиње са производњом  $O_2^-$ . Недостатак L-аргинина омогућава NOSs да уместо ове аминокселине, као субстрат користе молекуларни кисеоник и генеришу  $O_2^-$  (586).

Показано је да хомоцистеин може да мења активност NOSs, и усмерава је ка формирању  $O_2^-$ . Оксидациони стрес који изазива хомоцистеин, индукује оксидацију  $NH_4$ , поремећај активности eNOS, и последичну продукцију ROS (587). Поред тога, хомоцистеин оксидацијом протеинских транспортера, ограничава улазак L-аргинина у ћелије, што са своје стране опредељује eNOS да ствара  $O_2^-$  (588). Даље, поједине студије су указале да хомоцистеин инхибира диметиларгинин диметил-аминохидролазу (DDAH), ензим који разграђује ADMA-у (ендогени инхибитор NOS). Акумулирана ADMA у ћелији потом ступа у конкуренцију са L-аргинином за везујућа места NOSs, чиме умањује продукцију NO (589). Поред свих добро утврђених позитивних улога у одржавању КВС хомеостазе (494), NO у одређеним (пато)физиолошким околностима може да стимулише продукцију ROS, и тако изазове ћелијска оштећења. Ово се пре свега односи на услове истовремене довољне концентрације NO и  $O_2^-$ , који подлежу реакцији током које се ствара  $ONOO^-$ , један од најтоксичнијих ROS (589). У васкуларним глатким мишићима је уочено да хомоцистеин активацијом NF $\kappa$ B транскрипционог пута, повећава експресију iNOS и производњу NO од стране ове NOS изоформе. Ипак, овај NO који се ствара у условима оксидационог стреса, не остварује своја физиолошка (позитивна) дејства и доприноси даљем стварању ROS (590).

Међутим и NO са своје стране може да мења ефекте хомоцистеина у ћелијама. Овакво дејство NO остварује захваљујући својој способности да лако реагује са SH групама тиола и надгради нитрозотиоле, који служе за његов транспорт и стабилизацију. Тако су ендотелне ћелије развиле могућност `самоодбране` и детоксикације од дејстава хомоцистеина повећањем синтезе и ослобађања NO. Везивање овог сигналног молекула за хомоцистеин може да узрокује неутрализацију штетних дејстава овог тиола или чак да му промени механизам деловања. На тај начин, нитрозијацијом хомоцистеина, NO формира S-нитрозо-хомоцистеин, који има изразита вазодилататорна својства (586). Ипак, још увек није познато колики је ефективни значај ових процеса, обзиром на све наведене начине којима хомоцистеин смањује производњу и биорасположивост NO.

Експерименталне студије које испитују значај eNOS у оксидационим ефектима хомоцистеина нису бројне, и тек последњих година доживљавају експанзију. Neudrick и коаутори (591) су проучавали улогу NOS у оксидационим оштећењима ендотелних ћелија изазваних хомоцистеином. Ови аутори су показали да L-хомоцистеин индукује оксидациони стрес у смислу повећања липидне

пероксидације, и повећаног ослобађања  $O_2^-$ , и али без промена у нивоу  $H_2O_2$ . Употребом L-NAME сви поменути ефекти су били поништени, те аутори предлажу да један од потенцијалних прооксидационих механизма хомоцистеина укључује и улогу NOS (591).

У садашњој студији, улога ендогеног L-аргинин/NO система у ефектима хомоцистеина на изоловано срце је процењивана употребом неспецифичног NOS инхибитора (L-NAME) који је додаван у раствор сваког од облика хомоцистеина. Наши резултати показују да су се након коапикације DL хомоцистеина (DL Hcy) и L-NAME, нивои TBARS,  $O_2^-$ , и  $H_2O_2$ , статистички значајно смањили, док није било разлике у динамици ослобађања  $NO_2$  у односу на контролне услове (Табела 23, График 20). Слична динамика прооксидационих молекула је забележена и у случају администрације L-NAME са оба облика тиолактона. Тако је заједничка апликација DL Hcy tlhc и L-NAME такође довела до смањења нивоа TBARS,  $O_2^-$  и  $H_2O_2$ , без промена у ослобађању  $NO_2$  (Табела 24, График 21), док је комбинована употреба L Hcy tlhc са L-NAME, смањила нивое TBARS,  $NO_2$  и  $H_2O_2$ , али није узроковала промене у продукцији  $O_2^-$  (Табела 25, График 22).

Уопштено гледајући ови резултати сугеришу да је примена сваког од облика хомоцистеина са L-NAME-ом углавном довела до смањене продукције про-оксиданата, и да једине разлике постоје у динамици ослобађања NO, обзиром да се очекује да употребом његовог инхибитора (L-NAME), дође до смањене продукције овог молекула. Ипак, могуће објашњење за ове различитости лежи у стероспецифичности сваког од испитиваних облика хомоцистеина, и потенцијалној интеракцији, приликом апликације, са L-NAME-ом. Такође, упоређивањем статистичке значајности постигнутог снижења нивоа испитиваних маркера, уочавамо да није било значајне разлике међу ефектима неке од форми хомоцистеина, и да се зато исти могу у доброј мери генерализовати.

Смањењем нивоа  $O_2^-$ , и  $H_2O_2$  је дошло и до (очекиваног) смањења липидне пероксидације, тако да примењена комбинација супстанци очигледно не повећава оксидациони стрес, односно, изгледа да у одсуству NO, хомоцистеин не само да не доводи до оксидационих оштећења већ (наставља) да показује антиоксидациони ефекат. Упоређивањем ових налаза са резултатима самосталне апликације сваког од хомоцистеина (Табеле 19-21, Графици 16-18), можемо увидети да када је реч о основном облику хомоцистеина (DL Hcy), у условима блокаде синтезе NO (Табела 23, График 20), долази до смањене продукције испитиваних маркера оксидационог стреса у односу на услове када није било блокаде продукције поменутог молекула (Табела 19, График 16), тј. да ова форма хомоцистеина своје (анти)оксидационе



ефекте може остварити када је NOS/NO гасотрансмитерски систем блокиран.

Слично као и у претходном случају, DL Ncy tlhc, у одсуству синтезе NO (Табела 24, График 21), је смањио продукцију испитиваних про-оксиданаса у односу на услове без блокаде продукције NO (Табела 20, График 17), што указује да L-аргинин/NO систем може да има значаја у мењању оксидационог потенцијала DL Ncy tlhc. L Ncy tlhc је у односу на услове присуства NO (Табела 21, График 18), показао да блокада синтезе поменутог гасотрансмитера (Табела 25, График 23), смањењем продукције H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> и TBARS такође може да потенцира антиоксидациона својства и овог метаболита хомоцистеина.

Садашњи резултати могу бити делом у сагласностима са налазима Toral-а и сарадника (592) који су на моделу културе ендотелних ћелија указали да L-NAME смањује продукцију RNS и ROS изазвану хомоцистеином. Ипак, све разлике у експерименталном моделу, дози и врсти хомоцистеина нам ограничавају свако детаљније поређење са овом студијом.

Узевши у обзир ове резултате, можемо уочити да кардиодинамкси ефекти сваког од испитиваних облика хомоцистеина приликом блокаде синтезе NO (Табеле 9-11, Графици 6-8), вероватно нису посредовани оксидационим стресом, тј. да хомоцистеин у одсуству NO није остварио негативна дејства на срце услед оксидационих оштећења.

На основу наших резултата запажамо да L-аргинин/NO систем, још увек нејасним механизмима, може да има улогу у оксидационим својствима хомоцистеина. Будући да ова студија није обухватила испитивање експресије и активности NOS као и друга имунохистохемијска и хистолошка испитивања, ове резултате треба посматрати као уводна сазнања и базичне податке за даља и комплекснија истраживања ове проблематике.

## **5.9. УТИЦАЈ ИНХИБИЦИЈЕ СО НА ОКСИДАЦИОНЕ ЕФЕКТЕ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА**

Утицај СО на оксидационе ефекте хомоцистеина у КВС представља готово потпуно неистражено научно питање. И док о улози остала два гасотрансмитера у поменутој проблематици има све више информација, у доступним литературним базама података повезаност СО и редокс хомеостазе у присуству хомоцистеина остаје, умногоме непознато.

Зато ћемо се о улози CO у ефектима хомоцистеина на одржавање ћелијске редокс равнотеже послужити подацима из раније поменуте студије Kim-а и сарадника (546). Ово је један од ретких радова који донекле може да нас упуту на наведену тематику. Познато је да хомоцистеин изазива оксидациона оштећења ендоплазматског ретикулума и тако узрокује апоптозу ћелија (215, 216). У овом истраживању аутори су на моделу културе ендотелних ћелија испитивали потенцијални ефекат CO на (ендоплазматски) оксидациони стрес изазван разним агенсима, између осталог и хомоцистеином. Студија је показала да шесточасовна инкубација ћелија са 20  $\mu\text{mol/l}$  CO, пре апликације 50  $\mu\text{mol/l}$  Hcy, индукује активацију NO 1, што је за последицу имало инхибицију апоптозе (540). Наиме, егзогени CO је путем активације NO 1, стимулисао продукцију ендеогеног CO, који је потом супресијом различитих протеина зауставио ендоплазматска оксидациона оштећења изазавана хомоцистеином, и тако спречио започињање апототичке каскаде. Ови налази нам сугеришу да CO, било егзогени, било ендеогени, може да умањи интрацелуларни оксидациони стрес под утицајем хомоцистеина, тј. може да има цитопротективни ефекат. То нас наводи на претпоставку да NO/CO сигнални систем има извесну улогу у дејствима хомоцистеина на оксидо-редукциону хомеостазу односно способан је да се супротстави оксидационим ефектима овог тиола.

Повезаности CO и хомоцистеина у модулисању ћелијске редокс равнотеже се може такође уочити и на нивоу NADPH оксидаза. Као што је раније поменуто, ови мембрански ензими под утицајем различитих стимулуса могу имати једну од кључних улога у интрацелуларном стварању ROS, пре свега  $\text{O}_2^-$  (573). Претходна сазнања су истакла да стимулус за овакву активност NADPH оксидаза може да буде како CO (573), тако и хомоцистеин (568). Хипотетички, то би значило да би у случају присуства одговарајуће (довољне) концентрације CO и хомоцистеина, NADPH оксидаза била двоструко активирана и дошло би до повећане генерације ROS. Томе иду у прилог и резултати наше студије, који су указали да CO може да потенцира оксидациони стрес (Табела 21, График 18), чиме се намеће логично питање, може ли одсуством CO, хомоцистеин да смањи своја оксидациона оштећења и колико поменути сигнални молекули доприноси овим ефектима?

У садашњој студији смо применом неселективног NO инхибитора (PPR IX) са сваким од раствора хомоцистеина, покушали да испитамо да ли ендеогени CO мења оксидационе ефекте хомоцистеина у изолованом срцу пацова. Након ко-апликације базичног облика хомоцистеина (DL Hcy) и PPR IX је дошло до

статистички повећаног ослобађања  $O_2^-$ , док су се нивои  $H_2O_2$  и  $NO_2$  смањили. Вредности TBARS се нису значајније мењале у односу на контролне услове (Табела 26, График 23). Комбинација PPR IX са DL Hcy tlhc је имала за последицу само значајније смањење у продукцији  $H_2O_2$  без промене у динамици осталих маркера (Табела 27, График 24). Са друге стране, DL Hcy tlhc у комбинацији са PPR IX је довео до смањеног ослобађања  $NO_2$ ,  $O_2^-$ , и  $H_2O_2$ , док се нивои TBARS такође нису значајније мењали у односу на контролне услове (Табела 28, График 25).

На основу ових резултата увиђамо да, генерално посматрано, хомоцистеин и његови метаболити у одсуству синтезе CO остварују анти-оксидациони потенцијал, што потврђује про-оксидациони капацитет поменутог гасотрансмitera. Иначе, разлика у оствареним ефектима између обе изоформе хомоцистеина као и његовог основног облика, може, као и у претходним случајевима да буде последица стереизомерних карактеристика ових метаболита хомоцистеина.

За потврду ове анти-оксидационих својстава хомоцистеина у одсуству CO, можемо упоредити динамику испитиваних маркера приликом самосталне администрације сваког од облика хомоцистеина са садашњим резултатима (ко-апликација са PPR IX). Тако је у условима одсуства CO (Табела 26, График 23), у односу на самостални утицај (Табела 18, График 15) основни облик хомоцистеина (DL Hcy) испољио потенцијални анти-оксидациони ефекат. На тај начин, смо добили макар прелиминарну потврду претходно изнетих претпоставки да CO може да поседује про-оксидациони потенцијал (568, 573).

Утицај DL Hcy tlhc на динамику про-оксидационих маркера у околностима блокаде синтезе CO (Табела 27, График 24), у односу на његову самосталну примену (Табела 19, График 16) је довео, до смањења вредности  $H_2O_2$ , што као и у претходном случају може да укаже на про-оксидациону улогу CO у присуству хомоцистеина. Слично претходним запажањима, ефекат L Hcy tlhc на оксидациони стрес у условима одсуства CO (Табела 28, График 25) у односу на његову самосталну апликацију (Табела 20, График 17) није био значајније промењен, тј. овај метаболит хомоцистеина је показао још већи анти-оксидациони потенцијал. Ови резултати би могли да нас наведу на претпоставку да кардиодинамски ефекти свих облика хомоцистеина приликом блокаде синтезе CO (Табеле 12-14, Графици 9-11), нису последица оксидационог стреса, односно да хомоцистеин испољава негативан ефекат на рад срца посредством других, још увек нејасних механизма. Ипак, наша сазнања су прелиминарна, те неизоставно траже подршку у даљим и комплекснијим истраживањима.

## 5.10. УТИЦАЈ ИНХИБИЦИЈЕ $H_2S$ НА ОКСИДАЦИОНЕ ЕФЕКТЕ РАЗЛИЧИТИХ ОБЛИКА ХОМОЦИСТЕИНА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

У поређењу са претходна два гасотрансмитера, хомоцистеин је током свог метаболизма најдиректније повезан са  $H_2S$ . Као што смо раније поменули, транс-сулфурацијом хомоцистеина (и цистеина) помоћу CBS и CSE ензима настаје  $H_2S$  (547). Обзиром на ову узрочну повезаност метаболизма хомоцистеина и синтезе наведеног сигналног молекула, постоји потпуно оправдана претпоставка да  $H_2S$  може да има утицај на оксидационе ефекте хомоцистеина у КВС.

Хемијске карактеристике  $H_2S$  га чине врло ефикасним у уклањању слободних радикала, путем трансфера електрона или водониковог атома (593). Доказано је да овај гасотрансмитер веома лако ступа у интеракцију са  $ONOO^-$ ,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  и разграђује их (594). Досадашња сазнања су показала да  $H_2S$  остварује антиоксидациони ефекат у КВС. То се пре свега односи на инхибицију синтезе  $O_2^-$  у ендотелним (595), и васкуларним мишићним ћелијама (596), (услед смањења експресије и активности NADPH оксидаза), али и повећања активности и нивоа глутатиона као најважнијег ендогеног антиоксиданса (597). Поред васкуларне мреже  $H_2S$  је показао да и у срцу смањује производњу слободних радикала током реперфузије исхемичног миокарда (585). Осим тога, у нашем истраживању, смо испитујући утицај ендогеног  $H_2S$  на оксидациони стрес срца пацова, такође забележили да у одсуству овог гасотрансмитера долази до повећаног ослобађања  $O_2^-$  (Табела 22, График 19), односно да  $H_2S$  може да има изврстан антиоксидациони капацитет.

