

**УНИВЕРЗИТЕТ У ПРИШТИНИ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

Илија Драгојевић

**МЕТАБОЛИЗАМ СЛОБОДНИХ РАДИКАЛА У
ПОЛИМОРФОНУКЛЕАРНИМ ЛЕУКОЦИТИМА
БОЛЕСНИКА СА АКУТНИМ КОРОНАРНИМ
СИНДРОМОМ**

Докторска дисертација

Косовска Митровица, 2014. године

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....	2
2.1. Неутрофилни полиморфонуклеарни леукоцити- неутрофили.....	2
2.2. Кисеоник и реактивне врсте кисеоника.....	5
2.2.1. Супероксид анјон радикал, $O_2^{\bullet-}$	6
2.2.2. Хидроксил радикал, OH^{\bullet}	8
2.2.3. Хидроген пероксид, H_2O_2	8
2.2.4. Хипохлорна киселина, $HOCl$	9
2.2.5. Синглет кисеоник.....	10
2.3. Извори оксиданаса у неутрофилима.....	10
2.3.1. NADPH-оксидаза.....	10
2.3.2. Мијелопероксидаза (МПО).....	11
2.4. Оксидациони стрес.	11
2.4.1. Оксидационо оштећење биомолекула.....	12
2.4.1.1. Липидна пероксидација.....	12
2.4.1.2. Оксидациона модификација протеина.....	14
2.4.1.3. Оштећење појединих аминокиселина.....	15
2.5. Антиоксидациона заштита.....	15
2.5.1. Супероксид дизмутаза (СОД).....	15
2.5.2. Каталаза.....	16
2.5.3. Глутатион пероксидаза.....	17
2.5.4. Глутатион редуктаза.....	18
2.5.5. Глутатион (ГСХ).....	19
2.5.6. Екстрацелуларна антиоксидациона заштита.....	20
3. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	21
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА.....	22
4.1. Испитивани болесници.....	22
4.2. Биохемијске анализе испитиваног материјала.....	23
4.2.1. Припрема материјала за анализе.....	23

4.2.2. Одређивање концентрације протеина у лизату неутрофила.....	24
4.2.3. Одређивање производа липидне пероксидације у лизату неутрофила и плазми.....	24
4.2.3.1. Одређивање концентрације коњугованих диена.....	24
4.2.3.2. Одређивање концентрације укупних хидропероксида.....	25
4.2.4. Одређивање производа оксидационе модификације протеина.....	26
4.2.4.1. Одређивање концентрације узапредовалих оксидационих продуката протеина.....	26
4.2.5. Метода за одређивање концентрације нитрита/нитрата.....	26
4.2.6. Одређивање активности мијелопероксидазе	27
4.2.6.1. Метода за одређивање пероксидазне активности мијелопероксидазе	27
4.2.6.2. Метода за одређивање хлоринишуће активности мијелопероксидазе.....	27
4.2.7. Метода за одређивање концентрације хлорамина.....	29
4.2.8. Одређивање активности прооксидационог ензима-ксантин оксидазе.....	30
4.2.9. Одређивање неензимских и ензимских антиоксиданаса.....	30
4.2.9.1. Одређивање концентрације укупних непротеинских тиол једињења.....	30
4.2.9.2. Одређивање концентрације укупних тиол група.....	31
4.2.9.3. Одређивање каталитичке активности супероксид дизмутазе.....	31
4.2.9.4. Одређивање каталитичке активности глутатион пероксидазе-3.....	32
4.2.9.5. Метода за одређивање глутатион пероксидазе-1.....	33
4.2.9.6. Метода за одређивање активности каталазе.....	33
4.2.9.7. Одређивање каталитичке активности глутатион редуктазе.....	34
4.3. Статистичка обрада података.....	35
5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА.....	37
5.1. Карактеристике испитаника.....	37
5.2. Резултати испитивања лизата неутрофила болесника са акутним коронарним синдромом и контролне групе	40
5.2.1. Продукти оксидативне модификације у лизату неутрофила болесника са акутним коронарним синдромом и контролне групе	40
5.2.2. Неензимски и ензимски елементи антиоксидационе заштите у лизату неутрофила болесника са акутним коронарним синдромом и контролне групе.....	42
5.2.3. Каталитичка активност мијелопероксидазе у лизату неутрофила болесника са акутним коронарним синдромом и контролне групе.....	44

5.3. Резултати испитивања лизата неутрофила болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и контролне групе.....	45
5.3.1. Продукти оксидативне модификације у лизату неутрофила болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и контролне групе.....	45
5.3.2. Неензимски и ензимски елементи антиоксидационе заштите у лизату неутрофила болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и контролне групе.....	47
5.3.3. Каталитичка активност мијелопероксидазе у лизату неутрофила болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и контролне групе.....	49
5.4. Резултати испитивања плазме болесника са акутним коронарним синдромом и контролне групе.....	50
5.4.1. Продукти оксидативне модификације у плазми болесника са акутним коронарним синдромом и контролне групе.....	51
5.4.2. Неензимски и ензимски елементи антиоксидационе заштите у плазми болесника са акутним коронарним синдромом и контролне групе.....	53
5.4.3. Каталитичка активност мијелопероксидазе у плазми болесника са акутним коронарним синдромом и у контролној групи.....	55
5.4.4. Активност ксантин оксидазе и концентрација нитрита/нитрата у плазми болесника са акутним коронарним синдромом и у контролној групи.....	56
5.5. Резултати испитивања плазме болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и контролне групе.....	56
5.5.1. Продукти оксидативне модификације у плазми болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и у контролној групи.....	57
5.5.2. Неензимски и ензимски елементи антиоксидационе заштите у плазми болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и у контролној групи.....	58
5.5.3. Каталитичка активност мијелопероксидазе у плазми болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и у контролној групи.....	60
5.5.4. Активност ксантин оксидазе и концентрација нитрита/нитрата у плазми болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и здравих..	61
5.6. Корелациона анализа.....	62

5.6.1. Корелациона анализа вредности променљивих из лизата неутрофила у групи болесника са акутним коронарним синдромом.....	62
5.6.2. Корелациона анализа вредности променљивих из крвне плазме у групи болесника са акутним коронарним синдромом.....	64
5.7. Линеарна и мултипла (вишеструка) регресија.....	67
5.7.1. Линеарна и мултипла (вишеструка) регресија варијабли у лизату неутрофила у групи болесника са акутним коронарним синдромом.....	67
5.7.2. Линеарна и мултипла (вишеструка) регресија варијабли у плазми болесника са акутним коронарним синдромом.....	69
6. ДИСКУСИЈА.....	71
7. ЗАКЉУЧЦИ.....	94
8. ЛИТЕРАТУРА.....	97

1. УВОД

Неутрофилни полиморфонуклеарни леукоцити се сматрају ћелијама прве линије одбране од инфекције. Гледиште да имају кратак полуживот у циркулацији и да зреле ћелије не остварују биосинтетску активност усмерило је истраживања у правцу проучавања њихове улоге у борби против инфективних агенаса. Најновија открића вишеструко дужег живота у циркулацији, могућности одлагања апоптозе и постојања биосинтетске активности отварају ново поглавље у испитивању других могућих функција неутрофила. Акутни коронарни синдром представља *in vivo* модел исхемијско-реперфузионог оштећења. Неутрофили играју улогу у настанку акутног коронарног синдрома. Ако посматрамо неутрофиле као моћан извор реактивних врста, поставља се питање како се ове ћелије прилагођавају на услове исхемије и реперфузије у акутном коронарном синдрому, а у светлу продужене активације и живота у циркулацији. Испитивање метаболизма слободних радикала и реактивних врста у неутрофилима може нам пружити одговор на питање да ли је антиоксидациона заштита довољна да се супростави појачаном оксидационом стресу, и ако јесте који њени елементи имају главну улогу у томе.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Неутрофилни полиморфонуклеарни леукоцити- неутрофили

Полиморфонуклеарни леукоцити су добили име на основу присуства мултилобарног једра неправилног облика и великог броја гранула у цитоплазми. На основу различитог бојења садржаја у цитоплазми деле се на еозинofile, базофиле и неутрофиле. Поред тога, разлика се огледа и у садржају гранула који доводи до испољавања различитих функција ових ћелија.

Неутрофили [1,2] су најбројнији леукоцити (40-65%), чији је број $3-5 \times 10^6$ /мл крви. Време полуживота у циркулацији је 8-20 сати, а према најновијем открићу 5.4 дана [3,4]. Неутрофили представљају прву линију одбране од бактеријских и гљивичних инфекција. Маргинални пул [5] омогућава брзе промене у броју циркулишућих неутрофила, које су реверзибилне. Ако је потребан брз и велики пораст (10 пута) ослобађају се из костне сржи, а ако је потребно да се одржи тај пораст повећава се продукција. Након тога, неутрофили прелазе у ткива где живе неколико дана.

Величина им је 10 μm , у циркулацији су сферичног облика са неколицином цитоплазматских екструзија. Цитоплазма заузима 65%, једро 20 %, и грануле 15 % ћелијског простора [4, 6, 7]. У цитоплазми неутрофила се налазе бројне грануле- примарне (азурофилне), секундарне (специфичне) и терцијарне (садрже желатиназу), и секреторне везикуле. Састав и функција гранула варирају, а синтеза се одвија у различитим стадијумима развоја неутрофила.

Цитоплазма садржи мали број митохондрија, па неутрофили енергетске потребе задовољавају гликолизом и то углавном анаеробном гликолизом. То им омогућава да функционишу ефикасно и при ниском парцијалном притиску кисеоника какви услови владају у инфламраним ткивима. Поседују Голџи апарат и ендоплазматски ретикулум у малој количини.

Развој неутрофила се одвија од мултипотентне матичне ћелије преко мијелобласта, промијелоцита, мијелоцита, метамијелоцита до зреле ћелије [6]. При развоју опада способност ћелија да пролиферишу, а са диференцијацијом долази до појаве специфичних маркера и нестанка других (ензими и мембрански протеини). Од 100 ћелија са једром у костној сржи, 2 су

мијелобласти, 5 промијелоцити, 12 мијелоцити, 22 метамијелоцити и банд-ћелије, а 20 зрели неутрофили (око 60% свих ћелија).

Костна срж дневно произведе око 2×10^{11} неутрофила [6]. Мијелобласт има велико једро, мало гранула, а пероксидазна активност се региструје у Голџи апарату и ендоплазматском ретикулуму. Промијелоцит карактерише појава великог броја азурофилних гранула. Мијелоцит пролази кроз три циклуса деобе, а одликује га појава великог броја специфичних гранула. Остале ћелије су неспособне за деобу, а карактерише их складиштење гликогена.

Зрели неутрофил, микроспоспски, одликују мултилобарно једро и гранулирана цитоплазма. Степен биосинтезе је низак, што се може закључити по малом броју Голџи апарата и оскудном ендоплазматском ретикулуму. Неутрофили поседују грануле које садрже велики број ензима и мембранских рецептора. У физиолошким условима је садржај гранула биолошки инертан због непропустљивости мембрана. Њихово ослобађање се може десити за време фагоцитозе, када се секретују у фагоцитну везикулу или из ћелија. Ова дегранулација је регулисана посебним контролним механизмом [6, 7]. Појава фрустриране фагоцитозе означава ослобађање садржаја гранула екстрацелуларно, када се везикуле не затворе адекватно за време фагоцитозе или је циљни организам сувише велики. Неке компоненте гранула имају директну антимикробну активност, друге врше дигестију убијених организама, треће делују бактериостатски, док неке за сада немају дефинисану улогу.

Цитоскелет неутрофила је састављен од мреже микрофиламената, микротубула, интермедијерних филамената и микротрабекуларних решетака, унутар кога су уграђене интраћелијске компоненте [8]. Транслокација цитоплазматских органела и гранула, померање цитосолних протеина, рециклирање рецептора, као и главне функције - дијапедеза, фагоцитоза, активација NADPH оксидазе, дегранулација и регулација рецептора су тесно повезане са променама у организацији цитоскелета.

Наиме, у току активације неутрофила, цитоскелет прелази из солубилног (сол) у полуврсто (гел) стање са појавом псеудоподија. Настају тродимензионалне промене ћелијског облика у току хемотаксе и фагоцитозе, које су регулисане променом интраћелијске концентрације јона Ca^{2+} . Пад концентрације Ca^{2+} преводи сол у гел стање, и обрнуто. Промене у дужини актина утичу на усмерене покрете псеудоподија, актин је одговоран за

протрузију, а миозин за контракцију. Неутрофили се крећу брзином од 20 $\mu\text{m}/\text{мин}$ као одговор на хемоатрактанте, денатурисане протеине, липиде, комплемент c5a. Хемотакса је усмерено кретање у правцу концентрационог градијента. Цитоскелет има улогу у склапању компоненти функционално активне NADPH оксидазе и одвијању респираторног праска.

За неутрофиле крви се каже да су у стању мировања (енгл. *resting-mirnom*, непобуђеном). Када се активирају, било дејством стимулуса или пријањањем за површине, мењају облик - поларизују се са јасно израженим предњим и задњим крајем и спљоштавају, заузимајући амебоидни облик са псеудоподијама- постају *прајмовани*, односно побуђени (енгл. *priming-побуђивање*, припрема за активно деловање), и спремни да делују.

Побуђивање се може изазвати различитим патолошким и физиолошким стимулусима и подразумева припрему неутрофила за потпуну активацију [8]. Ова двостепена активација штити од неспецифичне активације неутрофила, који могу оштетити и здраво ткиво.

Побуђивање подразумева померање и фузију цитоплазматских гранула и везикула са плазма мембраном. За време овог процеса повећава се број рецептора и других протеина на површини ћелије, што чини неутрофиле способним да детектују fine промене у свом окружењу.

Субоптималне концентрације агониста неутрофилне функције могу индуковати усходну регулацију истих али без активације - феномен назван *прајминг*. *Прајмовани* неутрофили стварају повећан ниво реактивних врста и имају изражену дегранулацију и већу фагоцитну активност у односу на мирујуће ћелије [9].

Краткотрајни ефекти прајминга су повећана продукција оксиданаса, промене ћелијског облика и цитоскелета, повећање NADPH оксидазне активности, повећана експресија мембранских рецептора [10]. Ове промене су брзе и независне од *de novo* синтезе протеина. За наведене процесе су одговорни стварање секундарних гласника, померање гранула и везикула условљено променама у цитоскелету и последична мембранска фузија. Неактивисани неутрофили у крви су сферичног облика и заузимају амебоидну форму само кад адхерирају на површину зида крвних судова, немају способност стварања реактивних форми, а експресија рецептора је ниска.

Дуготрајни ефекти се остварују дејством цитокина кроз функционалне промене, сатима и данима касније, доводећи до продужења живота неутрофила [11]. Да би се продужио живот неутрофила потребна је активна генска експресија која омогућава испољавање њихових функција, а у условима инфламације, стварањем молекула који активно регулишу инфламаторну реакцију. Претходно схватање да зрели неутрофили не врше *de novo* синтезу молекула је промењено. Заснивало се микроскопском налазу малог броја ендоплазматских ретикулума, рибозома, недостатку нуклеолуса, кондензованом хроматину и полуживоту краћем од 12 часова. Продужена активност (живот) захтева синтезу пре свега оних компоненти које се брзо метаболишу.

Данас је прихваћено становиште да су неутрофили за време инфламације биосинтетски активни [12, 13], те да могу испољити и друге функције које су раније приписиване само моноцитима и макрофагима. Молекули које би зрели неутрофили морали да синтетишу су конститутивни регулаторни („house-keeping“) протеини актин и фосфоглицерокиназе, мембрански рецептори, компоненте оксидазе и цитокини којих нема у мирујућим ћелијама, као што су M-CSF, IFN- γ , G-CSF, IL-1, IL-6, IL-8.

2.2. Кисеоник и реактивне форме кисеоника

Молекулски кисеоник (O_2) је на собној температури гас, изграђен од 2 атома кисеоника међусобно повезаних ковалентном везом. Поседује два неспарена електрона паралелних спинова, показује парамагнетичност и има високу енергију активације. Иако је у принципу слабо реактиван кисеоник може да делује као оксидишући агенс, при чему се сам редукује. Због тога што се најчешће ради о двоелектронској редукцији оба примљена електрона морају да имају антипаралелне спинове у односу на атоме кисеоника (Паулијев принцип), што је практично немогуће. Уместо тога, молекул кисеоника прима један по један електрон, што вероватно објашњава његову слабу реактивност према другим молекулима [14]. Међутим, молекулски кисеоник може реаговати брзо са слободним радикалима и то по принципу једноелектронске редукције, али на срећу у људском организму већина молекула су нерадикали.

Реактивне кисеоничке форме је заједнички назив за слободне радикале и нерадикалске деривате кисеоника [15], какви су водоник пероксид, хипохлорна киселина и озон. По дефиницији, слободни радикал је сваки молекул или група атома способних да самостално опстану, а садрже један или више неспарених електрона у задњој орбитали [15]. Сви слободни радикали су реактивне форме, али не важи и обратно. Реактивни је релативан појам, јер нпр. супероксид анјон радикал ($O_2^{\bullet-}$) и водоник пероксид (H_2O_2) показују извесну селективност у реакцији са другим биомолекулима, за разлику од хидроксил радикала (HO^{\bullet}) који реагује са било којим молекулом у свом окружењу.

2.2.1. Супероксид анјон радикал, $O_2^{\bullet-}$

Примањем једног електрона кисеоник прелази у супероксид анјон радикал [16]. Извори супероксида су ксантин оксидаза, NADPH оксидазе, аутооксидационе реакције, хем протеини и респираторни ланац митохондрија.

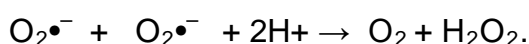
Ксантин оксидоредуктаза настаје из ксантин дехидрогеназе ензимском протеолизом или оксидацијом тиол групе [17]. Конверзија се дешава *in vivo* код оштећења ткива које води продукцији $O_2^{\bullet-}$. Обе форме ензима могу катализовати O_2 -зависну оксидацију NADH, стварајући $O_2^{\bullet-}$. У присуству NADH или хипо(ксантина) редукују нитрате у нитрите, и нитрите у азот моноксид (NO^{\bullet}) у условима исхемије. Аутооксидационе реакције су споре, али се у присуству метала променљиве валенце одвијају брзо.

Супероксид анјон радикал је мање реактиван од хидроксил радикала, показује селективност према супстрату, и тешко пролази кроз мембране. Брзо реагује са NO^{\bullet} , Fe-S кластерима у неким ензимима, хипохлорном киселином и хлораминима.

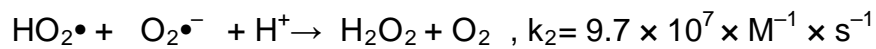
У присуству донора протона супероксид анјон радикал се протонизује у хидропероксил радикал (HO_2^{\bullet}): $HO_2^{\bullet} \leftrightarrow H^+ + O_2^{\bullet-}$.

Хидропероксил радикал је јачи редукујући агенс од $O_2^{\bullet-}$, али при физиолошком рН у ткивима однос се креће од 100:1 до 1000:1, $pK_a=4.8$ [18].

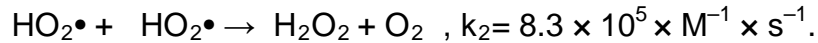
Реакције у којима учествује $O_2^{\bullet-}$ могу бити дизмутационе, у којима се један $O_2^{\bullet-}$ оксидује у O_2 , а други редукује у H_2O_2 :



Брзина реакције спонтане дизмутације је мала, и на рН 7.0 износи $5 \times 10^5 \times M^{-1} \times s^{-1}$ [18]. Међутим, у условима *in vivo* могуће су следеће реакције [19]:

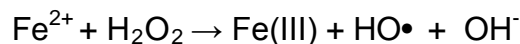
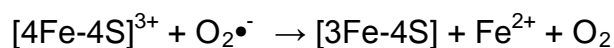
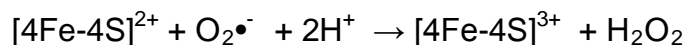


као и:

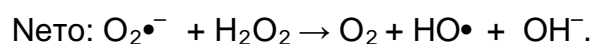
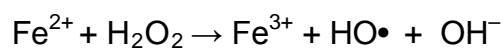
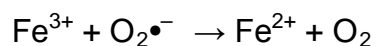


Супероксид анјон радикал је у воденој средини слабо реактиван. И поред тога, он може да делује на поједине антиоксидантне ензиме, нпр. каталазу, и смањи њихову активност. Хидропероксил радикал је реактивнији од супероксида и може иницирати липидну пероксидацију. Међутим, при физиолошком рН он се налази у траговима. У близини ћелијске мембране рН је нижи (< 5.0), што повећава концентрацију хидропероксил радикала.

Како је већина система који генеришу супероксид везана за мембране то ће и највећи део $O_2\bullet^-$ бити у протонизованој форми, која лакше пролази кроз мембрану и изазива оштећење. *In vivo* нису показани ови ефекти. Супероксид је селективан у свом дејству и може изазвати оштећење протеина. Главне мете су ензими који учествују у биосинтези аминокиселина и Кребсовом циклусу. Инактивацију изазива ослобађањем гвожђа из Fe-S кластера, које даље у Фентоновој реакцији [14] доводи до настанка хидроксил радикала:



Оксидисани ензими се могу поправити *in vivo* поновним састављањем кластера. Токсичне ефекте може испољити и кроз стварање других реактивних врста- H_2O_2 и $ONOO^-$ (пероксинитрит). Супероксид учествује у Haber-Weiss-овој реакцији [20]:

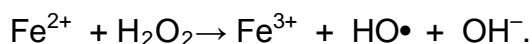


Мало је вероватно да се ова реакција одвија *in vivo*, али супероксид може одиграти улогу у настанку хидроксил радикала директно, ослобађајући Fe из кластера и феритина, и индиректно преко пероксинитрита ослобађањем Cu из церулоплазмина [21].

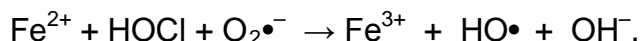
Слаба реактивност супероксида и водоник пероксида им омогућава да дифундују далеко од места настанка, и доведу до ослобађања јона метала променљиве валенце [22] и настанка хидроксила у било ком делу ћелије где је смештен осетљиви металопротеин.

2.2.2. Хидроксил радикал, HO•

Настаје у Фентоновој реакцији [14]:



Затим, може настати и дејством јонизујућег зрачења и УВ-индукованом хомолитичком фисијом O-O везе [23], као и у реакцији хипохлорне киселине у супероксида [24] у присуству метала променљиве валенце:



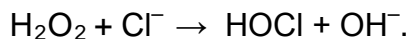
Хидроксил радикал је најреактивнији слободни радикал, са константом реда 10^7 - $10^{10} \times \text{M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ [25]. Ступа у 3 врсте реакција: одузимања водоника (са алкохолима), адиције (са ароматичним једињењима) и трансфера електрона (хлорни јони и нитрити).

2.2.3. Водоник пероксид, H₂O₂

Водоник пероксид је токсична врста која лако пролази кроз мембране као вода, и достиже интрацелуларну концентрацију од 10^{-7} - 10^{-8} M. Стварају га различите оксидазе (ХО i NADPH-оксидаза), а настаје и дејством супероксид дизмутазе (СОД) или спонтаном дизмутацијом $\text{O}_2^{\bullet-}$, затим у респираторном ланцу митохондрија. Слабо је реактиван, тако да је прави разлог његове токсичности заправо учешће у Фентоновој реакцији у којој настају HO• [14].

2.2.4. Хипохлорна киселина, HOCl

Хипохлорна киселина настаје у реакцији оксидације хлорних јона водоник пероксидом дејством мијелопероксидазе [26 – 28]:



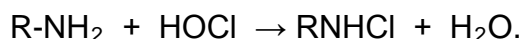
При рКа 7.5 HOCl се понаша се као слаба киселина. У физиолошким условима, на рН 7.4 је око 50% ове киселине у јонизованој форми: $\text{HOCl} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{OCl}^-$. Хипохлорна киселина се лако разграђује ослобађајући гас хлор при ниском рН:



Хипохлорна киселина инактивира α -антипротеиназу [29] (инхибитор протеолитичких ензима) реагујући са метионинским остатком уз настанак метионин сулфооксида. На исти начин инхибира тромбомодулин [30]. Циљни молекули *in vivo* су они у најближем окружењу због велике реактивности HOCl. Даље хипохлорна киселина оксидује тиоле, аскорбат, NAD(P)H, ДНК, ДНК базе (пиримидинске) [31], и тирозинске остатке у протеинима (настаје 3-хлоро- и 3,5-дихлоротирозин). Изазива оштећење бочног ланца, фрагментацију и агрегацију протеина кроз низ реакција (оксидација цистеина и метионина, настанак хлорамина [32] у реакцији са $-\text{NH}_2$ групама). Хипохлорна киселина пролази кроз мембране, при томе изазивајући оштећење мембранских протеина и липида.

Хипохлорна киселина реагује са остацима незасићених масних киселина [27] у саставу фосфолипида или естерификованог холестерола, адирајући се на С атоме са двоструком везом уз формирање хлорохидрина. У реакцији са супероксид анјон радикалом и металима променљиве валенце ствара хидроксил радикал [24]. Хипохлорна киселина оксидује нитрите у нитрате [33].

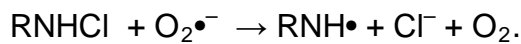
Таурин (2-аминоетан сулфонска киселина) се налази у високим концентрацијама у многим ткивима. Настаје као завршни продукт метаболизма аминокиселина које садрже сумпор. У реакцији са HOCl доводи до стварања таурин хлорамина [28], који такође може инактивирати антипротеиназу.



Слични производи настају у реакцијама HOCl са аминокиселинским групама протеина, липида, ДНК и аминокиселина у протеогликанима. Хлорамини су најпре идентификовани као дугоживећи оксиданси. Међутим, то важи само за таурин хлорамине. Наиме, протеински и аминокиселински хлорамини су нестабилни,

брзо прелазе у алдехиде, да би у наредним реакцијама из њих настали карбонили [34].

Хлорамини реагују са супероксидом и стварају N-центричне радикале:



Због тога присуство $\text{O}_2^{\bullet-}$ појачава оштећење протеина и протеогликана хипохлорном киселином [32]. Хлорамини могу да оксидује тиоле, аскорбат и метионин, али спорије од HOCl ($<10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

2.2.5. Синглет кисеоник

Постоје 2 стања синглет кисеоника. $^1\Sigma_g^+$ брзо прелази у $^1\Delta_g$, за које се сматра да је биолошки релевантно. $^1\Delta_g$ није слободни радикал. То је реактивна врста у којој су електрони ексцитирани па преносе енергију медијуму у коме су растворени [35]. Полувреме живота им је 4 μs . Синглет кисеоник настаје у фотохемијским и термичким реакцијама.

2.3. Извори оксиданаса у неутрофилима

Главни извор слободних радикала у неутрофилима су NADPH оксидаза и мијелопероксидаза (МПО).

2.3.1. NADPH-оксидаза

NADPH оксидаза [36], (EC 1.6.3.1) се састоји из:

1. б-типа цитохрома (суб b_{558}), хетеродимера, са већом субјединицом $\text{gp91}^{\text{phox}}$ (садржи FAD) и мањом p22^{phox} , присутног на мембрани, и
2. p47^{phox} , p67^{phox} , p40^{phox} и rac2 , који се налазе у цитоплазми у специфичним гранулама и секреторним везикулама (phox означава фагоцитну оксидазу, р-протеин, а gp -гликопротеин)

Активација захтева транслокацију цитоплазматских протеина до мембране и њихово склапање у активни комплекс. Модулација продукције супероксид радикала се врши преко rac2 .

Збирна реакција коју катализује овај ензимски комплекс је:



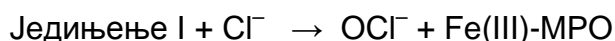
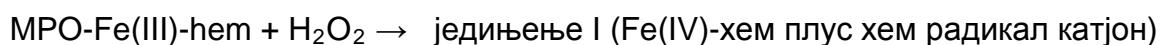
У самој реакцији цитосолни супстрат NADPH редукује FAD, при чему се сам оксидује. Редуковани FADH₂ се оксидује оксидованом формом цитохрома б₅₅₈. Овако настали редуковани цитохром б₅₅₈ даље редукује молекулски кисеоник до супероксид анјон радикала. Пренос електрона преко плазма мембране је праћен кретањем протона према споља кроз протонске канале да би се спречила ексцесивна ацидификација цитосола помоћу H⁺ ослобођеним оксидацијом NADPH. Канали су отворени док је оксидаза активна.

2.3.2. Мијелопероксидаза (МПО)

Мијелопероксидаза, (Е.С. 1. 11. 1. 7), чини чак 2-5% свих неутрофилних протеина [37]. Састоји се из 4 субјединице, по 2 исте од 60 и 15 kDa, и димер је. Хем је ковалентно везан за протеин са две естарске везе и преко сумпора, и садржи Fe³⁺.

Око 30% водоник пероксида насталог дизмутацијом супероксида у активираним неутрофилима МПО користи за стварање хипохлорне киселине, при чему за један сат њена концентрација може порастити преко 50 mM. Хипохлорна киселина реагује са таурином чија је концентрација у хуманим неутрофилима 10-50 mM и настаје таурин хлорамин [38].

Механизам мијелопероксидазне реакције је следећи:



2.4. Оксидациони стрес

Оксидациони стрес је поремећај прооксидационо- антиоксидационог баланса у корист првог [14], који води настанку потенцијалног оштећења (оксидационо оштећење) или оштећење биомолекула изазвано деловањем реактивних форми на састојке живих организама. Последице оксидационог стреса су повећана пролиферација, адаптација, ћелијско оштећење, сенесценција и ћелијска смрт. Јављају се појединачно или у комбинацији, а степен зависи од ћелијског типа и интензитета оксидационог стреса.

2.4.1. Оксидационо оштећење биомолекула

Оксидационо оштећење представља реверзибилне или иреверзибилне промене биомолекула, липида, протеина, ДНК, шећера, које ремети њихове физиолошке функције.

2.4.1.1. Липидна пероксидација

Липидна пероксидација је оксидационо оштећење полинезасићених масних киселина. Арахидонска киселина са 6 двогубих веза је начешћа мета.

Присуство двогубе везе између 2 С атома дестабилизује везу између суседног угљениковог атома и водониковог атома у саставу метиленске групе (-CH₂) у ланцу масне киселине. Одузимањем водоника из метиленске групе дејством оксиданса започиње процес липидне пероксидације [40]. .

Засићене и мононезасићене масне киселине су отпорније на оксидационо оштећење. Полинезасићене масне киселине се налазе у саставу мембрана, липопротеина и других молекула, те они и трпе оштећење у условима оксидационог стреса [41]. Липидна пероксидација је неодвојива од оксидационог оштећења протеина [42, 43], јер треба имати у виду липопротеински састав мембрана и једињења.

Липидна пероксидација се одвија у присуству супстрата који се оксидише, молекулског кисеоника, радикала кисеоничког порекла са високим оксидационим потенцијалом и метала променљиве валенце.

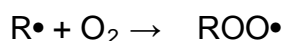
Механизми липидне пероксидације су ензимска и неензимска пероксидација уз аутооксидацију и фотооксидацију [44]. Неензимска липидна пероксидација се одвија у 3 фазе: иницијација, пропација и терминација [45].

