

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE

Mr sc. Blagoje P. Dimitrijević, dipl. veterinar

ISPITIVANJE MOGUĆNOSTI
KORIŠĆENJA IZOENZIMSKIH OBLIKA
SUPEROKSID DIZMUTAZE 1 KAO
BIOMARKERA INTENZITETA
PARAZITSKIH INFEKCIJA KOD OVACA

Doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Mr sc. Blagoje P. Dimitrijević, DVM

INVESTIGATING THE POSSIBILITIES OF
USING SUPEROXIDE DISMUTASE 1
ISOENZYME FORMS AS BIOMARKERS
FOR INTENSITIES OF PARASITIC
INFECTIONS IN SHEEP

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013.

Mentor:

dr Sofija Katić-Radivojević, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Članovi Komisije:

dr Sunčica Borozan, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

dr Mila Savić, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

dr Mihajlo Spasić, redovni profesor, Hemijski fakultet, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

IZJAVA ZAHVALNOSTI

Ova doktorska disertacija nastala je kao rezultat multidisciplinarnog pristupa problematici koja je u njoj obrađena. Ovo je nužno podrazumevalo timski pristup rešavanju problema koji su se javljali u toku izrade moje doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost i divljenje, za uloženi napor i rad dugujem, iznad svega, dr Sunčici Borozan, bez koje i ne bi bilo ove doktorske disertacije. Sa profesorkom Sunčicom sam u laboratoriji proveo nebrojene sate i dane u toku izrade disertacije, diskutujući, ponekad i vrlo vatreno, o dobijenim rezultatima. Mišljenja sam, da se energija koju je profesorka Sunčica uložila u rad sa mnom, ne može izraziti trenutno poznatim jedinicama. U mojim teškim i prelomnim momentima nezaboravna je i njena uloga *Spiritus movens*-a.

Profesorki Sofiji Katić-Radivojević zahvaljujem na nesebičnoj podršci, mudrim savetima i suptilnom uvođenju u razumevanje, gotovo čarobnog odnosa, kakav postoji između domaćina i parazita. Takođe, puno su mi značila i naša „terenska druženja“ u toku realizacije postavljenih ciljeva i zadataka, gde je došla do izražaja njena „širina“, kako istraživača, tako i vrlo sposobnog operativca u rešavanju zdravstvenih problema naših eksperimentalnih životinja.

Profesorki Mili Savić dugujem zahvalnost za bezrezervnu podršku i njen vedar duh, koji su mi davali snagu da istrajem i prevaziđem probleme koji su se nepredviđeno javljali.

Nemerljiv je doprinos i profesora Mihajla Spasića, *Sine qua non* ličnosti, kome pre svega dugujem zahvalnost na „ideji“ za temu doktorske disertacije. Njegov nepretenciozan pristup, čvrst stav na Zemlji i „real-time“ procena situacije, takođe zaslužuju moju zahvalnost.

Dr Ivanu Spasojeviću dugujem zahvalnost na pomoći u izvođenju i tumačenju rezultata EPRS. Dr Srđanu Stojanoviću dugujem zahvalnost za prijateljsku pomoć i podršku u toku izrade disertacije, kao i na kompjuterskoj simulaciji strukture SOD 1.

Na moju veliku žalost, profesorka Jelka Stevanović, nas je prerano napustila. Znam da bi se podjednako kao i ja radovala ovom mom uspehu. Ona je takođe deo ove doktorske disertacije, jer je svojim širokim znanjem, mudrim savetima i plemenitom odnosu učestvovala u gotovo svakoj fazi njene izrade.

Na kraju zahvalnost dugujem i mojoj porodici, pre svega zbog vremena koje sam im uskratio i ništa manje zbog nesebične podrške koju su mi pružili.

Blagoje Dimitrijević

ISPITIVANJE MOGUĆNOSTI KORIŠĆENJA IZOENZIMSKIH OBLIKA SUPEROKSID DIZMUTAZE 1 KAO BIOMARKERA INTENZITETA PARAZITSKIH INFEKCIJA KOD OVACA

Kratak sadržaj

U kliničkoj patologiji ovaca parazitske infekcije zauzimaju značajno mesto i pored zdravstvenog, predstavljaju i veliki ekonomski problem u uzgoju ovaca. Ovce su visoko prijemčive na infekciju parazitima, čak i u uslovima vrlo niske infekcije pašnjaka. Na taj način, ovce omogućavaju održavanje i amplifikaciju intenziteta parazitske faune u jednom epizootiološkom području i istovremeno mogu poslužiti kao „indikator“ vrsta životinja u cilju procene prisutne parazitske faune u nekom području.

Procena intenziteta parazitske infekcije u domaćinu je od posebnog značaja, pre svega zbog terapijskih mera koje treba preduzeti, ali takođe, predstavlja i bitan kriterijum koji se koristi u selekciji otpornijih jedinki. Prisustvo parazita i njihovih razvojnih oblika u toku migracije dovodi do poremećaja zdravstvenog stanja životinja, pri čemu je stepen oštećenja u direktnoj korelaciji sa brojem prisutnih parazita i/ili njihovih larvenih oblika, tj. sa intenzitetom parazitske infekcije. Slobodnoradikalske vrste nastale u toku parazitskih infekcija direktno inhibiraju neke od antioksidativnih enzima. Promene na ovim enzimima i njihova inhibicija utiču na kapacitet zaštite od oksidacionih oštećenja i relativni udeo pojedinih komponenti u ukupnom antioksidativnom potencijalu. Iz tog razloga postavljena je hipoteza da analiza ovih promena može da posluži kao dijagnostičko sredstvo u cilju utvrđivanja intenziteta parazitske infekcije.

Superoksid dizmutaze (SOD) (EC 1.15.1.1) predstavljaju prvu liniju odbrane u uslovima narušene redoks ravnoteže, jer sprečavaju formiranje niza vrlo štetnih reaktivnih kiseoničnih i azotovih vrsta (hidroksil radikala i peroksinitrita) i inicijaciju lančane reakcije oksidacije koja kao krajnji ishod ima značajna oštećenja biomolekula (lipida, proteina i nukleinskih kiselina). Poznat je „paradoks“ da se SOD 1 ireverzibilno inaktivira pri visokim koncentracijama vodonik-peroksida, koji je proizvod reakcije koju ovaj enzim katalizuje. Imajući u vidu napred navedenu činjenicu da infekcija parazitima dovodi organizam domaćina u stanje oksidativnog stresa, cilj ove doktorske disertacije bio je da se preciznije istraže promene u izoenzimskom profilu SOD 1 kod ovaca i ispita da li one mogu poslužiti kao biomarker intenziteta parazitskih infekcija.

Ispitivanje je izvršeno na ukupno 300 ovaca (starosti 12 do 18 meseci), i to na sojevima autohtone rase pramenke (sjeničko-peštarska pramenka, lipska pramenka i vlaška vitoroga pramenka), koji su obuhvaćeni programom očuvanja animalnih genetičkih resursa Republike Srbije i na uvezenim rasama ovaca (virtemberg, il d frans i šarole), u poluintenzivnom sistemu držanja, u četiri područja. U okviru svake ispitivane rase/soja, formirana je kontrolna grupa ovaca (n=10), negativnih na parazitsku infekciju.

Uzorkovanje fecesa za parazitološka ispitivanja i krvi za biohemijska ispitivanja izvršeno je tokom tri dana, u jutarnjim i večernjim satima. Određivanje prisutne vrste parazitske infekcije ovaca izvršeno je pregledom pojedinačnih uzoraka fecesa, metodom sedimentacije i flotacije. Intenzitet parazitske infekcije utvrđen je korišćenjem kvantitativne metode po McMaster-u (modifikacija po Zajiček-u).

Nivo oksidativnog stresa utvrđen je određivanjem sledećih parametara: aktivnost katalaze (CAT), koncentracija malondialdehida (marker peroksidacije lipida) i koncentracije karbonilnih i tiolnih

grupa (markeri oksidativne modifikacije proteina). Aktivnost Cu,Zn – superoksid dizmutaze, kao i prisustvo njenih izoenzimskih oblika i relativna izoenzimska distribucija aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH₁–LDH₅), utvrđena je elektroforetski.

U ispitivanim područjima, kod sojeva autohtone rase pramenke i uvezenih rasa ovaca, ustanovljena je parazitiska infekcija sa: *Trichostrongylidae*, *Nematodirinae*, *Protostrongylidae*, *Trichuris* spp, *Strongyloides* spp, *Anoplocephalidae*, *Dicrocoelium dendriticum* i *Eimeria* spp. Koprološkim pregledom utvrđen je različit ekstenzitet i intenzitet parazitskih infekcija kod sojeva autohtone rase pramenka i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim područjima. Kod autohtonih sojeva pramenke utvrđen je niži ekstenzitet i intenzitet parazitskih infekcija ($p < 0,05$).

Nivo oksidativnog stresa kod autohtonih sojeva pramenke i uvezenih rasa ovaca različit je u zavisnosti od ekstenziteta i intenziteta parazitske infekcije. Utvrđeno je da su oksidativne modifikacije proteina kod uvezenih rasa izraženije pri istom ekstenzitetu i intenzitetu parazitske infekcije u odnosu na sojeve autohtone rase pramenke ($p < 0,01$).

Utvrđeno je da je, bazalni nivo peroksidacije lipida ćelijske membrane kod kontrolnih grupa uvezenih rasa ovaca veći u odnosu na autohtone sojeve pramenke ($p < 0,001$). U prisustvu parazitske infekcije, i kod sojeva autohtone rase pramenke i kod uvezenih rasa ovaca, dolazi do oksidativne modifikacije lipida, koja je izraženija kod uvezenih rasa ovaca ($p < 0,05$).

Ukupna aktivnost superoksid dizmutaze 1 je veća kod sojeva autohtone rase pramenke u odnosu na uvezene rase ovaca ($p < 0,05$), što je potvrda jačeg odgovora sojeva pramenke na oksidativni stres izazvan parazitskom infekcijom. Sa porastom intenziteta parazitske infekcije ukupna aktivnost enzima SOD 1 se povećava i kod sojeva autohtone rase pramenke i kod uvezenih rasa ovaca.

Aktivnost katalaze se smanjuje sa povećanjem intenziteta parazitske infekcije, i kod sojeva autohtone rase pramenke i kod uvezenih rasa ovaca ($p < 0,05$).

Na osnovu relativne izoenzimske raspodele enzima laktat-dehidrogenaze (LDH), utvrđeno je oštećenje ćelija različitih organa, što je u zavisnosti od prisutne vrste i intenziteta parazitske infekcije. Kod ispitivanih sojeva autohtone rase pramenke i uvezenih rasa ovaca inficiranih sa *Strongyloides* spp, *Dicrocoelium dendriticum* i *Protostrongylidae* utvrđeno je oštećenje ćelija miokarda (LDH₂) i pluća (LDH₃). U prisustvu parazitske infekcije sa *Strongyloides* spp, *Trichuris* spp i *Dicrocoelium dendriticum* utvrđeno je oštećenje ćelija jetre (LDH₅).

U zavisnosti od intenziteta parazitske infekcije, i kod sojeva autohtone rase pramenke i kod uvezenih rasa ovaca, povećava se produkcija RNS. Kod uvezenih rasa ovaca nivo nitrozativnog stresa je intenzivniji u odnosu na sojeve pramenke ($p < 0,001$).

Primenom SDS-PAG elektroforeze i tačno-masene spektrometrije bliže je određena molekulska masa izolovane ovčije SOD 1, od 31,84 kDa i 29,5 kDa. Izoelektrofokusanjem je utvrđena izoelektrična tačka ovčije SOD 1 od 6,42.

U ogledima *in vitro*, pri izlaganju SOD 1 dejstvu vodonik-peroksida, dokazana je inhibicija aktivnosti ovog enzima i do 50%. Step en inhibicije aktivnosti enzima zavisio je od vremena ekspozicije i primenjene koncentracije vodonik-peroksida. Elektroforetskim analizama je utvrđeno da izlaganje SOD 1 vodonik-peroksidu dovodi do dimerizacije i fragmentacije ovog enzima i formiranja 6 proteinskih traka molekulske mase od 63,5 kDa, 31,84 kDa, 26,91 kDa, 21,97 kDa, 15 kDa i 13 kDa. Gasno-masenom analizom utvrđeno je da vodonik-peroksid dovodi do karbonilovanja SOD 1 (m/z 881,91 i m/z 909,42) i ireverzibilne oksidacije tiolne grupe enzima (m/z 938,65 i m/z 969,96). Izoelektrofokusanjem je utvrđeno i prisustvo SOD 1 sa izoelektričnom tačkom od 5,0, što je posledica oksidativnih modifikacija ovog enzima.

Spektralnom elektron paramagnetnom rezonancom, u ogledima *in vitro*, po prvi put, je dokazano stvaranje azot-dioksid radikala kao posledica oksidativnih modifikacija SOD 1.

Utvrđeno je da izoenzimski oblici SOD 1 mogu da se koriste kao biomarkeri u proceni intenziteta parazitskih infekcija kod ovaca. U zavisnosti od intenziteta parazitske infekcije i posledične oksidativne modifikacije javljaju se promene u izoenzimskim oblicima SOD 1.

Ključne reči: parazitske infekcije, oksidativni stres, biomarker, superoksid dizmutaza 1, izoenzimi, ovce

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Klinička biohemija i Bolesti preživara

UDK: 616-008.857:636.32/38

INVESTIGATING THE POSSIBILITIES OF USING SUPEROXIDE DISMUTASE 1 ISOENZYME FORMS AS BIOMARKERS FOR INTENSITIES OF PARASITIC INFECTIONS IN SHEEP

Abstract

In clinical pathology of sheep, parasitic infections occupy a significant place and besides health, pose a great economic problem in sheep breeding. Sheep are highly susceptible to parasitic infections, even under conditions of very low pasture infections. In this way, sheep support the sustainability and amplification of parasitic fauna intensity in an epizootiological region and may at the same time serve as “indicators” of animal species with the aim of evaluating the presence of parasitic fauna in a specific region.

The evaluation of parasitic infection intensity in the host is of special significance, primarily for the therapeutic measures necessary to be taken, but also, represents an essential criterion employed in selecting more resistant individuals. The presence of parasites and their developing forms during migration, leads to health disturbances in the animals, when the degree of damage is in direct correlation with the number of parasites present and/or their larval forms, ie. with the intensity of parasitic infection. Free radical species originating during parasitic infections, directly inhibit some of the antioxidative enzymes. Changes on these enzymes and their inhibition have an influence on the protective capacity from oxidative damages and a relative participation of certain components in the total antioxidative potential. For this reason, the hypothesis has been established that the analysis of these changes may serve as a diagnostic tool with the aim of determining the intensity of parasitic infection.

SOD (EC 1.15.1.1) presents the first line of defense under conditions of disturbed redox balance, as they prevent the formation of a series of very harmful reactive oxygen and nitrogen species (hydroxyl radicals and peroxy nitrates) and the initiation of oxidative chain reactions, which as an outcome are significant damages to biomolecules (lipids, proteins and nucleic acids). A known “paradox” is that SOD 1 is irreversibly inactivated at high concentrations of hydrogen peroxide, which is a product of the reaction catalyzed by this enzyme. Considering the previously elaborated fact that parasitic infections lead the organism of the host into oxidative stress, the aim of this doctoral thesis was to more precisely investigate changes in the isoenzymatic profile of SOD 1 in sheep and examine if these may serve as biomarkers for the intensity of parasitic infection.

The study was performed on a total of 300 sheep (aged 12 to 18 months), on strains of autochthonous Zackel sheep breed (Sjениčko-peštarska, Lipska and Vlaška vitoroga) which are included in the programme for conserving animal genetic resources in the Republic of Serbia as well as on imported breeds of sheep (Württemberg, Ile de France and Charollais) kept under semi intensive conditions in four regions. Within each investigated breed/strain, a control group of sheep was established (n=10), negative to parasitic infection.

Sampling of feces for parasitological and blood for biochemical assaying was performed during the course of three days , in the morning and in the evening. The distribution of

parasites in sheep was evaluated using the native smear coprological technique, by sedimentation and flotation methods. The degree of infection intensity per sheep was quantitatively established by the method of McMaster (modified by Zajiček).

The oxidative stress parameters were measured for catalase activity (CAT), the red cell membrane damage by level of malondialdehyde (MDA), while carbonyl and thiol plasma protein group concentrations were used as indicators of the degree of protein oxidative modification. The activity of Cu,Zn - superoxide dismutase (SOD 1) and relative distribution of lactate dehydrogenase (LDH₁-LDH₅) activity were determined electrophoretically.

In the studied regions, in the strains of autochthonous Zackel sheep breed and imported breeds of sheep, parasitic infections were detected as follows: *Trichostrongylidae*, *Nematodirinae*, *Protostrongylidae*, *Trichuris* spp. *Strongyloides* spp. *Anoplocephalidae*, *Dicrocoelium dendriticum* and *Eimeria* spp. Coprological examinations revealed various extensities and intensities of parasitic infections in the strains of autochthonous Zackel sheep breed as well in the imported breeds in the regions studied. In the strains of autochthonous Zackel sheep breed, lower extensities and intensities of parasitic infections were determined ($p < 0.05$).

The level of oxidative stress in autochthonous strains of Zackel and imported sheep breeds is different depending on the extensity and intensity of parasitic infection. It has been determined that the oxidative modifications of proteins from imported breeds are more expressed under same extensity and intensity of parasitic infection when compared with the autochthonous Zackel sheep strains ($p < 0.01$).

It has been determined that the basal level of cell membrane lipid peroxidation is higher in the control group of imported sheep breeds when compared with the autochthonous Zackel strains ($p < 0.001$). In the presence of parasitic infection, both in the autochthonous Zackel strains and imported sheep breeds, results in oxidative modification of lipids, this being more expressed in the imported sheep breeds ($p < 0.05$).

The total SOD 1 activity is higher in strains of the autochthonous Zackel breed when compared to the imported sheep breeds ($p < 0.05$), this confirming the stronger response of Zackel strains to oxidative stress provoked by parasitic infection. With the increase of parasite infection intensity, the total activity of SOD 1 enzyme increases in the strains of the autochthonous Zackel breed as well as in the imported breeds.

Catalase activity is reduced with the increase in parasite infection intensity, in all studied breeds, strains of the autochthonous Zackel breed and imported sheep breeds ($p < 0.05$).

On the basis of the relative isoenzyme distribution of the lactate-dehydrogenase (LDH) enzyme, damages to cells from various organs were determined, this being dependent on the presence of the species and intensity of parasitic infection. In the studied strains of the autochthonous Zackel and imported sheep breeds infected with *Strongyloides* spp, *Dicrocoelium dendriticum* and *Protostrongylidae*, damages to the cells of the miocard (LDH₂) and lung (LDH₃) were determined. In the presence of parasitic infections with *Strongyloides* spp, *Trichuris* spp and *Dicrocoelium dendriticum* damage to liver cells has been detected (LDH₅).

Depending on the intensity of parasitic infection, production of RNS increases in strains of the autochthonous Zackel breed as well as in the imported sheep breeds. In the imported sheep breeds, the level of nitrosative stress is more intense when compared to the Zackel strains ($p < 0.001$).

Applying SDS-PAG electrophoresis and HPLC/MS, the molecular mass of the sheep SOD 1 was determined more precise, 31.84 kDa and 29.5 kDa. By isoelectrofocusing, the isoelectric point of sheep SOD 1 was determined to be 6.42.

In *in vitro* experiments, during exposure of SOD 1 to the action of hydrogen peroxide, a 50% activity inhibition of this enzyme was proven. The degree of activity inhibition of this enzyme depended on the exposure time and applied concentration of hydrogen peroxide. With electrophoretic analyses, it has been determined that exposure of SOD 1 to hydrogen peroxide leads to the dimerization and fragmentation of this enzyme and formation of 6 protein bands with molecular weights of: 63.5 kDa, 31.84 kDa, 26.91 kDa, 21.97 kDa, 15 kDa and 13 kDa. By GC/MS analysis, it was determined that hydrogen peroxide leads to the carbonylation of SOD 1 (m/z 881.91 and m/z 909.42) and irreversible oxidation of the enzyme thiol groups (m/z 938.65 and m/z 969.96). By isoelectrofocusing, also the presence of SOD 1 with an isoelectric point of 5.0 has been determined, which was the consequence of the oxidative modifications of this enzyme.

With the aid of spectral electron paramagnetic resonance, in *in vitro* experiments, for the first time, the formation of the nitrogen dioxide radical was proven as a consequence of SOD 1 oxidative modification.

It has been determined that isoenzymatic forms of SOD 1 may be used as biomarkers for evaluating the intensities of parasitic infections in sheep. Depending on the intensity of the parasitic infection and the consequences of oxidative modifications, changes in isoenzymatic forms of SOD 1 appear.

Key words: *parasitic infections, oxidative stress, biomarker, superoxide dismutase 1, isoenzymes, sheep*

Scientific field: Veterinary medicine

Specific scientific field: Clinical biochemistry and Diseases of ruminants

UDC: 616-008.857:636.32/38

LISTA SKRAĆENICA

AGE – krajnji proizvodi glikozilovanja (engl. *Advanced Glycation End products*)

AOS – enzimi antioksidativne odbrane

H₂O₂ – vodonik-peroksid

HNE – hidroksinonenal

HOCl – hipohlorasta kiselina

NO[•] – azot-monoksid radikal

NOS – azot-oksid-sintaza (engl. *Nitric Oxide Synthase*)

O₂^{•-} – superoksid-anjon radikal

OH[•] – hidroksilni radikal

ONOO⁻ – peroksinitrit anjon radikal

RCS – reaktivne ugljenične vrste - (engl. *Reactive Carbon Species*)

RONs – reaktivne kiseonične i azotne vrste (engl. *Reactive Oxygen and Nitrogen Species*)

ROS – reaktivne kiseonične vrste (engl. *Reactive Oxygen Species*)

RSS – reaktivne tiolne vrste (engl. *Reactive Sulfur Species*)

SOD – superoksid-dismutaza

TBARS – tiobarbiturne reaktivne vrste

XO – ksantin-oksidaza

XD – ksantin-dehidrogenaza

LDH – laktat-dehidrogenaza

Mn-SOD – mangan-superoksid-dizmutaza

Fe-SOD – gvožđe- superoksid-dizmutaza

PUFA – polinezasićene masne kiseline (eng. *Polyunsaturated fatty acids*)

PAGE – poliakrilamid gel elektroforeza

SDS PAGE - natrijum-dodecilsulfat poliakrilamid gel elektroforeza

TRIS – tris (hidroksimetil) aminometan

EPRs – elektron paramagnetna rezonantna spektroskopija

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE	6
2.1. Značaj proučavanja autohtonih rasa ovaca za veterinarsku medicinu.....	6
2.1.1. Autohtone rase	7
2.1.1.1. Sjeničko-peštarski soj pramenke	7
2.1.1.2. Lipski soj pramenke.....	8
2.1.1.3. Vlaški vitorogi soj pramenke.....	9
2.1.2. Uvezene (egzotične) rase ovaca	10
2.1.2.1. Virtemberška ovca.....	10
2.1.2.2. Il d frans.....	11
2.1.2.3. Šarole	12
2.2. PARAZITSKE INFEKCIJE	13
2.2.1. Uticaj parazita na metabolizam domaćina.....	15
2.2.2. Patogeno delovanje <i>F. hepatica</i> , <i>D. dendriticum</i> i <i>S. papillosus</i>	17
2.2.3. Testovi za utvrđivanje intenziteta parazitske infekcije.....	21
2.3. ODNOS PARAZIT - DOMAĆIN	22
2.3.1. Razvojni put gastrointestinalnih nematoda.....	23
2.3.2. Razvojni put gastrointestinalnih trematoda	24
2.3.3. Razvojni put gastrointestinalnih cestoda	25
2.3.4. Mehanizmi kojima se paraziti bore za opstanak u tkivima domaćina.....	25
2.3.4.1. Proteinaze koje hidrolizuju peptidne veze.....	26
2.3.4.2. Ekstracelularna digestija proteina.....	27
2.3.4.3. Digestija hemoglobina	27
2.3.4.4. Proteinaze nematoda u invaziji tkiva domaćina	28
2.3.4.5. Izbegavanje imunskog sistema domaćina	31

2.3.4.6. Indukcija Th2 odgovora	32
2.3.4.7. Antioksidativni enzimi koje sekretuju helminti	32
2.3.4.8. Peroksiredoksini (PRXs)	34
2.4. OKSIDATIVNI STRES	35
2.4.1. Reaktivne kiseonične vrste (ROS)	37
2.4.2. Reaktivne azotove vrste (RNS)	40
2.4.3. Oksidansi, ćelijske mete i oksidativno oštećenje DNA, lipida i proteina.....	42
2.4.4. Mehanizmi odbrane od oksidativnog stresa – antioksidativna odbrana.....	45
2.4.5. Uticaj oksidativnog stresa u razvoju bolesti kod farmskih životinja.....	49
2.4.5.1. Oksidativni stres u patogenezi bolesti preživara	50
2.4.6. Određivanje parametara oksidativnog stresa i oštećenja makromolekula.....	55
2.4.6.1. Testovi za određivanje ukupnog kapaciteta antioksidanasa	56
2.4.6.2. Merenje oksidativnog oštećenja proteina	57
2.4.6.3. Merenje oksidativnog oštećenja lipida	58
2.5. SUPEROKSID DIZMUTAZE	59
2.5.1. Otkriće superoksid dizmutaze	60
2.5.2. Izvori superoksid-anjon radikala i mehanizmi njegovog delovanja.....	64
2.5.2.1. Hemijski izvori superoksid anjon radikala	64
2.5.2.2. Biološki izvori superoksid-anjon radikala.....	65
2.5.3. Mehanizam toksičnosti superoksid anjon radikala.....	66
2.5.4. Struktura Superoksid dizmutaze, njeni oblici i distribucija.....	68
2.5.4.1. Cu,Zn-Superoksid dizmutaza (SOD 1).....	69
2.5.4.1.1. Predloženi mehanizam katalitičkog dejstva Cu,Zn-SOD	71
2.5.4.2. Mn- i Fe- Superoksid dizmutaze	71
2.5.4.3. Ni - Superoksid dizmutaza	73
2.5.5. Mehanizam delovanja superoksid dizmutaze	73
3. CILJEVI I ZADACI ISTRAŽIVANJA	75
4. MATERIJAL I METODE RADA	77

4.1. MATERIJAL	77
4.1.1. Uzimanje uzoraka krvi i fecesa ovaca	78
4.2. METODE	78
4.2.1. Metode parazitološke dijagnostike	78
4.2.2. Metode biohemijskih ispitivanja	79
4.2.2.1. Određivanje pokazatelja oksidativnog stresa	79
4.2.2.2. Određivanje pokazatelja oksidativnih modifikacija proteina	80
4.2.2.3. Karakterizacija SOD 1 iz ovčijih eritrocita u ogledima <i>in vitro</i>	80
4.2.3. Elektroforetsko određivanje molekulske mase izolovane SOD 1 (SDS-PAGE)	81
4.2.4. Određivanje molekulske mase i izoelektrične tačke SOD 1 kompjuterskom metodom	81
4.2.5. Određivanje molekulske mase SOD 1 tečno-masenom spektralnom analizom (LC/MS)	81
4.2.6. Izoelektrofokuseranje izolovane ovčije SOD 1 - određivanje pI	81
4.2.7. Elektronska paramagnetna rezonantna spektroskopija (EPRS)	82
4.3. Statistička obrada podataka	83
5. REZULTATI	84
5.1. Rezultati parazitološkog pregleda uzoraka fecesa ispitivanih ovaca.....	84
5.2. Rezultati biohemijskog ispitivanja parametara oksidativnog stresa u eritrocitima i krvnoj plazmi ovaca.....	91
5.2.1. Ukupna aktivnost SOD 1 i njenih izoenzimskih oblika kod ispitivanih ovaca	91
5.2.2. Aktivnost enzima katalaze u eritrocitima ispitivanih ovaca	107
5.2.3. Rezultati analize koncentracije nitrita u krvnoj plazmi ispitivanih ovaca.....	109
5.2.4. Rezultati analize peroksidacije lipida u krvnoj plazmi ispitivanih ovaca	112
5.2.5. Rezultati analize oksidativnih modifikacija proteina	113
5.2.5.1. Odredjivanje koncentracije karbonilnih grupa	113
5.2.5.2. Odredjivanje koncentracije tiolnih grupa	115
5.2.6. Ispitivanje relativne aktivnosti izoenzimskih oblika LDH	117

5.2.7. Uporedna analiza rezultata oksidativnog stresa kod autohtonih i uvezenih rasa ovaca	135
5.3. Oksidativne modifikacije (degradacija) SOD 1 u ogledima <i>in vitro</i> izazvana različitim koncentracijama i vremenom tretiranja sa vodonik-peroksidom	143
5.3.1. Inhibicija ukupne aktivnosti SOD 1 različitim koncentracijama vodonik-peroksida i vremena inkubiranja.....	144
5.3.2. Elektroforetsko razdvajanje izolovane i modifikovane SOD 1	144
5.3.3. Izoelektrofokusiranje izolovane i modifikovane SOD 1	145
5.3.4. Tečno-masena spektralna analiza izolovane i modifikovane SOD 1	146
5.3.5. Elektron-spin paramagnetna rezonanca izolovane i modifikovane SOD 1	150
5.4. Korelacija intenziteta parazitskih infekcija sa izoenzimskim oblicima SOD 1	151
6. DISKUSIJA	153
7. ZAKLJUČCI	176
8. LITERATURA	179

1. UVOD

Favorizovanje visokoproduktivnih rasa u celom svetu je dovelo do rapidnog nestajanja autohtonih populacija domaćih životinja. Imajući u vidu značaj očuvanja biodiverzita kao i prednosti lokalno adaptiranih autohtonih rasa, proučavanju i zaštiti animalnih genetičkih resursa poklanja se velika pažnja. Podaci (FAO DAD-IS) o karakteristikama rase, osobinama zdravlja kao što je rezistencija/tolerancija koju populacije ispoljavaju prema različitim patogenima, ističu značaj autohtonih rasa. Stoga je jedan od predmeta ovog istraživanja da se utvrdi vrsta i intenzitet parazitske infekcije, kao i parametri oksidativnog stresa kod sojeva autohtone rase pramenke, koji su obuhvaćeni programom očuvanja animalnih genetičkih resursa u Republici Srbiji i uvezenih merino rasa ovaca.

U eritrocitima su prisutni enzimi zaštite od oksidacionih oštećenja kao što su superoksid dizmutaza (SOD, EC 1.15.1.1), katalaza (CAT, EC 1.11.1.6), glutation peroksidaza (GSHPx, EC 1.11.1.9) i glutation reduktaza (GR, EC 1.6.4.2). Njihovim sadejstvom se kanališu slobodnoradikalske reakcije tako da direktna oštećenja biomakromolekula budu što manja. U maturiranim eritrocitima nema *de novo* sinteze enzima te je kapacitet ovih sistema ograničen. Slobodnoradikalske vrste nastale u eritrocitima ili prooksidacioni molekuli iz cirkulacije direktno inhibiraju neke od enzima. Promene na antioksidativnim enzimima i njihova inhibicija utiču na kapacitet zaštite od oksidacionih oštećenja i relativni udeo pojedinih komponenti u ukupnom antioksidativnom potencijalu. Parazitske infekcije povećavaju produkciju reaktivnih vrsti aktivacijom neutrofila. Promene u aktivnosti i izoenzimskoj raspodeli superoksid dizmutaze mogu ukazati na stepen infekcije i početak sistemskog odgovora.

U kliničkoj patologiji ovaca parazitske infekcije zauzimaju značajno mesto i predstavljaju veliki zdravstveni i ekonomski problem u uzgoju ovaca (Saleh, 2008; Alvarez i sar., 2009). Kod preživara, zbog specifičnih uslova gajenja, treba imati u vidu da je mogućnost kontrole parazitskih infekcija veoma kompleksna. Imajući u vidu značaj interakcije genotipa, paragentskih faktora i životnog ciklusa parazita potencira se činjenica da jedan pristup u kontroli i terapiji parazitskih infekcija nije dovoljan i naglašava značaj integrisane primene više metoda. U cilju postizanja optimalne zaštite, u program kontrole uključuju se selekcija životinja na otpornost

prema parazitskim infekcijama, kontrola pašnjaka, ishrane i drugi elementi (Silvestre i sar., 2000; Kenyon i sar., 2009).

Kao najčešći paraziti koji ugrožavaju zdravlje ovaca na našem području su: *Fasciola hepatica*, *Dicrocoelium dendriticum*, želudačno-crevne *Trichostrongylidae* i *Strongyloides* spp.

Fasciola hepatica parazitira u žučnim kanalima jetre biljojeda (ređe kod čoveka). Životni ciklus ove trematode odvija se u prirodi preko vodenog pužića. Infektivna forma su metacerkarije koje pravi domaćin unosi sa hranom u organizam. Masovno prodiranje mladih parazita u jetru izaziva oštećenje kapsule, a može dovesti i do akutnog zapaljenja jetre i peritonitisa. Akutna fascioloza traje 4 do 6 nedelja po infekciji. Parazit se hrani eritrocitima, a na organizam domaćina deluje još i toksinima i mehanički. Odrasli paraziti žive u žučnim kanalima 3 do 5 godina (Saleh, 2008).

Dicrocoelium dendriticum živi u žučnim kanalima jetre kod biljojeda i svaštojeda. Životni ciklus ove trematode odvija se preko dva prelazna domaćina, prvi su pužići iz roda *Zebrina* i *Helicella*, a drugi mravi iz roda *Formica*, u kojima se formiraju metacerkarije, koje predstavljaju infektivnu formu za pravog domaćina. U toku 50 do 60 dana nakon ulaska u organizam od njih nastaju polno zreli paraziti. *Dicrocoelium* živi od 1,5 do 3 godine u žučnim kanalima domaćina (Otranto i Traversa, 2003; Manga-Gonzalez i sar., 2005).

Želudačno-crevne *Trichostrongylidae* parazitiraju u sirištu i tankim crevima izazivajući gastroenteritis. Prirodna infekcija retko je izazvana samo jednom vrstom iz ove grupe. Patološke promene nastaju u prisustvu larvenih i odraslih oblika ovih nematoda. Klinički ispoljen parazitizam je prvenstveno kod mlađih kategorija životinja, ali se povremeno može ispoljiti i kod starijih. Razvoj u spoljnoj sredini je direktan, bez prelaznog domaćina. Infekcija nastaje peroralnim unošenjem infektivnih larvica (stadijum L₃) (Rufener i sar., 2009; Yacob i sar., 2009).

Parazitski oblik *Strongyloides papillosus* predstavljaju partenogenetske ženke koje parazitiraju u tankom crevu ovaca. Životinje se inficiraju unošenjem infektivnih larvica (stadijum L₃), preko hrane i vode (pasivno) i/ili aktivnim ulaskom preko kože. Patološko delovanje parazita u domaćinu posledica je prisustva larvica u migraciji i/ili adultnih formi u tankim crevima (Eberhardt i sar., 2008; Olsen i sar., 2009).

Prisustvo ovih parazita i njihovih razvojnih oblika u toku migracije dovodi do poremećaja zdravstvenog stanja životinja, pri čemu je stepen oštećenja u direktnoj korelaciji sa brojem prisutnih parazita i/ili njihovih larvenih oblika (Dzik, 2006; Saleh, 2008; Saleh i sar., 2011). Prvu, nespecifičnu liniju odbrane, predstavljaju neutrofilni koji sintetišu u svojim strukturama reaktivnu kiseoničnu vrstu, superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$). Superoksid anjon radikal spada u grupu jakih oksidanasa, ali njegova prooksidativna aktivnost se odnosi na njegovu konjugovanu kiselinu, perhidroksi radikal (HOO^{\cdot}), koji oduzimanjem protona započinje proces peroksidacije lipida. Superoksid dizmutaza vrši neutralizaciju superooksid anjon radikala pri čemu nastaje vodonik-peroksid. Ravnotežna koncentracija vodonik-peroksida u ćeliji održava se razlaganjem pomoću katalaze ili glutation-peroksidazom. Zbog visokog sadržaja polinezasićenih masnih kiselina, najosetljiviji deo ćelije na prooksidativno oštećenje su membrane ćelija i ćelijskih organela. Peroksidacijom lipida nastaje malondialdehid (MDA) koji se vezuje za proteine i fosfolipide membrane, čime se remeti njihova funkcija (Mukul i sar., 2005; Pryor i sar., 2006; Rossner i sar., 2007; Valko i sar., 2007). Usled oštećenja ćelijske membrane dolazi do „curenja“ enzima citosola u ekstracelularni prostor. Jedan od takvih enzima je i laktat dehidrogenaza (LDH). Ovaj enzim postoji u pet izoenzimskih oblika sa različitom distribucijom u pojedinim organima, tako da se određivanje nivoa njihove aktivnosti može koristiti za procenu stepena i vrste oštećenog tkiva (Jaffe i sar., 1996).

Azot-oksidi (NO) nastaju u toku enzimske konverzije L-arginina u L-citrulin, pod dejstvom azot-oksidi sintetaze. Sa jednim nesparenim elektronom NO je vrlo reaktivan molekul koji oštećuje proteine, ugljene hidrate, nukleotide i lipide i udruženim dejstvom sa drugim medijatorima zapaljenske reakcije dovodi do oštećenja ćelija i tkiva. NO je i moćni relaksans glatkih mišićnih ćelija arterijskih i venskih krvnih sudova i inhibitor agregacije i adhezije trombocita. Donori NO imaju iz ovog razloga terapijski značaj. Međutim, azot-oksidi imaju ulogu i u patogenezi jer mogu reagovati sa kiseonikom ili superoksid anjon radikalom pri čemu nastaju različite reaktivne kiseonično–azotne vrste, koji su moćni oksidujućim agensima sa citotoksičnim delovanjem (Agarwal i sar., 2005).

Na mestima gde postoji povećana lokalna produkcija NO i $O_2^{\cdot-}$ (kao što je slučaj kod imunskog odgovora i zapaljenske reakcije), NO može reagovati sa $O_2^{\cdot-}$ formirajući moćni oksidacioni agens – peroksonitrit. Pri protonovanju peroksonitrita nastaje visoko reaktivna

peroksinitritna kiselina čijom homolitičkom razgradnjom nastaju hidroksilni i nitritni radikal koji su odgovorni za većinu toksičnih efekata (Rossner i sar., 2007; Valko i sar., 2007).

Prelazni metali katalizuju heterolitičko cepanje peroksinitritne kiseline, pri čemu nastaju hidroksilni anjon i nitronijum katjon, poznati agens za nitrovanje aromatičnih sistema, a njegov glavni efekat *in vivo* je nitrovanje tirozinskih ostataka proteina, što za posledicu ima gubitak funkcije proteina. Pod dejstvom peroksinitritne kiseline dolazi do oksidacije SH-grupa proteina, kao i glutationa (GSH), koji na ovaj način redukuje količinu peroksinitrita u ćeliji (Valko i sar., 2007).

Povećano izlaganje reaktivnim kiseoničnim i azotovim vrstama dovodi ćeliju u stanje oksidativnog stresa, i može izazvati kontrolisanu ćelijsku smrt (apoptoza), razvoj maligne ćelije ili nekontrolisanu ćelijsku smrt (nekroza). Ovaj mehanizam se nalazi u osnovi razvoja gotovo svake bolesti (Lykkesfeldt i Svendsen, 2007).

Parazitske infekcije dovode do povećane produkcije reaktivnih kiseoničnih i azotovih vrsta, što organizam domaćina uvodi u oksidativni/nitrozativni stres (Kolodziejczik i sar., 2006; Saleh i sar., 2011). Kvantifikaciju oksidativnog stresa u *in vivo* uslovima moguće je pratiti preko niza intermedijarnih metabolita i konačnih produkata u krvi i uzorcima biopsije tkiva koji nastaju oksidativnom modifikacijom biomakromolekula. Međutim, brojni limitirajući faktori čine kvantifikaciju promena izazvanih oksidativnim stresom kompleksnom. U literaturi prevladava stav da SOD 1 može biti korišćena kao pouzdan biomarker oksidativnog stresa (Arguelles i sar., 2004; Celi, 2011).

Superoksid dizmutaza 1 (SOD 1), označena u literaturi i kao Cu,Zn-superoksid dizmutaza, pripada familiji metalo-proteinaza. U grupi superoksid dizmutaza, pored SOD 1 (prisutna u citoplazmi), nalaze se i SOD 2 (prisutna u mitohondrijama) i SOD 3 (prisutna u ekscelularnom matriksu). Superoksid dizmutaza 1 je evolutivno visoko konzerviran enzim, sastavljen od dve subjediniće i njegova molekulska masa iznosi 32 kDa. U aktivnom mestu ovog enzima nalaze se joni bakra i cinka (Kim i sar., 2011). Ovaj enzim katalizuje reakciju pretvaranja superoksid anjon radikala do vodonik-peroksida. Eritrociti su, kao visoko specijalizovane ćelije, veoma pogodan model za proučavanje oksidativnog stresa iz više razloga. Kao prvo, aktivnost SOD 1 je najveća u eritrocitima, što je i razumljivo s obzirom na visok nivo prooksidativnih materija (visok parcijalni

pritisak kiseonika i prisustvo gvožđa, koje preko Fentonove reakcije dovodi do povećane produkcije superoksid anjon radikala). Zatim, u eritrocitima zbog odsustva jedra nema *de novo* sinteze enzima, zbog čega se prisutna SOD 1 i promene u njenom izoenzimskom profilu mogu smatrati validnim biomarkerom intenziteta oksidativnog stresa. I na kraju, reaktivne kiseonične i azotove vrste lako prolaze kroz jonske kanale u membrani eritrocita, tako da promene u izoenzimskom profilu SOD 1 ukazuju i na oksidativni stres sistemskog karaktera (Burak-Cimen, 2008; Nikolić-Kokić i sar., 2010).

Imajući u vidu napred navedenu činjenicu da infekcija parazitima dovodi organizam domaćina u stanje oksidativnog stresa postavljena je hipoteza da promene u izoenzimskim oblicima SOD 1 mogu poslužiti kao biomarker intenziteta parazitskih infekcija.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. ZNAČAJ PROUČAVANJA AUTOHTONIH RASA OVACA ZA VETERINARSKU MEDICINU

Favorizovanje jednostrano selekcioniranih, visokoproduktivnih rasa, neminovno je dovelo do gubitka interesa za gajenje autohtonih, niskoproduktivnih rasa, a samim tim do gubitka biodiverziteta animalnih genetičkih resursa u celom svetu. Imajući u vidu značaj genetičke varijabilnosti za opstanak vrste, predložen je globalni internacionalni program za proučavanje i zaštitu animalnih genetičkih resursa, to jest ugroženih rasa i varijeteta (*The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture*, FAO 2007).

U tom smislu je razvijena metodologija za sprovođenje ovog programa koja između ostalog uključuje i procedure za opisivanje i karakterizaciju rasa, fenotipske i fiziološke osobine koje karakterišu rasu, adaptiranost na uslove gajenja, kao i formiranje baze podataka za utvrđene karakteristike (*Domestic Animal Diversity Information System*, FAO, DAD IS, 2012). Na osnovu dobijenih podataka procenjuje se status rase ili soja u jednoj zemlji i donosi odluka o primeni odgovarajuće metode za konzervaciju rase. Na osnovu dosadašnjeg rada na konzervaciji populacija, formirao se stav, koji se sve više koristi kao osnovni princip, a to je, da konzervacija populacija ne sme da se posmatra kao entitet za sebe, već se favorizuje racionalno korišćenje animalnih genetičkih resursa, uz definisan odgajivački program i zdravstveni nadzor. Racionalno korišćenje animalnih genetičkih resursa, od velikog je značaja za stanovništvo nerazvijenih oblasti i predstavlja važan deo strategije ruralnog razvoja u periodu 2007-2013. godine, u svim evropskim zemljama.

Prema podacima FAO (*World Watch List for domestic animal diversity*) u svetu se gaji 1495 rasa i sojeva ovaca. Procena ugroženosti populacija pokazuje da 658 rasa ovaca ima kritičan status ili je pred istrebljenjem, dok je već 181 rasa nestala. Najveći broj rasa ovaca nestao je u Evropi (142 rase). U Evropi se trenuno gaji 770 rasa i sojeva ovaca, pri čemu samo 332 rase nisu ugrožene. Više decenija unazad, problem gubitka interesa za gajenje autohtonih rasa i sojeva

ovaca u Srbiji je evidentan i preduzimaju se mere da se izvrši karakterizacija ugroženih populacija i njihovo uključanje u programe zaštite biodiverziteta.

Sa aspekta veterinarke medicine konzervacija ugroženih sojeva i formiranje banke gena, baziranom na principu „plati sad – koristi kasnije“, ima značajno mesto u rekonstrukciji evolutivno adaptiranih populacija na uslove gajenja kao i u mogućnosti da se očuvaju retki geni, odnosno specifične karakteristike populacije. Posebno se ističe značaj konzervacije animalnih genetičkih resursa u cilju borbe protiv pojedinih parazitskih i infektivnih bolesti (Wakelin, 1992).

2.1.1. Autohtone rase

Pod delovanjem vektora prirodnog odabiranja, formiraju se populacije koje su dobro adaptirane na uslove ambijenta, otporne. Grubo narušavanje i nepoštovanje strukture autohtonih rasa uvek se pokazalo biološki nepovoljnim, a često nije donelo željene ekonomske efekte. Sve ovo ukazuje da bi autohtone rase u budućnosti mogle da odigraju značajnu ulogu kao izvor varijabilnosti važnih za otpornost i adaptivnu sposobnost.

2.1.1.1. Sjeničko-peštarski soj pramenke

Sjeničko-peštarski soj je najkrupniji soj pramenke. Ovaj soj se gaji u jugozapadnom delu Srbije, Crnoj Gori i Bosni. Prema klasifikaciji rasa (FAO, 2012) sjeničko-peštarski soj pripada regionalnim sojevima pramenke. U cilju zaštite ovog važnog animalnog resursa izvršena je karakterizacija populacije koja je pokazala da se danas teško mogu naći čisti, izvorni oblici sjeničke ovce. Izvorni oblici ove ovce mogu se naći u oblasti sjeničko-peštarske visoravni, na kojoj se tradicionalno gaji, u potpunosti adaptirana na izazove okruženja.

Glava sjeničko-peštarskog soja je obrasla belom dlakom sa karakterističnim tamno pigmentiranim poljima. Crni kolotovi nalaze se oko očiju – naočare, gubica je crno oivičena, donja i gornja usna su crne boje, kao i vrhovi ušiju. Dlaka na nogama je bela ili prskana, crno-bela. Runo je bele boje i čine ga levkasti pramenovi tako da je runo poluotvoreno. Ovce su šute a ovnovi imaju rogove u obliku spirale (Sl. 1). Visina ovaca je oko 67 cm, a ovnova 72 cm. Telesna

masa ovaca je oko 50 kg, a ovnova 70 kg. Randman mesa je oko 45%. Jagnjad su na rođenju teška 3,8 kg. Mlečnost u laktaciji od 5 do 6 meseci je oko 70 kg mleka. Plodnost ovaca je oko 120% (Savić, 2007).

U pogledu kvaliteta vune, sjeničko-peštarska ovca spada u pramenke sa najboljim kvalitetom vune. Finoća vunskih vlakana je C sortimenta. Godišnji prinos vune po ovci je oko 1,5 kg, a po ovnu oko 2 kg.

Radi popravljavanja mesnatosti, prinosa i kvaliteta vune populacije sjeničkog soja se ukrštaju sa različitim tipovima merino rasa.



Slika 1. Sjeničko-peštarski soj pramenke

2.1.1.2. Lipski soj pramenke

Lipski soj je dobio naziv po selu Lipe, pored Smedereva. Pripada pramenkama sa dugim repom. Eksterijerna odlika ovog tipa je mala glava, ovce su šute, a ovnovi imaju trouglaste rogove u obliku spirale. Vuna je bele boje, a noge su, kao i glava, obrasle crnom i sjajnom dlakom (Sl. 2). Runo je otvoreno, sa šiljastim i bičastim pramenovima, a vuna je D sortimenta. Visina ovaca je oko 60 cm, a ovnova 65 cm. Telesna masa ovaca je oko 55 kg, a ovnova 60 kg.

Ovaj soj ima potencijal za dobru proizvodnju mleka i u uslovima dobre ishrane može dati oko 1 kg mleka dnevno, u periodu laktacije, koja traje 3-4 meseca, mlečnost je preko 100 kg. Lipski soj ima značajan potencijal za mlečnost, pa se sistematskom selekcijom uz adekvatnu ishranu, može dobiti izrazito mlečna rasa.

Lipski soj je jedan od ugroženih sojeva pramenke. Trenutno se u programu zaštite (konzervacija *in situ*) ovog soja gaji oko 300 grla, u selu Lipe (FAO DAD IS, 2012). Na osnovu

klasifikacije rasa, koja je pokazatelj genetičkog biodiverziteta (FAO, 2012) lipski soj pramenke pripada lokalnim rasama, a po stepenu ugroženosti nalazi se na listi ugroženih rasa pod kontrolom i potreba za karakterizacijom soja i programom konzervacije je od izuzetnog značaja.



Slika 2. Lipski soj pramenke

2.1.1.3. Vlaški vitorogi soj pramenke

Vlaški vitorogi soj je tradicionalno gajen u Vojvodini. Eksterijerna odlika ovog soja su karakteristični uvrnuti pravi rogovi, slični kozjim rogovima, koji se javljaju kod oba pola (Sl. 3). Visina ovaca je oko 50 cm, a ovnova 57 cm. Telesna masa ovaca je oko 35 kg, a ovnova 40 kg. Vuna je crne, kestenjaste ili bele boje, dugačka preko 20 cm, pa često dopire do zemlje. Finoća vune je D i E sortimenta. Veoma je otporan i skroman u ishrani.

Gubitak interesa za gajenje autohtonih, niskoproduktivnih sojeva, doveo je do rizičnog statusa vlaško vitorogog soja. U oblasti južnog Banata, započet je proces zaštite vlaško vitorog soja, tako da se sada gaji oko 500 ovaca. Po stepenu ugroženosti nalazi se na listi ugroženih rasa pod kontrolom (FAO DAD IS, 2012).



Slika 3. Vlaški vitorogi soj pramenke

2.1.2. Uvezene (egzotične) rase ovaca

U cilju poboljšanja proizvodnih karakteristika autohtonih rasa ovaca, pedesetih godina prošlog veka, započet je opsežan program melioracijskog ukrštanja. Tako da, danas rasni sastav u ovčarstvu Srbije čine autohtone rase, melezi autohtonih rasa, kao i dobro aklimatizovane rase među kojima su virtemberg, il d frans i šarole. Zbog svojih dobrih aklimatizacionih svojstava, otpornosti, kao i izraženih proizvodnih osobina virtemberg, il d frans i šarole rase su rase koje se u mnogim zemljama koriste kao melioratori, direktno utičući na rasni sastav ovaca. Zbog značaja za svetsko ovčarstvo ove rase se svrstavaju u tzv. internacionalne rase, ali s obzirom na to da su u Srbiju uvezene, pripadaju i egzotičnim rasama (FAO, 2012).

2.1.2.1. Virtemberška ovca

Virtemberška ovca je nastala u nemačkoj pokrajini Virtemberg, ukrštanjem domaćih gruborunih primitivnih ovaca sa merino ovcama. Po svojim proizvodnim osobinama virtemberška ovca je tipična rasa za proizvodnju mesa i vune. Virtemberška rasa je krupna rasa, snažne konstitucije (Sl. 4). Visina grebena ovaca je 70 cm a ovcina 80 cm. Telesna masa ovaca je oko 80 kg, a ovcina 110 kg. Kao krupna ovca daje dosta mesa dobrog kvaliteta. Telesna masa jagnjadi na rođenju je oko 4,5 kg. Telo je pokriveno zatvorenim runom, sa cilindričnim pramenovima dužine 8-10 cm. Obraslost vunom je dobra, tako da se po ovcu godišnje dobija 4,5 kg, a od ovcina 7,5 kg vune, sa randmanom 50%. Vuna je AB i B sortimenta. Ranostasnost kao i

plodnost su vrlo dobro izraženi. Plodnost ovaca je oko 150%. Mlečnost ovaca u laktaciji od 5 do 6 meseci je preko 100 kg mleka.

Virtemberška rasa se dobro aklimatizuje u našim uslovima, pa se gaji u čistoj rasi ili se koristi za ukrštanje sa pramenkom, pri čemu se dobijaju otporni melezi, koji u tovu postižu dobre rezultate.



Slika 4. Virtemberg rasa ovaca

2.1.2.2. Il d frans

Il d frans (dišlej merino) je nastao u Francuskoj, ukrštanjem rambuže merina sa engleskom mesnatom lester rasom. Il d frans je krupna rasa za proizvodnju mesa i vune (Sl. 5). Telesna masa ovaca je do 70 kg, a ovnova preko 100 kg. Telesna masa jagnjadi na rođenju je 4,5 kg. Ranostasna je i ima dobre tovne sposobnosti. Vuna je vrlo dobrog kvaliteta, A i AB sortimenta. Od ovaca se godišnje dobije 4 kg a od ovnova 7 kg vune. Plodnost ovaca se kreće do 180%.

U našu zemlju se uvozi radi gajenja u čistoj rasi i ukrštanja sa pramenkom. Dugogodišnje iskustvo u gajenju ove rase je pokazalo da je dobro adaptirana na uslove ishrane i smeštaje i da pri ukrštanju sa pramenkom dolazi do izražaja pozitivan heterozis efekat.



Slika 5. Ile de France rasa ovaca

2.1.2.3. Šarole

Šarole je francuska rasa ovaca za proizvodnju mesa, koja je nastala kao rezultat vrlo duge selekcije. Nastala je u regionu kontinentalne klime, te se ovce šarole rase odlikuju velikom otpornošću i sposobnošću brzog prilagođavanja promenljivim klimatskim uslovima. Šarole rasa ovaca gaji se u otvorenom i poluotvorenom sistemu. Šarole rasa ovca je ranostasna, tako da veliki broj ženskih jagnjadi ulazi u priplod u uzrastu od 7 do 8 meseci. Ovce ove rase odlikuju izražene materinske osobine, plodnost i mlečnost. Dobre tovne sposobnosti kao što su visoki prirasti, dobra konformacija i kvalitet trupa, čine je značajnom rasom za proizvodnju mesa. Osobine šarole rase, kao što su dobre aklimatizacione sposobnosti, ranostasnost, dobra plodnost i kvalitet trupa čine ovu rasu veoma pogodnom za programe industrijskog ukrštanja. Sve je ovo uticalo da se danas šarole gaji u mnogim zemljama i da predstavlja internacionalnu rasu, koja značajno utiče na povećanje tovnih osobina u programima ukrštanja (Sl. 6).



Slika 6. Šarole rasa ovaca

2.2. PARAZITSKE INFEKCIJE

Do parazitskih infekcija odnosno razvoja bolesti (što podrazumeva izražene kliničko-patološke promene) doći će ukoliko su prisutni sledeći faktori: izvor infekcije, put transmisije, ulazno mesto i prisustvo osetljivog domaćina. Posmatrano sa aspekta evolucije, uspešnost nekog parazita se ne meri jačinom i vrstom poremećaja koji izaziva u domaćinu, već njegovom sposobnošću adaptacije i integracije u unutrašnju sredinu domaćina. Nasuprot akutnim, u većini slučajeva kratkotrajnim infekcijama koje izazivaju bakterije i virusi, infekcije izazvane parazitskim protozoama ili helmintima su hroničnog toka i parazit može biti perzistentno prisutan u domaćinu za duži vremenski period. Idealno uspešan parazit će regulisati imunski odgovor domaćina, suprimirajući ga samo do te mere koja će obezbediti opstanak parazita u domaćinu, ne remeteći u isto vreme odgovor domaćina na druge patogene koji bi mogli dovesti do smrti domaćina (Tizard, 2008).

Patogeno delovanje parazita na ili u domaćinu je različito i može biti: 1. mehaničko delovanje, 2. toksično delovanje, 3. imunološki posredovan patogeni efekat, 4. oduzimanje hrane i esencijalnih supstanci od domaćina, 5. uticaj na metabolizam domaćina, 6. unošenje u domaćina drugih parazita, bakterija, virusa i drugih mikroorganizama i 7. smanjenje otpornosti domaćina prema bakterijama, virusima i drugim parazitima (Tizard, 2008).

Veliki broj vrsta parazita, specijalno helminata, pri svom endogenom razvoju migriraju kroz različite organe domaćina razarajući njihova tkiva. Ovaj vid mehaničkog patogenog delovanja parazita je veoma značajan. Na ovaj način paraziti deluju tokom prodiranja u domaćina, tokom migracije njihovih razvojnih oblika kroz organizam, tokom boravka u stalnom mestu njihove lokalizacije i izlaska iz njega. Najznačajnija oštećenja nastaju tokom migracije parazita kroz pojedine organe, naročito ako je migracijom obuhvaćen veći broj organa.

Pri infekciji domaćina ozlede nanose samo oni paraziti koji u njega dospevaju kroz intaktnu kožu ili sluzokožu. Tako, larvice *Strongiloides papillosus*, *Ancylostoma sp.* i dr., pored oralne infekcije često mogu da inficiraju životinju i aktivnim prodiranjem kroz kožu (Eberhardt i sar., 2008).

Naročito veliko razaranje parenhima jetre nastaju pri probijanju mladih oblika metilja do žučnih kanala, gde je stalno mesto boravka ovog parazita. Isto tako, veliko oštećenje jetre i pluća nastaje od migrirajućih larvica askarida i nekih drugih vrsta helminata koje prolaze kroz ove organe.

Praktično svi paraziti koji su smešteni u lumenu kanala pojedinih organa ili su tamo slučajno dospeli mogu dovesti do smetnji u prohodnosti ili potpune okluzije. U procesu opstrukcije pojedinih kanala značajnu ulogu ima i njihovo sužavanje, nastalo kao posledica zadebljanja njihovih zidova (Chapman i Mitchell, 1982; Carmona i sar., 1993).

Na domaćina može delovati toksično čitav niz materija koje proizvode paraziti i izlučuju ih u sredinu u kojoj žive. Isto tako, i supstance oslobođene u domaćinu posle smrti i raspadanja parazita mogu delovati kao toksične materije. Sve ove materije mogu delovati lokalno na tkivo organa u kome paraziti žive ili, posle resorbovanja u krvotok i tkivne tečnosti, i na druge organe domaćina koji nemaju direktne veze sa parazitima. Proizvodi živih parazita koji su štetni za domaćina mogu biti pravi toksini kao i materije koje paraziti proizvode fiziološkim procesima svog metabolizma. Veoma je mali broj parazita uopšte koji proizvode prave toksine (npr. sarkocistin kod *Sarcocystis* spp). Uobičajeno je da se pod parazitskim toksičnim materijama podrazumevaju proizvodi njihovog metabolizma i sekrecije, koji štetno deluju na domaćina. Krajnji proizvodi metabolizma parazita rezultat su njihove normalne ekskretorno-sekretorne funkcije i označeni su zajedničkim imenom kao ekskretorno-sekretorni proizvodi. Do sada je relativno malo poznato koje su to sve materije, jer je uopšte relativno malo istraženo u oblasti metabolizma samih parazita (O' Neill i sar., 2001).

Najznačajniji krajnji proizvod metabolizma proteina kod najvećeg broja ispitanih vrsta protozoa i helminata je amonijak. Jedine vrste parazita koje izgleda da proizvode ureju i mokraćnu kiselinu u većim količinama su larveni oblici pantljičare. Nije utvrđeno da li i nematode mogu da proizvode ove materije. Za isvesne vrste helminata i protozoa ustanovljeno je da proizvode aminokiseline, kreatin i betain. Usled raspadanja uginulih parazita, naročito helminata velikih dimenzija, obrazuje se čitav niz još nedovoljno ispitanih materija, koje domaćin takođe može da apsorbuje. Jedan od značajnijih je i oleinska kiselina.

Sve ove otkrivene, kao i mnoge za sada nedefinisane materije koje izlučuju paraziti, deluju lokalno ili na ceo organizam. Posledice ovog delovanja biće različite, a u zavisnosti od toga koji je organ ili tkivo osetljivo prema njima.

Kod izvesnih parazitskih bolesti mogu se zapaziti poremećaji metabolizma ugljenih hidrata, proteina, masti, vitamina, gasova i drugih važnih materija kod domaćina. Iako nije sasvim jasno dokazano smatra se da za ove poremećaje mogu donekle da budu odgovorne i izlučene supstance parazita, koje se resorbuju i upliću u metabolizam domaćina. Iz svega izloženog može se zaključiti da su mnoge materije koje paraziti izlučuju u organizam svoga domaćina za njega vrlo štetne, ali njihova direktna ili indirektna štetna uloga nije još uvek dovoljno proučena (Dzik, 2005).

Takođe, paraziti oduzimaju svome domaćinu razne hranljive materije i druge esencijalne supstancije koje su mu potrebne za rast, održavanje i reprodukciju. Oni ovo ne čine samo u digestivnom traktu već i svuda u organizmu domaćina u kome žive. Paraziti lokalizovani van digestivnog trakta uzimaju materije za ishranu iz krvi domaćina, tkivnih tečnosti, zatim iz depoa hranljivih materija, koje domaćin ima u nekim organima. Na primer, oni mogu koristiti zalihe glikogena u jetri i mišićima ili masti iz raznih delova tela.

2.2.1. Uticaj parazita na metabolizam domaćina

Kao posledica kompleksnog delovanja parazita (mehaničko, toksično, oduzimanje hranljivih materija i dr.) nesumnjivo je da se u metabolizmu domaćina odigravaju izvesne smetnje. Međutim, na njihovom ispitivanju je nedovoljno rađeno.

Neorganske materije – kod helmintskih infekcije malo je poznato o promenama u neorganskim sastojcima krvi. Istraživanja vršena kod pojedinih bolesti nisu ukazala ni na kakve promene ili su one bile male. Kod jagnjadi inficiranih sa želudačno–crevnim nematodama zapažen je normalan bilans kalijuma i natrijuma, ali je nenormalno niska retencija fosfora i kalcijuma. U nekim slučajevima bilans kalcijuma bio je čak i negativan, tj. više kalcijuma je bilo izlučeno nego što je apsorbovano. Međutim, ustanovljeno je da ne postoje značajne razlike u

sadržaju minerala u kostima, između inficiranih i neinficiranih jagnjadi (Šibalić i Cvetković, 1996).

Ugljeni hidrati – Nema podataka da helmintske infekcije utiču tako često i tako ozbiljno na metabolizam ugljenih hidrata svojih domaćina, kao što je to kod infekcije protozoama. Najveće promene nivoa glikemije su ustanovljene u slučajevima parazitizma jetre.

Jedan od najkarakterističnijih poremećaja u metabolizmu proteina domaćina se odnosi na promene u proteinima krvi. Ukupni proteini krvnog seruma u najviše slučajeva nisu promenjeni ili se zapaža blago povećanje ili blago smanjenje njihovog sadržaja. Međutim znatne promene odigravaju se u nivou proteinskih frakcija. Promene u proteinima krvnog seruma kod helmintskih infekcija ogledaju se u promenjenom odnosu albumini/globulini, pri čemu je albuminska frakcija znatno smanjena, dok frakcije globulina mogu biti povećane, normalne ili ponekad čak i smanjene. Ipak, ukoliko i dolazi do smanjenja globulinskih frakcija, to smanjenje je znatno manje od smanjenja albuminskih frakcija. Prema tome, odnos albumini/globulini uvek je promenjen u korist globulina.

Jasno je da smanjenje nivoa krvnih proteina, naročito albumina, dovodi do sniženja osmotskog pritiska, čija posledica može biti gubitak tečnosti iz kapilara uz pojavu lokalnih edema. Ovakvoj posledici doprinosi i pojava anemije jer se usled anoksije povećava permeabilnost endotela kapilara.

Smatra se da kod helmintskih infekcija smanjen sadržaj albumina u krvi ima značajan udeo u nastajanju edema, mada i anemično stanje takođe ima udela u ovoj pojavi. Kod oštećenja jetre nastaju poremećaji metabolizma masti, proteina i ugljenih hidrata. Poremećaj metabolizma proteina ima kao posledicu promenu sastava i količine intracelularnih proteina, u vidu bubrenja i pojave granula proteinskog porekla (albuminoznu i parenhimatoznu degeneraciju). Promene veoma variraju od blagih reverzibilnih do teških, ireverzibilnih. U takvim slučajevima ćelije jetre gube sposobnost sinteze proteina i zbog toga u krvnoj plazmi se skoro redovno smanjuje koncentracija albumina.

U oštećenoj jetri nastaju i poremećaji metabolizma ugljenih hidrata koje u prvom redu karakteriše smanjen intenzitet glukoneogeneze. Kao posledice toga u hepatocitima se smanjuju rezerve glikogena sve do potpunog nestanka. Zbog toga hepatociti gube izvor energije koja je pre

svega potrebna za proces detoksikacije. Usled smanjenog intenziteta glukoneogeneze nastaju hipoglikemija, hiperketonemija, metabolička acidoza, i ne retko poremećaj funkcije CNS. Zavisno od intenziteta morfoloških promena manje ili više se poremete i druge aktivnosti jetre (ekskreciona funkcija, detoksikaciona funkcija, sinteza proteina, deponovanje vitamina i inaktivacija hormona).

2.2.2. Patogeno delovanje *Fasciola hepatica*, *Dicrocoelium dendriticum* i *Strongyloides papillosus*

Delovanje velikog metilja – *Fasciola hepatica* na organizam domaćina može se svesti na tri osnovna momenta: mehaničko, toksično i učestvovanje u nastajanju sekundarnih infekcija (Saleh, 2008).

Fascioloza (ili distomoza) je oboljenje životinja izazvano velikim metiljom, *Fasciola hepatica*. U zavisnosti od stepena infekcije bolest se može ispoljiti u akutnom ili hroničnom toku. Češći je hroničan tok bolesti koji se ispoljava u vidu zapaljenja jetre i žučnih puteva. Mogu oboleti sve domaće životinje ali najčešće se javlja kod ovaca, koza i goveda, ređe kod svinja i kopitara. Fascioloza je bolest enzooskog karaktera vezana za vlažna, močvarna područja, gde dovodi do značajnih ekonomskih šteta (direktnih i indirektnih). Odrasli paraziti su oblika lista, sivozelene boje i poseduju usnu i trbušnu pijavku. Dugi su 20-30 mm, široki 15 mm. Metilji parazitiraju u žučnim kanalima i žučnom mehuru pravog domaćina. Preko *ductus choledochus*-a jaja parazita dospevaju u creva odakle se izmetom životinje eliminišu u spoljnu sredinu (Armour, 2000).

Mehaničko delovanje ispoljavaju mladi oblici metilja pri aktivnom prodiranju prema svom normalnom mestu lokalizacije, tj. prema žučnim kanalima. Na svom putu migracije oni prvo probijaju zid creva, zatim traumatizuju peritoneum izazivajući lokalno ili difuzno zapaljenje. Probijanjem kroz Glisonovu kapsulu, pri čemu izazivaju lokalni ili difuzni perihepatitis, ulaze u sam parenhim jetre. Paraziti razaraju tkivo jetre i krvne kapilare, izazivajući znatna krvavljenja, a za sobom ostavljajući kanaliće, što sve ima za posledicu akutno zapaljenje jetre. Pri intenzivnoj

infekciji, kada u jetru dospe veliki broj metilja (više hiljada), kod ovaca često nastupa smrt posle mesec dana od infekcije, usled akutnog hepatitisa i posthemoragične anemije.

U toku migracije paraziti se mogu sresti u plućima, slezini, limfnim čvorovima, dijafragmi i u drugim tkivima u kojima izazivaju oštećenje. Sazrevanjem paraziti prelaze u parenhim jetre u žučne kanaliće i začepljuju ih usled čega može doći do zastoja žuči i nastanka žutice (mehanički ikterus). Odrasli paraziti svojim hitinskim ljuspicama na kutikuli i pijavkama traumatizuju i oštećuju sluznicu žučnih kanala izazivajući reaktivno zapaljenje. Hraneći se krvlju izazivaju anemiju. Zidovi žučnih kanala zadebljavaju, kasnije kalcifikuju i znatno se sužavaju. Zapaljenski proces se prenosi na okolno tkivo, parenhim propada i nastaje bujanje vezivnog tkiva. Usled suženja žučnih kanala i prisustva velike količine propalog epitela, eksudata, raspalih i živih parazita i njihovih jaja dolazi do zastoja žuči. Kao posledica ovog stanja nastaje disfunkcija digestivnog trakta i poremećaj motorike creva, zbog čega je sprečeno normalno varenje i resorpcija hrane sa svim posledicama koje iz tog proističu. Usled poremećaja funkcije jetre i anemije, u hroničnom toku bolesti životinje progresivno slabe i uginjavaju u kahektičnom stanju (Navare i Pugh., 2002).

Istovremeno sa mehaničkim, ispoljava se i toksično delovanje parazita njihovim metaboličkim proizvodima kao i raspadnim produktima uginulih parazita, jetrinog parenhima i žuči. Usled poremećaja funkcije jetre ove materije se ne mogu detoksikovati, već se progresivno povećava njihova koncentracija u organizmu. Toksične materije deluju lokalno na tkivo jetre i zidove žučnih kanala pojačavajući efekte mehaničkog delovanja parazita. U ovom pogledu se naročito ističe značaj materije koja sadrži velike količine proteo-lipo-glikolitičnih fermenta. Prelaskom toksičnih materija u krv ispoljava se njihovo delovanje i na druge organe i tkiva (krv, CNS i dr.). Usled delovanja toksičnih materija krvni sudovi postaju propustljivi što omogućava izlazak krvne tečnosti (hidremija) (Scott i sar., 2005).

Raspadni produkti tkiva i stazirana žuč predstavljaju pogodan supstrat za razvoj patogenih i saprofitskih bakterija, koje su tokom migracije uneli mladi oblici parazita iz creva (iz grupe koliformnih bakterija i dr.) ili su već postojali u jetri. S druge strane rezistencija ovakve jetre prema bakterijama i drugim agensima je znatno smanjena. Kao rezultat ovakve sekundarne infekcije nastaju apscesi, koji se kasnije zamenjuju ožiljnim tkivom. Poznato je da je izvestan procenat ovaca inficiran anaerobnim bakterijama *Clostridium oedematiens*, koje borave u zdravoj

jetri u latentnom stanju ne izazivajući bolest. Međutim, usled nastalih promena u jetri dolazi do opadanja njene rezistencije i promena oksido-redukcionog potencijala, što podstiče razmnožavanje bakterija i proizvodnju njihovih toksina, te dolazi do pojave bolesti (nekrotični hepatitis) (Chauvin i sar., 2001).

Dikrocelioza je oboljenje izazvano malim metiljom - *Dicrocoelium dendriticum*. Ova parazitska bolest, često potcenjena od strane istraživača i kliničara, slabo je poznata uprkos činjenici da je uzročnik morfološki opisan daleke 1819. godine. Krull i Mapes (1952) su opisali biološki ciklus razvoja malog metilja. Oboljenje je najčešće subakutnog toka, obično je uzročnik indirektnih ekonomskih gubitaka (pad proizvodnih rezultata), mada kod jakog intenziteta infekcije može dovesti i do uginuća. Bolest je često maskirana drugim parazitskim infekcijama, pa je i to jedan od razloga „zanemarivanja” ove bolesti (Otranto i Traversa, 2003). Uzročnik je trematoda oblika koplja, dužine 5-12 mm, širine 1,5-2,5 mm i poseduje usnu i trbušnu pijavku. Parazitira u manjim i većim žučnim kanalima i žučnom mehuru gde polaže jaja, koja sa žuči dospevaju u creva i preko fecesa se izbacuju u spoljnu sredinu. Za dalji razvoj parazita potrebna su dva prelazna domaćina, suvozemni pužići iz rodova *Zebrina*, *Helicella* i dr., i mravi iz roda *Formica*. Pravi domaćin se inficira kada sa hranom (trava) pojede i mrave u kojima se nalaze obrazovane metacerkarije (Manga-Gonzales i sar., 2005).

Iako o štetnom delovanju malog metilja–*Dicrocoelium dendriticum* postoje protivrečna mišljenja, danas sve više prevladava mišljenje da veliki broj ovog parazita može imati nepovoljan uticaj na domaćina. Teško je jasno definisati patogenezu infekcije malim metiljem s obzirom na činjenicu da je jako teško izazvati eksperimentalnu infekciju (Otranto i Traversa, 2002; Manga-Gonzales i sar., 2005). Klinička ispitivanja prisustva parazitskih infekcija na terenu, često ne ukazuju na prisustvo malog metilja jer prisutne gastro-intestinalne nematode, plućni vlašci i drugi metilji, daju iste kliničke simptome i na taj način maskiraju prisustvo malog metilja. Theodoridis i sar. (2002) su ispitivali uticaj prisustva malog metilja na broj eritrocita i koncentraciju albumina u krvi prirodno inficiranih ovaca korišćenjem radioizotopa. Ubacivanjem ⁵¹Cr i ¹²⁵J u organizam ovaca nije uočeno statistički značajno smanjenje broja eritrocita i koncentracije albumina. Na osnovu ovoga je zaključeno da prisustvo malog metilja u količini manjoj od 4000 ne uzrokuje značajnije promene gore navedenih parametara. Ranija ispitivanja pokazala su promene u navedenim parametrima, ali je to objašnjeno prisustvom, *Fasciola*

hepatica i *Haemonchus contortus*, parazita koji imaju veći patogenetski potencijal u odnosu na *Dicrocoelium dendriticum* (Šibalić i Cvetković, 1996).

Kod preživara, naročito ovaca i koza dikrocelioza se može ispoljiti i izvesnim kliničkim simptomima, a navode se i slučajevi uginuća. Paraziti deluju mehanički, ali se danas sve više pridaje značaj i toksičnom delovanju njihovih metaboličkih proizvoda. Promene na jetri nastaju pretežno u žučnim kanalima i intersticijumu, dok je sam parenhim jetre manje oštećen, pošto paraziti ne migriraju kroz njega. Svakako da intenzitet promena zavisi i od stepena infekcije i starosti životinja (Theodoridis i sar., 1991; Camara i sar., 1996). U ranom stadijumu bolesti ustanovljavaju se promene isključivo u žučnim kanalima. Kod malih preživara jače se ispoljava holangitis i ciroza, koja često postaje peribulozna. Kod dikrocelioze nije uočena opturacija žučnih kanala niti komplikacije izazvane bakterijskim infekcijama (Jithendran i Bhat, 1996).

