

## HOMOCISTEIN: HEMIJA, METABOLIZAM I ULOGA U PATOFIZIOLOŠKIM PROCESIMA

Duško Mirković, Nada Majkić-Singh, Svetlana Ignjatović

Institut za medicinsku biohemiju Kliničkog centra Srbije,  
Institut za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu

*Kratak sadržaj:* 1962. godine, 30 godina nakon otkrivanja hemijske strukture homocisteina, Carson i Neil su objavili rad u kome opisuju slučaj dve mlade osobe sa teškom mentalnom retardacijom, i povišenim nivoom homocisteina u urinu. McCully je 1975. u svom radu skrenuo pažnju na slučaj nalaza povećanog nivoa homocisteina u urinu i pojave karakterističnih trombo okluzivnih promena. Period 1991.–1998. godina je vreme obimnih komparativnih studija sa ciljem utvrđivanja veze između javljanja prerane arterijske koronarne bolesti i povećanog nivoa homocisteina u plazmi. Globalni rezultati ovih studija definitivno ukazuju da je biohemijski nalaz blago povećane vrednosti homocisteina u plazmi, u rasponu 15–45  $\mu\text{mol/L}$ , nezavisan faktor rizika za nastanak prerane arterijske koronarne bolesti, odnosno trombo-embolijskih promena u venskom delu vaskularnog sistema. Do kraja nije razjašnjen eventualni direktni uticaj homocisteina na endotelne ćelije krvnih sudova, ili uticaj nekog drugog faktora koji učestvuje u metionin-homocistein-cisteinskom putu, odgovornom za nastanak homocisteina (vitamini B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> i folna kiselina).

*Cljučne reči:* homocistein, koronarna aterijska bolest, hiperhomocisteinemija, faktor rizika

### Hemija homocisteina

Homocistein, kvantitativno glavni metabolit metionina, je aminokiselina, čija je hemijska struktura poznata od 1932 godine. Zajedno sa glutationom i cisteinom ubraja se u karakteristična amino tiolna jedinjenja organizma sisara (*Slika 1*).

Homocistein se u organizmu nalazi slobodan, ili u obliku disulfida i proteina. Slobodnog, ili redukovanog homocisteina, ima 1–2% u odnosu na ukupnu količinu homocisteina. Homocistin i homocistein-cistin su disulfidni oblici homocisteina. Najzastupljeniji oblik u kome se u organizmu nalazi i do 80%, je homocistein vezan za proteine, uglavnom albumin (*Slika 2*).

I pored očigledne sličnosti u hemijskom sastavu amino-tiolnih jedinjenja, njihova uloga u organizmu je različita. Termin »tiol« se odnosi na SH grupu, koja determiniše hemijske karakteristike ovih jedinjenja, koja su takva da omogućuju pomenutoj grupi jedi-

njenja da budu uključena u vrlo važne metaboličke puteve.

Cistein i homocistein su male molekule, molekulske mase 121,2, odnosno 135,1. Homocistein ima jednu metilensku grupu više. Glutation je tripeptid ( $\gamma$ -glutamil-cisteinilglicin) molekulske mase 307,3, u kome je cistin izvor »tio« grupe (1).

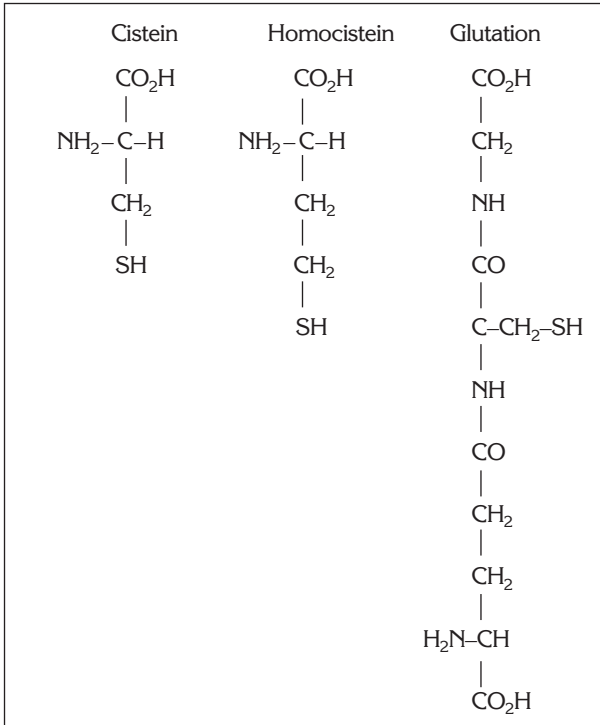
Fizičko-hemijske karakteristike »SH« grupe određuju njenu: pK vrednost, oksido-redukcioni potencijal, kao kapacitet za formiranje slobodnih radikala, parametara koji sa biohemijskog aspekta imaju za ishodište modulaciju u vrlo složenim procesima, koji mogu imati zaštitnu ulogu, ili predstavljati uslov za nastanak noksi, sa kasnijim različitim posledicama.

Sumpor i kiseonik se nalaze u istoj grupi periodnog sistema, te dele mnoge sličnosti kada su u pitanju hemijske osobine. Odatle vode poreklo brojne sličnosti u hemijskom ponašanju tiolne (R-SH) i alkoholne grupe (R-OH). Razlike u ponašanju tiolnih jedinjenja koje postoje u odnosu na alkohole, su logična posledica evidentnih razlika fizičko-hemijskih konstanti tiolne i alkoholne grupe; O-H veza je kraća u odnosu na S-H

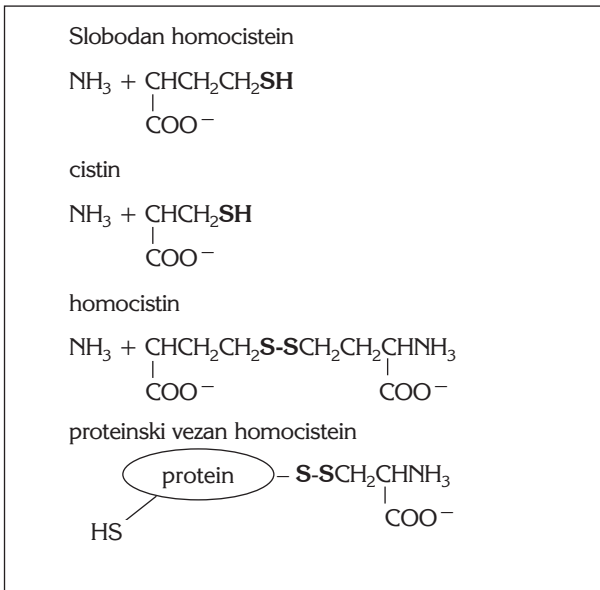
*Adresa autora*

Ass. mr sci. Duško Mirković  
Institut za medicinsku biohemiju  
Kliničkog centra Srbije  
11000 Beograd, Pasterova 2

\* Invited paper presented on 13th Congress of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine, May 14–18, 2002, Niš, Yugoslavia



Sika 1. Biogeni amino-tioli



Sika 2. Oblici homocisteina u organizmu

vezu, čime se objašnjava i veća jačina veze kiseonik-vodonik u alkoholnoj grupi u odnosu na tiolnu. I pored manje elektronegativnosti sumpora u odnosu na kiseonik, energija disocijacije tiolne grupe je niža nego alkoholne. Zato ne čudi izražena pojava RS<sup>-</sup> anjona u mnogim biohemijskim procesima (2, 3). Disocijacija pomenutog tipa se povećava sa porastom pH. Slabija S-H veza mnogo lakše podleže oksidaciji u odnosu na

O-H vezu kod alkohola, što izaziva veliku razliku između ove dve grupe organskih jedinjenja kada je u pitanju izlaganje dejstvu različitih oksidacionih agenasa.

Zajedničko za sve alkohole je da oksidacioni proces, znači promenu stepena oksidacije O-H grupi najbližeg ugljenikovog atoma, dok kod tiola proces oksidacija izaziva različite stepene oksidacije sumpora S-H grupe. U fiziološkim uslovima tioli se najvećim delom oksidišu do disulfida (RSSR). Sa hemijskog aspekta moguća oksidacija do sulfenične (RSOH), sulfenične (R-SO<sub>2</sub>H) i sulfonične (RSO<sub>3</sub>H) kiseline je vrlo mala, jer je ista karakteristična za prisustvo jačih oksidacionih agenasa, nesvojstvenih fiziološkim uslovima (4, 5).

Oksidoredukcioni potencijal biološki značajnih tiola i disulfida je sličan i kraće se u rasponu -0,2 do -0,4 V. Pored reakcije tipa  $2RS^{\cdot} \rightarrow 2RSSR + 2e^{-}$ , u kojoj je blago favorizovana nagradnja disulfida, alifatični tioli učestvuju u nizu redoks reakcija, intereagujući sa nizom drugih biološki aktivnih agenasa, kao što su: flavoproteini, citohromi, askorbat, kao i redukovani kiseonični radikali. Kod svih pomenutih reakcija tioli se transformišu u odgovarajuće disulfide.

Karakteristična je i mogućnost oksidacije tiola u prisustvu metalnih jona, kao katalizatora, koja za posledicu ima nagradnju nestabilnog tiol radikala (RS<sup>•</sup>), koji nastaje iz odgovarajućeg RS<sup>-</sup> intermedijera, koji je slobodan, ili vezan za metalni katalizator (4).

Reakcije tiola sa halidima pobuđuju pažnju, zbog mogućeg uticaja na biohemijske procese vaskularnog sistema. Sigurno je da biološki aktivni tioli u reakcijama sa alkil i aril halidima učestvuju kao supstituenti, dajući odgovarajuće sulfide (RSR<sup>-</sup>). Još veća verovatnoća postoji za odvijanje nukleofilne adicije RS<sup>-</sup> anjona na alfa i beta nezasićene karbonilne grupe (C=C=O) u beta poziciji. Reakcije sa vitaminom K i norepinefrinom su primeri ovakvih reakcija. Hemijska interakcija tiola sa dvogubom vezom cijanata (C=N), rezultira nagradnjom tiokarbonata (NH<sub>2</sub>-CO-SR). Ova reakcija omogućuje adicione procese na cikličnoj strukturu NAD, omogućavajući ispoljavanje kofaktorske uloge istog.

