



## THE EFFECTS OF HOMOCYSTEINE AND CARBON OXIDE INHIBITOR, APPLIED SEPARATELY AND SIMULTANEOUSLY, ON ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN THE RAT HEART TISSUE

### *UTICAJ HOMOCISTEINA I INHIBITORA SINTEZE UGLJEN-MONOKSIDA, ADMINISTRIRANIH POJEDINAČNO I SIMULTANO, NA AKTIVNOST ACETILHOLINESTERAZE U SRCU PACOVA*

Adi Hadžibegović<sup>1</sup>, Jelena Ćuk<sup>1</sup>, Danijela Krstić<sup>2</sup>, Dragan Đurić<sup>3</sup>

<sup>1</sup> University of Belgrade, Faculty of Medicine, Serbia

<sup>2</sup> Mentor: University of Belgrade, Faculty of Medicine, Institute of Medical Chemistry, Serbia

<sup>3</sup> Mentor: University of Belgrade, Faculty of Medicine, Institute of Medical Physiology "Richard Burian"

**Correspondence:** a.hadzibegovic@gmail.com

#### ABSTRACT

**Introduction:** Hyperhomocysteinemia has a role in the pathogenesis of various pathological states, such as cardiovascular and neurodegenerative disease and cancer. Acetylcholinesterase (AChE) is an enzyme that catalyzes the breakdown of acetylcholine. Carbon monoxide (CO) belongs to the gas transmitter family, and it has vasodilatory, anti-inflammatory, antiapoptotic and antioxidant effects. Considering these facts, the research of the relations between homocysteine and CO on AChE activity in rat cardia tissue should be relevant.

**Aim:** The objective of this study is to examine and compare the effects of homocysteine and Zn PPR IX on acetylcholinesterase activity in rat cardiac tissue, separately and simultaneously applied.

**Material and methods:** AChE activity in the rat cardiac homogenate tissue was examined after acute homocysteine application, in a dose of 8 mmol/kg b.m i.p., as well as Zn PPR IX application in a dose of 30  $\mu$ mol/kg b.m. i.p., separately and simultaneously. AChE activity was determined by Ellman method, 60 minutes after application.

**Results:** AChE activity was expressed as  $\Delta A/\text{min mg tissue}$ , and it was ( $0.039 \pm 0.003$ ) in the control group; ( $0.023 \pm 0.002$ ) in the group where homocysteine was applied; ( $0.024 \pm 0.002$ ) in the group where Zn PPR IX was applied; and ( $0.051 \pm 0.004$ ) in the group where tested compounds were applied simultaneously. Homocysteine caused a statistically significant reduction of AChE activity compared to the control group ( $p = 0.007$ ), Zn PPR IX also caused a statistically significant reduction of AChE activity, compared to the control group ( $p = 0.006$ ). There was statistically relevant difference between AChE activity caused by homocysteine and Zn PPR IX. Simultaneously applied compounds caused statistically significant increase of AChE activity, compared to control group ( $p = 0.009$ ).

**Conclusion:** Examined compounds caused statistically significant decrease of AChE activity in the rat cardiac homogenate tissue compared to control group, but there is not statistically significant difference between homocysteine and Zn PPR IX. Surprisingly, there is a statistically significant increase of AChE activity after homocysteine application and Zn PPR IX, simultaneously compared to control group, which is opposite to effects of these two compounds applied separately.

#### Key words:

homocysteine,  
Zn PPR IX,  
AChE,  
CO

## SAŽETAK

**Uvod:** Hiperhomocisteinemija ima ulogu u patogenezi raznih oboljenja, kao što su kardiovaskularna, neurodegenerativna oboljenja i kancer. Acetilholinesteraza (AChE) je enzim koji katalizuje hidrolizu acetilholina u holinergičkoj sinapsi. Ugljen-monoksid pripada familiji gasotransmitera i ima vazodilatatornu, antiinflamatornu, antiapoptoznu i antioksidativnu ulogu. Uzimajući sve navedeno u obzir, smatrali smo da je od interesa, što je i cilj ovog rada, da ispitamo ulogu homocisteina i ugljen-monoksida na aktivnost enzima AChE u srcu pacova.