Strongiloidoza je oboljenje izazvano parazitima iz roda *Strongyloides*. Do klinički manifestne bolesti dolazi samo u slučaju jakog intenziteta infekcije. Uzročnik bolesti kod ovaca je *Strongyloides papillosus*, koji je veličine 3,5-6 mm. Jaja parazita u momentu izbacivanja preko izmeta domaćina sadrže larvicu I stadijuma. U spoljnoj sredini iz jaja izlaze larvice rabditoidnog tipa, koje podležu direktnom ili indirektnom razvojnom ciklusu. U prvom, rabditoidne larvice posle presvlačenja postaju strongiloidne (infektivne), dok u drugom slučaju od rabditoidnih larvica se razvijaju slobodnoživeći mužjaci i ženke. Posle oplodjenja, ženke polažu jaja iz kojih izlaze rabditoidne larvice, koje pošto se presvuku, postaju strongiloidne. Infekcija nastaje prvenstveno aktivnim prodiranjem larvica kroz intaktnu kožu ili, unošenjem kontaminirane hrane ili vode. U organizmu domaćina larvice migriraju krvotokom do pluća, a zatim iskašljavanjem, preko traheje i larinksa dospevaju u ždrelo, odakle aktivnim gutanjem dospevaju u tanko crevo. Tu se obrazuje odrastao parazit, čija se prva jaja u fecesu domaćina pojavljuju za 8 do 10 dana od infekcije. U literaturi postoje podaci i o mogućnosti galaktogene infekcije larvicama koje su preko velikog krvotoka dospele u mlečnu žlezdu (Eberhardt i sar., 2008).

Strongiloidoza jagnjadi izaziva infekcija sa *Strongyloides papillosus*, iako je veliki broj mladih životinja inficiran, samo pri velikom intenzitetu infekcije dolazi do klinički ispoljene bolesti, koja se karakteriše mršavljenjem i zaostajanjem u rastu. Slabe infekcije jagnjadi ne izazivaju nikakve vidljive promene, ali podstiču imunsku reakciju. Turner smatra da se akutan oblik bolesti može očekivati posle infekcije sa 50 000 larvica, dok je Beveridge kod uginulih

jagnjadi nalazio 20 000- 40 000 parazita. Pri eksperimentalnim infekcijama vreme do uginuća bilo je utoliko kraće ukoliko je doza infekcije bila veća. Pri infekciji sa 100 000 larvica jagnjad je uginjavala od 13. do 41. dana, a sa 500 000 do 1 milion do 13. dana posle eksperimentalne infekcije.

Infekcija imunih životinja preko kože praćena je pojavom eritema i urtikarija na mestu prodiranja larvica. Kod veoma jakih infekcija može nastati kongestija pluća sa seroznom eksudacijom i ekstravazacijom u alveolama i intersticijalnom tkivu. U prednjim partijama tankog creva zapaža se jako kataralno zapaljenje, ponekad sa erozijama na sluznici i tečnim sluzavim sadržajem. Ove patološke promene prouzrokuju poremećaj u varenju hrane i apsorpciji hranljivih materija.

Pri slabijim infekcijama ne zapažaju se nikakvi klinički znaci. Za vreme kontinuirane infekcije na paši zapaženo je slabije napredovanje i anemija. Pri jakim (eksperimentalnim) infekcijama nastaje otežano disanje, kašalj, anoreksija, gubitak težine, klonulost, jaka ili umerena anemija, eozinofilija, ponekad potkožni edemi i proliv do uginuća (Taira, i Ura, 1991; Nakamura i sar., 1994; Nakamura. i Motokawa, 2000).

Postoje dokazi za mogućnost unošenja uzročnika druge etiologije (zarazne šepavosti) preko infektivnih larvica *Strongyloides papillosus* (Abbott i Lewis, 2005; Dimitrijević i sar., 2012).

2.2.3. Testovi za utvrđivanje intenziteta parazitske infekcije

Pored koprološke McMaster-ove metode, koja i pored nedostataka, još uvek predstavlja „zlatni standard“ (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 2004) za utvrđivanje intenziteta parazitske infekcije i rezistencije parazita na antihelminlike, postoje pokušaji da se razviju testovi zasnovani na molekularnoj PCR tehnici. Međutim, prisustvo inhibitornih materija (huminske kiseline i polisaharida) u fecesu predstavlja limitirajući faktor koji onemogućava izolovanje i kvantifikaciju DNA parazita iz fecesa, što je neophodno u cilju utvrđivanja intenziteta parazitske infekcije ovim testom. Pokušaji uvođenja ELISA u parazitološkoj dijagnostici, gde se na osnovu specifičnih antitela u krvnom serumu jedinke,

pored vrste prisutne parazitske infekcije, može utvrditi i intenzitet, nisu pružili zadovoljavajuće rezultate, zbog velikog procenta lažno pozitivnih rezultata. Takođe, kandidat navodi da je zajednički nedostatak svih ovih metoda nemogućnost utvrđivanja prisutne parazitske infekcije u prepatentnom periodu, kada su po pravilu i serološke i koprološke pretrage lažno negativne. Imajući u vidu i podatak da je od 2006. godine u Evropskoj Uniji zabranjena profilaktička dehelmintizacija, odnosno dozvoljena jedino terapijska, koja pored utvrđivanja vrste prisutne parazitske infekcije podrazumeva i određivanje njenog intenziteta (Andersen i sar., 2013), čime se potencira činjenica da su neophodna dalja istraživanja u cilju realne procene intenziteta prisutne parazitske infekcije.

2.3. ODNOS PARAZIT – DOMAĆIN

Paraziti su se evolutivno tako menjali da mogu da invadiraju domaćina i prežive u njegovom organizmu, sve dok ne dođu do stadijuma razmnožavanja. Naime, paraziti oslobađaju veliki broj različitih molekula koje im pomažu da prođu odbrambene barijere domaćina i izbegnu imunski napad domaćina. Sa ovog stanovišta posebno su interesantni enzimi i njihovi inhibitori koje luče paraziti. Većina molekula koje luče paraziti je uobičajena i za neparazitske organizme, tako da su se paraziti samo adaptirali da ih koriste onako kako im odgovara.

Serin-, aspartat-, cistein-, i metaloproteinaze su uključene u invaziju tkiva i ekstraćelijsku digestiju proteina (Dzik, 2005). Helminti luče inhibitore ovih enzima (serpine, aspine i cistatine) u cilju inhibicije proteinaza, kako domaćina tako i sopstvenih. Proteinaze i njihovi inhibitori, kao i helmintski homolozi citokina i molekula koje sadrže fosfatidil-holin, preusmeravaju imunski odgovor domaćina ka antiinflamatornom Th2 tipu (Machado i sar., 1996; O'Neill i sar., 2001).

Osim toga, parazitski enzimi koji metabolišu nukleotide i holinesteraze blokiraju zapaljenske procese koji bi potpomogli izbacivanje parazita iz gastrointestinalnog trakta (Dzik i sar., 2002). Intracelularni, metazoatski parazit, *Trichinella spiralis*, luči, između ostalog, protein kinaze i fosfataze, endonukleaze i DNA-vezujuće proteine, za koje se veruje da sprečavaju tj. ometaju ćelijske signale neophodne za diferencijaciju mišićnih ćelija (Dzik i sar., 2004).

Sekrecija antioksidantnih enzima štiti parazite od reaktivnih kiseoničnih vrsta, koje luče stimulisani fagociti kao odgovor na infekciju. Sa izuzetkom superoksid-dismutaze, katalaze (retko prisutne kod helminata) i glutation-peroksidaze (nezavisna je od selena, zbog čega ima slabu aktivnost prema H_2O_2), peroksiredoksini su glavni enzimi helminata koji detoksikuju H_2O_2 (Henkle-Dührsen i Kampkötter, 2001). Sekrecija antioksidantnih enzima je zavisna od stadijuma razvoja parazita. Postoje primeri regulacije njihove ekspresije u zavisnosti od koncentracije reaktivnih kiseoničnih vrsta u okruženju parazita (Dzik, 2005).

Uspeh parazita da se naseli u odgovarajućim tkivima domaćina zavisi od njihove sposobnosti da izbegnu imunski sistem domaćina i da tako prežive u domaćinu duži vremenski period. Najviše iznenađuje sposobnost parazitskih helminata: da dugoročno opstanu u domaćinu, da izazovu imuni odgovor tek posle mnogo godina boravka u domaćinu, kao i složeni razvojni ciklus, koji često uključuje stadijum-specifične antigene (Kennedy i Harnett, 2001).

Među brojnim parazitskim vrstama, helminti (nematode, cestode i trematode) imaju izuzetno raznolike i komplikovane puteve infekcije tkiva domaćina. Međutim, ipak postoje, neki obrasci sličnosti u migratornim putevima različitih grupa i vrsta parazita, većinom određeni anatomskim karakteristikama domaćina sisara (Knox, 1994).

2.3.1. Razvojni put gastrointestinalnih nematoda

Infekcija uglavnom nastaje ingestijom jaja/larve (oralni/pasivni put) ili aktivnom penetracijom larvi ili njihovih vektora (perkutani/aktivni put). Posle oralne infekcije i kratkog zasedanja gastrointestinalnog tkiva larvenim oblicima neke parazitske nematode, valjkasti crvi (*Haemonchus*, *Ostertagia* i *Trichostrongylus*), ostaju u gastrointestinalnom traktu do kraja svog života (odrasli paraziti se lokalizuju u lumenu). Infektivne larve nekih helmintskih parazita, međutim, penetriraju intestinalno tkivo i transportuju se venskom krvlju do jetre. Većina nematoda koje imaju ovakav put razvoja presvlači se u jetri. Zatim se transportuju venskom krvlju do srca i, preko plućne arterije, do pluća. U plućima se većina larvi nematoda zadržava u kapilarima i alveolama. Posle toga se penju, uz respiratorno stablo, do ždrela, iz koga se refleksno iskašljavaju i tako gutanjem ponovo dospevaju u gastrointestinalni trakt. Životni ciklus im se završava u crevima, gde sazrevaju do adultnog stadijuma. Ovaj migratorni put je tipičan za

Ascaris, *Ancylostoma* spp i *Toxocara canis* kod mladih pasa. Na putu do pluća domaćina, neke nematode, kao *Ancylostoma* i *Toxocara*, mogu koristiti i oralni i perkutani put infekcije.

Artropode prenose *Filaria* spp., čiji pripadnici sazrevaju i pare se u specifičnim tkivima domaćina. Odrasle filarije borave u različitim tkivima ljudi, gde mogu živeti nekoliko godina. U limfnim sudovima i limfnim čvorovima borave limfatične filarije, *Wuchereria bancrofti* i *Brugia malayi*. Razvojni oblici mužjaka i ženki *Onchocerca volvulus* akumuliraju se u potkožnom tkivu i indukuju stvaranje čvorova. Odrasli ženski oblici proizvode mikroflarije koje cirkulišu krvlju, izuzev *Onchocerca volvulus* i *Mansonella streptocerca*, koje ostaju u koži. Mikrofilarije inficiraju artropode koje bodu i sišu krv (komarci za limfatične filarijaze, obadi za *O. volvulus*). Unutar artropoda, mikroflarije se razvijaju za jednu do dve nedelje u infektivne filariforme (treći stadijum larve – L₃). Domaćin kičmenjak se inficira larvama, dok ga insketi bodu i sišu mu krv. Tako unete larve migriraju do odgovarajućeg tkiva domaćina, gde se razvijaju u odrasli oblik. To je spor proces koji može trajati i godinu dana (Dzik, 2005).

2.3.2. Razvojni put gastrointestinalnih trematoda

Migracioni profil većine parazitskih trematoda razlikuje značajno se od profila gastrointestinalnih nematoda. Krvni metilji (*Schistosoma*), takođe, slede perkutani put do pluća, a posle toga dolaze i naseljavaju se u portalnu venu (*S. mansoni*) ili u mezenteričnim venama (*S. haematobium* i *S. japonicum*). Parenje muških i ženskih metilja dešava se pre migracije do malih mezenteričnih vena i mesta gde polažu jaja. Jaja polažu u intestinalnim kapilarima (ili u kapilarima mokraćne bešike, u slučaju *Schistosoma japonicum*) i prolaze kroz zid creva (ili zid mokraćne bešike) u lumen ovih organa, potpomognute zapaljenskim procesom koji okružuje jaja. Deo jaja položen u mezenteričnim venama brzo prelazi kroz hepatportalni krvotok do jetre, gde slični inflamatorni proces uzrokuje glavne patološke promene povezane sa infekcijom. Metilji jetre (*Fasciola hepatica* i *F. gigantica*) ne koriste prednosti domaćinovog cirkulatornog sistema za transport, kao što je navedeno u prethodnom primeru. Naime, juvenilni, iz ciste izašli metilji, aktivno migriraju kroz intestinalni zid u peritonealnu šupljinu. Verovatno slučajno ili još uvek nedovoljno poznatim nekim hemotaktičkim procesom, juvenilni metilji pronalaze jetru i penetrišu kroz njenu fibroznu kapsulu. Posle nekoliko nedelja aktivnog kretanja kroz jetrin

parenhim, lokalizuju se u žučnim putevima. Tu sazrevaju i polažu jaja, koja preko žuči dospevaju u creva a zatim u spoljnu sredinu. Metilji medicinskog značaja razmnožavaju se seksualnim putem u krajnjem domaćinu i aseksualno u puževima, kao intermedijarnim domaćinima. Metilji imaju vrlo različite stadijume životnog ciklusa. Iz jaja izašla, slobodno-plivajuća miracidija inficira puževe, u kojima raste do sporociste i redije. Iz puževa izlaze cercarije, koje inficiraju kičmenjake, direktno ili preko inkapsuliranog oblika, poznatog kao metacerkaria (Dzik, 2005).

2.3.3. Razvojni put gastrointestinalnih cestoda

Životni ciklus cestoda (pljosnatih crva), uključuje konačnog (definitivnog) domaćina i, jednog ili više, prelaznih domaćina. Ako je prelazni domaćin sisar (to mogu biti i ljudi, kao akcidentalni domaćini), kukasta larva penetrira zid creva i, putem krvi i/ili limfe se raznosi kroz telo. Na predilekcionom mestu, u intermedijarnom domaćinu se razvija u infektivnu cistu. Ovu cistu (već poseduje rudimentarni skoleks) može da proguta krajnji domaćin (pas ili mačka), gutajući intermedijarnog domaćina. U intestinalnom traktu krajnjeg domaćina se ispoljava skoleks, preko koga se cista kači za crevnu mukozu, gde se cestode razvijaju u odrasli oblik. Svaki tip životnog ciklusa ima specijalizovanu formu larva (cisticercus, cisticerkoid, cenuris, hidatidna cista, koracidium, procerkoid, plerocerkoid) (Dzik, 2005).

2.3.4. Mehanizmi kojima se paraziti bore za opstanak u tkivima domaćina

Neki od mehanizama kojima se paraziti bore za opstanak u tkivima domaćina su: proteinaze koje hidrolizuju peptidne veze, enzimi koji učestvuju u ekstracelularnoj digestiji proteina, digestiji hemoglobina i proteinaze parazita bitne u invaziji tkiva domaćina.

2.3.4.1. Proteinaze koje hidrolizuju peptidne veze

Na osnovu važnih hemijskih grupa u aktivnom mestu, proteinaze se dele u nekoliko glavnih klasa: serin, aspartat, metalo- i cistein proteinaze. Proteinaze katalizuju široki spektar važnih bioloških reakcija koje vode ka aktivaciji enzima, hormona i peptidnih molekula. Enzimi koje aktiviraju proteinaze su uključeni u koagulaciju krvi i fibrinolizu, metabolizam proteina, imunske reakcije i remodelovanje tkiva (McKerrow, 1989; Tort i sar., 1999).

Sekrecija enzima je zajedničko svojstvo i slobodnoživećih i parazitskih organizama (protozoa, helminta i artropoda). U slučaju nematoda, koji se u toku složenog razvoja, od jaja preko stadijuma larve i lutke, više puta presvlače, ovaj proces je hormonski kontrolisan (kao kod insekata) a proteolitički enzimi su uključeni u varenje proteina kutikule i, u nekim slučajevima, u resorpciju proteina stare kutikule. Ovi enzimi su, po prirodi, leucin aminopeptidaze, cink metaloproteinaze i cistein proteinaze (Kennedy i Harnet, 2001). Sposobnost da luče proteinaze koje hidrolizuju kolagen kutikule je zajedničko svojstvo slobodnoživećih nematoda *Caenorhabditis elegans* (Wada i sar., 1998) i parazitskih nematoda. Sekrecija proteinaza događa se takođe tokom ćelijske migracije i razvoja gonada *C. elegans* (Moerman, 1999). Maternalna cistein proteinaza je neophodna za embriogenezu *C. elegans*, jer gubitak njene enzimske aktivnosti vodi ka aberantnim konformacionim promenama u proteinima žumanceta, što rezultira nenormalnoj fuziji trombocita (Briton i Murray, 2004). Prema tome, sekrecija proteinaza za ove svrhe je univerzalna, kako među parazitskim tako i među slobodno živećim organizmima.

Međutim, korišćenje proteinaza u cilju degradacije ekstracelularnog matriksa je izgleda jedinstvena osobina parazita, budući da larve i odrasli oblici slobodnoživećih (neparazitskih) *C. elegans* ne sekretuju proteinaze i ne razaraju ekstracelularni matriks (Lackey i sar., 1989). Specifično oslobađanje digestivnih enzima posle infekcije domaćina služi kao osnovna funkcija u tranziciji neparazitskih prema parazitskim vrstama (Hawdon i sar., 1995; Gamble i Mansfeld, 1996). Proteinaze parazita ubrzavaju invaziju tkiva domaćina i vare njihove proteine. Osim toga, pomažu parazitima da izbegnu imunski odgovor domaćina, sprečavaju koagulaciju krvi (McKerrow, 1989) i imaju stimulirajući efekat na rast parazita (Phares, 1996). Proteinazama koje

luči *Fasciola hepatica* bivaju svarena specifična antitela koja nastaju, kao odgovor, na infekciju ovim parazitom.

2.3.4.2. Ekstracelularna digestija proteina

Odavno je poznato da metalo- i serin- proteinaze deluju tokom parazitske invazije tkiva/ćelija u organizmu domaćina, ali skorašnja istraživanja ukazuju da su i cistein proteinaze umešane u invazione procese mnogih helminata (Sajid i McKerrow, 2002). Neke od ovih enzima luče helminti koji invadiraju tkiva i/ili se hrane njima (npr. *Haemonchus contortus*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Strongyloides rati* i *Ancylostoma caninum*). Cistein proteinaze parazitskih helminata imaju širi spektar delovanja u odnosu na faktore sredine (pH, temperatur a i sl.) nego homologni domaćinski enzimi. U poređenju sa parazitskim enzimima, lizosomalne cistein proteinaze sisara su aktivne pri niskim pH vrednostima, ali su relativno nestabilne pri neutralnom pH (Sajid i McKerrow, 2002), sa izuzetkom katepsina S. Uz značajnu razliku u odnosu na proteinaze kičmenjaka, enzimi parazita su mnogo aktivniji i stabilniji pri neutralnoj pH vrednosti. Ovaj široki raspon pH vrednosti u kojima su aktivne parazitske cistein proteinaze je u skladu sa brojnim ekstralizosomalnim funkcijama koje su opisane. Molekularna filogenija tvrdi da se cistein proteinaze javljaju rano u evoluciji, u cilju degradacije proteina kako ekstra- tako i intracelularno (Sajid i McKerrow, 2002). Postoje brojni primeri degradacije egzogenih proteina parazitskih protozoa, helminata i artropoda (McKerrow i sar., 1993; Tort i sar., 1999).

2.3.4.3. Digestija hemoglobina

Dva najbolje opisana sistema proteinaza kod parazita koji katalizuju degradaciju proteina domaćina su falciparin 2 i katepsin-B1. Falciparin 2 (izolovan iz uzročnika malarije *Plasmodium falciparum* razlaže hemoglobin domaćina, u digestivnim vakuolama parazita (Shenai i sar., 2000). Katepsin-B1 takođe razlaže hemoglobin, ali to radi u crevima metilja *Schistosoma*

mansoni (Dalton i sar., 1995). Vrlo je verovatno da slični sistemi hemoglobinolitičkih proteinaza postoje i u drugom metilju, *Fasciola hepatica*. Naime, kod njih je dokazana aktivnost brojnih cistein proteinaza, uključujući catepsin B-nalik, katepsinu L-sličnu dipeptidilpeptidazu i asparaginil endopeptidaze. Sličan put razlaganja hemoglobina i fibrinogena takođe se može odvijati ekskretorno-sekretornim (ES) produktima nematoda koje se hrane krvlju.

Odrasli oblik *Necator americanus* parazitira u tankim crevima domaćina. Parazit se prikači za zid creva i hrani se krvlju i tkivnim eksudatom. Ekskretorno-sekretorni produkt odraslog *N. americanus* sadrži heterogenu mešavinu sa proteolitičkom aktivnošću *in vitro*; najmanje dve cistein proteinaze, katepsinu B-slične proteinaze i katepsinu L-slične aspartat- i serin proteinaze. Iz ekskretorno-sekretornih produkata odraslih parazita su izolovane i metaloproteinaze sa antikoagulantnim svojstvima (Brown i sar., 1995). Veruje se da su odraslim parazitima neophodni proteolitički enzimi iz dva razloga. Prvi, zato što vare tkivo domaćina a drugo što sprečavaju za parazita potencijalno ometajući proces koagulacije od strane domaćina (Brown i sar., 1995). Nematode *Haemonchus contortus* parazitira i hrani se krvlju u abomazumu ovaca i drugih preživara. Njene L₄ larve i odrasli oblici uzrokuje značajno oštećenje sloja sluznice abomazuma inficiranih ovaca, što dovodi do jakog krvarenja i teških hroničnih anemija. Ekskretorno-sekretorne proteinaze odraslih formi ovog parazita takođe razlažu fibrinogen i plazminogen i ovo razlaganje je, delom uslovljeno prisustvom cistein- i aspartat proteinaze (Karanu i sar., 1993; Knox, 1994). Interesantno je da uzimanje radioizotopom obeleženog hemoglobina od strane odraslih parazita *in vitro* nije inhibisano cistein-proteinaza inhibitorom, mada je razlaganje hemoglobina u kulturi smanjeno za 50% (Fetterer i Rhoads, 1997). To može da znači da je cistein-proteinaza funkcionalna u ekstratelesnoj razgradnji krvi ali nije neophodna za resorpciju produkata te razgradnje.

2.3.4.4. Proteinaze nematoda u invaziji tkiva domaćina

Vezivno tkivo, kao i zidovi krvnih sudova, sadrže veliku količinu elastina i kolagena, što znači da sekretovani kolagenolitički i elastinolitički enzimi mogu potencijalno da ubrzaju prodiranje parazita kroz tkiva domaćina.

Odrasle forme *Haemonchus contortus* i L₄ larve razlažu ekstracelularni matriks koga proizvode glatkomišićne ćelije *in vitro* (Rhoads i Fetterer, 1995). Razlaganje matriksa uključuje specifične akcije cistein proteinaze i nije rezultat jednostavnog mehaničkog razaranja pokretnih parazita. Značajno je to, da i odrasli živi paraziti u kulturi i ekskretorno-sekretorni produkti odraslih parazita razlažu glikoprotein elastin i kolagene komponente matriksa stvorenog *in vitro* od strane glatko mišićnih ćelija. Izlučene cistein proteinaze su na taj način sposobne da hidrolizuju glikoproteine, koji su strukturni proteini neophodni u održavanju integriteta matriksa.

Takođe, sposobnost cistein proteinaza da razlažu i elastin i kolagen matriksa je slična istoj funkciji koju ima katepsin L kod sisara. Štaviše, enzim *H. contortus*-a je aktivan u širokom opsegu kisele i alkalne pH vrednosti (Karanu i sar., 1993; Rhoads i Fetterer, 1995). Na taj način, ovo svojstvo može omogućiti parazitima fleksibilnost da modifikuju ili moduliraju proteine domaćina ili utiču na procese koji uključuju razaranja tkiva, sprečavaju koagulaciju i ishranu ili omogućavaju izbegavanje imunskog sistema. Aktivnost cistein proteinaza može biti značajna za penetraciju abomazalne sluznice. Vredi spomenuti da je pronađeno, da proteinaze koje luči *Ostertagia ostertagi*, nematoda sirišta goveda, mogu da razlažu goveđi mucin (Geldhof i sar., 2000).

Trichinella spiralis je nematoda sa začuđujućim nedostatkom specifičnosti prema domaćinu. Infektivni stadijum njene larve, posle oslobađanja iz kapsule tankim crevima domaćina, penetrira kroz epitelne ćelije tankog creva. Prema tome, degradacija ekstracelularnog matriksa je bitna stavka neophodna za invaziju tkiva i ishranu parazita (Kennedy i Harnet, 2001). L₁ larva *T. spiralis* ne poseduje usni aparat ili stilus. Ove larve napadaju epitelne ćelije prvo glavom. Dokazano je da ove larve ozleđuju plazma membranu epitelnih ćelija creva pacova (linija IEC-6), stvarajući tako prolazni proboj u membrane. To ranjavanje se smatra uobičajenim događajem u crevnom epitelu. Ekskretorno-sekretorni produkti infektivnog stadijuma larve *T. spiralis* sadrže serin, aspartat i cisteine proteinaze (Criado i sar., 1992; Moczoń i Wranicz, 1999; Lun i sar., 2003) i cink-zavisne metalo-proteinaze, sa velikom količinom metalo-endoproteinaza, tj., kolagenaza (Lun i sar., 2003). Određena aminokiselinska sekvenca ove metaloproteinaze (58 kDa) *T. spiralis* pokazuje znatnu homologiju sa prekursorom i aktivnim oblikom cink metaloproteinaze TOH-2 *C. elegans* i različitih proteina članova astacin familije (toloid i BMP-1). Astacin metaloproteinaze, sintetisane kao zimogeni oblici, aktiviraju se post-translaciono

(Stöcker i sar., 1995). One imaju različite funkcije, a neke od njih su: varenje hrane (Stöcker i Zwilling, 1995), izleganje iz jaja (Yasumasu i sar., 1992) i hidroliza komponenti ekstracelularnog matriksa – npr. kolagena tipa I (Yan i sar., 2000). Tokom intestinalne faze razvoja, astacin metaloproteinaze su ključne za navedene funkcije. Međutim, manje je jasno, zašto odrasli oblik *Trichinella*, koji borave u citoplazmi epitelnih ćelija tankih creva, zahtevaju degradaciju fibrinogena i plazminogena (Todorova i sar., 1995). Moguće je da sekretovane proteinaze mogu imati antikoagulantnu ulogu, što doprinosi patologiji trihineloze. Elastaze, koje luče odrasli oblici crva, mogu učestvovati u razaranju tkiva creva i na taj način potpomažu, kako penetraciju parazita u enterocite domaćina, tako i oslobađanje hranljivih materija (Todorova i Stoyanow, 2000).

Kod drugih vrsta *Trichocephalida*, kao što je *Trichuris muris*, sekrecija dve glavne peptidaze (85 i 105 kDa), koje su serin peptidaze (poseduju određen stepen specifičnosti za molekule nalik kolagenazi), je vremenski zavisna. Nije uočena peptidazna aktivnost u ekstraktu ovih crva, što ukazuje na to da se ovi enzimi aktiviraju tokom ili tek nakon sekrecije od strane ovih parazita (Drake i sar., 1994). Funkcija ovih enzima *in vivo* još uvek je nejasna. Moguće je da doprinose ishrani parazita a sposobnost živih parazita da razlažu proteine bazalne membrane (Drake i sar., 1994) ukazuje na učešće ovih proteina u procesu invazije. Moguće je da ovi enzimi pomažu stvaranju i održavanju sredine oko parazita, s obzirom da je prednji deo odraslog parazita uklopljen u sincicijalni tunel, poreklom od epitela cekuma domaćina (Panesar, 1981). Moguće je i da se delovanjem sekretovanih peptidaza remeti integritet membrane epitelnih ćelija, što vodi „curenju” sastojaka ćelije i na taj način doprinosi oštećenju tkiva (Cooper i sar., 1992).

Filarija *Onchocerca volvulus* je bitna nematoda ljudi koja parazitira u koži i očnom tkivu. Dva važna događaja u infekciji sa *Onchocerca* uključuju migraciju kroz kožu larve. L3 larva migrira od mesta ujeda crne mušice do subkutisa gde se odrasli oblik filarije razvija i mikrofilarije migriraju iz subkutanih čvorova do udaljenih regija kože i ponekad do oka (Lackey i sar., 1989). Aktivnost serin i metaloproteinaza u ES produktima mikrofilarija i odraslih mužjaka razlažu se komponente ekstaracelularnog matriksa kože, kolagen tipa IV, fibronektin i laminin (Hafner i sar., 1998). Prema ovim autorima, proteolitička aktivnost ES produkata mikrofilarija i mužjaka odgovorna je za razlaganje elastičnih vlakana tkiva domaćina što je i uočeno u hroničnoj onhocerkozi. Proteolitička aktivnost ne postoji u ES produktima odraslih ženki. Ovo je verovatno

rezultat drugačijeg ponašanja parazita, jer infektivne larve i mužjaci moraju da migriraju kroz tkiva domaćina, dok odrasle ženke su sve vreme u čvorovima. Stadijum-specifična sekrecija 43-kDa serin elastaze *Onchocerca* je dokazana u *O. lienalis*, pri čemu ovaj enzim luče samo L3 larve ali ne i odrasli paraziti. Na taj način serin proteinaze L3 larve verovatno imaju važnu ulogu, ubrzavajući migraciju L3 larvi od mesta ujeda muve do udaljenih regija tela gde će se odrasle filarije razviti (Lackey i sar., 1989). Treba spomenuti, da osim proteinaza i hitinaze mogu imati važnu ulogu u parazitiranju filarija.

2.3.4.5. Izbegavanje imunskog sistema domaćina

Istraživanja različitih parazitskih infekcija obezbedila su opšte shvatanje da je otpornost prema intracelularnim parazitskim infekcijama udružena sa proizvodnjom proinflatornih citokina (IFN γ , IL-2, TNF β) od strane CD4⁺ T helper limfocitne subpopulacije, poznate i kao Th1 ćelije, koje izazivaju Th1-tip imunološkog odgovora. Prijemčivost prema infekcijama udružena je sa Th2 tipom odgovora za koji je zadužena subpopulacija Th2 limfocita (Street i Mosmann, 1991). Većina helmintima izazvanih infekcija ljudi i životinja indukuje imunski odgovor koga karakterišu pojačana produkcija citokina od strane Th2-limfocita (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13), i proizvodnja odgovarajućih antitela (IgG1 u miša, IgG4 u ljudi, IgE kod obe vrste). Ovaj dvostruki imunski fenotip, uopšte, postoji tokom trajanja infekcije. Helmintima izazvan tipa-2-udruženi imunski odgovor je povezan sa izbacivanjem gastrointestinalnih namatoda i formiranjem cirkumovalnih granuloma u šistozomijazi (Hofmann i sar., 2002). Regulacija Th1 i Th2 odgovora je dobro istražena (Kennedy i Harnet, 2001). Ovi odgovori su takođe i pod uticajem antigen-prezentirajućih ćelija i brojinih kostimulatornih molekula. Iako brojne studije ukazuju na ulogu eksretornih/sekretornih produkata u modulaciji imunog odgovora domaćina, identifikovano je samo nekoliko parazitskih molekula.

2.3.4.6. Indukcija Th2 odgovora

Neka istraživanja govore o ulozi cistein proteinaza u inhibiranju Th1 imuniteta, kroz indukciju IL-4. Interleukin-4 koga sekretuju CD4⁺ T ćelije, kao i neke minorne subpopulacije T limfocita i mast ćelijske linije, je glavni citokin odgovoran za Th2 diferencijaciju. Machado i sar. (1996) veruje da cistein proteinaze, sekretovane od strane raznih patogena, smanjuju Th1 odgovor, mehanizmom koji uključuje IL-4. Ove proteinaze podstiču mast ćelije i bazofilne granulocite da degranulišu i tako izluče IL-4. U skladu sa ovim, dokazano je da kod miša, katepsin L (cistein-proteinaza) iz *F. hepatica* suprimira produkciju IFN- γ , koji predstavlja citokin Th1-tipa odgovora. Šta više, molekuli koje sekretuje *F. hepatica* indukuje produkciju IL-4 i IL-10, citokine Th2-tipa odgovora (O'Neill i sar., 2001). Istraživanja sa nematodom *Brugia pahangi* (Osborne i Devaney, 1999) i trematodom *Schistosoma haematobium* kod urinarne šistozomijaze (King i sar., 1996) dokazuju da su Th1 ćelije koje su reagovalе na ove parazite bile suprimirane mehanizmom koji uključuje pojačanu produkciju IL-10, koja ponekad koincidira sa ćelijskom hiporeaktivnošću.

2.3.4.7. Antioksidativni enzimi koje sekretuju helminti

Helminti su anaerobni ili u pojedinim stadijumima svog razvoja fakultativno aerobni organizmi, koji žive u sredini sa niskim parcijalnim pritiskom kiseonika. Ovo je razlog zašto većina parazita ne poseduje ili je izgubila mehanizme za neutralizaciju ROS/RNS tokom regresivne evolucije, ili pak poseduje zanemarljiv kapacitet istih, u poređenju sa aerobnim organizmima. Nasuprot ovome, aerobni organizmi su tokom evolucije razvili brojne specijalizovane sisteme koji ih štite od toksičnog efekta slobodnih radikala kiseonika (Locatelli i sar., 2004; Dzik, 2005). Pretpostavlja se da i određeni antihelmintici svoj terapijski efekat ostvaruju zahvaljujući oksidativnom stresu, koji se razvija u toku njihove biotransformacije u organizmu domaćina (Locatelli i sar., 2004; Dimitrijević i sar., 2012).

Ipak, treba istaći da su i parazitski organizmi zadržali i/ili razvili u toku evolucije mehanizme zaštite od ROS-a (mada ne tako moćne kao aerobni organizmi) koji nastaju u infekcijom-stimulisanim fagocitima domaćina, odnosno u neutrofilnim granulocitima i makrofagima (Cross i Jones, 1991), a deo su urođenog mehanizma odbrane domaćina. Tako su kod svake istražene vrste parazitskih helminata opisane *superoksid dizmutaze* koje katalizuju dizmutaciju superoksid-anjon radikala u vodonik-peroksid i kiseonik (James, 1994), ali je enzim koji deluje na vodonik-perokside bilo teško identifikovati. Veoma je bitna kontrola količine H_2O_2 , zato što vodi formiranju OH^\bullet , za čije uklanjanje ne postoji specifičan enzim - čistač, zbog njegove izuzetno jake reaktivnosti. Zbog toga je najbolji način za kontrolu koncentracije OH^\bullet odbrana protiv H_2O_2 i $O_2^{\bullet-}$. Jedna klasa enzima sposobna za ovu funkciju kod sisara su *seleno-zavisne glutacione peroksidaze*. One katalizuju redukciju H_2O_2 i organskih hidroperoksida, uz oksidaciju glutaciona (GSH) do glutacion-disulfida (Henkle-Dührsen i Kampköter, 2001). Međutim, izgleda da seleno-zavisne glutacione peroksidaze ne postoje kod parazitskih nematoda (Callahan i sar., 1988), mada postoji familija *seleno-nezavisnih glutacione-peroksidaza* ali one nemaju ili imaju vrlo nisku aktivnost prema vodonik-peroksidu. Kod većine parazitskih vrsta je dokazana *katalaza*, koja katališe metabolizam vodonik-peroksida u molekularni kiseonik i vodu, mada je njena aktivnost niska a tzv. sekvenciono kodirana tipična katalaza je dokazana samo kod nekoliko vrsta nematoda – npr. kod *Haemonchus contortus* (Kotze i McClure, 2001) ili *Ascaris suum* (Eckelt i sar., 1998). Visoka aktivnost katalaze dokazan je za sada samo u telesnom ekstraktu *B. malayi* (Ou i sar., 1995).

Aktivacija makrofaga od strane citokina je važna u parazitskim infekcijama gde su uzročnici rezistentni na intraćelijsku destrukciju. Jedan od najznačajnijih puteva destrukcije u ovim aktiviranim ćelijama je produkcija azot oksida. Azotni radikali koji se formiraju interakcijom NO sa reaktivnim kiseoničnim radikalima su letalni za mnoge intracelularne parazite. Međutim, pojedini paraziti, a posebno protozoe, su eksperti za preživljavanje unutar makrofaga. Na taj način neki, kao što su *Leishmania*, *Toxoplasma*, i *Trypanosoma cruzi* mogu da migriraju u bezbedne intraćelijske odeljke; *Leishmania* i *T. cruzi* mogu da suprimiraju produkciju toksičnih radikala ili produkciju citokina dok *T. gondii* može pokrenuti apoptozu makrofaga (Tizard, 2008).

Kod parazita je nedavno opisana nova familija enzima - *peroksiredoksini* (Chae i sar., 1994). To su najverovatnije glavni H_2O_2 -detoksificirajući enzimi parazitskih nematoda i mnogih

drugih patogena (McGonigle i sar., 1998). Kod parazitskih nematoda, peroksiredoksini mogu igrati ključnu ulogu, budući da funkcionišu kao glavni antioksidativni enzimi ali su uključeni u procese ćelijske signalizacije.

2.3.4.8. Peroksiredoksini (PRXs)

Otkriće ovog sistema enzima predstavlja glavni korak u razumevanju mehanizama borbe parazitskih nematoda sa unutrašnjim ali i sa ROS koje sintetiše organizam u kome parazitiraju, kao odgovor na parazitsku infekciju. Peroksiredoksini postoje kao homodimeri. Imaju svojstvo da redukuju vodonik-peroksida do vode, a alkil hidroperoksida do odgovarajućih alkohola. Prema tome da li sadrže jednu ili dve visoko konzervisane residue cisteina klasifikovani su u dve familije: 1-Cys i 2-Cys (Chae i sar., 1994).

Peroksiredoksini se razlikuju od drugih peroksidaza po tome što ne poseduju kofaktore, kao što su metali ili prostetične grupe. Eksperimenti sa ljudskim *1-Cys peroksiredoksinom* ukazuju da je Cys-47-SH mesto oksidacije i da oksidisani produkt (verovatno Cys-SOH) može biti redukovan povratno do cisteina sa ditiotreitol (Kang i sar., 1998), ali fiziološki donor nije još identifikovan (Seo i sar., 2000). *2-Cys peroksiredoksini* su tioredoksin peroksidaze, za koje se pokazalo da redukuju H_2O_2 uz korišćenje elektrona iz tioredoksin sistema. Redukcija hidroperoksida sa 2-Cys enzimima je udružena sa stvaranjem međumolekulskih disulfidnih veza, koja se posledično redukuju, elektronima koje donira tioredoksin. Tioredoksin se regeneriše sistemom tioredoksin reduktaza i NADPH (Chae i sar., 1994a).

Pretpostavlja se da članovi PRX familije koji postoje kod sisara nisu prosti *back-up* sistemi za glutation peroksidazu i katalazu (Brigelius-Flohe, 1999) ali u cilju eliminisanja potencijalno štetnog efekta ROS, mogu igrati ulogu u prenošenju signala i ekspresiji gena, što je uslovljeno promenama u koncentraciji ROS-a (Lim i sar., 1998). Ustanovljeno je da trematoda *S. mansoni* poseduje i peroksiredoksin nalik bakterijskom (rezistentan na oksidativnu inaktivaciju; važan u regulisanju ćelijskih signalnih puteva) i sisarima-nalik osetljive peroksiredoksine (Sayed i Williams, 2004).

Peroksiredoksini su pronađeni i kod nekih vrsta nematoda, a kod određenih (*Ascaris*) predstavljaju glavne antioksidativne enzime (Tsuji i Kasuga-Aoki, 2001). Ovi enzimi su vrlo značajni i za parazitske helminte.

Antioksidantni enzimi koji reaguju sa ROS nastalim u fagocitnim ćelijama domaćina moraju biti izlučeni ili prisutni na površini parazita. Lokalizacija peroksiredoksina ukazuje da reaguju i sa endogeno i egzogeno nastalim ROS (Henkle-Dührsen i Kampkötter, 2001).

Budući da metilji ne poseduju katalazu i imaju vrlo niske koncentracije glutation-peroksidaze (Mei i LoVerde, 1997), smatra se da peroksiredoksini imaju glavnu ulogu u njihovoj antioksidativnoj odbrani od ROS-a domaćina (Kwatia i sar., 2000). 2-Cys peroksiredoksin protein (engl. *thioredoxin peroxidase*) je prisutan kod jedinki oba pola (Kwatia i sar., 2000). S obzirom da 2-Cys peroksiredoksini efikasno koriste redukujuće ekvivalente poreklom od tioredoksina i glutation sistema (alternativne donore elektrona), u stanju su da se izbore sa odbrambenim mehanizmima domaćina. pa zato lako migriraju i zato su prisutne u različitim tkivima (Sayed i Williams, 2004). Uloga peroksiredoksina u antioksidativnoj odbrani metilja je vrlo jasna kada se ima na umu da od momenta infekcije domaćina infektivnim oblicima postoji stalna ekspresija gena za sintezu ovih enzima. Tioredoksin je prisutan u ekskretorno-sekretornim produktima jaja pa potpomaže i njihovoj pasaži i opstanku u zapaljenskim procesom zahvaćenim tkivima.

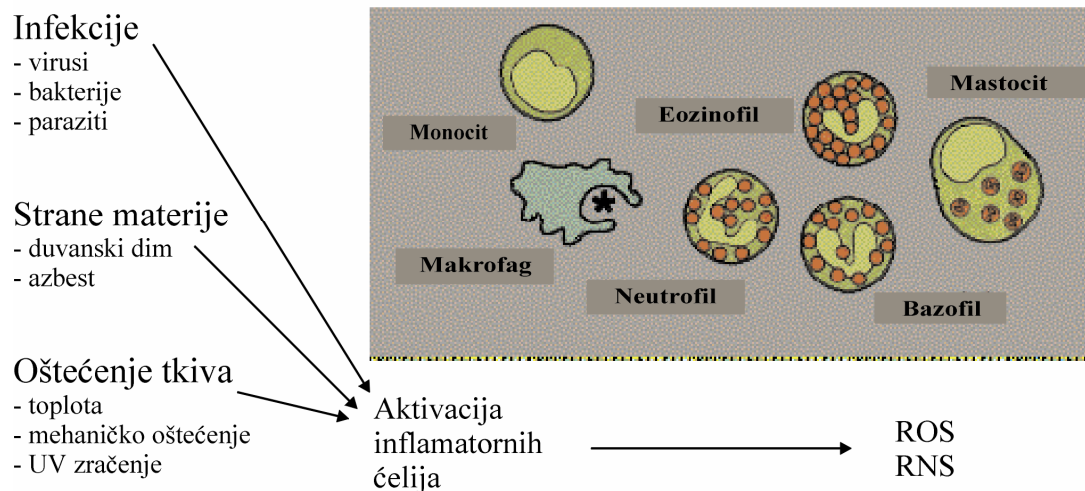
2.4. OKSIDATIVNI STRES

Način na koji kiseonik ispoljava toksični efekat na žive sisteme bio je nepoznat sve do pojave Geršmanove teorije o toksičnosti kiseonika. Po ovoj teoriji toksičnost kiseonika je rezultat pojave redukovanih oblika kiseonika, to jest slobodnih radikala (Gerschman i sar., 1954). Iste godine, Commoner i sar. su merenjem elektronske paramagnetne rezonance, dokazali prisustvo slobodnih radikala u različitim uzorcima bioloških materijala. Denham Harman je 1956. godine postavio teoriju po kojoj slobodni radikali imaju važnu ulogu u procesu starenja. Ova teorija je bila razlog pojave brojnih istraživačkih projekata na polju slobodnih radikala u biološkim sistemima. Druga faza u istraživanju slobodnih radikala počinje 1969. god. kada su McCord i

Fridovich otkrili enzim superoksid dismutazu (SOD), čime je pronađen neoboriv dokaz o važnosti slobodnih radikala u živim sistemima. Treći put je dat veliki značaj prisustvu slobodnih radikala u biološkim sistemima 1977.god. kada su Mittal i Murad dokazali da hidroksilni radikal (OH) aktivira enzim guanilat ciklazu i na taj način posredno stimuliše formiranje cikličnog guanozin monofosfata (cGMP) koji ima ulogu sekundarnog glasnika u složenom sistemu međućelijske komunikacije (Mittal i Murad, 1977). Od ovog perioda brojne novootkrivene činjenice dokazuju da biološki sistemi, ne samo da su se adaptirali na koenzistenciju sa slobodnim radikalima, već su razvili i brojne mehanizme, ili bolje rečeno dodelile slobodnim radikalima uloge u različitim fiziološkim procesima. Slobodni kiseonični radikali, ili reaktivne kiseonične vrste (ROS), kao i reaktivne azotove vrste (RNS) predstavljaju produkte normalnog ćelijskog metabolizma. Za ROS i RNS je poznato da imaju dvostruku ulogu, tj. dvolični karakter, s obzirom da na biološke sisteme mogu imati koristan ali i štetan efekat (Valko i sar., 2006). Koristan efekat ROS ispoljavaju pri niskim i/ili srednje visokim koncentracijama. Pri ovakvim koncentracijama ROS imaju ulogu u ćelijskom odgovoru na razne nokse (infektivne i neinfektivne prirode), u ćelijskom signalnom sistemu, kao i u indukciji mitogeneze.

Štetni efekat slobodnih radikala, koji se ogleda u oštećenju bioloških sistema, označava se kao oksidativni i nitrozativni stress (ROS/RNS) (Valko i sar., 2004; Ridnour i sar., 2004). Ovakvo stanje se javlja u biološkim sistemima kada postoji preterano stvaranje ROS/RNS s jedne strane, i deficit enzimskih i ne-enzimskih antioksidanata s druge strane. Drugim rečima, oksidativni stres proističe iz metaboličkih reakcija u kojima se koristi kiseonik i nastaje u stanjima kada je poremećena ravnoteža između prooksidanata i oksidanata u živim sistemima. ROS prisutne u većoj koncentraciji mogu oštetiti ćelijske lipide, proteine ili DNA, inhibirajući na taj način normalnu funkciju ćelije. Na ovaj način oksidativni stres ima ulogu u patogenezi brojnih bolesti, kao i u procesu strarenja. Održanje vrlo delikatne ravnoteže između korisnog i šetnog efekta slobodnih radikala postiže se mehanizmom tzv. „redoks regulacije”, a u cilju održavanja redoks homeostaze u biološkim sistemima (Dröge, 2002).

FAGOCITI



Shema 1. Uloga ROS i RNS u odbrambenoj reakciji organizma na različite nokse

2.4.1. Reaktivne kiseonične vrste (ROS)

Slobodni radikali se mogu definisati kao molekuli ili delovi molekula koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u atomskim ili molekulskim orbitalama (Halliwell i Gutteridge, 1999). Ovi nesparni elektroni čine slobodne radikale reaktivnim. Radikali poreklom od kiseonika predstavljaju najvažniju klasu reaktivnih vrsta koja se stvara u živim sistemima (Miller i sar., 1993). Molekulski kiseonik (dioksigen) ima jedinstvenu elektronsku konfiguraciju i sam po sebi je radikal. Adicijom jednog elektrona molekulskom kiseoniku formira se superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$) (Miller i sar., 1993). Superoksid anjon radikal, nastaje ili u toku metaboličkih procesa ili aktivacijom molekulskog kiseonika jonizujućim zračenjem. Ovako nastali superoksid anjon označava se kao „primarni” ROS, koji može dalje reagovati sa drugim molekulima pri čemu nastaju „sekundarni” ROS, direktno ili preko enzimski- ili metalom katalizovanim procesom, što je češći slučaj (Valko i sar., 2007).

Stvaranje superoksida dešava se većinom u mitohondrijama (Cadenas i Sies, 1998). Transportni lanac elektrona, koji se odvija u mitohondrijama, predstavlja glavni izvor ATP za ćelije sisara. Tokom prevođenja energije iz jednog oblika u drugi, u transportnom lancu elektrona, 1-3% elektrona stalno „curi”- izlazi iz lanca, prerano, formirajući sa kiseonikom

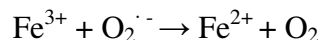
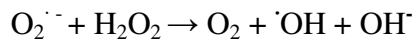
superoksid anjon radikal. Superoksid anjon radikal lako prolazi membranu mitohondrija i dospevši u citosol ima ulogu u brojnim patofiziološkim procesima (Valko i sar., 2004).

Hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$) predstavlja neutralni oblik hidroksilnog jona. Hidroksilni radikal je visoko reaktivan, što ga čini veoma štetnim. U *in vivo* uslovima njegovo polu-vreme života iznosi oko 10^{-9} sekundi (Pastor i sar., 2000), tako da svoje dejstvo ostvaruje reagujući sa molekulima koji se nalaze oko mesta njegove produkcije. Redoks status ćelije u velikoj meri zavisi od gvožđa (i bakar) redoks para i održava se u okviru vrlo uskih fizioloških granica. Homeostatski mehanizmi drže gvožđe u vezanom obliku, tako da u ćeliji nema slobodnog gvožđa. Međutim, u stresnim stanjima, u *in vivo* uslovima, veća količina superoksida oslobađa vezano gvožđe iz molekula (Liochev i Fridovich, 1994). Oslobođeno Fe^{2+} (divalentno gvožđe) može učestvovati u Fentonovoj reakciji, generišući visoko reaktivni hidroksilni radikal. Valko i sar. (2005), su dokazali da u stresnim stanjima, superoksid anjon radikal deluje kao oksidant enzimskih sistema u kojima se nalazi gvožđe, čime stimuliše produkciju $\cdot\text{OH}$ od vodonik-peroksida, jer dovodi do oslobađanja, za Fentonovu reakciju potrebnog, divalentnog jona gvožđa (Leonard i sar., 2004; Valko i sar. 2004).



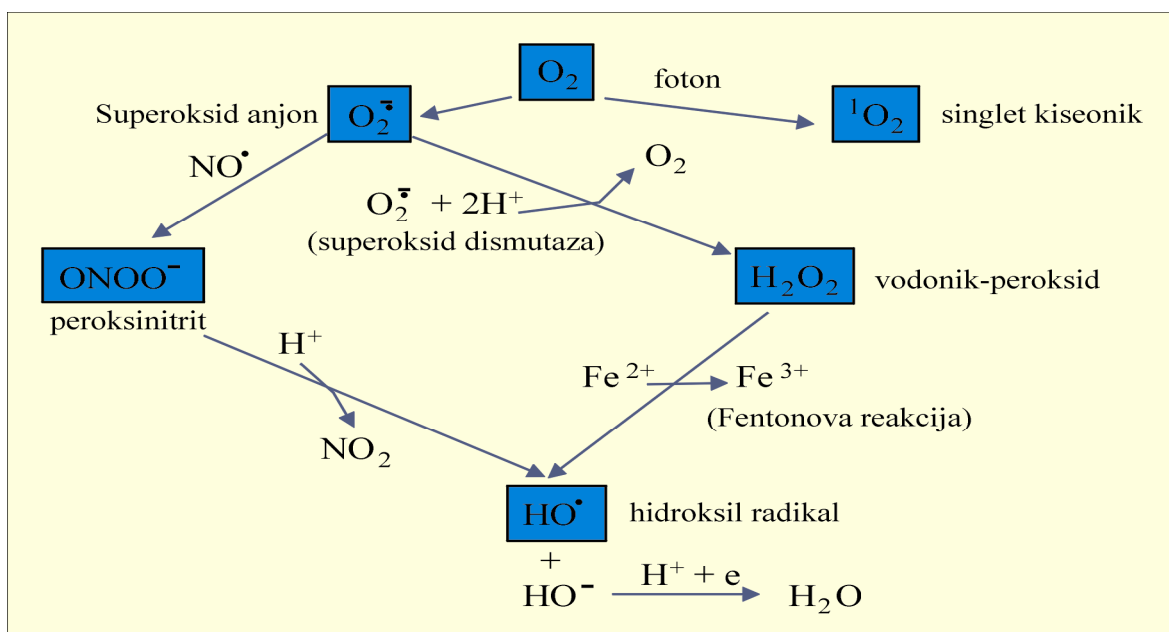
(Fentonova reakcija)

Superoksid anjon radikal učestvuje i u Haber-Weiss reakciji, koja predstavlja kombinaciju Fentonove reakcije i redukcije Fe^{3+} superoksid anjonom, pri čemu nastaje Fe^{2+} i kiseonik (Liochev i Fridovich, 2002):



Najrealističniji model za produkciju hidroksilnog radikala, po tipu Fentonove reakcije u *in vivo*, događa se kada su prisutni joni gvožđa, bakra, hroma i kobalta. Rae i sar. (1999) su dokazali da je gornji limit takozvanog „slobodnog pula” bakra bio daleko manji od jednog atoma po ćeliji. Ovaj nalaz dovodi u ozbiljnu sumnju sposobnost bakra da u *in vivo* uslovima preko Fentonove reakcije generiše hidroksilni radikal. Za Fentonovu reakciju se zna da se odvija u *in vitro*, ali njen značaj u fiziološkim stanjima još uvek nije potpuno jasan, imajući u vidu činjenicu da su slobodni

katalitički joni skoro nedostupni, jer ih vrlo efikasno uklanjaju metal-vezujući proteini (Kakhlon i Cabantchik, 2002). Međutim, postoje stanja „prepunjenosti gvoždem” u organizmu (npr. hemohromatoza) kada su dostupne veće količine „slobodnog gvožđa”, što može imati štetne efekte za ćelijske strukture.



Shema 2. Međukonverzija reaktivnih kiseoničnih vrsta

Sledeća reaktivna vrsta koja može nastati od kiseonika u biološkim sistemima su peroksil radikali (ROO^{\bullet}). Najjednostavnija forma peroksil radikala je HOO^{\bullet} , koji predstavlja protonovanu formu superoksid anjon radikala i naziva se hidroperoksil radikal ili perhidroksil radikal. To je konjugovana kiselina, $pK_a \sim 4,8$, i zbog ovakve konstante disocijacije, samo 0,3% superoksid anjon radikala se nalazi u ovom obliku u citoplazmi (De Grey, 2002). Dix i sar. su dokazali da hidroperoksil radikal može inicirati proces peroksidacije masnih kiselina preko dva paralelna mehanizma. Jedan od mehanizama se odvija u in vivo uslovima i ksantin oksidaza ima ulogu u ovom procesu. Ksantin oksidaza (XO) i ksantin dehidrogenaza (XD) su dve forme istog enzima označenog kao ksantin oksidoreduktaza (XOR) (Borges i sar., 2002; Vorbach i sar., 2003). U katabolizmu purina, XOR katalizuje oksidativnu hidroksilaciju hipoksantina do ksantina, a zatim ksantina do mokraćne kiseline. Mokraćna kiselina deluje kao moćni antioksidans koji „čisti”

slobodne radikale. Ksantin oksidoreduktaza, na taj način ima bitnu ulogu u enzimskoj odbrani ćelije od oksidativnog stresa (Vorbach i sar., 2003).

Peroksizomi predstavljaju ćelijske organele koje proizvode vodonik-peroksid u fiziološkim stanjima, ali ne i $O_2^{\cdot-}$ (Valko i sar., 2004). Peroksizomi troše veliku količinu kiseonika i učestvuju u nekoliko metaboličkih procesa. Korišćenje kiseonika u peroksizomima vodi ka produkciji vodonik-peroksida koji može oksidovati različite molekule. Ove organele takođe poseduju enzim katalazu koja neutrališe nagrađeni peroksid, i na taj način sprečava akumulaciju ovog toksičnog jedinjenja. Na ovaj način, peroksizomi održavaju delikatnu ravnotežu između produkcije i neutralizacije ROS. Kako peroksizomi to čine još uvek nije dovoljno jasno. Kada su peroksizomi oštećeni, velike količine vodonik-peroksida izlaze u citoplazmu, dovodeći ćeliju u stanje oksidativnog stresa.

Kada su fagocitne ćelije (npr. neutrofili) izložene nekom stimulusu, dolazi do niza reakcija koje su označene kao oksidativni prasak (*respiratory burst*) (De Coursey i Ligeti, 2005). Nikotinadenin dinukleotid fosfat (NAD(P)H) oksidaza u neutrofilima generiše superoksid anjon radikal, koji je neophodan za destrukciju bakterijskih ćelija. Ovaj enzimski kompleks se sastoji od dve, za membranu-vezane komponente, gp91^{phox} i p22^{phox}, koje čine citohrom b585, koji predstavlja enzimsko jezgro kompleksa. Posle aktivacije, citosolne komponente, p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} i G-vezani proteini, Rac i Rap1A, translociraju se do membrane pri čemu se formira aktivni enzimski kompleks. NAD(P)H oksidaze, koja se nalazi van fagocitnih ćelija, proizvode superoksid anjon radikal, u količini koja iznosi 1 do 10 % od nivoa produkcije $O_2^{\cdot-}$ u neutrofilima, i za ovako nastali radikal smatra se da ima funkciju u intraćelijskim signalnim procesima.

2.4.2. Reaktivne azotove vrste (RNS)

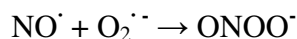
Azot oksid (NO^{\cdot}) je mali molekul koji sadrži jedan nespareni elektron u $2\pi_y^*$ orbitali, što ga čini slobodnim radikalom. NO^{\cdot} se stvara u biološkim sistemima pod dejstvom specifične azot oksid sintaze (NOSs), koja metaboliše arginin do citrulina uz stvaranje NO^{\cdot} preko pet oksidativnih reakcija (Ghafourifar i Cadenas, 2005). NO^{\cdot} predstavlja vrlo reaktivno signalno jedinjenje koje učestvuje u veoma važnim biološkim procesima, kao što su neurotransmisija, regulacija krvnog pritiska, odbrambeni mehanizmi, relaksacija glatke muskulature i u regulaciji

imunskog odgovora (Bergendi i sar., 1999). Zbog ovih njegovih osobina, 1992. godine, NO[•] je proglašen za „molekul godine” od strane *Science* časopisa (Koshland, 1992).

NO[•] ima polu-život od svega nekoliko sekundi u vodenom okruženju. NO[•] ima veću stabilnost u okruženju gde je niža koncentracija kiseonika (poluživot ~15 sec). Međutim, s obzirom da spada i u hidro- i lipo-solubilna jedinjenja, lako difunduje i kroz citoplazmu i kroz ćelijske membrane (Chiueh, 1999). NO[•] ima ulogu u neuronskoj transmisiji signala, kao i u sinaptičkoj plastičnosti u centralnom nervnom sistemu. U ekstraćelijskoj sredini, NO[•] reaguje sa kiseonikom i vodom gradeći nitratne i nitritne anjone.

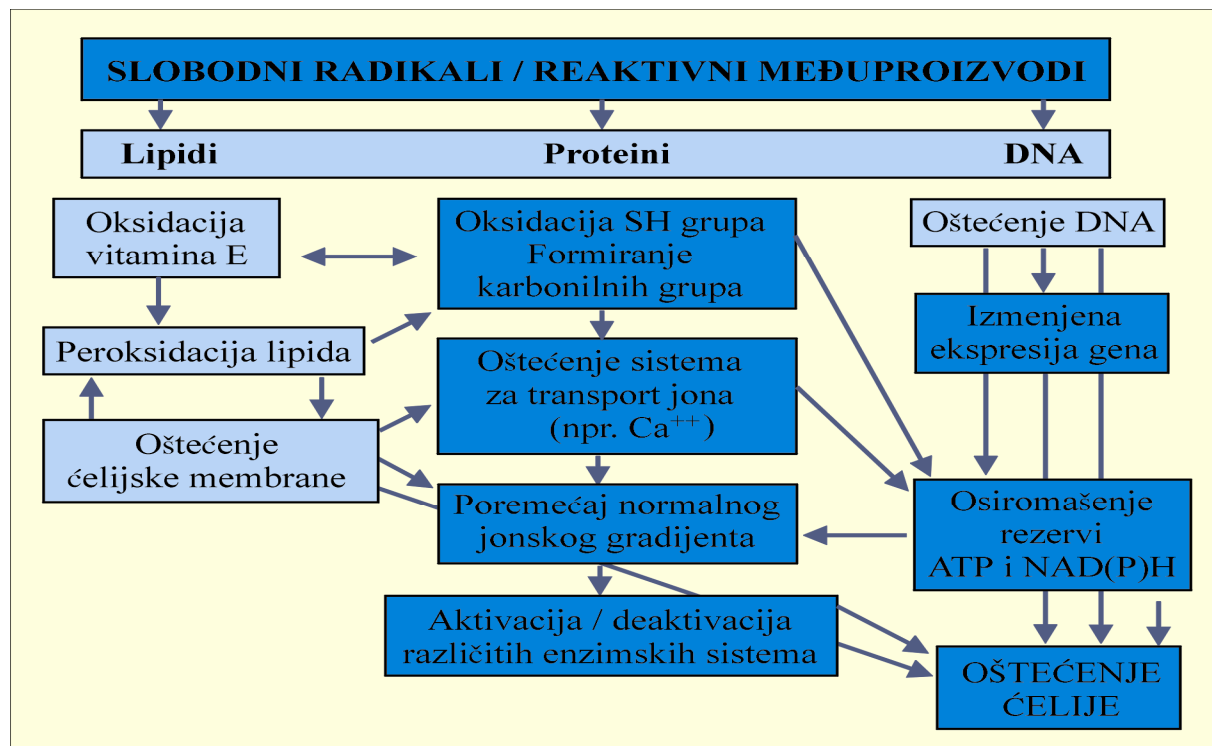
Preterana produkcija RNS označena je kao nitrozativni stres (Ridnour i sar., 2004). Ovo se može dogoditi kada je narušena ravnoteža između sistema koji generišu RNS i sistema koji ih neutrališu. Nitrozativni stres može pokrenuti reakcije nitrozilacije koje za krajnji efekat imaju promenu strukture proteina, a samim tim i njihove funkcije.

Ćelije imunskog sistema proizvode i superoksid anjon radikal i azot-oksid radikal tokom oksidativnog praska u toku imflamatornih procesa. U takvim uslovima, azot-oksid i superoksid anjon radikal mogu reagovati, pri čemu nastaje reaktivniji peroksinitrit anjon radikal (ONOO[•]), koji je potentniji oksidujući agens, i može dovesti do fragmentacije DNA i oksidacije lipida.



Na ovaj način sledi zaključak da toksičnost NO[•] proizilazi prevashodno iz njegove sposobnosti da kombinacijom sa superoksid anjonom nagradi peroksinitrit anjon radikal.

Azot-oksid lako vezuje neke prelazne metale, i u stvari većina njegovih fizioloških efekata nastaje kao rezultat njegovog inicijalnog vezivanja sa Fe²⁺ jonom iz hem grupe enzima guanilat ciklaze (Archer, 1993).



Shema 3. Uticaj ROS i RNS na biomakromolekule

2.4.3. Oksidansi, ćelijske mete i oksidativno oštećenje DNA, lipida i proteina

Oksidansi su supstance sposobne da oksidišu „target“ molekule. Ovo se može dogoditi jednim od sledeća tri načina: oduzimanjem vodonikovog atoma, oduzimanjem elektrona ili dodavanjem kiseonika. Oksidansi se mogu podeliti na različite načine, zavisno od njihove hemijske strukture i reaktivnosti. Jedan široko korišćen sistem podele zasniva se na činjenici da li su ili ne oksidansi slobodni radikali, tj. da li sadrže jedan nespareni elektron u spoljnoj orbitali, što predstavlja situaciju koja molekul čini nestabilnim. U grupu slobodnih radikala spadaju vrste kao što su hidroksil radikal (HO^\cdot), azot oksid (NO^\cdot) i superoksid (O_2^\cdot). Neka jedinjenja mogu biti visoko reaktivna a da nisu radikali. U takve oksidanse spadaju peroksinitrit (ONOO^\cdot), vodonik-peroksid (H_2O_2) i hipohlorna kiselina (HOCl).

Ipak, budući da štetan potencijal i radikala i ne-radikala široko varira i prilično je nepovezan sa radikalnim statusom molekula, klasifikacija prema ovom principu nema mnogo

smisla u biološkom pogledu. Drugačija i očigledno mnogo važnija klasifikacija oksidansa (i antioksidanasa) predložena je od strane Buettner (1993), koji je oksidanse podelio prema njihovom elektron redukcionom potencijalu, koji je blisko povezan sa njihovom biološkom reaktivnošću i na taj način njihovom potencijalno štetnom efektu. Prema ovom sistemu klasifikacije, HO \cdot se smatra najreaktivnijom poznatom kiseničnom vrstom.

Sve ćelije koje žive pod aerobnim uslovima stalno su izložene velikom broju oksidansa koji potiču iz raznih endogenih i egzogenih izvora (Halliwell i Gutteridge, 1999). Ipak, važno je naglasiti, da su oksidansi takođe endogene signalne molekule koje su uključene u kontrolu važnih kaskadnih procesa, kao što su apoptoza i inflamacija. Drugim rečima, povećana produkcija oksidansa, tj. oksidativni stres, nije nužno uvek povezan sa oksidativnim oštećenjem. Jedan dobar primer ove tvrdnje je radikal NO \cdot , koji ima istaknutu ulogu kao medijator vazodilatacije, kao i u nekim drugim procesima. Tako, povećana produkcija NO \cdot nije sama po sebi indikator oksidativnog stresa, mada, povećanje nivoa NO \cdot može voditi ka povećanoj produkciji vrlo štetnog oksidansa, ONOO \cdot . Stoga, rezultate bazirane samo na markerima oksidativnog stresa bez povezivanja sa oksidativnim oštećenjem, teško je tumačiti.

Postoji nekoliko endogenih izvora oksidansa, gde spada i respiratorni lanac u mitohondrijama u kome se molekularni kiseonik prevodi u vodu. Određeni procenat molekularnog kiseonika stalno "curi" iz transportnog lanca elektrona (respiratornog lanca) kao ROS međuproizvod i ovaj proces sam po sebi rezultira stvaranjem tzv. bazalnog nivoa oksidansa u živom organizmu, tj. *in vivo*. Na dalje, imunske reakcije mogu takođe značajno doprineti stvaranju oksidansa, posebno tokom infektivnih stanja ili kao rezultat autoimunskih reakcija. Kao primer, aktivirani neutrofili stvaraju i oslobađaju ROS sa namerom da unište strane materija (patogene), ali usled nedostatka specifičnosti ove reakcije dolazi do oštećenja i tkiva domaćina tj. sopstvenog tkiva. Štaviše, enzimi kao što su ksantin oksidaza i azot oksid sintaza (NOS) stvaraju O \cdot^- i NO \cdot ; dva radikala koja se mogu energetski kombinovati i nagraditi štetnu vrstu, tj. ONOO \cdot . Dobro je poznato da u *in vitro* uslovima slobodni radikali takođe mogu nastati preko tzv. metal-posredovane oksidacije, tzv. Fentonovog tipa hemijske reakcije, ali s obzirom na ograničenu dostupnost slobodnih „prelaznih” metala, malo je verovatno da ove reakcije imaju glavnu ulogu kao izvor oksidansa *in vivo* (Chen i sar., 2000).

Različiti egzogeni izvori ROS-a takođe doprinose direktno ili indirektno ukupnom nivou okidansa u organizmu. Ovo uključuje efekat jonizujućeg i ne-jonizujućeg zračenja, vazdušno zagađenje i prirodne toksične gasove, kao što je ozon, kao i hemikalije i toksine koji se koriste u kući, gde spadaju tzv. oksidišući dezinficijensi. Štaviše, strani mikroorganizmi indukuju stvaranje sekundarnih oksidišućih formacija i njihovo oslobađanje u domaćinu preko imunog sistema, kao što je gore navedeno, kao dodatak na njihove, ponekad, direktne oksidirajuće mogućnosti. Ishrana koja sadrži neadekvatne količine hranljivih materija, može takođe indirektno da rezultira pojavom oksidativnog stresa, remeteći ćelijske odbrambene mehanizme.

Ćelijski makromolekuli, a posebno, DNA, proteini i lipidi, su uobičajene mete oksidirajućih supstanci. Brojne oksidativne modifikacije DNA su opisane, što može voditi, poremećenom spajanju DNA lanaca, mutacijama, cepanju jednog ili oba lanca DNA i eventualno smrti ćelije (Poulsen, 2005). Oksidacija proteina vodi poremećenju funkciji enzima koji ne mogu da obavljaju njihove funkcije u ćeliji. Lipidi su važni sastojci lipidnog dvosloja ćelijske membrane i nezasićenih masnih kiselina koje se posebno lako oksidišu i mogu pokrenuti lančanu reakciju koja rezultira daljim oksidativnim oštećenjem, koje može dovesti integritet ćelije u pitanje. U ovom procesu, oduzimanje vodonikovog atoma od strane ROS-a rezultira stvaranjem konjugovanih dien struktura, što lipide čini mnogo osetljivijim za dalju oksidaciju. Njihova posledična reakcija sa molekulskim kiseonikom rezultira u formiranju lipidnog peroksil radikala koji je sposoban da oksidiše susednu lipidnu molekulu čime se dalje prenosi oksidativno oštećenje.

Pri visokim koncentracijama, ROS mogu izazvati oštećenja ćelijskih struktura, nukleinskih kiselina, lipida i proteina (Valko i sar., 2006). Za hidroksilni radikal se zna da može reagovati sa svim delovima DNA molekule, oštećujući i purinske i pirimidinske baze, kao i šećerni skelet, tj. dezoksiribozu (Halliwell i Gutteridge, 1999). Kao posledica oksidativnog oštećenja DNA dolazi do formiranja 8-OH-G. Permanentna oksidativna oštećenja genetskog materijala predstavljaju prvi korak u mutagenезi, karcinogenезi i starenju.

Dobro je poznato da metalom-izazvano stvaranje ROS rezultira oštećenjem, ne samo DNA, već i drugih ćelijskih komponenti kao što su polinezasićene masne kiseline fosfolipida, koje su izuzetno osetljive na oksidaciju. Jednom formirani, peroksil radikali (ROO[•]) stalno se regenerišu preko reakcija ciklizacije do endoperoksida uz stvaranje konačnog produkta peroksidacije, tj.

malondialdehida (MDA) (Marnett, 1999). Drugi produkt peroksidacije lipida je 4-hidroksi-2-nonenal (HNE). Za MDA se zna da ima mutageni efekat za bakterijske i ćelije sisara i kancerogeni efekat na ćelije pacova. HNE je slabo mutagenog potencijala, ali predstavlja glavni toksični produkt peroksidacije lipida.

Mehanizmi uključeni u oksidaciju proteina reaktivnim kiseoničnim vrstama su proučavani u eksperimentima u kojima su aminokiseline, prosti peptidi i proteini izlagani jonizujućem zračenju u uslovima gde se formiraju hidroksil radikali ili mešavina hidroksil/superoksid radikali (Stadtman, 2004). Bočni lanci svih aminokiselinskih rezidua proteina, posebno cistein i metionin, su osetljivi na oksidaciju izazvanu ROS/RNS (Stadtman, 2004). Oksidacija cisteina može voditi formiranju reverzibilnih disulfidnih grupa između proteinskih tiolnih grupa (-SH) i nisko molekularnih tiolnih grupa, posebno GSH (S-glutatiolizacija). Određivanje koncentracije karbonilnih grupa predstavlja dobar pokazatelj oksidativne modifikacije proteina pod dejstvom ROS-a. Brojni, visoko-osetljivi metodi su razvijeni za merenje koncentracije proteinskih karbonilnih grupa (Dalle-Donne i sar. 2003, 2005).

2.4.4. Mehanizmi odbrane od oksidativnog stresa – Antioksidativna odbrana

Zbog stalne izloženosti oksidansima, što je posledica prisustva za život neophodnog kiseonika, aerobni organizmi su se adaptirali na stalnu – neprekidnu borbu protiv oksidativnog stresa. Evolutivno unapredovala strategija ćelijske odbrane razvijala je i postepeno produžavala životni vek individue. Ćelijski mehanizmi odbrane mogu se podeliti u najmanje tri nivoa prema njihovoj funkciji u suzbijanju oksidansa, popravci/uklanjanju oksidativnog oštećenja ili inkapsuliranju ireverzibilnog oštećenja.

Kao prvi nivo odbrane protiv oksidansa, ćelija je opremljena sa tzv. antioksidans mrežom. Halliwell i Whiteman (2004) su definisali antioksidans kao "bilo koju supstancu koja, kada je prisutna u niskim koncentracijama u poređenju sa koncentracijom supstrata koji može da se oksiduje, značajno sprečava ili odlaže oksidaciju tog supstrata". Pri čemu, treba imati u vidu se termin "supstrat koji se može oksidovati" odnosi na svaki tip molekula koji se može naći *in vivo*

(Roche i sar., 2008). Antioksidansi su sposobni da doniraju elektron oksidansu, na taj način suzbijajući njihovu reaktivnost čime je drže pod kontrolisanim uslovima i sprečavaju oštećenje ćelijskih makromolekula. Antioksidansi postaju na taj način i sami radikali, ali su oni daleko stabilniji i nisu sposobni da izazovu ćelijsko oštećenje. Oksidisani antioksidansi se kasnije recikliraju do njihovog aktivnog redukovanog stanja brojnim ćelijskim procesima koji kao izvor energije koriste NADPH. Upravo ovaj proces recikliranja je ključ moći antioksidans mreže, koja bi se u protivnom vrlo brzo istrošila (Lykkesfeldt i sar., 2003). Antioksidans mreža se može podeliti čine dve osnovne grupe molekula, molekuli niže i molekuli veće molekulske mase (enzimske su prirode). U antioksidantne molekule niže molekulske mase spadaju vitamini C i E i glutation (GSH). Nasuprot njima, enzimskih antioksidanata ima više i oni češće poseduju specijalizovane funkcije, tj. superoksid dizmutaza katalizuje izmenu tj. stvaranje od dva molekula kiseonika jedan molekul O_2 i jedan molekul H_2O_2 , dok katalaza i GSH peroksidaza direktno deluju na uklanjanje H_2O_2 koji curi iz lanca transporta elektrona. Reduktaza dehidroaskorbinske kiseline i GSH reduktaza ubrzavaju recikliranje antioksidanasa tipa vitamina C i GSH.

