



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

УЛОГА АЗОТНОГ МОНОКСИДА (NO) У ЛОКАЛНОЈ
АНАФИЛАКТИЧКОЈ РЕАКЦИЈИ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА МИША

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

мр Весна Миличић

Крагујевац, 2014. година

Мојој породици, с љубављу

Захваљујем се

*Професору Владимиру Јаковљевићу, ментору,
на сарадњи, великој стручној помоћи и залагању*

*Асистенту Владимиру Живковићу,
на несебичној помоћи у свакој фази израде овога рада
и огромној позитивној енергији*

*Доценткињи Биљани Миличић,
на статистичкој обради података и великом разумевању*

*Колегама из Центра за дерматовенерологију КЦ Крагујевац,
на подршци*

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. АНАФИЛАКСА	2
1.1.1. Дефиниција анафилаксе	2
1.1.2. Епидемиологија анафилаксе	3
1.1.3. Етиолошки фактори-агенси који изазивају анафилаксу	3
1.1.4. Патогенеза анафилаксе	4
1.1.5. Клиничка слика, дијагностика и терапија анафилаксе	9
1.1.6. Улога модела анафилаксе у истраживањима	11
1.1.7. Механизми анафилаксе код миша	12
1.2. АЗОТ МОНОКСИД (NO)	15
1.2.1. Синтеза азот монооксида	15
1.2.2. NO и оксидациони стрес	18
1.2.3. Улога NO у анафилакси	19
1.3. СРЧАНА АНАФИЛАКСА	21
1.3.1. Улога хистамина у срчаној анафилакси	21
1.3.2. Улога NO у срчаној анафилакси	22
1.4. УЛОГА ОСТАЛИХ МЕДИЈАТОРА У СРЧАНОЈ АНАФИЛАКСИ	25
1.5. ХИСТАМИНАЗЕ У СРЧАНОЈ АНАФИЛАКСИ	26
2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	28
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	30
3.1. МАТЕРИЈАЛ	31
3.1.1. Комплет реагенаса за детерминацију азот монооксида (NO) у облику нитрита	31
3.1.2. Комплет реагенаса за детерминацију индекса липидне пероксидације (TBARS)	31
3.1.3. Комплет реагенаса за детерминацију супероксидног анјонског радикала (O_2^-)	31
3.1.4. Комплет реагенаса за детерминацију водоник пероксида (H_2O_2)	31
3.1.5. Комплет реагенаса за припремање Krebs-Hensenleit-овог перфузионог раствора	32
3.1.6. Реагенс за активну сензибилизацију	32
3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛ	32
3.3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ	33
3.4. БИОХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ	36

3.4.1.	Одређивање нитрита	36
3.4.2.	Одређивање супероксид анјон радикала (O_2^-)	38
3.4.3.	Одређивања индекса липидне пероксидације (TBARS)	39
3.4.4.	Одређивање водоник пероксида (H_2O_2)	40
3.5.	СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА	42
4.	РЕЗУЛТАТИ	43
4.1.	ХЕМОДИНАМСКИ ПАРАМЕТРИ	44
4.1.1.	ПРЕ СЕНЗИБИЛИЗАЦИЈЕ: iNOS-/- vs. WILD	44
4.1.1.1.	Систолни притисак	44
4.1.1.2.	Дијастолни притисак	46
4.1.1.3.	Срчана фреквенца	48
4.1.1.4.	Средњи перфузиони притисак	49
4.1.1.5.	Коронарни проток	50
4.1.2.	ПОСЛЕ СЕНЗИБИЛИЗАЦИЈЕ: iNOS-/- vs. WILD	52
4.1.2.1.	Систолни притисак	52
4.1.2.2.	Дијастолни притисак	53
4.1.2.3.	Срчана фреквенца	55
4.1.2.4.	Средњи перфузиони притисак	56
4.1.2.5.	Коронарни проток	58
4.1.3.	iNOS-/-: НЕСЕНЗИБИЛИСАНИ vs. СЕНЗИБИЛИСАНИ	59
4.1.3.1.	Систолни притисак	59
4.1.3.2.	Дијастолни притисак	61
4.1.3.3.	Срчана фреквенца	62
4.1.3.4.	Средњи перфузиони притисак	63
4.1.3.5.	Коронарни проток	65
4.1.4.	WILD: НЕСЕНЗИБИЛИСАНИ vs. СЕНЗИБИЛИСАНИ	66
4.1.4.1.	Систолни притисак	66
4.1.4.2.	Дијастолни притисак	68
4.1.4.3.	Срчана фреквенца	69
4.1.4.4.	Средњи перфузиони притисак	70
4.1.4.5.	Коронарни проток	72
4.2.	ОКСИДАЦИОНИ СТАТУС	73
4.2.1.	ПРЕ СЕНЗИБИЛИЗАЦИЈЕ: iNOS-/- vs. WILD	73

4.2.1.1. Индекс липидне пероксидације (TBARS)	73
4.2.1.2. Азот моноксид (NO)	75
4.2.1.3. Супероксид анјон радикал (O_2^-)	76
4.2.1.4. Водоник пероксид (H_2O_2)	78
4.2.2. ПОСЛЕ СЕНЗИБИЛИЗАЦИЈЕ: iNOS-/- vs. WILD	79
4.2.2.1. Индекс липидне пероксидације (TBARS)	79
4.2.2.2. Азот моноксид (NO)	80
4.2.2.3. Супероксид анјон радикал (O_2^-)	82
4.2.2.4. Водоник пероксид (H_2O_2)	83
4.2.3. iNOS-/-: НЕСНЗИБИЛИСАНИ vs. СЕНЗИБИЛИСАНИ	85
4.2.3.1. Индекс липидне пероксидације (TBARS)	85
4.2.3.2. Азот моноксид (NO)	86
4.2.3.3. Супероксид анјон радикал (O_2^-)	88
4.2.3.4. Водоник пероксид (H_2O_2)	89
4.2.4. WILD: НЕСНЗИБИЛИСАНИ vs. СЕНЗИБИЛИСАНИ	90
4.2.4.1. Индекс липидне пероксидације (TBARS)	90
4.2.4.2. Азот моноксид (NO)	92
4.2.4.3. Супероксид анјон радикал (O_2^-)	93
4.2.4.4. Водоник пероксид (H_2O_2)	94
5. ДИСКУСИЈА	96
5.1. ХЕМОДИНАМСКИ ПАРАМЕТРИ У АНАФИЛАКТИЧКОЈ РЕАКЦИЈИ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА МИША	98
5.2. ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС У АНАФИЛАКТИЧКОЈ РЕАКЦИЈИ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА МИША	103
6. ЗАКЉУЧЦИ	107
7. ЛИТЕРАТУРА	110

I

УВОД

1.1. АНАФИЛАКСА

1.1.1. Дефиниција анафилаксе

Анафилакса се често дефинише као озбиљна, генерализована или системска хиперсензитивна реакција која угрожава живот (1). Француски научници Richet и Portier су 1913. год добили Нобелову награду за медицину и физиологију за истраживање у овој области (2, 3). Они су предложили термин анафилакса који су извели из Грчких речи *phylaxis*-заштита и *a*-против, означавајући да имуни систем врши супротну функцију од заштите- профилаксе. Данас, сто година касније још увек не постоји универзално прихваћена дефиниција и клинички критеријуми (4). Ова чињеница рефлектује тежину разумевања овог поремећаја и проблеме при патофизиолошким али и епидемиолошким и клиничким испитивањима.

Профилакса и терапија анафилаксе су мало унапредовале последњих година и базирају се пре свега на избегавању алергена, десензибилизационој терапији и лековима као што су антихистаминици, епинефрин, кортикостероиди и интравенски раствори (4, 5). Насупрот томе значајни напори се улажу са циљем бољег разумевања механизма који су у основи поремећаја и увођења нових терапијских могућности. Већи део тих напора је усмерен ка развоју и анализи модела лабораторијских животиња, нарочито мишева (6). Овакав приступ има огромне предности јер је научни рад у овој области ограничен потенцијално фаталним механизмима за човека. Нарочита предност мишева над другим експерименталним животињама је доступност генетски измењених линија, односно мишева са модификованом активношћу гена.

1.1.2. Епидемиологија анафилаксе

Подаци о инциденци су често непрецизни јер анафилакса не спада у обољења која се пријављују институцијама које прате јавно здравље становништва. Ипак, сматра се да је то релативно чест проблем са преваленцом од 0.05 до 2% (5). Епидемиолошке студије наводе пораст учесталости овог обољења међу особама које живе у добрим социоекономским условима (7). Чак има аутора који, на основу својих истраживања, сматрају да се због повећане учесталости може употребити термин епидемија анафилаксе на сличан начин као што се то наводи за остале алергијске болести као што су астма, алергијски ринитис и атопијски дерматитис (8). Највећи број случајева анафилаксе се дешава међу децом и адолесцентима (5). До узраста од 15 година чешће се јавља међу особама мушког, а касније међу особама женског пола. Различити узрочници преовладавају у различитим добним групама; на пример, смртни исход од храном изазване реакције је најчешћи код адолесцената и младих одраслих особа (9, 10), док код особа средње животне доби и старих смрт најчешће настаје услед уједа инсеката, дијагностичких супстанци и лекова (11).

1.1.3. Етиолошки фактори-агенси који изазивају анафилаксу

Сваки агенс који има могућност да активира мастоците и базофиле може потенцијално изазвати анафилаксу (табела 1). Најчешћи агенси који изазивају анафилактичку реакцију су лекови, храна, уједи инсеката и физички напор (12). Ипак, више ретроспективних студија је показало да је идиопатска анафилакса најчешћа јер обухвата готово једну трећину случајева (13, 14).

Табела 1: Узроци анафилактичких и анафилактоидних реакција

Храна

Банане, цвекла, хељда, чај од камилице, јужно воће, кравље млеко*, беланце*, риба*, киви, сенф, пасуљ, кромпир, пиринач, семенке и орашасте плодови (кикирики, Бразилски орах, бадеми, лешници, пистаћи, пињоле, Индијски орах, сусам, семенке памука, семе сунцокрета, семе проса)*, шкољке*

Отров и пљувачка

Мрави, буве, *Hymenoptera* (пчеле, осе, стршљен, мушице)*, медузе, *Triatoma*, змије звечарке

Антибиотици

Amphotericin B, цефалоспорини, chloramphenicol, ciprofloxacin, nitrofurantoin, пеницилини*, streptomycin, тетрациклини, vancomycin

Aspirin и нестероидни антиинфламаторни лекови*

Разни други медикаменти

Антиалергијски екстракти, антилимфоцитни и антитимоцитни глобулини, антитоксини, carboplatin, corticotropin, dextran, фолна киселина, инсулини, манитол, methotrexate, methylprednisolone, опијати, паратхормон, прогестерон, protamine sulfate, стрептокиназе, succinylcholine, thiopental, trypsin, chymotrypsin, вакцине

Латекс гума*

Радиографски контрасти*

Крвни продукти

Криопреципитати, имуноглобулини, плазма, пуна крв

Семена течност

Физички фактори

Ниске температуре, физички напор (вежба)

Идиопатски*

*-Релативно чести узроци

1.1.4. Патогенеза анафилаксе

Термин хиперсензитивност се користи када се имуни одговор дешава у наглашеном или неадекватном облику, узрокујући понекад инфламаторне реакције и оштећења ткива. У најекстремнијој системској форми ове реакције-анафилакси, медијатори из мастоцита и базофила воде асфиксији, кардиоваскуларном колапсу и смрти.

Поједини аутори термин анафилакса користе искључиво за процесе посредоване имуноглобулином Е (IgE), док термин анафилактоидна реакција користе за IgE-независне реакције (12). Клинички се ове реакције не разликују тако да је и терапијски приступ исти. Узимајући у обзир те чињенице највећи број аутора саветује да се термин анафилактоидна реакција више не користи (7). Ипак, суштински је битно разумети ефекторне механизме укључене у патогенезу

анафилаксе са циљем да се развије оптималан приступ смањењу ризика и превенирају рецидиви.

Један од најмоћнијих механизма имуног система је стимулација ткивних мастоцита (и њиховог циркулишућег пандана – базофила) посредована имуноглобулином Е (IgE), који у већини анафилактичких реакција игра кључну улогу (7).

Синтетисан као одговор на излагање алергену везује се за високоафинитетни рецептор за IgE-FcεRI који се налази на мембрани мастоцита и базофила. При поновном излагању, алерген се везује за IgE на ћелији, премошћавајући два или више IgE молекула и Fc рецептора доводећи до ћелијске активације, ослобађања медијатора и реакције ране преосетљивости (15). Ова реакција се назива рана преосетљивост, јер започиње одмах, пар минута након сусрета са антигеном. Реакција касне фазе се карактерише запаљенским инфилтратом кога чине еозинофили, базофили, неутрофили и лимфоцити а који се формира 2 до 4 сата после дегранулације мастоцита и базофила. Поновљени атаци реакције касне фазе могу узроковати оштећење ткива (15). IgE такође доприноси интензитету анафилаксе и тако што повећава експресију FcεRI на мастоцитима и базофилима (16, 17).

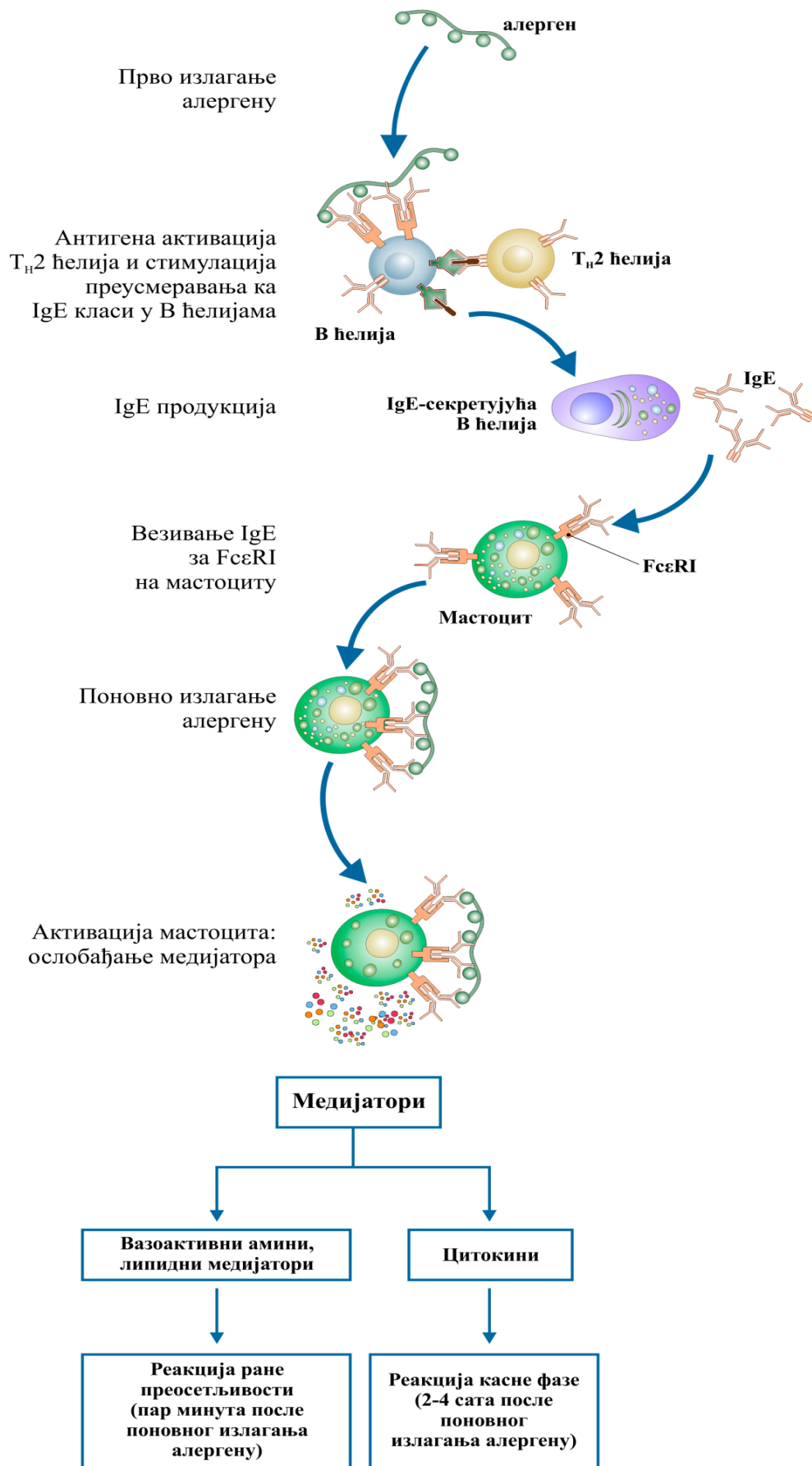
Типични след догађаја у IgE-посредованој раној преосетљивости се састоји из више степеника а започиње иницијалним излагањем антигену (слика 1.). Код осетљиве особе, протеински антиген околине (алерген), стимулише CD4⁺Th0 ћелије да диференцирају у CD4⁺Th2 ефекторске ћелије. Ове ћелије обезбеђују интерлеукин-4 (IL-4) и контактом посредоване сигнале који помажу диференцијацију В ћелија специфичних за тај антиген у IgE-продукујуће ћелије (15). Тај продуковани IgE циркулише и везује се за високо афинитетне Fc рецепторе, специфичне за ε тешки ланац, на мембрани циркулишућих базофила и мастоцита у различитим ткивима. Код наредног сусрета са антигеном он се везује за IgE на ћелији и може да премости два или више IgE молекула и Fc рецептора за које су везани .

Премошћавање Fc рецептора иницира преношење сигнала у мастоцитима и базофилима које резултира ослобађањем преформираних медијатора из цитоплазматских гранула и брзом синтезом и ослобађањем других медијатора (слика 2.). Клиничке и патолошке манифестације ране преосетљивости потичу од

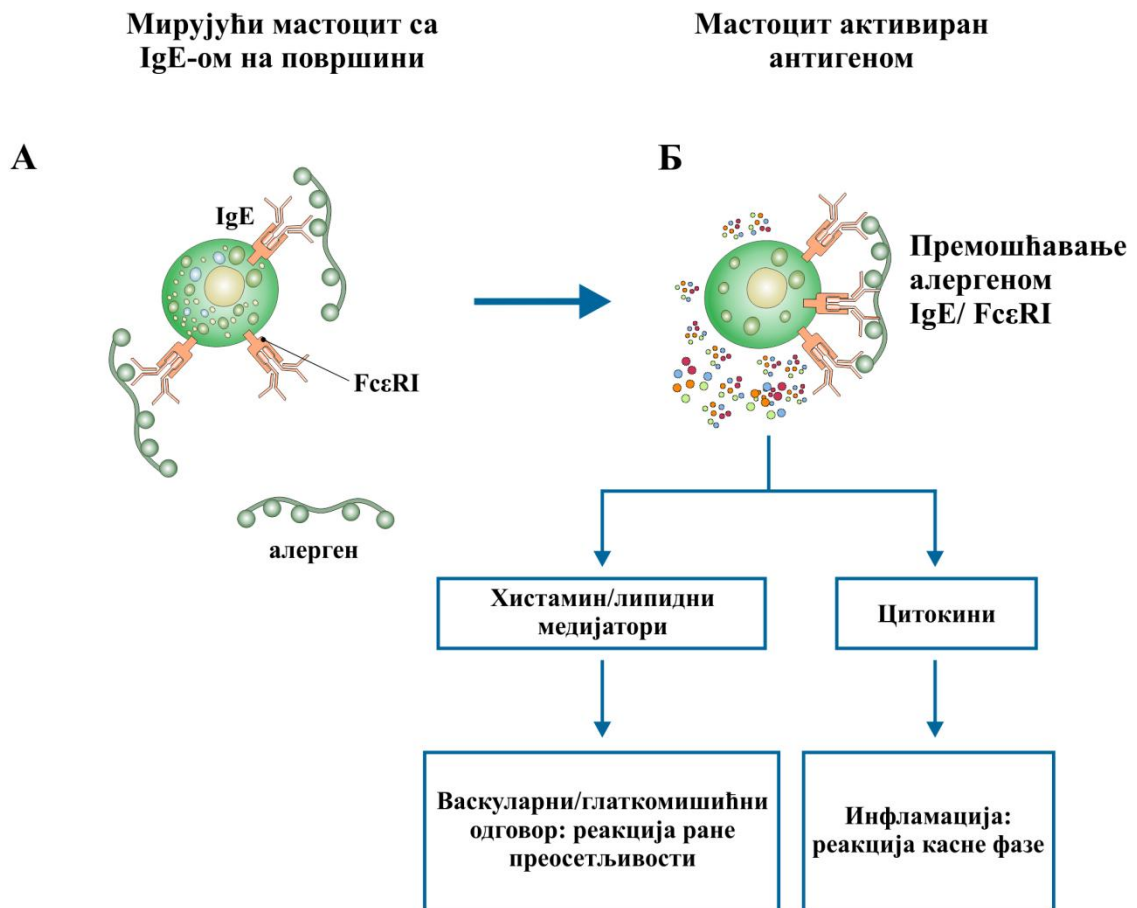
дејстава ослобођених медијатора. Неки од ових медијатора индукују ране васкуларне и глатко-мишићне реакције, а други стимулишу инфлукс леукоцита који резултира реакцијом касне фазе. Алергије се могу сматрати Th2-зависним болестима зато што Th2 ћелије продукују IL-4, неопходан за IgE продукцију, и IL-5, који стимулише еозинофиле. Ова реакција се разликује од касне преосетљивости која се остварује путем CD4⁺Th1, CD8⁺ T ћелија и макрофага, без централне улоге антитела.

Други имунолошки механизми у анафилакси укључују имуне комплексе, имуноглобулине Г и М (IgG, IgM), тромбоците и T ћелије, затим преусмеравање метаболизма еикосаноида ка формирању леукотриена и активацију система комплемента и коагулације (18). Код особа које имају идиопатску анафилаксу, сматра се да долази до премошћавања FcεRI рецептора путем аутоимунних механизма. Неимунолошки фактори, који активирају мастоците путем још увек недовољно разјашњених механизма укључују физички напор, излагање хладном ваздуху води, радијацији, етанолу, уједу инсеката, радио контрастима и лековима као што су опоиди и ванкомицин. Поједини окидачи (радио контрасти, отров инсеката и поједини лекови) могу да делују и путем два механизма (18).

Без обзира на имунолошке или неимунолошке механизме, и да ли су активирани FcεRI или други рецептори као Г протеин-парни рецептори (GPCRs) или Toll-like рецептори, мастоцити и базофили играју битну улогу у започињању и појачавању акутне алергијске реакције (16-19). Дегранулација мастоцита и базофила резултира наглим ослобађањем биохемијских медијатора и хемотактичких супстанци путем којих се остварују ефекторне функције (слика 3.). Долази до ослобађања медијатора инфламације, укључујући хистамин, протеазе као што је триптаза, мастоцитна карбоксипептидаза А3 и химаза, липида као што је фактор активације тромбоцита (PAF од енгл. platelet activating factor), простагландини и леукотриени као и хемокина и цитокина (7, 12).



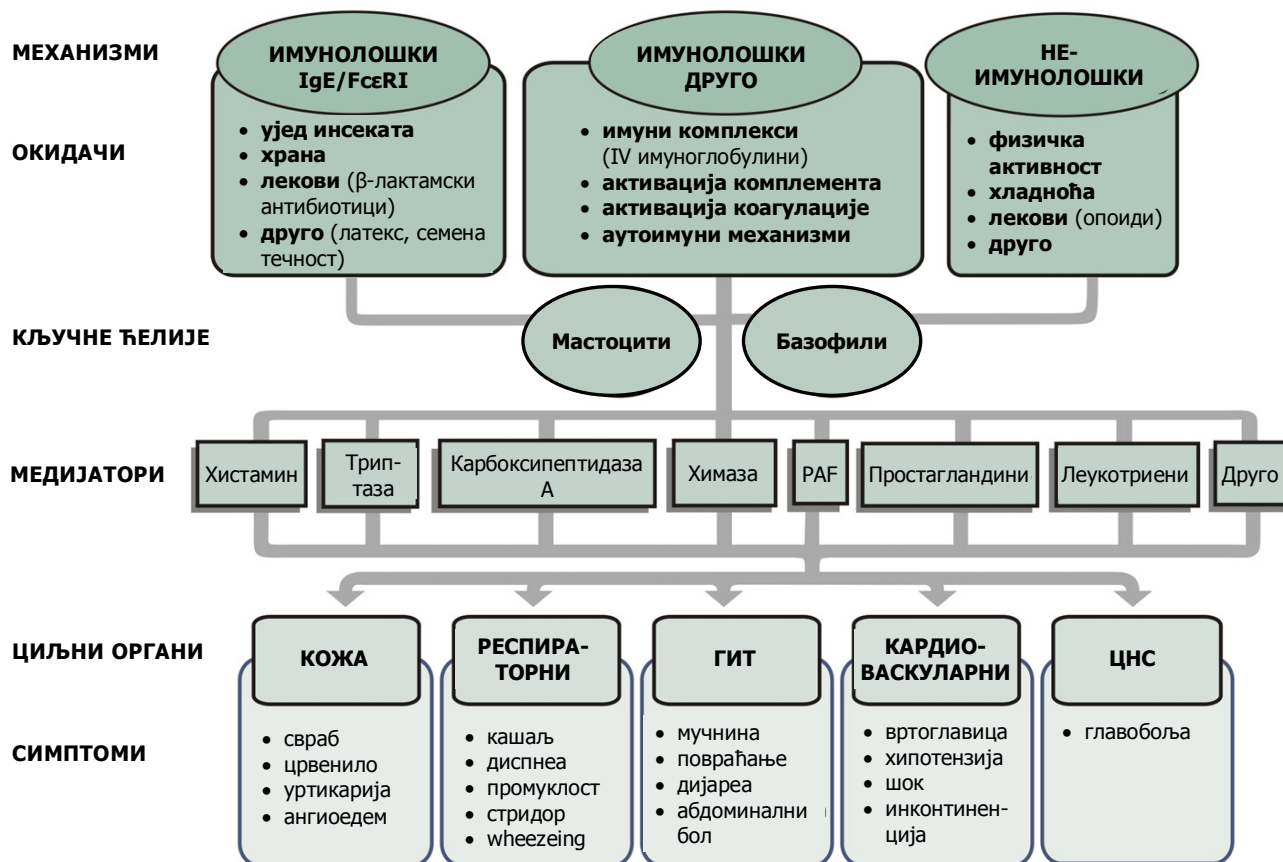
Слика 1. Индукција реакције ране преосетљивости



Слика 2. Активација мастоцита

Током тешких анафилактичких напада долази и до активације комплемента, укључења фактора коагулације и каликреин-кинин система (20). Подаци који говоре овоме у прилог су добијени из експеримената везаних за анафилаксу развијену након уједа инсеката (21). Утврђено је смањење компоненти комплемента С4 и С3 и продукција С3а. Доказ да током тешких анафилакси долази до укључења фактора коагулације је то што долази до снижавања нивоа фактора V, VIII и фибриногена и у појединим случајевима до развитка фаталне дисеминоване интраваскуларне коагулације (10, 22). Смањење високомолекуларног кининогена и формирање каликреин-С1 инхибитора и инхибитора фактора XIIa-С1 говори у прилог активације каликреин-кинин система (21, 22).

ПАТОГЕНЕЗА АНАФИЛАКСЕ



Слика 3. Патогенеза анафилаксе

1.1.5. Клиничка слика, дијагностика и терапија анафилаксе

Ослобођени медијатори делују на многе органе доводећи до системске алергијске реакције (повећавају васкуларни пермеабилитет, изазивају вазодилатацију, бронхијалну и висцералну глатко-мишићну контракцију као и локалну инфламацију) (15). Клиничку слику анафилаксе чини више различитих симптома и знакова обзиром да се ради о поремећају који захвата више органа (23). Код људи доминантни органи захваћени током анафилактичке реакције су плућа и срце (12, 20). Ипак, најчешће се јављају свраб, црвенило, уртикарија, ангиоедем, повраћање, ретке столице, болови у стомаку, тешкоће са дисањем, хипотензија, губитак свести и шок (24). Ређе се јављају главобоља, бол у грудима и неуролошки испади. Најчешћи су симптоми и знаци који се испољавају на кожи

а јављају се у више од 80% случајева. Мање од 20% случајева нема промене на кожи, што се нарочито односи на децу која реагују на ујед инсекта и на алергене из хране (25, 26). Клиничка слика се најчешће развија у оквиру првих 30 мин након излагања алергену, али понекад је потребно и више сати (12, 20). Респираторни и кардиоваскуларни колапс су одговорни за највећи број смртних исхода (12, 26).

Табела 2: Клиничке манифестације анафилаксе

Кутане	Urticaria, angioedema, свраб, црвенило морбилиформни осип
Респираторне	Горњи респираторни путеви-ринореа, конгестија, кијање, стридор, промуклост Доњи респираторни путеви-кашаљ, wheezeing, диспнеа, стезање у грудима, цијаноза
Кардиоваскуларне	Тахикардија, аритмија, синкопа, хипотензија, шок
Гастроинтестиналне	Свраб или оток усана/језика/непца, метални укус у устима, мучнина, повраћање, абдоминални грчеви, дијареа
Неуролошке	Анксиозност, главобоља, клоничко-тонички грчеви, синкопа, губитак свести
Офталмолошке	Свраб, црвенило коњуктива, лакримација

Постављање дијагнозе анафилаксе се примарно базира на детаљно узетим подацима о околностима које су довеле до напада, укључујући информације о свим излагањима потенцијалним алергенима и дешавањима која су претходила почетку симптома, као што су физичка активност, узимање лекова, примена контрастних средстава, конзумирање алкохола, опојних средстава, присуство акутних инфекција, емоционални стрес, путовања, предменструални статус код жена. Кључни моменат у дијагностици је препознавање типичног обрасца: нагло јављање карактеристичних симптома и знакова након пар минута до пар сати после излагања познатом или потенцијалном окидачу реакције, и њихова брза прогресија током времена (1, 7). Дијагностика је отежана код пацијената са оштећењем вида, слуха, неуролошким и психијатријским поремећајима, као и оних који болују од астме, хроничног обструктивног бронхитиса, слабости срца и других обољења чији знаци и симптоми могу да личе на оне код анафилаксе. Најчешће је у диференцијалној дијагнози потребно размотрити акутну астму, синкопу и напад панике, где нам промене на кожи помажу јер су честе код анафилаксе а код наведених обољења се ретко јављају (1, 4).

Од лабораторијске дијагностике спроводи се одређивање серумског нивоа триптазе и хистамина, при чему ове анализе нису широко доступне и нису специфичне за анафилаксу. Повишен ниво триптазе је присутан код анафилаксе изазване уједом инсеката и парентералном применом лекова, док је код анафилаксе изазване храном ниво често у границама референтних вредности (18). Триптаза може бити повишена код акутног инфаркта миокарда, траума, синдрома напрасне смрти новорођенчета, док хистамин може бити повишен код тровања рибом. Нормалне вредности триптазе и хистамина не искључују клиничку дијагнозу анафилаксе (1, 18). Понекад је неопходно искључити карциноид синдром, парадоксални одговор на феохромоцитом и друге ретке ентитете у диференцијалној дијагнози те је неопходно спровести и додатну дијагностику .

Дијагноза идиопатске анафилаксе се поставља када није утврђен окидач и поред детаљне анамнезе, кутаних алергијских тестова, мерења серумског IgE на потенцијалне алергене, као и спроведених провокационих тестова. Дијагноза идиопатске анафилаксе омогућава потенцијално откривање непознатих тј. препознатих алергена али и откривања мастоцитозе код пацијената.

Анафилакса спада у ургентна стања у медицини тако да је брза процена и адекватно реаговање од суштинског значаја. Неопходно је прекинути излагање алергену, дати епинефрин интрамускуларно, поставити пацијента у адекватан положај, омогућити интравенски приступ ради надокнаде течности, евентуално применити оксигенотерапију и вештачко дисање. Од лекова из друге линије користе се кортикостероиди, антихистаминици и β -2 адренергички агонисти (1).

1.1.6. Улога модела анафилаксе у истраживањима

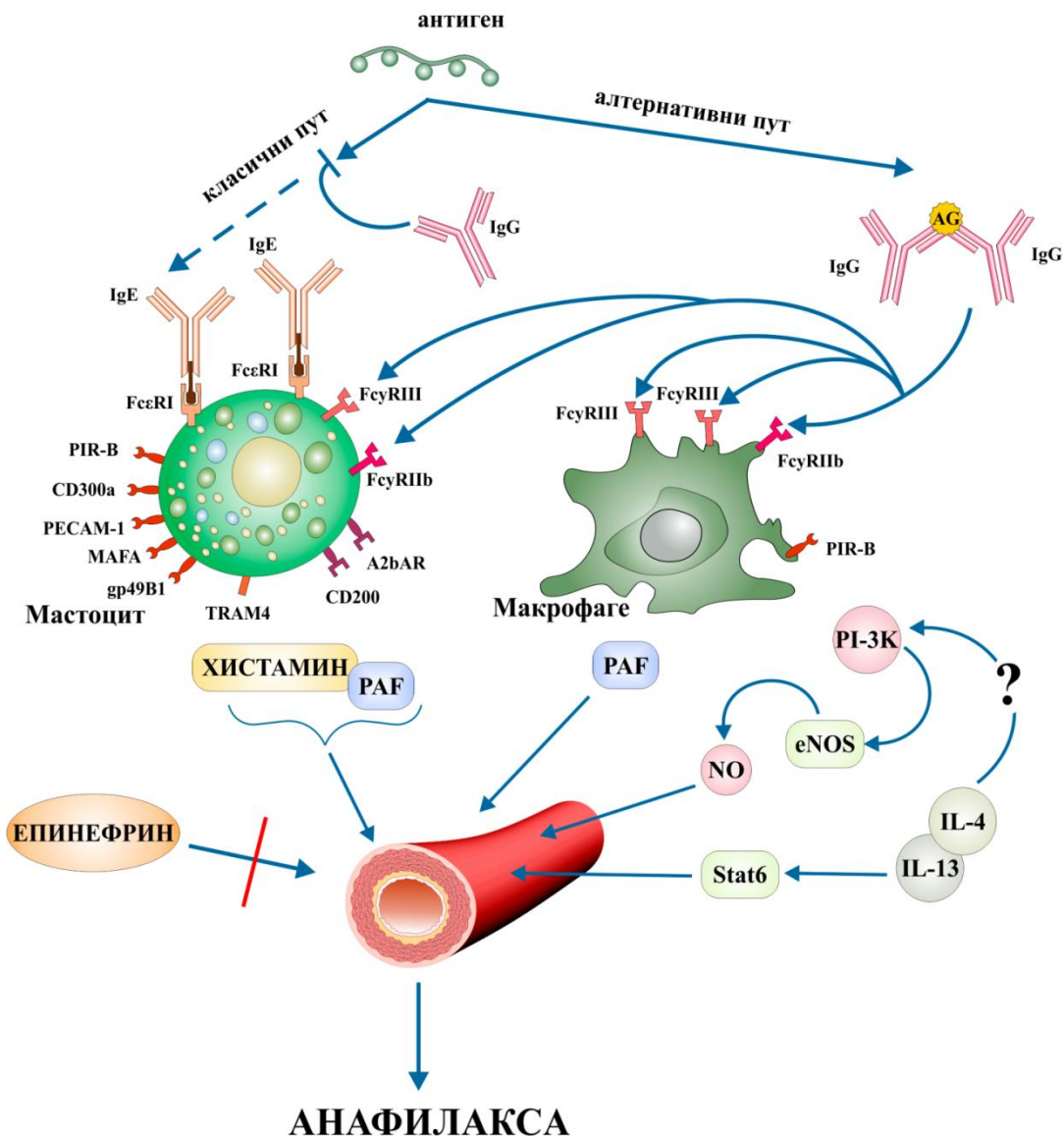
Обзиром да анафилакса укључује бројне имунопатолошке механизме и комплексне интеракције добро дефинисани животињски модели помажу у њиховом разумевању а све са циљем да се омогући добра дијагностика и терапија овог поремећаја. Коришћење животињских модела у истраживањима је у порасту а нарочито су погодни мишеви у испитивању системске анафилаксе јер је одавно показано да постоји велика сличност између људског и мишијег имуног система (27, 28).

