

Univerzitet u Beogradu

Farmaceutski fakultet

Ana R. Ninić

DOKTORSKA DISERTACIJA

**Genska ekspresija enzima
antioksidativne zaštite u tkivima pacova i
humanoj krvi: uticaj spoljnih faktora i
korelacija sa biohemijskim markerima
oksidativnog stresa**

Beograd, 2014.

Univerzitet u Beogradu

Farmaceutski fakultet



Ana R. Ninić

DOKTORSKA DISERTACIJA

**Genska ekspresija enzima
antioksidativne zaštite u tkivima pacova i
humanoj krvi: uticaj spoljnih faktora i
korelacija sa biohemijskim markerima
oksidativnog stresa**

Beograd, 2014.

University of Belgrade

Faculty of Pharmacy



Ana R. Ninić

DOCTORAL DISSERTATION

**Gene expression analyses of antioxidative
enzymes in rats' tissues and human blood:
the influence of external factors and
correlation with biochemical markers of
oxidative stress**

Belgrade, 2014.

Doktorska disertacije je urađena na Katedri za medicinsku biohemiju,
Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta

Mentor

Dr Vesna Spasojević-Kalimanovska, redovni profesor

Članovi komisije

1. _____

Dr Slavica Spasić, redovni profesor u penziji
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

2. _____

Dr Nataša Bogavac-Stanojević, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

3. _____

Dr Jelena Kotur-Stevuljević, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

4. _____

Dr Gordana Joksić, naučni savetnik
Institut za nuklearne nauke “Vinča”

Datum odbrane _____

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je nastala kao rezultat dugogodišnjeg, timskog rada kolega i saradnika na Katedri za medicinsku biohemiju, ali i velike, nesebične pomoći i podrške moje porodice. Ovom prilikom bih želela iskreno svima da se zahvalim.

Pre svega, duboku zahvalnost dugujem svom mentoru prof. dr Vesni Spasojević-Kalimanovskoj koja me je mudro usmeravala, dobronamerno savetovala, svesrdno pomagala i bodrila pre svega kao profesor, a onda i kao roditelj, kako bih prevazišla sve teškoće sa kojima sam se suočavala tokom izrade ove disertacije. Zahvaljujem joj se na znanju, iskustvu i ideji da osmisli koncept ove doktorske disertacije.

Prof. dr Slavici Spasić, koja me je uvela u svet statistike, se izrazito zahvaljujem na korisnim sugestijama u interpretaciji numeričkih rezultata i od koje sam naučila da problem posmatram iz nekog novog ugla i kako da svakom izazovu pristupam strpljivo i analitično.

Prof. dr Nataši Bogavac-Stanojević se, pored velike pomoći i znanja koje mi je prenela o statističkoj analizi podataka i pomoći u svim fazama eksperimentalnog rada, posebno zahvaljujem na vremenu koje je posvetila čitanju i korekciji publikovanih radova koji se odnose na ovu disertaciju, kao i same disertacije.

Prof. dr Jeleni Kotur-Stevuljević se duboko zahvaljujem na nesebičnoj, prijateljskoj i stručnoj pomoći i podršci u eksperimentalnom radu i pisanju i publikovanju naučnih radova od mog početka rada na Katedri za medicinsku biohemiju. Takođe, joj se zahvaljujem na pomoći u sakupljanju i obradi uzoraka biološkog materijala.

Veliku zahvalnost dugujem i Dr Gordani Joksić na ljubaznosti i korisnim sugestijama koje su doprinele poboljšanju kvaliteta ove doktorske disertacije.

Prof. dr Zorani Jelić-Ivanović izražavam posebnu zahvalnost za pomoć i korisne savete kako da izrazim svoje misli na jasan i koncizan način, a koji su mi mnogo značili u pisanju i pripremi radova za publikovanje u časopisima međunarodnog značaja u kojima su objavljeni najbitniji rezultati ove disertacije.

Pravo zadovoljstvo i privilegija je bila raditi sa mladim kolegama, diplomiranim farmaceutima-medicinskim biohemičarima, Mironom Sopićem i Jelenom Joksić, koji su mi pored dragocene pomoći, pružili i korisne savete i sugestije u eksperimentalom radu.

Zahvaljujem se koleginicama dr Ivani Baralic, dipl. farm. Milkici Crevar-Sakač, prof. dr Brižiti Đorđević i prof. dr Zorici Vujić, koje su učestvovala u saradnji naših projekata i omogućile da na njihovim ispitanicima i eksperimentalnim životinjama kvantifikujem gensku ekspresiju enzima antioksidativne zaštite.

Želela bih da se zahvalim svim ostalim zaposlenim na Katedri za medicinsku biohemiju na podršci i razumevanju ukoliko neku od svojih obaveza nisam izvršila dovoljno dobro zbog svoje angažovanosti na disertaciji.

Neizmernu zahvalnost dugujem roditeljima Milici i Radoslavu, bratu Vladimiru, nani Ružici i dedi Rajku, koji su mi bili životni oslonac i podrška i koji su me pre svega naučili ljubavi, strpljenju i toleranciji tokom svih ovih godina. Svom suprugu Nikoli se zahvaljujem na dugogodišnjoj ljubavi i podršci da istrajem u svom naučnom radu. Bez njih, njihove podrške i ljubavi, posebno u teškim trenucima, ovo ne bi bilo moguće, stoga je ova disertacija posvećena njima.

Genska ekspresija enzima antioksidativne zaštite u tkivima pacova i humanoj krvi: uticaj spoljnih faktora i korelacija sa biohemijskim markerima oksidativnog stresa

Sažetak

Genska ekspresija je proces koji obuhvata transkripciju gena, obradu transkripta i njegovu translaciju u protein. Kvantifikacijom genske ekspresije može se videti da li dolazi do ushodne ili nishodne regulacije specifičnih gena i posledica takve regulacije. Značajnu ulogu u zaštiti od oksidativnog stresa (prekomerne količine stvorenih slobodnih radikala) u intra- i ekstraćelijskom prostoru imaju enzimi antioksidativne zaštite, superoksid-dismutaza (SOD) i paraoksonaza (PON). Interakcije gena antioksidativne zaštite i fizičke aktivnosti, gena i tipa dijeta, gena i terapije hipolipemicima mogu da modifikuju ekspresiju tih gena; fizička aktivnost slobodnim radikalima, aterogena dijeta i terapija atorvastatinom svojim komponentama, direktno ili indirektno interagujući sa transkripcionim faktorima.