Са друге стране, колики је значај овог гасотрансмитера на одржавање редокс равнотеже у присуству хомоцистеина, односно каква је улога  $H_2S$  у оксидационим дејствима ове аминокиселине, се још увек недовољно зна. Према најновијим подацима, у условима хиперхомоцистеинемije  $H_2S$  може да мења оксидациона својства овог тиола, тј. да умањи оксидациони стрес ендотела изазван хомоцистеином. Наиме, ендотелне ћелије су у могућности да секретују CBS и CSE ензиме који потом путујући циркулацијом активно продукују  $H_2S$  из хомоцистеина (598). У присуству хомоцистеина, овако синтетисани  $H_2S$  спречава оксидациона оштећења и последичну дисфункцију ендотелних ћелија (598).

Yan и коаутори (599) су на моделу изолованих глатких мишића аорте, испитивали управо да ли  $\text{H}_2\text{S}$  може да утиче на цитотоксичност и оксидациони стрес изазван хомоцистеином. Културе наведених ћелија су биле изложене хомоцистеину ( $100 \mu\text{M}$ ), у присуству или одсуству  $\text{H}_2\text{S}$  донора ( $\text{NaHS}$ ) у растућим дозама ( $30, 50, 90, 100 \mu\text{M}$ ). Студија је указала да хомоцистеин у комбинацији са малим концентрацијама  $\text{H}_2\text{S}$  ( $30$  и  $50 \mu\text{M}$ ), смањује продукцију  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$ , и  $\text{O}_2^-$  и тиме ћелијска оштећења. То значи да  $\text{H}_2\text{S}$  (у ниским дозама) смањује оксидациони стрес под утицајем хомоцистина, односно има цитопротективни ефекат у присуству овог тиола.

Резултати наше студије показују да су се након коапикације DL Hcy и DL PAG, нивои  $\text{NO}_2$  и  $\text{O}_2^-$  статистички значајно смањили, а TBARS и  $\text{H}_2\text{O}_2$  порасли (Табела 29, График 26). Са друге стране, тиолактони су у овој комбинацији различито реаговали. Тако, комбинована администрација DL Hcy tlhc и DL PAG, осим смањења вредности TBARS, није изазвала битније промене осталих испитиваних маркера оксидационог стреса у односу на контролне услове (Табела 30, График 27), док је L Hcy tlhc у комбинацији са поменутиим инхибитором довео до смањења нивоа TBARS и  $\text{O}_2^-$ , али и пораста динамике ослобађања  $\text{NO}_2$  (Табела 31, График 28). Ови резултати нам сугеришу да, као и у случају удружене примене са инхибитором синтезе NO и CO, хомоцистеин и његови метаболити имају другачије ефекте. На основу ових резултата можемо да увидимо да је, у комбинацији са DL PAG, најтоксичније ефекте имао основни облик хомоцистина. Разлике у поменутиим резултатима између испитиваних облика хомоцистеина, као и у свим претходним случајевима, могу бити последица њихових хемијских особености, тј. стереизомерних карактеристика.

Ради прецизнијег уочавања улоге  $\text{H}_2\text{S}$  у оксидационим ефектима хомоцистеина у срцу, упоредићемо динамику ослобађања испитиваних маркера приликом самосталне администрације сваке од форми хомоцистеина и у случају ко-апликације са DL PAG (блокаде  $\text{H}_2\text{S}$ ). У односу на самосталну апликацију (Табела 18, График 15), када није било значајнијих промена у динамици ослобађања оксидационих маркера, DL Hcy је у одсуству синтезе  $\text{H}_2\text{S}$  (Табела 29, График 26), индуковао пораст производње TBARS и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , али и смањено ослобађање  $\text{NO}_2$  и  $\text{O}_2^-$ .

Будући да је ниво појединих маркера повећан, а других пак снижен, те да не можемо пронаћи доминантан тренд динамике ових параметара, запажамо да у случају основног облика хомоцистеина,  $H_2S$  још увек нема прецизан про- или анти-оксидациони потенцијал. Ипак, за разлику од других истраживања (599) ми смо испитивали утицај ендогеног  $H_2S$ , што у физиолошком смислу може бити још меродавније.

Ефекат DL Ncy tlhc на оксидациони стрес у условима одсуства  $H_2S$  (Табела 30, График 27) у односу на његову самосталну апликацију (Табела 19, График 16) није био битније промењен. Утицај L Ncy tlhc на динамику испитиваних маркера у околностима блокаде синтезе  $H_2S$  (Табела 31, График 28), у односу на његову самосталну примену (Табела 20, График 17), такође није довео до значајнијих промена, изузев повећаног ослобађања  $NO_2$ . Пораст нивоа  $NO_2$  у одсуству  $H_2S$ , може да буде последица чињенице да хомоцистеин врло често стимулише активацију iNOS (599), и самим тим продукцију NO који има одлике слободног радикала.

Посматрани са аспекта кардиодинамских ефеката хомоцистеина приликом блокаде синтезе  $H_2S$  (Табеле 15-17, Графици 12-14), садашњи резултати нам сугеришу да директни кардиодепресивни утицај испитиваних облика хомоцистеина, и у овом случају, највероватније не укључује оксидациона оштећења.

На основу наших резултата уочавамо да је утицај CSE/ $H_2S$  система на оксидационе ефекте хомоцистеина и њему сродних супстанци, у целини гледано, благо антиоксидациони. Прецизније речено, изгледа да хомоцистеин у присуству  $H_2S$  испољава мањи про-оксидациони ефекат, у односу на одсуство продукције овог сигналног молекула. Иако је садашње истраживање на тај начин у сагласности са претходним сазнањима, наредне комплексније студије су неопходне за детаљније разумевање ових сложених молекуларних интеракција.

**VI**

**ЗАКЉУЧЦИ**

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

1. Акутни и директни ефекти хомоцистеина и његових метаболита на изоловано срце пацова подразумевају негативно инотропно, и луситропно дејство, као и вазоконстрикторни утицај на коронарни ендотел, односно изазивају систолну и дијастолну дисфункцију, и редукцију коронарног протока. Добијени ефекти су били најизраженији употребом L облика тиолактона, што може да има и клинички значај, одређивањем ове фракције хомоцистеина у плазми код пацијената са КВБ.
2. Инхибиција синтезе CO и H<sub>2</sub>S је довела до комплетне депресије кардиодинамике и смањења коронарног протока изолованог срца пацова, што је показало да ови гасотрансмитери могу да имају улогу у контракцији кардиомиоцита и контроли коронарног васкуларног тонуса. С обзиром да су поменути ефекти били знатно већи у случају инхибиције CO, можемо закључити да овај сигнални молекул има већи значај у физиологији миокарда и коронарне циркулације у поређењу са остала два гасотрансмитера.
3. Приликом инхибиције синтезе NO, увиђамо да је најнегативнији ефекат на срце остварио L Нсу tlhc, док је најмање штетан утицај имао DL Нсу tlhc. Изгледа да улога NO-а у ефектима хомоцистеина зависи од присутног облика хомоцистеина, и најпозданији значај има у коронарној циркулацији, док на нивоу самог миокарда захтева даља и комплекснија истраживања.
4. У одсуству CO, сви испитивани облици хомоцистеина су испољили још снажнији негативни инотропни, луситропни и хронотропни ефекат, као и веће снижење коронарног протока. На тај начин смо доказали да овај гасотрансмитер може да има врло значајну улогу у дејствима хомоцистеина на срце.
5. У условима блокаде CSE/H<sub>2</sub>S сигналног пута, најнегативнији ефекат на срце је остварио опет L Нсу tlhc, док је најмање штетан утицај имао поново DL Нсу tlhc. Као и у случају инхибиције производње NO, разлика у ефектима испитиваних облика хомоцистеина могу вероватно бити последица њихових стероизмерних карактеристика. И поред извесне протективне улоге H<sub>2</sub>S-а у условима акутног деловања хомоцистеина на срце, изгледа да поменути гасотрансмитер не доприноси значајно промени ефеката овог тиола на изоловано срце пацова.



6. Резултати ове студије сугеришу да CO може да буде гасотрансмитер који поседује најважнију улогу у ефектима хомоцистеина и његових метаболита на изоловано срце пацова, тј. да ефекти хомоцистеина највише зависе од NO/CO сигналног пута.
7. Ефекти хомоцистеина на продукцију различитих реактивних ROS у срцу зависе од облика ове аминокиселине. У том смислу, чини се да је хомоцистеин у својој основној форми (DL Hcy) најмање штетан, односно да, на још увек нејасан начин, може да има потенцијалан анти-оксидациони ефекат. Са друге стране, и тиолактони су такође показали да не индукују оксидациони стрес, мада L Hcy tlhc може бити токсичнији, због повећане продукције H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
8. Генерално посматрано, у нашем истраживању хомоцистеин и њему сродне супстанце не доводе до развоја оксидационог стреса изолованог срца пацова, што значи да акутни кардиодинамски ефекти различитих облика хомоцистеина највероватније нису били посредовани оксидационим оштећењима, већ другим механизмима који захтевају даља истраживања.
9. Приликом инхибиције синтезе CO, продукција већине про-оксидационих маркера је била смањена, што указује на његов евентуални про-оксидациони потенцијал, али и потврђује његову улогу у одвијању оксидо-редукционих процеса у срцу.
10. H<sub>2</sub>S не доприноси развоју оксидационог стреса у миокарду и коронарној циркулацији, већ изгледа да поседује одређени антиоксидациони капацитет, који би наредним студијама морао да буде дефинитивно потврђен.
11. Ови резултати упућују на потенцијални значај гасотрансмитера као нових и све битнијих чинилаца у одржавању редокс равнотеже KBC-а, што може бити изузетно важно у расветљавању и адекватнијем тумачењу многих кардиоваскуларних болести у чијој патогенези неизоставну улогу има оксидациони стрес.
12. Блокада синтезе NO може да потенцира антиоксидациона својства свих испитиваних облика хомоцистеина. На тај начин, запажамо да L-аргинин/NO систем, још увек нејасним механизмима, може да има улогу у оксидационим својствима хомоцистеина.

13. Инхибиција  $\text{HO}/\text{CO}$  система потенцира анти-оксидациона својства хомоцистеина, што потврђује про-оксидациони капацитет овог гасотрансмитера у КВС. Ипак, наша сазнања су прелиминарна, те неизоставно траже подршку у даљим и комплекснијим истраживањима.
14. Утицај  $\text{CSE}/\text{H}_2\text{S}$  система на оксидационе ефекте хомоцистеина и њему сродних супстанци је, у целини гледано, благо антиоксидациони, али још увек нејасан. Прецизније речено, изгледа да хомоцистеин у присуству  $\text{H}_2\text{S}$  испољава нешто мањи прооксидациони ефекат, у односу на одсуство продукције овог сигналног молекула, што говори у прилог потенцијалном анти-оксидационом својству поменутог сигналног молекула.
15. Наши резултати указују да гасотрансмитери дефинитивно могу да имају улогу у оксидационим ефектима хомоцистеина у КВС, што може помоћи у бољем сагледавању и разумевању ових комплексних молекуларних интеракција, чије је учешће у патогенези различитих КВБ, а самим тим и њиховој ефикаснијој превенцији и терапији, несумњиво.

**VII**

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Mujović VM. Medicinska Fiziologija-Textbook, 2012., Izdavač: Fondacija "Solidarnost Srbije".
2. Katz M. Interplay between inotropic and lusitropic effects of cyclic adenosine monophosphate on the myocardial cell. *Circulation* 1990; 82: 1-7.
3. Mujović VM, Jakovljević V i Velkovski S. Relaksacija kontrakcije i relaksacije u specifičnim kardiomiopatijama i stanju remodelovanog miokarda srca. U: Stamenković Ž i saradnici (urednici). *Kardiomiopatije i disfunkcije srca*. Beograd, Elit Medica; 2007. str. 185-212.
4. Mujović VM. Kardiovaskularni sistem i homeostaza. U: *Kardiologija: udzbenik za poslediplomsku nastavu*. Beograd, Medicinski Fakultet; 1994. str. 14-26.
5. Mujović VM. Funkcija leve komore u stečenim manama srca. U: Stamenković Ž (urednik). *Stečena oboljenja zalistaka levog srca*. Beograd, Zavod za izdavanje udzbenika i nastavna sredstva; 1996. str. 110-23.
6. Djukanović N, Jakovljević V, Mujović VM. Evaluation of miocardial relaxation in conditions of cardiac remodeling. *Med pregl* 2009; 62: 555-568.
7. Guyton, AC.; John E. (John Edward) (2006). *Textbook Of Medical Physiology* (11th ed.). Philadelphia: Elsevier Inc.
8. Levy MN; Berne RM. (1997). *Cardiovascular physiology* (7<sup>th</sup> ed.). St. Louis: Mosby.
9. von Ludinghausen M. The clinical anatomy of coronary arteries. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2003;167:III-VIII, 1-111.
10. Alexander RW, Schlant RC, Fuster V, O'Rourke RA, Roberts R, Sonnenblick EH, eds. *Hurst's the heart*. New York, NY: McGraw-Hill, 1999.
11. Butz LW, du Vigneaud V. The formation of a homologue of cystine by the decompensation of methionine with sulphuric acid. *J Biol Chem* 1932; 99:135–142.
12. Baernstein, H. D. (1934) A modification of the method for determining methionine in proteins. *J. Biol. Chem.* 106: 451– 456.
13. du Vigneaud V, Patterson WJ, Hunt M. Opening of the ring of the thiolactone of homocysteine. *J Biol Chem.* 1938; 126: 217-31.
14. Mudd SH, Finkelstein JD, Irreferre F, Laster L. Transsulfuration in mammals. Microassays and tissue distribution of three enzymes of the pathway. *J Biol Chem* 1965; 240: 4382-92.
15. Carmel R, Jacobsen DW (ed) 2001. *Homocysteine in Health and Disease*. Cambridge University Press.

16. Dudman NPB, Hicks C, Lynch JF, Wilcken DEL, Wang J. Homocysteine thiolactone disposal by human arterial endothelial cells and serum in vitro. *Arterioscler Thromb* 1991; 11:663-70.
17. Mudd SH, Levy HL. Plasma homocyst(e)ine or homocysteine? *N Engl J Med* 1995; 333:325.
18. Mudd SH, Finkelstein JD, Refsum H, et al. Homocysteine and its disulfide derivatives. A suggested consensus terminology. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1704-1706.
19. Vilaseca MA, Moyano D, Ferrero I, Artuch R. Total homocysteine in pediatric patients. *Clin Chem* 1997; 43: 690-92.
20. Tonstad S, Refsum H, Ueland PM. Association between plasma total homocysteine and parental history of cardiovascular disease in children with familial hypercholesterolemia. *Circulation* 1997; 96: 1803-08.
21. Refsum H, Ueland P, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998; 49: 31-62.
22. Clarke R, Woodhouse P, Ulvik A, et al. Variability and determinants of total homocysteine concentrations in plasma in an elderly population. *Clin Chem* 1998; 44:102-07.
23. Faure Delanef L, Quere I, Chasse JF, et al. Methylene tetrahydrofolate reductase thermolabile variant in human longevity. *Am J Hum Genet* 1997; 60:999-1001.
24. Mansoor MA, Svardal AM, Ueland PM. Determination of the in vivo redox status cysteine cysteinylglycine, homocysteine and glutathione in human plasma. *Anal Biochem* 1992; 200:218-29.
25. Mansoor MA, Ueland PM, Aarsland A, Svardal AM. Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with homocystinuria. *Metabolism* 1993; 42:1481-85.
26. Mansoor MA, Svardal AM, Schneede J, Ueland PM. Dynamic relation between reduced, oxidized and protein-bound homocysteine and other thiol components in human plasma during methionine loading in healthy men. *Clin Chem* 1992; 38: 1316-21.
27. Mansoor MA, Guttormsen AB, Fiskerstrand T, et al. Redox status and protein binding of plasma aminothiols during the transient hyperhomocysteinemia that follows homocysteine administration. *Clin Chem* 1993; 39: 980-85.
28. Anderson R F, & Packer J. E. The radiolysis of aqueous solutions of homocysteine thiolactone. *Int. J. Radiat. Phys. Chem.* 1974; 6: 33– 46.