Анафилактичка реакција која се одвија локално у срцу као циљном органу може се *ex vivo* проучавати коришћењем срца сензибилисаних експерименталних животиња тако што се анафилактичка реакција индукује администрацијом специфичног антигена. Током година развијено је више модела изолованог срца експерименталних животиња, који чине поуздано оруђе у ширењу знања о патофизиологији и фармакологији овог феномена (29-33).

Knock out мишеви представљају моћан алат у истраживању функције гена и њихових продуката. То су у лабораторији посебним поступцима произведени сојеви код којих је одређени ген замењен или модификован неактивним или мутираним алелом (34). Миш дефицијентан у *iNOS* (*iNOS*^{-/-}) омогућава проучавање ефекторних улога NO у имунопатологији, патологији тумора, борбу против микроорганизама али нам пружа и одличну могућност за боље разумевање анафилаксе.

1.1.7. Механизми анафилаксе код миша

Централно место у свим истраживањима анафилаксе код мишева заузима чињеница да се системска анафилактичка реакција код мишева (брза потенцијално реверзибилна хипотензија, хипотермија, смањена покретљивост и чешање) може одиграти путем два независна механизма (35). Прва IgE-зависна реакција је интерлеукин 4 (IL-4) и IL-4 рецептор зависна; одиграва се након алергеном изазваног премошћавања високоафинитетног FcεRI рецептора презентованог на мастоцитима и базофилима. Ослобађање медијатора и цитокина изазива повећање васкуларног пермеабилитета и контракцију глатких мишића са сликом анафилаксе (6, 35-37). Други механизам је IgE-независан, индукује се посредством IgG антитела, активацијом ниско афинитетног IgG рецептора-FcγRIII и макрофага или базофила (38-40). Анафилакса остварена овим другим алтернативним механизмом захтева пропорционално више антигена и антитела него први класични механизам (6). У оба механизма се ослобађа PAF, али се само у IgE-зависној реакцији реакцији ослобађа хистамин (6, 36).



Слика 4: Класични и алтернативни пут у анафилакси миша

Антиген изазива анафилаксу код миша путем (а) премошћавањем IgE везаног за мастоцит путем FcεRI рецептора, што стимулише ослобађање хистамина и мањих количина PAF (IgE зависан или „класичан“ пут) или (б) везивањем у великој количини за IgG формирајући IgG-антиген имуне комплексе који премошћавају FcγRIII рецепторе, што стимулише ослобађање PAF али не хистамина (IgG зависни или „алтернативни“ пут). Интеракције са базофилима нису описане. Хистамин и PAF изазивају глаткомишићну контракцију и појачавају васкуларни пермеабилитет. IgG омогућава негативну повратну спрегу у оквиру „класичног“ пута. IL-4, IL-13 и NO погоршавају стање анафилаксе појачавајући целуларни одговор на проинфламаторне медијаторе. Епинефрин релаксира глатке мишиће и смањује васкуларни пермеабилитет.

Табела 3: Сличности и разлике између човечијег и имуног система миша од значаја за анафилаксу

Карактеристике	Миш	Човек
Присуство IgE	+	+
Присуство FcεRI на мастоцитима и базофилима	+	+
Присуство FcεRI на макрофагима и Langerhans-овим ћелијама	-	+
Присуство FcγRIIb на мастоцитима	+	+
Присуство FcγRIII на макрофагима	+	+
Присуство FcγRIIA, FcγRIIIA и FcγRIIIC	-	+
Продукција хистамина у мастоцитима	+	+
Продукција PAF у макрофагима	+	+
Активација мастоцита путем IgG	+ (слаба)	-
Везивање IgE за FcγRIIb и FcγRIII	+	+

IgG-зависна анафилакса још увек није доказана код људи, али је показано да хумани макрофаги имају FcγRIII рецепторе и да су способни да приликом активације ослобађају PAF (6) који може активирати мастоците (41). Код људи су описани случајеви анафилактичке реакције без мерљивог алерген-специфичног IgE антитела у серуму и без доказа за дегранулацију мастоцита (пораст нивоа серумске триптазе) што би могло да одговара IgG-зависном механизму (6).

Табела 4: Кључне чињенице везане за анафилаксу код мишева

- Анафилакса се код миша одиграва кроз два независна пута. Један укључује IgE, FcεRI, мастоците, PAF и хистамин и други који укључује IgG, FcγRIII, макрофаге и PAF.
- Значајно мање антигена и антитела је потребно за окидање IgE-зависне анафилаксе него за IgG-зависну.
- Већина анафилактичких реакција код људи је IgE-зависна и захтева мале количине алергена, али има доказа да може бити посредована путем IgG ако је индукована већом количином алергена.
- Анафилакса се појачава ендогено продукованим интерлеукином 4 и 13 (IL-4, IL-13), и азот моноксидом (NO) а инхибира ендогено продукованим β-адренергичким агонистима. Ови агенси делују на активацију мастоцита и макрофага.
- Имуни систем мишева и људи је довољно сличан да се чињенице везане за анафилаксу код мишева могу применити и код људи.

1.2. АЗОТ МОНОКСИД (NO)

Значај истраживања на пољу улоге NO је препозната 1998.год када су R. Furchgott, L. Ignarro и F. Murad добили Нобелову награду за научни рад који је довео до открића NO као биолошког медијатора продукованог у ћелијама сисара. Од тада је објављен велики број радова али се и даље NO као предмету актуелних истраживања у медицини и биохемији приписују контраверзне улоге. Добро познавање физичко-хемијских особина нам омогућава боље разумевање како NO може бити регулаторан, токсичан и протективан у биолошким системима.

1.2.1. Синтеза азот монооксида

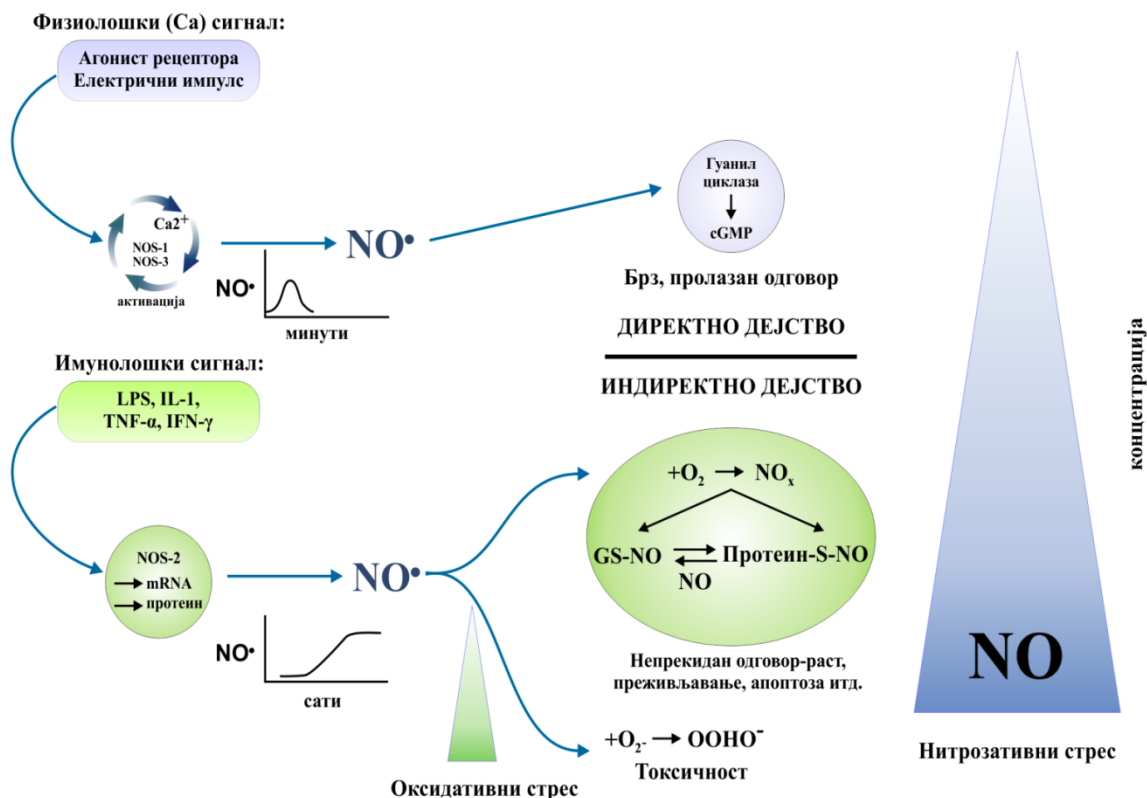
У живим системима NO се синтетише из L-аргинина уз молекуларни кисеоник и редуковану форму никотинамид динуклеотид фосфата (NADPH) као косупстрате. Ову реакцију катализује фамилија ензима NO синтетаза (NOSs) које конвертују L-аргинин у NO и L-цитрулин преко међупроизвода N-hydroxi-L-arginina (42). Идентификована су три члана NOSs фамилије коју чине велики и комплексни полипептидни хомодимери: неурална (nNOS-NOS1), ендотелна (eNOS-NOS3) и индуцибилна (iNOS-NOS2). Неурална и ендотелна NOS се конституционално експримирају, док се индуцибилна NOS експримира само током ћелијске активације. Индуцибилна NOS-NOS2, прво описана у макрофагима миша (43), је главни ензим за синтезу NO у имунолошким реакцијама и при инфламацији (44, 45). За разлику од друге две синтетазе, није присутна у мирујућој ћелији већ се експримира након ћелијске активације. NOS2 ген, који је под контролом транскрипционог фактора NFκB, се индукује посредством бактеријских полисахарида или класичних проинфламаторних цитокина као што су интерлеукин 1 (IL-1), тумор некрозис фактор (TNF) и интерферон-γ (IFNγ) који често синергијски делују (слика 5.). Експресију iNOS инхибирају анти инфламаторни цитокини интерлеукин 4 и 13 (IL-4, IL-13) и глукокортикоиди (46). За разлику од nNOS и eNOS које продукују мале количине NO, iNOS се регулише на транскрипционом нивоу, тако да једном индукована продукује велике количине NO.

Азот моноксид (NO) игра разне улоге у организму човека: он је медијатор вазодилатације, агрегације тромбоцита, неуротрансмисије, регулише функционисање, преживљавање и смрт различитих типова ћелија укључујући и оне које су део инфламације и имуности (47). NO се ствара током имуног и инфламаторног одговора; као токсичан делује на микроорганизме чиме учествује у неспецифичној имуности али учествује и у специфичној тако што индукује или регулише смрт и функционисање имуних ћелија. Може индуковати токсичне реакције против других ткива у организму, а обзиром да се повећано синтетише у инфламаторним обољењима, на пример у астми, сматра се и проинфламаторним чиниоцем. Такође, може функционисати и као анти-инфламаторни или имуносупресивни чинилац путем инхибиторног или апоптотичног ефекта на ћелије (47).

Разне биолошке функције су последица физичких и хемијских особина; NO је мали (30 Da) ненаелектрисани молекул који поседује неупарени електрон што га чини слободним радикалом. Због своје величине и одсуства наелектрисања неометано дифундује у и из ћелије и у оквиру различитих делова ћелије. Његова солубилност и особина да лако дифундује подсећа на кисеоник; као и кисеоник NO је гас под атмосферским условима али је у биолошким системима растворен. Као слободни радикал релативно је стабилан-не реагује са самим собом и има физиолошки полуживот од неколико секунди до неколико минута у зависности од концентрације и физико-хемијског окружења (48, 49).

NO учествује у најмање три основна метаболичка пута. Реагује у циркулацији са хемом хемоглобина, при чему настају нитрати и метхемоглобин. У оксидо-редукционим реакцијама оксидује се у нитрозијум катјон (NO^+) или се редукује у нитрозил анјон (NO^-), што за последицу има стварање више реактивних азотових врста (*Reactive nitrogen oxide species RNOS*). Такође активира ензим гуанил-циклазу (sGC) везивањем за хем компоненту њеног активног центра и директно подстиче настајање цикличног гуанозин монофосфата (cGMP), једног од најважнијих медијатора ћелијске сигнализације. Као одговор на физиолошку стимулацију, NO се брзо ствара у ниским (пикомоларним) концентрацијама; изазива брз и пролазни одговор у таргет ћелијама као што су глатко-мишићне ћелије, неурони и тромбоцити (50). У овим системима делује директно на гуанил циклазу да индукује секундарни месенџер циклични гуаносин монофосфат

(cGMP). Ово узајамно дејство између NO и sGC је заслужно за многе биолошке функције NO, пре свега релаксацију глатких мишића и вазодилатацију, регулацију агрегације тромбоцита, неуротрансмисију итд.



Слика 5: Синтеза азот монооксида (NO)

Азот моноксид (NO) се ствара или путем дејства конститутивно експримираних ензима NOS-1 и NOS-3 или индукованим ензимом NOS-2. NOS-1 и NOS-3 се активирају као одговор на физиолошке стимулусе који окидају интрацелуларни Ca²⁺ сигнал; продукују NO брзо и пролазно у ниском нивоу. NOS-2 није експримирана у мирујућој ћелији већ је индукована путем имунолошких стимулуса попут бактеријских полисахарида (LPS) или цитокина (IL-1, TNF-α или IFN-γ). Након кратког периода који одговара синтези mRNA и протеина, NOS-2 продукује континуирано NO у високим вредностима. Дејство NO је директно при ниским концентрацијама а директно при високим. Низак ниво NO продукован путем NOS-1 и NOS-3 интерагује директно са атомом гвожђа у хем групи гуанил циклазе активирајући тај ензим да продукује cGMP, који тада изазива брз, пролазан ћелијски одговор. Високе концентрације NO продуковане путем NOS-2 су нестабилне и брзо се оксидирају под аеробним условима у реактивне азотове врсте (RNOS) са општом формулом NO_x. RNOS нитрозирају тиолну групу у глутатиону продукујући S-нитрозоглутатион (GS-NO) или тиолне групе у протеинима формирајући протеин-S-NO. Оваква нитрозација инхибира активност многих протеина, укључујући митохондријалне ензиме и транскрипционе факторе и тако омогућава дуготрајне ћелијске ефекте. У стањима високих концентрација NO комбинованих са високим оксидационим стресом, супероксид (O₂⁻) интерагује са NO продукујући високо токсични пероксинитритни анјон (OONO⁻).

Насупрот, у имуном и инфламаторном одговору, цитокини и/или бактеријски липополисахариди индукују експресију индуцибилне форме синтетазе (iNOS-NOS 2) доводећи до релативно споре, непрекидне продукције NO у великој количини (47). У овом случају дејство NO је индиректно, путем реактивних азотових врста (RNOS), која се стварају у присуству молекуларног кисеоника. Ова једињења су нестабилна и брзо реагују са целуларним тиолима, укључујући протеине, цистеин и глутатион који представљају кључне таргете у ћелијској регулацији (48-50), или се хидролизирају и излучују у форми нитрита (49). S-нитрозотиоли представљају спороотпуштајуће депое NO, чиме значајно продужавају његов биолошки полуживот. У ћелијама и ткивима се успоставља компликован еквилибријум у коме се NO ослобађа и поново спаја са тиолима, уз истовремено ослобађање NO или RNOS. Овај процес „маневрисања“ NO са једног тиола на други, познат као транснитрозација је важан у транспорту, на пример из цитоплазме до једра (51). У условима комбинованом нитрозативног и оксидационог стреса, када су и NO и супероксид анјон (O_2^-) продуковани у високим концентрацијама, ова два радикала интерагују и стварају токсични и високореактивни пероксинитритни анјон ($ONOO^-$), за који се сматра да спроводи већину токсичних ефеката NO (48, 49). Индукција и регулација NO синтезе је представљена на слици 5. У биолошким системима N_2O_3 је главни оксидативни продукт NO, и са осталим RNOS се хидролизира и излучује у форми нитрита (NO_2^-) и нитрата (NO_3^-) (49).

1.2.2. NO и оксидациони стрес

Из претходно наведеног следи да је у метаболизму NO јако битна интеракција са реактивним врстама кисеоника ROS (*Reactive oxygen species ROS*). У аеробној ћелији је претежно редукована средина која погодује одвијању нормалног ћелијског метаболизма. Баланс редокс потенцијала у живој ћелији представља императив одржавања здравог фенотипа, као и самог преживљавања ћелије. У ћелијама аеробних организама током нормалног метаболизма, највећи део кисеоника се потпуно редукује до воде у респирационом ланцу или као супстрат у ензимским реакцијама (52). Од преосталих 2-5% молекулског кисеоника настају делимично редуковани облици од којих су неки веома

реактивни. Најбитнији су супероксидни анјон (O_2^-), водоник пероксид (H_2O_2) и хидроксилни радикал (OH^\cdot), а ћелије их генеришу како као део нормалног аеробног метаболизма у физиолошким стањима тако и у патолошким стањима. У физиолошким условима продукција ROS је у равнотежи са ефикасним системом антиоксиданаса. Примери ензиматских антиоксиданаса су супероксид дисмутаза, глутатион пероксидаза и каталаза, док су међу неензиматским антиоксидансима, витамини Е и С, β -каротен и глутатион. У патолошким стањима, када постоји превага прооксиданата над антиоксидансима долази до повећане продукције ROS. Ова високореактивна једињења реагују са биомолекулима (директно оштећују липидну мембрану процесом липидне пероксидације, делују на цитоплазматске протеине и једарну DNA) изазивајући њихова оштећења што је познато као оксидациони стрес. Читав низ механизма у ћелији је укључен да спречи или умањи штетне последице оксидационог стреса (53, 54). Оксидациони стрес може озбиљно да наруши ћелијску хомеостазу и утиче на ћелијску пролиферацију и диференцијацију. Такође као што је претходно наведено, могућа је и интеракција са NO^\cdot и стварање токсичног, високореактивног пероксинитритног анјона.

1.2.3. Улога NO у анафилакси

Многи радови су се бавили улогом NO у анафилакси. Сматра се да је повећана продукција NO разлог протраховане хипотензије код септичног и анафилактичког шока (55-57). То је поткрепљено резултатима истраживања у којима је утврђена повишена концентрација NO код људи и експерименталних животиња током анафилаксе (57-62). Ипак, извор NO није још увек прецизно одређен и у литератури се срећу контрадикторни и неочекивани резултати добијени када су истраживачи покушали да инхибирају његову продукцију у анафилакси (62-68). Такође, обзиром да цитокини могу да активирају експресију iNOS, што води великој продукцији NO и следственом шоку у инфламаторним болестима, као што је септични шок, многи аутори су сматрали се да је iNOS у основи анафилактичког шока (56,69).

Насупрот овоме, Cauwels и сарадници су презентovali истраживање које сугерише да је eNOS кључни медијатор анафилактичког шока код миша (70). У својој студији користили су два модела анафилаксе. У првом моделу су

интравенским ињекцијама PAF изазивали анафилаксу што знатно мање одговара ономе што се збива код људи. У другом моделу који знатно ближе одсликава анафилаксу код људи мишеви прво бивају сензибилисани овалбумином а затим се њиме изазива реакција. Ова студија доноси закључак да PAF индуковани шок у потпуности зависи од NO продукованог путем eNOS. Ови резултати су неочекивани јер сугеришу примарну улогу eNOS а NO продукован дејством ове синтетазе сматрају главним вазодилататорним чиниоцем. Ово саопштење је у својим радовима коментарисало више истраживача и сви се слажу у једном: да је то нов, неочекиван концепт који захтева даљи рад и евентуалну потврду (71). Свакако да ово саопштење сугерише да је улога NOS у анафилакси комплекснија него што се то раније мислило.

Gupta, испитујући са својим сарадницима ниво NO код пацијената са акутним алергијским реакцијама, показао да није било корелације између NO и било ког другог параметра (72). Ниво NO такође није био у корелацији са клиничким манифестацијама: присуством и обимом уртикарије или еритема, присуством wheezing-а, хипотензијом и тахикардијом. За разлику од хистамина, ниво NO није био у корелацији са кардиналним знацима анафилаксе, али је био у корелацији са брзином респирације код пацијената са акутним алергијским реакцијама. С друге стране, изразита iNOS имунореактивност је утврђена у епителу дисајних путева пацова сензибилисаног овалбумином, током анафилаксе изазване овалбуминим (73).

Sade и сарадници су на моделу анафилаксе код миша показали повећану експресију iNOS mRNA у плућима и срцу у кратком временском интервалу након излагања алергену (74). Ово повећање је било праћено ослобађањем хистамина и клиничким манифестацијама анафилактичке реакције. Насупрот овоме експресија eNOS се није мењала током експеримента. Закључак ове групе аутора је да се iNOS брзо индукује током анафилактичке реакције и да продукује велике количине NO. Такође они наводе неопходност даљих истраживања са циљем селективне инхибиције iNOS у циљу превенције анафилактичке вазодилатације без инхибиције протективног ефекта eNOS.

1.3. СРЧАНА АНАФИЛАКСА

Када страни, потенцијално штетан фактор продре у организам, долази до брзог одговора са циљем да се уклони патогени чинилац и ограничи оштећење. У физиолошким стањима, имуни систем је способан да у потпуности одстрани штетне стимулусе са врло мало или без знака инфламације. Међутим, при анафилактичкој реакцији дисбаланс сложених механизма који контролошу инфламаторни и имуни одговор могу довести до озбиљних последица које угрожавају здравље па чак и живот.

Срчана анафилакса која настаје услед системске дисеминације алергена чине функционалне и биохемијске промене на срцу које настају пре свега услед ослобађања проинфламаторних и вазоактивних супстанци из срчаних мастоцита (75-77). Карактерише је убрзање срчаног ритма и снаге контракције (хронотропни и инотропни ефекат) и тахиаритмије убрзо након излагања специфичном алергену-што су хистамин зависни ефекти (78), затим следе кардиодепресивни ефекти и коронарни спазам, вероватно настали услед дејства хемокина и еикосаноида (76, 77).

1.3.1. Улога хистамина у срчаној анафилакси

У срчаној анафилакси кључну улогу игра хистамин. Срчани мастоцити, углавном локализовани око коронарних крвних судова, са највећом концентрацијом у десној преткомори, у близини синоатријалног чвора представљају главни извор хистамина у срцу (75). Круцијална улога биогених амина у раној фази срчане анафилаксе јасно се сагледава у фармаколошким испитивањима у којима антагонисти другог типа хистаминских рецептора (H_2 рецептора), као што је буримаид, као и инхибитори дегранулације мастоцита, попут димаприта и импромидина, знатно слабе овај феномен (76, 78). У изолованом срцу сензибилисаног заморчића, алергеном индуковано ослобађање хистамина појачава норепинефрин, типични адренергички α_1 агонист, док га потрошња катехоламина смањује (75). Сам хистамин, аутокрино, путем H_2 рецептора, делујући негативном повратном спрегом на сопствено ослобађање из мастоцита, може да ослаби срчану анафилаксу. Агонисти H_2 рецептора (хистамин,

стабилни аналог 4-метил-хистамин, димаприт, импромидин) дозно-зависно смањују ослобађање ендогеног хистамина, позитивни хронотропни и инотропни ефекат као и тежину аритмија, изазваних излагањем сензибилисаних срца специфичном антигену. Супротно се дешава када се користи циметидин, блокатор H_2 рецептора (79). Штавише, хистамински H_3 рецептори, утврђени на пресинаптичким завршецима симпатичких нерава у срцу инхибирају ендогено ослобађање норепинефрина из симпатичких влакана (80). Следи да активација H_3 рецептора хистамином може представљати други, индиректни механизам којим се путем негативне повратне спреге смањује алергијско ослобађање хистамина, нисходном регулацијом активације мастоцита.

1.3.2. Улога NO у срчаној анафилакси

Све три NOS изоформе су експримиране у миокарду (81). eNOS је преобладајуће експримирана изоформа, али ниска, базална вредност експресије pNOS и iNOS се може детектовати у интактном вентрикуларном ткиву. eNOS је експримирана у ендотелним ћелијама, ендокардним, глаткомишићним ћелијама и кардиомиоцитима (81, 82). pNOS је локализована у нервима, ганглионима и спроводном ткиву, али није изолована у кардиомиоцитима (82, 83). У обољењима и стањима која су у вези са хипоксијом, инфекцијом, инфламацијом или активацијом цитокина, долази до повећане експресије iNOS у срцу (81, 84). Активност iNOS је детектована у различитим ћелијским типовима, укључујући ендотелне, ћелије ендокарда, макрофагима, васкуларним глаткомишићним ћелијама и кардиомиоцитима (82, 85).

Ефекти NO на миокард су дозно зависни (84, 86). Ниске, физиолошке количине имају благотворно дејство на срчану функцију, док висок пораст нивоа NO има супротне ефекте. Базалне, ендогене концентрације имају позитивно хронотропно и инотропно дејство; побољшавају механичку ефикасност леве коморе уз одговарајућу потрошњу кисеоника (87). Ови ефекти се смањују и чак постају контра-продуктивни са повећањем концентрације NO (88). Такође NO функционише као бифункционални регулатор апоптозе; при ниским концентрацијама, супримира апоптотични пут док при високим нивоима превазилази целуларне протективне механизме и испољава проапоптотичне и

цитотоксичне ефекте (89), тако да NO при ниским концентрацијама штити миокард од штетних стимулуса, док при високим може довести до оштећења и губитка миоцита (86).

Дихотомија ефекторних функција је „двосекли мач“ у биолошким системима (84, 86). Баланс између цитостатског и цитотоксичног ефекта вероватно лежи у концентрацији продукованог NO у ткивима, али и изоформи NOS која је активирана али и у комплексној интеракцији са другим слободним радикалима као што је супероксид.

NO као гасовити слободни радикал, најпознатији због свог потентног вазодилаторног ефекта (90), може играти протективну улогу током срчане анафилаксе, не само ублажавајући дуготрајне вазоконстрикторне ефекте еикосаноида и хемокина, већ и путем смањења ослобађања хистамина. У могућности је да неутралише активацију мастоцита индуковану и имунолошким и неимунолошким стимулусима (91) и сматра се физиолошким регулатором реактивности мастоцита, који ендогено продукују NO (92). Ослобађа се у коронарни ефлуент изолованог срца сензибилисаних заморчића након излагања алергену. Насупрот томе, ослобађање хистамина у наведеном моделу анафилаксе се смањује након администрације NO-донора натријум нитропрусида а повећава прекидањем ендogene синтезе NO путем блокатора NO-синтетаза L-монометил-L-аргинина (79).

Поред NO-донора, друге супстанце које су у могућности да повећају ендогено стварање NO могу да ослабе срчану анафилаксу. Пример је релаксин, пептидни хормон, представник инсулинске суперфамилије, најпознатији због своје улоге у репродукцији (93, 94). Релаксин има очигледан ефекат на кардиоваскуларни систем, првенствено периферну и коронарну вазорелаксацију и повећање фреквенције и снаге контракције, што се пре свега приписује његовој способности да повећава биосинтезу NO, индуковањем експресије iNOS у циљним ћелијама, укључујући ендотелне и глаткомишићне ћелије (95-97). Путем коронарне вазодилатације, релаксин повећава коронарни проток (95), а тај ефекат може да води уклањању хистамина и других проинфламаторних медијатора које ослобађају срчани мастоцити током анафилактичке активације. Обим анти-анафилактичког ефекта релаксина вероватно зависи од његовог директног инхибиторног дејства на мастоците и базофиле, што је утврђено и у *in vitro* и *in*

vivo испитивањима (98-100). Ова особина чини релаксин способним да превенира алергијски asthma-like одговор код сензибилисаних заморчића изложених инхалаторним алергенима (99). Стога, је Masini са сарадницима спровео студију са циљем да испита ефикасност релаксина у ублажавању ефеката срчане анафилаксе. Коришћењем добро дефинисаног модела изолованог срца активно сензибилисаних заморчића (75), утврдили су да релаксин чак и у ниским концентрацијама од 30ng/ml, дат пре излагања алергену у потпуности слаби позитивни хроно и инотропни ефекат изазван анафилактичком реакцијом и умањује краткотрајну коронарну констрикцију, ослобађање хистамина и накупљање калцијума у срчаном ткиву, што се дешава при оштећењу ћелија миокарда. Очекивано, ефекат релаксина укључује активацију ендogene синтезе NO, показане повећањем нивоа нитрита, крајњег продукта метаболизма NO у коронарном ефлуенту као и повећаном активношћу и експресијом iNOS и повећаним нивоом cGMP, који је у срчаном ткиву интрацелуларни сигнални ефектор NO (101). Ови резултати сугеришу да релаксин или његови аналози могу наћи терапеутску примену у хиперсензитивним реакцијама I типа и анафилакси, нарочито ако је присутна и срчана симптоматологија. Такође, релаксин може бити користан у алергијским болестима обзиром да су *in vitro* студије доказале да релаксин може да фаворизује диференцијацију naïve T ћелије од Th2 фенотипа, који карактерише IgE имуни одговор ка Th1 фенотипу (102).

Иначе, претходно поменута група истраживача, окупљена око Е. Masini више се година бавила улогом NO у срчаној анафилакси експерименталних животиња. Утврдили су да је код изолованог срца заморчића анафилактичка реакција удружена са наглим ослобађањем хистамина и дуготрајним ослобађањем нитрита (NO²⁻) који је оксидациони продукт NO (66). Коришћењем NO-донора и инхибитора синтезе NO у својим радовима ова група аутора доноси закључке о протективној улози NO током срчане анафилаксе тако што NO инхибира ослобађање хистамина из срчаних мастоцита и одржава тонус коронарних крвних судова. Овај ефекат NO остварује путем повећања концентрације cGMP и смањења интрацелуларног Ca²⁺ (101). Ипак као главни закључак свога рада наводе да за сада нису у могућности да идентификују извор NO путем кога се протективно дејство остварује.

1.4. УЛОГА ОСТАЛИХ МЕДИЈАТОРА У СРЧАНОЈ АНАФИЛАКСИ

Поред NO, угљен моноксид (CO) је други ендогено продуковани гасовити чинилац који игра улогу у модулацији срчане анафилаксе. Разумевање улоге CO као интер и интра целуларног месенџера је знатно напредовало последњих година. Међу метаболичким реакцијама које воде ендогеној синтези CO, најпознатија је она коју катализује хем оксигеназа (HO), ензим локализован у глатком ендоплазматском ретикулуму и који користи хем као специфични субстрат. Слично NO синтетазима, постоје различите HO изоформе, индуцибилна HO-1 и конститутивне HO-2 и HO-3, експримиране физиолошки у неколико органа (јетра, слезина, мозак, бубрези) (103). Ослобађање CO путем HO-1 је обимније него путем конститутивних изоензима и настаје након излагања ћелија различитим стимулусима, на пример топлоти, радијацији, проинфламаторним цитокинима и кисеоничким слободним радикалима (104). Повећање активности HO-1 и ендогени CO ниво се сматра укљученим у заштити ткива од инфламације и оксидационог стреса. Тачан механизам за HO-1-зависну заштиту није у потпуности јасан, али више различитих механизма могу бити укључени: 1) CO се везује и инактивише ензиме који садрже хем, а укључени су у запаљенске реакције; 2) повећана активност HO-1 исцрпљује интрацелуларни садржај хема, чиме се инхибира активност хем-зависних ензима укључених у инфламацију као што је циклооксигеназа (COX)-2 и iNOS. Штавише, при адекватним концентрацијама, CO се може такмичити са NO за везно место у хем компоненти гуанил циклазе, што води повећаној продукцији cGMP и имитирању корисног биолошког дејства NO.

Код алергијских реакција, битно је нагласити да су мастоцити и базофили способни да генеришу CO, који испољава негативну повратну спрегу на алергеном индуковано ослобађање хистамина (105, 106). Такође, у срцу се може експримирати HO-1 и то је место базалне HO-1 активности, што је произашло из чињенице да се билирубин као стабилни продукт ензимске деградације хема може измерити у нормалном ткиву срца (107). Стога, стимулација ендогене синтезе CO може бити други пут са циљем спутавања срчане анафилаксе. Са циљем тестирања ове хипотезе, сензибилисани заморчићи су третирани хемином (протопорфирином IX), субстратом и индуктором HO-1, затим су срца изолована

и индукована је *ex vivo* срчана анафилакса. Хемин је био у стању да повећа експресију NO-1 у срцу, да превенира алергеном индуковани инитропни и хронотропни ефекат, да смањи коронарни проток и да редукује ослобађање хистамина у коронарни ефлуент (108). Исти ефекат хемина је репродукован додавањем егзогеног гасовитог CO у перфузиони раствор сензибилисаних, изолованих срца пре додавања алергена. Насупрот овоме, сви претходно наведени ефекти су превенирани када су животиње третиране цинк- протопорфирином IX, специфичним NO-1 инхибитором. У оба случаја, заштитно дејство CO је било праћено повећањем нивоа cGMP и смањењем садржаја калцијума у срчаном ткиву (108). Убедљиво, анти-анафилактички ефекат индукован хемином и CO, се може приписати повећању нивоа cGMP у срцу, који може индуковати Ca²⁺ секвестрацију и редукцију цитосолног Ca²⁺ на ниво недовољан за окидање ослобађања садржаја из гранула мастоцита. Такође је могуће да анти-анафилактички ефекат хемина и CO произилази из покретања ослобађања NO. Када се култура васкуларних ендотелних ћелија изложи CO, оне ослобађају NO у медијум (109). Ако исти механизам функционише у срцу сензибилисаних замораца, CO-индуковано ослобађање NO може учествовати у свеобухватном анти-анафилактичком ефекту.

CO је добро познат загађивач околине, ипак све више доказа упућује на то да може да спроводи цитопротекцију, нарочито у срцу и крвним судовима. Поврх тога, претходно наведена студија подржава гледиште да индукција NO-1 активности може да обезбеди ендогени одбрамбени механизам против анафилактичких реакција. Као примамљива могућност произилази синтеза лекова способних да се „умешају“ у ендегену синтезу CO, што би могао да буде и нов приступ модулацији првог типа хиперсензитивних реакција.