Cilj istraživanja je bio da se ispita uticaj fizičke aktivnosti na gensku ekspresiju izoenzima SOD (Cu/Zn SOD i Mn SOD) u limfocitima sportista i uticaj aterogene dijeta i terapije atorvastatinom na gensku ekspresiju izoenzima PON (PON1, PON2, PON3) u jetri, belom masnom tkivu i aorti eksperimentalnih životinja. Pored toga, cilj je bio i da se uporede metode za izolaciju RNK iz krvi i ispita njihov uticaj na vrednosti genske ekspresije izoenzima SOD.

Istraživanje je obuhvatilo odrasle osobe (kontrolna grupa), grupu fudbalera pre i nakon 12 nedelja intenzivnog treniranja i eksperimentalne životinje koje su podeljene u 3 grupe (1. grupa na normalnoj dijeti – ND grupa, 2. grupa na aterogenoj dijeti - AD i 3. grupa na aterogenoj dijeti i terapiji atorvastatinom - ADA grupa). RNK je izolovana TRIzol™ metodom (TRI) iz mononuklearnih ćelija periferne krvi (TRI_{MČPK}) i na aparatu ABI Prism™ 6100 Nucleic Acid PrepStation (ABI) iz krvi (ABI_{KRV}) i mononuklearnih ćelija periferne krvi (ABI_{MČPK}). Takođe, RNK je izolovana pomoću TRIzol™ metode iz ispitivanih organa pacova. Za kvantifikaciju relativne genske ekspresije korišćena je Real time PCR metoda.

Fudbaleri su nakon 12 nedelja treniranja bili u oksidativnom stresu. Vrednosti genske ekspresije Cu/Zn SOD se nisu statistički značajno promenile ($p=0,106$), dok su vrednosti Mn SOD bile značajno veće ($p=0,031$) nakon treniranja. Vrednosti genske

ekspresije Cu/Zn SOD su bile parametar koji nezavisno utiče na ukupnu aktivnost SOD u plazmi ($p=0,025$), a koncentracija tiobarbituratna kiselina-reagujućih supstanci je imala ulogu prediktivnog faktora ($p=0,017$) za vrednosti genske ekspresije Mn SOD. Nivoi genske ekspresije PON1 su bili manji u ADA u odnosu na AD grupu pacova ($p=0,028$). ND grupa pacova je imala značajno manje nivoe ekspresije PON2 od AD grupe ($p=0,045$). Nivoi ekspresije PON1 su bili viši u jetri nego u aorti u ND, AD i ADA grupama ($p=0,004$, $p=0,014$ i $p=0,004$, respektivno). Nivoi ekspresije PON2 i PON3 su bili značajno viši od PON1 u aorti pacova svih grupa. PON3 je imala stabilnu ekspresiju u organima na koju nije uticao tip tretmana. Sve metode izolacije su dale zadovoljavajući prinos RNK. Čistoća rastvora RNK (odsustvo organskih i neorganskih kontaminanata) je bila zadovoljavajuća samo kod $TRI_{M\acute{C}PK}$ metode. RNK izolovana $TRI_{M\acute{C}PK}$ i $ABI_{M\acute{C}PK}$ metodama je bila intaktna, dok se u uzorcima dobijenim ABI_{KRV} metodom pokazala jasna degradacija RNK. Analizom varijanse je pokazano da su se vrednosti genske ekspresije Cu/Zn SOD i Mn SOD između testiranih metoda statistički značajno razlikovale. Interindividualni koeficijenti varijacija govore u prilog izrazito većoj varijaciji u vrednostima genske ekspresije izoenzima SOD dobijenim u ABI_{KRV} uzorcima.

Intenzivno treniranje je dovelo samo do ushodne regulacije gena za Mn SOD. Utvrđena je interakcija markera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite iz plazme i vrednosti genske ekspresije Cu/Zn SOD i Mn SOD iz limfocita. AD je indukovala ekspresiju PON2 gena, a ADA smanjila ekspresiju PON1 gena samo u jetri hiperlipidemičnih pacova. Metoda izolacije RNK i tip biološkog materijala pokazali su značajan uticaj na vrednosti genske ekspresije Cu/Zn SOD i Mn SOD.

Ključne reči: genska ekspresija, superoksid-dismutaza, paraoksonaza, oksidativni stres, metoda izolacije RNK

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Medicinska biohemija

UDK broj: 57.085 : [616.008.9 : 575.218] (043.3)

615.279 : 546.21 (043.3)

Gene expression analyses of antioxidative enzymes in rats' tissues and human blood: the influence of external factors and correlation with biochemical markers of oxidative stress

Abstract

Gene expression is a process that includes transcription, transcript processing and its translation into protein. Gene expression quantification can be used to see whether specific genes are up or down regulated and consequences of such regulation. Enzymes of antioxidative defense system, superoxide dismutase (SOD) and paraoxonase (PON) have important roles in protection against oxidative stress (excessive amount of generated free radicals) in intra- and extracellular space. Interaction of antioxidative defense genes and physical activity, genes and type of diet, genes and hypolipemic drugs can modify the expression patterns of these genes; physical activity by free radicals formation, atherogenic diet and atorvastatin therapy with its components, directly or indirectly interacting with transcription factors.

The aim of this study was to investigate the influence of physical activity on SOD isoenzymes' (Cu/Zn SOD and Mn SOD) gene expression in sportsmen' lymphocytes and the influence of atherogenic diet and atorvastatin therapy on paraoxonase isoenzymes' (PON1, PON2 and PON3) gene expression in liver, white adipose tissue and aorta of experimental animals. In addition, we compared methods for RNA isolation from blood and examined their influence on SOD isoenzymes' gene expression.