Иницијација липидне пероксидације може бити изазвана адицијом реактивних врста, или чешће одузимањем водониковог атома из метилен групе од стране реактивне форме (хидроксил радикал, азот моноксид, хипохлорна киселина). У оба случаја настаје алкил-радикал (R•).

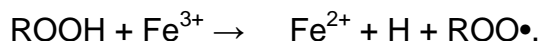
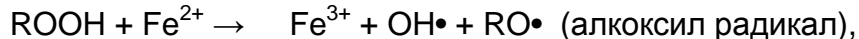
Двострука веза слаби енергију везе С-Н у метилен групи на суседном С атому (алил Н), посебно ако је присутна двогуба веза и на другом крају (бис алил Н). На рН 7.0 редукциони потенцијал бис алил- полинезасићене масне

киселине је 0.6 V. Одатле следи да су хидроксил, хидропероксил, RO• и ROO• радикал и способни да оксидишу полинезасићену масну киселину на месту алил Н. Хидроксил најлакше иницира липидну пероксидацију. Супероксид и азот моноксид нису довољно реактивни, али јесте HO₂•.

У фази пропагације органски, угљенични, радикали се стабилизују молекуларним преуређивањем и настанком коњугованих диена. Међутим, у аеробним условима ови органски радикали реагују са молекулским кисеоником градећи пероксил радикал (ROO•). Реакција зависи од присуства кисеоника:



Пероксил радикал одузима протон водоника из суседне масне киселине (RH) и прелази у органски, липидни, хидропероксид (ROOH). На до тада интактној масној киселини (RH) настаје нови R• радикал који даље реагује са кисеоником и ствара пероксил, односно долази до пропагације процеса. У присуству јона метала променљиве валенце овако настали липидни хидропероксиди могу започети каскаду липидне пероксидације, учешћем у Фентоновој реакцији [40, 46]:



Алкоксил и пероксил су одговорни за даљу пероксидацију [41]:



Ове реакције су брже од реакције водоник пероксида са Fe²⁺, док су оне са Fe³⁺ спорије. Оксидацијом алкокси радикала настаје дихидропероксид, чијом спонтаном разградњом настају кратколанчани испарљиви угљоводоници етан и пентан. Уклањање ROOH је могуће у првој фази дејством глутатион пероксидазе (Гпох), при чему се преводје у одговарајући алкохол. Затим, α-токоферол може да реагује са пероксил и алкоксил радикалима стварајући једињења која нису реактивна.

Терминација ланца липидне пероксидације настаје реакцијом пероксил радикала и α-токоферола, или алкил радикала уз формирање димера ROOR или хидроксил деривата ROH•. Ензими Гпох-1, Гпох фосфолипид

хидропероксид и селен-независна глутатион С-трансфераза су најзначајнији у терминацији липидне пероксидације.

Липидна пероксидација се може одвијати у контролисаним условима, када је посредована ензимима липооксигеназног и циклооксигеназног пута арахидонске киселине, када настају медијатори запаљенских процеса – ХПЕТЕ (деривати хидропероксиеикоса- тетра еноичне киселине) и ХЕТЕ (хидрокси деривати) и то дејством липооксигеназа, а дејством циклооксигеназа-ендопероксида [47].

Процес липидне пероксидације има физиолошку улогу у регулацији метаболизма мембранских липида, променама физичко-хемијских својстава и пропустљивости биомембрана, синтези биолошки активних молекула као што су еикасноиди, контроли ћелијске пролиферације и иницијацији одумирања ћелије [41, 44, 48, 49]. Токсични ефекти се огледају у смањењу флуидности мембрана, што је праћено повећаном пропустљивошћу за једно- и дво-валентне јоне, инактивацији мембранских ензима и губитку интегритета ћелијске мембране [50, 51].

2.4.1.2. Оксидациона модификација протеина

Настаје директним дејством реактивних форми, или секундарно дејством завршних продуката липидне пероксидације- малондиалдехида и гликацијом. Нека оштећења протеина су реверзибилна, као настанак метионин сулфооксида, S-нитрозилација, разарање Fe-S кластера супероксидом, глутатионилација и нитрација, док су друга ирерверзибилна, као на пример карбонилација бочних ланаца [52, 53].

Поједине аминокиселине су посебно осетљиве. Из тирозина под дејством пероксинитрита, NO_2^\bullet и хипохлорне киселине настају 3-нитро-, 3-хлоро- и дихлоро- тирозин. Нитрацији су подложни и фенилаланин и триптофан. Хемија оштећења је комплексна. Хидроксил радикал генерише велики број продуката, напада и пептидне везе одузимајући атоме водоника. С друге стране, водоник пероксид, азот моноксид и супероксид анјон радикал не испољавају директан већ само индиректан утицај. Наиме, пошто већина протеина везује метале променљиве валенце у реакцији са водоник пероксидом генеришу се хидроксил радикали који изазивају пероксидацију

бочних ланаца аминокиселина или пептидне везе. Протеински пероксиди се тешко отклањају, јер нису супстрати за каталазу и глутатион пероксидазе.

2.4.1.3. Оштећење појединих аминокиселина

Тиол групе се лако оксидују реактивним врстама и у присуству метала променљиве валенце, при чему настају тилил радикали и дисулфиди [54]. Метионин је осетљив на дејство хидроксила, пероксинитрита, хипохлорну киселину и хлорамине [29]. Хистидин, пролин, лизин и аргинин реагују са хидроксилом при чему настају 2-оксохистидин, и глутамат семиалдехид, док триптофан у реакцијама са хидроксилом, алкоксил и пероксил радикалима даје кинуренин [55]. Даље, фенилаланин под дејством хидроксил радикала даје орто-, пара- и мета-тирозин, а у реакцијама са реактивним врстама азота нитро фенилаланин. Валин у реакцији са хидроксил радикалом даје валин хидроксид (супстрат за Гпох).

2.5. Антиоксидациона заштита

Антиоксиданс је свака супстанца која одлаже, спречава или отклања оксидационо оштећење циљног молекула [14]. Антиоксидациону заштиту организма чине ензимски и нензимски антиоксиданси.

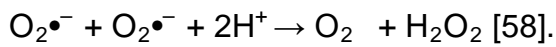
2.5.1. Супероксид дизмутаза (СОД)

Откриће супероксид дизмутазе (СОД; ЕС 1.15.1.1) довело је до постављања супероксидне теорије токсичности O_2 , и спознаје да су слободни радикали важни метаболички продукти. 1969-те године Fridrovich и Mc Cord су идентификовали Cu,Zn -СОД као ензим који у еритроцитима отклања супероксид анјон радикале [56].

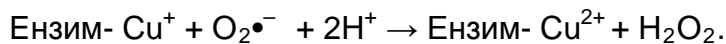
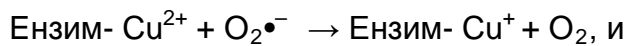
У условима *in vitro* ензим учествује и у другим реакцијама, нпр. NO^- (нитроксил) редукује Cu^{2+} ензима, па у присуству супероксида, СОД катализује конверзију NO^- у NO^\bullet [57] :

$NO^- + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \leftrightarrow NO^\bullet + H_2O_2$, и врши нитрацију тирозина преко $ONOO^-$.

Ензим има молекулску масу од 32000 Da, састоји се из 2 субјединице, од којих свака има активни центар са по једним јоном бакра и цинка. Ензим врши дизмутацију $O_2^{\bullet-}$ по следећој нето-формули:

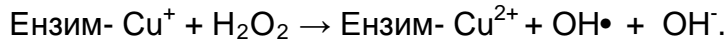
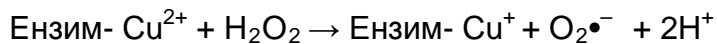


Брзина спонтане дизмутације при рН 7.0 је $5 \times 10^5 \times M^{-1} \times s^{-1}$, и зависи од промена рН. Брзина реакције коју катализује СОД је $1.5 \times 10^9 \times M^{-1} \times s^{-1}$, те је ово вероватнија реакција. Cu^{2+} катализује дизмутацију подлежући наизменичној оксидацији и редукцији:



Јон Zn^{2+} стабилизује просторну конформацију ензима. Хумана Cu,Zn -СОД је димер. Површина је негативно наелектрисана и одбија супероксид, осим позитивно наелектрисане стазе која води ка активном центру.

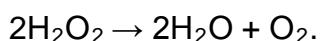
СОД испољава и прооксидационо дејство [59]. Наиме супероксид брзо реагује са Cu активног центра ($k_2 > 10^9 \times M^{-1} \times s^{-1}$) дајући H_2O_2 , који такође може реаговати са баком али спорије:



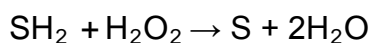
Тако СОД у присуству милимоларних концентрација H_2O_2 може створити хидроксил радикал у самом активном центру, што може довести до оштећења самог ензима и отпуштања бакра. Јон бакра се може везати за површину СОД и на том месту стварати оштећење.

2.5.2. Каталаза

Водоник пероксид уклањају 2 типа ензима и то каталаза и глутатион пероксидаза. Каталаза (EC 1.11.1.6) је интрацелуларни ензим који катализује реакцију директне разградње водоник пероксида до молекулског кисеоника:

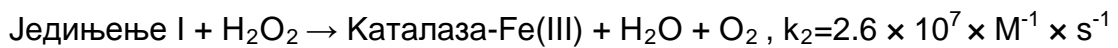


Пероксидаза уклања пероксид користећи га да оксидује други супстрат (означен као SH_2):



Каталаза је присутна у свим ткивима, а највише у јетри и еритроцитима. Каталаза има 4 субјединице, а свака од њих Fe(III)-hem у активном центру [60]. Активни центар је смештен испод површине молекула и до њега води узак канал обложеним хидрофобним остацима аминокиселина, што спречава приступ већини молекула осим H₂O₂. За сваку субјединицу је везан 1 молекул NADPH. Дисоцијација субјединица води инактивацији ензима. Такође је осетљив на циклусе замрзавања и одмрзавања, дејство јаких киселина и база.

Реакција коју катализује каталаза је реакција дизмутације, у којој се један молекул водоник пероксида редукује до воде, а други оксидује до молекулског кисеоника [41]:

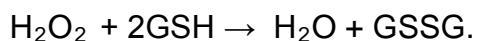


Улога NADPH је да одржи активност ензима, функционисући као донор е⁻ за једињење I када је концентрација H₂O₂ ниска, и преведећи једињење II у активну каталазу.

V_{max} за разградњу водоник пероксида је веома висока, па је тешко сатурисати каталазу. 2 молекула H₂O₂ реагују са једним активним центром, што при паду концентрације чини ову реакцију немогућом. Каталаза испољава и пероксидазну активност. Каталаза је највећим делом локализована у пероксизомима.

2.5.3. Глутатион пероксидаза-1 (Гпох-1)

Ензим глутатион пероксидаза-1 (Гпох-1, EC 1.11.1.9) уклања водоник пероксид, везујући његову редукцију до воде са оксидацијом глутатиона [61 – 63]:



Постоји више изоензима глутатион пероксидазе који су широко распрострањени у свим ткивима. Осим водоник пероксида редукују и хидропероксиде масних киселина: ROOH + 2GSH → H₂O + GSSG + ROH. Пероксидна група (ROOH) се редукује у алкохол (ROH). Да би ензим деловао мора најпре да се масна киселина ослободи дејством липаза [64].

Постоје најмање 4 изоензима глутатион пероксидазе. Гпох-1 је цитосолна, Гпох-3 се налази у крвној плазми, пореклом је из бубрега. Несигурно је какав ефекат испољава Гпох-3 у плазми због ниских микроларних вредности глутатиона, за разлику од Гпох-1 која делује у условима милимоларне концентрације глутатиона (ГСХ) у ћелији, при чему се то поклапа са њеном Км вредношћу. Гпох-1 и -3 имају 4 субјединице са по једним атомом селена у активном центру (селеноцистеин, R-SeH уместо R-SH). Реакциона шема је следећа:

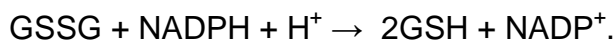
Ензим-Se⁻ + ROOH + H⁺ → ROH + Ензим-SeOH; веже се први молекул GSH:

Ензим-SeOH-GSH → H₂O + Ензим-Se-SG; други молекул GSH се веже:

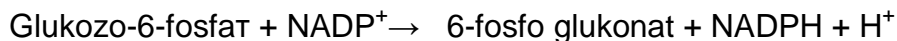
Ензим-Se-SG-GSH → Ензим-SeH-GSSG → Ензим-Se⁻ + H⁺ + GSSG.

2.5.4. Глутатион редуктаза

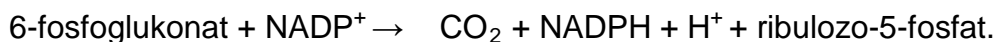
Глутатион редуктаза (ГР, ЕС 1.8.1.7) је ензим који садржи две субјединице, обе са 1 FAD у активном центру. Катализује реакцију редукције оксидованог глутатиона (GSSG) у биолошки активан, редуковани глутатион (GSH), користећи као дозор водоникових протона NADPH:



У овој реакцији NADPH редукује FAD који преноси е⁻ на дисулфидни мост у активном центру. Две -SH групе тако настале реагују са GSSG и редукују га у 2GSH, при чему се обнавља дисулфидни мост [65]. Извор NADPH за ову реакцију су ензими хексозо-монофосфатног шанта, глукозо-6-фосфат дехидрогеназа која катализује реакцију:



и 6-фосфоглуконат дехидрогеназа која катализује реакцију:



Брзина одвијања пентозног пута се регулише доступношћу NADP⁺, када се смањи однос NADPH /NADP⁺, пут убрзава да замени NADPH.

2.5.5. Глутатион (ГСХ)

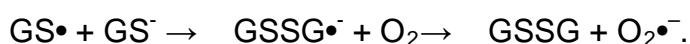
Главни орган синтезе глутатиона је јетра, из које се отпушта у циркулацију, којом доспева до ћелија. Оне га не могу преузети као таквог, већ га разлажу посредством мембранских ензима γ -глутамил трансферазе и дипептидазе, преузимајући настале аминокиселине па га синтетишу из њих у цитоплазми. У ћелијама је концентрација глутатиона 1-10 mM [66].

Кофактор је ензима глутатион пероксидаза и укључен је у друге метаболичке процесе- метаболизам аскорбата, интраћелијску комуникацију [67], штити протеинске –SH групе од оксидације и унакрсног везивања.

Захваљујући високој концентрацији у ћелијама редокс пар GSH/GSSG је главни носилац редокс баланса. При високој концентрацији од 10 mM и односу 99:1 у корист GSH, редукциони потенцијал је -250 mV. Вредност потенцијала се смањује са смањењем концентрације и односа GSH/GSSG. При томе треба имати у виду присуство и однос са другим редокс паровима (NADPH /NADP⁺, NADH /NAD⁺, аскорбат/дехидроаскорбат).

Штити од зрачења, снадбева Cu,Zn-COD багром и кофактор је ензима у синтези леукотријена. Има улогу у „паковању“ протеина са дисулфидним везама.

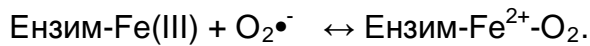
In vitro, реагује са хидроксил радикалом, хипохлорном киселином, пероксинитритом, али не и супероксидом. Због високе концентрације у ћелији ове реакције су могуће *in vivo*. У реакцијама са реактивним врстама често настаје тилил радикал (GS•), а затим и супероксид:



Настали O₂•⁻ се уклања помоћу COD, а GSSG прелази у GSH дејством глутатион редуктазе.

Реакција са ONOO⁻ даје GSNO (нитрозотиол) чијом разградњом се регенерише NO•. Такође, хелира јоне бакра и спречава њихово учешће у Фентоновој реакцији.

Низак ниво водоник пероксида у ћелији доприноси редокс регулацији и преносу сигнала [68]. Каталаза је кључни ензим у пероксизомима. Делује при високим концентрацијама водоник пероксида, а Гпох при ниским. Висок GSH је компензација за недовољну активност ензима. H₂O₂ делује на транскрипционе факторе. Ако га не отклони COD, супероксид оштећује каталазу:



СОД смањује настанак ONOO-, а са друге стране пероксинитрит инаktivира СОД нитрацијом, али и оксидује и инаktivира каталазу и Гпох; ако се H₂O₂ не уклони брзо може инаktivирати СОД.

2.5.6. Екстрацелуларна антиоксидациона заштита

Њена улога је да штити површину ћелија са којима је у контакту и састојке водене и липидне фазе. Вредности GSH, SOD и Гпох у екстрацелуларној средини су ниске.

Екстрацелуларна СОД (ЕЦ СОД) има већу масу (135kDa) од Cu,Zn SOD, тетрамер је, а свака субјединица садржи по један Cu и Zn [69]. *In vivo*, већина молекула СОД је везана за ћелијску површину. Тамо где је већа активност ЕС SOD смањена је Cu,Zn SOD, нпр. крвни судови-аорта. Хепарин повећава концентрацију ЕС SOD у крвној плазми јер је одваја од површине ендотелних ћелија [70]. ЕС SOD смањује интеракцију супероксид анјон радикала и азот монооксида смањући настанак пероксинитрита, и то нарочито у условима повећаног стварања супероксида [57].

3. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Досадашња истраживања бавила су се, углавном, улогом неутрофила у настанку и развоју акутног коронарног синдрома. У активираним неутрофилима у акутном коронарном синдрому одиграва се интензиван метаболизам реактивних форми кисеоника и хлора. У крвној плазми, у непосредном окружењу неутрофила, долази до промена у интензитету оксидационог стреса у условима исхемије и/или реперфузије у акутном коронарном синдрому. Да би смо остварили увид у наведене процесе поставили смо следеће циљеве истраживања:

1. Испитати метаболизам слободних радикала у неутрофилним полиморфонуклеарним леукоцитима болесника са акутним коронарним синдромом одређивањем маркера оксидационог стреса;
2. Испитати ниво антиоксидативне заштите у неутрофилним полиморфонуклеарним леукоцитима болесника са акутним коронарним синдромом одређивањем концентрације неензимских антиоксиданаса и активности антиоксидационих ензима;
3. Испитати активност мијелопероксидазе у неутрофилним полиморфонуклеарним леукоцитима и плазми болесника са акутним коронарним синдромом и повезаност са настанком реактивних врста и оксидативном модификацијом протеина;
4. Испитати повезаност чинилаца антиоксидативне заштите са процесом липидне пероксидације у неутрофилним полиморфонуклеарним леукоцитима болесника са акутним коронарним синдромом.
5. Испитати ниво антиоксидативне заштите и оксидационог стреса у плазми болесника са акутним коронарним синдромом.
6. На основу добијених резултата донети закључке о току метаболизма реактивних форми кисеоника и хлора у неутрофилима, као и о интензитету оксидационог стреса у неутрофилима и плазми и могућој повезаности промена у неутрофилима и плазми болесника са акутним коронарним синдромом.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА.

4.1. Испитивани болесници

Истраживањем су обухваћени пацијенти, примљени у Коронарну јединицу Одељења Интерне медицине Здравственог центра у Косовској Митровици, због бола у грудима са сумњом на акутни коронарни синдром. Дијагноза је постављена по важећим препорукама [71-74]. Референтна је дијагноза на отпусту, односно завршна дијагноза. Контролна група је састављена од здравих добровољних давалаца крви, коју одликује одсуство коронарне болести срца и фактора ризика за њен настанак (артеријска хипертензија, дијабетес мелитус и хиперлипидемија). Клиничке карактеристике група које су биле испитиване су пол и старост, а од фактора ризика артеријска хипертензија (ХТА), хиперлипидемија (ХЛП) и дијабетес мелитус (ДМ) [75]. Хипертензија је дефинисана као присуство повишеног артеријског притиска у вредности преко 140/90 mm Hg, у трајању дужем од годину дана са преписаном антихипертензивном терапијом. Хиперлипидемија је дефинисана као концентрација укупног холестерола и триглицерида, наташте, већа од 6.28, односно 4.11 mM/L. Дијабетес је одређен потребом за узимањем оралне антидијабетесне терапије.

Консензусом Удруженог комитета европског друштва за кардиологију (ESC) и Америчког колеџа кардиолога (ACC) [74] је успостављена нова дефиниција некрозе миокарда, према којој је кључно повишење маркера некрозе миокарда. Критеријуми за дијагнозу акутног, развијеног или скорашњег инфаркта миокарда су следећи:

1. типичан пораст и постепено снижење или много бржи раст и снижење биохемијских маркера некрозе миокарда, са најмање једним од следећих:
 - а. исхемијски сипптоми,
 - б. развој патолошког Q зупца на EKG-у,
 - ц. EKG промене које указују на миокардну исхемију (елевација или депресија ST-сегмента ≥ 0.1 mV у најмање два блиска одвода који снимају исто подручје миокарда),
 - д. коронарна артеријска интервенција (нпр. коронарна ангиопластика);
2. Патолошки налаз акутног инфаркта миокарда (АИМ).

Биохемијски критеријуми за откривање некрозе услед исхемије миокарда су:

1. максимална концентрација cTnT (срчани тропонин Т) или cTnI (срчани тропонин И) која превазилази 99-у перцентилну вредност референтне контролне групе најмање једанпут у току првих 24 часа,
2. максимална вредност СК-МВ која превазилази 99-у прецентилну вредност референтне контролне групе у 2 узастопна узорка, или максимална вредност која превазилази двоструку горњу границу нормале и то једнапут у току првих сати.

Дијагноза нестабилне ангине пекторис (НАП) је постављена према Braunwald-овој класификацији [73]. Пацијенти обухваћени овим истраживањем припадају IIIБ групи, коју карактеришу појава ангинозног бола у миру, у одсуству екстракардијалних стања (примарна НАП).

4.2. Биохемијске анализе испитиваног материјала

Свим испитаницима је на пријему узето 6 мл венске крви у епрувету са EDTA као антикоагулансом. Биохемијске анализе испитиване крви су обављене у лабораторији Института за Биохемију Медицинског факултета у Косовској Митровици.

4.2.1. Припрема материјала за анализе

Издвајање неутрофила је обављено на основу градијента густине по методи Воуита-а [76,77], користећи готове препарате Histopaque (H) -1119 и -1077.

Укратко, у епрувету се пажљиво сипа по 3 ml Histopaque-1119 и -1077 и 6 ml венске крви, тим редом. Центрифугирањем венске крви са наведеним препаратима на 700 × g, издваја се редом, плазма на врху, затим слој мононуклеара и тромбоцита, слој H-1077, слој гранулоцита, слој H-1119, и на дну епрувете слој у коме су еритроцити.

Нежном аспирацијом слој неутрофила се пребаци у 10.0 ml PBS (engl. phosphate buffered saline) пуфера, рН 7.4, и центрифугира на 200 × g. Поступак се понови два пута. Ако еритроцити контаминирају узорак додаје се хипотоничан раствор NaCl (0.033 M).

Затим је вршено бројање неутрофила у комори и хематолошком апарату. Процент неутрофила је био већи од 95%. Виабилност је испитивана бојењем са Трипан плавим (engl. Trypan blue). Након тога неутрофили се лизирају са 2 узастопна циклуса замрзавања и одмрзавања уз додавање 0.2%-ног Тритон Х-100 (1:10, v:v) ради боље солубилизације протеина. Лиза је потврђена бројањем неутрофила у коморама. Затим је одређивана концентрација протеина, и вршено даље разблаживање како би концентрација протеина била приближно иста у свим узорцима (око 0.5 mg/ml).

4.2.2. Одређивање концентрације протеина у лизату неутрофила

За одређивање концентрације протеина у лизату неутрофила коришћена је Lowry-ева метода, модификација по Reider-у [78], уз хумани албумин концентрације 1.0 g/L као стандард.

Folin-Ciocalteu-ов фенолни реагенс, фирме МОЛ Београд, је пре рада разређиван дестилованом водом на основу претходне титрације концентрованог реагенса. Апсорбанса насталог обојеног производа мерена је на $\lambda = 700 \text{ nm}$ и пропорционална је концентрацији протеина до 1.30 g/L. Узорци са већом концентрацијом протеина разређивани су физиолошким раствором NaCl (0.9%) и поступак је понављан, а разређење је увођено у формулу за израчунавање концентрације. Концентрација укупних протеина рачуната је по формули:

$$\text{proteini (g/L)} = \frac{A \text{ analize}}{A \text{ standarda}} \times 1.0 \text{ g/L}$$

4.2.3. Одређивање производа липидне пероксидације у лизату неутрофила и плазми

4.2.3.1. Одређивање концентрације коњугованих диена

Коњуговани диени настају издвајањем атома водоника из несатурисаних липида и укључени су у формирање и пропацију липидних радикала. Реаранжирање двогубих веза у полинесатурисаним

масним киселинама, резултира формирањем коњугованих диена, чија је карактеристика интензивна апсорпција близу 233 nm.

Одређивање концентрације коњугованих диена вршено је спектрофотометријски [79, 80] у циљу истраживања интензитета процеса липидне перосидације.

Мешавини (1.5 mL) етанол/етра = 3:1 додавана је одговарајућа запремина узорка 0.05 mL лизата неутрофила односно 0.05 mL плазме. Садржај је вортексиран 1 минут на вортекс мешалици, а затим центрифугиран 10 минута на 3000 обрт/мин. Слој органског раствора је пребачен у кварчне кивете. Апсорбанса етанол/етар фракције је читана спектрофотометријски на 233 nm, према слепој проби (етанол/етар = 3:1), а количина коњугованих диена је израчунавана на основу моларног апсорпционог коефицијента, који на таласној дужини 233 nm износи $2.8 \times 10^4 \times L \times M^{-1} \times cm^{-1}$ [81]. Резултати су изражени у $\mu mol/L$ плазме односно $\mu mol/g$ протеина лизата.

4.2.3.2. Одређивање концентрације укупних хидропероксида

Тест са тиобарбитурном киселином је једна од метода коришћена за детекцију оксидованих липида. Липидни хидропероксиди не могу бити издвојени комплетно од секундарних продуката липидне пероксидације током једноставне реакције са тиобарбитурном киселином (ТБА). За одређивање липидних хидропероксида, потребно је одвојити их од секундарних продуката, загревањем и додавањем одређеног катализатора. Јони гвожђа су ефикасни катализатори у процесу раздвајања хидропероксида, који потичу и од протеина [82].

Из тог разлога, за одређивање укупних хидропероксида помоћу ТБА или тзв. концентрације Fe^{+2} -индукованог малондиалдехида као катализатор је коришћен $1 \mu mol Fe^{+2}$, употребом $20 \mu L$ дневно свежег воденог раствора $FeSO_4 \times 7H_2O$, концентрације $50 mmol/L$.

Узорак је инкубиран 15 минута на 37 степени C са раствором феро соли [82], а затим је изведена обојена реакција помоћу тиобарбитурне киселине [83]. Интензитет насталог реакционог продукта очитан је на $\lambda = 532 nm$.

Концентрација укупних хидропероксида израчунавана на основу моларног апсорпционог коефицијента реакционог продукта који на

таласној дужини од 532 nm износи $1.56 \times 10^5 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Резултати су изражени као $\mu\text{mol/L}$ плазме, односно $\mu\text{mol/g}$ протеина лизата.

4.2.4. Одређивање производа оксидационе модификације протеина

4.2.4.1. Одређивање концентрације унапредовалих оксидационих продуката протеина (advanced oxidized protein products, AOPP)

Плазма АОПП је одређиван методом по Witko-Sarsat -у [84]. Као реагенси су коришћени PBS 7.4, KJ 1.16 M/L, глацијална сирћетна киселина и стандардни раствор Chloramin-T, концентрације 50 $\mu\text{mol/L}$.

Поступак је следећи. Узму се 3 епрувете. Укупна запремина реакционе смеше је 0.92 mL. Реакција се изводи са 0.08 mL узорка (плазма- епрувета означена као анализа, стандардни раствор- епрувета означена као стандард), додавањем PBS 7.4 до 0.8 mL. У епрувети која служи као слепа проба изоставља се узорак. Затим се дода раствор KJ (0.04 mL), а након 2 минута 0.08 mL глацијалне сирћетне киселине. Епрувете се промућкају, и апсорбанса се одмах чита на $\lambda=340 \text{ nm}$ према слепој проби. Концентрација АОПП се изражава у $\mu\text{mol Chloramin-T еквивалената/L}$, а израчунава се када се количник апсорбанси анализе и стандарда помножи са концентрацијом стандардног раствора.

4.2.5. Метода за одређивање концентрације нитрита/нитрата

Одређивање концентрације је вршено методом по Гувари [85] уз претходну депротеинизацију узорка и редукцију нитрата у нитрите дејством ензима нитрат редуктазе. Извођењем Грисове реакције и мерењем апсорбансе на 540 nm одређивана је концентрација нитрита.

Поступак је следећи. Најпре се 0.2 mL плазме центрифугује 1 сат, на 4 степена C, при 7500 обртаја у минути, да би се отклонили протеини и хемоглобин из узорка. Узму се 3 епрувете, означене као Слп, Ст и Ан. У Слп (слепа проба) се додаје само пуфер Кри pH 7.5, 50 mM до укупне запремине од 0.4 mL. У Ст (стандард) и Ан (анализа) се дода редом по 0.16 mL стандардног раствора NaNO_2 (36.9 $\mu\text{M/L}$). Затим се у Ст и Ан додају по 0.02 mL Нитрат редуктазе (5 U/mL) и NADPH/FAD (60 mM/L NADPH, 2 mM/L FAD) раствора.

Епрувете се инкубирају 2 сата на 25 степени С. Следи инкубација 20 минута на 37 степени С (или 3 минута у кључалом воденом купатилу) да би се елиминисао вишак NADPH. Након тога, се дода 0.1 mL Griess A (1%-ни сулфаниламид у 5%-ој фосфорној киселини), промућкају епрувете и након 5 минута дода Griess B (0.2%-ни водени раствор НЕДД- нафтилетилендиамин дихидрохлорид), уз мућкање. Након 10 минута инкубације на 25 степени С чита се апсорбанса Ст и Ан према слепој проби на $\lambda=540$ nm. Концентрација се изражава у $\mu\text{m/l}$, а израчунава се када се количник апсорбанси анализе и стандарда помножи са концентрацијом стандардног раствора.

4.2.6. Одређивање активности мијелопероксидазе

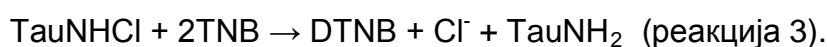
4.2.6.1. Метода за одређивање пероксидазне активности мијелопероксидазе

Каталитичка активност МРО одређивана је у систему 4-аминоантипирин/фенол, Триндеровом кинетичком реакцијом [86] у присуству натријум-азида у финалној концентрацији 1.2 mM/L за блокирање пероксидазне реакције каталазе. Као супстрат је коришћен 1.7 mM/L раствор водоник пероксида. Активност МРО изражавана је у U/L у плазми на основу моларног апсорпционог коефицијента хинонимина $1.3 \times 10^4 \times \text{L} \times \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. У лизату је активност изражавана у U/ g протеина.

4.2.6.2. Метода за одређивање хлоринишуће активности мијелопероксидазе

Хлоринишућа активност мијелопероксидазе је одређивана спектрофотометријски [87], у систему који садржи водоник пероксид, таурин и TNB, при pH 7.4 и температури 25 степени С. Наиме, као резултат активности МРО настаје хипохлорна киселина (реакција 1) која реагује са таурином (реакција 2) при чему се ствара таурин хлорамин који оксидује TNB у DTNB (реакција 3) што се детектује мерењем апсорбансе на 412 nm. Једна јединица МРО је дефинисана као она количина ензима која катализује продукцију HOCl у оној мери која је довољна да доведе до стварања 1 nM таурин хлорамина при pH 7.4, на 25 степени С, у току 30 минута у присуству 100 mM хлорида и 100 μM водоник пероксида.