29. Jakubowski H & Fersht A. Alternative pathways of rejection of non-cognate amino acids by aminoacyl-tRNA synthetases. *Nucleic Acids Res.* 1981; 9: 3105–3117.
30. Jakubowski H. The synthetic/editing site of an aminoacyl-tRNA synthetase: evidence for binding of thiols in the editing subsite. *Biochemistry* 1996; 35: 8252–8259.
31. Jakubowski H. Misacylation of tRNA<sup>Lys</sup> with noncognate amino acids by lysyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* 1999c; 38: 8088 – 8093.
32. Freer ST, J Kraut J. Crystal structures of D, L-homocysteine thiolactone hydrochloride: two polymorphic forms and a hybrid. *Acta Cryst*, 1965; 19, 992.
33. Jakubowski H. Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans. *J. Nutr* 2000; 130(2): 377S-381S.
34. Jakubowski H. Proofreading in vivo: editing of homocysteine by aminoacyl-tRNA synthetases in *Escherichia coli* *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 17672–17673.
35. Dudman NPB, Hicks C, Lynch JF, Wilcken DEL & Wang J. Homocysteine thiolactone disposal by human arterial endothelial cells and serum in vitro. *Arterioscler. Thromb* 1991; 11: 663–670.
36. Jakubowski H. Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures: possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 1935–1942.
37. Jakubowski H. Biosynthesis and reactions of homocysteine thiolactone. In: Carmel R, Jacobsen DW, (eds) 2001. *Homocysteine in Health and Disease*. Oxford, UK: Cambridge University Press.
38. Mudd HS, Matorin AI & Levy HL. Homocysteine thiolactone: failure to detect. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 1989; 63: 297–300.
39. Jakubowski H. Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. *J Biol Chem* 2000; 275: 3957-3962.
40. Mackness B, Durrington PN, & Mackness MI. Human serum paraoxonase. *Ge. Pharmacol* 1998; 31: 329 –336.
41. Harker LA, Harlan JM, and Ross R. Effect of sulfinpyrazone on homocysteine-induced injury and atherosclerosis in baboons. *Circ. Res.* 1983; 53: 731–738.
42. Donahue S, Sturman JA, and Gaul G. Arteriosclerosis due to homocysteinemia: failure to reproduce the model in weaning rabbits. *Am. J. Pathol.* 1974; 77: 167–174.

43. Van Aertes LA, Klaasboer HH, Postma NS, et al. Stereospecific in vitro embryotoxicity of L-homocysteine in pre- and post-implantation rodent embryos. *Toxic. In Vitro* 1993; 6: 743–749.
44. Rosenquist TH, Ratashak SA, Selhub J. Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: Effect of folic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:15227–32.
45. Jakubowski H, Lacinski M, Skorupski W, et al. Homocysteine-thiolactonase activity and *PONI* genotype in coronary artery disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2003; 26 (1): 63.
46. Shih DM, Gu L, Navab M, et al. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature (Lond.)* 1998; 394: 284 – 287.
47. Roberts JT, Caserio MC. *Basic Principals of Organic Chemistry*. New York and Amsterdam: WA. Benjamen, Inc., 1965; 747–58.
48. Streitweisser A, Heathcock CH. *Introduction to Organic Chemistry*. New York: Macmillan Publishing Co., 1985; 756–60.
49. Jakoby WB, Griffith OW. *Methods in Enzimology*. Orlando, FL: Academic Press, 1987; 366 – 76.
50. Jocelyn PC. *The Biochemistry of the SH Group*. London: Academic Press, 1972.
51. Friedman M. *The Chemistry and Biochemistry of the Sulfhydryl Group in Amino Acids, Peptids, and Proteins*. Pergamon Press, 1973.
52. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990; 1; 228–37.
53. Ueland PM, Refsum H, Brattstrom L. *Atreriosclerotic Cardiovascular Disease, Hemostasis and Endothelial Function*. New York: Marcel Decker, 1992; 183–96.
54. Mudd SH, Levy HL, Skovby F. *The Methabolic Basis of Inherited Diseases*. New York: Mc-Grow-Hill, 1989; 693–734.
55. Mudd SH, Pool JR. Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. *Metabolism* 1975; 24: 721–35.
56. Backlund PS, Smith RA. Metionine Synthesis from 5-methylthioadenosine in rat liver. *J Biol Chem* 1981; 256: 1533–35.
57. de la Haba G, Cantoni GL. The enzymatic synthesis from S-adenosyl-L-homocysteine from adenosine and homocysteine. *J Biol Chem* 1959; 234: 603–8.

58. 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.
59. 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.
60. McCully KS. Homocysteine theory of arteriosclerosis: Development and current status. *Atheroscler Rev* 1983; 11: 157–246.
61. 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.
62. Jencks DA, Matthews RG. Allosteric inhibition of methylenetetrahydrofolate reductase by adenosylmethionine. *J Biol Chem* 1987; 262: 2485–93.
63. 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.
64. 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.
65. Finkelstein JD. The regulation of homocysteine metabolism. In: Graham I, Refsum H, Rosenberg IH, Ueland PM, eds. *Homocysteine Metabolism: From Basic Science to Clinical Medicine*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1997; 3–9.
66. 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.
67. Geisel J, Zimbelmann I, Schorr H, Knapp JP, Bodis M, Hubner U and Hermann W. Genetic Defects as Important Factors for Moderate Hyperhomocysteinemia. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 688–704.
68. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics* 1995; 10: 111–3.



69. Kluijtmans Laj, Van den Heuvel LPWJ, Boers GHJ, et al. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 35–41.
70. Mirkovic D, Majkic-Singh N, Ignjatovic S. Homocistein: hemija metabolizam i uloga u patofizioloskim procesima. *Jugoslov Med Biohem* 2003; 22: 127– 140.
71. Mudd SH, Levy HL, Skovby F. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. New York; Mc Graw- Hill, 1989; 693–734.
72. 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.
73. 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.
74. 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.
75. Rima R. *Homocysteine Metabolism: From Basic Science to Clinical Medicine*: Boston: Kluwer Academic Publisher, 1997; 37–42.
76. Soo-Sang K, Edward LP, Myunghee HK, Neal R. *Homocysteine Metabolism From Basic Scienceto Clinical Medicine*. Boston: Kluwer Academic, 1997; 43–9.
77. 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.
78. Guttormsen AB, Schneede J., Fisherstrand T, Ueland PM, Refsum HM. Plasma concentration of homocysteine and other aminothiols compounds are related to food intake in healthy human subjects. *J Nutr* 1994; 124: 1934–41.
79. Guttormsen AB, Mansoor AM, Fiskerstrand T, Ueland PM, Refsum H. Assesment of homocysteine status. *J Inher Metab Dis* 1997; 20: 286–94.
80. Mahalle N, Kulkarni MV, Garg MK, Naik SS. Vitamin B12 deficiency and hyperhomocysteinemia as correlates of cardiovascular risk factors in Indian subjects with coronary artery disease. *J Cardiol*. 2013 Mar 5. doi:pii: S0914-5087(13)00042-7. 10.1016/j.jjcc.2012.11.009. [Epub ahead of print].

81. Spence JD. B vitamin therapy for homocysteine: renal function and vitamin B12 determine cardiovascular outcomes. *Clin Chem Lab Med*. 2013 Mar 1;51(3):633-7.
82. Molina-López J, Molina JM, Chiroso LJ, Florea DI, Sáez L, Planells E. Effect of folic acid supplementation on homocysteine concentration and association with training in handball players. *J Int Soc Sports Nutr*. 2013 Feb 21;10(1):10. [Epub ahead of print].
83. Yamamoto K, Isa Y, Nakagawa T, Hayakawa T. Involvement of 5-methyltetrahydrofolate in the amelioration of hyperhomocysteinemia caused by vitamin b(6) deficiency and L-methionine supplementation.
84. Ng TP, Aung KC, Feng L, Scherer SC, Yap KB. Homocysteine, folate, vitamin B-12, and physical function in older adults: cross-sectional findings from the Singapore Longitudinal Ageing Study. *Am J Clin Nutr*. 2012 Dec;96(6):1362-8.
85. Yamamoto K, Isa Y, Nakagawa T, Hayakawa T. Folic acid fortification ameliorates hyperhomocysteinemia caused by a vitamin B<sub>6</sub>-deficient diet supplemented with L-methionine. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2012;76(10):1861-5.
86. Albers U, Pedrero-Chamizo R, Meléndez A, Pietrzik K, Castillo MJ, González-Gross M. Efficacy of a 28-day oral cyanocobalamin supplementation on vitamin B status in Spanish institutionalized elderly. *Int J Vitam Nutr Res*. 2012 Apr;82(2):104-12.
87. Remacha AF, Sardà MP, Canals C, Queraltó JM, Zapico E, Remacha J, Carrascosa C. Combined cobalamin and iron deficiency anemia: a diagnostic approach using a model based on age and homocysteine assessment. *Ann Hematol*. 2013 Apr;92(4):527-31.
88. Oberley MJ, Yang DT. Laboratory testing for cobalamin deficiency in megaloblastic anemia. *Am J Hematol*. 2013 Feb 20. doi: 10.1002/ajh.23421. [Epub ahead of print].
89. Hou CT, Wu YH, Cheng CH, Huang PN, Huang YC. Higher plasma homocysteine is associated with lower vitamin B6 status in critically ill surgical patients. *Nutr Clin Pract*. 2012 Oct;27(5):695-700.

90. Lamers Y, Coats B, Ralat M, Quinlivan EP, Stacpoole PW, Gregory JF 3rd. Moderate vitamin B-6 restriction does not alter postprandial methionine cycle rates of remethylation, transmethylation, and total transsulfuration but increases the fractional synthesis rate of cystathionine in healthy young men and women. *J Nutr*. 2011 May;141(5):835-42.
91. Picker JD, Levy HL. Homocystinuria Caused by Cystathionine Beta-Synthase Deficiency. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP, editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993.
92. Ye X, Maras JE, Bakun PJ, Tucker KL. Dietary intake of vitamin B-6, plasma pyridoxal 5'-phosphate, and homocysteine in Puerto Rican adults. *J Am Diet Assoc*. 2010 Nov;110(11):1660-8.
93. Waśkiewicz A, Sygnowska E, Broda G. Dietary intake of vitamins B6, B12 and folate in relation to homocysteine serum concentration in the adult Polish population - WOBASZ Project. *Kardiol Pol*. 2010 Mar;68(3):275-82.
94. Foucher C, Brugère L, Ansquer JC. Fenofibrate, homocysteine and renal function. *Curr Vasc Pharmacol*. 2010 Sep;8(5):589-603.
95. Dong Q, Tang G, He M, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with estimated glomerular filtration rate in hypertensive Chinese males. *BMC Med Genet*. 2012 Aug 16;13:74.
96. Marti F, Vollenweider P, Marques-Vidal PM, et al. Hyperhomocysteinemia is independently associated with albuminuria in the population-based CoLaus study. *BMC Public Health*. 2011 Sep 26;11:733.
97. Fung MM, Salem RM, Lipkowitz MS, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism A1298C (Glu429Ala) predicts decline in renal function over time in the African-American Study of Kidney Disease and Hypertension (AASK) Trial and Veterans Affairs Hypertension Cohort (VAHC). *Nephrol Dial Transplant*. 2012 Jan;27(1):197-205.
98. 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.
99. 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.

100. 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.
101. Sahakyan K, Klein BE, Myers CE, Tsai MY, Klein R. Novel risk factors in long-term hypertension incidence in type 1 diabetes mellitus. *Am Heart J*. 2010 Jun;159(6):1074-80.
102. Giannattasio A, Calevo MG, Minniti G, et al. Folic acid, vitamin B12, and homocysteine levels during fasting and after methionine load in patients with Type 1 diabetes mellitus. *J Endocrinol Invest*. 2010 May;33(5):297-9.
103. Molina M, Gonzalez R, Folgado J, et al. Correlation between plasma concentrations of homocysteine and diabetic polyneuropathy evaluated with the Semmes-Weinstein monofilament test in patients with type 2 diabetes mellitus. *Med Clin (Barc)*. 2013 Jan 17. doi:pii: S0025-7753(12)00965-7. 10.1016/j.medcli.2012.09.042. [Epub ahead of print]
104. Ebesunun MO, Obajobi EO. Elevated plasma homocysteine in type 2 diabetes mellitus: a risk factor for cardiovascular diseases. *Pan Afr Med J*. 2012;12:48.
105. Sudchada P, Saokaew S, Sridetch S, Incampa S, Jaiyen S, Khaithong W. Effect of folic acid supplementation on plasma total homocysteine levels and glycemic control in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract*. 2012 Oct;98(1):151-8.
106. Korkmaz S, Yilmaz A, Yildiz G, Kiliçli F, Içağasioğlu S. Relationship between homocysteine and non-dipper pattern in patients with type 2 diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2012 Jul;56(5):285-90.
107. 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.
108. 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.
109. Koblin DD. Toxicity of nitrous oxide. In: Rice SA, Fish KJ. *Anesthetic Toxicity*. Raven Press 1994, 135 – 55.

110. Distrutti E, Mencarelli A, Santucci L, The methionine connection: homocysteine and hydrogen sulfide exert opposite effects on hepatic microcirculation in rats. *Hepatology*. 2008 Feb;47(2):659-67.
111. Sharma M, Rai SK, Tiwari RK, Tiwari M, Chandra R. Effects of nitric oxide modulators on cardiovascular risk factors in mild hyperhomocysteinaemic rat model. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008 Jul;103(1):25-30.
112. Sharma M, Rai SK, Tiwari M, Chandra R. Effect of hyperhomocysteinemia on cardiovascular risk factors and initiation of atherosclerosis in Wistar rats. *Eur J Pharmacol*. 2007 Nov 21;574(1):49-60.
113. Rasmussen K, Moller J. Total homocysteine in clinical practice. *Ann Clin Biochem* 2000; 37: 627–48.
114. 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.
115. Kim MW, Hong SC, Choi JS, Han JY, Oh MJ, Kim HJ, Nava-Ocampo A, Koren G. Homocysteine, folate and pregnancy outcomes. *J Obstet Gynaecol*. 2012 Aug;32(6):520-4.
116. Dhobale M, Chavan P, Kulkarni A, Mehendale S, Pisal H, Joshi S. Reduced folate, increased vitamin B(12) and homocysteine concentrations in women delivering preterm. *Ann Nutr Metab*. 2012;61(1):7-14.
117. Bergen NE, Jaddoe VW, Timmermans S, et al. Homocysteine and folate concentrations in early pregnancy and the risk of adverse pregnancy outcomes: the Generation R Study. *BJOG*. 2012 May;119(6):739-51.
118. Milatovic V, 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.
119. Bochyńska A, Lipczyńska-Łojkowska W, Gugąła-Iwaniuk M, et al. The effect of vitamin B supplementation on homocysteine metabolism and clinical state of patients with chronic epilepsy treated with carbamazepine and valproic acid. *Seizure*. 2012 May;21(4):276-81.
120. Blankenhorn DH, Malinow MR, Mack WJ. Colestipol plus niacin therapy elevates plasma homocysteine levels. *Coron Art Dis* 1991; 2: 357–60.
121. Cylwik B, Chrostek L. Disturbances of folic acid and homocysteine metabolism in alcohol abuse. *Pol Merkur Lekarski*. 2011 Apr;30(178):295-9.