The study included control group, soccer players before and after 12 weeks of intensive trainings and rats who were divided into 3 groups (1. group on normal diet - ND group, 2. group on atherogenic diet - AD group and 3. group on atherogenic diet with atorvastatin therapy- ADA group). RNA was isolated using Trizol™ method (TRI) from peripheral blood mononuclear cells (TRI_{PBMC}) and using ABI Prism™ 6100 Nucleic Acid PrepStation (ABI) from blood (TRI_{BLOOD}) and from peripheral blood mononuclear cells (ABI_{PBMC}). RNA was also isolated from rats' organs using TRI method. Real time PCR was used for relative gene expression quantification.

Soccer players were in oxidative stress after 12 weeks of intensive trainings. Cu/Zn SOD gene expression levels did not change significantly after training ($p=0.106$), while those of Mn SOD were significantly higher ($p=0.031$) after than before training. Cu/Zn

SOD expression levels were independent parameter that influenced total SOD activity in plasma ($p=0.025$). Concentration of thiobarbituric acid reactive substances was predictive parameter for Mn SOD gene expression values ($p=0.017$). PON1 expression levels were lower in ADA compared to AD group ($p=0.028$). ND group had significantly lower PON2 gene expression levels than AD group ($p=0.045$). PON1 gene expression levels were higher in liver than in aorta in ND, AD and ADA groups ($p=0.004$, $p=0.014$ and $p=0.004$, respectively). PON2 and PON3 expression levels were significantly higher than PON1 in aorta than in the liver of all groups. PON3 had stable expression in all organs which was not affected by type of treatment. All isolation methods gave sufficient RNA yield. Purity of RNA solutions was satisfactory only in TRI_{PBMC} samples (no organic solvents and inorganic salts). RNA isolated with TRI_{PBMC} and ABI_{PBMC} methods was intact, whereas ABI_{BLOOD} samples showed clear RNA degradation. Analysis of variance showed that Cu/Zn SOD and Mn SOD gene expression values were statistically different between tested methods. Higher variations in SOD isoenzymes' gene expression values were determined in ABI_{BLOOD} samples than in other samples.

The intensive trainings had led only to Mn SOD gene upregulation. The interactions of oxidative stress and antioxidant status markers from plasma and lymphocytes' Cu/Zn SOD and Mn SOD gene expression levels were determined. AD induced upregulation of PON2 gene and ADA induced down regulation of PON1 gene only in liver of hyperlipidemic rats. RNA isolation methods and the type of biological material showed significant effects on Cu/Zn SOD and Mn SOD gene expression values.

Key words: gene expression, superoxide dismutase, paraoxonase, oxidative stress, RNA isolation method

Scientific field: Pharmacy

Special topic: Medical biochemistry

UDC number: 57.085 : [616.008.9 : 575.218] (043.3)

615.279 : 546.21 (043.3)

SADRŽAJ:

I. UVOD.....	1
I.1. INTERAKCIJA GENA I SPOLJAŠNJIH FAKTORA	1
I.2. ENZIMI ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE.....	2
I.2.1. Superoksid-dismutaza	2
I.2.1.1. Cu/Zn SOD	2
I.2.1.1.1. Polimorfizmi i regulacija ekspresije Cu/Zn SOD gena	3
I.2.1.2. Mn SOD.....	4
I.2.1.2.1. Polimorfizmi i regulacija ekspresije Mn SOD gena	4
I.2.1.3. Ekstracelularna SOD	5
I.2.1.3.1. Polimorfizmi i regulacija ekspresije EC SOD gena.....	6
I.2.2. Paraoksonaza.....	6
I.2.2.1. Paraoksonaza 1 (PON1)	6
I.2.2.1.1. Polimorfizmi i regulacija ekspresije PON1 gena.....	8
I.2.2.2. Paraoksonaza 2 (PON2)	9
I.2.2.2.1. Polimorfizmi i regulacija ekspresije PON2 gena.....	9
I.2.2.3. Paraoksonaza 3 (PON3)	10
I.2.2.3.1. Polimorfizmi i regulacija ekspresije PON3gena.....	11
I.3. VARIJACIJE U VREDNOSTIMA GENSKE EKSPRESIJE	11
I.3.1. Uticaj bioloških varijacija na gensku ekspresiju	11
I.3.2. Uticaj fizičke aktivnosti na gensku ekspresiju	13
I.3.2.1. Fizička aktivnost i oksidativni stres	13
I.3.2.2. Antioksidativna zaštita u organizmu	15
I.3.2.3. Regulacija genske ekspresije slobodnim radikalima.....	17
I.3.2.4. Fizička aktivnost i antioksidativna zaštita.....	19
I.3.3. Uticaj različitog tipa dijete na gensku ekspresiju.....	20
I.3.4. Uticaj terapije hipolipemicima na gensku ekspresiju.....	22

I.3.5. Uticaj biološkog materijala i metode izolacije RNK na gensku ekspresiju ...	23
I.3.5.1. Krv i njene ćelije kao izvor RNK	24
I.3.5.2. Tkivo kao izvor RNK	26
I.3.5.3. Integritet RNK	26
II. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	28
III. ISPITANICI I METODE	29
III.1. ISPITANICI	29
III.2. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE	30
III.3. METODE	31
III.3.1. Antropometrijska merenja	31
III.3.2. Aerobni kapacitet (određivanje VO_2max)	31
III.3.3. Određivanje koncentracije osnovnih biohemijskih i hematoloških parametara	32
III.3.4. Određivanje koncentracije markera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite	32
III.3.4.1. Određivanje aktivnosti ukupne SOD i njenih izoenzima Cu/Zn SOD i Mn SOD	34
III.3.4.2. Određivanje koncentracije ukupnih sulfhidrilnih grupa	35
III.3.4.3. Određivanje nivoa superoksid-anjon radikala u plazmi optimizovanom Auclair-Voisin-ovom metodom	36
III.3.4.4. Određivanje koncentracije tiobarbiturna kiselina-reagujućih supstanci	37
III.3.4.5. Određivanje koncentracije uznapredovalih produkata oksidacije proteina	39
III.3.5. Izolacija RNK	40
III.3.5.1. Izolacija RNK pomoću TRIzol™ reagensa	40
III.3.5.2. Izolacija RNK korišćenjem ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation™ instrumenta	43
III.3.5.3. Određivanje koncentracije i provera kvaliteta rastvora RNK	45
III.3.5.4. Provera integriteta RNK	47