Ток реакције:



За одређивање хлоринишуће активности МПО од реагенаса се користе PBS 7.4 (2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 136.9 mM NaCl, 8.9 mM Na₂HPO₄ x 7H₂O), таурин (5mM у PBS-у), H₂O₂ (30%-ни основни раствор), NaN₃- 1 mM/L и 2 mM/L TNB.

Радни раствор H₂O₂ се припрема истог дана. Наиме, 0.012 mL основног H₂O₂ се раствори у 4.988 mL дестиловане воде. Стоји на собној температури, а користи се унутар 3 сата од справљања.

2 mM TNB се добија растварањем 1 mM DTNB у PBS 7.4. Додаје се 1 M/L NaOH (неколико капи) до рН 12.0 и сачека да настала боја достигне максималан интензитет. Након тога се рН врати на 7.4 додавањем 1 M/L HCl, кап по кап, уз сталну проверу на рН метру. Радни раствор TNB, концентрације 0.5 mM/L се добија петоструким разблажењем PBS-ом.

Поступак се изводи на 25 степени C, на начин приказан на Табели 1.

Табела 1. Поступак одређивања хлоринишуће активности МПО

	Слп	СлпАн	Ан
ТАУРИН	0.96	0.88	0.88
УЗОРАК (плазма/лизат)		0.08	0.08
Епрувете стоје 5 минута на 25 степени C			
Радни H ₂ O ₂	0.04	0.04	0.04
Епрувете стоје 30 минута на 25 степени C			
NaN ₃	0.04	0.04	0.04
Епрувете стоје 5 минута на 25 степени C			
Радни TNB	0.1		0.1
ТАУРИН		0.1	
Епрувете стоје 20 минута на 25 степени C			

Апсорбансе Слп, СлпАн и Ан се читају према ваздуху на $\lambda=412$ nm.

Хлоринишућа активност МПО се изражава у kU/L у плазми, и kU/g протеина лизата неутрофила, а израчунава се на следећи начин:

$$\text{MPO (U/mL)} = \frac{\text{Слп} + \text{СлпАн} - \text{Ан}}{0.00141 \times 2} \times \frac{1.14}{0.08} = 505.3 \times (\text{Слп} + \text{СлпАн} - \text{Ан})$$

Објашњење :

0.00141 - је екстинкциони коефицијент за DTNB ($\epsilon = 1.41 \times 10^4 \times \text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

2- дели се због тога што у реакцији 2 TNB дају 1 DTNB.

1.14- укупна запремина реакционе смеше, 0.08- запремина узорка.

4.2.7. Метода за одређивање концентрације хлорамина

Концентрација хлорамина је одређивана истом реакцијом којом се одређује хлоринишућа активност мијелопероксидазе [87]. Реакција је извођена директно са узорком, а концентрација одређивана на основу превођења TNB у DTNB (хлораминима узорка) мерењем апсорбансе на 412 nm.



Поступак је приказан на Табели 2.

Табела 2. Поступак одређивања концентрације хлорамина

	Слп	СлпАн	Ан
PBS 7.4	1.04	1.06	0.96
УЗОРАК (плазма, лизат)		0.08	0.08
TNB	0.1		0.1
Епрувете се инкубирају 45 минута на 25 степени C			

Апсорбансе Слп, СлпАн и Ан се читају према ваздуху на $\lambda=412 \text{ nm}$.

Концентрација хлорамина се изражава у nM/mL, односно $\mu\text{M/L}$ у плазми, и $\mu\text{M/g}$ протеина лизата неутрофила, а израчунава се на следећи начин:

$$\text{Хлорамини } (\mu\text{M/l}) = \frac{\text{Слп} + \text{СлпАн} - \text{Ан}}{0.00141 \times 2} \times \frac{1.14}{0.08} = 505.3 \times (\text{Слп} + \text{СлпАн} - \text{Ан})$$

Објашњење :

0.00141 - је екстинкциони коефицијент за DTNB ($\epsilon = 1.41 \times 10^4 \times L \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

2- дели се због тога што у реакцији 2 TNB дају 1 DTNB.

1.14- укупна запремина реакционе смеше, 0.08- запремина узорка.

4.2.8. Одређивање активности ксантин оксидазе

Ксантни оксидаза је про-оксидантни ензим. Активност ксантин оксидазе (EC 1.17.3.2) је одређивана спектрофотометријски, на основу промене апсорбансе на 293 nm, при оксидацији хипоксантина у мокраћну киселину [88].

Реакциона мешавина садржи 1000 μL супстрат/пуферног раствора (0.05 mol/L калијум-фосфатни пуфер pH 7.5 у коме се налази хипоксантин ($\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}$) у концентрацији 1 mol/L) и 50 μL узорка. Након инкубације узорка 10 минута на 37°C , реакција се прекида додавањем 1000 μL 2 mol/L HClO_4 и узорци се центрифугирају на 3000 обрт/мин у току 10 минута. Мери се апсорбанса реакционог продукта (мокраћне киселине) на 293 nm. Активност ксантин оксидазе израчунавана је на основу моларног апсорпционог коефицијента продукта реакције на 293 nm ($1.26 \times 10^4 L \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) и услова у реакционој смеси, а изражена је као U/L за плазму и у специфичним јединицама активности на g протеина лизата неутрофила.

4.2.9. Одређивање неензимских и ензимских антиоксиданаса

4.2.9.1. Одређивање концентрације укупних непротеинских тиол једињења

Концентрација укупних непротеинских тиол једињења у узорку одређивана је у реакцији [5.5' – дитиобис – (2-нитро-бензојеве киселине)] (DTNB) (Елманов реагенс), након уклањања протеина перхлорном киселином [89]. Принцип ове методе је заснован на реакцији DTNB и -SH група ГСХ и цистеина, при чему настаје обојени продукт дианјон 2-нитро-5-тиобензојева киселина (TNB). Метода заснована на овом принципу

модификовна од стране Sedlak-а и Lindsay- а [90] користи се за одређивање ГСХ у ткивима.

Анализираном узорку (0.2 ml) додавана је иста запремина 1 mol/L перхлорне киселине у 2 mmol/L динатријум EDTA-ту, а исталожени протеини уклањани су центрифугирањем 15 минута на 3000 обрт/мин. Супернатанту (0.2 mL) додати су 0.8 mL 0.3 mol/L динатријумхидроген фосфата и 0.2 mL Елмановог реагенса (1 mmol/L [5.5' – дитиобис – 2-нитро-бензоева киселина] у 34 mmol/L натријум цитрату). Апсорбанса насталог продукта очитана је одмах на спектрофотометру на $\lambda = 412 \text{ nm}$ уз слепу пробу реагенса.

Концентрација непротеинских тиол једињења изражавана је у $\mu\text{mol/L}$ у плазми и $\mu\text{mol/g}$ протеина у лизату неутрофила и израчунавана је на основу моларног апсорпционог коефицијента насталог 5-тио-2- нитробензоата, који на $\lambda = 412 \text{ nm}$ износи $\epsilon = 1.41 \times 10^4 \times L \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ [89].

4.2.9.2. Одређивање концентрације укупних тиол група

Употребом Ellman-овог реагенса (DTNB) спектрофотометријски је одређивана концентрација укупних тиол једињења [91]. Укупне тиол групе (t-SH, total) редукују DTNB [5.5' – дитиобис – (2-нитро- бензоева киселина)], стварајући жуто обојен анјон 5-тио-2-нитробензоеве киселине.

Моларни апсорпциони коефицијент анјона 5-тио-2-нитробензоеве киселине на $\lambda = 412 \text{ nm}$ износи $\epsilon = 1.36 \times 10^4 \times L \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ [89].

Поступак је извођен као за одређивање концентрације укупних непротеинских тиол једињења (тачка 4.2.9.1. Материјал и методе) описан за супернатант, без претходне депротеинизације узорка.

Концентрација укупних тиол једињења изражавана је у $\mu\text{mol/L}$ у плазми и $\mu\text{mol/g}$ протеина у лизату неутрофила и израчунавана је на основу моларног апсорпционог коефицијента насталог 5-тио-2- нитробензоата.

4.2.9.3. Одређивање каталитичке активности супероксид дизмутазе

Активност супероксид дизмутазе (EC 1.15.1.1) одређивана је спектрофотометријски, по методи Misra i Fridovich-а [56].

Ова метода за одређивање активности супероксид дизмутазе (SOD) се базира на инхибицији стварања адренохрома у току спонтане оксидације адреналина у базној средини.

Иницирајући догађај којим започиње ланчана реакција је једновалентна оксидација анјона адреналина изазвана металним катјоном или супероксид анјоном. Редуковани метални катјон, настао у току иницијације ланчане реакције може бити оксидован помоћу молекулског кисеоника, при чему такође настаје супероксид анјон.

Супероксид дизмутаза уклањањем супероксид анјона прекида ланчану реакцију аутооксидације адреналина и тиме стварање адренохрома, а степен инхибиције стварања адренохрома је сразмеран активности ензима.

Брзина стварања адренохрома се прати спектрофотометријски на $\lambda = 480 \text{ nm}$, на којој је моларни апсорпциони коефицијент за адренохром $4.02 \times 10^3 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Додавањем $200 \text{ } \mu\text{L}$ адреналина (Л-адреналин Д-хидрогентактат (C₉H₁₃NO₃C₄H₆O₆) 7 mmol/L , водени раствор) реакционој мешавини, која се састојала од $1000 \text{ } \mu\text{L}$ пуфера (0.05 mol/L глицински пуфер (0.2 mol/L глицина и 0.2 mol/L NaOH) pH 10.2) и $20 \text{ } \mu\text{L}$ узорка, започета је реакција инхибиције спонтане оксидације адреналина. Реакција се одвијала на температури од 25°C . Брзина стварања адренохрома је праћена спектрофотометријски на $\lambda = 480 \text{ nm}$ у трајању од 10 минута. Инхибиција спонтане оксидације адреналина је одређена у односу на вредност промене апсорбансе исте реакционе мешавине у коју је уместо плазме додавана дестилована вода (контрола).

Јединица активности супероксид дизмутазе (U) је дефинисана, као количина ензима која за 50% инхибира спонтану оксидацију адреналина у минути, у наведеним условима. Активност супероксид дизмутазе изражена је као $U \times 10^3/\text{L}$ (kU/L) плазме, и у специфичним јединицама активности на g протеина лизата.

4.2.9.4. Одређивање каталитичке активности глутатион пероксидазе-3

Активност глутатион пероксидазе-3 (Гпох-3) (EC 1.11.1.9) је одређивана помоћу кумолхидропероксида, као супстрата, методом Chin-а и

сарадника [92]. Узорак (0.05 mL) помешан је са 0.75 mL 50 mmol/L TRIS-HCl пуфера, pH 7.6 (пуфер I) и термостатиран 5 минута на 37°C. У контролу је затим додато 0.1 mL ГСХ (0.006 g у 10 mL пуфера I), а у узорак 0.1 mL ГСХ и 0.1 mL кумолхидропероксида (0.05 mL/10 mL метанола) и узорци поново термостатирани на 37°C, 5 минута.

Затим, је и у узорак и у контролу додато по 1 mL трихлорсирћетне киселине (ТСА 0.61 mol/L) и у контролу још 0.1 mL кумолхидропероксида. Охлађени узорци су центрифугирани на 3000 обрт/мин 10 минута.

Од обе пробе узето је по 1 mL супернатанта и додато по 2 mL 0.4 mol/L TRIS-HCL пуфера pH 8.9 (пуфер II), 0.1 ml 5, 5'-дитиобис- 2-нитро-бензоеве киселине (0.02 g DTNB у 5 mL пуфера II).

Апсорбанса реакционог продукта је мерена на 412 nm. Активност глутатион пероксидазе израчунавана је на основу моларног апсорпционог коефицијента продукта реакције ($\epsilon = 1.36 \times 10^4 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) [89] и услова у реакционој смеси, а изражена је као U/L за плазму.

4.2.9.5. Метода за одређивање глутатион пероксидазе-1

Одређује се истом методом [92] као и глутатион пероксидаза-3 са употребом 0.1 %-ног раствора водоник пероксида као супстрата. Одређивање је вршено у узорку лизата и изражавано у U/g протеина.

4.2.9.6. Метода за одређивање активности каталазе

Каталаза је одређивана колориметријски методом по Корољуку и Goth-y [93, 94]. Активност је изражавана у мК/гр протеина лизата. мК је ознака за мили константу.

Водоник пероксид реагује са амонијум хептамолбдатом ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$) стварајући жуто обојени комплекс, чији је максимум апсорпције светлости на $\lambda=410 \text{ nm}$.

Поступак је следећи. 0.1 mL лизата (Ан) се инкубира са 2.0 mL H_2O_2 (0.03%-ни, дневно свеж) 10 минута на 22 степена С. Истовремено се поставља контрола у којој се серум замењује дестилованом водом (Ко). Обе епрувете имају

своју слепу пробу у којој се H_2O_2 замењује истом запремином дестиловане воде (СлпКо и СлпАн). Након инкубације, у све епрувете се дода 0.1 mL 10%-не ТСА (трихлорсирћетне киселине) и 1.0 mL 4%-ног амонијум молибдата, који прекидају реакцију разградње водоник пероксида и воде настанку жуто обојеног комплекса. Након додавања врши се центрифугирање 10 минута на 3000 обртаја/мин, а затим се очита апсорбанса према слепим пробама.

Пошто је реч о реакцији псеудо првог реда, израчунава се константа реакције, тачније миликонстанта (mK)

$$mK/L = \frac{UZ}{ZU} \times 103 \times \log \frac{K_0}{A} \times 2.3 \times \frac{1}{t(s)}$$

$$mK/L = 122.7 \times \log \frac{K_0}{A}$$

$\ln = \log \times 2.3$, $t = 600$ s (секунди)

UZ- укупна запремина реакционе смеше, ZU- запремина узорка, K_0 - апсорбанса контроле, A- апсорбанса анализе.

4.2.9.7. Одређивање каталитичке активности глутатион редуктазе

Активност глутатион редуктазе (EC 1.6.4.2) одређивана је по методи Glatzle-а и сарадника [95]. По овој методи глутатион редуктаза катализује редукцију оксидованог глутатиона (GSSG) у присуству $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$. Оксидација $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$ се прати мерењем промене апсорбансе на 340 nm.

Реакција започиње додавањем одговарајуће запремине узорка (0.03 ml плазме, односно 0.03 ml лизата неутрофила) реакционој мешавини (KPi 1 mol/L pH 7.6 који садржи 0.15% (w/v) BSA + 1 mmol/L NADPH + 2 mmol/L GS-SG). Прати се промена апсорбансе на 340 nm у току 3 минута. Каталитичка активност глутатион редуктазе је пропорционална смањењу апсорбансе NADPH мерене на 340 nm [96].

Јединица активности глутатион редуктазе (U) је дефинисана као активност ензима која каталише реакцију у којој се разлаже један μmol $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$ у минути. Активност глутатион редуктазе израчунавана је на основу моларног апсорпционог коефицијента за $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$ на 340 nm

$(6.22 \times 10^3 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$ [97] и услова у реакционој смеши, а изражена је као U/L за плазму и у специфичним јединицама активности на g протеина лизата неутрофила.

4.3. Статистичка обрада података

Сви добијени подаци обрађени су статистички. У статистичкој обради података израчунаване су мере централне тенденције и мере варијабилитета, примењивани су параметријски и непараметријски тестови, корелациона и регресиона анализа.

Применом Колмогоров-Смирнов теста проверено је присуство нормалне дистрибуције вредности за све варијабле појединачно, у свим групама и подгрупама испитаника.

Континуиране варијабле са нормалном дистрибуцијом вредности су изражаване преко аритметичке средине и стандардне девијације ($\bar{x} \pm \text{SD}$). За утврђивање статистички значајне разлике у вредностима континуираних варијабли са нормалном дистрибуцијом између група и подгрупа испитаника коришћен је параметријски т-тест за два независна узорка.

Континуиране варијабле без нормалне дистрибуције су изражаване преко медијане и 95%-ог интервала поверења за медијану (95% CI). За утврђивање постојања статистички значајне разлике у вредностима континуираних варијабли без нормалне дистрибуције између група и подгрупа испитаника коришћен је непараметријски Mann-Whitney тест за два независна узорка.

Дисконтинуиране варијабле су изражаване у процентима или целим бројевима. За утврђивање постојања статистички значајне разлике у вредностима дисконтинуираних варијабли између група и подгрупа испитаника коришћен је χ^2 -тест за поређење пропорција два независна узорка. Када је број чланова групе био мањи од 20, коришћен је Фишеров егзактни тест.

За утврђивање постојања разлике између 3 групе коришћени су АНОВА и Крускал-Валис тест у зависности од дистрибуције вредности поменљиве.

У корелационој анализи је израчунаван Pearson-ов коефицијент корелације са 95% интервалом поверења и п-вредношћу за утврђивање повезаности између континуираних варијабли са нормалном дистрибуцијом

вредности. За утврђивање повезаности између континуираних варијабли без нормалне дистрибуције вредности израчунаван је Spearman-ов коефицијент ранг корелације са 95% интервалом поверења и р-вредношћу.

Урађена је и регресиона анализа, проста линеарна и мултипла регресија.

У свим статистичким анализама је за праг статистичке значајности узимана вероватноћа ризика $p=0.05$.

Статистичка обрада података је обављена уз помоћ програма MedCalc.

5. РЕЗУЛТАТИ

Истраживање је обухватило 77 болесника са акутним коронарним синдромом (30 са акутним инфарктом миокарда и 47 са нестабилном ангином пекторис) и 33 здрава добровољна даваоца крви који су чинили контролну групу. Обрађени су подаци о општим (пол и старост) и посебним (фактори ризика) карактеристикама поменутих испитаника.

5.1. Карактеристике испитаника

Одабир испитаника укључених у контролну групу извршен је на основу одсуства коронарне болести срца, и фактора ризика за њен настанак. Зато су у Табели 3. приказане карактеристике само испитиване групе.

Табела 3. Карактеристике болесника са акутним коронарним синдромом

	н	Старост (године)	Пол (М/Ж,н)	ДМ (н,%)	ХТА (н,%)	ХЛП (н,%)
Акутни коронарни синдром	77	63.5 ± 10.8	46/31	15 (19.5)	34 (44.2)	32 (41.6)

н-број чланова групе, ДМ- Дијабетес мелитус, ХТА- артеријска хипертензија, ХЛП- хиперлипидемија

Упоредјивана је старосна и полна структура испитиваних група (Табела 4).

Табела 4. Основне демографске карактеристике пацијената и контролне групе

	Акутни коронарни синдром (н = 77)	Контролна група (н = 33)
Старост (године)	63.5 ± 10.8	65.8 ± 13.2
Пол (м/ж; ф)	46 / 31	18 / 15

Варијабле су приказане као средња вредност ± СД или као учесталост (ф). Разлике међу групама су тестиране Студентовим т-тестом независних узорака или хи-квадрат тестом.

Просечна старосна доб пацијената по испитиваним групама, без обзира на пол, приказана је на Табели 4. Применом Студентовог т-теста утврђено је да не постоји сигнификантна разлика између просечне старости пацијената са АКС (63.5 година) и контролне групе (65.8 година) ($t=0.97$, $ss=108$, $p=0.334$).

Применом статистичке процедуре доказано је, да се групе са АКС и контролна, у односу на пол, сигнификантно не разликују на усвојеном нивоу поузданости $p < 0.05$, како унутар групе тако и између себе ($\chi^2 = 0.087$, $ss=1$, $p=0.767$). Према добијеном резултату закључак је да су испитиване групе равноправне између себе, са сличном заступљеношћу мушког и женског пола.

Даље, утврђивана је разлика у старости испитаника различитих полова унутар испитиваних група (Табела 5).

Табела 5. Старосне разлике у односу на пол испитаника

	Акутни коронарни синдром ($n = 77$)		Контролна група ($n = 33$)	
	Мушкарци ($n = 46$)	Жене ($n = 31$)	Мушкарци ($n = 18$)	Жене ($n = 15$)
Старост (године)	61.5 ± 11.1	$66.4 \pm 9.9^*$	61.0 ± 13.2	$71.7 \pm 11.0^*$

Старост испитаника је приказана као средња вредност \pm СД. Разлике између група су тестиране Студентовим т-тестом независних узорака.

* $p < 0.05$ у односу на супротан пол исте групе.

Утврђено је да су испитанице женског пола значајно старије од испитаника мушког пола у обе групе.

Испитивана је разлика у старости и заступљености полова код болесника са акутним коронарним синдромом у односу на присуство фактора ризика (Табеле 6,7).

Табела 6. Утицај старости пацијената са акутним коронарним синдромом на присуство коморбидних стања на пријему

	Коморбидитет (да/ не; f)	Старост пацијената са АКС (године)		p -вредност
		Са коморбидитетом	Без коморбидитета	
Дијабетес	15 / 62	64.1 ± 5.9	63.4 ± 11.8	0.746
Хипертензија	34 / 43	64.5 ± 12.0	62.7 ± 9.9	0.450
Хиперлипидемија	32 / 45	$59.6 \pm 9.9^*$	66.2 ± 10.7	0.008

Варијабле су приказане као средња вредност \pm СД или као учесталост (f). Старосне разлике међу групама су тестиране Студентовим т-тестом независних узорака. * $p < 0.05$ у односу на пацијенте без фактора ризика.

Болесници са акутним коронарним синдромом и хиперлипидемијом су значајно млађи у односу на болеснике без хиперлипидемије (Табела 6).

Утврђено је да не постоји статистички значајна разлика у заступљености полова у зависности од присутних фактора ризика код болесника са акутним коронарним синдромом (Табела 7).

Табела 7. Заступљеност полова у зависности од присутних фактора ризика у болесника са акутним коронарним синдромом

Болести	Пол				Укупно	
	Мушки		Женски		Број	%
	Број	%	Број	%		
Артеријска хипертензија	17	50.0	17	50.0	34	100.0
Дијабетес мелитус	6	40.0	9	60.0	15	100.0
Хиперлипидемија	18	56.2	14	43.8	32	100.0

Испитивана је разлика у старости, заступљености полова и учесталости фактора ризика (Табела 8) између болесника са акутним инфарктом миокарда и нестабилном ангином пекторис.

Табела 8. Основне демографске и клиничке карактеристике пацијената са акутним инфарктом миокарда и нестабилном ангином пекторис

	АИМ (n = 30)	НАП (n = 47)
Старост (године)	62.3 ± 11.7	64.2 ± 10.3
Пол (м / ж; f)	18 / 12	28 / 19
Хипертензија (да / не; f)	9 / 21	25 / 22
Дијабетес (да / не; f)	7 / 23	8 / 39
Хиперлипидемија (да / не; f)	11 / 19	21 / 26

Варијабле су приказане као средња вредност ± СД или као учесталост (f). Разлике међу групама су тестиране Студентовим т-тестом независних узорака или хи-квадрат тестом. Скраћенице: АИМ – акутни инфаркт миокарда; НАП – нестабилна ангина пекторис.

Утврђено је да не постоји значајна разлика у старости међу испитиваним групама. Утврђено је да не постоји значајна разлика у заступљености појединих полова у испитиваним групама ($X^2=0.258$, $cc=2$, $p=0.8792$; $X^2(\text{тренд})=0.199$, $D\Phi=1$, $p=0.6555$). Утврђено је да не постоји значајна разлика у заступљености артеријске хипертензије ($X^2=3.109$, $D\Phi=1$, $p=0.0779$), дијабетес мелитуса ($X^2=0.150$, $D\Phi=1$, $p=0.6988$) и хиперлипидемије ($X^2=0.21$, $D\Phi=1$, $p=0.6464$) између болесника са акутним инфарктом миокарда и нестабилном ангином.

5.2. Резултати испитивања лизата неутрофила болесника са акутним коронарним синдромом и контролне групе

5.2.1. Продукти оксидативне модификације у лизату неутрофила болесника са акутним коронарним синдромом и контролне групе

Одређивана је концентрација коњугованих диена, укупних хидропероксида и хлорамина у лизату неутрофила. Концентрација је изражавана у $\mu\text{mol/g}$ протеина лизата (Табела 9).

Табела 9. Продукти оксидативне модификације у неутрофилима

	Акутни коронарни синдром ($n = 77$)	Контролна група ($n = 33$)
Коњуговани диени	416 (99 – 1065) *	369 (216 – 511)
Хидропероксиди	2.6 (0.7 – 6.8)	2.8 (0.8 – 7.5)
Хлорамини	48.6 (12.2 – 138.4) *	33.3 (10.8 – 71.6)

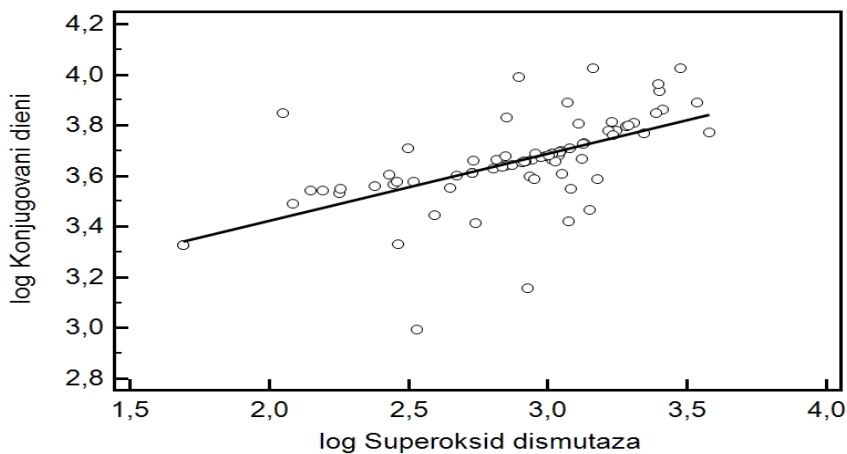
* $p < 0.05$; Вредности су приказане као медијана (минимална-максимална вредност), и изражене у $\mu\text{mol/g}$ протеина. Разлика је тестирана применом Mann-Whitney теста.

Применом Mann-Whitney теста, за тестирање значајности разлика концентрација коњугованих диена у лизату неутрофила пацијената са АКС и здравих утврђена је значајна разлика ($U=1138.0$, $p < 0.0001$).

Применом Mann-Whitney теста за тестирање значајности разлика добијених концентрација укупних хидропероксида у лизату неутрофила пацијената са АКС и здравих није утврђена значајна разлика ($U=597.0$, $p=0.3873$).

Концентрација хлорамина је значајно виша у лизату неутрофила болесника са АКС у односу на здраве ($U=561.0$, $p < 0.0001$).

Испитивана је међусобна зависност (Графикон 1) концентрације коњугованих диена и активности супероксид у лизату неутрофила болесника са акутним коронарним синдромом. Вредности променљивих су логаритамски трансформисане како би се добила нормална дистрибуција и хомогеност варијансе.

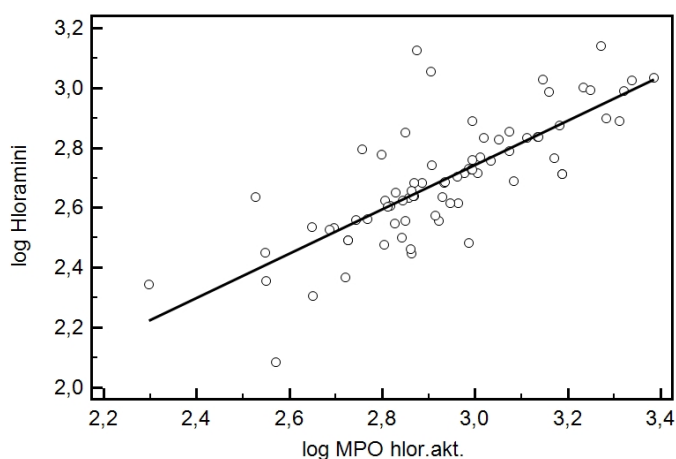


AKUTNI KORONARNI SINDROM

Графикон 1. Међусобни однос \log концентрације коњугованих диена ($\mu\text{mol/g}$ протеина) и \log активности супероксид дизмутазе (kU/g протеина) у лизату неутрофила болесника са акутним коронарним синдромом ($y = 2.897 + 0.26 x$).

Испитивањем међусобне зависности \log концентрације коњугованих диена и \log активности супероксид дизмутазе у лизату неутрофила болесника са акутним коронарним синдромом утврђена је значајна позитивна повезаност ($r=0.595$, $p<0.0001$) (Графикон 2).

Испитивана је међусобна зависност (Графикон 2) концентрације хлорамина и хлоринишуће активности мијелопероксидазе у лизату неутрофила болесника са акутним коронарним синдромом. Вредности променљивих су логаритамски трансформисане како би се добила нормална дистрибуција и хомогеност варијансе.



AKUTNI KORONARNI SINDROM

Графикон 2. Међусобни однос \log концентрације хлорамина ($\mu\text{mol/g}$ протеина) и \log хлоринишуће активности мијелопероксидазе (kU/g протеина) у лизату неутрофила болесника са акутним коронарним синдромом ($y = 0.528 + 0.739 x$).

Испитивањем међусобне зависности \log концентрације хлорамина и \log хлоринишуће активности мијелопероксидазе у лизату неутрофила утврђена је значајна позитивна повезаност ($r=0.773$, $p<0.0001$) (Графикон 2).

5.2.2. Неензимски и ензимски елементи антиоксидационе заштите у лизату неутрофила болесника са акутним коронарним синдромом и контролне групе

Одређивана је концентрација непротеинских тиол група и укупних тиол група у лизату неутрофила. Концентрација је изражавана у $\mu\text{mol/g}$ протеина лизата. Одређивана је активност супероксид дизмутазе (kU/g протеина), каталазе (милиКонстанта/ g протеина), глутатион пероксидазе и глутатион редуктазе у лизату неутрофила. Активност је изражавана у U/g протеина лизата. Резултати су приказани на Табели 10.

Табела 10. Антиоксидациона заштита неутрофила болесника са акутним коронарним синдромом и контролне групе

	Акутни коронарни синдром ($n = 77$)	Контролна група ($n = 33$)
Непротеински тиоли	23.2 (0.1 – 62.1) *	11.2 (2.6 – 40.6)
Укупни тиоли	108.5 (16.0 – 312.5) *	63.7 (7.3 – 400.0)
СОД	88.9 (4.9 – 377.6) *	56.3 (1.3 – 214.8)
Каталаза	31.5 (1.5 – 167.8)	29.2 (1.5 – 116.6)
ГПох-1	11.6 (0.9 – 107.7)	26.7 (1.9 – 108.6)
Глутатион редуктаза	13.7 (0.6 – 71.4)	13.8 (0.8 – 121.5)

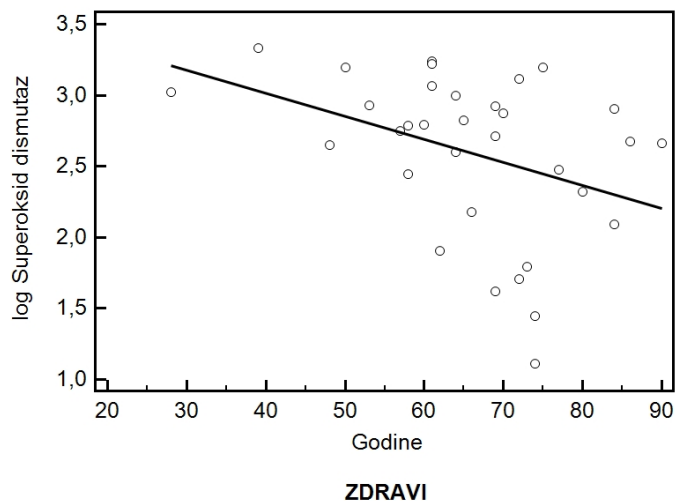
* $p<0.05$; Вредности су приказане као медијана (минимална-максимална вредност), и изражене у $\mu\text{mol/g}$ протеина за непротеинске и укупне тиол групе, а у U/g протеина за ензиме, осим СОД (kU/g протеина) и каталазе (милиКонстанта/ g протеина). Разлика је тестирана применом Манн-Whitney теста. Скраћенице: СОД- супероксид дизмутаза; ГПох-1 – глутатион пероксидаза-1.

