



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



II. interní klinika 3. LF UK a FNKV Praha

Dagmar Králová

**Úloha homocysteinu v patogenezi
aterosklerózy**

*Role of Homocysteine in the Pathogenesis
of Atherosclerosis*

Diplomová práce

Praha, červen 2007

Autor práce: Dagmar Králová

Studijní program: Všeobecné lékařství
s preventivním zaměřením

Vedoucí práce: **MUDr. Pavel Kraml, PhD**

Pracoviště vedoucího práce: **II. Interní klinika 3. LF UK
a FNKV Praha**

Datum a rok obhajoby: 26. 6. 2007

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci zpracovala samostatně a použila jen uvedené prameny a literaturu. Souhlasím, aby tato diplomová práce byla používána ke studijním účelům.

V Praze dne 18. 6. 2007

Dagmar Králová

Poděkování

MUDr. Pavlovi Kramlovi, PhD, Ing. Lucii Víchové, Ing. Kláře Hájkové, Doc. MUDr. Vlastě Rychterové, CSc. a MUDr. Davidu Kachlíkovi, PhD a dalším za odbornou pomoc a rodině a přátelům za podporu a toleranci.

Obsah

Úvod	6
1. Ateroskleróza	7
1.1 Popis aterosklerózy	7
1.2 Význam aterosklerózy	7
1.3 Průběh aterosklerózy	8
1.4 Rizikové faktory.....	10
2. Homocystein	11
2.1 Historie	11
2.2 Vznik	13
2.2.1 Plazmatická hladina a možnosti jejího ovlovňování ...	13
2.3 Homocystein a ICHS	16
2.4 Mechanizmy účinku	26
2.5 Detoxikace	31
2.6 Tromboembolická nemoc	33
2.6.1 Adenosylhomocystein	33
2.6.2 Trombocyty	33
2.6.3 Oxidační stres	34
2.6.4 Koagulace, fibrinolýza	35
2.6.4.1 Protein C	35
2.6.4.2 Antitrombin III.....	36
2.6.4.3 Fibrinolytický systém	36
2.7 Sekrece inzulínu	37
Závěr	39
Shrnutí	40
Summary	41
Prameny	42

Úvod

Toto téma jsem si vybrala proto, že ačkoli ateroskleróza, respektive její klinické důsledky, je jednou z hlavních příčin úmrtí v naší společnosti, obecné povědomí o jiných rizikových faktorech než o těch nejznámějších, je poměrně malé, což vede k častým omylům. Na následujících řádcích se pokusím zmapovat současné vědomosti o vlivu a účincích homocysteinu, jednoho z „minoritních“ rizikových faktorů, který se začíná těšit stále větší pozornosti.

1. Ateroskleróza

1.1 Popis aterosklerózy^{1,2}

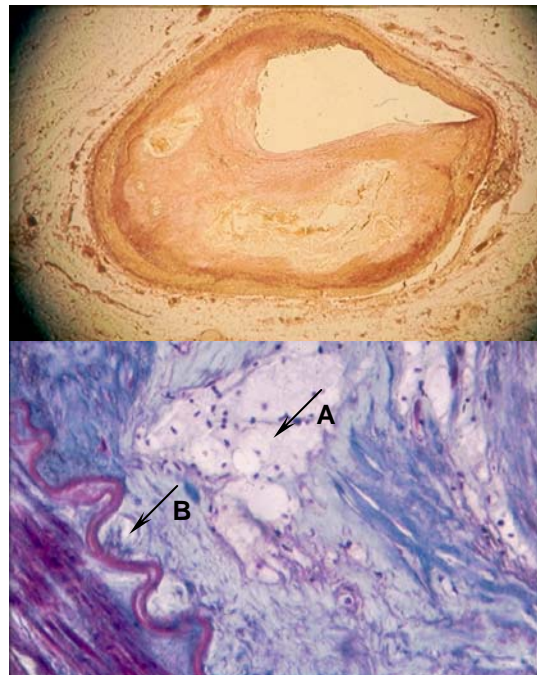
Doslovně ateroskleróza znamená kornatění tepen, ale jde o proces, který v konečném důsledku vede ke ztluštění stěn cév a ke ztrátě jejich elasticity. Hlavním znakem je tvorba fibrózních plaků, které mívají jádro bohaté na lipidy. Tato forma je nejdůležitější nozologickým projevem aterosklerózy. Za další jednotky mohou být považovány Mönckebergova mediokalcinóza, arterioloskleróza, avšak záleží na použité klasifikaci, jestli jsou zařazeny jako formy aterosklerózy nebo jako samostatná degenerativní onemocnění cév. Vznikající intimální léze jsou nazývány ateromové nebo též fibrolipidové pláty. Ateromové pláty promínují do lumen tepny. Oslabování pod nimi ležící medie vede ke komplikacím. Ateroskleróza, nebo přesněji její projevy, je příčinou přibližně poloviny všech úmrtí a závažných onemocnění na západní polokouli. V ekonomicky rozvinutých zemích její výskyt dosahuje epidemických hodnot.

1.2 Význam aterosklerózy

Ateroskleróza postihuje především elastické tepny, zejména aortu, karotidy a ilické tepny, a velké a střední arterie – věnčité tepny, femorální tepny, poplitey a tepny Willisova okruhu baze mozku. Nemoc začíná už v dětství, ovšem klinicky se manifestuje až ve středním a pozdějším věku, jakmile tepenné postižení poškodí orgány. Ačkoli ateroskleróza je povšechný proces, klinicky se ateroskleróza nejčastěji projeví postižením srdce, mozku, ledvin, dolních končetin a tenkého střeva. Nozologickými jednotkami jsou nejčastěji infarkt myokardu, cévní mozková příhoda a aneurysma aorty. Protože ateroskleróza sama o sobě klinicky vidět není nebo respektive je hůře zjistitelná, pro potřeby epidemiologického výzkumu se za klinický korelát považuje ischemická choroba srdeční, popř. koronární kalcifikace. Dalšími projevy na výše zmíněných orgánech a částech těla je ischemická choroba dolních

končetin až gangréna, mezenterická okluze, náhlá koronární smrt, ICHS včetně stabilní a chronické formy a ischemická encefalopatie (obr. 2).

Ateromové pláty jsou nejprve ojedinělé, s rozvojem nemoci se však jejich počet zvyšuje, a mohou uzavírat celý průsvit vážně poškozených arterií. Z toho vyplývá, že v menších tepnách může plát způsobit okluzi sám o sobě, snížit tak krevní průtok v distálně uložených orgánech a tak způsobit ischemické poškození. Častěji je však ischemie způsobena rupturou plátu a precipitací trombů na



Obr. 1. Histologické preparáty aterosklerotických změn. Nahoře obliterovaná arterie, dole v detailu medie. Šipka A ukazuje pěnové buňky, šipka B membrana elastica externa.

Laskavě zapůjčeno Doc. Rychterovou, Ústav patologické anatomie 3.LF UK a FNKV Praha

jeho povrchu, které způsobí náhlý uzávěr. Tento mechanismus se uplatňuje ve velkých arteriích a proto jsou následky vážné (obr. 1). Navíc tím, že uzávěr vzniká náhle, nemůže

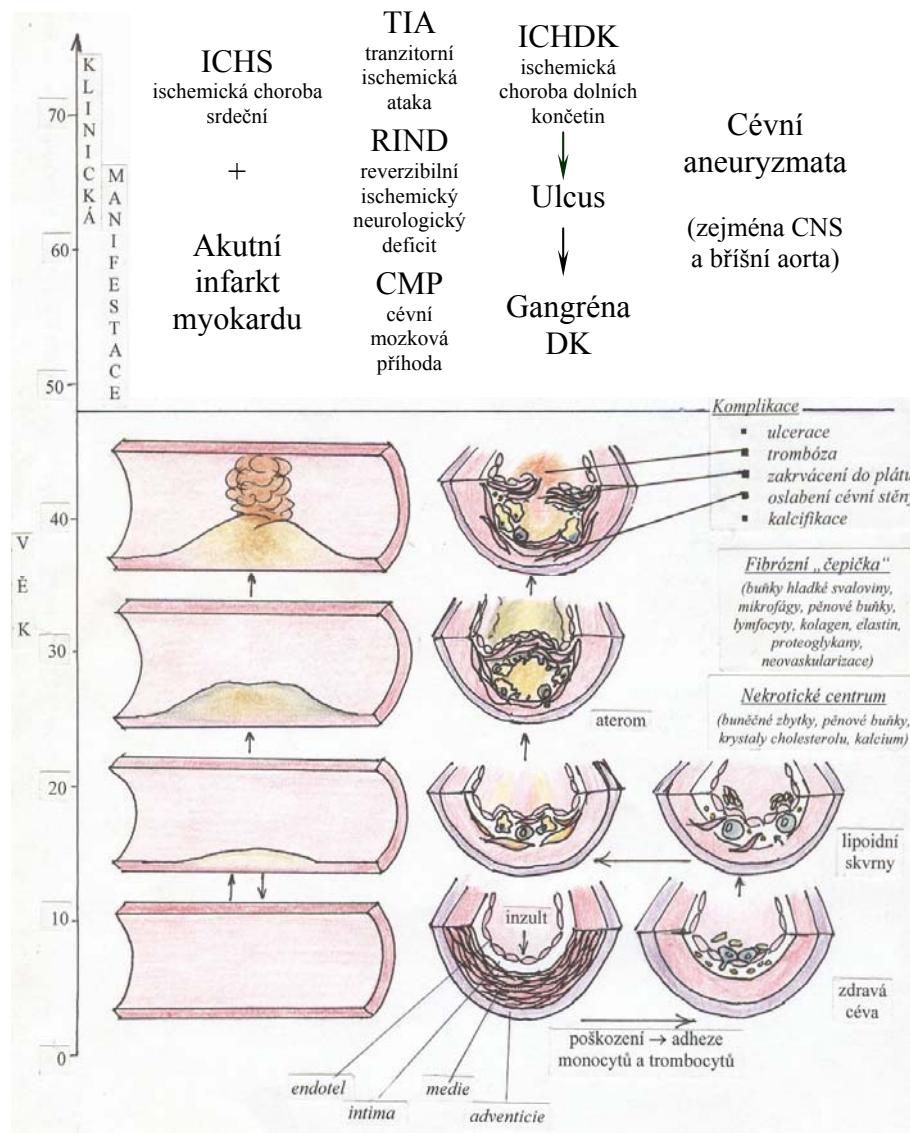
se uplatnit princip zvaný *preconditioning*, kdy se z důvodu dlouhodobé hypoperfuze vytváří kolaterální oběh a definitivní uzávěr pak nemá tak ničivé následky. Ateromy zasahují i do medie, která se ztenčuje, atrofuje a vazivově se mění, a oslabují tak cévní stěnu. To je další důležitý princip poškození velkých tepen, u kterých nedochází k zúžení průsvitu. Ateromy tak způsobují aneuryzmata a ruptury nebo právě trombózy. Dále jsou rozsáhlé ateromové pláty křehké a snadno se „drolí“, takže mohou způsobit embolie do distálních částí řečiště.

1.3 Průběh aterosklerózy

Vývoj probíhá od lipidních skvrn přes fibrózní a ateromové pláty po komplikované pláty (obr. 2).

