

ULOGA HIPERHOMOCISTEINEMIJE U NASTANKU POSTOPERATIVNIH VASKULARNIH KOMPLIKACIJA

Bojan Vučinić¹, Dragče Radovanović^{2,3}, Dragan Čanović^{2,3}, Mladen Pavlović^{2,3}, Dejan Lazić^{2,3}, Marko Spasić^{2,3},

Bojan Milošević^{2,3}, Saša Dimić¹, Boban Mitrović¹

¹Kliničko-bolnički centar Kosovska Mitrovica

²Klinika za hirurgiju, Klinički centar „Kragujevac“, Kragujevac

³Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac

THE ROLE OF HYPERHOMOCYSTEINEMIA IN THE DEVELOPMENT OF POSTOPERATIVE VASCULAR COMPLICATIONS

Bojan Vucinic¹, Dragce Radovanovic^{2,3}, Dragan Canovic^{2,3}, Mladen Pavlovic^{2,3}, Dejan Lazić^{2,3}, Marko Spasic^{2,3},

Bojan Milosevic^{2,3}, Sasa Dimic¹, Boban Mitrovic¹

¹Clinical Hospital Center, Kosovska Mitrovica, Serbia

²Clinic for General and Thoracic Surgery, Clinical Center „Kragujevac“, Kragujevac, Serbia

³Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

SAŽETAK

Hiperhomocisteinemija se ubraja u nekonvencionalne faktore rizika kardiovaskularnog morbiditeta – uzročno-posledično je u oba smera povezana sa oksidativnim stresom, endotelnom disfunkcijom, ćelijskim signalnim mehanizmima i apoptozom. Brojne kliničke i eksperimentalne studije su objasnile mehanizme i kliničku ekspresiju protrombotičnog i aterosklerotičnog delovanja homocisteina. Osnovni patološki supstrat, prethodna terapija i sama hirurška intervencija povezani su sa stanjem oksidativnog stresa i endotelne disfunkcije, čiji je jedan od važnih činilaca povišen plazmatski nivo homocisteina. Novija istraživanja ukazuju na mogućnosti uspešnog korigovanja hiperhomocisteinemije, posebno sekundarne.

Ključne reči: komplikacije, postoperativne; homocistein; vaskularne komplikacije.

Vaskularne komplikacije (arterijska i venska tromboza) spadaju u najčešće i najznačajnije postoperativne komplikacije, što nameće potrebu za daljim istraživanjem njihovih etioloških činilaca, od kojih je hiperhomocisteinemija jedan od najznačajnijih. Cilj ove studije je da ukaže na nova saznanja o ulozi hiperhomocisteinemije u nastanku vaskularnih komplikacija u postoperativnom periodu, kao i na mogućnosti prevencije i lečenja. Studija je izvedena u obliku preglednog članka. Podaci su dobijeni pretragom medicinskih baza podataka (korišćeni su MEDLINE □ PubMed □ i Science Direct) i uvidom u relevantnu aktuelnu naučnu i stručnu literaturu i naučne i stručne časopise.

Hemijska struktura homocisteina otkrivena je 1932. godine. Carson i Neil su 1962. godine u prikazu slučaja opisali hiperhomocisteinemiju i hiperhomocisteinuriju kod dve mlade osobe sa mentalnom retardacijom. McCully je 1975. ukazao na udruženost hiperhomocisteinurije i tromboembolijskih procesa (1). Zatim su sprovedena dalja

ABSTRACT

Hyperhomocysteinemia is one of the unconventional risk factors of cardiovascular morbidity – it is causally associated in both directions with oxidative stress, endothelial dysfunction, mechanisms of cell signaling and apoptosis. Numerous clinical and experimental studies have explained the mechanisms and clinical expression of atherosclerotic and prothrombotic effects of homocysteine. The main pathological substrate, previous therapy, and surgical procedure-intervention itself are associated with the state of oxidative stress and endothelial dysfunction, which is one of important factors for elevated plasma homocysteine levels. Recent studies point to the possibility of a successful correction of hyperhomocysteinemia, especially secondary one.

Key words: complications, postoperative; homocysteine; vascular complications.

istraživanja koja ukazuju na povezanost hiperhomocisteinemije blagog do umerenog stepena i koronarne bolesti, kao i tromboembolijskih procesa.

Metabolizam homocisteina

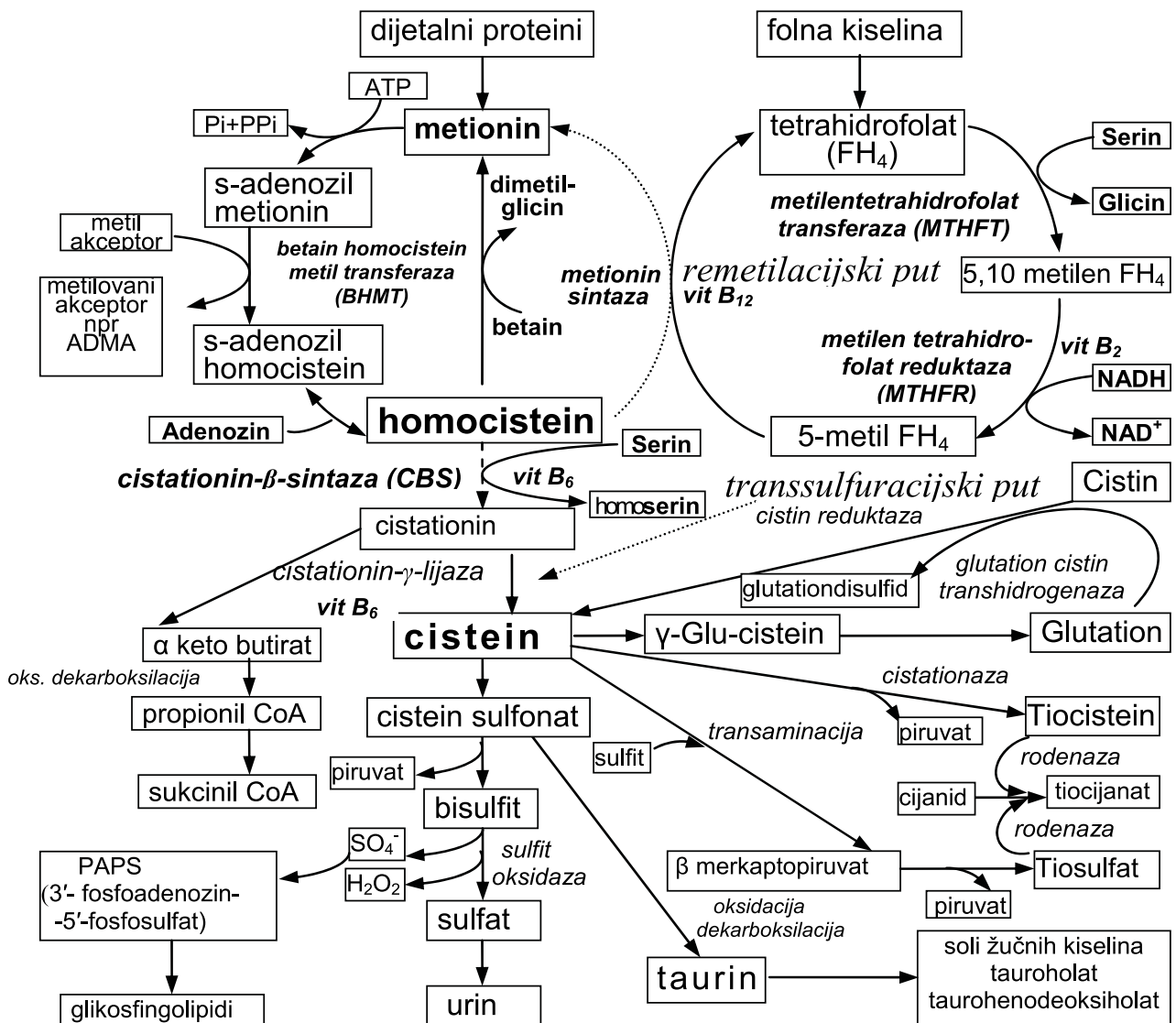
Homocistein je sulfhidrilna aminokiselina, koja ne ulazi u sastav peptida i proteina, ne unosi se alimentarnim putem, već nastaje iz esencijalne aminokiseline metionina. U procesu sinteze proteina od metionina nastaje S-adenozilmetionin (SAM), čijom dekarboksilacijom nastaje spermidin koji ima funkciju donora metil-grupe, pri čemu nastaje S-adenozilhomocistein (SAH), a od njega homocistein. Tako nastali homocistein metaboliše se preko dva metabolička puta: remetacionog (pri čemu se reverzibilno resintetiše metionin) i transsulfuracionog (pri čemu ireverzibilno nastaje cistein) (Slika 1). Remetilacioni put se odvija kroz više faza: homocistein dobija metil-grupu od 5-metiltetrahidrofolata prelazi u metionin u reakciji koja je katalizovana metionin sintazom