Drugi i mnogo važniji nivo odbrane je sposobnost da se detektuje i popravi ili ukloni oksidisani i oštećeni molekul. U ovaj nivo odbrane spada i serija tzv. DNA popravljajućih enzima koji su sposobni da detektuju oksidisanu ili pogrešno umetnutu bazu, isecajući ih i umetajući ispravnu neoštećenu bazu u lanac. Obim ove aktivnosti je enormno veliki; ustanovljeno je da DNA svake žive ćelije pretrpi 10.000 do 100.000 oksidativnih modifikacija dnevno, od kojih se 99,99% enzimski popravi. Drugi značaj ovog drugog nivoa odbrane uključuje katabolizam nefunkcionalnih tj. oksidativno modifikovanih proteina i lipida.

Konačno, ako stepen oksidativnog oštećenja premaši kapacitet mehanizma za popravku i uklanjanje, organizmi su opremljeni još jednim krajnjim oružjem, a to je kontrolisana ćelijska smrt ili apoptoza (Payne i sar., 1995). Sposobnost da izazovu programiranu ćelijsku smrt je od izuzetne važnosti u brojnim telesnim funkcijama, uključujući kontrolu rasta tkiva, i ova funkcija je očigledno pod kontrolom nekoliko signalnih puteva. Kako god, jedan od ovih mehanizama izgleda da je apoptoza izazvana oksidativnim stresom i na taj način ona čini krajnje sredstvo koje omogućava da se inkapsulira i izoluje oštećena ćelija (Payne i sar., 1995).

Izlaganje slobodnim radikalima, poreklom iz brojnih izvora, vodilo je razvoju seriji odbrambenih mehanizama (Cadenas, 1998). Odbrambeni mehanizmi protiv oksidativnog stresa,

izazvanog slobodnim radikalima, uključuju: 1. preventivne mehanizme, 2. mehanizme popravke, 3. fizičke, i 4. antioksidativne mehanizme odbrane. Enzimski antioksidativni mehanizmi uključuju sledeće enzime: superoksid dismutazu (SOD), glutation peroksidazu (GPx) i katalazu (CAT). Ne-enzimski antioksidansi su askorbinska kiselina (vitamin C), α -tokoferol (vitamin E), glutation (GSH), karotenoidi, flavonoidi i dr. Pod normalnim uslovima, postoji ravnoteža između aktivnosti i intracelularnih nivoa ovih antioksidansa. Ova ravnoteža je bitna za opstanak i zdravlje organizma.

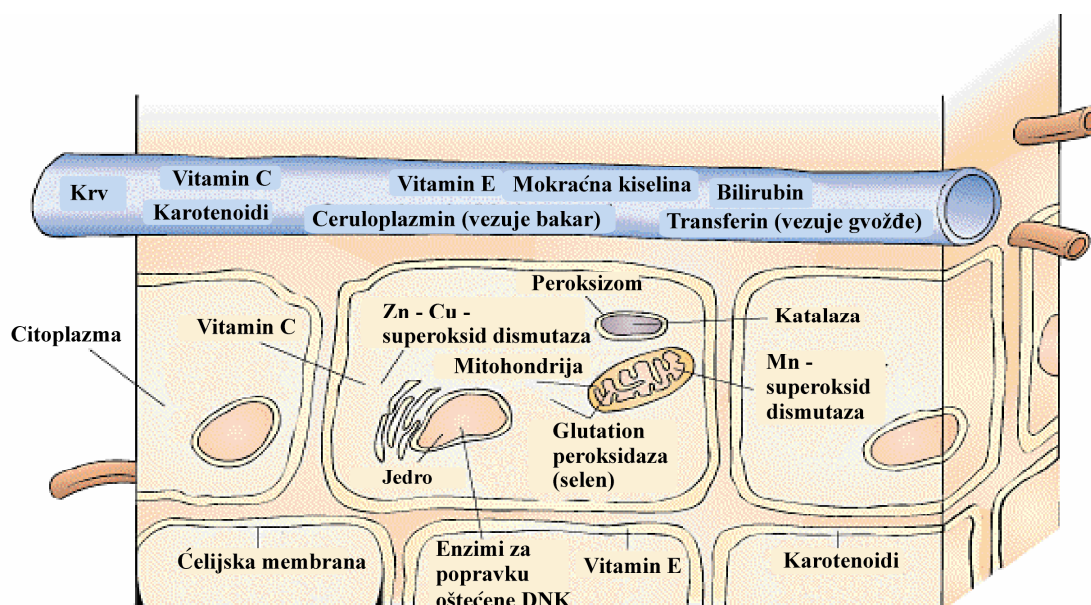
Oksidovana forma glutationa je glutation disulfid (GSSG). Glutation je prisutan u većoj količini u citoplazmi, jedru i mitohondrijama gde predstavlja glavnu antioksidansnu komponentu. S obzirom da se GSH sintetise u citoplazmi aktivnošću glutamat-cistein ligaze i glutation sintetaze, da bi dospelo u mitohondriju potrebno je da se transportuje kroz njenu membranu. Postoje dva mitohondrijalna antiport proteinska nosača koja mogu da obave ovu funkciju (dikarboksilatni proteinski nosač i 2-oksoglutaratni proteinski nosač). Ovo su potvrdili Shen i sar. (2005), koji su dokazali da glutation dodat u medijum, vrlo brzo preuzimaju mitohondrije, uprkos njegovoj visokoj koncentraciji u mitohondrijama.

GSH u jedru održava redoks stanje kritičnih sulfhidrilnih proteinskih grupa koje su neophodne za popravku i ekspresiju DNA. Oksidisani glutation se akumulira unutar ćelije i GSH/GSSH odnos je dobar pokazatelj oksidativnog stresa organizma (Nogueira i sar., 2004). Previsoka koncentracija GSSG može oksidativno oštetiti mnoge enzimske sisteme. Glavna protektivna uloga glutationa protiv oksidativnog stresa (Masella i sar., 2005) ogleda se u:

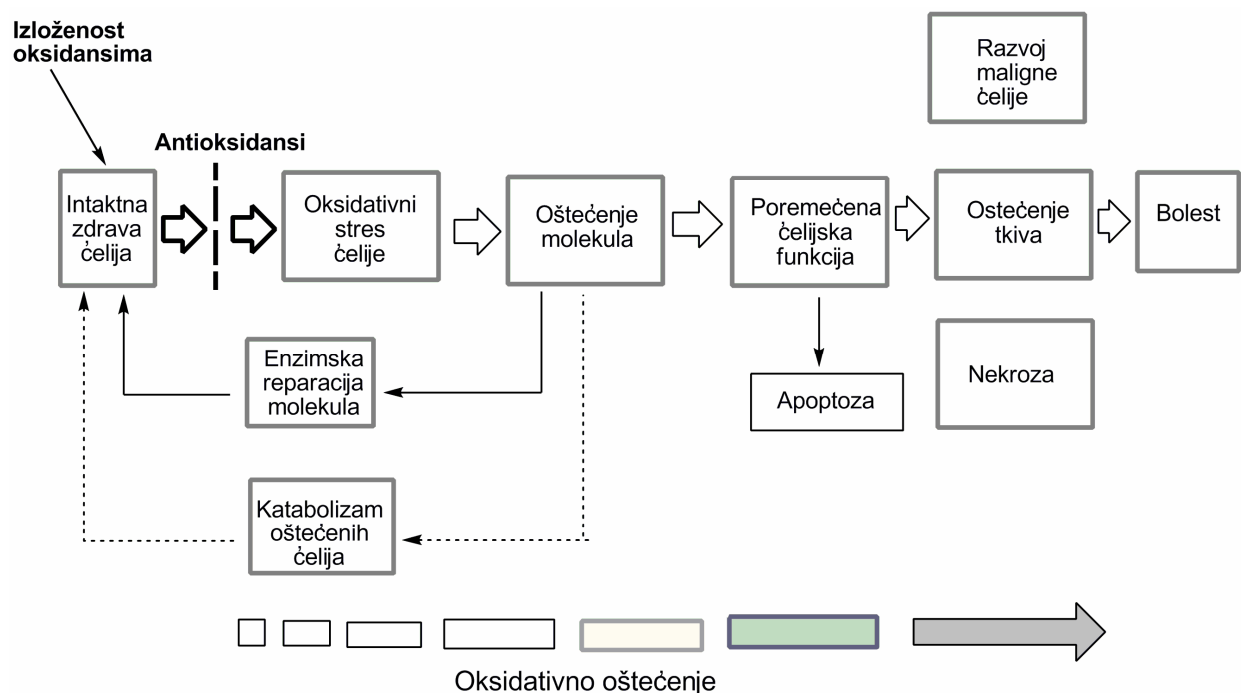
1. Glutation je kofaktor više enzima sa detoksifikacionim potencijalom u oksidativnom stresu, npr. glutation peroksidaze (GPx), glutation transferaze i dr.
2. Glutation učestvuje u transportu aminokiselina kroz plazma membranu;
3. Glutation direktno neutrališe hidroksil radikal i singlet kiseonik, detoksikuje vodonik-peroksid i perokside lipida katalitičkom aktivacijom glutationperoksidaze;
4. Glutation je sposoban da regeneriše većinu antioksidanasa, vitamine C i E. Sposobnost glutationa da regeneriše većinu važnih antioksidanasa je povezana sa redoks stanjem glutationdisulfid-glutation para (GSSG/GSH) (Pastor i sar., 2000).

Brojna literatura postoji o ulozi oksidativnog stresa u razvoju hroničnih patoloških stanja i procesa starenja. Kao rezultat toga, pretpostavlja se da oksidativno oštećenje i reaktivni kiseonični i azotovi radikali igraju važnu ulogu u inicijaciji i/ili razvoju brojnih bolesti, uključujući aterosklerozu i kancer (Ames i sar., 1995; Hoeschen, 1997). U farmskih životinja, oksidativni stres može biti uključen u nekoliko patoloških stanja, uključujući i stanja koja se odnose na proizvodne osobine životinja kao i uopšte na dobrobit držanja jedinki. Na taj način, za uobičajene bolesti kao što su pneumonija (Lauritzen i sar., 2003a) i sepsa u svinja (Basu i Eriksson, 2001) i rekurentna opstrukcija vazdušnih puteva u konja (Deaton i sar., 2004a,b; 2005) pokazalo se da u svojoj osnovi imaju narušenu redoks ravnotežu.

Oksidativni stres se obično definiše kao poremećaj ravnoteže između oksidansa i reduktanta (antioksidansa) na ćelijskom nivou. Oksidativno oštećenje kao rezultat jedne takve neravnoteže, uključuje oksidativnu modifikaciju ćelijskih makromolekula, ćelijsku smrt apoptozom ili nekrozom, kao i strukturno oštećenje tkiva.



Shema 4. Enzimске i neenzimske komponente antioksidativne odbrane



Shema 5. Sudbina ćelije, tkiva i organizma izloženih oksidativnom stresu

2.4.5. Uticaj oksidativnog stresa u razvoju bolesti kod farmških životinja

O ulozi oksidativnog stresa u razvoju hroničnih patoloških stanja (Adams i sar., 1983; Jenkins, 1988; Sies, 1991; Bucala i Cerami, 1992; Finkel, 2003; Pacher i sar., 2007) i procesa starenja (Harman, 1956; Melov, 2002) postoje brojni literaturni podaci. Pretpostavlja se da oksidativno oštećenje i reaktivni kiseonični i azotovi radikali igraju važnu ulogu u inicijaciji i/ili razvoju brojnih bolesti, uključujući hipertenziju, diabetes, aterosklerozu i kancer (Zelko i sar., 2002).

Veliki broj bolesti različitih vrsta domaćih životinja, goveda, konja, svinja i ovaca, povezan je sa stvaranjem ROS i/ili RNS. Naime, oksidativni stres može biti osnova oštećenja kod više patoloških stanja farmških životinja, uključujući i ona koja se odnose na izmenu proizvodnih osobina i dobrobit držanja životinja. Uloga oksidativnog stresa u razvoju bolesti kod farmških životinja prvo je izučavana, određivanjem askorbata i azot-oksida radikala (NO[•]), kod svinja, goveda i konja. Ustanovljeno je da je narušena redoks ravnoteža podloga za razvoj relativno

čestih patoloških stanja u veterinarskoj medicini, kao što su pneumonija i sepsa kod svinja i rekurentna opstrukcija vazdušnih puteva kod konja (Lykkesfeldt i Svendsen 2007). Prva istraživanja na svinjama i govedima su bila sporadična i uglavnom su se odnosila na infektivne bolesti, kao što su: pneumonija (El Kebir i sar., 2005; Lauritzen i sar., 2003), enteritis (Miller i sar., 1993), mastitis, endometritis i sepsa. Kod konja su ispitivanja prvo izvođena na trkačkim konjima i konjima sa opstrukcijom vazdušnih puteva, uključujući i rekurentnu opstrukciju vazdušnih puteva (engl. *Recurrent Airway Obstruction* - RAO), treningom-izazvane plućne hemoragije (engl. *Exercise Induced Pulmonary Haemorrhage* - EIPH), fizičkim naporom izazvan oksidativni stres, laminitis, artritis i volvulusa creva.

2.4.5.1. Oksidativni stres u patogenezi bolesti preživara

Za razliku od svinja koje predstavljaju pogodan model za istraživanje patofizioloških procesa u humanoj medicini, preživari (goveda, ovce i koze) su tek od nedavno predmet ispitivanja na polju oksidativnog stresa u veterinarskoj medicini (Celi, 2011). Ispitivanja oksidativnog statusa kod preživara deo su sistemskih istraživanja, koja se u novije vreme izvode sa ciljem da se pronađe odgovor na pitanje zašto je tranzicioni period najkritičniji deo proizvodno-reproduktivnog ciklusa preživara, pre svega visoko mlečnih krava. Naime, ovaj period, koji obuhvata tri nedelje pre i tri nedelje posle porođaja karakteriše se, u manjoj ili većoj meri, pojavom gotovo svih patoloških entiteta (zadržavanje posteljice, puerperalna pareza, ketoza, dislokacija sirišta, laminitis, klinički mastitisi) koji ugrožavaju zdravlje, život i proizvodne karakteristike preživara (Drackley, 1999; Contreras i Sordillo, 2011). James K. Drackley (1999) u svom radu postavlja pitanje zašto se u ovom relativno kratkom vremenskom periodu, u odnosu na ostatak laktacionog ciklusa od 305 dana, pojavljuje tako veliki broj patoloških stanja. Ispitivanje oksidativnog statusa visoko mlečnih krava u tranzicionom periodu je pokazalo da je zajednički imenitelj patoloških stanja u ovom periodu narušena oksidans-antioksidans ravnoteža, tj. pojava oksidativnog stresa (Sgorlon i sar., 2007; Turk i sar., 2008; Kankofer i sar., 2010). Dobro je poznato da se visoko mlečne krave u ovom periodu nalaze u negativnom bilansu energije zbog toga što sve veće energetske potrebe ploda i mlečne žlezde ne

moгу biti zadovoljene količinom hrane koju životinja unese. Usled negativnog bilansa energije dolazi do prestrojavanja energetskog metabolizma i posledične lipomobilizacije telesnih depoa masti sa ciljem da se zadovolje energetske potrebe ploda i mlečne žlezde (Mulligan i sar., 2006; Contreras i Sordillo, 2011). U toku lipolize, lipaze masnog tkiva (hormon senzitivne lipaze, triglicerid lipaze i monoacilglicerol lipaze) započinju proces razgradnje triglicerida do glicerola i neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA). Nakon kidanja estarske veze između glicerola i masnih kiselina u adipocitima, one postaju „slobodne“ i transportuju se u ekstracelularni prostor, odakle dospevaju u cirkulaciju. U krvi NEFA u najvećem procentu se transportuju vezane za albumin, mada se manji procenat transportuje u obliku nevezanih monomernih jedinica u vodenom rastvoru. Slobodne masne kiseline su dobar izvor energije, i obično se koriste kao supstrat za proizvodnju ATP u poprečno prugastoj muskulaturi i drugim perifernim tkivima u kojima postoji deficit glukoze, koja se u velikim količinama troši u tzv. insulin nezavisnim tkivima (ploda, mlečna žlezda). S obzirom, da je kapacitet jetre u metabolisanju NEFA ograničen, u slučaju obimne lipomobilizacije, višak NEFA se preusmerava u pravcu sinteze ketonskih tela (aceton, aceto-acetat, β -hidroksi butirat). Ovom prilikom visoko mlečne krave, ali i ovce i koze (mada u manjem stepenu) ulaze u jednu od podvrsta oksidativnog stresa, označenu kao „metabolički“ oksidativni stres (Sgorlon i sar., 2007; Dimitrijević i Borozan, 2008 Celi i sar., 2010). Naime, usled „lošeg kuplovanja“ u toku procesa oksidacije masnih kiselina dugog lanca i sinteze ATP u mitohondrijama, dolazi do „curenja“ elektrona i posledične pojave oksidativnog stresa (Lopez-Lluch i sar., 2006). U prilog potvrdi ove hipoteze ide i činjenica da je pri restriktivnoj ishrani, kao i u rasa krava sa manjom mlečnošću (manji nivo energetskog disbalansa) nivo oksidativnog stresa manji (Weindruch i sar., 2001).

Veća incidenca infektivnih procesa u tranzicionom periodu može se takođe objasniti pojavom oksidativnog stresa. Naime, imunoglobulini (antitela) su u osnovi proteini, i kao takvi podložni oksidativnoj modifikaciji izazvanoj reaktivnim kiseoničnim i azotnim vrstama. Slobodni radikali nastali u toku „oksidativnog praska“ (nespecifičnog imunskog odgovora) mogu izmeniti aktivna mesta imunoglobulina. Kratkotrajnim dejstvom niskih koncentracija slobodnih radikala na molekule imunoglobulina otkrivaju se nova aktivna mesta, čime se povećava polireaktivnost antitela. Ovo je takođe jedan od primera „korisnog“ efekta reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta. Međutim, dugotrajno izlaganje, visokim koncentracijama ROS/RNS, dovodi do denaturacije funkcionalnih grupa imunoglobulina (epitop) smanjujući na

taj način funkcionalnost imunoglobulina (specifičnog imunskog odgovora) i pojave novih funkcionalnih grupa, čime se objašnjava auto-antigena karakteristika imunoglobulina u nekim slučajevima hroničnog oksidativnog stresa (Dimitrov i sar., 2008).

U daljem tekstu prikazan je pregled patoloških stanja, u kojima je na direktan ili indirektan način, potvrđeno učešće oksidativnog stresa.

Intenzivna peroksidacija lipida se javlja kod krava u toku porođaja i perioda rane laktacije (Bernabucci i sar., 2005). Utvrđeno je povećanje stepena lipidne peroksidacije u eritrocitima krava sa *akutnim mastitisom* što ukazuje na vezu ove bolesti sa oksidativnim stresom. Zabeleženo je i značajno smanjenje koncentracije askorbata u krvnom serumu i mleku krava sa *akutnim* i *subkliničkim mastitisom*, izazvanim sa *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* ili *E. coli*, što takođe ukazuje da slobodni radikali imaju udela u razvoju ovih bolesti (Weiss i sar., 2004; Kleczkowski i sar., 2005; Ranjan i sar., 2005). Iz ovoga se može zaključiti da povećanje obima peroksidacije eritrocitnih lipida i smanjenje koncentracije askorbata ukazuju na oksidativni stres kod krava sa akutnim mastitisom.

Na udeo slobodnih radikala na razvoj mastitisa ukazuju i rezultati po kojima posle intramamarnе infuzije *E. coli* ili njenih endotoksina dolazi do značajnog povećanja koncentracije nitrita i nitrata u krvnoj plazmi i mleku (Blum i sar., 2000). Takvo stanje se zadržava i posle antibiotskog tretmana sa enrofloksacinom, ali se povećanje koncentracije nitrita i nitrata u mleku može sprečiti aminogvanidinom, koji je specifičan inhibitor iNOS (Bouchard i sar., 1999), što indirektno opet potvrđuje hipotezu o učešću oksidativnog stresa u razvoju ovog patološkog stanja.

Tretiranjem krava, kojima su izazvali *mastitis* intramamarnom infuzijom endotoksina, sa visokim dozama askorbata ili L-histidina Chaiyotwittayakun i sar., (2002) su ustanovili da tretman sa askorbatom nema efekat na kliničke simptome ali utiče na brže vraćanje mlečnosti na stanje pre infekcije.

S obzirom da rezerve vitamina E opadaju kako se telenje približava i ostaju niske tokom prve i druge nedelje posle teljenja, na udeo slobodnih radikala u pojavi kliničkih mastitisa ukazuje i podatak da vitamin E (3000 IU) primenjen 10. i 5. dana pre teljenja povećava baktericidnu sposobnost granulocita (Smith i sar., 1997). Potvrđeno je i da selen, sam ili mnogo bolje u kombinaciji sa vitaminom E, pojačava baktericidnu sposobnost neutrofilnih granulocita

(Hogan i sar., 1992). Ovi podaci neosporno dokazuju upletenost oksidativnog stresa u razvoju mastitisa.

Oksidativni stres ima udela i u razvoju *pneumonije* kod goveda. Tokom infekcija respiratornog trakta, neutrofilni granulociti se nagomilavaju u plućnom tkivu kako bi pomogli uklanjanje mikroorganizama. Međutim, u nekim slučajevima pneumonije goveda, odgovor neutrofilnih granulocita postaje preterano jak i zato dovodi do nagomilavanja brojnih produkata koji oštećuju tkivo. Među produktima koji sekretuju neutrofilni granulociti su i reaktivni azotovi međuproizvodi. Jedan od njih je azot-oksidi radikal (NO^\cdot) koji moduliše i akutnu i hroničnu zapaljensku reakciju jer je medijator povećane kapilarne propustljivosti, usled koje dolazi do „curenja” makromolekula iz krvi u tkiva. Uz to, superoksid-anjon radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$) koji nastaje tokom oksidativnog praska neutrofilnih granulocita, reaguje sa azot-oksidi radikalom (NO^\cdot) i nastaje peroksinitrit (ONOO^-) koji izaziva oštećenje tkiva. Utvrđeno je da granulociti izolovani iz krvi teladi sa *bronhopneumonijom* proizvode 10 puta više superoksid-anjon radikala ($\text{O}_2^{\cdot-}$) i imaju nižu aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u krvnoj plazmi u poređenju sa kontrolnom, zdravom grupom teladi (Ledwozyw i Stolarczyk, 1992). Nagomilani superoksid-anjon radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$) reaguje sa azot-monoksidom (NO), formirajući peroksinitrit-anjon (ONOO^-) koji značajno doprinosi obimnoj destrukciji tkiva kod bronhopneumonije. Studija koju su izveli Wessely-Szponder i saradnici (2004) je pokazala da neutrofilni granulociti izolovani iz krvi bolesnih životinja proizvode veliku količinu NO^\cdot i mijeloperoksidaze, koje kombinovanom aktivnošću mogu dovesti do formiranja jednog od markera oštećenja proteina - nitrotirozina.

Kod ovaca i koza, takođe je dokazano učešće oksidativnog stresa u razvoju i komplikaciji nekih patoloških stanja. Graviditetna toksemija predstavlja metabolički poremećaj koji se karakteriše hipoglikemijom i hiperketonemijom i nastaje usled negativnog bilansa energije. Obično se javlja u poslednjih šest nedelja graviditeta, kod pregojenih, gravidnih jedinki koje nose dva ili više ploda. Kao i u slučaju krava u tranzicionom periodu, isti patogenetski mehanizam, tj. obimna lipomobilizacija i posledično povišena koncentracija NEFA i ketonskih tela je glavni razlog pojave oksidativnog stresa u ovaca i koza sa graviditetnom toksemijom (Al-Qudah, 2011).

Parazitske infekcije malih preživara su najčešći eksperimentalni model u kome je ispitivan razvoj i uticaj oksidativnog stresa u patogenezi procesa u domaćinu (Saleh, 2008; Ujjwal i Dey, 2010; Dimitrijević i sar., 2012). Promene izazvane prisustvom parazita u velikoj meri zavisi od

vrste parazitske infekcije (Dede i sar., 2002). Paraziti su ksenobiotici i zbog te činjenice je logično očekivati pojavu oksidativnog stresa. Međutim, treba imati u vidu da je evolucija domaćina i parazita tekla uporedo (Dzik, 2005), te je to jedan od osnovnih razloga zašto je u nekim slučajevima parazitskih infekcija nivo oksidativnog stresa mnogo manji u odnosu na nivo nakon primenjene antiparazitske terapije, naime može se smatrati da su paraziti manje strani za organizam domaćina u odnosu na primenjene antiparazitike. Naravno, mehanizmi razvoja oksidativnog stresa razlikuju se u svojoj osnovi u ova dva slučaja. Izvor ROS/RNS u slučaju parazitske infekcije su pre svega neutrofilni granulociti i aktivirani makrofagi, koji ih u svojim strukturama sintetišu u cilju eliminacije parazita. Međutim, i paraziti su u toku evolucije razvili mehanizme koji ih štite od pogubnog dejstva reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta domaćina, mada je njihov antioksidativni kapacitet prilično limitiran. Oksidativni stres nakon terapije antiparaziticima nastaje u toku procesa biotransformacije lekova. Naime, u toku vezanih reakcija biotransformacije lekova, koje se odvijaju na citohromima dolazi do posledičnog „curenja“ elektrona i pojave reaktivnih kiseoničnih i azotovih vrsta. Zbog ovoga većina autora predlaže da se u terapijske protokole parazitskih infekcija uključe i antioksidansi (Dimitrijević i sar., 2012).

O uticaju oksidativnog stresa na razvoj bolesnog stanja i antioksidantnoj terapiji koja može ponekad da neutrališe promene izazvane oksidativnim oštećenjem postoji na stotine radova. Međutim, uprkos dobro dokumentovanoj korelaciji između oksidativnog stresa i nekih bolesti kod životinja i teorijske mogućnosti preveniranja i progresije bolesti primenom antioksidansa, rezultati velikog broja istraživanja na ljudima su obeshrabrujući. U velikom broju istraživanja u kojima su korišćene tzv. krajnje tačke (engl. *end points*) za procenu efekta oksidativnog stresa na organizam domaćih životinja (stepen morbiditeta i mortaliteta) primena antioksidativne terapije nije pružila zadovoljavajuće rezultate u smislu smanjenja rizika od obolevanja i uginuća.

Može se, s punim pravom, reći da prava kombinacija antioksidanasa nije još pronađena, uprkos obećavajućim rezultatima dobijenim kod nekih subpopulacija. Ostaje činjenica da su mehanizmi kliničkog poboljšanja zdravstvenog stanja pacijenata, korišćenjem moćnih antioksidanasa, kao što su askorbat i inhibitori prekursora NO[•], uglavnom nepoznati i očigledno podrazumevaju složenije nivoe od trenutno poznatih. Takođe, ne treba zaboraviti da su se u toku evolucije aerobni organizmi „navikli“ na prisustvo slobodnih radikala. Pojedini slobodni radikali imaju i pozitivne uloge u složenim organizmima (uloga u transmisiji informacija, regulatorne

uloge, itd). Smatra se, da zbog relativno kratkog poluživota, slobodni radikali predstavljaju idealne „switch off prekidače“, bitne za regulaciju brojnih, vrlo suptilno regulisanih procesa u organizmu (Spasojević, 2011). Drugim rečima, nisu svi slobodni radikali „dobri“, ali isto tako, nisu ni svi antioksidansi „dobri“. Proizvoljna primena antioksidanasa, pre svega vitamina, može imati i štetne posledice po organizam, jer se njihovom primenom remete neki od korisnih efekata reaktivnih vrsta.

Dakle, neophodna su dalja istraživanja u ovoj interesantnoj i bitnoj oblasti, jer je stanje sa ove tačke gledišta još uvek daleko od rutinske preporuke za antioksidantnu terapiju.

2.4.6. Određivanje parametara oksidativnog stresa i oštećenja makromolekula

S obzirom da oksidativni stres nastaje kao posledica narušene ravnoteže između oksidanasa i antioksidanasa, metode za kvantifikaciju oksidativnog stresa uglavnom se zasnivaju na direktnom ili indirektnom merenju oksidanasa, antioksidanasa i/ili proizvoda oksidativnog oštećenja. Budući da se radi o visoko reaktivnim supstancama, kvantitativno određivanje oksidanasa i antioksidanasa često zahteva specijalnu opremu i značajno iskustvo.

Aktivnost oksidanasa i antioksidanasa može biti praćena direktno, *in situ*, korišćenjem elektron spin rezonancije (ESR), ali ova metoda nije pogodna za rutinske analize. Elektronska paramagnetna rezonantna (EPR) spektroskopija predstavlja tehniku koja pruža jedinstveni uvid u biohemijske redoks procese, zahvaljujući svom kapacitetu da: (I) razlikuje i kvantifikuje različite reaktivne vrste, kao što su hidroksil radikal, superoksid, ugljenični radikali, vodonični atom, azot-monoksid, askorbil radikal, melanin i druge; (II) odredi antioksidativne kapacitete različitih jedinjenja, ekstrakata i namirnica; (III) pruži informacije o drugim važnim parametrima bioloških sistema. Kombinacija EPR spektroskopije i tradicionalnih biohemijskih metoda predstavlja efikasno oruđe u ispitivanju mehanizama oboljenja i moguće antioksidativne terapije, pružajući kompletniji uvid u redoks procese u organizmu (Spasojević, 2010).

Umesto nje, obično se koriste metode, kao što je indirektno merenje oksidanasa upotrebom fluorescentne boje dihlorfluorescein, jer su relativno jednostavne, mada i relativno nespecifične

(Rosenkranz i sar., 1992). Za ovu metodu se prvobitno mislilo da je specifična za H_2O_2 , ali se danas zna da nekoliko oksidanasa može proizvesti fluorescenciju. Boja ulazi u ćeliju kao nefluorescirajući- diacetat, koji se zatim deacetiluje i u takvom obliku ne može izaći iz ćelije. Reakcija sa oksidansom rezultira stvaranjem visoko fluorescirajućeg produkta dihlorofluoresceina, koji može biti kvantifikovan korišćenjem čitača za intenzitet fluorescencije, mikroskopom ili protočnom citometrijom. Povećana fluorescencija se može tumačiti kao povećanje nivoa oksidativnog stresa.

Merenje antioksidanasa može se vršiti ili određivanjem ukupnog kapaciteta antioksidanata ili preciznim određivanjem pojedinačnih antioksidanasa.

2.4.6.1. Testovi za određivanje ukupnog kapaciteta antioksidanasa

Testovi za određivanje ukupnog kapaciteta antioksidanasa uključuju: ukupni antioksidativni status (TAS), ukupni radikal hvatajući antioksidativni parametar (Total Radical-trapping antioxidant Parameter - TRAP) i gvožđe redukujući antioksidantni kapacitet (Ferric Reducing-Antioxidant Power - FRAP) spektrofotometrijske testove, kao i cikličnu voltametriju.

Ispitivanje antioksidativnog kapaciteta supstanci DPPH metodom (metoda hvatanja slobodnih DPPH radikala) je jedna od najčešće korišćenih metoda kojom se određuje sposobnost hvatanja slobodnih radikala. Ova brza i jednostavna metoda koristi relativno stabilni 2,2-difenil-pikrilhidrazil radikal, DPPH• radikal. Metoda se zasniva na redukciji alkoholnog rastvora DPPH radikala u prisustvu antioksidansa ili radikala ($R\cdot$) pri čemu dolazi do stvaranja neradikalnog oblika DPPH (DPPH-H). S obzirom da DPPH radikal apsorbuje na talasnoj dužini od 517 nm, njegovim pretvaranjem u neradikalni oblik, nakon reakcije s antioksidansom, dolazi do smanjenja apsorbanice. Smanjenje apsorbanice proporcionalno je aktivnosti upotrebljenog antioksidansa. Iz izmerenih vrednosti apsorbanice računa se procenat redukcije DPPH radikala.

Ispitivanje redukcione sposobnosti supstanci FRAP metodom je jednostavno, to je direktan test za određivanje redukcione sposobnosti antioksidansa. Ovom metodom se detektuju promene u apsorbanici uzorka na talasnoj dužini od 593 nm, a koje nastaju usled formiranja plavo obojenih

Fe²⁺-tripiridiltriazin proizvoda. Ovi proizvodi nastaju redukcijom bezbojnih Fe³⁺-jedinjenja usled otpuštanja elektrona od strane antioksidansa.

Specifičnija merenja antioksidanasa uključuju ona kojima se određuje *koncentracija redukovanog GSH i vitamina C*, koji predstavljaju verovatno dva najvažnija antioksidativna markera, budući da su sposobni da regenerišu druge antioksidanse do njihovog aktivnog stanja. Na taj način i promene u „mnogo više rangiranim” lipofilnim antioksidansima, kao što su vitamin E i koenzim Q, takođe mogu biti izražene merenjem GSH i vitamina C (Lykkesfeldt, 2003). Ipak, promene koncentracije vitamina E i koenzima Q takođe se određuju direktno, kao biomarkeri oksidativnog stresa. Unutarćelijska koncentracija GSH iznosi 2-8 mM, dok ga u plazmi ima zanemarljivo malo. Askorbata u krvnoj plazmi ima 20–50 μM a u ćelijama se njegova koncentracija izražava u mM. Specifične metode se zasnivaju na tačnoj hromatografiji - HPLC, a uključuju kvantifikaciju redoks parova GSH/GSH-disulfida (GSH/GSSG) i askorbat/dehidroaskorbinsku kiselinu za dalju kvantifikaciju redoks statusa, dok je jednostavnija i manje specifična primena spektrofotometrije. Glavni nedostatak ovog tipa analiza je veći rizik od autooksidacije posle uzorkovanja materijala, što vodi pogrešnoj proceni stepena oksidativnog stresa (Lykkesfeldt, 2002). Smanjen sadržaj antioksidanasa i smanjen redoks odnos GSH/GSSG ili askorbat/dehidroaskorbinske kiseline tumači se kao povećanje oksidativnog stresa.

Određivanje oksidativnog oštećenje obično je fokusirano na tri glavne vrste makromolekula: proteina, lipida i DNK.

2.4.6.2. Merenje oksidativnog oštećenja proteina

Zbog jednostavnosti, metoda kojom se detektuje oksidacija proteina je često korišćena kao metoda oksidativnog oštećenja. Oksidacija proteina se najčešće procenjuje preko tzv. *broja karbonilnih grupa*, koje nastaju kao rezultat nespecifične oksidacije aminokiselina slobodnim radikalima. To su brojni spektrofotometrijski testovi, od kojih je većina ograničene osetljivosti. Ukratko, plazma, serum, homogenat tkiva ili mikrozomalna frakcija reaguje sa 2,4-dinitrofenilhidrazinom, supstancom koja sa karbonilnim grupama formira hromogen sa visokim apsorptivitetom (Chevion i sar., 2000). Povećana apsorbanca na 370 nm se tumači kao indikator povećane oksidacije proteina. Postoje savremenije metode, ELISA (engl. *enzyme-linked*

immunosorbent assay) testovi (Buss i sar., 1997), imunohistohemijske metode (Smith i sar., 1998), Western blot imunoezeji kojim se određuje broj karbonilnih grupa nakon elektroforetskog razdvajanja proteina, 2-D gel elektroforeza/imunohemija (Yan i sar., 1998). *Kvantitativno određivanje specifičnih produkata oksidacije aminokiselina*, zahteva skupu opremu i njome se mogu kvantifikovati samo neke od mogućih brojnih oštećenja. U uslovima povećane proizvodnje NO dolazi do nitrovanja slobodnog tirozina i tirozinskih ostatka proteina.

Prisustvo 3-nitrotirozina u molekulu proteina remeti njegovu funkciju, može da inhibira vezivanje supstrata za enzim ili da naruši protein-protein interakcije. Povećana količina nitrozilovanog tirozina i proteina pronađena je tokom razvoja inflamatornih, infektivnih i degenerativnih procesa, kada dolazi do značajnog povećanja proizvodnje NO i razvoja oksidativnog stresa (Ischiropoulos, 1998).

3-nitrotirozina se može odrediti spektrofotometrijski, i ima karakterističan spektar u alkalnoj sredini sa maksimumom na 428 nm. Molarni apsorpcioni koeficijent za ovaj derivat na istoj talasnoj dužini je $4\ 200\ \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ (Riorden i Vallee, 1972). Kombinacija 2D-PAGE, western blot i masene spektrometrije je tipična strategija za identifikaciju 3-nitrotirozinski modifikovanih proteina. Ditirozina se može meriti fluorimetrijski u baznoj sredini (pH 9) pojavom karakterističnog pika na 410 nm (MacMillan-Crow i sar., 1998).

2.4.6.3. Merenje oksidativnog oštećenja lipida

Oksidacija lipida se može odrediti na više načina, ali se ističu dve grupe testova, *određivanje malondialdehida (MDA)* i *izoprostan testovi*. Često se, kao mera peroksidacije lipida koristi MDA i 4-hidroksi-nonenal (4-HNE), kao krajnji produkt njihove oksidacije. Budući da ovaj test uključuje derivatizaciju MDA, sa tiobarbiturnom kiselinom, posle čega sledi spektrofotometrijsko određivanje (Esterbauer i Zollner, 1989), često se naziva testom tiobarbiturne reaktivne vrste (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*, TBARS). Testovi za MDA su kritikovani zbog niske specifičnosti i formiranja artefakta, s obzirom da se meri samo deo *in vivo* nastalog MDA. Pored toga, postupak derivatizacije TBARS, sam po sebi, vodi stvaranju nekoliko MDA nesrodnih UV apsorbujućih i fluorescirajućih vrsta. Šta više, MDA

može biti stvoren *in vivo* na više načina, uključujući i oksidaciju lipida. Uprkos ovim činjenicama, ova metoda ostaje kao jedan od najkorisnijih i najčešće upotrebljivanih za merenje oksidativnog oštećenja, uglavnom zbog jednostavnosti. Mnogo osetljiviji postupak (TBARS) kvantifikuje samo izvorni MDA-TBA₂ proizvod, korišćenjem HPLC ili merenjem MDA, direktno bez derivatizacije (Lykkesfeldt, 2001). U stvari, MDA test se pokazao kao jedan od boljih pokazatelja oksidativnog oštećenja i često odlično korelira sa drugim markerima, kao što su izoprostani, koji se smatraju najpouzdanijim markerom oksidacije lipida (Morrow, 2000). Međutim, za određivanje izoprostana neophodna je oprema za masenu spektrometriju, što limitira korišćenje izoprostana kao skrining markera, ali su od nedavno dostupni i komercijalni *ELISA* testovi za izoprostan.

2.5. SUPEROKSID DIZMUTAZE

Superoxid dizmutaze (SOD, EC 1.15.1.1) su metalo-enzimi koji igraju ključnu ulogu u metabolizmu O₂^{•-}, jer sprečavaju inicijaciju lančane reakcije oksidacije, koju ovaj anjon pokreće, a koja za krajnji ishod ima značajna oštećenja biomolekula (Voet i Voet, 1995; Miller, 2004). Na taj način, SOD sprečavaju formiranje niza vrlo štetnih reaktivnih kiseoničnih vrsta, u koje spadaju vodonik peroksid, peroksinitrati (ONO₂⁻) i hidroksil radikal (HO[•]) (Miller, 2012). Aerobni metabolizam obezbeđuje 18 puta više energije po molekulu glukoze u odnosu na anaerobnu glikolizu, čime je omogućeno razvijanje velikih i složenih organizama tokom evolucije (Michiels, 1994). Prema tome, sposobnost da se koristi O₂ predstavlja presudnu evolucijsku prednost. Danas, međutim, čak i uz prisustvo višestrukih SOD i brojnih potpornih antioksidativnih sistema, naši životi su i dalje limitirani zbog neumitne štete koju izazivaju ROS/RNS, nastali kao sporedni, neželjeni proizvodi u toku aerobnih metaboličkih procesa (Miller, 2012).

Sposobnost da se preživi u atmosferi sa O₂ je ograničavajući kriterijum selekcije, tako da je vrlo malo organizama, koji ne sadrže SOD, uspelo da preživi tranziciju od redukujuće do oksidišuće okoline, koju je pre 2,4 milijarde godina izazvala evolucija oksigene fotosinteze

(Blakenship, 2010). Do razvoja SOD-a dolazi u tri različita navrata pod pritiskom evolucije da se razvije zaštita od superoksida. Jedan od ovih enzima je toliko prastar i značajan da ga možemo naći u svim oblicima života, što pokazuje da je nastao još pre diferencijacije eubakterija iz *archaea*. To znači da je enzim, koji nas održava mladim, bio prisutan tokom većeg dela evolucije života (Miller, 2012).

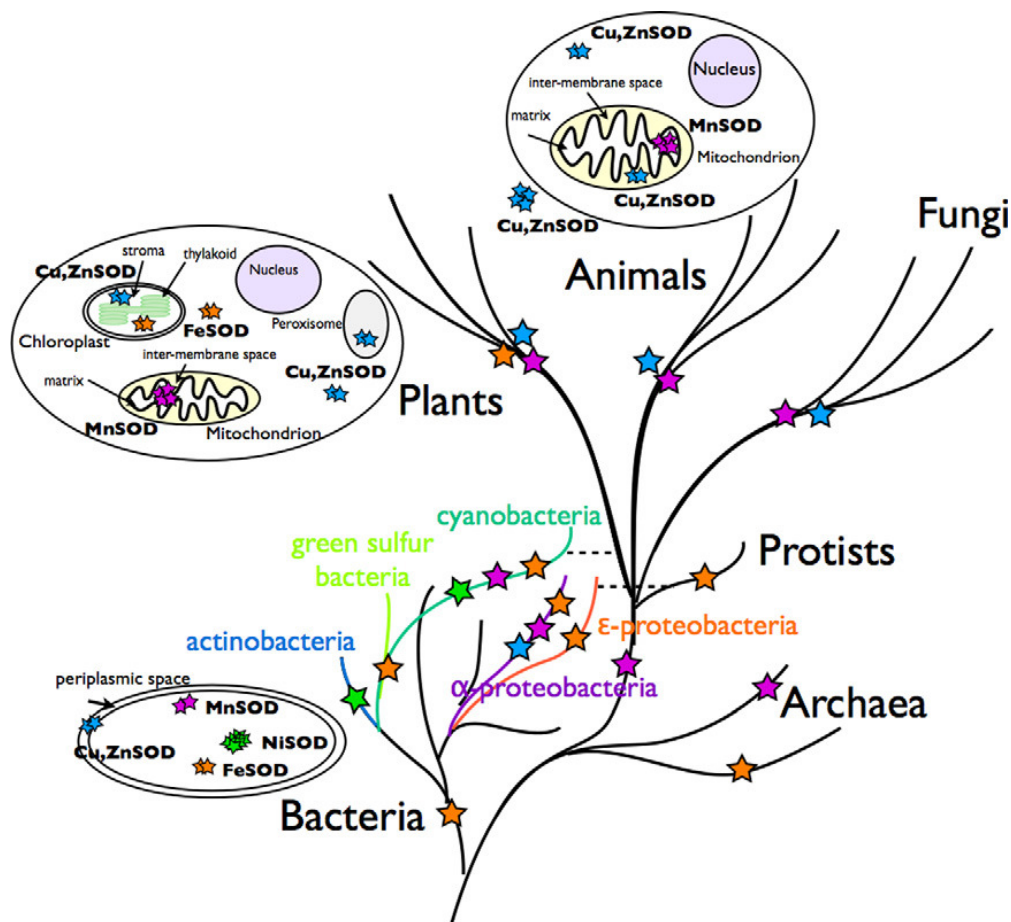
Najprimitivniji oblici SOD-a koriste Fe, što je u skladu sa shvatanjem da u redukujućoj sredini, kakva se smatra da je ona bila u vreme nastanka života, Fe preovlađuje i da je bilo lako dostupno. Međutim, savremeniji organizmi koriste jednu verziju ovog enzima kome je radi aktivnosti potrebno prisustvo Mn, što je u skladu sa činjenicom da se sa rastom nivoa O₂ u atmosferi bio-dostupnost Fe smanjuje, a njegova toksičnost povećava. To znači da su promene u neorganskom sastavu okoline izgleda podstakle promene u organskim sistemima, a time i evoluciju SOD-a (Shema 6) (Miller, 2003).

Ime SOD označava ne jedan, već tri različita enzima. Sva tri su stekla ime zahvaljujući svojoj sposobnosti da konvertuju dva molekula superoksid anjon radikala, pri čemu nastaje jedan molekul kisenika (dioksigen) i jedan molekul vodonik peroksida, uz utrošak dva ekvivalenta H⁺. Jedna od pripadnika SOD familije koristi Ni jon, a druga, Cu jon zajedno sa jonom Zn, da bi mogle da izvrše gore pomenutu reakciju neutralizacije superoksid anjona. Treća familija obuhvata enzime koji koriste Mn ili Fe, kao i enzime koji mogu da koriste oba ova metala kao deo katalitičkog centra. Različite familije SOD-a razlikuju se ne samo po metalnom jonu koji pospešuje aktivnost, već i po proteinskom sastavu i organizaciji (Shema 8 i 9) (Potter i Valentine, 2003; Wuerges i sar., 2004; Herbst i sar., 2009).

2.5.1. Otkriće superoksid dizmutaze

Hipoteza da se kiseonični radikali formiraju tokom aerobnog metabolizma, i da imaju toksični efekat na žive sisteme, je daleko od nove. Četrdesetih godina prošlog veka, Leonor Michaelis (najviše poznat kao osnivač enzimske kinetike) pretpostavio je da se u toku respiracije dešava još jedan elektonski događaj. Takođe, vezu između dejstva radijacije, tokom koje se stvaraju ROS, i mehanizma hiperbarične toksičnosti kiseonika, bila je dobro uočena još od strane radijacionih biologa posle II Svetskog rata. Međutim, prelomni trenutak koji označava početak

modernog doba u proučavanju toksičnosti kiseonika bio je otkriće enzima superoksid dizmutaze, od strane McCord-a i Fridovich-a 1969. Ovo otkriće imalo je duboke posledice na razvoj biohemije i toksikologije, koje je teško bilo predvideti na samom početku. To je dobar primer uticaja neočekivanog rezultata istraživanja, vođenog jednostavnom radoznalošću istraživača.

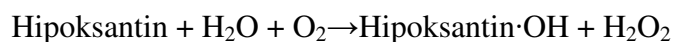


Shema 6. Distribucija SOD enzima u ćelijama i evolutivnom stablu života. Različite boje ukazuju na različite familije SOD enzima: narandžasta za Fe SOD, ljubičasta za Mn SOD, plava za Cu,Zn SOD i zelena za Ni SOD. Broj zvezda ukazuje na broj monomernih jedinica koje obrazuju enzim (prikazano samo u ćelijama, ali ne i u evolutivnom stablu života). (Ljubaznošću Dr Anne-Francis Miller)

Priča o superoksid dizmutazi počinje sa radovima Horecker-a i Heppel-a (1949) na *ksantinoksidazi*, kasnih četrdesetih godina prošlog veka. Purinski nukleozidi, adenzin i guanozin, katabolišu se metaboličkim putevima koji se prepliću. Adenzin se metaboliše do hipoksantina a guanozin do ksantina. Obe purinske baze metabolišu se do mokraćne kiseline: hipoksantin u dva

koraka, a ksantin u jednom. Samo jedan enzim, ksantin-oksidaza, katalizuje oksidaciju hipoksantina do ksantina, a zatim ksantina do mokračne kiseline.

Ksantin oksidaza je flavoenzim koji sadrži molibden i 4 gvožđe-sulfat centra. Transformacija hipoksantina do ksantina je stehiometrijska hidroksilacija, nakon koje sledi tautomerizacija produkta od enola do keto oblika, po jednačini koja izgleda ovako:



I zaista, vodonik-peroksid se stvara u ksantin/ksantin-oksidaza/O₂ ili hipoksantin/ksantin oksidaza/O₂ sistemima. Osim kiseonika, do produkcije vodonik-peroksida mogu dovesti i drugi oksidanti, kao što su: NADP⁺ (ksantin dehidrogenazna aktivnost) i organska nitro jedinjenja. Ovi alternativni oksidanti se u reakciji, naravno, redukuju. Tokom 1949, Horecker i Heppel, su istraživali sposobnost ksantin/ksantin oksidaza sistema da redukuju ovakve alternativne supstrate, i otkrili su da se gvožđe u oksidisanom citohromu c redukuje iz feri u fero oblik. Ali feri citohrom c nije mogao da zameni kiseonik u reakciji, tako da redukcija nije mogla biti prosta redoks reakcija između citohroma c i ksantina. Očigledno, ksantin/ksantin oksidaza sistem je stvarao jedan neidentifikovani redukujući agens, koji je bio sposoban da redukuje citohrom c. Postavljeno je pitanje, šta bi to moglo biti? Smatrali su da bi jedno od mogućih objašnjenja moglo biti da je reduktant bio produkt redukcije kiseonika. Kaplan i saradnici su proučavali ovaj problem i pretpostavili da „enzimski-vezan H₂O₂ može da deluje kao reduktant“. Naravno, to je bilo u suprotnosti sa uobičajenim hemijskim pravilima, po kojima bi vodonik-peroksid bio redukujući agens.

Ranih šezdesetih godina prošlog veka Irwin Fridovich sa Duke Univeziteta iz Severne Karoline (SAD), obratio je pažnju na ovaj nerešen problem. Naime, njegovu pažnju su privukli kontradiktorni izveštaji u radovima o sposobnosti citohroma c da prihvati elektrone poreklom od ksantin/ksantin oksidaza sistema. Fridovich je pretpostavio da neponovljivost rezultata može biti uslovljena razlikama u čistoći preparata citohroma c koji su koristile različite istraživačke grupe. On je pretpostavio da je u nekim uzorcima prisutan inhibitor reakcije. I zaista, otkriveno je da mioglobin i karbo-anhidraza (eritrocitni proteini, koji mogu u znatnoj meri da kontaminiraju uzorke citohroma c poreklom iz srca konja) inhibiraju redukciju citohroma c. Kako bi se mogla objasniti sposobnost ovih proteina da deluju kao inhibitori? Možda oni mogu da inhibiraju

interakciju citohroma c sa ksantin-oksidadom, vezivanjem za nju, ali nije bilo dokaza da takva protein-protein interakcija postoji. I kako je moguće da feri hemo-grupa citohroma c, smeštena duboko unutar proteina, može da napravi kontakt sa aktivnom mestom ksantin oksidaze? Sva ova zapažanja predstavljala su zagonetku!

Fridovich i Handler (1962) su prepostavili da produkt ksantin/ksantin oksidaza/O₂ sistema, koji posreduje redukciju citohroma c, može biti produkt redukcije sa jednim elektronom molekuskog kiseonik (O₂), i da je to superoksid-anjon radikal pre nego vodonik-peroksid. Za superoksid-anjon radikal se znalo da je produkt radiolize aerisanog vodenog rastvora. Ali se činila ekstravagantnom ideja da enzimskom reakcijom može nastati superoksid-anjon radikal, nestabilan slobodni radikal povezan sa procesima radiolize. Fridovich i Handler (1962) su postavili hipotezu da je enzimski posredovano stvaranje superoksida uključeno u ovu pojavu.

Joe McCord i Irwin Fridovich (1968) su počeli da proučavaju vezivanje karbon-anhidraze sa ksantin-oksidadom, misleći da ovo vezivanje mora biti uzrok inhibitornog dejstva ksantin oksidaze. Kada ovi pokušaji nisu urodili plodom, shvatili su da „stvarni“ inhibitor nije ni mioglobin ni karbo-anhidraza, već pre neki drugi eritrocitni protein, koji kontaminira sve uzorke, uključujući citohrom c. Test za ovaj „misteriozni“ inhibitor, naravno, bio je pri ruci: inhibicija ksantin/ksantin-oksidadom katalizovane redukcije citohroma c, pa su se pomenuti autori vratili nazad na originalni sirovi uzorak (eritrocite) i prečistili ih. Dokazano je da se inhibitorni faktor može razdvojiti od ostalih proteina hromatografski. Za ovu „aktivnost“ dokazano je da ne pripada proteinima za koje se sumnjalo da se vezuju za ksantin-oksidadu, već da potiče od materije prisutne u tragovima, ali izuzetne moći. Traženi protein bio je značajno otporan na inaktivaciju i na denaturaciju organskim rastvaračima (hloroform-etanol) kojima su se odstranjivali neželjeni proteini u sirovom uzorku preparata. Precipitacija sa hladnim acetonom, a zatim jonoizmenjivačka hromatografija, dovele su do otkrića plavo-zelenog enzim - proteina, koga su nazvali *superoksid-dizmutaza* („dizmutacija“ se odnosi na redox reakciju jedinjenja sa samim sobom). Oni su označili enzim kao „hemokuprein“, bakar-sadržavajući protein, nepoznate funkcije, koji je već bio izolovan iz eritrocita 30 godina ranije (McCord i Fridovich, 1969). I zaista, protein je izolovan, nezavisno i od strane drugih istraživača, iz jetre i mozga.

Identifikacija enzimske aktivnosti „hemokupreina“ kao superoksid-dizmutaze, bila je, naravno, ne kraj već početak još uvek aktuelne „romanse“ između oksidanata/antioksidanata i

biohemije. Ovo je neobičan primer u biohemiji, zbog toga, što ne samo da je otkriven vrlo bitan enzim, već i zbog istovremenog prepoznavanja biološkog značaja njegovog supstrata, superoksid-anjon radikala. U stvari, ovo je bio prvi dokaz da hemija slobodnih radikala ima važnu ulogu u biohemiji, dokazujući Michaelis-ovo ranije predviđanje.

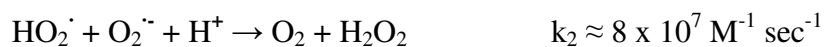
2.5.2. Izvori superoksid-anjon radikala i mehanizmi njegovog delovanja

2.5.2.1. Hemijski izvori superoksid anjon radikala

Da bi neki test mogao da se izvede neophodno je da postoji supstrat. Kalijum-superoksid (KO_2) je dugo poznat kao čvrsto jedinjenje, koje nastaje sagorevanjem kalijuma na visokim temperaturama. Njegovim rastvaranjem u vodi dobijaju se vodonik-peroksid i kiseonik, prema sledećoj jednačini, koju je determinisao Harcourt, još 1861. godine ($2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$).

Otkriće (Neuman, 1934) da KO_2 poseduje paramagnetna svojstva (tj. poseduje magnetni moment), ukazivalo je da njegova struktura treba da se predstavi kao so , K^+ i O_2^- .

Kinetika razlaganja superoksid-anjon radikala ispitivana je radiolizom vodenog rastvora, ranih 1960 (Schwartz, 1981). Tako je ustanovljeno da je ona zavisna od pH vrednosti (to je posledica svojstva konjugovane kiseline, perhidroksil-radikala, čija se jačina može uporediti sa jačinom koju poseduje sirćetna kiselina) ($\text{HO}_2^- \leftrightarrow \text{O}_2^- + \text{H}^+ \quad \text{pK}_a = 4,8$). Usled elektrostatičkog odbijanja anjona, reakcija dizmutacije je vrlo spora u početku. Reakcija se odvija brže pri pKa .



Stabilan rastvor koji sadrži superoksid-anjon može se pripremiti u anhidridnim uslovima, s obzirom da reakcija dizmutacije zahteva H^+ . McCord i Fridovich (1969) su koristili elektrolitičku

redukciju O₂ u dimetilformamidu. Potom je rastvor dimetilformamida uveden u ispitivani rastvor. Danas je uobičajeno da se superoksid-anjon generiše u enzimskim testovima (ksantin/ksantin-oksidadom) ili fotohemijским procesima. Prosvetljavanje različitih boja (riboflavin, metilensko plavo i sl.) u prisustvu tetrametiletildiamin (TEMED) generiše superoksid-anjon radikal. Mehanizam ovog procesa verovatno uključuje fotoekscitaciju boje, transfer elektrona od TEMED, i zatim redukciju kiseonika redukovanom bojom. Riboflavin i TEMED, takođe, mogu da se koriste kao sistem za generaciju radikala.

2.5.2.2. Biološki izvori superoksid-anjon radikala

Da li se superoksid formira u biološkim sistemima? Prisustvo enzima sposobnog da deluje na ovaj radikal vodi zaključku da supstrat takođe mora biti prisutan. Direktni dokaz za formiranje superoksida teže je dobiti, s obzirom na njegov vrlo kratak poluživot, posebno u prisustvu enzima. Ipak, treba reći da postoje jasni dokazi o stvaranju superoksida u biološkim sistemima.

1. Kada se mikrozomi ili membrane mitohondrija izlože dejstvu kiseonika, u prisustvu izvora elektrona u obliku NAD(P)H (Nishikawa i sar., 2000; Gonzalez, 2005; Ceriello i sar., 2009). Ovakvo stvaranje superoksida može se dokazati tehnikama kao što su elektron-paramagnetska rezonanca (EPR), spin-trapping-om i redukcijom citohroma c (Spasojević, 2011).
2. Biljni hloroplasti sakupljaju sunčevu energiju u cilju stvaranja NADPH redukujućih ekvivalenta, koji se onda koriste za reduktivnu sintezu ugljenih hidrata od ugljen-dioksida. Asada i sar., (1974) su dokazali da hloroplasti generišu superoksid anjon pri izlaganju svetlosti, očigledno autooksidacijom (oksidacija molekularnog kiseonika) komponenti fotosistema I, uključujući i moćan reduktant feredoksin (Asada, 1992; Pilon i sar., 2011).
3. „Oksidativni prasak“ neutrofila i makrofaga je specijalizovani enzimski sistem za generaciju superoksida i drugih reaktivnih kiseoničnih vrsta, u cilju uništavanja stranih ćelija (npr. bakterija, parazita, virusa) (Hyslop i sar., 1995; Schwarz, 1996; Dimitrijević i sar., 2012).

4. Agensi sa sposobnošću redoks-kruženja su hemijska jedinjenja koja podležu enzimskoj redukciji jednim-elektronom, tokom koje nastaje prolazni radikal. Posledična reoksidacija ovog radikala kiseonikom, generiše $O_2^{\cdot-}$. Reaktivne kiseonične vrste su primarno odgovorne za toksičnost redoks-kružećih agenasa (Guengerich, 2008). Dobro poznati primer agenasa sa ovakvim svojstvima su parakvat, naftohinoni, kao i juglon (poreklom iz oraha).

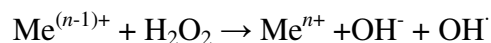
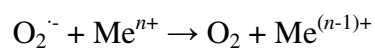
2.5.3. Mehanizam toksičnosti superoksid anjon radikala

O toksičnom uticaju superoksid-anjon radikala na žive sisteme najbolje govori činjenica da mutanti voćne mušice (mutacije koje dovode do zamene određenih aminokiselina drugim – lizina-96 sa serinom-96) imaju za 50% manju aktivnost superoksid dismutaze (Staveley i sar., 1991; Orr i Sohal, 1994). Ovi mutanti imaju, zbog toga, kraći životni vek. Takođe, inhibicija SOD akonitazom i posledice koje iz toga proizilaze ukazuje na toksičnost superoksid-anjon radikala. Ali još ostaju sporna pitanja: Zašto je superoksid toksičan? Koja je hemijska osnova uočenih štetnih biohemijskih efekata?

Interesantno je to što superoksid-anjon nije posebno reaktivan. Superoksid anjon je kao i većina drugih reaktivnih vrsta nestabilan i njegov poluživot iznosi svega nekoliko minuta. Međutim, promene koje on izaziva reagujući sa biomolekulima mogu trajati godinama, tako da je u novije vreme u nauku uveden pojam „metaboličke memorije“, koji upravo objašnjava dugoročne, štetne biohemijske efekte koje ovaj anjon izaziva. Naime, unutar ćelije postoje brojni biomolekuli (nukleinske kiseline, proteini, lipidi/lipoproteini) na koje mogu delovati superoksid anjon radikal i druge reaktivne vrste pri čemu nastaju nove reaktivne vrste sa dužim poluživotom. Jednom izmenjeni, dejstvom ROS/RNS, ovi target biomolekuli ispoljavaju izmenjenu funkciju u ćeliji tokom dužeg vremenskog perioda (Ceriello i sar., 2009).

Superoksid anjon radikal može da deluje kao redukujući ili oksidujuć agent (oksidacija epinefrina, askorbata, kateholamina i dr.) a može da podstakne i lančanu reakciju autooksidacije (Voet and Voet, 1995). Oksidacija fero gvožđa (4Fe-4S) u katalitičkom centru enzima α,β -dihidroksi dehidratazi i akonitazi dovodi do gubitka funkcije ovih enzima. Kao nukleofil, superoksid reaguje sa alkil-halidima, pri čemu nastaju peroksidi, a u reakciji sa disulfidima

formira sulfonsku i sulfinsku kiselinu. Reakcije ovog tipa ne podržavaju teoriju da je superoksid hemijski agens koji dovodi do oksidativnog stresa. S druge strane, izvori superoksida su takođe i izvori vodonik-peroksida, koji može da difunduje kroz ćelijske membrane (Ceriello i sar., 2009), preko dizmutacije superoksid-anjon radikala, i više pažnje je privukla upravo interakcija ovih redukovanih oblika kiseonika. Prema Haber-Weiss reakciji, u kojoj redukcijom sa jednim elektronom superoksid anjon radikala, formira vrlo reaktivan hidroksil radikal ($O_2^{\cdot -} + H_2O_2 + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O + OH^{\cdot}$). Međutim, pulsna radioliza je pokazala da se ova navodna reakcija ne dešava u znatnom stepenu. Druga mogućnost je da se odigra metalom – katalizovana redukcija vodonik peroksida, po jednačini:



U ovoj tzv. metal-katalizovanoj Haber-Weiss-ovoj reakciji, metalni jon (npr. Fe^{2+}) redukuje vodonik peroksid, pri čemu je ovde superoksid redukujući agens. U stvari, u drugom delu ove reakcije, redukcija vodonik-peroksida fero jonom je od posebnog značaja. Davne 1893., engleski hemičar Henry Fenton (Joseph i Mannervik, 2006) je dokazao da fero gvožđe sa vodonik peroksidom oksiduje tartarnu kiselinu do dihidroksimaleinske kiseline. Fenton je kasnije proširio primenu ovog oksidujućeg sistema i razvio nekoliko korisnih postupaka za sintezu ugljenih hidrata. Moguće učešće hidroksilnog radikala u mehanizmu Fentonove reakcije po prvi put je uočena 40-ih godina prošlog veka. Biohemijski značaj produkcije hidroksilnog radikala tzv. Fentonovom hemijskom reakcijom je sporna, s obzirom da fero jon verovatno nije prisutan u velikoj koncentraciji u živim sistemima. Međutim, ne treba zaboraviti da je superoksid-anjon u stanju da dovede do oslobađanja fero jona iz (4Fe-4S) centra nekih enzima, što ne isključuje mogućnost gore navedenog fenomena (Liochev i Fridovich, 1994).

Alternativna hipoteza o ulozi superoksid-dismutaze je predložena od strane Christine Winterbourn (1993). Po ovoj hipotezi, kiseonik deluje kao krajnji skupljač većine ćelijskih radikala, preko delovanja redukovanog glutaciona (GSH). GSH uklanja radikale redukcijom ($R^{\cdot} + GSH \rightarrow RH + GS^{\cdot}$). Proizvod ove reakcije, tiol-radikal, može sam po sebi da nastavi da oštećuje biomolekule, ali se brzo uklanja drugim molekulom glutacion anjona [$GS^{\cdot} + GS^{\cdot} \rightarrow GSSG^{\cdot}$].

Ova reakcija je izvodljiva, s obzirom da pKa glutaciona (8,8) dozvoljava da velika koncentracija anjona postoji pri neutralnoj pH vrednosti, i pulsna radioliza je pokazala da je ova reakcija brza.

S druge strane, GSSG^- brzo i ireverzibilno, redukuje kiseonik do superoksida [$(\text{GSSG})^- + \text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + \text{O}_2^-$].

Glutation-disulfid se redukuje sa NADPH i flavoenzim glutation-reduktazom ($\text{GSSG} + \text{NADPH} \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$), dok se superoksid detoksifikuje superoksid dizmutazom i katalazama ($2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$; $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). Na osnovu ovoga, može se zaključiti da superoksid-anjon radikal predstavlja neku vrstu kolektivnog jona (sudopere-slivnika) za većinu, ako ne i za sve ćelijske radikale, s obzirom da se svi radikali na kraju prevode u njega. Kombinovanim sadejstvom SOD i katalaze razlože se slobodni radikali. Na ovaj način, može se reći da ćelija koristi glutation kao opšti molekul za „popravku“ svih oštećenja izazvanih radikalima, i da se svi putevi popravke završavaju stvaranjem superoksid-anjon radikala (Winterbourn, 1993).

U odsustvu superoksid-dismutaze, stvoreni superoksid-anjon radikal dovodi ćeliju u stanje oksidativnog stresa. Sposobnost superoksid-anjon radikala da pokrene lančanu reakciju stvaranja slobodnih radikala znači da jedan molekul superoksida može da izazove stvaranje velikog broja molekula vodonik-peroksida (Voet and Voet, 1995).

2.5.4. Struktura superoksid dizmutaze, njeni oblici i distribucija

Na osnovu vrste metala prisutnom u katalitičkom centru razlikuju se tri klase superoksid-dismutaza: Cu,Zn SOD, Mn ili Fe SOD i Ni SOD. Mada se one potpuno razlikuju po svojoj proteinskoj strukturi i vrsti metalnog jona koji sadrže, njihova evolucija u cilju borbe sa superoksid anjon radikalom, dovela je do toga imaju i neke zajedničke ali i različite odlike (Miller, 2004). Najpre se mislilo da je Cu,Zn-SOD enzim isključivo prisutan u eukariotskim ćelijama, a onda je njegovo prisustvo dokazano i u bakterijskim vrstama (*Caulobacter crescentus*, *Brucella abortus*, *Legionella pneumophila*, *E. coli*).

Mn i Fe SOD su homologe, kako u pogledu aminokiselinske sekvence tako i strukture, a i vode poreklo od istog pretka. **Mn SOD** je pronađena u bakterijama i mitohondrijama eukariotskih

ćelija. Ovakva distribucija podržava trenutno, opšte prihvaćenu, teoriju da mitohondrije vode poreklo od prokariotskih ćelija koje su „ušle“ u progenitorsku eukariotsku ćeliju i sa njom uspostavile simbiotske odnose. *Fe SOD* je pronađena u bakterijama i u nekoliko familija viših biljaka, kao što je *Ginko biloba*. Kod većine drugih zelenih biljaka, hloroplasti sadrže Cu,Zn SOD a mitohondrije Mn SOD (Pilon i sar., 2011).

Praktično svi organizmi tolerantni prema kiseoniku poseduju neki od oblika SOD, što je i očekivano ako se uzme u obzir toksičnost redukovanih vrsta kiseonika koje su neizbežna posledica aerobnog života. Međutim, neke uočene nelogičnosti, treba tek rasvetliti. Na primer, bakterija *Lactobacillus plantarum* je izgleda zamenila akumulaciju visokih doza Mn(II), koji ima vrlo slabu superoksid-dismutaznu aktivnost, sintezom SOD enzima. Bez obzira na ovu činjenicu, jaka veza između posedovanja SOD i aerobnog života predstavlja jedan od najjačih dokaza za ulogu superoksida u medijaciji toksičnog efekta kiseonika (Abreu i Cabelli, 2010).

2.5.4.1. Cu,Zn-superoksid dizmutaza (SOD 1)

Eukariotska Cu,Zn-SOD može da se izdvoji iz uzoraka tretmanom sa etanolom/hloroformom, koji danaturiše i taloži hemoglobin i druge neželjene proteine. Cu,Zn-SOD je rastvorljiva u organskim rastvaračima (dodavanje acetona omogućava taloženje enzima). Međutim, i neki drugi enzimi „preživljavaju“ ovakav protokol (McCord i Fridovich, 1969). U cilju daljeg prečišćavanja se koriste jonoizmenjivačka i gel-filtraciona hromatografija.

Ogledi u kojima je odstranjivan metal i ponovo rekonstituisan pokazali su da je bakarni jon esencijalan za aktivnost SOD. I zaista, vodeni Cu(II) je izuzetno efikasan katalizator dismutacije superoksida, ali slobodan bakarni jon verovatno ne može da postoji u ćeliji. Budući da SOD enzim, bez Zn, ima smanjenu ali još uvek značajnu aktivnost, jasno je da jon bakra podleže enzimskom redoks-kruženju (iz Cu^{2+} u Cu^{+} stanje), dok jon cinka ima sekundarnu ulogu u procesu dizmutacije superoksida (Culotta i sar., 2006).

Uz pomoć x-zraka, određena je kristalografska struktura SOD poreklom iz eritrocita goveda i rekombinantne humane SOD, eksprimirane u ćeliji kvasca (Desideri i sar., 1988; Culotta i sar., 2006). Enzimi su homodimeri koji se sastoje iz 151 (goveđi) i 153 (humana) amino kiselinskih rezidua po subjedinici. Svaka subjedinica sadrži po jedan jon Cu i Zn. Svaka od subjedinica ima β -strukturu, sačinjenu od 8 antiparalelnih β -lanaca. Aktivno mesto enzima nalazi se sa spoljne strane strukture i sačinjeno je od aminokiselina smeštenih u petljama koje povezuju β -lance. Aktivno mesto je smešteno na dnu kanala, i formirano je kao molekularni levak, koji vodi ka Cu jonu koji se nalazi na dnu kanala. Enzim je tako strukturno formiran da deluje kao neka vrsta molekularnog „lasa“ za uvlačenje superoksidnih anjona. Mada je neto naelektrisanje enzima, pri fiziološkim vrednostima pH negativno (pI oko 5,0), aktivno mesto se nalazi u regiji sa visokim elektrostatičkim potencijalom, što je rezultat dejstva lizina i arginina i metalnih jona.

Tainer i saradnici (1983) su ukazali da ovo „elektrostatičko snižavanje nivoa podražljivosti“ vezivanjem superoksidnog anjona doprinosi neobično visokoj katalitičkoj aktivnosti enzima. Konstanta brzine drugog reda, za reakciju superoksida sa enzimom, je kontrolisana limitom difuzije. Drugim rečima, difuzija superoksida ograničava brzinu reakcije koja je drugog reda. Ovo znači da je većina susreta (sudara) sa supstratom produktivna, mada aktivno mesto zauzima samo deo zapremine površini proteina izloženoj rastvaraču. Očigledno, negativni naboj na površini sprečava neproduktive susrete, dok pozitivni potencijal u kanalu uvlači supstrat. Međutim, teško je potpuno razumeti elektrostatičko okruženje proteina, s obzirom da treba uzeti u obzir interakcije sa rastvaračem i suprotnih jona, koji se ne mogu registrovati (zapaziti) iz x-ray kristalografske strukture (Desideri i sar., 1992; Abreu i Cabelli, 2010; Miller, 2012).

Bakarni jon je koordinativno vezan u izobličenoj kvadratnoj-ravni za N-atom imidazolovog bočnog lanca četiri različite rezidue histidina i dostupan je rastvaraču. Jon cinka (Zn^{2+}) je smešten duboko unutar proteina, te je nedostupan rastvaraču i približno je u tetraedarskoj vezi sa N-atomom imidazolovog lanca tri histidina i jednim atomom kiseonika iz aspartata. Karakteristično je da jedan molekul histidina povezuje jone bakra i cinka, preko azotovog atoma koji je vezan za svaki od jona. Nije poznato da i jedan drugi protein ima takav razmeštaj metalnih jona. Ovakva veza zahteva da imidazolov prsten izgubi oba NH-protona, da bi nastao imidazolat anjon, što normalno zahteva ekstremno bazne pH vrednosti. Vezivanje prvog jona metala mora da značajno

smanjuje pK za drugi n atom, ubrzavajući vezivanje drugog. Ovakvo uređenje enzima je verovatno od strukturnog i katalitičkog značaja, mada ne treba zaboraviti da jon cinka nije neophodan za aktivnost (Desideri i sar., 1992; Miller, 2012).

2.5.4.1.1. Predloženi mehanizam katalitičkog dejstva Cu,Zn-SOD

Značaj arginina-141 je otkriven zahvaljujući eksperimentima sa mutiranim organizmima (Golenser i sar., 1998). Naime, zamena arginina lizinom dovodi do redukcije enzimske aktivnosti, dok zamena arginina neutralnom aminokiselinom dovodi do potpunog gubitka aktivnosti enzima. Vezivanje superoksid-anjona za Cu^{2+} je u skladu sa geometrijom substratnog kanala, kao što je već opisano. U prvoj polovini reakcije, superoksid redukuje Cu^{2+} iz katalitičkog centra u Cu^+ . Pri tome se raskida koordinativna veza sa imidazolil anjonom. Rezidua histidina rotira, dozvoljavajući Cu^+ da dobije povoljniju geometriju i da visoko bazni imidazolil anjon, oslobođen veze od kupri jona, oduzme jedan proton od rastvarača. U drugoj polovini reakcije, drugi jon superoksida vezuje se za bakarni jon, onda ga reoksidira i oduzima proton imidazolu, vraćajući enzim u nativno stanje. Nascentni HO_2^- anjon se protoniše rastvorom, pri čemu nastaje vodonik-peroksid (Desideri i sar., 1988; Desideri i sar. 1992).