**Cilj:** Cilj rada je bio da se uporede efekti homocisteina i cink-protoporfirina IX (Zn PPR IX - inhibitor enzima hemoksigenaze tipa 1), aplikovanih pojedinačno i simultano na aktivnost acetilholinesteraze u tkivu srca pacova.

**Materijal i metode:** U eksperimentu je određivana aktivnost AChE u homogenatu srca pacova pri akutnoj aplikaciji, homocisteina u koncentraciji od 8 mmol/kg t.m. i.p. i Zn PPR IX u koncentraciji 30  $\mu$ mol/kg t.m. i.p., pojedinačno i simultano. Aktivnost AChE je određivana metodom po Elmanu, 60 minuta posle aplikacije.

**Rezultati:** Aktivnost AChE je izražena kao AChE  $\Delta A/\text{min mg tkiva}$  i iznosila je  $0,039 \pm 0,003$  u kontrolnoj grupi;  $0,023 \pm 0,002$  u grupi tretiranoj homocisteinom;  $0,024 \pm 0,002$  u grupi tretiranoj Zn PPR IX i  $0,051 \pm 0,004$  u grupi tretiranoj homocisteinom i Zn PPR IX. Homocistein je izazvao značajno statističko smanjenje aktivnosti AChE u odnosu na kontrolnu grupu ( $p = 0,007$ ). Statistički značajno smanjenje aktivnosti AChE u odnosu na kontrolnu grupu izazvao je i Zn PPR IX ( $p = 0,006$ ). Nije utvrđena statistička značajnost između smanjenja aktivnosti AChE izazvane homocisteinom ili Zn PPR IX. Simultano aplikovane obe supstance izazvale su statistički značajno povećanje aktivnosti AChE u odnosu na kontrolnu grupu ( $p = 0,009$ ).

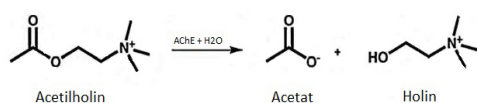
**Zaključak:** Ispitivane supstance statistički značajno smanjuju aktivnost acetilholinesteraze u homogenatu srca pacova u odnosu na kontrolnu grupu, ali nema statistički značajne razlike između aktivnosti AChE postignute homocisteinom ili Zn PPR IX. Iznenadujuće, dolazi do povećane aktivnosti AChE nakon simultane aplikacije homocisteina i Zn PPR IX u odnosu na kontrolnu grupu, što je u suprotnosti sa efektima ovih supstanci datih pojedinačno.

### Keywords:

homocistein,  
Zn PPR IX,  
acetilholinesteraza,  
ugljen-monoksid

## Uvod

Acetilholin (ACh) je jedan od najvažnijih neurotransmitera koji svoju fiziološku funkciju ostvaruje i u centralnom i u perifernom nervnom sistemu. U perifernom nervnom sistemu je glavni neurotransmiter koji reguliše aktivnost i simpatikusa i parasimpatikusa. Acetilholin preko svojih muskarinskih receptora deluje na srce negativno inotropno, dromotropno, hronotropno i batmotropno (1). Neki autori navode i da ACh štiti srce od ishemijsko/reperfuzionih povreda, kao i da ima protektivno dejstvo u hroničnoj srčanoj insuficijenciji (2). Acetilholinesteraza (EC 3.1.1.7; AChE) je enzim koji pripada familiji serin hidrolaza i katalizuje hidrolizu acetilholina u holinergičkoj sinapsi (3) (slika 1).

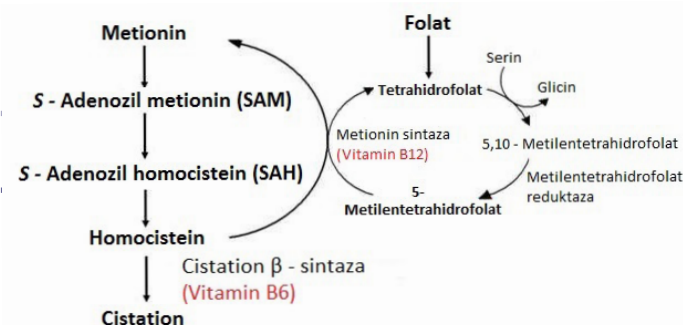


Slika 1. Hidroliza acetilholina na acetat i holin

Pored primarne uloge da hidrolizuje acetilholin u holinergičkim sinapsama, acetilholinesteraza ima i aktivnost u hematopoeznim i nervnim ćelijama, osteoblastima,

vaskularnim endotelnim ćelijama i leukocitima (4–6).