Još jedna od važnih razlika u hemijskom ponašanju tiola u odnosu na alkohole se odnosi na reakcije sa karbonilnom grupom. Tioli sa tiolnom grupom bliskoj amino grupi reaguju sa karbonilnim supstratima, dajući relativno stabilan tiazolidin. Sa udaljavanjem SH- i NH<sub>2</sub><sup>-</sup> grupe težnja ka nagradnji hemimerkaptana raste. Analogno pomenutim reakcijama teku sa biohemijskog aspekta izuzetno važne reakcije na karboksilnu grupu odgovarajućih kiselina (RCO<sub>2</sub>H), dajući tio estere. Najbolji primer je reakcija sa koenzimom A, koja rezultira nagradnjom odgovarajućeg RS-acil proizvoda, odgovornog za acilaciju u mnogim biohemijskim reakcijama. Posebnu pažnju danas pobuđuje specifično stvaranje cikličnog homocistein tiolaktona, koji nastaje specifično samo iz homocisteina. Ciklizacija se ubrzava snižavanjem pH, a po najnovijim ispitivanjima značajna je pod fiziološkim uslovima.

Homocistein i njemu srodni biogeni tioli, daju hemijski i fiziološki specifične proizvode u reakcijama sa azotnim oksidima: azot-dioksidom ( $\text{NO}_2$ ), diazot-trioksidom ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) i diazot-tetraoksidom ( $\text{N}_2\text{O}_4$ ). Izražena je i sklonost ka interakciji sa metalnim nitrozil kompleksima (M-NO). U oba slučaja produkti reakcija su S-nitrozotiol, ili tionitritni (RS-NO) proizvodi. Ove supstance jako aktiviraju enzim gvanilat-ciklazu i važan su intermedijer u metabolizmu endotelijum relaksirajućeg faktora. Razgradnja tiolaktona takođe moduliše aktivnost drugih metalo, tiol zavisnih enzima. U ovim slučajevima radi se o uspostavljanju NO-metal i S-metal veza, u obliku kiselo rezistentnih helatnih kompleksa sa metalnim jonima (5).

### Metabolizam homocisteina

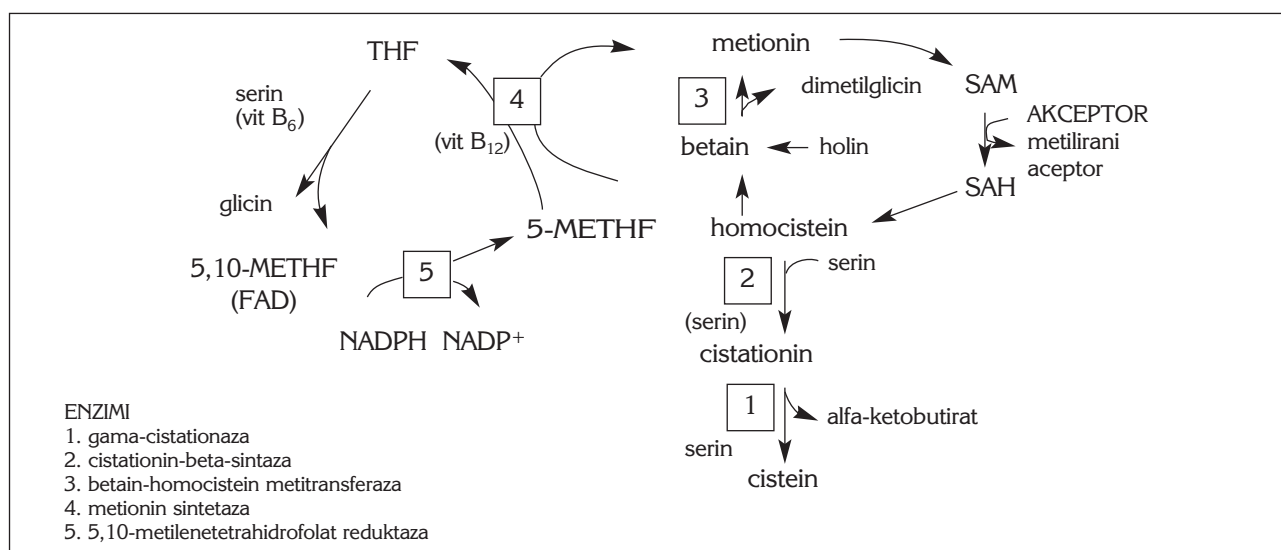
Homocistein je samo sa čisto hemijskog aspekta aminokiselina. Ako se sa biohemijskog aspekta pojam aminokiseline personifikuje sa subjedinicom u sintezi proteina, homocistein to zapravo nije, jer u pomenutom procesu ne učestvuje. Isti se najjednostavnije može nazvati metabolitom esencijalne aminokiseline metionina. Nastanak homocisteina je složen biohemijski proces, vrlo fino regulisan, koji na svom značaju dobija, tek onda kada se sagleda činjenica da učestvuje u remetilacionom ciklusu koji ponovo vodi ka sintezi, odnosno završavanju metionina. Metabolizam metionina započinje učestvom metionina u sintezi proteina, odnosno sintezi S-adenozilmetionina, koji svojom dekarboksilacijom participira u sintezi spermidina, ili se ponaša kao donor metil grupe uz izdvajanje adenozilhomocisteina, odnosno homocisteina. Metabolički put biva u narednim fazama i zatvoren resintezom metionina, ili jedan deo homocisteina biva nepovratno metabolisan do cisteina (6).

### Ciklus metionin-homocistein-metionin

Svaka ćelija organizma sisara ima sposobnost metabolizovanja metionina. Dve reakcije su u kompeticiji za raspoloživu količinu metionina: proteinska sinteza, ili početna reakcija metionin-homocistein-metionin ciklusa, nagradnja S-adenozilmetionina.

Reakcija transformacije metionina do S-adenozilmetionina je katalizovana metionin-adenozil-transferazom (EC 2.5.1.6). Enzim ima tri izoenzijske forme. Jedna je jetrena, sa relativno visokom vrednošću  $K_m$ , pozitivno modulirana adenozilmetioninom. Ova enzijska forma je jedina koja omogućava jetri da pozitivno odgovori na povišene vrednosti metionina u ishrani, odnosno cirkulaciji, što rezultira skokovitim promenama koncentracije adenozilmetionina u jetri, a što nije slučaj sa drugim tkivima i organima, gde je koncentracija istog relativno konstantna. Sintetisani adenozilmetionin najvećim delom ostaje u ćeliji gde je sintetisan (7) (Slika 3).

Adenozilmetionin može svoju metil grupu predati u nekoj od transmetilacionih reakcija, ili biti podvrgnut dekarboksilaciji u prisustvu adenozilmetionin dekarboksilaze (EC 4.1.1.50), dajući propilaminsko jezgro, potrebno za sintezu poliamina, kao što je putrescin. Kao proizvod pomenute reakcije, 5-metiloadenozin se uključuje u kružnu sekvencu koja rezultira resintezom metionina. Dokazano je da na raspoloživi put dekarboksilacije odlazi samo oko 10% adenozilmetionina, dok se ostatak usmerava ka sintezi homocisteina (8). Preostalih 90% adenozilmetionina predstavlja važan izvor metil grupe, koja biva predata različitim donorima, u prisustvu takođe različitih transferaza, uz izdvajanje S-adenozilhomocisteina. Najznačajniji predstavnik ove grupe enzima je glicin-metil-transferaza. Bez obzira na hemijski sastav metil donora, odnosno na enzim koji proces transmetilacije katalizuje, S-ade-



Slika 3. Ciklus metionin-homocistein-metionin

nozilhomicistein je najmoćniji inhibitor pomenutog procesa. Zato je za normalnu kinetiku transmetilacije sekvence, potrebna pravilna kontrola ovog procesa, što podrazumeva blagovremeno uklanjanje S-adenozilhomicisteina pomoću tri biohemijska puta (9). Jedan put je enzimski katalizovan, enzimom adenozin-homicisteinazom (3.3.1.1), i omogućava nastavak metionin-homicistein-metionin ciklusa, jer daje homocistein. Ovaj enzim se nalazi u svim ćelijama organizma. Drugi put uklanjanja je vezivanje za proteine unutar ćelije. Kada je kapacitet intraćelijskog vezivanja prevaziđen, višak S-adenozilhomicisteina se transportuje van ćelije. Dokazano je da se ovako stvoreni metabolit skladišti u i bubregu (10, 11).

Nastavak ciklusa znači podržavanje resinteze metionina, što katalizuju dva karakteristična enzima, dok treći put znači trajno uklanjanje homocisteina iz organizma. Odvijanje bilo kog od pomenutih metaboličkih puteva može biti obavljeno u samoj ćeliji nagradnje homocisteina, ili se transportuje u neki drugi organ, na primer jetru, u kojoj je dinamika katabolizma brža.

Betain-homicistein-metiltransferaza (2.1.1.5) je enzim koji omogućava nastavak resinteze homocisteina. Nalazi se u jetri svih sisara i koristi betain kao metil donor (12). Drugi enzim, metilfolat-homicistein metiltransferaza (2.1.1.13), katalizuje transmetilaciono proces u svim tkivima sisara. Metil donor je u ovom slučaju 5-metiltetrahydrofolat, a nezamenljivi kofaktor metil-homicistein metiltransferaze je cijankobalamin.

Cistation- $\beta$ -sintaza se takmiči sa dve napred pomenute metilaze. Ovaj enzim započinje proces uklanjanja homocisteina iz metionin-homicistein-metionin ciklusa. Ovo je trans-sulfuracioni put, koji se završava stvaranjem cisteina. U procesu još učestvuje i enzim c-cistationaza. Oba enzima su piridoksal-fosfat zavisni (13, 14).