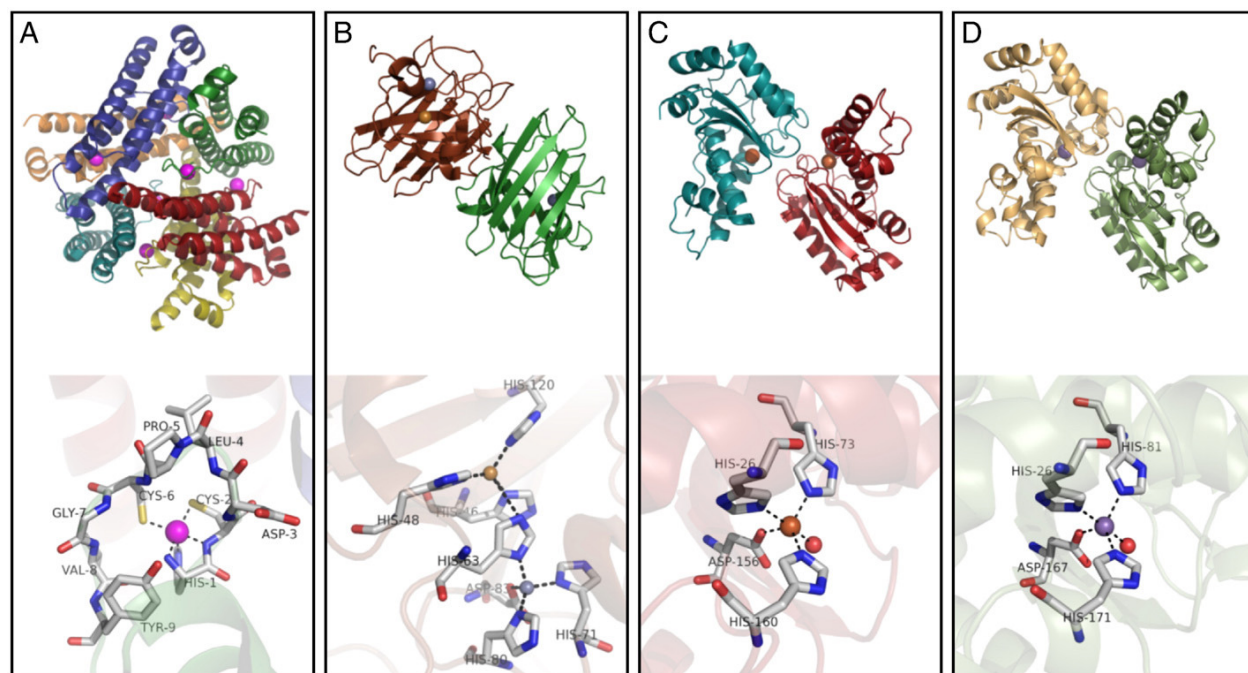
U krvnoj plazmi sisara je (1982) otkriveno prisustvo još jedne Cu,Zn-SOD. Ona je označena kao *ekstracelularna SOD*. Ovaj enzim je homotetramer, čija svaka subjedinica sadrži po jedan jon Cu i Zn u aktivnom centru, koji je verovatno organizovan slično kao kod citosolne SOD. Međutim, aminokiselinska sekvenca ova dva enzima je vrlo različita i antitela protiv jedne ne reaguju sa antitelima protiv druge (antigenski se razlikuju).

2.5.4.2. Mn- i Fe- superoksid dizmutaze

Ovi enzimi su obično dimeri, mada mogu biti i tetrameri. Njihove subjedinice imaju po oko 190 aminokiselina; i svaka sadrži jedan metalni jon. Budući da Mn- i Fe- SOD imaju veoma

sličnu strukturu, verovatno potiču od istog prekursora. Njihova tercijarna struktura se razlikuje od Cu,Zn-SOD. Svaka subjedinica se sastoji od dva domena, jednog koji ima α -helikoidnu strukturu i drugog koji ima i α i β strukturu. Mn(III) jon u oksidisanom enzimu je u gotovo trigonalnoj bipiramidalnoj vezi sa tri histidina, jednim aspartatom i jednim molekulom vode, u veoma hidrofobnoj lokalnoj sredini. Uprkos vrlo različitoj tercijarnoj strukturi ovih enzima, u poređenju sa Cu,Zn-SOD, neke karakteristike su im slične.

Metalni jon je lociran na kraju kanala koji liči na levak a pozitivni naboj, koji potiče od lizina i arginina rezidua, uvlači anjon u levak. Metal-specifičnost Mn- i Fe- SOD predstavlja izvanrednu zagonetku. Ni aminokiselinska sekvenca, ni kristalna struktura ne objašnjavaju razlike koje mogu da objasne specifično vezivanje Mn jednim proteinom a Fe drugim. Stallings i sar. (1992) pretpostavljaju da „inicijalno vezivanje metala može da se dogodi u delimično formiranoj strukturi“.



Shema 7. Komparativni prikaz strukture i aktivnih mesta četiri SOD enzima. (A) Ni-SOD poreklom iz *Streptomyces coelicolor*; (B) humana Cu,Zn-SOD; (C) Fe-SOD poreklom iz *E. coli*; (D) Mn-SOD

2.5.4.3. Ni - superoksid dizmutaza

Nikl superoksid dizmutaza je tek skoro otkriveni član porodice superoksid dizmutaza (Ni SOD). Ovaj enzim je izolovan iz velikog broja bakterija pripadnika roda *Streptomyces* i cijanobakterija. Analizom je utvrđeno da poseduje heksamernu strukturu sa molekularnom težinom od približno 80 kDa, pri čemu svaka monomerna jedinica sadrži, u literaturi označeno kao „nikl-kuka“. Svaki jon nikla je vezan malim peptidnim lancem sa vezujućim ligandima koji se sastoje od dva amida, jednog poreklom od N-terminusa i drugog poreklom od cisteina u položaju 2 u glavnom lancu, dve tiolne grupe, jedne iz cisteina u položaju 2 i jedne poreklom iz cisteina 6, i imidazola poreklom od histidina u položaju 3. Ovo je prva SOD u kojoj su vezujući ligandi ništa drugo nego histidini, aspartati i voda/hidroksidi. Nikl je redoks aktivan ali detalji mehanizma još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni, velikim delom i zbog toga što je vrlo teško izvesti reakciju između nikla i superoksid anjon radikala (Barondeau i sar., 2004).

S obzirom da je prisustvo Ni-SOD ograničeno na svega nekoliko grupa živih organizama, pretpostavlja se da se u evoluciji pojavila posle diferencijacije eukariota i razvoja velikog broja bakterija. Zbog toga što aktivno mesto Ni-SOD obrazuju devet N-terminalnih amino kiselina koje nisu integralni deo sekundarne i tercijarne strukture, pretpostavlja se da je Ni vezujuće mesto možda kasnije dodato na već postojeći protein formiran od četiri heliksa (Miller, 2012).

2.5.5. Mehanizam delovanja superoksid dizmutaze

Postavlja se pitanje zašto su superoksid dizmutaze uopšte potrebne, s obzirom da je i nekatalizovana dismutacija brza, čak i pri neutralnom pH? Kao što je Fridovich pokazao (1962), sponatna dismutacija je reakcija drugog stepena, u odnosu na koncentraciju $O_2^{\cdot-}$. Nasuprot ovome, enzimski katalizovana dismutacija, koja se pokreće interakcijom molekula $O_2^{\cdot-}$ sa molekulom enzima, je reakcija prvog stepena u odnosu na koncentraciju superoksida. Na taj način, pri niskim koncentracijama superoksida, dominira enzimski katalizovana reakcija. Ravnotežno stanje koncentracije superoksida može da se održava pri mnogo nižim vrednostima u prisustvu enzima. Ili, rečeno drugim rečima, pri nižim koncentracijama superoksida, veća je mogućnost susreta

superoksid-anjon radikala i superoksid dizmutaze, u odnosu na mogućnost da se susretne sa drugim molekulom superoksid radikala (Desideri i sar., 1992).

Sve superoksid-dizmutaze su metaloenzimi. Verovatno najprostije tumačenje mehanizma enzimske katalize je tzv. ping-pong proces, u kome se metalni centar enzima prvo redukuje a zatim oksiduje superoksidom, pri čemu enzim takođe ubrzava transfer protona do superoksid-anjon radikala. Ovo je trenutno opšte prihvaćen mehanizam, ali treba imati u vidu da i druge mogućnosti nisu isključene (Abreu i Cabelli, 2010; Miller, 2012).

2. CILJEVI I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Na osnovu pregleda literaturnih podataka, postavljena je hipoteza o uticaju intenziteta parazitske infekcije na parametre oksidativnog stresa kod ovaca. U tu svrhu definisani su sledeći ciljevi ove doktorske disertacije:

- Da se utvrdi vrsta i intenzitet parazitskih infekcija kod sojeva autohtone rase pramenke i uvezenih rasa ovaca u istom sistemu držanja
- Da se utvrdi razlika u odgovoru na oksidativni stres kod grupa autohtonih sojeva pramenke i uvezenih rasa ovaca formiranih prema intenzitetu i vrsti parazitske infekcije
- Izvrši izolovanje ovčije SOD 1 i njena bliža karakterizacija
- Da se ispita uticaj i mehanizam dejstva različitih koncentracija i vremena ekspozicije vodonik-peroksida na SOD 1

Radi ispunjenja postavljenih ciljeva definisani su sledeći zadaci:

- Klinički pregled ovaca
- Konvencionalnim parazitološkim metodama utvrditi vrstu i intenzitet parazitskih infekcija kod sojeva autohtone rase pramenke i uvezenih rasa ovaca u istom sistemu držanja
- Odrediti parametre oksidativnog stresa u krvnoj plazmi i eritrocitima ispitivanih ovaca (aktivnost SOD 1 i katalaze, koncentraciju nitrita, malon-dialdehida, karbonilnih i tiolnih grupa i relativnu distribuciju izoenzima laktat-dehidrogenaze)

- Izolovati ovčiju SOD 1 i izvršiti njenu bližu karakterizaciju na osnovu elektroforetske pokretljivosti u nativnim i denaturišućim uslovima i tečno-masenom spektrometrijom
- Izvršiti elektroforetsko razdvajanje izoenzima SOD 1 kod ispitivanih životinja
- Izoelektrofokusanjem odrediti izoelektričnu tačku (pI vrednost) SOD 1
- U ogledima *in vitro* ispitati uticaj vodonik-peroksida na SOD 1
- Elektron paramagnetnom rezonancijom (EPRS) ispitati mehanizam dejstva vodonik-peroksida na izolovanu ovčiju SOD 1
- Utvrditi u kojoj meri i pod kojim uslovima izoenzimski oblici ovog enzima mogu da posluže kao biomarkeri intenziteta parazitskih infekcija. U tu svrhu izvršiti korelaciju intenziteta parazitske infekcije i izoenzimske raspodele SOD 1

4. MATERIJAL I METODE RADA

4.1. MATERIJAL

Ispitivanje je izvršeno na ukupno 300 ovaca (starosti 12 do 18 meseci), i to na sojevima autohtone rase pramenke (sjeničko-peštarska pramenka, lipska pramenka i vlaška vitoroga pramenka), koji su obuhvaćeni programom očuvanja animalnih genetičkih resursa Republike Srbije i na uvezenim rasama ovaca (virtemberg, il d frans i šarole), u poluintenzivnom sistemu držanja, u četiri područja: Sjeničko-peštarska visoravan, južni Banat, Smederevo – selo Lipe i Obrenovac. U cilju poređenja ekstenziteta, intenziteta i odgovora organizma domaćina na parazitsku infekciju, sa aspekta oksidativnog stresa, u svakom području ispitivanjem su bile obuhvaćene autohtona i uvezena rasa/soj ovaca, po sledećoj shemi:

I ispitivano područje (Sjeničko-peštarska visoravan) – sjeničko-peštarska pramenka (n=50) i virtemberg (n=20).

II ispitivano područje (južni Banat) – vlaška vitoroga pramenka (n=50) i virtemberg (n=20).

III ispitivano područje (Smederevo–selo Lipe) – lipska pramenka (n=50) i virtemberg (n=20).

IV ispitivano područje (Obrenovac) – sjeničko-peštarska pramenka (n=30), il d frans (n=40) i šarole (n=20).

U okviru svake ispitivane rase/soja, formirana je kontrolna grupa ovaca (n=10), negativnih na parazitsku infekciju.

4.1.1. Uzimanje uzoraka krvi i fecesa ovaca

Uzorci fecesa uzimani su pojedinačno od svake ovce, direktno iz ampule rektuma, tokom tri dana, u jutarnjim i večernjim satima. Uzorci fecesa od svake životinje pakovani su u zasebne, obeležene plastične kese i transportovani u ručnom frižideru do parazitološke laboratorije Katedre za parazitologiju, Fakulteta veterinarske medicine.

Za, planom rada predviđena biohemijska ispitivanja, krv je uzorkovana punkcijom *v. jugularis*, u vakuum epruvetama sa heparinom (3.8 % Litijum-natrijum-heparin, Vacuette Vicor, USA), uz prethodno fiksiranje životinja. Krvna plazma je odvojena od ćelijskih elemenata krvi centrifugiranjem na 3000 rpm, 15 minuta. Nakon odvajanja leukocita i trombocita vodenom vakuum-pumpom, istaloženi eritrociti su tri puta isprani fiziološkim rastvorom. Ovako dobijeni uzorci krvne plazme i eritrocita bili su skladišteni na -20°C , do analize.

4.2. METODE

4.2.1. Metode parazitološke dijagnostike

Prema postavljenom zadatku, u otkrivanju i determinaciji parazita i njihovih razvojnih oblika primenjeni su standardni ključevi parazitoloških metoda za određivanje morfoloških i morfometrijskih karakteristika parazita (jaja, larvica i/ili adultnih oblika).

Koprološka dijagnostika je vršena metodama sedimentacije i flotacije (Kassai, 1999). Metoda flotacije bazira se na principu da specifično lakše čestice suspendovane u tečnosti sa većom specifičnom težinom parazita isplivavaju na površinu i koncentruju se. Ova tehnika izvođena je na sledeći način: u petrijevu šolju, prečnika 10 cm, stavljen je feces u količini oko 5 gr. Uzimanje materijala vršeno je sa više mesta jednog uzorka. Sa zasićenim rastvorom (ZnSO_4), specifične težine 1.30 do 1.47 g/cm^3 , u količini od 20 ml pravljen je suspenzija, koja je posle ceđenja razlivena u bakteriološke epruvete do vrha, u cilju dobijanja konveksne površine tečnosti

u vidu jednog meniskusa. Za pripremu preparata za pregled fecesa korišćena je varijanta metode bez upotrebe centrifuge.

Preko epruvete je zatim stavljana pokrovnica, a zatim je epruveta ostavljena u stalku 20-30 minuta da bi se izvršila flotacija. Posle ovog vremena, pažljivo se skida pokrovnica i stavlja svojom donjom stranom na predmetnicu i posmatra preparat. Pregled preparata vršen je pod mikroskopom, pri uvećanju 7x10 i 7x40 na mikroskopu *Reichert*.

Metoda sedimentacije, kada se feces suspenduje u vodi, jaja i/ili larvice parazita, će se taložiti kao teže od drugih fekalnih partikula u malom prostoru. Time se vrši koncentracija, a metoda se radi u konusnim čašama zapremine 1 litar, po opisu postupka Kassai (1999). Morfološka i morfometrijska merenja rađena su na jajima i larvicama parazita izdvojenih metodom sedimentacije direktno iz fecesa ili iz koprokulture.

Intenzitet parazitske infekcije određen je brojanjem parazitskih elemenata (jaja/larvi helminata i oocisti protozoa) u fecesu (Euzeby, 1982), korišćenjem kvantitativne metode po McMaster-u (modifikacija po Zajiček-u, 1978) i izražen kao srednja vrednost broja parazitskih elemenata po gramu fecesa. Na osnovu literaturnih podataka (Kassai, 1999) i utvrđenog broja parazitskih elemenata/gramu fecesa, intenzitet parazitske infekcije je definisan kao blagi, srednji i visoki.

4.2.2. Metode biohemijskih ispitivanja

Tokom realizacije postavljenih ciljeva i zadataka istraživanja, za određivanje pojedinačnih parametara, korišćene su sledeće metode:

4.2.2.1. Određivanje pokazatelja oksidativnog stresa:

1. Ukupna aktivnost Cu,Zn-SOD je određivana komercijalnim test paketom, WST-1 (Fisher Scientific Labosi; Elancourt, France). Aktivnost izoenzimskih oblika Cu,Zn-SOD određivana je vertikalnom elektroforezom na 10% PAGE-gelu, oksidacijom NBT – *nitro-*

tetrazolijumskogplavog (HOEFFER MINI VE, Amersham, LKB, 2117, Bromma, Uppsala Sweden), po metodi Beuchamp i Fridovich (1971).

2. Aktivnost katalaze (CAT) je određivana primenom UV-kinetičke metode, uz prisustvo H₂O₂, na spektrofotometru (CECIL CE 2021 UV/VIS), po metodi Aebi (1984).

3. Koncentracija malon-dialdehida (MDA) je određivana spektrofotometrijski, u reakciji sa tiobarbiturnom kiselinom, (CECIL CE 2021 UV/VIS), po metodi Stock i Dormandy (1971).

4. Izoenzimski oblici laktat-dehidrogenaze (LDH₁, LDH₂, LDH₃, LDH₄ i LDH₅) su određivani vertikalnom elektroforezom na 7,5% PAGE-gelu (HOEFFER MINI VE, Amersham, LKB, 2117, Bromma, Uppsala Sweden), uz primenu TRIS-glicinskog pufera, po metodi Yoshida i Takakuwa (1997).

5. Koncentracija nitrita je određivana u reakciji sa Griess-ovim reagensom, uz čitanje na ELISA čitaču na 540 nm (Plate reader, Mod. A1, Nubenco Enterprises, ICN), po metodi Guevara i saradnika (1998).

4.2.2.2. Određivanje pokazatelja oksidativnih modifikacija proteina:

1. Određivanje koncentracije karbonilnih grupa izvršeno je u reakciji sa 2,4-dinitrofenilhidrazinom, spektrofotometrijski, na 365 nm (CECIL CE 2021 UV/VIS) (Levine i sar., 1990).

2. Određivanje koncentracije slobodnih tiolnih grupa, izvršeno je u reakciji sa Elmanovim reagensom, spektrofotometrijski, na 412 nm (CECIL CE 2021 UV/VIS) (Ellman, 1959).

4.2.2.3. Karakterizacija SOD 1 iz ovčijih eritrocita u ogledima *in vitro*

SOD 1 izolovana iz ovčijih eritrocita tretirana je sa vodonik-peroksidom različitih koncentracija (0,15; 0,30; 1,5; 3,0; 15 i 30 mM) na 37 °C u vremenskom intervalu od 30, 60, 90 i 180 min. Nakon inkubiranja enzima sa odgovarajućom koncentracijom vodonik-peroksida u pomenutim vremenskim intervalima određena je aktivnost SOD1 na prethodno opisani način.

4.2.3. Elektroforetsko određivanje molekulske mase izolovane SOD 1 (SDS-PAGE)

Određivanje molekulske mase izolovane i liofilizovane SOD1 izvedeno je u denaturišućim uslovima na 12% SDS-PAGE elektroforetski. Kao markeri molekulskih masa korišćeni su standardi proteina u rasponu molekulskih masa od 10 do 170 kDa (Invitrogen, USA) .

4.2.4. Određivanje molekulske mase i izoelektrične tačke SOD 1 kompjuterskom metodom

Molekulska masa datog enzima i pI vrednost je određena kompjuterskom metodom korišćenjem kompjuterskog softverskog paketa Discovery Studio Visualizer 3,0, a na osnovu literaturnih podataka aminokiselinskih sekvenci (Dimitrijević i sar., 2012).

4.2.5. Određivanje molekulske mase SOD 1 tečno-masenom spektralnom analizom (LC/MS)

LC/MS analize su rađene na masenom spektrometru 6210 Time-of-Flight LC-MS system (Agilent Technologies, Germany). Liofilizovani uzorci ovčije SOD1 su rastvoreni u bidestilovanoj vodi (4,5 mg/ml) u struji mobilne faze (0,2 % mravlja kiselina u vodi-acetonitril = 50:50) protoka 0,2 mL/min i unošeni su u maseni spektrometar pomoću Agilent Technologies 1200 Series HPLC instrumenta (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) sa binarnom pumpom, autosamplrom, kolonskim kompartmentom (sa ZDV ćelijom umesto kolone) i DAD detektorom.

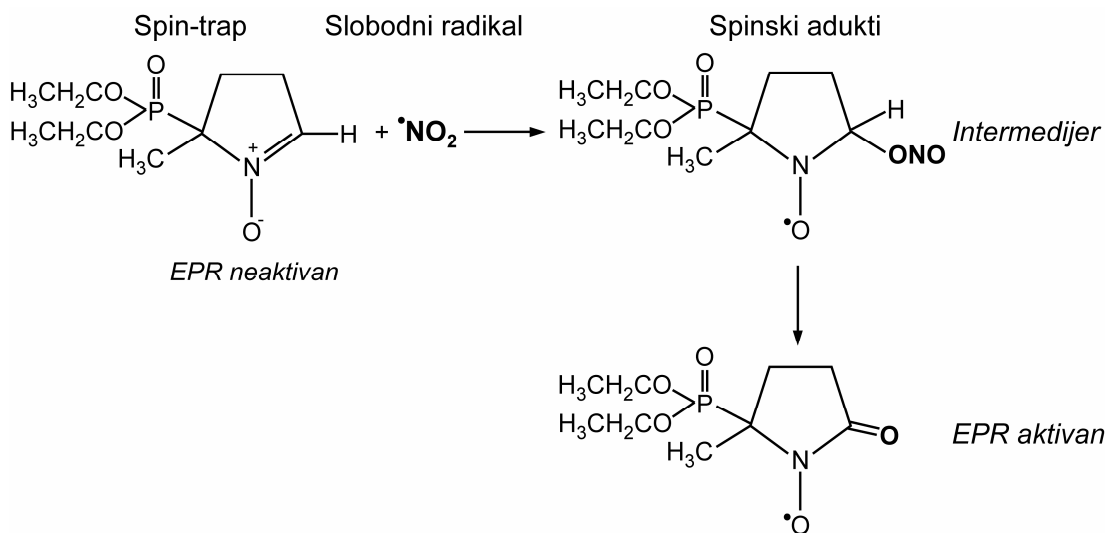
Maseni spektri su snimani u pozitivnom modu u sledećim uslovima: napon kapilare 4000 V, temperatura gasa 350 °C, protok gasa za sušenje 12 L/min, pritisak nebulajzera 45 psig, napon fragmentora 200 V, opseg masa 100–3200 m/z. Za sakupljanje i obradu podataka korišćen je MassHunter Workstation Software.

4.2.6. Izoelektrofokusanje izolovane ovčije SOD 1 - određivanje pI

Izoelektrična tačka određena je izoelektrofokusanjem na 4% poliakrilamid gelu koji sadrži 3% amfolin u rasponu pH vrednosti od 4-10.

4.2.7. Elektronska paramagnetna rezonantna spektroskopija (EPRS)

EPR spektroskopija predstavlja metodu kojom se mogu detektovati biološke i hemijske vrste sa jednim ili više nesparenih elektrona. Za detekciju kratkoživećih vrsta koristi se metoda spin-trapping, ili kako se kod nas ponekad prevodi spinskih hvatača. Osnova ove metode je da se u sistem uvede spin-trap (spinski hvatač) koji nema nesparene elektrone. Međutim, u specifičnoj hemijskoj reakciji sa kratkoživećim slobodnim radikalima nastaje adukt koji je relativno stabilan (dužina poluživota se meri u minutama i desetinama minuta), a koji u svojoj strukturi ima nesparen elektron. Kako EPR signal ovog elektrona zavisi od njegove hemijske okoline, dobijaju se specifični EPR spektri za različite adukte, čime je omogućena detekcija slobodnih radikala koji su učestvovali u reakciji sa spin-trapom. U retkim slučajevima adukt nije stabilan i biva transformisan u adukt drugačije strukture ali zadržava nesparen elektron.



Shema 6. Mehanizam spin-trapping metode

Hemikalije korišćene za izvođenje EPRS su: DEPMPPO (5-dietoksifosforil-5-metil-1-pirolin-N-oksid) spin-trap (Enzo Life Sciences, Lausen, Švajcarska), H_2O_2 (Renal, Budimpešta, Mađarska).

Nakon tretmana vodonik- peroksidom (videti 4.2.2.3.), uzorci Cu,ZnSOD su čuvani na -80°C . Neposredno pre EPR merenja, uzorci su otopljeni i u svaki je apliciran DEPMPPO (finalna koncentracija: 15 mM) i H_2O_2 (finalna koncentracije: 3 mM). Svaki uzorak (60 μL) je smešten u

gas-propusnu teflonsku cevčicu (Zeus Industries, Raritan, NJ, SAD; debljina zida 0,025 mm, unutrašnji prečnik 0,6 mm) i insertovan u kvarcnu kapilaru. EPR spektri su snimljeni na sobnoj temperaturi na X-bend Varian E104-A EPR spektrometru (9,51 GHz). Korišćeni su sledeći parametri prilikom snimanja: modulaciona amplituda, 2 Gausa; modulaciona frekvencija, 100 kHz; mikrotalasna snaga, 20 mW; vreme skeniranja, 4 minuta. Spektri su snimljeni upotrebom EW softvera (Scientific Software Inc, Blumington, SAD). Za svaki uzorak su snimljena po tri spektra koji su sabrani (akumulirani). Spektralna simulacija je izvedena upotrebom kompjuterskog programa WINEPR SimFonia (Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Karlsruhe, Nemačka). Korišćeni su ranije opisani parametri za simulaciju signala DEPMPO/O adukta: $a^N = 7.02$; $a^P = 40.92$; $a^H = 3.99$; $a^H = 2.99$ (Astolfi i sar., 2005).

4.3. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka izvršena je korišćenjem kompjuterskog programa GraphPad Prism 5.00 (San Diego, CA, USA). Rezultati istraživanja su predstavljeni uz pomoć deskriptivnih statističkih parametara (aritmetička sredina, standardna devijacija, standardna greška, koeficijent i interval varijacije) i prikazani tabelarno i grafički. Statistička značajnost razlika ispitivanih vrednosti (p) utvrđena je upotrebom ANOVA testa, Tukey-ovim testom. Kao statistički značajne uzete su razlike na nivou od $p < 0,05$, $p < 0,01$ i $p < 0,001$.

Stepen povezanosti ispitivanih parametara utvrđen je Pearson-ovim koeficijentom korelacije (r) i proverom statističke značajnosti koeficijenta korelacije ($p < 0,05$).

5. REZULTATI

5.1. Rezultati parazitološkog pregleda uzoraka fecesa ispitivanih ovaca

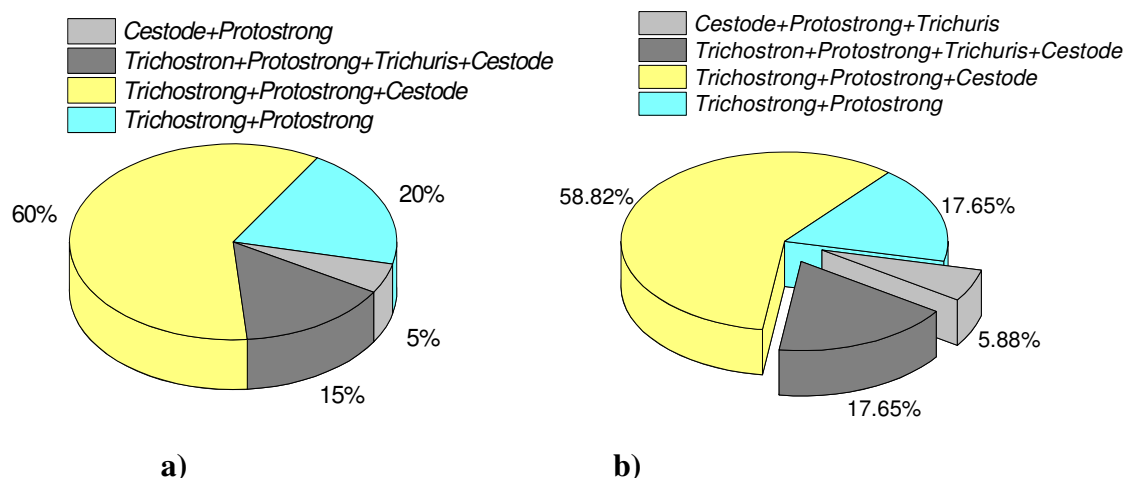
Na osnovu koprolološkog pregleda u ispitivanim grupama ovaca, na bazi morfoloških i morfometrijskih parametara korišćenjem ključeva po Euzebiju (Euzeby, 1989) ustanovljena je vrsta prisutne parazitske infekcije. Intenzitet infekcije utvrđen je koprolološkim pregledom pojedinačnih uzoraka fecesa, sakupljenih tokom tri dana, korišćenjem kvantitativne metode po McMaster-u (Kassai, 1999). Na osnovu broja jaja po gramu fecesa (Pelledy, 1974; Euzeby, 1981; Kassai, 1999) i kriterijuma prikazanog u tabeli 1, utvrđen je intenzitet parazitske infekcije.

Tabela 1. Kriterijum za utvrđivanje intenziteta infekcije

Broj jaja/gramu fecesa	Intenzitet parazitske infekcije		
	Blagi	Srednji	Visoki
<i>Trichostrongylidae</i>	<1000	1000-2000	>2000
<i>Protostrongylidae</i>	<50	50-150	>150
<i>Trichuris</i> spp	<300	300-500	>500
<i>Nematodirinae</i>	<100	100-600	>600
<i>Anoplocephalidae</i>	<10	10-100	>100
<i>Strongyloides</i> spp	<1000	1000-2000	>2000
<i>Eimeria</i> spp	<50000	50000-100000	>100000

Rezultati parazitološkog ispitivanja ekstenziteta infekcije prikazani su na grafikonima od 1 do 8, dok je intenzitet infekcije (izražen kao: \bar{X} broj jaja/gram fecesa \pm SD) u ispitivanim grupama ovaca, po epizootiološkim područjima, prikazan u tabelama od 2 do 8.

Analizom rezultata ekstenziteta parazitske infekcije ispitivanih ovaca, u I epizootiološkom području, prikazanog na grafikonu 1, može se videti da je najveći procenat ispitivanih ovaca bio istovremeno inficiran sa tri vrste parazita (*Trichostrongylidae*, *Protostrongylidae* i cestode), 60% sjeničko-peštarske pramenke i 58,82% virtemberg ovaca.



Grafikon 1. Ekstenzitet parazitske infekcije u epizootiološkom području I (Sjениčko-peštarska visoravan), kod a) sjeničko-peštarske pramenke i b) virtemberg rase ovaca

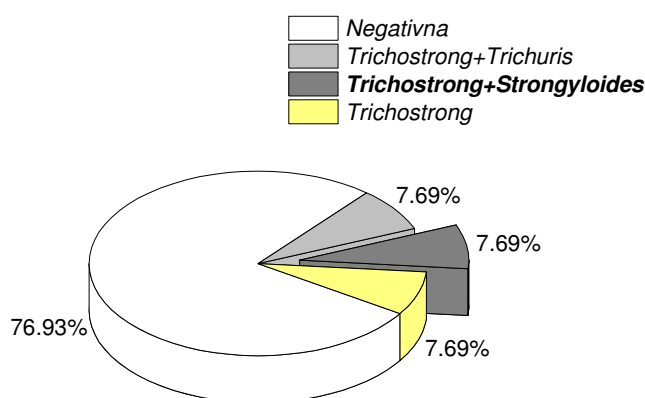
Tabela 2. Intenzitet parazitske infekcije u epizootiološkom području I (Sjeničko-peštarska visoravan) kod a) sjeničko-peštarske pramenke i b) virtemberg rase ovaca

rasa/soj Vrsta parazita	sjeničko-peštarska pramenka		virtemberg	
	$\bar{X} \pm SD$	IV	$\bar{X} \pm SD$	IV
<i>Trichostrongylidae</i>	438 ± 304	134 – 742	1135 ± 130***	1005 – 1265
<i>Protostrongylidae</i>	101 ± 34*	67 – 135	80 ± 44	10 – 128
<i>Trichuris spp</i>	28 ± 9	19 – 37	41 ± 31	10 – 72
<i>Nematodirinae</i>	257 ± 62	195 – 319	394 ± 173*	221 – 567
<i>Anoplocephalidae</i>	156 ± 75	98 – 293	149 ± 111	39 – 296
<i>Eimeria spp</i>	/	/	20 ± 2	18 – 22

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

Manji procenat ovaca bio je istovremeno inficiran sa četiri vrste parazita (*Trichostrongylidae*, *Protostrongylidae*, *Trichuris* i cestode), 15% sjeničko-peštarske pramenke i 17,65% virtemberg ovaca. Sa dve vrste parazita (*Trichostrongylidae*, *Protostrongylidae*) bilo je istovremeno inficirano 20% sjeničko-peštarske pramenke i 17,65% virtemberg ovaca. U 5% slučajeva utvrđena je istovremena infekcija sa dve vrste parazita (*Protostrongylidae* i cestode) kod sjeničko-peštarske pramenke, dok je kod 5,88% ovaca virtemberg rase utvrđena istovremena infekcija sa tri vrste parazita (*Protostrongylidae*, *Trichuris* i cestode). Međusobnim poređenjem utvrđenog intenziteta parazitske infekcije kod sjeničko-peštarske pramenke i virtemberg ovaca dokazana je

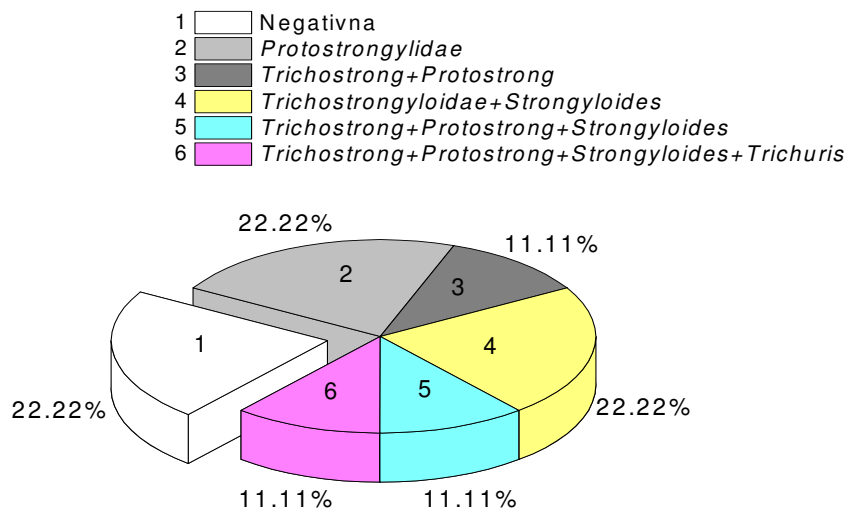
statistički značajna razlika u intenzitetu infekcije sa *Trichostongylidae* ($p < 0,001$), *Nematodirinae* ($p < 0,05$) i *Protostrongylidae* ($p < 0,05$). Takođe, treba reći da je kod virtemberg rase ovaca utvrđen veći intenzitet infekcije sa *Trichuris* spp, ali bez statističke značajnosti u odnosu na sjeničko-peštarsku pramenku ($p > 0,05$). I pored činjenice, da prema korišćenim ključevima za utvrđivanje intenziteta parazitske infekcije, kod autohtone sjeničko-peštarske pramenke i uvezene virtemberg rase ovaca ne postoje razlike u intenzitetu parazitske infekcije, evidentno je, na osnovu broja jaja po gramu fecesa, da sjeničko-peštarska pramenka u istim uslovima parazitskog pritiska, izlučuje manji broj jaja parazita, tj. ima niži intenzitet parazitske infekcije.



Grafikon 2. Ekstenzitet parazitske infekcije u epizootiološkom području II (selo Lipe – Smederevo) kod lipske pramenke

Analizom rezultata ekstenziteta parazitske infekcije ispitivanih ovaca, u II epizootiološkom području, prikazanog na grafikonima 2 i 3, može se videti da je 70% lipske pramenke bilo negativno na prisustvo parazitske infekcije, dok je svega 20% virtemberg ovaca, pri istom pritisku parazitske infekcije u ispitivanom području, bilo negativno. U istom procentu (7,69%) kod lipske pramenke je utvrđena istovremena infekcija sa dve vrste parazita (*Trichostongylidae* + *Protostrongylidae* i *Trichostongylidae* + *Strongyloides*) i monoinfekcija sa *Trichostongylidae*.

Za razliku od lipske pramenke, kod virtemberg ovaca, u II epizootiološkom području, najveći broj ovaca (22%) bio je istovremeno inficiran sa dve vrste parazita (*Trichostongylidae* + *Strongyloides*) i 11,11% sa (*Trichostongylidae* + *Protostrongylidae*).



Grafikon 3. Ekstenzitet parazitske infekcije u epizootiološkom području II (selo Lipe – Smederevo) kod virtemberg rase ovaca

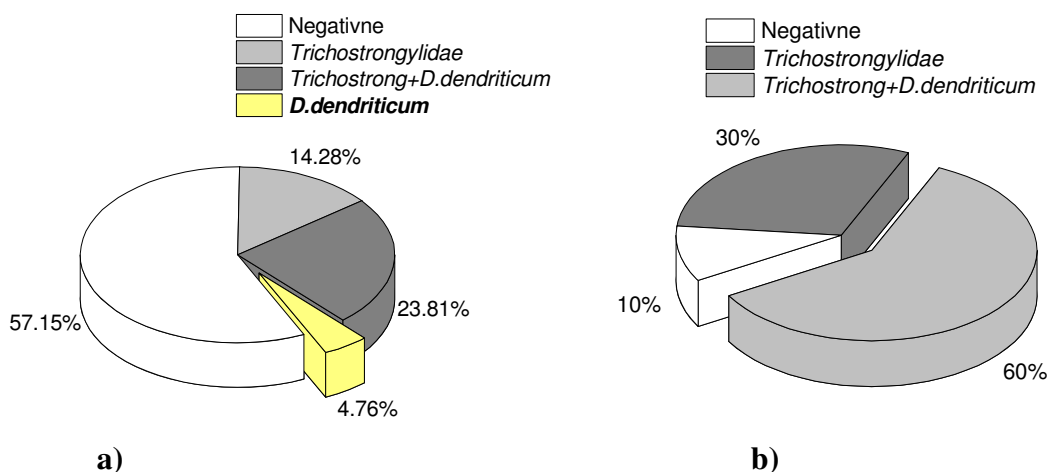
Tabela 3. Intenzitet parazitske infekcije u epizootiološkom području II (selo Lipe – Smederevo) kod lipske pramenke

rasa/soj	lipska pramenka		virtemberg	
	$\bar{X} \pm SD$	IV	$\bar{X} \pm SD$	IV
<i>Trichostrongylidae</i>	72 ± 46	26 – 118	$857 \pm 567^*$	290 – 1424
<i>Trichuris</i> spp	11 ± 3	8 – 14	12 ± 2	10 – 14
<i>Strongyloides</i> spp	41 ± 2	39 – 43	21 ± 7	14 – 28
<i>Protostrongylidae</i>	/	/	36 ± 33	33 – 69
<i>Nematodirinae</i>	/	/	77 ± 57	20 – 134

* $p < 0,05$

Takođe, u 11,11% slučajeva utvrđena je istovremena infekcija sa tri (*Trichostrongylidae* + *Protostrongylidae* + *Strongyloides*) i četiri vrste parazita (*Trichostrongylidae* + *Protostrongylidae* + *Strongyloides* + *Trichuris*). Monoinfekcija sa *Protostrongylidae* utvrđena je u 11,11% jedinki. Na osnovu analize rezultata ekstenziteta parazitskih infekcija može se videti da je, u istim uslovima parazitskog pritiska, kod virtemberg rase ovaca utvrđena infekcija sa *Protostrongylidae* i *Nematodirinae*, čije prisustvo nije dokazano kod lipske pramenke. Međusobnim poređenjem utvrđenog intenziteta parazitske infekcije, u ispitivanom II epizootiološkom području (selo Lipe - Smederevo), dokazana je statistički značajna razlika u intenzitetu infekcije sa *Trichostrongylidae* između lipske pramenke i virtemberga ($p < 0,05$). Takođe, kod

virtemberg rase ovaca utvrđeno je i prisustvo parazitske infekcije sa *Nematodirinae* i *Protostrongylidae*, za razliku od autohtone lipske pramenke.



Grafikon 4. Ekstenzitet parazitske infekcije u epizootiološkom području III (južni Banat) kod ovaca a) vlaške vitoroge i b) virtemberga

Tabela 4. Intenzitet parazitske infekcije u epizootiološkom području III (Južni Banat) kod vlaške vitoroge ovce

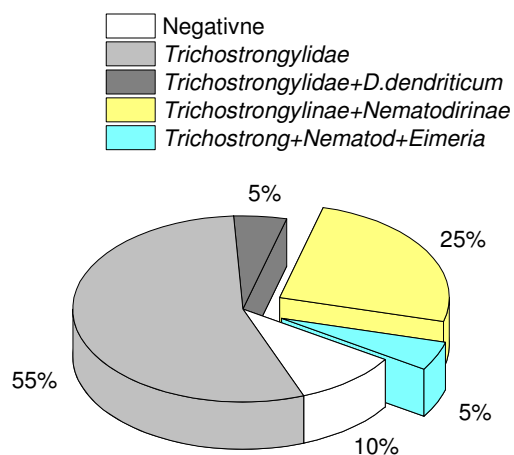
rasa/soj Vrsta parazita	vlaška vitoroga pramenka		virtemberg	
	$\bar{X} \pm SD$	IV	$\bar{X} \pm SD$	IV
<i>Trichostrongylidae</i>	578 ± 473	105 – 1051	$985 \pm 274^*$	711 – 1259
<i>D. dendriticum</i>	21 ± 9	12 – 30	26 ± 10	16 – 36

U III epizootiološkom području, utvrđeno je kod vlaške vitoroge pramenke i virtemberg rase ovaca prisustvo dve parazitske vrste (*Trichostrongylidae* + *D. dendriticum*). Međutim, interesantno je da je 57,15% vlaške vitoroge pramenke bilo negativno na prisustvo parazitske infekcije ovim vrstama, nasuprot virtemberg ovacama, gde je utvrđeno svega 10% negativnih jedinki. Kod 23,81% vlaško vitoroge pramenke i 60% virtemberg ovaca utvrđena je istovremena infekcija sa ove dve vrste parazita. Kod 14,28% vlaško vitoroge pramenke i 30% virtemberg ovaca utvrđena je monoinfekcija sa *Trichostrongylidae*. Jedino je kod vlaško vitoroge ovce utvrđena monoinfekcija sa *D. dendriticum*, u 4,76% jedinki. Međusobnim poređenjem autohtone vlaške vitoroge pramenke i virtemberg ovaca utvrđen je statistčki značajno veći intenzitet infekcije sa *Trichostrongylidae* kod virtemberg rase ovaca u odnosu na vlašku vitorogu pramenku

($p < 0,05$). Nije utvrđena statistička razlika u intenzitetu infekcije sa malim metiljem ($p > 0,05$).

Rezultati analize ekstenziteta i intenziteta parazitske infekcije u IV epizootiološkom području (Obrenovac) prikazani su na grafikonima od 5 do 7 i u tabelama od 5 do 7.

Analizom rezultata ekstenziteta parazitske infekcije ispitivanih ovaca, u IV epizootiološkom, može se videti da je svega 10% sjeničko-peštarske, 39,87% il d frans i 85,71% šarole rase ovaca bilo negativno na prisustvo parazitske infekcije. Monoinfekcija sa *Trichostrongylidae* utvrđena je kod 55% ovaca sjeničko-peštarske pramenke i 13,28% il d frans ovaca. Kod 5% sjeničko-peštarskih pramenki je utvrđena istovremena infekcija sa dve vrste parazita (*Trichostrongylidae* + *D. dendriticum*) i u 30% sa *Trichostrongylidae* + *Nematodirinae*.

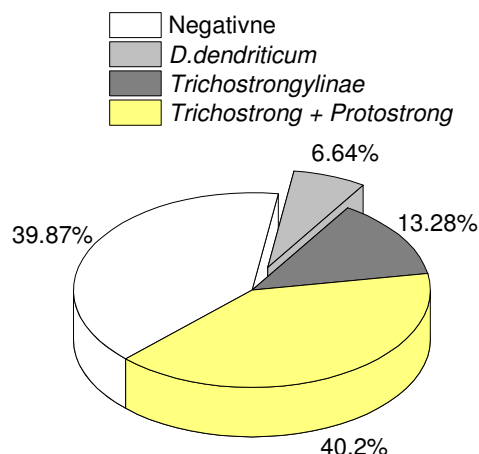


Grafikon 5. Ekstenzitet parazitske infekcije u epizootiološkom području IV (Obrenovac) kod sjeničko-peštarske pramenke

Tabela 5. Intenzitet parazitske infekcije u epizootiološkom području IV (Obrenovac) kod sjeničko-peštarske pramenke

rasa/soj	sjeničko-peštarska pramenka	
	$\bar{X} \pm SD$	IV
<i>Trichostrongylidae</i>	1798 ± 616**	1182 – 2414
<i>D. dendriticum</i>	14 ± 5	9 – 19
<i>Nematodirinae</i>	28 ± 16	12 – 44
<i>Eimeria</i> spp	65 ± 4	61 – 69

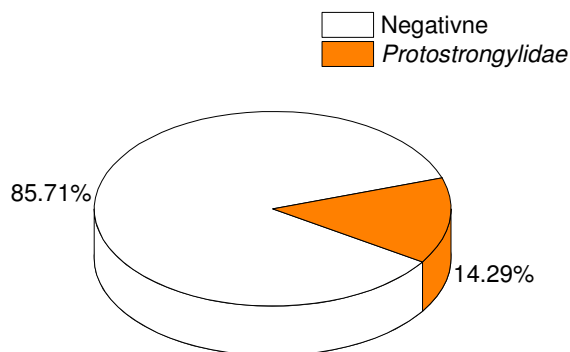
Kod il d frans ovaca u 40,20% slučajeva je utvrđena istovremena infekcija sa dve vrste parazita (*Trichostrongylidae* + *Protostrongylidae*) i u 13,28% slučajeva monoinfekcija sa *Trichostrongylidae* i u 6,64% slučajeva sa *D. dendriticum*.



Grafikon 6. Ekstenzitet parazitske infekcije u epizootiološkom području IV (Obrenovac) kod rase ovaca il d frans

Tabela 6. Intenzitet parazitske infekcije u epizootiološkom području IV (Obrenovac) kod rase ovaca il d frans

Vrsta parazita	$\bar{X} \pm SD$	IV
<i>Trichostrongylidae</i>	1136 ± 604	532 – 1740
<i>D. dendriticum</i>	16 ± 3	13 – 19
<i>Protostrongylidae</i>	79 ± 40	39 – 119



Grafikon 7. Ekstenzitet parazitske infekcije u epizootiološkom području IV (Obrenovac) kod rase ovaca šarole

Tabela 7. Intenzitet parazitske infekcije u epizootiološkom području IV (Obrenovac) kod rase ovaca šarole

Vrsta parazita	$\bar{X} \pm SD$	IV
<i>Protostrongylidae</i>	21 ± 3	18 – 24

Interesantno je da kod šarole rase ovaca bila prisutna monoinfekcija sa *Protostrongylidae* i u to u 14,29% jedinki.

Međusobnim poređenjem ispitivanih grupa ovaca, u IV epizootiološkom području (Obrenovac), utvrđeno je da postoji razlika u ekstenzitetu, tj. vrsti prisutne parazitske faune. Kod sjeničko-peštarske pramenke utvrđeno je prisustvo infekcije sa *Nematodirinae*, za razliku od il d frans ovaca, kod kojih nije dokazan ovaj parazit, ali je zato dokazana parazitska infekcija sa *Protostrongylidae*. Statističkom analizom podataka, između ispitivanih grupa ovaca, nije utvrđena razlika u intenzitetu prisutne parazitske infekcije. Na istom epizootiološkom području, ispitivana grupa šarole rase ovaca, razlikovala se u odnosu na gore pomenute grupe ovaca, po tome što je kod njih bila prisutna monoinfekcija sa *Protostrongylidae*, sa intenzitetom infekcije statistički značajno manjim ($p < 0,05$) u odnosu na il d frans grupu ovaca, kod koje je takođe dokazana ova vrsta parazitske infekcije.

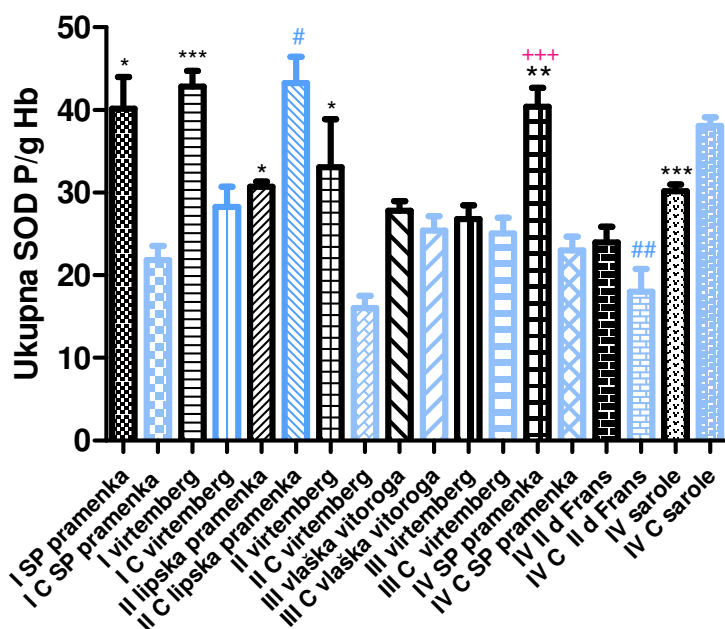
5.2. Rezultati biohemijskog ispitivanja parametara oksidativnog stresa u eritrocitima i krvnoj plazmi ovaca

5.2.1. Ukupna aktivnost SOD 1 i njenih izoenzimskih oblika kod ispitivanih ovaca

U cilju ispitivanja uticaja intenziteta parazitske infekcije na parametre oksidativnog stresa određivane su aktivnosti enzima antioksidativne odbrane (SOD 1 i CAT), stepen oštećenja ćelijske membrane tj. peroksidacija lipida, preko nivoa MDA, kao i stepen oksidativnih modifikacija proteina preko koncentracije karbonilnih i tiolnih grupa.

Superoksid dizmutaza 1 je enzim koji neutrališe prisustvo superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$) do H_2O_2 . Aktivnost SOD 1 može biti povećana u slučaju prevelike produkcije $O_2^{\cdot-}$ ili

inhibirana u slučaju prevelike proizvodnje H₂O₂. Rezultati analize ukupne aktivnosti enzima SOD prikazani su na grafikonu 8 i u tabelama 8 i 9.



Grafikon 8. Ukupna aktivnost enzima SOD u eritrocitima ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Legenda: (*) statistički značajna razlika između ogledne i kontrolne grupe ovaca, na nivou: $p < 0,05^*$; $p < 0,001^{***}$; (+) statistički značajna razlika između oglednih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,001^{+++}$; (#) statistički značajna razlika između kontrolnih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,05^{\#}$; $p < 0,01^{\#\#}$

Uočeno je da se ukupna aktivnost enzima SOD 1 povećava u zavisnosti od prisutnog ekstenziteta i intenziteta parazitske infekcije posmatrano u odnosu na kontrolnu grupu ovaca.

Tabela 8. Deskriptivni statistički parametri ukupne aktivnosti enzima SOD 1 u eritrocitima ovaca, u ispitivanim epizootiološkim područjima (I Sjeničko-peštarska visoravan i II s. Lipe-Smederevo)

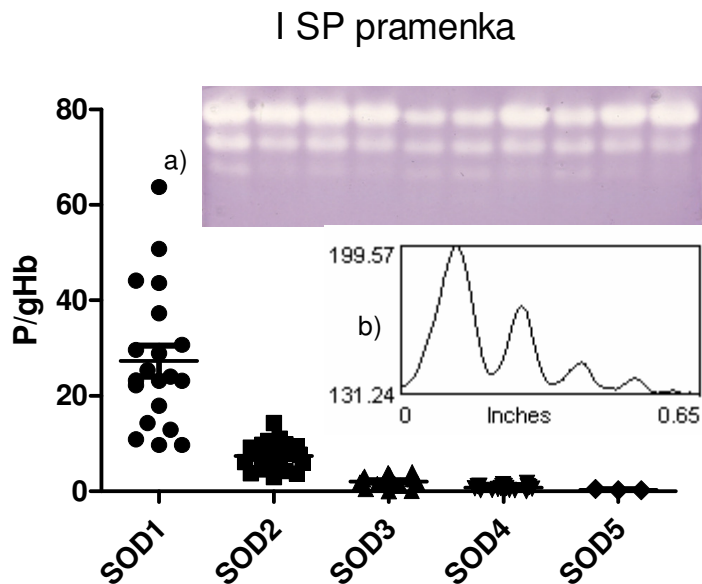
Parametar	Epizootiološko područje								
	I Sjeničko-peštarska visoravan				II selo Lipe - Smederevo				
	sjeničko-peštarska pramenka		virtemberg		lipska pramenka		virtemberg		
	O	C	O	C	O	C	O	C	
Ukupna SOD 1									
\bar{X} (P/gHb)	40.13	21.85	42.80	28.28	30.74	43.28	33.05	16.02	
SD	16.30	3.88	7.76	6.45	0.97	10.03	14.31	2.14	
SE	3.84	1.73	1.94	2.43	0.56	3.17	5.84	1.51	
CV (%)	40.62	17.76	18.14	22.80	3.17	23.18	43.29	13.38	
IV	min	19.75	17.12	30.43	19.04	29.77	28.10	17.11	14.50
	max	76.19	25.79	57.21	36.45	31.72	56.85	57.21	17.53
Mediana	35.57	21.21	42.78	27.81	30.73	44.50	30.50	16.02	

Tabela 9. Deskriptivni statistički parametri ukupne aktivnosti enzima SOD 1 u eritrocitima ovaca, u ispitivanim epizootiološkim područjima (III Južni Banat i IV Obrenovac)

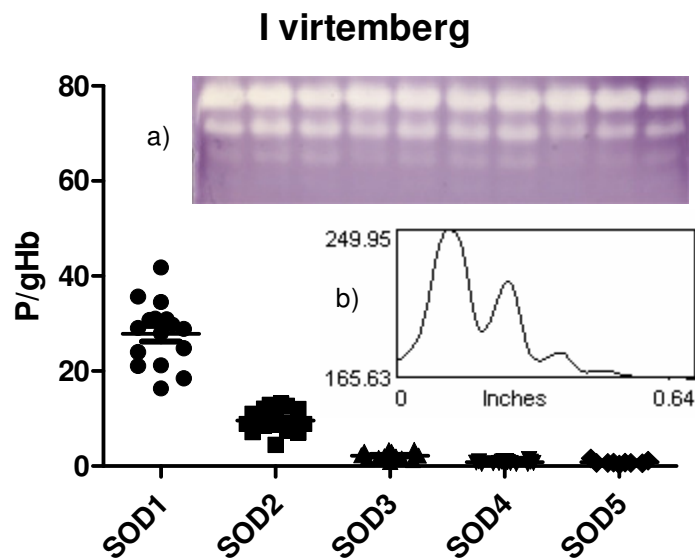
Parametar	Epizootiološko područje										
	III Južni Banat				IV Obrenovac						
	vlaška vitoroga pramenka		virtemberg		sjeničko-pešterska pramenka		il d frans		šarole		
Ukupna SOD 1	O	C	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{X} (P/gHb)	27.81	25.41	26.81	25.07	40.39	23.03	23.98	18.03	30.20	38.07	
SD	4.07	4.87	4.67	4.13	10.58	3.28	6.98	7.26	1.87	2.06	
SE	1.17	1.72	1.65	1.85	2.31	1.64	1.87	2.74	0.76	1.03	
CV (%)	14.64	19.17	17.42	16.50	26.18	14.25	29.15	40.29	6.22	5.43	
IV	min	21.47	14.00	22.65	19.04	17.73	19.32	15.67	9.25	28.48	35.67
	max	36.66	29.30	36.34	29.80	61.96	25.79	40.43	25.62	31.91	40.44
Mediana	27.60	26.42	25.11	25.11	41.90	23.50	23.66	21.69	30.20	38.08	

Povećanje aktivnosti ovog enzima dokazano je kod sjeničko-pešterske pramenke (I epizootiološko područje), dok je kod ogledne grupe lipske pramenke utvrđeno smanjenje aktivnosti ovog enzima, u odnosu na kontrolnu grupu ovaca, na nivou statističke značajnosti od $p < 0,05$. Kod virtemberg rase ovaca u I epizootiološkom području utvrđeno je povećanje ukupne aktivnosti SOD 1 u odnosu na kontrolnu grupu ovaca, na nivou statističke značajnosti od $p < 0,001$, dok je kod sjeničko-pešterske pramenke u IV epizootiološkom području (Obrenovac) povećanje ukupne aktivnosti ovog enzima bilo na nivou statističke značajnosti od $p < 0,01$. U istom epizootiološkom području utvrđen je pad aktivnosti ovog enzima kod šarole rase ovaca u odnosu na kontrolnu grupu, na nivou statističke značajnosti od $p < 0,001$. Međusobnim poređenjem ukupne aktivnosti ovog enzima kod ispitivanih rasa/sojeva ovaca, u okviru istog epizootiološkog područja, utvrđeno je da postoji statistički značajno povećanje samo kod sjeničko-pešterske pramenke, u IV epizootiološkom području, u odnosu na il d frans i šarole rasu ovaca, na nivou statističke značajnosti od $p < 0,001$. U ostalim ispitivanim slučajevima, u okviru istog epizootiološkog područja, između autohtonih i uvezenih rasa ovaca nisu utvrđene statistički značajne razlike u ukupnoj aktivnosti enzima SOD 1.

Da bi se utvrdilo da li prisutna parazitska infekcija i posledični razvoj oksidativnog stresa u organizmu ovaca, kao odgovor na infekciju, imaju uticaja na izoenzimsku raspodelu SOD 1, izvršeno je elektroforetsko razdvajanje ovog enzima. Rezultati analize izoenzimske raspodele SOD 1, kod autohtonih i uvezenih rasa ovaca, po ispitivanim epizootiološkim područjima, prikazani su na grafikonima od 9 do 18 i u tabeli 10.

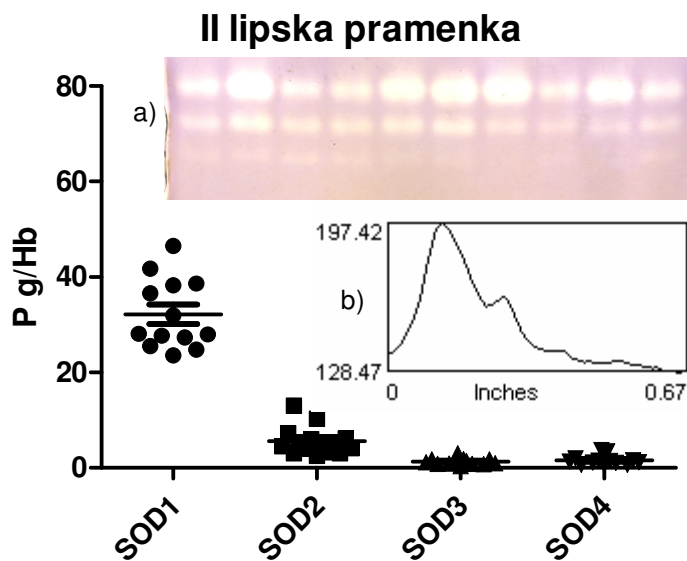


Grafikon 9. Izoenzimska raspodela aktivnosti SOD 1 u eritrocitima sjeničko-peštarske pramenke (I epizootiološko područje, Sjeničko-peštarska visoravan), a) elektroforegram na 10% PAGE; b) denzitogram

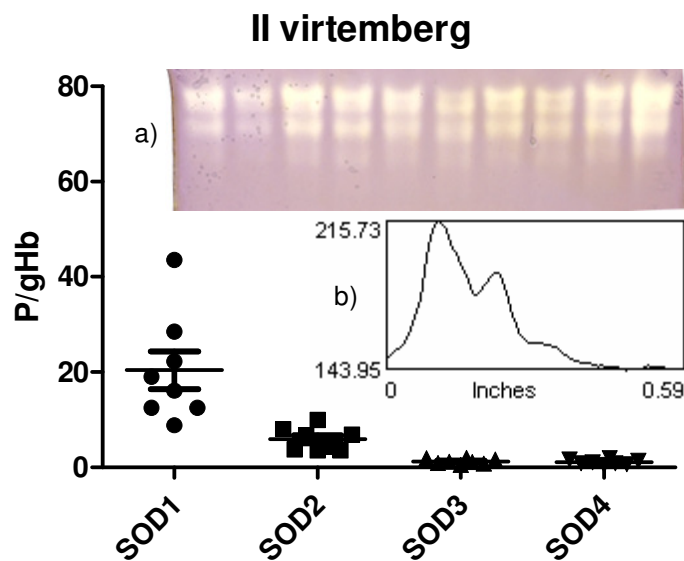


Grafikon 10. Izoenzimska raspodela aktivnosti SOD 1 u eritrocitima ovaca virtemberg rase (I epizootiološko područje, Sjeničko-peštarska visoravan), a) elektroforegram na 10% PAGE; b) denzitogram

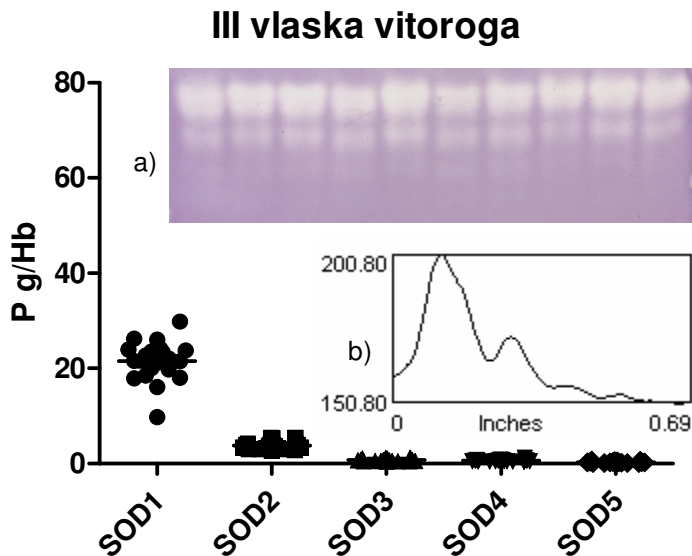
Međusobnim poređenjem izoenzimskih oblika SOD 1 kod ovaca negativnih i pozitivnih na parazitsku infekciju kod autohtone rase, vlaške vitoroge ovce, dokazana je inhibicija aktivnosti svih izoenzimskih oblika SOD 1, ali ne i statistički značajna razlika ($p > 0,05$). Rezultati ove analize prikazane su na grafikonu 16 i u tabeli 11.



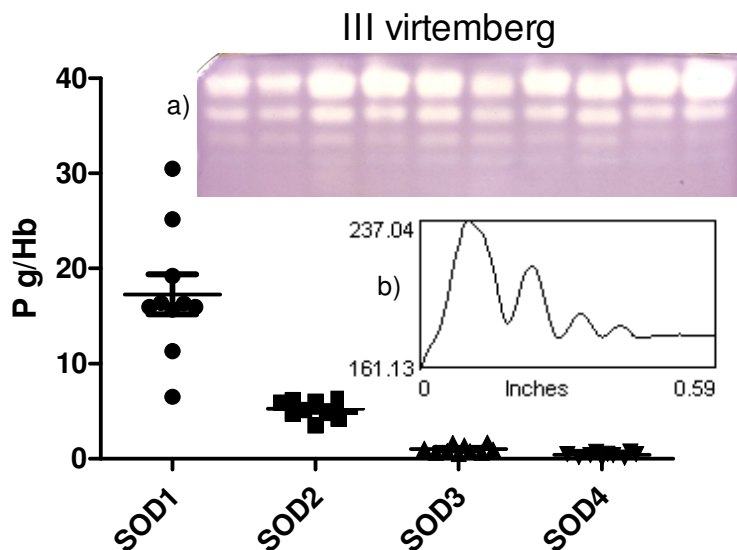
Grafikon 11. Izoenzimska raspodela aktivnosti SOD 1 u eritrocitima lipske pramenke (II epizootiološko područje, selo Lipe - Smederevo), a) elektroforegram na 10% PAGE; b) denzitogram



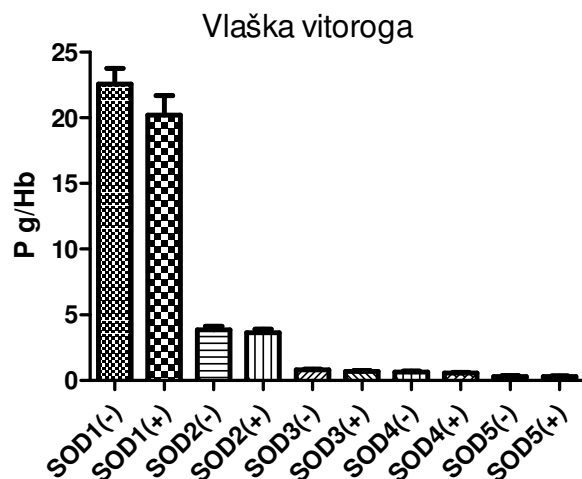
Grafikon 12. Izoenzimska raspodela aktivnosti SOD 1 u eritrocitima ovaca virtemberg (II epizootiološko područje, selo Lipe – Smederevo), a) elektroforegram na 10% PAGE; b) denzitogram



Grafikon 13. Izoenzimska raspodela aktivnosti SOD 1 u eritrocitima vlaške vitoroge pramenke (III epizootiološko područje, Južni Banat), a) elektroforegram na 10% PAGE; b) denzitogram



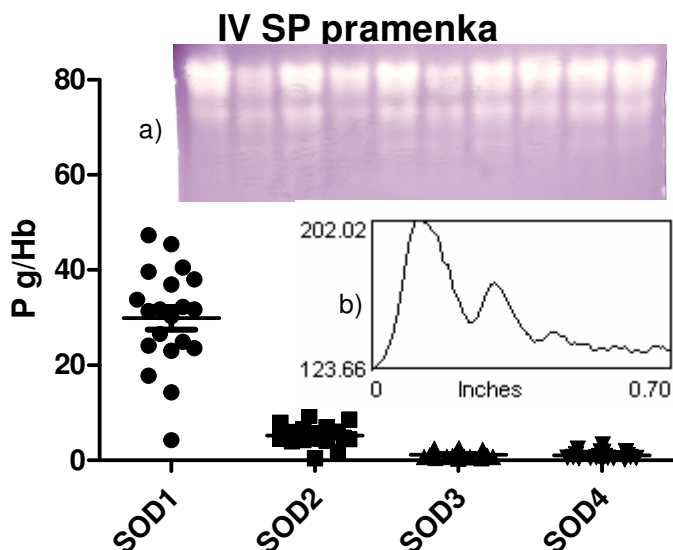
Grafikon 14. Izoenzimska raspodela aktivnosti SOD 1 u eritrocitima virtemberg rase ovaca (III epizootiološko područje, Južni Banat), a) elektroforegram na 10% PAGE; b) denzitogram



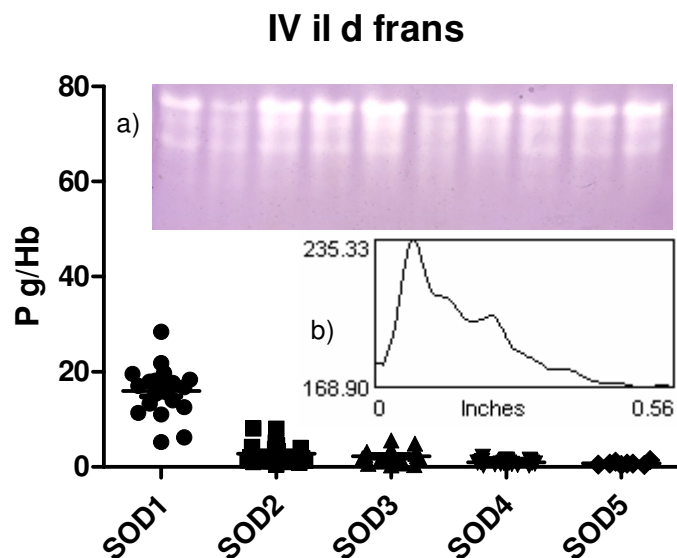
Grafikon 15. Relativna izoenzimska aktivnost SOD 1 u eritrocitima autohtone vlaške vitoroge pramenke, negativnih (-) i pozitivnih (+) na infekciju parazitima

Tabela 10. Deskriptivni statistički parametri relativne izoenzimske aktivnosti SOD 1 u eritrocitima autohtone vlaške vitoroge pramenke, negativnih (-) i pozitivnih (+) na infekciju parazitima

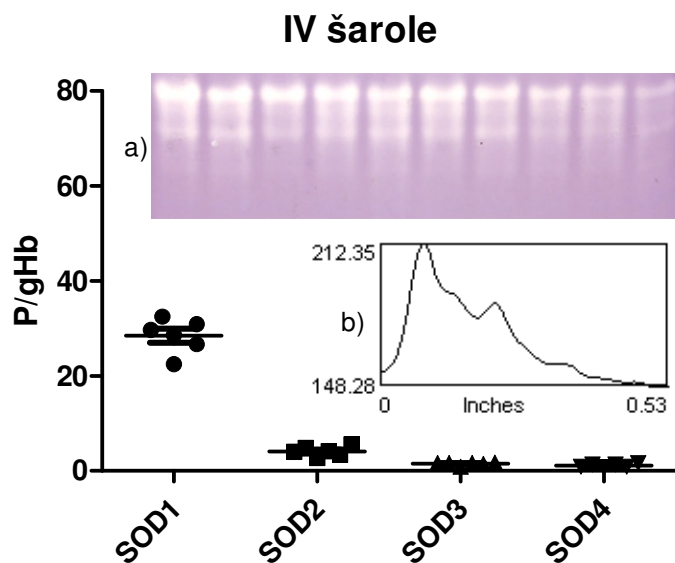
SOD 1 (P/gHb)	SOD 1-1 (-)	SOD 1-1 (+)	SOD 1-2 (-)	SOD 1-2 (+)	SOD 1-3 (-)	SOD 1-3 (+)	SOD 1-4 (-)	SOD 1-4 (+)	SOD 1-5 (-)	SOD 1-5 (+)
\bar{X}	22,57	20,19	3,86	3,63	0,79	0,68	0,64	0,55	0,29	0,29
SD	3,93	4,53	0,84	0,85	0,26	0,25	0,24	0,19	0,20	0,15
SE	1,18	1,51	0,25	0,28	0,08	0,08	0,07	0,06	0,07	0,05



Grafikon 16. Izoenzimska raspodela aktivnosti SOD 1 u eritrocitima sjeničko-peštarske pramenke (IV epizootiološko područje, Obrenovac), a) elektroforegram na 10% PAGE b) denzitogram

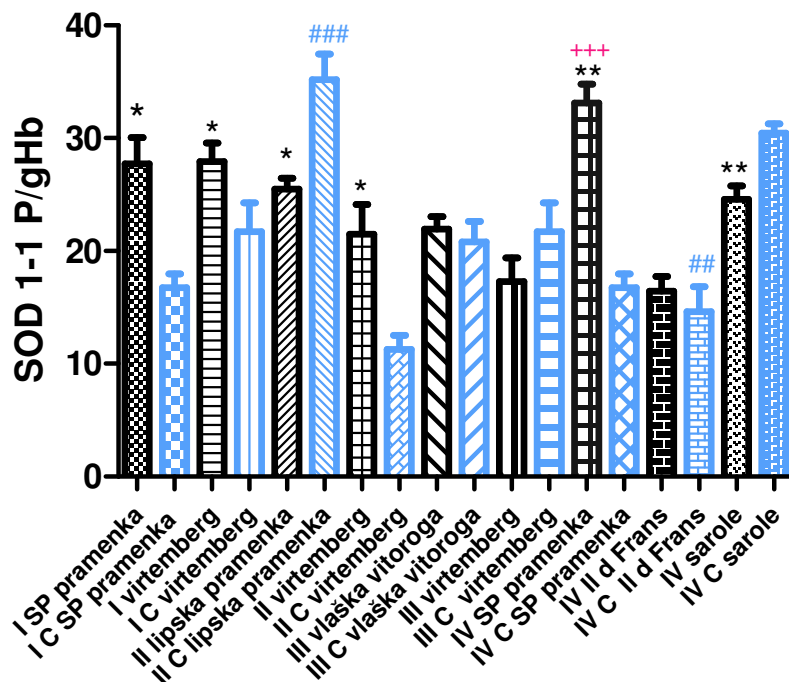


Grafikon 17. Izoenzimska raspodela aktivnosti SOD 1 u eritrocitima Il d frans rase ovaca (IV epizootiološko područje, Obrenovac), a) elektroforegram na 10% PAGE b) denzitogram



Grafikon 18. Izoenzimska raspodela aktivnosti SOD 1 u eritrocitima šarole rase ovaca (IV epizootiološko područje, Obrenovac), a) elektroforegram na 10% PAGE b) denzitogram

Statistička značajnost razlika u aktivnosti izoenzimskog oblika SOD 1-1, inficiranih i kontrolnih grupa, autohtonih i uvezenih rasa ovaca prikazani su na grafikonu 19 i u tabelama 11 i 12.



Grafikon 19. Izoenzimska raspodela aktivnosti SOD 1 u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Legenda: (*) statistički značajna razlika između ogledne i kontrolne grupe ovaca, na nivou: $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; (+) statistički značajna razlika između oglednih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,001^{+++}$; (#) statistički značajna razlika između kontrolnih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,01^{##}$; $p < 0,001^{###}$

Tabela 11. Deskriptivni statistički parametri izoenzimske raspodele aktivnosti enzima SOD 1-1 u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Parametar	Epizootiološko područje								
	I Sjeničko-pešterska visoravan				II selo Lipe - Smederevo				
	sjeničko-pešterska pramenka		virtemberg		lipska pramenka		virtemberg		
SOD 1-1	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{X} (P/gHb)	27.70	16.75	27.92	21.72	25.48	35.18	21.47	11.28	
SD	8.84	2.12	6.67	7.24	1.94	6.85	5.31	2.11	
SE	2.36	1.23	1.67	2.56	0.97	2.28	2.65	1.22	
CV (%)	29.92	12.68	23.90	29.31	7.60	19.48	24.72	18.73	
IV	min	14.32	14.39	16.40	13.36	23.55	27.29	16.11	8.84
	max	44.18	18.51	41.83	36.28	28.13	46.51	28.50	12.52
Mediana	24.71	17.34	28.98	19.37	25.13	36.57	20.63	12.48	

Analizom dobijenih rezultata izoenzimskog oblika SOD 1-1, utvrđeno je da prisutna parazitska infekcija dovodi do indukcije ovog izoenzimskog oblika SOD 1, u odnosu na kontrolnu grupu ovaca, na nivou statističke značajnosti od $p < 0,05$, kod sjeničko-pešterske

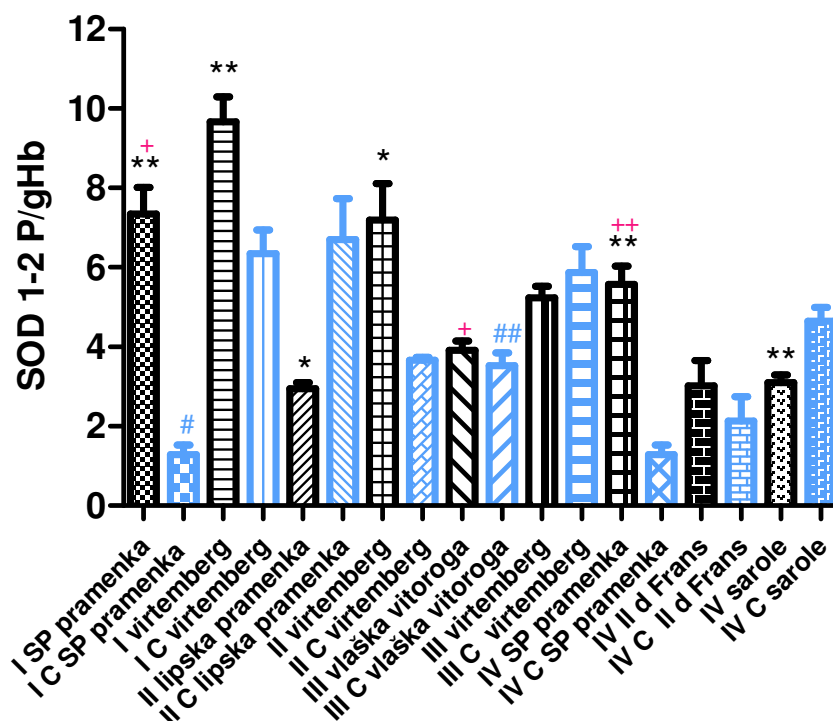
pramenke i virtemberg rase ovaca u I epizootiološkom području, i kod virtemberg rase ovaca u II epizootiološkom području.