Lipoidní skvrny jsou žlutavá ložiska, 2 – 10 mm velká, vyskytující se podél stěny, ne cirkulárně. Do lumen neprominují nebo jen nepatrně. Jak již bylo zmíněno, tvoří se již u dětí, mohou být pozorovány již během prvního roku života, jsou však plně reverzibilní. Nejprve se objevují v hrudní aortě, do 10. roku života se rozšíří na břišní aortu a věnčité tepny. Jde o ložiskové nahromadění pěnových buněk – lipidy naplněných makrofágů – v intimě. Ne ze všech lipoidních skvrn se vyvine sklerotický plát, v současné době se předpokládá, že to jsou prekuzory aterosklerotických změn, které však mohou vymizet. Za základní lézi aterosklerózy se tak považuje sklerotický plát.

Sklerotický plát již prominuje do lumen nad intimu a české



prameny (Speciální patologie²) udávají dva typy sklerotických plátů – fibrózní a aterosklerotický. Fibrózní pláty jsou tvořeny hyalinizovaným kolagenním vazivem a obsahují málo lipidů, což způsobuje jejich šedavou barvu a tuhou konzistenci. Aterosklerotické pláty jsou na lipidy bohaté, jsou

Obr. 2. Schéma průběhu aterosklerózy.
Upraveno dle Robbins Pathologic Basis of Disease, 6th Edition, Philadelphia, USA 1999

žluté a měkčí. Na délku měří od několika milimetrů po několik cm, tloušťka se pohybuje většinou mezi 1 - 5 mm. Věkem mohou pláty splývat. Stupeň postižení jednotlivých tepen se může u jednoho člověka značně lišit, někdo má postiženy zejména koronární tepny, jiný převážně mozkové atp.

Komplikovaná ateroskleróza znamená ulcerace, trombóza, krvácení nebo kalcifikace ateromu. *Ulcerace* – defekt intimálního povrchu plátu – mohou být různě hluboké. Od povrchových lézí typu ruptury povrchové vazivové „čepičky“ (fibrous cap) po obnažení rozsáhlé plochy. Ulcerace disponuje k tvorbě trombů, ke krvácení do plátů nebo k vyprázdnění ateromových hmot do řečiště a způsobení cholesterolové embolie. Obnažený subendoteliální kolagen má trombogenní efekt, malé nástěnné tromby mohou být zavzaty do plátu, velký uzavírající plát znemožní cirkulaci a způsobí ischemii vyživované tkáně.

Ke *krvácení* může dojít dvojím způsobem. Buď již zmíněným zakrvácením do plátu nebo prasknutím tenkostěnné vény ve vaskularizovaném plátu. Oba mechanismy vedou k akutnímu zvětšení objemu plátu a k možnému uzávěru cévy.

Dystrofická kalcifikace je obvykle pozdní změna, kdy se vápenné soli ukládají do hyalinního vaziva nebo ateromové hmoty plátu. Při pokročilém procesu je postižena céva tuhá „trubička“.

1.4 Rizikové faktory

Rizikové faktory dělíme na konvenční nebo též nezávislé, tradiční a nekonvenční, netradiční. Konvenční, nebo též nezávislé faktory, jsou faktory, které samy o sobě působí aterogenně. Závislé faktory takto samy o sobě takto nepůsobí nebo jejich samostatný efekt není plně prokázán, ale potencují účinek nezávislých faktorů, působí-li současně. Mezi konvenční rizikové faktory řadíme věk, mužské pohlaví, hypertenzi, kouření, diabetes mellitus, hyperlipoproteinémie (hypercholesterolémie, hypertriacylglycerolémie), obezitu, fyzickou inaktivitu a pozitivní rodinnou anamnézu (genetickou predispozici). Mezi nekonvenční faktory

se řadí stres, u žen postmenopauzální snížená hladina estrogenů, chronická renální insuficience, infekce určitým agens (Chlamydia pneumoniae, CMV), chronické infekce obecně, autoimunní onemocnění, zvýšené endogenní zásoby železa (hyperferritinémie), vysoký příjem sacharidů, alkoholu, příjem trans-mastných kyselin, hyperhomocysteinémie. Tyto netradiční rizikové faktory jsou stále diskutovány, jelikož jejich nezávislý kauzální vztah k ateroskleróze nebyl doposud jednoznačně objasněn. A právě homocysteinu bude věnován následující text.

2. Homocystein

Otázka, jaký by aminokyselina homocystein mohla mít vliv na vznik aterosklerózy a tím i na incidenci kardiovaskulárních chorob, vyvstala po popsání nozologické jednotky homocysteinurie, kdy postižení kromě jiného trpí ve zvýšené míře výskytem těchto onemocnění. Na následujících řádcích se pokusím shrnout současný stav poznání na základě studií, které byly na toto téma provedeny.

2.1 Historie

Molekula homocysteinu byla objevena v roce 1932 a Vincentem du Vigneaudem byla označena za toxickou aminokyselinu, která je syntetizována buňkami a není proto nutné ji dodávat potravou. O tom, čemu slouží a k čemu je dobrá, se však dlouhou dobu nic nevědělo. Do centra pozornosti se dostala až třicet let po svém objevení, kdy byla určena nová klinická jednotka, homocysteinurie.

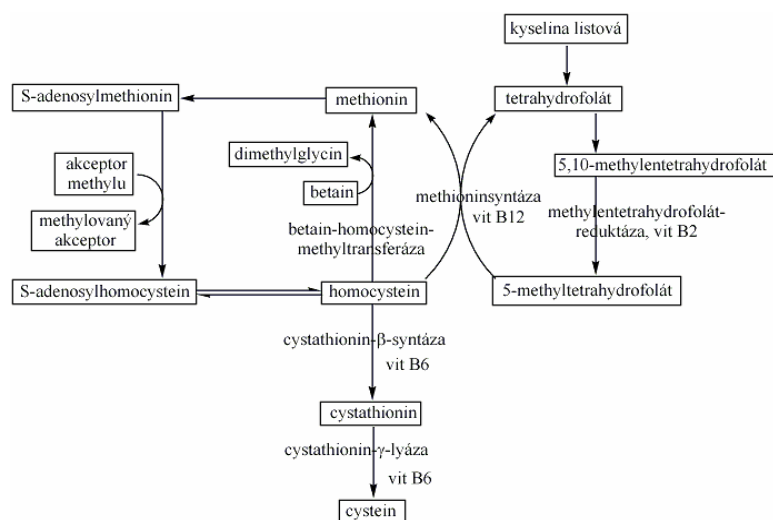
Homocysteinurie je vrozené metabolické onemocnění, kdy postižení, kromě toho, že jsou mentálně retardovaní, vysocí, nazrzlí, trpí deformitami skeletu a poruchami zraku z dislokace čočky, jsou hlavně postižení významnou aterosklerózou, která nastupuje podstatně dříve než u běžné populace, a tromboembolickými komplikacemi, které nemocného smrtí někdy mezi pubertou až třetím deceniem.

Laboratorním korelátem je zvýšená hladina metabolitu homocysteinu v moči a výrazně vysoká hladina homocysteinu v krvi.

Americký lékař Kilmer McCully prokázal rodinný výskyt onemocnění a zároveň jako první popsal patologicko-anatomické změny v orgánech postižených, zejména aterosklerotická poškození.

McCullymu se v roce 1967 podařilo prokázat aterosklerotické změny a tromboembolické komplikace u pacientů s jinými enzymatickými defekty, které také zvyšují hladinu homocysteinu, čímž vytvořil hypotézu, že hyperhomocysteinémie je příčina, nikoli následek předčasné aterosklerózy a tromboembolické nemoci u těchto pacientů. Bylo to v době, kdy v USA probíhala epidemie kardiovaskulárních chorob. Tehdy převládla cholesterolová teorie, která je obecně uznávána dodnes.

Nicméně i nadále probíhaly výzkumy homocysteinu a jeho úlohy v patogenezi různých onemocnění. Tyto studie upozorňují nejen na možný vliv ve vzniku aterosklerózy, ale i jiných onemocnění, jako např. vředové choroby gastroduodenální, nespecifických střevních zánětů, revmatických onemocnění kloubů, migrény, chronického únavového syndromu, z gynekologicko-porodnických problémů poruch plodnosti, předčasných porodů, potratů a vrozených vývojových vad plodu, zejména defektů uzávěru neuronální trubice, dále osteoporózy. Je také



Obr 3. Vznik homocysteinu.

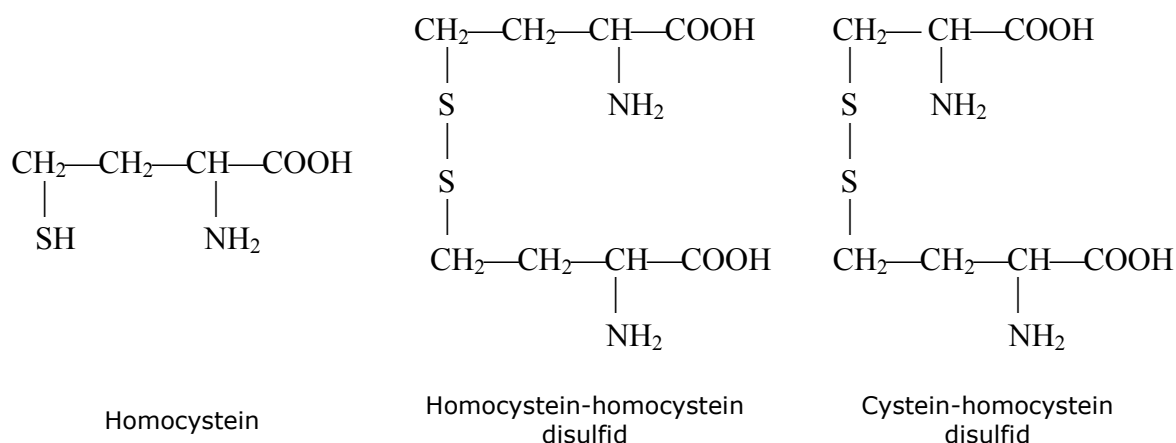
Upraveno dle Malinowski et al.: Homocysteine, Diet, and Cardiovascular Diseases⁴

možné, že zvýšená hladina homocysteinu hraje určitou roli při vzniku neurologických a psychiatrických poruch, alergií a poruch imunity, čímž může podmiňovat vznik nádorových onemocnění³.

2.2 Vznik

Homocystein, kyselina 2 -amino-4-merkpto máselná, je odvozená aminokyselina, která vzniká jako meziprodukt přeměny methioninu na cystein (obr. 3).