#### *Raspodela enzima u organima*

Raspodela enzima uključenih u metabolizam homocisteina nije ujednačena po organima. U jetri je zastupljena izoenzimsko forma metionin-adenoziltransferaze, sa najvećom vrednosti Km. Zastupljenost betain-homicistein metiltransferaze je najveća u jetri svih sisara, a najrasprostranjenija je metilfolat-homicistein-metiltransferaza, koje ima u svim tkivima. Poznato je da cistationin- $\beta$ -sintaze nema u srcu, plućima, testisima, nadbubrežnoj žlezdi i slezini. U mozgu i adipoznom tkivu nema  $\chi$ -cistationaze. Trans sulfuracioni put metabolizma homocisteina je potpun u samo 4 organa, jetri, bubregu, malom intestinumu i pankreasu. To su organi sa najvećom potrebom za resintezom glutaciona, te trans-sulfuracija ovog tipa i služi zadovoljenju ovih potreba (14).

#### *Regulacija metabolizma homocisteina*

Regulacija metabolizma homocisteina, najšire gledajući, znači obezbeđivanje ravnoteže u brzini odvi-

janja dva metabolička puta, koji dodirnu tačku imaju baš na nivou stvaranja homocisteina. To su ciklus resinteze metionina s jedne i trans sulfuracioni put, s druge strane.

Cistation- $\beta$  sintaza omogućava početak trans-sulfuracije i uklanjanje homocisteina iz organizma. Glicin-transferaza eliminiše metil grupu metionina. U ravnoteži sa ovim procesima je metilacija homocisteina, kvantitativno najznačajnije katalizovana metilfolat-homicistein metiltransferazom, manjim delom i betain-homicistein metiltransferazom (15, 16).

Dva mehanizma modulišu raspodelu homocisteina između ova dva kompetitivna metabolička puta. Prvi uključuje razlike u afinitetima enzima za supstrat. Km vrednosti za obe metilaze su reda veličine 0,6 mmol/L homocisteina. Vrednosti Km za cistation-sintazu su više od 100 puta. Zato je konzervacija metionina, kroz remetilacionu sekvencu favorizovani metabolički put. Cistation-sintaza može da koristi homocistein tek onda kada je kapacitet za metilaciju homocisteina zasićen.

Drugi regulacioni mehanizam je zasnovan na efektivnim karakteristikama tri metabolita: adenozilmetionina (AdoMet), adenozilhomocisteina (AdoHcy) i 5-metiltetrahydrofolata (MTHF). AdoMet inhibira sintezu MTHF-a i inaktivira betain-metiltransferazu, a indukuje cistation-sintazu. Ovo navodi na zaključak da povećanje koncentracije AdoMet, kao logična posledica povećanog unosa metionina hranom, favorizuje intenziviranje transulfuracionog puta i direktnu inhibiciju metilacije homocisteina, sprečavanjem sinteze dovoljne količine MTHF.

Ovakva raspodela među konkurentskim metaboličkim putevima je najizraženija u jetri, zbog relativno viših koncentracija AdoMet u jetri u odnosu na druge organe (17).

Uticaj AdoMet na regulaciju metabolizma homocisteina je nezavisnim istraživanjem potvrđen i dopunjen novim saznanjima o inhibiciji glicin metiltransferaze MTHF-om. Ovo predstavlja još jedan, dopunski mehanizam regulacije.

Inhibirajući sintezu MTHF-a sAdoMet, redukuje inhibiciju glicin transferaze, omogućavajući da trans-sulfuracioni put bude dominantan. Snižene vrednosti AdoMet imaju suprotan efekat (18, 19).

Uticaj AdoHcy na regulaciju metabolizma homocisteina je suprotan dejstvu AdoMet. Njegov uticaj je važan u nehepatičnim tkivima, gde koncentracija istog fluktuiru mnogo više od AdoMet (20, 21).

### **Greške regulacije metabolizma homocisteina U hiperhomocisteinemija**

Eventualni uticaj preteranog unošenja metionina hranom, koji bi mogao da dovede do hiperhomocisteinemije, danas se ne smatra samostalnim mogućim uzrokom nastanka ove pojave. Učešće nutricionog

faktora ovog tipa bi moglo da ima značaja u sadejstvu sa ostalim uzrocima odstupanja od normalne regulacije metabolizma homocisteina, kao što su genetski, ili nedovoljna količina ko-faktora u enzimski katalizovanim reakcijama pomenutog metaboličkog puta.

Evidentne greške u metabolizmu homocisteina izazvane su genetskim alternacijama, koje se odražavaju na pravilnu sintezu cistation-sintaze i metilentetrahidrofolat-reduktaze (MTHFR). Poznate su greške u sintezi betain-homocistein metiltransferaze (BHMT) i metionin-sintaze ali su slabije proučene, jer su vrlo retke (22, 23).

Pojava hiperhomocisteinemije znači povećanje kako slobodnog tako i vezanog homocisteina, tako da se radi o povećanju koncentracija ukupnog homocisteina. Hiperhomocisteinemija vodi ka povećanju koncentracija intracelularnog AdoHcy; rezultujuća inhibicija AdoMet zavisnih transmetilacionih reakcija, mogu biti glavni uzrok kasnijih bioloških i hemijskih abnormalnosti.

Radi lakšeg sagledavanja problematike nastanka i posledica hiperhomocisteinemije, učinjeni su pokušaji sistematizovanja faktora koji poznatim i nepoznatim mehanizmima dovode do ove pojave. Jedna od takvih podela obuhvata sledeće faktore: genetske, fiziološke, patološke i farmakološki aktivne supstance.

#### *Genetski faktori*

Metilentetrahidrofolat-reduktaza (MTHFR) omogućava konverziju 5,10-metilentetrahidrofolata u 5-metilentetrahidrofolat, u prisustvu NADPH. 5-metilentetrahidrofolat je supstrat za cijankobalamin zavisnu metionin sintazu. MTHFR flavin zavisni enzim, koga čine dve identične, 77 kDa subjediniče, sa N-terminalnim katalitičkim domenom i c-terminalnim regulatornim domenom. Opisano je oko 50 slučajeva teške MTHFR deficijencije, sa teškim neurološkim i vaskularnim komplikacijama. Gen, odgovoran za sintezu enzima je kloniran, a 14 karakterističnih mutacija je takođe opisano. Termolabilna forma enzima, poznata kao tMTHFR, je čest pratilac koronarne arterijske bolesti.

Najčešća mutacija koja vodi ka ispoljavanju termolabilnosti enzima, je poznata kao C677T. Izazvana je alanin-valin supstitucijom. Učestalost javljanja ove mutacije je u proseku visoka, ali različita po etničkim grupama. Za francuski deo kanadske populacije ona iznosi 38%, kod afričkog dela američke populacije samo 10%, a u ostalim studijama procenat je od 25–39%. Da li je rizik za pojavu, odnosno kvantitativni iznos hiperhomocisteinemije veći kod homozigota u odnosu na heterozigotne pacijente, do kraja nije razjašnjeno, ali je evidentan vrlo važan uticaj folata na suzbijanje negativne ekspresije tMTHFR (24).

Vitamin B<sub>12</sub> zavisne metionin-sintaze (MS) ima u svim ćelijama i tkivima. Učestalost javljanja genetskih

grešaka u sintezi ovog enzima definitivno je mnogo manja u odnosu na MTHFR, ali je danas predmet proučavanja. Poznata je struktura MS cDNA od 3798 nukleotida, koji determinišu sekvencu od 1265 aminokiselina, ukupne molekulske mase 140 kDa. Na osnovu proučavanja fibroblasta pacijenata sa MS deficijencijom, definisana su dva tipa MS deficijentne bolesti, poznati kao cblE i cblG tip. cblE alternacija se odnosi na redukciju samog MS enzima, a cblG na promenu MS apoenzima (25).

Ulazak homocisteina u transulfuracioni put je katalizovan vitamin B<sub>6</sub> zavisnom cistation-β-sintazom (CBS), koja ima ograničenu tkivnu distribuciju. Opisano je nekoliko stotina slučajeva CBS deficijencije. Ovo je najčešći uzrok javljanja homocisteinurije. Humani cDNK za CBS ima 2554 nukleotida, kodira sekvencu subjediniče od 551 aminokiseline molekulske mase oko 63 kDa. Oko 40 mutacija je otkriveno na CBS genu. Smatra se da je 0,5–1,5% svake populacije zahvaćeno heterozigotnom formom CBS deficijencije. Do sada je u najvećem broju slučajeva ovaj deo populacije ostajao neotkriven, jer enzimski deficit ovog tipa se do sada vodio kao asimptomatski. Vrednosti homocisteinemije su blago povišene. U toku su opsežna ispitivanja u vezi eventualno povećane osetljivosti ovih osoba na homocistein indukovane nokse. Homozigotne forme daju vrednosti homocisteinemije, često više od 50 mmol/L, kao i povećanje koncentracije metionina (26–33).

#### *Fiziološki faktori*

Fiziološki faktori koji utiču na nivo homocisteina su: starost, pol, i način života.

Srednja koncentracija ukupnog homocisteina povećava se sa starenjem. Osobe starije od 50 godina imaju u zavisnosti od populacione grupe, prosečno i do 1,9 mmol/L viši nivo homocisteinemije, nego mlađe od ove kritične starosne granice. Kod žena je ova razlika još izraženija i iznosi do 2,2 μmol/L, a kod muškaraca je 1,6 μmol/L.

Koncentracija ukupnog homocisteina kod muškaraca je za oko 25% viša nego kod premenopausalnih žena. Ova razlika se smanjuje posle menopauze, ali nikad ne nestaje. Hormonska terapija, na bazi estrogena, manifestuje se negativnom korelacijom u odnosu na koncentracije homocisteina, kod postmenopausalnih žena.