122. Rasmussen K, Moller J. Total homocysteine in clinical practice. *Ann Clin Biochem* 2000; 37: 627–48.
123. Yu C, Zeng F, Luo M, Wu S. A silica nanoparticle-based sensor for selective fluorescent detection of homocysteine via interaction differences between thiols and particle-surface-bound polymers. *Nanotechnology*. 2012 Aug 3;23(30):305503.
124. 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.
125. 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.
126. 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.
127. Probst R, Brtandl R, Blumke M, Neumeier D. Stabilization of homocysteine concentration in whole blood. *Clin Chem* 1998; 44: 1567–9.
128. Lussier-Cacan S, Xhignesse M, Piolot A, Selhub J, Davignon J, Genest Jr J. Plasma total homocysteine in healthy subjects: sex-specific relation with biological traits. *Am J Clin Nutr* 1996; 64: 587-93.
129. Refsum A, Ueland PM: Homocysteine and cardiovascular disease: *Annu Rev Medicine* 1998; 49: 31-62.
130. Djuric D, Jakovljevic V, Rasic-Markovic A, Djuric A and Stanojlovic O. Homocysteine, folic acid and coronary artery disease: possible impact on prognosis and therapy. *Indian J Chest Dis Allied Sci* 2008; 50: 39-48.
131. Alvarez B, Yugueros X, Fernández E, Luccini F, Gené A, Matas M. Relationship between plasma homocysteine and the morphological and immunohistochemical study of carotid plaques in patients with carotid stenosis over 70%. *Ann Vasc Surg*. 2012 May;26(4):500-5.
132. Stampfer MJ. Homocysteine levels and cardiovascular disease. *Am Fam Physician*. 1997 Oct 15;56(6):1568, 1571-2.
133. 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.

134. Smith SC Jr, Collins A, Ferrari R, et al. Our time: a call to save preventable death from cardiovascular disease (heart disease and stroke). *J Am Coll Cardiol*. 2012 Dec 4;60(22):2343-8.
135. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, and Anand S. Global burden of cardiovascular diseases: Part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation* 104: 2746–2753, 2001.
136. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, and Anand S. Global burden of cardiovascular diseases: Part II: variations in cardiovascular disease by specific ethnic groups and geographic regions and prevention strategies. *Circulation* 104: 2855–2864, 2001.
137. Syme SL. Rethinking disease: where do we go from here? *Ann Epidemiol* 6: 463–468, 1996.
138. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, and Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 97: 1837–1847, 1998.
139. Ueland PM, Refsum H, Beresford SA, Vollset SE. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr*. 2000;72(2):324–32.
140. Kaplan ED. Association between homocyst(e)ine levels and risk of vascular events. *Drugs Today*. (Barc) 2003;39(3):175–92.
141. The Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *Jama*. 2002;288(16):2015–22.
142. Ford ES, Smith SJ, Stroup DF, Steinberg KK, Mueller PW, Thacker SB. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a systematic review of the evidence with special emphasis on casecontrol studies and nested case-control studies. *Int J Epidemiol*. 2002;31(1):59–70.
143. Alam N, Khan HI, Chowdhury AW, et al. Elevated serum homocysteine level has a positive correlation with serum cardiac troponin I in patients with acute myocardial infarction. *Bangladesh Med Res Counc Bull*. 2012 Apr;38(1):9-13.
144. Egerton W, Silberberg J, Crooks R, Ray C, Xie L, Dudman N. Serial measures of plasma homocyst(e)ine after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1996;77(9):759–61.
145. Bostom AG, Culleton BF. Hyperhomocysteinaemia in chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10(4):891–900.

146. Hultberg B, Andersson A, Lindgren A. Marginal folate deficiency as a possible cause of hyperhomocystinaemia in stroke patients. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1997;35(1):25–8.
147. Slot O. Homocysteine, a marker of cardiovascular disease risk, is markedly elevated in patients with gout. *Ann Rheum Dis.* 2013 Mar;72(3):457.
148. Bhargava S, Ali A, Manocha A, Kankra M, Das S, Srivastava LM. Homocysteine in occlusive vascular disease: a risk marker or risk factor. *Indian J Biochem Biophys.* 2012 Dec;49(6):414-20.
149. Alvarez B, Yugueros X, Fernández E, Luccini F, Gené A, Matas M. Relationship between plasma homocysteine and the morphological and immunohistochemical study of carotid plaques in patients with carotid stenosis over 70%. *Ann Vasc Surg.* 2012 May;26(4):500-5.
150. Case records of the Massachusetts General Hospital. Marked cerebral symptoms following a limp of three months' duration. *New Engl J Med* 209: 1063–1066, 1933.
151. Mudd SH, Levy HL, et al. Disorders of transsulfuration. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, edited by Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, and Valle D. New York: McGraw-Hill, 1995, pp. 1279–1327.
152. McCully KS and Wilson RB. Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis* 1975; 22: 215–227.
153. Wilcken DEL and Wilcken B. The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. *J Clin Invest* 1976; 57: 1079–1082.
154. Heneghan HM, Sultan S. Homocysteine, the cholesterol of the 21st century. Impact of hyperhomocysteinemia on patency and amputation-free survival after intervention for critical limb ischemia. *J Endovasc Ther.* 2008 Aug;15(4):399-407.
155. Eikelboom JW, Lonn E, Genest J Jr., Hankey G, and Yusuf S. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med* 1999; 131: 363–375.
156. Cai H and Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 2000; 87: 840–844.
157. Schachinger V, Britten MB and Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000;101: 1899–1906.



158. Kanani PM, Sinkey CA, Browning RL, Allaman M, Knapp HR, and Haynes WG. Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans. *Circulation* 1999;100: 1161–1168.
159. Lentz S, Sobey C, Piegors D, Bhopatkar M, Faraci F, and Malinow M. Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 1996; 98: 24–29.
160. Woo KS, Chook P, Lolini YI, Cheung ASP, Chan LT, Sun YY, Sanderson JE, Metreweli C, and Celermajer DS. Hyperhomocysteinemia is a risk factor for arterial endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 1997; 96: 2542–2544.
161. Dayal S, Bottiglieri T, Arning E, Maeda N, Malinow MR, Sigmund CD, Heistad DD, Faraci FM, Lentz SR. Endothelial dysfunction and elevation of S-adenosylhomocysteine in cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Circ Res*. 2001;88:1203–1209.
162. Eberhardt RT, Forgione MA, Cap A, Leopold JA, Rudd MA, Trolliet M, Heydrick S, Stark R, Klings ES, Moldovan NI, Yaghoubi M, Goldschmidt-Clermont PJ, Farber HW, Cohen R, Loscalzo J. Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest*. 2000;106:483–491
163. Tawakol A, Omland T, Gerhard M, Wu JT, Creager MA. Hyperhomocyst(e)inemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation*. 1997;95:1119–1121.
164. Bennett-Richards K, Kattenhorn M, Donald A, Oakley G, Varghese Z, Rees L, Deanfield JE. Does oral folic acid lower total homocysteine levels and improve endothelial function in children with chronic renal failure? *Circulation*. 2002;105:1810–1815.
165. Chambers JC, Ueland PM, Obeid OA, Wrigley J, Refsum H, Kooner JS. Improved vascular endothelial function after oral B vitamins: An effect mediated through reduced concentrations of free plasma homocysteine. *Circulation*. 2000;102:2479–2483.
166. McCully KS. Homocysteine and vascular disease. *Nat Med* 1996; 2: 386–389.
167. Faraci FM and Lentz SR. Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction. *Stroke* 2004; 35: 345–347.

168. Starkebaum G and Harlan JM. Endothelial cell injury due to coppercatalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J. Clin. Invest.* 1986; 77: 1370–1376.
169. Ungvari Z, Csiszar A, Edwards JG, Kaminski PM, Wolin MS, Kaley G and Koller A. Increased superoxide production in coronary arteries in hyperhomocysteinemia: role of tumor necrosis factor-alpha, NAD(P)H oxidase, and inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23: 418–424.
170. Dayal S, Brown KL, Weydert CJ, Oberley LW, Arning E, Bottiglieri T, Faraci FM and Lentz SR. Deficiency of glutathione peroxidase-1 sensitizes hyperhomocysteinemic mice to endothelial dysfunction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22: 1996–2002.
171. Doshi SN, McDowell IFW, Moat SJ, Lang D, Newcombe RG, Kredon MB, Lewis MJ, and Goodfellow J. Folate improves endothelial function in coronary artery disease: an effect mediated by reduction of intracellular superoxide? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1196–1206.
172. Stroes ESG, van Faassen EE, Yo M, Martasek P, Boer P, Govers R, and Rabelink TJ. Folic acid reverts dysfunction of endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res* 2000; 86: 1129–1134.
173. Boger RH, Bode-Boger SM, Sydow K, Heistad DD and Lentz SR. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20: 1557–1564.
174. Boger RH, Lentz SR, Bode-Boger SM, Knapp HR and Haynes WG. Elevation of asymmetric dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans. *Clin. Sci.* 2001; 100: 161–167.
175. Stuhlinger MC, Oka RK, Graf EE, Schmolzer I, Upson BM, Kapoor O, Szuba A, Malinow MR, Wascher TC, Pachinger O and Cooke JP. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2003; 108: 933–938.
176. Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY, Zhou J, Maeda N, Krisans SK, Malinow MR and Austin RC. Homocysteine induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and fatty acid biosynthetic pathways. *J. Clin. Invest.* 2001; 107: 1263–1273.

177. Wang H, Yoshizumi M, Lai KH, Tsai JC, Perrella MA, Haber E and Lee ME. Inhibition of growth and p21(ras) methylation in vascular endothelial cells by homocysteine but not cysteine. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 25380–25385.
178. Newburgh LH & Clarkson S. Production of atherosclerosis in rabbits by diets rich in animal protein. *J. Am. Med. Assoc.* 1922; 79:1106–1108.
179. Meeker D R & Kesten HD. Effect of high protein diets on experimental atherosclerosis of rabbits. *Arch. Pathol.* 1941; 31:147–162.
180. Lofland HB, TB. Clarkson TB, Rhyne L & Goodman HO. Interrelated effects of dietary fats and proteins on atherosclerosis in the pigeon. *J. Atheroscler. Res.* 1966; 6:395–403.
181. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56: 111-28.
182. Toker A, Yerlikaya F, Yener Y, Toy H. Serum homocysteine, arginine, citrulline and asymmetric dimethyl arginine levels, and histopathologic examination of the abdominal aorta in rats exposed to acrylamide. *Biotech Histochem.* 2013 Feb;88(2):103-8.
183. Ma K, Lv S, Liu B, Liu Z, Luo Y, Kong W, Xu Q, Feng J, Wang X. CTLA4-IgG ameliorates homocysteine-accelerated atherosclerosis by inhibiting T-cell overactivation in apoE(-/-) mice. *Cardiovasc Res.* 2013 Feb 1;97(2):349-59.
184. Jiang Y, Zhang H, Sun T, Wang J, Sun W, Gong H, Yang B, Shi Y, Wei J. The comprehensive effects of hyperlipidemia and hyperhomocysteinemia on pathogenesis of atherosclerosis and DNA hypomethylation in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2012 Oct;44(10):866-75.
185. Zhang D, Chen Y, Xie X, Liu J, Wang Q, Kong W, Zhu Y. Homocysteine activates vascular smooth muscle cells by DNA demethylation of platelet-derived growth factor in endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2012 Oct;53(4):487-96.
186. Arzamastsev DD, Karpenko AA, Kostiuhenko GI. Inflammation of the vascular wall and hyperhomocysteinemia in patients with atherosclerosis obliterans of lower limb arteries. *Angiol Sosud Khir.* 2012;18(1):27-30.
187. Liang Y, Yang X, Ma L, Cai X, Wang L, Yang C, Li G, Zhang M, Sun W, Jiang Y. Homocysteine-mediated cholesterol efflux via ABCA1 and ACAT1 DNA methylation in THP-1 monocyte-derived foam cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2013 Mar;45(3):220-8.
188. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 1999; 340: 115–126.

189. Navab M, Berliner JA, Watson AD, et al. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996; 16: 831–842.
190. Spady DK. Reverse cholesterol transport and atherosclerosis regression. *Circulation* 1999; 100: 576–578.
191. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al (1995) A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995; 92: 1355–1374.
192. Lee RT and Libby P. The unstable atheroma. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997; 17: 1859–1867.
193. Kockx MM, De Meyer GR, Muhring J, Bult H, Bultinck J and Herman AG. Distribution of cell replication and apoptosis in atherosclerotic plaques of cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1996; 120: 115–124.
194. Hegyi L, Skepper JN, Cary NR and Mitchinson MJ. Foam cell apoptosis and the development of the lipid core of human atherosclerosis. *J. Pathol.* 1996; 180: 423–442.
195. Hossain GS, van Thienen JV, et al. TDAG51 is induced by homocysteine, promotes detachment-mediated programmed cell death, and contributes to the development of atherosclerosis in hyperhomocysteinemia. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 30317–30327.
196. Zhang C, Cai Y, Adachi MT, Oshiro S, Aso T, Kaufman RJ and Kitajama S. Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 35867–35874.
197. Zhou J, Møller J, Ritskes Hoitinga M, Larsen ML, Austin RC and Falk E. Effects of vitamin supplementation and hyperhomocysteinemia on atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 2003; 168: 255–262.
198. Wang H, Jiang X, Yang F, et al. Hyperhomocysteinemia accelerates atherosclerosis in cystathionine beta-synthase and apolipoprotein E doubleknock-out mice with and without dietary perturbation. *Blood* 2003; 101: 3901–3907.
199. Poddar R, Sivasubramanian N, Dibello PM, Robinson K and Jacobsen D. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circulation* 2001; 103: 2717–2723.

200. Wang G and O K. Homocysteine stimulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 receptor (CCR2) in human monocytes: possible involvement of oxygen free radicals. *Biochem. J.* 2001; 357: 233–240.
201. Zhou J, Werstuck GH, Lhotak S, et al. Association of multiple cellular stress pathways with accelerated atherosclerosis in hyperhomocysteinemic ApoE-deficient mice. *Circulation* 2004 Jul 13;110(2):207-13.
202. Hofmann MA, Lalla E, Lu Y, et al. Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *J. Clin. Invest.* 2001; 107: 675–683.
203. Starkebaum G and Harlan JM. Endothelial cell injury due to coppercatalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J. Clin. Invest.* 1986; 77: 1370–1376.
204. Israelsson B, Brattstrom LE, Hultberg BL. Homocysteine and myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1988; 71: 227–33.
205. Jacobsen DW. Hyperhomocysteinemia and oxidative stress: time for a reality check? *TArterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20: 1182–1184.
206. Zappacosta B, Mordente A, Persichilli S, Minucci A, Carlino P, Martorana GE, Giardina B and De Sole P. Is homocysteine a pro-oxidant? *Free Rad. Res.* 2001; 35: 499–505.
207. Vitvitsky V, Mosharov E, Tritt M, Ataulakhanov F and Banerjee R. Redox regulation of homocysteine-dependent glutathione synthesis. *Redox Rep.* 2003; 8: 57–63.
208. Mosharov E, Cranford MR and Banerjee R. The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry* 2000; 39: 13005–13011.
209. Lang D, Kredan MB, Moat SJ, Hussain SA, Powell CA, Bellamy MF, Powers HJ and Lewis MJ. Homocysteine-induced inhibition of endotheliumdependent relaxation in rabbit aorta: role for superoxide anions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20: 422–427.
210. Duan J, Murohara T, Ikeda H, Sasaki K, Shintani S, Akita T, Shimada T and Imaizumi T. Hyperhomocysteinemia impairs angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20: 2579–2585.
211. Heinecke JW, Rosen H, Suzuki LA and Chait A (1987) The role of sulfurcontaining amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 1987; 262:

10098–10103.