(MS), a ona je vitamin B12 zavisna. 5-metiltetrahydrofolat nastaje od folne kiseline u reakciji katalisanom metilen tetrahydrofolat reduktazom (MTHFR). Alternativni remetlacioni put odvija se u jetri gde betain (derivat holina) služi kao metil-donor. Transulfuracioni put se odigrava u uslovima povišenog nivoa metionina i sniženog nivoa cisteina. Homocistein sa serinom u reakciji kondenzacije gradi cistationin u reakciji koja je katalisana cistationin-β-sinatazom (zavisnom od piridoksina). Od cistationina delovanjem γ cistationinaze (piridoksin zavisne) nastaju cistein i α keto butirrat. Prekomerni cistein se oksidiše do taurina ili neorganskog sulfata koji se eliminiše urinom. Od cisteina mogu nastati različiti značajni metaboliti kao što su potentni antioksidans glutation, taurin, tiocistein i tiosulfat supstrati rodenaze kjučnog enzima u detosikaciji cijanida kao i 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfat (PAPS) značajan sa sintezu sfingolipida. Poremećaji transulfuracijskog puta dovode

do smanjene produkcije glutationa iz cisteina što ima za posledicu insuficijentnu antioksidativnu zaštitu.

Etiologija i patogeneza hiperhomocistinemije

Uzroci hiperhomocisteinemije mogu se načelno podeliti na genetske i negenetske. Jedan ili više genetskih ili stečenih poremećaja u metabolizmu homocisteina izaziva hiperhomocistinemiju i homocistinuriju. Različiti genetski defekti dovode do poremećaja različitog stepena u delovanju MTHFR (metilentetrahydrofolat reduktaze), MTHFT (metilentetrahydrofolat transferaze), BHMT (betain homocistein metiltransferaze) i CBS (cistation β sintaze) (2–5) (Tabela 1). Negenetski činioci koji utiču na homocisteinemiju jesu fiziološka i specifična stanja organizma, alimentarni faktori, životni stil, različita patološka stanja organizma i neki lekovi. Ovi faktori utiču pojedinačno ali i udruženo, čime se potvrđuje



Slika 1. Shematski prikaz metabolizma homocisteina

multikauzalnost i specifičnost patogeneze hiperhomocisteinemije.

1) Fiziološka i specifična stanja organizma kao što su životna dob, pol, graviditet, period rekonvalescencije utiču na plazmatski nivo homocisteina. Muškarci imaju viši nivo homocisteina nego žene, a za 25% nego predmenopauzalne žene. Posle menopauze razlika je manja, ali se održava i dalje u nešto manjem obimu. Nivo homocisteina raste sa starosnom dobi. Osobe starosne dobi preko 50 godina imaju i do 1,9 $\mu\text{mol/l}$ višu homocisteinemiju nego osobe mlađe dobi. Sa svakom decenijom homocisteinemija raste prosečno za 1 $\mu\text{mol/l}$, kod žena za 2,2 $\mu\text{mol/l}$, a kod muškaraca za 1,6 $\mu\text{mol/l}$. Postmenopauzne žene imaju viši plazmatski nivo homocisteina od predmenopauznih. Suplementacija estrogenima koriguje ovu razliku. Tokom graviditeta dolazi do pada plazmatske koncentracije homocisteina zbog hipoalbuminemije, s obzirom na to da je njegova dominantna komponenta vezana za albumin. Posle transplantacije bubrega i srca dolazi do povećanja plazmatskog nivoa homocisteina, što je u pozitivnoj korelaciji sa intenzitetom i trajanjem imunosupresivne terapije kortikosteroidima i ciklosporinom.

2) Alimentarni faktori

Alimentarni faktori kao što su deficit folne kiseline, piridoksina i kobalamina, kao i povećan unos metionina, pospešuju hiperhomocisteinemiju (6). Kod dve trećine pacijenata starije životne dobi sa hiperhomocisteinemijom utvrđena je pozitivna korelacija sa deficitom kobalamina, folne kiseline i piridoksina; 15% ispitanika starijih od 65 godina ima deficit kobalamina. U mlađoj životnoj dobi od ove izraženija je korelacija sa nivoom folne kiseline. Homocisteinemija je važan parametar u dijagnostikovanju megaloblastne anemije, tj. u detektovanju deficita folata jer je senzitivniji od hematoloških parametara kao što su makrocitoza, MCV (100 fl), hipersegmentacija polimorfonukleara ili direktno određivanje serumskog kobalamina, plazmatskog i eritrocitnog folata.