Hiperhomocisteinemija predstavlja povećanu koncentraciju homocisteina u krvi (iznad 16  $\mu$ mol/l). Nastaje zbog polimorfizma gena koji kodiraju regulatorne enzime u transulfurnom putu i metioninskom ciklusu, deficita vitamina B6 i B12 i folne kiseline (7) (slika 2).

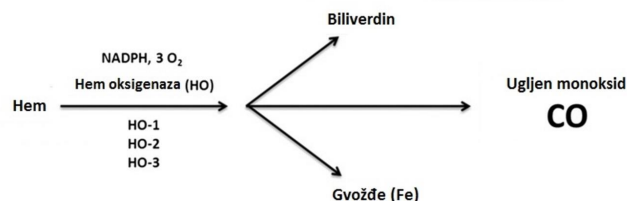


Slika 2. Metabolizam homocisteina

Homocistein se konvertuje u reaktivniji ciklični tioestar homocistein tiolakton (8). Homocistein predstavlja faktor rizika za kardiovaskularne bolesti (ateroskleroza, tromboza i endotelna disfunkcija), kao i za nastanak nagle srčane smrti i aritmija (9–12).

Endogeni ugljen-monoksid (CO) ima važnu fiziološku ulogu u homeostazi kardiovaskularnog i nervnog

sistema. On, pored toga, deluje i antioksidativno, antiinflamatorno i antiapoptotički (13, 14). Ugljen-monoksid nastaje dejstvom mikrozomalnog enzima hemoksigenaze (E.C. 1:14:99:3, HO) (slika 3).



Slika 3. Sinteza ugljen-monoksida

Hemoksigenaza katalizuje razgradnju hema na biliverdin, gvožđe i ugljen-monoksid. Hemoksigenaza ima tri izoenzima: hemoksigenazu 1 (HO-1), hemoksigenazu 2 (HO-2) i hemoksigenazu 3 (HO-3). Hemoksigenaza 1 je inducibilni enzim, dok su HO-2 i HO-3 konstitutivni (15). Povećana ili smanjena ekspresija HO prisutna je kao jedan od patofizioloških mehanizama u mnogim bolestima, kao što su Alchajmerova i Parkinsonova bolest, povišen krvni pritisak, hipertrofija srca, hronična srčana insuficijencija itd. Aktivnost hemoksigenaze može da se inhibira cink-protoporfirinom IX (Zn PPR IX), te primenom ovog inhibitora može da se ispita endogena uloga ugljen-monoksida (14, 16, 17). U literaturi je malo podataka koji ispituju uticaj homocisteina na aktivnost AChE u srcu, a još je manje podataka o ulozi ugljen-monoksida na aktivnost AChE u srcu.

Cilj ovog rada je da se ispita uticaj homocisteina i ugljen-monoksida, inhibicijom njegove sinteze, zajedno i pojedinačno, na aktivnost AChE u srcu pacova.

## Materijal i metode

Pri eksperimentalnom radu poštovan je Pravilnik za rad sa eksperimentalnim životinjama Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. U eksperimentu su korišćeni odrasli mužjaci, Vistar (*Wistar*) albino pacovi, telesne mase  $250 \pm 50$  g, odgajani u vivarijumu Instituta za medicinsku fiziologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Životinje se čuvaju u kontrolisanim laboratorijskim uslovima (temperatura vazduha  $22 \pm 1$  °C, relativna vlažnost vazduha 50%, ciklus svetlost:tama 12:12h, početak svetlosti 9h) i sa slobodnim pristupom vodi i standardnoj hrani. Pacovi su podeljeni u 4 eksperimentalne grupe (ukupno 20, u svakoj grupi po 5 pacova).