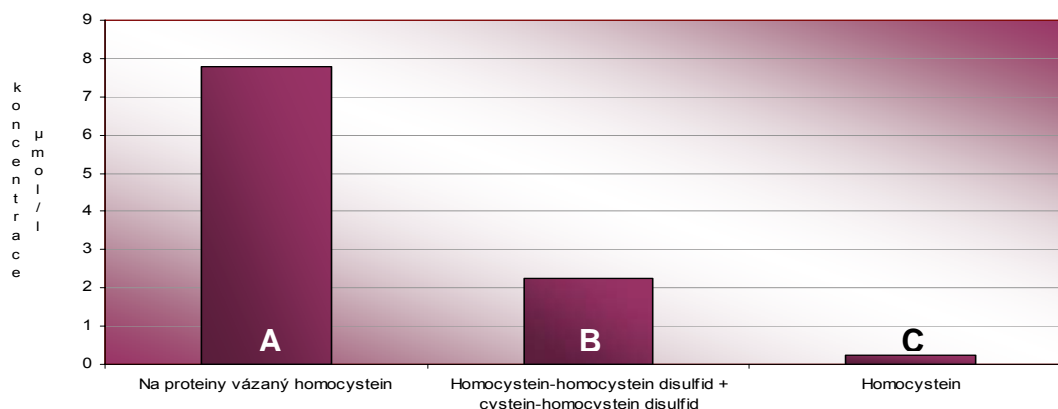
V plazmě je rychle oxidován na smíšený disulfid cysteinu a homocysteinu a disulfid homocysteinu (obr. 4).



Obr. 4. Dle Malinow M.R. et al.: Homocysteine, Diet, and Cardiovascular Diseases⁴

2.2.1 Plazmatická hladina a možnosti jejího ovlivňování

Plazmatická homocysteinémie (hladina homocysteinu v krevní plazmě) je součet koncentrací všech tří složek tzv. volné formy a formy vázané, což je na proteiny (zejména albumin) vázaný homocystein v různých formách (jako homocystein, cystein-homocystein disulfid a ostatní smíšené disulfidy homocysteinu; obr. 5)⁵.



Obr. 5. Celková plazmatická koncentrace homocystein v plazmě, jednotlivé složky. A je vázaná forma, B+C tvoří volnou nevázanou formu, A+B+C je celkový plazmatický homocystein.

Upraveno dle Mudd et al.: Homocysteine and Its Disulfide Derivates⁵

Vzhledem k měnícím se stravovacím návykům společnosti, kdy vzrůstá spotřeba masa a masných a mléčných výrobků bohatých na živočišné bílkoviny (jejichž metabolickým produktem je právě homocystein) a přitom klesá spotřeba zeleniny, jakožto přirozeného zdroje kyseliny listové, není překvapivé, že narůstá incidence výše zmíněných chorob, které se dají souhrnně označit jako choroby civilizační.

Na druhou stranu existují studie, které prokazují, že homocysteinémie není významně ovlivněna dietními návyky a celkovým příjmem proteinů a tedy ani methioninu v potravě u lidí. U zvířecích modelů je příjem methioninu významným faktorem. I u člověka ovšem nárazově podaná dávka methioninu nad 100 mg/kg tělesné hmotnosti *per os* může zvýšit hladinu homocysteinu. Toho se využívá jako diagnostický zátěžový test při poruchách metabolismu homocysteinu (methionin loading test – MLT). Z toho také vyplývá, že diagnostická měření hladiny se musejí provádět na lačno, aby nedošlo ke zkreslení výsledků chybou již v preanalytické části vyšetření, protože hodnoty mohou stoupat postprandiálně.

Normální hodnoty lačné homocysteinémie jsou stanoveny na 5 - 15 $\mu\text{mol/l}$, mírné zvýšení na 16 - 30 $\mu\text{mol/l}$, střední hyperhomocysteinémie je 31 - 100 $\mu\text{mol/l}$ a těžká nad 100 $\mu\text{mol/l}$, ale většina studií pracuje pouze s termínem hyperhomocysteinémie, obvykle definovaným koncentrací homocysteinu nad 16 $\mu\text{mol/l}$.

Vzhledem k tomu, že kofaktory enzymů podílejících se na metabolismu methioninu jsou vitaminy B₆, B₁₂ a kyselina listová – folát, tak další z možností, jak ovlivnit homocysteinémii je příjem vitaminů. Mnoho studií dokázalo nepřímo úměrnou závislost mezi koncentrací homocysteinu v plazmě a plazmatickými koncentracemi folátu, vitamínu B₆ a B₁₂. Při suplementaci kyselinou listovou v dávce mezi 0,2 a 15 mg/den došlo ke snížení homocysteinémie bez známek zjevné toxicity. Tento účinek potvrdila i metaanalýza 12 klinických studií, která prokázala pokles hladin homocysteinu o 25% při podávané dávce 0,5 až

5,7 g/den. Dalšího 7% snížení bylo dosaženo přidáním vitamínu B₁₂ (dávka v rozmezí 0,02 – 1 mg/den). Food and Nutrition Board z Institute of Medicine ve Washingtonu DC doporučuje, aby podávaná dávka kyseliny listové nepřesáhla 1 mg/den, aby nemohlo dojít k překrytí známek hypovitaminózy B₁₂. Při zjevné hypovitaminóze B₁₂ se střední až těžkou hyperhomocysteinémií stačila suplementace vitamínem k normalizaci hladiny homocysteinu v cca 70% případů. Dávka vitamínu B₆ pod 250 mg/den sice neovlivní hladinu homocysteinu v krvi, ale jeho podání v dávce 50 – 250 mg/den sníží hladinu homocysteinu po zátěžovém testu methioninem až o 25% v otevřené nekontrolované studii, v placebem kontrolované randomizované studii bylo dosaženo obdobného výsledku (22%). Jiná placebem kontrolovaná studie použila kombinaci výše uvedených vitamínů v dávkách (jednotky v mg/den): folát 0,65, vitamin B₆ 10 a vitamin B₁₂ 0,4. Kombinace byla velmi účinná u pacientů s mírnou a střední hyperhomocysteinémií.

Dalšími vitaminy, které mohou ovlivnit hladinu homocysteinu v krvi je riboflavin, který způsobí mírný pokles, nebo kyselina nikotinová, která již v terapeutických dávkách může naopak vést k vzestupu hladin homocysteinu.

Četné studie ukazují, že uživatelé potravinových doplňků mají nižší hladiny homocysteinu oproti těm, kteří je neužívají a vyšší hladiny folátu a vitamínů B₆ a B₁₂. Účinek vitamínů, ať již přirozených zdrojů, tak i z potravinových doplňků, potvrzují i analýzy Framinghamské studie (Framingham Heart Study), kdy přívod vitamínů byl nepřímo úměrný počtu stenóz a počtu CMP ve 20 leté prospektivní studii. Avšak hodnoty homocysteinu zde měřeny nebyly. Vitaminové doplňky však nejsou součástí doporučení odborných společností v prevenci aterosklerózy, protože naopak v Heart Protection Study bylo užívání např. antioxidantních vitamínů spojeno s vyšším rizikem rozvoje ICHS⁶.

Dalšími faktory, které mohou ovlivnit hladinu homocysteinu ve smyslu zvýšení hodnot, jsou některé léky (L-dopa, metotrexát, teofylin), endokrinopatie (hypotyreóza), poruchy ledvin, systémový lupus

erytematodes, expozice nitrátům a samozřejmě věk. O genetických dispozicích se zmíním později.

Citované studie tedy poměrně přesvědčivě dokládají, že hyperhomocysteinémie provází aterosklerózu a její klinické manifestace. Co však dosud spolehlivě prokázáno nebylo, je vztah příčinnosti a následku. Dosud se přesně neví, zda je zvýšená hladina homocysteinu příčina aterosklerózy nebo jejím následkem a pokud, tak jak moc odpovídá závažnosti poškození a jestli by se tedy nedala použít jako biologický marker aterosklerózy ještě před rozvojem klinicky manifestních onemocnění, zejména ischemické choroby srdeční (ICHS)⁴.

2.3 Homocystein a ICHS

Mechanismus, kterým hyperhomocysteinémie může teoreticky akcelarovat aterosklerózu, je pravděpodobně zvýšený oxidační stres, který poškozuje funkci endotelu a aktivuje krevní destičky, podrobněji jej rozepíši dále. Některé prospektivní studie ukázaly, že vzrůst hladin homocysteinu dvojnásobně zvyšuje riziko ICHS a trochu méně riziko cerebrovaskulárních příhod. Hyperhomocysteinémie by měla být prokázána u pacientů s progresivní nebo nevysvětlitelnou aterosklerózou a vhodně zaléčena. Léčba hyperhomocysteinémie je primární vitaminovou suplementací; hlavní v terapii jsou vitaminy B₆, B₁₂ a kyselina listová. Betain a 5-methyl-tetrahydrofolát jsou také účinné ve snižování hladin homocysteinu. Léčba mírně zvýšených hladin homocysteinu u pacientů bez projevů aterosklerózy zatím není doporučena, čeká se na výsledky randomizovaných studií⁷.

Pro klinickou praxi je možnost, že by se pomocí měření hladin homocysteinu dalo určit riziko rozvoje ICHS, velmi lákavá. Zbývá tedy určit, jestli je takto použitelné. Iftikhar J. Kullo se spolupracovníky z Mayo Clinic si jako měřítko rizika zvolili kalcifikace koronárních tepen (CAC) a zaměřili se na souvislost mezi plazmatickou hladinou homocysteinu a CAC v různých kategoriích rizika ICHS. Šlo o to, že

zatímco ve skupinách s nízkým nebo vysokým rizikem rozvoje koronárních nemocí, je určení ohrožení relativně jednoduché, skupina pacientů se středním rizikem je poměrně nehomogenní a prognóza se u jednotlivých osob může značně lišit. Přitom je tato skupina poměrně početná. Míru rizika autoři definovali podle framinghamských kritérií, což je vícenásobný statistický model, který používá věk, pohlaví, kouření, krevní tlak, cholesterol, HDL cholesterol a glykémii popřípadě anamnestická data o diabetu ke stanovení eventuálního rizika kardiovaskulárních nemocí u jedinců, u kterých dosud nebyly diagnostikovány⁸. Ačkoli framinghamské rizikové skóre (stratifikace rizika kardiovaskulárních chorob) je obecně uznáváno, má, stejně jako všechna ostatní podobná kritéria, své limity. Proto se hledají i jiná kritéria, tzv. nekonvenční, pro zpřesnění odhadu. Kromě homocysteinu a jeho hladin v krvi, to může být mj. i již zmíněná úroveň kalcifikaci koronárních tepen.

Plazmatický homocystein je asociován s množstvím kalcifikací koronárních tepen jako ukazatele koronární aterosklerózy, u účastníků se středním 10letým rizikem i po zohlednění konvenčních rizikových faktorů ICHS, avšak tato závislost se neuplatňovala u účastníků s nízkým nebo naopak vysokým rizikem.

V celkovém vzorku bylo zjištěno, že vzrůstající věk, hypertenze, kouření, hladina celkového a HDL cholesterolu a sérové hladiny kreatininu jsou každý nezávisle provázen vyšší hladinou plazmatického homocysteinu. Vzrůstající věk, hypertenze a kouření jsou provázeny vyšším počtem kalcifikací a homocysteinémie může být jedním z mediátorů aterogenicity těchto rizikových faktorů. Vyšší hladiny sérového kreatininu byly provázeny nižším výskytem CAC ve vícenásobných regresních modelech pro celkový vzorek a skupinu se středním rizikem, což je neočekávaný výsledek, který je nutno potvrdit v dalších výzkumech. Homocystein zůstal asociován s množstvím CAC v celkovém vzorku i po úpravě rizikovými faktory pro ICHS, což naznačuje, že by mohl mít nezávislý aterogenní efekt sám o sobě.

Biologickou významnost homocysteinu jako proaterogenního faktoru podporují výsledky *in vitro* studií.