Tabela 1. Genski poremećaji sinteze homocisteina. MTHFR – metilentetrahidrofolat reduktaza; MTHFT – metilentetrahidrofolattransferaza; CBS – cistation β sintaza

Enzimski poremećaj	Genski poremećaj	Posledice	Terapija
MTHFR defekt (< 20% aktivnosti)	Homozigotna mutacija (retka)	Opasna hiperhomocistinemija u određenim uslovima	Supstitucija folne kiseline (vit. B9) (različita senzitivnost)
MTHFR deficijencija (< 50% aktivnosti)	Homozigotna C677T mutacija	Povećava bazalnu hiperhomocisteinemiju	
CBS defekt (< 2% aktivnosti)	Homozigotna mutacija	Opasna bazalna hiperhomocisteinemija Arterijska i venska okluzija	Piridoksin (vitamin B6) (različita senzitivnost)
CBS deficijencija (< 2% aktivnosti)	Heterozigotna autozomno recesivno	Porast homocistinemije posle opterećenja metioninom Preвременa aterosklerotska tromboembolija	
Hipofunkcija metionin sintaze	Poremećem metabolizam kobalamina (retka)	Intermedijarna do opasna bazalna hiperhomocistinemija	Kobalamin (vit. B12)

Diferenciranje deficita kobalamina u odnosu na deficit folata omogućuje nalaz povišene koncentracije metilmalonične kiseline kod deficita kobalamina. U deficitu kobalamina dolazi do deponovanja metiltetrahidrofolata i smanjenja ostalih derivata folata. Piridoksin je kofaktor cistation β sintaze od koje zavisi transulfuracioni put. Njegov deficit je ređi nego deficit kobalamina i folata jer se deponuje u jetri, a zastupljen je u hrani biljnog i životinjskog porekla. Javlja se u stanjima malnutricije, tj. malapsorpcije npr. u etilizmu (unos 1,5 g etanola po kg telesne mase dnevno t. m. / dan u trajanju dužem od pet godina) kao i u hepatopatijama. Deficit piridoksina izaziva poremećaj aktivnosti cistation β sintaze (transulfuracijskog puta) i hiperhomocistinemije posle opterećenja metioninom. Kod pacijenata sa kongenitalnom insuficijencijom cistation β sintaze uzimanje piridoksina koriguje hiperhomocisteinemiju u različitoj meri u zavisnosti od stepena ili nivoa genetskog defekta ali nikada do fiziološkog nivoa. Opservacione studije ukazuju na korelaciju između smanjenog nivoa piridoksalfosfata sa rizikom incidence de novo i rekurentnog venskog tromboembolizma (7). Suplementacija visokim dozama piridoksina smanjuje incidencu tromboembolizma kod pacijenata sa homocistinurijom. Povećan unos metionina preko hrane animalnog porekla povećava plazmatski nivo homocisteina i kod zdravih osoba, ali u manjem obimu u odnosu na one s predispozicijom.

3) Životni stil.

Hiperhomocisteinemija u etilizmu može biti permanentna (kod hepatopatije) ili prolazna kod akutnog etilizma bez razvijene hepatopatije. U hroničnom etilizmu plazmatski nivo homocisteina je i do dva puta viši nego kod neetilicara, što se objašnjava poremećajem metabolizma folata. Pušači imaju viši plazmatski nivo homocisteina nego nepušači. Sedanterni način života povezan je sa hiperhomocisteinemijom. Kobalamin je pretežno zastupljen u životnim namirnicama animalnog porekla.

4) Različita patološka stanja organizma.

Intolerancija glukoze, renalna insuficijencija, različiti maligniteti, hipotireoidizam, neki oblici psorijaze, akutna limfoblastna leukemija kao i primena nekih lekova povezani su sa hiperhomocisteinijom. Hiperhomocisteinija postoji kod pacijenata sa odmaklom dijabetesnom retinopatijom, a izraženija je kod udružene nefropatije kao i kod makroangiopatije. Endotelna disfunkcija povezana je sa povećanim koncentracijama von Willebrandovog faktora i homocisteina prisutna je kod pacijenata sa normalnom albuminurijom i incipijentnom nefropatijom. Hiperhomocisteinija je usko povezana sa terminalnom fazom renalne insuficijencije i povećanim rizikom od kardiovaskularnog komorbiditeta. Visok nivo homocisteina vezanog za proteine može sniziti nivo glomerularne filtracije, što dalje povećava hiperhomocisteiniju i predstavlja *circulus vitiosus*. Postoji direktna korelacija između homocisteinije, kreatininije i glomerularne filtracije. U stanju uremije proteinski vezan homocistein je povećan dok je slobodni normalan. Suplementacija folata koriguje nivo homocisteina ali ne u potpunosti zbog prisustva inhibitora folat konjugaze kod pacijenata na hemodijalizi. Suplementacija piridoksinom je još insuficijentnija. U stanju uremije dolazi do kompromitovanja i ekstrarenalnih enzima uključenih u metabolizam homocisteina. Ledirane tubularne ćelije dovode do neadekvatne transulfuracije u katabolizmu homocisteina. Patološka stanja digestivnog trakta ahlorhidrija, deficit intrinzič faktora, insuficijencija egzokrinog pankreasa, inflamatorna bolest creva, stanja posle hirurških procedura na želucu i crevima dovode do malapsorpcije kobalamina, ali i drugih faktora povezanih sa metabolizmom homocisteina. Lekovi kao što su metotreksat, fenitoin i sulfsalazin smanjuju nivo folata i narušavaju funkciju enzima uključenih u metabolizam homocisteina. Homocisteinija je senzitivni indikator antifolatnog delovanja metotreksata. Fenitoin i karbamazepin dovode do poremećaja metabolizma folata. Primena anestetičkih gasova azot-monoksida (NO) i azot-suboksida (N₂O) izaziva povećanje nivoa homocisteina. Azot-monoksid inaktivira metioninsintazu jače od azot-suboksida. Azot-suboksid (N₂O) dovodi do inaktivisanja metioninsintaze usled interakcije sa kobalaminom, kao i zbog inaktivisanja metilmalonil-CoA pri čemu nastaje deponovanje 5-metiltetrahidrofolata i deplecija folata urinom. Azauridin kao antagonist piridoksina uzrokovao je hiperhomocisteiniju i vaskularne poremećaje zbog čega više nije u primeni. L-dopa se metaboliše O-metilacijom do 3-O-metil-dope pod uticajem katehol-O-metiltransferaze, a kao donor metil grupe je S-adenozilmetionin što dovodi do povećanja S-adenozilhomocisteina. Suplementacija estrogena kod postmenopausalnih žena dovodi do korekcije hiperhomocisteinije. Hipotireoidizam i deficit estrogena su povezani sa hiperhomocisteinijom. Neke

studije ukazuju na to da bezafibrat i fenofibrat povećavaju palzmatšku koncentraciju homocisteina. Primena folne kiseline i kobalamina sa fenofibratom redukuje nivo homocisteina. Neke studije ukazuju na to da metformin potencira stanje hiperhomocisteinije.