212. Outinen PA, Sood SK, Pfeifer SI, Pamidi S, Podor TJ, Li J, Weitz JI and Austin RC. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood* 1999; 94: 959–967.
213. Weiss N, Zhang YY, Heydrick S, Bierl C and Loscalzo J. Overexpression of cellular glutathione peroxidase rescues homocyst(e)ine-induced endothelial dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 12503–12508.
214. Juan SH, Lee TS, Tseng KW, Liou JY, Shyue SK, Wu KK and Chau LY. Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer inhibits the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2001; 104: 1519–1525.
215. Kokame K, Agarwala KL, Kato H and Miyata T. Herp, a new ubiquitinlike membrane protein induced by endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 32846–32853.
216. Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, et al. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and fatty acid biosynthetic pathways. *J. Clin. Invest.* 2001; 107: 1263–1273.
217. Zinszner H, Kuroda M, Wang XZ, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL and Ron D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 1998; 12: 982–995.
218. Hossain GS, van Thienen JV, Werstuck GH, et al. TDAG51 is induced by homocysteine, promotes detachment-mediated programmed cell death, and contributes to the development of atherosclerosis in hyperhomocysteinemia. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 30317–30327.
219. Zhang C, Cai Y, Adachi MT, Oshiro S, Aso T, Kaufman RJ and Kitajama S. Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 35867–35874.
220. Huang RFS, Huang SM, Lin BS, Wei JS and Liu T-Z. Homocysteine thiolactone induces apoptotic DNA damage mediated by increased intracellular hydrogen peroxide and caspase 3 activation in HL-60 cells. *Life Sci.* 2001; 68: 2799–2811.

221. Boot MJ, Steegers-Theunissen RPM, Poelmann RE, van Iperen L and Gittenberger-de Groot AC. Homocysteine induces endothelial cell detachment and vessel wall thickening during chick embryonic development. *Circ. Res.* 2004; 94: 542–549.
222. Di Simone N, Maggiano N, Caliandro D, Riccardi P, Evangelista A, Carducci B and Caruso A. Homocysteine induces trophoblast cell death with apoptotic features. *Biol. Reprod.* 2003; 69: 1129–1134.
223. Ziegler DM. Role of reversible oxidation-reduction of enzyme hiois-disulfides in metabolic regulation. *Annu Rev Biochem* 1985; 54: 305–29.
224. Hajjar KA. Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor. *J Clin Invest* 1993; 91: 2873–9.
225. Rodgers GM. Hemostatic properties of normal and perturbed vascular cells. *FASEB J* 1988; 2: 116–23.
226. Rodgers GM, Kane WH. Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. *J Clin Invest* 1986; 77: 1909–16.
227. Nishinaga M, Ozawa T, Shimada K. Homocysteine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Clin Invest* 1993; 92: 1381–6.
228. Palareti G, Salardi S, Piazzzi S *et al.* Blood coagulation changes in homocystinuria: effects of pyridoxine and other specific therapy. *J Pediatr* 1986; 109: 1001–6.
229. Rodgers GM, Conn MT. Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood* 1990; 75: 895–901.
230. Hayashi T, Honda G, Suzuki K. An atherogenic stimulus homocysteine inhibits cofactor activity of thrombomodulin and enhances thrombomodulin expression in human umbilical vein endothelial cells. *Blood* 1992; 79: 2930–6.
231. Lentz SR, Sobey CG, Piegors DJ *et al.* Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 1996; 98: 24–9.
232. Hajjar KA. Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor. *J Clin Invest* 1993; 91: 2873–9.

233. Harpel PC, Chang VT, Borth W. Homocysteine and other sulfhydryl compounds enhance the binding of lipoprotein(a) to fibrin: a potential biochemical link between thrombosis, atherogenesis, and sulfhydryl compound metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10193–7.
234. Harpel PC, Zhang X, Borth W. Homocysteine and hemostasis: pathogenic mechanisms predisposing to thrombosis. *J Nutr* 1996; 126 (4 Suppl): 1285S–9S.
235. Panganamala RV, Karpen CW, Merola AJ. Peroxide mediated effects of homocysteine on arterial prostacyclin synthesis. *Prostaglandins Leukotrienes & Medicine* 1986; 22: 349–56.
236. Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O *et al.* Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest* 1993; 91: 308–18.
237. Nappo F, De Rosa N, Marfella R *et al.* Impairment of endothelial functions by acute hyperhomocysteinemia and reversal by antioxidant vitamins. *JAMA* 1999; 281: 2113–18.
238. Harker LA, Ross R, Slichter SJ, Scott CR. Homocysteine-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest* 1976; 58: 731–41.
239. Hill-Zobel RL, Pyeritz RE, Scheffel U *et al.* Kinetics and distribution of <sup>111</sup>Indium-labeled platelets in patients with homocystinuria. *N Engl J Med* 1982; 307: 781–6.
240. McDonald L, Bray C, Field C, Love F, Davies B. Homocystinuria, thrombosis and the blood platelets. *Lancet* 1964; i:745–6.
241. Di Minno G, Davi G, Margaglione M *et al.* Abnormally high thromboxane biosynthesis in homozygous homocystinuria. Evidence for platelet involvement and probucol-sensitive mechanism. *J Clin Invest* 1993; 92: 1400–6.
242. Graeber JE, Slott JH, Ulane RE, Schulman JD, Stuart MJ. Effect of homocysteine and homocystine on platelet and vascular arachidonic acid metabolism. *Pediatr Res* 1982; 16: 490–3.
243. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362 (6423): 801–9.
244. Tyagi SC. Homocysteine redox receptor and regulation of extracellular matrix components in vascular cells. *Am J Physiol* 1998; 274 (2 Pt 1): C396–405.



245. Tsai JC, Wang H, Perrella MA *et al.* Induction of cyclin A gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1996; 97: 146–53.
246. Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994; 79: 551–5.
247. Lubec B, Labudova O, Hoeger H *et al.* Homocysteine increases cyclin-dependent kinase in aortic rat tissue. *Circulation* 1996; 94: 2620–5.
248. Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M *et al.* Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6369–73.
249. Graeme J Hankey, John W Eikelboom. Homocysteine and vascular disease. *The Lancet* 1999; 354: 407–13.
250. Kang SS, Wong PW, Malinow MR. Hyperhomocysteinemia as risk factor for occlusive vascular disease. *Annu Rev Nutr* 1992; 43: 1279–98.
251. Pietrzik K, Bronstrup A. Causes and consequences of hyperhomocysteinemia. *Int J vitam Nutr Res* 1997; 67: 389–95.
252. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998; 49: 31–62.
253. 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.
254. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 1999; 354: 407–13.
255. 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.
256. Jakubowski H. The molecular basis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease. *Clin Chem Lab Med*, 2007; 45: 1704-1716.
257. Chwatko G, Boers GH, Strauss KA, Shih DM, Jakubowski H. Mutations in methylenetetrahydrofolate reductase or cystathionine beta-synthase gene, or a highmethionine diet, increase homocysteine thiolactone levels in humans and mice. *FASEB J* 2007; 21: 1707-1713.
258. Kerkeni M, Tnani M, Chuniaud L, Miled A, Maaroufi K, Trivin F. Comparative study on in vitro effects of homocysteine thiolactone and homocysteine on HUVEC cells: evidence for a stronger proapoptotic and proinflammatory homocysteine thiolactone. *Mol Cell Biochem* 2006; 291: 119-

126.

259. Kamudhamas A, Pang L, Smith SD, Sadovsky Y, Nelson DM. Homocysteine thiolactone induces apoptosis in cultured human trophoblasts: a mechanism for homocysteine-mediated placental dysfunction? *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191: 563-571.
260. Roybal CN, Yang S, Sun CW, *et al.* Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4. *J Biol Chem* 2004; 279: 14844-14852.
261. Jakubowski H. Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *FASEB J* 1999; 13: 2277-2283.
262. Perla-Kajan J, Stanger O, Luczak M, *et al.* Immunohistochemical detection of Nhomocysteinylation of proteins in humans and mice. *Biomed Pharmacother* 2008; 62: 473-479.
263. Jakubowski H. Anti-N-homocysteinylation protein autoantibodies and cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 1011-1014.
264. Bogdanski P, Pupek-Musialik D, Dytfeld J, Lacinski M, Jablecka A, Jakubowski H. Plasma homocysteine is a determinant of tissue necrosis factor- $\alpha$  in hypertensive patients. *Biomed Pharmacother* 2008; 62: 360-365.
265. Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 456S-460S.
266. Endo N, Nishiyama K, Otsuka A, Kanouchi H, Taga M, Oka T. Antioxidant activity of vitamin B6 delays homocysteine-induced atherosclerosis in rats. *Br J Nutr* 2006; 95: 1088-1093.
267. Jakubowski H, Boers GH, Strauss KA. Mutations in cystathionine beta-synthase or methylenetetrahydrofolate reductase gene increase N-homocysteinylation of protein levels in humans. *FASEB J* 2008; 22: 4071-4076.
268. Jakubowski H. New method for the determination of protein N-linked homocysteine. *Anal Biochem* 2008; 380: 257-261.
269. Ferretti G, Bacchetti T, Moroni C, Vignini A, Nanetti L, Curatola G. Effect of homocysteinylation of low density lipoproteins on lipid peroxidation of human endothelial cells. *J Cell Biochem* 2004; 92: 351-360.
270. Undas A, Brozek J, Jankowski M, Siudak Z, Szczeklik A, Jakubowski H. Plasma homocysteine affects fibrin clot permeability and resistance to lysis in human subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1397-1404.

271. Sauls DL, Lockhart E, Warren ME, Lenkowski A, Wilhelm SE, Hoffman M. Modification of fibrinogen by homocysteine thiolactone increases resistance to fibrinolysis: a potential mechanism of the thrombotic tendency in hyperhomocysteinemia. *Biochemistry* 2006 28; 45: 2480-2487.
272. Undas A, Jankowski M, Twardowska M, Padjas A, Jakubowski H, Szczeklik A. Antibodies to N-homocysteinylation albumin as a marker for early-onset coronary artery disease in men. *Thromb Haemost* 2005; 93: 346-350.
273. Undas A, Stepień E, Glowacki R, Tisonczyk J, Tracz W, Jakubowski H. Folic acid administration and antibodies against homocysteinylation proteins in subjects with hyperhomocysteinemia. *Thromb Haemost* 2006; 96: 342-347.
274. Bona KH, Njolstad I, Ueland PM, *et al.* Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 354: 1578-1588.
275. Aparna P, Betigeri AM, Pasupathi P. Homocysteine and oxidative stress markers and inflammation in patients with coronary artery disease. *Int J Biol Med Res.* 2010; 1(4): 125-129.
276. Lominadze D, Roberts AM, Tyagi N, Moshal KS, Tyagi SC. Homocysteine causes cerebrovascular leakage in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 290(3):H1206–13.
277. Moshal KS, Camel CK, Kartha GK, *et al.* Cardiac dys-synchronization and arrhythmia in hyperhomocysteinemia. *Curr Neurovasc Res.* 2007 Nov;4(4):289-94.
278. Joseph J, Joseph L. Hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease: New mechanisms beyond atherothrombosis. *Metabolic Syndrome and Related Disorders.* 2003; 1:97–104.
279. Joseph J, Joseph L, Shekhawat N, Devi S, Wang J, Melchert R, *et al.* Hyperhomocysteinemia leads to pathologic ventricular hypertrophy in normotensive rats. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology.* 2003; 285(2):H679–H686.
280. Walker E, Black J, Parris C, Bryda EC, Cansino S, Hunt L, *et al.* Effect of experimental hyperhomocysteinemia on cardiac structure and function in the rat. *Ann Clin Lab Science.* 2004; 34:175–180.
281. Joseph J, Handy DE, Loscalzo J. Quo vadis: whither homocysteine research? *Cardiovasc Toxicol.* 2009 Jun;9(2):53-63.

282. Devi S, Kennedy RH, Joseph L, Shekhawat NS, Joseph J. Effect of long-term hyperhomocysteinemia on myocardial structure and function in hypertensive rats. *Cardiovascular Pathology*. 2006;
283. Vasani RS, Beiser A, D'Agostino RB, Levy D, Selhub J, Jacques PF, et al. Plasma homocysteine and risk for congestive heart failure in adults without prior myocardial infarction. *Journal of the American Medical Association*. 2003; 289:1251–1257.
284. Joseph J, Pencina MJ, Wang TJ, et al. Cross-sectional relations of multiple biomarkers representing distinct biological pathways to plasma markers of collagen metabolism in the community. *J Hypertens*. 2009 Jun;27(6):1317-24.
285. Woessner, JF, Jr. The matrix metalloproteinase family. In: Park, WC.; Mecham, RP., editors. *Matrix Metalloproteinase*. San Diego, Calif: Academic Press; 1998. p. 1-13.
286. Tyagi SC, Smiley LM, Majumdar VS, Clonts B, Parker JL. Reduction-oxidation (redox) and vascular tissue level of homocyst(e)ine in human coronary atherosclerotic lesions and role in vascular extracellular matrix remodeling and vascular tone. *Mol Cell Biochem*. 1998; 181:107–116.
287. Miller A, Majumdar V, Palmer L, Bower JD, Tyagi SC. Reversal of endocardial endothelial dysfunction by folic acid in homocysteinemic hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 2002; 15:157–163.
288. Majumdar VS, Hayden MR, Tyagi SC. Homocysteine induces calcium second messenger in vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol*. 2000; 183:28–36.
289. Wang KK, Yuen PW. Calpain inhibition: an overview of its therapeutics potential. *Trend Pharmacol Sci*. 1994; 15:412–419.
290. Popp O, Heidinger M, Heinrich RL, Ries C, Jochum M, Parrado SG. The Calpastatin-Derived Calpain Inhibitor CP1B Reduces mRNA Expression of Matrix Metalloproteinase-2 and -9 and Invasion by Leukemic THP-1 Cells. *Biol Chem*. 2003; 384:951–958.
291. Xu J, Cui G, Esmailian F, Plunkett M, Marelli D, Ardehali A, Odum J, Liu H, Sen L. Atrial ECM remodeling and maintenance of atrial fibrillation. *Circulation*. 2004; 109(3):363–368.
292. Hunt MJ, Aru GM, Hayden MR, Moore CK, Hoit BD, Tyagi SC. Induction of oxidative stress and disintegrin metalloproteinases in human heart end stage failure. *Am J Physiol*. 2002; 283(2):L239–245.