1.5. ХИСТАМИНАЗЕ У СРЧАНОЈ АНАФИЛАКСИ

Као што је претходно наведено, хистамин игра главну улогу у раној фази срчане анафилаксе. Са фармаколошког становишта, не само H₂ блокатори (78), што се очигледно очекује, већ и H₂ агонисти инхибирајући активацију мастоцита (79), успевају да слабе срчану анафилаксу у изолованом моделу сензибилисаног заморчића. Као додаток молекулима који делују на ослобађање хистамина или на

његово дејство на циљне ћелије, трећи могући пут који је заслужио испитивање је коришћење ензима који убрзавају катаболизам хистамина. У ткиву, ендогени хистамин се инактивише оксидативном деаминацијом путем аминоксидаза, које су широко присутне у живом свету, животињама, биљкама и бактеријама (110, 111). Субсет ових ензима укључује диамино оксидазе или хистаминазе, који садрже бакар као функционалну протетичку групу и специфично оксидишу хистамин, заједно са другим моноаминима, као што је кадаверин и путресцин (110). Хистаминазе се налазе у садницама грашка, одакле се у великој количини могу пречистити. Ове хистаминазе добијене из биљака су тестиране са циљем да се испита њихова способност да слабе срчану анафилаксу у класичним *ex vivo* срчаним моделима активно сензибилисаних заморчића. Субстанца је додавана, или као чист ензим или везан за полиетилен-гликол са циљем побољшања фармакокинетског профила, у перфузиони раствор изолованог срца пре додавања алергена. Као што је и очекивано, хистаминазе су превенирале хроно и инотропни ефекат индукован алергеном и слабиле су коронарну констрикцију, смањивале ослобађање хистамина у коронарни ефлуент као и садржај калцијума што се дешава као знак оштећења ткива миокарда (112). Хистаминазе су такође повећале ендогену синтезу NO, што је процењено повећаним ослобађањем нитрита у коронарни ефлуент и повећаним нивоом cGMP у срчаном ткиву. Овај ефекат хистаминаза је вероватно индиректан и повезан са синтезом реактивних кисеоникових врста ROS током оксидације хистамина, које могу повећати и активност NOS и биорасположивост NO путем конкуренције за везивање за хемопротеине (113). Из наведеног следи да NO доприноси анти-анафилактичком дејству хистаминаза.

II

ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

С обзиром на контраверзне податке из литературе циљ наше студије је добијање прецизних података о улози NO синтетисаног путем L-arginin/NO система у локалној анафилактичкој реакцији изолованог срца миша. Под хипотезом да је миш дефицијентан у iNOS моћно оруђе за боље разумевање улоге NO циљ истраживања је одређивање кардиодинамских параметара и параметара оксидационог стреса у експерименталном моделу срчане анафилаксе.

Кардиодинамски параметри који су одређивани су: SP-сistolни притисак, DP-дијастолни притисак, HR-срчани ритам, MBP- средњи перфузиони притисак, CF- коронарни проток.

Параметри оксидационог стреса који су одређивани су: индекс липидне пероксидације (мерен као TBARS), супероксид анион радикал (O_2^-) и водоник пероксид (H_2O_2), као и количина ослобођених нитрита (NO_2^-), као индикатора продукције NO.

III

МАТЕРИЈАЛ И
МЕТОДЕ

3.1. МАТЕРИЈАЛ

За аналитичко одређивање параметара оксидативног статуса, припрему пуфера и перфузионих раствора коришћени су комерцијални реагенси *pro analysis* квалитета:

3.1.1. Комплет реагенаса за детерминацију азот монооксида (NO) у облику нитрита:

Сулфанилна киселина (4-амино бензенсулфонска киселина, $C_6H_7NO_3S$), Mr 173,19 Sigma; N-(1-нафтил)-етилендиамин дихидрохидрат (NEDA, $C_{12}H_{15}C_{12}N$), Mr 259,18 Sigma; амонијум хлорид (NH_4Cl), Mr 53,49 MERCK; Боракс ($Na_2B_4O_7 \times 10H_2O$), Mr 381,4 Sigma; 85% орто-фосфорна киселина (H_3PO_4), $\rho=1,685 \text{ gcm}^{-3}$ MERCK; натријум нитрит ($NaNO_2$), Mr 69 MERCK.

3.1.2. Комплет реагенаса за детерминацију индекса липидне пероксидације (TBARS):

2-тиобарбитурна киселина (TBA, $C_4H_4N_2O_2S$), Mr 144,15 Sigma; натријум хидроксид ($NaOH$) Mr 40,00 MERCK.

3.1.3. Комплет реагенаса за детерминацију супероксидног анјонског радикала (O_2^-):

TRIS (Трис (хидроксиметил) аминометан, $C_4H_{11}NO_3$), Mr 121,14 MERCK, 37% хлороводонична киселина (HCl), $\rho=1,19 \text{ gcm}^{-3}$, Mr 36,5 MERCK; Na_2EDTA , Mr 372,24 MERCK; Нитро-тетразолијум плаво хлорид (NBT, $C_{40}H_{30}ClN_{10}O_6$), Mr 817,6 Sigma; Желатин, MERCK.

3.1.4. Комплет реагенаса за детерминацију водоник пероксида (H_2O_2):

Калијум хидрогенфосфат дихидрат ($K_2HPO_4 \times 2H_2O$) Mr 214,23 MERCK; калијум дихидрогенфосфат дихидрат ($KH_2PO_4 \times 2H_2O$) Mr 164,09 MERCK; натријум хлорид ($NaCl$) Mr 58,44 MERCK; водоник пероксид (H_2O_2) MERCK; D(+)-глукоза монохидрат (декстроза) MERCK; фенол црвено (phenol red,

C₁₉H₁₄O₅S), Mr 354,4 Sigma; пероксидаза из коњске ротквице (peroxidase from horse radish – HRPO EC 1.11.1.7) Sigma.

3.1.5. Комплет реагенаса за припремање Krebs-Hensenleit-овог перфузионог раствора:

Натријум хлорид (NaCl, 27.216 g/4l), калијум хлорид (KCl, 1.4 g/4l), калцијум хлорид (CaC_{12(anh.)}, 1,117 g/4l), магнезијум сулфат (MgSO₄×7H₂O, 1,636 g/4l), калијум дихидроген фосфат (KH₂PO₄×2H₂O, 0.0644 g/4l), натријум бикарбонат (NaHCO₃, 8,36g/4l) и глюкоза (C₆H₁₂O₆×H₂O, 8,8g/4l). MERCK

3.1.6. Реагенс за активну сензибилизацију

Овалбумин (chicken egg) SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Ger.

3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛ

За изучавање функције коронарне циркулације определили смо се за модификовани *Langendorff*-ов модел изолованог срца (*Oscar Langendorff*, 1895), применљив на изолованом срцу сисара (пас, мачка, зец, заморчић). У нашим истраживањима користили смо модел изолованог срца миша (iNOS-/- дефицијентни сој и wild тип).

Две класичне варијанте *Langendorff*-ове технике које се примењују у експерименталним истраживањима су:

- Перфузија изолованог срца при константном протоку кроз коронарно васкуларно корито;
- Перфузија изолованог срца при константном притиску кроз коронарно васкуларно корито;

при чему је други параметар променљива варијабла. У првој варијанти експерименталног модела променљива варијабла је притисак, који се региструје на писачу посебним системом преносника (трансдјусера), док је у другој варијанти експерименталног модела то проток, који се региструје „*flowmetrijski*“, тј. скупљањем венског ефлуента у одређеном временском интервалу или помоћу „*flow-metra*“, који се апликује директно у коронарно артеријско корито.

Ми смо се определили за другу варијанту модификованог *Langendorff*-овог модела, који као константну величину има притисак, док је проток променљива компонента. Однос ових величина постављен је следећом формулом:

$$p = \text{const} / \text{protok} = 1 / \text{radijus}^4$$

3.3. ЕКПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ

Старосна доб жртвованих мишева је била 6-8 недеља, пол мушки а телесна маса 20-25 грама. Животиње су биле подељене у четири експерименталне групе (12 животиња у групи). Животиње су чуване у стандардним лабораторијским условима (температура ваздуха $22 \pm 1^\circ\text{C}$, релативна влажност ваздуха 50%, 12:12ч циклус светлост:тама, (са почетком светлог периода у 9:00ч) и са слободним приступом води и храни. При експерименталном раду поштован је Правилник о раду са експерименталним животињама и добијена је сагласност Етичког комитета за рад са експерименталним животињама.

Жртвовање животиња вршено је након краткотрајне етарске наркозе, цервикалном дислокацијом (Schedule 1 of the Animals/Scientific Procedures, Act 1986, UK). Након тога, уследило је хируршко отварање абдомена, дијафрагма је пресечена лучно, с лева на десно, а затим је грудни кош отворан, брзо, бочно, дуж мамиларне линије. Да би се одржало у релативној хомеостази, током ових процедура, срце је хлађено физиолошким раствором ($+4^\circ\text{C}$). По отварању грудног коша, пресечен је перикард на врху срца и на тај начин срце је било спремно за изоловање. Након пресецања перикарда, крвни судови на бази срца се ресецирају, орган се вади из грудног коша и одмах се ставља у леден физиолошки раствор [$(-4) - (-10)$], чиме се импровизује тзв. „физиолошка клешта“ и своде се метаболички процеси у миокарду на минимум. По стављању органа на лед, врши се тупа препарација базе срца, са отклањањем свих елемената, изузев асцендентне аорте јер се кроз њу врши ретроградна перфузија. У препарисану аорту убацује се канила за ретроградну перфузију и тако спремљен препарат се поставља на модификовани сетинг за изоловано срце, по *Langendorff*-у, чиме експеримент почиње. У циљу што поузданијих резултата, ова хируршка процедура траје свега 2-3 минута.

Након постављања изолованог срца на апарату по *Langendorff*-у, вршена је дисекција митралне валвуле кроз претходно проширени отвор плућних вена, тако да је на тај начин притисак у левој преткомори сведен на нулу, чиме се искључио сваки утицај на коронарну циркулацију, који не зависи од функције леве коморе. На овај начин су се постигли оптимални услови за ретроградну перфузију изолованог срца, јер је ток раствора за перфузију имао следећи смер: аорта-лева преткомора-лева комора-коронарни синус-коронарне артерије-коронарне вене, чиме се ограничио простор нашег истраживања, а то је срце и коронарна циркулација.

Апаратура по *Langendorff*-у за испитивање срца и коронарне циркулације при константном притиску на коронарне артерије се састоји од следећих елемената:

-Система цеви, са примарним стубом једне дупле цеви, у којој се постиже жељени перфузиони притисак, као и помоћног система цеви за гасификацију раствора, инфузију агенаса, којима смо третирали срце, као и *Watter-Jacketa-a*, који уклања разлику између температуре просторије и температуре раствора и тиме приближава температуру оптималној.

-Резервоара за комплексни *Krebs-Hensenleit*-ов раствор за перфузију изолованог срца, запремине 4 литара.

-Боце са смешом за гасирање физиолошког раствора, који садржи смешу кисеоника и угљен-диоксида у односу 95%O₂:5%CO₂, који остварује физиолошки парцијални притисак ових гасова у перфузионом медијуму и путем негативног притиска одређује смер тока физиолошког раствора.

-Воденог купатила у коме се постиже температура физиолошког раствора од 37°C (изотермичност).

-Инфузионе пумпе, којом је вршена администрација жељених агенаса директно у аортну канилу.

-Електростимулатора, којим се постизао константни „*pacings*“ изолованог срца и тиме омогућавао његов регуларнији и дужи рад.

После изоловања из грудног коша, срце је постављано на систем цеви и вршена је дисекција митралне валвуле. Уколико је изоловано срце почело да ради, апликоване су електроде, повезане са електростимулатором у близини СА чвора, како би се постигао оптимални „*pacings*“, струјом $U=4V$, $v=320bpm$.

Стабилизација препарата је трајала 30 минута на базичном перфузионом притиску, што је у нашем случају била вредност од 60 cm H₂O.

Испитивање функционалности коронарне циркулације у смислу одређивања опсега њеног ауторегулаторног ранга вршено је мењањем перфузионог притиска од базичног према нижим (40, 30, 20 cm H₂O) и вишим вредностима (80, 100, 110, 120 cm H₂O). Након постизања сваке вредности перфузионог притиска у систему цеви, препарат је стабилизован 5 минута на свакој од поменутих вредности CPP-а и затим је одређиван проток. Регистравањем протока у функцији промене коронарног перфузионог притиска, добијана је крива промене протока у функцији коронарног перфузионог притиска, чиме је одређиван опсег перфузионих притисака у којима коронарне артерије одржавају приближно исти проток, односно остварују ауторегулацију протока крви кроз комплетно коронарно васкуларно корито, као и кроз миокард.

Сензор (Experimetria Ltd, Budapest, Hungary), повезан са аортом је коришћен за континуирано мерење параметара од значаја за нашу студију: SP- систолни притисак (engl. systolic pressure), DP- дијастолни притисак (engl. diastolic pressure), HR- срчани ритам (engl. heart rate), MBP- средњи перфузиони притисак (engl. mean blood-perfusion pressure). CF- коронарни проток (engl. coronary flow), је мерен *flowmetrijski*, након што је проток процењен као стабилан (три мерења исте вредности), сакупљањем коронарног ефлуента у интервалима од 2 минута. Наведени параметри су измерене као стабилизационе вредности, пре изазивања срчане анафилаксе.

Срчана анафилакса је изазивана убризгавањем раствора (1mg/1ml) овалбумина у аортну канилу. Наредних 10 минута, у интервалима од два минута (0-2, 2-4, 4-6, 6-8, 8-10) континуирано су мерени SP, DP, HR, MBP, CR.

Истраживање је било подељено у четири (IV) експерименталне групе. Експерименталне групе су биле:

- I - несензибилисани СВА/Н мишеви
- II- СВА/Н мишеви активно сензибилисани овалбумином
- III- несензибилисани iNOS-/- мишеви
- IV- iNOS-/- мишеви активно сензибилисани овалбумином

Мишеви се активно сензибилишу овалбумином са две интраперитонеалне ињекције (100µg овалбумина у 100µl физиолошког раствора) првог и четрнаестог

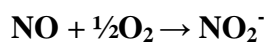
дана. Двадесетосмог дана срце се изолује и перфундује на описани начин. Анафилактичка реакција изолованог срца провоцира се ињичирањем раствора овалбумина кроз аортну канилу (1mg/1ml *Krebs-Hensenleit*-ов раствора).

3.4. БИОХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ

Сви реактивни молекули, који су били од интереса за наше истраживање одређивани су спектрофотометријски. У узорцима коронарног венског ефлуента (прикупљених током експеримента, пре и током овалбумином изазване срчане анафилаксе) су одређивани следећи параметри: индекс липидне пероксидације (мерен као TBARS) (114), супероксид анјон радикал (O_2^-) (115) и водоник пероксид (H_2O_2) (116), као и количина ослобођених нитрита (NO_2^-), као индикатора продукције NO.

3.4.1. Одређивање нитрита

Одређивање количине ослобођених нитрита у коронарном венском ефлуенту представљало је за нас најдоступнију индиректну методу за одређивање функционалности ендотелног L-аргинин/NO система. С обзиром да су методе за директно одређивање азотног монооксида (NO) нама за сада недоступне, спектрофотометријска метода одређивања количине ослобођених нитрита представља доступну и довољно поуздану методу за ову процену. С обзиром да се у реакцији са молекуларним кисеоником:



ствара еквимоларна количина нитрита, можемо са веома великом сигурношћу тврдити да количина ослобођених нитрита у коронарном венском ефлуенту представља количину ослобођеног NO-а. Ова наша хипотеза је до сада потврђена радовима многих аутора, иако је наша истраживачка група изнела у претходним годинама једно потпуно ново тумачење, а то је да нитрити могу бити и индикатор разградње азотног монооксида. У сваком случају, за овај аспект нашег

истраживања, спектрофотометријско одређивање је технички и научно потпуно прихватљиво.

Биохемијски се ова метода заснива на употреби Griess-реагенса, који са нитритима гради диазо-комплекс, који даје љубичасту боју. Griess-ов реагенс се припрема *ex tempore*, непосредно пре аналитичког одређивања, мешањем једнаких запремина (v/v) 1 % сулфанилне киселине, растворене у 5 % орто-фосфорној киселини (може се чувати на собној температури) и 0.1 % воденог раствора : N-(1-нафтил)-етилendiамин дихидрохлорида (NEDA), који се чува у тамној бочици на 4 °C, због своје високе фотохемијске реактивности.

У епрувете (12 x 100) пипетирано је 1 ml коронарног венског ефлуента, 250 μ l свеже направљеног Griess-ов реагенса и 125 μ l амонијачног пуфера (pH=9.0), кога сачињавају амонијум хлорид (NH₄Cl) и натријум тетраборат (Na₂B₄O₇). Амонијачни пуфер, који се у току припеме мора загревати, због изузетно слабе растворљивост натријум тетрабората, има за сврху стабилизацију диазо-комплекса. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћено је 1 ml Krebs-Hensenleitov-ог раствора. Концентрација ослобођених нитрита у узорцима одређивана је на основу калибрационе криве. Калибрациона крива је конструисана на основу екстинкција узорака, који су у себи садржале познату концентрацију нитрита, након њихове реакције са Griess-овим реагенсом у присуству пуфера. Добијана је пипетирањем различитих количина воденог раствора 1 mM NaNO₂ у 1 ml Krebs-Hensenleitov-ог раствора и то: 3, 6, 12, 24 μ l, чиме је добијена концентрација нитрита од: 2.18, 4.37, 8.73 и 17.34 nmol NO₂⁻/ml. Након стабилизације боје на собној температури 5-10 минута приступа се детерминисању концентрације ослобођених нитрита спектрофотометријски на таласној дужини од $\lambda=550$ nm. Концентрација, а затим количина ослобођених нитрита добијана је на основу:

1. Одређивања стандардног фактора (F), који се добијао из следеће једначине:

Екстинкција стандарда-екстинкција слепе пробе

Концентрација NaNO₂ у стандарду

за сваки појединачни стандард (F1-F4), а затим добијањем њихове аритметичке средине.

2. Дељењем разлике екстинкција узорка и слепе пробе са стандардом F:

$$\text{nmol NO}_2/\text{ml efluenta} = \Delta E (E_u - E_{sp})/F.$$

3. Након тога, *количина* ослобођених нитрита по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин:

$$\text{nmol NO}_2/\text{minut/g wt} = \Delta E/F \times CF \text{ (Koronarni protok, Coronary flow)}/m_{\text{heart}}$$

3.4.2. Одређивање супероксид анјон радикала (O_2^-)

Одређивање количине супероксид анјон радикала (O_2^-) у коронарном венском ефлуенту заснива се на реакцији O_2^- са нитро тетразолијум плавим (**Nitro Blue Tetrazolium - NBT**) до нитроформазан плавог (Auclair and Voisin, 1985). Мерење се врши на таласној дужини максималне апсорпције $\lambda_{\text{max}}=550\text{nm}$. Есејна смеша ("assay mixture") садржи: 50 mM TRIS-HCl пуфера (pH=8.6), 0.1 mM EDTA, 0.1 mg/ml желатина и 0.1 mM NBT. Пре употребе раствор се претходно гасира азотом под притиском у трајању од једног часа.

У епрувете (12x100) пипетирано је 50 μl коронарног венског ефлуента и 950 μl есејне смеше, чиме реакција отпочиње. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћена је адекватна количина Krebs-Hensenleitov-ог раствора. На самом почетку реакције измери се екстинкција смеше и нотира се као екстинкција E_1 . Сваких 60 секунди се врши мешање пластичним штапићем и нотира екстинкција након мешања до своје стабилизације, што подразумева две узастопне приближно исте екстинкције. Последња екстинкција се означава као E_2 . Исти поступак се примењује и за слепу пробу.

1. Концентрација ослобођеног O_2^- добијена је на основу следећих једначина

$$\Delta E_u = E_{2u} - E_{1u} \text{ (za uzorak)}$$

$$\Delta E_{sp} = E_{2sp} - E_{1sp} \text{ (za slepu probu)}$$

$$\Delta E = \Delta E_u - \Delta E_{sp}$$

$$\text{nmol O}_2^-/\text{ml efluenta} = \Delta E/0.015 \times 1/0.05$$

2. Након тога, **количина** ослобођеног O_2^- по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин

$$\text{nmol } O_2^-/\text{minut/g} = \Delta E/0.015 \times 1/0.05 \times CF/m_{\text{srca}}$$

3.4.3. Одређивања индекса липидне пероксидације (TBARS)

Индекс липидне пероксидације, као један од параметара оксидативног стреса, одређиван је индиректно преко продуката реакције липидне пероксидације са тиобарбитурном киселином, одакле и потиче скраћеница TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances). У нашим истраживањима ниво TBARS-а у коронарном венском ефлуенту смо одређивали спектрофотометријски. Метода се заснива на одређивању нивоа липидних пероксида на основу реакције једног од њих, малонилдиалдехида (MDA) са тиобарбитурном киселином (ТВА).

У епрувете (12x100) пипетирано је 800 μl коронарног венског ефлуента и 200 μl 1% ТВА у 0.05 М NaOH. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћена је еквивалентна количина Krebs-Hensenleitov-ог раствора. Након пипетирања, узорци су инкубирани у воденом купатилу 15 минута на 100 $^{\circ}\text{C}$. Након инкубације, узорци су прилагођени собној температури, па се приступа детерминисању концентрације ослобођених TBARS у коронарни венски ефлуент спектрофотометријски на таласној дужини од $\lambda=530\text{nm}$.

1. Концентрација ослобођених TBARS добијана је на основу следеће једначине:

$$\text{nmol TBARS/ml ефлуента} = \Delta A (A_u - A_{sp})/1.56 \times 1.25,$$

при чему је A_u апсорбанца узорка, док је A_{sp} апсорбанца слепе пробе, док су 1.56 и 1.25 корекциони фактор за овај есеј.

2. Након тога, **количина** ослобођених TBARS по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин:

$$\text{nmol TBARS/минуту/g wt} = \Delta A / 1.56 \times 1.25 \times \text{CF/m}_{\text{srca}}$$

Важно је напоменути да су у тумачењу резултата, за разлику од свих осталих биохемијских параметара, ниво TBARS изражавао у μM , док је количина осталих молекула изражавана у nM . Разлог је у количини TBARS, која је за један ранг величина већа од свих осталих параметара. Овакав наш резултат је последица неспецифичности TBARS, као теста, јер он представља сумацију целог једног начина деловања реактивних кисеоничних и азотних врста, док сви остали параметри везани за појединачне молекуле, који имају различите механизме дејства, као појединачне кисеоничне врсте.

3.4.4. Одређивање водоник пероксида (H_2O_2)

Детерминација количине водоник пероксида (H_2O_2) заснива се на оксидацији фенол црвеног помоћу водоник пероксидом реакцијом која је катализована ензимом пероксидазом из коњске ротквице (*Horseradish Peroxidase* - HRPO). Ова реакција резултује формирањем једињења чији је максимум апсорпције $\lambda_{\text{max}}=610\text{nm}$. Линеарна зависност апсорбанце 610nm од концентрациј H_2O_2 је постојана за $1-60 \mu\text{M}$ опсег концентрација ($1-60 \text{nmol/ml}$). Ова метода омогућује детерминацију настајања и ослобађања H_2O_2 за временски интервал од $5-60$ минута. У епрувете (12×100) пипетирано је $200 \mu\text{l}$ коронарног венског ефлуента и $800 \mu\text{l}$ свеже направљеног раствора фенол црвеног (*Phenol Red Solution-PRS*) који садржи 140mM NaCl , 10mM калијум фосфатног пуфера ($\text{pH} \approx 7$), $5,5 \text{mM D}(+)\text{-глюкозе}$ и $0,28 \text{mM}$ фенол црвеног. Узорцима се затим дода $10 \mu\text{l}$ ($1:20$) HRPO, припремљен *ex tempore*. Узорци су отављани на собној температури 10 минута, а затим се подеси $\text{pH} \approx 12$, помоћу 1M NaOH . Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћена је адекватна количина Krebs-Hensenleitov-ог раствора. Концентрација ослобођеног H_2O_2 у коронарном венском ефлуенту израчунавана је на основу калибрационог дијаграма (стандардне криве), одређиваног за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве, користи се стандардни (Stock) раствор H_2O_2 , уз претходну проверу концентрације (A_{230} за $10 \text{mM H}_2\text{O}_2$ износи $0,810$). У 3 епрувете пипетирано је : (уместо коронарног венског

ефлуента) 5, 10 и 20 μl , 1 mM раствора H_2O_2 , 200 μl дестиловане, 800 μl раствора фенол црвеног и 10 μl (1:20) HRPO. Након инкубације од 10 минута на собној температури, подешена је $pH \approx 12$ помоћу 1 M NaOH (10 μl). Тако је финална концентрација H_2O_2 у 3 узорака стандарда износила: 2,75; 5,49; и 10,99 nmol/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{ml}$. Мерење апсорбанце (A) вршене су на таласној дужини максималне апсорпције $\lambda_{\text{max}}=610\text{nm}$, у стакленим киветама, запремина 1 ml на спектрофотометру LKB Biochrom. модел: Ulltросрес 4050. Од добијених апсорбанци одузима се вредност апсорбанце слепе пробе (B), чиме се добија коначна апсорбанца (ΔA). Концентрација, а затим и количина ослобођеног H_2O_2 у коронарном венском ефлуенту израчунавана је на основу:

1. Фактор апсорбанце (F) по једном nmol-у водоник пероксида:

$$F = \Delta A / \text{nmol } \text{H}_2\text{O}_2 / \text{cuv}$$

2. На основу апсорбанце узорка на $\lambda_{\text{max}}=610\text{nm}$ (A_u) и њеног упоређивања са слепом пробом (A_{sp}) израчунава се финална апсорбанца (ΔA) ($A = A_u - A_{sp}$). Помоћу овако добивене апсорбанце, фактора F и количине коронарног венског ефлуента употребљеног опотребљеног у есеју (200 ml) и израчунавана је концентрација и количина H_2O_2 у коронарном венском ефлуенту по формули:

$$\text{nmol } \text{H}_2\text{O}_2 / \text{ml ефлуента} = \Delta A / F$$

3. Након тога, **количина** ослобођеног H_2O_2 по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин:

$$\text{nmol } \text{H}_2\text{O}_2 / \text{ml} / \text{минут} / \text{g wt} = \Delta A / F \times CF / m_{\text{srca}}$$

3.5. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

У циљу извођења неопходних статистичких тестирања, коришћен је статистички програмски пакет SPSS for Windows (18.0).

На почетку истраживања све варијабле описане су класичним дескриптивним методама статистике. У овој студији сва обележја посматрања била су нумеричка и описана су класичном мером централне тенденције и мерама варијабилитета: аритметичком средином и стандардном девијацијом. Приказ добијених резултата дат је табеларно и графички.

Избор теста за анализу вредности посматраних нумеричких обележја посматрања зависио је од нормалности расподеле података. Обзиром да су све посматране варијабле имале нормалну расподелу коришћени су параметарски тестови.

За анализу промене вредности хемодинамских параметара и параметара оксидационог стреса, између посматраних врста мишева, као и пре и после сензибилизације у истој групи мишева, у периоду пре давања алергена и током десетоминутног периода праћења по његовом давању коришћена је двофакторска анализа варијансе са поновљеним мерењима (RM-ANOVA).

T-тест коришћен је за поређење вредности посматраних варијабли, између анализираних група, у сваком од времена мерења.

Гранична вредност за прихватање хипотезе о постојању разлике између тестираних група у анализираним варијаблама постављена је на $p < 0,05$.

IV

РЕЗУЛТАТИ

Резултати добијени у овом раду односе се на хемодинамске параметре и оксидациони статус, праћених код експерименталних животиња а посматраних у односу на сензибилизацију. У складу са постављеним циљевима у овом раду добијени резултати приказни су у више делова. Први део резултата односи се на хемодинамске параметре, праћених пре и после сензибилизације, између посматраних експерименталних животиња: iNOS^{-/-} и wild мишева. Праћена је и разлика у вредностима хемодинамских параметара, код сваке од група експерименталних животиња у односу на сензибилизацију: пре и после. Сви ови параметри праћени су током два минута пре (стабилизационе вредности) као и после давања алергена (овалбумина) током двоминутних интервала (0-2 минута, 2-4, 4-6, 6-8 и 8-10).

Други део резултата односи се на оксидациони статус. И овде је рађена анализа праћених параметара по истом моделу: поређење параметара оксидационог статуса током 2 минута пре као и током десетоминутног периода (у интервалу од по два минута) од давања алергена, између iNOS^{-/-} и wild мишева пре, и после сензибилизације, као и њихова анализа унутар сваке од посматраних група мишева у односу на сензибилизацију.

Напомена: у даљем тексту термин wild (енгл. дивљи) се односи на сој СВА/Н мишева који за разлику од iNOS^{-/-} мишева имају очувану функцију гена за iNOS.

4.1. ХЕМОДИНАМСКИ ПАРАМЕТРИ

4.1.1. ПРЕ СЕНЗИБИЛИЗАЦИЈЕ: iNOS^{-/-} vs. WILD

4.1.1.1. Систолни притисак

Анализом вредности систолног притиска, између iNOS^{-/-} и wild мишева, пре давања алергена и десет минута по његовом давању, уочена је статистички значјна промена вредности овог параметра у обе анализиране групе (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; $p=0,003$). У обе групе после давања овалбумина забележен је статистички значајан пад систолног притиска. Током наредна два минута, пад систолног притиска и даље је био

присутан у групи wild мишева док је у групи iNOS-/- мишева дошли до благог пораста. У наредном периоду код iNOS-/- мишева бележи се пораст систолног притиска до шестог минута од давања алергена, а потом до благог пада. Код wild мишева, до пораста притиска долази од четвртог до шестог минута а онда до благог пада до краја периода праћења. На крају десетоминутног периода, вредности систолног притиска у обе групе мишева биле су статистички значајно мање од почетних вредности.

Табела 5

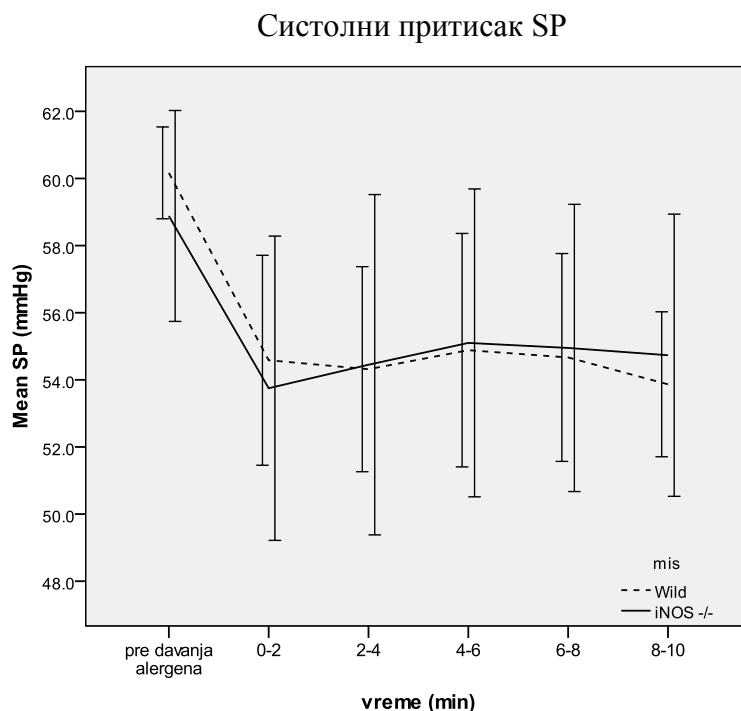
Систолни притисак SP

Време мерења	Миш		Значајност ^a
	wild	iNOS-/-	
Период стабилизације	60,17±1,30	58,88±2,99	p=0,358
0-2	54,58±2,98	53,75±4,32	p=0,706
2-4	54,32±2,91	54,45±4,83	p=0,955
4-6	54,88±3,31	55,10±4,37	p=0,925
6-8	54,67±2,95	54,95±4,07	p=0,893
8-10	53,87±2,06	54,73±4,01	p=0,648

^aт-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Динамика промене вредности овог параметра, мереног пре давања овалбумина и десет минута по његовом давању, статистички значајно се мењала, између анализираних група (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*врста миша; p=0,018).

Графикон 1



Вредности систолног притиска у групи iNOS^{-/-} мишева имале су статистички значајно мањи пад после давања алергена, него код wild мишева, графикон 1. Систолни притисак измерен у сваком од периода посматрања, није се статистички значајно разликовао између анализираних група, табела 5.

4.1.1.2. Дијастолни притисак

Статистички значајна промена, током опсервираног периода од пре давања алергена до десет минута по његовом давању, запажена је и у вредностима дијастолног притиска у обе анализирание групе мишева (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; $p=0,017$). Током прва два минута у обе групе забележен је пораст дијастолног притиска. У групи wild мишева пораст притиска је настављен до четвртог минута по давању алергена, затим је дошло до благог пада па поновног пораста. Код iNOS^{-/-} мишева од другог до осмог минута дијастолни притисак је падао да би од осмог до десетог минута забележен благ пораст. Ниво разлике у вредностима дијастолног притиска, између ове две групе мишева, током дестоминутног периода праћења није се статистички значајно

мењао (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*врста миша; $p=0,018$), графикон 2.

Табела 6

Дијастолни притисак DP

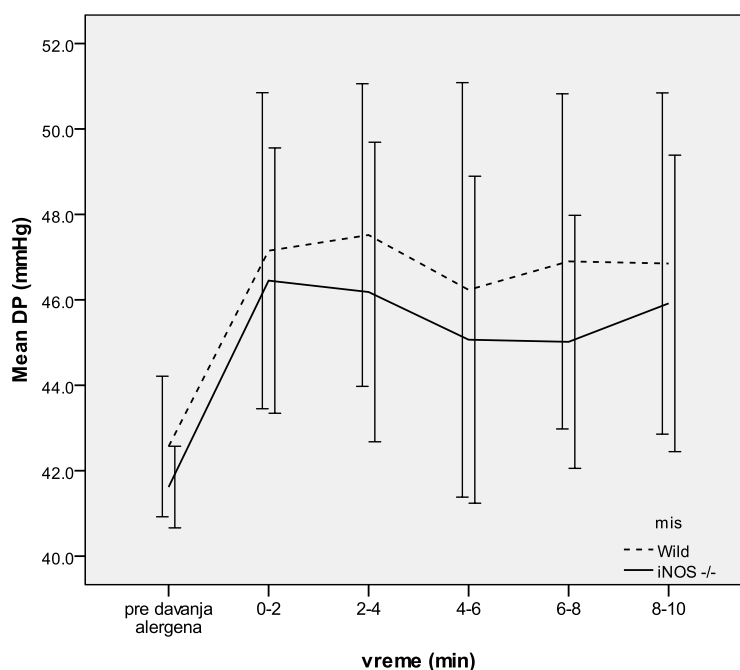
Време мерења	Миш		Значајност ^a
	wild	iNOS-/-	
Период стабилизације	42,57±1,57	41,62±0,91	$p=0,228$
DP (X±SD)	0-2	47,15±3,52	$p=0,717$
	2-4	47,52±3,37	$p=0,507$
	4-6	46,23±4,62	$p=0,638$
	6-8	46,90±3,74	$p=0,348$
	8-10	46,85±3,80	$p=0,660$

^aT-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Између wild и iNOS-/- мишева није уочена статистички значајна разлика у дијастолном притиску ни у једном од периода опсервације: пре давања алергена, два, четири, шест, осам и десет минута по давању алергена, табела 6.

Графикон 2

Дијастолни притисак DP



4.1.1.3. Срчана фреквенца

Није уочена статистички значајна промена срчаног ритма, у периоду од пре давања алергена до десет минута од момента по његовом давању, ни у једној од анализираних група мишева wild i iNOS-/- (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; $p=0,234$). Ниво разлике у вредностима срчаног ритма између анализираних група, измерене пре давања алергена није се статистички значајно мењала током десетоминутног периода праћења по његовом давању (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*врста миша; $p=0,664$).