III.3.6. Kvantifikacija genske ekspresije	48
III.3.6.1. Reakcija reverzne transkripcije.....	49
III.3.6.2. Real time PCR	50
III.3.6.2.1. Princip Real time PCR metode	51
III.3.6.2.2. Detekcija i kvantifikacija PCR produkata.....	52
III.3.6.2.3. Validacija Real time PCR metode.....	54
III.3.6.2.4. Metoda standardne krive za relativnu kvantifikaciju.....	55
III.3.6.2.5. Komparativna $\Delta\Delta C_t$ metoda	55
III.3.7. Statistička obrada podataka	58
IV. REZULTATI	59
IV.1. UTICAJ FIZIČKE AKTIVNOSTI NA GENSKU EKSPRESIJU IZOENZIMA SOD.....	59
IV.2. UTICAJ DIJETE I TERAPIJE ATORVASTATINOM NA GENSKU EKSPRESIJU IZOENZIMA PON.....	66
IV.3. POREĐENJE METODA ZA IZOLACIJU RNK IZ HUMANE KRVI.....	76
IV.4. POREĐENJE METODA ZA IZOLACIJU RNK I UTICAJ INTERINDIVIDUALNIH VARIJACIJA NA GENSKU EKSPRESIJU IZOENZIMA SOD U KONTROLNOJ GRUPI	85
V. DISKUSIJA	88
V.1. UTICAJ FIZIČKE AKTIVNOSTI NA GENSKU EKSPRESIJU IZOENZIMA SOD U LIMFOCITIMA	88
V.2. UTICAJ ATEROGENE DIJETE I TERAPIJE ATORVASTATINOM NA GENSKU EKSPRESIJU IZOENZIMA PON	93
V.3. UTICAJ METODE IZOLACIJE RNK I RAZLIČITIH UZORAKA KRVI NA GENSKU EKSPRESIJU IZOENZIMA SOD	97
VI. ZAKLJUČAK.....	105
VI. LITERATURA	107

LISTA SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU

$^1\text{O}_2$ – singlet kiseonik

5-HETE - 5-hidroksi-(6,8,11,14)-eikozatetraenska kiselina

8-OH-dG - 8-hidroksi-2'deoksigvanozin

ABI - ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation™ za izolaciju RNK

ABI_{KRV} - ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation™ za izolaciju RNK iz krvi

ABI_{MČPK} - ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation™ metoda za izolaciju RNK iz mononuklearnih ćelija periferne krvi

ADP- adenzin-difosfat

AD – aterogena dijeta

ADA – aterogena dijeta i terapija atorvastatinom

ALS - amiotrofna lateralna skleroza

ALT – alanin-aminotransferaza

AMP - adenzin-monofosfat

ANOVA – analiza varijanse

AOPP - *engl.* advanced oxidation protein products (produkti uznapredovale oksidacije proteina)

AP1 – *engl.* activator protein 1

AsK – askorbinska kiselina

AST – aspartat-aminotransferaza

ATF-1- *engl.* cyclic AMP-dependent transcription factor

ATP- adenzin-trifosfat

B – nestandardizovani koeficijent korelacije

B2M - β -2-mikroglobulin

C/EBP – *engl.* CCAAT-enhancer-binding protein

cDNK – *engl.* complementary DNA (komplementarna DNK)

CI – interval pouzdanosti

CREB-1 – *engl.* cAMP responsive element binding protein 1

CRP - C-reaktivni protein

Ct – *engl.* treshold cycle – ciklus praga

DAsK - dehidroaskorbinska kiselina

DNK - dezoksiribonukleinska kiselina

dNTP – dezoksinukleozid-trifosfat

DTNB - 2,2'-dinitro-5,5'- ditio-benzenova kiselina
E – efikasnost amplifikacije PCR reakcije
EDTA - etilendiaminotetrasirćetna kiselina
Egr-1 – *engl.* early growth response protein 1
ERK – *engl.* extracellular signal-regulated kinases
GADPH - gliceraldehid-3-fosfatdehidrogenaza
gDNK - genomska DNK
GPx – glutation-peroksidaza
GR – glutation-reduktaza
GSH – redukovani glutation
GSSG – oksidovani glutation
H₂O₂ – vodonik peroksid
HDL - lipoproteinska čestica visoke gustine
HDL-H – HDL-holesterol
HMBS – *engl.* hydroxymethylbilane synthase
HMG-KoA – hidrosimetilglutaril-koenzim A
HNF4α – *engl.* hepatocyte nuclear factor 4α
HPRT1 – *engl.* Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase1
IFN – interferon
IL – interleukin
iRNK- informaciona RNK
ITM – indeks telesne mase
JNK3- *engl.* c-jun N-terminal protein kinases
KoA – koenzim A
KV - koeficijent varijacije
L· – alkil-radikal
LDL – lipoproteinska čestica niske gustine
LDL-H – LDL-holesterol
LH – redukovani lipid
LOO· – alkilperoksil-radikal
LOOH – lipidni hidroperoksid
LXR – *engl.* liver X receptor
MAPK- *engl.* mitogen-activated protein kinase
MČPK- mononuklearne ćelije periferne krvi