1. Kontrolnoj grupi (K) aplikovan je fiziološki rastvor (1ml 0,9% NaCl, pH 7,4, i.p.).
2. Eksperimentalnoj grupi (E1) aplikovan je D,L-homocistein u koncentraciji 8mmol/kg t.m. i.p.
3. Eksperimentalnoj grupi (E2) aplikovan je Zn PPR IX u koncentraciji 30  $\mu$ mol/kg t.m. i.p.
4. Eksperimentalnoj grupi (E3) aplikovani su D,L-homo-

cistein u koncentraciji 8 mmol/kg t.m. i.p. i ZnPP-IX u koncentraciji 30  $\mu$ mol/kg t.m. i.p.

Šezdeset minuta nakon ubrizgavanja supstance životinje su žrtvovane dekapitacijom pomoću giljotine, a zatim im je uzeto srce, koje je homogenizovano u fosfatnom puferu pH 8,00 (1 ml pufera/200 mg tkiva srca). U ovako pripremljenom homogenatu srca određivana je aktivnost AChE.

Određivanje specifične aktivnosti acetilholinesteraze u tkivu srca

Određivanje aktivnosti AChE u homogenatu srca rađeno je metodom po Elmanu (*Ellman*) (18). Metoda je zasnovana na reakciji bojenog reagensa 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina) (DTNB), sa proizvodom hidrolize tiholinog supstrata, acetiltiholin-jodida (AChJ) i tiholinom, pri čemu nastaje jedinjenje 5-tio-2-nitro-benzoat žute boje, čiji je intenzitet srazmeran specifičnoj aktivnosti enzima AChE. Prvo je 40  $\mu$ l homogenata tkiva srca razblaženo sa 580  $\mu$ l fosfatnog pufera pH 8,0 i preinkubirano na temperaturi 37 °C 10 minuta. Nakon preinkubacije je sukcesivno dodato 20  $\mu$ l bojenog reagensa DTNB i 10  $\mu$ l supstrata AchJ. Pripremljena smesa je inkubirana na temperaturi 37 °C, 5 minuta. Enzimska reakcija je zaustavljena dodavanjem 50  $\mu$ l natrijum-dodecil-sulfata (SDS). Promena apsorbance je merena spektrofotometrijski na 420 nm talasne dužine. Specifična aktivnost enzima AChE je izražena kao  $\Delta A / \text{min} \cdot \text{mg}$  tkiva. Korišćen je Gilford model 240 spektrofotometar.

Korišćene supstance

Za realizaciju eksperimenta su korišćene sledeće supstance: DL homocistein, Zn PPR IX, DTNB, AChI i SDS, koje su nabavljene od Sigma Chemicals, Sent Louis, SAD. Supstance, korišćene u eksperimentu, bile su *pro analysis* kvaliteta.

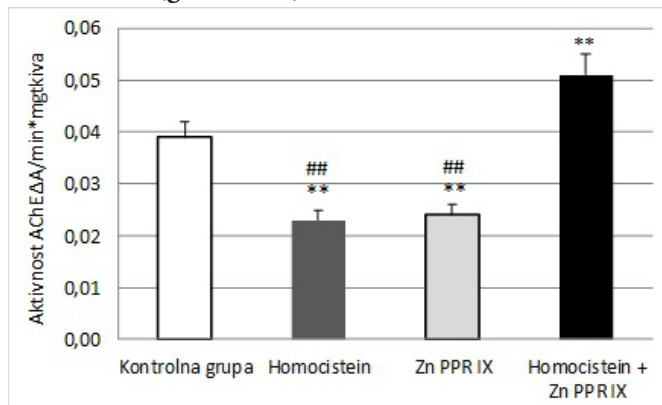
Statistička obrada

Za procenu statističke značajnosti razlike u aktivnosti enzima AChE između analiziranih grupa korišćen je t-test za nezavisne uzorke. Statistički značajnim su smatrane vrednosti  $p < 0,05$ , a statistički veoma značajnim vrednosti  $p < 0,01$ . Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina grupe podataka ( $X$ )  $\pm$  standardna greška (SE). Statistički podaci analizirani su računarskim programom „R“.