Табела 7

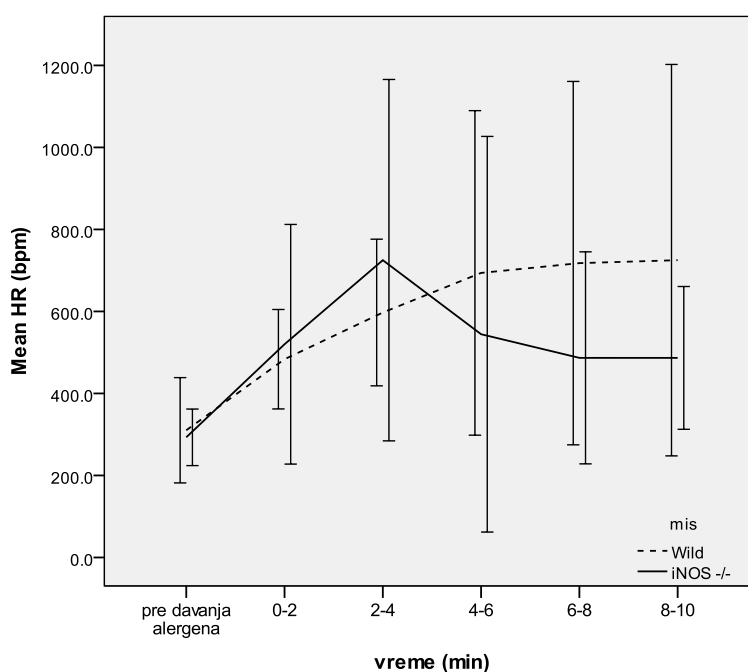
Срчани ритам HR

Време мерења	Миш		Значајност ^a
	wild	iNOS-/-	
Период стабилизације	310,17±122,37	293,05±65,74	$p=0,769$
HR ($\bar{X}\pm SD$)	0-2	483,42±115,59	$p=0,772$
	2-4	597,37±170,42	$p=0,506$
	4-6	693,95±377,06	$p=0,552$
	6-8	717,78±422,26	$p=0,274$
	8-10	725,00±454,85	$p=0,256$

^aт-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Графикон 3

Срчани ритам HR



Статистички значајна разлика у вредностима HR, између посматраних група мишева, није уочена ни у једном од анализираних времена праћења, табела 7.

4.1.1.4. Средњи перфузиони притисак

Анализом вредности средњег перфузионог притиска, у периоду од пре давања алергена па све до десет минута по његовом давању, није уочена статистички значајна разлика, ни у једној од посматраних група мишева (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; $p=0,274$). Статистички значајна разлика није уочена ни у динамици промене вредности овог параметра, између wild и iNOS-/- мишева, током напред наведеног десетоминутног периода праћења (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*врста миша; $p=0,579$), графикон 4.

Табела 8

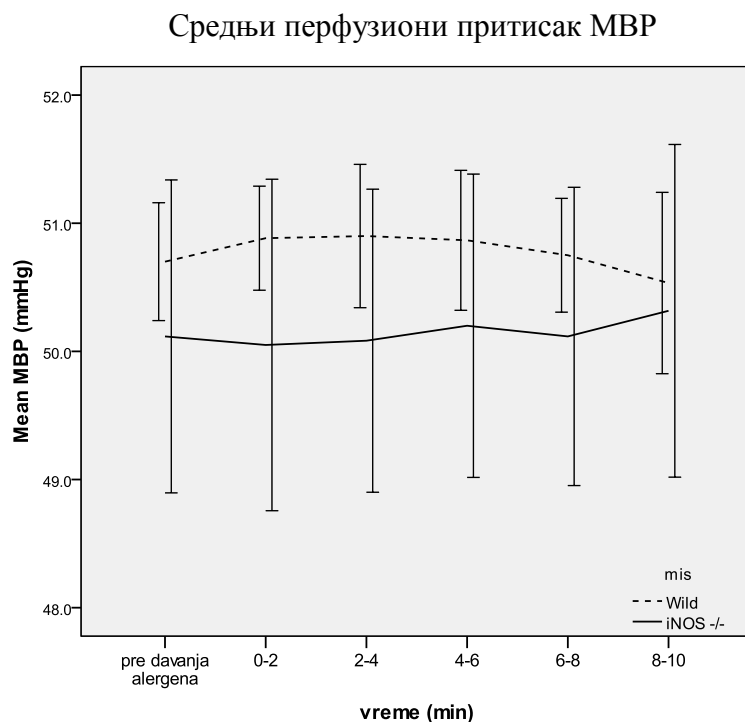
Средњи перфузиони притисак MBP

Време мерења	Миш		Значајност ^a
	wild	iNOS-/-	
Период стабилизације	50,70±0,44	50,12±1,16	$p=0,277$
MBP ($\bar{X} \pm SD$)			
0-2	50,88±0,39	50,05±1,23	$p=0,145$
2-4	50,90±0,53	50,08±1,12	$p=0,140$
4-6	50,87±0,52	50,20±1,13	$p=0,218$
6-8	50,75±0,42	50,12±1,11	$p=0,220$
8-10	50,53±0,67	50,32±1,24	$p=0,714$

^aT-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Вредности средњег перфузионог притиска, измерене код iNOS-/- мишева нису се статистички значајно разликовале, посматрано у односу на вредности код wild мишева, ни у једном од времена мерења, табела 8.

Графикон 4



4.1.1.5. Коронарни проток

Током десетоминутног периода праћења, у обе групе испитиваних мишева запажена је статистички значајна промена вредности коронарног протока (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; $p=0,004$).

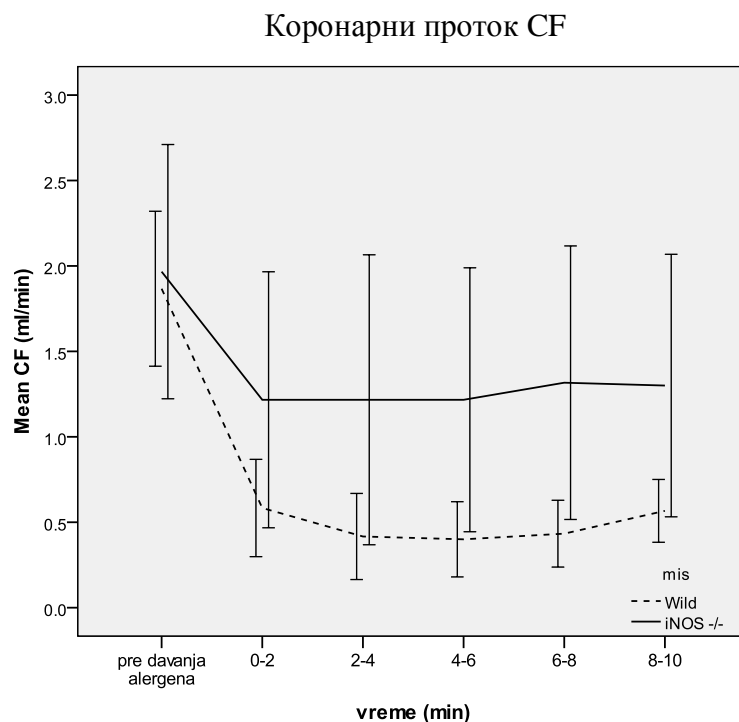
Табела 9

Коронарни проток CF

Време мерења	Миш		Значајност ^a
	Wild	iNOS ^{-/-}	
Период стабилизације	1,87±0,43	1,97±0,71	$p=0,774$
CF			
(X±SD)			
0-2	0,58±0,27	1,21±0,71	$p=0,070$
2-4	0,42±0,24	1,22±0,81	$p=0,043^*$
4-6	0,40±0,21	1,22±0,72	$p=0,026^*$
6-8	0,43±0,19	1,32±0,76	$p=0,020^*$
8-10	0,57±0,17	1,30±0,73	$p=0,038^*$

^aТ-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Графикон 5



У обе групе, после давања алергена забележен је пад коронарног протока, који је трајао до шест минута по његовом давању, док се у задња четири мунута праћења (од 6-ог до 10-ог минута) запажа благи пораст коронарног протока у обе групе. Код iNOS^{-/-} мишева пад коронарног протока по давању алергена, био је статистички значајно мањи него у групи wild мишева. Динамика промене вредности овог параметра током десетоминутног периода праћења није се статистички значајно разликовао (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*врста миша; $p=0,579$), графикон 5.

Између wild и iNOS^{-/-} мишева разлика у коронарном протоку није била статистички значајна пре давања алергена и два минута по његовом давању, табела 5. Међутим као што је напред речено у периоду после давања алергена, већи пад вредности овог параметра запажа се у групи wild мишева, тако да се од четвртог минута па све до краја десетоминутног периода праћења, статистички значајно веће вредности бележе у групи iNOS^{-/-} мишева, табела 9.

4.1.2. ПОСЛЕ СЕНЗИБИЛИЗАЦИЈЕ: iNOS-/- vs. WILD

4.1.2.1. Систолни притисак

У обе анализиране групе мишева, после сензибилизације, по давању овалбумина, током десетоминутног периода праћења, забележен је статистички значајан пад систолног притиска (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; $p=0,000$). У групи iNOS-/- мишева током целокупног периода праћења бележи се пад систолног притиска који је био најизраженији током прва четири минута по давању алергена да би у наредних шест минута дошло до његове стабилизације и благог пада.

Табела 10

Систолни притисак SP

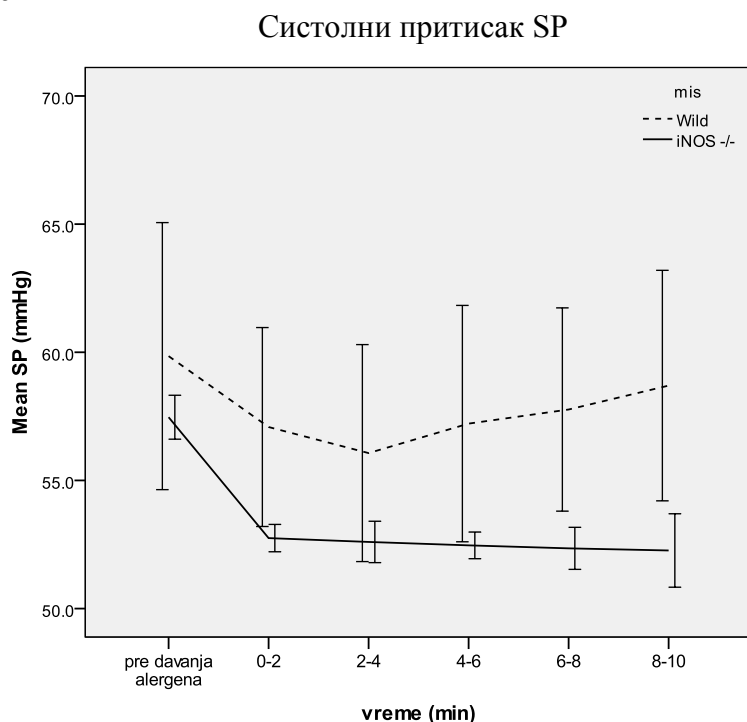
Време мерења	Миш		Значајност ^a
	wild	iNOS-/-	
Период стабилизације	59,85±4,96	57,46±0,82	$p=0,273$
0-2	57,08±3,70	52,75±0,51	$p=0,017^*$
2-4	56,07±4,03	52,60±0,77	$p=0,066$
4-6	57,22±4,39	52,46±0,50	$p=0,025^*$
6-8	57,77±3,78	52,35±0,78	$p=0,006^*$
8-10	58,70±4,28	52,27±1,36	$p=0,006^*$

^aт-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

У групи wild мишева пад систолног притиска је био присутан током прва четири минута а онда долази до његовог пораста у наредном периоду али и поред раста систолног притиска у овој групи мишева, на крају десетоминутног периода праћења његове вредности су и даље биле статистички значајно мање него вредности систолног притиска мерене пре давања алергена, табела 6. Ниво разлике у вредностима систолног притиска, између анализираних група мишева током посматраног периода праћења, статистички значајно се мења и то у смислу повећања те разлике (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*врста миша; $p=0,002$), графикон 6.

Анализом вредности систолног притиска, између iNOS^{-/-} и wild мишева, у сваком времену мерења, статистички значајна разлика није уочена само пре давања алергена и четири минута по његовом давању, док се у последњих шест минута посматрања статистички значајно веће вредности овог параметра бележе у групи wild мишева, табела 10.

Графикон 6



4.1.2.2. Дијастолни притисак

Анализом вредности дијастолног притиска десет минута по давању алергена, код сензибилисаних мишева статистички значајна промена вредности овог параметра уочена је у обе анализиране групе мишева (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; $p=0,000$). У групи iNOS^{-/-} мишева забележен је пораст дијастолног притиска два минута по давању алергена а потом стабилизација, уз благ пораст до краја периода праћења. У групи wild мишева током десетоминутног периода праћења, запажамо стално осциловање дијастолног притиска и наизменичан пад и пораст. Током прва два минута запажамо пораст дијастолног притиска, затим пад у наредна два минута, па поновни пораст од 4-ог до 6-ог минута, док је током задња четири минута примећен константан пад. Ниво разлике између iNOS^{-/-} и wild мишева, током

десетоминутног периода праћења, статистички значајно се мењао, као што је већ напред описано (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*врста миша; $p=0,003$), графикон 7.

Табела 11

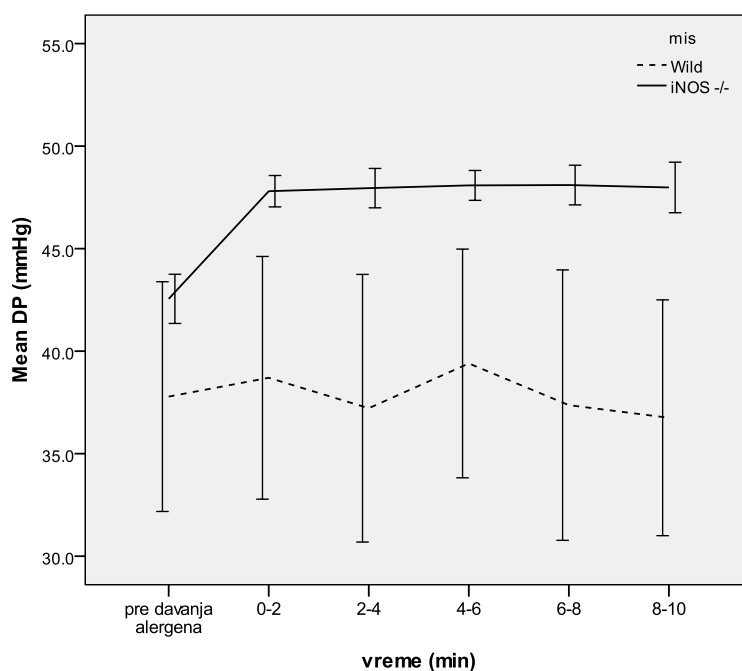
Дијастолни притисак DP

Време мерења	Миш		Значајност ^a
	wild	iNOS ^{-/-}	
Период стабилизације	37,78±5,34	42,55±1,14	$p=0,058$
DP (X±SD)			
0-2	38,70±5,64	47,80±0,73	$p=0,003^*$
2-4	37,22±6,22	47,95±0,92	$p=0,002^*$
4-6	39,40±5,32	48,08±0,69	$p=0,003^*$
6-8	37,37±6,28	48,10±0,92	$p=0,002^*$
8-10	36,75±5,48	47,98±1,17	$p=0,001^*$

^aТ-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Графикон 7

Дијастолни притисак DP



Вредности дијастолног притиска, мерене у сваком од времена мерења, нису се статистички значајно разликовале само пре давања алергена док по давању овалбумина, бележе се статистички значајне разлике у вредностима овог параметра између iNOS-/- и wild мишева, табела 11. По давању алергена вредности дијастолног притиска мерене код iNOS-/- мишева биле су статистички значајно веће.

4.1.2.3. Срчана фреквенца

Статистички значајна промена вредности срчане фреквенце забележена је код сензибилисаних и iNOS-/- и wild мишева током десетоминутног периода праћења по давању овалбумина (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; $p=0,000$). У групи wild мишева запажа се пад HR током прва четири минута а онда благ пораст до краја периода праћења. Код iNOS-/- мишева запажа се значајан пораст срчане фреквенце током прва два минута који се наставља само слабије изражено до шестог минута а потом се уочава пад вредности овог параметра у наредна четири минута. И поред пада HR током последња четири минута код iNOS-/- мишева вредности овог параметра забележене на крају праћења и даље су биле веће од вредности измерених пре давања алергена. Динамика промене вредности HR током периода праћења, статистички значајно се разликовала између wild и iNOS-/- мишева после сензибилизације (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*врста миша; $p=0,000$), графикон 8.

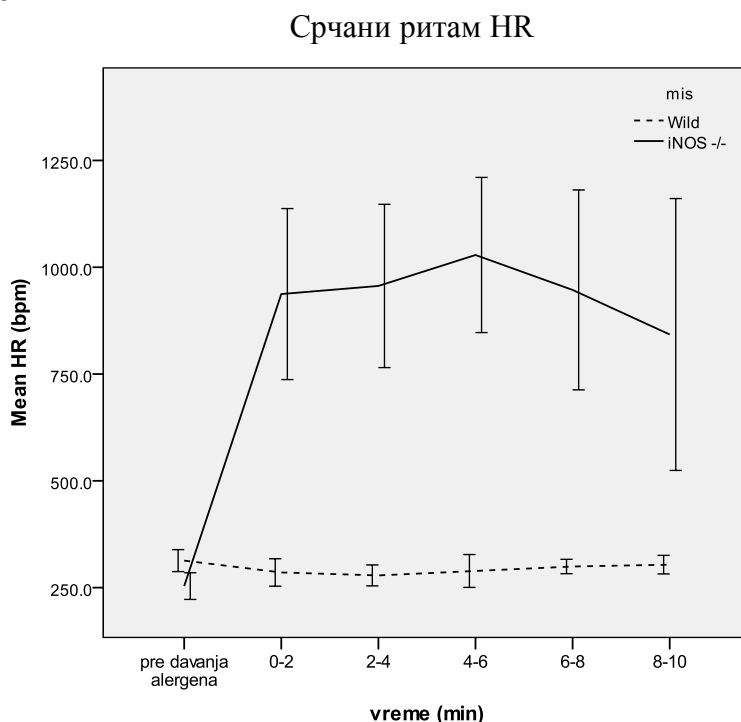
Табела 12

Време мерења		Срчани ритам HR		Значајност ^a
		Миш		
		wild	iNOS-/-	
HR ($\bar{X} \pm SD$)	Период стабилизације	313,23±24,50	253,55±29,72	$p=0,004^*$
	0-2	285,50±30,58	937,21±190,75	$p=0,000^*$
	2-4	278,55±23,34	956,22±182,12	$p=0,000^*$
	4-6	289,02±36,66	1028,68±173,04	$p=0,000^*$
	6-8	299,43±16,02	946,88±222,92	$p=0,000^*$
	8-10	303,75±20,73	842,57±303,23	$p=0,001^*$

^aТ-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

У сваком од посматрених времена мерења бележи се статистички значајна разлика у вредностима срчане фреквенце између iNOS^{-/-} и wild мишева, табела 12. Пре почетка давања алергена, статистички значајно веће вредности овог параметра измерене су код wild мишева, док после давања овалбумина статистички значајно веће вредности срчане фреквенце бележе се код iNOS^{-/-} мишева.

Графикон 8



4.1.2.4. Средњи перфузиони притисак

Статистички значајна промена средњег перфузионог притиска, мерена пре давања алергена и наредних десет минута по његовом давању, уочена је у обе анализиране сензибилисане групе мишева wild и iNOS^{-/-} (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; $p=0,000$). У групи iNOS^{-/-} мишева, запажа се благ пораст МВР два минута по давању алергена, а потом његов континуирани благи пад. У групи wild мишева МВР, показивао је наизменично пад и пораст. Током прва два минута бележи се пад, потом пораст, затим поновни пад и са таквим наизменичним осциловањем на свака два минута остао је до краја десетоминутног периода праћења. Ниво разлике у вредностима МВР, који је забележен пре давања алергена, статистички значајно се мењао током десет минута

по давању алергена (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*врста миша; $p=0,000$), графикон 9.

Табела 13

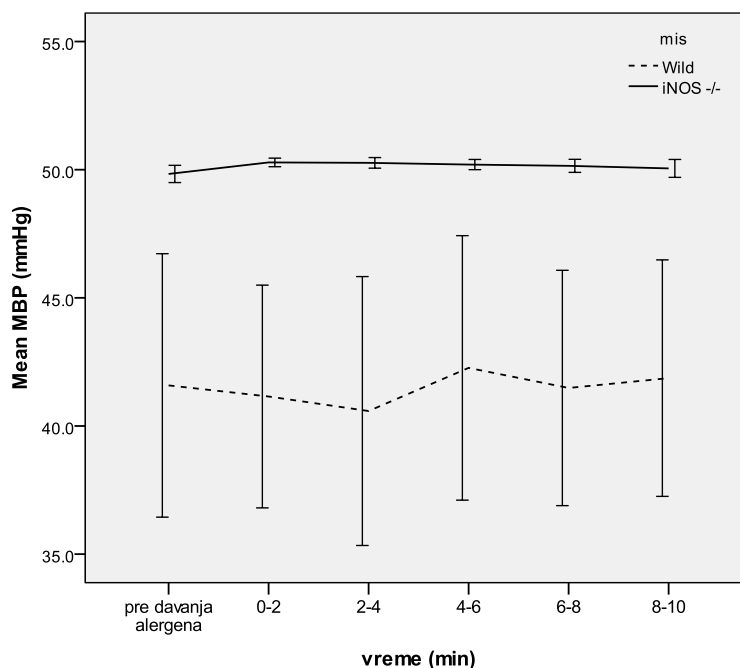
Средњи перфузиони притисак МВР

Време мерења	Миш		Значајност ^a
	wild	iNOS ^{-/-}	
Период стабилизације	41,56±4,90	49,83±0,32	$p=0,002^*$
МВР ($X \pm SD$)	0-2	41,15±4,14	$p=0,000^*$
	2-4	40,58±5,00	$p=0,001^*$
	4-6	42,27±4,92	$p=0,003^*$
	6-8	41,48±4,37	$p=0,001^*$
	8-10	41,87±4,39	$p=0,001^*$

^aТ-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Графикон 9

Средњи перфузиони притисак

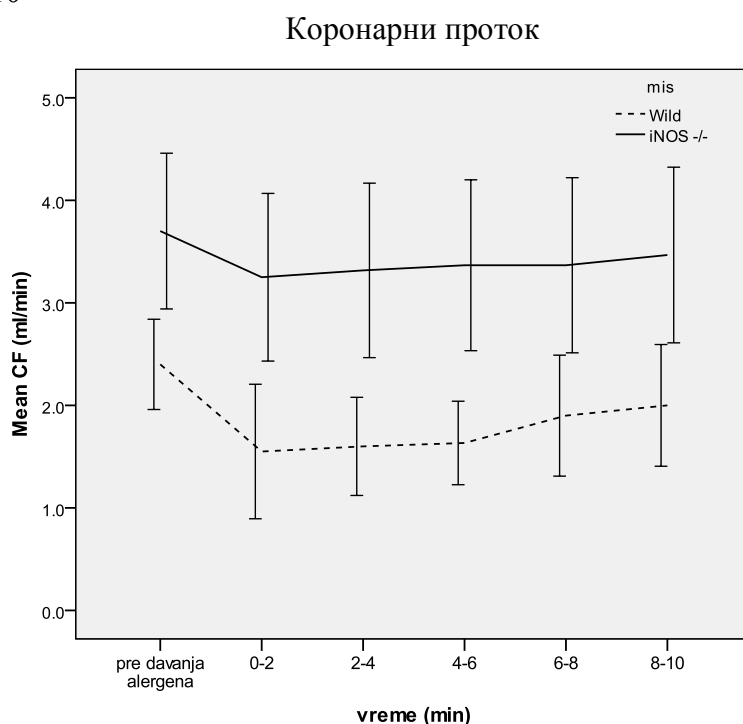


Анализом вредности МВР, у свим посматраним периодима мерења почев од времена пре давања алергена па све до десет минута по његовом давању, уочена је статистички значајна разлика у вредностима овог параметра између анализираних група мишева и то тако да су статистички значајно веће вредности овог параметра измерене код iNOS^{-/-} мишева, табела 13.

4.1.2.5. Коронарни проток

После сензибилизације, у обе групе мишева wild и iNOS^{-/-}, по давању алергена, запажена је статистички значајна промена коронарног протока (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; $p=0,001$). У групи iNOS^{-/-} мишева запажа се статистички значајан пад коронарног протока у прва два минута по давању алергена, а потом континуирани пораст у наредних осам, тако да су на крају десетоминутног периода праћења вредности овог параметра биле и даље мање од почетних.

Графикон 10



Нешто већи пад коронарног протока два минута после давања овалбумина запажен је у групи wild мишева, који је и у овој групи био праћен порастом овог параметра у наредних осам минута до краја посматраног периода праћења. У групи wild мишева запажен је нешто израженији пораст коронарног протока у периоду од шестог до десетог минута него у претходна четири минута од другог до шестог, а вредности на крају периода праћења и даље су била мања од почетних вредности овог параметра. Током времена није уочена статистички значајна промена нивоа разлике вредности овог параметра између анализираних група (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*врста миша; $p=0,070$), графикон 10.

Табела 14

Коронарни проток

Време мерења	Миш		Значајност ^a
	wild	iNOS-/-	
Период стабилизације	2,40±0,42	3,70±0,72	^a p=0,003*
0-2	1,55±0,62	3,25±0,78	^a p=0,002*
CF (X±SD)			
2-4	1,60±0,46	3,32±0,81	^a p=0,001*
4-6	1,63±0,39	3,37±0,79	^a p=0,001*
6-8	1,90±0,56	3,37±0,81	^a p=0,005*
8-10	2,00±0,56	3,47±0,82	^a p=0,005*

^aT-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Вредности коронарног протока, статистички значајно су се разликовале у сваком од анализираних времена мерења, између различитих група мишева, табела 10. И пре давања алергена, статистички значајно веће вредности коронарног протока измерене су у групи iNOS-/- мишева и тако је остало све до краја десетоминутног периода праћења, табела 14.

4.1.3. iNOS-/-: НЕСЕНЗИБИЛИСАНИ vs. СЕНЗИБИЛИСАНИ

4.1.3.1. Систолни притисак

Статистички значајна промена вредности систолног притиска, уочена је и у групи сензибилисаних и у групи несензибилисаних iNOS-/- мишева, десет минута после давања овалбумина, (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; p=0,001). И пре и после сензибилизације, статистички значајно највећи пад систолног притиска забележена је током прва два минута по давању алергена.

Код несензибилисаних мишева у наредна четири минута бележи се пораст вредности овог параметра а потом у наредна четири минута поновни пад, док код сензибилисаних iNOS-/- мишева пад вредности систолног притиска био је присутан током целог периода праћења, с' тим што је од другог до десетог минута био дискретан. Ниво разлике вредности овог параметра између сензибилисаних и несензибилисаних iNOS-/- мишева није се статистички значајно разликовао током посматраног периода праћења (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*сензибилизација; p=0,138) графикон 11.

Табела 15

Систолни притисак SP

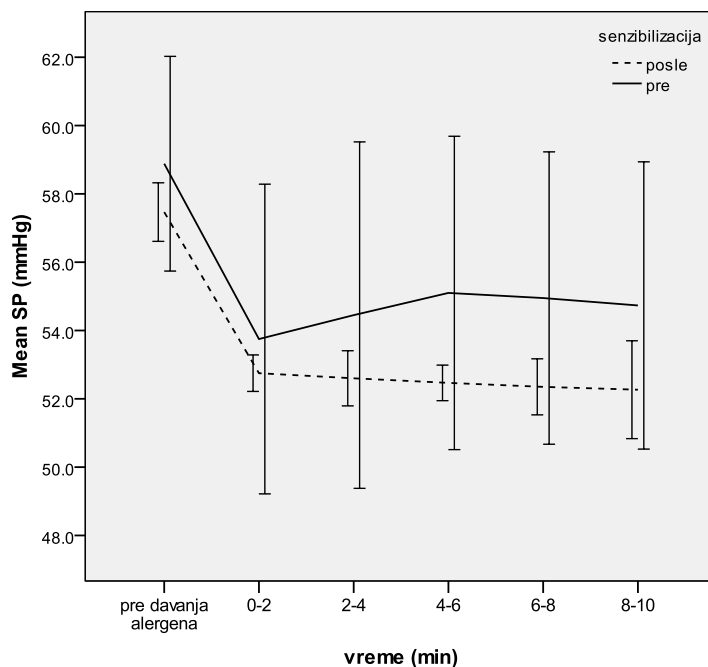
Време мерења	iNOS-/- -сензибилизација		Значајност ^a
	Пре	После	
Период стабилизације	58,88±2,99	57,46±0,82	^a p=0,290
0-2	53,75±4,32	52,75±0,51	^a p=0,586
2-4	54,45±4,83	52,60±0,77	^a p=0,376
4-6	55,10±4,37	52,46±0,50	^a p=0,173
6-8	54,95±4,07	52,35±0,78	^a p=0,156
8-10	54,73±4,01	52,27±1,36	^a p=0,184

^aT-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Анализом вредности систолног притиска између сензибилисаних и несензибилисаних iNOS-/- мишева, у сваком од појединачних времена мерења, није уочена статистички значајна разлика ни у једном од посматраних временских интервала, табела 15.

Графикон 11

Систолни притисак SP



4.1.3.2. Дијастолни притисак

Вредности дијастолног притиска, статистички значајно су се мењале десет минута после давања алергена и у групи сензибилисаних и у групи несензибилисаних iNOS-/- мишева (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; $p=0,000$). У обе групе, дошло је до статистички значајног пораста вредности дијастолног притиска два минута по давању алергена, који је у групи сензибилисаних мишева био праћен благим порастом до осмог минута а потом се бележи благ пад а у групи несензибилисаних мишева запажен је пад до осмог минута па у задња два минута забележен је пораст вредности овог параметра. Између сензибилисаних и несензибилисаних мишева није уочена статистички значајна разлика у начину промене вредности овог параметра током посматраног периода праћења (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*сензибилизација; $p=0,507$) графикон 12.

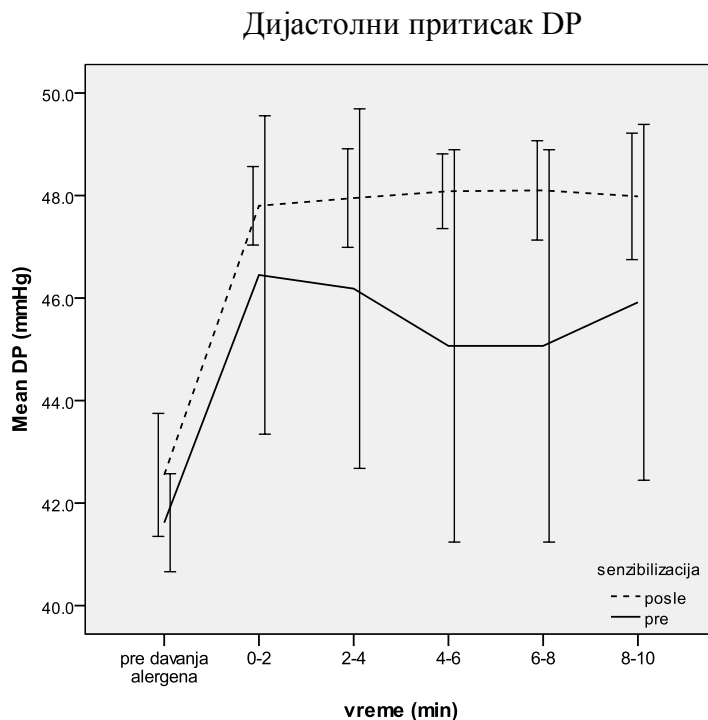
Између анализираних група iNOS-/- мишева пре и после сензибилизације, статистички значајна разлика у вредностима дијастолног притиска забележена је само у осмом минуту по двању алергена и то тако да су веће вредности измерене после сензибилизације, табела 16.

Табела 16

Дијастолни притисак DP				
Време мерења	iNOS-/- -сензибилизација		Значајност ^a	
	Пре	После		
	Период стабилизације	41,62±0,91	42,55±1,14	^a $p=0,149$
DP (X±SD)	0-2	46,45±2,96	47,80±0,73	^a $p=0,303$
	2-4	46,18±3,34	47,95±0,92	^a $p=0,240$
	4-6	45,07±3,65	48,08±0,69	^a $p=0,075$
	6-8	45,02±2,82	48,10±0,92	^a $p=0,029^*$
	8-10	45,91±3,31	47,98±1,17	^a $p=0,180$

^aТ-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Графикон 12



4.1.3.3. Срчана фреквенца

Статистички значајна промена срчане фреквенце, запажена је и код сензибилисаних и код несензибилисаних iNOS^{-/-} мишева, током десетоминутног периода праћења после давања овалбумина (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; $p=0,009$). Није уочена статистички значајна разлика у динамици промене овог параметра током напред наведеног периода праћења а између iNOS^{-/-} мишева пре и после сензибилизације (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*сензибилизација; $p=0,507$) графикон 13. У обе групе запажен је статистички значајан пораст HR два минута после давања алергена, који је био настављен и у наредном периоду у групи несензибилисаних мишева, док је од четвртог минута па до десетог минута по давању алергена забележен константан пад вредности овог параметра. У групи сензибилисаних мишева запажен је пад HR од другог до четвртог минута, па благ пораст до шестог минута и поновни пад до краја периода праћења.

Анализом вредности овог параметра у сваком од посматраних времена мерења, између сензибилисаних и несензибилисаних iNOS^{-/-} мишева,

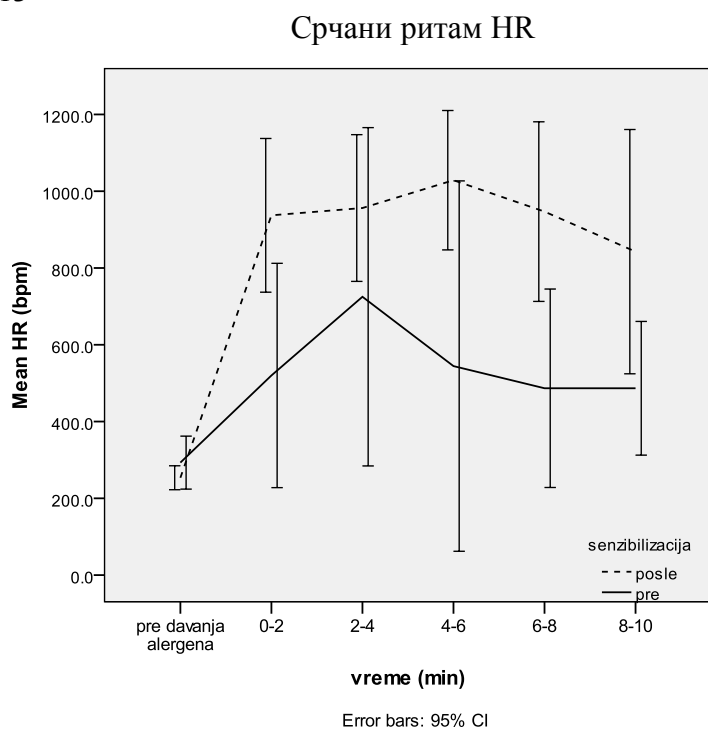
статистички значајна разлика је уочена у другом, шестом, осмом и десетом минути по давању алергена, табела 17.