Применом Mann-Whitney теста је утврђено да су у лизату неутрофила болесника са АКС значајно више вредности непротеинских тиол група ($U=654.0$, $p=0.0001$), укупних тиол група ($U=939.5$, $p=0.0308$) и супероксид дизмутазе ($U=878.0$, $p=0.0105$) у односу на контролну групу.

Применом Mann-Whitney теста је утврђено да не постоје статистички значајне разлике у активности каталазе ($U=1200.5$, $p=0.648$), глутатион

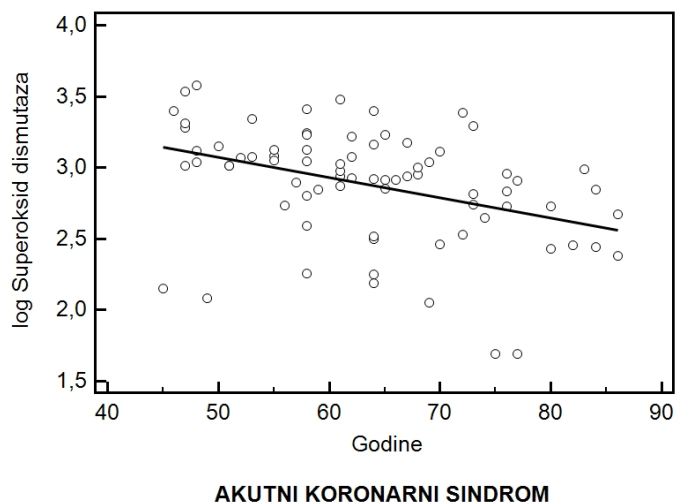
пероксидазе-1 ($U=1011.0$, $p=0.0905$) и глутатион редуктазе ($U=1148.5$, $p=0.4262$) у лизату неутрофила болесника са АКС и здравих.

Испитивана је међусобна зависност година старости и активности супероксид дизмутазе у лизату неутрофила болесника са акутним коронарним синдромом (Графикон 4) и контролне групе (Графикон 3). Вредности СОД су логаритамски трансформисане како би се добила нормална дистрибуција и хомогеност варијансе.



Графикон 3. Међусобни однос старости (године) и \log активности супероксид дизмутазе (кУ/г протеина) у лизату неутрофила у контролној групи ($y = 3.662 + -0.016 x$).

Испитивањем међусобне зависности година старости и \log активности супероксид дизмутазе у лизату неутрофила у контролној групи испитаника утврђена је значајна негативна повезаност ($r=-0.376$, $p=0.031$) (Графикон 3).



Графикон 4. Међусобни однос старости (године) и \log активности супероксид дизмутазе (кУ/г протеина) у лизату неутрофила болесника са акутним коронарним синдромом ($y = 3.792 + -0.014 x$).

Испитивањем међусобне зависности година старости и log активности супероксид дизмутазе у лизату неутрофила болесника са акутним коронарним синдромом утврђена је значајна негативна повезаност ($r=-0.391$, $p=0.0004$) (Графикон 4).

5.2.3. Каталитичка активност мијелопероксидазе у лизату неутрофила болесника са акутним коронарним синдромом и контролне групе

Одређивана је пероксидазна (U/г протеина) и хлоринишућа активност (kU/г протеина) мијелопероксидазе у лизату неутрофила. Резултати су приказани на табели 11.

Табела 11. Каталитичка активност мијелопероксидазе у неутрофилима болесника са акутним коронарним синдромом и контролне групе

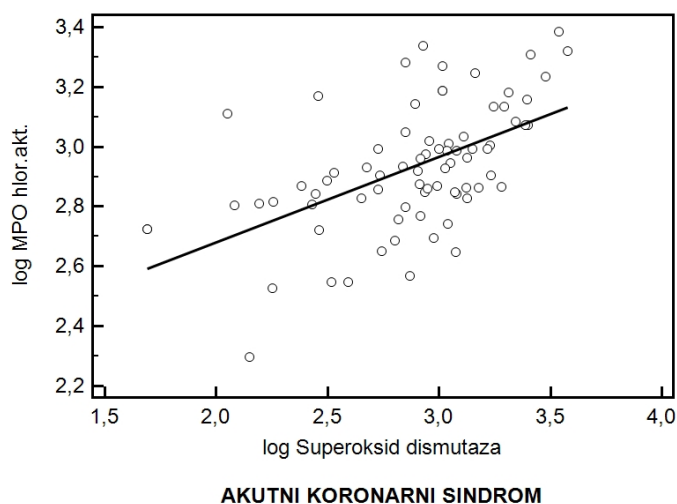
	Акутни коронарни синдром (n=77)	Контролна група (n=33)
Пероксидазна активност	16.0 (0.2-82.0)	18.3 (0.3-99.2)
Хлоринишућа активност	83.3 (19.8-242.9) *	65.5 (37.1-176.7)

* $p<0.05$; Вредности су приказане као медијана (минимална-максимална вредност), и изражене у U/ г протеина за перокс.акт. а kU/ г протеина за хлор.акт. Разлика је тестирана применом Mann-Whitney теста.

Применом Mann-Whitney теста, за тестирање значајности разлика хлоринишуће активности мијелопероксидазе у лизату неутрофила пацијената са АКС и контролне групе (Табела 11) утврђена је разлика ($U=835.5$, $p=0.0045$).

Применом Mann-Whitney теста за тестирање значајности разлика пероксидазне активности мијелопероксидазе у лизату неутрофила пацијената са АКС и контролне групе (Табела 11) није утврђена значајна разлика ($U=1269.5$, $p=0.9948$).

Испитивана је међусобна зависност (Графикон 5) активности супероксид дисмутазе и хлоринишуће активности мијелопероксидазе у лизату неутрофила болесника са акутним коронарним синдромом. Вредности променљивих су логаритамски трансформисане како би се добила нормална дистрибуција и хомогеност варијансе.



Графикон 5. Међусобни однос log хлоринишуће активности мијелопероксидазе (kU/g протеина) и log активности супероксид димутаза (kU/g протеина) у лизату неутрофила болесника са акутним коронарним синдромом ($y = 2.108 + 0.286 x$).

Испитивањем међусобне зависности log активности супероксид димутаза и log хлоринишуће активности мијелопероксидазе у лизату неутрофила утврђена је значајна позитивна повезаност ($r=0.608$, $p<0.0001$) (Графикон 5).

5.3. Резултати испитивања лизата неутрофила болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и контролне групе

5.3.1. Продукти оксидативне модификације у лизату неутрофила болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и контролне групе

Одређивана је концентрација коњугованих диена, укупних хидропероксида и хлорамина у лизату неутрофила. Концентрација је изражавана у $\mu\text{mol/g}$ протеина лизата. Резултати су приказани на Табели 12.

Подаци за коњуговане диене одступају од нормалне дистрибуције, Левенов тест је позитиван, па се примењује Крускал-Валис тест. Тест статистика= 19.3534, $ss=2$, $p=0.0001$. Post-hoc анализа применом поређења парова група према Коновер-у је показала да постоји разлика између медијана концентрације коњугованих диена у лизату неутрофила болесника са акутним инфарктом миокарда ($U=221.0$, $p=0.0002$) и нестабилном ангином ($U=376.0$,

$p=0.0001$) са једне стране и контролне групе са друге (Табела 12). Применом Mann-Whitney теста за парове група је утврђен ниво значајности разлика. Не постоји значајна разлика између група са акутним инфарктом миокарда и нестабилне ангине ($U=661.5$, $p=0.6496$)

Табела 12. Продукти оксидативне модификације у неутрофилима болесника са акутним инфарктом, нестабилном ангином и у контролној групи

	Акутни инфаркт миокарда (n=30)	Нестабилна ангина пекторис (n=47)	Контролна група (n=33)
Коњуговани диени	456 (143 -1065) *	474 (99 -1059) *	369 (216 - 511)
Хидропероксиди	2.6 (0.8-6.8)	2.6 (0.7-6.6)	2.8 (0.8-7.5)
Хлорамини	46.9 (12.2-138.4) *	51.6 (20.3-133.9) *	33.3 (10.8-71.6)

* $p<0.05$ у односу на контролну групу. Вредности су приказане као медијана (минимална-максимална вредност), и изражене у $\mu\text{mol/g}$ протеина. Разлика је тестирана применом Mann-Whitney теста.

Подаци за укупне хидропероксиде одступају од нормалне дистрибуције, Левенов тест је позитиван, па се примењује Крускал-Валис тест. Тест статистика= 0.817, $ss=2$, $p=0.6643$. Post-hoc анализа применом поређења парова група према Коновер-у је показала да не постоји разлика између медијана концентрације укупних хидропероксида у лизату неутрофила болесника са акутним инфарктом миокарда ($U=454.0$, $p=0.5723$) и нестабилном ангином ($U=684.0$, $p=0.3709$) са једне стране и контролне групе са друге (Табела 12). Применом Mann-Whitney теста за парове група је утврђен ниво значајности разлика. Не постоји значајна разлика између група са акутним инфарктом миокарда и нестабилне ангине ($U=679.5$, $p=0.7899$).

Подаци за хлорамине одступају од нормалне дистрибуције, Левенов тест је позитиван, па се примењује Крускал-Валис тест. Тест статистика= 21.7642, $df=2$, $p<0.0001$. Post-hoc анализа применом поређења парова група према Коновер-у је показала да постоји разлика између медијана концентрације коњугованих диена у лизату неутрофила болесника са акутним инфарктом миокарда ($U=243.5$, $p=0.0005$) и нестабилном ангином ($U=317.5$, $p<0.0001$) са једне стране и контролне групе са друге (Табела 12). Применом Mann-Whitney теста за парове група је утврђен ниво значајности разлика. Не постоји значајна

разлика између група са акутним инфарктом миокарда и нестабилне ангине (U=649.5, p=0.5621).

5.3.2. Неензимски и ензимски елементи антиоксидационе заштите у лизату неутрофила болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и контролне групе

Одређивана је концентрација непротеинских тиол група и укупних тиол група у лизату неутрофила. Концентрација је изражавана у $\mu\text{mol/g}$ протеина лизата. Одређивана је активност супероксид дизмутазе (kU/g протеина), каталазе(милиКонстанта/g протеина), глутатион пероксидазе и глутатион редуктазе у лизату неутрофила. Активност је изражавана у U/g протеина лизата. Резултати су приказани на Табели 13.

Табела 13. Елементи антиоксидационе заштите неутрофила болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и контролне групе

	Акутни инфаркт миокарда (n=30)	Нестабилна ангина пекторис (n=47)	Контролна група (n=33)
Непротеински тиоли	23.5 (0.9-61.0) *	22.4 (0.1-61.0) *	11.2 (2.6-40.6)
Укупне тиол групе	111.2 (20.3-275.0) *	104.5 (16.0-312.5)	63.7 (7.3-400.0)
СОД	85.4 (12.1-257.2) *	94.3 (4.9-377.6) *	56.3 (1.3-214.8)
Каталаза	34.3 (5.2-156.0)	28.3 (1.5-167.8)	29.2 (1.5-116.6)
ГПох-1	15.4 (1.3-93.6)	10.3 (0.9-107.7)	26.7 (1.9-108.6)
Глутатион редуктаза	11.5 (0.8-71.4)	15.9 (0.6-46.0)	13.8 (0.8-121.5)

* $p < 0.05$ у односу на контролну групу; Вредности су приказане као медијана (минимална-максимална вредност), и изражене у $\mu\text{mol/g}$ протеина за непротеинске и укупне тиол групе, а у U/ g протеина за ензиме, осим СОД (kU/g протеина) и каталазе (милиКонстанта/g протеина). Разлика је тестирана применом Mann-Whitney теста. Скраћенице: СОД- супероксид дизмутаза; ГПох-1 – глутатион пероксидаза-1.

Подаци за непротеинске тиол групе одступају од нормалне дистрибуције, Левенов тест је позитиван, па се примењује Крускал-Валис тест. Тест статистика= 16.1759, $ss=2$, $p=0.0003$. Post-hoc анализа применом поређења парова група према Коновер-у је показала да постоји разлика између медијана концентрације непротеинских тиол група у лизату неутрофила болесника са

акутним инфарктом миокарда ($U=253.0$, $p=0.0009$) и нестабилном ангином ($U=401.0$, $p=0.0003$) са једне стране и контролне групе са друге (Табела 13). Применом Mann-Whitney теста за парове група је утврђен ниво значајности разлика. Не постоји значајна разлика између група са акутним инфарктом миокарда и нестабилне ангине ($U=693.0$, $p=0.9$).

Подаци за укупне тиол групе одступају од нормалне дистрибуције, Левенов тест је позитиван, па се примењује Крускал-Валис тест. Тест статистика= 7.7538, $ss=2$, $p=0.0207$. Post-hoc анализа применом поређења парова група према Коновер-у је показала да постоји разлика између медијана концентрације укупних тиол група у лизату неутрофила болесника са акутним инфарктом миокарда ($U=308.0$, $p=0.01$) са једне стране и контролне групе са друге (Табела 13). Применом Mann-Whitney теста за парове група је утврђен ниво значајности разлика. Не постоји значајна разлика између група са акутним инфарктом миокарда и нестабилне ангине ($U=523.0$, $p=0.6496$), и групе са нестабилном ангином и контролне групе ($U=631.5$, $p=0.1593$)

Подаци за супероксид дизмутазу одступају од нормалне дистрибуције, Левенов тест је позитиван, па се примењује Крускал-Валис тест. Тест статистика= 6.6336, $ss=2$, $p=0.0363$. Post-hoc анализа применом поређења парова група према Коновер-у је показала да постоји разлика између медијана активности супероксид дизмутазе у лизату неутрофила болесника са акутним инфарктом миокарда ($U=350.0$, $p=0.046$) и нестабилном ангином ($U=528.0$, $p=0.0156$) са једне стране и контролне групе са друге (Табела 13). Применом Mann-Whitney теста за парове група је утврђен ниво значајности разлика. Не постоји значајна разлика између група са акутним инфарктом миокарда и нестабилне ангине ($U=674.5$, $p=0.75$).

Подаци за каталазу одступају од нормалне дистрибуције, Левенов тест је позитиван, па се примењује Крускал-Валис тест. Тест статистика= 2.8829, $ss=2$, $p=0.2366$. Post-hoc анализа применом поређења парова група према Коновер-у је показала да не постоји разлика између медијана активности каталазе у лизату неутрофила болесника са акутним инфарктом миокарда ($U=401.0$, $p=0.1958$) и нестабилном ангином ($U=751.5$, $p=0.8145$) са једне стране и контролне групе са друге (Табела 13). Применом Mann-Whitney теста за парове група је утврђен ниво значајности разлика. Не постоји значајна разлика између

група са акутним инфарктом миокарда и нестабилне ангине ($U=548.5$, $p=0.1021$).

Подаци за глутатион пероксидазу-1 одступају од нормалне дистрибуције, Левенов тест је позитиван, па се примењује Крускал-Валис тест. Тест статистика= 3.3816, $ss=2$, $p=0.1844$. Post-hoc анализа применом поређења парова група према Коновер-у је показала да не постоји разлика између медијана активности глутатион пероксидазе-1 у лизату неутрофила болесника са акутним инфарктом миокарда ($U=418.5$, $p=0.2924$) и нестабилном ангином ($U=592.5$, $p=0.0737$) са једне стране и контролне групе са друге (Табела 13). Применом Mann-Whitney теста за парове група је утврђен ниво значајности разлика. Не постоји значајна разлика између група са акутним инфарктом миокарда и нестабилне ангине ($U=631.5$, $p=0.4426$).

Подаци за глутатион редуктазу одступају од нормалне дистрибуције, Левенов тест је позитиван, па се примењује Крускал-Валис тест. Тест статистика= 0.6516, $ss=2$, $p=0.7219$. Post-hoc анализа применом поређења парова група према Коновер-у је показала да не постоји разлика између медијана активности глутатион редуктазе у лизату неутрофила болесника са акутним инфарктом миокарда ($U=441.5$, $p=0.4616$) и нестабилном ангином ($U=707.0$, $p=0.5$) са једне стране и контролне групе са друге (Табела 13). Применом Mann-Whitney теста за парове група је утврђен ниво значајности разлика. Не постоји значајна разлика између група са акутним инфарктом миокарда и нестабилне ангине ($U=692.5$, $p=0.8961$).

5.3.3. Каталитичка активност мијелопероксидазе у лизату неутрофила болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и контролне групе

Одређивана је пероксидазна (U/g протеина) и хлоринишућа активност (kU/g протеина) мијелопероксидазе у лизату неутрофила. Резултати су приказани на Табели 14.

Табела 14. Каталитичка активност мијелопероксидазе неутрофила болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и контролне групе

	Акутни инфаркт миокарда (n=30)	Нестабилна ангина пекторис (n=47)	Контролна група (n=33)
Пероксидазна активност	19.0 (0.3-49.7)	14.8 (0.2-82.0)	18.3 (0.3-99.2)
Хлоринишућа активност	78.5 (19.8-217.4) *	85.9 (33.6-242.9) *	65.5 (37.1-176.7)

* $p < 0.05$ у односу на контролну групу; Вредности су приказане као медијана (минимална-максимална вредност), и изражене у U/ г протеина за перокс.акт. а kU/ г протеина за хлор.акт. Разлика је тестирана применом Mann-Whitney теста.

Подаци за пероксидазну активност мијелопероксидазе одступају од нормалне дистрибуције, Левенов тест је позитиван, па се примењује Крускал-Валис тест. Тест статистика= 1.5807, $ss=2$, $p=0.4537$. Post-hoc анализа применом поређења парова група према Коновер-у је показала да не постоји разлика између медијана пероксидазне активности мијелопероксидазе у лизату неутрофила болесника са акутним инфарктом миокарда ($U=445.0$, $p=0.4914$) и нестабилном ангином ($U=726.5$, $p=0.632$) са једне стране и контролне групе са друге (Табела 14). Применом Mann-Whitney теста за парове група је утврђен ниво значајности разлика. Не постоји значајна разлика између група са акутним инфарктом миокарда и нестабилне ангине ($U=583.0$, $p=0.2$).

Подаци за хлоринишућу активност мијелопероксидазе одступају од нормалне дистрибуције, Левенов тест је позитиван, па се примењује Крускал-Валис тест. Тест статистика= 8.0571, $ss=2$, $p=0.0178$. Post-hoc анализа применом поређења парова група према Коновер-у је показала да постоји разлика између медијана хлоринишуће активност мијелопероксидазе у лизату неутрофила болесника са акутним инфарктом миокарда ($U=323.0$, $p=0.0179$) и нестабилном ангином ($U=512.5$, $p=0.01$) са једне стране и контролне групе са друге (Табела 14). Применом Mann-Whitney теста за парове група је утврђен ниво значајности разлика. Не постоји значајна разлика између група са акутним инфарктом миокарда и нестабилне ангине ($U=691.5$, $p=0.8879$).

5.4. Резултати испитивања плазме болесника са акутним коронарним синдромом и контролне групе

5.4.1. Продукти оксидативне модификације у плазми болесника са акутним коронарним синдромом и контролне групе

Одређивана је концентрација продукта оксидативне модификације у плазми болесника са акутним коронарним синдромом и у контролној групи. Резултати су приказани на Табели 15.

Табела 15. Концентрација продукта оксидативне модификације у плазми болесника са акутним коронарним синдромом и у контролној групи

	Акутни коронарни синдром (n=77)	Контролна група (n=33)
Коњуговани диени	543.6 (214.5-1870.0) *	298.0 (78.1-578.6)
Хидропероксиди	15.2±5.7 *	11.7±3.5
АОПП	88.6±29.9 *	54.0±21.5
Хлорамини	44.8±17.3 *	35.3±9.7

* $p < 0.05$; Вредности су приказане као медијана (минимална-максимална вредност) и аритметичка средина \pm стандардна девијација, и изражене у $\mu\text{mol/l}$ плазме. Разлика је тестирана применом Mann-Whitney теста и Студентовог т-теста. Скраћеница: АОПП-узнапредовали оксидациони продукти протеина.

Применом Mann-Whitney теста, за тестирање значајности разлика концентрација коњугованих диена у плазми пацијената са АКС и контролне групе (Табела 15) утврђена је значајна разлика ($U=314.5$, $p < 0.0001$).

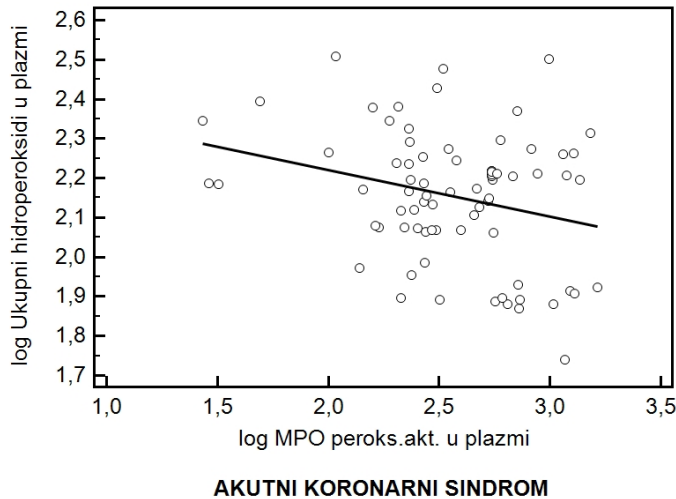
Применом Студентовог т-теста за тестирање значајности разлика добијених концентрација укупних хидропероксида у плазми пацијената са АКС и контролне групе (Табела 15) није утврђена значајна разлика ($t(d)=-3.978$, $ss=94$, $p=0.0001$). Урађена је корекција за неједнаке варијансе применом Велчовог теста.

Концентрација узнапредовалих оксидационих продукта протеина (АОПП) је значајно виша у плазми болесника са АКС (Табела 15) у односу на контролну групу ($t(d)=-6.814$, $ss=82.9$, $p < 0.0001$).

Концентрација хлорамина је значајно виша у плазми болесника са АКС (Табела 15) односу на контролну групу ($t(d)=-3.669$, $ss=99.9$, $p=0.0004$).

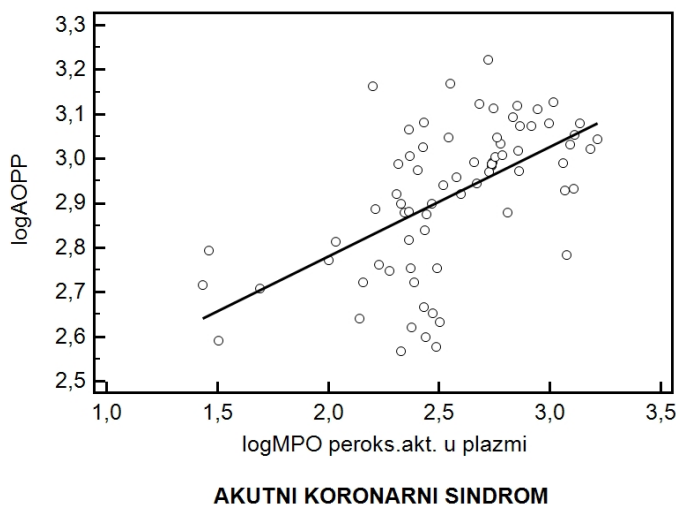
Испитивана је међусобна зависност (Графикони 6 и 7) концентрације укупних хидропероксида и АОПП, са једне стране, и пероксидазне активности

мијелопероксидазе, са друге стране, у плазми болесника са акутним коронарним синдромом. Вредности променљивих су логаритамски трансформисане како би се добила нормална дистрибуција и хомогеност варијансе.



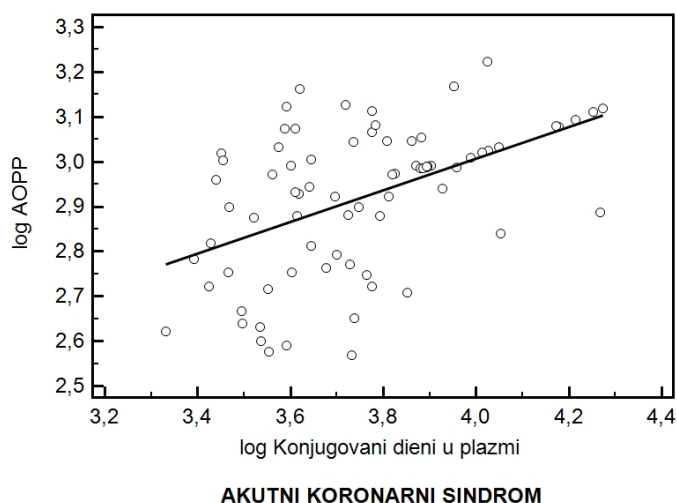
Графикон 6. Међусобни однос \log концентрације укупних хидропероксида ($\mu\text{mol/l}$) и \log пероксидазне активности мијелопероксидазе (U/l) у плазми болесника са акутним коронарним синдромом ($y = 2.455 + -0.118 x$).

Утврђена је значајна негативна корелација \log концентрације укупних хидропероксида и \log пероксидазне активности мијелопероксидазе у плазми болесника са акутним коронарним синдромом ($r = -0.27$, $p = 0.018$) (Графикон 6).



Графикон 7. Међусобни однос \log концентрације АОПП ($\mu\text{mol/l}$) и \log пероксидазне активности мијелопероксидазе (U/l) у плазми болесника са акутним коронарним синдромом ($y = 2.289 + 0.246 x$).

Утврђена је значајна корелација \log концентрације АОПП и \log пероксидазне активности мијелопероксидазе у плазми болесника са акутним коронарним синдромом ($r=0.576$, $p<0.0001$) (Графикон 7). Утврђена је значајна корелација \log концентрације АОПП и \log концентрације коњугованих диена у плазми болесника са акутним коронарним синдромом ($r=0.486$, $p<0.0001$) (Графикон 8).



Графикон 8. Међусобни однос \log концентрације АОПП ($\mu\text{mol/l}$) и \log концентрације коњугованих диена ($\mu\text{mol/l}$) у плазми болесника са акутним коронарним синдромом ($y = 1.597 + 0.352 x$).

5.4.2. Неензимски и ензимски елементи антиоксидационе заштите у плазми болесника са акутним коронарним синдромом и контролне групе

Табела 16. Елементи антиоксидационе заштите у плазми болесника са акутним коронарним синдромом и у контролној групи

	Акутни коронарни синдром (n=77)	Контролна група (n=33)
Укупне тиол групе	304.6 (82.5-821.2)	296.2 (101.2-540.0)
Супероксид дизмутаза	83.6±25.3 *	113.3±17.5
Глутатион пероксидаза-3	97.4 (3.3-617.8) *	29.1 (0.1-116.3)

* $p<0.05$; Вредности су приказане као медијана (минимална-максимална вредност) и аритметичка средина \pm стандардна девијација, и изражене у $\mu\text{mol/l}$ плазме за укупне тиол групе, а у KU/l плазме за супероксид дизмутазу и U/l за глутатион пероксидазу-3. Разлика је тестирана применом Манн-Whitney теста и Студентовог t -теста.

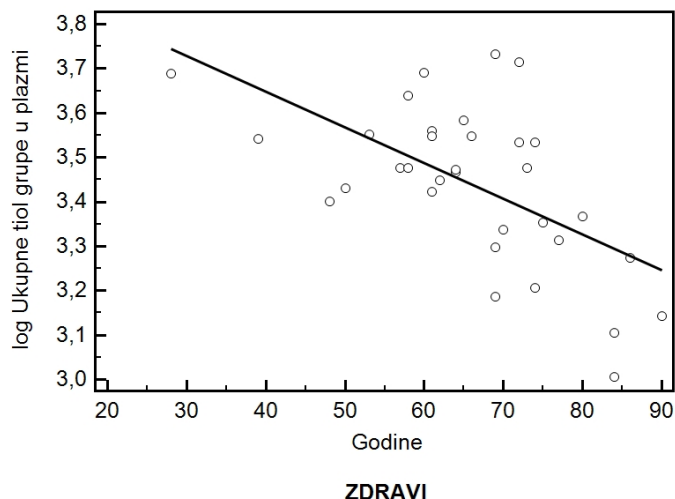
Одређивано је присуство елемената антиоксидационе заштите у плазми болесника са акутним коронарним синдромом и у контролној групи. Резултати су приказани на Табели 16.

Применом Mann-Whitney теста је утврђено да је у плазми болесника са АКС значајно виша активност глутатион пероксидазе-3 ($U=551.0$, $p<0.0001$) у односу на контролну групу (Табела 16).

Применом Студентовог т-теста уз корекцију Велчовим тестом за неједнаке варијансе је утврђена значајно нижа активност супероксид дизмутазе у плазми болесника са АКС ($t(d)=-7.059$, $ss=85.9$, $p<0.0001$) у односу на контролну групу (Табела 16).

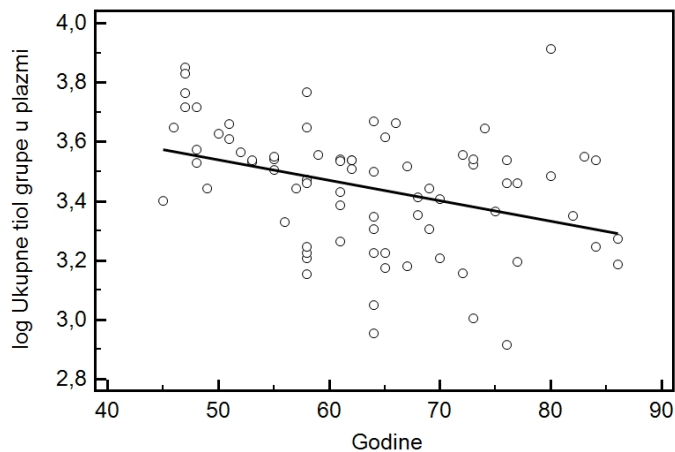
Применом Mann-Whitney теста је утврђено да не постоје статистички значајне разлике у концентрацији укупних тиол група ($U=1248.5$, $p=0.8859$) у плазми болесника са АКС и контролне групе (Табела 16).

Испитивана је међусобна зависност година старости и концентрације укупних тиол једињења у плазми болесника са акутним коронарним синдромом (Графикон 10) и контролне групе (Графикон 9). Вредности тиола су логаритамски трансформисане како би се добила нормална дистрибуција и хомогеност варијансе.



Графикон 9. Међусобни однос старости (године) и log концентрације укупних тиол група ($\mu\text{mol/l}$) у плазми контролне групе ($y = 3.968 + -0.008 x$).