## Rezultati

Specifična aktivnost enzima AChE u homogenatu tkiva srca pacova tretiranih fiziološkim rastvorom bila je  $0,039 \pm 0,003$ , a tretiranih D,L-homocisteinom u koncen-

traciji 8 mmol/kg t.m. bila je  $0,023 \pm 0,002$ . Dobijeni rezultati pokazuju da D,L-homocistein pri ispitivanoj koncentraciji dovodi do statistički veoma značajne inhibicije aktivnosti AChE ( $p = 0,009$ ) od 41% u odnosu na kontrolnu vrednost (**grafikon 1**).



**Grafikon 1.** Specifična aktivnost enzima AChE ( $\Delta A/\text{min} \cdot \text{mg tkiva}$ ) u homogenatu srca pacova kontrolne grupe, grupe tretirane D,L-homocisteinom, grupe tretirane Zn PPR IX i grupe tretirane simultano D,L-homocisteinom i Zn PPR IX. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina grupe merenja ( $X$ )  $\pm$  standardna greška (SE) (\*\* $p < 0,01$  u poređenju sa kontrolnom grupom; ## $p < 0,01$  u poređenju sa grupom tretiranom simultano D,L-homocisteinom i Zn PPR IX).

Specifična aktivnost enzima AChE u homogenatu tkiva srca pacova tretiranih Zn PPR IX ( $30 \mu\text{mol/kg t.m.}$ ) iznosila je  $0,024 \pm 0,002$ . Dobijena razlika u aktivnosti enzima u odsustvu (kontrola) i prisustvu Zn PPR IX statistički je visokoznačajna ( $p = 0,006$ ). Cink-protoporfirin IX, pri ispitivanoj koncentraciji, izaziva smanjenje specifične aktivnosti ispitivanog enzima za 32% u odnosu na kontrolnu vrednost (**grafikon 1**).

D,L-homocistein (8 mmol/kg t.m.) izazvao je smanjenje specifične aktivnosti AChE za 4% u odnosu na Zn PPR IX ( $30 \mu\text{mol/kg t.m.}$ ). Ovo smanjenje aktivnosti acetilholinesteraze nije statistički značajno ( $p = 0,73$ ) (**grafikon 1**).

Specifična aktivnost enzima AChE u homogenatu tkiva srca pacova tretiranih D,L-homocisteinom (8 mmol/kg t.m.) i Zn PPR IX ( $30 \mu\text{mol/kg t.m.}$ ) iznosila je  $0,051 \pm 0,004$ . Na grafikonu 1 prikazana je aktivnost AChE srca pacova tretiranih simultano D,L-homocisteinom i Zn PPR IX.

Dobijeni rezultati pokazuju da aktivnost AChE nakon tretmana D,L-homocisteinom iznosi 45% od aktivnosti u grupi tretiranoj D,L-homocisteinom i Zn PPR IX. Ovo smanjenje aktivnosti acetilholinesteraze statistički je veoma značajno ( $p = 0,0001$ ). Specifična aktivnost AChE nakon aplikovanja Zn PPR IX iznosi 47% u odnosu na specifičnu aktivnost AChE izmerene nakon simultanog aplikovanja D,L-homocisteina i Zn PPR IX. Ovo smanjenje aktivnosti acetilholinesteraze statistički je veoma značajno ( $p = 0,0001$ ).

U grupi koja je simultano tretirana D,L-homocisteinom (8 mmol/kg t.m.) i Zn PPR IX ( $30 \mu\text{mol/kg t.m.}$ )

izazvano je povećanje specifične aktivnosti AChE za 23% u odnosu na kontrolnu grupu. Ovo smanjenje aktivnosti acetilholinesteraze statistički je veoma značajno ( $p = 0,009$ ) (**grafikon 1**).