Табела 17

		Срчани ритам HR		
Време мерења		iNOS-/- -сензибилизација		Значајност ^a
		Пре	После	
	Период стабилизације	293,05±65,74	253,55±29,72	^a p=0,210
HR (X±SD)	0-2	519,98±278,41	937,21±190,75	^a p=0,013*
	2-4	724,98±419,95	956,22±182,12	^a p=0,244
	4-6	544,43±459,65	1028,68±173,04	^a p=0,036*
	6-8	486,73±246,37	946,88±222,92	^a p=0,007*
	8-10	486,68±165,92	842,57±303,23	^a p=0,030*

^aТ-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Графикон 13



4.1.3.4. Средњи перфузиони притисак

Током анализираниог периода праћења по давању овалбумина, статистички значајна промена у вредностима средњег перфузионог притиска уочена је пре и

после сензибилизације iNOS^{-/-} мишева (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; $p=0,025$). Ниво разлике у вредностима овог параметра није се статистички значајно мењао током десетоминутног периода праћења по давању овалбумина (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења* сензибилизација; $p=0,507$) графикон 14. Између сензибилисаних и несензибилисаних iNOS^{-/-} мишева статистички значајна разлика у вредностима МВР није уочена ни у једном од анализираних времена мерења, табела 18.

Табела 18

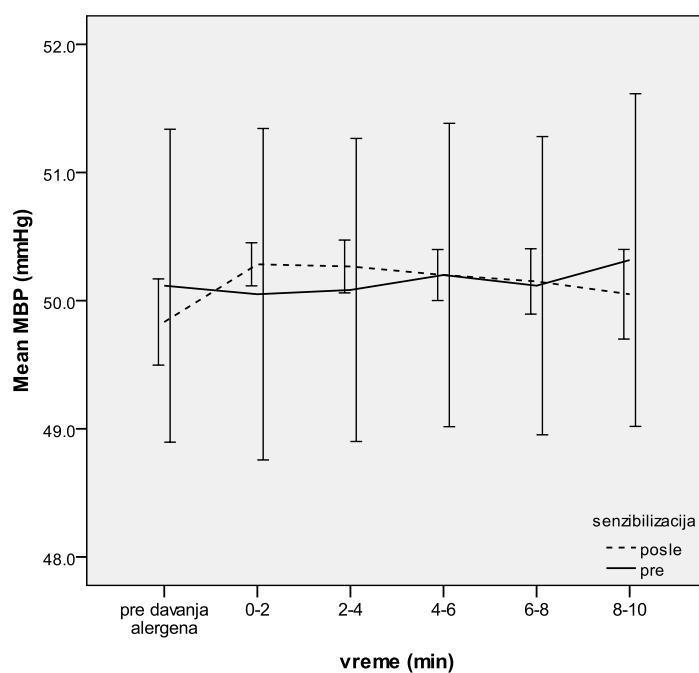
Средњи перфузиони притисак МВР

Време мерења	iNOS ^{-/-} -сензибилизација		Значајност ^a
	Пре	После	
Период стабилизације	50,12±1,16	49,83±0,32	^a $p=0,578$
МВР (X±SD)			
0-2	50,05±1,23	50,28±0,16	^a $p=0,655$
2-4	50,08±1,12	50,27±0,20	^a $p=0,703$
4-6	50,20±1,13	50,20±0,19	^a $p=0,999$
6-8	50,12±1,11	50,15±0,24	^a $p=0,944$
8-10	50,32±1,24	50,05±0,33	^a $p=0,621$

^aт-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Графикон 14

Средњи перфузиони притисак



4.1.3.5. Коронарни проток

Статистички значајна промена коронарног протока, десет минута по давању алергена забележена је и код сензибилисаних и код несензибилисаних iNOS-/- мишева (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; $p=0,001$). У обе анализиране групе мишева дошло је до статистички значајног пада вредности овог параметра, два минута по давању алергена а затим до благог пораста у наредних осам минута. Ниво разлике у вредностима коронарног протока између сензибилисаних и несензибилисаних iNOS-/- мишева, није се статистички значајно мењао током десетоминутног периода праћења по давању алергена (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*сензибилизација; $p=0,373$), графикон 15.

Статистички значајно веће вредности коронарног протока забележене су код iNOS-/- мишева после сензибилизације, и то од почетних вредности пре давања алергена, па све до краја десетог минута од давања алергена, табела 19.

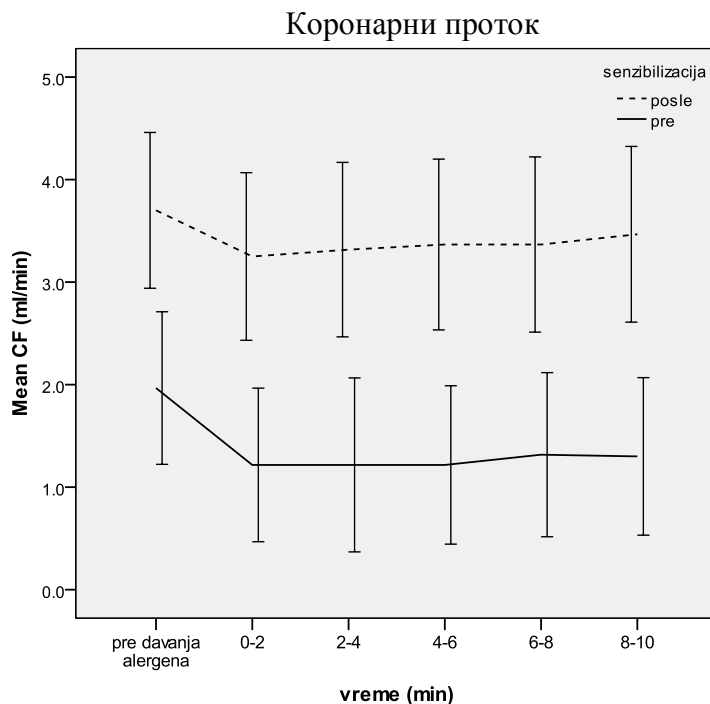
Табела 19

Коронарни проток CP

Време мерења	iNOS-/- -сензибилизација		Значајност ^a	
	Пре	После		
Период стабилизације	1,97±0,71	3,70±0,72	^a $p=0,002^*$	
CF ($\bar{X} \pm SD$)	0-2	1,21±0,71	3,25±0,78	^a $p=0,001^*$
	2-4	1,22±0,81	3,32±0,81	^a $p=0,001^*$
	4-6	1,22±0,72	3,37±0,79	^a $p=0,001^*$
	6-8	1,32±0,76	3,37±0,81	^a $p=0,001^*$
	8-10	1,30±0,73	3,47±0,82	^a $p=0,001^*$

^aТ-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Графикон 15



4.1.4 WILD: НЕСЕНЗИБИЛИСАНИ vs. СЕНЗИБИЛИСАНИ

4.1.4.1. Систолни притисак

И пре и после сензибилизације, код wild мишева, запажен је статистички значајна промена систолног притиска, у току дестоминутног периода праћења после давања овалбумина (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; $p=0,001$), графикон 16. Између сензибилисаних и несензибилисаних wild мишева, уочена је статистички значајна разлика у динамици промене овог параметра током анализираних периода праћења после давања алергена (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*сензибилизација; $p=0,014$), графикон 16.

Као што је напред речено, у обе групе током прва четири минута бележи се пад вредности систолног притиска, који у групи сензибилисаних мишева био праћен порастом у наредних шест минута а у групи несензибилисаних порастом до шестог минута па поновним падом од шестог до десетог минута.

Табела 20

Систолни притисак SP

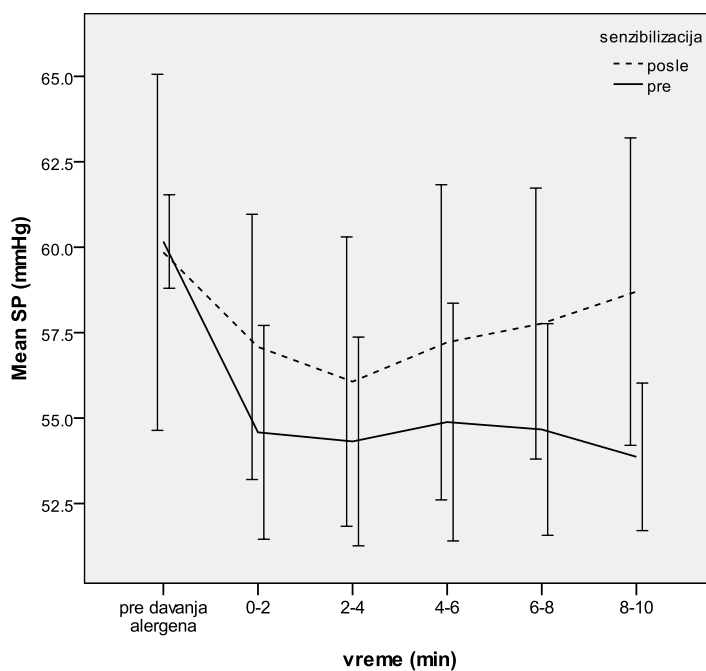
Време мерења	wild-сензибилизација		Значајност ^a
	Пре	После	
Период стабилизације	60,17±1,30	59,85±4,96	^a p=0,883
SP (X±SD)			
0-2	54,58±2,98	57,08±3,70	^a p=0,226
2-4	54,32±2,91	56,07±4,03	^a p=0,409
4-6	54,88±3,31	57,22±4,39	^a p=0,324
6-8	54,67±2,95	57,77±3,78	^a p=0,144
8-10	53,87±2,06	58,70±4,28	^a p=0,032*

^aT-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Анализом вредности систолног притиска у сваком од времена праћења, статистички значајна разлика између сензибилисаних и несензибилисаних мишева запажена је само у десетом минути по давању алергена и то тако да су веће вредности овог параметра измерене у групи сензибилисаних мишева, табела 20.

Графикон 16

Систолни притисак SP



4.1.4.2. Дијастолни притисак

Током десетоминутног периода праћења, уочена је статистички значајна промена вредности дијастолног притиска код wild мишева, пре и после сензибилизације (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; $p=0,043$), графикон 17. Пре и после сензибилизације, по давању алергена долази до пораста вредности DP током прва 2 мин, док у периоду од 4-10 мин се бележи у групи несензибилисаних мишева благо осциловање вредности овог параметра. После сензибилизације почетни пораст DP током прва 2 мин био је мањи него пре сензибилизације али су биле веће осцилације у смислу наизменичног пада и пораста у наредних 8 мин. Ниво разлике у вредностима овог параметра, током десетоминутног анализираног периода после давања алергена, статистички значајно се мењао (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*сензибилизација; $p=0,045$), и то тако да између ових група мишева разлика у вредностима дијастолног притиска није била статистички значајна пре давања алергена, док су се после давања алергена, статистички значајно веће вредности овог параметра мериле код несензибилисаних мишева табела 21.

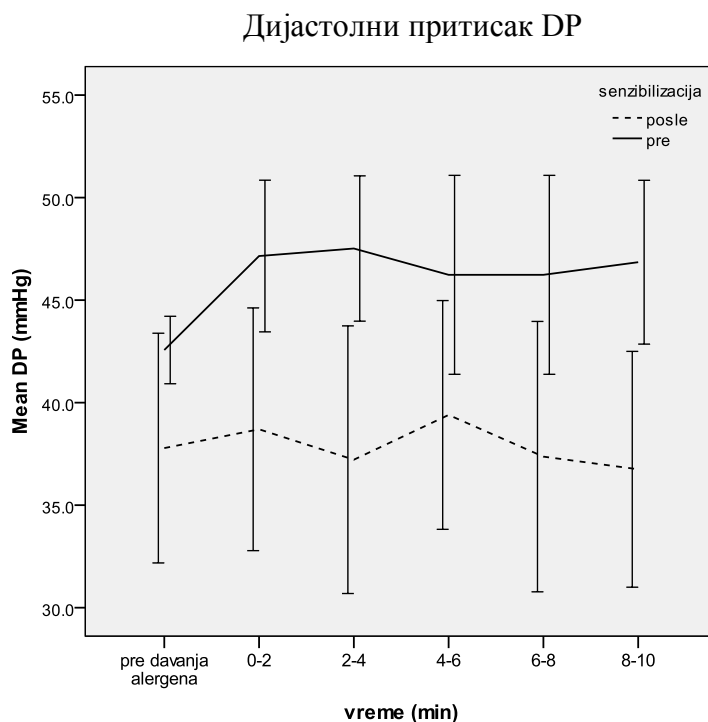
Табела 21

Дијастолни притисак DP

Време мерења	wild-сензибилизација		Значајност ^a
	Пре	После	
Период стабилизације	42,57±1,57	37,78±5,34	^a $p=0,061$
0-2	47,15±3,52	38,70±5,64	^a $p=0,011^*$
2-4	47,52±3,37	37,22±6,22	^a $p=0,005^*$
4-6	46,23±4,62	39,40±5,32	^a $p=0,039^*$
6-8	46,90±3,74	37,37±6,28	^a $p=0,010^*$
8-10	46,85±3,80	36,75±5,48	^a $p=0,024^*$

^aт-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Графикон 17



4.1.4.3. Срчана фреквенца

Табела 22

Срчани ритам HR

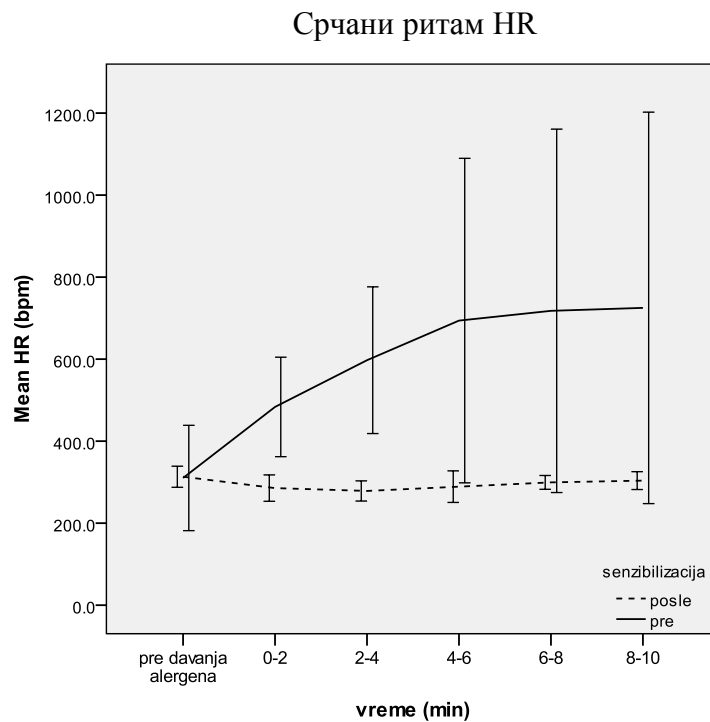
Време мерења	wild-сензибилизација		Значајност ^a
	Пре	После	
Период стабилизације	310,17±122,37	313,23±24,50	^a p=0,953
HR			
(X±SD)			
0-2	483,42±115,59	285,50±30,58	^a p=0,002*
2-4	597,37±170,42	278,55±23,34	^a p=0,001*
4-6	693,95±377,06	289,02±36,66	^a p=0,026*
6-8	717,78±422,26	299,43±16,02	^a p=0,036*
8-10	725,00±454,85	303,75±20,73	^a p=0,047*

^aT-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Срчана фреквенца, и код сензибилисаних и код несензибилисаних wild мишева, није показала статистички значајну промену после давања алергена, сем значајног почетног пораста током прва два минута праћења (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; $p=0,368$), графикон 18. Начин промене вредности овог параметра по давању алергена, статистички значајно се

разликовао између сензибилисаних и несензибилисаних мишева (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*сензибилизација; $p=0,015$), графикон 18. И код овог параметра, није постојала статистички значајна разлика у његовим вредностима пре давања алергена, док су почев од другог па све до десетог минута праћења, статистички значајно веће вредности срчане фреквенце бележене код несензибилисаних мишева, табела 22.

Графикон 18



4.1.4.4. Средњи перфузиони притисак

Вредности средњег перфузионог притиска, код wild мишева статистички значајно су се мењале десет минута по давању овалбумина и пре и после сензибилизације (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; $p=0,001$), графикон 19. Статистички значајна разлика уочена је и у динамици промене вредности овог параметра између група током посматраног десетоминутног периода (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*сензибилизација; $p=0,000$). Пре сензибилизације забележен је пораст вредности МВР током прва два минута по давању алергена, а затим континуирани

пад, док после сензибилизације током прва четири минута бележи се пад вредности МВР, а потом наизменични пад и пораст, графикон 19.

У сваком од времена мерења, вредности овог параметра биле су статистички значајно веће код несензибилисаних мишева, табела 23.

Табела 23

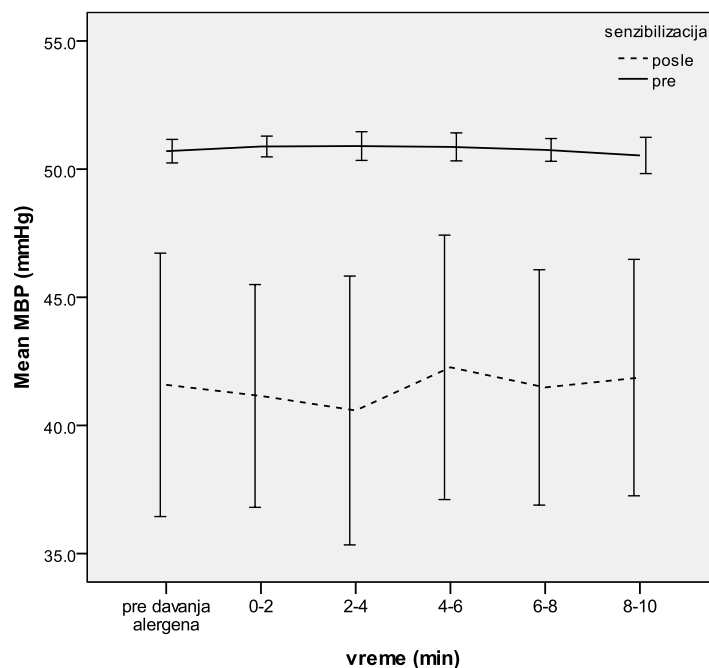
Средњи перфузиони притисак МВР

Време мерења	wild-сензибилизација		Значајност ^a
	Пре	После	
Период стабилизације	50,70±0,44	41,56±4,90	^a p=0,001*
0-2	50,88±0,39	41,15±4,14	^a p=0,000*
2-4	50,90±0,53	40,58±5,00	^a p=0,001*
4-6	50,87±0,52	42,27±4,92	^a p=0,002*
6-8	50,75±0,42	41,48±4,37	^a p=0,000*
8-10	50,53±0,67	41,87±4,39	^a p=0,001*

^aт-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Графикон 19

Средњи перфузиони притисак



4.1.4.5. Коронарни проток

И пре и после сензибилизације, вредности коронарног протка статистички значајно су се мењале после давања алергена у групи wild мишева (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; $p=0,003$), графикон 20. У групи несензибилисаних мишева запажа се значајан пад коронарног протока два минута по давању овалбумина, затим нешто слабије изражен пад у наредна четири минута, а потом благи пораст до краја периода праћења. После сензибилизације, такође се запажа значајан пад два минута по давању алергена а затим континуирани пораст до краја периода праћења. Ниво разлике у вредностима коронарног протока, током десетоминутног периода праћења, између сензибилисаних и несензибилисаних мишева статистички значајно се мењао (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*сензибилизација; $p=0,012$).

Наиме, између сензибилисаних и несензибилисаних wild мишева пре давања алергена, разлика у вредностима коронарног протока није била статистички значајна, док су се по давању алергена статистички значајно веће вредности овог параметра мериле код сензибилисаних мишева, табела 24.

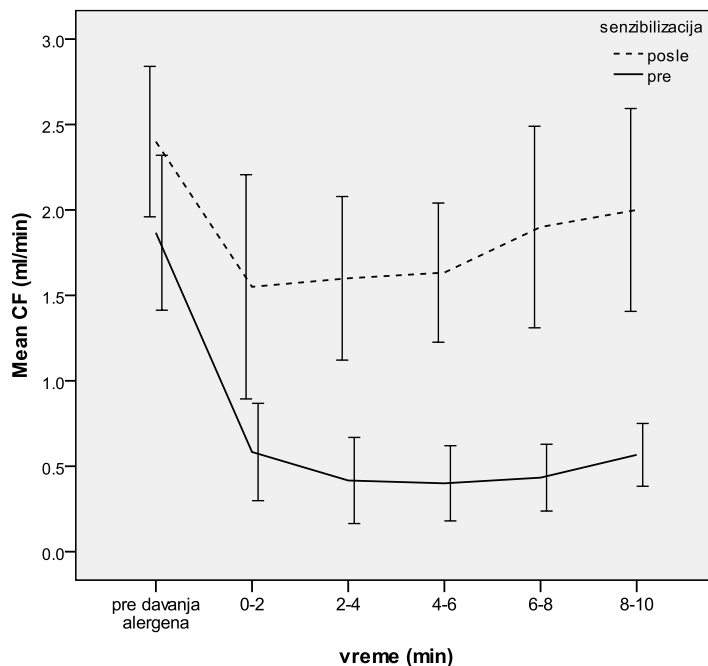
Табела 24

		Коронарни проток CP		
Време мерења	wild-сензибилизација		Значајност ^a	
	Пре	После		
	Период стабилизације	1,87±0,43	2,40±0,42	^a $p=0,055$
CF ($\bar{X}\pm SD$)	0-2	0,58±0,27	1,55±0,62	^a $p=0,006^*$
	2-4	0,42±0,24	1,60±0,46	^a $p=0,000^*$
	4-6	0,40±0,21	1,63±0,39	^a $p=0,000^*$
	6-8	0,43±0,19	1,90±0,56	^a $p=0,000^*$
	8-10	0,57±0,17	2,00±0,56	^a $p=0,000^*$

^aТ-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Графикон 20

Коронарни проток



4.2. OKSIDACIONI STATUS

4.2.1. ПРЕ СЕНЗИБИЛИЗАЦИЈЕ: iNOS^{-/-} vs. WILD

4.2.1.1. Индекс липидне пероксидације (TBARS)

Није уочена статистички значајна промена вредности TBARS-a, током десетоминутног периода по давању овалбумина, ни у једној од анализираних група мишева: wild и iNOS^{-/-} (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; $p=0,245$). У групи wild мишева, два минута по давању алергена долази до статистички значајног пада вредности TBARS-a, које настављају да се смањују, само много слабијим интензитетом у периоду од другог до осмог минута, док у последња два минута праћења бележи се пораст вредности овог параметра, графикон 21. Код iNOS^{-/-} мишева варирања вредности овог параметра било је слабијег интензитета и без статистички значајних промена током десет минута праћења од момента давања алергена, графикон 21. Вредности TBARS-a имале су наизменичан пад и пораст током десет минута праћења у групи iNOS^{-/-} мишева. Статистички значајна разлика уочена је у начину промене вредности овог

параметра у посматраном периоду праћења, између wild и iNOS^{-/-} мишева (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*врста миша; p=0,043), графикон 21. Као што је напред описано, у групи wild мишева у прва два минута по давању алергена бележимо вишеструки пад вредности овог параметра, док је у групи iNOS^{-/-} мишева варирање вредности TBARS-а било незнатно.

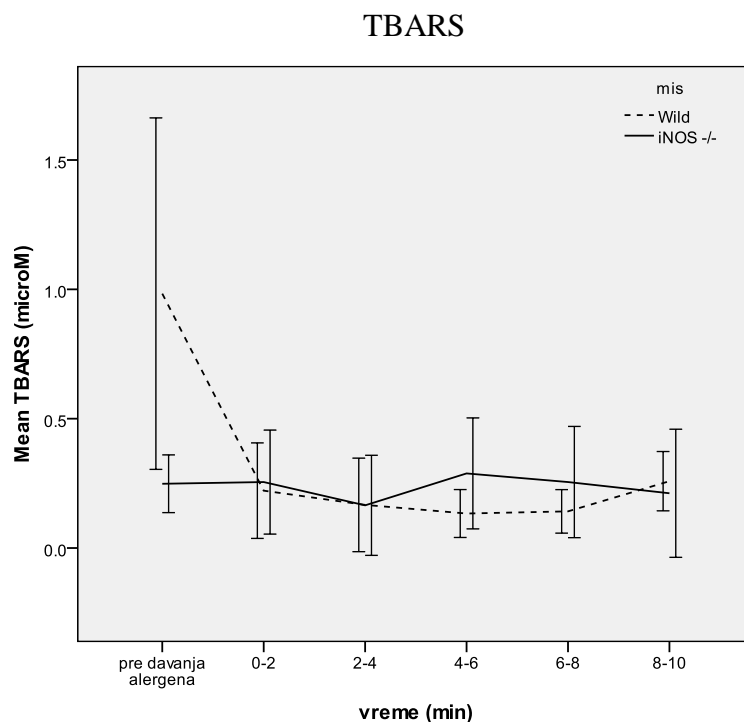
Табела 25

Време мерења		TBARS		Значајност ^a
		Миш		
		wild	iNOS ^{-/-}	
TBARS ($\bar{X} \pm SD$)	Период стабилизације	0,98±0,65	0,25±0,11	p=0,021*
	0-2	0,22±0,17	0,25±0,19	p=0,760
	2-4	0,17±0,17	0,16±0,18	p=0,987
	4-6	0,13±0,09	0,29±0,20	p=0,119
	6-8	0,14±0,08	0,25±0,20	p=0,236
	8-10	0,26±0,11	0,21±0,24	p=0,670

^at-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Анализом вредности TBARS-а у сваком од времена мерења, статистички значајну разлику између iNOS^{-/-} и wild мишева бележимо само у периоду пре давања алергена, и то тако да су статистички значајно веће вредности овог параметра измерене код wild мишева, табела 25.

Графикон 21



4.2.1.2. Азот моноксид (NO)

Табела 26

NO			
Време мерења	Миш		Значајност ^a
	wild	iNOS ^{-/-}	
Период стабилизације	3,85±1,94	5,99±2,75	p=0,150
0-2	0,86±0,41	3,39±1,82	p=0,008*
2-4	0,78±0,73	3,26±2,17	p=0,024*
4-6	0,67±0,29	3,29±1,66	p=0,003*
6-8	0,67±0,31	3,40±1,99	p=0,008*
8-10	0,95±0,38	3,76±2,10	p=0.009*

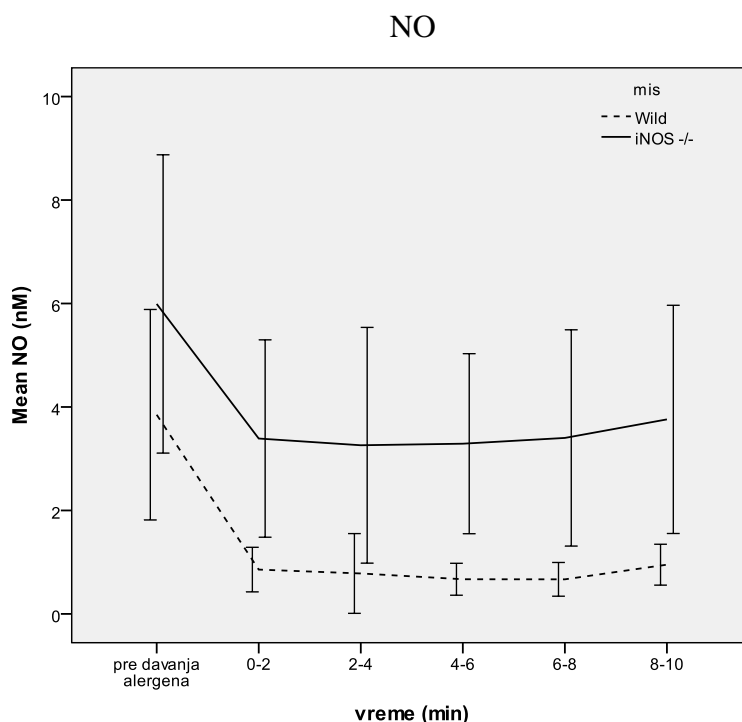
^aТ-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Вредности NO, статистички значајно су се мењале и код iNOS^{-/-} и код wild мишева, десет минута по давању алергена, у периоду пре сензибилизације (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; p=0,011), графикон 22. У обе групе мишева дошло је до статистички значајног пада вредности овог параметра два минута по давању алергена, док је у наредних осам минута,

варирање вредности овог параметра у обе групе мишева било без статистички значајне разлике. Ниво разлике у вредностима NO између wild и iNOS^{-/-} мишева није се статистички значајно мењао током десетоминутног периода праћења (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*врста миша; p=0,949), графикон 22.

Статистички значајна разлика у вредностима NO, пре сензибилизације, нађена је у свим временима мерења од другог до десетог минута и то тако да су статистички значајно веће вредности овог параметра мерене код iNOS^{-/-} мишева, табела 26. Наиме, пре давања алергена није постојала статистички значајна разлика у вредностима овог параметра између wild и iNOS^{-/-} мишева, по давању алергена забележен је већи пад вредности NO код wild мишева тако да су измерене статистички значајно мање вредности код ове врсте мишева, што се одржало до краја периода праћења.

Графикон 22



4.2.1.3. Супероксид анјон радикал (O₂⁻)

Пре сензибилизације, није уочена статистички значајна промена у вредностима O₂⁻, током десетоминутног периода праћења по давању алергена, ни

код wild ни код iNOS^{-/-} мишева (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; $p=0,089$), графикон 23. Статистички значајна разлика није уочена ни у динамици промене вредности овог параметра, између анализираних група мишева (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*врста миша; $p=0,850$), графикон 23.

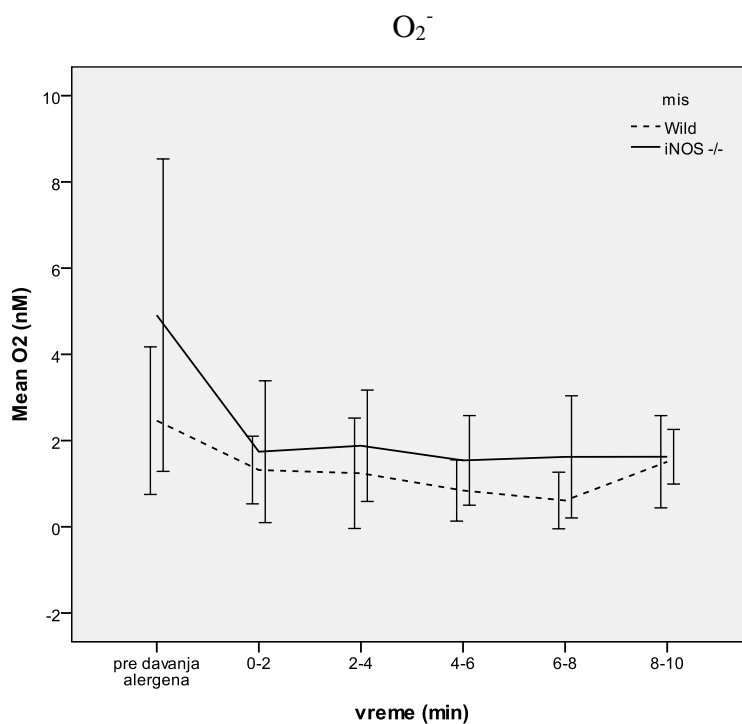
Између wild и iNOS^{-/-} мишева, није уочена статистички значајна разлика у востима O_2^- , ни у једном од анализираних времена мерења, табела 27.

Табела 27

		O_2^-		
Време мерења		Миш		Значајност ^a
		wild	iNOS ^{-/-}	
O_2^- ($\bar{X} \pm SD$)	Период стабилизације	2,46 \pm 1,63	4,91 \pm 3,45	$p=0,148$
	0-2	1,31 \pm 0,75	1,74 \pm 1,57	$p=0,562$
	2-4	1,24 \pm 1,22	1,88 \pm 1,23	$p=0,388$
	4-6	0,84 \pm 0,67	1,54 \pm 0,99	$p=0,184$
	6-8	0,61 \pm 0,62	1,62 \pm 1,35	$p=0,127$
	8-10	1,51 \pm 1,01	1,62 \pm 0,60	$p=0,814$

^aт-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Графикон 23



4.2.1.4. Водоник пероксид (H₂O₂)

Статистички значајна промена вредности H₂O₂, у периоду од пре давања алергена до краја десетоминутног периода праћења по његовом давању, забележена је и код iNOS^{-/-} и код wild мишева (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; p=0,024), графикон 24. Статистички значајан пад вредности забележен је током прва два минута по давању алергена у обе групе мишева, који је настављен и у наредна два минута. Од четвртог до дестог минута у групи wild мишева забележен је пораст вредности овог параметра али слабијег инетзитета него што је био пад у претходном периоду тако да су на крају дестог минута вредности овог параметра биле и даље значајно мање него почетне. Код iNOS^{-/-} мишева, од четвртог до осмог минута бележи се пораст вредности H₂O₂, па у последња два минута праћења поновни пад. Начин промене вредности овог параметра, десет минута после давања алергена није се статистички значајно разликовао између wild и iNOS^{-/-} мишева, пре сензибилизације (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*врста миша; p=0,649), графикон 24.

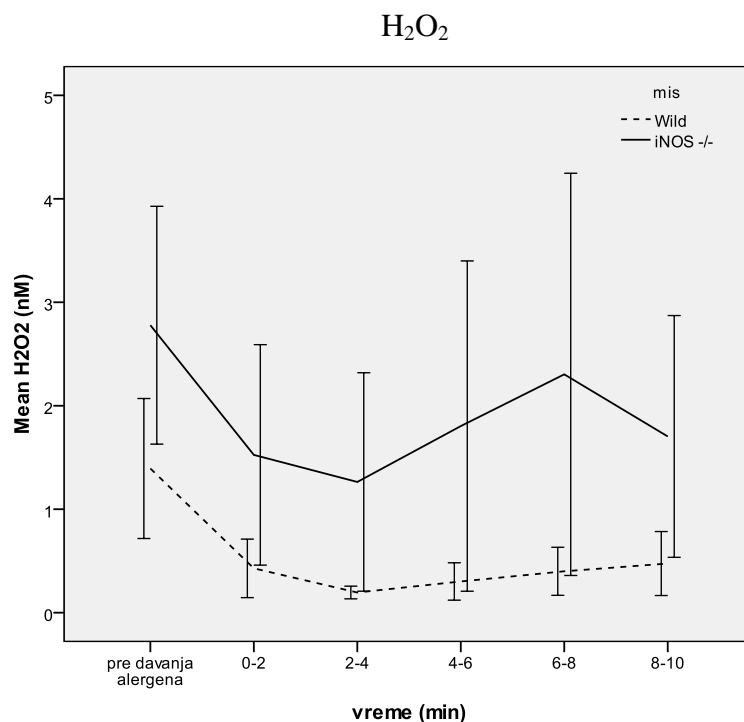
Табела 28

		H ₂ O ₂		Значајност ^a
Време мерења	Период стабилизације	Миш		
		wild	iNOS ^{-/-}	
H ₂ O ₂ (X±SD)	0-2	1,39±0,64	2,78±1,09	p=0,024*
	2-4	0,43±0,27	1,52±1,01	p=0,028*
	4-6	0,19±0,06	1,26±1,00	p=0,027*
	6-8	0,30±0,17	1,80±1,52	p=0,037*
	8-10	0,40±0,22	2,30±1,85	p=0,031*
	8-10	0,47±0,29	1,70±1,11	p=0,026*

^aт-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

У сваком од анализираних времена мерења измерене су статистички значајно веће вредности овог параметра код iNOS^{-/-} мишева, табела 28.