MDA - malondialdehid
MDAsK - monodehidroaskorbinska kiselina
Me - medijana
NADH – redukovani nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADPH- redukovani nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat
NBT - nitroblutetrazolijum
NF-1- *engl.* nuclear factor 1
NF-κB – *engl.* nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
ND – normalna dijeta
O₂ – molekularni kiseonik
O₂⁻ - superoksid-anjon-radikal
OH[·] – hidroksil-radikal
PAX- *engl.* PAXgene™ Blood RNA Kit
PBS – fosfatni pufer
PCR – *engl.* polymerase chain reaction - reakcija lančane polimeraze
PDGF – *engl.* platelet-derived growth factor
PI3K- fosfatidilinozitol-3-kinaza
PON - paraoksonaza
PPAR – *engl.* peroxisome proliferator-activated receptor
PPIA – *engl.* peptidyl prolyl isomerase A
QIAamp – *engl.* QIAamp™ RNA Blood Mini Kit
RNK - ribonukleinska kiselina
ROS – *engl.* reactive oxygen species - reaktivna kiseonikova jedinjenja
RQ – *engl.* relative quantification - relativna genska ekspresija
rRNK – ribozomalna RNK
RT- reverzna transkripcija
SE – *engl.* standard error – standardna greška
SH grupe – sulfhidrilne grupe
SOD – superoksid-dismutaza
Sp1 – *engl.* specificity protein 1
SREBP – *engl.* sterol regulatory element-binding protein
TBK - tiobarbiturna kiselina
TBKRS - tiobarbituratna kiselina-reagujuće supstance
TBP – *engl.* TATA box binding protein

TG – trigliceridi

TNF- *engl.* tumor necrosis factor

TRI - TRIzol™ metoda za izolaciju RNK

TRI_{MČPK} - TRIzol™ metoda za izolaciju RNK iz mononuklearnih ćelija periferne krvi

TRIS - 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol

TAE - TRIS-acetat-EDTA

UH – ukupni holesterol

uPA – *engl.* urokinase-type plasminogen activator

VLDL – lipoproteinska čestica veoma niske gustine

WT-1 – *engl.* Wilms tumor protein-1

X· – slobodni radikal

Ywhas – *engl.* tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide

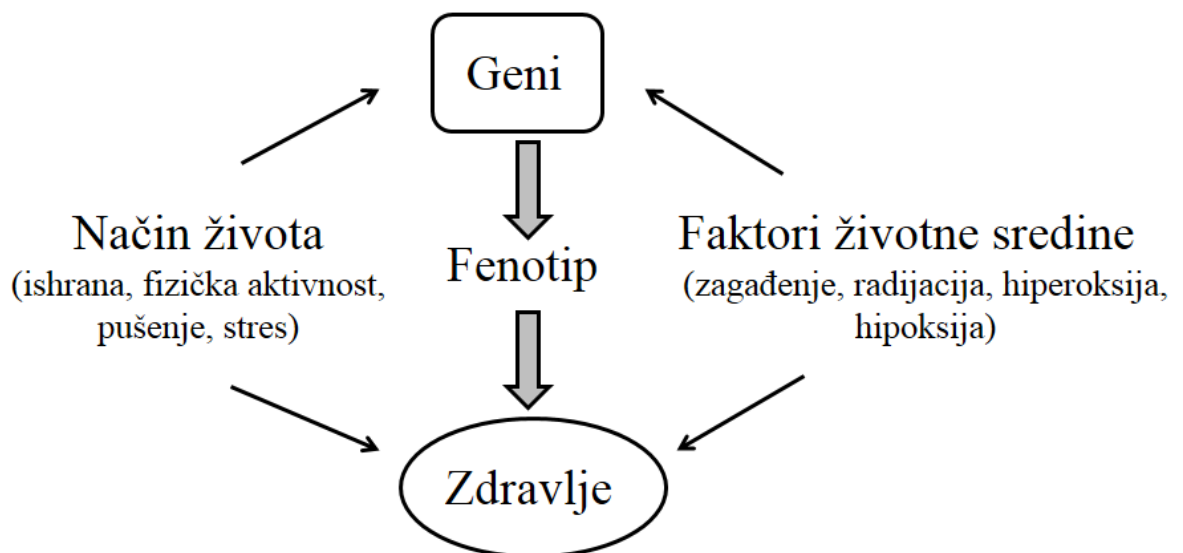
α-tok - α-tokoferol

α-tok· - α-tokoferil-radikal

I. UVOD

I.1. INTERAKCIJA GENA I SPOLJAŠNJIH FAKTORA

Gen je osnovna funkcionalna jedinica nasleđivanja, koju čini uređena sekvenca nukleotida locirana na hromozomu i koja nosi informaciju za sintezu specifičnih produkata. Transkripcijom se informacija sadržana u genima prevodi u molekul informacione ribonukleinske kiseline (iRNK), koja se translacijom prevodi u polipeptidni lanac. Geni određuju genotip organizma, a odgovori gena na spoljašnje faktore koji uključuju hormonske, metaboličke i neurološke promene u tkivima i organima manifestuju se kao fenotip, tj. merljiv odgovor gena na transkripciju i translaciju (1). Dok geni daju samo nacrt različitih fenotipskih karakteristika, faktori životne sredine i načina života mogu da modifikuju specifične strukturne i funkcionalne karakteristike organizma. Indukcija ili inhibicija ekspresije određenih gena regulisana je nizom činioca koji uključuju transkripcione faktore, hormone, fizičko-hemijsko stanje ćelije, metilaciju histona kojom se menja stanje hromatina i omogućava pristup genima i drugim faktorima (2,3). Nivo ekspresije gena daje uvid u to da li dolazi do ushodne ili nishodne regulacije specifičnih gena, koji od njih mogu biti odgovorni za nastanak određenih bolesti, ili imaju ulogu u specifičnim procesima kao što su starenje, fizička aktivnost i oksidativni stres (4).