Mezní hodnota pro zvýšený homocystein zde byla stanovena na $\geq 13 \mu\text{mol/l}$. Účastníci s homocysteinémií vyšší než $13 \mu\text{mol/l}$ měli signifikantně vyšší výskyt CAC než jedinci s normálními hladinami homocysteinu.

Při výzkumu byla používána standardní definice středního rizika ICHS a pacienti s diabetem byli zahrnuti do skupiny s vysokým rizikem. Závěry byly podobné, ať při středním riziku definovaném jako 10 leté riziko 10 - 20% nebo 6 - 15% a nebo když diabetičtí pacienti nebyli zahrnuti *a priori* do skupiny s vysokým rizikem. Souvislost mezi hladinou homocysteinu a výskytem CAC jenom v této středně rizikové skupině podporuje teorii, že hladina homocysteinu může být pouze podmíněčný rizikový faktor. To znamená, že homocystein by mohl uplatnit své aterogenní vlastnosti pouze v součinnosti s určitými hodnotami klasických rizikových faktorů. Tyto výsledky jsou v souladu s předchozími studii, které nenašly významnou souvislost hladin homocysteinu s výskytem kalcifikací v koronárním řečišti u relativně mladých jedinců s příznivým rizikovým profilem.

Co se týče skupiny pacientů s vysokým rizikem ICHS, může být nesignifikantnost výsledku způsobena buď relativně malým počtem účastníků ve vzorku nebo skutečností, že v terénu vzrůstajícího věku a nárůstu kumulativních aterosklerotických změn homocystein přestává být nezávislým rizikovým faktorem. Výpovědní hodnota některých rizikových faktorů pro aterosklerózu se snižuje se vzrůstajícím věkem, zvláště u mužů. Autoři shledali, že v skupině s vysokým rizikem jsou pouze věk, mužské pohlaví a antihypertenzní terapie asociovány s výskytem kalcifikací. Toto potvrzuje i další studie, která zjistila, že zvýšená hladina homocysteinu koreluje se vzrůstajícím běžným karotickým poměrem tloušťky intima/media a sníženým indexem kotník/paže (IKP) ve vzorku populace nad 55 let, ale tento vztah se již nepotvrdil ve skupině nad 75 let věku.

Je nutné uvážit případná omezení této studie. Pro vliv homocysteinu je rozhodující, že plazmatická hladina homocysteinu byla měřena v USA po dvouletém obohacování mouky kyselinou listovou. To mohlo vést k podcenění závažnosti souvislosti mezi homocysteinémií a výskytem CAC. Střední hladina homocysteinu v tomto vzorku populace ($9,26 \pm 2,9 \mu\text{mol/l}$ žen a $10,41 \pm 2,5 \mu\text{mol/l}$ u mužů) je nižší, než byla naměřena před rokem 1990 ve skupině Framinghamské studie ($12,0 \pm 5,4 \mu\text{mol/l}$ u žen a $13,0 \pm 8,8 \mu\text{mol/l}$ u mužů). Dále CAC není přesný korelát kardiovaskulárních onemocnění. Jiná měření souvislosti mezi hladinou homocysteinu a kardiovaskulární nemocí mohou přinést jiné výsledky. A konečně etnické rozdíly jsou známy jak v homocysteinémii tak ve výskytu kalcifikací koronárních tepen, takže tyto výsledky jsou použitelné pouze pro kavkazskou populaci.

Plazmatický homocystein je asociován s množstvím výskytu kalcifikací v koronárním řečišti i po vztažení na ICHS rizikové faktory ve vzorku obsahujícím i pacienty s hypertenzní chorobou. Pro objasnění vztahu byly použity kategorie 10letého rizika ICHS, homocystein byl nezávisle asociován s počtem výskytu kalcifikací u probandů se středním rizikem (6 - 20%), ale ne u jedinců s nižším nebo vyšším rizikem. Hladina homocysteinu může poskytnout další informaci o míře rizika kardiovaskulárních onemocnění u pacientů spadajících do této kategorie⁹.

Další prací, která se zabývá problémem, nakolik je změněna hladina homocysteinu při zvýšeném riziku kardiovaskulárních nemocí, je práce skupiny polských lékařek vedených Barbarou Głowińską. Ty se zaměřily na zvýšenou koncentraci homocysteinu u dětí a dospívajících s hypertenzí provázející diabetus mellitus 1. typu (DM1T). Ischemická choroba srdeční je primární příčinou morbidity a mortality mezi diabetiky, zvláště mezi těmi, kteří onemocněli jako mladí. Jejich cílem bylo zhodnotit koncentraci homocysteinu u dětí a mladých s DM1T a pokusit se určit závislost mezi homocysteinem a stupněm metabolické kontroly a kompenzace v závislosti na trvání nemoci, věku

manifestace, potřebné inzulinové dávce, manifestaci komplikací a rodinné anamnéze ICHS.

Tohoto výzkumu se zúčastnily 103 děti a mladiství (ve věkovém rozmezí 4 – 20 let, věkový průměr 13,3 roku) s DM1T, s průměrnou dobu trvání 5,3 roku. Kontrolní skupina se skládala ze 44 zdravých, neobézních dětí. Koncentrace homocysteinu byla měřena EIA imunoezymatickou metodou.

Průměrná hladina homocysteinu v experimentální skupině byla 5,6 $\mu\text{mol/l}$, což je hodnota, která se významně nelišila od hladiny 6,1 $\mu\text{mol/l}$ v kontrolní skupině. Žádné statisticky významné rozdíly v hladině homocysteinu v závislosti na metabolické kompenzaci, věku manifestace, způsobu inzulinoterapie nebo rodinné anamnéze nebyly zjištěny. Signifikantní nárůst byl zaznamenán u dětí, které byly nemocné dlouho (déle než 10 let): 6,1 $\mu\text{mol/l}$ proti 5,1 $\mu\text{mol/l}$ u dětí, které byly nemocné kratší dobu. Dále byly zaznamenány významně vyšší hladiny u dětí, které měly diabetické komplikace (6,1 proti 5,3 $\mu\text{mol/l}$) a u dětí s arteriální hypertenzí.

Signifikantní nárůst hladiny homocysteinu u dětí s DM1T a arteriální hypertenzí naznačuje, že tato skupina je zvláště ohrožena rozvojem časných aterosklerotických změn, nezávisle na metabolické kompenzaci a parametrech lipidového metabolismu.

Existují sledování potvrzující roli homocysteinu v akceleraci těchto změn u diabetiků, manifestované zvláště mikroalbuminurií a postupně progredujícím renálním poškozením, přičemž porušený metabolismus homocysteinu v ledvinách je příčinou vzrůstající koncentrace homocysteinu v krvi. Vzestup hladiny homocysteinu byl sledován i u osob se změněnou funkcí ledvin na jiném podkladě než diabetu. U diabetiků se však porušení ledvinných funkcí vyskytuje dříve. Role homocysteinu v manifestaci arteriální hypertenze u dětí zatím čeká na objasnění. Signifikantní nárůst hladin homocysteinu nalezený u diabetických dětí s hypertenzí značí, že tyto děti jsou zvláště ohrožené časným rozvojem aterosklerotických změn nezávisle na kompenzaci

a lipidovém profilu. To by vyžadovalo zahrnout mezi cíle terapie i snížení a kontrolu hladiny homocysteinu v krvi¹⁰.

Předchozí citované práce a mnohé další dokazují, že hyperhomocysteinémie se vyskytuje u pacientů s aterosklerózou a vyšším rizikem rozvoje kardiovaskulárních chorob. Avšak stále není jasné, zda zvýšená hladina homocysteinu je příčinou nebo spíše důsledkem kardiovaskulárních onemocnění. Protože genetické varianty enzymů zasahujících do metabolismu homocysteinu nemohou být ovlivněny aterosklerózou, průkaz asociace některých určitých variant s kardiovaskulárním onemocněním by mohl dovolit předpokládat příčinnost. Z této úvahy vyšli Janošíková et al., když na modelu regresní analýzy zkoumali 11 genových variant methioninového cyklu při manifestaci ICHS u 591 kontrol a 278 pacientů s ICHS.

Oproti metabolitům, jejichž hladiny se mohou měnit v závislosti na vaskulárním onemocnění jako takovém, genové varianty jsou dané a v průběhu života se nemění. Za předpokladu „mendelovské randomizace“ může asociace genetických variant sledovaných rysů v case-control studii naznačovat příčinnou souvislost. Proto asociace variability genů methioninového cyklu s ICHS, pokud je sledována, naznačuje, že geneticky podmíněné defekty v metabolismu homocysteinu a jemu příbuzných sloučenin mohou být příčinou nebo aspoň ovlivňujícím faktorem spíš, než jejím pouhým následkem.

Bylo popsáno přibližně 10 běžných genetických variant enzymů methioninového cyklu, podrobněji studována však byla pouze varianta *c.677C>T* methyl-tetrahydrofolát-reduktázy (MTHFR). Souvislost mezi nosičstvím této varianty a výskytem kardiovaskulárních chorob byla později stanovena na základě rozsáhlé metaanalýzy, která zahrnovala 11.162 případů a 12.758 kontrol. Tato metaanalýza odhadla OR pro polymorfismus *677TT/677CC* na 1,16(95%CI=1,05-1,28). Vztahy ostatních variant genů byly sledovány pouze v omezeném počtu studií, a tak jejich souvislost s rizikem či výskytem ICHS ještě nebyla přesně stanovena.

Autoři této studie zkoumali vztah vybrané genetické modifikace enzymů methioninového cyklu s rizikem výskytu kardiovaskulární nemoci. Analyzovali prevalenci pěti vzácných a šesti běžných variant genů pro cystathion- β -syntázu (CBS), methylen-tetrahydrofolát-reduktázu (MTHFR), methionin-syntázu (MTR) a methionin-syntázu-reduktázu (MTRR) u 278 pacientů s ICHS a 591 kontrol. Všichni účastníci podstoupili standardní methioninový zátěžový test, kdy byly určeny hodnoty plazmatického homocysteinu a ostatních aminothioliů a vybraných vitaminů. Souvislost mezi jednotlivými genetickými variantami a rizikem ICHS byla modelována pomocí logistické regresní analýzy s ohledem na konvenční rizikové faktory a další chemické sloučeniny. Pouze jediná varianta byla spojena s prokazatelně nižším rizikem ICHS. V podskupině kontrol nosičů této varianty a v odpovídající skupině srovnatelných nosičů divoké varianty byla stanovena koncentrace meziproduktů methioninového cyklu v krvi. Na základě této analýzy autoři formulovali hypotézu o možné roli homocysteinu a příbuzných sirných metabolitů v rozvoji aterosklerózy.

Heterozygozita podrobně studované varianty *c.677C>T* genu pro MTHFR byla provázena statisticky nevýznamným 28% nárůstem rizika rozvoje ICHS v této studii. Data této studie byla zahrnuta do široké metaanalýzy, která potvrdila, že homozygozita pro *c.677C>T* má signifikantně vyšší riziko ICHS než homozygoté s divokým typem genu.

Dále v každém MTHFR a MTRR genu analyzovali dva odlišné polymorfizmy. Ve shodě s jinými studii pozorovali silnou vazbu nerovnováhy mezi *c.677C>T* a *c.1298A>C* variantami MTHFR genu, Naproti tomu analýza neprokázala relevantní vazbu nerovnováhy mezi *c.66A>G* a *c.524C>T* MTRR genu.