293. Tyagi N, Sedoris KC, Moshal KS, Ovechkin AV, Tyagi SC. Mechanism of homocysteine-induced oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 289(6):H2649–H2656.
294. Mohan RM, Golding S, Paterson DJ. Intermittent hypoxia modulates nNOS expression and heart rate in response to sympathetic nerve stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 281(1):H132–138.
295. Breukelman S, Mulder EJ, van Oord R, Jonker H, van der Weijden BC, Taverne MA. Continuous fetal heart rate monitoring during late gestation in cattle by means of Doppler ultrasonography: reference values obtained by computer-assisted analysis. *Theriogenology.* 2006; 65(3):486–98.
296. Huang CF, Su MJ. Positive inotropic action of NMDA receptor antagonist (+)-MK801 in rat heart. *J Biomed Sci.* 1999; 6(6):387–98.
297. Di Micco J, Monroe AJ. Stimulation of metabotropic glutamate receptors in the dorsomedial hypothalamus elevates heart rate in rats. *Am J Physiol.* 1996; 270:R1115–21.
298. 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.
299. 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.
300. Wang R (ed). *Signal Transduction and the Gasotransmitters: NO, CO and H<sub>2</sub>S in Biology and Medicine.* 2004, Humana Press, New Jersey, USA.
301. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373–376.
302. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br. J. Pharmacol* 2006;147:S193–S201.
303. 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.
304. Brecht DS. Nitric oxide signaling specificity—the heart of the problem. *J. Cell Sci* 2003;116:9–15.
305. Knowles, R. G.; Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *The Biochemical journal.* 298 ( Pt 2) (Pt 2): 249–258.

306. 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.
307. 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.
308. Ignarro L.J. (2001): Nitric Oxide. A Novel Signal Transduction Mechanism For Transcellular Communication; 16: 477- 483.
309. 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.
310. Groneberg D, König P, Lies B, et al. Cell-Specific Deletion of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Reveals a Dual Pathway for Nitrenergic 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].
311. 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.
312. Moncada S, Erusalimsky JD. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2002;3:214–220.
313. 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.
314. 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.
315. 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.
316. 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.

317. Stroissnigg H, Trancíková A, Descovich L, et al. *S*-Nitrosylation of microtubule-associated protein 1B mediates nitric-oxide-induced axon retraction. *Nat. Cell Biol* 2007; 9:1035–1045.
318. 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.
319. Yoshida T, Inoue R, Morii T, et al. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine *S*-Nitrosylation. *Nat. Chem. Biol* 2006;2:596–607.
320. Kim SF, Huri DA, Snyder SH. Inducible nitric oxide synthase binds, *S*-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2. *Science* 2005;310:1966–1970.
321. Blumenthal Ivan (2001). Carbon monoxide poisoning. *J R Soc Med (The Royal Society of Medicine)* 94 (6): 270–272.
322. Verma A, Hirsch D, Glatt C, Ronnett G, Snyder S. Carbon monoxide: A putative neural messenger. *Science* 1993; 259 (5093): 381–4.
323. 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.
324. 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.
325. Chin BY, Jiang G, Wegiel B, et al. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  stabilization by carbon monoxide results in cytoprotective preconditioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2007;104:5109–5114.
326. Boehning D, Sedaghat L, Sedlak TW, Snyder SH. Heme oxygenase-2 is activated by calcium-calmodulin. *J. Biol. Chem* 2004;279:30927–30930.
327. Boehning D, Moon C, Sharma S, et al. Carbon monoxide neurotransmission activated by CK2 phosphorylation of heme oxygenase-2. *Neuron* 2003;40:129–137.
328. 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.
329. Boehning D, Snyder SH. Novel neural modulators. *Annu. Rev. Neurosci* 2003;26:105–131.

330. 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.
331. 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.
332. 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.
333. Reinking J, Lam MM, Pardee K, et al. The *Drosophila* nuclear receptor E75 contains heme and is gas responsive. *Cell* 2005;122:195–207.
334. Dioum EM, Rutter J, Tuckerman JR, Gonzalez G, Gilles-Gonzalez MA, McKnight SL. NPAS2: A gas-responsive transcription factor. *Science* 2002; 298:2385–2387.
335. 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.
336. Kabil O, Banerjee R. Redox biochemistry of hydrogen sulfide. *J Biol Chem* 2010; 285: 21903-21907.
337. Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, et al. H<sub>2</sub>S as a Physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science* 2008; 322: 587-590.
338. 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.
339. Łowicka E, Bełtowski J. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) - the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacol Rep* 2007; 59: 4-24.
340. 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.
341. Wang R. Two's company, three's a crowd: Can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J* 2002;16:1792–1798.
342. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous K<sub>ATP</sub> channel opener. *EMBO J* 2001;20:6008–6016.
343. Mustafa AK, Gadalla MM, Snyder SH. Signaling by gasotransmitters. *Sci Signal.* 2009 Apr 28;2(68):re2.



344. 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.
345. Ingi T, Cheng J, Ronnett GV. Carbon monoxide: an endogenous modulator of the nitric oxide-cyclic GMP signalling system. *Neuron* 1996;6:835–842.
346. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:517–554.
347. 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.
348. 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.
349. 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.
350. 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.
351. Zhao W, Wang R. H<sub>2</sub>S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H474–H480.
352. 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.
353. 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.
354. 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.

355. Antoniades C, Antonopoulos A S, Bendall J K, Channon K M. Targeting redox signaling in the vascular wall: from basic science to clinical practice. *Curr Pharm Des.* 2009;15 (3 ):329–42.
356. Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012: 936486.
357. Jakovljević VLj, Mujović VM, Novokmet SS, Miloradović M, Djurić DM. Different effects of specific phosphodiesterase inhibitors on oxidative stress during coronary autoregulation in isolated rat heart. In: *Advances in Recent Cardiovascular Research.* A. Varro, A. Vegh (eds), Monduzzi Editore, Bologna, pp. 101-106, 2002.
358. Halliwell B. Antioxidant defense mechanisms: from the beginning to the end. *Free Rad Res* 1999; 31: 261-72
359. Zikic RV, Stajn AS, Saicic YS, Spasic MB, Milovanovic SR. Toksikoloski znacaj zastite od oksidacionih ostecenja, 2000, PMF Kragujevac ed: M.Petrovic pp.1-139
360. Lelli JL, Becks LL, Dabrowska MI, Hinshaw DB : ATP converts necrosis to apoptosis in oxidant injured endothelial cells. *Free Rad.Biol. med.*25: 694-702, 1998.
361. Finkel T. Oxidative signals and oxidative stress.*Curr. Opin. Cell.Biol.* 2003., 15: 247-54
362. Finkel T. Redox dependent signal transduction. *FEBS letters* 2000., 476,52-4.
363. Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG.Hydrogen peroxide: A metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nature Reviews Mol Cell Biol,* 2007 ; 8 :722-8.
364. Macip S, Kosoy A, Lee SW, O'Connell MJ, Aaronson SA. Oxidative induces a prolonged but reversible arrest in p 53-null cancer cells involving a Chk-1 dependent G2 checkpoint. *Oncogene* 2006;25:6037-47.
365. Duvoix A, Delhalle S, Blasius R, Schnekenburger M, Morceau F, Fougere M et al. Effect of chemopreventive agents on glutathione S-transferase P 1-1 gene expression mechanism via activating protein 1 and nuclear factor kappa B inhibition. *Biochem Pharmacol* 2004 Sep 15;68(6):1101-11.

366. Mohr A, Buneker C, Gough RP, Zwacka RM. MnSOD protects colorectal cancer cells from TRAIL-induced apoptosis by inhibition of Smac/DIABLO release. *Oncogene* 2008;27: 763-74.
367. Hitchler MJ, Domann FE. An epigenetic perspective on the free radical theory of development. *Free Rad Biol Med* 2007; 43 (7):1023-36.
368. Dale-Donna I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006;52(4):1-23.
369. Ferreira AR, Bonatto F, Pasquali MA, Poludor M, et al. Oxidative stress effects on the central nervous system of rats after acute exposure to ultra-high frequency electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics* 2006; 27: 487-493.
370. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York 1999.
371. Nelson DL and Cox M.M. *Lehninger principles of biochemistry*, NY: W.H. Freeman and Company 2008; 5: 720-1.
372. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci.* 2000;25(10):502-8.
373. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*, New York: Oxford University Press, 1985, p.p. 1-20.
374. Chen AF, Chen DD, Daiber A, et al. Free radical biology of the cardiovascular system. *Clin Sci (Lond)*. 2012 Jul;123(2):73-91.
375. Petkau A. Scientific basis for the clinical use of superoxide dismutases. *Cancer Treatment* 1985;13:17-44.
376. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002 Jan;82(1):47-95. Review.
377. Kvam E, Tyrrell RM. Artificial background induced levels of oxidative base damage in DNA from human cells, Short communication, *Carcinogenesis* 1997; 18(11): 2281-2283,.
378. Santos NAG, Catao Beyera CS, Martins NM, Curti C. Hydroxyl radical scavenger ameliorates cisplatin induced nephrotoxicity by preventing oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetics metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Cancer Chemoter Pharmacol* 2008;61:145-55.
379. Ten Kate M, van der Wal JBC, Cluiter W. The role of superoxide anions in the development of tumor recurrence. *Br J Cancer* 2006;95:1497-1503.

380. Novo E, Marra F et al. Dose dependent and divergent effects of superoxide anions on cell death proliferation and migration of activated human hepatic stellate cells. *Gut* 2006;55:90-7.
381. Singh A: Introduction: Interconversion of singlet oxygen and related species. *Photochem. Photobiol.* 1978;28:429-433.
382. Đorđević, V. B., Pavlović, D. D. and Kocić, G. M. (2000). Karakteristike slobodnih radikala. In: *Biohemija slobodnih radikala* (Đorđević, V. B., Pavlović, D. D. and Kocić, G. M., ec.). Tehnofarm d.o.o., Beograd, pp. 7-69.
383. Antunes F, Salvador A, Marinho HS, Alves R, Pinto RE. Lipid peroxidation in mitochondrial inner membranes. I. An integrative kinetic model. *Free Radic Biol Med.* 1996;21(7):917-43.
384. Jacob C, Winyard PG. Redox signaling and regulation in biology and medicine. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co; 2009; p. 13-40.
385. Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1985 Dec 17;311(1152):617-31.
386. Rhee SG, Kang SW, Jeong W, Chang TS, Yang KS, Woo HA. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr Opin Cell Biol.* 2005;17(2):183-9. Review.
387. Lo YY, Wong JM, Cruz TF. Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases. *J Biol Chem.* 1996 28;271(26):15703-7.
388. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
389. Shanse B, Sies H, and Boveric A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605.
390. Cheng FC, Jen JF, Tsai TH. Hydroxyl radical in living systems and its separation methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002 Dec 5;781(1-2):481-96.
391. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann Rev Biochem* 1989; 58: 79-110.
392. Haber F, Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society* 1934; 147: 332-51.

393. Steinbeck MJ, Khan AU and Kapnovsky MJ - Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *J Biol Chem* 1992; 267 (19): 13425-13433.
394. Scott G. Antioxidants the modern elixir. *Chem Britain* 1995; 31: 879-882.
395. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338 (1): 668-676.
396. Morrow JD, Minton TA, Roberts LJ 2nd. The F<sub>2</sub>-isoprostane, 8-epi-prostaglandin F<sub>2</sub> alpha, a potent agonist of the vascular thromboxane/endoperoxide receptor, is a platelet thromboxane/endoperoxide receptor antagonist. *Prostaglandins* 1992; 44 (2): 155-163.
397. Sevanian A, Davies KJA, Hochstein P. Serum albumin as an antioxidant for ascorbic acid. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 1129S-34S.
398. Ceaser EK, Moelleping DR, Shiva S, et al. Mechanisms of signal transduction mediated by oxidized lipids: the role of the electrophile-responsive proteome. *Biochem Soc Trans* 2004; 32 (Pt): 151-155.
399. Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol Aspects Med.* 1998;19(4-5):221-357.
400. 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 Dec;84(24):9265-9.
401. Liu SJ, Shen HX, Feng JX, Tubino M. Flow injection analysis of nitrogen dioxide using a galvanic detector. *J Automat Chem.* 1998;20(1):17-21.
402. Hu C, Noll BC, Schulz CE, Scheidt WR. Four-coordinate iron(II) porphyrins: electronic configuration change by intermolecular interaction. *Inorg Chem.* 2007 Feb 5;46(3):619-21.
403. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996 Nov;271(5 Pt 1):C1424-37.
404. Stamler JS, Hausladen A. Oxidative modifications in nitrosative stress. *Nat Struct Biol.* 1998 Apr;5(4):247-9.
405. Mayer B, Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci.* 1997;22(12):477-81.
406. Moncada S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Med.* 1999 Apr;92(4):164-9.

407. Hanson KM, Clegg RM. Two-photon fluorescence imaging and reactive oxygen species detection within the epidermis. *Methods Mol Biol.* 2005;289:413-22.
408. Cotgreave IA, Moldéus P, Orrenius S. Host biochemical defense mechanisms against prooxidants. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1988;28:189-212.
409. Halliwell B. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS Letters* 2003; 540 (1-3): 3-6.
410. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidants compounds in biological systems. Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutrit Biochem* 2005; 16: 577-586.
411. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004; 266 (1-2): 37-56.
412. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995; 64:97-112.
413. Margaritis I, Palazzetti S, Rousseau AS, Richard MJ, Favier A. Antioxidant supplementation and tapering exercise improve exercise-induced antioxidant response. *J Am Coll Nutr* 2003; 22(2): 147-56
414. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures, *Physiol Rev*, 1998; 78: 547-81
415. Fridovich I. Superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 1997; 272(30): 18515-7
416. Chow CK. Vitamin E and oxidative success. *Free Radical Biology and Medicine* 1991; 11: 215-32
417. Yadav A, Mishra PC. Modeling the activity of glutathione as a hydroxyl radical scavenger considering its neutral non-zwitterionic form. *J Mol Model.* 2013 Feb;19(2):767-77.
418. Gutteridge JM, Smith A. Antioxidant protection by heamopexin of heam-stimulated lipid peroxidation. *Biochem J* 1988; 256: 861-85.
419. Perveen S, Patel H, Arif A, Younis S, Codipilly CN, Ahmed M. Role of EC-SOD overexpression in preserving pulmonary angiogenesis inhibited by oxidative stress. *PLoS One.* 2012;7(12):e51945.

420. Salomone F, Volti GL, Rosso C, Grosso G, Bugianesi E. Unconjugated Bilirubin, A Potent Endogenous Antioxidant, is Decreased in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis and Advanced Fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013 Feb 21. doi: 10.1111/jgh.12155. [Epub ahead of print].
421. 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.
422. Willis D. Expression and modulatory effects of heme oxygenase in acute inflammation in the rat. *Inflamm Res* 1995;44:S218–S220.
423. 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.
424. 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.
425. 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.
426. 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.
427. 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.
428. 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.
429. Motterlini R, Green CJ, Foresti R. Regulation of heme oxygenase-1 by redox signals involving nitric oxide. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:615–624.
430. Nausier 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.
431. 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.

432. 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.
433. 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.
434. 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.
435. 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.* 2013 Jun 11. [Epub ahead of print]
436. Kimura Y, Kimura H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress, *FASEB J.* 2004; 18: 1165–1167.
437. 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.
438. 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 Oct 26;101(9):919-27.
439. Taegtmeyer, H: One hundred years ago: Oscar Langendorff and the birth of cardiac metabolism, *Can J Cardiol.* Dec. 1995; 11(11): pp. 1030-5.
440. Zimmer, H: *The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers*, *News Physiol Sci* 13: pp. 1998; 203-210.
441. Bargiggia GS, Bertucci C, Recusani F, et al. A new method for estimating left ventricular dp/dt by continuous wave Doppler-echocardiography. Validation studies at cardiac catheterization. *Circulation.* 1989 Nov;80(5):1287-92.
442. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95:351–358.
443. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15 N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 26:131–138.