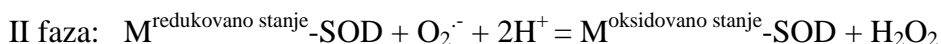
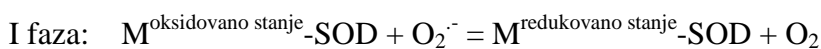
Slika 1. Interakcija gena i spoljašnjih faktora (Preuzeto iz Alessio HM, Hagerman AE (eds.) *Oxidative stress, exercise and aging*, 2006.)

I.2. ENZIMI ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE

I.2.1. Superoksid-dismutaza

Superoksid-dismutaza (SOD), E.C. 1.15.1.1, otkrivena od strane McCord-a i Fridovich-a 1969. godine (5), ima značajnu ulogu u odbrambenim mehanizmima ćelija izloženim prisustvu velike količine kiseonika. SOD katalizuje konverziju superoksid-anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$) do molekularnog kiseonika (O_2) i vodonik peroksida (H_2O_2), obezbeđujući njegovu potpunu eliminaciju brzinom 10.000 puta većom od one bez prisustva enzima.

Do sada su kod sisara identifikovani različiti izoenzimi SOD, strukture gena koji ih kodiraju i strukture proteina. Svi poznati izoenzimi SOD zahtevaju redoks-aktivne tranzicione metale u aktivnom centru koji su neophodni za njihovu katalitičku aktivnost. Mehanizam za metaloenzim-zavisnu dismutaciju $O_2^{\cdot-}$ se odvija u dva koraka. Prvobitno, oksidovana forma metala (Fe^{3+} , Cu^{2+} i Mn^{3+}) vezuje $O_2^{\cdot-}$ u reakciji gde preuzima elektron i oslobađa O_2 . U drugoj fazi, redukovani metaloenzim (Fe^{2+} , Cu^+ i Mn^{2+}) vezuje drugi $O_2^{\cdot-}$, proton, oslobađa H_2O_2 i vraća se u oksidovano stanje.



Tri glavna izoenzima SOD, Cu/Zn SOD, Mn SOD i ekstracelularna SOD (EC SOD), su identifikovana kod sisara sa različitom tkivnom distribucijom (6,7).

I.2.1.1. Cu/Zn SOD

Cu/Zn SOD ili SOD1 nalazi se u citoplazmi, lizozomima, peroksizomima, jedru ćelija i intermembranskom prostoru mitohondrija sisara (8-10). Kod sisara, jetra i bubrezi ima najveću količinu i aktivnost Cu/Zn SOD, kao i motorni neuroni. Humana Cu/Zn SOD je homodimer (molekulske mase 32 kDa), koji sadrži jedan jon Cu^{2+} i jedan jon Zn^{2+} vezanim za svaku subjedinicu (molekulske mase 16 kDa), a koja se sastoji od 153 aminokiseline. Uloga jona Cu^{2+} je od velike važnosti za funkciju enzima i njegova zamena sa drugim metalom, ili njegov gubitak iz proteinske strukture dovodi do inaktivacije enzima (5). Jon Zn^{2+} doprinosi stabilizaciji enzima. Cu/Zn SOD je osetljiv na inhibiciju cijanidom i proizvodom reakcije, H_2O_2 (6).

1.2.1.1.1. Polimorfizmi i regulacija ekspresije Cu/Zn SOD gena

Gen za Cu/Zn SOD se nalazi na 21. hromozomu kod ljudi (11). Humani hromozom 21 se intenzivno proučavao zbog njegove povezanosti sa Down-ovim sindromom i trizomijom 21. Iako pacijenti sa Down-ovim sindromom pokazuju 50% povećanje u aktivnosti Cu/Zn SOD zbog viših nivoa Cu/Zn SOD proteina, uloga ovog enzima u patogenezi ove bolesti nije, još uvek, u potpunosti jasna. Više od 90 polimorfizama Cu/Zn SOD gena su povezani sa amiotrofnom lateralnom sklerozom (ALS) ili Lou Gehrig-ovom bolešću. Ovaj fatalni poremećaj uzrokuje degradaciju motornog neurona u kortikospinalnom traktu, moždanom stablu i povezan je sa oksidativnim oštećenjima (12).

Cu/Zn SOD je široko distribuirana u različitim ćelijama (9). Njena ekspresija je stabilna i nije lako inducibilna kao kod drugih izoenzima SOD. Smatra se referentnim genom i neretko se koristi kao interna kontrola za ekspresiju i aktivnost Mn SOD (13). Uprkos saznanju da je Cu/Zn SOD konstitutivno ekspimirana, nivoi njene iRNK mogu biti regulisani različitim fiziološkim faktorima. Stimulusi koji dovode do ushodne regulacije Cu/Zn SOD ekspresije su: toplotni šok, UVB- i X- zračenje, teški metali, ozon, azot-oksidi, arahidonska kiselina, različite hemikalije (β -naftoflavon, t-butiril-hidrohinon, jodacetamid, fenobarbiton) (8). Analiza proksimalnog promotorskog regiona je utvrdila postojanje Sp1 (*engl.* specificity protein 1), Egr-1 (*engl.* early growth response protein 1), WT-1 (*engl.* Wilms tumor protein 1) i C/EBP (*engl.* CCAAT-enhancer-binding protein) vezujućih mesta koja su veoma važna za visoku ekspresiju Cu/Zn SOD (13). NF- κ B (*engl.* nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) se aktivira preko fosfatidilinozitol-3-kinaza (PI3K) signalnog puta i, takođe, dovodi do ushodne regulacije Cu/Zn SOD gena (13). Malo se zna o faktorima koji inhibiraju ekspresiju Cu/Zn SOD. Prekomerna produkcija TNF- α (*engl.* tumor necrosis factor α) u inflamatornim stanjima je povezana sa povećanim oksidativnim stresom (povećanom količinom O_2^- i njegovih reaktivnih metabolita), koji dovodi do nishodne regulacije Cu/Zn SOD gena preko JNK (*engl.* c-jun N-terminal protein kinases) i AP-1 (*engl.* activator protein 1) apoptotičkih signalnih puteva. Nishodna regulacija Cu/Zn SOD gena je pokazana u alveolarnim epitelnim ćelijama tipa II i plućnim fibroblastima nakon izlaganja hipoksiji. Antitumorski lek, mitomicin C, takođe, inhibira transkripciju gena u humanim HepG2 ćelijama hepatoma (13).