Patofiziološki mehanizmi lezija nastalih u hiperhomocisteiniji

Hiperhomocisteinija patološko delovanje ispoljava direktno delujući na sulfhidrilne grupe, tj. disulfidne mostove različitih molekula i indirektno indukujući oksidativni stres (2). Kao rezultanta ovih delovanja nastaju morfološke i funkcionalne lezije, endotelna disfunkcija sa svim njenim posledicama (vazospazam, arterijska i venska tromboza, embolija, ishemija), kao i morfološke i funkcionalne promene vezivnog tkiva sa uticajem na ćelijsku proliferaciju i apozu. U stanju hiperhomocisteinije suvišni homocistein podleže delovanju metionil RNA sintaze (methionyltRNA synthetase – MetRS), pri čemu nastaje visokoreaktivni homocistein tiolakton (Hcy-thiolactone). On se vezuje za različite tirole, tj. proteine u organizmu koji sadrže cistein, odnosno cistin, tj. za disulfidne veze (mostove) koje grade molekule cisteina u procesu koji je poznat kao N-homocisteinilacija, gradeći N-Hcy proteine. Ovako modifikovani proteini mogu biti: proteini plazme, lipoproteini, proteini vezivnog tkiva. Nivo anti-N-Hcy-protein antitela koreliše sa nivoom CRP-a, što ukazuje na proinflamatorno delovanje Hcy-ptoteina. N-Hcy-albumin povećava vezivanje monocita za ćelije endotela i indukuje ekspresiju proinflamatornih citokina VCAM1, ICAM1 i MCP1 na monocitima i ćelijama endotela N-Hcy-albumin dovodi do disregulacije mnogobrojnih gena, uključujući i pet odgovornih za aktivaciju endotela kao što su: CCL2, HSPD1, ADAM 17, TFP1 i NRPI. Identifikovano je mesto N-homocisteinilacije na mestu Lys562 na nestrukturisanom regionu (na koje se vezuju plazmin i tPA) protrombogenom N-Hcy fibrinogenu, koji se akumulira u cirkulaciji kod CBS deficitentnih pacijenata. On kompromituje fibrinolizu kod ovih pacijenata. N-Hcy LDL je visoko imunogen i biva znatno brže preuzet makrofazima nego nativni LDL. Apolipoprotein A (apo[s]) vezuje se disulfidnim mostovima za apoB-100 LDL-a. Apo (a) pokazuje homologiju sa plazminogenom i vezuje se za plazminom modifikovanu površinu fibrina. Tropoelastin je značajan za arhitektoniku vezivnog tkiva stabilise vlakna elastina, a njegovo izlaganje himocisteinu ne izaziva značajan poremećaj funkcije iako sadrži jedan disulfidni most. Kolagen je dominantna komponenta vezivnog tkiva i čini oko 25–30% ukupnih proteina organizma. Lizinski ostaci kolagena uključeni su u formiranje kovalentnih intramolekularnih unakrsnih piridinolinskih veza, što je od ključnog značaja za strukturu i stabilnost kolagena. H-homocisteinilacija

lizinskih ostataka preko Hcy tiolaktona narušava fiziološku strukturu i funkciju kolagena. Homocistein dovodi do poremećaja vezivnog tkiva utičući na kolagen, fibriline i fibronektin. Povećava rastvorljivost kolagena, utiče na njegovu sintezu i unakrsno povezivanje. Fibrilini (fibrilin-1, fibrilin-2, fibrilin-3) kalcijum vezujući glikoproteini molekulske mase 340 kDa glavne su komponente mikrofibrila promera 10–12 nm ekstracelularnog matriksa. Fibrilin-1 je najbogatiji cisteinskim ostacima (sadrži 13,4%), što predstavlja osnovu za uticaj homocisteina na disulfidne mostove cisteinskih rezidua koje redukuje. Ovaj proces postoji u Marfanovom sindromu (uzrokovan mutacijom gena za fibrilin-1) i hiperhomocisteinemiji. Osim što redukuje disulfidne veze, homocistein redukuje i kalcijum vezujuće domene na fibrilinu. Ovako modifikovani fibrilin deponuje se u dermalnim fibroblastima. Histopatološki nalazi pacijenata sa aneurizmatiskim proširenjima pokazuju razdvajanje vlakana elastina u glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova. U Marfanovom sindromu funkcija fibrilina-1 je poremećena usled genskog defekta, a u hiperhomocisteinemiji zbog sekundarne reakcije sa homocisteinom. Fibronektin se u organizmu nalazi u slobodnom obliku sintetisan u hepatocitima i vezanom u mezenhimalnim ćelijama. Stabiliše kolagen tipa I i III, trombospondin-1, fibulin-1 i LTBP-1. Celularni fibronektin sadrži više od 60 cisteinskih ostataka vezanih disulfidnim mostovima formirajući intralanačane disulfide. Homocistein se veže za ove mostove u procesu S-homocisteinmetilacije. Ovaj proces može biti reverzibilan pod dejstvom redukujućeg agensa 2-merkaptetanola. Masena spektrometrija ukazuje na to da se homocisteinilacija dešava na N i C terminalnim domenima, ali ne na kolagen vezujućem regionu. Ovim procesom kompromitovano je vezivanje fibronektina na ćelije de novo kao i na fibrin dok je vezivanje za kolagen suficijentno. Vezivanje Hcy na faktor V koagulacije uzrokuje njegovu rezistenciju na inaktivaciju proteinom C, a može se inhibisati β-merkaptetanolom koji može istisnuti već vezani homocistein. Aneksin A2 je kalcijumom regulisani i fosfolipid vezujući protein značajan za fibrinolitički proces koji podleže uticaju homocisteina. Aneksin A2 je endotelni koreceptor za plazminogen i tkivni aktivator plazminogena (tissue plasminogen activator – TPA), koji katališu aktivnost plazmina. Homocistein inhibiše vezivanje TPA i plazminogena na aneksin A2. Tretman 2-merkaptetanolom uspostavlja receptorsku funkciju aneksina 2 (3, 4).