U trudnoći se javlja karakteristično smanjenje homocisteinemije, zbog smanjenja koncentracije cirkulišućeg albumina, za koji je vezan veći deo homocisteina. Način ishrane je važna determinanta, koja utiče na nivo homocisteina. Nivo serumskog ukupnog homocisteina kod zdravih osoba varira sa unosom metionina hranom na način različit onom kod osoba sa predispozicijom za hiperhomocisteinemiju proporcionalno unosu metionina. Opšte uzevši hrana životinjskog porekla je bogatija metioninom. Meso i riba sa-

drže 2,7 g/100 g, jaja 3,2 g/100 g, kravlje mleko 2,9 g/100 mL, a humano mleko samo 1,4 g/100 mL metionina. Voće i povrće sadrže 0,9–1,2 g/100 g, sa izuzetkom bresaka i grožđa sa 3,6 g/100 g.

Dosadašnja ispitivanja su dala kontradiktorne podatke o uticaju lipidnog statusa na pojavu hiperhomocisteinemije. Bitna su takođe istraživanja koja u *in vitro* uslovima ukazuju na interakcije lipoproteina i homocisteina, koje u dosadašnjim prospektivnim studijama nisu prepoznate (34–36).

Pušenje i pasivan način života, bez značajnijeg fizičkog napora su udruženi sa povećanjem nivoa homocisteina.

#### Patološki faktori

Brojne studije su pokazale da je najčešći razlog umerene hiperhomocisteinemije nedostatak vitamina. Vitamini deluju kao kofaktori, koji potpomažu ispoljavanje katalitičke sposobnosti enzima u metionin-homocistein-metionin ciklusu. To su cijankobalamin, piridoksal fosfat i folna kiselina. Generalni opšti stav je da nekvalitetna ishrana, ili malapsorpcija ovih supstanci povećava rizik za nastanak hiperhomocisteinemije. Čak i kod zdravih, pravilno hranjenih osoba postoji negativna korelacija između nivoa ovih vitamina i homocisteina. Ova negativna korelacija je još izraženija kod starijih osoba, kada je u pitanju cijankobalamin. Korelacija, za stariju populaciju postoji i kad je u pitanju folna kiselina, ali je ista izraženija kod mlađe populacije. Ovakvi biohemijski odnosi su sa stanovišta dijagnostike megaloblastne anemije, odnosno utvrđivanja manjka folne kiseline, uticali da određivanje nivoa homocisteinemije postane važan parametar. Homocistein je osetljiviji parametar od hematoloških parametara kao npr.: makro-ovalocitoze, MCV (> 100 fL), hipersegmentacije polimorfonukleara, ili direktnog određivanja serumskog vitamina B<sub>12</sub>, plazmatskog ili eritrocitnog folata (37).

Deficijencija cijankobalamina se diferencira u odnosu na deficijenciju folata nalazom povišenih vrednosti metilmalonične kiseline, koji sa povišenom vrednosti ukupnog homocisteina daju sliku hipovitaminoze B<sub>12</sub>.

Uticaj vitamina B<sub>6</sub> je najslabije istražen. Kod pacijenata sa urođenom smanjenom aktivnošću cistation-β-sintaze, uzimanje piridoksal-fosfata smanjuje nivo homocisteinemije, ali nikad do normalnih vrednosti. Efekat zavisi i o kojoj genskoj alternaciji se radi. Interesantno je da davanje vitamina B<sub>6</sub> smanjuje nivo homocisteina nakon testa opterećenjem metioninom, ali ne i kod hronične hiperhomocisteinemije. Malapsorpcija vitamina B<sub>6</sub> je mnogo ređa od ranije pomenutih, te je i verovatnoća za ispoljavanje iste na koncentraciju homocisteina mnogo manja.

Homocisteinemija je direktno korelirana sa serumskim kreatininom i glomerularnom filtracijom. Kod

uremije redukovani homocistein nije povećan, ali jeste proteinski vezan. Suplementaciona terapija folatom daje rezultate, ali nikad vrednosti homocisteinemije ne vraća na normalu. Još slabiji efekti se postižu tretmanom vitamina B<sub>6</sub>. Odsustvo dovoljno izraženog odgovora na tretman folnom kiselinom objašnjava se prisustvom inhibitora folatne konjugaze, nedavno otkrivenog kod pacijenata na hemodijalizi. Aktivacija folne kiseline, inače znači dodatak glutamilnog ostatka neaktivnoj formi vitamina, što rezultira nagradnjom aktivnog folipoliglutamata. Dužina dodatog radikala je kontrolisana ravnotežnim delovanjem folat-konjugaze, koja teži odvajanju glutamilnih ostataka od poliglutamil-folata, i folil-poligamaglutamat-sintetaze koja teži dodavanju glutamilnih ostataka. Najveću biološku aktivnost imaju folilpoliglutamati kratkih lanaca, kojih iz gore pomenutih razloga kod uremičnih pacijenata nema dovoljno. Hronična uremija takođe narušava ekstrarenalnu aktivnost enzima odgovornih za metabolizam homocisteina (38–39).

Kako je bubreg značajno mesto metabolizma homocisteina, drugi mehanizam koji se nameće je oštećenje tubularnih ćelija, koje više nisu u mogućnosti da efikasno obavljaju transulfuracione procese u katabolizmu homocisteina, kod različitih stepena bubrežne insuficijencije. Transplantacija bubrega i srca vodi ka povećanju homocisteinemije, koja je u pozitivnoj korelaciji sa količinama primenjenih imunosupresiva ciklosporinom i kortikosteroidima (40).

Narušavanje normalnog metabolizma homocisteina postoji definitivno kod pacijenata sa *diabetes mellitusom* tip 1. Uobičajen razvoj bolesti nosi sa sobom rizik za razvoj mikro i makroangiopatije, sa retinopatijom i nefropatijom, kao pratećim komplikacijama. Povećane vrednosti homocisteina su nađene kod pacijenata sa odmaklim stadijumom retinopatije. U okviru ove grupe, znake hiperhomocisteinemije su imali samo oni pacijenti, koji su pored pomenute komplikacije ispoljavali znake nefropatije. Kod pacijenata bez, ili sa minimalnim znacima retinopatije, nisu detektovane povišene vrednosti homocisteina (41).

Hiperhomocisteinemija se javlja kod *diabetes mellitus-a* sa makroangiografskim komplikacijama, koje takođe između ostalog vode nefropatiji. Tačan mehanizam za ubrzavanje ateroskleroze u pomenutim slučajevima nije razjašnjen, ali se dovodi u vezu sa narušenim metabolizmom homocisteina na nivou bubrega.

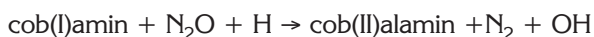
#### Farmakološki aktivne supstance

Niz farmakološki aktivnih supstanci iz nekoliko farmakoloških grupa različitim mehanizmima utiču na nivo homocisteinemije.

*Antifolati.* Metotreksat je inhibitor dihidrofolat reduktaze, koja vodi ka usporenoj regeneraciji i kasnijoj razgradnji redukovanih folata, uključujući i 5-metil-

tetrahydrofolat. Na ovaj način je onemogućena pravilna remetilacija homocisteina u metionin. Nivo plazmatskog ukupnog homocisteina je stoga osetljiv indikator antifolatnog dejstva metotreksata, poželjnog kod neoplazmi, psorijaze i reumatoidnog artritisa. Hiperhomocisteinemija ovog tipa dostiže maksimum posle dva dana pri dozi od 25 mg dnevno, odnosno za nekoliko sati kod kancera i davanja 1–3,6 g na dan (42).

*Azotni oksidi.* Izlaganje pacijenata dejstvu azot-suboksida ( $N_2O$ ), kao anestetičkog agensa, vodi ka povećanju nivoa homocisteina. Nekoliko ispitivanja u *in vitro* uslovima su pokazala postojanje karakteristične interakcije između azot suboksida i cijankobalamina:



Ovaj proces teče u toku normalnog ispoljavanja katalitičke aktivnosti metionin-sintaze, koja biva inaktivirana, zbog vezivanja oslobođenih OH radikala za aktivno mesto na enzimu. Istim mehanizmom se vrši i inaktivacija metilmalonil-CoA, ali pri dužem delovanju azot-suboksida. Na ovaj način se objašnjava i nagomilavanje 5-metiltetrahydrofolata, kao i povećan gubitak folata urinom. Nivo plazmatskog ukupnog homocisteina se povećava zbog nagomilavanja istog u ćelijama i izlaska u ekstracelularni prostor (43).

Danas postoje preliminarni podaci o inaktivaciji metionin-sintaze delovanjem azot-monoksida (NO), u još jačem obliku nego kod dejstva azot-suboksida. Rezultati su dobijeni na osnovu ispitivanja na ćelijama jetre pacova, a zbog višestrukog značaja azot monoksida u biohemijskoj regulaciji ista se nastavljaju.

*Antagonisti vitamina B<sub>6</sub>.* Azauridin je antimetabolit koji je korišćen za tretman refraktarne psorijaze. Delujući kao antagonist vitamina B<sub>6</sub>, izazivao je hiperhomocisteinemiju, kao i teške krize vaskularnog tipa, čiji mehanizam do 1976. godine, kada je zabranjen za upotrebu, nije do kraja razjašnjen (44).

*L-dopa.* Koristi se u tretmanu pacijenata sa Parkinsonovom bolešću. Povećava koncentraciju dopamina u mozgu. Najvažniji katabolički put je O-metilacija do 3-O-metil-dope. Reakcija je katalizovana katehol-O-metiltransferazom, a kao izvor metil grupe služi S-adenozilmetionin. Dokazana je smanjena koncentracija S-adenozilmetionina, odnosno povećana koncentracija S-adenozilhomocisteina, kako na životinjama, tako i kod pacijenata na terapiji L-dopom. Pojedinačna doza L-dope odmah izaziva hiperhomocisteinemiju, a hronično uzimanje je održava. U farmakološkoj praksi ima još jedinjenja koja su supstrati S-adenozil transmetilaza, a čiji efekat na nivo homocisteina nije ispitan (45).