Podaci o ekspresiji gena Cu/Zn SOD kod ljudi tokom razvoja i starenja su kontradiktorni. Neki autori su pokazali da nema povećanja aktivnosti Cu/Zn SOD u plućima tokom kasne fetalne faze, dok su drugi dokumentovali povećanje i nivoa iRNK i aktivnosti tokom rasta (8).

1.2.1.2. Mn SOD

Mn SOD ili SOD2 je homotetramer sa znatno većom molekulskom masom (88kDa) u odnosu na Cu/Zn SOD. Svaka subjedinica molekulske mase od 22 kDa sadrži jon Mn^{3+} u aktivnom centru (14). Nalazi se u mitohondrijalnom matriksu gde obezbeđuje vitalnu zaštitu od reaktivnih jedinjenja kiseonika (ROS, *engl.* reactive oxygen species), koji nastaju u hiperoksiji. Nije osetljiv na inhibiciju cijanidom i H_2O_2 . Kod ljudi, aktivnost Mn SOD u renalnom korteksu je veća nego u drugim tkivima.

1.2.1.2.1. Polimorfizmi i regulacija ekspresije Mn SOD gena

Gen za Mn SOD je lociran na humanom hromozomu 6 (15). Opisano je nekoliko mutacija Mn SOD gena kod ljudi. Supstitucija alanina valinom na poziciji 9 dovodi do prevremenog starenja i povezana je sa povećanim rizikom za retku bolest motornih neurona posebno kod žena (16), sa nefamilijarnom idiopatskom kardiomiopatijom (17), ali nema efekta na pojavu Parkinsonove bolesti ili ALS kao mutacije u genu za Cu/Zn SOD (12). Mn SOD deficijencija rezultira u povećanju koncentracije mitohondrijalnog O_2^- koji inhibira komplekse I i II respiratornog lanca (18). Pokazano je da ima značajnu ulogu u ćelijskoj diferencijaciji, tumorogenezi (19) i da štiti pluća od efekata izazvanih hiperoksijom (17).

Indukcija Mn SOD gena kao odgovor na oksidativni stres je već davno dokazana. Jonizujuće zračenje, 12-O-tetradekanoilforbol 13-acetat, citokini IL-1 (*engl.* interleukin 1), IL-4, IL-6, TNF- α , lipopolisaharid i IFN- γ (*engl.* interferon- γ) su potentni aktivatori ekspresije gena u različitim tkivima i tipovima ćelija (8,13). Mesta regulacije transkripcije na promotorskom regionu koja su pod uticajem citokina (dužine 236 baznih parova) sadrže vezujuća mesta za transkripcione faktore NF- κ B, C/EBP i NF-1 (*engl.* nuclear factor 1). NF- κ B je identifikovan kao presudan transkripcioni faktor koji reguliše indukciju Mn SOD. Protein-kinaza C-stimulišući agensi indukuju ekspresiju gena za Mn SOD preko aktivacije CREB-1 (*engl.* cAMP responsive element binding protein 1) i ATF-1 (*engl.* cyclic AMP-dependent transcription factor), a ne preko NF- κ B

i AP-1. Interesantno je da citostatici kao što su vinblastin, taksol i vinkristin, takođe, indukuju ekspresiju Mn SOD gena aktivacijom protein-kinaze C. Joni magnezijuma, koji su u visokoj koncentraciji toksični za ćeliju, indukuju ekspresiju Mn SOD gena u kanceru dojke. PDGF (*engl.* platelet-derived growth factor), takođe, indukuje ekspresiju ovog gena u NIH3T3 ćelijama koja je povezana sa aktivacijom Egr-1 transkripcionog faktora (8,13).

Ekspresija Mn SOD je slična ekspresiji Cu/Zn SOD i specifična je za različite vrste. Kod ljudi Cu/Zn SOD i Mn SOD imaju sličan profil genske ekspresije koja se povećava sa odrastanjem u plućima i jetri, ali aktivnosti izoenzima nisu uvek u korelaciji sa nivoima iRNK (8).

1.2.1.3. Ekstracelularna SOD

Ekstracelularna SOD (EC SOD ili SOD3) je hidrofobni glikoprotein tetramerne strukture identičnih subjedinica molekulske mase od po 30kDa kod većine vrsta (7,20). Nakon uklanjanja signalnog peptida, protein EC SOD se sastoji od 3 domena: amino-terminalnog na kome se vrši glikozilacija, aktivnog mesta koje sadrži dvovalentne jone Cu^{2+} i Zn^{2+} i pokazuje homologiju sa Cu/Zn SOD i kratkog karboksi-terminalnog domena (21). EC SOD poseduje veliki afinitet za vezivanje za heparin i druge heparin-sulfate zahvaljujući pozitivno naelektrisanom heparin-vezujućem mestu koje se nalazi u okviru C-terminalnog domena (22). Polikatjonski matriks-vezujući domen EC SOD omogućava njegovo direktno vezivanje za površinu ćelija i/ili matriks vezivnog tkiva. Iako je, prvenstveno, pronađena u serumu (20), samo mala količina EC SOD je prisutna u krvi i vaskularnom endotelu, tako da je najviše enzima prisutno u ekstravaskularnoj frakciji (90–99%) (22). EC SOD je detektovana u limfi, ascitesu i cerebrospinalnoj tečnosti (20).

EC SOD ima ulogu da uklanja O_2^- i štiti tkiva od ekstraćelijskog oksidativnog stresa samo kada je vezana za proteoglikane (20). Takođe, sprečava i inflamaciju kao odgovor na bolesti pluća. Inflamatorne ćelije oslobađaju proteaze koje pripadaju proprotein-konvertujućoj porodici (furin) i oslobađaju EC SOD sa membrana, čime izlažu ekstraćelijski matriks oksidativnom dejstvu ROS i povećavaju koncentraciju EC SOD (23).