Oksidativni stres i endotelna disfunkcija uzrokovani hiperhomocisteinemijom

Homocistein uzrokuje oksidativni stres preko više mehanizama: povećanom produkcijom slobodnih

reaktivnih radikala, atenuacijom antioksidativnih sistema, direktnim citotoksičnim delovanjem na endotel i proinflamatornim delovanjem. U stanju hiperhomocisteinemije slobodne reaktivne vrste nastaju usled: autooksidacije homocisteina, produkcije H₂O₂ u katabolizmu homocisteina. Homocistein COOHCH(CH₂CH₂SH)NH₂ kao slobodna aminokiselina može biti u redukovanom (kao tiol SH) ili oksidovanom obliku (kao simetrični disulfid homocistin RSSR). U plazmi dominira tiolni, tj. redukovani oblik homocisteina koji lako podleže oksidaciji, pri čemu dva redukovana molekula daju disulfid, dva H⁺ i dva e⁻.



U prisustvu jona metala i kiseonika može doći do autooksidacije homocisteina pri čemu nastaju superoksidni i hidroksilni anjoni, vodonik-peroksid i tiolni slobodni radikali kao npr. homocistein tionolakton (ciklizovani oblik homocisteina). Tioli u prisustvu jona gvožđa iniciraju lipidnu peroksidaciju, produkciju hidroksilnog radikala i oksidativno modifikovanih proteina. Hidroksil radikali (OH⁻, OH[•]) i superoksidni anjon (O₂^{-•}), pod dejstvom superosid dismutaze ili spontano, konvertuju se u H₂O₂. Efekti navedenog procesa su favorizovani ihibišućim delovanjem homocisteina na ekspresiju glutation peroksidaze (Gpx-1) antioksidativnog enzima koji redukuje vodonik-peroksid do vode. Regulacija oksidacije sumpornih aminokiselina važna je za zaštitu integriteta ćelije. Navedeni radikali mogu redukovati Cu²⁺ ceruloplazmina u Cu⁺, što dovodi do oksidacije LDL jer izostaje protektivni efekat Cu²⁺. Hiperhomocisteinemija (> 100 μmol/l) stimuliše oksidaciju LDL-a preko oksidacije Cu²⁺ ceruloplazmina.

Atenuacija antioksidativnih sistema u hiperhomocisteinemiji

Homocistein inhibiše sintezu i aktivnost antioksidativnih faktora i dovodi do njihovog iscrpljivanja povećanom produkcijom slobodnih reaktivnih radikala. Poremećaji transulfuracijskog puta dovode do smanjene produkcije glutationa iz cisteina. Homocistein inhibiše ekspresiju glutation peroksidaze (Gpx-1) antioksidativnog enzima koji redukuje vodonik-peroksid do vode. Homocistein u koncentraciji od 50 μmol/l specifično inhibiše produkciju i aktivnost glutation peroksidaze. Slobodni reaktivni radikali reaguju sa različitim solubilnim antioksidansima. Homocistein indukuje konverziju azot-monoksida (NO[•]) u peroksinitrit (ONOO⁻) (5). Endotelna disfunkcija uzrokovana hiperhomocisteinemijom nastaje usled: direktnog citotoksičnog delovanja na ćelije endotela, stimulacije apoptoze endotelnih ćelija, stimulacije proliferacije vaskularnih glatkih mišićnih ćelija (vessel smooth muscle cells – VSMC), smanjuje antioksidativnu zaštitu endotela

smanjujući ekspresiju ćelijske mRNA gutationproksidaze na endotelocitima, redukcije biorasploživosti ključnih kofaktora endotelne azot-monoksid sintetaze (eNOS) kao što je tetrahidrobiopterin (BH4), povećanja produkcije i smanjena razgradnje asimetričnog dimetilarginina (asymmetrical dymetil arginine – ADMA) (8). ADMA nastaje pri konverziji s-adenozil metionina u s-adenozil homocistein pod katalitičkim dejstvom betain homocistein metil transferaze (BHMT). ADMA je snažan inhibitor endotelne azot-monoksid sintetaze (eNOS) jer dovodi do njenog nespregavanja, pri čemu umesto protektivnog azot-monoksida dolazi do produkcije slobodnih reaktivnih vrsta kao što je superoksidni anjon. Asimetrični dimetilarginin se katabolizuje pod dejstvom dimetilarginin dimetilaminohidrolaze (dimethylarginine dimethylaminohydrolase – DDAH), koju snažno inhibiše homocistein. Postoji pozitivna korelacija između nivoa ADMA i visokoreaktivnog C proteina: delovanjem na homeostazu lipida organizma (stimuliše sintezu holesterola indukcijom HMGCoA (povećanjem sinteze njene mRNK), povećava oksidaciju LDL, proinflamatornim delovanjem (postoji pozitivna korelacija između nivoa homocisteina i C reaktivnog proteina), delovanjem na strukturu i funkciju vezivnog tkiva (9). Kao rezultanta navedenih mehanizama nastaje endotelna disfunkcija koja se klinički ispoljava vazospazmom, trombotičnom dijatezom, metaboličkim i imunološkim poremećajima. Važna determinanta endotelne (dis)funkcije je biorasploživost azot-monoksida (NO). Smanjena biorasploživost azot-monoksida u stanju hiperhomocisteinemije nastaje usled: smanjene produkcije, povećane potrošnje usled reakcije sa slobodnim reaktivnim radikalima (superoksidni anjon nastao autooksidacijom homocisteina reaguje sa azot-monoksidom gradeći peroksinitrit, u reakciji S-nitrozilacije homocisteina, pri čemu nastaje manje toksičan S-nitrozohomocistein, koji može imati ograničeno vazodilatatorno delovanje, uzrokuje inhibiciju trombocita bez produkcije vodonik-peroksida). Kratkotrajno izlaganje endotela (manje od 15 minuta) umereno povišenim koncentracijama homocisteina stimuliše eNOS (oslobodeni NO neutrališe homocistein, pri čemu nastaje S-nitrozohomocisteina i drugi RSNO), dok dugotrajno delovanje visokih koncentracija deluje supresivno (dolazi do iscrpljivanja detoksikacionog mehanizma), što ukazuje na postojanje dinamičke ravnoteže između aktivnosti eNOS i plazmatske koncentracije homocisteina.

Protokom posredovana vazodilatacija (flow mediated vasodilatation – FMVD) znatno je niža kod starijih ispitanika sa hiperhomocisteinemijom, kao i kod prethodno zdravih ispitanika koji su opterećeni metioninom. Dokaz da je ona uzrokovana oksidativnim stresom rezultat je istraživanja koje pokazuje da se smanjena FMVD može prevenirati ako ispitanik nedelju

dana pre opterećenja metioninom uzima terapijske doze askorbinske kiseline. Porast koncentracije koagulacionih markera posle opterećenja metioninom može se prevenirati prethodnom primenom askorbata i tokoferola. Primena folne kiseline i kobalamina u trajanju od osam nedelja kod pacijenata sa koronarnom bolešću poboljšava FMVD i smanjuje nivo homocisteina u poređenju sa placebom.