Испитивањем међусобне зависности година старости и log концентрације непротеинских тиол група у плазми контролне групе утврђена је значајна негативна повезаност ($r=-0.591$, $p=0.0003$) (Графикон 9).



AKUTNI KORONARNI SINDROM

Графикон 10. Међусобни однос старости (године) и log концентрације укупних тиол група ($\mu\text{mol/l}$) у плазми болесника са акутним коронарним синдромом ($y = 3.886 + -0.007 x$).

Испитивањем међусобне зависности година старости и log концентрације непротеинских тиол група у плазми болесника са акутним коронарним синдромом утврђена је значајна негативна повезаност ($r=-0.364$, $p=0.0011$) (Графикон 10).

5.4.3. Каталитичка активност мијелопероксидазе у плазми болесника са акутним коронарним синдромом и у контролној групи

Одређивана је каталитичка активност мијелопероксидазе у плазми болесника са акутним коронарним синдромом и у контролној групи (Табела 17).

Табела 17. Каталитичка активност мијелопероксидазе у плазми болесника са акутним коронарним синдромом и у контролној групи

	Акутни коронарни синдром (n=77)	Контролна група (n=33)
Пероксидазна активност	35.6 (2.7-163.0) *	29.1 (4.1-100.4)
Хлоринишућа активност	31.0±10.7	31.0±7.8

* $p<0.05$; Вредности су приказане као медијана (минимална-максимална вредност) и аритметичка средина \pm стандардна девијација, и изражене у kU/l за хлор.акт. и U/ за перокс.акт. Разлика је тестирана применом Манн-Whitney теста и Студентовог t-теста.

Применом Mann-Whitney теста за тестирање значајности разлика пероксидазне активности мијелопероксидазе у плазми пацијената са АКС и контролне групе (Табела 17) утврђена је значајна разлика ($U=946.5$, $p=0.0346$).

Применом Студентовог т- теста, за тестирање значајности разлика хлоринишуће активности мијелопероксидазе у плазми пацијената са АКС и контролне групе (Табела 17) није утврђена значајна разлика ($t= -0.02, df=108$, $p=0.9841$).

5.4.4. Активност ксантин оксидазе и концентрација нитрита/нитрата у плазми болесника са акутним коронарним синдромом и у контролној групи

Одређивана је активност ксантин оксидазе и концентрација нитрита/нитрата у плазми болесника са акутним коронарним синдромом и у контролној групи. Резултати су приказани на Табели 18.

Табела 18. Активност ксантин оксидазе и концентрација нитрита/нитрата у плазми болесника са акутним коронарним синдромом и у контролној групи

	Акутни коронарни синдром ($n=77$)	Контролна група ($n=33$)
Ксантин оксидаза	16.1 (1.0-53.9)	17.4 (0.8-75.8)
Нитрити/нитрати	89.4 (1.6-255.2) *	14.6 (2.4-85.3)

* $p<0.05$; Вредности су приказане као медијана (минимална-максимална вредност) и изражене у $\mu\text{mol/l}$ за нитрите/нитрате, а у U/l за ксантин оксидазу. Разлика је тестирана применом Mann-Whitney теста.

Применом Mann-Whitney теста је утврђено да не постоје статистички значајне разлике у активности ксантин оксидазе ($U=1198.5$, $p=0.6386$) у плазми болесника са АКС и контролне групе (Табела 18).

Применом Mann-Whitney теста је утврђено да је у плазми болесника са АКС значајно виша концентрација нитрита/нитрата ($U=207.5$, $p<0.0001$) у односу на контролну групу (Табела 18).

5.5. Резултати испитивања плазме болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и контролне групе

5.5.1. Продукти оксидативне модификације у плазми болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и у контролној групи

Одређивани су продукти оксидативне модификације у плазми болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и у контролној групи. Резултати су приказани на Табели 19.

Табела 19. Продукти оксидативне модификације у плазми болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и контролној групи

	Акутни инфаркт миокарда (n=30)	Нестабилна ангина пекторис (n=47)	Контролна група (n=33)
Коњуговани диени	543 (214 -1870) *	544 (246 - 1847) *	298 (78 - 579)
Хидропероксиди	15.2 ± 5.4 *	15.2 ± 5.9 *	11.7 ± 3.5
АОПП	95.5 (37.0-145.4) *	91.0 (39.0-167.1) *	48.9 (13.4-115.8)
Хлорамини	47.9 (4.2-92.0) *	42.1 (7.3-91.5) *	35.9 (19.2-70.8)

* $p < 0.05$ у односу на контролну групу; Вредности су приказане као медијана (минимална-максимална вредност) и аритметичка средина ± стандардна девијација, и изражене у $\mu\text{mol/l}$. Разлика је тестирана применом Mann-Whitney теста и Студентовог т-теста. Скраћеница: АОПП-продукти унапредовале оксидације протеина.

Подаци за коњуговане диене одступају од нормалне дистрибуције, Левенов тест је позитиван, па се примењује Крускал-Валис тест. Тест статистика= 38.8984, $ss=2$, $p < 0.0001$. Post-hoc анализа применом поређења парова група према Коновер-у је показала да постоји разлика између медијана концентрације коњугованих диена у плазми болесника са акутним инфарктом миокарда ($U=135.0$, $p < 0.0001$) и нестабилном ангином ($U=179.5$, $p < 0.0001$) са једне стране и контролне групе са друге (Табела 19). Применом Mann-Whitney теста за парове група је утврђен ниво значајности разлика. Не постоји значајна разлика између група са акутним инфарктом миокарда и нестабилне ангине ($U=701.5$, $p=0.9667$).

Подаци за укупне хидропероксиде показују нормалну дистрибуцију. Левенов тест хомогености варијанси је негативан (2.072, $ss1/ss2$, 2/107, $p=0.131$). Теститањем разлика, анализом варијансе утврђена је разлика између испитиваних група ($F=5.454$, $ss=2/107$, $p=0.006$). Применом Студентовог т-теста утврђена је значајно виша концентрација укупних хидропероксида у плазми болесника са акутним инфарктом миокарда ($t(d)=-3.050$, $ss=49.3$, $p=0.0037$) и

нестабилном ангином ($t(d) = -3.358$, $ss=76.2$, $p=0.0012$) са једне стране и контролне групе са друге (Табела 19). Не постоји значајна разлика између група са акутним инфарктом миокарда и нестабилне ангине ($t=0.0234$, $ss=75$, $p=0.9814$).

Подаци за хлорамине одступају од нормалне дистрибуције, Левенов тест је позитиван, па се примењује Крускал-Валис тест. Тест статистика= 12.1089, $ss=2$, $p=0.0023$. Post-hoc анализа применом поређења парова група према Коновер-у је показала да постоји разлика између медијана концентрације хлорамина у плазми болесника са акутним инфарктом миокарда ($U=276.5$, $p=0.0026$) и нестабилном ангином ($U=489.5$, $p=0.0052$) са једне стране и контролне групе са друге (Табела 19). Применом Mann-Whitney теста за парове група је утврђен ниво значајности разлика. Не постоји значајна разлика између група са акутним инфарктом миокарда и нестабилне ангине ($U=572.5$, $p=0.1663$).

Подаци за АОПП одступају од нормалне дистрибуције, Левенов тест је позитиван, па се примењује Крускал-Валис тест. Тест статистика= 28.0114, $ss=2$, $p<0.0001$. Post-hoc анализа применом поређења парова група према Коновер-у је показала да постоји разлика између медијана концентрације АОПП у плазми болесника са акутним инфарктом миокарда ($U=210.5$, $p=0.0001$) и нестабилном ангином ($U=249.0$, $p<0.0001$) са једне стране и контролне групе са друге (Табела 19). Применом Mann-Whitney теста за парове група је утврђен ниво значајности разлика. Не постоји значајна разлика између група са акутним инфарктом миокарда и нестабилне ангине ($U=696.5$, $p=0.9293$).

5.5.2. Неензимски и ензимски елементи антиоксидационе заштите у плазми болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и у контролној групи

Одређивани су елементи антиоксидационе заштите у плазми болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и у контролној групи. Резултати су приказани на Табели 20.

Табела 20. Елементи антиоксидационе заштите у плазми болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и у контролној групи

	Акутни инфаркт миокарда (n=30)	Нестабилна ангина пекторис (n=47)	Контролна група (n=33)
Укупне тиол групе	283 (90 - 709)	315 (83 - 821)	296 (101- 540)
СОД	84.4 ± 28.5 *	83.1 ± 23.4 *	113.3 ± 17.5
ГПох-3	127.4 (18.2-617.8) *	77.7 (3.3-536.0) *	29.1 (0.1-116.3)

* $p < 0.05$ у односу на контролну групу; Вредности су приказане као медијана (минимална-максимална вредност) и аритметичка средина ± стандардна девијација, и изражене у $\mu\text{mol/l}$ плазме за укупне тиол групе, а у kU/l плазме за СОД и U/l за ГПох-3. Разлика је тестирана применом Mann-Whitney теста и Студентовог т-теста. Скраћенице: СОД- супероксид дизмутаза; ГПох-3 – глутатион пероксидаза-3.

Подаци за укупне тиол групе одступају од нормалне дистрибуције, Левенов тест је позитиван, па се примењује Крускал-Валис тест. Тест статистика= 0.2804, $df=2$, $p=0.8692$. Post-hoc анализа применом поређења парова група према Коновер-у је показала да не постоји разлика између медијана концентрације укупних тиол група у плазми болесника са акутним инфарктом миокарда ($U=478.5$, $p=0.8204$) и нестабилном ангином ($U=737.0$, $p=0.7067$) са једне стране и контролне групе са друге (Табела 20). Применом Mann-Whitney теста за парове група је утврђен ниво значајности разлика. Не постоји значајна разлика између група са акутним инфарктом миокарда и нестабилне ангине ($U=660.5$, $p=0.642$).

Подаци за супероксид дизмутазу показују нормалну дистрибуцију. Левенов тест хомогености варијанси је негативан (2.12, $DF1/DF2$, 2/107, $p=0.125$). Теститањем разлика, анализом варијансе утврђена је разлика између испитиваних група ($F=18.579$, $ss=2/107$, $p < 0.001$). Применом Студентовог т-теста утврђена је значајно нижа активност супероксид дизмутазе у плазми болесника са акутним инфарктом миокарда ($t(d)=4.799$, $ss=47.4$, $p < 0.0001$) и нестабилном ангином ($t=6.254$, $ss=78$, $p < 0.0001$) са једне стране и контролне групе са друге (Табела 20). Не постоји значајна разлика између група са акутним инфарктом миокарда и нестабилне ангине ($t=-0.205$, $ss=75$, $p=0.7382$).

Подаци за глутатион пероксидазу-3 одступају од нормалне дистрибуције, Левенов тест је позитиван, па се примењује Крускал-Валис тест. Тест статистика= 23.0795, $df=2$, $p < 0.0001$. Post-hoc анализа применом поређења

парова група према Коновер-у је показала да постоји разлика између медијана активности глутатион пероксидазе-3 у плазми болесника са акутним инфарктом миокарда ($U=171.0$, $p<0.0001$) и нестабилном ангином ($U=380.0$, $p=0.0001$) са једне стране и контролне групе са друге (Табела 20). Применом Mann-Whitney теста за парове група је утврђен ниво значајности разлика. Не постоји значајна разлика између група са акутним инфарктом миокарда и нестабилне ангине ($U=608.5$, $p=0.3135$).

5.5.3. Каталитичка активност мијелопероксидазе у плазми болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и у контролној групи

Одређивана је каталитичка активност мијелопероксидазе у плазми болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и у контролној групи. Резултати су приказани на Табели 21.

Табела 21. Каталитичка активност мијелопероксидазе у плазми болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и у контролној групи

	Акутни инфаркт миокарда (n=30)	Нестабилна ангина пекторис (n=47)	Контролна група (n=33)
Пероксидазна активност	38.7 (2.7-152.0)	35.6 (2.9-163.0) *	29.1 (4.1-100.4)
Хлоринишућа активност	30.8 (12.1-54.1)	29.9 (4.5-58.1)	30.8 (11.1-55.1)

* $p<0.05$ у односу на контролну групу; Вредности су приказане као медијана (минимална-максимална вредност) и аритметичка средина \pm стандардна девијација, и изражене у kU/l за хлор.акт. и U/ за перокс.акт. Разлика је тестирана применом Mann-Whitney теста.

Подаци за пероксидазну активност мијелопероксидазе одступају од нормалне дистрибуције, Левенов тест је позитиван, па се примењује Крускал-Валис тест. Тест статистика= 4.4691, $ss=2$, $p=0.0107$. Post-hoc анализа применом поређења парова група према Коновер-у је показала да постоји разлика између медијана пероксидазне активности мијелопероксидазе у плазми болесника са акутним инфарктом миокарда ($U=372.0$, $p=0.0105$) и нестабилном ангином ($U=574.5$, $p=0.0495$) са једне стране и контролне групе са друге (Табела 21). Применом Mann-Whitney теста за парове група је утврђен ниво

значајности разлика. Не постоји значајна разлика између група са акутним инфарктом миокарда и нестабилне ангине ($U=701.0$, $p=0.9667$).

Подаци за хлоринишућу активност мијелопероксидазе одступају од нормалне дистрибуције, Левенов тест је позитиван, па се примењује Крускал-Валис тест. Тест статистика= 1.3494, $ss=2$, $p=0.5092$. Post-hoc анализа применом поређења парова група према Коновер-у је показала да не постоји разлика између медијана хлоринишуће активност мијелопероксидазе у плазми болесника са акутним инфарктом миокарда ($U=436.0$, $p=0.4167$) и нестабилном ангином ($U=744.5$, $p=0.7619$) са једне стране и контролне групе са друге (Табела 21). Применом Mann-Whitney теста за парове група је утврђен ниво значајности разлика. Не постоји значајна разлика између група са акутним инфарктом миокарда и нестабилне ангине ($U=596.5$, $p=0.257$).

5.5.4. Активност ксантин оксидазе и концентрација нитрита/нитрата у плазми болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и здравих

Одређивана је активност ксантин оксидазе и концентрација нитрита/нитрата у плазми болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и у контролној групи. Резултати су приказани на Табели 22.

Табела 22. Активност ксантин оксидазе и концентрација нитрита/нитрата у плазми болесника са акутним инфарктом миокарда, нестабилном ангином и у контролној групи

	Акутни инфаркт миокарда (n=30)	Нестабилна ангина пекторис (n=47)	Контролна група (n=33)
Ксантин оксидаза	15.3 (1.5-52.8)	17.5 (1.0-53.9)	17.4 (0.8-75.8)
Нитрити/нитрати	81.7 (11.4-255.2) *	91.0 (1.6-237.3) *	14.6 (2.4-85.3)

* $p<0.05$ у односу на контролну групу; Вредности су приказане као медијана (минимална-максимална вредност) и изражене у $\mu\text{mol/l}$ за нитрите/нитрате, а у U/l за ксантин оксидазу. Разлика је тестирана применом Mann-Whitney теста.

Подаци за ксантин оксидазу одступају од нормалне дистрибуције, Левенов тест је позитиван, па се примењује Крускал-Валис тест. Тест статистика= 0.9005, $ss=2$, $p=0.6375$. Post-hoc анализа применом поређења

парова група према Коновер-у је показала да не постоји разлика између медијана активности ксантин оксидазе у плазми болесника са акутним инфарктом миокарда ($U=491.5$, $p=0.9616$) и нестабилном ангином ($U=700.0$, $p=0.4606$) са једне стране и контролне групе са друге (Табела 22). Применом Mann-Whitney теста за парове група је утврђен ниво значајности разлика. Не постоји значајна разлика између група са акутним инфарктом миокарда и нестабилне ангине ($U=624.0$, $p=0.3975$).

Подаци за нитрите/нитрате одступају од нормалне дистрибуције, Левенов тест је позитиван, па се примењује Крускал-Валис тест. Тест статистика= 23.0795, $df=2$, $p<0.0001$. Post-hoc анализа применом поређења парова група према Коновер-у је показала да постоји разлика између медијана концентрације нитрита/нитрата у плазми болесника са акутним инфарктом миокарда ($U=88.5$, $p<0.0001$) и нестабилном ангином ($U=119.0$, $p<0.0001$) са једне стране и контролне групе са друге (Табела 22). Применом Mann-Whitney теста за парове група је утврђен ниво значајности разлика. Не постоји значајна разлика између група са акутним инфарктом миокарда и нестабилне ангине ($U=673.0$, $p=0.7382$).

5.6. Корелациона анализа

5.6.1. Корелациона анализа вредности променљивих из лизата неутрофила у групи болесника са акутним коронарним синдромом

Испитивана је мера узајамне зависности логаритамски трансформисаних вредности променљивих из лизата неутрофила ,са једне стране и година старости (Табела 23) и фактора ризика (Табела 24), са друге стране. Логаритамска трансформација је обављена да би се успоставила нормална дистрибуција података и био израчунат Пирсонов коефицијент корелације. Анализа је обављена у групи болесника са акутним коронарним синдромом.

На Табели 23 су приказане статистички значајне корелације у групи болесника са акутним коронарним синдромом између логаритамски трансформисаних вредности променљивих из лизата неутрофила и година старости.

Табела 23. Утицај година старости на поједине варијабле неутрофилних леукоцита у групи болесника са акутним коронарним синдромом

	Коњуговани диени	Супероксид дизмутаза	Хлорамини
Коефицијент корелације	-0.270	-0.391	-0.283
<i>p</i> -вредност	0.018	< 0.001	0.013

Приказане су вредности Пирсоновог коефицијента корелације. Све вредности варијабли из лизата неутрофила су претходно логаритамски трансформисане.

На Табели 24 су приказане статистички значајне корелације у групи болесника са акутним коронарним синдромом између логаритамски трансформисаних вредности променљивих из лизата неутрофила и фактора ризика.

Табела 24. Утицај хиперлипидемије на поједине варијабле неутрофила пацијената са акутним коронарним синдромом

	Коњуговани диени	Глутатион пероксидаза-1	Супероксид дизмутаза
ХЛП	0.260 (0.022)	-0.260 (0.022)	0.369 (0.001)

Приказане су вредности Пирсоновог коефицијента корелације и *p*-вредност (у загради). Све вредности варијабли су претходно логаритамски трансформисане. Скраћенице: ХЛП – хиперлипидемија;

На Табели 25 су приказане статистички значајне корелације у групи болесника са акутним коронарним синдромом између логаритамски трансформисаних вредности променљивих из лизата неутрофила.

Табела 25. Корелација варијабли у лизату неутрофила у групи болесника са акутним коронарним синдромом

	Непротеинске тиол групе	Укупне тиол групе	Супероксид дизмутаза	Каталаза	Глутатион пероксидаза-1	Глутатион редуктаза	МПО перокс. акт	МПО хлор. акт.	Хлорамини
Коњуговани Диени	0.343	0.332	0.595	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	0.458	0.486
Укупни Хидропероксиди	Н.С.	Н.С.	0.231	0.342	Н.С.	0.394	0.358	0.492	0.261
Непротеинске тиол групе	Н.С.	Н.С.	0.243	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	0.315	0.348
Укупне тиол групе	Н.С.	Н.С.	0.282	0.295	0.235	Н.С.	0.320	0.359	0.398
Супероксид дизмутаза	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	0.544	0.430
Каталаза	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	0.334	0.234	0.759	Н.С.	Н.С.
Глутатион пероксидаза-1	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	0.324	0.420	Н.С.	Н.С.
Глутатион редуктаза	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	0.238	0.322	0.229
Мијелопероксидаза хлор. акт.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	0.773

Приказане су вредности Пирсоновог коефицијента корелације; n=77 (број чланова групе); Све вредности варијабли су претходно логаритамски трансформисане да би се добила нормална дистрибуција; Приказане су само статистички значајне (p<0.05) корелације. Изостављене су варијабле које немају статистички значајне корелације. Болдиране су корелације између варијабли које се укључују у модел мултипле регресије; Н.С. – није статистички значајно; МПО-мијелопероксидаза.

5.6.2. Корелациона анализа вредности променљивих из крвне плазме у групи болесника са акутним коронарним синдромом

Испитивана је мера узајамне зависности логаритамски трансформисаних вредности променљивих из крвне плазме, са једне стране и година старости (Табела 26) и фактора ризика (Табела 27), са друге стране. Логаритамска трансформација је обављена да би се успоставила нормална дистрибуција података и био израчунат Пирсонов коефицијент корелације. Анализа је обављена у групи болесника са акутним коронарним синдромом.

На Табели 26 су приказане статистички значајне корелације у групи болесника са акутним коронарним синдромом између логаритамски трансформисаних вредности променљивих из крвне плазме и година старости.

Табела 26. Утицај година старости на поједине варијабле крвне плазме у групи болесника са акутним коронарним синдромом

	Узнапредовали оксидациони продукти протеина (АОПП)	Нитрити/ нитрати	Укупни тиоли
Коефицијент корелације	-0.283	-0.274	-0.364
<i>p</i> -вредност	0.013	0.016	0.001

Приказане су вредности Пирсоновог коефицијента корелације. Све вредности варијабле су претходно логаритамски трансформисане.

На Табели 27 су приказане статистички значајне корелације у групи болесника са акутним коронарним синдромом између логаритамски трансформисаних вредности променљивих из крвне плазме и фактора ризика.

Табела 27. Утицај хиперлипидемије на поједине варијабле крвне плазме пацијената са акутним коронарним синдромом

	АОПП	Коњуговани диени	Глутатион пероксидаза ³	Мијелопероксидаза (хлор. акт.)	Нитрити/ нитрати	Хидроперо- ксиди	Укупни тиоли
Коефицијент корелације	0.32	0.438	0.242	0.294	0.286	0.439	0.465
<i>p</i> -вредност	< 0.001	0.0001	0.034	0.009	0.012	< 0.001	< 0.001

Приказане су вредности Пирсоновог коефицијента корелације. Све вредности варијабле су претходно логаритамски трансформисане. Болдиране су корелације између варијабле које се укључују у модел мултипле регресије; АОПП-узнапредовали оксидациони продукти протеина.

Такође, утврђена је значајна корелација ХТА са АОПП ($\rho=0.317$, $p=0.0049$) у групи болесника са АКС.

На Табели 28 су приказане статистички значајне корелације у групи болесника са акутним коронарним синдромом између логаритамски трансформисаних вредности променљивих из крвне плазме.

Табела 28. Корелација варијабли у плазми у групи болесника са акутним коронарним синдромом

	Укупни хидропероксиди	Узнапредовали оксидациони продукти протеина (АОПП)	Укупне тиол групе	Супероксид дизмутаза	Глутатион пероксидаза-3	Мијелопероксидаза перокс. акт.	Хлорамини	Нитрити/нитрати
Коњуговани диени	0.299	0.486	0.484	Н.С.	0.273	Н.С.	Н.С.	Н.С.
Укупни хидропероксиди	Н.С.	Н.С.	0.370	Н.С.	0.272	-0.270	0.260	0.428
Узнапредовали оксидациони продукти протеина (АОПП)	Н.С.	Н.С.	0.517	-0.229	Н.С.	0.576	0.248	Н.С.
Укупне тиол групе	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	0.235	0.303	Н.С.
Хлорамини	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	0.469
Ксантин оксидаза	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	-0.231

Приказане су вредности Пирсоновог коефицијента корелације; $n=77$ (број чланова групе); Све вредности варијабли из плазме су претходно логаритамски трансформисане да би се добила нормална дистрибуција; Приказане су само статистички значајне ($p<0.05$) корелације. Изостављене су варијабле које немају статистички значајне корелације. Болдиране су корелације између варијабли које се укључују у модел мултипле регресије; Н.С. – није статистички значајно.

5.7. Линеарна и мултипла (вишеструка) регресија

Линеарна регресија је испитивана кроз однос између вредности зависних варијабли из лизата неутрофила (коњуговани диени, укупни хидропероксиди, хлорамини) и плазме (коњуговани диени, укупни хидропероксиди, хлорамини, АОПП), са једне стране, и независних варијабли из лизата неутрофила и плазме, као и фактора ризика и старости испитаника, са друге стране, у групи болесника са акутним коронарним синдромом. Подаци континуираних варијабли су претходно логаритамски трансформисани како би успоставила нормална дистрибуција и хомогеност варијанси. Испитивана је линеарна регресија између варијабли са претходно утврђеном статистички значајном корелацијом ($p < 0.05$), где је Пирсонов коефицијент корелације вредности 0.3-0.7. Затим су статистички значајне регресије ($p < 0.05$) укључене у модел "корак по корак" (engl. stepwise) мултипле регресије како би се утврдило које независне варијабле на нивоу значајности $p < 0.05$ доприносе вредности зависне варијабле у односу на једну или више удружених независних варијабли. У табелама су приказани прости линеарни модели за све независне променљиве, и мултипли регресиони модели за значајне независне променљиве.

5.7.1. Линеарна и мултипла (вишеструка) регресија варијабли у лизату неутрофила у групи болесника са акутним коронарним синдромом

У групи болесника са акутним коронарним синдромом испитиван је однос зависних и независних варијабли у лизату неутрофила.

Табела 29. Линеарна и мултипла регресија са Log концентрацијом коњугованих диена у лизату неутрофила у групи болесника са акутним коронарним синдромом

Независна варијабла	Линеарна регресија			Мултипла регресија		
	Б	СГ	П	β	СГ	П
Log Супероксид дизмутаза	0.2640	0.04117	<0.0001	0.2101	0.04353	<0.0001
Log Хлорамини	0.4287	0.08894	<0.0001	0.2492	0.08650	0.0052
Log Непротеинске тиол групе	0.1397	0.04422	0.0023			
Log Укупне тиол групе	0.1954	0.06406	0.0032			
Log МПО хлор. акт.	0.3859	0.08649	<0.0001			

Б-нестандардизовани коефицијент ("slope"), СГ- стандардна грешка, β- стандардизовани коефицијент, Log -вредности независних варијабли су логаритамски трансформисане. МПО- мијелопероксидаза.

Добијен је статистички значајан мултипли регресиони модел ($F=26.7154$, $p<0.001$). Овим моделом (Табела 29) је објашњено 40.36 % укупне варијансе ($R^2\text{-adjusted}=0.4036$). Статистички значајне биле су варијабле: Log супероксид дизмутаза и Log хлорамини.

Табела 30. Линеарна и мултипла регресија са Log концентрацијом укупних хидропероксида у лизату неутрофила у групи болесника са акутним коронарним синдромом

Независна варијабла	Линеарна регресија			Мултипла регресија		
	Б	СГ	П	β	СГ	п
Log МПО хлор.акт.	0.5446	0.1113	<0.0001	0.4317	0.1092	0.0002
Log МПО перокс.акт.	0.1434	0.04317	0.0014	0.1022	0.0358	0.0098
Log Глутатион редуктаза	0.1678	0.04518	0.0004	0.0885	0.0428	0.0423
Log Каталаза	0.1640	0.05204	0.0023			

Б-нестандардизовани коефицијент ("slope"), СГ- стандардна грешка, β- стандардизовани коефицијент, Log -вредности независних варијабли су логаритамски трансформисане. МПО- мијелопероксидаза.

Добијен је статистички значајан мултипли регресиони модел ($F=14.0056$, $p<0.001$). Овим моделом (Табела 30) је објашњено 33.92 % укупне варијансе ($R^2\text{-adjusted}=0.3392$). Статистички значајне биле су варијабле: Log МПО хлор.активност, Log МПО перокс.акт. и Log Глутатион редуктаза .

Табела 31. Линеарна и мултипла регресија са Log концентрацијом хлорамина у лизату неутрофила у групи болесника са акутним коронарним синдромом

Независна варијабла	Линеарна регресија			Мултипла регресија		
	Б	СГ	П	В	СГ	п
Log Коњуговани диени	0.5517	0.1145	<0.0001	0.4517	0.1170	0.0002
Log Укупне тиол групе	0.2655	0.07069	0.0003	0.1772	0.06884	0.0120
Log Непротеинске тиол групе	0.1608	0.05007	0.0019			
Log Супероксид дизмутаза	0.2165	0.05246	0.0001			

Б-нестандардизовани коефицијент ("slope"), СГ- стандардна грешка, β- стандардизовани коефицијент, Log -вредности независних варијабли су логаритамски трансформисане.

Добијен је статистички значајан мултипли регресиони модел ($F= 15.8050$, $p<0.001$). Овим моделом је објашњено 28.04 % укупне варијансе ($R^2\text{-adjusted}= 0.2804$). Статистички значајне биле су варијабле: Log коњуговани диени и Log укупне тиол групе.

5.7.2. Линеарна и мултипла (вишеструка) регресија варијабли у плазми болесника са акутним коронарним синдромом

Табела 32. Линеарна и мултипла регресија са Log концентрацијом коњугованих диена у плазми у групи болесника са акутним коронарним синдромом

Независна варијабла	Линеарна регресија			Мултипла регресија		
	Б	СГ	п	β	СГ	п
Log АОПП	0.6704	0.1391	<0.0001	0.5318	0.1390	0.0003
Хиперлипидемија (има/нема)	0.1970	0.04673	0.0001	0.1415	0.04537	0.0026
Log Укупне тиол групе у плазми	0.5236	0.1092	<0.0001			

Б-нестандардизовани коефицијент ("slope"), СГ- стандардна грешка, β- стандардизовани коефицијент, Log -вредности независних варијабли су логаритамски трансформисане. АОПП- узнапредовали оксидациони продукти протеина.

Добијен је статистички значајан мултипли регресиони модел ($F=17.8257$, $p<0.001$). Овим моделом (Табела 32) је објашњено 30.69 % укупне варијансе ($R^2\text{-adjusted}=0.3069$). Статистички значајне биле су варијабле: Log АОПП и хиперлипидемија.

Табела 33. Линеарна и мултипла регресија са Log концентрацијом укупних хидропероксида у плазми у групи болесника са акутним коронарним синдромом

Независна варијабла	Линеарна регресија			Мултипла регресија		
	Б	СГ	п	β	СГ	п
Log Нитрити/нитрати	0.2260	0.0550	0.0001	0.174	0.0538	0.0018
Хиперлипидемија (има/нема)	0.1461	0.03454	0.0001	0.115	0.034	0.0012
Log Укупне тиол групе у плазми	0.2960	0.08576	0.0009			
Log Коњуговани диени у плазми	0.2213	0.08150	0.0082			

Б-нестандардизовани коефицијент ("slope"), СГ- стандардна грешка, β- стандардизовани коефицијент, Log -вредности независних варијабли су логаритамски трансформисане.

Добијен је статистички значајан мултипли регресиони модел ($F=15.277$, $p<0.001$). Овим моделом (Табела 33) је објашњено 27.31 % укупне варијансе ($R^2\text{-adjusted}=0.2731$). Статистички значајне биле су варијабле: Log нитрити/нитрати, и хиперлипидемија.

Табела 34. Линеарна и мултипла регресија са Log концентрацијом хлорамина у плазми у групи болесника са акутним коронарним синдромом

Независна варијабла	Линеарна регресија			Мултипла регресија		
	Б	СГ	П	β	СГ	п
Log Нитрити/нитрати	0.3165	0.0687	<0.0001	0,3165	0.0687	<0.0001
Log Укупне тиол групе у плазми	0.3093	0.1124	0.0074			

Б-нестандардизовани коефицијент ("slope"), СГ- стандардна грешка, β- стандардизовани коефицијент, Log -вредности независних варијабли су логаритамски трансформисане.

Добијен је статистички значајан мултипли регресиони модел ($F=21.2$, $p=0.004$). Овим моделом (Табела 34) је објашњено 21 % укупне варијансе (R^2 -adjusted=0.21). Статистички значајна је била варијабла: Log нитрити/нитрати.