Dále byla zkoumána prevalence individuálních variant po rozdělení podle věku a pohlaví. Mezi šesti běžnými variantami se jenom u prevalence nosičů varianty CBS *c.844ins68* zdá, že se mění v závislosti na věku probandů. Prevalence této varianty se pohybovala kolem 12% mezi narozením a 45 lety, zatímco vzrostla na 16% ve skupině >45 let.

Tento rozdíl však není statisticky významný ($p=0,25$ pro celkový rozdíl). Rozdíl v prevalenci CBS *c.844ins68* varianty mezi pacienty a kontrolami a možnost změny v zastoupení v závislosti na věku naznačuje, že tato varianta může poskytovat ochranu proti vzniku a rozvoji ICHS.

V jednoduché logistické regresní analýze jenom nosičství *c.844ins68* CBS genu bylo provázeno významným poklesem rizika rozvoje ICHS. Analýza také potvrdila, že konvenční rizikové faktory jsou asociovány s rostoucím rizikem rozvoje ICHS.

Vztah genetických variant a ICHS byl také modelován pomocí vícenásobné logistické regresní analýzy pro minimalizaci vlivu stanovených rizikových faktorů a pro zohlednění interakcí. Ochranný efekt *c.844ins68* varianty CBS genu zůstává signifikantní i při vztažení k věku, pohlaví, kouření, spotřebě alkoholu, hypertenzi, hyperlipidemii a diabetu mellitu. Avšak vztažení k poměru pas/boky (WHR – waist/hip ratio) ochranný účinek eliminovalo u štíhlých osob ($WHR \leq 0,85$). U obézních efekt zůstal zachován. Interakce WHR a CBS *c.844ins68* varianty je poměrně překvapivá. Může být způsobena rozdílem inzulinového metabolismu u obézních pacientů. WHR je ukazatelem abdominální obezity, která je jedním z charakteristických projevů syndromu inzulinové rezistence. Je zajímavé, že inzulinová rezistence je také provázena porušením metabolismu homocysteinu. Bylo prokázáno, že vysoké hladiny inzulinu jsou snižovány aktivitou transsulfurační dráhy v místě, kde je katalyzátorem právě CBS. Modulace inzulinové rezistence zesílením transsulfurace homocysteinu může tedy i takto snižovat riziko rozvoje a manifestace ICHS nebo prosté manifestace. Vícenásobný model také ukázal, že homozygotita pro *c.66A>G* MTRR genu je spojena se sníženým rizikem výskytu ICHS. Avšak protože tento genotyp nesleduje Hardy-Weinbergovu rovnováhu (genetický model pro mendelovskou dědičnost, kdy musí být výběr náhodný a frekvence alel konstantní, populace dostatečně velká, aby byl genetický drift zanedbatelný¹¹), nejsou tato data spolehlivá.

Logistická regresní analýza ukázala, že nosičství CBS *c.844ins68* varianty má pozitivní korelaci s poklesem rizik ICHS a tak naznačuje, že genetické varianty mohou ovlivnit rozvoj nebo klinickou manifestaci ICHS.

Pro vysvětlení možného mechanismu nebo možných mechanismů protektivního účinku této varianty genu pro CBS byli zdraví nosiči a srovnatelný počet nosičů divokého typu genu vybraných s ohledem na věk, pohlaví a menopauzu, podrobeni vyšetření hladin plazmatického homocysteinu, cysteinu a krevního S-adenosylmethioninu (AdoMet), S-adenosylhomocysteinu (AdoHcy) a glutathionu. Srovnání hlavních klinických charakteristik mezi jednotlivými dvojicemi (nosič-kontrola) neukázaly statisticky významné rozdíly, avšak rozdíly ve většině sledovaných biochemických markerů významné byly. Podobnost fenotypu obou skupin dovoluje dát do souvislosti rozdíly koncentrace metabolitů homocysteinu u nosičů *c.844ins68* varianty. Hladiny metabolitů nalačno se příliš neliší u nosičů mutace od nosičů divokého typu genu s výjimkou AdoMet. Avšak vystavení účastníků methioninové zátěži odhalí rozdíl ve funkční kapacitě nosičů mutace oproti homozygotům s divokým typem. Pozátěžové vzorky nosičů mutace vykazovaly významně nižší hladiny AdoHcy a celkového plazmatického homocysteinu, vyšší poměr AdoMet/AdoHcy a vyšší poměr plazmatického cysteinu k homocysteinu. Metabolické změny u nosičů CBS *c.844ins68* tak naznačují lepší methylační funkci a zlepšenou eliminaci homocysteinu po methioninové zátěži, pravděpodobně stimulací transsulfurace.

Hlavním výstupem této studie je asociace CBS *c.844ins68* varianty se statisticky významným poklesem rizika klinické manifestace ICHS. Nicméně to, jak přesně nosičství CBS *c.844ins68* ochraňuje před rozvojem ICHS obézní jedince, nebylo dosud přesně objasněno.

Výsledky tohoto sledování CBS *c.844ins68* jsou rozdílné od závěrů několika předchozích case-control studií, které nepotvrdily relevantnost asociace mezi nosičstvím CBS *c.844ins68* a aterosklerózou. V těchto

studiích však nebylo zohledněno ani etnikum ani věk, takže uvážíme-li vliv právě etnika a prevalenci CBS *c.844ins68* v závislosti na věku, chybějící asociace v těchto pracích nemusí být nutně v rozporu se závěry citované studie.

První náznaky, že genetické varianty enzymů zasahujících do metabolismu methioninu a homocysteinu mohou ovlivnit riziko ICHS, přineslo měření hladin homocysteinu a jeho metabolitů u kontrolních jedinců, kteří neměli projevy ICHS. Účinek snížení homocysteinu díky CBS variantě je u těchto jedinců spíše malý a je provázen zřetelnými změnami v koncentraci ostatních sirných sloučenin. Autoři proto předpokládají, že ochranný efekt CBS *c.844ins68* varianty může být způsoben kombinací její schopnosti snižovat hladinu homocysteinu cestou transsulfurační dráhy spolu s facilitací methylace.

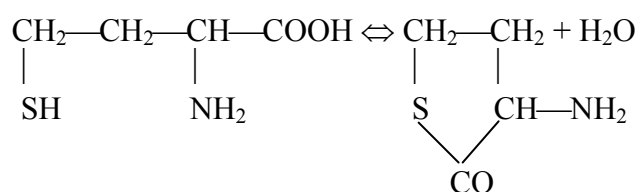
Další argument, který tuto hypotézu podporuje, je, že pacienti s Downovým syndromem mají nižší výskyt a pomalejší progresi ICHS. To může být způsobeno aktivovanou transsulfurací způsobenou hyperexpresí CBS genu, který se nachází na 21. chromozomu, kterého mají tito pacienti tři kopie. Metabolické změny přítomné u nosičů CBS *c.844ins68* souhlasí se zesílením neustálého odbourávání homocysteinu transsulfurační dráhou. Nižší pozátěžová koncentrace homocysteinu u nosičů varianty CBS *c.844ins68bp* je srovnatelná se závěry předchozích prací. V této studii nosičé CBS *c.844ins68* také vykazovali po zátěži nižší hladiny AdoHcy a vzrůstající poměr cysteinu k homocysteinu, který může být použit jako nepřímý marker účinnosti transsulfurace. Dvě molekulární studie nepřímo podporují závěry, že *c.844ins68* alela opravdu může být spojena s vyšší aktivitou CBS a se vzrůstajícím množstvím CBS mRNA. Nosičství této alely tak může být spojeno s vyšší účinností procesu odstraňování homocysteinu z methioninového cyklu cestou transsulfurační dráhy, zvláště v podmínkách zvýšeného přísunu methioninu.

Navíc porucha methylace byla předpokládána jako mechanismus endotelové dysfunkce a faktor zapříčiňující proliferaci hladké svaloviny

v cévní stěně při expozici tkáňových kultur a CBS deficientních myší homocysteinu. Methylace je zajišťována četnými methyltransferázami, které jsou obecně inhibovány AdoHcy a naopak fungují účinněji se vzrůstající koncentrací AdoMet. Nižší AdoHcy a vyšší AdoMet koncentrace u nosičů CBS *c.844ins68* tak naznačuje, že nosičství této protektivní alely může být provázeno zlepšenou methylační funkcí vaskulárního systému¹².

2.4 Mechanizmy účinku

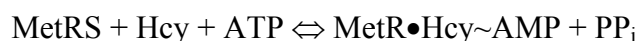
Škodlivý účinek homocysteinu byl postupně prokázán, na tomto místě tedy zmíním teorie o principech, kterými se uplatňuje.



Obr. 6. Thiolakton homocysteinu.

Dle Přistoupilová K. et al.: Homocystein – molekula těšící se rostoucí pozornosti¹³

Obecně je přijímána tzv. homocystein-laktonová teorie (obr. 9). Homocystein sám se nemůže zapojovat do biochemických pochodů, proto je konvertován reakcí katalyzovanou některou chybně fungující methionyl-tRNA-syntázou (MetRS, enzym popsáný ve všech živých organizmech včetně člověka) na thiolakton homocysteinu (HcyT) (obr. 6, 7).^{14,15,16,17,18}

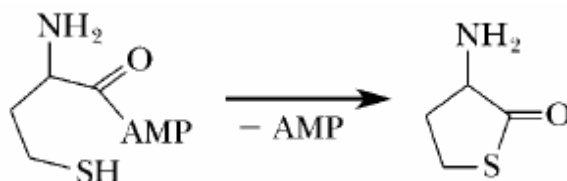


thiolakton homocysteinu

Obr. 7. Konverze homocysteinu na thiolakton homocysteinu.

Upraveno dle Jakubowski et al., Homocystein Thiolactone and Protein Homocysteinylation in Human Endothelial Cells¹⁷

Tato konverze zahrnuje reakci Hcy s ATP, formuje se tak na MetRS vázaný homocystein-adenylát (MetR•Hcy~AMP) a pyrofosfát (PP_i). Hcy~AMP vstupuje do reakce, kde je thiolová skupina postranního řetězce (-SH, obr. 8) homocysteinu substituována AMP skupinou karboxylu aktivovaného homocysteinu, vzniká tak thiolakton homocysteinu jako produkt:



Obr. 8. Konverze homocysteinu na thiolakton homocysteinu.

Dle Jakubowski et al., Homocystein Thiolactone and Protein Homocysteinylation in Human Endothelial Cells¹⁷

HcyT byl nejprve objeven v mikrobiálních kulturách, ale bylo zjištěno, že je také syntetizován nejen v endotelových, ale i v ostatních savčích buňkách. Zda syntéza HcyT probíhá i v lidských buňkách cév zatím není známo. Ovšem pokud ano, může to být přijatelné vysvětlení chemického mechanismu toxického účinku Hcy na cévní stěnu a endotelie. V experimentální kultuře lidských endotelií z umbilikální vény (HUVECs) byla pozorována možný průběh hydrolýzy thiolaktonu. Stejně tak byla popsána v této kultuře posttranslační inkorporace Hcy do proteinů¹⁷.