Hronično povećan unos metionina preko npr. crvenog mesa može dovesti do endotelne disfunkcije. Folna kiselina poboljšava FMVD korekcijom nivoa homocisteina i povećanjem biorasploživosti BH4. Navedeni mehanizmi su ustanovljeni studijama sprovedenim u *in vitro* i *in vivo* uslovima.

Protrombotično delovanje homocisteina

Homocistein uzrokuje trombotičnu dijatezu delovanjem na: endotel, trombocite, solubilne faktore koagulacije, trombolizu i vezivno tkivo (10). Protrombotično delovanje ostvaruje pretežno preko endotelne disfunkcije tako što: smanjuje biorasploživost NO i prostaciklina, povećava koncentraciju i indukuje aktivnost endotelnog tkivnog faktora, povećava endotel zavisnu aktivnost faktora V koagulacije, smanjuje inaktivaciju aktivisanog faktora V aktivisanim proteinom C, povećava nivo faktora VIII koagulacije, stimuliše aktivaciju faktora X koagulacije, inhibiše vezivanje antitrombina III za endotel i heparan sulfat, smanjuje broj vezujućih mesta za tkivni aktivator plazminogena na endotelu preko delovanja na aneksin A II, smanjuje sintezu i koncentraciju trombomodulina na ćelijskoj površini i aktivaciju proteina C, modifikuje afinitet apo(a) za plazminom modifikovani fibrin, inhibiše fibrinolizu stimulišući vezivanje lipoproteina na fibrin, stimuliše aktivaciju i agregaciju trombocita.

Homocistein učestvuje u restenozii nakon perkutanih endovaskularnih procedura kao što su balon angioplastika i plasiranje stentova. On neograničeno stimuliše neointimalnu hiperplaziju, abnormalno remodelovanje, endotelne oksidativne lezije, proliferaciju VSMC i trombozu. Ispitivanja na eksperimentalnim životinjama pokazala su da hiperhomocisteinemija uzrokovana dijetom smanjuje reendotelizaciju nakon balon angioplastike karotidne arterije, koja se može stimulisati primenom folne kiseline. Hiperhomocisteinemija preko prooksidativnog, proinflamatornog i protrombotičnog delovanja dovodi do destabilizacije plaka i njegove rupture. Plazmatski nivo homocisteina ima prediktivni značaj, jer korelira sa plazmatskim markerima tromboze kao i sa koncentracijom troponina T kod pacijenata sa akutnim koronarnim sindromom. Sa maksimalnom koncentracijom troponina T korelira koncentracija ukupnog homocisteina.

Klinička slika hiperhomocisteinemije

Hiperhomocisteinemija pored kardiovaskularnih poremećaja dovodi do dislokacije očnog sočiva, osteoporoze, povećanja koncentracije S-adenozilhomocisteina i deficita adenoza sa posledičnom sklonošću epileptičnim napadima i oštećenjem kognitivnih funkcija (11-15). Kod primarne hiperhomocisteinemije klinička slika je teža, kompleksnija i javlja se u ranom detinjstvu. Patološki nalazi pokazuju posledice poremećaja vezivnog tkiva kao što su poremećaj strukture i arhitektonike sa razaranjem zonularnih vlakana očnog sočiva, defektu osteogenezu, multiple infarkte CNS-a, aneurizmatiska proširenja arterija itd. Poremećaj CBS (cistation β sintaze) ispoljava se kod starije dece mentalnom retardacijom (IQ oko 65), psihičkim smetnjama, epileptičnim napadima, ekstrapiramidnim simptomima, dislokacijom očnog sočiva, trombotičnom dijatezom i skeletnim poremećajima. Postoji različita senzitivnost na primenu piridoksina. Skeletni poremećaji uključuju osteoporozu i spontane frakture kičmenih pršljenova, slični su onim opisanim kod Marfanovog sindroma kao što su: visoko zakrivljeno nepce, *pectus excavatum* ili *carinatum*, *genu valgum*, *pes cavus* ili *planus*, skolioza. Marfanov sindrom nastaje zbog autozomnodominantnog genskog poremećaja za fibrilin-1 i fibrilin-2, dok su promene kod hiperhomocisteinemije uzrokovane homocisteinilacijom fibrilina. Tromboembolizam je glavni uzrok morbiditeta i većinski relativno visokog preranog mortaliteta. Tromboza je opisana u svim arterijama i venama: cerebralnim, koronarnim, mezenteričnim, renalnim i perifernim. Oko 50% venskih tromboza povezano je sa plućnim embolusima. Postoji visok rizik postoperativnih i postpartalnih tromboza. Prisutna je vaskularna degeneracija sa nastankom arterijskih aneurizmi. Kod deficita metilen tertrahidrofolat reduktaze (MTHFR) dominantni su neurološki poremećaji sa psihomotornom retradacijom, epileptičnim napadima, poremećajima hoda i psihičkom nestabilnošću. Postoji visok rizik za vaskularni morbiditet. Patološki nalazi pokazuju dilataciju ventrikula i malu težinu CNS-a, kalcifikaciju bazalnih ganglija, trombozu u arterijama i venama. Prisutna je demijelinizacija kao i kod deficita kobalamina. Kod deficijencije metionin sintaze prisutni su: razvojni poremećaji, megaloblastna anemija, demencija i spastičnost. Opisani su i degeneracija retine, oštećenje srca i hemoliza. Kod sekundarne hiperhomocisteinemije dominantni su poremećaji kardiovaskularnog sistema: arterijska hipertenzija, trombookluzive lezije, vazospastički poremećaji itd.

Hiperhomocisteinemija ima veliku ulogu u nastanku postoperativnih vaskularnih komplikacija zbog sledećih uzroka: terapija osnovne bolesti zbog koje je indikovano operativno lečenje može uzrokovati

hiperhomocisteinemiju (primena kortikostroida, alkilirajućih agenasa, određenih citostatika, hipolipemičkih sredstava), stanje pacijenta pre operacije npr. stanje malnutricije, terapija pridruženih bolesti (antiepileptici, hipoglikemijski i hipolipemijski lekovi), anestezija sa primenom azotnih oksida povećava plazmatski nivo homocisteina, sama hirurška procedura preko fizičke lezije tkiva podstiče stanje inflamacije i osidativnog stresa sa posledičnom endotelnom disfunkcijom, što dovodi do stanja smanjene produkcije i povećane potrošnje antioksidanasa čije protektivno delovanje u odnosu na delovanje homocisteina izostaje.

Terapija hiperhomocisteinemije

Cilj terapije hiperhomocisteinemije kod pacijenata sa indikovanim operativnim lečenjem jeste da se: koriguje enzimski poremećaj i time smanji produkcija homocisteina, stimuliše vezivanje i eliminacija već produkovanog homocisteina, smanji produkcija i eliminišu slobodne reaktivne vrste kao i metaboliti nastali u metabolizmu i delovanjem homocisteina, stimulišu fiziološke funkcije endotela, koriguju toksični efekti homocisteina i njegovih metabolita.