Табела 35. Линеарна и мултипла регресија са Log концентрацијом узапредовалих оксидационих продуката протеина (АОПП) у плазми у групи болесника са акутним коронарним синдромом

Независна варијабла	Линеарна регресија			Мултипла регресија		
	Б	СГ	П	В	СГ	п
Log Коњуговани диени у плазми	0.3527	0.07319	<0.0001	0.193	0.063	0.0033
Log Укупне тиол групе у плазми	0.4052	0.07751	<0.0001	0.19	0.069	0.008
Log МПО перокс. акт. у плазми	0.2465	0.04041	<0.0001	0.19	0.034	<0.0001
Артеријска хипертензија (има/нема)	0.1028	0.03548	0.0049	0.079	0.025	0.0024

Б-нестандардизовани коефицијент ("slope"), СГ- стандардна грешка, β- стандардизовани коефицијент, Log -вредности независних варијабли су логаритамски трансформисане. МПО- мијелопероксидаза.

Добијен је статистички значајан мултипли регресиони модел ($F=25.61$, $p<0.001$). Овим моделом (Табела 35) је објашњено 56.43 % укупне варијансе (R^2 -adjusted=0.5643). Статистички значајне биле су варијабле: Log коњуговани диени у плазми, Log укупне тиол групе у плазми, Log МПО перокс. акт. у плазми и артеријска хипертензија.

6. ДИСКУСИЈА

Бројни докази повезују неутрофиле са патофизиолошком основом настанка акутног коронарног синдрома и развоја његових компликација. Укратко, неутрофили учествују у настанку ерозије и руптуре атеросклеротичног плака и следственој тромбози, што доводи до делимичне или потпуне опструкције крвних судова и исхемијског оштећења миокарда, као и у абнормалном вентрикуларном моделовању након тога. Руптура и/или ерозија атеросклеротичног плака и консекутивна тромбоза је најчешћа патофизиолошка основа за развој акутног коронарног синдрома. Анализе руптурираних плакова показују да постоје одређене карактеристике тренутно стабилних плакова које их у будућности могу учинити подложним тромбози (вулнерабилни плакови).

Мијелопероксидаза, ензим азурофилних гранула неутрофилних гранулоцита, а делом и моноцита и ткивних макрофага, има јединствену способност да појачава оксидациони потенцијал водоник-пероксида, стварањем далеко моћнијих оксиданата, каква је хипохлорна киселина. Откривено је да мијелопероксидаза: преводи LDL (енгл. low density lipoproteins) у атерогену форму, селективно модификује аполипопротеин А-I и ствара дисфункционални HDL (енгл. high density lipoproteins), изазива ендотелну дисфункцију смањењем биолошке расположивости азот монооксида (NO), доприноси развоју вулнерабилног плака и абнормалном вентрикуларном ремоделовању након инфаркта миокарда. Од посебног је значаја за развој акутног коронарног синдрома њена способност да доприноси развоју вулнерабилног плака [98]. *In vitro* и *in vivo* су потврђени бројни механизми развоја вулнерабилног плака. Прво, *in vitro* је утврђено да мијелопероксидаза активира неколико матриксних металопроотеиназа (ММП) чиме покреће протеолизну каскаду доводећи до руптуре фиброзне капе [99,100,101]. Друго, доприноси апоптози ендотелних ћелија [102], што представља механизам развоја суперфицијалних ерозија на којима настаје интракоронарни тромб. Треће, преко смањења биолошке расположивости NO [103,104] мења нормалну антитромботску активност ендотелне површине у протромбогену, кроз експресију различитих протромботичних и антифибринолитичких фактора [105]. Четврто, подстиче експресију ткивног фактора коагулације на ендотелним ћелијама. Откривено је да преко хипохлорне киселине активира латентне облике ММП-7, ММП-8 и

ММП-9 [99,100]. Промена активности ММП-7 би могла представљати важан механизам контроле деградације структурних протеина матрикса, и могућег настанка руптуре атеросклеротичног плака. Количина мијелопероксидазе у макрофагима корелира са стадијумом развоја атеросклеротичног плака [106]. Макрофаги, који садрже мијелопероксидазу у већим количинама присутни су у вулнерабилним плаковима. Мијелопероксидаза, генерисањем хипохлорне киселине, изазива смрт и одвајање ендотелних ћелија активацијом апоптозе [102], што доводи до десквamacије епитела и стварања суперфицијалних ерозија на интими артерија које представљају супстрат за настанак тромбозе на месту фибромускуларних плакова. Код пацијената са нестабилном ангином пекторис леукоцити бивају активирани при проласку кроз коронарну циркулацију, при чему ослобађају ензим мијелопероксидазу [107]. Активација неутрофила при проласку кроз коронарну циркулацију је маркер распрострањеног инфламаторног процеса у коронарним крвним судовима. Под појмом распрострањености подразумева се захваћеност више од једне главне коронарне артерије. Са друге стране, код пацијената са стабилном ангином пекторис не долази до значајне активације неутрофила.

Међутим, мали број истраживања се бавио променама у самим неутрофилима у условима исхемије и реперфузије у акутном коронарном синдрому.

Предмет садашње студије је био метаболизам слободних радикала кисеоника и хлора у неутрофилима болесника са акутним коронарним синдромом. Главни извор слободних радикала кисеоника у неутрофилима је мембранска НАДПХ-оксидаза која ствара супероксид радикал. Даље, супероксид радикал се дејством супероксид дисмутазе или спонтаном дисмутацијом протонизоване форме преводи у водоник-пероксид. Водоник пероксид представља реактивну форму кисеоника. Представља супстрат за неколико ензима: каталазу, глутатион пероксидазу и мијелопероксидазу. За активност глутатион пероксидазе неопходно је присуство глутатиона у редукованој форми у којој га одржава ензим глутатион редуктаза. Како би остварили увид у ток реакција до настанка водоник пероксида одређивана је активност наведених ензима, осим НАДПХ-оксидазе. Из водоник пероксида под одређеним условима настаје најпотентнији слободни радикал кисеоника-хидроксил радикал. Хидроксил радикал инцира оксидативну модификацију

бројних молекула, што смо утврђивали мерењем продуката липидне пероксидације- конјугованих диена и укупних хидропероксида. Мерењем активности мијелопероксидазе и концентрације хлорамина- реактивне форме хлора испитивали смо у којој је мери водоник пероксид супстрат за овај ензим. Такође, у плазми у непосредном окружењу неутрофила вршено је одређивање показатеља антиоксидативне заштите и оксидационог стреса, како би се утврдила евентуална повезаност продуката метаболизма слободних радикала кисеоника и хлора у неутрофилима са наведеним и обрнуто.

У овој студији је одабир контролне групе био заснован на претпоставци да одсуство акутних и хроничних обољења, као и фактора ризика, омогућава издвајање неутрофила из крви у рестинг, непобуђеном стању. Испитивана група болесника са акутним коронарним синдромом је подељена на две подгрупе болесника са акутним инфарктом миокарда и са нестабилном ангином пекторис, како би се утврдило у којој мери различит степен и трајање исхемије утичу на метаболизам слободних радикала кисеоника и хлора у неутрофилима. Даље, анализа је показала да нема значајне разлике у старосној и полној структури између испитиваних група. Такође, не постоји разлика између испитиваних подгрупа. Наиме пол и старост могу утицати на вредност неких од одређиваних варијабли, те је тако избегнут тај ометајући утицај у анализи.

Статистичком анализом је утврђено да су испитанице женског пола значајно старије у односу испитанике мушког пола у групи болесника са акутним коронарним синдромом. То је у сагласности са ставом да старост мушкараца већа од 55 година и старост жена у менопаузи већа од 65 година представљају независне факторе ризика за настанак коронарне болести срца [108]. У групи болесника са акутним коронарним синдромом испитанице са хиперлипидемијом су били значајно млађи од оних без хиперлипидемије. Хиперлипидемија је, такође, један од независних фактора ризика за настанак коронарне болести срца [108]. Није утврђена разлика у старости болесника са акутним коронарним синдромом са и без дијабетес мелитуса и артеријске хипертензије. Пошто хиперлипидемија не изазива симптоме за разлику од дијабетес мелитуса и артеријске хипертензије, можемо претпоставити да није на време откривена и коригована, и да је довела до убрзаног развоја коронарне болести срца, која се испољила раном појавом акутног коронарног синдрома. Даље, утврђено је да не постоји разлика у заступљености полова у односу на присутне факторе

ризика код болесника са акутним коронарним синдромом. То нам говори да пол, *per se*, нема утицаја на настанак АКС. Такође, утврђено је да не постоји разлика у заступљености фактора ризика између болесника са акутним инфарктом миокарда и нестабилном ангином пекторис. Фактори ризика испољавају утицај на појаву и развој коронарне болести срца, али не и на то у ком ће се клиничком облику АКС испољити.

Након одређивања активности ензима и концентрације супстанци у лизату неутрофила, нашли смо се у недоумици у вези изражавања њихових вредности на 3 начина: према броју неутрофила, према запремини или маси протеина. Сличну недоумицу је имао Е. Beutler, али у вези еритроцита [109]. Наиме, у случају изражавања на запремину и број ћелија јављају се бројни извори грешака, почев од разблаживања, пипетирања, промене запремине ћелија при узимању узорка под дејством антикоагуланса, до суспендовања ћелија у пуферу. Затим, потреба да се у истом узорку више пута одреди број неутрофила, након издвајања и суспендовања у пуферу, ресуспендовања да би се подесио број неутрофила на сличну вредност у свим узорцима, и након лизирања, а у условима када у лабораторији не постоји хематолошки анализатор, већ се бројање ћелија мора извршити у другој удаљеној лабораторији, определило нас је за најмање логичан избор- изражавање према маси протеина. Ако у случају изражавања активности ензима можемо говорити о специфичној активности, онда у случају концентрације различитих интермедијера постоји тек случајна веза са концентрацијом протеина.

Током побуђивања и активације неутрофила мембранска НАДПХ-оксидаза постаје функционална, ексцесивно троши доступни молекулски кисеоник стварајући супероксид анјон радикале. Супероксид анјон радикали се преводе у водоник пероксид, било спонатном или ензимски катализованом дизмутацијом. У нашем истраживању је утврђен пораст активности СОД у лизату неутрофила болесника са АКС (Табела 10) и подгрупама са АИМ и НАП (Табела 13). То говори у прилог одвијања ензимски катализоване дизмутације супероксид радикала. Настали водоник пероксид представља супстрат за неколико ензима присутних у неутрофилима: каталазу, глутатион пероксидазу-1 и мијелопероксидазу. У нашем истраживању је утврђено да нема значајних промена у активности каталазе, глутатион пероксидазе-1 и глутатион редуктазе у лизату неутрофила болесника са АКС (Табела 10) и подгрупама са АИМ и

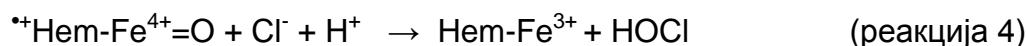
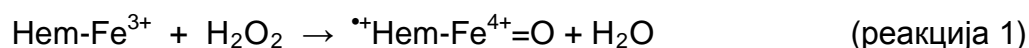
НАП (Табела 13). Каталаза се налази у малобројним пероксизомима. Не постоје подаци да се њихов број мења у току активације неутрофила. K_m вредност за каталазу је висока, око 25.0 mM, што представља ограничење за повећање активности каталазе у неутрофилима, поред просторне одвојености од места настанка водоник пероксида. K_m вредност за глутатион пероксидазу-1 варира од 0.45-0.77 mM у зависности од промене концентрације глутатиона (0.5-2.0 mM) [110]. K_m вредност за МПО варира до максималне 1.0 mM у условима налик физиолошким, а мења се у зависности од концентрације јона хлора и промене киселости средине [111]. У нашем истраживању смо утврдили пад активности Гпох-1, који је изнад прага статистичке значајности. Иако постоји преклапање K_m вредности МПО и Гпох-1 за водоник-пероксид као супстрат, услед просторне одвојености ензима, од којих се МПО налази на месту стварања, МПО представља главни ензим неутрофила који метаболише водоник пероксид. Томе у прилог говори пораст хлоринишуће активности МПО у неутрофилима болесника са АКС (Табела 11), добијен у нашем истраживању, као и висока корелација активности СОД, која ствара водоник пероксид дизмутацијом супероксид радикала, и хлоринишуће активности МПО у истој групи болесника (Табела 25, Графикон 5).

У нашем истраживању је утврђено да нема значајних промена у активности глутатион пероксидазе-1 и глутатион редуктазе, али да постоји значајан пораст концентрације непротеинских тиол група у лизату неутрофила болесника са АКС (Табела 10) и подгрупама са АИМ и НАП (Табела 13). Највећи део непротеинских тиол група у ћелијама потиче од глутатиона (90%) и цистеина који је супстрат за његову синтезу. Иако овом студијом није било могуће открити тачан узрок, повећана концентрација глутатиона у леукоцитима може имати вишеструки значај. Као прво, пораст редукованог глутатиона је један од показатеља редуктивног стреса. Новија истраживања показују да вишак редукујућих агенаса може појачати оксидационе реакције у митохондријама, индуковати цитотоксичост и на још недовољно познат начин смањити контрактилну способност и повећати осетљивост срчаног мишића за исхемијско оштећење [112,113].

Даље, пораст редукованог глутатиона вероватно има везе са одложеном апоптозом неутрофила у АКС. Наиме, чињеница је да је пад концентрације глутатиона [114] неопходан за индукцију поремећаја редокс равнотеже у фази

индукције митохондријалног пута апоптозе, али није довољан *per se* да осигура извршење програмиране смрти ћелије. Сматра се да оскудне митохондрије у неутрофилима имају улогу у апоптози [115]. У раду Garlichs и сар. је потврђено значајно одлагање апоптозе у неутрофилима болесника са АКС [116]. Утврђен је значајан пораст концентрације укупних тиол група у лизату неутрофила болесника са АКС (Табела 10) и подгрупи са АИМ, док је изостао у подгрупи са НАП (Табела 13). Укупне тиол групе обухватају непротеинске и протеинске тиол групе. Концентрацији укупних тиол група значајно доприноси пораст непротеинских тиол група, јер нису утврђене значајне промене у концентрацији протеинских тиол група (резултати нису приказани).

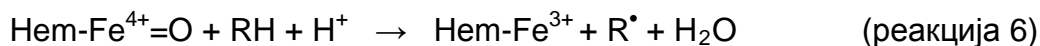
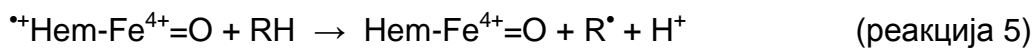
У нативној МПО, гвожђе хема је у тровалентном облику, а између њега и дисталног хистидина налази се молекул воде [117]. Након дифузије, на том месту се везује водоник-пероксид, који бива редукован до воде, а нативна МПО прелази у једињење I (реакција 1). У овој реакцији се преносе два електрона. Ова реакција се састоји од две полуреакције (реакција 2 и 3). Поред тога, и органски хидропероксиди [118] и хипохлорна киселина [119,120] могу да оксидују нативну МПО у једињење I. Хем гвожђе прелази у ферил облик, а само једињење I се може посматрати као облик ферил катјон радикала, у коме је кисеоник двоструком везом везан за гвожђе [121]. Једињење I се директно редукује у нативни ензим одузимањем два електрона од јона хлора при чему настаје хипохлорна киселина [122,123] (реакција 4). Реакције у којима учествују нативна МПО и једињење I заједно чине циклус хлоринације (халогенације).



Поред јона хлора у реакцијама халогенације могу учествовати и јони јода, брома и тиоцијаната (псеудохалогена реакција) и то по следећем редоследу на основу константе реакције другог реда: $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$ [120,124,125]. Међутим, на основу концентрације у неутрофилима и вредности стандардних редукционих потенцијала закључено је да тиоцијанати и јони хлора представљају супstrate за МПО *in vivo* [125]. Даље, претпоставља се постоји

конпетиција у везивању за дистални хистидин између јона хлора и водоник пероксида [117]. Реверзибилно везивање хлора за једињење I претходи настанку хипохлорне киселине [126]. Хлоринација таурина се дешава у реакцији са ензим везаном хипохлорном киселином [127].

Поред циклуса хлоринације, МПО пролази и кроз пероксидазни циклус у коме кроз две везане реакције једноелектронске редукције једињење I преко једињења II (реакција 5) прелази у нативну МПО (реакција 6).



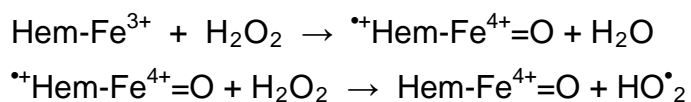
где RH означава донора електрона, а R[•] његов производ радикал.

Једињења која могу послужити као једноелектронски донори за једињење I и једињење II су тирозин [128], нитрити [129], тиоли [130], водоник пероксид [118] и друга једињења. Редослед реакција у којима се нативна МПО преводи преко једињења I и једињења II назад у нативни облик представља пероксидазни циклус (реакције 1,5 и 6). Овај циклус се може одвијати и у супротном смеру, што зависи од редокс равнотеже [131]. У истраживању Arnholda и сар. [132] утврђени су стандардни редукциони потенцијали редокс парова из пероксидазног циклуса МПО. Стандардни редукциони потенцијал редокс пара једињење I/нативна МПО је 1.16 V, и не мења се са променом концентрације МПО и водоник пероксида. Стандардни редукциони потенцијал редокс пара једињење II/нативна МПО износи 0.97 V. Одатле је израчунато да стандардни редукциони потенцијал редокс пара једињење I/једињење II износи 1.35 V.

У поменутиим реакцијама пероксидазног циклуса МПО као донор електрона могу послужити нитрити, који се оксидују у азот-диоксид (N₂O₄, NO[•]₂), који се у воденој средини разлаже на нитрате и нитрите. Реакција нитрита са једињењем I је два пута бржа од реакције са јонима хлора. Међутим, реакција са једињењем II је веома спора. И тирозин [128] је донор при чему прелази у тирозил радикал. Тирозил радикали реагују међусобно стварајући дитирозин. Реакција тирозина са једињењем I је два пута спорија од реакције са јонима хлора. Реакција са једињењем II се одвија довољно брзо да не захтева присуство косупстрата, чиме се затвара пероксидазни циклус. Релативно

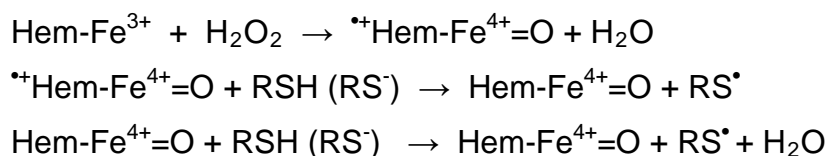
велика брзина реакције тирозина са једињењем I, наводи на испитивање да ли је ова реакција физиолошки релевантна *in vivo*. Заиста, потврђено је да тирозил радикали учествују у настанку унакрсних веза у протеинима [33], у иницијацији липидне пероксидације ЛДЛ [134] и модификацији ХДЛ [135]. Мерљиви продукт оксидације тирозина је дитирозин. За разлику од тирозина, нитрити при физиолошкој концентрацији не могу да редукују једињење II довољно брзо да би та реакција била физиолошки релевантна, па захтевају учешће косупстрата, најчешће тирозина. При повишеној концентрацији нитрита смањује се зависност од косупстрата, и одигравају МПО-посредоване реакције нитрације тирозил остатака [135], албумина [136] и ЛДЛ [137], под дејством NO[•]₂ (азот диоксид радикал).

Водоник пероксид и органски хидропероксиди [118,138] могу бити супстрати за једињења I и II .



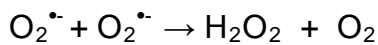
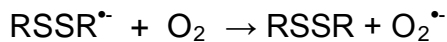
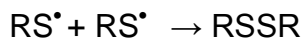
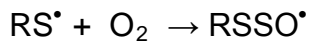
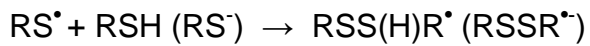
Органски хидропероксиди се разлажу дејством неутрофила и МПО на слободне радикале (пероксил и алкоксил радикали) [139]. Показано је да МПО [118] катализује разлагање хидропероксида на два начина. Прво, двоелектронском редукцијом преводи хидропероксиде у одговарајуће алкохоле, а сама се оксидује у једињење I. Даље одузимањем водоника, настаје пероксил радикал и једињење II. Реакције са једињењем II су споре и не могу бити физиолошки релевантне, па је за окончање пероксидазног циклуса потребно учешће косупстрата.

Тиоли [130] могу бити донори електрона за МПО у пероксидазном циклусу:



где су RSH-тиоли , RS⁻ -тиолат јон, и RS[•]-тилил радикал.

Тилил радикал у воденој средини учествује у комплексним повезаним реакцијама које нису катализоване ензимима (неензимске слободнорадикалске реакције), које имају за последицу оксидацију тиола удружену са потрошњом кисеоника, стварањем супероксид радикала и регенерисањем водоник пероксида [140].



Реакције глутатиона и цистеина са једињењем I су могуће, али знатно спорије (10-1000 пута) од реакције са јонима хлора, док реакција са једињењем II није могућа, и захтева присуство косупстрата- тирозина или аскорбата.

Из свега наведеног, проистиче да су супстрати који служе као донори електрона у пероксидазном циклусу МПО способни да редукују једињење I, али не и једињење II, за шта је потребно учешће косупстрата. Показало се да је аскорбат [141] најбољи косупстрат, који превођењем једињења II у нативну МПО подстиче хлоринишућу активност МПО, и то при концентрацијама које одговарају физиолошким у неутрофилима [142]. Наиме концентрација аскорбата у неутрофилима је око 0.7 mM. Неутрофили преузимају овај витамин у облику дехидроаскорбинске киселине промтно је редукујући у аскорбинску. Током фагоцитозе опада концентрација аскорбата, због оксидације у дехидроаскорбат, а тај пад је повезан са учешћем у ензимском циклусу МПО. Одржавање аскорбата у редукованом стању је физиолошка функција глутатиона [143]. Међутим, питање је да ли је активност редокс пара глутатион/дехидроаскорбинска киселина довољна да обнови и одржава ниво аскорбинске киселине у ћелији која је оптерећена оксидационим стресом [144]. Претпоставља се да је преузимање екстрацелуларне аскорбинске и дехидроаскорбинске киселине важан део ћелијског механизма који врши регулацију унутарћелијске концентрације аскорбата.

Што се тиче циклуса хлоринације у коме је главни производ хипохлорна киселина, показало се да иста настаје ван џепа у коме је смештен хем [145]. У

активном центру настаје непротонизована форма ОСГ, која се протонизује ван ензима у хипохлорну киселину. На тај начин се избегава оксидација хемијских група у активном центру и губитак активности МПО. Хлоринација таурина се одвија унутар самог ензима у реакцији са хлоринисаним једињењем I, или ван ензима под дејством хипохлорне киселине.

У нашем истраживању је утврђено да нема промена у пероксидазној активности МПО у лизату неутрофила болесника са АКС и подгрупама са АИМ и НАП, а да је истовремено присутан значајан пораст хлоринишуће активности МПО (Табеле 11 и 14). Као што је претходно речено, за испољавање хлоринишуће активности неопходно је редуктивно дејство аскорбата. Значајну улогу у одржавању аскорбата у редукованом стању има глутатион, кога у редукованом стању одржава глутатион редуктаза. Одатле, позитивна корелација хлоринишуће активности МПО са концентрацијом непротеинских тиола и активношћу НАДПХ-зависне Гред (Табела 25) говори у прилог постојања једне осовине редуктивних елемената која преноси редуктивни потенцијал НАДПХ, глутатиона и вероватно аскорбата на МПО, омогућавајући јој да испољи хлоринишућу активност. Са друге стране, значајна повезаност хлоринишуће активности МПО са активношћу супероксид дисмутазе и концентрацијом хлорамина (Табела 25), сведочи да СОД обезбеђује супстрат за активност МПО, а да су хлорамини производи те активности (Графикон 2).

У нашем истраживању је утврђен значајан пораст концентрације хлорамина у лизату неутрофила болесника са АКС (Табела 9) и подгрупама са АИМ и НАП (Табела 12), што је у вези са повећаном хлоринишућом активношћу МПО. Међу хлораминима постоје најмање три групе. N-хлорамини, деривати α -амино киселина (лизин) су релативно нестабилни и за неколико минута прелазе у алдехиде [146]. Хлорамини који су деривати β -амино киселина (таурин) су релативно стабилни [147], са полувременом живота од 18 сати [148]. Трећој групи припадају липофилни хлорамини (монохлорамин), који лако дифундују кроз ћелијску мембрану [149]. Нестабилни хлорамини делују на месту настанка, а остали на местима удаљеним од места настанка. Хлорамини имају мањи оксидативни потенцијал од хипохлорне киселине, али омогућавају њено продужено деловање. Посебну пажњу захтева таурин због релативно високе концентрације у неутрофилима од 10-30 mM [150]. Са обзиром на високу концентрацију у неутрофилима, можемо претпоставити да измерени хлорамини

углавном потичу од таурин хлорамина. У неутрофилима таурин има заштитну улогу, јер ублажава штетне ефекте хипохлорне киселине.

Најзначајнији предиктори концентрације хлорамина у лизату неутрофила болесника са АКС су били концентрација коњугованих диена и укупних тиол група (Табела 31). Позитивна повезаност са концентрацијом укупних тиол група је у супротности са показаним утицајем хлорамина [151] на оксидацију тиола у плазми у смислу смањења њихове концентрације. Редуктивни потенцијал укупних тиол група је значајан за настанак хлорамина. Укупне тиол групе су предиктори концентрације хлорамина у лизату неутрофила болесника са АКС. Треба поменути да је из статистичке анализе из модела мултипле регресије изостављена хлоринишућа активност МПО због високе корелације са хлорминима.

Неопходни услови за одигравање процеса липидне пероксидације су: присуство супстрата који се оксидише, слободних радикала, молекулског кисеоника, метала са променљивом валенцом, као и деловање антиоксидативних ензима, витамина и других антиоксиданаса важних за терминацију липидне пероксидације. У неутрофилима са одвија неензимска пероксидација уз аутооксидацију у присуству слободних радикала. Иницијатори липидне пероксидације су хидроксил радикал, перхидрокси радикал и тиоли, који одузимају атом водоника из метил групе која се налази у α положају у односу на двогубу везу, при чему настаје алкил радикал незасићене масне киселине. Његовим цепањем и унутармолекулским преуређивањем двогубих веза настају конјуговани диени. За даље одвијање липидне пероксидације потребно је присуство молекулског кисеоника. Наиме, у реакцији са молекулским кисеоником, конјуговани диени образују липидни пероксид, који даље адире водоник из суседне незасићене масне киселине стварајући липидни хидропероксид и нови алкил радикал. Тиме се омогућава пропација липидне пероксидације. Дакле, конјуговани диени представљају ране, примарне и нестабилне продукте липидне пероксидације и родитељске молекуле хидропероксида, секундарних продуката. Са друге стране, хидропероксиди могу настати и оксидативном модификацијом протеина реакцијом алдехидних продуката липидне пероксидације са тиол групама аминокиселина [152,153], као и дејством хидроксил радикала и синглет кисеоника на хистидин, тирозин и триптофан [154,155,156]. Сама метода за одређивање укупних хидропероксида

мери већ настале хидропероксида, као и количину супстрата која у реакцији са солима гвожђа доводи до настанка малондиалдехида. Резултати нашег истраживања показују пораст концентрације коњугованих диена у лизату неутрофила у групи болесника са акутним коронарним синдромом (Табела 9) и подгрупама са акутним инфарктом миокарда и нестабилном ангином пекторис (Табела 12). Истовремено, није дошло до значајних промена у концентрацији укупних хидропероксида. Пораст концентрације коњугованих диена је израз акутних промена насталих продукцијом слободних радикала у току активације неутрофила у АКС. Истовремени изостанак пораста концентрације укупних хидропероксида може се објаснити недостатком молекулског кисеоника у условима исхемије без кога се не може одиграти пропација липидне пероксидације, као и кратким временским интервалом који је протекао након активације неутрофила и продукције слободних радикала. Сматра се да у току активације неутрофила најмање 60% доступног молекулског кисеоника бива утрошено од стране НАДПХ оксидазе. Могуће је да у условима исхемије у АКС готово сав кисеоник бива усмерен ка оксидази, узимајући у обзир да неутрофили енергетске потребе подмирују анаеробном гликолизом.

Најзначајнији предсказатељ концентрације коњугованих диена у неутрофилима болесника са АКС је била активност супероксид дисмутазе у лизату (Табела 29). То говори у прилог прооксидантног дејства СОД. Улога СОД се огледа у превођењу супероксид анјон радикала у мање реактивни водоник пероксид. У условима пораста активности СОД нагомилава се водоник пероксид (59), који у милимоларној концентрацији може реаговати са бакром активног центра СОД преведећи купри у купро јон, који у Фентоновој реакцији ствара хидроксил радикал. Хидроксил радикал настао у активном центру може довести до оштећења ензима и отпуштања бакра, који се онда везује за површину ензима и изазива даље оштећење [157,158]. Исто дејство је показано и у истраживању Мирић [159] и сар. Даље, утврђена је негативна корелација СОД (Графикон 4) и коњугованих диена са годинама старости (Графикон), а позитивна са хиперлипидемијом у групи болесника са АКС. Gautam и сар. [160] су такође утврдили пад активности СОД повезан са старењем уз истовремени пораст интензитета липидне пероксидације исказан концентрацијом малонилдиалдехида. Истовремена повезаност СОД и коњугованих диена са старењем

говори у прилог да СОД испољава прооксидантно дејство независно од година старости болесника са АКС.

Хиперлипидемија представља један од фактора ризика за развој коронарне болести срца. Уочена је повезаност хиперлипидемије са оксидационим стресом, али тачан механизам није утврђен [161,162,163]. Такође, показан је појачан оксидативни метаболизам у неутрофилима код хиперлипидемичних пацијената [161]. Могуће је да повећано стварање супероксид радикала у условима хиперлипидемије и повећане активности СОД потенцира прооксидативно дејство СОД и повећава стварање коњугованих диена. Насупрот резултатима нашег истраживања Ефе и сар. су утврдили пад активности СОД и пораст интензитета липидне пероксидације, без значајне међусобне повезаности [164].

Други фактор који утиче на концентрацију коњугованих диена у АКС је концентрација хлорамина. Није нам позната реакција у којој директним дејством хлорамина настају коњуговани диени, али је познато да и коњуговани диени (24) и хлорамини (28) могу настати у реакцији са хипохлорном киселином, продуктом хлоринишуће активности МПО. Ако узмемо у обзир да је у нашем истраживању утврђена значајна корелација хлоринишуће активности МПО са једне стране, и хлорамина и коњугованих диена са друге стране, можемо закључити да је настанак коњугованих диена и хлорамина повезан са хлоринишућом активношћу МПО, а да је њихова међусобна веза случајна.