*Hormonska terapija.* Ideja da nivo ukupnog homocisteina zavisi od hormonskog statusa, potiče od podataka o nižem nivou homocisteinemije kod premenopausalnih žlezda u odnosu na postmenopausalne i muškarce. Ovi podaci su kasnije potkrepljeni či-

njenicama o nižim vrednostima homocisteina u trudnoći, kao kod žena u menopauzi sa supstitucionom hormonskom terapijom.

Kod uzimanja kontraceptivnih sredstava na bazi estrogena konstatovano je povećanja nivoa homocisteina samo u periodima ciklusa, sa povećanim lučenjem hormona. Nisu registrovane oscilacije koncentracije homocisteina kod odsustva uzimanja kontraceptiva. Mehanizam kojim bi se objasnile ove pojave nisu razjašnjene. Ima indicija da estrogeni smanjuju nivo kobalamina i folata, bez ispoljavanja kliničkih znakova hipovitaminoza. Davanje estrogen antagonista, tipa tamoksifena, smanjuje nivo ukupnog homocisteina za 30%, u roku od 6 do 12 meseci (46).

*Antiepileptici.* Primena fenitoina i karbamazepina povećava homocisteinemiju, najverovatnije usled remećenja homeostaze folata (47).

*Derivati žučnih kiselina.* Primena kolestipola i sličnih preparata povećava ukupni homocistein, zbog deficita folata, a koji je izazvan poremećenom adsorpcijom (48).

*Alkohol.* Konzumiranje alkohola vodi ka pojavi različitih tipova hiperhomocisteinemije. Težak hronični alkoholizam sa razvijenom bolesti jetre, prati stalna hiperhomocisteinemija. Prolazna hiperhomocisteinemija je obavezna kod akutne intoksikacije alkoholom, kod osoba bez oštećenja jetre. Nastanak poremećaja metabolizma homocisteina se objašnjava u oba slučaja narušavanjem metabolizma folata, karakterističnog za ovu grupu pacijenata. U toku su ispitivanja fenomena povećane učestalosti, moždanih krvarenja kod alkoholičara, koja je eventualno povezana za hiperhomocisteinemijom (49).

Za razliku od gore navedenih sledeće farmakološki aktivne supstance smanjuju nivo homocisteina:

*Adenozin i srodna jedinjenja* su inaktivatori, ili inhibitori S-adenozilhomocistein-hidrolaze, koja je odgovorna za hidrolizu S-adenozilhomocisteina do homocisteina. U slučaju akumulacija S-adenozilhomocisteina treba koristiti ovakve supstance, kao antitvoralne agense (50).

*Sulfhidrilne supstance.* Tri farmakološki aktivne sulfhidrilne supstance smanjuju nivo homocisteinemije. To su: dimetilcistein (D-penicilamin), metal izmenjivački agens sa primenom u tretmanu reumatoidnog artritisa, N-acetilcistein, mukolitičko sredstvo i 2-merkamptoletan sulfonat, hemoterapeutski protektor. Sva jedinjenja ovog tipa imaju slobodnu sulfhidrilnu grupu i sposobna su da grade disulfide u plazmi, te u hemijsku interakciju ovog tipa stupaju i sa homocisteinom, snižavajući koncentraciju istog (51).

D-penicilamin smanjuje slobodan i protein vezan homocistein za 50 do 90%, kod pacijenata sa homocisteinurijom. Ista supstanca smanjuje nivo proteinski vezanog homocisteina u toku čuvanja uzoraka seruma. Kod pacijenata sa kancerom, tretman 2-merkam-

ptotetan sulfonatom, snižava homocisteinemiju za više od 50%, posle nekoliko dana primene. N-acetilcistein posle pojedinačne peroralne doze, smanjuje ukupni homocistein za 20 do 50%, za razliku od slobodne frakcije koja raste (51).

### Biološke varijacije i referentni intervali

#### Vreme uzorkovanja

Jedini izvor metionina kao esencijalne aminokiseline, kod sisara je proteinima bogata ishrana. Za očekivati je zato da unos hrane povećava nivo homocisteina u krvi. Nakon prvih ispitivanja iz 1989. godine, koja su ukazivala na odsustvo razlike u koncentraciji homocisteina pre i posle jela, došlo se do podataka da se 2–4 sata posle doručka bogatog proteinima snižavaju vrednosti homocisteinemije. Još iscrpniji podaci ukazuju na snižavanje vrednosti nivoa homocisteina, u roku 1–4 sata posle doručka sa 15 do 18 g proteina. Homocistein blago raste nakon tri sata, ukoliko se u toku ručka unese oko 50 g proteina, da bi koncentracioni maksimum, od 15 do 20%, nastupio posle 6–8 sati. Sledećeg dana ujutru nivo homocisteina je i dalje viši od onog pre konzumiranja proteina bogatog ručka (52).

Homocistein se sporo eliminiše iz organizma, sa poluživotom 3–4 sata. Samo ovaj podatak ukazuje na mogućnost povećanja homocisteina 12–20 sati nakon obroka bogatog proteinima. Objašnjenje za snižavanje homocisteina posle obroka je da se u periodu od nekoliko sati po istom eliminiše homocistein nagrađen od metionina unesenog prethodnog dana. Zato se kod uzorkovanja preporučuje da ono bude na tašte, sa posebnim naglaskom na sastav zadnjeg obroka. Preporučuje se laki obrok veče pre uzorkovanja, vađenje krvi ne duže od 3 sata posle lakog doručka, a pre ručka.

Pošto je 80% ukupnog homocisteina vezano za proteine plazme, a koncentracija homocisteina je niža u ležećem, nego u sedećem položaju, o ovome se mora voditi računa kod standardizovanja načina vađenja krvi. U ispitivanjima na zdravim dobrovoljcima, nađeno je smanjenje nivoa homocisteina, ako je vađena krv uzorkovana u ležećem položaju u odnosu na sedeći položaj, i za 29,9% (3,5 mmol/L), odnosno srednjoj vrednosti sniženja od 19% (2,1 mmol/L). Ovako dramatična razlika nije nađena u drugom ispitivanju, iste vrste na 12 zdravih žena i isto toliko zdravih muškaraca. I u ovom slučaju srednji iznos smanjenja homocisteina iznosio je značajnih 6,3%, što je u odnosu na nađenu analitičku varijaciju od 3,1%, izuzetno mnogo (53).

#### Stabilnost homocisteina u punoj krvi

Koncentracija ukupnog homocisteina u serumu i plazmi je nakon vađenja krvi zavisna od načina pripreme seruma i plazme. Metabolizam metionina se

intenzivno nastavlja u eritrocitima i posle venepunkcije, te dolazi do izlivanja homocisteina u ekstracelularni prostor. Zbog toga je opšte pravilo da posle prikupljanja krvi, istu treba staviti u posudu sa ledom i centrifugirati u roku od jednog sata. Ukoliko hlađenje izostane u toku prvog sata treba očekivati povećanje nivoa ukupnog homocisteina do 10%. U toku eventualnog dužeg stajanja pune krvi na sobnoj temperaturi koncentracija homocisteina se povećava, koje je nezavisno od zatečene koncentracije u ekstracelularnom prostoru. Povećanje iznosi oko 35% u prvih 4 sata, pa do 75%, u toku 24 sata.

Moguća je primena antikoagulantnih sredstava, koji kod dobijanja plazme za određivanje homocisteina imaju ulogu agenasa za inhibiciju daljeg metabolizma istog. Ne postoji konsenzus o najboljem načinu konzervacije homocisteina, ali najbolji rezultati su dobijeni sa: natrijum-fluoridom, limunskom kiselinom i 3-deazaadenozin. Primena EDTA se često spominje i nešto ređe koristi. EDTA ne može direktno da inhibira izlazak homocisteina iz eritrocita, već samo da sprečava oštećenje eritrocita u toku koagulacije, čime se proces usporava.

Značajan efekat postoji samo pri hlađenju na +4 °C, kada povećanje koncentracije homocisteina ne prelazi 5%.

Natrijum-fluorid omogućava takođe parcijalnu inhibiciju izlaska homocisteina iz eritrocita, tako da na sobnoj temperaturi to povećanje u toku 2 sata ne prelazi 10%. Uz hlađenje na +4 °C inhibicija izlaska homocisteina iz eritrocita je skoro potpuna. Ne postoji konsenzus ni oko koncentracija pogodnih za primenu. Pri krajnjoj koncentraciji od 100 mmol/L natrijum-fluorida, koja obezbeđuje pomenutu povećanu stabilnost u toku 2 sata, primećuje se osmotski izlazak vode iz eritrocita, zbog hipertoničnosti u ekstracelularnom prostoru, izazvane dodatkom natrijum-fluorida. Ovaj efekat dovodi do značajne dilucije, koja je kompenzovana izlaskom homocisteina iz eritrocita, jer je inhibicija izlaska kako je napomenuto delimična. 3-deazaadenozin inhibira transformaciju S-adenozilhomocisteina u homocistein. U *in vitro* uslovima ovo jedinjenje ima jači efekat na inhibiciju izlaska homocisteina iz eritrocita od natrijum-fluorida. Praktično postoji potpuna inhibicija ovog procesa u toku 72 sata na 25 °C, pri krajnjim koncentracijama reagensa između 50 mmol/L i 1 mmol/L. 3-deazaadenozin ne interferira kod HPLC određivanja homocisteina, ali zbog kompeticije sa S-adenozilhomocisteinom, ne može se koristiti kod imunodređivanja (54).