444. Kostić MM, Petronijević MR, Jakovljević VL. Role of nitric oxide (NO) in the regulation of coronary circulation. *Physiol Res*. 1996; 45(4):273-8.
445. Jakovljević VLj, Mujović VM, Novokmet SS, Miloradović M, Djurić DM. Different effects of specific phosphodiesterase inhibitors on oxidative stress during coronary autoregulation in isolated rat heart. In: *Advances in Recent Cardiovascular Research*. A. Varro, A. Vegh (eds), Monduzzi Editore, Bologna, pp. 2002; 101-106.
446. Auclair C, Voisin E (1985). Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press Une, Boca Raton, pp 123–132.
447. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980; 38:161–170.
448. Veeranna V, Zalawadiya SK, Niraj A, et al. Homocysteine and reclassification of cardiovascular disease risk. *J Am Coll Cardiol* 2011, 58:1025–1033.
449. Mangoni AA, Zinellu A, Carru C, Attia JR, McEvoy M. Serum thiols and cardiovascular risk scores: a combined assessment of transsulfuration pathway components and substrate/product ratios. *J Transl Med*. 2013 Apr 15;11(1):99.
450. Ahluwalia N, Blacher J, Szabo de Edelenyi F, et al. Prognostic value of multiple emerging biomarkers in cardiovascular risk prediction in patients with stable cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2013 Mar 26. doi:pil: S0021-9150(13)00193-7. 10.1016/j.atherosclerosis.2013.03.017. [Epub ahead of print].
451. Delles C. Homocysteine and the very elderly: is there a message for cardiovascular risk? *J Hypertens*. 2013 May;31(5):874-6.
452. Leung SB, Zhang H, Lau CW, Huang Y, Lin Z. Salidroside improves homocysteine-induced endothelial dysfunction by reducing oxidative stress. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:679635. doi: 10.1155/2013/679635. Epub 2013 Mar 26.
453. Norsidah KZ, Asmadi AY, Azizi A, Faizah O, Kamisah Y. Palm tocotrienol-rich fraction improves vascular proatherosclerotic changes in hyperhomocysteinemic rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:976967. doi: 10.1155/2013/976967. Epub 2013 Mar 20.

454. Omae T, Nagaoka T, Tanano I, Yoshida A. Homocysteine Inhibition of Endothelium-Dependent Nitric Oxide-Mediated Dilation of Porcine Retinal Arterioles via Enhanced Superoxide Production. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 Mar 28;54(3):2288-95.
455. Cortés MP, Becerra JP, Vinet R, Alvarez R, Quintana I. Inhibition of ATP-induced calcium influx by homocysteine in human umbilical vein endothelial cells. *Cell Biol Int*. 2013 Feb 21. doi: 10.1002/cbin.10077. [Epub ahead of print].
456. Feng C, Bai X, Xu Y, Hua T, Huang J, Liu XY. Hyperhomocysteinemia associates with small vessel disease more closely than large vessel disease. Norsidah KZ, Asmadi AY, Azizi A, Faizah O, Kamisah Y. *Int J Med Sci*. 2013;10(4):408-12.
457. van Dijk SC, Smulders YM, Enneman AW, et al. Homocysteine level is associated with aortic stiffness in elderly: cross-sectional results from the B-PROOF study. *J Hypertens*. 2013 May;31(5):952-959.
458. Nilsson K, Gustafson L, Hultberg B. Elevated plasma homocysteine level in vascular dementia reflects the vascular disease process. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*. 2013 Jan;3(1):16-24.
459. Alsulaimani S, Gardener H, Elkind MS, et al. Elevated homocysteine and carotid plaque area and densitometry in the Northern Manhattan Study. *Stroke*. 2013 Feb;44(2):457-61.
460. de Roest GJ, Allaart CP, Kleijn SA, et al. Prediction of long-term outcome of cardiac resynchronization therapy by acute pressure–volume loop measurements. *Eur J Heart Fail* (2013) 15 (3): 299-307.
461. Ventura P, Panini R, Verlato C, Scarpetta G, Salvioli G. Hyperhomocysteinemia and related factors in 600 hospitalized elderly subjects. *Metabolism* 2001;50:1466–71.
462. Cesari M, Zanchetta M, Burlina A, et al. Hyperhomocysteinemia is inversely related with left ventricular ejection fraction and predicts cardiovascular mortality in high-risk coronary artery disease hypertensives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:115–21.
463. Sundström J, Sullivan L, Selhub J, et al. Relations of plasma homocysteine to left ventricular structure and function: the Framingham Heart Study *Eur Heart J*, 2004; 25 (6): 523-530.

464. Bokhari SW, Bokhari ZW, Zell JA, et al. Plasma homocysteine levels and the left ventricular systolic function in coronary artery disease patients. *Coron Artery Dis*, May 2005; 16(3): pp 153-161.
465. Jakubowski H. Pathophysiological consequences of homocysteine excess. *J Nutr* 2006; 136 (6 Suppl): 1741S-9S.
466. Chwatko G, Jakubowski H. Urinary excretion of homocysteine-thiolactone in humans. *Clin Chem* 2005; 51: 408-15.
467. Jakubowski H. Homocysteine is a protein amino acid in humans. Implications for homocysteine-linked disease. *J Biol Chem* 2002; 277: 30425-8.
468. Jakubowski H, Perla-Kaján J, Finnell RH, et al. Genetic or nutritional disorders in homocysteine or folate metabolism increase protein N-homocysteinylation in mice. *FASEB J* 2009; 23: 1721-7.
469. Sikora M, Twardowski T, Jakubowski H. The role of homocysteine thiolactone in some of human diseases. *Postepy Biochem* 2006; 52: 417-23.
470. Beltowski J, Wójcicka G, Jakubowski H. Modulation of paraoxonase 1 and protein N-homocysteinylation by leptin and the synthetic liver X receptor agonist T0901317 in the rat. *J Endocrinol* 2010; 204: 191-8.
471. Sipkens JA, Krijnen PA, Meischl C et al. Homocysteine affects cardiomyocyte viability: concentration-dependent effects on reversible flip-flop, apoptosis and necrosis. *Apoptosis*. 2007 Aug;12(8):1407-18.
472. Poddar R, Sivasubramanian N, DiBello PM, Robinson K, Jacobsen DW. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circulation*. 2001 Jun 5;103(22):2717-23.
473. Joseph J, Washington A, Joseph L, et al. Hyperhomocysteinemia leads to adverse cardiac remodeling in hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H2567– 74.
474. Joseph J, Joseph L, Shekhawat NS, et al. Hyperhomocysteinemia leads to pathological ventricular hypertrophy in normotensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H679– 86.
475. Kennedy RH, Owings R, Shekhawat N and Joseph J. Acute negative inotropic effects of homocysteine are mediated via the endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H812-H817.

476. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, et al. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 1992; 257(5068): pp. 387-389.
477. Wan J, Deng Y, Guo J, et al. Hyperhomocysteinemia inhibited cardiac stem cell homing into the peri-infarcted area post myocardial infarction in rats. *Exp Moll Pathol Volume*, August 2011; 91(1): 411–418.
478. Sakata Y, Yamamoto K, Mano T, et al. Activation of matrix metalloproteinases precedes left ventricular remodeling in hypertensive heart failure rats: its inhibition as a primary effect of angiotensin converting enzyme inhibitor. *Circulation* 2004;109:2143 –9.
479. Yamazaki T, Lee JD, Shimizu H, Uzui H, Ueda T. Circulating matrix metalloproteinase-2 is elevated in patients with congestive heart failure. *Eur J Heart Fail* 2004;6:41– 5.
480. Stanger O, Weger M. Interactions of homocysteine, nitric oxide, folate and radicals in the progressively damaged endothelium. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1444– 54.
481. Panagia V, Gupta MP, Ganguly PK and Dhalla NS. Methionine-induced positive inotropic effect in rat heart: possible role of phospholipid N-methylation. *Circ Res* 1988;62:51-55.
482. Shackebaei D , Nicola King N, Suleiman MS. Effect of homocysteine on the isolated and perfused rat heart during ischaemia-reperfusion. University College London, 2006; *Proc Physiol Soc* 3, PC98
483. Pacher P, Ungvari Z, Kecskemeti V. Electrophysiological effects of homocysteine in isolated rat right ventricular papillary muscles and left atria. *General Pharmacology* 1999; 32: 439–443.
484. Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 324: 1149–1155, 1991.
485. Turhan H, Aksoy Y, Yetkin E. Homocysteine and coronary microcirculation: Is it a microvasculopathic agent? *International Journal of Cardiology* 2006;110: 269 – 270.
486. Tawakol A, Forgiione MA, Stuehlinger M, et al. Homocysteine impairs coronary microvascular dilator function in humans. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1051– 8.

487. Ascione L, De Michele M, Accadia M, et al. Effect of acute hyperhomocysteinemia on coronary flow reserve in healthy adults. *J Am Soc Echocardiogr* 2004;17:1281–5.
488. He L, Hui Zeng H, Li F, et al. Homocysteine impairs coronary artery endothelial function by inhibiting tetrahydrobiopterin in patients with hyperhomocysteinemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 299: E1061–E1065.
489. Oosterbaan AM, Bon E, Steegers-Theunissen RP, et al. Homocysteine exposure affects early hemodynamic parameters of embryonic chicken heart function. *Anat Rec (Hoboken)*. 2012; 295(6):961-7.
490. Pellegrino D, Shiva S, Angelone T, Gladwin MT, Tota B. Nitrite exerts potent negative inotropy in the isolated heart via eNOS-independent nitric oxide generation and cGMP-PKG pathway activation. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jul;1787(7):818-27.
491. Jakovljevic VLj, Canovic PS, Andjelkovic NV, Djuric DM. The effects of nimodipine and L-NAME on coronary flow and oxidative stress parameters in isolated rat heart. *Acta Physiol Hung*. 2006 Dec;93(4):251-61.
492. Jakovljevic VLj, Djordjevic DZ, Djuric DM. The effects of vitamin C and nitric oxide synthase inhibition on coronary flow and oxidative stress markers in isolated rat heart. *Gen Physiol Biophys*. 2011 Sep;30(3):293-300.
493. Jakovljevic VLj, Djuric DM. The effects of nitric oxide synthase--versus lipoxygenase inhibition on coronary flow and nitrite outflow in isolated rat heart. *Gen Physiol Biophys*. 2005 Jun;24(2):199-207.
494. Toledo JC Jr, Augusto O. Connecting the chemical and biological properties of nitric oxide. *Chem Res Toxicol*. 2012 May 21;25(5):975-89.
495. Bradley KK, Buxton IL, et al. Nitric oxide relaxes human myometrium by a cGMP-independent mechanism. *Am J Physiol* 1998;275:C1668–C1673.
496. Ingi T, Cheng J, Ronnett GV. Carbon monoxide: an endogenous modulator of the nitric oxide-cyclic GMP signalling system. *Neuron* 1996;6:835–842.
497. 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.
498. Cocceani F. Carbon monoxide and dilation of blood vessels. *Science* 1993; 260:739.

499. Kimura H. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267:129–133.
500. Wu L, Cao K, Lu Y, et al. Different mechanisms underlying the stimulation of  $K_{Ca}$  channels by nitric oxide and carbon monoxide. *J Clin Invest* 2002;110:691–700.
501. Feelisch M. The biochemical pathways of nitric oxide formation from nitrovasodilators: appropriate choice of exogenous NO donors and aspects of preparation and handling of aqueous NO solutions. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991;17:S25–S33.
502. Kim YM, Bergonia HA, Muller C, et al. Loss and degradation of enzyme-bound heme induced by cellular nitric oxide synthesis. *J Biol Chem* 1995;270:5710–5713.
503. Reiffenstein RJ, Hulbert WC, Roth SH. Toxicology of hydrogen sulfide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1992;32:109–134.
504. Zhao W, Zhang J, Lu Y, et al. The vasorelaxant effect of  $H_2S$  as a novel endogenous gaseous  $K_{ATP}$  channel opener. *EMBO J* 2001;20:6008–6016.
505. Otterbein LE, Choi AMK. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol* 2000;279:L1029–L1037.
506. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:517–554.
507. Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, et al. Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 2001;92:1015–1026.
508. Morita T, Kourembanas S. Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide. *J Clin Invest* 1995;96:2676–2682.
509. Motterlini R, Gonzales A, Foresti R, et al. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide contributes to the suppression of acute hypertensive responses in vivo. *Circ Res* 1998;83:568–577.
510. Gao F, Gao E, Yue TL, et al. Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischaemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Circulation* 2002;105:1497–1502.
511. Turko IV, Murad F. Protein nitration in cardiovascular diseases. *Pharmacol Rev* 2002;54:619–634.

512. Hartsfield CL. Cross talk between carbon monoxide and nitric oxide. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:301–307.
513. Zakhary R, Gaine SP, Dinerman JL, et al. Heme oxygenase 2:endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:795–798.
514. Morita T, Kourembanas S. Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell–derived carbon monoxide. *J Clin Invest* 1995;96:2676–2682.
515. 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.
516. Maulik N, Engelman DT, Watanabe M, et al. Nitric oxide/carbon monoxide: a molecular switch for myocardial preservation during ischemia. *Circulation* 1996;94:398–406.
517. Schmidt HHHW, Lohmann SM, Walter U. The nitric oxide cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1993;1178:153–175.
518. Siow RC, Sato H, Mann GE. Heme oxygenase-carbon monoxide signalling pathway in atherosclerosis: anti-atherogenic actions of bilirubin and carbon monoxide? *Cardiovasc Res* 1999;41:385–394.
519. Liu H, Song D, Lee SS. Role of heme oxygenase-carbon monoxide pathway in pathogenesis of cirrhotic cardiomyopathy in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001;280:G68–G74.
520. Soni H, Patel P, Rath AC, Jain M, Mehta AA. Cardioprotective effect with carbon monoxide releasing molecule-2 (CORM-2) in isolated perfused rat heart: Role of coronary endothelium and underlying mechanism. *Vascul Pharmacol*. 2010 Jul-Aug;53(1-2):68-76.
521. Abramochkin DV, Haertdinov NN, Porokhnya MV, Zefirov AL, Sitdikova GF. Carbon monoxide affects electrical and contractile activity of rat myocardium. *J Biomed Sci*. 2011 Jun 15;18:40.
522. Porokhya MV, Abramochkin DV, Abramov AA, Kuzmin VS, Sukhova GS. Inotropic effects of gaseous transmitters in isolated rat heart preparation. *Bull Exp Biol Med*. 2012 Oct;153(6):855-7.