Иако је анализа утицаја појединих променљивих на концентрацију коњугованих диена у лизату неутрофила болесника са АКС у моделу мултипле регресије показала да концентрација непротеинских тиол група није међу најзначајним предикторима, не сме се занемарити интригантан резултат значајне корелације и просте линеарне регресије између непротеинских тиол група и коњугованих диена. Непротеинске тиол групе потичу највећим делом од глутатиона (90%) и цистеина, који је супстрат за синтезу глутатиона. Глутатион се сматра најзначајнијим интрацелуларним неензимским антиоксидансом, због улоге у заштити од реактивних кисеоничких врста [165]. У контексту резултата добијених у нашем истраживању размотрићемо његово прооксидантно дејство, као и цистеина. Од раније је познато да глутатион испољава прооксидациона својства не неколико начина: ензимским разлагањем на реактивне тиоле [166] и у процесу регенерације аскорбата индиректним превођењем фери у фери јон

[167]. У *in vitro* експерименту [168] испитивано је прооксидантно дејство глутатиона и цистеина у систему Fe^{2+} - индуковане липидне пероксидације, и антиоксидантно дејство истих у систему Fe^{2+} /аскорбат- индуковане липидне пероксидације. Глутатион није показао прооксидационо деловање, док је антиоксидационо било зависно од присуства глутатион пероксидазе. Цистеин није показао директно антиоксидационо дејство, што сугерише да у том смислу има значаја само као прекурсор у синтези глутатиона. Са друге стране, цистеин може имати директно прооксидационо дејство, што је или резултат стварања тилил радикала у току аутооксидације посредоване јонима гвожђа или директне редукције Fe^{3+} у Fe^{2+} . Прооксидантно дејство цистеина зависи од концентрације [168]. Изнад концентрације од 0.5 mM опада. Ова појава се може упоредити са двоструком улогом аскорбата у односу на процес липидне пероксидације. Наиме, при ниским концентрацијама аскорбат делује прооксидативно, а при високим антиоксидативно [169,170]. Показало се да однос $\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$ пресудан за инцијацију липидне пероксидације [171,172]. Висока концентрација аскорбата инхибира липидну пероксидацију одржавајући гвожђе у редукованом облику Fe^{2+} , спречавајући конверзију у Fe^{3+} , која претходи иницијацији липидне пероксидације [171]. Напоменимо да постоји преломна вредност за аскорбат (0.25 mM), при којој прооксидантна активност прелази у антиоксидантну. С обзиром да су докази о прооксидантном дејству глутатиона контрадикторни, и да смо у нашем истраживању одредили пораст концентрације непротеинских тиол група, чини се мало вероватним да глутатион подстиче процес липидне пероксидације. Друго могуће објашњење проистиче из способности продукта липидне пероксидације да инактивирају ГПох [173], услед чега се глутатион одржава у редукованом облику. У нашем истраживању је утврђен пад активности Гпох-1 у неутрофилима, мада не значајан, који је био у негативној корелацији са повишеном концентрацијом продукта липидне пероксидације у плазми. На крају, могуће је да пораст глутатиона као редуктивног еквивалента, индиректно преко аскорбата [142,143,144], погодује испољавању хлоринишуће активности МПО чији продукт хипохлорна киселина може утицати на липидну пероксидацију. У прилог вези непротеинских тиол група са хлоринишућом активношћу говори резултат међусобне корелације добијен у нашем истраживању.

Поређењем вредности променљивих у лизату неутрофила болесника са акутним инфарктом миокарда и нестабилном ангином пекторис, са једне стране, и здравих, са друге стране, добијене су исте промене као код акутног коронарног синдрома. Изостао је једино пораст концентрације укупних тиола код болесника са нестабилном ангином пекторис. То сугерише да промене у метаболизму слободних радикала не зависе од степена и трајања исхемије.

Кроз анализу добијених резултата се све време поставља питање постојања и утицаја редуктивног стреса на вредности променљивих у лизату неутрофила испитиваних болесника. Не постоји прецизна дефиниција редуктивног стреса. Редуктивни стрес се повезује са стањима у којима статус ћелије или њених компартмана постаје релативно редукован, у смислу доминације редуктивних над оксидованим еквивалентима. Може се посматрати кроз однос редокс парова: глутатион/глутатион дисулфид, НАД(П)Х/НАД(П), лактат/пируват, β -хидроксибутират/ацетоацетат, аскорбат/дехидроаскорбат. Повећање овог односа или самих редукованих елемената би означавало редуктивни стрес. Главни узрок настанка редуктивног стреса је недостатак кисеоника (хипоксија, исхемија). Недостатак кисеоника као терминалног акцептора електрона у митохондријама доводи до нагомилавања редукованих кофактора (НАДХ, НАДПХ) и оксидованих супстрата. У остатку ћелије, истовремено наступа утршак АТП-а. Гликолиза може надоместити губитак АТП-а (у краћем временском периоду), али уз настанак нових редукованих еквивалената. Интензитет редуктивног стреса би зависио од гликолитичког капацитета ћелија. Непознато је како редуктивни стрес утиче на стварање слободних радикала и редокс регулацију путева трансдукције сигнала, од којих зависе виталност и физиолошке функције ћелије. До сада је једино утврђена улога редуктивног стреса у развоју кардиомиопатије у експерименту са мишевима [174]. У другом истраживању [175] у коме су испитаници били изложени ексцентричном вежбању (извођење покрета који доводе до оштећења мишића) утврђен је оксидациони стрес у целој групи. Међутим, издвојена је подгрупа у којој доминира редуктивни стрес, што сугерише значај индивидуалног реаговања на подвргавање физичком стресу. У нашем истраживању предмет испитивања су биле промене у метаболизму слободних радикала у неутрофилима код болесника са АКС. АКС карактерише исхемија праћена реперфузијом. Неутрофили су ћелије са малим бројем митохондрија

које немају улогу у стварању енергије. Енергетске потребе подмирују на рачун гликолизе. Поред гликолизе у њима се одвија и хексозо-монофосфатни шант, у коме је активност ензима глукозо-6-фосфат дехидрогеназа и 6-фосфоглуконат дехидрогеназа извор редуктивних еквивалената (НАДПХ). У току активације неутрофила у АКС, у условима исхемије нагомилавају се редуктивни елементи. У току исхемије и/или реперфузије (реоксигенације) активирана НАДПХ-зависна оксидаза производи супероксид анјон радикале који се спонтаном и ензимски катализованом (СОД) дисмутацијом превде у водоник пероксид који метаболише у највећој мери МПО, о чему сведочи позитивна корелација активности два ензима. Са друге стране, нагомилава се други редуктивни еквивалент глутатион. У нашем истраживању је утврђен двоструки пораст концентрације глутатиона, у условима непромењене активности глутатион редуктазе. Глутататион редуктаза захтева присуство НАДПХ за испољавање своје активности. Можемо претпоставити да се већина НАДПХ усмерава ка мембранској оксидази, због чега изостаје пораст активности Гред. Пораст непротеинских тиола се може објаснити вероватним повећањем синтезе глутатиона у шта немамо увид, или повећаном активношћу Гред која је претходила активацији неутрофила. Повезаност активности Гред и непротеинских тиол група, са једне стране, и хлоринишуће активности МПО, са друге стране, добијена у нашем истраживању, говори у прилог преносу редуктивног стреса (потенцијала) са НАДПХ преко Гред на глутатион. Спону између глутатиона и МПО вероватно чини аскорбинска киселина, још један редуктивни еквивалент, која је неопходна за испољавање хлоринишуће активности МПО. На тај начин, у условима редуктивног стреса, у активираним неутрофилима обезбеђује се супстрат за активност ензима, и потенцира хлоринишућа активност. Истовремено СОД и таурин штите неутрофиле од штетног дејства слободних радикала и реактивних врста (хипохлорна киселина), сводећи ниво оксидационог ошећења на настанак конјугованих диена, са чијим су стварањем повезани (прооксидативно дејство). Можемо закључити да је редуктивни стрес неопходан за метаболисање реактивних врста кисеоника и хлора.

Осим у неутрофилима, праћене су и промене продуката оксидативне модификације, прооксиданаса и појединих елемената антиоксидантне заштите

крвне плазме изазване АКС. Улога антиоксидативне заштите плазме огледа се у заштити површине ћелија са којима је у контакту (ендотелне ћелије), као и једињења која су саставни део водене и липидне фазе (липопротеини), од оштећења изазваних деловањем реактивних форми. Главни чиниоци антиоксидативне заштите плазме су укупни тиоли, аскорбат као и ензими екстрацелуларна СОД и Гпох-3.

Укупне тиол групе плазме потичу највећим делом од албумина [176]. Наиме, албумин садржи слободну $-SH$ групу цистеина у положају 34, и доприноси концентрацији укупних тиола у плазми до $500 \mu M/l$. Реагује брзо са $ONOO^-$, NO^*_2 , $HOCl$, ROO^* и RO^* , а споро са H_2O_2 .

У нашем истраживању је утврђено да нема промена у концентрацији укупних тиол група у плазми болесника са АКС и подгрупама са АИМ и НАП (Табеле 16 и 20). Поред тога, у плазми болесника са АКС утврђена је повезаност концентрације укупних тиола са концентрацијом коњугованих диена, укупних хидропероксида, АОПП, хлорамина и пероксидазном активношћу МПО (Табела 28). Ова повезаност указује на активацију антиоксидативне заштите везане за тиоле у условима повећаног оксидационог стреса, која је довољна тек да задржи ниво тиола на сличним вредностима као у контролној групи здравих. Утврђен је значајан пад концентрације укупних тиол група у плазми са порастом година старости болесника са АКС (Табела 26) и у контролној групи (Графикон 9). То је у сагласности са резултатима истраживања Rossi-а и сар. [177] што је у њиховом раду повезано са измереним повећаним стварањем дисулфида са цистеином и хомоцистеином у току старења. Утврђена је позитивна корелација тиола са присуством хиперлипидемије (Табела 27).

Главнину екстрацелуларне супероксид дизмутазе (ЕЦ-СОД) стварају и секретују у екстрацелуларну средину фибробласти и глатке мишићне ћелије [178]. ЕЦ-СОД се везује за хепарин-сулфат протеогликане и гликозаминогликане на површини ендотелних ћелија. ЕЦ-СОД везана за површину ендотелних ћелија представља примарни извор плазма ЕЦ-СОД [179]. Наиме, показано је да се ЕЦ-СОД секвестрира између површине ендотелних ћелија и плазме [180]. 97-98% се везује за површину ендотелних ћелија, а преосталих 2-3% се налази у плазми, при чему је утврђено да је полувреме живота СОД око 20 сати. У томе се разликује од цитосолне форме чији је полуживот кратак и која се веома брзо елиминише путем бубрега. У

условима реперфузије ЕЦ-СОД се ослобађа у циркулацију, а у року од 2 часа тек 50% бива поново везано за ендотел. На ослобађање ЕЦ-СОД утиче давање хепарина, који изазива нагли пораст ЕЦ-СОД у плазми која се враћа на почетне вредности тек након 300 минута [181]. ЕЦ-СОД на површини ендотелних ћелија штити од прекомерне продукције супероксид анјон радикала и спречава настанак пероксинитрита, одржавајући на тај начин ниво азот монооксида [182]. Такође, има у улогу у превенцији оксидације ЛДЛ [183].

У нашем истраживању је утврђен пад активности СОД у плазми болесника са АКС (Табела 16) и подгрупама са АИМ и НАП (Табела 20). Пад активности СОД се најчешће повезује са прекомерном продукцијом водоник пероксида који променом валенце бакра из активног центра ствара услове за настанак хидроксил радикала који оштећују ензим [59,157,158]. Пад активности СОД у плазми рефлектује и пад активности фракције везане за зид крвног суда. Болесницима са АКС, код којих је хепарин био саставни део терапије, крв је узимана пре његовог давања.

Гпох-3 је једина глутатион пероксидаза присутна у плазми. Ствара се највећим делом у бубрезима [184]. Редукује органске хидропероксиде у одговарајуће алкоhole, али и водоник-пероксид до воде. Издвојена је из липидне фракције плазме. Bjornstedt и сар. [185] су показали да је за испољавање активности глутатион пероксидазе-3 потребна концентрација глутатиона већа од 1 mM/L, што је знатно више од концентрације у плазми која варира 4-20 μ M/L [186]. Као алтернатива глутатиону, разматрана је улога тиоредоксина као кофактора Гпох-3 при концентрацијама 2.5-5 μ M/L, да би касније било утврђено да његова физиолошка концентрација у плазми није већа од 38 nM/L [187]. Ови резултати су створили недоумицу у вези физиолошке улоге Гпох-3 у разградњи хидропероксида. Касније су Chen и сар. [188] утврдили да је дошло до грешке услед употребе неадекватног пуфера, и да Гпох-3 испољава активност при физиолошким концентрацијама глутатиона у плазми, што показује да је он највероватнији кофактор у реакцији. Vuijsse и сар. су утврдили да је повећан морталитет код кардиоваскуларних обољења са ниском активношћу Гпох-3 у серуму [189].

У нашем истраживању је утврђен значајан пораст активности Гпох-3 у плазми болесника са АКС (Табела 16) и подгрупама са АИМ и НАП (Табела 20).

Такође, утврђена је значајна повезаност активности Гпох-3 са присуством хиперлипидемије (Табела 27) и концентрацијом укупних хидропероксида и коњугованих диена у плазми болесника са АКС (Табела 28). То сугерише да до пораста активности Гпох-3 долази у склопу одговора на повећан интензитет липидне пероксидације.

Ксантин оксидаза у плазми потиче највећим делом из ендотелних ћелија капилара јетре [190]. Она се реверзибилно везује са спољашње стране мембране ендотелних ћелија преко сулфатисаних гликозаминогликанских рецептора. Давање хепарина у терапијске сврхе доводи од отпуштања ензима у крвоток услед конкуренције за рецепторе на ендотелу. Постоји у две форме, од којих ксантин оксидазна редукује молекулски кисеоник и ствара супероксид анјон радикал и водоник пероксид. Конверзија ксантин дехидрогеназе у оксидазу наступа услед оксидације тиола, у условима исхемије, и ограниченom протеолизом дејством ткивних протеаза које могу потицати и из неутрофила. Сматра се да има улогу у исхемијско-реперфузионом оштећењу органа [191].

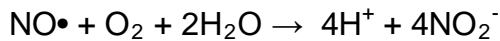
У нашем истраживању је утврђено да не постоје значајне промене у активности ксантин оксидазе у плазми болесника са АКС (Табела 18) и подгрупама са АИМ и НАП (Табела 22). Активност ксантин оксидазе мерена је узорцима узетим пре давања хепарина болесницима код којих је био саставни део терапије, тако да нисмо имали увид у укупну активност. Као што је претходно објашњено, хепарин ослобађа ксантин оксидазу у циркулацију. У литератури нема података у којој мери активност ксантин оксидазе у плазми одражава активност ензима у зиду крвног суда. Даље, утврђена је негативна корелација активности ксантин оксидазе у плазми болесника са АКС са концентрацијом нитрита/нитрата (Табела 28). Супероксид анјон радикал, продукт ксантин оксидазе, реагује са азот моноксидом стварајући пероксинитрит, услед чега се смањује његова биолошка расположивост.

У нашем истраживању је утврђен значајан пораст пероксидазне активности МПО у плазми, без промена у хлоринишућој активности МПО у плазми болесника са АКС (Табела 17) и подгрупама са АИМ и НАП (Табела 21). Истовремено је утврђена значајна повезаност пероксидазне активности МПО са концентрацијом АОПП у плазми болесника са АКС (Табела 28). Повећаном оксидацијом тирозина дејством МПО повећава се настанак дитирозина [28] који доприноси порасту концентрације АОПП.

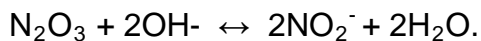
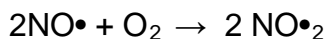
Концентрација хлорамина у плазми је значајно повећана код болесника са АКС (Табела 15) и подгрупама са АИМ и НАП (Табела 19). Најзначајнији предиктор концентрације хлорамина у плазми болесника са АКС је концентрација нитрита/нитрата у плазми (Табела 34). Пораст хлорамина у плазми највероватније потиче од таурин хлорамина створених од стране неутрофила.

Азот моноксид, $\text{NO}\bullet$, настаје каталитичким дејством синтазе азот монооксида (НОС) на супстрат аргинин у присуству молекулског кисеоника и NADPH. Постоје три изоформе синтазе: НОС-1 или неуронална, НОС-2 или индуцибилна, и НОС-3 или ендотелна. НОС-1 и НОС-3 су конститутивне и одликује их континуирано стварање малих количина $\text{NO}\bullet$, и то до 1 μM у кардиоваскуларном систему (ендотелне ћелије) које омогућавају испољавање физиолошких ефеката. Индуцибилна НОС присутна у макрофагима, неутрофилима и епителним ћелијама, способна је да генерише 10 пута веће количине азот монооксида, али само у склопу имуног одговора. Висока концентрација $\text{NO}\bullet$ делује цитотоксично [192].

Оксидацијом $\text{NO}\bullet$ у воденим растворима настају нитрити (NO_2^-) у реакцији



која представља суму реакција



$\text{NO}\bullet_2$ -азот диоксид радикал је реактивнији од азот монооксида. Реакција $\text{NO}\bullet$ и O_2 се брже одвија у хидрофобној средини, у унутрашњости мембрана и липопротеинима [193,194,195].

Азот моноксид је слабо реагује са већином биолошких молекула, нпр. Да би са тиолима да би створио нитрозотиоле, мора најпре да се преведе у пероксинитрит или азот-диоксид радикал. Брзо реагује са другим слободним радикалима: хидроксил радикалом, пероксил радикалом, тилилом и тирозином [194,196,197].

Штетно дејство $\text{NO}\bullet$ остварује преко пероксинитрита (ONOO^-) који настаје у реакцији $\text{NO}\bullet$ и $\text{O}_2^{\bullet-}$, која је за цео ред величине бржа од реакције дизмутације супероксид анјона катализоване СОД [198,199]. Пероксинитрит реагује са тирозином стварајући 3-нитротирозин. На стварање нитротирозина

утиче МПО, чији продукт хипохлорна киселина реагује са $\text{NO}_2\cdot$ при чему настаје нитрил хлорид (NO_2Cl) [200], нитрирајући агенс. Сам $\text{NO}\cdot$ може инхибирати индуцибилну НОС, а инхибицију отклања МПО уклањањем $\text{NO}\cdot$ реакцијом у којој настаје нитрил хлорид [201], потенцирајући на тај начин деловање иНОС.

Полувреме живота $\text{NO}\cdot$ у крвној плазми је око 1 секунд, нитрита 110 секунди, а нитрата 5-8 сати [202]. Концентрација нитрата у плазми је око 30 $\mu\text{M/L}$, а нитрита 0.15-1 $\mu\text{M/L}$ и сматра се да одражава краткорочну ендотелну синтезу $\text{NO}\cdot$ [203,204,205,206]. Нитрати се излучују путем урина. Оксихемоглобин оксидује нитрите у нитрате, а деоксихемоглобин редукује нитрите у азот моноксид у условима пада парцијалног притиска кисеоника изазивајући вазодилатацију. И ксантин дехидрогеназа врши конверзију нитрита у азот моноксид. Нитрити делују и као скевенџери хипохлорне киселине [207], па се не могу посматрати само као завршни продукти оксидације азот монооксида.

У групи болесника са АКС (Табела 18) и подгрупама са АИМ и НАП (Табела 22) утврђен је значајан пораст концентрације нитрита/нитрата у плазми, што говори у прилог повећаног стварања азот монооксида највероватније услед индукције иНОС. Негативна корелација нитрита/нитрата са ксантин оксидазом (Табела 28) показује индиректно настанак пероксинитрита у реакцији $\text{NO}\cdot$ са супероксидом. И други истраживачи су добили сличне резултате. У експерименталном моделу инфаркта миокарда Akiyama и сар. [208] су утврдили значајан пораст, а Sanchez и сар. [209] су показали повећану продукцију $\text{NO}\cdot$ у неутрофилима болесника са АКС. Djordjevic и сар. [210] су утврдили пораст нитрита/нитрата у плазми болесника са НАП.

У нашем истраживању је утврђен пораст концентрације коњугованих диена у плазми болесника са АКС (Табела 15) и подгрупама са АИМ и НАП (Табела 19). У групи болесника са АКС пораст концентрације коњугованих диена је био повезан са присуством хиперлипидемије (Табела 27). Најзначајнији предиктор концентрације коњугованих диена у плазми болесника са АКС је била концентрација АОПП у плазми и присуство хиперлипидемије (Табела 32). Такође, утврђен је пораст концентрације укупних хидропероксида у плазми болесника са АКС (Табела 15) и подгрупама са АИМ и НАП (Табела 19). У групи болесника са АКС био је значајно повезан са присуством хиперлипидемије (Табела 27). Најзначајнији предиктор концентрације укупних

хидропероксида у плазми болесника са АКС била је концентрација нитрита/нитрата у плазми и присуство хиперлипидемије (Табела 33). Наведени подаци говоре да је повећан интензитет липидне пероксидације у плазми у АКС у великој мери повезан са хиперлипидемијом. Тачан механизам повезаности хиперлипидемије са оксидационим стресом није познат. Зависност липидне пероксидације од АОПП, продуката оксидације протеина, је нејасна, али потврђује да се процеси оксидације различитих група једињења (липиди, протеини) не могу посматрати одвојено.

Узнапредовали оксидациони продукти протеина (АОПП) су најпре представљени као нови маркер оксидационог стреса код пацијената на хемодијализи. Утврђено је да настају у реакцијама катализованим мијелопероксидазом. Спектралне карактеристике АОПП одговарају садржају дитиروزина, карбонила и пентозидина. Није утврђено присуство нитротирозина. АОПП потичу од оксидационо измењеног албумина. МПО ствара дитиروزине пероксидазном активношћу, а хлорамине хлоринишућом активношћу. Нестабилни хлорамини албумина прелазе преко алдехида у карбониле. АОПП представљају резултат оксидационог стреса изазваног МПО [211].

Утврђен је значајан пораст концентрације АОПП у плазми болесника са АКС (Табела 15) и подгрупама са АИМ и НАП (Табела 19). Пораст АОПП у АКС је, такође, утврђен у истраживању Скварилове [212] и сар. Утврђена је позитивна корелација концентрације АОПП у плазми болесника са АКС са присуством хиперлипидемијом (Табела 27). Такође, је утврђена значајна корелација са хлораминим у плазми. Најзначајнији предиктори концентрације АОПП у плазми болесника са АКС (Табела 35) су концентрација коњугованих диена и укупних тиола у плазми и пероксидазна активност МПО, као и присуство артеријске хипертензије. Пораст АОПП показује да у плазми постоји повећани оксидациони стрес који води порекло од активности МПО. Томе у прилог говори зависност вредности АОПП од пероксидазне активности МПО, као и повезаност са хлораминима. Могуће је да утицај тиола, с обзиром да већином потичу од албумина, на АОПП индиректно одражава зависност АОПП од концентрације албумина. Baskol и сар. [213]. су у студији са болесницима са реуматоидним артритисом добили сличне корелације АОПП, тиола, пероксидазне активности МПО и маркера липидне пероксидације. Хи и сар. [214] су показали у студији пацијената на перитонеалној дијализи да артеријска

хипертензија има утицај на повећање оксидативне модификације протеина, и обрнуто да оксидативни стрес има улогу у њеној патогенези.

7. ЗАКЉУЧЦИ

Метаболизам супероксид анјон радикала и водоник пероксида у неутрофилима у акутном коронарном синдрому одвија се уз учешће и садејство ензима супероксид дизмутазе и мијелопероксидазе:

- активност супероксид дизмутазе и хлоринишућа активност мијелопероксидазе је већа у неутрофилима у акутном коронарном синдрому;
- активност супероксид дизмутазе и хлоринишућа активност мијелопероксидазе су значајно повезане у неутрофилима у акутном коронарном синдрому;
- нема промена у активности глутатион пероксидазе и каталазе у неутрофилима у акутном коронарном синдрому.

Хлорамини су главни продукти у метаболизму реактивних врста хлора у неутрофилима у акутном коронарном синдрому и настају хлоринишућом активношћу мијелопероксидазе:

- концентрација хлорамина је повећана у неутрофилима у акутном коронарном синдрому;
- концентрација хлорамина и хлоринишућа активност мијелопероксидазе су значајно повезане у неутрофилима у акутном коронарном синдрому.

Редуктивни стрес је неопходан да би се испољила хлоринишућа активност мијелопероксидазе у неутрофилима у акутном коронарном синдрому:

- концентрација непротеинских и укупних тиола је већа у неутрофилима у акутном коронарном синдрому;
- концентрација непротеинских тиола и хлоринишућа активност мијелопероксидазе су значајно повезане у неутрофилима у акутном коронарном синдрому,
- активност глутатион редуктазе и хлоринишућа активност мијелопероксидазе су значајно повезане у неутрофилима у акутном коронарном синдрому.

Липидна пероксидација у неутрофилима у акутном коронарном синдрому је акутног карактера и настаје прооксидационим дејством супероксид дизмутазе:

- концентрација коњугованих диена је већа у неутрофилима у акутном коронарном синдрому;
- нема значајних промена у концентрацији укупних хидропероксида у неутрофилима у акутном коронарном синдрому;
- утврђен је значајан утицај пораста активности супероксид дизмутазе на концентрацију коњугованих диена у неутрофилима у АКС.

Степен и трајање исхемије у акутном коронарном синдрому не утичу на метаболизам реактивних форми кисеоника и хлора у неутрофилима:

- није утврђена разлика у вредностима испитиваних променљивих у неутрофилима између акутног инфаркта миокарда и нестабилне ангине.

Интензитет оксидационог стреса у плазми акутном коронарном синдрому је висок и испољава се повећаном оксидационом модификацијом липида и протеина:

- концентрација коњугованих диена је већа у плазми у акутном коронарном синдрому;
- концентрација укупних хидропероксида је већа у плазми у акутном коронарном синдрому;
- концентрација унапредовалих оксидационих продуката протеина је већа у плазми у акутном коронарном синдрому.

Хиперлипидемија утиче на интензитет оксидационог стреса:

- утврђен је значајан утицај присуства хиперлипидемије на пораст концентрације коњугованих диена у плазми у акутном коронарном синдрому;
- утврђена је значајна повезаност присуства хиперлипидемије са порастом концентрације укупних хидропероксида и унапредовалих оксидационих продуката протеина у плазми у акутном коронарном синдрому.

Ниво антиоксидационе заштите је недовољан да би спречио оксидациону модификацију липида и протеина у плазми у акутном коронарном синдрому и представља слаб одговор на повећани оксидациони стрес:

- активност супероксид дизмутазе је мања у плазми у акутном коронарном синдрому;
- нема промена у концентрацији укупних тиола у плазми у акутном коронарном синдрому;
- активност глутатион пероксидазе-3 је већа у плазми у акутном коронарном синдрому;
- концентрација коњугованих диена, укупних хидропероксида и унапредовалих оксидационих продуката протеина је већа у плазми у акутном коронарном синдрому;
- утврђена је повезаност концентрације укупних тиола са концентрацијом коњугованих диена, укупних хидропероксида, унапредовалих оксидационих продуката протеина и пероксидазном активношћу мијелопероксидазе у плазми у акутном коронарном синдрому;
- утврђена је значајна повезаност активности глутатион пероксидазе-3 са концентрацијом укупних хидропероксида и коњугованих диена у плазми у акутном коронарном синдрому.

Унапредовали оксидациони продукти протеина у плазми у акутном коронарном синдрому представљају показатељ оксидационог стреса који води порекло од активности мијелопероксидазе:

- концентрација унапредовалих оксидационих продуката протеина и пероксидазна активност мијелопероксидазе су већи у плазми у акутном коронарном синдрому;
- утврђен је значајан утицај пероксидазне активности мијелопероксидазе на концентрацију унапредовалих оксидационих продуката протеина у плазми у акутном коронарном синдрому;
- утврђена је значајна повезаност концентрације унапредовалих оксидационих продуката протеина и концентрације хлорамина у плазми у акутном коронарном синдрому.

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Doeing DC, Borowicz JL, Crockett ET. Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. *BMC Clin Pathol* 2003; 3: 3.
2. Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol* 2004; 172: 2731–2738.
3. Pillay J, et al. In vivo labeling with $^2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 2010; 116: 625–627.
4. Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature Immunol* 2011; 12: 1035–1044.
5. Ussov WY, Aktolun C, Myers MJ, Jamar F, Peters AM. Granulocyte margination in bone marrow: comparison with margination in the spleen and liver. *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55: 87–96.
6. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010; 33: 657–670.
7. Hager M, Cowlan JB, Borregaard N. Neutrophil granules in health and disease. *J. Intern Med* 2010; 268: 25–34.
8. Crawford N, Eggleton P. Dynamic changes in neutrophil cytoskeleton during priming and subsequent surface stimulated functions. *Biochem Soc Trans* 1991; 19: 1048-55.
9. Hallett MB, Lloyds D. Neutrophil priming: the cellular signals that say ‘amber’ but not ‘green’. *Immunol Today* 1995;16:264–8.
10. Bender JG, McPhail LC, van Epps DE. Exposure of human neutrophils to chemotactic factors potentiates activation of the respiratory burst enzyme. *J Immunol* 1983; 130: 2316-23.
11. Edwards SW, Holden CS, Humphreys JM, Hart CA. Granulocytemacrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) primes the respiratory burst and stimulates protein biosynthesis in human neutrophils. *FEBS Lett* 1989; 256: 62-6.
12. Beaulieu AD, Lang F, Belles-Isles, M, Poubelle P. Protein biosynthetic activity of polymorphonuclear leukocytes in inflammatory arthropathies: Increased synthesis and release of fibronectin. *J Rheumatol* 1987; 14: 656-61.

13. Hughes V, Humphreys JM, Edwards SW. Protein synthesis is activated in primed neutrophils: a possible role in inflammation. *Biosci Rep* 1987; 7: 881-9.
14. Halliwell B, Gutteridge MC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984; 219: 157-171.
15. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transaction* 2007; 35: 1147-50.
16. Winterbourn CC, Kettle AJ. Radical-radical reactions of $O_2^{\bullet-}$: a potential route to toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305:729.
17. Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of Allopurinol. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 87-114.
18. Singh A. Chemical and biochemical aspects of superoxide radicals and related species of activated oxygen. *J physiol Pharmacol* 1982; 60: 1330-45.
19. McCord JM. The superoxide free radical: its biochemistry and pathophysiology. *Surgery* 1983; 94: 412-14.
20. Rowley DA, Halliwell B. Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of copper salts: a pathophysiology significant reaction? *Arch Biochem Biophys* 1983; 225: 279-84.
21. Packer J, Slater T, Wilson R. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 1979; 278: 733-38.
22. Lipinski B. Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2011. Doi: 10.1155/2011/809696.
23. Nesmeyanov AN, Nesmeyanov NA. Free-radical chain reactions. U *Fundamentals of organic chemistry, Vol.4* Mir Publishers, Moscow, 1981.
24. Peskin AV, Winterbourn CC. Histamine chloramine reactivity with thiol compounds, ascorbate and methionine and with intracellular GSH. *Free Rad Biol Med* 2003; 35:1252.
25. Weiss SJ. Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand* 1986; 548: 9-37.
26. Schraufstatter IU et al. Mechanisms of OCl^- injury to target cells. *J Clin Invest* 1990; 85:554.
27. Winterbourn CC, Kettle AJ. Biomarkers of MPO-derived HOCl. *Free Rad Biol Med* 2000; 29: 403.
28. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *NEJM* 1989; 320: 365.