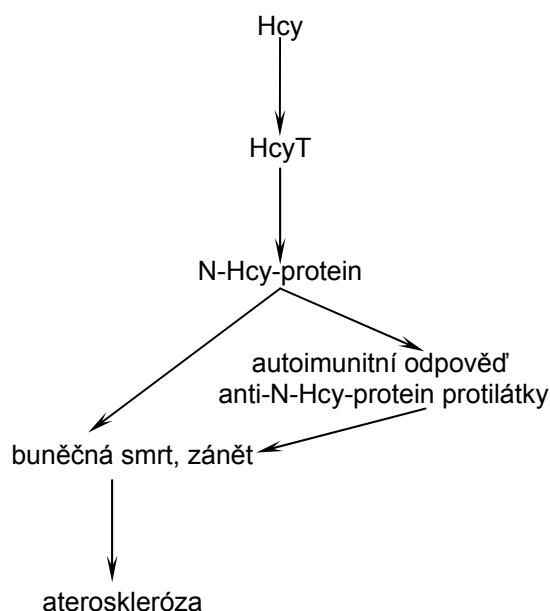
Mechanismů účinku HcyT je pravděpodobně několik. Jedním z mechanismů je spotřeba energie buňky jednak tvorbou homocysteinyl-tRNA, jednak proteolytickou degradací homocysteinem modifikovaných proteinů¹⁹.

HcyT dále vstupuje díky vzájemné strukturální podobnosti do metabolických drah methioninu. Hcy je nitrosilací převeden na analog methioninu S-nitroso-Hcy a může být zaměněn s methioninem v proteosyntéze v biologických systémech včetně kultury lidských endotelových buněk. Záměna za methionin způsobuje vznik defektních proteinů.^{15,16}

Další z účinků HcyT je dán jeho schopností posttranslační modifikace proteinů za vzniku sloučenin, ve kterých je Hcy napojen izopeptidovou vazbou na ϵ -aminoskupinu lyzinových zbytků proteinů. Výsledným produktem pak jsou Hcy- ϵ N-Lys-proteiny. Krevní koncentrace homocysteinem modifikovaných bílkovin je přímo úměrná celkové plazmatické koncentraci homocysteinu. Hcy-N-albumin a Hcy-N-hemoglobin představují hlavní zásoby homocysteinu v krvi a jsou podstatně významnější než volný homocystein co do množství.

Poškození proteinů modifikací thiolaktonem homocysteinu spouští imunitní odpověď. U lidí byly nalezeny autoantilátky proti epitopu Hcy- ϵ N-Lys na HcyT modifikovaných proteinech.^{14,15,18,20}

Schopnost homocysteinu zasahovat do biosyntézy proteinů je podkladem poškození bílkovin, spouští apoptózu a vyvolává imunitní odpověď a pravděpodobně hraje roli v patogenezi lidských nemocí. Biochemický podklad by mohl být následující. Translační dráha má tyto výstupy:



Obr. 9. Homocystein-thiolaktonová hypotéza.

Upraveno dle Jakubovskí: Pathological Consequences of Hcy Excess¹⁴

- 1) reverzibilní S-nitrosylaci homocysteinu NO produkovaným NO-syntázou;
- 2) aminoacylaci tRNA-methioninu S-nitroso-homocysteinem katalyzovanou MetRS;
- 3) přenos S-nitroso-homocysteinu z S-nitroso-homocystein-tRNA-methioninu na tvořené polypeptidové řetězce na pozice obvykle obsazované methioninem. Následná transnitrosylace zanechává homocystein včleněný do proteinového řetězce.

Posttranslační dráha zahrnuje:

- 1) metabolickou konverzi homocysteinu na thiolakton homocysteinu katalyzovanou methionyl-tRNA-syntázou (MetRS);
- 2) acylaci lyzinových zbytků bílkovin HcyT (=N-homocysteinylace).

Tímto procesem jsou modifikované nejrůznější plazmatické proteiny a to jak *in vitro*, tak i *in vivo*. Homocysteinylace vede k inkorporaci přídavných thiolových skupin, které mohou poškodit fyzikálně-chemické vlastnosti a biologické účinky proteinů nebo zvyšovat humorální imunitní odpověď²¹.

Plazmatická koncentrace HcyT je zvýšena 59krát u pacientů s hyperhomocysteinémií zapříčiněnou mutací v MTHFR a 72krát u nosičů mutace CBS genu. HcyT v plazmě i v moči je také zvýšen u myší krměných dietou o vysokém obsahu methioninu²².

Hladina HcyT je závislá na poměru Hcy/Met, hladině kyseliny listové a HDL koncentraci, faktorech spojených s kardiovaskulárními chorobami. HDL-asociovaná lidská plazmatická Hcy-thiolaktonáza/paraoxonáza (PON) hydrolyzuje HcyT na homocystein, čímž snižuje N-homocysteinylaci. PON se podílí na protektivní roli HDL částic vůči oxidativnímu poškození a vůči toxicitě homocysteinu, čímž zpomaluje rozvoj aterosklerózy. Variabilita tohoto enzymu může hrát významnou úlohu ve výskytu kardiovaskulárních chorob asociovaných s homocysteinem.

Na HDL izolovaných od normolipidemických lidí inkubovaných s Hcy-thiolaktonem vzrůstá výskyt thiolových skupin (-SH) , z čehož vyplývá, že zde probíhá N-homocysteinylace. Nárůst výskytu -SH skupin koreluje se základní aktivitou HDL-PON, což ukazuje na možnou souvislost mezi vnímavostí HDL částic k homocysteinylaci a aktivitou HDL-PON. Pokles aktivity enzymu byl sledován u homocysteinylovaných HDL částic (Hcy-HDL). Negativní korelace mezi základní úrovní aktivity HDL-PON a procentuálním poklesem její aktivity naznačuje, že jedinci s vyšší úrovní aktivity enzymu mají nižší pokles její aktivity při

homocysteinylnaci, než jedinci s primárně nízkou aktivitou PON. Pozitivní korelace mezi procentuálním poklesem PON aktivity a procentuálním nárůstem koncentrace -SH skupin na Hcy-HDL ukazuje, že modifikace PON aktivity je dána změnami na povrchu Hcy-HDL. Proto pokles její aktivity u HDL částic inkubovaných s HcyT ukazuje, že homocysteinylnace může vést ke snížení antioxidační aktivity HDL i odolnosti vůči toxicitě HcyT²³.

Existují důkazy o tom, že HcyT reaguje i s LDL, kdy je volná aminoskupina LDL derivatizována pomocí HcyT za vzniku LDL-homocystamidu (Hcy-LDL) s -SH skupinou. Bylo popsáno strukturální a funkční poškození Hcy-LDL a zdá se, že homocysteinylnace LDL zvyšuje jeho aterogenitu. Oxidativní poškození endotelových buněk je považováno za rozhodující faktor při iniciaci aterosklerotického procesu. Na experimentálním modelu lidských aortálních endoteliích (HAEC) byla sledována interakce Hcy-LDL s endoteliemi a jejich oxidativní poškození. Ačkoli při inkubaci LDL s HcyT se neprokázalo oxidativní poškození LDL částic ani modifikace apoproteinů nebo fyzikálněchemických vlastností lipoproteinů, Hcy-LDL (inkubace při 37°C po dobu 3 hodin s HAEC) indukuje oxidativní poškození endotelií se signifikantním nárůstem hladiny lipidových hydroperoxidů oproti buňkám inkubovaných s kontrolním LDL. Základem změn je významný pokles viability buněk inkubovaných s Hcy-LDL. Podařilo se prokázat vztah mezi koncentrací -SH skupin na LDL a úrovní oxidativního poškození HAEC. To vše naznačuje, že Hcy-LDL má cytotoxický efekt, který je pravděpodobně spojen se vzestupem peroxidace lipidů a oxidačním poškozením endotelových buněk²⁴. Hcy-LDL agreguje a je zvýšeně vychytáván makrofágy za vzniku pěnových buněk a lipidových depozit v ateromech. HcyT uvolněný z Hcy-LDL zavzatých do cévních stěn vede k poškození intimy, oxidaci cholesterolu a nenasycených mastných kyselin, k agregaci destiček, myointimální hyperplazii, depozici sulfatovaných glykosaminoglykanů, k fibróze a kalcifikaci aterosklerotických plátů a k zesílení účinku trombogenních faktorů²⁵.

Další diskutovanou možností mechanismu účinku Hcy je možná vazba homocysteinu na NO a ovlivnění metabolismu argininu, včetně ADMA (N(G),N(G)-dimethylarginin). Je zdůrazňována souvislost mezi metabolismem homocysteinu, adenosinu a ostatních nukleotidů. N-homocysteinylace proteinů thiolaktonem velmi podstatně mění jejich vlastnosti a zdá se, že je to hlavní příčina biotoxicity homocysteinu a jeho účinky v patogenezi aterosklerózy a ostatních nemocí²⁶.

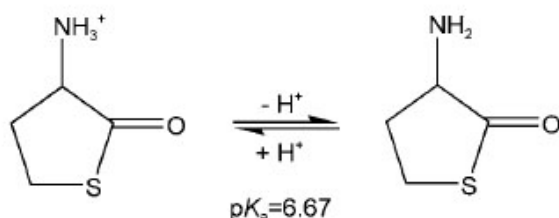
2.5 Detoxikace

Chemická reaktivita HcyT je spojována se vznikem kardiovaskulární choroby. Proto je jeho detoxikační cesta jedním z možných mechanismů snížení toxicity Hcy. HcyT je hydrolyzován na homocystein paraoxonázou, Ca^{2+} -závislou esterázou syntetizovanou v játrech a obsaženou v plazmatických HDL.

Díky tomu, že jde chemicky o aminoacylthioester, HcyT se snadno zapojuje do oxidoredukčních reakcí, přesněji jeho aktivovaná karboxylová skupina. Pro objasnění mechanismu reakcí této skupiny, byla analyzována kinetika kondenzace HcyT s formaldehydem, acetaldehydem a pyridoxalfosfátem při pH od 5 do 10. Reakce byly nejprve prováděny s ohledem na koncentrace HcyT, aldehydu a hydroxidových iontů. Ze dvou ionických forem HcyT^+ ($\text{pK}_a=6,67 \pm 0,05$) byla kyselá forma HcyT^+ přibližně 100x reaktivnější než zásaditá forma HcyT^0 . Vzhledem k tomu, že normální pH vnitřního prostředí je $7,4 \pm 0,04$, v krvi převládá, méně reaktivní forma. Reakce HcyT s aldehydem vede ke vzniku meziprojektu karbinolaminu, jehož konverze dává vzniknout 1,3-tetrahydrothiazin-4-karboxylové kyselině a jejímu 2-substituovanému analogu.