Графикон 24



4.2.2. ПОСЛЕ СЕНЗИБИЛИЗАЦИЈЕ: iNOS^{-/-} vs. WILD

4.2.2.1. Индекс липидне пероксидације (TBARS)

Није уочена статистички значајна промена TBARS-a, током дестоминутног праћења по давању алергена, ни у једној од посматраних група мишева: сензибилисаних wild и сензибилисаних iNOS^{-/-} мишева (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; $p=0,304$), графикон 25. Статистички значајна разлика није уочена ни у начину промене вредности овог параметра између анализираних група мишева током напред наведеног периода праћења (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*врста миша; $p=0,443$), графикон 25.

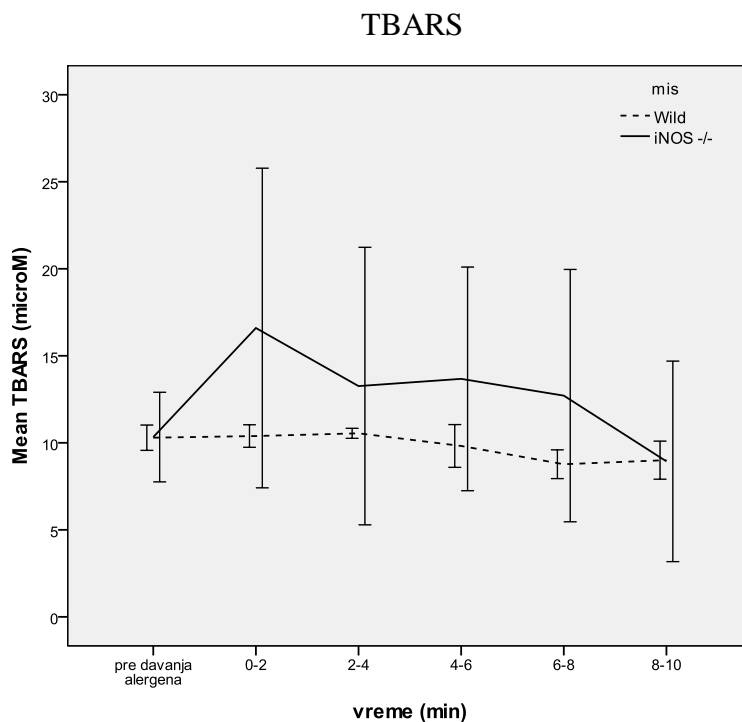
Анализом вредности TBARS-a у сваком од времена мерења, између посматраних група мишева wild и iNOS^{-/-} после сензибилизације, почев од периода пре давања алергена па све до десет минута по његовом давању, а мерених на свака два минута, статистички значајна разлика између напред наведених група мишева није уочена ни у једном од интервала мерења, табела 29.

Табела 29

		ТВАРS		
Време мерења		Миш		Значајност ^a
		wild	iNOS-/-	
ТВАРS ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	Период стабилизације	10,29±0,69	10,33±2,45	p=0,974
	0-2	10,39±0,62	16,60±8,75	p=0,114
	2-4	10,55±0,27	13,26±7,60	p=0,403
	4-6	9,82±1,17	13,67±6,12	p=0,161
	6-8	8,77±0,79	12,71±6,91	p=0,195
	8-10	9,00±1,04	8,93±5,49	p=0,976

^aT-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Графикон 25



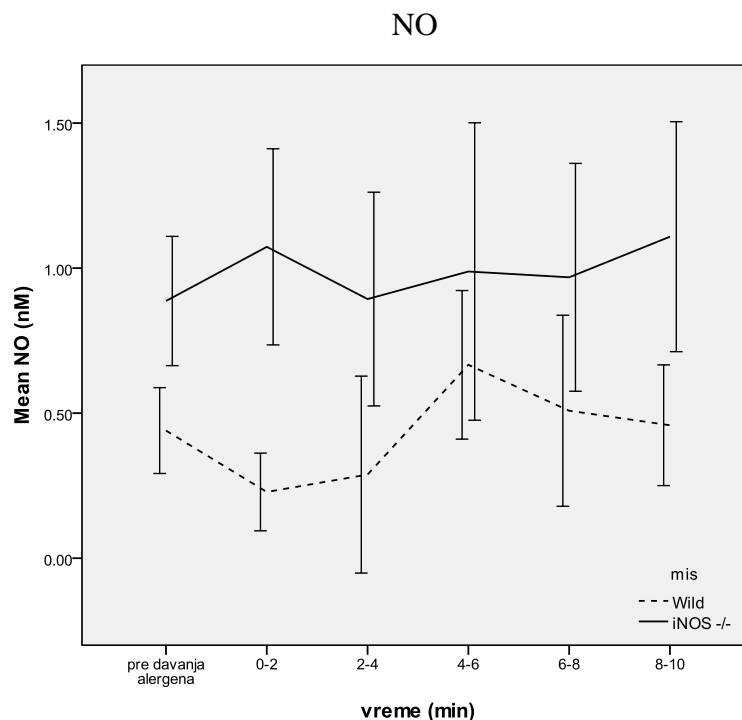
4.2.2.2. Азот моноксид (NO)

После сензибилизације, није уочена статистички значајна промена вредности NO, десет минута по давању алергена, ни у једној од посматраних група мишева; iNOS-/- и wild (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; p=0,380), графикон 26. Статистички значајна разлика уочена је нивоу

разлике у вредностима овог параметра, између анализираних група мишева, током посматраног периода праћења (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*врста миша; $p=0,004$), графикон 26. У групи iNOS^{-/-} мишева, и пре давања алергена мериле су се статистички значајно веће вредности NO него у групи wild мишева. Код iNOS^{-/-} мишева наизменично, на свака два минута, расле су и падале вредности овог параметра. Током прва два минута забележен је пораст, па затим пад вредности NO у наредна два минута, тако да је у задња два минута бележен пораст вредности овог параметра. Иако је долазило и до пада вредности NO, на крају периода праћења у овој групи мишева биле су статистички значајно веће него пре давња алергена. Код wild мишева, два минута по давању алергена бележи се пад вредности NO, па раст у наредна четири минута и поновни пад вредности NO током четири последња минута праћења. На крају десетоминутног периода посматрања, вредности NO у групи wild мишева биле су приближно исте као и на почетку, графикон 26.

Између wild и iNOS^{-/-} мишева, после сензибилизације, статистички значајна разлика у вредностима NO по давњу алергена није уочена само у периоду од четвртог до шестог минута, табела 30.

Графикон 26



Табела 30

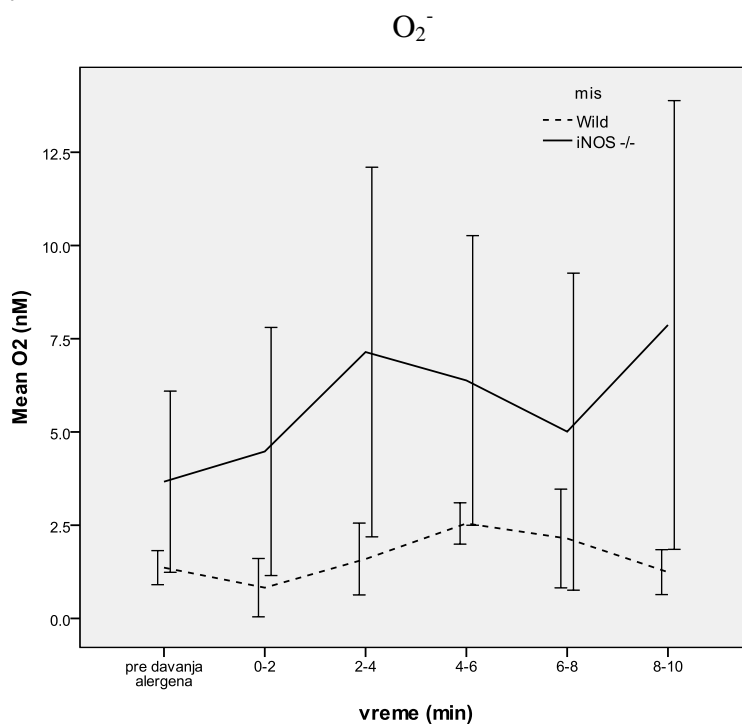
		NO		
Време мерења		Миш		Значајност ^a
		wild	iNOS ^{-/-}	
NO ($\bar{X} \pm SD$)	Период стабилизације	0,44 \pm 0,14	0,89 \pm 0,21	p=0,002*
	0-2	0,23 \pm 0,13	1,07 \pm 0,32	p=0,000*
	2-4	0,29 \pm 0,32	0,89 \pm 0,35	p=0,011*
	4-6	0,67 \pm 0,24	0,99 \pm 0,49	p=0,180
	6-8	0,51 \pm 0,31	0,97 \pm 0,37	p=0,044*
	8-10	0,46 \pm 0,20	1,11 \pm 0,38	p=0,004*

^aT-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

4.2.2.3. Супероксид анјон радикал (O_2^-)

Вредности O_2^- , током десет минута по давању алергена, у групи сензибилизаних wild и iNOS^{-/-} мишева, нису се статистички значајно мењале (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; p=0,084), графикон 27.

Графикон 27



Табела 31

Време мерења		Миш		Значајност ^a
		wild	iNOS-/-	
O ₂ (X±SD)	Период стабилизације	1,36±0,43	3,37±2,31	p=0,038*
	0-2	0,82±0,74	4,48±3,17	p=0,021*
	2-4	1,59±0,92	7,14±4,72	p=0,018*
	4-6	2,54±0,53	6,38±3,70	p=0,031*
	6-8	2,14±1,26	5,01±4,05	p=0,129
	8-10	1,24±0,57	7,87±5,73	p=0,018*

^aT-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Статистички значајна промена није уочена ни у нивоу разлике између анализираних група мишева, током посматраног периода праћења (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*врста миша; p=0,364), графикон 27. Током десет минута праћења, почев од момента пре давања алергена, статистички значајно веће вредности O₂⁻ мерене су у групи iNOS-/- мишева.

Анализом вредности овог параметра у сваком од периода праћења, статистички значајна разлика између сензибилизованих wild и iNOS-/- мишева није забележена само осам минута по давању алергена, табела 31.

4.2.2.4. Водоник пероксид (H₂O₂)

После сензибилизације wild и iNOS-/- мишева, вредности H₂O₂ нису се статистички значајно мењале ни у једној од група мишева током дестоминутног периода праћења по давању овалбумина (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; p=0,646), графикон 28. Статистички значајна разлика између сензибилизованих wild и iNOS-/- мишева, није уочена ни у динамици промена вредности овог параметра током анализираних временског периода (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*врста миша; p=0,732), графикон 28.

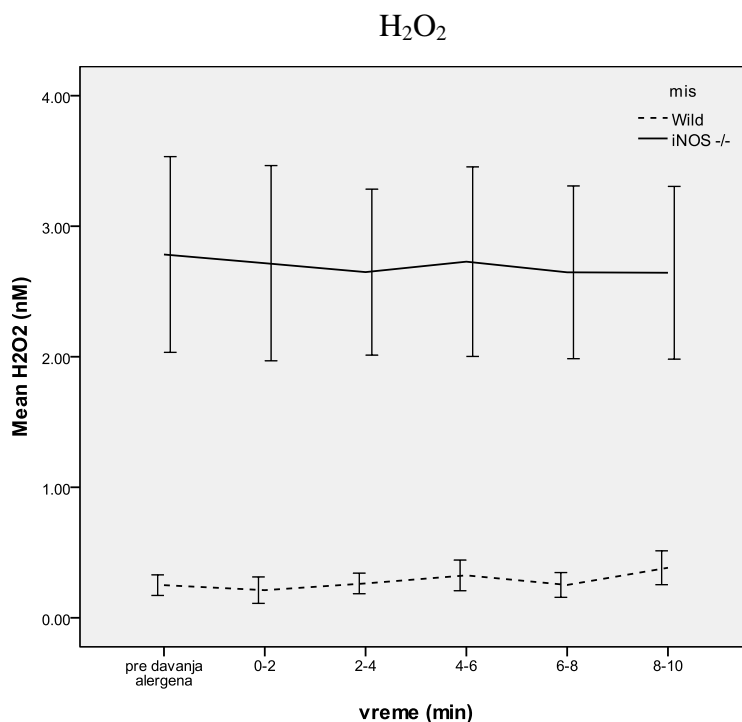
Табела 32

		H ₂ O ₂		
Време мерења		Миш		Значајност ^a
		wild	iNOS ^{-/-}	
H ₂ O ₂ (X±SD)	Период стабилизације	0,25±0,07	2,78±0,71	p=0,000*
	0-2	0,21±0,10	2,71±0,72	p=0,000*
	2-4	0,26±0,07	2,65±0,60	p=0,000*
	4-6	0,32±0,11	2,73±0,69	p=0,000*
	6-8	0,25±0,09	2,65±0,63	p=0,000*
	8-10	0,38±0,12	2,64±0,63	p=0,000*

^aT-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

У сваком од анализираних времена мерења, статистички значјно веће вредности H₂O₂, мерене су код iNOS^{-/-} мишева, табела 32.

Графикон 28



4.2.3. iNOS-/-: НЕСЕНЗИБИЛИСАНИ vs. СЕНЗИБИЛИСАНИ

4.2.3.1. Индекс липидне пероксидације (TBARS)

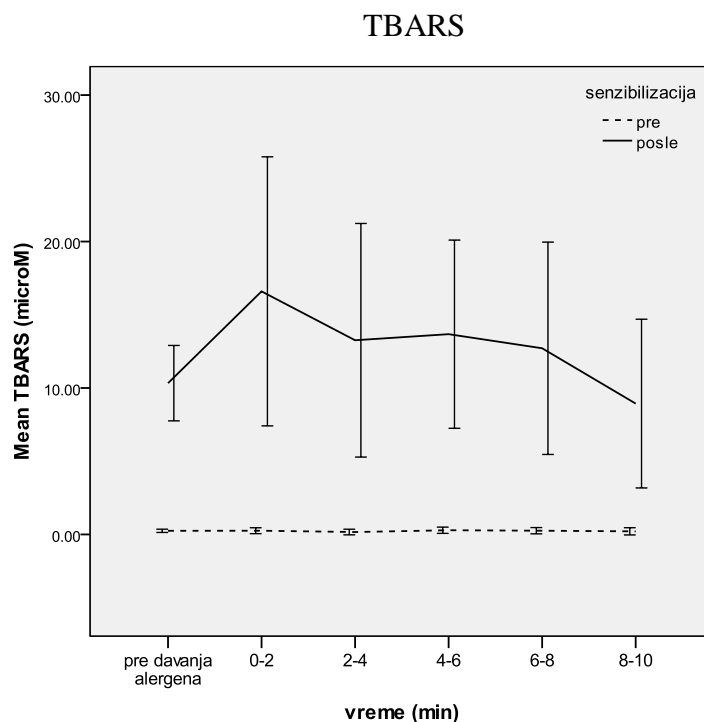
Као што је напред већ речено и описано у групи iNOS-/- мишева током дестоминутног праћења по давању алергена, није забележена статистички значајна промена у вредностима TBARS, ни пре ни после сензибилизације (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; $p=0,306$), графикон 29. Статистички значајна промена, током посматраног периода, није забележена ни у нивоу разлику у вредностима овог параметра између посматраних група: сензибилисаних и несензибилисаних iNOS-/- мишева (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*сензибилизација; $p=0,284$), графикон 29. Наиме и пре давања алергена, као и током дестоминутног периода праћења, статистички значајно веће вредности забележене су код iNOS-/- мишева после сензибилизације, табела 33.

Табела 33

Време мерења		TBARS		Значајност ^a
		iNOS-/- -Сензибилизација Пре	После	
TBARS ($\bar{X} \pm SD$)	Период стабилизације	0,25 \pm 0,11	10,33 \pm 2,45	$p=0,000^*$
	0-2	0,25 \pm 0,19	16,60 \pm 8,75	$p=0,001^*$
	2-4	0,16 \pm 0,18	13,26 \pm 7,60	$p=0,002^*$
	4-6	0,29 \pm 0,20	13,67 \pm 6,12	$p=0,000^*$
	6-8	0,25 \pm 0,20	12,71 \pm 6,91	$p=0,001^*$
	8-10	0,21 \pm 0,24	8,93 \pm 5,49	$p=0,003^*$

^aТ-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Графикон 29



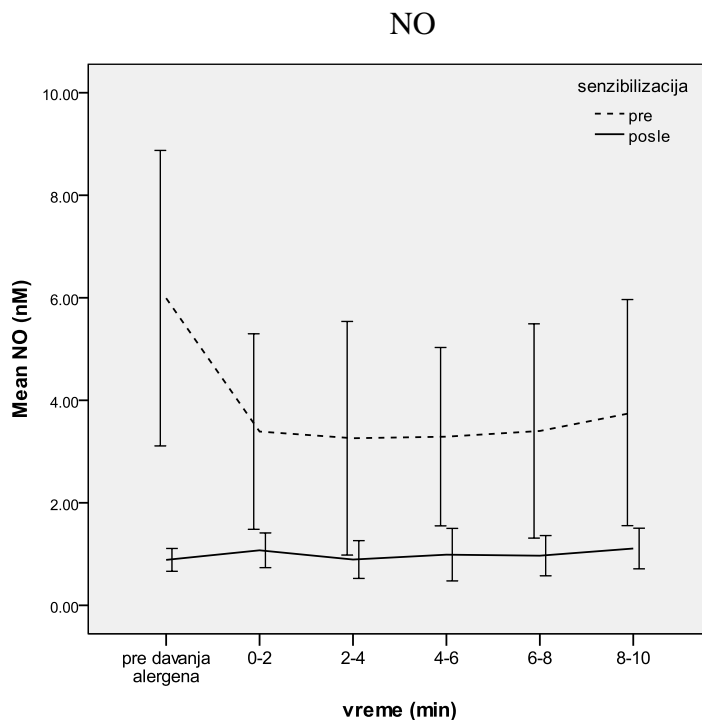
Анализом вредности TBARS-а, у сваком од посматраних периода мерења пре и после сензибилизације, почев од пре давања алергена па на сваких два минута, до краја десетоминутног периода праћења, уочена је статистички значајна разлика у вредностима овог параметра и то тако да су статистички значајно веће вредности мерене код iNOS-/- мишева биле после сензибилизације, табела 33.

4.2.3.2. Азот моноксид (NO)

Статистички значајна промена вредности NO, у групи iNOS-/- мишева забележена је пре, док после сензибилизације током дестоминутног периода праћења није било статистички значајне разлике (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; $p=0,002$), графикон 30. Пре сензибилизације, током прва два минута по давању алергена забележен је статистички значајан пад вредности NO, који је настављен и у наредна два минута али знатно слабијег интензитета. У периоду од четвртог минута до краја периода праћења забележен је константан благи пораст вредности NO. После сензибилизације, два минута по давању алергена забележен је пораст вредности NO па потом пад и такав наизменичан пад и пораст вредности овог параметра задржан је до краја анализираних периода. Промене вредности NO после сензибилизације а по давању

алергена биле су статистички значајно слабијег интензитета него пре сензибилизације (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*сензибилизација; $p=0,002$), графикон 30.

Графикон 30



Табела 34

NO

Време мерења	iNOS-/- -Сензибилизација		Значајност ^a
	Пре	После	
Период стабилизације	5,99±2,75	0,89±0,21	$p=0,001^*$
NO ($X \pm SD$)	0-2	3,39±1,82	$p=0,012^*$
	2-4	3,26±2,17	$p=0,025^*$
	4-6	3,29±1,66	$p=0,009^*$
	6-8	3,40±1,99	$p=0,015^*$
	8-10	3,76±2,10	1,11±0,38

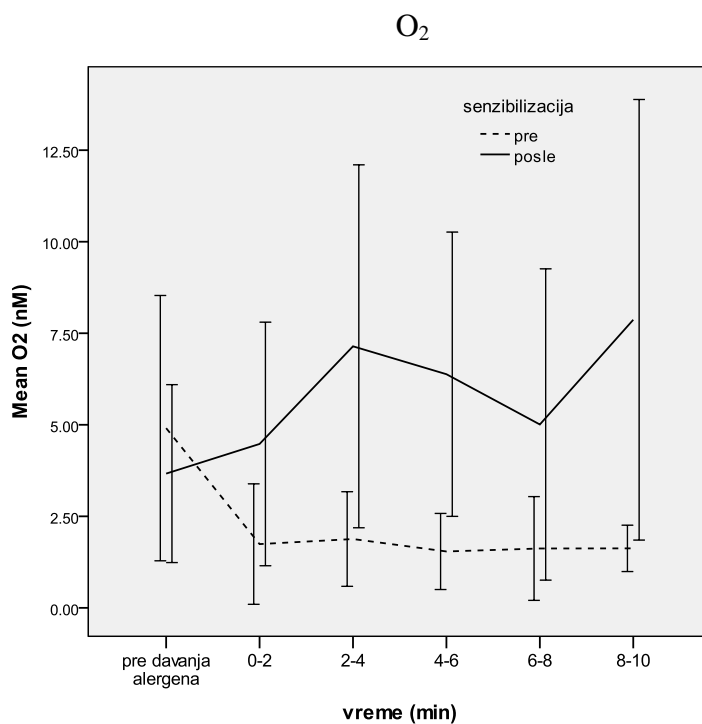
^aТ-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

У сваком од посматраних времена мерења, бележених у односу на давање алергена, вредности NO пре сензибилизације, биле су статистички значајно веће него после сензибилизације, табела 34.

4.2.3.3. Супероксид анјон радикал (O_2^-)

Вредности O_2^- , у периоду од десет минута по давању алергена, у групи iNOS^{-/-} мишева посматраних пре и после сензибилизације, нису се статистички значајно мењале (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; $p=0,473$), графикон 31. Статистички значајна разлика није уочена ни у динамици промене вредности овог параметра, између сензибилисаних и несензибилисаних iNOS^{-/-} мишева, током опсервираног десетоминутног периода по давању алергена (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*сензибилизација; $p=0,091$), графикон 31.

Графикон 31



Анализом вредности O_2^- у сваком од појединачних периода мерења (пре давања алергена, другог, четвртог, шестог, осмог и дестог минута по његовом давању), статистички значајна разлика запажена је четвртог, шестог и дестог минута по давању алергена, и то тако да су статистички значајно веће вредности измерене после сензибилизације, табела 35.

Табела 35

Време мерења		O ₂ ⁻		Значајност ^a
		iNOS-/- -Сензибилизација		
		Пре	После	
O ₂ (X±SD)	Период стабилизације	4,91±3,45	3,37±2,31	p=0,481
	0-2	1,74±1,57	4,48±3,17	p=0,087
	2-4	1,88±1,23	7,14±4,72	p=0,025*
	4-6	1,54±0,99	6,38±3,70	p=0,011*
	6-8	1,62±1,35	5,01±4,05	p=0,081
	8-10	1,62±0,60	7,87±5,73	p=0,024*

^aT-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

4.2.3.4. Водоник пероксид (H₂O₂)

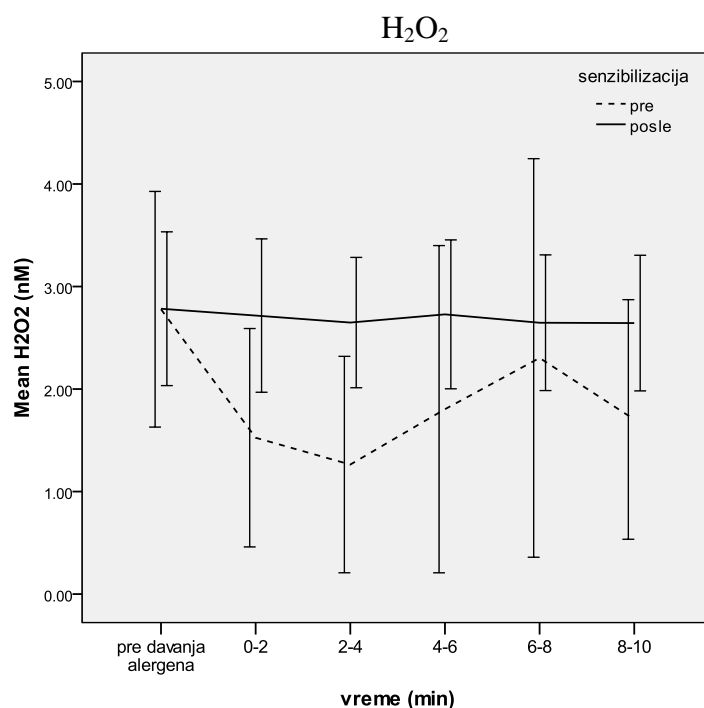
Није уочена статистички значајна разлика између вредности H₂O₂, мереним током десетоминутног периода праћења по давању алергена, у групи iNOS-/- мишева ни пре ни после давања алергена (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; p=0,210), графикон 32. Ниво разлике између вредности овог параметра мерених пре и после сензибилизације iNOS-/- мишева, а током десетоминутног периода праћења по давању алергена, није се статистички значајно мењао (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења* сензибилизација; p=0,197), графикон 32.

Табела 36

Време мерења		H ₂ O ₂		Значајност ^a
		iNOS-/- -Сензибилизација		
		Пре	После	
H ₂ O ₂ (X±SD)	Период стабилизације	2,78±1,09	2,78±0,71	p=0,993
	0-2	1,52±1,01	2,71±0,72	p=0,040*
	2-4	1,26±1,00	2,65±0,60	p=0,016*
	4-6	1,80±1,52	2,73±0,69	p=0,205
	6-8	2,30±1,85	2,65±0,63	p=0,676
	8-10	1,70±1,11	2,64±0,63	p=0,102

^aT-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Графикон 32



Између сензибилисаних и несензибилисаних iNOS^{-/-} мишева, статистички значајна разлика у вредностима водоник пероксида забележена је само другог и четвртог минута по давању алергена, и то тако да су веће вредности измерене после сензибилизације, табела 36.

4.2.4. WILD: НЕСЕНЗИБИЛИСАНИ vs. СЕНЗИБИЛИСАНИ

4.2.4.1. Индекс липидне пероксидације (TBARS)

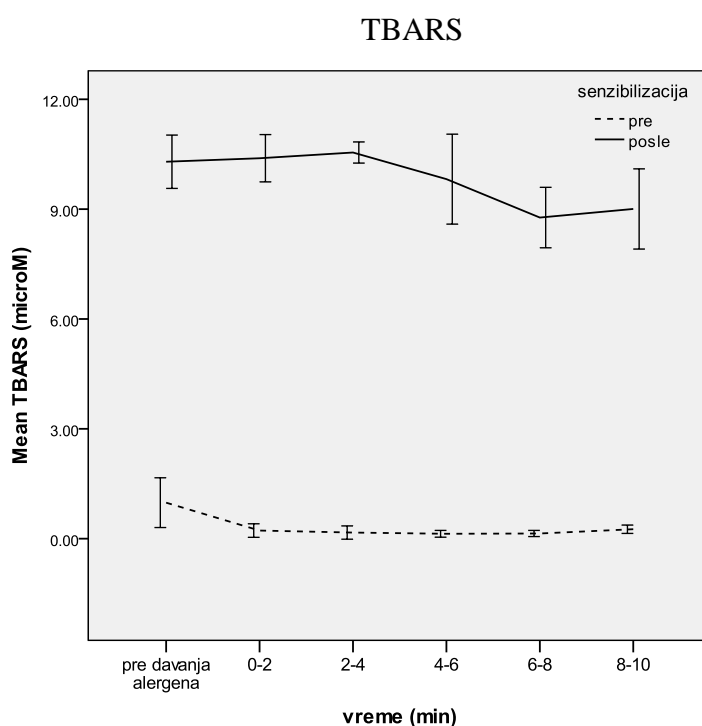
Табела 37

		TBARS		Значајност ^a
Време мерења		wild-Сензибилизација		
		Пре	После	
TBARS (X _± SD)	Период стабилизације	0,98±0,65	10,29±0,69	p=0,000*
	0-2	0,22±0,17	10,39±0,62	p=0,000*
	2-4	0,17±0,17	10,55±0,27	p=0,000*
	4-6	0,13±0,09	9,82±1,17	p=0,000*
	6-8	0,14±0,08	8,77±0,79	p=0,000*
	8-10	0,26±0,11	9,00±1,04	p=0,000*

^aT-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Током дестоминутног периода праћења, по давању алергена, статистички значајна промена вредности TBARS-а, уочена је код wild мишева и пре и после сензибилизације (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; $p=0,000$), графикон 33. Пре сензибилизације током прва два минута по давању алергена забележен је значајан пад вредности TBARS-а, док је у наредних шест минута забележено је благо варирање вредности овог параметра, које је било праћено значајним порастом током последња два минута. После сензибилизације, током прва четири минута бележи се благи пораст вредности TBARS-а, затим пад вредности овог параметра у наредна четири минута и поновни благ пораст задња два минута. Ниво разлике у вредностима TBARS-а, пре и после сензибилизације, код wild мишева у периоду од десет минута по давању алергена, статистички значајно се мењао (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*сензибилизација; $p=0,001$), графикон 33.

Графикон 33

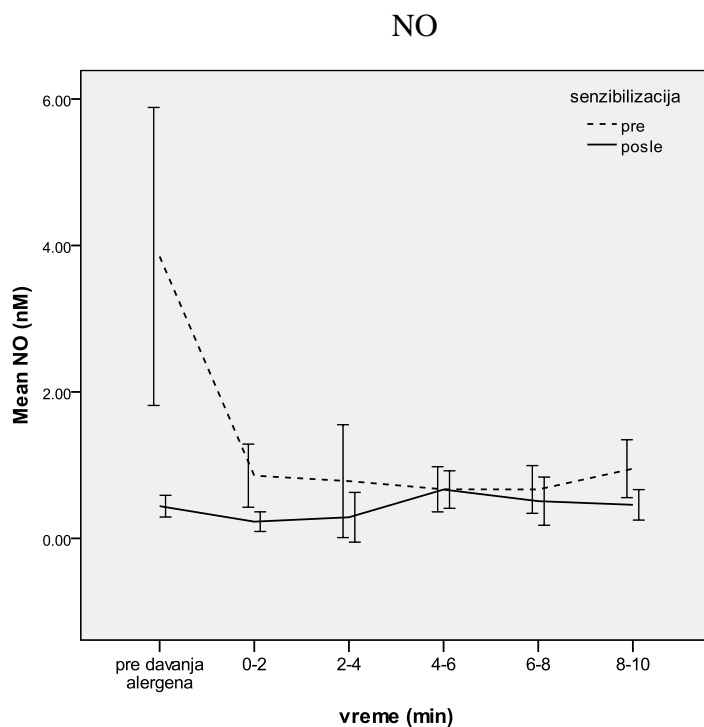


Између сензибилисаних и несензибилисаних wild мишева, уочена је статистички значајна разлика у вредностима TBARS-а, у сваком од посматраних времена мерења. Статистички значајно веће вредности овог параметра измерене су код сензибилисаних wild мишева, табела 37.

4.2.4.2. Азот моноксид (NO)

Статистички значајна промена вредности NO, забележена је и код сензибилисаних и код несензибилисаних wild мишева, десет минута по давању алергена (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; $p=0,010$), графикон 34. Код несензибилисаних wild мишева забележен је статистички значајан пад вредности NO током прва два минута, који је настављен само знатно слабијег интензитета све до осмог минута по давању алергена док задња два минута бележи се пораст вредности овог параметра. После сензибилизације бележи се наизменичан пад и пораст вредности овог параметра, при чему су највеће вредности NO измерене шестог и осмог минута по давању алергена. Није уочен статистички значајан утицај сензибилизације, на динамику промене вредности овог параметра, приликом давања алергена у групи wild мишева (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*сензибилизација; $p=0,085$), графикон 34.

Графикон 34



Статистички значајна разлика у вредностима NO, између сензибилисаних и несензибилисаних wild мишева уочена је пре давања алергена, другог и десетог минута по давању алергена и то тако да су веће вредности измерене код несензибилисаних мишева, табела 38.

Табела 38

		NO		
Време мерења		wild-Сензибилизација		Значајност ^a
		Пре	После	
NO (X±SD)	Период стабилизације	3,85±1,94	0,44±0,14	p=0,002*
	0-2	0,86±0,41	0,23±0,13	p=0,005*
	2-4	0,78±0,73	0,29±0,32	p=0,163
	4-6	0,67±0,29	0,67±0,24	p=0,983
	6-8	0,67±0,31	0,51±0,31	p=0,396
	8-10	0,95±0,38	0,46±0,20	p=0,018*

^aT-тест за независне узорке; *Статистички значајна разлика

4.2.4.3. Супероксид анјон радикал (O₂⁻)

Није уочена статистички значајна промена вредности O₂⁻ десет минута по давању алергена, код wild мишева ни пре ни после сензибилизације (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; p=0,276), графикон 35. Ниво разлике у вредностима O₂⁻, статистички значајно се мењао између сензибилизаних и несензибилизаних мишева, током дестоминутног периода праћења по давању алергена (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*сензибилизација; p=0,012), графикон 35. Разлика у вредностима O₂⁻, која је постојала пре давања алергена, статистички значајно се смањила другог и четвртог минута по давању алергена. До повећања разлике у вредностима овог параметра дошло је шестог и осмог минута по давању алергена, да би се та разлика поново смањила на крају периода праћења. Веће вредности овог параметра мерене су код несензибилизаних мишева пре давања алергена, као и два минута по његовом давању и на крају периода праћења док су у осталим временима мерења веће вредности овог параметра биле код сензибилизаних мишева.

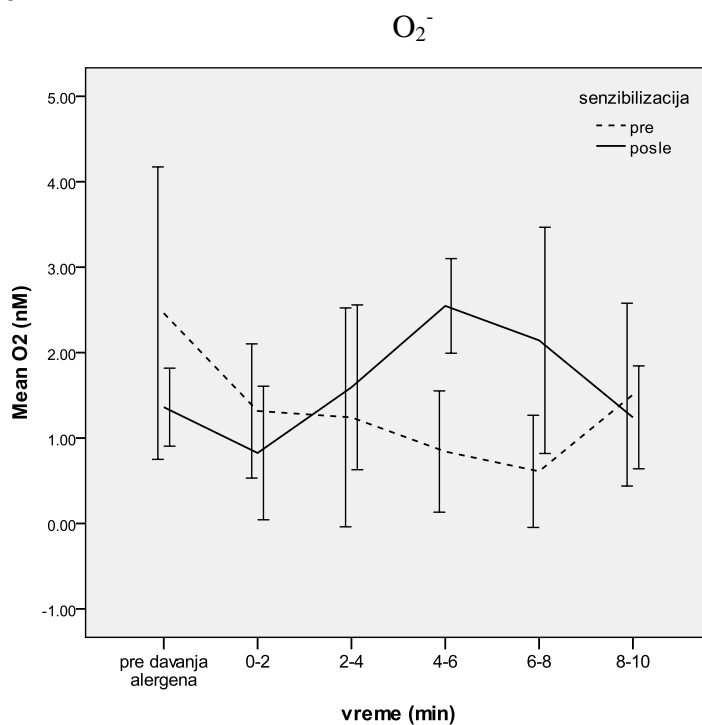
Вредности O₂⁻, између сензибилизаних и несензибилизаних wild мишева статистички значајно су се разликовале само шестог и осмог минута по давању алергена, табела 39.