29. Moreno JJ, Pryor WA. Inactivation of α_1P inhibitor by $ONOO^-$. *Chem Res Toxicol* 1992; 5:425.
30. Glaser CB et al. Oxidation of a specific methionine in thrombomodulin by activated neutrophil products blocks cofactor activity. *J Clin Invest* 1992; 90: 2565.
31. Spencer JP et al. NO_2^- -induced deamination and OCl^- -induced oxidation of DNA in intact human respiratory tract epithelial cells. *Free Rad Biol Med* 2000; 28:1039.
32. Hawkins CL et al. $O_2^{\bullet-}$ can act synergistically with OCl^- to induce damage to proteins. *FEBS Lett* 2002; 510:41.
33. Whiteman M et al. Nitrite-mediated protection against $HOCl$ -induced chondrocyte toxicity. A novel cytoprotective role of NO^\bullet in the inflamed joint? *Arth Rheum* 2003; 48: 3140.
34. Hawkins CL, Pattison DI, Davies MJ. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids* 2003; 25: 259-74.
35. Slater TF. Free-radical mechanism in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222: 1-15.
36. Zhao T, Bokoch GM. Critical role of prolin-rich tyrosine kinase-2 in reversion of the adhesion-mediated suppression of ROS generation by human neutrophils. *J Immunol* 2005; 174: 8049.
37. Hampton MB, et al. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, MPO, and bacterial killing. *Blood* 1998; 92: 3007.
38. Learn DB, et al. Taurine and hypotaurine content of human leukocytes. *J Leuk Biol* 1990; 48: 174.
39. Halliwell B. The antioxidant paradox. *Lancet* 2000; 355:1179-80.
40. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 715S-25S.
41. Đorđević V, Pavlović D, Kocić G. *Biohemija slobodnih radikala* 2000. Medicinski fakultet Niš.
42. Stadtman ER, Berlett BS. Free-radical-mediated modification of proteins. *Free Rad Toxicol* 1997; 71-87.
43. Vaughan M. Oxidative Modification of Macromolecules. *J Biol Chem* 1997; 272 (30): 18513-517.
44. Basu S. Lipid peroxidation: a linkage between non-enzymatic and enzymatic oxidation. *Toxicology* 2003; 189: 113-127.
45. Wheatley RA. Some recent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation. *Trends in Anal Chem* 2000; 19(10):617-628.

46. Halliwell B, Gutteridge JMC. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. *FEBS Lett* 1992; 307: 108-112.
47. Yin H, Morrow JD, Porter NA. Identification of a novel class of endoperoxides from arachidonate autoxidation. *J Biol Chem* 2004; 279(5): 3766-76.
48. Stadtman ER. Covalent Modification Reactions Are Marking Steps in Protein Turnover. *Biochem* 1990; 29(27): 6223-6331.
49. Halliwell B. Free radicals and antioxidants. *Nutr Rev* 1994; 52: 253-265.
50. Milne GL, Porter NA. Separation and identification of phospholipid peroxidation products. *Lipids* 2001; 36(11): 1265-75.
51. Gil P, Farinas F, Casado A, Lopez-Fernandez E. Malondialdehyde: A possible Marker of Ageing. *Gerontology* 2002; 48: 209-214.
52. Stadtman ER. Role of oxidant species in aging. *Curr Med Chem* 2004; 11:1105.
53. Davies MJ. The oxidant environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1703: 93.
54. Jones CM. EPR spin trapping investigation into the kinetics of GSH oxidation by $O_2^{\bullet-}$: re-evaluation of the rate constant. *Free Rad Biol Med* 2002; 32: 982.
55. Taylor SW et al. Oxidative post-translational modification of tryptophan residues in cardiac mitochondrial proteins. *J Biol Chem* 2003; 278: 195587.
56. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247(10): 3170-5.
57. Oury TD, Day BJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest* 1996; 75: 615-636.
58. Cruickshanks KJ, Klein BEK, Klein R. Ultraviolet light exposure and lens opacities: the Beaver Dam Eye Study. *Am J Pub Health* 1992; 82: 1658-47.
59. Ramirez DC et al. Mechanisms of H_2O_2 -induced CuZnSOD-centered radical formation as explored by immuno-spin trapping: the role of Cu- and $CO_3^{\bullet-}$ - mediated oxidation. *Free Rad Biol Med* 2005; 38: 201.
60. Vetrano AM, Heck DE, Mariano ThM, Mishin V, Laskin DL, Laskin JD. Characterization of the Oxidase Activity in Mammalian Catalase. *J Biol Chem* 2005; 280(42): 35372-381.
61. Esworthy RS, Chu FF, Geiger P, Girotti AW, Doroshow JH. Reactivity of plasma glutathione peroxidase with hydroperoxide substrates and glutathione. *Arch Biochem Biophys* 1993; 307: 29-34.

62. Yamamoto Y, Takahashi K. Glutathione peroxidase isolated from plasma reduces phospholipid hydroperoxides. *Arch Biochem Biophys* 1993; 305: 541-545.
63. Yu H, Liu J, Lui X, Zang T, Luo G, Shen J. Kinetic studies on the glutathione peroxidase, activity of selenium – containing glutathione transferase. *Compar Biochem and Physiol* 2005; 141: 382-389.
64. Imai H, Nakagawa Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* 2003; 34(2): 146-
65. Komives T, Gullner G, Kiraly Z. Role of Glutathione and Glutathione-Related Enzymes in Response of Plants to Environmental Stress. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 851(1): 251-258.
66. Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Rad Res* 1999; 31(4): 273-300.
67. Kretzschmar M. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Exp Toxicol Pathol* 1996; 48: 439-446.
68. Rhee SG et al. Controlled elimination of H₂O₂: regulation of peroxiredoxin, catalase and GSH peroxidase via post-translational modification. *Antiox Redox Signal* 2005; 7: 619.
69. Nozaik-Grayck E, Suliman HB, Piantadosi CA. Extracellular superoxide dismutase. *Intern J of Biochem & Cell Biol* 2005; 37: 2466-2471.
70. Lookene A, Stenlund P, Tibell LA. Characterization of heparin binding of human extracellular superoxide dismutase. *Biochem* 2000; 39: 230-236.
71. Bertrand ME, Simoons ML, Fox KA, et al. Management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J* 2002; 23: 1809-1840.
72. Van der Werf F, Ardissino D, Betriu A, et al. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J* 2003; 24: 28-66.
73. Hamm CW, Braunwald E. A classification of unstable angina revisited. *Circulation* 2000; 102: 118-122.
74. The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee. Myocardial infarction redefined – a consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2000; 21: 1502-1513.

75. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler M. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001; 89: e1-e7.
76. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 21: suppl 97:77.
77. English D, Andersen BR. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradient of ficoll-hypaque. *J Immunol Methods* 1974; 5:249.
78. Lowry OH, Rosebrough NJ, Faar AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-270.
79. Recknagel RO, Glende EA JR. Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. *Methods Enzymol* 1984; 105: 371-7.
80. Tappel AL. *Free radicals in Biology* 1980, pp. 1-47. Academic Press, NY.
81. Asakawa T, Matsushita S. Thiobarbituric Acid Test for Detecting Lipid Peroxides. *Lipids* 1979;14(40):401-406.
82. Babizhayev MA, Costa BE. Lipid peroxide and reactive oxygen species generating systems of the crystalline lens. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1225: 326-7.
83. Ledwozyw A, Michalak B, Stepien A, Kadziolka A. The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 1986; 155: 275-284.
84. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 1998;161:2524–32
85. Guevara I, Iwanejko J, Dembinska –Kiesc A, et al. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta* 1998; 274: 177-188.
86. J. A. Metcalf, J. I. Gallin, W. M. Nauseef, and R. K. Root, “Myeloperoxidase functional assays,” in *Laboratory Manual of Neutrophil Function*, pp. 150–151, Raven Press, New York, NY, USA, 1986.
87. Dypbukt JM, Bishop C, Brooks WM, Thong B, Eriksson H, Kettle AJ. A sensitive and selective assay for chloramine production by myeloperoxidase. *Free Rad Biol Med* 2005; 39: 1468-1477.

88. Bergmayer UH. Methoden Der Enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim 1970; 483-484.
89. Dacie JV, Lewis SM, 1984, Practical Haematology: Estimation of reduced glutathione (GSH), London: Churchill Livingstone, 6 th ed, pp 168-170.
90. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Anal Biochem 1968; 25: 192-205.
91. Jocelyn PC. Spectrophotometric assay of tiols. Methods Enzymol 1987; 143: 44-67.
92. Chin PTY, Stults FH, Tapell AL. Purification of rat lung soluble glutathione peroxidase. Biochem Biophys Acta 1976; 445: 558-666.
93. Koroluk MA, Ivanova LI, Maiorova IG, Tokarev V. A method of determining catalase activity. Lab Delo 1988; 1: 16-9.
94. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. Clin Chim Acta 1991; 196: 143-152.
95. Glatzle D, Vuillenmir JP, Weber F, Decker K. Glutathione reductase test with whole blood – a convenient procedure for the assesment of the riboflavine status in humans. Experimentia 1974; 30(6): 565-638.
96. Majkić Сингх Н. Клиничка ензимологија 1993.АИД Практикум, Београд.
97. Bukowska B. 2,4,5-T and 2,4,5-TCP induced oxidative damage in human erythrocytes; the role of glutathione. Cell Biol Internation 2004; 28: 557-563.
98. Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005; 25: 1102-1111.
99. Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). J Biol Chem. 2001; 276: 41279-41287.
100. Peppin GJ, Weiss SJ. Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils. Proc Natl Acad Sci USA. 1986; 83: 4322-4326.
101. Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid generated by myeloperoxidase modifies adjacent tryptophan and glycine residues in the catalytic domain of matrix metalloproteinase-7 (Matrilysin). J Biol Chem. 2003; 278: 28403-28409.

102. Sugiyama S, Kugiyama K, Aikawa M, Nakamura S, Ogawa H, Libby P. Hypochlorous acid, a macrophage product, induces endothelial apoptosis and tissue factor expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 1309-1314.
103. Harisson DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest.* 1997; 100: 2153-2157.
104. Forgione MA, Leopold JA, Loscalzo J. Roles of endothelial dysfunction in coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol.* 2000; 15:409-415.
105. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation.* 2004; 109: II27-II33.
106. Sugiyama S, Okada Y, Sukhova GK, Virmani R, Heinecke JW, Libby P. Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte-macrophage colony stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am J Pathol.* 2001; 158: 879-891.
107. Buffon A, Biasucci LM, Liuzzo G et al. Widespread coronary inflammation in unstable angina. *N Engl J Med.* 2002; 347: 5-12.
108. Ridker PM. Novel risk factors and markers for coronary artery disease. *Adv Inter Med* 2000; 45: 391-418.
109. Beutler E. Red cell metabolism. *A manual of biochemical methods.* New York: Grune and Stratton, 1975:30–32.
110. Liu L, Mao S, Liu X, Huang X, Xu J, Liu J. Functional mimicry of the active site of glutathione peroxidase by glutathione imprinted selenium-containing protein. *Biomacromolecules* 2008, 9, 363–368.
111. Suzuki K, Yamada M, Akashi K, Fujikura T. Similarity of kinetics of three types of myeloperoxidase from human leukocytes and four types from HL-60 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1986; 245: 167-173.
112. Zhang H, Limphong P, Pieper J, Liu Q, Rodesch CK, Christians E, Benjamin IJ. Glutathione-dependent reductive stress triggers mitochondrial oxidation and cytotoxicity. *FASEB J* 2012; 26: 1442-51.
113. Yu Q, Lee CF, Wang W, Karamanlidis G, Kuroda J, Matsushima S, Sadoshima J, Tian R. Elimination of NADPH oxidase activity promotes reductive stress and sensitizes the heart to ischemic injury. *J Am Heart Assoc* 2014; 3: e000555. doi: 10.1161/JAHA.113.000555.

114. Ghibelli L, Coppola S, Rotilio G, Civitareale P, Scovassi AI et al. Glutathione depletion causes cytochrome c release even in the absence of cell commitment to apoptosis. *FASEB J* 1999; 13: 2031-2036.
115. Maianski NA, Geissler J, Srinivasula SM, Alnemri ES, Roos D, Kuijpers TW. *Cell Death Differ* 2004; 11: 143-153.
116. Garlich CD, Eskafi S, Cicha I, Schmeisser A, Walzog B, Raaz D, Stumpf C, Yilmaz A, Bremer J, Ludwig J, Daniel WG. Delay of neutrophil apoptosis in acute coronary syndromes. *J Leuk Biol* 2004; 75: 828-835.
117. Fiedler TJ, Davey CA, Fenna RE. X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8Å resolution. *J Biol Chem* 2000; 275: 11964–11971.
118. Furtmüller PG, Burner U, Jantschko W, Regelsberger G, Obinger C. Two-electron reduction and one-electron oxidation of organic hydroperoxides by human myeloperoxidase. *FEBS Lett* 2000; 484: 139–143.
119. Floris R, Wever R. Reaction of myeloperoxidase with its product HOCl. *Eur J Biochem* 1992; 207: 697–702.
120. Furtmüller PG, Burner U, Jantschko W, Regelsberger G, Obinger C. The reactivity of myeloperoxidase compound I formed with hypochlorous acid. *Redox Report* 2000; 5: 173–178.
121. Dolphin D, Felton RH. The biological significance of porphyrin p-cation radical. *Acc Chem Res* 1974; 7: 26.
122. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: occurrence and biological function. In: Everse J, Everse KE, Grisham MB. (eds) *Peroxidases in Chemistry and Biology*. Boston, MA: CRC Press, 1991; 1–35.
123. Harrison JE, Schultz J. Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem* 1976; 251: 1371–1374.
124. Furtmüller PG, Burner U, Obinger C. Reaction of myeloperoxidase compound I with chloride, bromide, iodide and thiocyanate. *Biochemistry* 1998; 37: 17923–17930.
125. Van Dalen CJ, Whitehouse MW, Winterbourn CC, Kettle AJ. Thiocyanate and chloride as competing substrates for myeloperoxidase. *Biochem J* 1997; 327: 487-492.
126. Furtmüller PG, Obinger C, Hsuanyu Y, Dunford HB. Mechanism of the reaction of myeloperoxidase with hydrogen peroxide and chloride ion. *Eur J Biochem* 2000; 267: 5858–5864.

127. Marquez LA, Dunford HB. Chlorination of taurine by myeloperoxidase. Kinetic evidence for an enzyme-bound intermediate. *J Biol Chem* 1994; 269: 7950–7956.
128. Marquez, LA, Dunford HB. Kinetics of oxidation of tyrosine and dityrosine by myeloperoxidase compounds I and II. Implications for lipoprotein peroxidation studies. *J Biol Chem* 1995; 270: 30434–30440.
129. Burner U, Furtmüller PG, Kettle AJ, Koppenol WH, Obinger C. Mechanism of reaction of myeloperoxidase with nitrite. *J Biol Chem* 2000; 275: 20597–20601.
130. Burner U, Jantschko W, Obinger C. Kinetics of oxidation of aliphatic and aromatic thiols by myeloperoxidase compounds I and II. *FEBS Lett* 1999; 443: 290–296.
131. Dunford HB. *Heme Peroxidase*. New York: Wiley-VCH, 1999; 70–89.
132. Arnhold J, Furtmüller PG, Obinger C. Redox properties of myeloperoxidase. *Redox Report* 2003; 8: 179-186.
133. Heinecke JW, Li W, Francis GA, Goldstein JA. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins. *J Clin Invest* 1993; 91: 2866–2872.
134. Savenkova MI, Mueller DM, Heinecke JW. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase is a physiological catalyst for the initiation of lipid peroxidation in low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1994; 269: 20394–20400.
135. Francis GA, Mendez AJ, Bierman EL, Heinecke JW. Oxidative tyrosylation of high density lipoprotein by peroxidase enhances cholesterol removal from cultured fibroblasts and macrophage foam cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 6631–6635.
136. Hazell LJ, Stocker R. Oxidation of low-density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages. *Biochem J* 1993; 290: 165–172.
137. Soupart P. In *Amino Acid Pools: Distribution, Formation and Function of Free Amino Acids* (Holden JT, ed), Amsterdam, Elsevier Publishing Co. Inc, 1962: 220-262.
138. Furtmüller PG, Arnhold J, Jantschko W, Pichler H, Obinger C. Redox properties of the couples compound I/compound II and compound II/native enzyme of human myeloperoxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 301: 551–557.

139. Chamulitrat W, Cohen MS, Mason RP. Free radical formation from organic hydroperoxides in isolated human polymorphonuclear neutrophils. *Free Rad Biol Med* 1991; 11: 439-445.
140. Burner U, Obinger C. Transient-state and steady-state kinetics of the oxidation of aliphatic and aromatic thiols by horseradish peroxidase. *FEBS Lett* 1997; 411: 269-274.
141. Bolscher B, Zoutberg G, Cuperus R, Wever R. Vitamin C stimulates the chlorinating activity of human myeloperoxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1984; 784: 189-191.
142. Marquez LA, Dunford HB, Van Wart H. Kinetic studies on the reaction of compound II of myeloperoxidase with ascorbic acid. Role of ascorbic acid in myeloperoxidase function. *J Biol Chem* 1990; 265:5666-5670.
143. Mrtensson J, Meister A. Glutathione deficiency decreases tissue ascorbate levels in newborn rats: Ascorbate spares glutathione and protects. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4656-4660.
144. Winkler BS, Orseli MS, Rex TS. The redox couple between glutathione and ascorbic acid: chemical and physiological perspective. *Free Rad Biol Med* 1994; 17: 333-349.
145. Ramos DR, Garcia MV, Moises Canle L, Santaballa JA, Furtmuller PG, Obinger C. Myeloperoxidase-catalyzed taurine chlorination: initial versus equilibrium rate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2007; 466: 221–233.
146. Hazen SL, d'Avignon A, Anderson MM, Hsu FF, Heinecke JW. Human neutrophils employ the myeloperoxidase hydrogen peroxide-chloride system to oxidize α -amino acids to a family of reactive aldehydes. *J Biol Chem* 1998; 273:4997–5005.
147. Thomas EL, Grisham MB, Jefferson MM. Preparation and characterization of chloramines. *Methods Enzymol* 1986; 132: 569–585.
148. Weiss SJ, Lampert MB, Test ST. Long-lived oxidants generated by human neutrophils: characterization and bioactivity. *Science* 1983; 222 (4624): 625-628.
149. Grisham MB, Jefferson MM, Thomas EL. Role of monochloramine in the oxidation of erythrocyte hemoglobin by stimulated neutrophils. *J Biol Chem* 1984; 259: 6676–6772.

150. Marcinkiewicz J, Grabowska A, Bereta J, Bryniarski K, Nowak B. Taurine chloramine down-regulates the generation of murine neutrophil inflammatory mediators. *Immunopharmacology* 1998; 40: 27–38.
151. Carr AC, Hawkins CL, Thomas SR, Stocker R, Frei B. Relative reactivities of N-chloramines and hypochlorous acid with human plasma constituents. *Free Rad Biol Med* 2001; 30: 526-536.
152. Rao KS, Recknagel RO. Early onset of lipid peroxidation in rat liver after carbon tetrachloride administration. *Exp Mol Pathol* 1968; 9: 271-278.
153. Jiang ZY, Hunt JV, Wolff SP. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxides in low density lipoproteins. *Anal Biochem* 1992; 202 (2): 384-389.
154. Wright A, Bubb WA, Hawkins CL, et al. Singlet oxygen-mediated protein oxidation: evidence for the formation of reactive side chain peroxides on tyrosine residues. *Photochem Photobiol* 2002; 76: 35-46.
155. Agon VV, Bubb WA, Hawkins CL, et al. Sensitizer-mediated photooxidation of histidine residues: evidence for the formation of reactive side chain peroxides. *Free Rad Biol Med* 2006; 40: 698-710.
156. Ronsein GE, Bof de Oliveira MC, Gennari de Medeiros MH, et al. Characterization of O₂ (1Deltag)- derived oxidation products of tryptophan: a combination of tandem mass spectrometry analyses and isotopic labeling studies. *J Am Soc Mass Spectrom* 2008; 20: 188-197.
157. Xu KY, Kuppusamy P. Dual effects of copper-zinc superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336: 1190–1193.
158. Ramirez DC, Gomez-Mejiba S, Corbett JT, Deterding LJ, Tomer KB, Mason RP. Cu,Zn-superoxide dismutase-driven free radical modifications: copper- and carbonate radical anion-initiated protein radical chemistry. *Biochem J* 2009; 417: 341–353.
159. Miric DJ, Kistic BM, Zoric LD, Miric BM, Mirkovic M, Mitic R. Influence of cataract maturity on aqueous humor lipid peroxidation markers and antioxidant enzymes. *Eye* 2014; 28: 72–77.
160. Gautam N, Chakraborty SP, Kundu PK, Roy S. Age associated changes in antioxidant and antioxidative enzymes in human neutrophil of different aged people. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2012; S423-S428.
161. Ludwig PW, Hunninghake DB, Hoidal JR. Increased leukocyte oxidative metabolism in hyperlipoproteinemia. *Lancet* 1982;14:348–50.

162. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993;91:2546–51.
163. Godin DV, Dahlman DM. Effects of hypercholesterolemia on tissue antioxidant status in two species differing in susceptibility to atherosclerosis. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1993;79:151–66.
164. Efe H, Deger O, Kirci D, Karahan SC, Orem A, Calapoglu M. Decreased neutrophil antioxidative enzyme activities and increased lipid peroxidation in hyperlipoproteinemic human subjects. *Clinica Chimica Acta* 1999; 279: 155–165.
165. Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Rad Res* 1999; 31(4): 273-300.
166. Mimnaugh EG. Potentiation by glutathione of adriamycin-stimulated lipid peroxidation in kidney microsomes. *Biochem Pharmacol* 1986; 35: 4337-4339.
167. Bast A, Haenen GRMM, Savenije-Chapel EM. Inhibition of rat hepatic microsomal lipid peroxidation by mesna via glutathione. *Arzneim Forsch* 1987; 37: 1043-1045.
168. Haenen GRMM, Vermeulen NPE, Timmerman H, Bast A. Effect of thiols on lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Chem Biol Interactions* 1989; 71: 201-212.
169. Kornbrust DJ, Mavis RD. Microsomal lipid peroxidation. *Mol Pharmacol* 1980; 28: 2051-2055.
170. Rao GHR, Gerrard JM, Eaton JW, White JG. The role of iron in prostaglandin synthesis, ferrous iron mediated oxidation of arachidonic acid. *Prostaglandins Med* 1978; 1:55-70.
171. Braugher JM, Duncan LA, Chase RL. The involvement of iron in lipid peroxidation. *J Biol Chem* 1986; 261: 10282-10289.
172. Minotti G, Aust SD. The requirement for iron(III) in the initiation of lipid peroxidation by iron(II) and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1987; 262: 1098-1104.
173. Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareno EJ, Romero B, Marin N, Roma J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environmental Health Perspectives* 1998; 106: 1229-1234.
174. Zhang X, Min X, Li C, Benjamin IJ, Qian B, Zhang Xi, et al. Involvement of Reductive Stress in the Cardiomyopathy in Transgenic Mice With Cardiac-Specific Overexpression of Heat Shock Protein 27. *Hypertension* 2010; 55: 1412-1417.

175. Margaritelis NV, Kyparos A, Paschalis V, Theodorou AA, Panayiotou G, Zafeiridis A, Dipla K, Nikolaidis MG, Vrabas IS. Reductive stress after exercise: The issue of redox individuality. *Redox Biology* 2014; 2: 520–528.
176. Halliwell B, Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280:1.
177. Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Dalle-Donne I. Cysteinylation and homocysteinylation of plasma protein thiols during ageing of healthy human beings. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 3131-3140.
178. Marklund SL. Expression of extracellular superoxide dismutase by human cell lines. *Biochemical Journal* 1990; 266: 213–219.
179. Mahaney MC, Czerwinski SA, Adachi T, Wilcken DEL, Wang XL. Plasma levels of extracellular superoxide dismutase in an Australian population: genetic contribution to normal variation and correlations with plasma nitric oxide and apolipoprotein A-I levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 683-688.
180. Karlsson K, Sandstrom J, Edlund A, Edlund T, Marklund SL. Pharmacokinetics of extracellular-superoxide dismutase in the vascular system. *Free Rad Biol Med* 1993; 14: 185-190.
181. Karlsson K, Marklund SL. Heparin-induced release of extracellular superoxide dismutase to human blood plasma. *Biochem J* 1987; 242: 55-59.
182. Wink DA, Hanbauer I, Krishna MC, DeGraff W, Gamson J, Mitchell JB. Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *PNAS* 1993; 90: 9813–9817.
183. Takatsu H, Tasaki H, Kim HN, Ueda S, Tsutsui M, Yamashita K, Toyokawa T, Morimoto Y, Nakashima Y, Adachi T. Overexpression of EC-SOD suppresses endothelial-cell-mediated LDL oxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 285: 84–91.
184. Chu FF, Esworthy RS, Doroshov JH, Doan K, Liu XF. Expression of plasma glutathione peroxidase in human liver in addition to kidney, heart, lung, and breast in humans and rodents. *Blood* 1992; 79: 3233-3238.
185. Bjornstedt M, Xue J-Y, Huang W-H, Akesson B, Holmgren A. The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electrons donors to human plasma glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1994;269:29382-4.
186. Anderson ME, Meister A. Dynamic state of glutathione in blood plasma. *J Biol Chem* 1980; 255: 9530-3.

187. Michelet F, Gueguen R, Leroy P, Wellman M, Nicolas A, Siest G. Blood and plasma glutathione measured in healthy subjects by HPLC: relation to sex, aging, biological variables, and life habits. *Clin Chem* 1995; 41: 1509-17.
188. Chen N, Liu Y, Greiner CD, Holtzman JL. Physiologic concentrations of homocysteine inhibit the human plasma GSH peroxidase that reduces organic hydroperoxides. *J Lab Clin Med* 2000; 136: 58-65.
189. Buijsse B, Lee DH, Steffen L, Erickson RE, Luepker RV, Jacobs DR, Holtzman JL. Low serum glutathione peroxidase activity is associated with increased cardiovascular mortality in individuals with Low HDLc's. *PLOS ONE* 2012; 7: e38901.
190. Kelly EE, Trostchansky A, Rubbo H, Freeman BA, Radi R, Tarpey MM. Binding of xanthine oxidase to glycosaminoglycans limits inhibition by oxypurinol. *J Biol Chem* 2004; 279: 37231-37234.
191. Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of Allopurinol. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 87-114.
192. Darra E, Rungtatscher A, Carcereri de Prati A, et al. Dual modulation of nitric oxide production in the heart during ischemia/reperfusion injury and inflammation. *Thromb Haemost* 2010; 104: 200-206.
193. Beckman JS, Koppenol WS. $\text{NO}\bullet$, $\text{O}_2^{\bullet-}$ and ONOO^- : the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 1996; 271: C1424.
194. Grisham MB, et al. $\text{NO}\bullet$. I. Physiological chemistry of $\text{NO}\bullet$ and its metabolites: implication in inflammation. *Am J Physiol* 2001; 276: G315.
195. Moller M et al. Direct measurement of $\text{NO}\bullet$ and O_2 partitioning into liposomes and LDL. *J Biol Chem* 2005; 280: 8850.
196. Guittet O, et al. $\text{NO}\bullet$: a radical molecule in quest of free radicals in proteins. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 1054.
197. Halliwell B, et al. $\text{NO}\bullet$ and ONOO^- . The ugly, the uglier and the not so good. *Free Rad Res* 1999; 31: 651.
198. Grisham MB, Jourd'Heuil D, Wink DA. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol* 1999; 39: G315-G321.
199. Koppenol WH. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Rad Biol Med* 1998; 25: 385-391.
200. Brown GC. Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 1119-1121.

201. Abu-Soud HM, Hazen SL. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem* 2000; 275: 5425-5430.
202. Bryan NS, Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Rad Biol Med* 2007; 43: 645-657.
203. Wennmalm A, et al. Metabolism and excretion of NO• in humans. *Circ Res* 1993; 73:1121.
204. Kleinbongard P, et al. Plasma NO₂⁻ reflects constitutive NO• synthase activity in mammals. *Free Rad Biol Med* 2003; 35: 790.
205. Cosby K, et al. Nitrite reduction to NO• by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nature Med* 2003; 9: 1498.
206. Huang Z, et al. Enzymatic function of hemoglobin as a NO₂⁻ reductase that produces NO• under allosteric control. *J Clin Invest* 2005; 115:2099.
207. Whiteman M, et al. Nitrite-mediated protection against HOCl-induced chondrocyte toxicity. A novel cytoprotective role of NO• in the inflamed joint? *Arth Rheum* 2003; 48:3140.
208. Akiyama K, Suzuki H, Grant P, Bing RJ. Oxidation products of nitric oxide, NO₂ and NO₃, in plasma after experimental myocardial infarction. *Mol Cell Cardiol* 1997; 29:1–9.
209. Sanchez de Miguel L, Arriero MM, Farre J, Jimenez P, Garcia-Mendez A, de Frutos T. Nitric oxide production by neutrophils obtained from patients during acute coronary syndromes: expression of the nitric oxide synthase isoforms. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:818–25.
210. Djordjevic VB, Stojanovic I, Cosic V, Zvezdanovic L, Deljanin-Ilic M, Dimic S, Kundalic B, Cvetkovic T, Jevtovic-Stoimenov T. Serum neopterin, nitric oxide, inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α levels in patients with ischemic heart disease. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46: 1149–1155.
211. Capeillere-Blandin C, Gausson V, Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V. Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004; 1689: 91– 102.
212. Skvarilova M, Bulava A, Stejskal D, Adamovska S, Bartek J. Increased level of advanced oxidation products (AOPP) as a marker of oxidative stress in patients with acute coronary syndrome. *Biomed Papers* 2005; 149: 83-87.

213. Baskol G, Demir H, Baskol M, Kilic E, Ates F, Karakukcu C, Ustdal M. Investigation of protein oxidation and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. *Cell Biochem Funct* 2006; 24: 307–311.
214. Xu H, Cabezas-Rodrigues I, Qureshi AR, Heimbürger O, Barany P, Snaedal S, et al. Increased level of modified advanced oxidation protein products are associated with central and peripheral blood pressure in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int* 2014; In press.

Изјава о ауторству

Потписани, Илија Драгојевић

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**„МЕТАБОЛИЗАМ СЛОБОДНИХ РАДИКАЛА У ПОЛИМОРФОНУКЛЕАРНИМ
ЛЕУКОЦИТИМА БОЛЕСНИКА СА АКУТНИМ КОРОНАРНИМ СИНДРОМОМ“**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

Илија Драгојевић

У Косовској Митровици, 2015.

Изјава о истоветности штапане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Илија Драгојевић**

Наслов рада „**МЕТАБОЛИЗАМ СЛОБОДНИХ РАДИКАЛА У
ПОЛИМОРФОНУКЛЕАРНИМ ЛЕУКОЦИТИМА БОЛЕСНИКА СА АКУТНИМ
КОРОНАРНИМ СИНДРОМОМ**“

Ментор Проф.др Дијана Мирић

Потписани, **Илија Драгојевић**

Изјављујем да је штапана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици.

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

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици.

Потпис докторанда

Илија Драгојевић

У Косовској Митровици, 2015.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**„МЕТАБОЛИЗАМ СЛОБОДНИХ РАДИКАЛА У ПОЛИМОРФОНУКЛЕАРНИМ
ЛЕУКОЦИТИМА БОЛЕСНИКА СА АКУТНИМ КОРОНАРНИМ СИНДРОМОМ“**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

Умија Трајковић

У Косовској Митровици,

2015.