523. Musameh MD, Fuller BJ, Mann BE, Green CJ, Motterlini R. Positive inotropic effects of carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs) in the isolated perfused rat heart. *Br J Pharmacol*. 2006;149:1104–1112.
524. Soni HM, Jain MR, Mehta AA. Mechanism(s) Involved in Carbon Monoxide-releasing Molecule-2-mediated Cardioprotection During Ischaemia-reperfusion Injury in Isolated Rat Heart. *Indian J Pharm Sci*. 2012 Jul;74(4):281-91.
525. Fu M, Zhang W, Yang G, Wang R. Is cystathionine gamma-lyase protein expressed in the heart? *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Nov 30;428(4):469-74.
526. McFaul SJ, McGrath JJ. Studies on the mechanism of carbon monoxide-induced vasodilation in the isolated perfused rat heart. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1987 Mar 15;87(3):464-73.
527. Bian JS, Yong QC, Pan TT, et al. Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes. *J Pharm Experim Therap* 2006; 316:670–678.
528. Carson RJ, Seyffarth G, Mian R and Maddock H. Interactions Between Gasotransmitters. In Wang R (ed). *Signal Transduction and the Gasotransmitters: NO, CO and H<sub>2</sub>S in Biology and Medicine*. 2004, pp 33-55, Humana Press, New Jersey, USA.
529. Zhong GZ, Li YB, Liu XL, Guo LS, Chen ML, Yang XC. Hydrogen sulfide opens the KATP channel on rat atrial and ventricular myocytes. *Cardiology*. 2010;115(2):120-6.
530. Sun Y, Tang CS, Jin HF, Du JB. The vasorelaxing effect of hydrogen sulfide on isolated rat aortic rings versus pulmonary artery rings. *Acta Pharmacol Sin* 2011; 32: 456-464.
531. Liu YH, Yan CD, Bian JS. Hydrogen sulfide: a novel signaling molecule in the vascular system. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011 Dec;58(6):560-9.
532. Danishpajoo IO, Gudi T, Chen Y, Kharitonov VG, Sharma VS, Boss GR. Nitric oxide inhibits methionine synthase activity in vivo and disrupts carbon flow through the folate pathway. *J Biol Chem*. 2001; 276: 27296–27303.
533. Juckett MB, Weber M, Balla J, Jacob HS, Vercellotti GM. Nitric oxide donors modulate ferritin and protect endothelium from oxidative injury. *Free Radic Biol Med*. 1996; 20: 63–73.



534. Brown KS, Kluijtmans LA, Young IS, et al. Genetic evidence that nitric oxide modulates homocysteine: the NOS3 894TT genotype is a risk factor for hyperhomocystenemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Jun 1;23(6):1014-20.
535. Fu WY, Dudman NP, Perry MA, Wang XL. Homocysteine attenuates hemodynamic responses to nitric oxide in vivo. *Atherosclerosis.* 2002 Mar;161(1):169-76.
536. Becker JS, Adler A, Schneeberger A, et al. Hyperhomocysteinemia, a cardiac metabolic disease: role of nitric oxide and the p22phox subunit of NADPH oxidase. *Circulation.* 2005 Apr 26;111(16):2112-8.
537. Sood HS, Cox MJ, Tyagi SC. Generation of nitrotyrosine precedes activation of metalloproteinase in myocardium of hyperhomocysteinemic rats. *Antioxid Redox Signal.* 2002 Oct;4(5):799-804.
538. Christova T, Diankova Z, Setchenska M. Heme oxygenase--carbon monoxide signalling pathway as a physiological regulator of vascular smooth muscle cells. *Acta Physiol Pharmacol Bulg.* 2000;25:9-17.
539. Liu XM, Chapman GB, Peyton KJ, et al. Antiapoptotic action of carbon monoxide on cultured vascular smooth muscle cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003;228:572-575.
540. Ishikawa K, Sugawara D, Wang X, et al. Heme oxygenase-1 inhibits atherosclerotic lesion formation in ldl-receptor knockout mice. *Circ Res.* 2001;88:506-512.
541. Dallas ML, Yang Z, Boyle JP, et al. Carbon monoxide induces cardiac arrhythmia via induction of the late Na<sup>+</sup> current. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 Oct 1;186(7):648-56.
542. Andre L, Boissière J, Reboul C, et al. Carbon monoxide pollution promotes cardiac remodeling and ventricular arrhythmia in healthy rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 Mar 15;181(6):587-95.
543. Berne JP, Lauzier B, Rochette L, Vergely C. Carbon monoxide protects against ischemia-reperfusion injury in vitro via antioxidant properties. *Cell Physiol Biochem.* 2012;29(3-4):475-84.
544. Clark JE, Naughton P, Shurey S, et al. Cardioprotective actions by a water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. *Circ Res.* 2003 Jul 25;93(2):e2-8.

545. Sawle P, Foresti R, Green CJ, Motterlini R. Homocysteine attenuates endothelial haem oxygenase-1 induction by nitric oxide (NO) and hypoxia. *FEBS letters* 2001; 508(3): 403–406
546. Kim KM, Pae HO, Zheng M, et al. 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 Oct 26;101(9):919-27.
547. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *Faseb J* 2002; 16:1792–1798.
548. Chang L, Geng B, Yu F, et al. Hydrogen sulfide inhibits myocardial injury induced by homocysteine in rats. *Amino Acids.* 2008 May;34(4):573-85.
549. Zhao W, Zhang J, Lu Y, & Wang R. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO Journal*, 2001; 20: 6008–6016.
550. Mujumdar VS, Hayden MR, & Tyagi SC. Homocyst(e)ine induces calcium second messenger in vascular smooth muscle cells. *Journal of Cellular Physiology*, 2000; 183: 28–36.
551. Pan TT, Neo KL, Hu LF et al. H<sub>2</sub>S preconditioning-induced PKC activation regulates intracellular calcium handling in rat cardiomyocytes. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 2008; 294: C169–C177.
552. Weiss N. Mechanisms of increased vascular oxidant stress in hyperhomocysteinemia and its impact on endothelial function. *Current Drug Metabolism*, 2005; 6: 27-36.
553. Loscalzo J. The Oxidant Stress of Hyperhomocyst(e)inemia. *J. Clin. Invest.* 1996; 98: 5–7.
554. Weiss N, Heydrick S, Zhang YY, Bierl C, Cap A, Loscalzo J. Cellular redox state and endothelial dysfunction in mildly hyperhomocysteinemic cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 Jan;22(1):34-41.
555. Weiss N, Zhang YY, Heydrick S, Bierl C, Loscalzo J. Overexpression of cellular glutathione peroxidase rescues homocyst(e)ine-induced endothelial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Oct 23;98(22):12503-8.
556. Flohé, L. (1989) in *Glutathione: chemical, biochemical and medical aspects*, (Dolphin, D.; Poulson, R. and Avramovic, O.Eds.), John Wiley & Sons, Inc, New York, pp. 644-731.

557. Sies H, Sharov VS, Klotz LO, Briviba K. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J Biol Chem.* 1997 Oct 31;272(44):27812-7.
558. Forgiione MA, Weiss N, Heydrick S, et al. Cellular glutathione peroxidase deficiency and endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 Apr;282(4):H1255-61.
559. Adachi T, Yamada H, Futenma A, Kato K, Hirano K. Heparin-induced release of extracellular-superoxide dismutase form (V) to plasma. *J Biochem.* 1995 Mar;117(3):586-90.
560. Yamamoto M, Hara H, Adachi T. Effects of homocysteine on the binding of extracellular-superoxide dismutase to the endothelial cell surface. *FEBS Lett.* 2000 Dec 8;486(2):159-62.
561. Welch, G.N. and Loscalzo, J. (1998) Homocysteine and atherothrombosis. *N. Engl. J. Med.*, 338(15), 1042-1050.
562. Puri, R.N. and Roskoski, R. Jr. (1988) Reaction of low molecular weight aminothiols with o-phthalaldehyde. *Anal. Biochem.*, 173(1), 26-32.
563. El-Khairi, L.; Vollset, S.E.; Refsum, H. and Ueland, P.M. (2003) Plasma total cysteine, mortality, and cardiovascular disease hospitalizations: the Hordaland Homocysteine Study. *Clin. Chem.*, 49(6 Pt 1), 895-900.
564. Norsidah KZ, Asmadi AY, Azizi A, Faizah O, Kamisah Y. Palm tocotrienol-rich fraction reduced plasma homocysteine and heart oxidative stress in rats fed with a high-methionine diet. *J Physiol Biochem.* 2012 Dec 4. [Epub ahead of print].
565. Zhang C, Cai Y, Adachi MT, et al. Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response. *J Biol Chem.* 2001 Sep 21;276(38):35867-74.
566. Böger RH, Bode-Böger SM, Sydow K, Heistad DD, Lentz SR. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Jun;20(6):1557-64.
567. Ungvari Zoltan, Pacher P, Rischak K, Szollar L, Koller A. Dysfunction of Nitric Oxide Mediation in Isolated Rat Arterioles With Methionine Diet- Induced Hyperhomocysteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1899-1904.
568. 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.

569. Chang L, Zhao J, Xu J, Jiang W, Tang CS, Qi YF. Effects of taurine and homocysteine on calcium homeostasis and hydrogen peroxide and superoxide anions in rat myocardial mitochondria. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004 Apr;31(4): 237-43.
570. Luc R, Vergely C. Forgotten Radicals in Biology. *International Journal of Biomedical Science* 2008;4(4): 255-259.
571. Smith BC, Fernhoff NB, Marletta MA. Mechanism and kinetics of inducible nitric oxide synthase auto-S-nitrosation and inactivation. *Biochemistry*. 2012 Feb 7;51(5):1028-40.
572. Jones CI, Han Z, Presley T, et al. Endothelial cell respiration is affected by the oxygen tension during shear exposure: role of mitochondrial peroxynitrite. *American Journal of Physiology*, 2008; 295: pp. C180–C191.
573. Ushio-Fukai M. VEGF signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2007; 9: pp. 731–739.
574. Bilban M, Haschemi A, Wegiel B, et al. Heme oxygenase and carbon monoxide initiate homeostatic signaling. *Journal of Molecular Medicine*, 2008; 86: pp. 267–279.
575. Rathore R, Zheng YM, Niu CF et al. Hypoxia activates NADPH oxidase to increase [ROS]<sub>i</sub> and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> through the mitochondrial ROS-PKC $\alpha$  signaling axis in pulmonary artery smooth muscle cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 2008; 45: pp. 1223–1231.
576. Lamon BD, Zhang FF, Puri N, et al. Dual pathways of carbon monoxide-mediated vasoregulation: modulation by redox mechanisms. *Circulation Research*, 2009; 105: pp. 775–783.
577. Lo Iacono L, Boczkowski J, Zini R, et al. A carbon monoxide-releasing molecule (CORM-3) uncouples mitochondrial respiration and modulates the production of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 2011 Jun 1;50(11):1556-64.
578. Moraes JA, Barcellos-de-Souza P, Rodrigues G, et al. Heme modulates smooth muscle cell proliferation and migration via NADPH oxidase: a counter-regulatory role for heme oxygenase system. *Atherosclerosis*. 2012 Oct;224(2):394-400.
579. André L, Gouzi F, Thireau J, et al. Carbon monoxide exposure enhances arrhythmia after cardiac stress: involvement of oxidative stress. *Basic Res Cardiol*. 2011 Nov;106(6):1235-46.

580. Wu M, Huang J, Xu S, Ling T, Xie Y, Shen W. Haem oxygenase delays programmed cell death in wheat aleurone layers by modulation of hydrogen peroxide metabolism. *J Exp Bot.* 2011 Jan;62(1):235-48.
581. Li L, Rose P, Moore PK: Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2011;51: 169–187.
582. Arikan DC, Bakan V, Kurutas EB, Sayar H, Coskun A. Protective effect of tadalafil on ischemia/reperfusion injury of rat ovary. *J. of Pediatric Surgery* 45, 2010;45: 2203–2209.
583. Calvert JW, Coetzee WA, Lefer DJ: Novel insights into hydrogen sulfide mediated cytoprotection. *Antioxidants & redox signaling* 2010;12: 1203–1217.
584. Szabo C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007;6: 917–935.
585. 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 Oct 20;152(2):177-83.
586. Steed MM and Tyagi SC. Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia. *Antioxid. Redox Signal.* 2011; 15: 1927–1943.
587. 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.
588. 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.
589. 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.
590. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 2004; 75: 639–653.
591. 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.
592. Topal G, Brunet A, Millanvoye E, et al. Homocysteine induces oxidative stress by uncoupling of NO synthase activity through reduction of tetrahydrobiopterin. *Free radical biology & medicine* 2004; 36(12):pp. 1532-1541.

593. Carballal S, Trujillo M, Cuevasanta E, Bartesaghi S, Moller MN, Folkes LK, Garcia-Bereguiain MA, Gutierrez-Merino C, Wardman P, Denicola A. Reactivity of hydrogen sulfide with peroxynitrite and other oxidants of biological interest. *Free Radic Biol Med.* 2010;3:196–205.
594. Streeter E, Ng HH, Hart JL. Hydrogen sulfide as a vasculoprotective factor. *Med Gas Res.* 2013 Apr 29;3(1):9.
595. Muzaffar S, Jeremy JY, Sparatore A, Del Soldato P, Angelini GD, Shukla N. H<sub>2</sub>S-donating sildenafil (ACS6) inhibits superoxide formation and gp91phox expression in arterial endothelial cells: role of protein kinases A and G. *Br J Pharmacol.* 2008;3:984–994.
596. Muzaffar S, Shukla N, Bond M, Newby AC, Angelini GD, Sparatore A, Del Soldato P, Jeremy JY. Exogenous hydrogen sulfide inhibits superoxide formation, NOX-1 expression and Rac1 activity in human vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res.* 2008;3:521–528.
597. Kimura Y, Goto Y, Kimura H. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxid Redox Signal.* 2010;3:1–13.
598. 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.
599. Tyagi N, Gillespie W, Vacek JC, Sen U, Tyagi SC, Lominadze D. Activation of GABA-A receptor ameliorates homocysteine-induced MMP-9 activation by ERK pathway. *Journal of Cellular Physiology.* 2009;220:257–266.



## ОБРАЗАЦ 1.

### ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Потписник  
др Владимир Живковић

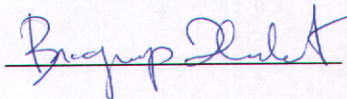
Број одлуке и датум прихватања:  
године

ИЗЈАВЉУЈЕМ да је докторска дисертација под називом "Ефекти хомоцистеина и супстанци сродних хомоцистеину на кардиодинамику и коронарни проток изолованог срца пацова: улога гасних трансмитера и оксидационог стреса":

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација ни у целини, ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права нити користио интелектуалну својину других лица.

У Крагујевцу,  
20. 01. 2014. године

Потпис аутора  
др Владимир Живковић





## ОБРАЗАЦ 2.

### ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Потписник  
др Владимир Живковић

Број одлуке и датум прихватања:  
177/13, 02.04.2013. године

Студијски програм:  
Докторске академске студије

Наслов рада:

Ефекти хомоцистеина и супстанци сродних хомоцистеину на кардиодинамику и коронарни проток изолованог срца пацова: улога гасних трансмитера и оксидационог стреса

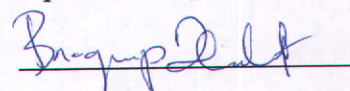
Ментор:  
Проф. Др Владимир Јаковљевић

ИЗЈАВЉУЈЕМ да је штампана верзија докторске дисертације истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу ДИГИТАЛНОГ РЕПОЗИТОРИЈУМА УНИВЕРЗИТЕТА У КРАГУЈЕВЦУ.

ДОЗВОЉАВАМ да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су: име и презиме, година и место рођења, датум одбране рада. Ови лични подаци могу се објавити мрежним станицама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама универзитета у Крагујевцу.

У Крагујевцу,  
20. 01. 2014. године

Потпис аутора  
др Владимир Живковић





### ОБРАЗАЦ 3.

#### ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

ОВЛАШЋУЈЕМ Универзитетску библиотеку да у дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу унесе моју докторску дисертацију под насловом "Ефекти хомоцистеина и супстанци сродних хомоцистеину на кардиодинамику и коронарни проток изолованог срца пацова: улога гасних трансмитера и оксидационог стреса", која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative commons), за коју сам се одлучио:

1. Ауторство
2. Ауторство-некомерцијално
3. Ауторство-некомерцијално-без прераде
- 4. Ауторство-некомерцијално-делити под истим условима**
5. Ауторство-без прераде
6. Ауторство-делити под истим условима

У Крагујевцу,  
20. 01. 2014. године

Потпис аутора  
др Владимир Живковић