Tabela 12. Deskriptivni statistički parametri izoenzimske raspodele aktivnosti enzima SOD 1-1 u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Parametar	Epizootiološko područje										
	III Južni Banat				IV Obrenovac						
	vlaška vitoroga pramenka		virtemberg		sjeničko-peštarska pramenka		il d frans		šarole		
SOD 1-1	O	C	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{X} (P/gHb)	21.96	20.82	17.29	21.72	33.12	16.75	16.46	14.62	24.58	30.44	
SD	3.78	5.10	6.67	7.23	8.04	2.12	5.03	5.48	2.43	1.67	
SE	1.09	1.80	2.10	2.55	1.67	1.22	1.30	2.24	1.22	0.83	
CV (%)	17.23	24.53	28.56	29.31	24.28	12.68	29.60	27.50	9.91	5.49	
IV	min	16.07	9.770	6.500	13.36	17.79	14.39	6.250	5.220	22.47	28.63
	max	29.81	26.25	30.48	36.28	47.32	18.51	28.46	19.74	26.69	32.53
Mediana	21.83	21.92	16.13	19.37	31.70	17.34	16.75	16.65	24.58	30.31	

Interesantno je da je kod lipske pramenke inficirane parazitima utvrđeno smanjenje aktivnosti izoenzima SOD 1-1, u odnosu na kontrolnu grupu, na nivou statističke značajnosti od $p < 0,05$. U IV epizootiološkom području (Obrenovac) kod sjeničko-peštarske pramenke utvrđeno je povećanje aktivnosti SOD 1-1, kod ovaca inficiranih parazitima, u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,01$). Kod šarole rase ovaca, takođe je utvrđeno da prisutna parazitska infekcija dovodi do inhibicije aktivnosti ovog izoenzima, u odnosu na kontrolnu grupu ovaca ($p < 0,01$). Međusobnim poređenjem autohtonih i uvezenih rasa ovaca, samo je u IV epizootiološkom području utvrđeno da postoji razlika u nivou indukcije ovog izoenzima kod sjeničko-peštarske pramenke u odnosu na il d frans i šarole rasu ovaca ($p < 0,001$).

Pored glavnog izoenzinskog oblika superoksid dizmutaze 1, SOD 1-1, dokazana je i druga izoenzimska frakcija, SOD 1-2, kod ispitivanih ovaca. Rezultati relativne raspodele ovog izoenzima, kod autohtonih i uvezenih rasa ovaca po ispitivanim epizootiološkim područjima, prikazani su na grafikonu 20 i u tabelama 13 i 14.



Grafikon 20. Izoenzimska raspodela aktivnosti SOD 1-2 u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Legenda: (*) statistički značajna razlika između ogledne i kontrolne grupe ovaca, na nivou: $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; (+) statistički značajna razlika između oglednih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,05^+$; $p < 0,01^{++}$; (#) statistički značajna razlika između kontrolnih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,05^{\#}$; $p < 0,01^{\#\#}$

Tabela 13. Deskriptivni statistički parametri izoenzimske raspodele aktivnosti enzima SOD 1-2 u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Parametar	Epizootiološko područje								
	I Sjeničko-pešterska visoravan				II selo Lipe - Smederevo				
	sjeničko-pešterska pramenka		virtemberg		lipska pramenka		virtemberg		
SOD 1-2	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{X} (P/gHb)	7.34	1.28	9.66	6.34	2.94	6.70	7.19	3.66	
SD	2.99	0.42	2.52	1.90	0.29	3.09	2.05	0.12	
SE	0.67	0.24	0.63	0.60	0.14	1.03	0.92	0.07	
CV (%)	29.76	27.72	26.10	30.03	10.05	26.22	28.56	3.23	
IV	min	2.97	1.00	4.53	3.01	2.52	3.95	4.35	3.59
	max	14.33	1.77	13.23	8.65	3.21	13.06	9.99	3.80
Mediana	6.98	1.09	8.89	6.30	3.02	6.04	6.90	3.60	

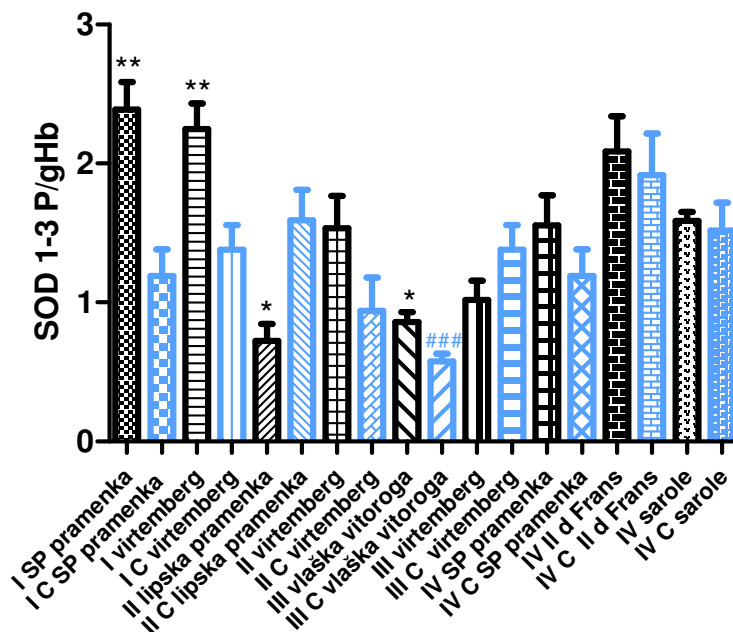
Tabela 14. Deskriptivni statistički parametri izoenzimske raspodele aktivnosti enzima SOD 1-2 u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Parametar	Epizootiološko područje										
	III Južni Banat					IV Obrenovac					
	vlaška vitoroga pramenka		virtemberg		sjeničko-pešterska pramenka		il d frans		šarole		
SOD 1-2	O	C	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{X} (P/gHb)	3.92	3.52	5.23	5.87	5.57	1.28	3.01	2.13	3.10	4.64	
SD	0.77	0.90	0.92	1.83	2.30	0.42	2.48	1.49	0.39	0.70	
SE	0.22	0.32	0.29	0.64	0.46	0.24	0.64	0.61	0.19	0.35	
CV (%)	19.74	25.71	17.62	21.22	21.27	29.72	16.36	14.01	12.66	15.12	
IV	min	3.02	2.73	3.51	3.01	0.45	1.00	1.04	0.51	2.76	4.00
	max	5.46	5.40	6.31	8.60	9.80	1.77	8.10	4.06	3.44	5.56
Mediana	3.78	3.11	5.29	6.21	5.16	1.09	1.49	1.72	3.10	4.50	

Analizom dobijenih rezultata relativne distribucije izoenzima SOD 1-2, u I epizootiološkom području (Sjeničko-pešterska visoravan), dokazana je indukcija ovog izoenzimskog oblika, kod autohtone sjeničko-pešterske pramenke i virtemberg rase ovaca, u prisustvu parazitske infekcije u odnosu na kontrolnu grupu ovaca na nivou statističke značajnosti od $p < 0,01$. Između ispitivanih rasa ovaca utvrđeno je statistički značajno povećanje aktivnosti SOD 1-2 kod virtemberg rase u odnosu na sjeničko-peštersku pramenku ($p < 0,05$). Kod kontrolnih grupa ovaca, takođe je utvrđena statistički veća prisutnost ovog izoenzima kod virtemberg rase u odnosu na sjeničko-peštersku pramenku ($p < 0,05$). U II epizootiološkom području, kod lipske pramenke, u prisustvu parazitske infekcije, utvrđeno je smanjenje ovog izoenzima u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,05$), dok je kod virtemberg rase dokazano povećanje SOD 1-2, u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,05$). U III epizootiološkom području, kod oglednih i kontrolnih grupa, vlaške vitoroge i virtemberg rase ovaca, nije utvrđena statistički značajna razlika. Međutim, kod ogledne grupe virtemberg rase ovaca registrovana je veća aktivnost ovog izoenzima u odnosu na vlašku vitorogu pramenku na nivou statističke značajnosti od $p < 0,05$. Kod kontrolnih grupa ovaca, u ovom epizootiološkom području utvrđena je statistički značajno veća aktivnost kod virtemberg rase u odnosu na vlašku vitorogu pramenku ($p < 0,01$). U IV epizootiološkom području, statistički značajno povećanje aktivnosti SOD 1-2 utvrđeno je samo kod sjeničko-pešterske pramenke inficirane parazitima u odnosu na kontrolnu grupu ovaca, na nivou od $p < 0,01$. Isti nivo statističke značajnosti razlika, ali u smislu smanjenja aktivnosti ovog izoenzima, utvrđen je kod šarole rase ovaca inficiranih parazitima, u

odnosu na kontrolnu grupu. Međusobnim poređenjem aktivnosti SOD 1-2, kod ispitivanih rasa ovaca u IV epizootiološkom području, jedino je kod sjeničko-peštarske pramenke u odnosu na il d frans rasu, utvrđena njegoja statistički značajno veća aktivnost na nivou $p < 0,01$.

Rezultati izoenzimske raspodele SOD 1-3 prikazani su na grafikonu 21 i u tabelama 15 i 16.



Grafikon 21. Izoenzimska raspodela aktivnosti SOD 1-3 u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Legenda: (*) statistički značajna razlika između ogledne i kontrolne grupe ovaca, na nivou: $p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***; (#) statistički značajna razlika između kontrolnih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,001$ ###

Tabela 15. Deskriptivni statistički parametri izoenzimske raspodele aktivnosti enzima SOD 1-3 u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

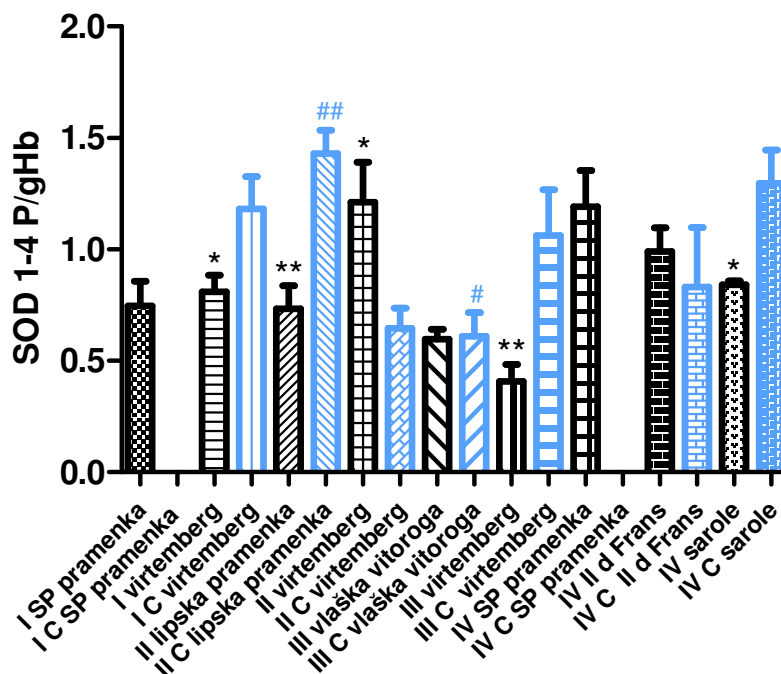
Parametar	Epizootiološko područje								
	I Sjeničko-peštarska visoravan				II selo Lipe - Smederevo				
	sjeničko-peštarska pramenka		virttemberg		lipska pramenka		virttemberg		
SOD 1-3	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{X} (P/gHb)	2.39	1.19	2.25	1.38	0.723	1.59	1.53	0.94	
SD	0.82	0.33	0.72	0.53	0.25	0.66	0.46	0.47	
SE	0.19	0.19	0.18	0.18	0.12	0.22	0.23	0.23	
CV (%)	23.45	27.86	23.38	29.01	24.54	21.55	20.13	29.64	
IV	min	1.17	0.96	0.87	0.80	0.36	0.84	1.11	0.52
	max	3.98	1.57	3.46	2.59	0.91	3.06	1.95	1.62
Mediana	2.50	1.04	2.23	1.35	0.81	1.45	1.54	0.81	

Tabela 16. Deskriptivni statistički parametri izoenzimske raspodele aktivnosti enzima SOD 1-3 u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Parametar	Epizootiološko područje										
	III Južni Banat				IV Obrenovac						
	vlaška vitoroga pramenka		virtemberg		sjeničko-pešterska pramenka		il d frans		šarole		
	O	C	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{X} (P/gHb)	0.86	0.58	1.02	1.38	1.55	1.19	2.08	1.91	1.58	1.52	
SD	0.24	0.15	0.43	0.53	1.09	0.33	0.88	0.67	0.13	0.39	
SE	0.07	0.05	0.13	0.17	0.21	0.19	0.25	0.29	0.06	0.19	
CV (%)	28.79	26.06	22.21	29.01	29.26	27.86	22.28	30.00	8.38	26.05	
IV	min	0.54	0.36	0.51	0.80	0.35	0.96	0.67	1.25	1.47	0.93
	max	1.21	0.77	1.70	2.59	4.39	1.57	3.29	2.78	1.70	1.78
Mediana	0.80	0.53	0.88	1.35	1.13	1.04	2.27	1.82	1.58	1.68	

Analizom dobijenih rezultata utvrđeno je da kod ispitivanih ovaca usled prisutne parazitske infekcije, u I epizootiološkom području, dolazi do povećanja aktivnosti izoenzima SOD 1-3, na nivou statističke značajnosti od $p < 0,01$ kod virtemberg ovaca u odnosu na kontrolnu grupu. Kod lipske pramenke, u II epizootiološkom području, utvrđeno je smanjenje aktivnosti ovog izoenzima u prisustvu parazitske infekcije u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,05$). U III epizootiološkom području dokazano je povećanje aktivnosti SOD 1-3 kod vlaške vitoroge ovce inficirane parazitima u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,05$), dok je kod virtemberg rase dokazano smanjenje u odnosu na kontrolnu grupu, ali bez statističke značajnosti razlika. Karakteristično je da je kod kontrolne grupe vlaško vitoroge ovce utvrđena statistički značajno manja aktivnost SOD 1-3 u odnosu na kontrolnu grupu virtemberg rase ovaca ($p < 0,001$). U IV epizootiološkom području utvrđeno je povećanje aktivnosti ovog izoenzima u prisustvu parazitske infekcije, ali bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolnu grupu ovaca.

Rezultati izoenzimske raspodele aktivnosti SOD 1-4 prikazani su na grafikonu 22 i u tabelama 17 i 18.



Grafikon 22. Izoenzimska raspodela aktivnosti SOD 1-4 u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Legenda: (*) statistički značajna razlika između ogledne i kontrolne grupe ovaca, na nivou: $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; (#) statistički značajna razlika između kontrolnih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,05^{\#}$; $p < 0,01^{\#\#}$

Tabela 17. Deskriptivni statistički parametri izoenzimske raspodele aktivnosti enzima SOD 1-4 u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Parametar	Epizootiološko područje								
	I Sjeničko-pešterska visoravan				II selo Lipe - Smederevo				
	sjeničko-pešterska pramenka		virtemberg		lipska pramenka		virtemberg		
	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{X} (P/gHb)	0.74	/	0.80	1.18	0.73	1.43	1.21	0.64	
SD	0.49	/	0.30	0.45	0.20	0.28	0.36	0.15	
SE	0.10	/	0.07	0.14	0.10	0.10	0.18	0.09	
CV (%)	25.78	/	27.08	28.86	28.14	19.67	29.81	24.02	
IV	min	0.01	/	0.33	0.36	0.61	1.13	0.82	0.52
	max	1.74	/	1.50	1.82	1.04	1.95	1.63	0.82
Mediana	0.68	/	0.76	1.25	0.64	1.42	1.19	0.60	

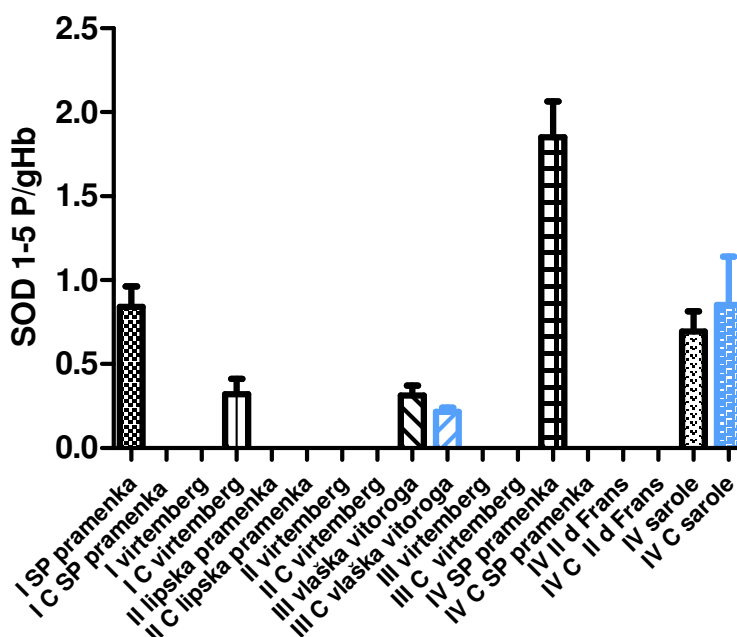
Analizom dobijenih rezultata utvrđeno je da kod sjeničko-pešterske pramenke dolazi do indukcije izoenzima SOD 1-4 u prisustvu parazitske infekcije, u I i IV epizootiološkom području. Kod kontrolnih grupa ovih ovaca nije dokazano prisustvo ovog izoenzima.

Tabela 18. Deskriptivni statistički parametri izoenzimske raspodele aktivnosti enzima SOD 1-4 u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Parametar	Epizootiološko područje										
	III Južni Banat					IV Obrenovac					
	vlaška vitoroga pramenka		virtemberg			sjeničko-pešterska pramenka		il d frans		šarole	
SOD 1-4	O	C	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{X} (P/gHb)	0.59	0.60	0.40	1.06	1.19	/	0.99	0.83	0.84	1.29	
SD	0.15	0.30	0.23	0.50	0.815	/	0.40	0.65	0.03	0.30	
SE	0.04	0.10	0.07	0.20	0.16	/	0.10	0.26	0.02	0.15	
CV (%)	26.23	29.56	28.40	27.32	28.42	/	29.86	28.53	4.12	23.22	
IV	min	0.24	0.31	0.06	0.36	0.10	/	0.21	0.28	0.81	0.88
	max	0.79	1.21	0.76	1.73	3.27	/	1.49	2.09	0.87	1.60
Mediana	0.61	0.47	0.42	1.19	0.92	/	1.04	0.62	0.84	1.35	

Kod ovaca virtemberg rase, u I i III epizootiološkom području, dolazi do smanjenja aktivnosti SOD 1-4 u prisustvu parazitske infekcije na nivou statističke značajnosti od $p < 0,05$ i $p < 0,01$, u odnosu na kontrolne grupe ovaca. Kod šarole rase ovaca (IV epizootiološko područje) utvrđeno je smanjenje aktivnosti ovog izoenzima u prisustvu parazitske infekcije u odnosu na kontrolnu grupu ovaca ($p < 0,05$).

Rezultati izoenzimske raspodele SOD 1-5 kod autohtonih i uvezenih rasa ovaca prikazani su na grafikonu 23 i u tabelama 19 i 20.



Grafikon 23. Izoenzimska raspodela aktivnosti SOD 1-5 u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Tabela 19. Deskriptivni statistički parametri izoenzimske raspodele aktivnosti enzima SOD 1-5 u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Parametar	Epizootiološko područje							
	I Sjeničko-pešterska visoravan				II selo Lipe - Smederevo			
SOD 1-5	sjeničko-pešterska pramenka		virtemberg		lipska pramenka		virtemberg	
	O	C	O	C	O	C	O	C
\bar{X} (P/gHb)	0.84	/	0.32	/	/	/	/	/
SD	0.36	/	0.15	/	/	/	/	/
SE	0.12	/	0.09	/	/	/	/	/
CV (%)	23.7	/	29.1	/	/	/	/	/
IV	min	0.39	/	0,21	/	/	/	/
	max	1.66	/	0,50	/	/	/	/
Mediana	0.72	/	0.25	/	/	/	/	/

Tabela 20. Deskriptivni statistički parametri izoenzimske raspodele aktivnosti enzima SOD 1-5 u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

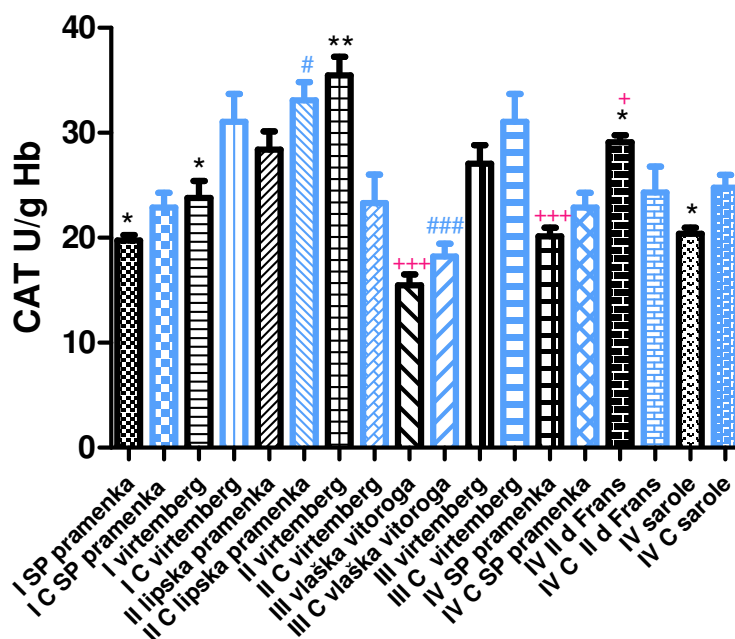
Parametar	Epizootiološko područje									
	III Južni Banat				IV Obrenovac					
SOD 1-5	vlaška vitoroga pramenka		virtemberg		sjeničko-pešterska pramenka		il d frans		šarole	
	O	C	O	C	O	C	O	C	O	C
\bar{X} (P/gHb)	0.31	0.21	/	/	1.85	/	/	/	0.69	0.85
SD	0.19	0.06	/	/	0.47	/	/	/	0.26	0.49
SE	0.06	0.02	/	/	0.21	/	/	/	0.12	0.28
CV (%)	21.24	28.93	/	/	25.77	/	/	/	28.28	28.36
IV	min	0.09	0.11	/	/	1.43	/	/	0.46	0.45
	max	0.61	0.29	/	/	2.52	/	/	1.12	1.41
Mediana	0.27	0.23	/	/	1.59	/	/	/	0.70	0.70

Analizom dobijenih rezultata utvrđena je indukcija izoenzima SOD 1-5 od 100% usled prisustva parazitske infekcije kod sjeničko-pešterske pramenke (I i IV epizootiološko područje) i virtemberg rase ovaca (I epizootiološko područje). Kod vlaške vitoroge pramenke dokazano je povećanje aktivnosti ovog izoenzima, a kod šarole rase ovaca smanjenje, u odnosu na kontrolne grupe ovaca, ali bez statističke značajnosti. Kod ostalih ispitivanih ovaca nije utvrđeno postojanje SOD 1-5 izoenzimskog oblika.

5.2.2. Aktivnost enzima katalaze u eritrocitima ispitivanih ovaca

Katalaza je enzim koji katalizuje razgradnju vodonik-peroksida do vode i molekuskog kiseonika. Rezultati analize aktivnosti ovog enzima u eritrocitima, kao i nivoi

statističke značajnosti razlika, kod autohtonih i uvezenih rasa ovaca, po ispitivanim epizootiološkim područjima, prikazani su na grafikonu 24 i u tabelama 21 i 22.



Grafikon 24. Ukupna aktivnost enzima CAT u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Legenda: (*) statistički značajna razlika između ogledne i kontrolne grupe ovaca, na nivou: $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; (+) statistički značajna razlika između oglednih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,05^+$; $p < 0,001^{+++}$; (#) statistički značajna razlika između kontrolnih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,05^{\#}$; $p < 0,001^{###}$

Tabela 21. Deskriptivni statistički parametri ukupne aktivnosti enzima CAT u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Parametar	Epizootiološko područje								
	I Sjeničko-pešterska visoravan				II selo Lipe - Smederevo				
	sjeničko-pešterska pramenka		virttemberg		lipska pramenka		virttemberg		
CAT	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{X} (U/gHb)	19.75	22.87	23.77	31.04	28.42	33.07	35.47	23.31	
SD	2.21	2.84	6.57	6.57	2.98	5.63	4.00	4.661	
SE	0.51	1.42	1.64	2.68	1.72	1.78	1.79	2.691	
CV (%)	11.21	12.43	27.66	21.19	10.49	17.05	11.29	20.00	
IV	min	15.14	20.49	16.32	22.38	25.56	24.83	29.40	18.12
	max	23.54	26.99	41.38	38.33	31.51	40.41	40.50	27.14
Mediana	19.48	22.00	23.59	32.14	28.18	32.85	35.32	24.67	

Analizom aktivnosti katalaze uočava se da dolazi do inhibicije aktivnosti ovog enzima usled prisustva parazitske infekcije, kod svih ispitivanih ovaca, osim kod virttemberg rase ovaca ($p < 0,01$) u II epizootiološkom području i il d frans ovaca u IV

epizootiološkom području ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu, gde je uočeno povećanje aktivnosti.

Tabela 22. Deskriptivni statistički parametri ukupne aktivnosti enzima CAT u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Parametar	Epizootiološko područje										
	III Južni Banat				IV Obrenovac						
	vlaška vitoroga pramenka		virtemberg		sjeničko-peštarska pramenka		il d frans		šarole		
CAT	O	C	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{X} (U/gHb)	15.48	18.21	27.04	31.04	20.15	22.87	29.13	24.31	20.38	24.77	
SD	3.15	4.31	5.92	6.57	4.02	2.84	2.34	6.52	1.00	2.464	
SE	1.05	1.24	1.78	2.68	0.81	1.42	0.65	2.46	0.577	1.23	
CV (%)	20.39	23.71	21.89	21.19	19.97	12.43	8.04	26.85	4.91	9.95	
IV	min	9.70	12.15	18.06	22.38	12.00	20.49	25.95	12.43	19.38	22.53
	max	18.93	29.42	38.45	38.33	26.12	26.99	35.17	31.62	21.38	27.54
Mediana	16.63	17.76	26.82	32.14	19.15	22.00	28.41	24.31	20.38	24.50	

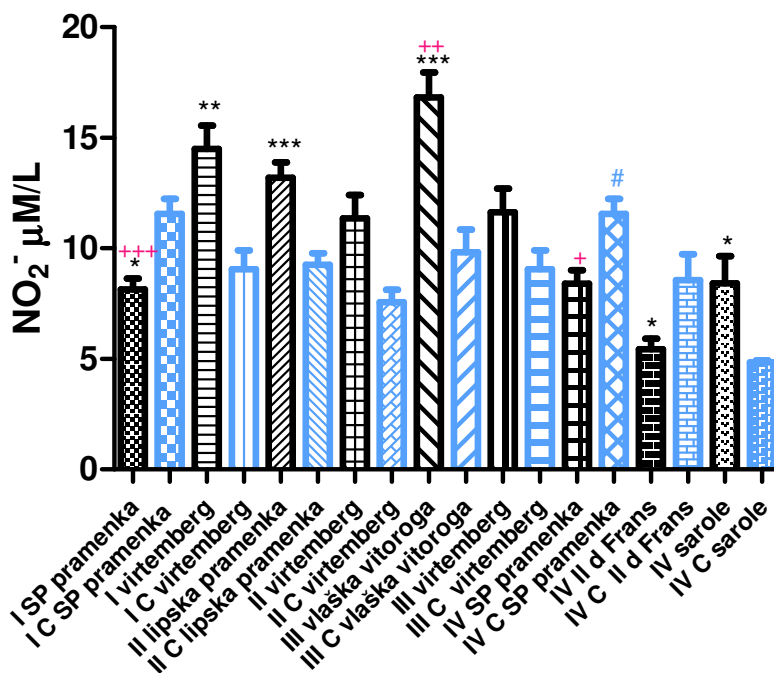
U III epizootiološkom području, kod autohtone vlaške vitoroge pramenke utvrđeno je smanjenje aktivnosti katalaze u odnosu na virtemberg rasu ovaca, i kod oglednih i kontrolnih grupa, na nivou statističke značajnosti od $p < 0,001$. U IV epizootiološkom području utvrđeno je smanjenje aktivnosti katalaze kod sjeničko-peštarske pramenke u odnosu na il d frans, na nivou statističke značajnosti od $p < 0,001$. Između il d frans i šarole ovaca smanjenje aktivnosti katalaze je bilo na nivou statističke značajnosti razlika od $p < 0,05$. Između kontrolnih grupa ovaca, u okviru istog epizootiološkog područja, jedino je kod lipske pramenke dokazana povećana aktivnost katalaze u odnosu na virtemberg rasu ovaca ($p < 0,05$), dok je kod vlaške vitoroge utvrđeno smanjenje aktivnosti u odnosu na virtemberg rasu ovaca ($p < 0,001$).

5.2.3. Rezultati analize koncentracije nitrata u krvnoj plazmi ispitivanih ovaca

Da bi utvrdili da li prisustvo parazita dovodi do produkcije RNS, analizirana je koncentracija nitrata u krvnoj plazmi autohtonih i uvezenih rasa ovaca. Rezultati analize prikazani su na grafikonu 25 i u tabelama 23 i 24.

Analizom koncentracije nitrata u krvnoj plazmi uočen je različit odgovor kod ispitivanih grupa ovaca. Interesantno je da su kod sjeničko-peštarske pramenke u I i IV epizootiološkom području, kao i kod il d frans rase (IV epizootiološko područje)

registrovan pad koncentracije nitrita, u odnosu na njihove kontrolne grupe, pri istoj vrsti parazitske infekcije. Kod svih ostalih ispitivanih rasa/sojeva ovaca utvrđen je porast koncentracije nitrita u prisustvu parazitske infekcije, u odnosu na vrednosti nitrita kontrolnih grupa.



Grafikon 25. Koncentracija nitrita u krvnoj plazmi autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Legenda: (*) statistički značajna razlika između ogledne i kontrolne grupe ovaca, na nivou: $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$; (+) statistički značajna razlika između oglednih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,01^{++}$; $p < 0,001^{+++}$; (#) statistički značajna razlika između kontrolnih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,05^{\#}$

Tabela 23. Deskriptivni statistički parametri koncentracije nitrita u krvnoj plazmi autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Parametar	Epizootiološko područje								
	I Sjeničko-pešterska visoravan				II selo Lipe - Smederevo				
	sjeničko-pešterska pramenka		virtemberg		lipska pramenka		virtemberg		
NO_2^-	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{X} ($\mu\text{M/L}$)	8.15	11.56	14.50	9.05	13.20	9.25	11.36	7.56	
SD	2.20	1.18	4.24	2.547	1.55	1.45	2.10	0.79	
SE	0.49	0.68	1.06	0.85	0.69	0.51	1.05	0.56	
CV (%)	27.11	10.22	29.30	28.12	11.76	15.76	18.52	10.56	
IV	min	4.68	10.63	8.660	5.30	11.36	7.00	9.58	7.00
	max	14.76	12.89	22.57	12.89	15.55	10.91	14.26	8.13
Mediana	8.06	11.16	14.00	9.87	12.97	9.42	10.80	7.56	

Pomenuti pad koncentracije nitrita kod sjeničko-peštarske pramenke u I epizootiološkom području, bio je na nivou statističke značajnosti od $p < 0,05$, u odnosu na kontrolnu grupu. U istom području, utvrđen je porast koncentracije nitrita kod virtemberg rase, na nivou statističke značajnosti od $p < 0,01$, u odnosu na kontrolnu grupu ovaca.

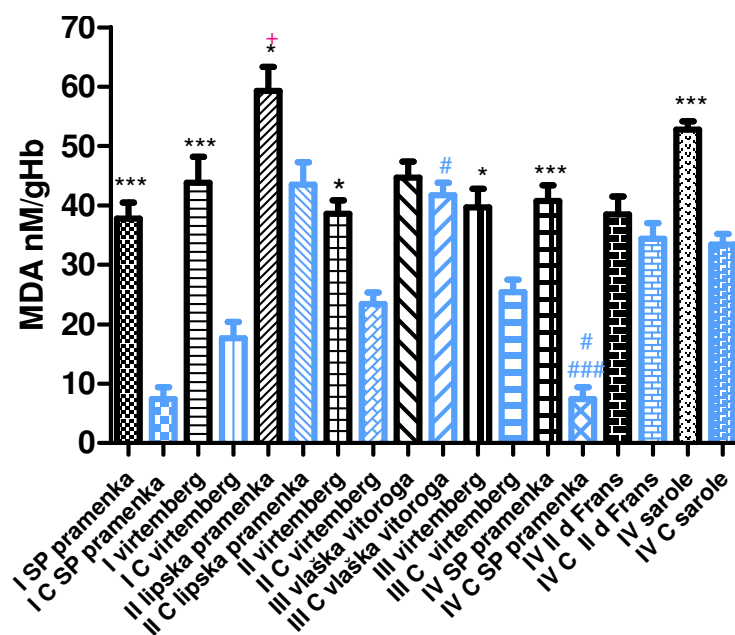
Tabela 24. Deskriptivni statistički parametri koncentracije nitrita u krvnoj plazmi autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Parametar	Epizootiološko područje										
	III Južni Banat				IV Obrenovac						
	vlaška vitoroga pramenka		virtemberg		sjeničko-peštarska pramenka		il d frans		šarole		
NO ₂ ⁻	O	C	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{X} (μM/L)	16.83	9.83	11.63	9.06	8.41	11.56	5.43	8.56	8.43	4.83	
SD	3.57	3.22	3.03	2.54	2.99	1.18	1.69	3.33	2.43	0.19	
SE	1.13	1.018	1.07	0.85	0.59	0.68	0.47	1.18	1.21	0.09	
CV (%)	21.24	29.75	26.10	28.12	29.59	10.22	28.23	28.91	28.80	3.94	
IV	min	10.71	6.86	7.15	5.30	4.06	10.63	2.59	3.51	6.72	4.67
	max	23.57	16.14	16.35	12.89	15.98	12.89	8.14	12.41	11.90	5.00
Mediana	17.57	9.00	11.34	9.87	7.60	11.16	5.00	8.56	7.56	4.83	

Međusobnim poređenjem vrednosti nitrita oglednih grupa ovaca, u ovom epizootiološkom području, utvrđeno je da ista vrsta parazitske infekcije, kod virtemberg rase ovaca uzrokuje značajno veću produkciju nitrita ($p < 0,001$). Između kontrolnih grupa ovaca nisu utvrđene razlike u koncentraciji nitrita ($p > 0,05$). Kod lipske pramenke, u II epizootiološkom području, utvrđene su više koncentracije nitrita u odnosu na virtemberg rasu ovaca ($p < 0,001$), i pored činjenice da ekstenzitet i intenzitet parazitske infekcije bio manji kod lipske pramenke. U III epizootiološkom području, kod vlaške vitoroge pramenke vrednosti koncentracije nitrita bile su statistički značajno veće u odnosu na kontrolnu grupu ovaca ($p < 0,001$). Međusobnim poređenjem rasa, u ovom epizootiološkom području, utvrđene su statistički značajno veće vrednosti kod autohtone rase u odnosu na virtemberg rasu ovaca ($p < 0,01$). Razlog za ovakav nalaz je verovatno nešto veće prisustvo infekcije sa *D. dendriticum* kod vlaške vitoroge pramenke. Kod sjeničko-peštarske pramenke, u IV epizootiološkom području, vrednosti koncentracije nitrita bile su statistički značajno veće od vrednosti utvrđenih kod il d frans ovaca ($p < 0,05$). Kod šarole rase ovaca vrednosti nitrita bile su statistički značajno veće u prisustvu infekcije sa plućnim vlašcima ($p < 0,05$), u odnosu na kontrolnu grupu, i bez statističke značajnosti razlika u odnosu na sjeničko-peštarsku pramenku i il d frans, sa istog epizootiološkog područja.

5.2.4. Rezultati analize peroksidacije lipida u krvnoj plazmi ispitivanih ovaca

Na dejstvo ROS i RNS posebno su osetljive nezasićene masne kiseline koje ulaze u sastav ćelijske membrane. Kao krajnji proizvod, „agresivnog“ dejstva reaktivnih kiseoničnih i azotovih vrsta na polinezasićene masne kiseline, u toku procesa označenog kao lipidna peroksidacija, nastaje MDA. Vrednosti koncentracije ovog parametra u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca prikazani su na grafikonu 26 i u tabelama 25 i 26.



Grafikon 26. Koncentracija MDA u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Legenda: (*) statistički značajna razlika između ogledne i kontrolne grupe ovaca, na nivou: $p < 0,05^*$; $p < 0,001^{***}$; (+) statistički značajna razlika između oglednih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,05^+$; (#) statistički značajna razlika između kontrolnih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,05^{\#}$; $p < 0,001^{###}$

Tabela 25. Deskriptivni statistički parametri koncentracije MDA u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Parametar	Epizootiološko područje								
	I Sjeničko-pešterska visoravan				II selo Lipe - Smederevo				
	sjeničko-pešterska pramenka		virttemberg		lipska pramenka		virttemberg		
MDA	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{X} (nM/gHb)	37.78	7.415	43.85	17.67	59.29	43.50	38.57	23.44	
SD	12.16	4.91	14.48	6.73	10.61	10.02	4.640	2.71	
SE	2.72	2.00	4.36	2.75	4.01	3.79	2.32	1.92	
CV (%)	22.19	26.17	23.01	28.12	17.89	23.04	12.03	11.56	
IV	min	22.88	2.05	27.31	10.74	46.75	28.59	32.49	21.52
	max	73.68	15.02	70.33	24.49	77.18	54.74	42.43	25.35
Mediana	35.16	5.435	41.22	17.66	60.68	46.37	39.67	23.44	

Analizom koncentracije MDA uočava se porast vrednosti ovog parametra u prisustvu parazitske infekcije, kako kod autohtonih tako i kod uvezenih rasa ovaca, u odnosu na kontrolne grupe ovaca.

Tabela 26. Deskriptivni statistički parametri koncentracije MDA u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Parametar	Epizootiološko područje										
	III Južni Banat				IV Obrenovac						
	vlaška vitoroga pramenka		virtemberg		sjeničko-pešterska pramenka		il d frans		šarole		
MDA	O	C	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{X} (nM/gHb)	44.70	41.73	39.67	25.42	40.73	7.415	38.46	34.41	52.76	33.45	
SD	8.09	7.32	9.79	3.59	13.58	4.91	10.48	7.73	2.39	2.99	
SE	2.69	2.11	3.09	2.07	2.61	2.00	3.02	2.58	1.38	1.73	
CV (%)	18.10	17.55	24.69	14.12	23.34	26.17	27.24	22.48	4.54	8.95	
IV	min	37.63	29.69	25.78	22.63	16.17	2.05	24.73	22.59	50.00	30.00
	max	62.21	58.12	54.35	29.47	67.57	15.02	56.64	43.51	54.26	35.30
Mediana	39.80	41.80	39.59	24.16	43.60	5.435	37.16	33.79	54.02	35.06	

Nivoi statističke značajnosti razlika prikazani su na grafikonu 26. Poređenjem koncentracije MDA između autohtonih i uvezenih rasa ovaca unutar istog epizootiološkog područja, jedino su kod lipske pramenke utvrđene statistički značajno veće vrednosti u odnosu na virtemberg rasu ovaca ($p < 0,05$). Može se uočiti da je nivo lipidne peroksidacije kontrolnih grupa uvezenih rasa ovaca veći pod fiziološkim uslovima, u odnosu na kontrolne grupe autohtonih rasa ovaca.

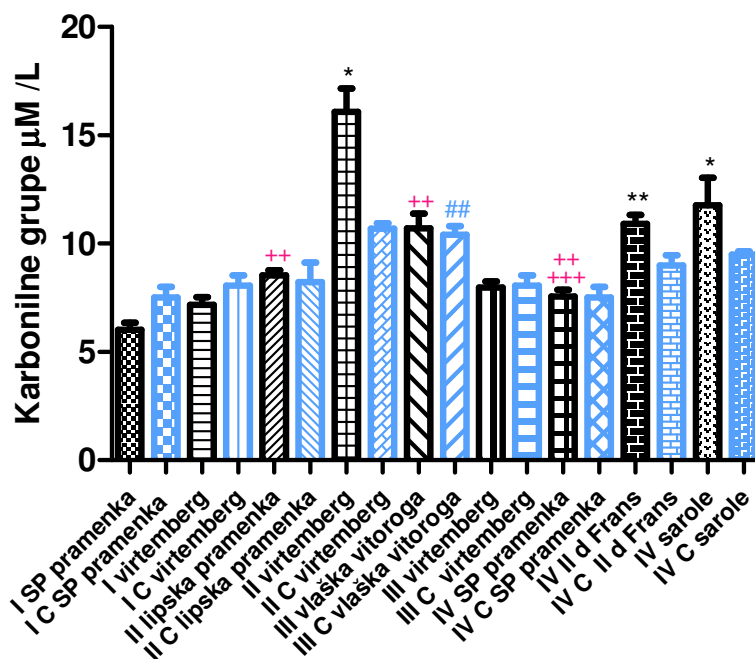
5.2.5. Rezultati analize oksidativnih modifikacija proteina

5.2.5.1. Odredjivanje koncentracije karbonilnih grupa

Pored lipida, i druge vrste biomakromolekula predstavljaju „target“ molekule za ROS i RNS. Step en oštećenja proteina utvrđen je određivanjem koncentracija karbonilnih i tiolnih grupa. Rezultati ovih analiza prikazani su na grafikonima 27 i 28 i u tabelama od 27 do 30.

Analizom rezultata koncentracije karbonilnih grupa u krvnoj plazmi ovaca, po ispitivanim epizootiološkim područjima može se primetiti da su proteini, kao vrsta biomakromolekula manje osetljivi u odnosu na lipide na dejstvo ROS i RNS. Takođe, treba

imati u vidu, da ova ispitivanja predstavljaju transversalni presek stanja oksidativnog stresa izazvanog prisustvom parazitske infekcije, a ne longitudinalni, u organizmu ovaca. Naime, nepoznavanje tačnog momenta nastanka parazitske infekcije predstavlja limitirajući faktor u proceni oksidativnih modifikacija proteina.



Grafikon 27. Koncentracija karbonilnih grupa u krvnoj plazmi autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Legenda: (*) statistički značajna razlika između ogledne i kontrolne grupe ovaca, na nivou: $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; (+) statistički značajna razlika između oglednih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,01^{++}$; $p < 0,001^{+++}$; (#) statistički značajna razlika između kontrolnih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,01^{\#}$

Tabela 27. Deskriptivni statistički parametri koncentracije karbonilnih grupa u krvnoj plazmi autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Parametar	Epizootiološko područje								
	I Sjeničko-peštarska visoravan				II selo Lipe - Smederevo				
	sjeničko-peštarska pramenka		virtemberg		lipska pramenka		virtemberg		
Karbonilne grupe	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{X} (µM/L)	6.02	7.50	7.16	8.05	8.54	8.23	16.07	10.70	
SD	1.34	0.71	1.41	1.52	0.39	2.68	1.87	0.35	
SE	0.32	0.50	0.35	0.48	0.22	0.89	1.08	0.25	
CV (%)	22.22	9.43	19.65	18.91	4.60	32.62	11.62	3.30	
IV	min	3.55	7.00	5.32	5.73	8.09	5.41	14.27	10.45
	max	8.32	8.00	9.32	10.14	8.77	13.04	18.00	10.95
Mediana	6.20	7.50	7.16	8.00	8.37	7.23	15.95	10.70	

U svakom slučaju, evidentan je porast broja karbonilnih grupa kod virtemberg rase ovaca, u drugom epizootiološkom području, u odnosu, kako na svoju kontrolnu grupu ($p < 0,05$), tako i u odnosu na autohtonu lipsku pramenku ($p < 0,01$). Kod vlaške vitoroge pramenke utvrđen je preko koncentracije karbonilnih grupa, veći stepen oksidativnog oštećenja proteina, u odnosu virtemberg rasu ovaca ($p < 0,01$), u istom epizootiološkom području.

Tabela 28. Deskriptivni statistički parametri koncentracije karbonilnih grupa u krvnoj plazmi autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

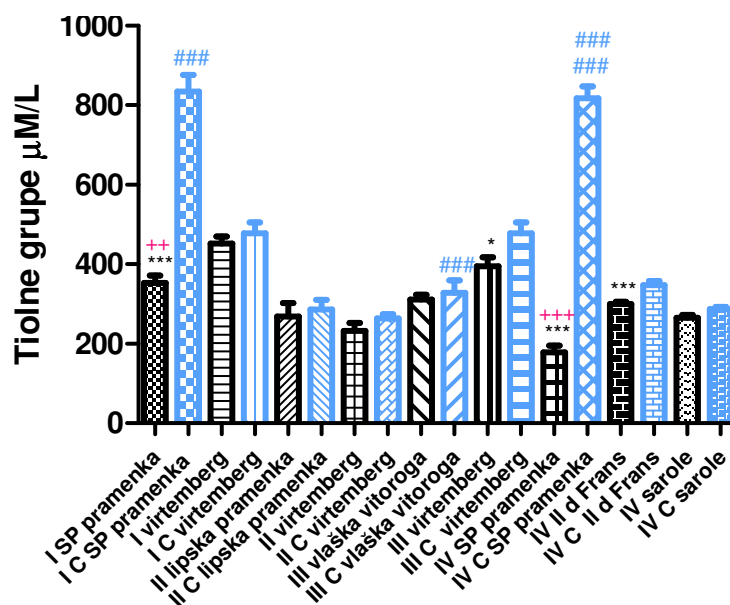
Parametar	Epizootiološko područje										
	III Južni Banat				IV Obrenovac						
	vlaška vitoroga pramenka		virtemberg		sjeničko-peštarska pramenka		il d frans		šarole		
Karbonilne grupe	O	C	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{X} ($\mu\text{M/L}$)	10.71	10.42	7.98	8.05	7.56	7.50	10.90	8.98	11.77	9.48	
SD	1.78	1.44	0.87	1.52	1.57	0.71	1.45	1.43	1.79	0.31	
SE	0.67	0.39	0.27	0.48	0.30	0.50	0.42	0.47	1.27	0.15	
CV (%)	16.69	13.83	10.89	18.91	20.80	9.43	13.36	15.93	15.26	3.30	
IV	min	8.68	8.41	7.14	5.73	4.77	7.00	8.68	5.90	10.50	9.23
	max	13.05	12.23	10.09	10.14	10.86	8.00	12.82	10.64	13.04	9.91
Mediana	10.50	10.59	7.88	8.00	7.27	7.50	11.23	9.04	11.77	9.40	

Međutim, treba primetiti da su vrednosti koncentracije karbonilnih grupa kod kontrolne grupe vlaške vitoroge pramenke na istom nivou statističke značajnosti u odnosu na kontrolnu grupu virtemberg rase ovaca ($p < 0,01$). U četvrtom epizootiološkom području, koncentracija karbonilnih grupa bila je statistički značajno niža u odnosu na il d frans ($p < 0,001$) i šarole rasu ovaca ($p < 0,01$). Pri tome, nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentraciji karbonilnih grupa između kontrolne grupe sjeničko-peštarske pramenke i grupe inficirane parazitima ($p > 0,05$).

5.2.5.2. Određivanje koncentracije tiolnih grupa

Analizom rezultata koncentracije tiolnih grupa uočava se njihov pad kao posledica prisustva parazitske infekcije kod ispitivanih ovaca. Kod sjeničko-peštarske pramenke, u I epizootiološkom području pad koncentracije SH grupa u odnosu na kontrolnu grupu bilo je na nivou statističke značajnosti od $p < 0,001$, a u odnosu na virtemberg rasu ovaca na nivou statističke značajnosti od $p < 0,01$. Kontrolne grupe ovaca, u ovom epizootiološkom

području, razlikovale su se u koncentraciji tiolnih grupa na nivou $p < 0,001$. U trećem epizootiološkom području, između ogledne i kontrolne grupe vlaške vitoroge pramenke nije postojala statistički značajna razlika ($p > 0,05$). Kod autohtonog soja vlaške vitoroge pramenke uočeno je smanjenje koncentracije tiolnih grupa u odnosu na virtemberg rasu, sa istog epizootiološkog područja, na nivou statističke značajnosti od $p < 0,05$. Između kontrolnih grupa ovih rasa ovaca utvrđene su niže vrednosti tiolnih grupa kod vlaške vitoroge pramenke ($p < 0,001$).



Grafikon 28. Koncentracija tiolnih grupa u krvnoj plazmi autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Legenda: (*) statistički značajna razlika između ogledne i kontrolne grupe ovaca, na nivou: $p < 0,05^*$; $p < 0,001^{***}$; (+) statistički značajna razlika između oglednih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,01^{++}$; $p < 0,001^{+++}$; (#) statistički značajna razlika između kontrolnih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,001^{###}$

Tabela 29. Deskriptivni statistički parametri koncentracije tiolnih grupa u krvnoj plazmi autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Parametar	Epizootiološko područje								
	I Sjeničko-pešterska visoravan				II selo Lipe - Smederevo				
	sjeničko-pešterska pramenka		virtemberg		lipska pramenka		virtemberg		
Tiolne grupe	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{X} (µM/L)	353.0	834.2	451.9	478.3	268.4	286.3	232.4	263.8	
SD	82.96	59.83	72.93	86.91	75.84	67.33	52.26	32.23	
SE	18.55	42.30	17.69	27.48	33.92	23.81	19.75	10.74	
CV (%)	23.50	7.17	16.14	18.17	28.26	23.52	22.49	12.22	
IV	min	255.0	791.9	341.0	369.0	182.0	185.0	165.0	206.0
	max	629.0	876.5	634.0	635.0	335.0	403.0	292.0	313.0
Mediana	342.0	834.2	445.0	444.5	303.0	281.0	256.0	268.0	

U četvrtom epizootiološkom području, kod sjeničko-peštarske pramenke utvrđeno je smanjenje koncentracije tiolnih grupa usled prisustva parazitske infekcije ($p < 0,001$), u odnosu na kontrolnu grupu ovaca.

Tabela 30. Deskriptivni statistički parametri koncentracije tiolnih grupa u krvnoj plazmi autohtonih i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim epizootiološkim područjima

Parametar	Epizootiološko područje										
	III Južni Banat				IV Obrenovac						
	vlaška vitoroga pramenka		virtemberg		sjeničko-peštarska pramenka		il d frans		šarole		
Tiolne grupe	O	C	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{X} ($\mu\text{M/L}$)	178.5	816.8	299.9	347.4	265.0	287.0	178.5	816.8	299.9	347.4	
SD	87.89	51.93	21.34	27.47	11.31	11.14	87.89	51.93	21.34	27.47	
SE	16.91	29.98	5.703	10.38	8.000	5.568	16.91	29.98	5.703	10.38	
CV (%)	12.96	29.30	18.89	18.17	29.24	6.36	7.12	7.91	4.27	3.88	
IV	min	8.68	8.41	7.14	5.73	4.77	7.00	8.68	5.90	10.50	9.23
	max	13.05	12.23	10.09	10.14	10.86	8.00	12.82	10.64	13.04	9.91
Mediana	10.50	10.59	7.88	8.00	7.27	7.50	11.23	9.04	11.77	9.40	

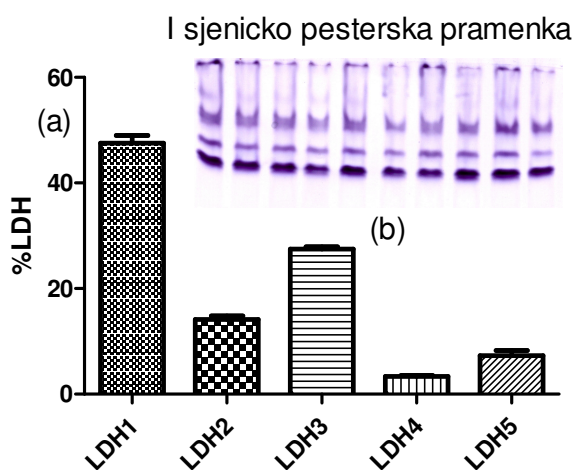
Isti nivo statističke značajnosti razlika ($p < 0,001$), utvrđen je i kod il d frans rase u odnosu na kontrolnu grupu ovaca. Međusobnim poređenjem oglednih ovaca, unutar ovog epizootiološkog područja, utvrđeno je statistički značajno smanjenje koncentracije tiolnih grupa kod sjeničko-peštarske pramenke u odnosu na il d frans rasu ovaca ($p < 0,001$). Interesantno je, da je koncentracija tiolnih grupa kod kontrolne grupe sjeničko-peštarske pramenke statistički značajno veća ($p < 0,001$), u odnosu na kontrolne grupe il d frans i šarole rasu ovaca. S obzirom na korisne efekte tiolnih grupa, u smislu neutralizacije ROS i RNS, može se reći da je ova karakteristika sjeničko-peštarske pramenke poželjna osobina.

5.2.6. Ispitivanje relativne aktivnosti izoenzimskih oblika LDH

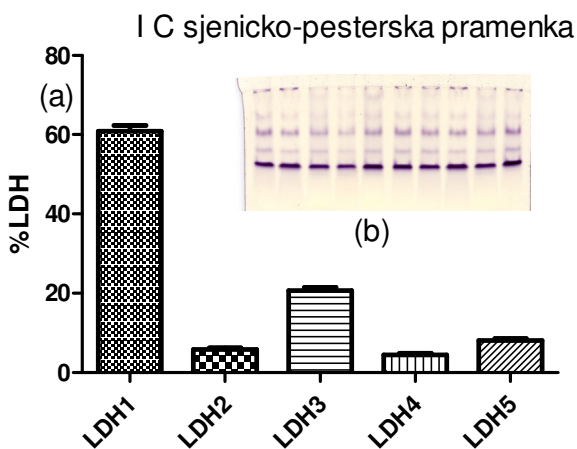
Laktat dehidrogenaza je veliki, tetramerni enzim koji se nalazi u citoplazmi i katalizuje poslednju reakciju glikolize. Sve ćelije makroorganizma sadrže LDH, koja treba da omogući proizvodnju energije pri pojavi anaerobnih uslova. Oštećenjem ćelijske membrane u toku procesa lipidne peroksidacije, dolazi do „curenja“, izlaska ovog enzima u ekstracelularni prostor. Određivanje ukupne aktivnosti LDH ima mali dijagnostički značaj. Zbog toga je specifičnije određivanje njenih izoenzimskih oblika. Heterogenost LDH objašnjena je subjediničnom strukturom njenih izoenzima. Prema elektroforetskoj pokretljivosti i distribuciji izoenzima LDH u tkivima i organima oni se mogu podeliti u tri

grupe: prvu grupu čine tzv. “brzi izoenzimi“ LDH₁ (H₄ subjediniice) i LDH₂ (H₃M subjediniice) koji su najviše zastupljeni u ćelijama srca, bubrega i eritrocitima. Drugu grupu čine tzv. „spori izoenzimi“, LDH₄ (H_M3 subjediniice) i LDH₅ (M₄ subjediniice) karakteristični za ćelije jetre i skeletnih mišića. Treću grupu čini tzv. srednji izoenzim - LDH₃ (H₂M₂ subjediniice) sa karakterističnom distribucijom u ćelijama pluća, tiroideje i nadbubrega.

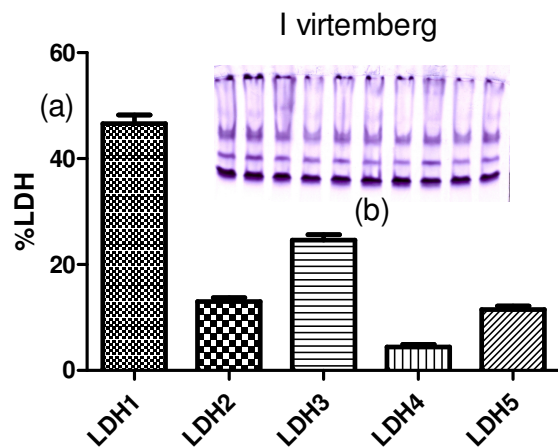
Rezultati analize izoenzimske raspodele relativne aktivnosti LDH u krvnoj plazmi autohtonih i uvezenih rasa ovaca prikazani su na grafikonima od 31 do 41.



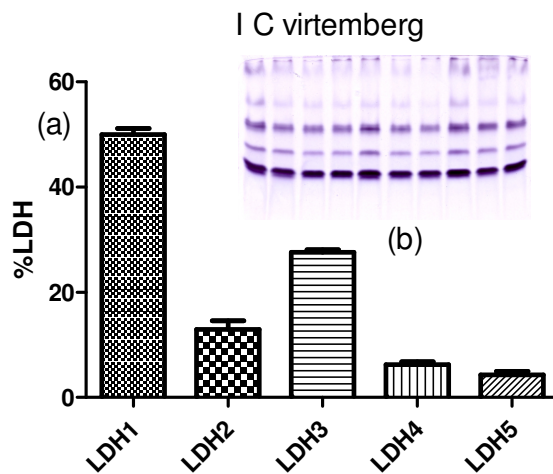
Grafikon 31. Izoenzimska raspodela relativne aktivnosti LDH (a) u krvnoj plazmi sjenicko-pesterske pramenke, u I epizootiološkom području (Sjenicko-pesterska visoravan) i (b) elektroforegram LDH na PAGE



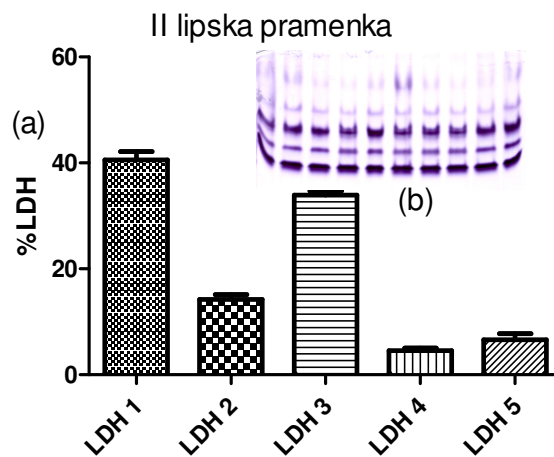
Grafikon 32. Izoenzimska raspodela relativne aktivnosti LDH (a) u krvnoj plazmi kontrolne grupe sjenicko-pesterske pramenke, u I epizootiološkom području (Sjenicko-pesterska visoravan) i (b) elektroforegram LDH na PAGE



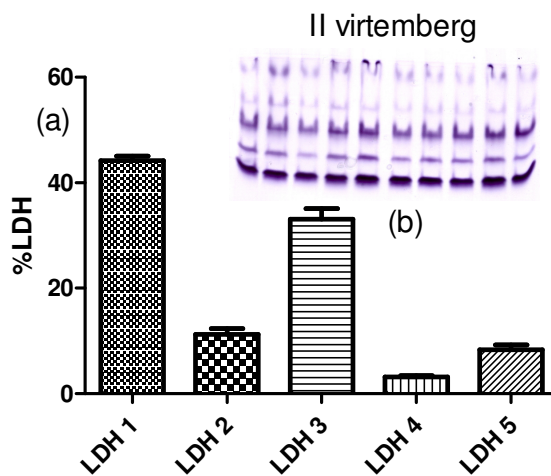
Grafikon 33. Izoenzimska raspodela relativne aktivnosti LDH (a) u krvnoj plazmi virtemberg rase ovaca, u I epizootiološkom području (Sjeničko-peštarska visoravan) i (b) elektroforegram LDH na PAGE



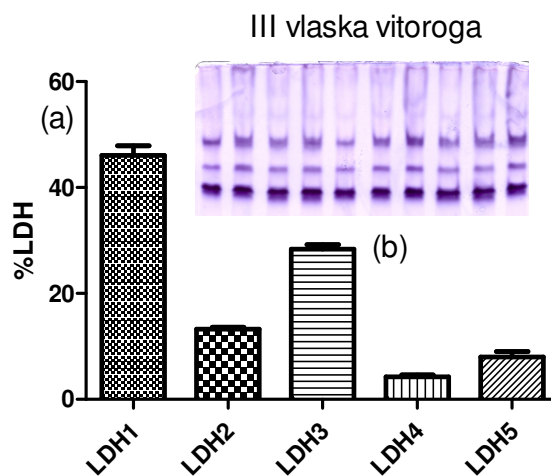
Grafikon 34. Izoenzimska raspodela relativne aktivnosti LDH (a) u krvnoj plazmi kontrolne grupe virtemberg rase ovaca, u I epizootiološkom području (Sjeničko-peštarska visoravan) i (b) elektroforegram LDH na PAGE



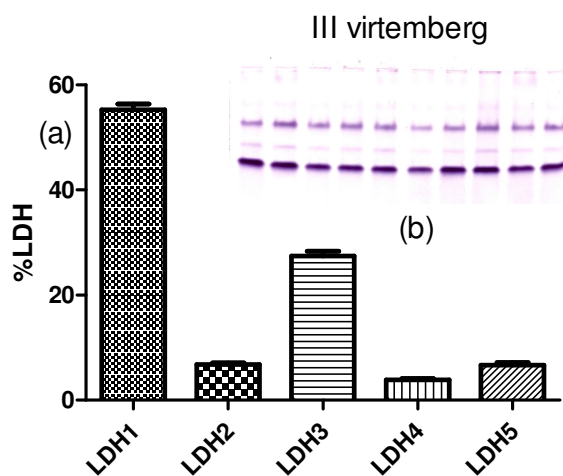
Grafikon 35. Izoenzimska raspodela relativne aktivnosti LDH (a) u krvnoj plazmi lipske pramenke, u II epizootiološkom području (s Lipe-Smederevo) i (b) elektroforegram LDH na PAGE



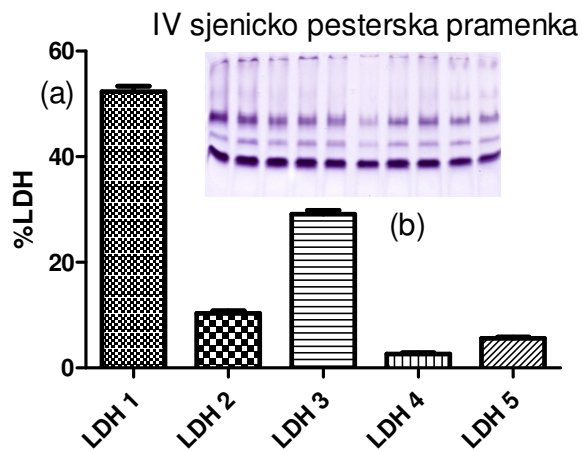
Grafikon 36. Izoenzimska raspodela relativne aktivnosti LDH (a) u krvnoj plazmi virtemberg rase ovaca, u II epizootiološkom području (s Lipe-Smederevo) i (b) elektroforegram LDH na PAGE



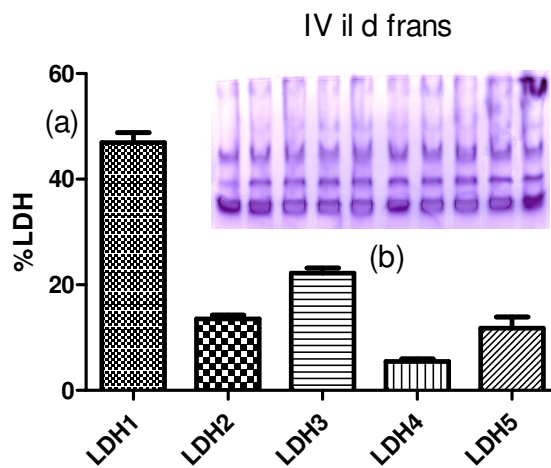
Grafikon 37. Izoenzimska raspodela relativne aktivnosti LDH (a) u krvnoj plazmi vlaške vitoroge pramenke, u III epizootiološkom području (Južni Banat) i (b) elektroforegram LDH na PAGE



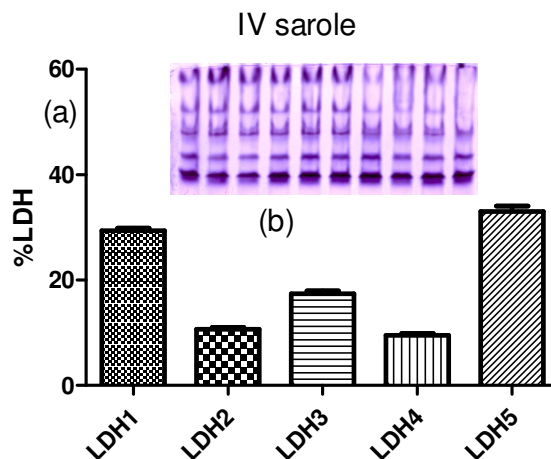
Grafikon 38. Izoenzimska raspodela relativne aktivnosti LDH (a) u krvnoj plazmi virtemberg rase ovaca, u III epizootiološkom području (Južni Banat) i (b) elektroforegram LDH na PAGE



Grafikon 39. Izoenzimska raspodela relativne aktivnosti LDH (a) u krvnoj plazmi sjeničko-pešterske pramenke, u IV epizootiološkom području (Obrenovac) i (b) elektroforegram LDH na PAGE

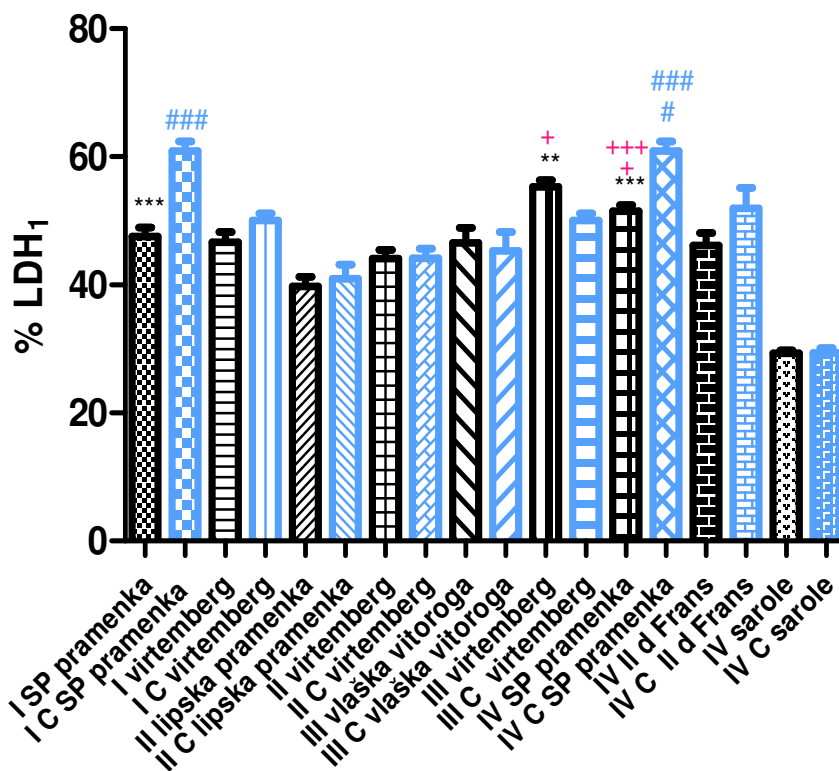


Grafikon 40. Izoenzimska raspodela relativne aktivnosti LDH (a) u krvnoj plazmi il d frans rase ovaca, u IV epizootiološkom području (Obrenovac) i (b) elektroforegram LDH na PAGE



Grafikon 41. Izoenzimska raspodela relativne aktivnosti LDH (a) u krvnoj plazmi šarole rase ovaca, u IV epizootiološkom području (Obrenovac) i (b) elektroforegram LDH na PAGE

Statistička značajnost razlika relativne izoenzimske raspodele aktivnosti LDH prikazana je na grafikonima od 42 do 46 i u tabelama od 31 do 40.



Grafikon 42. Izoenzimska raspodela relativne aktivnosti LDH₁ u krvnoj plazmi autohtonih i uvezenih rasa ovaca, u ispitivanim epizootiološkim područjima

Legenda: (*) statistički značajna razlika između ogledne i kontrolne grupe ovaca, na nivou: $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***; (+) statistički značajna razlika između oglednih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,05$ +; $p < 0,001$ +++; (#) statistički značajna razlika između kontrolnih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,05$ #; $p < 0,001$ ###

Tabela 31. Deskriptivni statistički parametri izoenzimske raspodele relativne aktivnosti LDH₁ u krvnoj plazmi ovaca, u epizootiološkom području I (Sjениčko-peštarska visoravan) i II (s Lipe – Smederevo)

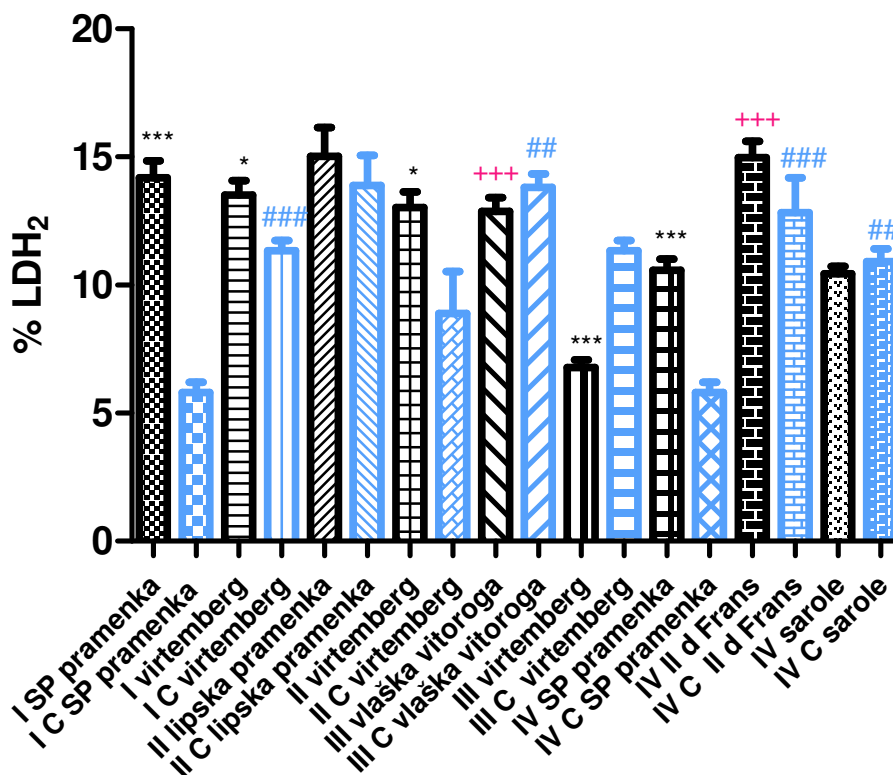
Parametar	Epizootiološko područje								
	I Sjениčko-peštarska visoravan				II selo Lipe - Smederevo				
	sjениčko-peštarska pramenka		virtemberg		lipska pramenka		virtemberg		
% LDH ₁	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{x}	47.54	60.90	46.65	50.01	39.75	40.97	44.12	44.19	
SD	6.37	4.65	6.22	3.68	2.96	6.53	2.26	2.94	
SE	1.42	1.47	1.55	1.16	1.48	2.18	1.30	1.47	
CV (%)	13.40	7.64	13.33	7.36	7.46	15.95	5.12	6.65	
IV	min	35.54	51.99	40.27	44.51	36.51	32.68	41.80	39.98
	max	65.32	69.50	65.46	57.27	42.86	55.77	46.31	46.32
Mediana	48.15	61.15	45.01	50.55	39.81	39.94	44.25	45.22	

Tabela 32. Deskriptivni statistički parametri izoenzimske raspodele relativne aktivnosti LDH₁ u krvnoj plazmi ovaca, u epizootiološkom području III (Južni Banat) i IV (Obrenovac)

Parametar	Epizootiološko područje										
	III Južni Banat				IV Obrenovac						
	vlaška vitoroga pramenka		virtemberg		sjениčko-peštarska pramenka		il d frans		šarole		
% LDH ₁	O	C	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{x}	46.57	45.33	55.28	50.01	51.50	60.90	46.17	51.99	29.31	29.37	
SD	8.31	8.21	3.46	3.68	4.73	4.65	7.18	7.70	0.93	1.48	
SE	2.30	2.90	1.09	1.16	0.91	1.47	1.92	3.14	0.46	0.74	
CV (%)	17.86	18.12	6.26	7.36	9.20	7.64	15.56	14.82	3.17	5.05	
IV	min	29.98	37.63	50.13	44.51	39.48	51.99	39.48	38.61	28.50	27.17
	max	57.99	59.39	61.61	57.27	66.25	69.50	62.15	58.74	30.11	30.37
Mediana	48.07	43.17	54.41	50.55	51.91	61.15	42.60	53.92	29.31	29.98	

Kod sjениčko-peštarske pramenke u I epizootiološkom području može se uočiti pad aktivnosti LDH₁ izoenzima u prisustvu parazitske infekcije, u odnosu na kontrolnu grupu ovaca ($p < 0,001$). Između oglednih grupa ovaca (sjениčko-peštarske pramenke i virtemberg) ne postoji statistička značajnost razlika u aktivnosti ovog izoenzima LDH ($p > 0,05$). Međutim, između kontrolnih grupa ovih ovaca uočena je statistički značajna razlika između aktivnosti LDH₁, na nivou od $p < 0,001$. U II epizootiološkom području (selo Lipe-Smederevo) između ispitivanih ovaca nisu uočene statistički značajne razlike u aktivnosti ovog izoenzima ($p > 0,05$). U III epizootiološkom području kod virtemberg rase ovaca uočava se povećanje aktivnosti LDH₁ u odnosu na kontrolnu grupu ovaca ($p < 0,01$). Takođe, kod virtemberg rase ovaca, povećanje aktivnosti ovog enzima u odnosu na vlašku vitorogu

pramenku nalazi se na nivou statističke značajnosti od $p < 0,05$. U IV epizootiološkom području kod sjeničko-peštarske pramenke zapaža se pad aktivnosti LDH_1 u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$). Isto tako, uočen je pad aktivnost i kod il d frans grupe ovaca, u odnosu na kontrolnu grupu, ali bez statističke značajnosti razlika ($p > 0,05$). Kod šarole rase ovaca, nisu uočene razlike u aktivnost ovog izoenzima između ogledne i kontrolne grupe ovaca ($p > 0,05$). Međusobnim poređenjem aktivnosti LDH_1 , u ovom epizootiološkom području, između oglednih grupa tri rase ovaca, uočava se najveća aktivnost kod sjeničko-peštarske pramenke, na nivou statističke značajnosti razlika od $p < 0,05$ u odnosu na il d frans, i od $p < 0,001$ u odnosu na šarole rasu ovaca. Isti nivoi statističke značajnosti razlika utvrđeni su i međusobnim poređenjem kontrolnih grupa ovih rasa ovaca.