Za korekciju enzimskih defekata primenjuju se folna kiselina (vitamin B₉), kobalamin (vitamin B₁₂) kofaktori remetilacijskog puta, betain supstrat alternativnog remetilacijskog puta i piridoksin (vitamin B₆) kofaktor transulfuracijskog puta. Supstance sa sulfhidrilnim grupama koje vezuju homocistein istiskuju ga sa različitih molekula koje su podlegle s-nitrozilaciji i podstiču njegovu eliminaciju iz organizma. Supstance sa antioksidativnim delovanjem neutrališu i koriguju efekte slobodnih reaktivnih vrsta i poboljšavaju endotelnu funkciju. Najčešće primenjivane su: α lipo(i)nska kiselina, askorbat, tokoferol, polifenoli. Za uklanjanje delovanja metabolita čiju sintezu stimuliše homocistein koriste se antioksidansi, ACE inhibitori, antagonisti angiotenzinskih AT1 receptora, β blokatori, selektovani lekovi sa hipolipemičkim i hipoglikemičkim delovanjem. Ovi lekovi se pored ostalih indikacija koriste i za terapiju endotelne disfunkcije uzrokovane asimetričnim dimetilargininom.

Fiziološka uloga piridoksina (vitamina B₆) u metabolizmu homocisteina: u obliku piridoksal 5 fosfata kao kofaktor cistationin- β -sintaze (CBS) uključen je u produkciju cistationina iz homocisteina (transulfuracijski put), kofaktor je cistationin- γ -lijaze koja katališe konverziju cistationina u α keto butirat, neophodan je za sintezu 5,10 metilentetrahidrofolata (5,10 MTHF) iz tetrahidrofolata (THF). Primenjuje se u obliku piridoksin pidolata, piridoksal fosfata, piridoksin hidrohlorida, piridoksamin hidrohlorida, a uobičajena dnevna doza za odrasle iznosi 100 mg. Maksimalna dnevna doza za

odrasle može biti do 170 mg/dan. Perifernu senzornu neuropatiju uzrokovala je pojedinačna doza od 500 mg/dan ili prolongirana primena u dozi od 200 mg/dan. Folna kiselina, pteroilmonoglutaminska kiselina (vitamin B₉, vitamin B₁₁) sa vitaminom B₁₂ uključena je u remetilaciju homocisteina u metionin. Folna kiselina omogućuje transfer jedne karbonske grupe sa S-adenozilmetionina (SAM) na različita organska jedinjenja, što je povezano sa sintezom različitih makromolekula (npr. purina) i integralnim ćelijskim procesima kao što su ćelijski rast i proliferacija. Minimalni dnevni dijetalni unos je 50 µg/dan, preporučena terapijska dnevna doza je 400 µg/dan za odrasle, a tokom trudnoće do 600 µg/dan. Opsežne metaanalize ukazuju na to da u tretmanu hiperhomocisteinemije treba primeniti doze folne kiseline od 800 µg/dan ili više. Folinska kiselina (5-formil-THF) je redukovani oblik folne kiseline. Primenjuje se u obliku kalcijum ili natrijum folinata u prevenciji toksičnosti inhibitora dihidrofolat reduktaze (onemogućena je redukcija folata u tetrahidrofolat) prvenstveno metotreksata, ali i antibiotika trimetoprima i pirimetamina, fluorouracila. Kalcijum folinat se primenjuje: per os, paraenteralno (im. iv. inj, iv. inf.) Maksimalna doza kalcijum folinata per os je 50 mg/dan za odrasle. Natrijum folinat samo parenteralno. Kod cerebralne deficijencije folata primenjena je per os doza kalcijum folinata od 0,5 do 1 mg/kg/dan sa značajnim kliničkim uspehom. Kobalamin (vitamin B₁₂) – kofaktor metioninsintaze primenjuje se u obliku cijanokobalamina i hidroskobalamina. Pored i. m. injekcija cijanokobalamin se može primeniti i per os. Doze im. primenjenog hidroskobalamina za odrasle kod deficita kobalamina iznose od 250 do 1.000 µg naizmenično tokom dve nedelje.

Kod dece sa homocistinurijom starije od mesec dana inicijalna doza koja se primenjuje i. m. iznosi 1 mg dnevno u toku 5–7 dana, koja se redukuje na 1 mg jednom do dva puta nedeljno u zavisnosti od efekta. Neka deca reaguju na doze od 5 do 10 mg jednom do dva puta nedeljno u toku meseca.

Holin (vitamin J) može funkcionisati kao metil donor u metabolizmu homocisteina. Preporučeni dnevni unos za odrasle je 425 mg za žene i 550 mg za muškarce. Terapijske doze u terapiji hiperhomocisteinemije iznose i do 3,5 g na dan. Betain, trimetilglicin je oksidovani oblik holina. On je supstrat betain homocistein metil transferaze (BHMT) pri čemu služi kao metil donor. Najčešće primenjivana doza kod odraslih je 6 g/dan u dve doze. U zavisnosti od nivoa homocisteina može se ordinirati do 20 g/dan. Preporučena doza za decu do tri godine je 100 mg/kg/dan u dve doze. Kod pacijenata sa CBT deficijencijom moguća je hipermetioninemija i edem mozga, što nalaže periodičnu primenu betaina.

Rezultati kliničkih i eksperimentalnih studija pokazali su različitu efikasnost pojedinačne primene vitamina kao kofaktora kod enzimskih defekata kao i politerapiju kod sekundarnih hiperhomocisteinemija. Neosporno je dokazan benefit kombinovane terapije navedenim vitaminima i antioksidansima u prevenciji kardiovaskularnih lezija. Primena folne kiseline i kobalamina koriguju endotelnu disfunkciju kod pacijenata sa koronarnom bolešću. Folna kiselina i piridoksin smanjuju incidencu pozitivnog stres EKG-a kod pacijenata sa blagom i promenljivom hiperhomocistinemijom. Pacijenti tretirani folnom kiselinom, piridoksinom i kobalaminom pokazuju značajnu regresiju zone karotidnog plaka pri smanjenju plazmatskog nivoa homocisteina ispod 14 µmol/l. Kod pacijenata sa transplantovanim bubregom hiperhomocisteinemija je korigovana suplementacijom folnom kiselinom (doza 5 mg/dan), piridoksinom (50 mg/dan) i kobalaminom (50 µg/dan). Suplementacija holinom dovodi do smanjenja hiperhomocisteinemije uzrokovane opterećenjem metioninom.