Табела 39

		O_2^-		
Време мерења		wild-Сензибилизација		Значајност ^a
		Пре	После	
O_2 ($\bar{X} \pm SD$)	Период стабилизације	2,46 \pm 1,63	1,36 \pm 0,43	p=0,141
	0-2	1,31 \pm 0,75	0,82 \pm 0,74	p=0,281
	2-4	1,24 \pm 1,22	1,59 \pm 0,92	p=0,585
	4-6	0,84 \pm 0,67	2,54 \pm 0,53	p=0,001*
	6-8	0,61 \pm 0,62	2,14 \pm 1,26	p=0,024*
	8-10	1,51 \pm 1,01	1,24 \pm 0,57	p=0,589

^at-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Графикон 35



4.2.4.4. Водоник пероксид (H_2O_2)

Није уочена статистички значајна промена H_2O_2 , десет минута по давању алергена, ни код сензибилисаних ни код несензибилисаних wild мишева (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења; p=0,123), графикон 36. Статистички значајна разлика између, сензибилисаних и несензибилисаних wild

мишева, није уочена ни у динамици промене вредности овог параметра, у периоду од десет минута по давању алергена (Двофакторска анализа варијансе, фактор време мерења*сензибилизација; $p=0,109$), графикон 36.

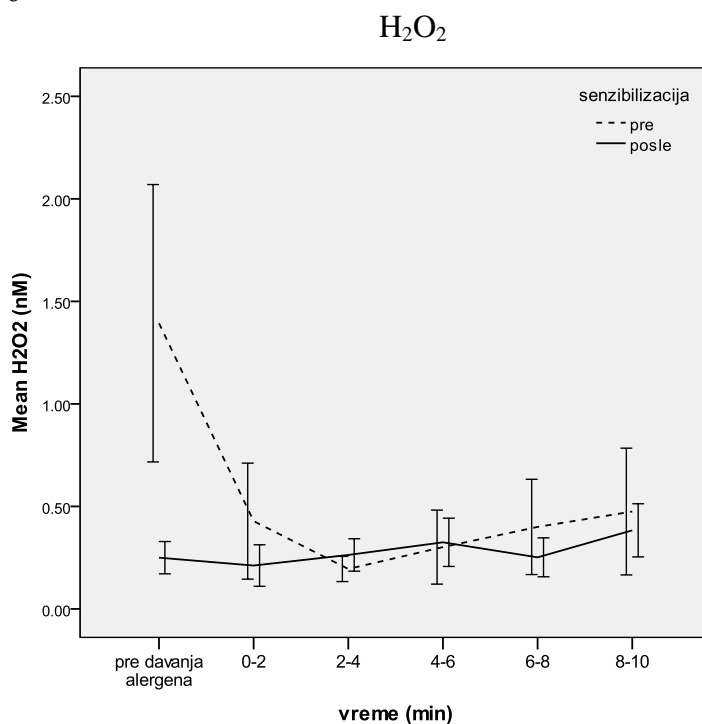
Између сензибилисаних и несензибилисаних wild мишева, статистички значајна разлика у вредностима H_2O_2 , уочена је само пре давања алергена и то тако да су веће вредности мерене код несензибилисаних мишева, табела 40.

Табела 40

		H_2O_2		Значајност ^a
Време мерења		wild-Сензибилизација		
		Пре	После	
H_2O_2 ($\bar{X} \pm SD$)	Период стабилизације	1,39±0,64	0,25±0,07	$p=0,002^*$
	0-2	0,43±0,27	0,21±0,10	$p=0,093$
	2-4	0,19±0,06	0,26±0,07	$p=0,110$
	4-6	0,30±0,17	0,32±0,11	$p=0,786$
	6-8	0,40±0,22	0,25±0,09	$p=0,160$
	8-10	0,47±0,29	0,38±0,12	$p=0,498$

^aT-тест за независне узорке; * Статистички значајна разлика

Графикон 36



V

ДИСКУСИЈА

Главни механизми на којима се заснива анафилактичка реакција подразумевају нагло ослобађање медијатора из мастоцита и базофила, укључујући хистамин, триптазе, серотонин, PAF, леукотриене, простагландине, цитокине и NO. Ипак улога сваког од наведених медијатора у патогенези анафилаксе још увек није у потпуности дефинисана (12, 55). Развој симптома и знакова зависи од природе алергена, количине и пута којим се контакт са алергеном остварује (12).

Много радова је сугерисало улогу повишене продукције NO у протрахованој хипотензији код септичног и другим формама шока, укључујући и анафилактички шок (55-57). Ова запажања су поткрепљена чињеницом да су повишене вредности NO утврђене у случајевима анафилактичких и анафилактоидних реакција и код људи и код животиња (57-62). Ипак има и саопштења који не налазе корелацију између нивоа NO и хистамина, као ни са клиничким манифестацијама анафилаксе (уртикаријом, еритемом, присуством wheezing-a, хипотензијом и тахикардијом) (72).

Утврђивање извора NO може помоћи у потпуном разјашњењу патогенезе овог поремећаја и довести до успостављања бољих терапијских опција. Ипак, улога и извор NO нису у потпуности разјашњени и контрадикторни резултати су добијани када су истраживачи покушали да инхибирају његову продукцију током анафилаксе (62-68). NO има двојни ефекат у многим патолошким процесима што вероватно зависи од његовог извора, концентрације и места дејства. Код сепсе, висок ниво NO који се продукује путем iNOS доводи до инхибиције eNOS, чиме се поништава протективно дејство eNOS (117, 118). Сматра се да се слично дешава и код алергијских болести, попут астме, где низак ниво NO продукован путем eNOS има позитивну улогу у регулацији проходности дисајних путева и васкуларног тонуса (119, 120). Покушај да се превенира анафилактички шок путем инхибиције продукције NO може бити неуспешан ако се не узме у обзир да се може инхибирати и позитиван ефекат NO на крвне судове и ваздушне путеве. Инхибиција продукције NO путем неспецифичних инхибитора доводи до мање израженог пада притиска који се јавља у анафилакси, али истовремено погоршава срчану функцију (63-68).

За разлику од nNOS и eNOS које се конституционално експримирају и продукују мале количине NO, iNOS је регулисана на транскрипционом нивоу, и једном индукована путем цитокина или ендотоксина продукује велике количине

NO у дужем временском периоду. За разлику од инфламаторних стања као што су сепса, реуматоидни артритис, инфламаторне болести црева и алергијских стања попут астме, анафилакса је клиничка манифестација реакције ране преосетљивости која се дешава пре него што дође до инфламације. Анафилаксу карактерише брз и често драматичан почетак са брзим порастом концентрације NO (62-68). Обзиром да се iNOS регулише на транскрипционом нивоу, њена активација зависи од *de novo* синтезе RNA и протеина, за шта је потребно време од најмање 4 до 8 сати. Насупрот, код анафилаксе се хемодинамски одговор на алерген јавља пар минута након излагања, што води закључку да су конституционално експримиране NOS одговорне за хемодинамски одговор (60-65). Овим проблемом су се у свом раду бавили Sade и сарадници, доказујући повећану експресију iNOS mRNA у плућима и срцу миша већ 10 минута након излагања алергену, при чему се експресија eNOS није мењала током експеримента (74). Нешто пре овог рада, Cauwels и сарадници су презентovali истраживање које сугерише да је eNOS кључни медијатор анафилактог шока код миша (70).

Иако је доста радова објављено из ове области јасно је да су закључци различити, чак контрадикторни и да ни синтетаза која је укључена као ни окидач који доводи до повећане продукције NO нису прецизирани. Хипотеза која је нас руководила у нашем испитивању је да iNOS дефицијентни мишеви представљају моћно оруђе за боље разумевање улоге NO у анафилакси.

5.1. ХЕМОДИНАМСКИ ПАРАМЕТРИ У АНАФИЛАКТИЧКОЈ РЕАКЦИЈИ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА МИША

У нашем раду коришћен је модел изолованог срца миша добијеног од wild и knock-out iNOS^{-/-} сојева, а одређиване су вредности систолног (SP), дијастолног (DP), средњег перфузионог притиска (MBP), срчане фреквенције (HR) и коронарног протока (CF) као и утицај акутне администрације алергена овалбумина на наведене параметре.

Вредности SP, DP, MBP, HR, CF, пре сензибилизације, у периоду пре администрације овалбумина, нису се статистички значајно разликовале између iNOS^{-/-} и Wild мишева. Ови резултати су у складу са резултатима које је добио

Lei Xi са својим сарадницима испитујући улогу iNOS у кардиопротекцији изазваној монофосфорил липидом А (121). Они нису уочили разлику у преисхемичним базалним вредностима срчане фреквенце и коронарног протока између iNOS-/- и Wild мишева. Godecke са сарадницима (122), испитујући коронарну хемодинамику код eNOS knock-out мишева су такође показали да се базални CF и HR, не разликују између knock-out и wild мишева.

У нашем раду није било статистички значајне разлике у SP, DP, MBP и HR између iNOS-/- и wild мишева, пре сензибилизације, током периода посматрања. Након излагања алергену вредност SP значајно пада, док вредност DP значајно расте у обе групе, током целог, десетоминутног периода праћења. Вредности SP у групи iNOS-/- мишева имале су статистички значајно мањи пад после давања алергена него код wild мишева. Давање овалбумина је изазвало повећање вредности HR у обе групе, али без статистичке значајности. Вредности MBP нису се статистички значајно разликовале између група мишева ни у једном од времена мерења, као ни динамика промене вредности овог параметра.

Током десетоминутног периода праћења, у обе групе испитиваних мишева запажена је статистички значајна промена вредности CF. После давања алергена забележен је пад коронарног протока, који је трајао до шест минута по његовом давању, док се у последња четири мунута праћења запажа благи пораст коронарног протока у обе групе. Код iNOS-/- мишева пад коронарног протока по давању алергена, био је статистички значајно мањи него у групи wild мишева, тако да се од четвртог минута па све до краја десетоминутног периода праћења, статистички значајно веће вредности бележе у групи iNOS-/- мишева.

После сензибилизације, у обе анализиране групе мишева, након давања овалбумина долази до статистички значајног пада SP, током десетоминутног периода праћења. Анализом вредности SP, између iNOS-/- и wild мишева, у сваком времену мерења, статистички значајна разлика није уочена само пре давања алергена и четири минута по његовом давању, док се у последњих шест минута посматрања статистички значајно веће вредности овог параметра бележе у групи wild мишева. И пре и после сензибилизације, статистички значајно највећи пад систолног притиска забележен је у обе групе мишева (iNOS-/- и wild) током прва два минута по давању алергена.

Наведени резултати су у корелацији са резултатима Osade и сарадника (55) који су процењивали анафилаксу код мишева изазвану лизозимом беланцета мерећи промене у крвном притиску. Они су у својој студији показали да код сензибилисаних мишева вредности средњег систолног крвног притиска рапидно опадају током првих 10 минута након давања алергена. И у нашем раду, пре и после сензибилизације, у обе групе мишева, на крају десетоминутног периода праћења вредности SP мереног на изолованом срцу миша, биле су статистички значајно мање од почетних вредности. Ова група аутора је такође закључила да NO игра значајну улогу у анафилакси код миша јер је N^G-nitro-L-arginin metil ester, неселективни инхибитор NO синтетаза, значајно блокирао хипотензију, док је давање великих количина L-arginina, прекурсора синтезе NO, поново довело до хипотензије. У нашем раду, код несензибилисаних мишева, након давања алергена мањи пад притиска се бележи у групи iNOS^{-/-} мишева, док се код сензибилисаних мишева статистички значајно већи пад вредности SP бележи у овој групи.

Код сензибилисаних мишева уочена је статистички значајна промена вредности DP у обе анализиране групе мишева након давања алергена. У групи iNOS^{-/-} мишева забележен је пораст два минута по давању алергена а потом стабилизација, уз благ пораст до краја периода праћења, док се у групи wild мишева запажало стално осциловање и наизменичан пад и пораст вредности да би на крају десетоминутног периода праћења вредност DP била нижа од почетне. Вредности DP, мерене у сваком од времена мерења, нису се статистички значајно разликовале само пре давања алергена док по давању овалбумина, вредности DP мерене код iNOS^{-/-} мишева су биле статистички значајно веће.

У групи сензибилисаних wild мишева запажа се пад HR током прва четири минута а онда благ пораст до краја периода праћења. Код iNOS^{-/-} мишева запажа се значајан пораст срчане фреквенце током прва два минута који се наставља само слабије изражено до шестог минута а потом се уочава пад вредности овог параметра у наредна четири минута. И поред пада током последња четири минута код iNOS^{-/-} мишева вредности овог параметра забележене на крају праћења и даље су биле веће од вредности измерених пре давања алергена. Пре почетка давања алергена, статистички значајно веће вредности HR измерене су код wild

мишева, док после давања овалбумина статистички значајно веће вредности срчане фреквенце бележе се код iNOS-/- мишева.

Након сензибилизације у групи iNOS-/- мишева, запажа се благ пораст МВР два минута по давању алергена, а потом његов континуирани благи пад. У групи wild мишева МВР, показивао је наизменично пад и пораст. У свим посматраним периодима мерења почев од времена пре давања алергена па све до десет минута по његовом давању, статистички значајно веће вредности овог параметра измерене код iNOS-/- мишева.

У групи сензибилисаних iNOS-/- мишева запажа се статистички значајан пад коронарног протока у прва два минута по давању алергена, а потом континуирани пораст у наредних осам, тако да су на крају десетоминутног периода праћења вредности овог параметра биле и даље мање од почетних. Нешто већи пад СФ два минута после давања овалбумина запажен је у групи wild мишева, који је и у овој групи био праћен порастом овог параметра у наредних осам минута до краја посматраног периода праћења, при чему су вредности на крају периода праћења и даље биле мање од почетних. Вредности СФ, статистички значајно су се разликовале у сваком од анализираних времена мерења, између различитих група мишева при чему су веће вредности СФ измерене у групи iNOS-/- мишева.

Поређењем добијених вредности испитиваних хемодинамских параметера између сензибилисаних и несензибилисаних мишева у оквиру сваке групе (iNOS-/- и wild) можемо да уочимо врло занимљиве разлике у одговору на акутну апликацију алергена односно реакцију срца на овалбумин. Наиме, у групи iNOS-/- мишева можемо да запазимо да није било разлике у диманици промене свих хемодинамских показатеља између сензибилисаних и несензибилисаних мишева након акутне администрације овалбумина. Ипак, треба напоменути да су вредности срчане фреквенце (HR) у групи сензибилисаних мишева, у сваком од појединачних периода мерења биле статистички значајно веће. Такође, иако није било разлике у динамици промене СФ, статистички веће вредности СФ су примећене након сензибилизације.

Са друге стране, потпуно другачији тренд је добијен у групи wild мишева пре и после сензибилизације, где смо уочили значајну разлику у динамици промене свих испитиваних хемодинамских параметара. Додатним, пажљивим

посматрањем промене вредности поменутих параметара током времена мерења у Wild групи, закључујемо да је опоравак срца (представљен ранијом нормализацијом SP и DP, мањим оцилацијама срчаног ритма, као и бржим побољшањем коронарне перфузије) сензибилисаних мишева ефикаснији у односу на групу несензибилисаних. Овакви резултати нам сугеришу да, бар када је реч о срцу и нашем моделу анафилаксе, очигледно да се ова реакција не одвија искључиво по моделу имуне анафилаксе, већ се мора узети обзир могућност контрибуције и неимуних механизма по типу анафилактоидне – неимуне анафилаксе.

У литератури нисмо наишли на радове који су испитивали утицај давања овалбумина на хемодинамске параметре изолованог срца iNOS-/- мишева, што онемогућава поређење наших са резултатима сличних студија. Углавном наилазимо резултате радова који су користили лабораторијски модел анафилактичке реакције изолованог срца заморчића.

Qiu Rong је са својим сарадницима презентовао три различите фазе у одговору на провокацију алергеном код изолованог срца заморчића сензибилисаних овалбумином: 1. Фаза повећања, коју карактерише синусна тахикардија и повећање параметара срчане функције 2. Фаза аритмија, коју карактеришу озбиљне аритмије и смањење срчаног протока и слабљење срчане функције и 3. Фаза опоравка, коју карактерише поновно успостављање синусног ритма и прогресивно побољшање срчане функције (29). Наши резултати су слични: у обе анализиране групе сензибилисаних мишева, након давања овалбумина долази до статистички значајног пада SP, пораста DP и пада CF док је пораст HR забележен код iNOS-/- мишева, при чему су промене параметара најизраженије у прва 2 минута, затим долази до стабилизације и постепеног повратка на вредности измерене пре излагања алергену.

Mest и сарадници (123) су у свом раду представили да је ослобађање ендогених срчаних медијатора одговорно за развитак аритмија, тахикардије, редуковане срчане контрактилности након индукције анафилаксе на моделу изолованог срца заморца. Њихови резултати сугеришу да су различити медијатори временски-зависно укључени у промене срчане функције тако да пораст ослобађања хистамина корелира са тахикардијом, тромбосана са повећањем коронарног перфузионог притиска, инхибиција липоксигеназе и

циклооксигеназе редукује пораст перфузионог притиска. Такође су утврдили повећање срчане фреквенције и систолног притиска леве коморе, иницијално смањење а затим дуготрајно повећање перфузионог притиска, након излагања овалбумину. У нашем раду код сензибилисаних iNOS-/- мишева, запажа се благ пораст МВР два минута по давању алергена, а потом његов континуирани благи пад, док је у групи wild мишева МВР, показивао наизменично пад и пораст.

5.2. ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС У АНАФИЛАКТИЧКОЈ РЕАКЦИЈИ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА МИША

У физиолошким условима продукција ROS је у равнотежи са ефикасним системом антиоксиданаса, док у патолошким стањима ова високо реактивна једињења изазивају оштећења биомолекула. Иако је њихова улога проучавана у вуше патофизиолошких процеса нема много саопштења везано за улогу у анафилакси. Продукција NO у *in vivo* моделу срчане анафилаксе код пса је знатно повећана у периоду од 2-3 минута након давања овалбумина, да би се после 20 минута вратила на почетне вредности (124). Perez-Gomez са сарадницима сматра да антиоксидациона ензимска активност и параметри оксидационог стреса могу служити као биохуморални маркер алергијских реакција. Они су утврдили да је TBARS био повишен код мононуклеарних ћелија и еритроцита пацијената са алергијским реакцијама на лекове (125).

У садашњем истраживању вредности TBARS-а се нису значајно мењале између wild и iNOS-/- групе несензибилисаних мишева, али је било разлике у динамици промене, обзиром да у групи wild мишева два минута по давању алергена долази до статистички значајног пада вредности овог параметара.

Вредности NO-а су се значајно мењале у обе групе мишева у смислу снижења вредности овог параметра у прва два минута након давања овалбумина. Иако су вредности овог маркера статистички значајно веће у сваком од времена мерења у iNOS-/- групи, нема разлике у начину промене вредности NO-а током времена. Повећана продукција NO-а у iNOS-/- групи, иако у први мах нелогична, може се објаснити компензаторним повећањем активности eNOS у срцима мишева, обзиром да нашем методологијом у ефлуенту меримо укупну производњу овог маркера, и то индиректно мерењем нивоа NO_2^- , што може бити и

индикатор деградације NO, о чему је наша истраживачка група већ више пута дискутовала (127,128).

За разлику од NO-а, ниво ослобађања O_2^- се није битније разликовао током времена између група, али и у динамици промене. Вредности H_2O_2 бележе статистички значајан пад у обе групе током прва два минута од давања алергена, без разлике између група у начину промене, при чему значајно веће вредности овог параметра меримо код iNOS-/- мишева у сваком тренутку мерења.

После сензибилизације динамика биохемијских параметара (TBARS, NO, O_2^- , H_2O_2) је била следећа:

У посматраним групама wild и iNOS-/- сензибилисаних мишева није уочена статистички значајна промена вредности TBARS-а, током десетоминутног праћења по давању алергена. Такође између посматраних група у сваком од периода мерења није утврђена статистички значајна разлика у вредности овог параметра. Иако постоји тренд пораста вредности овог параметра у групи iNOS-/-, током свих, (а нарочито током прва два минута) времена мерења, није забележена статистичка значајност. На основу овога ипак можемо да увидимо повећано солобађање TBARS у iNOS-/-, групи, што може указати да липидна оштећења ћелијских мембрана не морају облигаторно да буду посредована спрегом NO/OH⁻/OHOO⁻, већ другим до сада непознатим механизмима.

Статистички значајна разлика уочена је у начину промене вредности NO између сензибилисаних wild и iNOS-/- мишева, током посматраног периода праћења. У групи сензибилисаних iNOS-/- мишева, пре давања алергена мериле су се статистички значајно веће вредности NO него у групи wild мишева. Након давања алергена код iNOS-/- мишева, током прва два минута забележен је пораст, а затим на свака два минута, наизменично су падале и расле вредности да би на крају периода праћења у овој групи мишева биле статистички значјно веће него пре давања алергена. Код wild мишева, два минута по давању алергена бележи се пад вредности NO, па пораст у наредна четири минута и поновни пад током четири последња минута праћења да би на крају десетоминутног периода посматрања, вредности NO у групи wild мишева биле приближно исте као и на почетку. Ови налази само потврђују нашу претходну опсервацију о могућој компензаторној хиперактивности eNOS у групи iNOS-/- мишева, која наставља да

долази до изражаја и током сензибилизације, чиме доказује укљученост неке од форми NOS у анафилатичкој реакцији.

Вредности O_2^- , током десет минута по давању алергена, у групи сензибилисаних wild и iNOS-/- мишева, нису се статистички значајно мењале. Током периода праћења, почев од момента пре давања алергена, статистички значајно веће вредности O_2^- мерене су у групи iNOS-/- мишева. Компарацијом добијених резултата за O_2^- сензибилисаних wild и iNOS-/- мишева можемо да приметимо тренд повећања вредности током времена праћења у iNOS-/- групи, али без статистичке значајности.

После сензибилизације wild и iNOS-/- мишева, вредности H_2O_2 нису се статистички значајно мењале ни у једној од група мишева, током периода праћења након давања овалбумина. У сваком од анализираних времена мерења, статистички значајно веће вредности H_2O_2 , мерене су код iNOS-/- мишева.

Вредности TBARS-а у групи iNOS-/- мишева су статистички значајно веће после сензибилизације у сваком од времена мерења, што се исто може уочити и у Wild групи. Ови налази су очекивани и генерално показују да претходно излагање алергену повећава ћелијска оштећења, што је у корелацији са претходним истраживањима (125).

Што се тиче компарације NO у iNOS-/- групи у односу на присуство/одсуство сензибилизације можемо да запазимо ниже вредности и смањену динамику промене после сензибилизације, при чему код wild мишева није уочена статистички значајна утицај сензибилизације на динамику промене вредности овог параметра.

У погледу O_2^- вредности се нису значајно мењале, нити је уочена статистички значајна разлика у динамици промене овог параметра између сензибилисаних и несензибилисаних iNOS-/- мишева. За разлику од wild групе код које је забележена разлика у динамици ослобађања O_2^- у смислу већих вредности овог параметра код несензибилисаних мишева пре давања алергена, два минута по давању, као и на крају периода праћења, док су у осталим временима мерења веће вредности овог параметра биле код сензибилисаних мишева.

Између сензибилисаних и несензибилисаних iNOS-/- мишева статистички значајна разлика у вредности H_2O_2 забележена је само другог и четвртог минута по давању алергена, тако што су веће вредности измерене после сензибилизације. У wild групи је забележена значајна разлика само пре давања алергена тако што су веће вредности мерене код несензибилисаних мишева.

У литератури нисмо нашли истраживања која се баве оксидационим статусом у анафилактичкој реакцији изолованог срца миша тако да нисмо били у могућности да податке из наше студије упоредимо. Cauwels са сарадницима је представио истраживање које сугерише примарну улогу eNOS у анафилактичком шоку код миша а NO продукован дејством ове синтетазе главним вазодилаторним чиниоцем (70, 126). Обзиром да су *knock out* мишеви коришћени у нашој студији iNOS дефицијентни, а функција eNOS је очувана сматрамо да би то могао бити разлог веће продукције NO у односу на групу wild мишева.

VI

ЗАКЉУЧЦИ

Анафилактичку реакцију изолованог срца миша након излагања алергену (овалбумину) карактерише:

1. Статистички значајни пад SP код Wild и iNOS-/- мишева при чему је статистички значајније већи пад присутан код iNOS-/- мишева.
2. Статистички значајна промена DP у обе посматране групе мишева, при чему су у групи iNOS-/- мишева вредности веће уз израженији пораст у прва два минута а затим благ пораст. У групи wild мишева запажа се стално осциловање DP.
3. HR значајно расте код iNOS-/- мишева, док се код wild мишева запажа пад а затим пораст HR.
4. Веће вредности MBP измерене код iNOS-/- у односу на wild мишеве при чему се код iNOS-/- запажа пораст након давања алергена а потом континуирани благи пад. Код wild мишева MBP наизменично пада и расте.
5. iNOS-/- мишеви имају веће вредности CF и пре и после давања алергена. Након давања алергена у обе групе долази до значајног пада CF, најизраженије у току прва два минута а касније долази до постепеног пораста.
6. iNOS-/- мишеви бележе већи поремећај хемодинамских параметара у односу на wild мишеве у смислу израженијег пада SP, већег пораста DP, убрзања HR и већих вредности MBP.
7. Најизраженије промене хемодинамских параметара се у обе групе мишева дешавају у прва 2 минута по давању алергена.
8. Није уочена статистички значајна промена вредности TBARS-а, NO, O₂⁻ и H₂O₂ после излагања алергену ни у једној од посматраних група мишева, iNOS-/- и wild. Из ових резултата следи да оксидациони стрес не игра значајну улогу у анафилактичкој реакцији изолованог срца миша. Обзиром да се ради о пионирском истраживању неопходна су даља, комплекснија истраживања која би подржала или оповргла ову тезу.
9. У групи iNOS-/- мишева, пре и после давања алергена, током периода посматрања мериле су се статистички значајно веће вредности NO него у

групи wild мишева. Обзиром да је у групи iNOS^{-/-} мишева дошло до продукције NO произилази да iNOS није искључиво одговорна за синтезу NO током анафилактичке реакције већ је могућа компензаторна хиперактивност eNOS.

10. Иако постоји тренд пораста вредности TBARS-а у групи iNOS^{-/-} мишева, током свих, (а нарочито током прва два минута) времена мерења, није забележена статистичка значајност. На основу овога ипак можемо да увидимо повећано солобађање TBARS у iNOS^{-/-} групи, што може указати да липидна пероксидација ћелијских мембрана не мора облигаторно да буде посредована спрегом NO/OH⁻/OHOO⁻, већ другим до сада непознатим механзмима.

VII
ЛИТЕРАТУРА

1. Simons FER et al. World Allergy Organization Guidelines for the Assessment and Management of Anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127(3): 587-93.
2. Cohen SG, Portier, Richet and the discovery of anaphylaxis: a centennial. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 331-6.
3. Cohen SG, Bukantz SC, Clemens von Pirquet, MD. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 722-6.
4. Sampson HA, Munoz-Furlong A, Campbell RL, Adkinson NF et al. Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: Summary report-Second National Institute of Allergy and Infectious disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:391-7.
5. Lieberman P, Camarago CA Jr, Bohlke K, et al. Epidemiology of anaphylaxis: findings of the American College of Allergy, Asthma and Immunology Epidemiology of Anaphylaxis Working Group. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; 97: 596-602.
6. Finkelman FD. Anaphylaxis: Lessons from mouse models. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120(3):506-15.
7. Simons FER. Anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(2): 402-7.
8. Simons FER, Sampson HA. Anaphylaxis epidemic: Fact or fiction? *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122(6): 1166-8.
9. Bock SA, Munoz-Furlong A, Sampson HA. Further fatalities caused by anaphylactic reactions to food, 2001-2006. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1016-8.
10. Pumphrey RSH, Gowland MH. Further fatal allergic reactions to food in the United Kingdom, 1999-2006. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1018-9.
11. Greenberger PA, Rotskoff BD, Lifschultz B. Fatal anaphylaxis: postmortem findings and associated comorbid diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007; 98: 252-7.
12. Kemp SF, Lockey RF. Anaphylaxis: A review of causes and mechanisms. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:341-8.
13. Yocum MW, Butterfield JH, Klein JS, Volcheck GW et al. Epidemiology of anaphylaxis in Olmsted county:a population-based study. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:452-6.
14. Kemp SF, Lockey RF, Wolf BL, Lieberman P. Anaphylaxis: a review of 266 cases. *Arch Inter Med* 1995;155(16):1749-54.

15. Immediate hypersensitivity. In: Abbas AK, Lichtman AH, Jordan S. Cellular and Molecular Immunology. Third edition, Philadelphia, 2000: 424-444.
16. Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:S450-6.
17. Rivera J, Gilfillan AM. Molecular regulation of mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:1214-25.
18. Simons FER, Frew AJ, Ansotegui IJ, Bochner BS, Finkelman F, Golden DBK, et al. Risk assessment in anaphylaxis: current and future approaches. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:S2-24.
19. Korhonen H, Fisslthaler B, Moers A, Wirth A, et al. Anaphylactic shock depends on endothelial G_q/G₁₁. *J Exp Med* 2009;206(2):411-20.
20. Khan BQ, Kemp SF. Pathophysiology of anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011;11:319-25.
21. Van der Linden P-WG, Struyvenberg A, Kraaijenhagen RJ, et al. Anaphylactic shock after insect-sting challenge in 138 persons with a previous insect-sting reaction. *Ann Intern Med* 1993;118:161-8.
22. Smith PL, Kagey-Sobotka A, Bleeker ER, et al. Physiologic manifestation of human anaphylaxis. *J Clin Invest* 1980;66:1072-80.
23. Tang AW. A practical guide to anaphylaxis. *American Family Physician* 2003;68(7):1325-32.
24. Wang J, Sampson HA. Food anaphylaxis. *Clinical and Experimental Allergy* 2007;37:651-60.
25. Braganza SC, Acworth JP, Mckinnon DR, Peake JE, Brown AF. Paediatric emergency department anaphylaxis: different patterns from adults. *Arch Dis Child* 2006;91:159-63.
26. Moneret-Vautrin DA, Morisset M, Flabbee J, Beaudouin E, Kanny G. Epidemiology of life-threatening and lethal anaphylaxis: a review. *Allergy* 2005;60:443-51.
27. Daser A, Batjer N, Kolsch U, et al. Quantitative assessment of immediate cutaneous hypersensitivity in a model of genetic predisposition to atopy. *Int Arch Allergy Immunol* 1998;117:239-43.
28. Baeza ML and Zubeldia JM. Immunology of Anaphylaxis: Lessons from Murine Models. *Current Allergy and Asthma Reports* 2007;7:49-55.

29. Rong Q, Zhao-Gui G. Cardiac anaphylaxis in isolated working guinea pig heart. *Acta Pharmacologica Sinica* 1988;9(2):143-7.
30. Gauthier NS, Matherne GP, Morrison RR, Headrick JP. Determination of Function in the Isolated Working Mouse Heart: Issues in Experimental design. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:453-61.
31. Larsen TS, Belke DD, Sas R, Giles WR, Severson DL, Lopaschuk GD, Tyberg JV. The isolated working mouse heart: methodological considerations. *Eur J Physiol* 1999;437:979-85.
32. Sutherland FJ, Shattock MJ, Baker KE, Hearse DJ. Mouse isolated perfused heart: characteristic and cautions. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003;30:867-78.
33. Hattori H, Kato M, Tamanaka M, Aoki T, Furuhashi K, Manabe S. Development of a novel mouse anaphylaxis model produced by intermittent intravenous injections of ovalbumin without adjuvant. *J Toxicol Pathol* 2007;20:237-44.
34. Zlatanović M. Knock out miševi. *Medicinski časopis* 2007;41(2):10-12.
35. Strait RT, Morris SC, Yang M, Qu XW, Finkelman FD. Pathways of anaphylaxis in the mouse. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:658-68.
36. Strait RT, Morris SC, Finkelman FD. IgG blocking antibodies inhibit IgE-mediated anaphylaxis in vivo through both antigen interception and Fc γ RIIb crosslinking. *J Clin Invest* 2006;116:833-41.
37. Wastling JM, Knight P, Ure J, Wright S, Thornton EM, Scudamore CL, et al. Histochemical and ultrastructural modification of mucosal mast cell granules in parasitized mice lacking the beta-chymase, mouse mast cell protease-1. *Am J Pathol* 1998;153:491-504.
38. Hazebos WL, Gessner JE, Hofhuis FM, Kuipers H, Meyer D, Heijnen IA, et al. Impaired IgG-dependent anaphylaxis and Arthus reaction in Fc γ RIII (CD16) deficient mice. *Immunity* 1996;5:181-8.
39. Hazebos WL, Heijnen IA, Meyer D, Hofhuis FM, Renardel de Lavalette CR, Schmidt RE, et al. Murine IgG1 complexes trigger immune effector functions predominantly via Fc γ RIII (CD16). *J Immunol* 1998;161:3026-32.
40. Karasuyama H, Tsujimura Y, Obata K, et al. Role for basophils in systemic anaphylaxis. *Chem Immunol Allergy* 2010;95:85-97.
41. Kajiwara N, Sasaki T, Bradding P, et al. Activation of human mast cells through the platelet-activating factor receptor. *J Allergy Clin Immunol* 2007;125:1137-45.

42. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;357:593-614.
43. Stuehr DJ, Marletta MA. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BSG infection, lymphokines or interferon- γ . *J Immunol* 1987;518-25.
44. Langrehr JM, Hoffman RA, Lancaster JR, Simmons RL. Nitric oxide-a new endogenous immunomodulator. *Transplantation* 1993;55:1205-12.
45. Bogdan C, Rölinghoff M, Diefenbach A. reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 2000;12:64-76.
46. Berkeman N, Robichaud A, Robbins RA, Roesems G, Haddad EB, Barnes PJ, Chung KF. Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by interleukin-4 and interleukin-13 in human epithelial cells. *Immunology* 1996;89:363-7.
47. Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol* 2001;1:1397-406.
48. Butler AR, Flitney FW, Williams DL. NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *Trends Pharmacol Sci* 1995;16:18-22.
49. Wink DA, Hanbauer I, Grisham MB et al. Chemical biology of nitric oxide: regulation and protective and toxic mechanisms. *Curr Topics Cell Regulation* 1996;34:159-87.
50. Coleman JW. Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. *Clin Exp Immunol* 2002;129:4-10.
51. Kröncke KD, Fehsel K, Suschek C, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. *Int Immunopharmacol* 2001;1:1407-20.
52. Jakovljević VLj, Mujović VM, Novokmet SS, Miloradović M, Djurić DM. Different effects of specific phosphodiesterase inhibitors on oxidative stress during coronary autoregulation in isolated rat heart. In: *Advances in Recent Cardiovascular Research*. A. Varro, A. Vegh (eds), Monduzzi Editore, Bologna, pp. 101-106, 2002.
53. McCord JM, Fridovich I. Superoxid dismutase an enzymatic function for erythrocyte. *J Bio Chem* 1969;244:6049-55.