Tato reakce je v několika ohledech neobvyklá. Ve srovnání s jinými reakcemi aminů s karbonylovými sloučeninami, které bývají obvykle katalyzované kyselinou a jsou charakterizované pH optimem, kondenzace thiolaktonu s aldehydem je katalyzována hydroxydovými

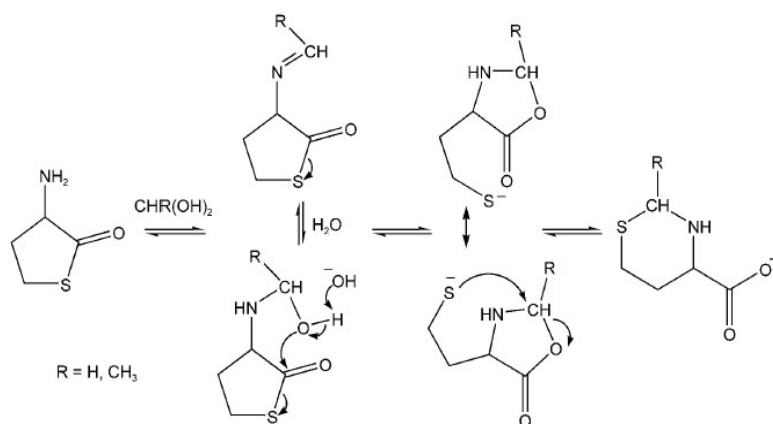
anionty a rychlost reakce stoupá kontinuálně v závislosti na zvyšujícím se pH. Hodnota pKa (což je hodnota pH, při kterém je v roztoku stejné množství kyselých jako zásaditých forem) aminové skupiny je $6,67 \pm 0,05$ a thiolakton je ve formě kyseliny 100krát reaktivnější než ve formě zásady (obr. 7).



Obr. 7. Thiolakton homocysteinu ve formě kyseliny a zásady.

Z Jakubowski: Mechanism of condensation of homocysteine thiolactone with aldehydes¹⁹

Dále by bylo možné na základě pozorování jiných reakcí aminu s aldehydem předpokládat tvorbu iminu jako produktu, v této reakci se ovšem imin v rovnováze s karbolaminem vyskytuje pouze jako meziprodukt. Tvorba karmolaminu destabilizuje thioesterovou vazbu a urychluje reakci $\sim 10\,000$ krát. K této destabilizaci dochází působením kyslíku karbolaminové skupiny na esterovou vazbu, (obr. 8). To vede k uvolnění k thiolátové skupiny, k reakci thiolátové skupiny s uhlíkem pocházejícím z aldehydu a ke tvorbě šestičlenného tetrathiazinového kruhu a k rozštěpení laktonu.



Obr. 8. Mechanismus kondenzace thiolaktonu homocysteinu s formaldehylem ($R=H$) a acetaldehydem ($R=CH_3$).

Z Jakubowski: Mechanism of condensation of homocysteine thiolactone with aldehydes¹⁹

Ačkoli je thiolakton homocysteinu stejně jako aldehydy přítomen v živých organismech, přítomnost 1,3-tetrahydrothiazin-4-karboxylové kyseliny byla popsána pouze u *Aerobacter aerogenes*. Snadná tvorba tetrahydrothiazinů z thiolaktonu homocysteinu a aldehydů umožňuje předpokládat, že thiolakton je z těla vyloučen ve formě nereaktivního tetrahydrothiazinu, avšak do jaké míry k tomu dochází, nebylo dosud publikováno¹⁹.

2.6 Tromboembolická nemoc²⁶

Jak již bylo zmíněno v úvodu, homocystein zasahuje do nejrůznějších systémů. Dalším velmi důležitým účinkem, který stručně zmíním, je ovlivnění krevní srážlivosti.

15 – 40% pacientů s klinickými projevy aterosklerózy (IM, CMP, ICHS) mají zvýšené hladiny homocysteinu.

2.6.1 Adenosylhomocystein

Akumulace adenosylhomocysteinu v buňkách v důsledku vysoké hladiny cirkulujícího homocysteinu, inhibuje methyltransferázy, které pomáhají opravovat poškozené buňky. Tento mechanismus byl popsán u pacientů s renálním selháním a středně těžkou hyperhomocysteinémií.

2.6.2 Trombocyty

Biochemické měření metabolitů v moči a klinické studie s ASA ukazují, že zvýšená syntéza tromboxanu A₂ (TXA₂) krevními destičkami, je hlavním rizikovým faktorem trombózy, spojené se závažnými riziky. In vitro byla prokázána abnormálně vysoká syntéza TXA₂ u osob s homocysteinurií na základě měření hlavních enzymatických metabolitů v moči. Abnormality v syntéze TXA₂ mají zřejmě původ v krevních destičkách.

Jako kritický bod aktivace destiček je známa aktivace koagulační kaskády spolu s endotelovou dysfunkcí a endotelová dysfunkce sama osobně. Tyto procesy vedou ke zvýšení syntézy TXA₂. Hyperkoagulační stav a endotelová dysfunkce jsou zapříčiněny mimo jiné homocysteinem.

U pacientů s homocysteinurií byla v některých studiích popsána abnormálně krátká doba přežívání trombocytů. Vyšší agregace destiček po expozici homocysteinu byla potvrzena studiemi, ovšem existují diskrepance ve výsledcích jednotlivých pokusů objasňujících účinek HcyT na funkci destiček. První studie naznačovaly, že efekt je malý, ovšem postupem času, jak byly používány různé varianty inaktivních solí thiolaktonu homocysteinu (hydrochloridových forem), se ukázalo, že volné baze HcyT potencují agregabilitu trombocytů. Možné řešení přinesla práce prokazující, že homocystein nezpůsobuje agregaci destiček sám o sobě. To je ve shodě s antiagregačním efektem ostatních thiolů s nízkou molekulární hmotností, které mají fyzikálně-chemické vlastnosti podobné cysteinu a glutathionu. Ovšem homocystein může zvýšit adhezivitu destiček k endoteliím. Adheze je následkem toxického efektu Hcy na endotelie. Ty produkují endothelium-derived relaxing factor (EDRF), který reaguje s Hcy za vzniku S-nitroso-Hcy. To je silný antiadhezivní činitel pro trombocyty s biologickým poločasem 15 minut (pro srovnání EDRF má $T_{1/2}$ 5 - 30 sekund). Proto se za normálních podmínek toxicita Hcy neprojeví, neboť je neutralizována vznikajícím S-nitroso-Hcy. Jakmile ovšem hladina Hcy naroste natolik, že EDRF je plně satureován, přebytek nemodifikovaného Hcy uplatní svůj toxický účinek. Zapříčiní poškození endotelií, čímž se sníží i produkce EDRF a tím poklesne produkce ochranného metabolitu S-nitroso-Hcy.

2.6.3 Oxidační stres

Aplikace 500 mg probucolu, což je antioxidant s preventivním účinkem proti oxidaci LDL in vitro, vedla v pokusu ke 40-60% poklesu exkrece TX metabolitů močí, která však nesouhlasila s poklesem

cholesterolu v krvi. Zatímco oxidace LDL, která může zvyšovat syntézu TXA₂ destičkami, je usnadněna Hcy, inhibice syntézy TXA₂ probucolem ukazuje na možnost, že oxidace lipoproteinů se účastní na vzrůstu metabolismu kyseliny arachidonové v destičkách. Toto bylo prokázáno u pacientů s deficitem CBS. Peroxidace lipidů může být iniciována nejenom peroxidem vodíku, ale i superoxidovým aniontem a hydroxylovými radikály, které jsou produkovány během autooxidace thiolů.

2.6.4 Koagulace, fibrinolýza

Ex vivo data od pacientů s homocysteinurií ukázala různé abnormality koagulačního systému.

2.6.4.1 Protein C

Byly popisovány redukováné hladiny faktoru VII, antitrombinu a proteinu C. In vitro studie popsaly, že aktivita faktoru V a aktivace protrombinu vzrůstá po přidání 0,5 – 10 μmol/l Hcy (studie byla provedena na kultuře bovinních aortálních endotelií). Efekt je závislý na délce inkubace, protože je ovlivněn přirozeným antikoagulačním faktorem proteinem C. Inkubace HUVECs i bovinních buněk se 7,5 μmol/l Hcy vede po 6 – 9 hodinách k 90% inhibici aktivace proteinu C, pravděpodobně na principu kompetitivní inhibice trombomodulin-trombinové interakce Hcy. Byl popsán na čase a dávce závislý inhibiční efekt Hcy na aktivitu kofaktoru trombomodulinu. Trombomodulinová aktivita (měřená aktivací proteinu C) byla interakcí s Hcy (10 mmol/l) o 5 – 10% nižší oproti kultuře, která nebyla vystavena inkubaci. Pravděpodobně se jedná o redukcí nativního trombomodulinu, kterou následuje kompenzatorní vzestup exprese trombomodulinového genu a vzestup celkové hladiny trombomodulinu. Nakonec bylo v nebuněčných systémech prokázáno, že Hcy dokáže inhibovat vazbu trombomodulinu na trombin, což je způsobeno poklesem vazebné kapacity redukováného trombomodulinu.

Inkubace HUVECs s 10 mmol/l Hcy po dobu 6 hodin vede k 8násobnému vzestupu aktivity tkáňového faktoru. Účinek je závislý na dávce. Bylo prokázáno, že sirná skupina Hcy je jen pomocným prvkem mezi sledovanými faktory.

2.6.4.2 Antitrombin III

Vliv homocysteinu na antitrombin III (APIII) byl zkoumán na interakci mezi AP a heparin-like glykosaminoglykany na prasečích aortálních endoteliích. Maximální vazebná kapacita antitrombinu III k heparansulfátu byla snížena o 30% oproti normálu po 24 inkubaci s 1 mmol/l Hcy. Toto závisí na thiolových skupinách a zdá se, že umocňuje produkci peroxidu vodíku. K zastavení procesu došlo přidáním katalázy, superoxidodismutáza tento efekt neměla.

2.6.4.3 Fibrinolytický systém

Po inkubaci HUVECs s 1,5 – 7,5 mmol/l Hcy došlo k 65% poklesu výskytu buněčných vazebných míst pro tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA). Stejně tak došlo k poklesu výskytu vazebných míst pro t-PA na 40 kDa receptorových proteinech. Receptorová kapacita pro vazbu plazminogenu přitom nebyla poškozena. Zdá se tedy, že poškození se týká pouze domény pro t-PA, C-konec vazající plazminogen zůstal nezměněn.

Jiná studie sledovala možnost modulace fibrinolýzy Hcyna základě interakce mezi plazminem modifikovaným fibrinem a lipoproteinem (a) (Lp(a)). Lp(a) interferuje s fibrinolýzou díky strukturální podobnosti se čtvrtým závitem plazminogenu. Tato vazba je inhibována ϵ -aminokapronovou kyselinou, což dokládá vazebnou specifitu. Naopak byla potencována cysteinem, glutathionem a N-acetylcysteinem. Homocystein by mohl být zodpovědný za poškození apo(a) struktury, nejspíš odkrytím dalších vazebných míst pro fibrin. Takto může být trombogenní efekt Lp(a) zvyšován homocysteinem.

2.7 Sekrece inzulinu

Jako poslední systémový účinek zmíním studie zabývající se vlivem homocysteinu na sekreci inzulinu.