Korišćenje limunske kiseline u koncentraciji 0,5 mol/L nepoznatim mehanizmom obezbeđuje potpunu (100%) stabilnost nivoa homocisteina u punoj krvi 6 sati na 23 °C. Samo se pretpostavlja da do prekida u metabolizmu homocisteina dolazi zbog snižavanja pH vrednosti. Prva ispitivanja ukazuju da postoji blaga »baseline« interferencija kod HPLC određivanja, koja uslovljava niže vrednosti u odnosu na korišćenje EDTA



kao konzervansa. Interferencije kod FPIA određivanja nema (54).

Teoretski elaboriran, a u praksi još dovoljno neispitan način stabilizacije homocisteina, je pravljenje lizata uz delovanje EDTA i limunske kiseline. U ovom slučaju je neophodno određivanje novih referentnih intervala.

Hemoliza praktično ne utiče na određivanje ukupnog homocisteina. Koncentracija ovog parametra u eritrocitima je  $0,80 \pm 1,05$  mmol/L, te ne može bitno da promeni nivo homocisteina u ekstracelularnom prostoru.

#### *Stabilnost homocisteina u serumu i plazmi*

Nakon odvajanja seruma, ili plazme nivo homocisteina je vrlo stabilan. Može se kao pravilo prihvatiti da je stabilnost na sobnoj temperaturi 4 dana, na 0–2 °C nekoliko nedelja, a na –20 °C nekoliko godina. Uza stopna zamrzavanja i odmrzavanja ne utiču na koncentraciju istog.

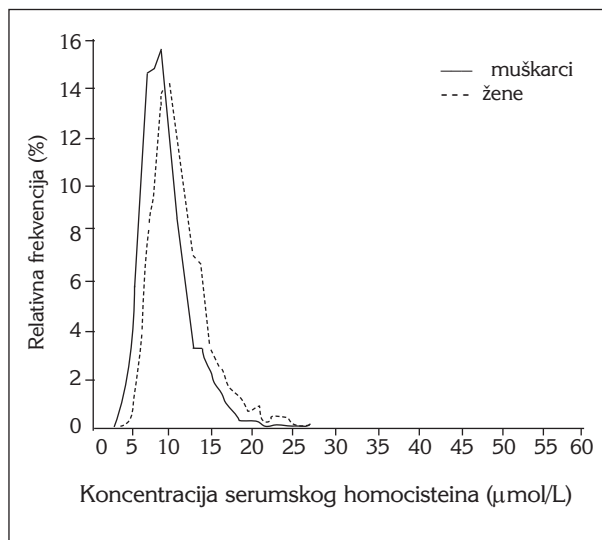
Venska staza kod vađenja krvi, usled korišćenja poveske u trajanju od 3 minuta, izaziva srednje povećanje homocisteinemije od 2,8%.

Intra-individualna varijacija kod ukupnog homocisteina, utvrđena na osnovu mnogih studija, je u granicama 7–9,4%, te se ne smatra velikom. Zato pomenuti podaci o smanjenju koncentracije homocisteina pri vađenju krv u ležećem položaju dobijaju na značaju. Takođe se primećuje mali udeo greške zbog venske staze (55).

#### *Referentne vrednosti*

Inter-individualna varijacija prema, različitim izvorima, iznosi u zdravoj populaciji 24 do 34%. Ne postoji konsenzus oko gornje granice referentnih vrednosti za ukupni homocistein. Raspon koncentracija kod zdravih ispitanika iznosi od 5 do 15  $\mu$ mol/L, pri čemu je distribucija pomerena ka višim vrednostima, a gornja granica referentnih vrednosti se od laboratorije do laboratorije bitno razlikuje. Varijacije nastaju ne samo zbog korišćenja različitih metoda određivanja, ili različitog načina vađenja krvi, nego i zbog kvaliteta standardnog uzorka. Naime, primećeno je da distribucija vrednosti homocisteinemije postaje pravilnija nakon suplementacije kontrolne grupe odgovarajućim vitaminima, odgovornim za pravilan metabolizam homocisteina.

Raznolikost podataka na ovu temu se može ilustrovati i sledećim primerima. Opsežno ispitivanje uticaja homocisteina na pojavu karotidne stenozе, ukazalo je na gornju granicu referentnih vrednosti od 14  $\mu$ mol/L, i to za kontrolnu grupu sa provereno korektnim nivoima folne kiseline, cijankobalamina i piridoksal-fosfata. Međutim Stampfer izveštava o tolerantnim vrednostima ukupnog homocisteina od 15,8 mmol/L



Slika 4. Referentne vrednosti homocisteina

za uslovno zdravu grupu osoba bez provere nivoa karakterističnih vitamina, odnosno bez suplementacije istih. Ispitivanje na 1 428 zdravih osoba pre suplementacije vitaminima, dalo je kao srednju vrednost referentnih vrednosti 12 mmol/L, sa naglašenim pomeranjem ka višim vrednostima, dok se nakon suplementacije ta vrednost značajno snizila, na 8,3  $\mu$ mol/L, uz normalnu distribuciju vrednosti. Na osnovu ovog modela 95% vrednosti leži u opsegu referentnih vrednosti od 4,9 do 11,7  $\mu$ mol/L (Slika 4).

Zbog svega gore navedenog, sigurno je da do skoro generalno pominjana granična vrednost od 15 mmol/L ne važi, a da za zbog raznolikosti faktora koji utiču na nivo homocisteinemije za svaku populaciju moraju biti određene referentne vrednosti (56).

#### *Test opterećenja metioninom*

Oralni test opterećenja metioninom se često u literaturi navodi kao potencijalno dijagnostičko sredstvo, za otkrivanje grešaka u metabolizmu homocisteina. Osnova testa je u davanju povećanih količina metionina, koji treba da izvrši zasićenje trans sulfuracnog kataboličkog segmenta metabolizma homocisteina. U zavisnosti od vremena potrebnog za vraćanje nivoa homocisteinemije u normalu, vrši se procena predispozicije na prisustvo hiperhomocisteinemije. Test je prvenstveno bio namenjen otkrivanju heterozigotnih alternacija cistation- $\beta$ -sintaze sa normalnim bazalnim nivoom homocisteina.

Uslovi za obavljanje testa nikada do kraja nisu standardizovani. Jedan od prvobitno propisanih načina sastojao se u peroralnom davanju davanje 0,1 g metionina po kilogramu telesne težine. Uzorkovanje krvi se vrši neposredno pre opterećenja, a zatim posle 2, 4, 6 i 8 sati. Opterećenje sa 3,8 g metionina po kvadratnom metru telesne površine, sa uzorkovanjem

neposredno pre i 4 sata po opterećenju, je jedan od načina opisan u literaturi da bi *post-dose* period bio skraćen na 2 sata 1995. godine. Koncentracioni pik metionin dostiže za 2 sata, a homocistein za 6 do 8 sati. Test je pozitivan ako je porast homocisteinemije po opterećenju u odnosu na bazalni nivo veći od srednjeg povećanja kontrolne grupe, plus 2 standardne devijacije, ili je povećanje veće od najvećeg pojedinačnog povećanja iz kontrolne grupe (57).

Do vrlo afirmativnih podataka se došlo, nakon korišćenja pomenutog četvorasatnog testa, jer su referisani podaci da u grupi od 274 ispitanika, više od 40% ima приметно odstupanje u toleranciji, a da nema odstupanja u vrednostima ukupnog homocisteina.

Međutim, primećeni su problemi kod aplikacije testa u kliničkoj praksi, zbog njegove relativne složenosti. Uočena je nemogućnost realizacije normalizacije odgovora na opterećenje metioninom, iz nepoznatih razloga, kao i relativno visoka cena. Zato je Američka asocijacija za srce predložila korišćenje ovog testa u istraživačke svrhe, a za klinička ispitivanja definitivno naznačila određivanje ukupnog homocisteina (58).

#### *Određivanje homocisteina u urinu*

Određivanje homocisteina u urinu danas nema veliki značaj, jer je potisnuto određivanjem u krvi. Međutim, napredak u sticanju saznanja vezanih za eventualni značaj homocisteina su neraskidivo vezana za ranija određivanja istog u urinu. Prva saznanja o povezanosti homocisteina i teških okluzija krvnih sudova, su donesena na osnovu detekcije visokih koncentracija homocisteina u urinu ovih pacijenata. To je bilo kolorimetrijsko određivanje sa nitroprusidom, u prisustvu cijanida, koja je sredinom šezdesetih godina bila metoda izbora u ovom segmentu biohemijske analitike. Metoda po svojoj osetljivosti nije mogla da se meri sa današnjim, ali je mogla da odgovori nameni u slučaju pomenutih teških oblika hiperhomocisteinemije, uglavnom izazvanih genetskom predispozicijom. Potreba za tačnim određivanjem subnormalnih vrednosti ukupnog homocisteina, reda veličine nekoliko desetina mmol/L, učinila je ovu metodu neprikladnom.

Korišćenje aminoanalizatora i HPLC tehnike za određivanje homocisteina u urinu danas nije nepoznato, ali je definitivno jasno da će biološki materijal, izbora ostati derivati krvi (59).

#### **Potencijalna uloga homocisteina i njegovih metabolita u nastanku aterotrombotičkih promena**

Brojni eksperimentalni podaci ukazuju na vezu između hiperhomocisteinemije i povećane sklonosti ka aterogenezi. Patološke promene na vaskularnom sistemu, praćene hiperhomocisteinemijom i homocistin-

urijom se bitno razlikuju od istog tipa lezija kod deficita vitamina C, u kome je smanjen oksidativni metabolizam homocisteina. Nedostatak dehidroaskorbata, potrebnog za usporavanje oksidacije, homocisteina u homocisteinsku kiselinu, remeti normalan tok transformacije homocisteina u homocisteinsku kiselinu. Homocisteinska kiselina je prekursor fosfoadenozin-fosfosulfata, koji se konvertuju u sulfatne estre, a isti su važni u sintezi sulfatizovanih proteoglikana konektivnog tkiva (60).