Grafikon 43. Izoenzimska raspodela relativne aktivnosti LDH_2 u krvnoj plazmi autohtonih i uvezenih rasa ovaca, u ispitivanim epizootiološkim područjima

Legenda: (*) statistički značajna razlika između ogledne i kontrolne grupe ovaca, na nivou: $p < 0,05$; *; $p < 0,001$ ***; (+) statistički značajna razlika između oglednih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,001$ +++; (#) statistički značajna razlika između kontrolnih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,01$ ##; $p < 0,001$ ###

Tabela 33. Deskriptivni statistički parametri izoenzimske raspodele relativne aktivnosti LDH₂ u krvnoj plazmi ovaca, u epizootiološkom području I (Sjениčko-peštarska visoravan) i II (s Lipe – Smederevo)

Parametar	Epizootiološko područje								
	I Sjениčko-peštarska visoravan				II selo Lipe - Smederevo				
	sjeničko-peštarska pramenka		virtemberg		lipska pramenka		virtemberg		
% LDH ₂	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{x}	14.19	5.813	13.50	11.34	15.03	13.90	13.02	8.89	
SD	2.89	1.24	2.22	1.22	2.24	3.46	1.23	2.83	
SE	0.64	0.39	0.57	0.40	1.12	1.15	0.62	1.63	
CV (%)	20.38	21.31	16.46	10.77	14.95	24.94	9.50	21.86	
IV	min	6.91	4.49	9.92	9.48	12.09	6.30	11.98	5.64
	max	19.77	7.350	17.99	12.94	17.19	19.00	14.65	10.81
Mediana	14.38	5.330	13.19	11.09	15.41	14.51	12.72	10.24	

Tabela 34. Deskriptivni statistički parametri izoenzimske raspodele relativne aktivnosti LDH₂ u krvnoj plazmi ovaca, u epizootiološkom području III (Južni Banat) i IV (Obrenovac)

Parametar	Epizootiološko područje										
	III Južni Banat				IV Obrenovac						
	vlaška vitoroga pramenka		virtemberg		sjeničko-peštarska pramenka		il d frans		šarole		
% LDH ₂	O	C	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{x}	12.88	13.81	6.778	11.34	10.57	5.813	14.97	12.83	10.45	10.91	
SD	1.89	1.50	0.92	1.22	2.28	1.24	2.38	2.71	0.57	0.99	
SE	0.52	0.53	0.29	0.40	0.44	0.39	0.64	1.35	0.28	0.49	
CV (%)	14.67	10.92	13.61	10.77	21.62	21.31	15.92	21.11	5.46	9.10	
IV	min	8.88	12.27	5.52	9.48	5.58	4.49	10.38	10.96	10.10	9.59
	max	16.09	16.54	8.36	12.94	14.99	7.35	18.26	16.76	11.29	11.73
Mediana	12.73	13.28	6.580	11.09	10.89	5.330	15.79	11.81	10.20	11.17	

Analizom izoenzimskog oblika LDH₂ uočava se porast njegove aktivnosti u odnosu na kontrolnu grupu, kod gotovo svih ispitivanih ovaca, osim u III epizootiološkom području.

U I epizootiološkom području kod sjeničko-peštarske pramenke povećanje aktivnosti LDH₂ je na nivou statističke značajnosti od $p < 0,001$, u odnosu na kontrolnu grupu. Kod virtemberg rase ovaca porast aktivnosti LDH₂ je na nivou statističke značajnosti od $p < 0,05$, u odnosu na kontrolnu grupu. Međusobnim poređenjem oglednih grupa ovaca, u I epizootiološkom području, uočava se malo veća aktivnost ovog izoenzima kod sjeničko-peštarske pramenke, ali je ona bez statističke značajnosti, u odnosu na virtemberg rasu ovaca ($p > 0,05$). Poređenjem kontrolnih grupa ovih rasa ovaca, uočava se veća aktivnost

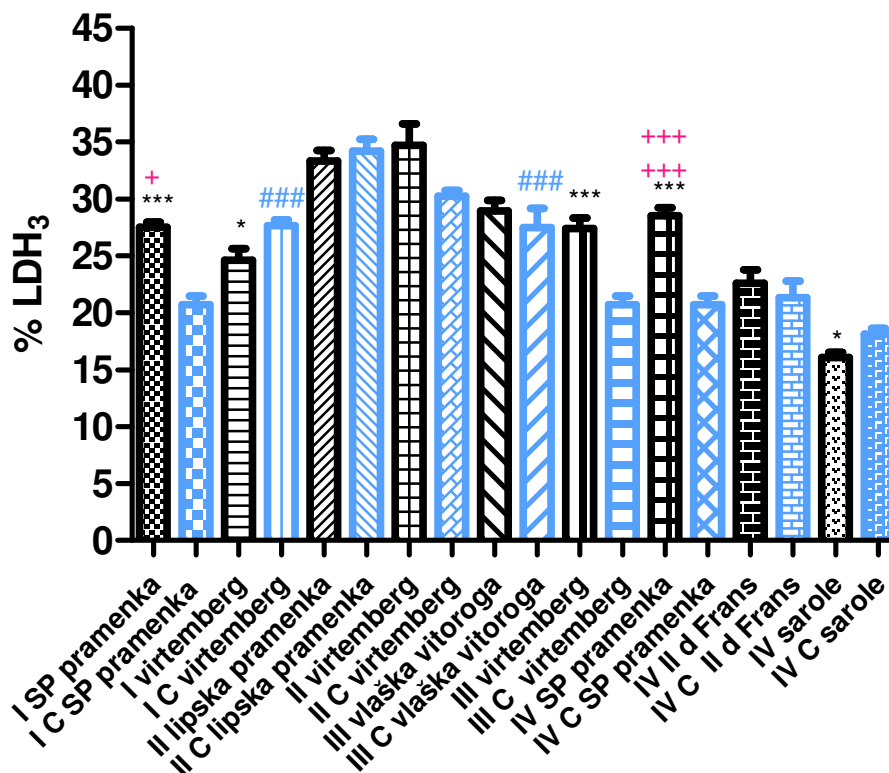
LDH₂ kod virtemberg rase ovaca, na nivou statističke značajnosti od $p < 0,001$, u odnosu na kontrolnu grupu sjeničko-peštarske pramenke.

U drugom epizootiološkom području, takođe se uočava porast aktivnosti LDH₂ u prisustvu parazitske infekcije, ali je bez statističke značajnosti razlika između ogledne i kontrolne grupe lipske pramenke ($p > 0,05$). Kod virtemberg rase ovaca ovo povećanje aktivnosti u odnosu na kontrolnu grupu ovaca, nalazi se na nivou statističke značajnosti razlika od $p < 0,05$. Međusobnim poređenjem oglednih i kontrolnih grupa lipske pramenke i virtemberg rase ovaca, nisu uočene statistički značajne razlike ($p > 0,05$).

U III epizootiološkom području uočava se pad aktivnosti LDH₂, kod vlaške vitoroge pramenke, ali bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolnu grupu ovaca ($p > 0,05$). Međutim, kod virtemberg rase ovaca pad aktivnosti LDH₂, je na vrlo visokom nivou statističke značajnosti, u odnosu na kontrolnu grupu ovaca ($p < 0,001$). Međusobnim poređenjem rasa ovaca, u III epizootiološkom području, zapaža se veća aktivnost LDH₂ kod vlaške vitoroge pramenke u odnosu na virtemberg rasu, na nivou statističke značajnosti od $p < 0,001$. I kod kontrolnih grupa ovih rasa ovaca, veća aktivnost LDH₂ uočena je kod vlaške vitoroge pramenke u odnosu na virtemberg ($p < 0,01$).

U IV epizootiološkom području aktivnost izoenzimskog oblika LDH₂ kod sjeničko-peštarske pramenke bila je veća u odnosu na kontrolnu grupu, na nivou statističke značajnosti razlika od $p < 0,001$. Kod il d frans ovaca, takođe je uočena veća aktivnost LDH₂ u odnosu na kontrolnu grupu, ali bez statističke značajnosti ($p > 0,05$). Kod šarole rase ovaca uočena je nešto niža aktivnost LDH₂, ali bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolnu grupu ovaca ($p > 0,05$). Međusobnim poređenjem aktivnosti LDH₂ kod ispitivanih rasa ovaca u ovom epizootiološkom području, najveća aktivnost uočena je kod il d frans rase ovaca, koja se od druge dve rase ovaca (sjeničko-peštarska pramenka i šarole) razlikovala na visokom nivou statističke značajnosti ($p < 0,001$).

Kod kontrolne grupe il d frans ovaca aktivnost LDH₂ bila je statistički značajno veća u odnosu na kontrolnu grupu sjeničko-peštarske pramenke ($p < 0,001$), dok je statistička značajnost razlika između šarole rase i sjeničko-peštarske pramenke bila na nivou od $p < 0,01$.



Grafikon 44. Izoenzimska raspodela relativne aktivnosti LDH₃ u krvnoj plazmi autohtonih i uvezenih rasa ovaca, u ispitivanim epizootiološkim područjima

Legenda: (*) statistički značajna razlika između ogledne i kontrolne grupe ovaca, na nivou: $p < 0,05^*$; $p < 0,001^{***}$; (+) statistički značajna razlika između oglednih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,05^+$; $p < 0,001^{+++}$; (#) statistički značajna razlika između kontrolnih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,001^{###}$

Tabela 35. Deskriptivni statistički parametri izoenzimske raspodele relativne aktivnosti LDH₃ u krvnoj plazmi ovaca, u epizootiološkom području I (Sjениčko-peštarska visoravan) i II (s Lipe – Smederevo)

Parametar	Epizootiološko područje								
	I Sjeničko-peštarska visoravan				II selo Lipe - Smederevo				
	sjeničko-peštarska pramenka		virtemberg		lipska pramenka		virtemberg		
% LDH ₃	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{x}	27.49	20.71	24.63	27.65	33.33	34.17	34.70	30.23	
SD	2.03	2.42	4.01	1.52	1.85	3.17	3.78	0.85	
SE	0.45	0.76	1.00	0.48	0.92	1.06	1.89	0.49	
CV (%)	7.38	11.72	16.29	5.52	5.57	9.29	10.91	2.84	
IV	min	22.62	16.29	15.46	25.76	30.63	29.87	31.73	29.67
	max	31.09	23.37	29.06	30.35	34.82	39.67	40.22	31.22
Mediana	27.66	21.16	25.63	27.46	33.93	34.20	33.43	29.81	

Tabela 36. Deskriptivni statistički parametri izoenzimske raspodele relativne aktivnosti LDH₃ u krvnoj plazmi ovaca, u epizootiološkom području III (Južni Banat) i IV (Obrenovac)

Parametar	Epizootiološko područje										
	III Južni Banat				IV Obrenovac						
	vlaška vitoroga pramenka		virtemberg		sjeničko-peštarska pramenka		il d frans		šarole		
% LDH ₃	O	C	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{X}	28.92	27.47	27.41	20.71	28.53	20.71	22.59	21.32	16.06	18.14	
SD	3.44	4.76	2.92	2.42	3.59	2.42	4.57	3.54	0.63	0.97	
SE	0.95	1.68	0.92	0.76	0.69	0.76	1.18	1.44	0.44	0.48	
CV (%)	11.90	17.34	10.67	11.72	12.59	11.72	20.26	16.63	3.92	5.35	
IV	min	22.96	19.85	22.65	16.29	19.34	16.29	10.87	17.29	15.61	16.87
	max	34.61	32.89	30.41	23.37	36.72	23.37	27.11	25.85	16.50	19.23
Mediana	29.23	28.11	28.95	21.16	28.35	21.16	24.14	20.50	16.06	18.22	

Analizom aktivnosti izoenzima LDH₃ uočava se porast njegove aktivnost kod sjeničko-peštarske pramenke, u I epizootiološkom području, u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$). Kod ovaca virtemberg rase, u istom području, uočen je pad aktivnosti LDH₃ u odnosu na kontrolnu grupu na, nivou statističke značajnosti od $p < 0,05$. Međusobnim poređenjem rasa ovaca na ovom području uočene su veće vrednosti LDH₃ kod sjeničko-peštarske pramenke u odnosu na virtemberg rasu ($p < 0,05$) i niže vrednosti kod kontrolne grupe sjeničko-peštarske pramenke u odnosu na kontrolnu grupu virtemberg rase ovaca ($p < 0,001$).

U II epizootiološkom području kod ogledne i kontrolne grupe lipske pramenke aktivnost LDH₃ bila je gotovo identična. Kod ogledne grupe virtemberg rase ovaca uočava se veća aktivnost LDH₃ u odnosu na kontrolnu grupu, ali bez statističke značajnosti ($p > 0,05$).

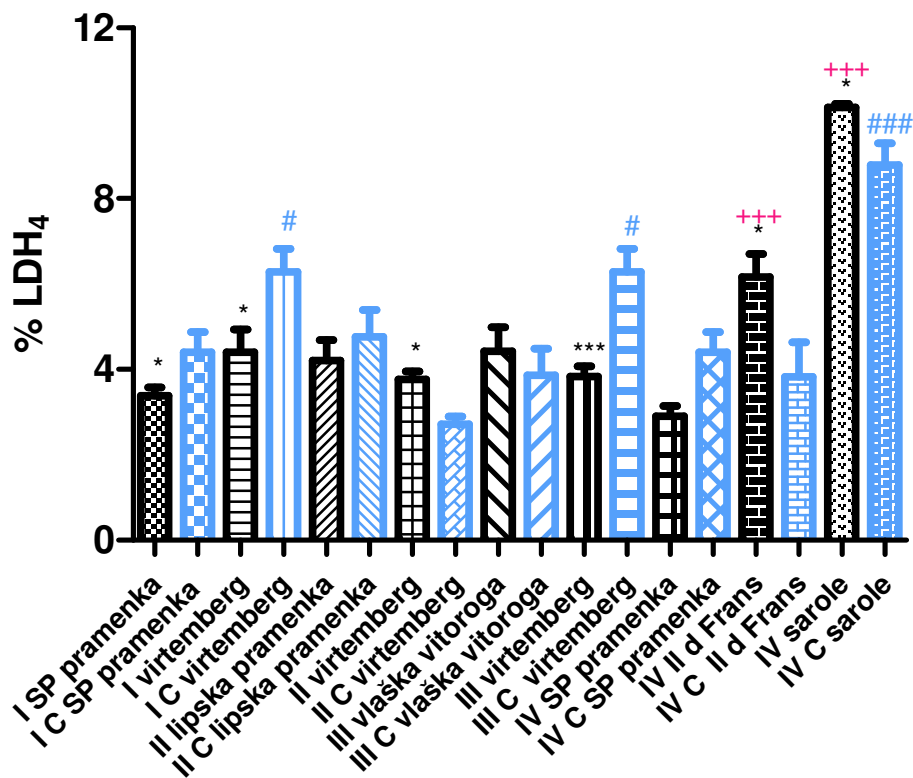
U III epizootiološkom području kod vlaške vitoroge pramenke uočava se nešto veća aktivnost LDH₃ u prisustvu parazitske infekcije, ali bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolnu grupu ovaca ($p > 0,05$). Nasuprot ovom nalazu, kod virtemberg rase povećana je aktivnost ovog izoenzima u odnosu na kontrolnu grupu, na visokom nivou statističke značajnosti ($p < 0,001$). Međusobnim poređenjem oglednih grupa ove dve rase ovaca nisu uočene statistički značajne razlike u aktivnosti LDH₃ ($p > 0,05$), ali je kod kontrolnih grupa dokazana veća aktivnost ovog izoenzima kod vlaške vitoroge pramenke u odnosu na virtemberg rasu ovaca ($p < 0,001$).

U IV epizootiološkom području najveća aktivnosti LDH₃ je utvrđena kod sjeničko-peštarske pramenke. Između ogledne i kontrolne grupe ovog soja pramenke, aktivnost LDH₃ je bila na visokom nivou statističke značajnosti razlika ($p < 0,001$). Ogledna i kontrolna grupa il d frans rase ovaca nisu se razlikovale u aktivnosti ovog izoenzima ($p > 0,05$), dok je kod ogledne grupe šarole rase ovaca utvrđena niža aktivnost LDH₃ u odnosu na kontrolnu grupu, na nivou $p < 0,05$. Međusobnim poređenjem ispitivanih rasa ovaca, unutar ovog područja, najveća aktivnost LDH₃ je uočena kod sjeničko-peštarske pramenke, koja je bila na visokom nivou statističke značajnosti razlika u odnosu na oglednu grupu il d frans i šarole rase ovaca ($p < 0,001$). Između kontrolnih grupa ovaca nije utvrđena statistička značajnost razlika ($p > 0,05$).

Analizom aktivnosti izoenzima LDH₄ u I epizootiološkom području utvrđen je pad njegove aktivnosti u prisustvu parazitske infekcije. Ovaj pad aktivnosti bio je na nivou statističke značajnosti razlika od $p < 0,05$ između oglednih i kontrolnih grupa i sjeničko-peštarske pramenke i virtemberg rase ovaca. Pri tome, veća aktivnost ovog izoenzima utvrđena je kod kontrolne grupe virtemberg rase u odnosu na sjeničko-peštarsku pramenku, na istom nivou statističke značajnosti razlika ($p < 0,05$). Kod oglednih grupa ovih rasa ovaca veća aktivnost LDH₄ je utvrđena kod virtemberg rase ovaca, ali bez statističke značajnosti razlika ($p > 0,05$).

U II epizootiološkom području, kod lipske pramenke utvrđena je niža aktivnost LDH₄ u odnosu na kontrolnu grupu, ali bez statističke značajnosti ($p > 0,05$), dok je kod virtemberg rase utvrđeno povećanje njegove aktivnosti na nivou statističke značajnosti razlika od $p < 0,05$.

Međusobnim poređenjem aktivnosti LDH₄, kod ispitivanih rasa ovaca, unutar ovog područja, više vrednosti su utvrđene kod ogledne i kontrolne grupe lipske pramenke, ali bez statističke značajnosti razlika u odnosu na oglednu i kontrolnu grupu virtemberg rase ovaca ($p > 0,05$). U III epizootiološkom području, utvrđeno je blago povećanje aktivnosti LDH₄ kod vlaške vitoroge pramenke inficirane parazitima, ali bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolnu grupu ovaca ($p > 0,05$). Kod ogledne grupe virtemberg rase utvrđen je pad aktivnosti LDH₄ u odnosu na kontrolnu grupu ovaca, na visokom nivou statističke značajnosti razlika ($p < 0,001$).



Grafikon 45. Izoenzimska raspodela relativne aktivnosti LDH₄ u krvnoj plazmi autohtonih i uvezenih rasa ovaca, u ispitivanim epizootiološkim područjima

Legenda: (*) statistički značajna razlika između ogledne i kontrolne grupe ovaca, na nivou: $p < 0,05^*$; $p < 0,001^{***}$; (+) statistički značajna razlika između oglednih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,001^{+++}$; (#) statistički značajna razlika između kontrolnih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,05^{\#}$; $p < 0,001^{\###}$

Tabela 37. Deskriptivni statistički parametri izoenzimske raspodele relativne aktivnosti LDH₄ u krvnoj plazmi ovaca, u epizootiološkom području I (Sjениčko-peštarska visoravan) i II (s Lipe – Smederevo)

Parametar	Epizootiološko područje								
	I Sjeničko-peštarska visoravan				II selo Lipe - Smederevo				
	sjeničko-peštarska pramenka		virtemberg		lipska pramenka		virtemberg		
% LDH ₄	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{x}	3.38	4.41	4.41	6.28	4.20	4.77	3.76	2.71	
SD	0.87	1.49	2.09	1.69	0.95	1.87	0.34	0.37	
SE	0.19	0.47	0.52	0.53	0.47	0.62	0.19	0.18	
CV (%)	25.91	23.94	27.61	26.99	22.75	29.23	9.04	13.59	
IV	min	2.26	2.90	2.10	3.35	3.48	2.69	3.51	2.35
	max	5.21	8.14	9.78	9.13	5.61	8.85	4.15	3.12
Mediana	3.26	4.07	3.88	6.26	3.86	4.73	3.63	2.69	

Međusobnim poređenjem rasa, u ovom ispitivanom području, nešto veća aktivnost ovog izoenzima je utvrđena kod vlaške vitoroge pramenke u odnosu na virtemberg rasu, ali

bez statističke značajnosti razlika ($p > 0,05$), dok je kod kontrolne grupe virtemberg rase dokazana veća aktivnost LDH₄ u odnosu na kontrolnu grupu vlaške vitoroge pramenke, na nivou statističke značajnosti razlika od $p < 0,05$.

Tabela 38. Deskriptivni statistički parametri izoenzimske raspodele relativne aktivnosti LDH₄ u krvnoj plazmi ovaca, u epizootiološkom području III (Južni Banat) i IV (Obrenovac)

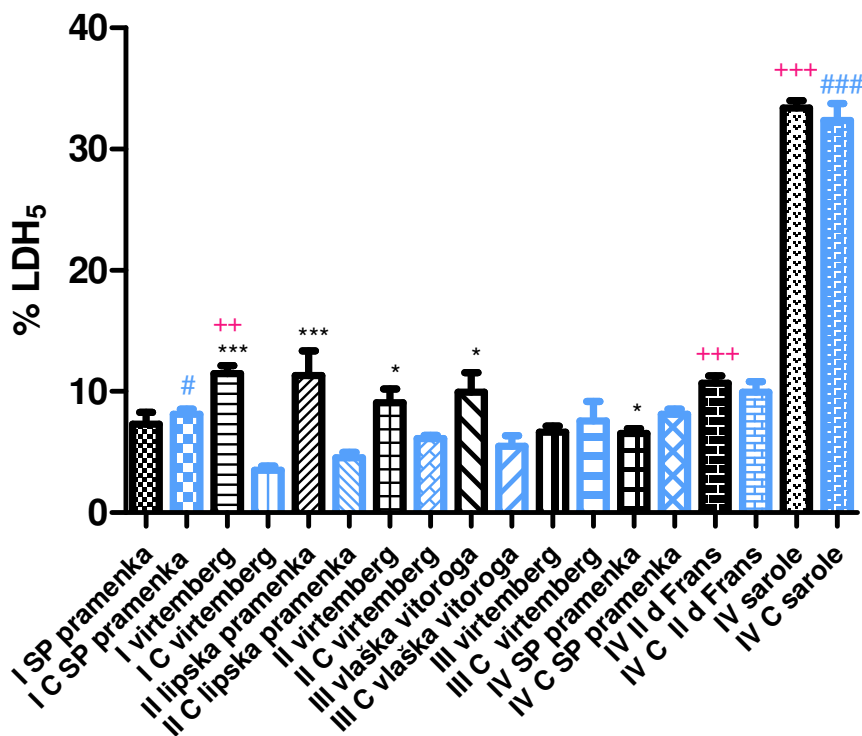
Parametar	Epizootiološko područje										
	III Južni Banat				IV Obrenovac						
	vlaška vitoroga pramenka		virtemberg		sjeničko-peštarska pramenka		il d frans		šarole		
% LDH ₄	O	C	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{x}	4.43	3.87	3.83	6.28	2.90	4.40	6.16	3.82	10.14	8.78	
SD	2.01	1.74	0.74	1.69	1.25	1.49	2.09	1.99	0.17	0.88	
SE	0.55	0.61	0.23	0.53	0.24	0.47	0.54	0.81	0.08	0.51	
CV (%)	25.42	25.20	19.42	26.99	23.29	23.94	23.88	22.03	1.74	10.11	
IV	min	2.35	2.17	1.86	2.59	3.35	1.18	2.90	3.07	2.18	9.95
	max	3.12	8.82	7.33	4.96	9.13	6.17	8.14	10.08	6.46	10.34
Mediana	3.89	3.88	3.67	6.26	2.84	4.07	5.33	2.93	10.22	8.70	

U IV epizootiološkom području, jedino je kod sjeničko-peštarske pramenke utvrđen pad aktivnosti LDH₄ u prisustvu parazitske infekcije, u odnosu na kontrolnu grupu ovaca, ali bez statističke značajnosti razlika ($p > 0,05$). Kod ostalih ispitivanih rasa (il d frans i šarole) dokazan je porast aktivnosti LDH₄ usled prisustva parazitske infekcije, u odnosu na kontrolnu grupu, na nivou statističke značajnosti od $p < 0,05$. Međusobnim poređenjem ispitivanih rasa, statistički značajno veća aktivnost LDH₄ je dokazana kod il d frans u odnosu na sjeničko-peštarsku pramenku ($p < 0,001$). Takođe, kod šarole rase aktivnost ovog izoenzima bila je statistički značajno veća, kako u odnosu na sjeničko-peštarsku pramenku, tako i u odnosu na il d frans rasu ovaca ($p < 0,001$).

Kontrolne grupe sjeničko-peštarske pramenke i il d frans rase ovaca nisu se razlikovale u aktivnosti ovog izoenzima ($p > 0,05$), ali je između kontrolne grupe šarole i ovih rasa utvrđen visok nivo statističke značajnosti razlika ($p < 0,001$).

Analizom relativne aktivnosti LDH₅, u I epizootiološkom području, nije utvrđena statistički značajna razlika između ogledne i kontrolne grupe sjeničko-peštarske pramenke ($p > 0,05$). Međutim, kod ogledne grupe virtemberg rase ovaca utvrđena je statistički značajno veća aktivnost ovog izoenzima LDH u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$). Međusobnim poređenjem ispitivanih rasa, u ovom području, aktivnost LDH₅ bila je

statistički značajno veća kod virtemberg rase u odnosu na sjeničko-peštarsku pramenku, na nivou $p < 0,01$.



Grafikon 46. Izoenzimska raspodela relativne aktivnosti LDH₅ u krvnoj plazmi autohtonih i uvezenih rasa ovaca, u ispitivanim epizootiološkim područjima

Legenda: (*) statistički značajna razlika između ogledne i kontrolne grupe ovaca, na nivou: $p < 0,05$ *; $p < 0,001$ ***; (+) statistički značajna razlika između oglednih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,01$ ++; $p < 0,001$ +++; (#) statistički značajna razlika između kontrolnih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,05$ #; $p < 0,001$ ###

Tabela 39. Deskriptivni statistički parametri izoenzimske raspodele relativne aktivnosti LDH₅ u krvnoj plazmi ovaca, u epizootiološkom području I (Sjeničko-peštarska visoravan) i II (s Lipe – Smederevo)

Parametar	Epizootiološko područje								
	I Sjeničko-peštarska visoravan				II selo Lipe - Smederevo				
	sjeničko-peštarska pramenka		virtemberg		lipska pramenka		virtemberg		
% LDH ₅	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{x}	7.31	8.10	11.50	3.514	11.31	4.56	9.07	6.11	
SD	4.35	1.42	2.54	0.91	3.54	1.31	2.51	0.46	
SE	0.97	0.45	0.63	0.32	2.04	0.43	1.12	0.26	
CV (%)	29.59	17.55	22.12	25.77	21.33	28.70	27.65	7.59	
IV	min	2.70	5.50	8.12	2.35	7.25	3.18	7.02	5.62
	max	20.81	9.61	16.93	4.99	13.77	6.99	12.62	6.54
Mediana	5.77	8.31	11.40	3.38	12.92	4.78	7.62	6.19	

Tabela 40. Deskriptivni statistički parametri izoenzimske raspodele relativne aktivnosti LDH₅ u krvnoj plazmi ovaca, u epizootiološkom području III (Južni Banat) i IV (Obrenovac)

Parametar	Epizootiološko područje										
	III Južni Banat				IV Obrenovac						
	vlaška vitoroga pramenka		virtemberg		sjeničko-peštarska pramenka		il d frans		šarole		
% LDH ₅	O	C	O	C	O	C	O	C	O	C	
\bar{X}	9.93	5.49	6.65	7.58	6.53	8.10	10.69	9.96	33.39	32.37	
SD	5.59	2.40	1.55	4.75	2.08	1.422	2.06	1.92	1.16	2.74	
SE	1.61	0.85	0.49	1.58	0.40	0.45	0.59	0.86	0.58	1.37	
CV (%)	26.32	23.82	23.38	22.63	21.97	17.55	19.28	19.28	3.48	8.49	
IV	min	4.26	2.46	4.65	1.45	3.57	5.50	7.73	8.01	32.29	30.12
	max	19.32	9.15	8.76	16.04	12.06	9.61	13.34	12.48	34.49	36.36
Mediana	7.49	4.70	6.51	7.35	6.17	8.31	11.59	9.54	33.39	31.49	

Interesantno je, da je kod kontrolne grupe sjeničko-peštarske pramenke aktivnost LDH₅ bila veća u odnosu na kontrolnu grupu virtemberg rase, na nivou statističke značajnosti od $p < 0,05$. U II epizootiološkom području, utvrđeno je povećanje aktivnosti LDH₅ u grupama ovaca sa parazitskom infekcijom. Ovo povećanje aktivnosti LDH₅ bilo je kod lipske pramenke na nivou statističke značajnosti od $p < 0,001$, u odnosu na kontrolnu grupu, i na nivou od $p < 0,05$ kod virtemberg rase ovaca u odnosu na kontrolnu grupu. Međusobnim poređenjem oglednih i kontrolnih grupa ispitivanih rasa, nije utvrđena statistički značajna razlika u aktivnosti izoenzima LDH₅ ($p > 0,05$). U III epizootiološkom području, kod sjeničko-peštarske pramenke utvrđena je veća aktivnost izoenzima LDH₅ u odnosu na kontrolnu grupu, na nivou $p < 0,05$, dok između ogledne i kontrolne grupe virtemberg rase, u ovom području, nije utvrđena statistička značajnost razlika ($p > 0,05$). Takođe, nije utvrđena statistička značajnost razlika, ni pri međusobnom poređenju oglednih i kontrolnih grupa ispitivanih rasa ovaca ($p > 0,05$). U IV epizootiološkom području, kod sjeničko-peštarske pramenke utvrđen je pad aktivnosti LDH₅, na nivou statističke značajnosti od $p < 0,05$, u odnosu na kontrolnu grupu ovaca. Kod il d frans i šarole rase ovaca, postoji blagi porast aktivnosti ovog izoenzima, u odnosu na kontrolne grupe, ali bez statističke značajnosti razlika ($p > 0,05$). Međusobnim poređenjem ispitivanih rasa ovaca, unutar ovog područja, utvrđena je veća aktivnost LDH₅ kod ogledne grupe il d frans ovaca u odnosu na oglednu grupu sjeničko-peštarske pramenke, na nivou statističke značajnosti razlika od $p < 0,001$. Između kontrolnih grupa ovih rasa ovaca nije utvrđena statistička značajnost razlika u aktivnosti LDH₅ ($p > 0,05$). Kod šarole rase aktivnost LDH₅ bila je

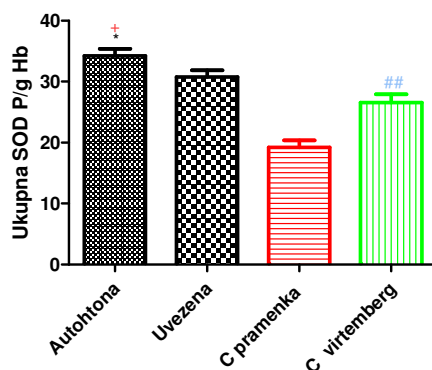
statistički značajno veća, kako u odnosu na il d frans tako i u odnosu na sjeničko-peštarsku pramenku, na nivou od $p < 0,001$. Između kontrolnih grupa sjeničko-peštarske pramenke i il d frans ovaca nije utvrđena statistički značajna razlika ($p > 0,05$). Međutim, aktivnost LDH₅ kod kontrolne grupe šarole rase ovaca bila je statistički značajno veća, u odnosu i na sjeničko-peštarsku pramenku i il d frans rasu ovaca ($p < 0,001$).

Analizom dobijenih rezultata izoenzimske raspodele LDH₁₋₅ uočava se promena njihove aktivnosti koja je u zavisnosti od ekstenziteta i intenziteta parazitske infekcije. Vrsta prisutne parazitske infekcije je faktor koji određuje izoenzimski profil LDH. Ovo se može objasniti različitim putevima migracije razvojnih oblika različitih vrsta parazita u organizmu domaćina. Oštećenja ćelija i tkiva koja nastaju pri migraciji rezultiraju različitim izoenzimskim profilom LDH u krvnoj plazmi inficiranih životinja.

Da bi utvrdili u kojoj meri su autohtone rase ovaca otpornije na prisutne parazitske infekcije u odnosu na uvezene, posmatrano sa stanovišta oksidativnog stresa, analizirali smo ukupnu aktivnost SOD 1.

5.2.7. Uporedna analiza rezultata oksidativnog stresa kod autohtonih i uvezenih rasa ovaca

Da bi utvrdili da li prisustvo parazitske infekcije ima uticaja na indukciju sinteze SOD 1 analizirali smo rezultate unutar istih grupa ovaca koje su bile pozitivne na prisustvo parazita i kontrolnih grupa ovaca, negativnih na prisustvo parazitske infekcije. Rezultati analize prikazani su na grafikonu 47 i u tabeli 41.



Grafikon 47. Ukupna aktivnost SOD 1 u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca i kontrolnih grupa pramenke i virtemberga

Legenda: (*) statistički značajna razlika između ogledne i kontrolne grupe ovaca, na nivou: $p < 0,05^*$; (+) statistički značajna razlika između oglednih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,05^+$; (##) statistički značajna razlika između kontrolnih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,01^{##}$

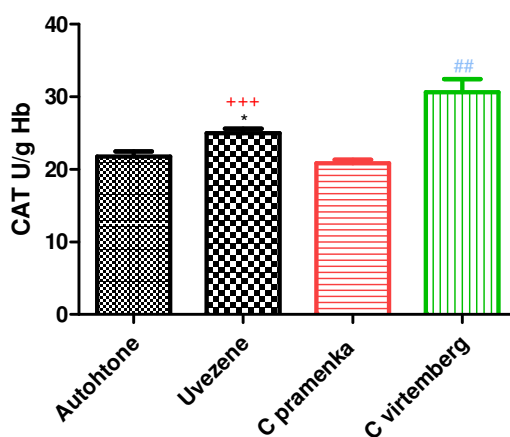
Tabela 41. Deskriptivni statistički parametri ukupne aktivnosti SOD 1 u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca i kontrolnih grupa pramenke i virtemberga

Ukupna SOD 1	Grupe ovaca			
	autohtona	uvezena	C pramenka	C virtemberg
\bar{X} (P/gHb)	34,22	30,77	19,22	26,58
SD	11,58	10,26	2,05	2,77
SE	1,17	1,07	1,18	1,38

Na osnovu rezultata može se zaključiti da u prisustvu parazita kod autohtonih rasa ovaca dolazi do promene ukupne aktivnosti SOD 1, u odnosu na aktivnost ovog enzima kod kontrolne grupe ovaca, na nivou statističke značajnosti $p < 0,05$. Poređenjem aktivnosti SOD 1, ogledne i kontrolne grupe, kod uvezenih rasa ovaca je primećen je porast aktivnosti SOD 1, u prisustvu parazitskih infekcija, ali bez statističke značajnosti ($p > 0,05$).

Međusobnim poređenjem aktivnosti ovog enzima, između inficiranih autohtonih i uvezenih rasa ovaca, utvrđena je veća aktivnost SOD 1 kod autohtonih rasa ovaca, na nivou statističke značajnosti razlika od $p < 0,05$. S druge strane, međusobnim poređenjem kontrolnih grupa autohtonih i uvezenih rasa, dokazana je veća aktivnost SOD 1 kod uvezenih rasa ovaca, na nivou statističke značajnosti od $p < 0,01$.

Aktivnosti katalaze autohtonih i uvezenih rasa ovaca prikazane su na grafikonu 48 i u tabeli 42.



Grafikon 48. Aktivnost CAT u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca i kontrolnih grupa pramenke i virtemberga

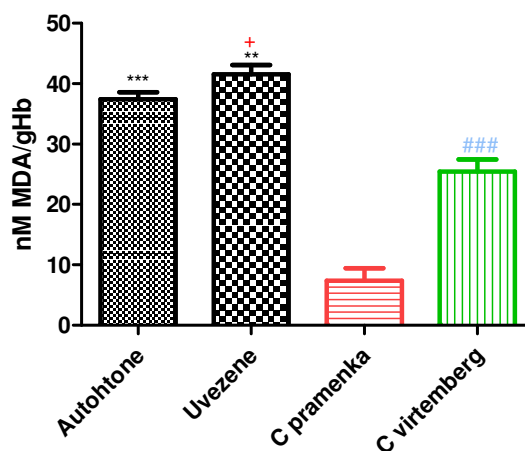
Legenda: (*) statistički značajna razlika između ogledne i kontrolne grupe ovaca, na nivou: $p < 0,05$ *; (+) statistički značajna razlika između oglednih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,001$ +++; (#) statistički značajna razlika između kontrolnih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,01$ ##

Tabela 42. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti CAT u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca i kontrolnih grupa pramenke i virmemberga

CAT	Grupe ovaca			
	autohtona	uvezena	C pramenka	C virmemberg
\bar{X} (U/gHb)	21,77	24,99	20,83	30,63
SD	6,48	6,19	0,84	4,09
SE	0,67	0,58	0,49	1,38

Analizom aktivnosti CAT između ogledne i kontrolne grupe autohtonih rasa ovaca primećen je blagi porast aktivnosti ovog enzima u prisustvu parazitskih infekcija, ali bez statističke značajnosti, $p > 0,05$. Kod uvezenih rasa ovaca uočen je pad aktivnosti CAT usled prisustva parazitske infekcije, na nivou statističke značajnosti od $p < 0,05$, u odnosu na kontrolnu grupu. Poređenjem aktivnosti CAT između autohtonih i uvezenih rasa ovaca dokazan je pad aktivnosti ovog enzima kod autohtonih rasa, na nivou statističke značajnosti od $p < 0,001$. Međusobnim poređenjem kontrolnih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, primećena je veća aktivnost CAT kod uvezenih rasa ovaca, na nivou statističke značajnosti od $p < 0,01$.

Da bi utvrdili da li postoji razlika u nivou lipidne peroksidacije u prisustvu parazitske infekcije, kod autohtonih i uvezenih rasa ovaca, određivana je koncentracija MDA. Rezultati ove analize prikazani su na grafikonu 49 i u tabeli 43.



Grafikon 49. Koncentracija MDA u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca i kontrolnih grupa pramenke i virmemberga

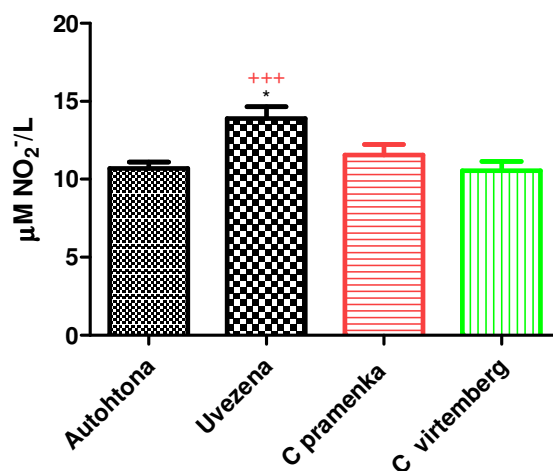
Legenda: (*) statistički značajna razlika između ogledne i kontrolne grupe ovaca, na nivou: $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***; (+) statistički značajna razlika između oglednih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,05$ +; (#) statistički značajna razlika između kontrolnih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,001$ ###

Tabela 43. Deskriptivni statistički parametri koncentracije MDA u eritrocitima autohtonih i uvezenih rasa ovaca i kontrolnih grupa pramenke i virmberga

MDA	Grupe ovaca			
	autohtona	uvezena	C pramenka	C virmberga
\bar{X} (nM/gHb)	37,38	41,51	7,41	25,42
SD	10,92	10,74	4,91	3,59
SE	1,16	1,53	2,00	2,07

Analizom koncentracije MDA između ogledne i kontrolne grupe autohtonih rasa ovaca primećen je porast koncentracije MDA u prisustvu parazitskih infekcija, na nivou statističke značajnosti od $p < 0,001$. Kod uvezenih rasa ovaca uočen je takođe porast koncentracije ovog parametra usled prisustva parazitske infekcije, na nivou statističke značajnosti od $p < 0,01$, u odnosu na kontrolnu grupu. Poređenjem koncentracije MDA između autohtonih i uvezenih rasa ovaca dokazano je povećanje koncentracije MDA kod uvezenih rasa, na nivou statističke značajnosti od $p < 0,05$. Međusobnim poređenjem kontrolnih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, primećena su veća oštećenja ćelijske membrane kod uvezenih rasa ovaca, na vrlo visokom nivou statističke značajnosti, $p < 0,001$.

Da bi utvrdili da li postoji razlika u nivou nitrozativnog stresa između autohtonih i uvezenih rasa ovaca, analizirali smo koncentraciju nitrita. Rezultati ove analize prikazani su na grafikonu 50 i u tabeli 44.



Grafikon 50. Koncentracija nitrita u krvnoj plazmi autohtonih i uvezenih rasa ovaca i kontrolnih grupa pramenke i virmberga

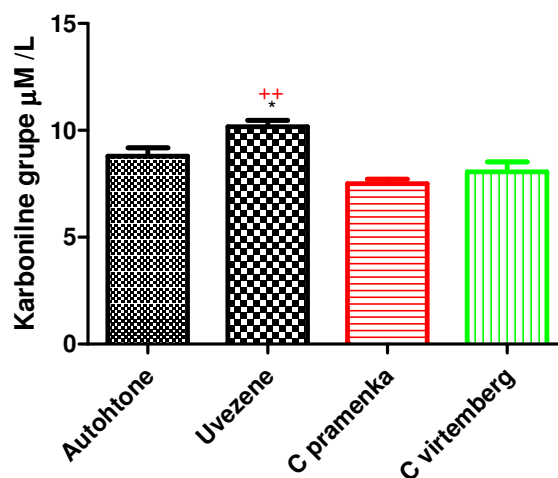
Legenda: (*) statistički značajna razlika između ogledne i kontrolne grupe ovaca, na nivou: $p < 0,05$ *; (+) statistički značajna razlika između oglednih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,001$ +++

Tabela 44. Deskriptivni statistički parametri koncentracije nitrita u krvnoj plazmi autohtonih i uvezenih rasa ovaca i kontrolnih grupa pramenke i virtemberga

NO ₂ ⁻	Grupe ovaca			
	autohtona	uvezena	C pramenka	C virtemberg
\bar{X} (μM/L)	10,69	13,90	11,56	10,55
SD	3,97	5,71	1,18	1,45
SE	0,43	0,76	0,68	0,59

Analizom koncentracije nitrita između ogledne i kontrolne grupe autohtonih rasa ovaca nije utvrđena statistički značajna razlika ($p > 0,05$). Kod uvezenih rasa ovaca utvrđen je porast koncentracije nitrita u grupi ovaca inficiranih parazitima, na nivou statističke značajnosti od $p < 0,05$, u odnosu na kontrolnu grupu. Poređenjem koncentracije nitrita između autohtonih i uvezenih rasa ovaca dokazano je povećanje koncentracije ovog parametra kod uvezenih rasa ovaca inficiranih parazitima, na vrlo visokom nivou statističke značajnosti, $p < 0,001$. Međusobnim poređenjem kontrolnih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, nije primećena statistički značajna razlika u koncentraciji nitrita ($p > 0,05$).

Da bi utvrdili da li postoji razlika, između autohtonih i uvezenih rasa ovaca, u nivou oksidativnih modifikacija proteina u prisustvu parazitskih infekcija, analizirali smo koncentraciju karbonilnih i tiolnih grupa. Rezultati ove analize prikazani su na grafikonima 51 i 52, i u tabelama 45 i 46.



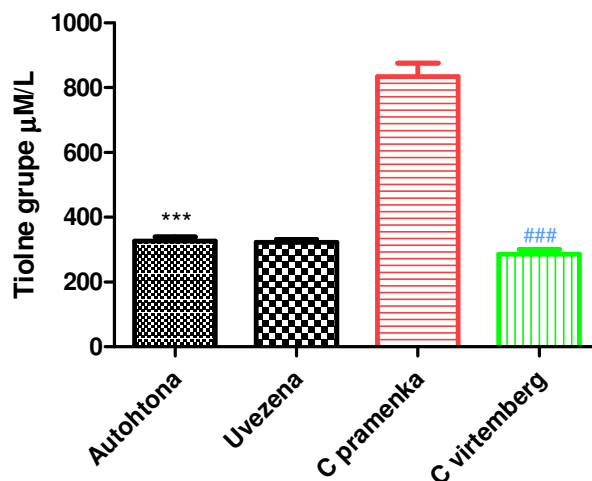
Grafikon 51. Koncentracija karbonilnih grupa u krvnoj plazmi autohtonih i uvezenih rasa ovaca i kontrolnih grupa pramenke i virtemberga

Legenda: (*) statistički značajna razlika između ogledne i kontrolne grupe ovaca, na nivou: $p < 0,05$ *; (+) statistički značajna razlika između oglednih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p < 0,01$ **

Tabela 45. Deskriptivni statistički parametri koncentracije karbonilnih grupa u krvnoj plazmi autohtonih i uvezenih rasa ovaca i kontrolnih grupa pramenke i virmberga

Karbonilne grupe	Grupe ovaca			
	autohtona	uvezena	C pramenka	C virmberg
\bar{X} ($\mu\text{M/L}$)	8,79	10,17	7,50	8,05
SD	3,99	3,01	0,55	1,52
SE	0,39	0,30	0,22	0,48

Analizom koncentracije karbonilnih grupa, između ogledne i kontrolne grupe autohtonih rasa ovaca nije utvrđena statistički značajna razlika ($p>0,05$). Kod uvezenih rasa ovaca utvrđen je porast koncentracije karbonilnih grupa u ovaca inficiranih parazitima, na nivou statističke značajnosti od $p<0,05$, u odnosu na kontrolnu grupu. Poređenjem koncentracije karbonilnih grupa, između autohtonih i uvezenih rasa ovaca dokazano je povećanje koncentracije ovog parametra kod uvezenih rasa ovaca inficiranih parazitima, na visokom nivou statističke značajnosti, $p<0,01$. Međusobnim poređenjem kontrolnih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, nije primećena statistički značajna razlika u koncentraciji karbonilnih grupa ($p>0,05$).



Grafikon 52. Koncentracija tiolnih grupa u krvnoj plazmi autohtonih i uvezenih rasa ovaca i kontrolnih grupa pramenke i virmberga

Legenda: (*) statistički značajna razlika između ogledne i kontrolne grupe ovaca, na nivou: $p<0,001$ ***; (#) statistički značajna razlika između kontrolnih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, na nivou: $p<0,001$ ###

Analizom koncentracije tiolnih grupa, između ogledne i kontrolne grupe autohtonih rasa ovaca utvrđen je pad koncentracije tiolnih grupa izazvan prisustvom parazitske

infekcije, na vrlo visokom nivou statističke značajnosti razlika ($p < 0,001$). Kod uvezenih rasa ovaca nije utvrđena pomena u koncentraciji tiolnih grupa u prisustvu parazitskih infekcija u odnosu na kontrolnu grupu ($p > 0,05$). Poređenjem koncentracije tiolnih grupa između autohtonih i uvezenih rasa ovaca nije dokazana promena u vrednosti ovog parametra ($p > 0,05$). Međusobnim poređenjem kontrolnih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca, uočene su statistički značajno niže vrednosti koncentracije tiolnih grupa kod uvezenih rasa ovaca, na nivou ($p < 0,001$).

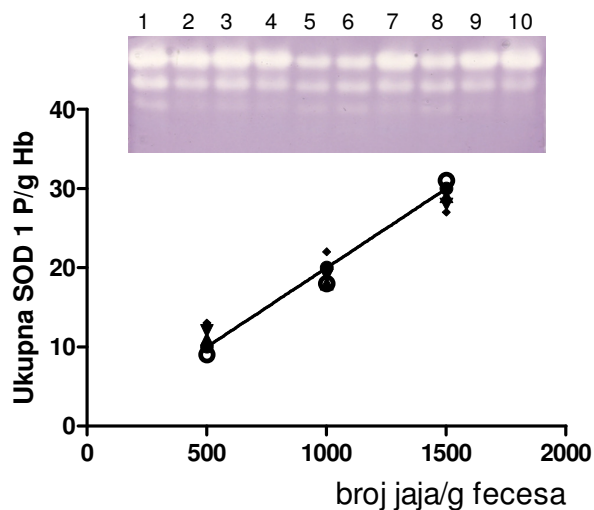
Tabela 46. Deskriptivni statistički parametri koncentracije tiolnih grupa u krvnoj plazmi autohtonih i uvezenih rasa ovaca i kontrolnih grupa pramenke i virtemberga

Tiolne grupe	Grupe ovaca			
	autohtona	uvezena	C pramenka	C virtemberg
\bar{X} ($\mu\text{M/L}$)	326,10	323,10	834,20	286,40
SD	145,20	94,95	59,83	46,13
SE	13,54	9,05	42,30	14,59

Da bi utvrdili da li u prisustvu parazitskih infekcija dolazi do promena u ukupnoj aktivnosti SOD 1, kod autohtonih i uvezenih rasa ovaca, izvršena je korelaciona analiza između intenziteta parazitskih infekcija, izraženog kao broj jaja/gramu fecesa i ukupne aktivnosti SOD 1, izražene kao P/gHb. Rezultati analize prikazani su na grafikonima 53 i 54.

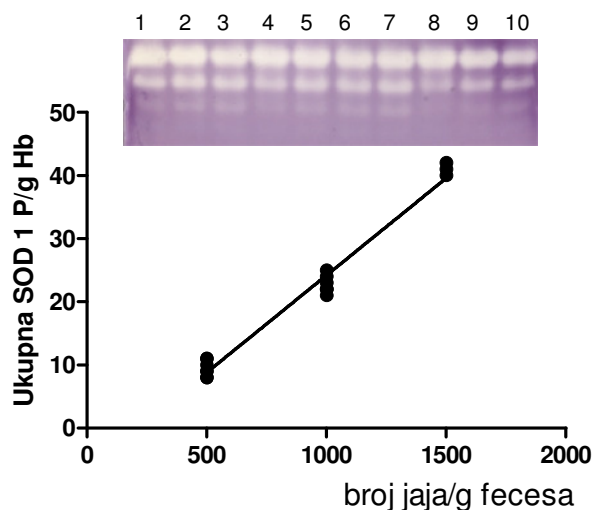
Analizom ukupne aktivnosti SOD 1 kod autohtonih rasa ovaca jasno se uočava zavisnost aktivnosti enzima od intenziteta parazitske infekcije. Kod blagog intenziteta parazitske infekcije (<500 jaja/g fecesa) aktivnost SOD 1 je $9,2 \pm 1,1$ P/gHb. Kod srednjeg intenziteta parazitske infekcije (500-1000 jaja/g fecesa), aktivnost SOD 1 se povećava za oko 100%. Kod visokog intenziteta parazitske infekcije ukupna aktivnoist SOD 1 je iznosila 30 ± 2 P/gHb.

Analizom ukupne aktivnosti SOD 1 kod uvezenih rasa ovaca takođe se uočava zavisnost aktivnosti enzima od intenziteta parazitske infekcije. Kod blagog intenziteta parazitske infekcije (<500 jaja/g fecesa) aktivnost SOD 1 je $10,5 \pm 1,2$ P/gHb. Kod srednjeg intenziteta parazitske infekcije (500-1000 jaja/g fecesa), aktivnost SOD 1 se povećava za oko 150%. Kod visokog intenziteta parazitske infekcije ukupna aktivnoist SOD 1 je iznosila $40,7 \pm 0,9$ P/gHb.



Grafikon 53. Uticaj intenziteta parazitske infekcije na ukupnu aktivnost SOD 1 kod autohtonih rasa ovaca

Legenda: Uzorci SOD 1, 5 i 6 kod ovaca sa blagim intenzitetom parazitske infekcije; uzorci SOD 1, 8 i 9 kod ovaca sa srednjim intenzitetom parazirske infekcije i uzorci SOD 1, 1-4, 7 i 10 kod ovaca sa visokim intenzitetom parazitske infekcije



Grafikon 54. Uticaj intenziteta parazitske infekcije na ukupnu aktivnost SOD 1 kod uvezenih rasa ovaca

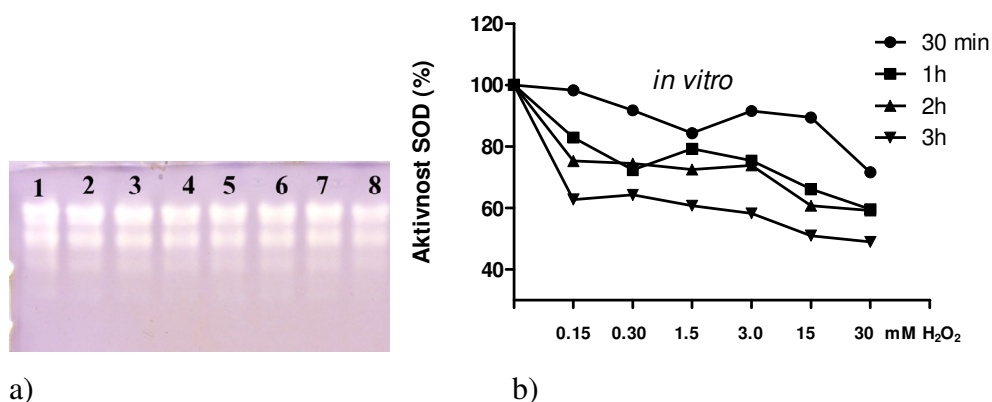
Legenda: Uzorci SOD 1, 10 kod ovaca sa blagim intenzitetom parazitske infekcije; uzorci SOD 1, 9 kod ovaca sa srednjim intenzitetom parazirske infekcije i uzorci SOD 1, 1-8 kod ovaca sa visokim intenzitetom parazitske infekcije

Analizom rezultata ukupne aktivnosti SOD 1, iz nagiba prave, jasno se uočava da je kod uvezenih rasa ovaca aktivnost ovog enzima povećana u prisustvu parazitske infekcije.

5.3. Oksidativne modifikacije (degradacija) SOD 1 u oglecima *in vitro* izazvana različitim koncentracijama i vremenom tretiranja sa vodonik-peroksidom

5.3.1. Inhibicija ukupne aktivnosti SOD 1 različitim koncentracijama vodonik-peroksida i vremena inkubiranja

Inkubiranje izolovane SOD 1 iz eritrocita ovaca sa različitim koncentracijama H_2O_2 (0,15 mM, 0,3 mM, 1,5 mM 3mM, 15mM i 30 mM) tokom 30 min, 1h, 2h i 3h rezultiralo je evidentnim gubitkom aktivnosti ovog enzima (Tabela 47). Skoro 15% aktivnosti SOD 1 bilo je smanjeno kada je ovaj enzim izložen dejstvu 1,5 mM H_2O_2 , i više od 28% inaktivacije je uočeno nakon izlaganja 30 mM H_2O_2 u trajanju od 30 min. Gubitak aktivnosti enzima bio je jasno zavisian od koncentracije H_2O_2 (Grafikon 55).



Grafikon 55. Aktivnost SOD 1 u prisustvu različitih koncentracija vodonik peroksida; a) elektroforegram SOD 1; 1-kontrola; 2-8 koncentracije vodonik peroksida od 0,15 do 30 mM, inkubiranih 30 do 180 min b) ukupna aktivnost SOD 1 u zavisnosti od koncentracije i vremena inkubiranja sa H_2O_2

Za jedan sat vremena inkubiranja smanjena je aktivnost enzima za 24,56% pri koncentraciji H_2O_2 od 3,0 mM, dok je aktivnost enzima smanjena za 33,90% i 40,43% pri tretiranju sa 15 mM i 30 mM H_2O_2 .

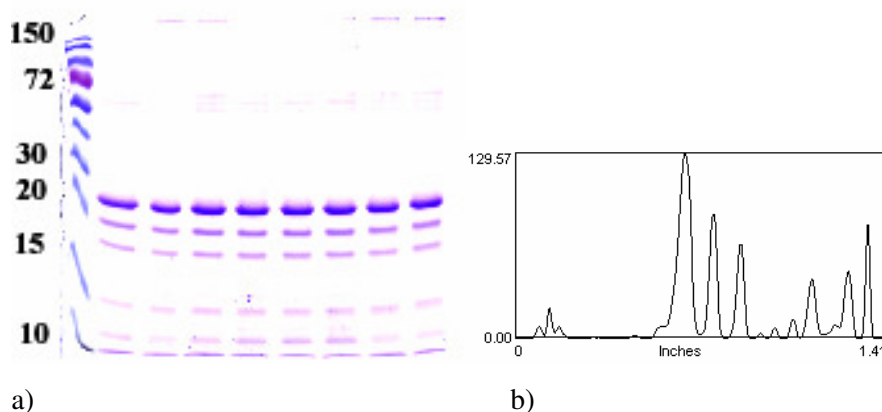
Sa produženjem vremena inkubiranja enzima i povišenjem koncentracije H_2O_2 aktivnost SOD 1 je inhibirana. Procenat aktivnosti ovog enzima u prisustvu različitih koncentracija H_2O_2 i vremena ekspozicije prikazan je na grafikonu 55.

Tabela 47. Aktivnost SOD 1 u zavisnosti od koncentracije i vremena inkubiranja sa H₂O₂

Koncentracija H ₂ O ₂ (mM)	Aktivnost SOD 1 (P/gHb)				
	Vreme inkubacije (min)				
	0	30	60	120	180
0,15	21,42	21,06	17,76	16,12	13,43
0,3	21,32	19,65	15,49	15,94	13,76
1,5	21,37	18,07	16,98	15,53	13,00
3,0	21,20	19,61	16,16	14,25	12,48
15	21,19	19,15	14,60	12,00	10,92
30	21,22	15,34	12,76	12,00	10,48

5.3.2. Elektroforetsko razdvajanje izolovane i modifikovane SOD 1

Modifikacija SOD 1 nakon izlaganja H₂O₂ ispitivana je poliakrilamid gel elektroforezom (PAGE) u nedenaturišućim (Sl. 10) i denaturišućim (SDS) uslovima (Sl. 11), kao i izoelektrofokusanjem (Sl. 12). Nedenaturišući gelovi (Sl. 10) jasno su pokazali formiranje nekoliko traka nakon oksidativne modifikacije SOD. Interesantno je da je izlaganje H₂O₂ rezultiralo u formiranju najmanje 5 traka demonstrirajući da je H₂O₂ zaista sposoban da modifikuje enzim na način sličan O₂^{•-}. Molekulske mase dobijenih traka iznosile su: 31,84 kDa, 26,91 kDa, 21,97 kDa, 15 kDa i 13 kDa. Molekulske mase dobijenih traka izračunate su na osnovu baždarnog dijagrama konstruisanog na osnovu log Mr standarda proteina i njihove pokretljivosti u poliakrilamid gelu ($y = 2,053 - 0,8965x$, $r = 0,9909$).

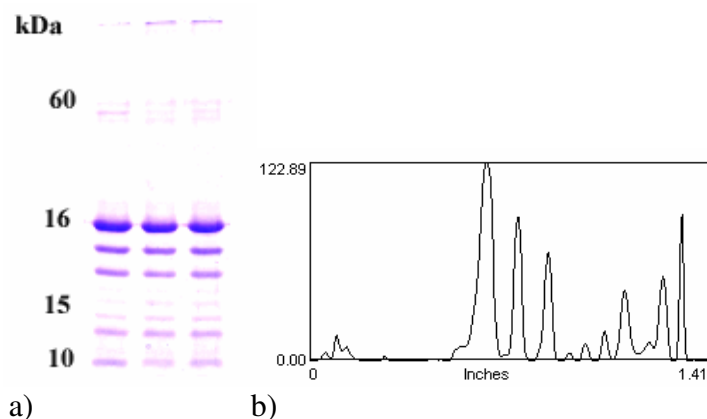


Slika 10. a) Elektroforegram SOD 1 inkubirane sa vodonik-peroksidom; b) denzitogram SOD 1 nakon elektroforetskog razdvajanja

Rezultati prikazani na slici 10 mogu da se objasne izmenom naelektrisanja ili direktnom fragmentacijom proteina. Mogućnost direktne fragmentacije proteina bila je dokazana izvođenjem SDS-PAG elektroforeze gde su uočene proteinske trake niskih molekulskih masa od 10 do 15 kDa. Osim toga, izoelektrično fokusiranje (Slika 12) je pokazalo da su promene naelektrisanja bile delimično odgovorne za različite proteinske trake uočene na SDS gelu (Slika 11).

Ovi rezultati pokazuju da SOD 1 podleže ranjoj, delimičnoj denaturaciji pri izlaganju oksidativnim uslovima, povećavajući na taj način mogućnost za brzu degradaciju modifikovanog proteina. Pored toga, trake uočene tokom oksidativnog izlaganja mogu ukazivati na to da reakcija H_2O_2 ili $O_2^{\cdot -}$ sa SOD 1 možda nije slučajna, već pre podrazumeva mesto-specifične modifikacije ovog enzima.

Inkubiranjem uzorka izolovane SOD 1 sa većom koncentracijom vodonik-peroksida i u dužem vremenskom intervalu dovodi do pojave većeg broja traka manjih molekulskih masa od 16 kDa kao i pojavu traka većih molekulskih masa. Rezultati analize prikazani su na slici 11.

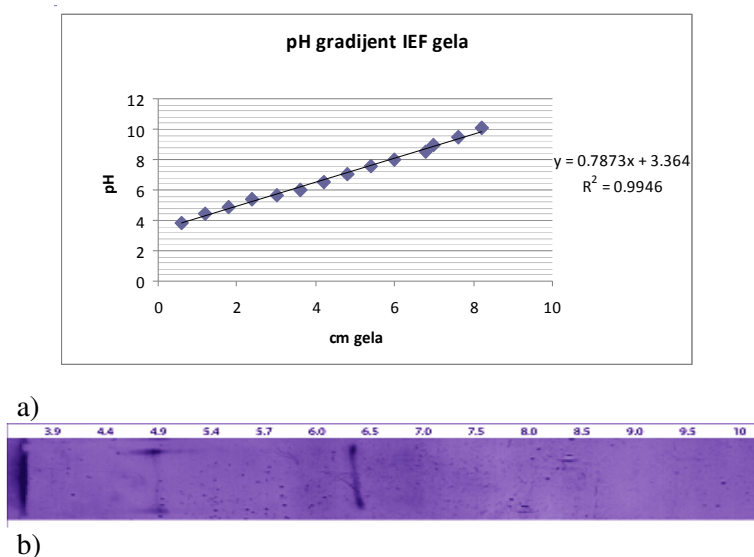


Slika 11. a) SDS-PAGE SOD 1 na 12% gelu nakon inkubiranja sa vodonik-peroksidom; b) denzitogram SOD 1 nakon elektroforetskog razdvajanja

5.3.3. Izoelektrofokusing izolovane i modifikovane SOD 1

Rezultati analize izoelektrofokusing SOD 1 dati su na slici 12. Izoelektrična tacka izračunata je korišćenjem standarda i konstruisanjem jednačine prave na osnovu

pokretljivosti markera i njihove pI vrednosti (srednja vrednost od 3 izmerena IEF gela) Izoelektrična tačka izolovanog enzima iznosila je 6,42. Dodatna, slabija proteinska traka je vidljiva na svim gelovima i ima vrednost pI 5,0. Uzorak je nanošen na samom kraju kiselog regiona. Prisustvo SOD 1 sa pI vrednošću od 5,0 ukazuje na post-translacione modifikacije ovog enzima, izazvane H₂O₂, pri čemu se menja naelektrisanje enzima.



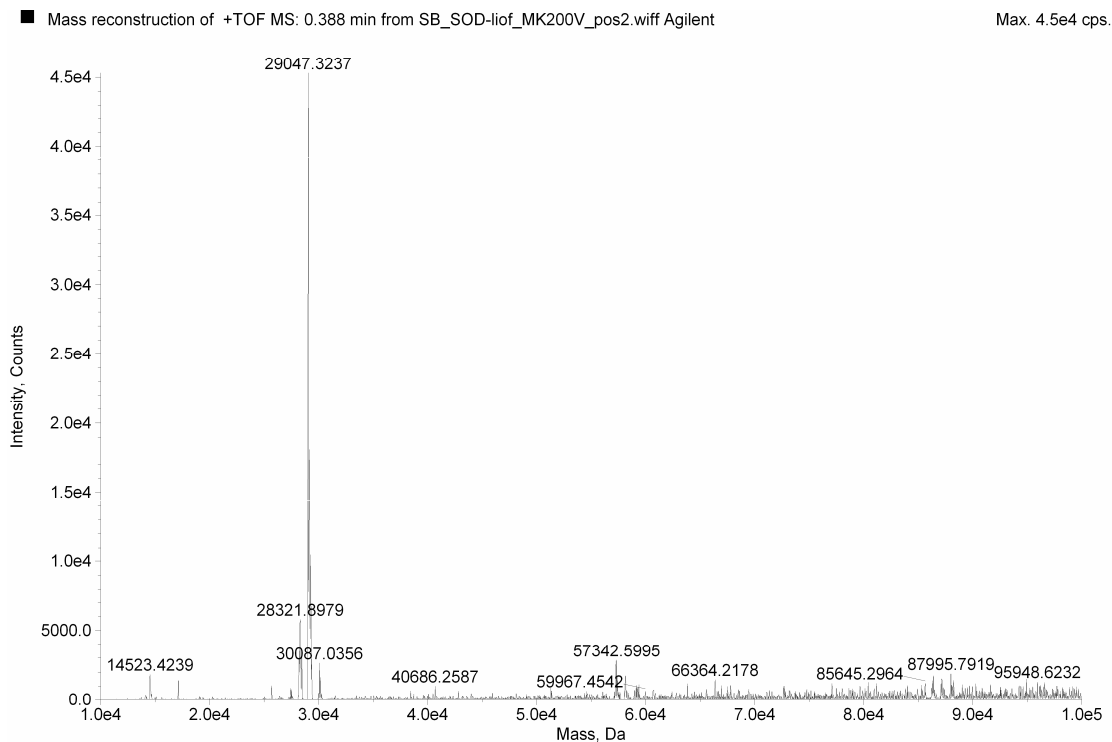
Slika 12. Izoelektrično fokusiranje na gelu sa pH vrednošću u opsegu od 4-10; (svi gelovi su izvedeni u automatskom elektroforeza gel sistemu), a) jednačina prave standarda proteina sa pI vrednostima; b) SDS-PAGE SOD 1

5.3.4. Tečno-masena spektralna analiza izolovane i modifikovane SOD 1

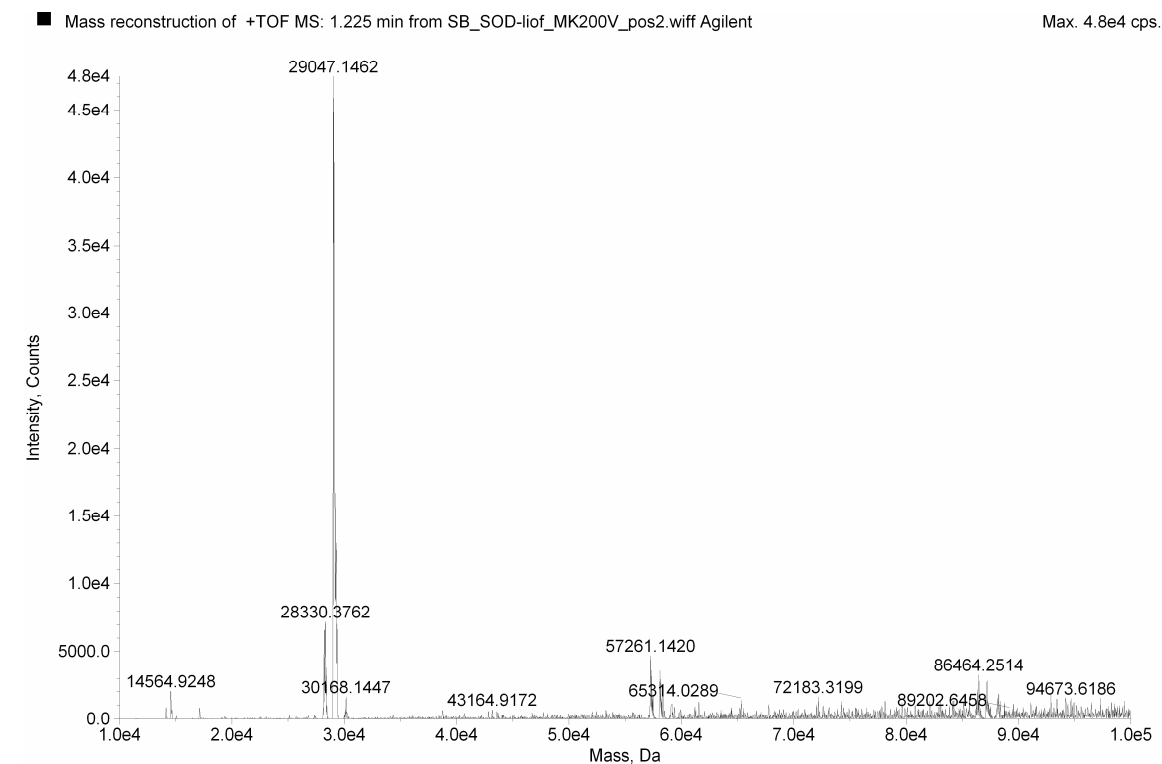
U cilju bliže karakterizacije izolovane SOD 1 iz eritrocita ovaca izvršena je tečno-masena spektralna analiza ovog enzima. Rezultati ove analize prikazani su na slikama od 13 do 19.

Tečno-masenom spektralnom analizom dokazano je prisustvo glavnog pika od 29,05 kDa. Pored ovog pika dokazano je minorno prisustvo pika od 14,5 kDa što ukazuje da je u uzorcima izolovane SOD 1 prisutan i monomer ovog enzima, kao i njegov dimer, od 57,3 kDa, prisustan u tragovima.

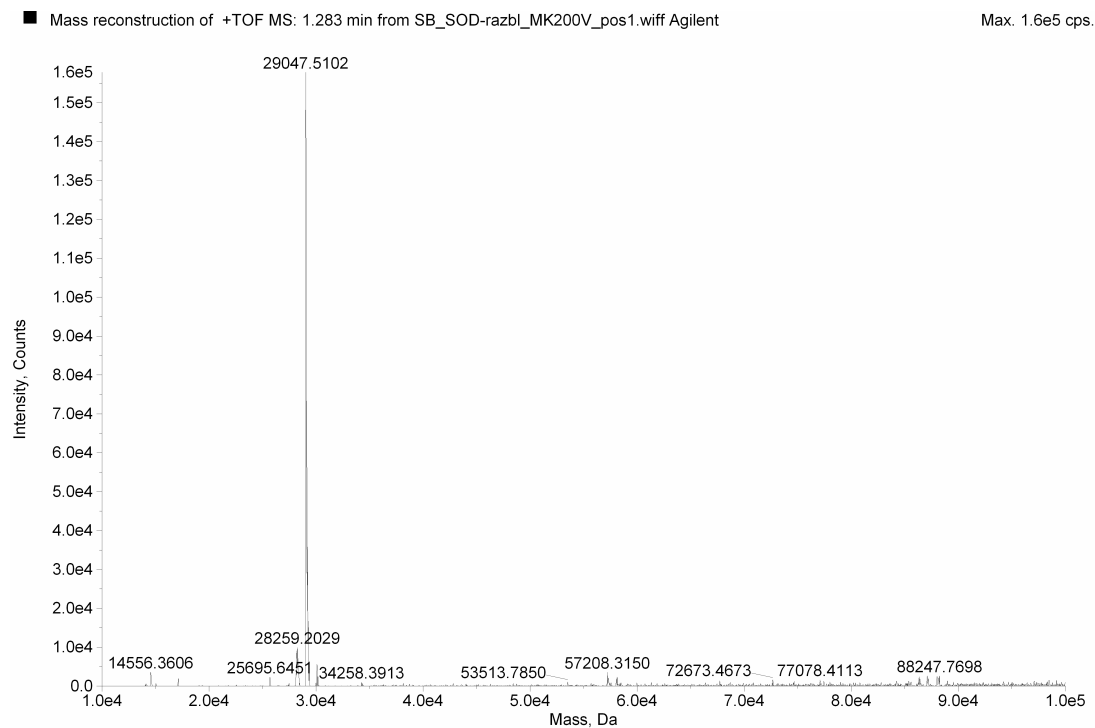
Teorijskom simulacijom, korišćenjem kompjuterskog programa Discovery Studio Visualizer 3.0 (USA), a na osnovu poznatih aminokiselinskih sekvenci SOD 1 izračunata molekulska masa ovog enzima je 31,39 kDa, dok je njena pI vrednost iznosila 6,14.