Piridoksin primenjen per os rapidno smanjuje plazmatski nivo metionina i homocisteina skoro do normalne vrednosti. U početku tretmana kod odraslih i starije dece treba primeniti doze 150 do 300 mg/dan, zatim smanjivati u zavisnosti od efekta. Suplementacija cisteina može imati benefita kod pacijenata koji su delimično senzitivni na piridoksin. Sinhrona primena folne kiseline (5 do 10 mg/dan) i betaina (preko 12 g/dan) može sniziti plazmatski nivo homocisteina, ali posiviti nivo metionina.

Tretman deficita metilentetrahidrofolat reduktaze: betain primenjen u visokim dozama smanjuje homocisteinemiju uz porast metioninemije. Ostali protokoli podrazumevaju kombinovanu primenu folne (folininske) kiseline koabalamina i piridoksina. Tretman deficijencije metionin sintaze podrazumeva kobalamin u visokim dozama, betain i folna (folinska) kiselina. Kod novorođenčadi sa hiperhomocisteinemijom restrikcija hrane bogate metioninom i suplementacija betaina preveniraju nastanak mentalne retardacije, dok primena piridoksina kod piridoksin senzitivnih prevenira tromboembolizam. Ishrana bogata žitaricama koje sadrže visok nivo folata doprinosi korekciji hiperhomocisteinemije. Sulfhidrilna jedinjenja: farmakološki aktivna sulfhidrilna jedinjenja imaju slobodnu sulfhidrilnu grupu koja im omogućuje da grade disulfide u plazmi, što čine i sa homocisteinom, čime snižavaju njegovu koncentraciju. Najpoznatija su: dimetilcistein (D-penicilamin), N-acetilcistein i 2-merkamptoetan sulfonat. Ova jedinjenja imaju ograničenu primenu u terapiji hiperhomocisteinemije. Dimetilcistein (D-penicilamin) koristi se kao helirajuće sredstvo kod različitih intoksikacija, kao imunosupresiv u terapiji reumatoidnog artritisa i sklerodermije. U tretmanu intoksikacija per os

doza za odrasle je do 2 g na dan, a za decu do 20 mg/kg na dan. Tiopronin [N-(2-Merkaptopropionil) glycin] sličan dimetilcisteinu primenjen u terapiji reumatoidnog artritisa može sniziti nivo homocisteina u plazmi stimulišući njegovu renalnu ekskreciju. N-acetil cistein pored mukolitičkog delovanja ima i antioksidativno delovanje koje ostvaruje kao prekursor glutationa. On povećava frakciju slobodnog homocisteina koji podleže renalnoj ekskreciji. Per os doza za odrasle je do 600 mg/dan. 2-merkamptoetan sulfonat najčešće se koristi u obliku natrijum-2-merkamptoetan sulfonata kao hemoprotektor koji inhibiše toksične efekte alkilirajućih agenasa ifosfamida i ciklofosfamide koji dovode do lediranja urotela i uzrokuju hemoragični cistitis preko produkcije akroleina i 4-hidroksifosfamida. U dozi od 70 do 100 mg/kg primenjen i. v. ne uzrokuje neželjena dejstva na kostnu srž, CNS, renalnu i hepatičnu funkciju. Doziranje kod primene ifosfamida sprovodi se prema utvrđenim protokolima.

ZAKLJUČAK

Rezultati dobijeni tokom prikupljanja podataka pokazuju da je hiperhomocisteinemia važan faktor rizika za nastanak postoperativnih vaskularnih komplikacija. Terapija primenjena pre i u toku hirurške intervencije može uzrokovati ili pogoršati stanje hiperhomocisteinemije. Hiperhomocisteinemia uticajem na sintezu vezivnog tkiva kompromituje njegovu strukturu i arhitektoniku čime nepovoljno utiče na proces regeneracije i zarastanje rana, dovodi do nastanka morfoloških lezija vaskularnog zida (aneurizme). Hiperhomocisteinemia je stanje nastalo usled urođenih ili stečenih poremećaja koje se može korigovati adekvatnom terapijom.

LITERATURA

- Lupoli R, Di Minno A, Spadarella G, et al. Methylation reactions, the redox balance and atherothrombosis: the search for a link with hydrogen sulfide. *Semin Thromb Hemost* 2015; 41: 423–32.
- Gurda D, Handschuh L, Kotkowiak W, Jakubowski H. Homocysteine thiolactone and N-homocysteinylated protein induce pro-atherogenic changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Amino Acids* 2015; 47: 1319–39.
- Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 1996; 98: 5–7.
- Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Homocysteine and glutathione peroxidase-1. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 1923–40.
- Handy DE, Zhang Y, Loscalzo J. Homocysteine down-regulates cellular glutathione peroxidase (GPx1) by decreasing translation. *J Biol Chem* 2005; 280: 15518–25.
- McCully KS. Homocysteine, vitamins, and vascular disease prevention. *Am J Clin Nutr* 2007; 86: 1563S–8S.
- Hron G, Lombardi R, Eichinger S, Lecchi A, Kyrle PA, Cattaneo M. Low vitamin B6 levels and the risk of recurrent venous thromboembolism. *Haematologica* 2007; 92: 1250–3.
- Carluccio MA, Ancora MA, Massaro M, et al. Homocysteine induces VCAM-1 gene expression through NF-κB and NAD(P)H oxidase activation: protective role of Mediterranean diet polyphenolic antioxidants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: 2344–54.
- Ekim M, Sekeroglu MR, Balahoroglu R, Ozkol H, Ekim H. Roles of the oxidative stress and ADMA in the development of deep venous thrombosis. *Biochem Res Int*. 2014; 2014:703128.
- Lech M, Kościelniak B, Bryk A, Undas A. Determinants of the elevated factor VIII activity in patients following venous thromboembolism. *Przegl Lek* 2016; 73: 210–5.
- Bakoyiannis C, Karaolani G, Moris D et al. Homocysteine as a risk factor of restenosis after carotid endarterectomy. *Int Angiol* 2015; 34: 166–71.
- Park WC, Chang JH. Clinical implications of methylenetetrahydrofolate reductase mutations and plasma homocysteine levels in patients with thromboembolic occlusion. *Vasc Specialist Int* 2014; 30: 113–9.
- Balogh E, Maros T, Daragó A, et al. Plasma homocysteine levels are related to medium-term venous graft degeneration in coronary artery bypass graft patients. *Anatol J Cardiol* 2016; 16: 868-73.
- Kang J, Jiang X, Wu B. Analysis of Risk Factors for Lower-limb Deep Venous Thrombosis in Old Patients after Knee Arthroplasty. *Chin Med J (Engl)* 2015; 128: 1358–62.
- Cascella M, Arcamone M, Morelli E, et al. Multidisciplinary approach and anesthetic management of a surgical cancer patient with methylene tetrahydrofolate reductase deficiency: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep* 2015; 9: 175.