Byly použity experimentální kolonie pankreatických BRIN-BD11 β -buněk, aby se zjistilo, jaké funkční defekty se projeví při dlouhodobé expozici HcyT v porovnání s homocysteinem. Akutní i dlouhodobá expozice oběma agens zapříčinila na koncentraci závislou inhibici glukózou indukované sekrece inzulinu. Poškození sekrece inzulinu reaguje na alanin, KCl, zvýšení koncentrace vápenatých iontů, forskolin a PMA. Akutní expozice také zapříčinila významný pokles amplitudy membránové depolarizace navozené KCl, ale neměla efekt na změny koncentrace Ca^{2+} navozené alaninem nebo KCl. Množství buněčného inzulinu a poškození DNA nebylo v buněčné kultuře prokázáno, ovšem byly zde pozorovány známky časně apoptózy spolu s poruchou buněčné integrity. V konečném důsledku tak expozice thiolaktonu homocysteinu stejně jako homocysteinu vede k dysfunkci β -buněk a k jejich zániku mechanismem závislým na změnách membránového potenciálu a intracelulární koncentrace Ca^{2+} .²⁸

Dalším možným mechanismem účinku homocysteinu na β -buňky může spočívat v jeho schopnosti autooxidace a následné tvorby peroxidu vodíku. 20 nebo 40 minutovou inkubací BRIN-BD11 β -buňky s homocysteinem se ukázalo, že homocystein v koncentraci 50 - 1000 $\mu\text{mol/l}$ inhibuje základní i glukózou indukovanou sekreci inzulinu, přičemž síla účinku je závislá na koncentraci homocysteinu. Inzulinotropní odpověď na alanin, arginin, 2-ketoizokaproát, zvýšení koncentrace Ca, tolbutamid, KCl, forskolin a forbo-12-myristat-13-acetát byla homocysteinem také významně snížena. Stejně tak preinkubace s homocysteinem měla za následek snížení sekrece při stimulaci glukózou a při každém testu sekretagogy. Je zajímavé, že přebytek katalázy (100 $\mu\text{g/ml}$) v pufru, který stačil na odstranění peroxidu vodíku vyprodukovaném homocysteinem, nezmírnil škodlivý efekt homocysteinu. Ačkoli homocystein může produkovat reaktivní formy

kyslíku, z této studie vyplývá, že poškození β -buněk homocysteinem může být nezávislé na jeho oxidačním efektu²⁹.

Závěr

Homocystein je molekula, „o které se mluví“ a mluví se o ní mnohdy hodně protichůdně. Lze najít názory, zvláště v populárně naučných materiálech, které snížení hladiny homocysteinu staví na úroveň univerzálního léku proti *všem* civilizačním chorobám. Bylo by hezké, kdyby takový lék existoval, obávám se však, že vitaminy redukující hladinu homocysteinu jím nejsou.

Homocystein je molekula, která bez pochyby může ovlivňovat celou řadu metabolických pochodů. Zda zasahuje nějakým zásadním způsobem přímo do iniciace a progresu aterosklerózy nelze zatím jednoznačně doložit. Problém je v tom, že ačkoli jsou postupně popisovány různé možné mechanismy účinku, stále se přesně neví, nakolik je homocystein nezbytný pro spuštění patologického procesu. Jinými slovy, zda by se daná porucha nerozběhla i sama o sobě, případně jak rychle a jak těžký by byl její průběh.

Ukazuje se, že v ateroskleróze je homocystein závislým faktorem, který spíše negativně ovlivňuje průběh onemocnění, než že by je sám zapříčinil. Je přirozený metabolit, organismus má dostatečné kapacity, jak jeho hladinu regulovat a jeho toxický účinek neutralizovat. Škodlivým se stává tehdy, jsou-li regulační mechanismy poškozeny ať již primárně nebo sekundárně jiným onemocněním, které pak homocystein může zpětně ještě zhoršovat.

Nekonstantní výskyt hyperhomocysteinémie u pacientů s kardiovaskulárními chorobami zatím nedává příliš nadějí pro využití diagnostiky rizika ICHS. Ani dietní pokusy o snížení plazmatických hladin homocysteinémie a podávání vitaminů B6, B12 a folátu nevedly ke snížení kardiovaskulární morbidity či mortality.

Shrnutí

Hyperhomocysteinémie podle některých autorů může zhoršovat průběh aterosklerózy na základě několika různých mechanismů. Homocystein jako nestabilní sloučenina je oxidován za vzniku thiolaktonu homocysteinuu, který je hlavním nosičem poškození. Homocysteinylací proteinů spouští autoimunitní reakci, která hraje ve velmi podstatnou úlohu v rozvoji cévního poškození, protože i to je na zánětlivém podkladě. Záměnou za methionin v proteosyntéze dává vznik defektním proteinům. Oxidací LDL částic zvyšuje oxidační stres, usnadňuje ukládání lipoproteinů do cévní stěny a tím usnadňuje její poškození. Zvýšením agregability destiček a ovlivněním koagulačních faktorů ve smyslu prokoagulace může urychlit tvorbu trombu na aterosklerózou poškozených cévách, což vede k manifestaci onemocnění. Je možné, že poškozením pankreatických β buněk vede k postupnému zhoršení sekrece inzulínu a tak k hyperglykémii. Navzdory těmto teoriím je kauzální vztah hyperhomocysteinémie k ateroskleróze je však stále předmětem diskuzí.

Summary

Hyperhomocysteinemia may aggravate atherosclerosis through several mechanisms. Homocysteine is a non-stable compound, it can be oxidized to form homocysteine-thiolactone, possibly a major harming agent. Protein homocysteinylation triggers autoimmune response which plays a very important role in the development of vascular cell injury and enhances the inflammatory process within the arterial intima. The permutated methionine in the proteosynthesis produces aggrieved proteins. The possible aggravating role in LDL oxidation may enhance the atherogenicity of these lipoproteins. The increase of platelet aggregation in association with procoagulation effects can accelerate the development of intravascular thrombi. Moreover, Hcy may possibly cause damage of pancreatic β cells and thus decline of insulin secretion. Despite these theories, the exact association between Hcy and atherosclerosis remains to be further elucidated.

Prameny

- 1: Cotran R.S., Kumar V., Collins T. et al.: *Tobbins Pathological Basis of Disease*, 6th Edition, Philadelphia: *W.B. Sanders Company*, 1999, s. 498-510.
- 2: Šteiner I., Nožička Z., Povýšilová V.: *Patologie oběhového ústrojí z Povýšil C., Šteiner I., Dušek P. et al.: Speciální patologie 1. díl, Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, Praha 2001, s. 7-10.*
- 3: Erben K.: Homocystein – podivuhodná molekula nebezpečná pro člověka, *Vesmír* 2004/8; 433.
- 4: Malinow, M. R. et al.: Homocyst(e)ine, Diet, and Cardiovascular Diseases A Statement for Healthcare Professionals From the Nutrition Committee, American Heart Association. *Circulation* 1999;99:178-182.
- 5: Mudd S.H., Finkelstein J.D., Refsum H. et al.: Homocysteine and Its Disulfide Derivates: A Suggested Konsensus Terminology. *Arteriosclerosis, Trombosis and Vascular Biology* 2000; 20; 1704-1706.
- 6: Heart Protection Study Collaborative Group: MRC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2002 Jul 6;360(9326):23-33.
- 7: Guthikonda S., Haynes W.G.: Homocysteine: role and implications in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2006 Mar; 8(2): 100-6.
- 8: National Heart, Lung, and Blood Institute; Framingham Heart Study: Estimating Coronary Heart Disease (CHD) Risk Using Framingham Heart Study Prediction Score Sheets, (on-line) www.nhlbi.nih.gov/about/framingham/riskabs.htm (16. 6. 2007)
- 9: Kullo I.J., Li G., Bielak L.F. et al.: Association of plasma homocysteine with coronary artery calcification in different categories of coronary heart disease risk. *Mayo Clin Proc*. 2006 Feb; 81(2): 177-82.
- 10: Głowińska B., Urban M., Peczyńska J. et al.: Elevated concentrations of homocysteine in children and adolescents with arterial hypertension accompanying Type 1 diabetes. *Clinical Research, Med Sci Monit*, 2001; 7(6): 1242-1249.

- 11: Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně: Genetika populací – organizace genetické variability (on-line) old.mendelu.cz/~agro/af/genetika/vsg3/pop/popul4.html
- 12: Janošíková B., Pavlíková M., Kocmanová D. et al.: Genetic variants of homocysteine metabolizing enzymes and the risk of coronary artery disease. *Molecular genetics and Metabolism* 79 (2003) 167-175.
- 13: Přistoupilová K., Přistoupil T.I., Heyrovský M.: Homocystein – molekula těšící se rostoucí pozornosti. *Chemické listy* 93, 365-374 (1999).
- 14: Jakubowski H.: Pathophysiological consequences of homocysteine excess. *J Nutr.* 2006 Jun;136(6 Suppl):1741S-1749S.
- 15: Jakubowski H.: Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cell Mol Life Sci.* 2004 Feb;61(4):470-87.
- 16: Jakubowski H.: Homocysteine-thiolactone and S-nitroso-homocysteine mediate incorporation of homocysteine into protein in humans. *Clin Chem Lab Med.* 2003 Nov;41(11):1462-6.
- 17: Jakubowski H., Zhang L., Bardeguet A., Aviv A.: Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation in human endothelial cells: implications for atherosclerosis. *Circ Res.* 2000 Jul 7;87(1):45-51.
- 18: Beltowski J.: Protein homocysteinylation: a new mechanism of atherogenesis? *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2005;59:392-404.
- 19: Jakubowski H.: Mechanism of the condensation of homocysteine thiolactone with aldehydes. *Chemistry.* 2006 Oct 25;12(31):8039-43.
- 20: Jakubowski H.: Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cell Mol Life Sci.* 2004 Feb;61(4):470-87.
- 21: Jakubowski H.: Protein N-homocysteinylation: implications for atherosclerosis. *Biomed Pharmacother.* 2001 Oct;55(8):443-7.
- 22: Chwatko G., Boers G.H., Strauss K.A., Shih D.M., Jakubowski H.: Mutations in methylenetetrahydrofolate reductase or cystathionine {beta}-syntase gene, or a high-methionine diet,

increase homocysteine thiolactone levels in humans and mice. *FASEB J.* 2007 Feb 27; [Epub ahead of print]

23: Ferretti G., Bacchetti T., Marotti E., Curatola G.: Effect of homocysteinylolation on human high-density lipoproteins: a correlation with paraoxonase activity. *Metabolism.* 2003 Feb;52(2):146-51.

24: Ferretti G., Bacchetti T., Moroni C., Vignini A., Nanetti L., Curatola G.: Effect of homocysteinylolation of low density lipoproteins on lipid peroxidation of human endothelial cells. *J Cell Biochem.* 2004 May 15;92(2):351-60.

25: McCully K.S.: Chemical pathology of homocysteine. I. Atherogenesis. *Ann Clin Lab Sci.* 1993 Nov-Dec;23(6):477-93.

26: Di Minno G., Coppola A., Mancini F.P., Margaglione M.: Homocysteine, platelet function and thrombosis. *Haematologica* 1999; 84: (EHA-4 educational book): 61-63.

27: Patterson S., Flatt P.R., McClenaghan N.H.: Homocysteine-induced impairment of insulin secretion from clonal pancreatic BRIN-BD11 beta-cells is not prevented by catalase. *Pancreas.* 2007 Jan;34(1):144-51.

28: Patterson S., Flatt P.R., McClenaghan N.H.: Major metabolic homocysteine-derivative, homocysteine thiolactone, exerts changes in pancreatic beta-cell glucose-sensing, cellular signal transduction and integrity. *Arch Biochem Biophys.* 2007 May 15;461(2):287-93.