Pored ovog, homocisteinska kiselina ima i ulogu u modulaciji dejstva hormona rasta i dejstvo na N-metil D-aspartat (NMDA), pod tip glutamatnog receptora. Prema tome nedovoljna količina askorbinske kiseline opisanim mehanizmom vodi ka povećanju krstosti konektivnog tkiva i smanjenju kohezije endotel-nih ćelija zida krvnih sudova (61).

Povećana količina homocisteinske kiseline bi prema gore izloženom mehanizmu, mogla predstavljati pogodan uslov za normalan proces sulfatizovanja proteoglikana i održavanje normalnog integriteta vaskularnog zida. Prvo je objašnjeno da se povećana homocisteinurija javlja uz teške vaskularne poremećaje, bez deficita vitamina C. Ovo se objašnjava sa karakteristično izmenjenom sintezom sulfatizovanih proteoglikana. Ova sinteza u slučaju kada je koncentracija homocisteina povećana nije usporena, ali postoje eksperimentalni podaci da se umesto fibrilarne forme, stvara globularna forma sulfatizovanih proteoglikana. Takođe kulture normalnih endotel-nih ćelija pri *in vitro* izazvanoj povećanoj ekspoziciji homocisteina, počinju da sintetišu pomenutu izmenjenu formu sulfatizovanih proteoglikana. Na ovaj proces se nadovezuje i povećano prisustvo homocistein tiolaktona, čija produkcija zbog hiperhomocisteinemije takođe raste. Homocistein tiolakton po svemu sudeći pospešuje akumulaciju sulfat-bogatih proteoglikana u obliku do sada već registrovanog metahromatičnog materijala.

Pojava pojačane sulfatne esterifikacije u slučaju pojave globularnih sulfatizovanih proteoglikana se sa hemijskog aspekta dovodi u vezu sa interakcijom negativno naelektrisanih proteoglikanskih ostataka. Oni uspostavljaju jonske veze sa svojim epsilon-amino grupama izazivajući konformacione promene, koje vode ka uspostavljanju kvaternerne strukture globularnog tipa. Kvaternerne amonijum grupe serumskih lipoproteina i joni kalcijuma ispoljavaju logičan afinitet prema sulfatnim grupama proteoglikana i ulaze u sastav ateroklerotičnog plaka. Elektrostatički nabijeni proteoglikani takođe inhibiraju normalnu regulaciju mio-intimal-nih ćelija, što vodi ka miointimalnoj proliferaciji (62).

Postoje i pretpostavke o destruktivnom dejstvu homocisteina na kolagen. Dva mehanizma su uključena u ovaj proces. Jedan je ponovo pojačana sulfatizacija proteoglikana koja vodi ka pojačanoj produkciji kolagenih vlakana. Drugi mehanizam se odnosi na reakciju homocisteina i aldehidnih grupa prokolagena

u formu tiazolidina, čija pojačana produkcija znači građenje abnormalnog kolagena, zbog nemogućnosti uspostavljanja normalnih poprečnih veza između kolagenih vlakana (crosslinks).

Patološka ispitivanja posle smrti pacijenata sa teškim oblicima homocisteinurije pokazala su teška oštećenja arterijskog zida, sa upadljivom intimalnom hiperplazijom, vakuolizacijom i fibrozom. Mnogobrojni trombi, zatvaraju i ovako sužen lumen krvnih sudova (63).

Za narušavanje integriteta endotelijuma pored mehanizma sulfatacije proteoglikana, postoji po novim saznanjima i direktno toksično dejstvo homocisteina. Eksperimentalno izazvana hiperhomocisteinemija, kod nehumanih primata izaziva deendotelizaciju i zadebljanje intime. Oralni metionin test opterećenja kod ljudi, izaziva deskvamaciju endotelnih ćelija, dokazanu cirkulacionim endotelemijom. Kulture zida ljudske umbilikalne arterije i goveđe aorte, pokazuju homocistein zavisno oslobađanje kreatina, odvajanje i lizu ćelija, sve znake cito-toksičnosti. Inhibiranje gore navedenih pojava katalazom, ukazuje na povezanost cito-toksičnog dejstva homocisteina sa dejstvom kiseoničnih slobodnih radikala (64).

Dokazana je sklonost tiola da svojom autooksidacijom daju kiseonična jedinjenja: superoksid radikal ( $O_2^-$ ), hidroksilni radikal ( $OH^\cdot$ ) i vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ). Auto oksidacija homocisteina u prisustvu metalnih jona omogućava transport dva elektrona na molekule kiseonika. Nastali superoksid i tial radikal su intermedijeri u ovoj oksidoredukciji, sa krajnjim proizvodom, vodonik-peroksidom. Direktno toksično dejstvo superoksid radikala, se ogleda u njegovoj sklonosti ka oksidaciji lipoproteina male gustine (LDL), odnosno uticaju na povećano preuzimanje LDL čestica od strane »scavenger« ćelija. Ovo je glavni preduslov za nastanak penastih (foam) ćelija. Endotelijalna citotoksičnost homocisteina može biti suprimirana dejstvom azot-oksida, kao »relaksirajućeg faktora«, koga proizvodi endotelijum. Homocistein i azot-oxid reaguju pod fiziološkim uslovima, dajući S-nitrozohomocistein. Oba jedinjenja i S-nitrozocistein, imaju značajna vazodilatatorna i antiagregacijska svojstva. Pokazano je da direktno, trenutno dejstvo homocisteina nema efekta na agregaciona svojstva trombocita, ali ako je inkubacija produžena, agregacioni proces se ubrzava. Razlog ove pojave je verovatno u postepenom pražnjenju pula azotnog oksida. Ukoliko proces oštećenja endotelijuma uzme maha, na raspolaganju je sve manji broj endotelnih ćelija koje mogu da produkuju azotni-oxid, a to omogućava da citotoksični efekat homocisteina u funkciji vremena sve više dolazi do izražaja (65).

Pacijenti sa homozigotnom homocisteinurijom imaju rane znake javljanja, venskih i arterijskih tromboza. Dokazano je da homocistein menja balans između prokoagulantnih i antikoagulantnih faktora. Selektivna inhibicija delovanja i sekrecije trombomodulina, redukcija aktivacije proteina C i aktivacija proteo-

liznog aktivatora faktora V, su neka od karakterističnih dejstava homocisteina. Do kraja nije razjašnjen potencijalni uticaj na fon Vilebrandov faktor i faktor VII. Detektovana je smanjena aktivnost antitrombina III, kod pacijenata sa hiperhomocisteinemijom. Smanjeno vezivanje za svoje receptore i smanjena proteolitička aktivnost tkivnog plazminogen aktivatora je dokazana kod produžene inkubacije homocisteina *in vitro* (66).

U eksperimentalnim uslovima, pri koncentraciji homocisteina od 2 mmol/L dolazi do značajnog povećanja afiniteta lipoproteina (a) za fibrin. Ovaj kompleks može da inhibira plazmin i tako favorizuje trombozu (67).

### Homocistein i koronarna bolest

Direktnih patoloških i anatomskih nalaza o promenama u vaskularnom sistemu, osoba sa više, ili manje izraženom hiperhomocisteinemijom kojima bi bila objašnjena pojava koronarne bolesti, još uvek nema, mada je još 1976, zabeležena povećana učestalost koronarne bolesti u pacijenata sa poremećenim metabolizmom homocisteina (68).

U narednih 15 godina je bilo samo sporadičnih izveštaja na ovu temu. Od 1990. godine interesovanje za ovu problematiku drastično je poraslo. Prva pozitivna saznanja o korelaciji povećanog nivoa homocisteina i učestalosti koronarne bolesti, su sadržani u radovima iz 1992. i 1993. godine (69, 70).

Na bazi pomenutih i mnogobrojnih meta-analiza iz 1995. godine, koje su obuhvatile oko 4000 osoba, homocistein je počeo da dobija epitet jednog od 200 faktora rizika za nastanak koronarne bolesti i pored sporadičnih negativnih nalaza po ovom pitanju. Danas se često postavlja pitanje kakav je međusoban odnos udela pojedinih faktora rizika za nastanak neželjene posledice, u ovom slučaju, koronarne bolesti. Sigurno najvažniji faktori rizika su hipertenzija, pušenje i lipidni status. Relativno veliki broj studija ukazuje na pozitivnu korelaciju ukupnog holesterola, HDL, LDL holesterola i ukupnog homocisteina. Po prvi put se spominje mogućnost uticaja homocisteina kao nezavisnog faktora rizika za nastanak bolesti, od lipidnog statusa 1995. i 1996. godine (70).

Diferencijacija uticaja hiperhomocisteinemije u odnosu na hipertenziju je izgleda najveći problem, jer je dokazana izuzetno izražena pozitivna korelacija ova dva faktora rizika (71–73).

Podaci o uticaju pušenja na nivo homocisteina su najoskudniji, a samo pušenje sa sobom nosi opasnost smanjenog unosa mnogih važnih sastojaka, uključujući i vitaminske kofaktore metabolizma homocisteina, te na taj način mogu uticati na javljanje hiperhomocisteinemije.

*Zahvalnost.* Ovaj rad je urađen u okviru projekta 1260 koji finansira Ministarstvo za nauku, tehnologije i razvoj Republike Srbije.

## HOMOCYSTEINE: CHEMISTRY, METABOLISM AND ROLES IN PATHOPHYSIOLOGY PROCESSES

*Duško Mirković, Nada Majkić-Singh, Svetlana Ignjatović*

*Institute for Medical Biochemistry, Clinical Centre of Serbia*

*Institute for Medical Biochemistry, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade*

**Summary:** In 1962, 30 years after chemical structure discovery of homocysteine, Carson and Neil reported work in which they described cases of two young people, with severe mental retardation and high homocysteinuria. In 1975 McCully emphasized the association between homocysteinuria and thrombus-occlusive vascular changes. Period 1991–98, is the time of very extensive comparative studies, with aim of establishing links between premature coronary artery disease and high homocysteine level in plasma. These results in a whole show that biochemical findings of a mild increase of homocysteine plasma levels, in span of 15–45  $\mu\text{mol/L}$ , are independent risk factor for premature coronary artery disease appearance. So far mechanism of direct homocysteine uninfluenced on endothelial vascular vessels cells, or influence of any other factor, which play role in methionine-homocysteine-cysteine path (vitamins B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, folic acid) are not strictly elucidated.