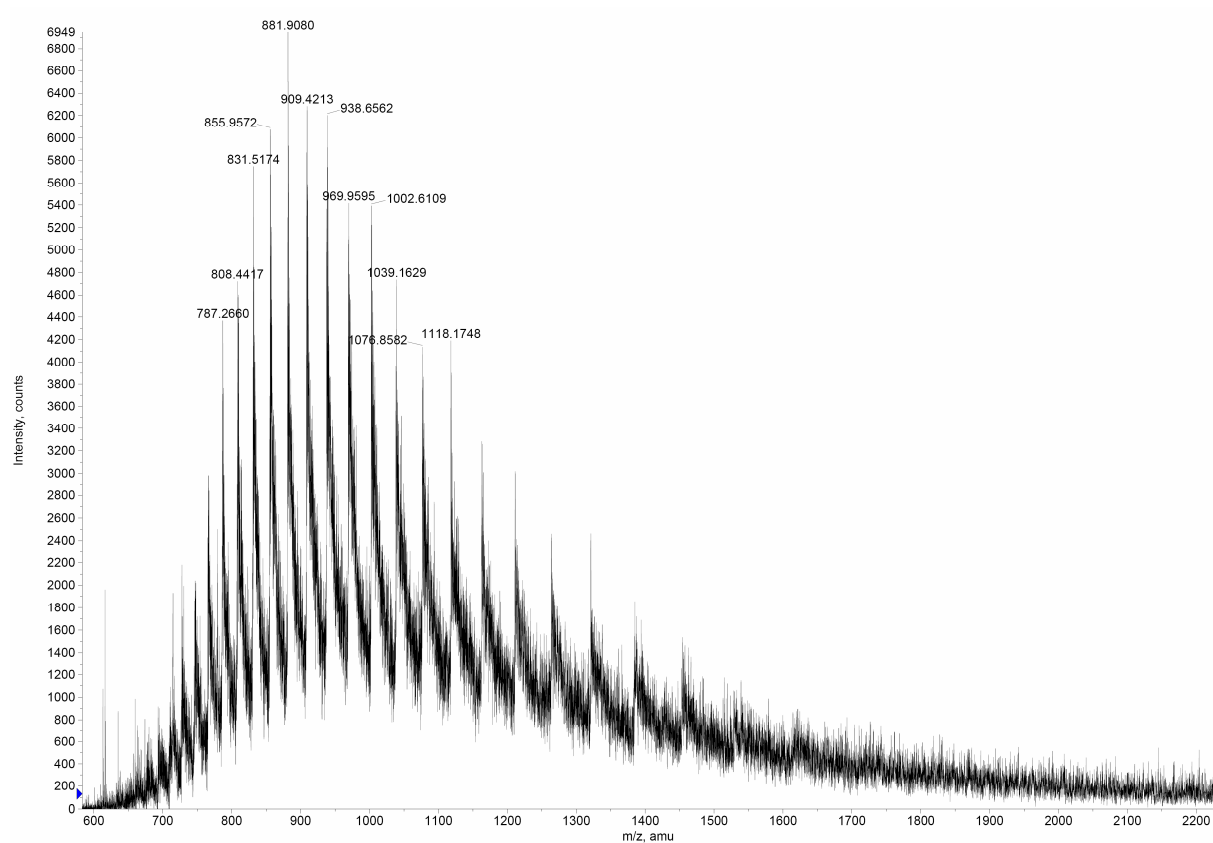
Slika 13. Tečno-maseni spektar nemodifikovane ovčije SOD 1 (kontrola)



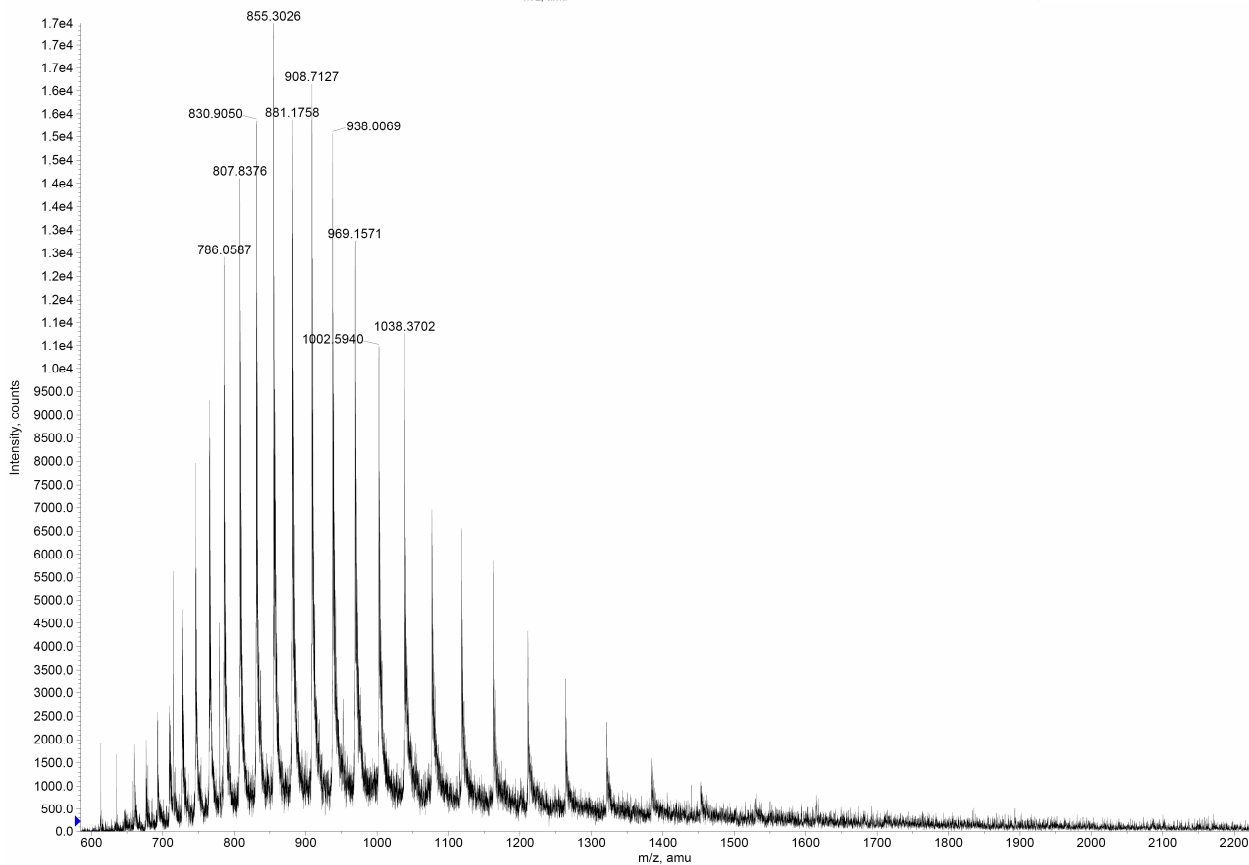
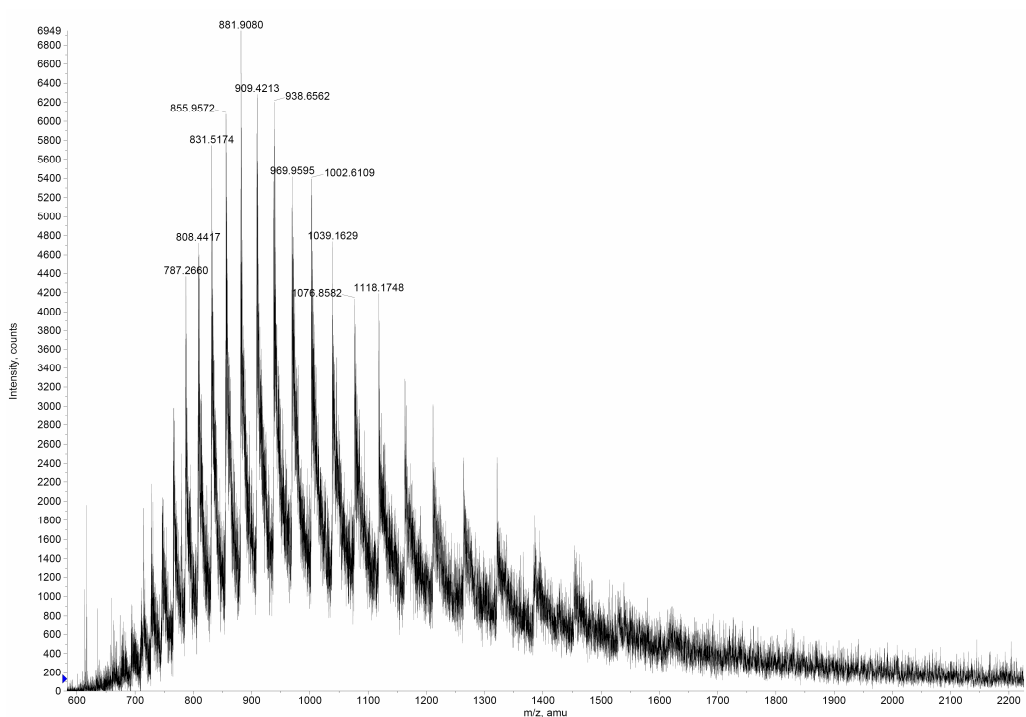
Slika 14. Tečno-maseni spektar nemodifikovane ovčije SOD 1



Slika 15. Tečno-maseni spektar nemodifikovane ovčije SOD 1



Slika 16. Gasno-maseni spektar nemodifikovane ovčije SOD 1



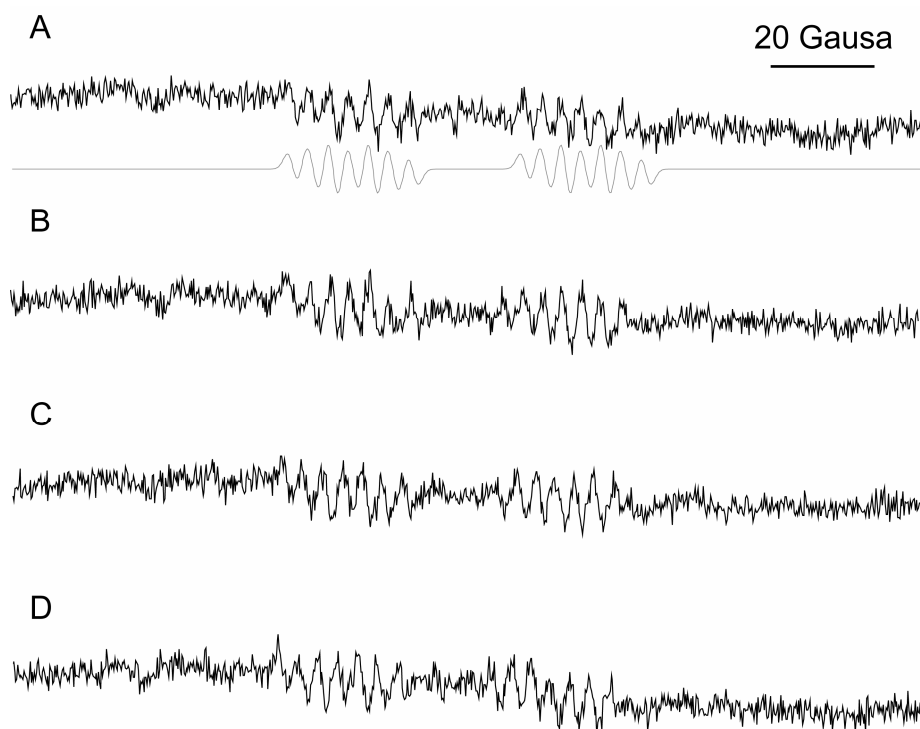
Slike 17 i 18. Gasno-maseni spektar koncentrovane i razblažene nemodifikovane ovčije SOD 1

Karakteristični, najintenzivniji pikovi nastali masenom fragmentacijom izolovane SOD 1 su: 855, 881, 908, 938, 969, 1038, 1039 m/z. Pored navedenih identifikovani su i joni manjih molekulskih masa i to: 831, 808 i 786 m/z. Navedeni fragmentacioni joni ukazuju da je verovatno došlo do karbonilovanja SOD 1, kao i oksidativne modifikacije slobodne SH grupe.

5.3.5. Elektron-spin paramagnetna rezonanca izolovane i modifikovane SOD 1

Da bi utvrdili da li vodonik-peroksid dovodi do stvaranja hidroksilnog radikala nakon dejstva na izolovanu SOD 1 izvršena je EPR analiza. Rezultati ove analize prikazani su na slici 19.

Slika pokazuje da kada je SOD 1 izložena uticaju H_2O_2 dolazi do produkcije azot-dioksid radikala, što je potvrđeno spektralnom simulacijom. Pre dodavanja H_2O_2 nije bilo detektabilne produkcije radikala. Produkcija je bila sličnog intenziteta u svim uzorcima, s tim da se može uočiti blago povećana produkcija u uzorcima 2 i 3 (paneli B i C na slici 19).



Slika 19. EPR spektri DEPMPPO adukta u rastvoru Cu,Zn-SOD tretirane vodonik peroksidom. A) Uzorak 1; B) Uzorak 2; C) Uzorak 3; D) Uzorak 4; Svaki spektar predstavlja akumulaciju tri eksperimentalna spektra. Sivo - spektralna simulacija signala DEPMPPO/O adukta koji predstavlja proizvod raspada DEPMPPO/ NO_2 adukta.

5.4. Korelacija intenziteta parazitskih infekcija sa izoenzimskim oblicima SOD 1

Da bi utvrdili da li izoenzimski oblici SOD 1 mogu da se koriste kao parametri parazitskih infekcija izvršili smo korelaciju izoenzimskih oblika SOD 1 i intenziteta parazitske infekcije kod autohtonih i uvezenih rasa ovaca. Rezultati ove analize prikazani su u tabeli 48.

Tabela 48. Korelaciona analiza izoenzimskih oblika SOD 1 i intenziteta parazitskih infekcija kod ovaca

Vrsta i intenzitet parazitske infekcije	Pearson-ov koeficijent korelacije (r^2)					
	Ukupna SOD 1	Izoenzimski oblici SOD 1				
		SOD 1-1	SOD 1-2	SOD 1-3	SOD 1-4	SOD 1-5
sjeničko-pešterska pramenka (I)						
<i>Trichostrongylidae</i>	0,129 ^{ns}	0,111 ^{ns}	0,209 ^{ns}	0,207 ^{ns}	0,182 ^{ns}	/
<i>Protostrongylidae</i>	0,085 ^{ns}	0,078 ^{ns}	-2,969 ^{ns}	0,136 ^{ns}	0,195 ^{ns}	0,896**
<i>Anoplocephalidae</i>	-0,044 ^{ns}	-0,084 ^{ns}	0,003 ^{ns}	0,253 ^{ns}	0,321*	0,583 ^{ns}
<i>Nematodirinae</i>	-0,180 ^{ns}	-0,261 ^{ns}	0,052 ^{ns}	0,415**	0,172 ^{ns}	-0,799*
<i>Trichuris</i>	0,202 ^{ns}	0,482 ^{ns}	-0,589 ^{ns}	-0,766*	-0,362 ^{ns}	1,00
virtemberg (I)						
<i>Trichostrongylidae</i>	0,230 ^{ns}	0,366 ^{ns}	-0,065 ^{ns}	-0,116 ^{ns}	-0,262 ^{ns}	0,345 ^{ns}
<i>Protostrongylidae</i>	0,340 ^{ns}	0,215 ^{ns}	0,308 ^{ns}	0,031 ^{ns}	0,105 ^{ns}	-0,753***
<i>Anoplocephalidae</i>	0,055 ^{ns}	0,146 ^{ns}	0,067 ^{ns}	-0,010 ^{ns}	-0,234 ^{ns}	-0,198 ^{ns}
<i>Nematodirinae</i>	0,102 ^{ns}	-0,056 ^{ns}	0,393*	0,368*	-0,025 ^{ns}	-0,378 ^{ns}
<i>Trichuris spp</i>	0,409 ^{ns}	0,564 ^{ns}	-0,031 ^{ns}	-0,347 ^{ns}	-0,228 ^{ns}	/
lipska pramenka (II)						
<i>Trichostrongylidae</i>	-0,597	-0,321	-0,129	-0,142	-0,742*	/
virtemberg (II)						
<i>Trichostrongylidae</i>	-0,127	-0,257	0,102	-0,110	-0,298	/
<i>Strongyloides spp</i>	-0,622*	-0,772**	0,005	0,262	0,317	/
<i>Trichuris spp</i>	/	/	/	/	/	/
<i>Protostrongylidae</i>	0,171	0,119	0,238	0,488	-0,420	/
<i>Nematodirinae</i>	-0,998***	-0,975***	-0,981***	-0,973***	-0,912***	/
vlaška vitoroga pramenka (III)						
<i>Trichostrongylidae</i>	0,626 ^{ns}	0,487 ^{ns}	0,704 ^{ns}	0,033 ^{ns}	0,984**	-0,789 ^{ns}
<i>D. dendriticum</i>	-0,928*	-0,833 ^{ns}	-0,581 ^{ns}	-0,552 ^{ns}	-0,742 ^{ns}	0,835 ^{ns}
virtemberg (III)						
<i>Trichostrongylidae</i>	0,384 ^{ns}	0,327 ^{ns}	0,369 ^{ns}	0,102 ^{ns}	-0,233 ^{ns}	/
<i>D. dendriticum</i>	0,785*	0,810*	-0,151 ^{ns}	-0,195 ^{ns}	0,178 ^{ns}	/
sjeničko-pešterska pramenka (IV)						
<i>Trichostrongylidae</i>	-0,205 ^{ns}	-0,202 ^{ns}	-0,247 ^{ns}	-0,312 ^{ns}	-0,185 ^{ns}	/
<i>D. dendriticum</i>						
<i>Nematodirinae</i>	0,215 ^{ns}	0,178 ^{ns}	0,477 ^{ns}	0,341 ^{ns}	-0,072 ^{ns}	0,116 ^{ns}
<i>Trichostrongylidae</i>	0,375 ^{ns}	-0,860***	-0,059 ^{ns}	-0,101 ^{ns}	-0,293 ^{ns}	0,345 ^{ns}
Il d Frans (IV)						
<i>Trichostrongylidae</i>	0,485***	0,225 ^{ns}	0,302*	/	/	/
<i>Protostrongylidae</i>	0,795***	-0,277 ^{ns}	0,877***	/	/	/
<i>D. dendriticum</i>	0,95***	0,92***	/	/	/	/

*p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns – nema statističke značajnosti

Izoenzimski oblici SOD 1 koreliraju sa intenzitetom parazitske infekcije na sledeći način: SOD 1-1 negativno korelira sa *Trichostrongylidae*, *Nematodirinae*, *Strongyloides* spp sa blagim i srednjim intenzitetom parazitske infekcije. Izoenzimski oblik SOD 1-2 pozitivno korelira sa *Trichostrongylidae*, *Protostrongylidae*, *Nematodirinae* i *D. dendriticum* sa visokim intenzitetom parazitske infekcije uvezenih rasa ovaca. SOD 1-3 negativno korelira sa *Nematodirinae* i *Trichuris* spp kod blagog intenziteta parazitske infekcije kod autohtonih i uvezenih rasa ovaca, dok pozitivno korelira sa *Nematodirinae* kod visokog intenziteta parazitske infekcije. Izoenzim SOD 1-4 pozitivno korelira sa *Anoplocephalidae* sa visokim intenzitetom parazitske infekcije kod autohtonih rasa ovaca. SOD 5 pozitivno korelira sa *Protostrongylidae* kod visokog intenziteta parazitske infekcije. Kod blagog intenziteta parazitske infekcije dolazi do narušavanja strukture SOD 1 i gubitka njene aktivnosti. Kod uvezenih rasa ovaca dolazi do povećanja aktivnosti izoenzimskog oblika SOD 1-2 kao posledice narušavanja glavnog i dominantnog oblika SOD 1-1. Kod visokog intenziteta parazitske infekcije postoji pozitivna korelacija sa odgovarajućim izoenzimskim oblicima SOD 1 (SOD 1-2, SOD 1-4, SOD 1-5).

6. DISKUSIJA

U kliničkoj patologiji ovaca parazitske infekcije zauzimaju značajno mesto i pored zdravstvenog, predstavljaju i veliki ekonomski problem u uzgoju ovaca. Ovce su visoko prijemčive na infekciju parazitima, čak i u uslovima vrlo niske infekcije pašnjaka (Chauvin i sar., 2001; Suarez i sar., 2009). Naime, način paše koji podrazumeva unošenje delova trave vrlo blizu zemljišta, kao i same zemlje (dnevno ovca unese i do pola kilograma zemlje u svoj digestivni trakt) predstavlja glavni faktor koji ovce predisponira na infekcije parazitskim vrstama (Al-Shaibani i sar., 2008). Na taj način, ovce omogućavaju održavanje i amplifikaciju intenziteta parazitske faune u jednom epizootiološkom području i istovremeno, mogu poslužiti kao „indikator“ vrsta životinja prisutne parazitske faune u nekom području (Saleh, 2008; Kenyon i sar., 2009). Takođe, očekuje se da će zbog klimatskih promena, tj. globalnog otopljanja, i sve veće rezistencije na postojeće antihelmintike (Fleming i sar., 2006) problem parazitskih infekcija kod malih preživara dobijati na značaju u budućnosti (Hudson i sar., 2006; Van Dijk i sar., 2010; Martinez-Valladares i sar., 2013).

Posmatrano sa aspekta evolucije, uspešnost nekog parazita se ne meri jačinom i vrstom poremećaja koji izaziva u domaćinu, već njegovom sposobnošću adaptacije i integracije u unutrašnju sredinu domaćina. Nasuprot akutnim, u većini slučajeva kratkotrajnim infekcijama koje izazivaju bakterije i virusi, infekcije izazvane parazitskim protozoama ili helmintima su hroničnog toka i parazit može biti perzistentno prisutan u domaćinu za duži vremenski period. Idealno uspešan parazit će regulisati imunski odgovor domaćina, suprimirajući ga samo do te mere koja će obezbediti opstanak parazita u domaćinu, ne remeteći u isto vreme odgovor domaćina na druge patogene koji bi mogli dovesti do smrti domaćina (Maizels i sar., 2004; Dzik, 2005).

Patogeno delovanje parazita na ili u domaćinu je različito i može biti: 1. mehaničko delovanje, 2. toksično delovanje, 3. imunološki posredovan patogeni efekat, 4. oduzimanje hrane i esencijalnih supstanci od domaćina, 5. uticaj na metabolizam domaćina, 6. unošenje u domaćina

bakterija, virusa i drugih mikroorganizama i 7. smanjenje otpornosti domaćina prema bakterijama, virusima i drugim parazitima (Tizard, 2008).

Veliki broj vrsta parazita, specijalno helminata, pri svom endogenom razvoju migriraju kroz različite organe domaćina razarajući njihova tkiva. Ovaj vid mehaničkog patogenog delovanja parazita je veoma značajan. Na ovaj način paraziti deluju tokom prodiranja u domaćina, tokom migracije njihovih razvojnih oblika kroz organizam, tokom boravka u stalnom mestu njihove lokalizacije i izlaska iz njega. Najznačajnija oštećenja nastaju tokom migracije parazita kroz pojedine organe, naročito ako je migracijom obuhvaćen veći broj organa (Theodoropoulos i sar., 2001).

Na domaćina može delovati toksično čitav niz materija koje proizvode paraziti i izlučuju ih u sredinu u kojoj žive. Isto tako, i supstance oslobođene u domaćinu posle smrti i raspadanja parazita mogu delovati kao toksične materije. Sve ove materije mogu delovati lokalno na tkivo organa u kome paraziti žive ili, posle resorbovanja u krvotok i tkivne tečnosti, i na druge organe domaćina koji nemaju direktne veze sa parazitima. Proizvodi živih parazita koji su štetni za domaćina mogu biti pravi toksini kao i materije koje paraziti proizvode fiziološkim procesima svog metabolizma. Veoma je mali broj parazita koji uopšte proizvode prave toksine (npr. sarkocistin kod *Sarcocystis* spp). Uobičajeno je da se pod parazitskim toksičnim materijama podrazumevaju proizvodi njihovog metabolizma i sekrecije, koji štetno deluju na domaćina. Krajnji proizvodi metabolizma parazita rezultat su njihove normalne ekskretorno-sekretorne funkcije i označeni su zajedničkim imenom kao ekskretorno-sekretorni proizvodi. Do sada je relativno malo poznato koje su to sve materije, jer je uopšte relativno malo i istraženo u oblasti metabolizma samih parazita (O' Neill i sar., 2001; Dzik, 2005).

Mada termin "helmini" pokriva polifiletsku grupu, kao što su nematode na jednoj strani, a trematode i cestode na drugoj strani, svi parazitski organizmi imaju zajedničku istoriju života – evoluciju, sa ostalim slobodno-živećim organizmima, tako da koriste univerzalne molekule za veoma različite funkcije. Ovakva adaptacija je podrazumevala ili uspešno savladavanje ili izbegavanje imunskog sistema domaćina. Parazitski helmini prema tome nisu loše adaptirani patogeni organizmi već u potpunosti adaptirani obligatni paraziti čiji opstanak zavisi od mogućnosti dostizanja pune adaptacije na domaćina. Posledično tome, oni obično uzrokuju srednje teške ili subkliničke forme bolesti (Idris i sar., 2012). Paraziti uzrokuju bolest, a ne smrt.

Samo u slučaju kada helminti invadiraju domaćina na koga nisu u potpunosti adaptirani ili u neobično velikom broju dolazi do pojave klinički ispoljene bolesti. Takođe, posebno su ugrožene mlađe kategorije, kao i gravidne jedinice (Bishop i Stear, 2001). Iz ovoga sledi jedna od bitnih karakteristika infekcije crevnim nematodama, a to je, vrlo široka varijacija prisustva parazita unutar populacije životinja. Obično ne postoji normalna distribucija, ali se ipak može uočiti jedan obrazac raširenosti parazitske infekcije u nekoj grupi životinja. Drugim rečima, minimalan broj domaćina može biti utočište većini parazita. Na taj način, većina životinja može biti inficirana sa svega nekoliko parazita (blagi intenzitet infekcij), ali i nekoliko životinja, unutar iste populacije, može sadržati veliki broj parazita (visok intenzitet infekcije). Veličina opterećenosti domaćina parazitima je kontrolisana domaćinovim genetskim faktorima i prirodom imunskog odgovora na ove parazite. Neke životinje mogu biti predisponirane na tešku infekciju kao rezultat genetskih, bihejvioralnih, nutricionističkih ili faktora sredine. Ova predispozicija može takođe da ukazuje na razlike u ekspoziciji, prijemčivosti ili rezistenciji (Dzik, 2005; Tizard, 2006; Dzik, 2010).

Jednostrana introdukcija visokoproduktivnih rasa, neminovno je dovelo do gubitka interesa za gajenje autohtonih, niskoproduktivnih rasa, a samim tim do gubitka biodiverziteta autohtonih animalnih genetičkih resursa u celom svetu. Imajući u vidu značaj genetičke varijabilnosti za opstanak vrste, predložen je globalni internacionalni program za proučavanje i zaštitu animalnih genetičkih resursa, to jest ugroženih rasa i varijeteta (*The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture*, FAO 2007). U tom smislu je razvijena metodologija za sprovođenje ovog programa koja između ostalog uključuje i procedure za opisivanje i karakterizaciju rasa, fenotipske i fiziološke osobine koje karakterišu rasu, adaptiranost na uslove gajenja, kao i formiranje baze podataka za utvrđene karakteristike (*Domestic Animal Diversity Information System*, DAD IS, 2012). Na osnovu dobijenih podataka procenjuje se status rase ili soja u jednoj zemlji i donosi odluka o primeni odgovarajuće metode za konzervaciju rase. Na osnovu dosadašnjeg rada na konzervaciji populacija, formirao se stav, koji se sve više koristi kao osnovni princip, a to je, da konzervacija populacija ne sme da se posmatra kao entitet za sebe, već se favorizuje racionalno korišćenje animalnih genetičkih resursa, uz definisan odgajivački program i zdravstveni nadzor. Sa aspekta veterinarske medicine konzervacija ugroženih sojeva i formiranje banke gena, ima značajno mesto u rekonstrukciji evolutivno adaptiranih populacija na uslove gajenja kao i u mogućnosti da se očuvaju retki geni, odnosno specifične karakteristike

populacije. Posebno se ističe značaj konzervacije animalnih genetičkih resursa u cilju borbe protiv pojedinih parazitskih i infektivnih bolesti (Wakelin, 1992).

Pored koprološke McMaster-ove metode, koja i pored nedostataka, još uvek predstavlja „zlatni standard“ (Holdsworth i sar., 2004) za utvrđivanje intenziteta parazitske infekcije i rezistencije parazita na antihelminthike, postoje pokušaji da se razviju testovi zasnovani na molekularnoj PCR tehnici. Međutim, prisustvo inhibitornih materija (huminske kiseline i polisaharida) u fecesu predstavlja limitirajući faktor koji onemogućava izolovanje i kvantifikaciju DNA parazita iz fecesa, što je neophodno u cilju utvrđivanja intenziteta parazitske infekcije ovim testom. Pokušaji uvođenja ELISA u parazitološkoj dijagnostici, gde se na osnovu specifičnih antitela u krvnom serumu jedinke, pored vrste prisutne parazitske infekcije, može utvrditi i intenzitet, nisu pružili zadovoljavajuće rezultate, zbog velikog procenta lažno pozitivnih rezultata. Zajednički nedostatak svih ovih metoda nemogućnost utvrđivanja prisutne parazitske infekcije u prepatentnom periodu, kada su po pravilu i serološke i koprološke pretrage lažno negativne. Imajući u vidu i podatak da je od 2006. godine u Evropskoj Uniji zabranjena profilaktička dehelmintizacija (Andersen i sar., 2013), odnosno dozvoljena jedino terapijska, koja pored utvrđivanja vrste prisutne parazitske infekcije podrazumeva i određivanje njenog intenziteta, neophodna su dalja istraživanja u cilju realne procene intenziteta prisutne parazitske infekcije u organizmu domaćina.

Imajući u vidu gore navedeno, jedan od ciljeva ove doktorske disertacije bio je da se utvrdi ekstenzitet i intenzitet prisutnih parazitskih infekcija kod autohtonih sojeva pramenke (sjeničko-peštarska, lipska i vlaška vitoroga pramenka) i uvezenih rasa ovaca (virtemberg, il d frans i šarole), u četiri ispitivana područja (I-Sjeničko-peštarska visoravan, II- Smederevo – selo Lipe, III-južni Banat i IV-Obrenovac).

Na osnovu ključeva za identifikaciju (Euzaby, 1981) u ispitivanom području Sjeničko-peštarske visoravni kod sjeničko-peštarske pramenke i virtemberg ovaca ustanovljena je parazitska infekcija sa: *Trichostongylidae*, *Nematodirinae*, *Protostrongylidae*, *Trichuris* spp, *Anoplocephalidae* i *Eimeria* spp. Nije uočena razlika u ekstenzitetu parazitske infekcije između ovaca u ovom području.

Kod najvećeg procenta ispitivanih ovaca (60% sjeničko-peštarske pramenke i 58,82% virtemberg ovaca) ustanovljena je istovremena parazitska infekcija sa *Trichostongylidae*, *Protostrongylidae* i *Anoplocephalidae*. Manji procenat ovaca bio je istovremeno inficiran sa *Trichostongylidae*, *Protostrongylidae*, *Trichuris* spp i *Anoplocephalidae* (15% sjeničko-peštarske pramenke i 17,65% virtemberg ovaca). Istovremena infekcija sa *Trichostongylidae* i *Protostrongylidae* utvrđena je kod 20% sjeničko-peštarske pramenke i 17,65% virtemberg ovaca. Na osnovu broja parazitskih elemenata po gramu fecesa u grupi sjeničko-peštarske pramenke utvrđen je blagi intenzitet infekcije sa *Trichostongylidae* (438±304) i *Trichuris* spp (28±9); srednji sa *Protostrongylidae* (101±34); sa *Anoplocephalida* srednji (81±19) i visoki (156±25); sa *Nematodirinae* blagi (67±32), srednji (432±154) i visoki (640±33). U istom području kod virtemberg rase ovaca utvrđen je blagi intenzitet parazitske infekcije sa *Protostrongylidae* (80±44) i *Trichuris* spp (41±11); srednji intenzitet infekcije sa *Trichostongylidae* (1135±130) i *Nematodirinae* (394±273) i sa *Anoplocephalidae* srednji (43±5) i visoki (396±150) intenzitet parazitske infekcije. Poređenjem intenziteta parazitske infekcije dokazana je statistički značajno veća razlika u intenzitetu infekcije sa *Trichostongylidae* ($p < 0,001$) i *Nematodirinae* ($p < 0,05$) kod virtemberg ovaca, dok je kod sjeničko-peštarske pramenke utvrđen veći intenzitet parazitske infekcije sa *Protostrongylidae*, na nivou značajnosti $p < 0,05$. Kod virtemberg rase ovaca utvrđen je veći intenzitet infekcije sa *Trichuris* spp, ali bez statističke značajnosti u odnosu na sjeničko-peštarsku pramenku ($p > 0,05$).

U ispitivanom području Smederevo-selo Lipe, utvrđena je parazitska infekcija lipske pramenke sa *Trichostongylidae*, *Trichuris* spp i *Strongyloides papillosus* i virtemberg ovaca sa *Trichostongylidae*, *Trichuris* spp, *S. papillosus*, *Protostrongylidae* i *Nematodirinae*. Analizom rezultata ekstenziteta parazitske infekcije ispitivanih ovaca, utvrđeno je da je 70% lipske pramenke bilo negativno na prisustvo parazitske infekcije, dok je svega 20% ovaca virtemberg rase bilo negativno. Kod lipske pramenke ustanovljeno je istovremeno prisustvo dve vrste parazitskih infekcija, sa *Trichostongylidae* i *Protostrongylidae*, i monoinfekcija sa *Trichostongylidae*, u 7,69% ispitivanih ovaca. Kod ovaca virtemberg rase, u 22% slučajeva, ustanovljena je istovremena parazitska infekcija sa *Trichostongylidae* i *S. papillosus* i u 11,11% sa *Trichostongylidae* i *Protostrongylidae*. Takođe, u 11,11% slučajeva utvrđena je istovremena infekcija sa *Trichostongylidae*, *Protostrongylidae* i *S. papillosus* i sa *Trichostongylidae*, *Protostrongylidae*, *S. papillosus* i *Trichuris* spp. Monoinfekcija sa *Protostrongylidae* utvrđena je

u 11,11% jedinki. Na osnovu broja parazitskih elemenata po gramu fecesa kod lipske pramenke utvrđen je blagi intenzitet parazitske infekcije sa *Trichostongylidae* (55 ± 46), *Trichuris* spp (11 ± 3) i *S. papillosus* (41 ± 2). Kod virtemberg ovaca, u istom ispitivanom području utvrđen je blagi intenzitet infekcije sa *Trichuris* spp (12 ± 2) i *S. papillosus* (21 ± 7), i blagi i srednji intenzitet parazitske infekcije sa *Trichostongylidae* (631 ± 361 i 1180 ± 34), *Protostrongylidae* (36 ± 3 i 69 ± 17) i *Nematodirinae* (41 ± 20 i 123 ± 11). Poređenjem intenziteta parazitske infekcije utvrđen je statistički značajno veći intenzitet parazitske infekcije sa *Trichostongylidae* kod ovaca virtemberg rase, na nivou statističke značajnosti $p < 0,05$.

U ispitivanom području južni Banat kod vlaško vitoroge pramenke i virtemberg ovaca utvrđena je parazitska infekcija sa *Trichostongylidae* i *Dicrocoelium dendriticum*, pri čemu je 57,15% vlaške vitoroge pramenke bilo negativno na prisustvo parazitske infekcije, nasuprot ovacama virtemberg rase, gde je utvrđeno svega 10% negativnih jedinki. Kod 23,81% vlaško vitoroge pramenke i 60% virtemberg ovaca utvrđena je istovremena parazitska infekcija sa *Trichostongylidae* i *D. dendriticum*. Kod 14,28% vlaško vitoroge pramenke i 30% virtemberg ovaca utvrđena je monoinfekcija sa *Trichostrongylidae*. Jedino je kod vlaško vitoroge ovce utvrđena monoinfekcija sa *D. dendriticum*, u 4,76% ispitanih jedinki. Na osnovu broja jaja po gramu fecesa kod vlaške vitoroge pramenke utvrđen je blagi intenzitet parazitske infekcije sa *Trichostongylidae* (578 ± 122) i *D. dendriticum* (21 ± 9). Kod virtemberg ovaca utvrđen je blagi (711 ± 100) i srednji (1300 ± 50) intenzitet parazitske infekcije sa *Trichostongylidae* i blagi intenzitet infekcije sa *D. dendriticum* (26 ± 10). Poređenjem intenziteta parazitske infekcije utvrđen je statistički značajno veći intenzitet parazitske infekcije sa *Trichostongylidae* kod virtemberg ovaca, na nivou statističke značajnosti $p < 0,05$.

U ispitivanom području Obrenovac utvrđena je parazitska infekcija sjeničko-peštarske pramenke sa *Trichostongylidae*, *Nematodirinae*, *D. dendriticum* i *Eimeria* spp; il d frans ovaca sa *Trichostongylidae*, *Protostrongylidae* i *D. dendriticum* i monoinfekcija šarole ovaca sa *Protostrongylidae*. Analizom rezultata ekstenziteta parazitske infekcije ispitivanih ovaca utvrđeno je da je 10% sjeničko-peštarske pramenke, 39,87% il d frans i 85,71% šarole rase ovaca bilo negativno na prisustvo parazitske infekcije. Monoinfekcija sa *Trichostrongylidae* utvrđena je kod 55% ovaca sjeničko-peštarske pramenke i 13,28% il d frans ovaca. Kod 5% sjeničko-peštarskih pramenki je utvrđena istovremena infekcija sa *Trichostrongylidae* i *D. dendriticum*, i u

30% sa *Trichostrongylidae* i *Nematodirinae*. Kod il d frans ovaca u 40,20% slučajeva je utvrđena istovremena infekcija sa *Trichostrongylidae* i *Protostrongylidae*, i u 13,28% jedinki monoinfekcija sa *Trichostrongylidae* i u 6,64% sa *D. dendriticum*. Kod šarole rase ovaca bila je prisutna monoinfekcija sa *Protostrongylidae* u 14,29% ispitivanih ovaca. Na osnovu broja parazitskih elemenata po gramu fecesa kod sjeničko peštarske pramenke utvrđen je blagi (190 ± 70), srednji (1182 ± 150) i visoki (2130 ± 170) intenzitet parazitske infekcije sa *Trichostrongylidae* i blagi intenzitet infekcije sa *D. dendriticum* (15 ± 5), *Nematodirinae* (28 ± 16) i *Eimeria* spp (65 ± 4). Kod il d frans ovaca utvrđen je blagi i srednji intenzitet parazitske infekcije sa *Trichostrongylidae* (318 ± 159 i 1500 ± 270) i *Protostrongylidae* (28 ± 12 i 102 ± 35) i blagi intenzitet infekcije sa *D. dendriticum* (16 ± 3). Kod šarole rase ovaca utvrđen je blagi intenzitet parazitske infekcije sa *Protostrongylidae* (21 ± 3). Poređenjem intenziteta parazitske infekcije utvrđen je statistički značajno veći intenzitet parazitske infekcije sa *Trichostrongylidae* kod sjeničko-peštarske pramenke u odnosu na il d frans rasu ovaca, na nivou statističke značajnosti $p < 0,01$.

Naši rezultati analize ekstenziteta i intenziteta parazitskih infekcija kod ispitivanih ovaca su u saglasnosti sa nalazima drugih autora (Gauly i Erhardt, 2002; Al-Shaibani i sar., 2008; Idris i sar., 2012).

U oksidativnom metabolizmu, u fiziološkim uslovima, formiranje slobodnih radikala odvija se kontinuirano, ali u neznatnom obimu. U uslovima poremećene homeostaze u ćeliji nastaje višak slobodnih radikala, što dovodi do oštećenja ćelija i tkiva. Antioksidativni sistem objedinjuje niz reakcija usmerenih na različite aspekte i faze u lancu oksidativnog oštećenja konstituenata ćelija i tkiva (Lykkesfeldt i Svendsen, 2007).

Prisustvo parazitskih elemenata u makroorganizmu pokreće odbrambene mehanizme domaćina. Prvu, nespecifičnu liniju odbrane, predstavljaju makrofagi koji sintetišu u svojim strukturama reaktivnu kiseoničnu vrstu, superoksidni anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$). SOD je enzim koji neutrališe prisustvo superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$) do H_2O_2 . Njena aktivnost može biti povećana u slučaju prevelike produkcije $O_2^{\cdot-}$ ili inhibirana u slučaju prevelike proizvodnje H_2O_2 . Superoksidni anjon radikal spada u grupu jakih oksidanasa, ali njegova prooksidativna aktivnost se odnosi na njegovu konjugovanu kiselinu, perhidroksi radikal (HOO^{\cdot}), koja inicijalno pokreće proces oštećenja lipida, oduzimanjem protona, čime započinje proces peroksidacije lipida.

Autooksidacijom superooksidnog anjon radikala nastaje vodonik-peroksid. Ravnotežna koncentracija vodonik-peroksida u ćeliji održava se razlaganjem pomoću katalaze ili glutation-peroksidazom (GSH-Px).

U našim ispitivanjima kod sojeva pramenke, kao posledica infekcije parazitima, u zavisnosti od intenziteta parazitske infekcije dolazi do povećanja aktivnosti enzima SOD 1 ($34,22 \pm 11,58$ P/gHb) u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,05$). Kod uvezenih rasa ovaca aktivnost ovog enzima je nepromenjena kod gotovo svih ispitivanih grupa ($30,77 \pm 10,26$ P/gHb), u odnosu na kontrolnu grupu ($26,58 \pm 2,77$ P/gHb). Utvrđeno je da povećano stvaranje ROS-a, izazvano parazitskom infekcijom, direktno utiče na izoenzimsku distribuciju SOD 1. Analizom rezultata izoenzimskih oblika SOD 1-1 dokazana je statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u povećanju aktivnosti izoenzima SOD1-1 kod autohtonih sojeva pramenke, u 75% ispitivanih ovaca, dok je kod ispitivanih uvezenih rasa ovaca utvrđeno smanjenje aktivnosti ovog izoenzimskog oblika u 60% ovaca. Pri istoj vrsti i intenzitetu parazitske infekcije kod autohtonih sojeva pramenke utvrđeno je dvostruko povećanje aktivnosti ovog izoenzima, dok je kod uvezenih rasa ovaca ovo povećanje iznosilo 1,3 puta, u odnosu na kontrolne grupe. Pored glavnog i dominantnog izoenzimskog oblika SOD 1-1, dokazana je i druga izoenzimaska frakcija SOD 1-2 kod ispitivanih ovaca. Analizom rezultata dokazana je statistički značajna razlika u povećanju aktivnosti SOD 1-2, sa porastom intenziteta parazitske infekcije kod autohtonih sojeva pramenke, u odnosu na kontrolne grupe. Ovo povećanje aktivnosti kod autohtonih sojeva pramenke ($7,34 \pm 2,99$ P/gHb) u odnosu na kontrolnu grupu ($1,28 \pm 0,42$ P/gHb), bilo je na nivou statističke značajnosti $p < 0,01$. Kod uvezenih rasa ovaca takođe je utvrđen porast aktivnosti SOD 1-2, sa porastom intenziteta parazitske infekcije, ali za razliku od autohtonih sojeva pramenke, na nivou statističke značajnosti $p < 0,05$. Relativna aktivnost izoenzimskog oblika SOD 1-2 međusobno se razlikuje i između kontrolnih grupa autohtonih sojeva pramenke ($1,28 \pm 0,42$ P/gHb) i uvezenih rasa ovaca ($6,34 \pm 1,90$ P/gHb), na visokom nivou statističke značajnosti ($p < 0,001$).

Aktivnost SOD 1-3 opada pri blagom intenzitetu parazitske infekcije ($0,72 \pm 0,15$ P/gHb) u odnosu na kontrolnu grupu ($1,59 \pm 0,34$ P/gHb), i kod autohtonih sojeva pramenke i kod uvezenih rasa ovaca ($1,02 \pm 0,13$ P/gHb i $1,38 \pm 0,17$ P/gHb), na nivou statističke značajnosti $p < 0,05$. Pri srednjem i visokom intenzitetu parazitske infekcije utvrđen je porast aktivnosti ovog izoenzima, na nivou statističke značajnosti $p < 0,01$.

Aktivnost SOD 1-4 opada pri blagom intenzitetu parazitske infekcije ($0,73 \pm 0,20$ P/gHb) u odnosu na kontrolnu grupu ($1,43 \pm 0,28$ P/gHb), i kod autohtonih sojeva pramenke i kod uvezenih rasa ovaca ($0,40 \pm 0,11$ P/gHb i $1,06 \pm 0,19$ P/gHb), na nivou statističke značajnosti $p < 0,01$. Pri srednjem i visokom intenzitetu parazitske infekcije utvrđen je porast aktivnosti ovog izoenzima kod autohtonih sojeva pramenke ($1,19 \pm 0,16$ P/gHb) u odnosu na kontrolnu grupu, na nivou statističke značajnosti $p < 0,001$.

Kod ispitivanih autohtonih sojeva pramenke utvrđen je porast aktivnosti SOD 1-5 izoenzima ($1,85 \pm 0,21$ P/gHb) i to u 80% ovaca, kod visokog intenziteta parazitske infekcije. Navedeni izoenzim nije dokazan kod kontrolnih grupa autohtonih sojeva pramenke i uvezenih rasa ovaca.

Katalaza je enzim koji vrši razgradnju vodonik-peroksida do vode i molekuskog kiseonika, i to vrlo brzo zbog svoje izuzetno visoke V_{max} . Analizom aktivnosti katalaze uočava se da sa porastom intenziteta parazitske infekcije u svim ispitivanim grupama opada njena aktivnost, na nivou statističke značajnosti $p < 0,05$. Aktivnost katalaze kod autohtonih sojeva pramenke kod visokog intenziteta parazitske infekcija iznosila je $19,75 \pm 2,21$ U/gHb, za razliku od aktivnosti kod kontrolne grupe $22,87 \pm 4,02$ U/gHb, dok je kod uvezenih rasa iznosila $23,77 \pm 6,57$ U/gHb i kod kontrolne grupe $31,04 \pm 6,57$ U/gHb, što je u suprotnosti sa nalazima kod monoinfekcije sa *Strongyloides papillosus* (Dimitrijević i sar., 2012). Dobijeni nalazi se mogu objasniti uticaje ekskretorno-sekretornih produkata parazita na strukturu i funkciju enzima katalaze.

Vodonik-peroksid, osim toga što može biti razgrađen pod dejstvom enzima katalaze, on može biti homolitički razgrađen i u prisustvu jona prelaznih metala kao što su Fe^{2+} i Cu^{+} . U tom slučaju nastaje hidroksilni radikal. Hidroksilni radikal je najpotentniji kiseonični radikal. Zbog svoje ekstremne reaktivnosti veoma neselektivno, inicijalno reaguje sa biomakromolekulima, bilo da je DNK ili neki drugi za integritet i funkcionalnost ćelije bitan konstituent.

Osim što značajno učestvuju u borbi protiv patogena, slobodne kiseonične vrste mogu dovesti i do oštećenja svih ćelijskih struktura i makromolekula. Zbog visokog sadržaja polinezasićenih masnih kiselina (PUFA), najosetljiviji deo ćelije na oksidativno oštećenje su membrane ćelija i ćelijskih organela. Sastav membranskih lipida i promenjeni fluiditet utiču i na aktivnost nekih membranskih enzima. U zavisnosti od toga na kojim subćelijskim membranama

se odigrava peroksidacija lipida, zavisi ozbiljnost i obimnost narušenih ćelijskih funkcija. Peroksidacija lipida je višefazni proces koji se odvija kroz inicijalnu, propagacionu i terminalnu fazu. Malondialdehid (MDA) je krajnji produkt peroksidacije lipida PUFA, koji se preko Shiff-ovih baza, unakrsno vezuje za proteine i fosfolipide membrana (Valko i sar., 2007; Mukul i sar., 2005; Pryor i sar., 2006; Rossner i sar., 2007.). Naši rezultati ukazuju da intenzitet infekcije povećava stepen oštećenja ćelijske membrane. Koncentracija MDA se povećava u zavisnosti od intenziteta parazitske infekcije, u poređenju sa kontrolnom grupom ($p < 0,001$). Sadržaj MDA kontrolnih grupa autohtonih i uvezenih rasa ovaca se međusobno razlikovao na statistički visokom nivou značajnosti, $p < 0,001$.

Azot(II)-oksid (NO) je visoko difuzibilan molekul koji brzo prolazi kroz biološke membrane i ima ulogu biološkog signala u mnogim fiziološkim procesima (vazodilatacija, inhibicija agregacije trombocita, u neurotransmisiji, u procesima kao što su pamćenje i učenje, a učestvuje i u imunskom odgovoru). Smatra se da NO u brojnim patološkim stanjima kao antioksidans štiti ćeliju od agenasa koji indukuju oksidativni stres. Međutim, NO ima ulogu i u patogenezi jer može da reaguje sa kiseonikom ili superoksid-anjon radikalom pri čemu nastaju različite reaktivne kiseonične i azotove vrste (ROS i RNS), koji su moćni oksidujućci agensi sa citotoksičnim delovanjem. Koncentracija nitrita u našim ispitivanjima pokazivala je tendenciju rasta u zavisnosti od prisutne parazitske faune i intenziteta infekcije. Kod blagog intenziteta parazitske infekcije koncentracija nitrita kod autohtonih sojeva pramenke iznosila je $8,15 \pm 0,49 \mu\text{M/L}$, a kod kontrolne grupe $6,83 \pm 1,02 \mu\text{M/L}$ ($p < 0,05$). Kod visokog intenziteta parazitske infekcije kod uvezenih rasa ovaca koncentracija nitrita iznosila je $14,50 \pm 4,24 \mu\text{M/L}$, a kod kontrolne grupe $9,05 \pm 0,85 \mu\text{M/L}$ ($p < 0,01$). Međusobnim poređenjem koncentracije nitrita kod istog intenziteta parazitske infekcije utvđena je statistički značajno veća produkcija nitrita kod uvezenih rasa ovaca u odnosu na sojeve pramenke ($p < 0,001$). Pojedini autori navode da na mestima gde postoji povećana lokalna produkcija NO i O_2^- (kao što je slučaj kod imunskog odgovora), NO može reagovati sa O_2^- formirajući moćni oksidacioni agens—peroksinitrit (ONOO^-). Pri protonovanju ONOO^- nastaje visoko reaktivna peroksinitritna kiselina (ONOOH) koja vrlo lako daje OH^\cdot i NO_2^- koji su odgovorni za većinu toksičnih efekata ONOO^- (Locatelli i sar., 2004; Saleh, 2008; Dimitrijević i sar., 2012). Glavni efekti peroksinitrita su reakcije oksidacije i nitrovanja biomolekula. Ova ispitivanja su pokazala da prisustvo parazita dovodi do

procesa oksidacije pojedinih aminokiselinskih ostataka u molekulu proteina što se potvrđuje povećanom koncentracijom karbonilnih grupa (Dimitrijević i sar., 2012).

Stepen oštećenja proteina utvrđen je na osnovu koncentracije karbonilnih i tiolnih grupa i pri tom je dokazan porast koncentracije karbonilnih grupa kod uvezenih rasa ovaca na nivou statističke značajnosti $p < 0,01$ u odnosu na autohtone sojeve pramenke. Maksimalna koncentracija karbonilnih grupa kod uvezenih rasa ovaca bila je $16,07 \pm 1,87 \mu\text{M/L}$, kod kontrolne grupe $10,70 \pm 0,35 \mu\text{M/L}$, dok je kod autohtonih sojeva pramenke iznosila $8,54 \pm 0,39 \mu\text{M/L}$, a kod njene kontrolne grupe $8,23 \pm 0,89 \mu\text{M/L}$.

Pod dejstvom ONOOH dolazi do oksidacije SH-grupa proteina kao i glutationa (GSH), koji na taj način redukuje količinu peroksinitrita u ćeliji. Peroksinitritna kiselina inicira niz lančanih reakcija u molekulu DNK koje mogu dovesti do prekida lanca ovog biomakromolekula. Analizom rezultata koncentracije tiolnih grupa uočava se njihov pad kao posledica prisustva parazitske infekcije kod ispitivanih ovaca. Sa povećanjem intenziteta infekcije opada koncentracija tiolnih grupa, tako kod autohtonih sojeva pramenke kod visokog intenziteta infekcije utvrđene su vrednosti od $178 \pm 88 \mu\text{M/L}$, a kod kontrolne grupe $834 \pm 60 \mu\text{M/L}$ ($p < 0,001$). Kod uvezenih rasa ovaca koncentracija tiolnih grupa takođe opada ($232 \pm 52 \mu\text{M/L}$) u odnosu na kontrolnu grupu ($264 \pm 32 \mu\text{M/L}$). Međutim, koncentracije tiolnih grupa kod kontrolnih grupa uvezenih rasa ovaca statistički su značajno niže u odnosu na kontrolne grupe autohtonih sojeva pramenke ($p < 0,001$).

Usled oštećenja ćelijske membrane u procesu peroksidacije lipida i posledične izmene njene permeabilnosti dolazi do „curenja“ mnogih enzima citosola u ekstracelularni prostor (Saleh, 2008; Dimitrijević i sar., 2012). Na osnovu aktivnosti ovih enzima može se utvrditi stepen oštećenja pojedinih organa. Jedan od takvih enzima je i laktat-dehidrogenaza (LDH). Ovaj enzim postoji u pet izoenzimskih oblika sa različitom distribucijom u pojedinim organima, tako da se određivanje nivoa njihove aktivnosti može koristiti kako za procenu stepena oštećenja tako i vrste oštećenog tkiva (Jaffe i sar., 1996; Abd El-Rahman i sar., 1999). Prvu grupu čine tzv. „brzi izoenzimi“ LDH₁ i LDH₂ koji su najviše zastupljeni u srcu, bubrezima i eritrocitima, drugu grupu čine tzv „spori izoenzimi“, LDH₄ i LDH₅ karakteristični za jetru i skeletne mišiće, i treću grupu srednji izoenzimi LDH₃ karakteristični za pluća, tiroideju i nadbubreg. Prisustvo parazita u

organizmu domaćina, naročito njihovi razvojni oblici u migraciji, mogu značajno da oštete parenhimatozne organe kao što su pluća, srce i jetra, u takozvanom prepatentnom periodu razvoja parazita, kada je koprološka pretraga po pravilu negativna.

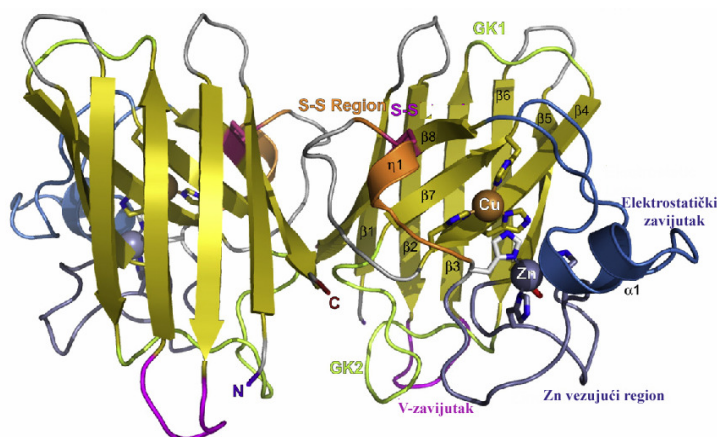
Na osnovu relativne izoenzimske raspodele enzima laktat-dehidrogenaze (LDH), u našim ispitivanjima utvrđeno je oštećenje ćelija različitih organa, u zavisnosti od prisutne vrste i intenziteta parazitske infekcije. Kod ispitivanih sojeva pramenke i uvezenih rasa ovaca inficiranih sa *Strongyloides* spp, *D. dendriticum* i *Protostrongylidae* utvrđeno je oštećenje ćelija miokarda (LDH₂ 10,57±2,28%; kontrola 5,81±1,24%), pluća (LDH₃ 27,49±2,03%; kontrola 2,71±2,42%) i jetre (LDH₅ 11,50±2,54%; kontrola 3,51±0,91%). U prisustvu parazitske infekcije sa *Trichuris* spp utvrđeno je samo oštećenje ćelija jetre. Posebno treba istaći da je samo kod uvezenih rasa ovaca ustanovljeno značajno povećanje izoenzimske raspodele LDH₄ (6,16±0,54%) u odnosu na kontrolne grupe (3,82±0,81%), na nivou statističke značajnosti p<0,05. Ispitivanje izoenzimskih oblika LDH može da se koristi kao dopunski podatak u dijagnostici vrste i stepena oštećenja organskog sistema.

Uz pomoć x-zraka, određena je kristalografska struktura SOD 1 goveđih eritrocita i rekombinantne humane SOD 1. Enzim je homodimer koji se sastoji kod goveda iz 151 i 153 aminokiselinskih ostataka kod ljudi. Svaka subjedinica sadrži jedan atom Cu i jedan atom Zn. Svaka od subjedinica ima β-strukturu, sačinjenu od 8 antiparalelnih β-lanaca. Aktivno mesto enzima nalazi se sa spoljne strane strukture i sačinjeno je od aminokiselina smeštenih u petljama koje povezuju β-lance. Aktivno mesto je smešteno na dnu kanala i formirano je kao molekularni levak, koji vodi ka Cu-jonu koji se nalazi na dnu kanala. Enzim je tako strukturno formiran da deluje kao neka vrsta molekularnog „lasa“ za hvatanje superoksidnih anjona. Mada je neto naelektrisanje enzima, pri fiziološkim vrednostima pH negativno (pI oko 5,0), aktivno mesto se nalazi u regiji sa visokim elektrostatičkim potencijalom, što je rezultat dejstva lizina i arginina i metalnih jona. Tainer i saradnici (1983) su ukazali da ovo „elektrostatičko snižavanje nivoa podražljivosti vezivanja superoksid-anjona doprinosi neobično visokoj katalitičkoj aktivnosti enzima. Konstanta brzine drugog reda, za reakciju superoksid anjon radikala sa enzimom, je kontrolisana limitom difuzije. Drugim rečima, difuzija superoksida ograničava brzinu reakcije koja je drugog reda. Ovo znači da je većina sudara sa supstratom efikasna, mada aktivno mesto zauzima samo deo zapremine po površini proteina izloženoj rastvaraču. Očigledno, negativno

naelektrisanje na površini sprečava neefikasne sudare, dok pozitivni potencijal u kanalu uvlači supstrat. Međutim, teško je potpuno razumeti elektrostatičko okruženje proteina, s obzirom da treba uzeti u obzir interakcije sa rastvaračem i suprotnih jona, koji se ne mogu registrovati iz x-ray kristalografske strukture.

Bakarni jon je esencijalan za aktivnost SOD 1. Vodeni rastvor jona Cu(II) je izuzetno efikasan katalizator dizmutacije superoksida, ali slobodan bakarni jon verovatno ne može da postoji u ćeliji. Budući da enzim SOD 1, bez jona cinka, ima smanjenu ali još uvek značajnu aktivnost, jasno je da Cu-jon podleže enzimskom redoks-kruženju, (iz Cu^{2+} u Cu^+ stanje) dok Zn ima sekundarnu ulogu u procesu dizmutacije superoksida.

Bakarni Cu^{2+} jon je koordinativno vezan u deformisanoj kvadratnoj-ravni za N-atom imidazolovog bočnog lanca histidina i dostupan je rastvaraču. Jon cinka (Zn^{2+}) je smešten duboko unutar proteina, te je nedostupan rastvaraču i približno tetraedarski vezan sa N-atomom imidazolovog lanca sa tri histidina i jednim atomom kiseonika iz aspartata. Karakteristično je da jedan molekul histidina povezuje bakarne i cinkove jone, preko azotovog atoma koji je vezan za svaki od jona. Nije poznato da i jedan drugi protein ima takav raspored metalnih jona. Ovakva veza zahteva da imidazolov prsten izgubi oba NH-protona, da bi nastao imidazolil anjon, što normalno zahteva ekstremno bazne pH vrednosti. Vezivanje prvog jona metala mora da značajno smanjuje pK za drugi N atom, ubrzavajući vezivanje drugog. Ovakvo uređenje enzima je verovatno od strukturnog i katalitičkog značaja, mada ne treba zaboraviti da jon Zn nije neophodan za aktivnost ovog enzima.



Slika 20. Trodimenzionalna struktura Cu,Zn-SOD

Značaj arginina-141 je otkriven zahvaljujući eksperimentima sa mutiranim organizmima (Tainer i sar., 1987). Naime, zamena arginina lizinom dovodi do redukcije enzimske aktivnosti, dok zamena arginina neutralnom aminokiselinom dovodi do potpunog gubitka aktivnosti enzima. Vezivanje superoksid-anjona za Cu^{2+} je u skladu sa geometrijom supstratnog kanala, kao što je već opisano. U prvoj polovini reakcije, superoksid redukuje Cu^{2+} iz katalitičkog centra u Cu^+ . Pri tome se raskida koordinativna veza sa imidazolil anjonom. Rezidua histidina rotira, dozvoljavajući Cu^+ da dobije povoljniju geometriju i da visoko bazni imidazolil anjon, oslobođen veze od kupri jona, oduzme jedan proton od rastvarača. U drugoj polovini reakcije, drugi jon superoksida vezuje se za bakarni jon, onda ga reoksiduje i oduzima proton imidazolu, vraćajući enzim u nativno stanje. Nascentni HO_2^- anjon se protonuje rastvorom, pri čemu nastaje vodonik-peroksid (slika 20).

U krvnoj plazmi sisara je otkriveno prisustvo još jedne Cu,Zn- SOD. Ona je označena kao **ekstracelularna SOD**. Ovaj enzim je homotetramer, čija svaka subjedinica sadrži po jedan jon bakra i cinka u aktivnom centru, koji je verovatno organizovan slično kao kod citosolne SOD. Međutim, aminokiselinska sekvenca ova dva enzima je vrlo različita i antitela protiv jedne ne reaguju sa antitelima protiv druge tj. antigenski se razlikuju (Schinina i sar., 1986; Holovska i sar., 1996).

Važnost elektrostatičkih interakcija u mehanizmu delovanja Cu,Zn-superoksid dismutaze (SOD 1) je dobro poznata. Anjonski supstrat (O_2^-) se usmerava prema mestu dizmutacije, katalitički aktivnom jonu bakra, pomoću kanala koji poseduje pozitivno naelektrisanje koje nastaje usled prisustva visoko konzerviranih (očuvanih) rezidua baznih AK. U slučaju goveđeg enzima, dokazano je da je stepen konstante katalitičke reakcije u potpunosti fizički kontrolisan i određen jonizacijom dve AK rezidue sa približnim pK vrednostima od 10 i 11. S druge strane, poznato je da je površina enzima negativno naelektrisana čime se odbija negativno naelektrisan O_2^- i time se izbegavaju neefikasne kolizije izvan aktivnog mesta enzima. U svetlu ovih saznanja u našoj laboratoriji posebna pažnja usmerena je prema karakterizaciji SOD enzima.

Eritrocitna SOD 1 je stalno izložena O_2^- i H_2O_2 *in vivo* preko autooksidacije hemoglobina i metabolizma vrlo različitih toksičnih jedinjenja. Prema tome, fragmentacija SOD može biti od posebnog biološkog značaja. Akumulacija proteinskih fragmenata može u stvari da predstavlja suštinski toksikološki izazov za eritrocite i druge ćelije. Ovakvi fragmenti bi trebalo da podležu

brzoj degradaciji pod dejstvom intracelularnih peptidaza mada ova pretpostavka još uvek nije testirana.

Eritrociti su usled autoksidacije hemoglobina pod stalnim fluksom $O_2^{\cdot -}$ i H_2O_2 . Različiti lekovi i agensi sredine doprinose oksidativnom stresu kome su eritrociti izloženi. Maturirani eritrociti nemaju mogućnost *de novo* sinteze proteina, i ne mogu da zamene oksidativno oštećenu SOD. Salo i saradnici (1990) su postavili hipotezu da MPO katalizuje prepoznavanje i inicijalnu degradaciju H_2O_2 -modifikovane SOD u eritrocitima, na taj način prevenirajući akumulaciju SOD agregata i umanjuje formiranje SOD fragmenata.

Dokazano je da inaktivacija SOD 1 sa H_2O_2 uključuje oksidativnu modifikaciju histidinskog ostatka koji je važan u vezivanju bakra za aktivno mesto enzima. Pretpostavlja se da H_2O_2 može da izazove parcijalnu denaturaciju ili razotkrivanje regije aktivnog mesta SOD. Ovakva denaturacija može da otkrije prethodno zaštićene hidrofobne amonokiseline koje predstavljaju poželjne proteolitičke substrate. Desideri i saradnici (1994) navode da u odsustvu proteolitičkih enzima *in vitro*, H_2O_2 -modifikovana SOD podleže daljim reakcijama razlaganja. Izgleda verovatno da H_2O_2 (ili $O_2^{\cdot -}$) inaktivacija SOD 1 *in vivo* stvara i modifikovani (ali i intaktni – ceo) proteolitički supstrat i direktne fragmentacione produkte. Takvi fragmenti (koji mogu imati vrlo nepovoljne biološke efekte) mogu ličiti na prave peptide (izuzev za njihove modifikovane amino i karboksilne krajeve) i mogu se brzo razgraditi intracelularnim peptidazama.

Ne-enzimsko glikozilovanje obuhvata složenu seriju reakcija između redukujućih šećera i aminogrupa proteina, lipida i nukleinskih kiselina. Tokom glikozilovanja, karbonilne grupe šećera sporo reaguju sa slobodnim amino grupama stvarajući Schiff-ove baze. Schiff-ove baze podležu tzv. Amadori premeštanju i tokom niza daljih reakcija premeštanja, ciklizacije, dehidratacije itd., stvaraju vrlo različita jedinjenja, koja su grupno označena kao uznapredovali proizvodi glikozilovanja (*Advanced Glycation end products* - AGEs). Stvaranje AGE je praćeno formiranjem, između ostalog i brojnim reaktivno kiseoničnim vrstama (ROS), metilgliksalom (MG), koji dalje reaguje i oštećuje proteine i druge biološki važne molekule.

Stvaranje MG *in vivo* može takođe da se dogodi i iz intermedijarnih glikolitičkih produkata, ketonskih tela, kao rezultat katabolizma treonina, oksidativne degradacije polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) i tokom autooksidacije šećera jonima prelaznih metala. Gliksalaza sistem

konvertuje MG do D-laktata i obezbeđuje održavanje niskih nivoa MG *in vivo*. Povećani nivoi MG su otkriveni u krvi dijabetičnih pacijenata i u sočivu pacova sa dijabetesom koji je izazvan streptozicinom. Za MG je dokazano da je visoko reaktivan i prema proteinima i prema nukleinskim kiselinama. Glikozilovanje proteina sa MG, za razliku od one sa redukujućim šećerima, je uglavnom usmerena ka argininu, dok druge aminokiseline kao što je lizin i u manjoj meri histidin i cistein se takođe modifikuju tokom reakcija proteina sa MG. Metilglioksal reaguje ireverzibilno sa proteinskim amino grupama, formirajući AGEs (Jabeen i sar., 2006).

Danas je dobro poznato da ROS izaziva oštećenje bioloških makromolekula što vodi lipidnoj peroksidaciji, oksidaciji proteina, inaktivaciji enzima, modifikaciji baza DNA i kidanju lanca DNA. Zbog toga očekuje se da je oštećenje izazvano oksidativnim stresom pogoršano ako su antioksidativni enzimi inaktivisani ovakvim procesima. Dokazano je da povišeni nivoi MG negativno utiču na SOD 1 koji čine prvu i najvažniju liniju antioksidativne odbrane, posebno od dejstva superoksid-anjon radikala. Izlaganje Cu,Zn-SOD sa MG dovodi do njenog unakrsnog kovalentnog povezivanja sa posledičnim gubitkom enzimske aktivnosti i oslobađanja jona bakra. U novijim radovima dokazano je da anti-SOD antitela obezbeđuju zaštitu od inaktivacije SOD sa različitim šećerima (Yim i sar., 1990; Jabeen i sar., 2006).

Povećana produkcija hidroksilnog radikala dovodi do stvaranja lipidnih hidroperoksida, koji stvaraju familiju (grupu jedinjenja) označenih kao α,β -nezasićeni aldehidi. Ovako nastali reaktivni aldehidi dovode do tzv. Michael-ovih reakcija adicije na bočne lance lizina, histidina i cisteinskih ostataka, što se označava kao „proteinska karbonilovanje“. Reaktivni lipidi mogu da se akumuliraju u visokim koncentracijama u ćelijama, što može rezultirati modifikacijom proteina i pojavom novih ili gubitkom već postojećih funkcija proteina. Korišćenjem metoda masene spektrometrije mogu se identifikovati mesta i obim karbonilovanja proteina, što je proširilo naša saznanja o tome kako oksidativni stres utiče na regulaciju ćelijskih procesa (Zhang i sar., 2000; Grimsrud i sar., 2008).

U slučaju proteina, brojne post-translacione modifikacije su opisane, koje nastaju kao rezultat direktne oksidacije amino-kiselinskih rezidua ili kao posledica formiranja reaktivnih međuproizvoda oksidacijom ćelijskih komponenti. Oksidacija metionina do sulfoksida, kao i cisteina do sulfenske, sulfinske i sulfonske kiseline događa se vrlo često, i uobičajeno se može (izuzev sulfonske kiseline) enzimski redukovati. Oksidacijom ugljenih hidrata nastaju

međuproizvodi koji reaguju sa proteinima pri čemu nastaju AGEs, od kojih neki pokazuju visoku reaktivnost prema proteinima. Pored toga, uočeno je da značajni deo ROS-om izazvanih posttranslacionih modifikacija rezultira adicijom reaktivnih karbonilnih grupa na funkcionalnim grupama proteina, generalno označenih kao „proteinsko karbonilovanje“, pri čemu su najčešće i najreaktivnije aldehidne karbonilne grupe (Jabeen i sar., 2006; Grimsrud i sar, 2008).

Direktno karbonilovanje proteina može nastati u toku različitih reakcija. Oksidacija bočnog lanca aminokiselina sa metalima i vodonik-peroksidom dovodi do formiranja semialdehidnih aminokiselina, pri čemu se većina ovih reakcija dešava na lizinu, argininu i prolinu. Takođe, treba reći da, proteinsko karbonilovanje može da nastane preko indirektnog mehanizma koji podrazumeva oksidaciju lipida posredovanu hidroksilnim radikalom. Polinezasićeni lanci fosfolipida ili polinezasićenih masnih kiselina kao što su arahidonska i linoleinska kiselina su vrlo osetljivi na peroksidaciju i cepanje lanca preko tzv. neenzimskog Hock procesa cepanja, pri čemu nastaju različiti aldehidi i ketoni poreklom od lipida. Produkti lipidne peroksidacije mogu da prođu kroz ćelijsku membranu, omogućavajući reaktivnim lipidima koji sadrže aldehide da kovalentno modifikuju transmembranske proteine ali i relativno udaljene proteine od mesta produkcije ROS. Novija istraživanja su pokazala da proteinska karbonilovanja nastala pod dejstvom aldehida poreklom od lipida su češća u odnosu na direktnu oksidaciju aminokiselinskih bočnih lanaca (Grimsrud i sar, 2008), što je u saglasnosti sa našim nalazima.

Najreaktivnije vrste aldehida nastalih oksidacijom PUFA su α,β -nezasićeni aldehidi, uključujući 4-HNE, 4-ONE i akrolein. Zbog prisustva elektrona (koji povlači) u funkcionalnim grupama, dvostruka veza 4HNE ili 4-ONE služi kao mesto za Michael-ovu adiciju na atom sumpora u cisteinu, azota u histidinu i u manjoj meri ϵ -NH₂ grupa lizina. Postoje dokazi za reakciju sa argininom takođe, ali ipak u manjoj meri u odnosu na lizin. Mada je 4-HNE istorijski posmatrano najbolje proučen produkt lipidne peroksidacije, 4-ONE je takođe visoko reaktivan. Posle formiranja Michael-ovih adukata, polovina aldehida može u nekim slučajevima da se preusmeri u pravcu formiranja Schiff-ovih baza sa bočnim ostacima lizina formirajući intra i/ili intermolekulske unakrsne veze između aminokiselina. U slučaju 4-ONE, modifikacija rezidua lizina preko 1,2-adicije (formiranje Schiff-ovih baza i adicija molekula vode na dvostruku vezu) može takođe rezultirati nastanku ketoamidnih adukata. U model sistemima, masena

spektrometrijska analiza je pokazala da više od 99% proteina modifikovanih *in vitro* sa 4-HNE zadržava slobodnu karbonilnu grupu. Bez obzira na strukturu MDA, koji nema dvostruku vezu, njegova reaktivnost ne zaostaje za napred navedenim nezasićenim aldehydima. Tako da povišene koncentracije MDA dokazane u našim ispitivanjima mogu da ukažu na intenziviranje napred navedenih procesa (Grimsrud i sar, 2008).

Status Cu u organizmu i nivoi bakra u hrani snažno utiču na SOD aktivnost u jetri i eritrocitima pojedinih vrsta sisara (Rusanov i sar., 1986) uključujući i eritrocite ovaca (Peter i Suttle, 1984). Takođe, 20 – 50% jetrinog Cu (Bremner, 1980) i približno 60% Cu u eritrocitima (Konstantinova i Russanov, 1988) povezano sa SOD. Izgleda da priroda SOD aktivnosti u jetrinim subcelularnim frakcijama zavisi od metabolizma bakra u jetri i učešća lizozoma u njemu.

Metabolizam bakra u ovaca se karakteriše nekim osobenostima: 1) Sadržaj Cu u jetri je mnogo veći i distribucija metala u subcelularnim frakcijama je drugačija u poređenju sa većim brojem vrsta sisara (Konstantinova i Russanov, 1988); 2) Ovce su znatno više osetljivije na trovanje Cu zbog niske bilijarne ekskrecije bakra (Bremner, 1980); 3) Lizozomalni bakar perzistira dugi vremenski period pre nego što se konačno ekskretuje (Konstantinova i Russanov, 1988). Vrlo malo podataka postoji o aktivnosti jetrine SOD, i ne postoje dostupni podaci za njenu subcelularnu distribuciju, prirodu i elektroforetske karakteristike.