## Diskusija

Homocistein je doveo do statistički značajnog smanjenja aktivnosti AChE u homogenatu tkiva srca pacova u odnosu na kontrolnu grupu ( $p = 0,009$ ). Ovo je u skladu sa podacima koji su pronađeni u literaturi (19-21). Homocistein ostvaruje ovaj efekat direktno ili preko svog metabolita, homocistein tiolaktona, i to ireverzibilnom inhibicijom AChE i/ili preko slobodnih radikala koje proizvodi (19-21). Živković i autori navode da je dejstvo homocisteina na aktivnost AChE jedan od mogućih patofizioloških mehanizama za nastanak bradikardije i aritmije (22). Ova grupa autora takođe navodi da homocistein tiolaktom dovodi do smanjenja srčane kontraktilnosti (23). Dobijeni rezultati govore u prilog činjenici da smanjena aktivnost AChE može da izazove smanjenje srčane kontraktilnosti i nastanak aritmija, verovatno smanjenom razgradnjom i povećanjem koncentracije parasimpatičkog neurotransmitera acetilholina, koji ostvaruje poznate efekte na srce (negativno inotropno, hronotropno dromotropno i batmotropno dejstvo).

Do značajnog smanjenja aktivnosti AChE u homogenatu tkiva srca pacova došlo je i posle aplikacije inhibitora sinteze ugljen-monoksida (Zn PPR IX). U literaturi ne postoje podaci o dejstvu ugljen-monoksida na aktivnost acetilholinesteraze, tako da je, prema našem saznanju, ovo prvo zapažanje u tom pravcu. U literaturi se takođe navodi da ugljen-monoksid dovodi do negativnog inotropnog efekta na srce pacova (24). Jedan od pretpostavljenih mehanizama bi mogao da uključuje acetilholin, odnosno modulaciju njegove koncentracije ili odgovarajućih receptora. Posle uvrđenog smanjenja aktivnosti AChE, izazvanog inhibicijom sinteze ugljen-monoksida u tkivu srca u našim eksperimentima očigledno je, međutim, da prethodna hipoteza ne može da bude prihvaćena. Homocistein, koji smanjuje aktivnost AChE za 41% u poređenju sa kontrolnom grupom, dovodi do relativno većeg smanjenja aktivnosti od Zn PPR IX, koji smanjuje aktivnost AChE za 32% u poređenju sa kontrolnom grupom, iako nije registrovana statistička značajnost.

Živković i autori navode da kombinacija homocistein tiolaktona i Zn PPR IX dovodi do negativnog inotropnog i hronotropnog dejstva na izolovanom srcu pacova (23). U našim eksperimentima, kombinacija homocisteina i Zn PPR IX dovela je do povećane aktivnosti AChE u odnosu na kontrolnu grupu (povećanje je iznosilo 23%). Ovaj rezultat je iznenađujuć jer je u suprotnosti sa pojedinačnim delovanjem navedenih supstanci na aktivnost AChE. Aktivnost AChE je povećana za 55% u odnosu na grupu tretiranu homocisteinom, a 39% u odnosu na grupu tretiranu Zn PPR IX. Ovaj rezultat ukazuje na to da je razlog verovatno specifična interakcija između homociste-

ina i Zn PPR IX, odnosno formiranje izmenjene hemijske strukture ili hemijskih veza, što može da utiče na modulaciju aktivnosti AChE.

Akutno davanje D,L-homocisteina (8 mmol/kg t.m.) i Zn PPR IX (30 µmol/kg t.m.) statistički značajno smanjuje aktivnost AChE srca pacova u odnosu na kontrolnu grupu, ali nema statistički značajne razlike između aktivnosti AChE postignute D,L-homocisteinom i Zn PPR IX. Iznenadujuće, prilikom aplikacije ove dve supstance zajedno dolazi do povećanja aktivnosti AChE i ovo povećanje je statistički veoma značajno, što će biti predmet naših daljih istraživanja.