**Key words:** homocysteine, coronary artery disease, hyperhomocysteinemia, risk factor

### Literatura

1. Roberts JT, Caserio MC. Basic Principals of Organic Chemistry. New York and Amsterdam: WA. Benjamin, Inc., 1965; 747–58.
2. Streitweisser A, Heathcock CH. Introduction to Organic Chemistry. New York: Macmillan Publishing Co., 1985; 756–60.
3. Jakoby WB, Griffith OW. Methods in Enzimology. Orlando, FL: Academic Press, 1987; 366–76.
4. Jocelyn PC. The Biochemistry of the SH Group. London: Academic Press, 1972.
5. Friedman M. The Chemistry and Biochemistry of the Sulfhydryl Group in Amino Acids, Peptids, and Proteins. Pergamon Press, 1973.
6. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. J Nutr Biochem 1990; 1; 228–37.
7. Ueland PM, Refsum H, Brattstrom L. Atherosclerotic Cardiovascular Disease, Hemostasis and Endothelial Function. New York: Marcel Decker, 1992; 183–96.
8. Mudd SH, Levy HL, Skovby F. The Methabolic Basis of Inherited Diseases. New York: Mc-Grow-Hill, 1989; 693–734.
9. Mudd SH, Pool JR. Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. Metabolism 1975; 24: 721–35.
10. Backlund PS, Smith RA. Metionine Synthesis from 5-methylthioadenosine in rat liver. J Biol Chem 1981; 256: 1533–35.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. McCully KS. Homocysteine theory of arteriosclerosis: Development and current status. Aththeroscl rev 1983; 11: 157–246.
15. 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.
16. Jencks DA, Matthews RG. Allosteric inhibition of methyltetrahydrofolate reductase by adenylylmethionine. J Biol Chem 1987; 262: 2485–93.
17. 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.
18. Goyette P, Summer JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt DS, Matthews RG, Rozen R. Human methyltetrahydrofolate reductase; isolation of c-DNA mapping and mutation identification. Nature Genet 1994; 7: 195–200.
19. Finkelstain 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.

20. 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.
21. Jurgen Geisel, Ilona Zimbelmann, Heike Schorr, Jean-Pierre Knapp, Marion Bodis, Ulrich Hubner and Wolfgang Hermann. Genetic Defects as Important Factors for Moderate Hyperhomocysteinemia. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 688–704.
22. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA. A candidate genetic risk factor vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics* 1995; 10: 111–3.
23. Kluijtmans Laj, Van den Heuvel LPWJ, Boers GHJ, et al. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylen-tetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 35–41.
24. Mudd SH, Levy HL, Skovby F. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. New York; Mc Graw- Hill, 1989; 693–734.
25. 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.
26. Kang SS, Wong PWK, Zhou J, Sora J, Ruggie N, Greulich G. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in patients with coronary artery disease. *Metabolism* 1991; 37: 611–13.
27. 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.
28. Carson NAJ, Cushword DC, Dent CE et al. Homocystinuria: A new inborn error of metabolism with mental deficiency. *Arch Dis Child* 1963; 38: 425–36.
29. Mudd SH, Skovby F, Levy HL et al. The natural history of homocystinuria due to  $\beta$ -synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985; 37: 26–31.
30. Rima R. *Homocysteine Metabolism: From Basic Science to Clinical Medicine*: Boston: Kluwer Academic Publisher, 1997; 37–42.
31. Soo-Sang K, Edward LP, Myunghee HK, Neal R. *Homocysteine Metabolism From Basic Scienceto Clinical Medicine*. Boston: Kluwer Academic, 1997; 43–9.
32. Skovby F. Homocystinuria. Clinical, biochemical and genetic aspects of cystathionine beta-synthase and its deficiency in man. *Acta Paediatr Scand* 1985; 321: 1–21.
33. Mudd SH, Edwards WA, Loeb PM, Brown MS, Laster L. Homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency; The effect of Pyridoxine. *J Clin Invest* 1970; 49: 1762–73.
34. 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.
35. Guttormsen AB, Schneede J., Fisherstrand T, Ueland PM, Refsum HM. Plasma concentration of homocysteine and other aminothiol compounds are related to food intake in healthy human subjects. *J Nutr* 1994; 124: 1934–41.
36. Guttormsen AB, Mansoor AM, Fiskerstrand T, Ueland PM, Refsum H. Assessment of homocysteine status. *J Inher Metab Dis* 1997; 20: 286–94.
37. Brattstrom L, Lindgren A, Israelson B, Andersson A, Hultberg B. Homocysteine and cysteine: determinants of plasma levels in middle-aged and elderly subjects. *J Intern Med* 1994; 236: 633–41.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. Bertino JR. Ode de methotrexate. *J Clin Oncol*. 1993; 11: 5-14. Allegrac CH, Fine RL, Drake JC, Chabner BA. The effect of metotrexate on intracellular folate pools in human MCF-7 breast cancer cells. Evidence for direct inhibition of purine synthesis. *J Biol Chem* 1987; 261: 6478–85.
43. Koblin DD. Toxicity of nitrous oxide. In: Rice SA, Fish KJ. *Anesthetic Toxicity*. Raven Press 1994, 135–55.
44. Rasmussen K, Moller J. Total homocysteine in clinical practice. *Ann Clin Biochem* 2000; 37: 627–48.
45. 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.
46. Velja Milatovic, and Marius J. van der Mooren. Homocysteine in Postmenopausal Women and the Importance of Hormone Replacement Therapy. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39 (8): 764–7.
47. Dastur DK, Dave UP. Effect of prolonged anticonvulsant medication in epileptic patients: serum lipids, vitamins

- B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> and folic acid, proteins and fine structure of the liver. *Epilepsia* 1987; 28: 147–59.
48. Blankenhorn DH, Malinow MR, Mack WJ. Colestipol plus niacin therapy elevates plasma homocysteine levels. *Coron Art Dis* 1991; 2: 357–60.
49. Hultberg B, Berglund M, Andersson A, Frank A. Elevated plasma homocysteine in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 17: 687–9.
50. Rasmussen K, Moller J. Total homocysteine in clinical practice. *Ann Clin Biochem* 2000; 37: 627–48.
51. 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.
52. Clarke R, Woodhouse P, Ullvik 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.
53. 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.
54. Moller J, Rasmussen K. Homocysteine in plasma: stabilisation of blood samples with fluoride. *Clin Chem* 1995; 41: 759–68.
55. Probst R, Brtandl R, Blumke M, Neumeier D. Stabilization of homocysteine concentration in whole blood. *Clin Chem* 1998; 44: 1567–9.
56. 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.
57. Mansoor MA, Svardal AM, Schneede J, Ueland PM. Dynamic relation between reduced, oxidized, and protein-bound homocysteine and other thiol components in plasma during methionine loading in healthy man. *Clin Chem* 1992; 38: 1316–21.
58. Bostom AG, Roubenoff R, Dellaripa P, Nadeau MR, Sutherland P, Wilson PW. Validation of abbreviated oral methionine-loading test. *Clin Chem* 1995; 41: 948–9.
59. Matthias Nauck, Emmanuel Bisse, Markus Nauck and Heinrich Wieland. Preanalytical Conditions Affecting the Determination of the Plasma Homocysteine Concentration. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 675–680.
60. Graeme J Hankey, John W Eikelboom. Homocysteine and vascular disease. *The Lancet* 1999; 354: 407–13.
61. Kang SS, Wong PW, Malinow MR. Hyperhomocysteinemia as risk factor for occlusive vascular disease. *Annu Rev Nutr* 1992; 43: 1279–98.
62. Pietrzik K, Bronstrup A. Causes and consequences of hyperhomocysteinemia. *Int J vitam Nutr Res* 1997; 67: 389–95.
63. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998; 49: 31–62.
64. Wu LL, Wu J, Hunt Sc, James BC, Vincent GM, Williams RR. Plasma homocysteine as a risk factor for early familial coronary artery disease. *Clin Chem* 1994; 40: 552–61.
65. Israelsson B, Brattstrom LE, Hultberg BL. Homocysteine and myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1988; 71: 227–33.
66. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 1999; 354: 407–13.
67. Jacobsen DW, Gatautis VJ, Green R, Robinson K, Savon SR, Secic M, Sylvia de Jong. Hyperhomocysteinemia in Patients with Peripheral Arterial Occlusive Disease. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 714–6.
68. Ubbink JB, Vermaak WJ, Delport R, van der Merwe, Becker PJ, Potgieter H. Effective homocysteine metabolism may protect South African black against coronary heart disease. *Am J Clin Nutr* 1995; 62: 802–8.
69. Vermaak WJ, Ubbink JB, Delport R, Becker PJ, Bissport SH, Ungerer JP. Ethnic Immunity to coronary Heart Disease. *Atherosclerosis* 1991; 89: 155–62.
70. Obeid OA, Mannan N, Perry G, Iles RA, Boucher BJ. Homocysteine in healthy east London Bangladeshis. *Lancet* 1998; 352: 1829–30.
71. den Heijer M, Keijzer MBAJ. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for Venous Thrombosis. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39 (8): 710–3.
72. Mirković D. Prospektivna studija o statusu homocisteina kod karakterističnih grupa pacijenata. *Jug Med Biochem* 2002; 2; 114.
73. Mirković D. »Potencijalni hemizmi uticaja homocisteina na nastanak bolesti vaskularnog sistema«. Peta godišnja naučna konferencija »Profesor Ivan Berkeš«. 22. novembra 2002 Beograd.

*Rad primljen: 25. 03. 2003*

*Prihvaćen za štampu: 16. 05. 2003*