Naši rezultati ukazuju da u ogledima *in vitro*, inkubiranjem izolovane ovčije SOD 1 dolazi do oksidativnih modifikacija ovog enzima, izazvanih različitim koncentracijama i vremenom tretiranja sa vodonik-peroksidom. Dokazano je da je inkubiranje SOD 1, izolovane iz eritrocita ovaca, sa povećanjem koncentracije H₂O₂ (0,15 mM; 0,3 mM; 1,5 mM; 3 mM; 15 mM i 30 mM) tokom 30, 60, 120 i 180 min rezultiralo značajnim gubitkom aktivnosti SOD 1. Skoro 15% aktivnosti SOD 1 bilo je inhibirano kada je enzim izložen 1,5 mM H₂O₂, i više od 28% nakon izlaganja 3,0 mM H₂O₂, u trajanju od 30 min. Inhibicija aktivnosti enzima bila je jasno zavisna od primenjene koncentracije H₂O₂. Nakon izlaganja u trajanju od jednog časa smanjena je aktivnost enzima za 24,56% pri primenjenoj koncentraciji H₂O₂ od 3,0 mM, dok je aktivnost enzima smanjena za 33,90% i 40,43% pri koncentraciji H₂O₂ od 15 mM i 30 mM, pri izlaganju od 180 min. Navedeni rezultati su u saglasnosti sa nalazima Salo i saradnika (1990). Postoje podaci koji pokazuju nisku elektroforetsku pokretljivost citosolne i granularne SOD u jetri gravidnih ovaca i njihovih fetusa na 7,5% PAGE (Konstantinova, Russanov, 1986). Ovi nalazi su

podstakli naša istraživanja u izučavanju elektroforetskih svojstava SOD 1. Autori navode da tipični denzitogram ukazuje na prisustvo tri pika SOD aktivnosti i skoro jednake Rf-vrednosti (pik 1=0,10 i 0,12; 2=0,16 i 0,18; 3=0,21 i 0,22). Potpuna inhibicija svih SOD traka sa KCN još jednom je potvrdila da SOD u citosolu jetre i IMS ovaca je Cu,Zn-sadržavajući enzim.

Niska anjodna pokretljivost jetrine SOD 1 može biti uslovljena veličinom i/ili ukupnim neto naelektrisanjem proteina. Međutim, poznato je da SOD u tkivima sisara, izuzev ekstracelularne ima molekulsku masu od oko 32 kDa. Stoga slaba pokretljivost u električnom polju ovog enzima iz jetre ovaca zavisi od njegovog pozitivnog naelektrisanje pre nego li od njegove molekulske mase.

Naši rezultati pokazuju da oksidativne modifikacije SOD 1 nakon izlaganja H₂O₂, ispitivane poliakrilamid gel elektroforezom (PAGE) u nenedenaturišućim i denaturišućim (SDS) uslovima, jasno su pokazali da je izlaganje SOD 1 vodonik-peroksidu rezultiralo, formiranjem 6 proteinskih traka, nastalih kao posledica oksidativnih modifikacija ovog enzima. Ovim je utvrđeno da je H₂O₂ zaista sposoban da modifikuje enzim SOD 1. Molekulske mase dobijenih proteinskih traka iznosile su: 31,84 kDa, 26,91 kDa, 21,97 kDa, 15 kDa i 13 kDa. Mogućnost direktne fragmentacije enzima H₂O₂ bila je dokazana izvođenjem SDS-PAG elektroforeze gde su uočene proteinske trake nižih molekulskih masa, od 10 do 16 kDa. Inkubiranje uzoraka izolovane SOD 1 sa većom koncentracijom vodonik-peroksida (15 do 30 mM), u dužem vremenskom intervalu (120 i 180 min) dovodi i do pojave proteinske trake veće molekulske mase, od 60 kDa.

Pojedini autori navode da je pojava izoenzimskog oblika SOD 1 sa pI vrednošću od 5,0 posledica ireverzibilne oksidativne modifikacije slobodne SH grupe enzima, pod dejstvom H₂O₂, do sulfinske ili sulfonske kiseline, čime se povećava kiselost ovog enzima. Kao posledica oksidativnih modifikacija dolazi do agregacije izoformi SOD 1, što rezultira ne samo gubitkom funkcije enzima, već i pojavom citotoksičnog efekta ovog enzima (Choi i sar., 2005).

Istraživanja Geller i Winge (1982) su pokazala da izoelektrofokusanje na poliakrilamid gelu, u pH opsegu od 3 do 10, da citosolna i IMS sadrže tri SOD izoenzima sa izoelektričnim tačkama od približno 5,5 do 8,0. Sa ciljem da se razdvoje trake dalje fokusiranje je izvedeno na amfolitima pH vrednosti od 5,0-8,0. Izoelektrična tačka izoenzima iznosi približno 5,7; 6,5 i 7,5. Nije zabeležena SOD aktivnost u ispitivanim uzorcima pri pH opsegu od 2,5 do 5,0. Sličnost

elektroforetskog obrasca SOD jetre ovaca u citoplazmi i IMS ukazuju da je enzim lokalizovan u lizozomima, pored citoplazme kao što je dokazano i u pacova (Geller i Winge, 1982).

Na osnovu naše analize izoelektrofokusanja, na PAGE u pH intervalu od 3 do 10, izoelektrična tačka (pI) izolovanog enzima SOD 1 iznosila je 6,42. Posle tretiranja sa H_2O_2 , dodatna, slabija proteinska traka je vidljiva na svim gelovima i utvrđena je pI vrednost 5,0. Osim toga, izoelektrično fokusiranje je pokazalo da su promene naelektrisanja enzima bile delimično odgovorne za različite proteinske trake uočene na SDS-PAGE. Ovi podaci dokazuju da SOD 1 prvo podleže delimičnoj denaturaciji pri izlaganju oksidativnim uslovima, pri čemu se na taj način povećava mogućnost za brzu degradaciju modifikovanog enzima. Pored toga, reproducibilnost traka uočenih tokom oksidativnog izlaganja ukazuje na to da reakcija H_2O_2 sa SOD 1, nije slučajna, već pre uključuje mesto-specifične oksidativne modifikacije.

U cilju bliže karakterizacije izolovane SOD 1 iz eritrocita ovaca izvršena je tečno-masena spektralna analiza enzima. Ovom analizom dokazano je prisustvo glavnog pika od 29,05 kDa. Pored ovog, dokazano je i minimalno prisustvo pika od 14,5 kDa što ukazuje da je u uzorcima izolovane SOD 1 prisutan monomer ovog enzima, kao i njegov dimer, od 57,3 kDa, prisutan u tragovima. Karakteristični, najintenzivniji pikovi nastali masenom fragmentacijom izolovane SOD 1 su: 855, 881, 908, 938, 969, 1038 i 1039 m/z. Pored navedenih identifikovani su i joni manjih molekulskih masa i to: 831, 808 i 786 m/z. Teorijskom simulacijom, korišćenjem kompjuterskog programa Discovery Studio Visualizer 3.0 (USA), na osnovu poznatih aminokiselinskih sekvenci SOD 1, izračunata je molekulska masa ovog enzima i iznosila je 31,39 kDa, dok je njena pI vrednost 6,14. Dobijene vrednosti su u saglasnosti sa našim napred navedenim eksperimentalnim rezultatima.

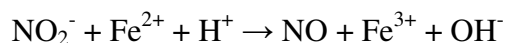
Schinina i saradnici (1986) navode da je velika sličnost ovčijeg enzima sa goveđim enzimom, koji je najintenzivnije proučavan enzim ove klase, pruža jedinstvenu priliku za izučavanje odnosa struktura-funkcija. Zapravo, jedina glavna razlika između ova dva enzima ispostavlja se da je neto naelektrisanje proteina. Dok su bočni ugljovodonični lanci, koji potiču od baznih amino kiselinskih ostataka (Lys + Arg) sa ukupnim pozitivnim naelektrisanjem 6 u goveđoj i sa 5 u svinjskoj SOD1, kod ovčijeg enzima ovo naelektrisanje je 4. Isti autori navode da izoelektrična tačka određena izoelektrofokusanjem iznosi $8,0 \pm 0,2$, što predstavlja najvišu vrednost za bilo koju SOD sisara, i u svakom slučaju za SODs za koje su primarna struktura i

molekulski podaci poznati. Dok obe, i goveđa i ovčija SOD koriste pozitivno naelektrisanje da bi sprovele superoksid jon do bakarnog jona u aktivnom mestu, izgleda da se ovčija SOD ne ponaša na taj način, s obzirom da na molekulskoj površini enzima O_2^- nije odbijen negativnim naelektrisanjem. Na osnovu ovoga ovčiji enzim bi trebao da je manje efikasan u odnosu na kravlju SOD. U stvari katalitička konstanta ($\times 10^9 M^{-1} s^{-1}$) ispostavlja se da je 2,27 i 2,03 pri pH 9,6, za kravlju i ovčiji enzim. Ovi rezultati potvrđuju da elektrostatički gradijent između aktivnog mesta i naelektrisanja na ostatku proteinske površine ima važnu ulogu u određivanju enzimske aktivnosti (Desideri i sar., 1994).

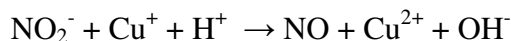
Da bi utvrdili da li vodonik-peroksid, nakon dejstva na izolovanu SOD 1 dovodi do stvaranja hidroksilnog radikala, izvršena je EPRS analiza. Rezultati ove analize su pokazali da kada se SOD 1 izloži dejstvu H_2O_2 dolazi do Fentonove reakcije, kao i produkcije azot-dioksid radikala.

Osnovni put produkcije $\cdot NO_2$ radikala je kroz raspad peroksinitrita ($ONOO^- \rightarrow \cdot NO_2 + \cdot OH$). Za ovaj radikal se zna da se vezuje za proteine čime aktivira proteaze da dati protein razgrade (Halliwell, 2004). Azot-dioksid radikal je aktivni oksidant u biološkim sistemima, i osim reakcije sa proteinima, veoma brzo oksiduje sulfhidrilne grupe i urate (Krishna i sar., 1996; Wink i Mitchell, 2003). Na koji način Cu,Zn-SOD, prethodno tretirana sa H_2O_2 , čime su postignute ireverzibilne promene na proteinu (gubitak aktivnosti, denaturacija), a zatim izložena ponovo fiziološkoj koncentraciji vodonik peroksida nije potpuno jasno. Poznato je da aminokiseline mogu oksidacijom da daju N-centrirane radikale (Spasojević i sar., 2012), ali to svakako nije $\cdot NO_2$.

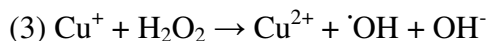
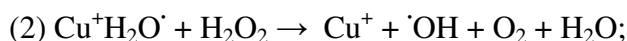
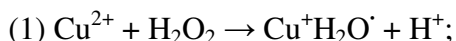
Interesanto je napomenuti da Cu,Zn-SOD učestvuje u nitrovanju proteina pri čemu nastaje 3-nitrozotirozin (Zhu, 2008). Naime uočeno je da je kod SOD 1 deficitarnih miševa hemisjki indukovano nitrovanje proteina u jetri skoro odsutna, i da ovaj efekat nije povezan sa nivoom NO u krvi, već sa nivoom nitrata i nitrita. Nitrovanje je ostvareno dodavanjem holo-, ali ne apo-enzima, ukazujući na važnu ulogu Cu^{2+} u Cu,Zn-SOD. Analogno reakciji u hemoglobinu (Lundberg i sar., 2008):



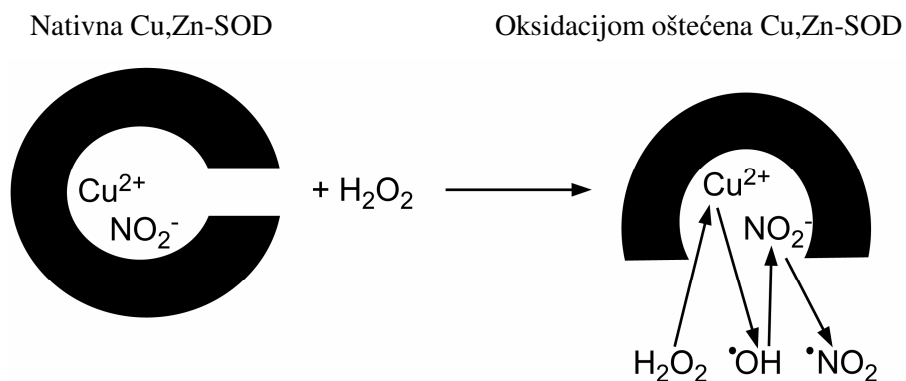
može se pretpostaviti da je u Cu,Zn-SOD nitritni jon (NO_2^-) vezan za bakar i da može biti konvertovan do NO kroz reakciju:



Međutim, u proteinu oštećenom oksidacijom dolazi do procesa koji bi mogli objasniti ovde prikazane rezultate. Naime, bakar reaguje sa H_2O_2 pri čemu nastaje hidroksil radikal ($\cdot\text{OH}$). Ovo se dešava kroz tri međusobno povezane reakcije i ne zahteva prisustvo redukujućih sredstava (Spasojević i sar., 2010):



Ovaj radikal u ranije opisanoj reakciji reaguje sa nitratom dajući kao proizvod $\cdot\text{NO}_2$ (Augusto, 2002). Predloženi mehanizam je prikazan na shemi 7.



Shema 7. Princip spin-trapinga na primeru trapa DEPMPO i azot dioksid radikala ($\cdot\text{NO}_2$)

Dok ostaje da se ova hipoteza dalje ispita, prikazani rezultati jasno ukazuju da u krvi kao posledica oksidativnih modifikacija Cu,Zn-SOD može doći do produkcije azot-dioksid radikala, što ranije nikada nije pokazano. Kao što je već navedeno, ovaj radikal pokazuje specifične

biološke karakteristike i targete, što može uneti čitavu jednu novu komponentu u razumevanju oksidativnog stresa u krvi.

Naši rezultati ukazuju na usku povezanost intenziteta i vrste parazitske infekcije sa promenama u strukturi i funkciji enzima SOD 1. navedena tvrdnja je potkrepljena dokazanim korelacijama među navedenim parametara.

Izoenzimski oblici SOD 1 koreliraju sa intenzitetom i vrstom parazitske infekcije na sledeći način: SOD 1-1 negativno korelira sa *Trichostongylidae* ($r = -0,860$; $p < 0,001$), *Nematodirinae* ($r = -0,975$; $p < 0,001$) i *S. papillosus* ($r = -0,772$; $p < 0,01$) kod blagog i srednjeg intenziteta parazitske infekcije kod autohtonih i uvezenih rasa ovaca. SOD 1-2 pozitivno korelira sa *Trichostongylidae* ($r = 0,302$; $p < 0,05$), *Protostrongylidae* ($r = 0,887$; $p < 0,001$) i *Nematodirinae* ($r = 0,392$; $p < 0,05$) sa visokim intenzitetom parazitske infekcije kod uvezenih rasa ovaca. SOD 1-3 negativno korelira sa *Nematodirinae* ($r = -0,972$; $p < 0,001$) i *Trichuris* spp ($r = -0,766$; $p < 0,05$) kod blagog intenziteta parazitske infekcije kod sojeva autohtone rase pramenke i uvezenih rasa ovaca. Isti izoenzim ima pozitivnu korelaciju sa *Nematodirinae* ($r = 0,368$; $p < 0,05$) kod visokog intenziteta parazitske infekcije. SOD 1-4 pozitivno korelira sa *Anoplocephalidae* ($r = 0,321$; $p < 0,05$), *Trichostongylidae* ($r = 0,984$; $p < 0,001$) sa visokim intenzitetom parazitske infekcije. SOD 1-5 pozitivno korelira sa *Protostrongylidae* sa visokim intenzitetom parazitske infekcije ($r = 0,896$; $p < 0,001$).

Sumarno, kao što je pomenuto ROS i RNS predominantno uzrokuju ćelijska oštećenja, imaju i ulogu signalnih molekula i učestvuju u intracelularnoj regulaciji. ROS i RNS interferiraju sa ekspresijom gena i signalnim transdukcionim putevima. Oni utiču na redoks status i mogu izazvati pozitivne odgovore (ćelijska proliferacija), ali i negativno (ćelijska smrt). Imaju ulogu sekundarnih glasnika, kao što je regulacija Ca^{2+} citosolne koncentracije, regulacija proteinske fosforilacije, aktivacija određenih transkripcionih faktora kao što su NF- κ B i AP-1 familija faktora. Reaktivne kiseonične i azotove vrste inhibiraju pojedine enzime i interaguju sa sulfhidrilnim grupama cisteinskih ostataka. Ove strukturne promene menjaju proteinsku konformaciju koja vodi ushodnoj regulaciji nekoliko signalnih kaskada, kao što su scr7abl kinaza, MAPK i PI3 kinaza zavisni signalni putevi. Ovi signalni kaskadni putevi vode aktivaciji nekoliko redoks-regulišućih transkripcionih faktora (AP-1, NF- κ B, p53, HIF-1, NFAT).

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata istraživanja kandidat je izveo sledeće zaključke:

1. U ispitivanim područjima, kod sojeva autohtone rase pramenke i uvezenih rasa ovaca, ustanovljena je infekcija sa sledećim parazitima: *Trichostrongylidae*, *Nematodirinae*, *Protostrongylidae*, *Trichuris* spp, *Strongyloides* spp, *Anoplocephalidae*, *Dicrocoelium dendriticum* i *Eimeria* spp. Vrsta parazitske infekcije zavisila je od ispitivanog područja i rase/soja ovaca.

2. Koprološkim pregledom utvrđen je različit ekstenzitet i intenzitet parazitskih infekcija kod sojeva autohtone rase pramenka i uvezenih rasa ovaca u ispitivanim područjima. Kod autohtonih sojeva pramenke utvrđen je niži ekstenzitet i intenzitet parazitskih infekcija ($p < 0,05$).

3. Nivo oksidativnog stresa kod autohtonih sojeva pramenke i uvezenih rasa ovaca različit je u zavisnosti od ekstenziteta i intenziteta parazitske infekcije. Utvrđeno je da su oksidativne modifikacije proteina kod uvezenih rasa izraženije pri istom ekstenzitetu i intenzitetu parazitske infekcije u odnosu na sojeve autohtone rase pramenke ($p < 0,01$).

4. Utvrđeno je da je, bazalni nivo peroksidacije lipida ćelijske membrane kod kontrolnih grupa uvezenih rasa ovaca veći u odnosu na autohtone sojeve pramenke ($p < 0,001$). U prisustvu parazitske infekcije, i kod sojeva autohtone rase pramenke i kod uvezenih rasa ovaca, dolazi do oksidativne modifikacije lipida, koja je izraženija kod uvezenih rasa ovaca ($p < 0,05$).

5. Ukupna aktivnost superoksid dizmutaze 1 je veća kod sojeva autohtone rase pramenke u odnosu na uvezene rase ovaca ($p < 0,05$), što je potvrda jačeg odgovora sojeva pramenke na oksidativni stres izazvan parazitskom infekcijom. Sa porastom intenziteta parazitske infekcije ukupna aktivnost enzima SOD 1 se povećava i kod sojeva autohtone rase pramenke i kod uvezenih rasa ovaca.

6. Aktivnost katalaze se smanjuje sa povećanjem intenziteta parazitske infekcije, i kod sojeva autohtone rase pramenke i kod uvezenih rasa ovaca ($p < 0,05$).

7. Na osnovu relativne izoenzimske raspodele enzima laktat-dehidrogenaze (LDH), utvrđeno je oštećenje ćelija različitih organa, što je u zavisnosti od prisutne vrste i intenziteta parazitske infekcije. Kod ispitivanih sojeva autohtone rase pramenke i uvezenih rasa ovaca inficiranih sa *Strongyloides* spp, *Dicrocoelium dendriticum* i *Protostrongylidae* utvrđeno je oštećenje ćelija miokarda (LDH₂) i pluća (LDH₃). U prisustvu parazitske infekcije sa *Strongyloides* spp, *Trichuris* spp i *Dicrocoelium dendriticum* utvrđeno je oštećenje ćelija jetre (LDH₅).

8. U zavisnosti od intenziteta parazitske infekcije, i kod sojeva autohtone rase pramenke i kod uvezenih rasa ovaca, povećava se produkcija RNS. Kod uvezenih rasa ovaca nivo nitrozativnog stresa je intenzivniji u odnosu na sojeve pramenke ($p < 0,001$).

9. Primenom SDS-PAG elektroforeze i tačno-masene spektrometrije bliže je određena molekulska masa izolovane ovčije SOD 1, od 31,84 kDa i 29,5 kDa. Izoelektrofokusanjem je utvrđena izoelektrična tačka ovčije SOD 1 od 6,42.

10. U ogledima *in vitro*, pri izlaganju SOD 1 dejstvu vodonik-peroksida, dokazana je inhibicija aktivnosti ovog enzima i do 50%. Step en inhibicije aktivnosti enzima zavisio je

od vremena ekspozicije i primenjene koncentracije vodonik-peroksida. Elektroforetskim analizama je utvrđeno da izlaganje SOD 1 vodonik-peroksidu dovodi do dimerizacije i fragmentacije ovog enzima i formiranja 6 proteinskih traka molekulskih masa od 63,5 kDa, 31,84 kDa, 26,91 kDa, 21,97 kDa, 15 kDa i 13 kDa. Gasno-masenom analizom utvrđeno je da vodonik-peroksid dovodi do karbonilovanja SOD 1 (m/z 881,91 i m/z 909,42) i ireverzibilne oksidacije tiolne grupe enzima (m/z 938,65 i m/z 969,96). Izoelektrofokusanjem je utvrđeno i prisustvo SOD 1 sa izoelektričnom tačkom od 5,0, što je posledica oksidativnih modifikacija ovog enzima.

11. Spektralnom elektron paramagnetnom rezonancom, u ogledima *in vitro*, po prvi put, je dokazano stvaranje azot-dioksid radikala kao posledica oksidativnih modifikacija SOD 1.

12. Utvrđeno je da izoenzimski oblici SOD 1 mogu da se koriste kao biomarkeri u proceni intenziteta parazitskih infekcija kod ovaca. U zavisnosti od intenziteta parazitske infekcije i posledične oksidativne modifikacije javljaju se promene u izoenzimskim oblicima SOD 1.

13. Pri blagom intenzitetu parazitske infekcije dolazi do smanjenja aktivnosti izoenzimskog oblika SOD 1-1. Kod srednjeg i visokog intenziteta infekcije, izoenzimska aktivnost SOD 1-2 se povećava. Ustanovljeno je da je aktivnost SOD 1-3 izoenzimskog oblika smanjena kod blagog intenziteta, a povećana kod visokog intenziteta parazitske infekcije oblim glistama (*Nematodirinae* i *Trichuris* spp). U prisustvu visokog intenziteta infekcije sa pantljičarama (*Anoplocephalidae*) aktivnost izoenzima SOD 1-4 se povećava, dok se u prisustvu parazitske infekcije sa plućnim vlašcima (*Protostrongylidae*) povećava aktivnost izoenzima SOD 1-5.

8. LITERATURA

1. Abbott, K.A., Lewis, C.J., 2005. Current approaches to the management of ovine footrot. *Vet J*, 169, 28-41.
2. Aboutwerat, A., Pemberton, P.W., Smith, A., Burrows, P.C., McMahon, R.F.T., Jain, S.K. Warnes, T.W., 2003. Oxidant stress is a significant feature of primary biliary cholestasis. *Biochim Biophys Acta*, 1637, 142-50.
3. Abreu, I.A., Cabelli, D.E., 2010. Superoxide dismutases – a review of the metal – associated mechanistic variations. *Biochim Biophys Acta*, 1804, 263-274.
4. Adams, J.D., Lauterberg, B.H., Mitchell, J.R., 1983. Plasma glutathione and glutathione disulphide in the rat: Regulation and response to oxidative stress. *J Pharmacol Exp Therap*; 227, 749-54.
5. Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. In: Packer L (Ed.), *Methods in Enzymology*, Vol 105, Academic Press, Orlando, 121-126.
6. Agarwal, A., Gupta, S., Sharma, R., 2005. Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective. *Reprod Biomed.*, 11, 641-650.
7. Al-Qudah K.M., 2011. Oxidant and antioxidant profile of hyperketonemic ewes affected by pregnancy toxemia. *Vet Clin Pathol*, 40, 60-65.
8. Al-Shaibani, I.R.M., Phulan, M.S., Arijo, A., Qureshi, T.A., 2008. Contamination of infective larvae of gastrointestinal nematodes of sheep on communal pasture. *Int J AgricultBiol*, 10, 653-657.
9. Alvarez, L., Moreno, G., Moreno, L., Ceballos, L., Shaw, L., Fairweather, I., Lanusse, C., 2009. Comparative assessment of albendazole and triclabendazole ovicidal activity on *Fasciola hepatica* eggs, *Vet Parasitol*, 164, 211-216.
10. Ames, B.N., Gold, L.S., Willett, W.C., 1995. The causes and prevention of cancer. *Proc Nat Acad Sci*, USA 92, 5258-5265.

11. Andersen, U.V, Howe, D.K, Olsen, S.N, Nielsen, M.K., 2013. Recent advances in diagnosing pathogenic equine gastrointestinal helminths: the challenge of prepatent detection. *Vet Parasitol*, 192, 1-9.
12. Archer, S., 1993. Measurement of nitric-oxide in biological models. *FASEB J*, 7, 349–360.
13. Arguelles, S., Garcia, S., Maldonado, M., Machado, A., Ayala, A., 2004. Do the serum oxidative stress biomarkers provide a reasonable index of the general oxidative stress status? *Biochim Biophys Acta*, 1674, 251-259.
14. Armour, J., 2000. In: Martin, W.B., Aitken, I.D. (Eds), *Diseases of Sheep*, third ed. Blackwell Science Ltd, Oxford, p 171.
15. Asada, K., 1992. Production and scavenging of active oxygen in chloroplast, In: *Molecular Biology of Free Radical Scavenging System*, J.G. Scandalios, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 173-192.
16. Astolfi, P., Greci, L., Panagiotaki, M., 2005. Spin trapping of nitrogen dioxide and of radicals generated from nitrous acid. *Free Radic Res*, 39, 137-144.
17. Augusto, O., Bonini, M.G., Amanso, A.M., Linares, E., Santos, C.C.X, De Menezes, S.L., 2002. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radical Biol Med*, 32, 9, 841-859.
18. Dimitrijević, B., Borozan, S., 2008. Influence of Gluconeogenesis on Metabolic status and Appearance of Oxidative Stress in Peripartal Cows, *XXV Jubilee World Buiatrics Congress, Book of abstracts*, Budapest, Hungary, July 6-11, pp 5-6.
19. Barondeau, D.P., Kassmann, C.J., Bruns, C.K., Tainer, J.A., Getzoff, E.D., 2004. Nickel superoxide dismutase structure and mechanism. *Biochem*, 43, 8038-8047.
20. Basu, S., Eriksson, M., 2001. Retinol palmitate counteracts oxidative injury during experimental septic shock. *Ann Acad Med Singapore*, 30, 265–269.
21. Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem*, 44, 276-287.

22. Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z., Ferencik, M., 1999. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci*, 65, 1865–1874.
23. Bernabucci, U., Ronchi, B., Lacetera, N., Nardone, A., 2005. Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci*, 88, 2017–2026.
24. Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. *Ann Biochem*, 44, 276-287.
25. Bishop, S.C., Stear, M.J., 2001. Inheritance of faecal egg counts during early lactation in Scottish Blackface ewes facing mixed, natural nematode infections, *Animal Sci*, 73, 389-395.
26. Blakenship, R.E., 2010. Early evolution of photosynthesis. *Plant Physiol*, 154, 434-438.
27. Blum, J.W., Dosogne, H., Hoeben, D., Vangroenweghe, F., Hammon, H.M., Bruckmaier, R.M., Burvenich, C., 2000. Tumor necrosis factor alpha and nitrite/nitrate responses during acute mastitis induced by *Escherichia coli* infection and endotoxin in dairy cows. *Domestic Animal Endocrin*, 19, 223–235.
28. Borges, F., Fernandes, E., Roleira, F., 2002. Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Curr Med Chem*, 9, 195–217.
29. Bouchard, L., Blais, S., Desrosiers, C., Zhao, X., Lacasse, P., 1999. Nitric oxide production during endotoxin-induced mastitis in the cow. *J Dairy Sci*, 82, 2574–2581.
30. Bremner, I., 1980. Absorption, transport and distribution of copper. In : Biological roles of copper, pp. 23-36. – Excerta Medica. Ciba Foundation Symposium 79 (new series), Amsterdam/Oxford/New York.
31. Brigelius-Flohe, R., 1999. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med*, 27, 951-965.
32. Britton, C., Murray, L., 2004. Cathepsin L protease is essential for yolk processing during embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Sci*, 117, 5133-5143.

33. Brown, A., Burleigh, J.M., Billett, E.E., Pritchard, D.I., 1995. An initial characterization of proteolytic enzymes secreted by the adult stage of the human hookworm *Necator americanus*. *Parasitol*, 110, 555-563.
34. Bucala, R., Cerami, A., 1992. Advanced glycosylation: chemistry, biology, and implications for diabetes and aging. *Adv Pharmacol*, 23, 1-34.
35. Buettner, G.R., 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate, *Arch Biochem Biophys*, 300, 535-543.
36. Burak Cimen, M.Y., 2008. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Chim Acta*, 390, 1-11.
37. Buss, I.H., Chan, T.P., Sluis, K.B., Domigan, N.M., Winterbourn, C.C., 1997. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radic Biol Med*, 23, 361-366.
38. Cadenas, E., Sies, H., 1998. The lag phase. *Free Radic Res*, 28, 601-609.
39. Callahan, H.L., Crouch, R.K, James, E.R., 1988. Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants. *Parasitol Today*, 4, 218-225.
40. Camara, L., Pfister, K., Aeschlimann, A., 1996. Histopathological analysis of bovine livers infested by *Dicrocoelium dendriticum*, *Vet Res*, 27(1), 87-92.
41. Carmona, C., Dowd, A.J., Smith, A.M., Dalton, J.P., 1993. Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Mol Biochem Parasitol*, 62(1), 9-17.
42. Carr, A., McCall, M. R., Frei, B., 2000. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species-reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*, 20, 1716-1723.
43. Celi, P., Di Trana, A., Claps, S., 2010. Effects of plane nutrition on oxidative stress in goats during the peripartum period. *Vet J*, 184, 95-99.
44. Celi, P., 2011. Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 33(2), 233-240.

45. Ceriello, A., Ihnat, M.A., Thorpe, J.E., 2009. The “metabolic memory”: Is more than just tight glucose control necessary to prevent diabetic complications? *J Clin Endocrinol Metabol*, 94, 410-415.
46. Chae, H.Z., Robison, K., Poole, L.B., Church, G., Storz, G., Rhee, S.G., 1994. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 7017-7021.
47. Chae, H.Z., Uhm, T.B., Rhee, S.G., 1994. Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 7022-7026.
48. Chaiyotwittayakun, A., Erskine, R.J., Bartlett, P.C., Herd, T.H., Sears, P.M., Harmont, R.J., 2002. The effect of ascorbic acid and L-histidine therapy on acute mammary inflammation in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 85, 60–67.
49. Chapman, C.B., Mitchell, G.F., 1982. Proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes released by *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol*, (2-3):165-78.
50. Chauvin, A., Moreau, E., Boulard, C., 2001. Responses of *Fasciola hepatica* infected sheep to various infection levels. *Vet Res*, 32, 87–92.
51. Chen, K., J. Suh, A.C. Carr, J.D., Morrow, J. Zeind, B. Frei, 2000: Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload, *Am J Physiol Endocrinol Metabol*, 279, E1406-E1412.
52. Chevion, M., Berenshtein, E., Stadtman, E.R., 2000. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radical Res*, 33, S99–S108.
53. Chiueh, C. C., 1999. Neuroprotective properties of nitric oxide. *Ann NY Acad Sci*, 890, 301–311.
54. Choi, J., Rees, H.D., Weintraub, S.T., Levey, A.I., Chin, L.S., Li, L., 2005. Oxidative modifications and aggregation of Cu,Zn-superoxide dismutase associated with Alzheimer and Parkinson diseases, *J Biol Chem*, 280, 11648-11655.

55. Contreras, G.A., Sordillo, L.M., 2011. Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. *Comp Immunol Microb Infect Dis*, 34: 3: 281-289.
56. Cooper, E.S., Whyte-Alleng, C.A.M., Finzi-Smith, J.S., McDonald, T.T., 1992. Intestinal nematode infections in children: the pathophysiological price paid. *Parasitol*, 104, S91-S103.
57. Criado, A.F., Armas, S.C., Gimenez, C.P., Casado, N.E., Jimenez, A.G., Rodriguez, F.C., 1992. Proteolytic enzymes from *Trichinella spiralis* larvae. *Vet Parasitol*, 45, 133-140.
58. Cross, A.R., Jones, O.T., 1991. Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys Acta*, 1057, 281-298.
59. Culotta, V.C., Yang, M., O'Halloran, T.V., 2006. Activation of superoxide dismutases: putting the medal to the pedal. *Biochim Biophys Acta*, 1763, 747-758.
60. Dalle-Donne, I., Scaloni, A., Giustarini, D., Cavarra, E., Tell, G., Lungarella, G., 2005. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom. Rev*, 24, 55-99.
61. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, G., Giustarini, D., Milzani, A., 2009. Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci*, 34(2):85-96.
62. Dalton, J.P., Smith, A.M., Clough, K.A., Brindley, P.J., 1995. Digestion of haemoglobin by schistosomes: 35 years on. *Parasitol Today*, 11; 299-303.
63. De Coursey, T. E., Ligeti, E., 2005. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell Mol Life Sci*, 62, 2173-2193.
64. De Grey, A.D.N.J., 2002. HO₂[•]: The forgotten radical. *DNA Cell Biol.*, 21, 251-257.
65. Deaton, C.M., D.J. Marlin, N.C. Smith, P.A. Harris, C.A. Roberts, R.C. Schroter, F.J. Kelly, 2004. Pulmonary epithelial lining fluid and plasma ascorbic

- concentrations in horses affected by recurrent airway obstruction, *Am J Vet Res*, 65, 80-87.
66. Dede, S., Deger, Y., Kahraman, T., Deger, S., Alkan, M., Cemek, M., 2002. Oxidation products of nitric oxide and the concentrations of antioxidant vitamins in parasitized goats. *Acta Vet Brno*, 71, 341-345.
67. Desideri, A., Falconi, M., Parisi, V., Morante, S., Rotilio, G., 1988. Is the activity-linked electrostatic gradient of bovine Cu,Zn superoxide dismutases conserved in homologous enzymes irrespective of the number and distribution of charges? *Free Radic Biol Med*, 5, 313-317.
68. Desideri, A., Falconi, M., Polticelli, F., Bolognesi, M., Djinovic, K., Rotilio, G., 1992. Evolutionary conservativeness of electric field in the Cu,Zn superoxide dismutase active site, *J Mol Biol*, 223, 337-342.
69. Dimitrijević, B., Borozan, S., Katić-Radivojević, S., Stojanović, S., 2012. Effects of infection intensity with *Strongyloides papillosus* and albendazole treatment on development of oxidative/nitrosative stress in sheep, *Vet Parasitol*, 186, 364-375.
70. Dimitrijević, B., Borozan, S., Stojanović, S., 2012. π - π and cation- π interactions in protein-porphyrin complex crystal structures. *RSC Adv*, 2, 12963-12972.
71. Dimitrov, D., Jordan, Tchavdar, L., Vassilev, Sebastien Andre, Srinivas, V., Kaveri, Sebastián Lacroix-Desmazes, 2008. Functional variability of antibodies upon oxidative processes, *Autoimm Rev*, 35, 574-578.
72. Drackley, J.K., 1999. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier. *J Dairy Sci*, 82, 2259-2273.
73. Drake, L.J., Bianco, A.E., Bundy, D.A.P., Ashall, F., 1994. Characterization of peptidases of adult *Trichuris muris*. *Parasitol*, 109, 623-630.
74. Droge, W., 2002. Free radical in the physiological control of cell function, *Physiol Rev*, 82, 47-95.
75. Dzik, J.M., 2005. Molecules released by helminth parasites involved in host colonization, *Acta Biochim Polon*, 53, 1,33-64.

76. Dzik, J.M., 2010. The ancestry and cumulative evolution of immune reactions, *Acta Biochim Polon*, 57, 443-466.
77. Dzik, J.M., Gołos, B., Jagielska, E., Zieliński, Z., Wałajtys-Rode, E., 2004. A non-classical type of alveolar macrophage response to *Trichinella spiralis* infection. *Parasite Immunol*, 26, 197–205.
78. Eberhardt, G.A., Mayer, W.E., Bonfoh, B., Streit, A., 2008. The *Strongyloides* (*Nematoda*) of sheep and the predominant *Strongyloides* of cattle at least two different, genetically isolated populations, *Vet Parasitol*, 157, 89-99.
79. Eckelt, V.H., Liebau, E., Walter, R.D., Henkle-Dursen K., 1998. Primary sequence and activity analyses of a catalase from *Ascaris suum*. *Mol Biochem Parasitol*, 95, 203-214.
80. El Kebir, D., Taha, R., Hubert, B., Gauvin, D., Gangal, M., Blaise, G., 2005. The antiinflammatory effect of inhaled nitric oxide on pulmonary inflammation in a pig model. *Can J Physiol Pharmacol*, 83, 252–258.
81. Ellman, G.K., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys*, 82, 70–77.
82. Esterbauer, H., Zollner, H., 1989. Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products. *Free Radic. Biol Med*, 7, 197–203.
83. Euzeby, J., 1982. Diagnostic expérimental des helminthoses animales (animaux domestiques - animaux de laboratoire - primates). Travaux Pratiques d'Helminthologie Vétérinaire. Informations Techniques des Services Vétérinaires, Ministère de l'Agriculture, Paris, 360 p.
84. FAO, 2012. Domestic Animal Diversity Information System, Food and Agriculture Organization of the United Nations. (DAD IS).
85. FAO, 2007. The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture, Commission on genetic resources for food and agriculture, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.
86. Fettere, R.H., Rhoads, M.L., 1997. The in vitro uptake and incorporation of hemoglobin by adult *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol*, 69, 77-87.

87. Finkel, T., 2003. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol*, 15, 247-254.
88. Fridovich, I., Handler, P., Xanthine oxidase, V., 1962. Differential inhibition of the reduction of various electron acceptors, *J Biol Chem*, 237, 916-921.
89. Gamble, H.R., Mansfield, L.S., 1996. Characterization of excretory-secretory products from larval stages of *Haemonchus contortus* cultured *in vitro*. *Vet Parasitol*, 62, 291-305.
90. Gauly, M., Erhardt, G., 2002. Changes in faecal trichostrongyle egg count and haematocrit in naturally infected Rhon sheep over two grazing periods and associations with biochemical polymorphism. *Small Ruminant Res*, 44, 103-108.
91. Geldhof P, Claerebout E, Knox DP, Jagneessens J, Vercruyssen J., 2000. Proteinases released *in vitro* by the parasitic stages of the bovine abomasal nematode *Ostertagia ostertagi*. *Parasitol*, 121, 639-647.
92. Geller, B.L., Winge, D.R., 1982. Rat liver Cu,Zn-superoxide dismutase. Subcellular location in lysosomes. *J Biol Chem*, 257, 15, 8945-52.
93. Ghafourifar, P., Cadenas, E., 2005. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci*, 26, 190-195.
94. Golenser, J., Peled-Kamar, M., Schwartz, E., Friedman, I., Groner, Y., Pollack, Y., 1998. Transgenic mice with elevated level of Cu,Zn SOD are highly susceptible to malaria infection. *Free Rad Biol Med*, 24, 9, 1504-1510.
95. Gonzalez, F.J., 2005. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1, *Mut Res*, 569, 101-110.
96. Grimsrud, P.A., Xie, H., Griffin, T.J., Bernlohr, D.A., 2008. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *J Biol Chem*, 283, 32, 21837-21841.
97. Guengerich, F.P., 2008. Cytochrome P450 and chemical toxicology, *Chem Res Toxicol*, 21, 70-83.

98. Guevara, I., Iwanejko, J., Dembinska-Kiec, A., Pankiewicz, J., Wanat, A., Anna, P., Golabek, I., Bartus, S., Malczewska-Malec, M., Szczudlik, A., 1998. Determination of nitrite and nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta*, 274, 177–188.
99. Haffner, A., Guilavogui, A.Z., Tischendorf, F.W., Brattig, N.W., 1998. *Onchocerca volvulus*: microfilariae secrete elastinolytic and males nonelastinolytic matrix-degrading serine and metalloproteases. *Exp Parasitol*, 90, 26-33.
100. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999, Free Radicals in Biology and Medicine. third ed. Oxford University Press, New York
101. Halliwell, B., Whiteman, M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*, 142, 231-255.
102. Hawdon, J.M., Jones, B.J., Perregaux, M.A., Hotez, P.J., 1995. *Ancylostoma caninum*: metalloprotease release coincides with activation of infective larvae *in vitro*. *Exp Parasitol*, 80, 205-211.
103. Henkle-Dührsen, K., Kampkötter, A., 2001. Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. *Mol Biochem Parasitol*, 114,129-141.
104. Herbst, R.W., Guce, A., Bryngelson, P.A., Higgins, K.A., Ryan, K.C., Cabelli, D.E., Garman, S.C., Maroney, M.J., 2009. Role of conserved tyrosine residues in NiSOD catalysis: a case of convergent evolution. *Biochem*, 48, 3354-3369.
105. Hoeschen, R.J., 1997. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Can J Cardiol*, 13, 1021-1025.
106. Hoffmann, K.F., Wynn, T.A., Dunne, D.W., 2002. Cytokine-mediated host responses during schistosome infections; walking the fine line between immunological control and immunopathology. *Adv Parasitol*, 52, 265-307.
107. Höglund, J., Gustafsson, K., Ljungström, B.L., Engström, A., Donnan, A., Skuce, P., 2009. Anthelmintic resistance in Swedish sheep flocks based on a comparison of the results from the faecal egg count reduction test and resistant allele frequencies of the beta-tubulin gene. *Vet Parasitol*, 161(1-2):60-8.

108. Holdsworth, P.A., Conway, D.P., McKenzie, M.E., Dayton, A.D., Chapman, H.D., Mathis, G.F., Skinner, J.T., Mundt, H.C., Williams, R.B., 2004. World Association for the Advancement in Veterinary Parasitology (WAAVP) guidelines for the evaluating the efficacy of anticoccidial drugs in ruminants. *Vet Parasitol*, 121, 189-212.
109. Horecker, B. L and Heppel, L. A., 1949. The reduction of cytochrome c by xanthine oxidase. *J Biol Chem*, 178:683-690.
110. Hudson, P.J., Cattadori, I.M., Boag, B., Dobson, A.P., 2006. Climate disruption and parasite-host dynamics: patterns and processes associated with warming and the frequency of extreme climatic events, *J Helminth*, 80, 175-182.
111. Hyslop, P.A., Hinshaw, D.B., Scraufstatter, I.U., Cochrane, C.G., Kunz, S., Vosbeck, K., 1995. Hydrogen peroxide as a potent bacteriostatic antibiotic: Implications for host defense. *Free Radic Biol Med*, 19, 31-37.
112. Idris, A., Moors, E., Sohnrey, B., Gauly, M., 2012. Gastrointestinal nematode infections in German sheep. *Parasitol Res*, 110, 1453-1459.
113. Ischiropoulos, H., 1998. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys*, 356, 1, 1-11.
114. Jabeen, R., Mohammad, A., Elefano, E.C., Petersen, J.R., Saleemuddin, M., 2006. Antibodies and Fab fragments protect Cu,Zn-SOD against methylglyoxal-induced inactivation. *Biochim Biophys Acta*, 1760, 1167-1174.
115. Jaffe, A.S., Y. Landt, C.A. Parvin, D.R. Abendsehein, E.M. Geltman, J.H. Ladenson, 1996. Comparative sensitivity of cardiac troponin I and lactate dehydrogenase isoenzymes for diagnosing acute myocardial infarction. *Clin Chem* 42 1770–1776.
116. James, E.R., 1994. Superoxide dismutase. *Parasitol Today*, 10, 481-484.
117. Jenkins, R.R., 1988. Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med*, 5: 156-70.

118. Jithendran, K.P., Bhat T.K., 1996. Prevalence of dicrocoeliosis in sheep and goats in Himachal Pradesh, India. *Vet Parasitol*, 61(3-4):265-71.
119. Joseph, D.P., Mannervik, B., 2006, In: Molecular Toxicology, Oxford University Press, ISBN 0-19-517620-0, p 23.
120. Kakhlon, O., Cabantchik, Z.I., 2002. The labile iron pool: Characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radic Biol Med*, 33, 1037–1046.
121. Kang, S.W., Baines, I.C., Rhee, S.G., 1998. Characterization of mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. *J Biol Chem*, 273, 6303-6311.
122. Kankofer, M., Albera, E., Feldman, M., Gundling, N., Hoedemaker, M., 2010. Comparison of antioxidative/oxidative profiles in blood plasma of cows with and without retained fetal placental membranes. *Theriogenol*, 74: 1385-1395.
123. Karanu, F.N., Rurangirwa, F.R., McGuire, T.C., Jasmer, D.P., 1993. *Haemonchus contortus*: identification of proteases with diverse characteristics in adult worm excretory-secretory products. *Exp Parasitol*, 77, 362-371.
124. Kassai, T., 1999. Veterinary Parasitology, Butterworth-Heinemann, Linacre House, Jordan Hill, Oxford, OX28DP, ISBN 0 7506 3563 0
125. Kennedy, M.W., Harnett, W., ed (2001) *Parasitic Nematodes Molecular Biology Biochemistry and Immunology*, CABI Publishing.
126. King, C.L., Medhat, A., Malhotra, I., Nafeh, M., Helmy, A., Khaudary, J., Ibrahim, S., El-Sherbiny, M., Zaky, S., Stupi, R.J., Brustoski, K., Shehata, M., Shata, M.T., 1996. Cytokine control of parasite-specific anergy in human urinary schistosomiasis. IL-10 modulates lymphocyte reactivity. *J Immunol*, 156, 4715-4721.
127. Kleczkowski, M., Klucinski, W., Shaktur, A., Sikora, J., 2005. Concentration of ascorbic acid in the blood of cows with subclinical mastitis. *Polish J Vet Sci*, 8, 121–125.

128. Knox, D.P., 1994. Parasite enzymes and the control of roundworm and fluke infestation in domestic animals. *Br Vet J*, 150, 319-337.
129. Konstantinova, S.G., Russanov, E.M., 1988. Studies on the nature of superoxide dismutase activity in sheep liver subcellular fractions. *Acta Physiol Pharmacol Bulg*, 14, 4, 71-77.
130. Koshland, D. E., 1992. The molecule of the year. *Sci*, 258, 1861.
131. Kotze, A.C., McClure, S.J., 2001. *Haemonchus contortus* utilises catalase in defence against exogenous hydrogen peroxide *in vitro*. *Int J Parasitol*, 31, 1563-1571.
132. Krishna, M.C., Russo, A., Mitchell, J.B., Goldstein, S., Dafni, H., Samuni, A., 1996. Do nitroxide antioxidants act as scavengers of O₂⁻. or as SOD mimics? *J Biol Chem*, 271, 42, 26026-26031.
133. Krull, W.H., Mapes, C.R., 1952: Studies on the biology of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 (Trematoda: Dicrocoeliidae), including its relation to the intermediate host, *Cionella lubrica* (Müller). VII. The second intermediate host of *Dicrocoelium dendriticum*. *Cornell Vet*, 42(4):603-4.
134. Kwatia, M.A., Botkin, D.J., Williams, D.L., 2000. Molecular and enzymatic characterization of *Schistosoma mansoni* thioredoxin peroxidase. *J Parasitol*, 86; 908-915.
135. Lackey, A., James, E.R., Sakanari, J.A., Resnick, S.D., Brown, M., Bianco, A.E., McKerrow, J.H., 1989. Extracellular protease of *Onchocerca*. *Exp Parasitol*, 68, 176-185.
136. Lauritzen, B., Lykkesfeldt, J., Friis, C., 2003. Evaluation of a single dose versus divided dose regimen of danofloxacin in treatment of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Res Vet Sci*, 74, 271-277.
137. Ledwozyw, A., Stolarczyk, H., 1992. The involvement of polymorphonuclear leucocytes in the pathogenesis of bronchopneumonia in calves. VI. Superoxide dismutase and lipoprotein lipase activities. *Acta Vet Hungarica*, 40, 267-277.

138. Leonard, S.S., Harris, G.K., Shi, X., 2004. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med*, 37(12):1921-42.
139. Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, 186, 464–478.
140. Lim, M.J., Chae, H.Z., Rhee, S.G., Yu, D.Y., Lee, K.K., Yeom, Y.I., 1998. The type II peroxiredoxin gene family of the mouse: molecular structure, expression and evolution. *Gene*, 216, 197-205.
141. Liochev, S. I., & Fridovich, I., 2002. The Haber–Weiss cycle—70 years later: An alternative view. *Redox Rep*, 7, 55–57.
142. Liochev, S., Fridovich, I., 1994. The role of superoxide anion radical in the production of hydroxyl radical: In vitro and in vivo, *Free Radical Biol Med*, 16, 29-33.
143. Locatelli, C., Pedrosa, R.C., De Bem, A.F., Creczynski-Pasa, T.B., Cordova, C.A., Wilhelm-Filho, D., 2004. A comparative study of albendazole and mebendazole-induced, time dependent oxidative stress, *Redox Rep*, 9(2):89-95.
144. Lopez-Lluch, G., Hunt, N., Jones, B., Zhu, M., Jamieson, H., Hilmer, S., Cascajo, M.V., Allard, J., Ingram, D.K., Navas, P., de Cabo, R., 2006. Caloric restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *PNAS USA*, 103: 1768-1773.
145. Lun, H.M., Mak, C.H., Ko, R.C., 2003. Characterization and cloning of metalloproteinase in the excretory/secretory products of the infective stage larva of *Trichinella spiralis*. *Parasitol Res*, 90, 27-37.
146. Lundberg, J.O., Weitzberg, E., Gladwin, M.T., 2008. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 7, 2, 156-67.
147. Lykkesfeldt, J., 2001. Determination of malondialdehyde dithiobarbituric acid adduct in biological samples by HPLC with fluorescence detection: Comparison with UV–visible spectrophotometry. *Clin Chem*, 47, 1725–1728.

148. Lykkesfeldt, J., Svendsen, O., 2007. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *Vet J*, 173, 502-511.
149. Lykkesfeldt, J., Viscovich, M., Poulsen, H.E., 2003. Ascorbic acid recycling in human erythrocytes is induced by smoking in vivo. *Free Radic Biol Med*, 35, 1439–1447.
150. Machado, D.C., Horton, D., Harrop, R., Peachell, P.T., Helm, B.A., 1996. Potential allergens stimulate the release of mediators of the allergic response from cells of mast cell lineage in the absence of sensitization with antigenspecific IgE. *Eur J Immunol*, 26, 2972-2980.
151. MacMillan-Crow, L.A., Crow, J.P., Thompson, J.A., 1998. Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochem*, 37(6):1613-1622.
152. Maizels, R.M., Balic, A., Gomez-Escobar, N., Nair, M., Taylor, D., Allen, J.E. 2004. Helminth parasites – masters of regulation. *Immunol Rev*, 201, 89-116.
153. Manga-Gonzales, M.Y., Gonzales-Lanza, C., 2005. Field and experimental studies on *Dicrocoelium dendriticum* and dicrocoeliasis in northern Spain, *J Helminthol*, 79, 291-302.
154. Marnett, L.J., 1999. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mut. Res-Fund Mol Mech Mut*, 424, 83–95.
155. Marnett, L. J., 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogen*, 21, 361–370
156. Martinez-Valladares, M., Martinez-Perez, J.M., Robles-Perez, D., Cordero-Perez, C., Famularo, M.R., Fernandez-Pato, N., Castanon-Ordonez, L., Rojo-Vazquez, F.A., 2013. The present status of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematode infections of sheep in the northwest of Spain by in vivo and in vitro techniques, *Vet Parasitol*, 191, 177-181.
157. McCord, J. M., & Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem*, 244, 6049–6055.

158. McGonigle, S., Curley, G.P., Dalton, J.P., 1998. Peroxiredoxins: a new antioxidant family. *Parasitol Today*, 14, 139-145.
159. McKerrow, J.H., Sun, E., Rosenthal, P.J., Bouvier, J., 1993. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol*, 47, 821-853.
160. McKerrow, J.H., 1989. Parasite proteases. *Exp Parasitol*, 68: 111-115.
161. Mei, H., LoVerde, P.T., 1997. *Schistosoma mansoni*: the developmental regulation and immunolocalization of antioxidant enzymes. *Exp Parasitol*, 86, 69-78.
162. Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., Remacle, J., 1994. Importance of S-glutathione peroxidase, catalase, and Cu,Zn-SOD for cell survival against oxidative stress, *Free Radic Biol Med*, 17, 235-248.
163. Miller, A.-F., 2012. Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett*, 586, 5, 585-595.
164. Miller, A.-F., 2004. Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills, *Curr Opin Chem Biol*, 8, 162-168.
165. Miller, M.J., Zhang, X.J., Sadowska-Krowicka, H., Chotinaruemol, S., McIntyre, J.A., Clark, D.A., Bustamante, S.A., 1993. Nitric oxide release in response to gut injury. *Scand J Gastroenterol*, 28, 149-154.
166. Mittal, C.K., Murad, F., 1977. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74(10):4360-4.
167. Moczon, T., Wranicz, M., 1999. *Trichinella spiralis*: proteinases in the larvae. *Parasitol Res*, 85, 47-58.
168. Moerman, D.G., 1999. A metalloprotease prepares the way. *Curr Biol*, 9, R701-R703.
169. Morrow, J.D., 2000. The isoprostanes: Their quantification as an index of oxidant stress status in vivo. *Drug Metabol Rev*, 32, 377-385.

170. Mukul, D., Kishore, B., Naveen, P., Reddy, L., Srivastava, M., 2005. Oxydative damage of plasma proteins and lipids in epidemic dropsy patients: Alterations in antioxidant status, *Bioch Biophys Acta*, 1722, 209-217.
171. Mulligan, F.J., O'Gradz, L., Rice, D.A., Dohertz, M.L., 2006. A herd health approach to dairy cow nutrition and production diseases of the transition cow. *Anim Reprod Sci*, 96, 331-353.
172. Nakamura, Y., Motokawa, M., 2000. Hypolipemia associated with the wasting condition of rabbits infected with *Strongyloides papillosus*, *Vet Parasitol*, 88, 147-151.
173. Nakamura, Y., Tsuji, N., Taira, N., 1994. Wasting condition under normal cardiac rhythms in rabbits following *Strongyloides papillosus* infection. *J Vet Med Sci*, 56, 1005-1007.
174. Navare, C.B., Pugh, D.G., 2002. Sheep and Goat Medicine. W.B. Saunders Company, Philadelphia, p. 100
175. Neuman, E.W., 1934. Potassium superoxide and the three-electron bond. *J Chem Phys*, 2, 31-33.
176. Nikolić-Kokić, A., Blagojević, D., Spasić, M.B., 2010. Complexity of free radical metabolism in human erythrocytes, *J Med Biochem*, 29, 189-195.
177. Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M.A., Beebe, D., Oates, P.J., Hammes, H.P., Giardino, I., Brownlee, M., 2000. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, 404, 787-790.
178. Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: *Toxicol Pharmacol*, 25, 31-38.
179. Olsen, A., Leshout, L., Hanspeter, M., Polderman, T., Polman, K., Steinmann, P., Stothard, R., Thybo, S., Verweij, J.J., Magnussen, P., 2009. Strongyloidiasis – the most neglected of the neglected tropical diseases, *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*, 103, 967-972.

180. O'Neill, S.M., Mills, K.H.G., Dalton, J.P., 2001. *F. hepatica* cathepsin L cysteine proteinase suppresses *Bordetella pertussis*-specific IFN-g production *in vivo*. *Parasite Immunol*, 23, 54-547.
181. Orr, W.C., Sohal, R.S., 1994. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*, *Sci*, 263, 1128-1130.
182. Otranto, D., Traversa, D., 2002. A review of dicrocoeliosis of ruminants including recent advances in the diagnosis and treatment, *Vet Parasitol*, 107, 317-335.
183. Otranto, D., Traversa, D., 2003. Dicrocoeliosis of ruminants: a little known fluke disease, *Trends Parasitol*, 19, 1, 14-24.
184. Ou, X., Thomas, G.R., Chacon, M.R., Tang, L., Selkirk, M.E., 1995. *Brugia malayi*: differential susceptibility to and metabolism of hydrogen peroxide in adults and microfilariae. *Exp Parasitol*, 80, 530-540.
185. Pacher, P., Beckman, J.S., Liaudet, L., 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*, 87(1): 315-424.
186. Panesar, T.S., 1981. The early phase of tissue invasion by *Trichuris muris* (nematoda: Trichuroidea). *Z Parasitenkd*, 66, 163-166.
187. Pastor, N., Weinstein, H., Jamison, E., Brenowitz, M., 2000. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J Mol Biol*, 17, 304(1), 55-68.
188. Payne, C.M., Bernstein, C., Bernstein, H., 1995. Apoptosis overview emphasizing the role of oxidative stress, DNA damage and signaltransduction pathways. *Leukem Lymphom* 19, 43-93.
189. Peter, D.W., Suttle, N.F., 1984. Factors influencing Cu,Zn superoxide dismutase activity in ovine and its use in the diagnosis of hypocuprosis. *Proc Nutr Sci*, 43, 100A.

190. Phares, K., 1996. An unusual host-parasite relationship: The growth hormone like factor from plerocercoids of spirometrid tapeworms. *Int J Parasitol*, 26, 575-588.
191. Pilon, M., Ravet, K., Tapken, W., 2011. The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases, *Biochem Biophys Acta*, 1807, 989-998.
192. Potter, S.Z. and Valentine, J.S., 2003. The perplexing role of copper-zinc superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis (Lou Gehrig's disease). *J Biol Inorg Chem*, 8, 373-380.
193. Poulsen, H.E., 2005. Oxidative DNA modifications. *Experim Toxicol Pathol*, 57 (Suppl. 1), 161-169.
194. Pryor, W.A., Houk, K.N., Foote, C.S., Fukuto, J.M., Ignarro, L.J., Squadrito, G.L., Davies, K.J.A., 2006. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291, 491-511.
195. Rae, T.D., Schmidt, P.J., Pufahl, R.A., O'Halloran, T.V., 1999. Undetectable intracellular free copper: The requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Sci*, 284, 805-808.
196. Ranjan, R., Swarup, D., Naresh, R., Patra, R.C., 2005. Enhanced erythrocytic lipid peroxides and reduced plasma ascorbic acid, and alteration in blood trace elements level in dairy cows with mastitis. *Vet Res Comm*, 29, 27-34.
197. Rhoads, M.L., Fetterer, R.H., 1995. Developmentally regulated secretion of cathepsin L-like cysteine proteases by *Haemonchus contortus*. *J Parasitol*, 81, 505-512.
198. Ridnour, L.A., Thomas, D.D., Mancardi, D., Espey, M.G., Miranda, K.M., Paolucci, N., 2004. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biol Chem*, 385, 1-10.
199. Riordan, J.F., Vallee, B.L., 1972. Nitration with tetranitromethane. *Methods Enzymol*, 25, 515-521.

200. Roche, M., Rondeau, P., Singh, N.R., Tarnus, E., Bourdon, E., 2008. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett*, 582, 1783-1787.
201. Rosenkranz, A.R., Schmaldienst, S., Stuhlmeier, K.M., Chen, W., Knapp, W., Zlabinger, G.J., 1992. A microplate assay for the detection of oxidative products using 20,70-dichlorofluorescein-diacetate. *J Immunol Meth*, 156, 39-45.
202. Rossner, P.Jr, Terry, M.B., Gammon, M.D., Agrawal, M., Zhang, F.F., Ferris, J.S., Teitelbaum, S.L., Eng, S.M., Gaudet, M.M., Neugut, A.I., Santella, R.M., 2007. Plasma protein carbonyl levels and breast cancer risk, *J Cell Mol Med*, 11,5, 1138-1148.
203. Rossner, P.Jr., Svecova, V., Milcova, A., Lnenickova, Z., Solansky, I., Santella, R.M, Sram, R.J., 2007. Oxidative and nitrosative stress markers in bus drivers. *Mutat Res*, 617(1-2), 23-32.
204. Rufener, L., Kaminsky, R., Maser, P., 2009. In vitro selection of *Haemonchus contortus* for resistance reveals a mutation at amino acid 198 of β -tubulin, *Mol Biochem Parasitol*, 168, 120-122.
205. Russanov, E.M., Kassabova, S.G., Konstatinova, P.S., Balevska, P.S., 1986. Effect of chronic copper loading on the activity of rat liver antioxidative enzymes. *Acta Physiol Pharmacol Bulg*, 12, 51-56.
206. Sajid, M., McKerrow, J.H., 2002. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol*, 120, 1-21.
207. Saleh, M.A., Mahran, O.M., Bassam, Al-Salahy, M., 2011. Circulating oxidative stress status in dromedary camels infested with sarcoptic mange, *Vet Res Commun*, 35(1), 35-45.
208. Saleh, M.A., 2008. Circulating oxidative stress status in desert sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*, *Vet Parasitol*, 154, 262-269.
209. Salo, D.C., Pacifici, R.E., Lin, S.W., Giuliviv, C., Davies, K.J.A., 1990. Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation. *J Biol Chem*, 265, 20, 11919-11927.

210. Savić, M., Jovanović, S., Vegara, M., 2007. Stočarstvo. Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu i Norwegian University of Life Sciences, Norveška, str.304, ISBN 978-86-81043-30-1.
211. Sayed, A.A., Williams, D.L., 2004. Biochemical characterization of 2-Cys peroxiredoxins from *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem*, 279, 26159-26166.
212. Schwarz, H.A., 1981. Free radicals generated by radiolysis of aqueous solutions, *J Chem Ed*, 58, 101-105, (State of the Art Symposium: Radiation Chemistry).
213. Scott, P.R., Sargison, N.D., Macrae, A., Rhind, S.R., 2005. An outbreak of subacute fasciolosis in Soay sheep: Ultrasonographic, biochemical and histological studies, *Vet J*, 170, 325-331.
214. Seo, M.S, Kang, S.W., Kim, K., Baines, I.C., Lee, T.H., Rhee, S.G., 2000. Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *J Biol Chem*, 275, 20346-20352.
215. Sgorlon, S., Stradaoli, G., Gabai, G., Stefanon, B., 2008. Variation of starch and fat diet affects metabolic status and oxydative stress in ewes, *Small Ruminant Res*, 74, 123-129.
216. Shen, F., Wu, L.P., Lu, Y., Liang, H.W., Bruce, I., Xia, Q., 2005. Mitochondrial permeability transition dynamics: an indicator of mitochondrial potassium channel opener. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 7:7317-20.
217. Shenai, B.R., Sijvali, P.S., Singh, A., Rosenthal, P.J., 2000. Characterization of native and recombinant falcipain-2, a principal trophozoite cysteine protease and essential hemoglobinase of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*, 275, 29000-29010.
218. Sies H., 1991. Oxidative stress: from basic research to clinic application. *Am J Med*, 91: (Suppl. 3C), 31-38.
219. Silvestre, A., Chartier, C., Sauve, C., Cabaret, J., 2000. Relationship between helminth species, diversity intensity of infection and breeding management in dairy goats. *Vet Parasitol*, 94, 91-105.

220. Smith, N.C., Ovington, K.S., Boray, J.C., 1992. Fasciola hepatica: free radical generation by peritoneal leukocytes in challenged rodents. *Int J Parasitol*, 22(3):281-6.
221. Smith, K.L., Hogan, J.S., Weiss, W.P., 1997. Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. *J Animal Sci* 75, 1659–1665.
222. Spasojević, B., Bogdanović-Pristov, J., Vujisić, Lj, Spasić, M., 2012. The reaction of methionine with hydroxyl radical: reactive intermediates and methanethiol production. *Amino Acids*, 42, 6, 2439-2455.
223. Spasojević, I., 2011. Free radicals and antioxidants at a glance using EPR spectroscopy, *Crit Care Rev Clin Sci*, 48, 114-142.
224. Spasojević, I., 2010. Electron paramagnetic resonance – a powerful tool of medical biochemistry in discovering mechanisms of disease and treatment prospects. *J Med Biochem* 29, 175–188.
225. Spasojević, I., Mojović, M., Stević, Z., Spasić, S., David, J., Arian, M., Spasić, M., 2010. Bioavailability and catalytic properties of copper and iron for Fenton chemistry in human cerebrospinal fluid. *Red Rep*, 15, 1, 29-35.
226. Stadtman, E.R., 2004. Role of oxidant species in aging. *Curr Med Chem*, 11, 1105–1112.
227. Stallings, W.C., Bull, C., Fee, J.A., Lah, M.S., Ludwig, M.L., 1992. Iron and manganese superoxide dismutases: Catalytic inferences from the structures, in *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems*, J.G. Scandalios, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 193-211.
228. Staveley, B.E., Philips, J.P., Hilliker, A.J., 1991. Phenotypic consequence of copper/zinc superoxide dismutase overexpression in *Drosophila melanogaster*, *Genome*, 33, 867-872.
229. Stock, J., Dormandy, T.L., 1971. The autooxidation of human red cell lipid induced hydrogen peroxide. *Br J Haematol*, 20, 95–101.
230. Stöcker W, Zwilling R. Astacin, 1995. *Methods Enzymol*, 248, 305-325.

231. Street, N.E., Mosmann, T.R., 1991. Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB J*, 5, 171-177.
232. Suarez, V.H., Cristel, S.L., Buseti, M.R., 2009. Epidemiology and effects of gastrointestinal nematode infection on milk productions of dairy ewes, *Parasite*, 16, 141-147.
233. Šibalić, S., Cvetković, Lj., 1996. Parazitske bolesti domaćih životinja, Univerzitet u Beogradu, p30.
234. Tainer, J.A., Getzoff, E.D., Richardson, J.S., Richardson, D.C., 1983. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase, *Nature*, 306, 284-287.
235. Taira, N., Ura, S., 1991. Sudden death in calves associated with *Strongyloides papillosus* infection, *Vet Parasitol*, 39, 313-319.
236. Theodoridis Y., J.L. Duncan, J.M. MacLean and C.A. Himonas, 1991. Pathophysiological studies on *Dicrocoelium dendriticum* infection in sheep, *Vet Parasitol*, 39, 1-1 61-66.
237. Theodoropoulos, G., Hicks, S.J., Corfield, A.P., Miller, B.G., Carrington, S.D., 2001. The role of mucins in host-parasite interactions: part II – helminth parasites, *Trends Parasitol*, 17, 130-135.
238. Tizard R.I., 2008. Veterinary Immunology: An Introduction, 8th edition, *Elsevier Health Sciences*.
239. Tsuji, N., Kasuga-Aoki, H., 2001. Cloning and characterisation of a peroxiredoxin from the swine roundworm *Ascaris suum*. *Int J Parasitol*, 30, 125-128.
240. Turk, R., Juretić, D., Gereš, D., Svetina, A., Turk, N., Flegar-Meštrić, Z., 2008. Influence of oxidative stress and metabolic adaptation on PON1 activity and MDA level in transition dairy cows. *Anim Reprod Sci*, 108: 1-2, 98-106.
241. Ujjwal, K., De Dey, S., 2010. Evaluation of organ function and oxidant/antioxidant status in goats with sarcoptic mange. *Trop Animal Health Prod*, 42: 1663-1668.

242. Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem Biolog Interac*, 160, 1-40
243. Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J, Telser, J., 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*, 266, 37-56.
244. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 44-84.
245. Van Dijk, J., Sargison, N.D., Kenyon, F., Skuce, P.J., 2010. Climate change and infectious disease: helminthological challenges to farmed ruminants in temperate regions. *Animal*, 4, 377-392.
246. Voet, D. and Voet, J.G., 1995. *Biochemistry*, 2nd ed., Wiley, New York.
247. Vorbach, C., Harrison, R., & Capecchi, M. R., 2003. Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *Trends Immunol*, 24, 512–517.
248. Wada, K., Sato, H., Kinoh, H., Kajita, M., Yamamoto, H., Seiki, M., 1998. Cloning of three *Caenorhabditis elegans* genes potentially encoding novel matrix metalloproteinases. *Gene*, 211, 57-62.
249. Wakelin, D., 1992. Genetic variation in resistance to parasitic infection: experimental approaches and practical applications. *Vet Parasitol*, 53, 139-147.
250. Weindruch, R., Keenan, K.P., Carney, J.K., Fernandes, G., Feures, R.J., Floyd, R.A., Halter, J.B., Ramsey, J.J., Richardson, A., Roth, G.S., Spindler, S.R., 2001. Caloric restriction mimetics: metabolic interventions. *J Gerontol*, 56 (Special Issue I), 20-33.
251. Weiss, W.P., Hogan, J.S., Smith, K.L., 2004. Changes in vitamin C concentrations in plasma and milk from dairy cows after an intramammary infusion of *Escherichia coli*. *J Dairy Sci*, 87, 32–37.

252. Wink, D.A., Mitchell, J.B., 2003. Nitric oxide and cancer: an introduction. *Free Radic Biol Med*, 34, 8, 951-954.
253. Winterbourn, C.C., 1993. Superoxide as an intracellular radical sink. *Free Radical Biol Med*, 14, 85-90.
254. Wuerges, J., Lee, J.-W., Yim, Y.-I., Yim, H.-S., Kang, S.-O., Carugo, K.D. 2004. Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. *Proc Natl Acad.Sci*, USA 101, 8569-8574.
255. Yacob, H.T., Mistre, C.H., Adem, A.H., Basu, A.K., 2009. Parasitological and clinical responses of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* (L₃) with and without ivermectin treatment, *Vet Parasitol*, 166, 119-123.
256. Yan, L., Leontovich, A., Fei, K., Sarras, M.P., Jr., 2000. Hydra metalloproteinase 1: a secreted astacin metalloproteinase whose apical axis expression is differentially regulated during head regeneration. *Dev Biol*, 219, 115-128.
257. Yan, L.J., Orr, W.C., Sohal, R.S., 1998. Identification of oxidized proteins based on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, immunochemical detection, isoelectric focusing, and microsequencing. *Anal Biochem*, 263, 67-75.
258. Yasumasu, S., Yamada, K., Akasaka, K., Mitsunaga, K., Iuchi, I., Shimada, H., Yamagami, K., 1992. Isolation of cDNAs for LCE and HCE, two constituent proteases of the hatching enzyme of *Oryzias latipes*, and concurrent expression of their mRNAs during development. *Dev Biol*, 153, 250-258.
259. Yim, M.B., Chock, P.B., Stadtma, E.R., 1990. Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci*, 87, 5006-5010.
260. Yoshida, M., Takakuwa, Y., 1997. Method for the simultaneous assay of initial velocities of lactate dehydrogenase isoenzymes following gel electrophoresis. *J. Biochem Biophys, Met.* 34, 167-175.
261. Zajiček, D., 1978. Comparison of the efficiency of two quantitative ovoskopic methods. *Veterinarni Med*, 23, 275-280.

262. Zelko, I.N., Mariani, T.J., Folz, R.J., 2002. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biol Med*, 33: 337-349.
263. Zhang, H., Joseph, J., Felix, C., Kalyanaraman, B., 2000. Bicarbonate enhances the hydroxylation, nitration and peroxidation reactions catalyzed by copper, zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 275, 19, 14038-14045.
264. Zhu, J.H., Zhang, X., Roneker, C., McClung, J.P., Zhang, S., Thannhauser, T.W., Ripoll, D.R., Sun, Q., Lei, X.G., 2008. Role of copper,zinc-superoxide dismutase in catalyzing nitrotyrosine formation in murine liver. *Free Radical Biol Med*, 45, 611-618.

BIOGRAFIJA

Blagoje Dimitrijević je rođen 08.12.1973. godine u Leskovcu, Srbija. Osnovnu školu i Gimnaziju završio je u rodnom mestu. Fakultet veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, upisao je školske 1992/1993 godine i na istom diplomirao sa prosečnom ocenom 9,39. Posle diplomske studije – magistratura, vid Patologija i terapija životinja, na Fakultetu veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, završio je odbranom magistarske teze, pod naslovom „Pokazatelji funkcionalnog stanja jetre i oksidativnog stresa u krvi ovaca pre i posle dehelmintizacije“, 26.04.2010. godine.

Na Katedri za bolesti papkara, Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, zaposlen je od 2005. godine, u zvanju asistenta. Aktivno učestvuje u naučno-istraživačkom radu u okviru projekata koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани: мр Благоје П. Димитријевић

број уписа _____

Изјављујем

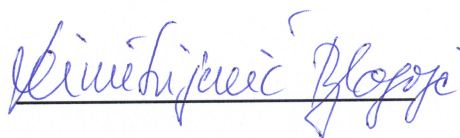
да је докторска дисертација под насловом

„Испитивање могућности коришћења изоензимских облика супероксид дизмутазе 1 као биомаркера интензитета паразитских инфекција код оваца“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 07.03.2013.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Благоје П. Димитријевић

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада: „Испитивање могућности коришћења изоензимских облика супероксид дизмутазе 1 као биомаркера интензитета паразитских инфекција код оваца“

Ментор: др Софија Катић-Радивојевић, редовни професор

Потписани мр Благоје П. Димитријевић

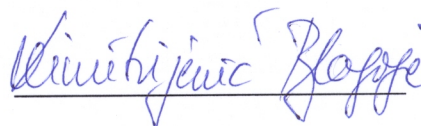
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 07.03.2013.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Испитивање могућности коришћења изоензимских облика супероксид дизмутазе 1 као биомаркера интензитета паразитских инфекција код оваца“,

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

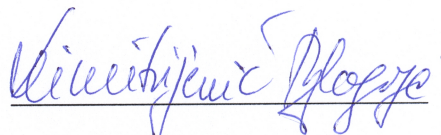
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 07.03.2013.

Потпис докторанда



мр Благоје Димитријевић

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.