## Napomena

Rezultati prikazani u ovom radu deo su projekta osnovnih istraživanja br. 175043 Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, kojim rukovodi prof. dr Dragan M. Đurić sa Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

## Reference

1. Prado M, Reis R, Prado V, de Mello M, Gomez M, de Mello F. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochemistry International*. 2002;41(5):291-299.
2. Roy A, Guatimosim S, Prado V, Gros R, Prado M. Cholinergic activity as a new target in diseases of the heart. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. 2015;20(1):527-237.
3. Dvir H, Silman I, Harel M, Rosenberry T, Sussman J. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chemico-Biological Interactions*. 2010;187(1-3):10-22.
4. Grisaru D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur J Biochem*. 1999;264(3):672-686.
5. Kirkpatrick C, Bittinger F, Unger R, Kriegsmann J, Kilbinger H, Wessler I. The Non-neuronal Cholinergic System in the Endothelium: Evidence and Possible Pathobiological Significance. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 2001;85(1):24-28.
6. Genever P, Birch M, Brown E, Skerry T. Osteoblast-derived acetylcholinesterase: a novel mediator of cell-matrix interactions in bone?. *Bone*. 1999;24(4):297-303.
7. Medina M, Urdiales J, Amores-Sánchez M. Roles of homocysteine in cell metabolism. *European Journal of Biochemistry*. 2001;268(14):3871-3882.
8. Jakubowski H. Pathophysiological Consequences of Homocysteine Excess. *J Nutr*. 2006;136(6):1741-1749.
9. Clarke R. Homocysteine and cardiovascular disease. *Journal of Cardiovascular Risk*. 1998;5(4):213-215.
10. Hankey G, Eikelboom J. Homocysteine and vascular disease. *The Lancet*. 1999;354(9176):407-413.
11. Burke A. Increased Serum Homocysteine and Sudden Death Resulting from Coronary Atherosclerosis With Fibrous Plaques. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2002;22(11):1936-1941.
12. Givvimani S, Qipshidze N, Tyagi N, Mishra K, Sen U, Tyagi C. Synergism between arrhythmia and hyperhomocysteinemia in structural heart disease. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2011 3(2): 107-119.
13. Peterson Sj, Frishman Wh, Abraham Ng. Targeting heme oxygenase: therapeutic implications for diseases of the cardiovascular system. *Cardiol Rev*. 2009;17(3):99-111.
14. Wu L, Wang R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol Rev*. 2005;57(4):585-630.
15. Rochette L, Cottin Y, Zeller M, Vergely C. Carbon monoxide: Mechanisms of action and potential clinical implications. *Pharmacol Ther*. 2013;137(2):133-152.
16. Allwood Ma, Kinobe Rt, Ballantyne L, Romanova N, Melo Lg, Ward Ca, et al. Heme oxygenase-1 overexpression exacerbates heart failure with aging and pressure overload but is protective against isoproterenol-induced cardiomyopathy in mice. *Cardiovasc Pathol*. 2014;23(4):231-237.
17. Liu H, Song D, Lee SS. Role of heme oxygenase-carbon monoxide pathway in pathogenesis of cirrhotic cardiomyopathy in the rat. *Am J Physiol Gastrointest liver Physiol*. 2001;280(1):68-74.
18. Ellman Gl, Courtney Kd, Andres Vj, Feather-Stone Rm. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961;7:88-95.
19. Petrović M, Fufanović I, Elezović I, Čolović M, Krstić D, Jakovljević V, et al. The effect of homocysteine thiolactone on acetylcholinesterase activity in rat brain, blood and heart. *Serbian J Exp Clin Res*. 2010;11(1):19-22.
20. Stefanello F, Zugno A, Wannmacher C, Wajner M, Wyse A. Homocysteine inhibits butyrylcholinesterase activity in rat serum. 2003;18(3):187-94.
21. Darvesh S, Walsh R, Martin E. Homocysteine thiolactone and human cholinesterases. 2007;27(1).
22. Živković S. Efekti D,L-homocistein tiolaktona na razvoj aritmija i aktivnost enzima acetilholinesteraze u srcu pacova. *Med Podml*. 2011;62(1-2):39-46.
23. Živković V, Jakovljević V, Pechanova O, Srejić I, Joksimović J, Selaković D, et al. Effects of DL-homocysteine thiolactone on cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers in the isolated rat heart: The role of different gasotransmitters. *Biomed Res Int*. 2013;2013:9-9.
24. Abramochkin D, Haertdinov N, Porokhnya M, Zefirov A, Sitdikova G. Carbon monoxide affects electrical and contractile activity of rat myocardium. *J Biomed Sci*. 2011;18(1):40.