54. Halliwell B. Antioxidant defense mechanisms: from the beginning to the end. *Free Rad Res* 1999;31: 261-72.
55. Osada S, Ichiki H, Oku H, Ishiguro K, Kunitomo M, Semma M. Participation of nitric oxide in mouse anaphylactic hypotension. *Eur J Pharmacol* 1994;252:347-50.
56. Szabo C, Thiemeermann C. Invited opinion: role of nitric oxide in hemorrhagic, traumatic, and anaphylactic shock and thermal injury. *Shock* 1994;2:145-55.
57. Rolla G, Nebiolo F, Guida G, Heffler E, Bommarito L, Bergia R. Level of exhaled nitric oxide during human anaphylaxis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;97(2):264-5.
58. Viaro F, Dalio MB, Evora PR. Catastrophic cardiovascular adverse reactions to protamine are nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate dependent and endothelium mediated: should methylene blue be the treatment of choice? *Chest* 2002;122:1061-6.
59. Tsuda A, Tanaka KA, Huraux C, Szlam F, Sato N, Yamaguchi K, Levy JH. The in vitro reversal of histamine-induced vasodilation in the human internal mammary artery. *Anesth Analg* 2001;93:1453-9.
60. Mitsuhashi H, Saitoh J, Takeuchi H, Hasome N, Horiguchi Y, Shimizu R. Production of nitric oxide in anaphylaxis in rabbits. *Shock* 1994;2:381-4.
61. Amir S, English AM. An inhibitor of nitric oxide production, NG-nitro-L-arginine-methyl ester, improves survival in anaphylactic shock. *Eur J Pharmacol* 1991;203:125-7.
62. Abend Y, Ashkenazy Y, Witzling V, Feigl D, Geltner D, Moshonov S, Zor U. Nitric oxide: a mediator in anaphylactic shock in guinea-pigs. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1996;7:57-69.
63. Bellou A, Lambert H, Gillois P, Montemont C, Gerard P, Vauthier E, Sainte-Laudy J, Longrois D, Gueant JL, Mallie JP. Constitutive nitric oxide synthase inhibition combined with histamine and serotonin receptor blockade improves the initial ovalbumin-induced arterial hypotension but decreases the survival time in brown norway rats anaphylactic shock. *Shock* 2003;19:71-8.
64. Fargeas MJ, Theodorou V, Weirich B, Floramonti J, Bueno L. Decrease in sensitisation rate and intestinal anaphylactic response after nitric oxide synthase inhibition in a food hypersensitivity model. *Gut* 1996;38:598-602.
65. Pallapies D, Thelen K, Dembinska-Kiec A, Simmet T, Peskar BA. Effect of 3-morpholinopropanolone (SIN-1), NG-nitro-L-arginine (NNA) and NG-

- monomethyl-L-arginine (NMMA) on isolated anaphylactic guinea-pig hearts. *Agents Actions Suppl* 1992;37:114-9.
66. Masini E, Gambassi F, Di Bello MG, Mugnai L, Raspanti S, Mannaioni PF. Nitric oxide modulates cardiac and mast cell anaphylaxis. *Agents Actions* 1994;41 Spec No:C89-90.
 67. Mitsuhashi H, Takeuchi H, Saitoh J, Hasome N, Horiguchi Y, Shimizu R. An inhibitor of nitric oxide synthase, N omega-nitro-L-arginine-methyl ester, attenuates hypotension but does not improve cardiac depression in anaphylaxis in dogs. *Shock* 1995;3:447-53.
 68. Mitsuhashi H, Saitoh J, Hasome N, Takeuchi H, Horiguchi Y, Shimizu R. Nitric oxide synthase inhibition is detrimental to cardiac function and promotes bronchospasm in anaphylaxis in rabbits. *Shock* 1995;4:143-8.
 69. Szabo C, et al. Platelet-activating factor contributes to the induction of nitric oxide synthase by bacterial lipopolysaccharide. *Circ Res* 1993;99:1-9.
 70. Cauwels A, Janssen b, Buys E, Sips P, Brouckaert. Anaphylactic shock depends on PI3K and eNOS-derived NO. *J Clin Invest* 2006;116(8):2244-51.
 71. Lowenstein C, Michel T. What's in a name? eNOS and anaphylactic shock. *J Clin Invest* 2006; 116 (8):2075-8.
 72. Gupta A, Lin RY, Pesola GR, Bakalchuk L, Curry A, Lee H, Knight RJ, Tenenbaum C, Westfal RE. Nitric oxide levels in patients with acute allergic reactions. *The Internet Journal of Asthma, Allergy and Immunology* 2004;3(1).
 73. Renzi PM, Sebastiano N, Al Assaad AS, Giaid A, Hamid Q. Inducible nitric oxide synthase mRNA and immunoreactivity in the lungs of rats eight hours after antigen challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17:36-40.
 74. Sade K, Schwartz IF, Etkin S, Schwartzberg S, Levo Y, Kivity S. Expression of inducible nitric oxide synthase in a mouse model of anaphylaxis. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2007;17:379-85.
 75. Giotti A, Guidotti A, Mannaioni PF, Zilletti L. The influences of adrenotropic drugs and noradrenaline on the histamine release in cardiac anaphylaxis in vitro. *J Physiol* 1966;184:924-41.
 76. Bani D, Nistri S, Mannaioni PF, Masini E. Cardiac Anaphylaxis: Pathophysiology and Therapeutic Perspectives. *Current Allergy and Asthma Reports* 2006;6:14-19.

77. Levi R, Burke JA, Guo ZG, et al. Acetyl glyceryl ether phosphorylcholine (AGEPC): a putative mediator of cardiac anaphylaxis in the guinea pig. *Circ res* 1984;54:117-24.
78. Capurro N, Levi R. The heart as a target organ in systemic allergic reactions: comparison of cardiac anaphylaxis in vivo and in vitro. *Circ Res* 1975;36:520-8.
79. Blandina P, Brunelleschi S, Fantozzi R, et al. The anti-anaphylactic action of histamine H₂-receptor agonist in the guinea-pig isolated heart. *Br J Pharmacol* 1987;90:459-66.
80. Endou M, Poli E, Levi R. Histamine H₃ receptor signaling in the heart: possible involvement of Gi/Goproteins and N-type Ca channels. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;269:221-29.
81. Brahmajothi MV, Campbell DL. Heterogeneous basal expression of nitric oxide synthase and superoxide dismutase isoforms in mammalian heart: implication for mechanisms governing indirect and direct nitric oxide-related effects. *Circ Res* 1999;85:575-87.
82. Balligand J-L, Cannon PJ. Nitric oxide synthases and cardiac muscle: autocrine and paracrine influences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1846-58.
83. Ursell PC, Mayes M. Anatomic distribution of nitric oxide synthase in the heart. *Int J cardiol* 1995;50(3):217-23.
84. Drexel H. Nitric oxide synthase in the failing heart: a double-edged sword. *Circulation* 1999;99(23):2972-5.
85. Saito T, HuF, Tayara L, Fashas L, Shennib H, Giaid A. Inhibition of NOS II prevents cardiac dysfunction in myocardial infarction and congestive heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283(1):H339-H345.
86. Rakhit RD, Marber MS. Nitric oxide: an emerging role in cardioprotection? *Heart* 2001;86:368-72.
87. Mohan P, Brutsaert DL, Paulus WJ, Sys SU. Myocardial contractile response to nitric oxide and cGMP. *Circulation* 1996;96:1223-9.
88. Horton JW, Maass D, White J, Sanders B. Nitric oxide modulation of TNF- α -induced cardiac contractile dysfunction is concentration dependent. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H1955-H1965.

89. Kim Y-M, Bombeck CA, Billiar TR. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ Res* 1999;84:253-6.
90. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-6.
91. Salvemini D, Masini E, Pistelli A, et al. Nitric oxide: a regulatory mediator of mast cell reactivity. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991;17(Suppl):S258-64.
92. Salvemini D, Masini E, Anggard E, et al. Synthesis of a nitric oxide-like factor from L-arginine by rat serosal mast cells: stimulation of guanylatecyclase and inhibition of platelet aggregation. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;169:596-601.
93. Bani D. Relaxin: a pleiotropic hormone. *Gen Pharmacol* 1997;28:13-22.
94. Sherwood OD. Relaxin's physiological roles and other diverse actions. *Endocrin Rev* 2004;25:205-34.
95. Bani Sacchi T, Bigazzi M, Bani D, et al. Relaxin-induced increased coronary flow through stimulation of nitric oxide production. *Br J Pharmacol* 1995;116:1589-94.
96. Bani D, Failli P, Bello MG, et al. Relaxin activates the L-arginine-nitric oxide pathway in vascular smooth muscle cells in culture. *Hypertension* 1998;31:1240-47.
97. Failli P, Nistri S, Quattrone S, et al. Relaxin upregulates inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide generation in rat coronary endothelial cells. *FASEB J* 2002;16:252-54.
98. Masini E, Bani D, Bigazzi M, et al. Effects of relaxin on mast cells: in vitro and in vivo studies in rats and guinea pigs. *J Clin Invest* 1994;94:1974-80.
99. Bani D, Ballati L, Masini E, et al. Relaxin counteracts asthma-like reaction induced by inhaled antigen in sensitized guinea pigs. *Endocrinology* 1997;138:1909-15.
100. Bani D, Baronti R, Vannacci A, et al. Inhibitory effects of relaxin on human basophils activated by stimulation of the FC ϵ receptor: the role of nitric oxide. *Int Immunopharmacol* 2002;2:1195-1204.
101. Masini E, Zagli G, Ndisang JF, Solazzo M, Mannaioni PF, Bani D. Protective effect of relaxin in cardiac anaphylaxis: involvement of the nitric oxide pathway. *Br J Pharmacol* 2002; 137: 337-44.

102. Piccinni MP, Bani D, Beloni L, et al. Relaxin favors the development of Th1-like T cells. *Eur J Immunol* 1999;29:2241-7.
103. Maines MD, Panahian N. The heme oxygenase system and cellular defense mechanisms. Do HO-1 and HO-2 have different functions? *Adv Exp Med Biol* 2001;502:249-72.
104. Willis D, Moore AR, Frederick R, Willoughby DA. Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nature Med* 1996;2:87-90.
105. Mirabella C, Baronti R, Berni LA, et al. Hemin and carbon monoxide modulate the immunological response of human basophils. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;118:259-60.
106. Ndisang JF, Gai P, Berni L, et al. Modulation of the immunological response of guinea pig mast cells by carbon monoxide. *Immunopharmacology* 1999;43:65-73.
107. Vannacci A, Marzocca C, Zagli G, et al. Generation of nitric oxide and carbon monoxide provide protection against cardiac anaphylaxis. In *Heme Oxygenase in Biology and Medicine*. Edited by Abraham N. New York: Kluwer; 2002:431-5.
108. Ndisang JF, Wang R, Vannacci A, et al. Haeme oxygenase-1 and cardiac anaphylaxis. *Br J Pharmacol* 2001;134:1689-96.
109. Thom SR, Xu Ya, Ischiropoulos H. Vascular endothelial cells generate peroxynitrite in response to carbon monoxide exposure. *Chem res Toxicol* 1997;10:1023-31.
110. Mondovi B, Agro AF. Structure and functions of amine oxidase. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1982;148:141-53.
111. Klinman JP, Mu D. Quinonozymes in biology. *Annu Rev Biochem* 1994;63:299-344.
112. Masini E, Vannacci A, Marzocca C, et al. A plant histaminase modulates cardiac anaphylactic response in guinea pig. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 840-6.
113. Fukuto JM, Wallace GC, Hsieh R, Chaudhuri G. Chemical oxidation of N-hydroxyguanidine compounds: release of nitric oxide, nitroxyl and possible relationship to the mechanism of biological nitric oxide generation. *Biochem Pharmacol* 1992;43:607-13.

114. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-8
115. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA (ed): *Handbook of methods for oxygen radical research*, CRC Press, Inc, Boca Raton, pp. 123-32, 1985
116. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Method* 1980; 38(1-2): 161-70
117. Schwartz D, Mendonca M, Schwartz I, Xia Y, Satriano J, Wilson CB, Blantz RC. Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolysaccharide administration provokes renal dysfunction in rats. *J Clin Invest* 1997;100:439-48.
118. Hallemeesch MM, Janssen BJ, de Jonge WJ, Soeters PB, Lamers WH, Deutz NE. NO production by eNOS and iNOS reflects blood pressure changes in LPS-challenged mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:E871-5.
119. Ricciardolo FL, Geppetti P, Mistretta A, Nadel JA, Sapienza MA, Bellofiore S, Di Maria GU. Randomised double-blind placebo-controlled study of the effect of inhibition of nitric oxide synthesis in bradykinin-induced asthma. *Lancet* 1996;348:374-7.
120. Ricciardolo FL, Timmers MC, Geppetti P, van Schadewijk A, Brahim JJ, Sont JK, de Gouw HW, Hiemstra PS, van Krieken JH, Sterk PJ. Allergen-induced impairment of bronchoprotective nitric oxide synthesis in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:198-204.
121. Xi L, Jarrett NC, Hess ML, Kukreja RC. Essential role of inducible nitric oxide synthase in monophosphoryl lipid A- induced late cardioprotection. *Circulation* 1999; 99: 2157-63.
122. Gödecke A, Decking U, Ding Z, Hirchenhain J, Bidmon HJ, Gödecke S, Schrader J. Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circ Res* 1998; 82: 186-94.

123. Mest HJ, Pönicke K, Heinroth-Hoffmann I, Meißner N, Gießler Ch. Relevance of mediators to cardiac parameters of isolated anaphylactic guinea-pig heart. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 1955; 53: 21-9.
124. Saitoh J, Mitsuhata H, Takeuchi H, Hasome N, Shimizu R. In vivo production of nitric oxide in the canine heart in IgE-mediated anaphylaxis. *Shock* 1996; 6(1): 66-70.
125. Perez-Gomez C, Segura JM, Blanca M, Asenjo M, Mates JM. Antioxidant activity levels and oxidative stress as blood markers of allergic response to drugs. *Biochem Cell Biol* 2000; 78: 691-8.
126. Cauwels A. Nitric oxide in shock. *Kidney International* 2007; 72: 557-65.
127. Djurić DM, Mitrović VM, Jakovljević VLJ. The effects of calcium channel antagonists on coronary nitrite outflow in isolated rat heart. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 2002; 52(5): 363-70.
128. Djurić DM, Vuksanović A, Jakovljević VLJ. The effects of folic acid and nitric oxide synthase inhibition on coronary flow and oxidative stress markers in isolated rat heart. *Mol Cell Biochem* 2007; 300(1-2): 177-83.

VIII

ПРИЛОГ И

БИОГРАФИЈА

АУТОРА СА

БИБЛИОГРАФИЈОМ

8.1 КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број: РБ	
Идентификациони број: ИБР	
Тип документације: ТД	Монографска публикација
Тип записа: ТЗ	Текстуални штампани материјал
Врста рада: ВР	Докторска дисертација
Аутор: АУ	Весна Миличић
Ментор/коментор: МН	Проф. др Владимир Јаковљевић
Наслов рада: НР	Улога азотног монооксида (NO) у локалној анафилатичкој реакцији изолованог срца миша
Језик публикације: ЈП	Српски (ћирилица)
Језик извода: ЈИ	Српски/Енглески
Земља публиковања: ЗП	Република Србија
Уже географско подручје: УГП	Шумадијски округ
Година: ГО	2014.
Издавач: ИЗ	Ауторски репринт
Место и адреса: МС	34000 Крагујевац, ул. Светозара Марковића број 69
Физички опис рада: ФО	121/5/40/36/128
Научна област:	Медицина
Научна дисциплина: ДИ	Експериментална физиологија

Предметна одредница/ кључне речи ПО	анафилакса, срчана анафилакса, NO, NOS, коронарна хемодинамика, оксидациони стрес
УДК	
Чува се: ЧУ	У библиотеци Факултета медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Република Србија
Важна напомена: МН	
Извод: ИД	<p>Циљ. Циљ ове студије је био испитивање улоге азот монооксида (NO) у анафилакси. Обзиром да је анафилакса потенцијално опасна по живот, испитивања у овој области су ограничена те су неопходни експериментални модели. Са циљем да се јасније испита улога NO у анафилакси користили смо модел локалне анафилактичке реакције изолованог срца миша дивљег и соја дефицијентног у индуцибилној форми азот моноксид синтетазе (iNOS^{-/-}).</p> <p>Методe. У студији су коришћена срца мужјака миша (старосне доби 6-8 недеља, телесне масе 20-25грама, по 12 у свакој експерименталној групи) која су изолована и перфундована методом ретроградне перфузије по Лангендорфу (Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary) при константном коронарном перфузионом притиску и варијабилном протоку. Експерименталне животиње су биле подељене у четири групе: iNOS^{-/-} и дивљи сој (енгл. wild), сензибилисани и несензибилисани. Мишеви су сензибилисани са две интраперитонеалне ињекције овалбумина (100µg), првог и четрнаестог дана. Двадесет осмог дана срца су изолована и перфундована у Лангендорфовом апарату. Срчана анафилакса је изазивана ињекцијом раствора овалбумина (1mg/1ml) кроз аортну канилу. Током десет минута, у интервалима од по 2 минута коронарни</p>

проток (CF), систолни притисак (SP), дијастолни притисак (DS), срчана фреквенца (HR) и средњи перфузиони притисак (MBP) су одређивани а прикупљани су узорци коронарног ефлуента. У узорцима коронарног венског ефлуента спектрофото-метријским методама су одређивани следећи маркери оксидационог стреса: индекс липидне пероксидације – мерен као TBARS, азот моноксид у форми нитрита (NO_2), супероксид анјон радикал (O_2^-) и водоник пероксид (H_2O_2).

Резултати. Резултати истраживања су приказани на 36 табела и 36 графикана. Сумарно посматрано, анафилактичку реакцију изолованог срца миша карактерше, пад SP, повећање DP, убрзање HR, повећање вредности MBP и смањење CF. У групи iNOS^{-/-} мишева бележи се већи поремећај хемодинамских параметара у односу на wild сојеве. Најизраженије промене хемодинамских параметара се у обе групе мишева дешавају у прва два минута по давању алергена. Није уочена статистички значајна промена вредности TBARS-а, NO, O_2^- и H_2O_2 после излагања алергену ни у једној од посматраних група мишева. У групи iNOS^{-/-} мишева, пре и после давања алергена, током периода посматрања мериле су се статистички значајно веће вредности NO него у групи wild мишева.

Закључак. Анафилактичку реакцију изолованог срца миша iNOS^{-/-} и wild сојева карактерише поремећај хемодинамских параметара док значајне промене вредности параметара оксидационог стреса нису утврђене. Обзиром да је у групи iNOS^{-/-} мишева дошло до продукције NO произилази да iNOS није искључиво одговорна за синтезу NO током анафилактичке реакције већ је могућа компензаторна хиперактивност ендотелне NOS (eNOS).

Датум прихватања теме од стране ННВ: ДП	23.06.2010.
Датум одбране: ДО	
Чланови комисије: КО	<p>1. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, председник</p> <p>2. Проф. др Мирко Росић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан</p> <p>3. Проф. др Драган Ђурић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Физиологија, члан</p>

8.2 KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICINE KRAGUJEVAC

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Documentation type: DT	Monographic publication
Type of record: TR	Textual material, printed
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Vesna Miličić
Menthor/co-mentor MN	Prof. Vladimir Jakovljević, MD, PhD
Title: TI	Role of nitric oxide (NO) in isolated mouse heart model of anaphylaxis
Language of text: LT	Serbian(cyrilic)
Language of abstract:	Serbian/English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Šumadija manucipality
Publication year: PY	2014.
Publisher: PU	Author s reprint
Publication place: PP	34000 Kragujevac, Svetozara Markovica Street, 69
Physical description: PD	121/5/40/36/128
Scientific field: SF	Medicine
Scientific discipline: SD	Experimental physiology

Subject/key words: SKW	anaphylaxis, cardiac anaphylaxis, NO, NOS, coronary hemodynamics, oxidative stress
UDC	
Holding data: HD	Library of Faculty of medical sciences, University of Kragujevac, Republic of Serbia
Note: N	
Abstract: AB	<p>Objective. The aim of this study was to analyze role of nitric oxide (NO) in anaphylaxis. Anaphylaxis is potentially life-treating disorder, research in this field is limited and experimental models are required. In order to reveal more clearly the role of NO in anaphylaxis we have used the model of isolated heart of wild type and inducible oxide synthase deficient mouse (iNOS^{-/-}).</p> <p>Methods. The hearts of male mice, (6-8 weeks old, body mass 20-25g, 12 in each experimental group), were excised and perfused in a Langendorff apparatus for isolated heart with constant pressure and variable flow (Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary). The animals were divided into four groups: iNOS^{-/-} and wild type mice, sensitized and unsensitized. The mice were sensitized by two intraperitoneal injections of 100µg ovalbumin, first and fourteenth day. On the twenty-eight day the hearts were isolated and mounted into a Langendorff perfusion apparatus. Cardiac anaphylaxis was elicited by injection of solution (1mg/1ml) of ovalbumin into the aortic cannula. For the next ten minutes, in intervals of two minutes coronary flow rates (CF), systolic pressure (SP), diastolic pressure (DS), heart rate (HR) and mean perfusion pressure (MBP) were measured and samples of coronary effluent were collected. In the samples of coronary venous effluent the following parameters were determined using spectrophotometric methods: lipidperoxidation index – measured as</p>

	<p>TBARS, nitrogen monoxide in the form of nitrite (NO₂), superoxide anion radical (O₂⁻) and hydrogen peroxide (H₂O₂).</p> <p>Results. Our results are presented in 36 tables and 36 charts. To summarize, anaphylactic reaction of isolated mouse hart is characterized by decreased of SP, increased of DP, acceleration of HR, higher values of MBP and decline of CF in each group. With iNOS^{-/-} mice the greater disorder of hemodynamic parameters is recorded in relation of wild type. The most pronounced changes occur in the first two minutes after the administration of ovalbumin in each group. No statistically significant changes in TBARS, NO, O₂⁻ and H₂O₂ were observed after administration of the allergen in each group. In the group of iNOS^{-/-} mice, before and after the administration of the allergen, higher levels of NO are measured than in the wild mice group.</p> <p>Conclusion. Anaphylactic reaction of isolated wild and iNOS^{-/-} mouse heart is characterized by disorder of hemodynamic parameters while significant change of oxidative stress parameters was not observed. As NO was produced in iNOS^{-/-} heart model we can conclude that iNOS is not only responsible isoform but compensatory hyperactivity of endothelial NOS (eNOS) is possible mechanism.</p>
<p>Accepted by the Scientific Board on: ASB</p>	<p>23.06.2010</p>
<p>Defended on: DE</p>	
<p>Thesis defended board (Degree/name/surname/title/faculty) DB</p>	<p>1. Prof Nebojša Arsenijević, PhD, full professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific domain: Microbiology and Immunology and Basics of Oncology, president</p>

	<p>2. Prof Mirko Rosić, PhD, full professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific domain: Physiology, member</p> <p>3. Prof Dragan Đurić, PhD, full professor, School of Medicine, University of Belgrade, scientific domain: Physiology, member</p>
--	---

8.3. БИОГРАФИЈА АУТОРА

1. ЛИЧНИ ПОДАЦИ

Име и презиме: Весна Миличић

Датум и место рођења: 27.07.1971. године, Крагујевац, Република Србија

Адреса: Др Радосава Марковића 39, Крагујевац

Телефон: 064/1428443

2. ОБРАЗОВАЊЕ

Прва крагујевачка гимназија,

Медицински Факултет у Крагујевцу, дипломирала 1997. Године

Медицински Факултет у Београду, специјализирала дерматовенерологију 2004.
године

Медицински Факултет у Крагујевцу, магистрирала 2006. године

3. ПОЗНАВАЊЕ СТРАНИХ ЈЕЗИКА

Енглески језик (напредни ниво)

4. РАДНО ИСКУСТВО

Сарадник у звању асистента за ужу научну област Дерматовенерологија,

Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу

Специјалиста дерматовенеролог, Центар за дерматовенерологију, КЦ Крагујевац

5. РАЗНО

Учесник великог броја домаћих и међународних конгреса и симпозијума.

Члан Удружења дерматовенеролога Србије.

8.4. БИБЛИОГРАФИЈА

Радови штампани у часописима на СС/SCI листи:

1. Ravic-Nikolic A, **Milicic V**, Ristic G, Jovovic-Dagovic B. Pyoderma gangrenosum associated with Sjogren syndrome. Eur J Dermatol 2009; 19 (4): 392-3.
2. Ravić-Nikolić A, **Milicic V**, Ristic G, Jovovic-Dagovic B, Mitrović S. Actinic reticuloid presented as facies leonine. Intl J Dermatol 2012; 51: 234-238.
3. Ravić-Nikolić A, Mladenović V, Mitrović S, **Miličić V**, Djukić A, Jovović-Dagović B, Savčić G. Generalized eruptive xanthomas associated with diabetic dyslipidemia. Eur J Dermatol 2014, accepted for publication, doi: 10.1684/ejd.2014.2323.

Радови штампани у часописима цитираним у INDEX MEDICUS-у:

1. **Miličić V**, Ravić-Nikolić A, Jovović-Dagović B, Ristić G, and Mitrović S. Generalized granuloma annulare presenting as arcuate dermal erythema. Acta dermatoven APA. 2010; 19 (1): 25-27.
2. Ravić-Nikolić A, **Miličić V**, Jovović-Dagović B, Ristić G. Gyrate erythema associated with metastatic tumor of gastrointestinal tract. Dermatol Online J. 2006 Oct 31;12(6):11.
3. Jovović-Dagović B, Ravić-Nikolić A, **Miličić V**, Ristić G. Bilateral nevus of Ota in a light-skinned woman, Dermatology Online Journal 2007 July 31; 13(3):19.

Радови штампани у часописима цитираним у EMBASE-у:

1. **Milicic V**, Baskic D, Zdravkovic N and Arsenijevic N. Nitric oxide and IFN- γ plasma levels in patients with atopic dermatitis. Ser J Exp Clin Res 2008, 9 (4): 143-148.
2. Ravic-Nikolic A, **Milicic V**, Ristic G, Jovovic-Dagovic B, Krstic N. Herpes zoster in a patient with rheumatoid arthritis and mixed connective tissue disease. Ser J Exp Clin Res 2008, 9 (4): 155-157.
3. Крстић Н, Стојиљковић М, Столић Р, Ристић Г, Равић-Николић А, **Миличић В**. Етиопатогенеза и клиничке карактеристике псоријазе у периоду од 2007. до 2009. године . Медицински часопис 2009; 2: 13-19.
4. **Миличић В**, Равић-Николић А, Јововић-Даговић Б, Митровић С, Ристић Г, Крстић Н. Lichen planopilaris- приказ случаја. Медицински часопис 2010; 2: 24-27.
5. Крстић Н, Чановић П, Равић-Николић А, **Миличић В**. Улога дермоскопије у дијагностици малигнух меланома. Медицински часопис 2010; 3: 21-24.

8.5. AUTHORS CURRICULUM VITAE

1. PERSONAL DATA

Name and surname: Vesna Miličić

Date and place of birth: 27.07.1971. Kragujevac, Serbia

Address: Dr Radosava Markovića 39, Kragujevac

Phone: 064/1428443

2. EDUCATION

Prva kragujevačka gimnazija,

Medical Faculty in Kragujevac, graduated - 1997.

Medical Faculty in Belgrade, specialized in dermatovenereology – 2004.

Medical Faculty in Kragujevac, has master's degree - 2006.

3. FOREIGN LANGUAGE

English (advanced)

4. WORK EXPERIENCE

Assistant trainee et Department of Dermatovenereology, Faculty of Medical Sciences,
University of Kragujevac, Kragujevac

Dermatovenereologist in Department of Dermatovenereology, Clinical Center
Kragujevac, Kragujevac

5. MISCELLANEOUS

Participant in large number of national and international congresses and symposiums.

Member of Serbian association of Dermatology.

8.6. LIST OF PUBLICATIONS

ARTICLES PUBLISHED IN CC/SCI JOURNALS:

1. Ravic-Nikolic A, **Milicic V**, Ristic G, Jovovic-Dagovic B. Pyoderma gangrenosum associated with Sjogren syndrome. Eur J Dermatol 2009; 19 (4): 392-3.
2. Ravić-Nikolić A, **Milicic V**, Ristic G, Jovovic-Dagovic B, Mitrović S. Actinic reticuloid presented as facies leonine. Intl J Dermatol 2012; 51: 234-238.
3. Ravić-Nikolić A, Mladenović V, Mitrović S, **Miličić V**, Djukić A, Jovović-Dagović B, Savčić G. Generalized eruptive xanthomas associated with diabetic dyslipidemia. Eur J Dermatol 2014, accepted for publication, doi: 10.1684/ejd.2014.2323.

ARTICLES PUBLISHED IN JOURNALS CITED IN INDEX MEDICUS:

1. **Miličić V**, Ravić-Nikolić A, Jovović-Dagović B, Ristić G, and Mitrović S. Generalized granuloma annulare presenting as arcuate dermal erythema. Acta dermatoven APA. 2010; 19 (1): 25-27.
2. Ravić-Nikolić A, **Miličić V**, Jovović-Dagović B, Ristić G. Gyrate erythema associated with metastatic tumor of gastrointestinal tract. Dermatol Online J. 2006 Oct 31;12(6):11.
3. Jovović-Dagović B, Ravić-Nikolić A, **Miličić V**, Ristić G. Bilateral nevus of Ota in a light-skinned woman, Dermatology Online Journal 2007 July 31; 13(3):19.

ARTICLES PUBLISHED IN JOURNALS CITED IN EMBASE:

1. **Milicic V**, Baskic D, Zdravkovic N and Arsenijevic N. Nitric oxide and IFN- γ plasma levels in patients with atopic dermatitis. Ser J Exp Clin Res 2008, 9 (4): 143-148.
2. Ravic-Nikolic A, **Milicic V**, Ristic G, Jovovic-Dagovic B, Krstic N. Herpes zoster in a patient with rheumatoid arthritis and mixed connective tissue disease. Ser J Exp Clin Res 2008, 9 (4): 155-157.
3. Крстић Н, Стојиљковић М, Столић Р, Ристић Г, Равић-Николић А, **Миличић В**. Етиопатогенеза и клиничке карактеристике псоријазе у периоду од 2007. до 2009. године . Медицински часопис 2009; 2: 13-19.
4. **Миличић В**, Равић-Николић А, Јововић-Даговић Б, Митровић С, Ристић Г, Крстић Н. Lichen planopilaris- приказ случаја. Медицински часопис 2010; 2: 24-27.
5. Крстић Н, Чановић П, Равић-Николић А, **Миличић В**. Улога дермоскопије у дијагностици малигнух меланома. Медицински часопис 2010; 3: 21-24.

8.7 ИНДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I. Аутор</i>
Име и презиме: Весна Миличић
Датум и место рођења: 27.07.1971. године, Крагујевац, Република Србија
Садашње запослење: Сарадник у звању асистента за ужу научну област Дерматовенерологија, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу Специјалиста дерматовенеролог, Центар за дерматовенерологију, КЦ Крагујевац
<i>II. Докторска дисертација</i>
Наслов: Улога азотног монооксида (NO) у локалној анафилактичкој реакцији изолованог срца миша
Број страница: 121
Број слика: 5 Број табела: 40 Број графикона: 36
Број библиографских података: 128
Установа и место где је рад израђен: Лабораторија за кардиоваскуларну физиологију, Институт Факултета медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац
Научна област (УДК): Медицина, Физиологија
Ментор: Проф. др Владимир Јаковљевић
<i>III. Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 18.02.2010.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: 1285/9 05.07.2010.
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: 1. Проф. др Небојша Арсенијевић, председник 2. Проф. др Владимир Јаковљевић, члан 3. Проф. др Драган Ђурић, члан 4. Проф. др Мирко Росић, члан 5. Проф. др Снежана Живанчевић – Симоновић, члан
Комисија за оцену докторске дисертације: 1. Проф. др Небојша Арсенијевић, председник 2. Проф. др Мирко Росић, члан 3. Проф. др Драган Ђурић, члан
Комисија за одбрану докторске дисертације: 1. Проф. др Небојша Арсенијевић, председник 2. Проф. др Мирко Росић, члан 3. Проф. др Драган Ђурић, члан
Датум одбране дисертације:

ОБРАЗАЦ 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Потписана

мр Весна Миличић

број уписа 2007/75

ИЗЈАВЉУЈЕМ да је докторска дисертација под називом „Улога азотног монооксида (NO) у локалној анафилактичкој реакцији изолованог срца миша“:

- 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 кршила ауторска права нити користила интелектуалну својину других лица

У Крагујевцу,

26.05.2014.

Потпис аутора

мр Весна Миличић

ОБРАЗАЦ 2.

ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКОГ РАДА

Име и презиме аутора
мр Весна Миличић

Број уписа
2007/75

Студијски програм:
Докторске академске студије

Наслов рада:

Улога азотног монооксида (NO) у локалној анафилактичкој реакцији изолованог срца
миша

Ментор:
Проф. др Владимир Јаковљевић

Потписана мр Весна Миличић

ИЗЈАВЉУЈЕМ да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској
верзији коју сам предала за објављивање на порталу ДИГИТАЛНОГ
РЕПОЗИТОРИЈУМА УНИВЕРЗИТЕТА У КРАГУЈЕВЦУ

ДОЗВОЉАВАМ да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског
звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења, датум
одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у
електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Крагујевцу.

У Крагујевцу,
26.05.2014.

Потпис аутора
мр Весна Миличић

ОБРАЗАЦ 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

ОВЛАШЋУЈЕМ Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Улога азотног монооксида (NO) у локалној анафилактичкој реакцији изолованог срца миша“, која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодним за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative commons) за коју сам се одлучила:

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

У Крагујевцу,
26.05.2014.

Потпис аутора
мр Весна Миличић

ОБРАЗАЦ 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Потписана
мр Весна Миличић

број уписа 2007/75

ИЗЈАВЉУЈЕМ да је докторска дисертација под називом „Улога азотног монооксида (NO) у локалној анафилактичкој реакцији изолованог срца миша“:

- 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 кршила ауторска права нити користила интелектуалну својину других лица

У Крагујевцу,
26.05.2014.

Потпис аутора
мр Весна Миличић



ОБРАЗАЦ 2.

ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКОГ РАДА

Име и презиме аутора
мр Весна Миличић

Број уписа
2007/75

Студијски програм:
Докторске академске студије

Наслов рада:

Улога азотног монооксида (NO) у локалној анафилактичкој реакцији изолованог срца миша

Ментор:
Проф. др Владимир Јаковљевић

Потписана мр Весна Миличић

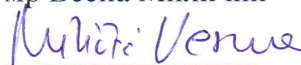
ИЗЈАВЉУЈЕМ да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на порталу ДИГИТАЛНОГ РЕПОЗИТОРИЈУМА УНИВЕРЗИТЕТА У КРАГУЈЕВЦУ

ДОЗВОЉАВАМ да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења, датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Крагујевцу.

У Крагујевцу,
26.05.2014.

Потпис аутора
мр Весна Миличић



ОБРАЗАЦ 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

ОВЛАШЋУЈЕМ Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Улога азотног монооксида (NO) у локалној анафилактичкој реакцији изолованог срца миша“, која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодним за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative commons) за коју сам се одлучила:

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

У Крагујевцу,
26.05.2014.

Потпис аутора
мр Весна Миличић