I.2.1.3.1. Polimorfizmi i regulacija ekspresije EC SOD gena

EC SOD gen se nalazi na humanom hromozomu 4 (21). Do danas je otkrivena samo jedna mutacija u centralnom delu karboksi-terminalnog domena sa pozitivno naelektrisanim ostacima aminokiselina, koji definiše heparin-vezujući domen. Supstitucija arginina glicinom na položaju 213 uzrokuje 8 do 15 puta povećanje u koncentraciji EC SOD u plazmi (24) i povećava rizik za pojavu kardiovaskularnih bolesti (25). Njena ekspresija je ograničena na specifične ćelije i tkiva, gde njena aktivnost prevazilazi aktivnosti druga dva izoenzima (21). Regulacija ekspresije EC SOD se, pored specifičnih transkripcionih faktora, vrši i sa NF- κ B, Sp1/Sp3 i C/EBP (22).

I.2.2. Paraoksonaza

Članovi multigenske porodice paraoksonaze (PON) imaju značajnu ulogu u održavanju niskog oksidativnog stanja u krvi i ćelijama i zaštiti od razvoja ateroskleroze (26-28). Pored antiinflamatornih i antiaterogenih osobina, pretpostavlja se da imaju značajne uloge u normalnim funkcijama ćelija (29). PON1, PON2 i PON3 se nalaze kao klasteri susednih gena na dugom kraku humanog hromozoma 7. Strukturno su veoma slični, pokazuju 70% sličnosti u sekvenci nukleotida i 60% sličnosti u redosledu aminokiselina. PON2 je prvi otkriveni član ove genske porodice, nakon koga su otkriveni PON1 i PON3 (30,31).

I.2.2.1. Paraoksonaza 1 (PON1)

PON1 je protein koji se sastoji od 354 aminokiseline sa molekulskom masom od 43 do 47 kDa. Sintetiše se u jetri gde pokazuje i najveću ekspresiju, a zatim se sekretuje u cirkulaciju gde je većim delom vezana za lipoproteinske čestice visoke gustine (*engl.* high-density lipoproteins - HDL). Normalna serumska aktivnost PON1 potiče, upravo, od ove vezane za HDL česticu. Mala količina PON1 se nalazi na lipoproteinskim česticama veoma niske gustine (*engl.* very low-density lipoprotein - VLDL) i postprandijalnim hilomikronima (26,31), dok nije nađena na lipoproteinskim česticama niske gustine (*engl.* low-density lipoproteins - LDL) (32).

S obzirom da PON1 poseduje organofosfataznu, arilesteraznu i laktonaznu aktivnost, hidrolizuje veliki broj različitih supstrata: oksone (paraokson, hlorporifos okson i diazokson kao toksične metabolite organofosfatnih insekticida), nervne otrove (sarin i

soman), aromatične estre (fenilacetat, tiofenilacetat i 2-naftilacetat) i aromatične i alifatične laktone. Takođe, PON1 katalizuje i reverznu reakciju, tj. laktonaciju γ - i δ -hidroksi-karbonskih kiselina. PON1 učestvuje u metabolizmu nekih lekova koji sadrže laktone i ciklične karbonate, među kojima su i inhibitori HMG-KoA (hidroksimetilglutaril-koenzim A) reduktaze - statini (mevastatin, lovastatin i simvastatin) (30,31,33,34).

Dobro je poznata antiaterogena uloga PON1. Ona štiti HDL i LDL čestice od oksidacije i katalizuje razgradnju biološki aktivnih oksidovanih lipida na lipoproteinima i u arterijskom zidu (27,31,35,36), čime usporava nastanak masnih ćelija i razvoj ateroskleroze. Endogeni supstrati i mehanizam antiaterogenog dejstva PON1 još uvek nisu u potpunosti poznati. Pretpostavlja se da je njena prirodna aktivnost laktonazna i fiziološki supstrati mogu biti neki laktoni koji ulaze u sastav hrane, metaboliti lekova (statini, spironolakton i glukokortikoid γ -laktoni), ili derivati oksidacije masnih kiselina kao što su lakton 5-hidroksi-(6,8,11,14)-eikozatetraenske kiseline (5-HETE), koji se nalazi na oksidovanim lipoproteinskim česticama (34). Pored antiaterogene, PON1 ima antiinflamatornu i antioksidativnu ulogu (30,34). Sposobnost da hidrolizuje perokside iz lipoproteinskih čestica (35) i sposobnost da uklanja oksidovane fosfolipide (36) su značajne u eliminaciji medijatora oksidativnog stresa. Ovim ulogama doprinosi i njena laktonazna aktivnost pošto postoji mnogo oksidovanih metabolita polinezasićenih masnih kiselina koji su strukturno slični laktonima.

Aktivnost i koncentracija PON1 u serumu pokazuje velike interindividualne varijacije. Starost utiče na PON1 aktivnost. Serumaska aktivnost je vrlo niska na rođenju, a zatim raste, i između 6 i 15 meseci dostiže nivoe odraslih osoba koji se održavaju relativno konstantnim tokom celog života. Ipak, progresivno smanjenje aktivnosti je detektovano kod starih osoba (37,39). Aktivnost PON1 može da varira u zavisnosti od patološkog stanja. Snižene aktivnosti su detektovane kod pacijenata sa dijabetesom tipa I i II, kod pacijenata: sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom koji su na hemodijalizi, sa reumatoidnim artritismom, hipertireoidizmom, Alchajmerovom bolešću, hroničnim hepatitisom i inflamatornim stanjima (37,39).

Različiti genetski faktori, polimorfizmi u promotorskom i kodirajućem regionu PON1, zajedno sa različitim spoljašnjim faktorima, utiču na aktivnost i koncentraciju PON1 u cirkulaciji (30,37-40).

I.2.2.1.1. Polimorfizmi i regulacija ekspresije PON1 gena

Najviše su proučavana dva glavna polimorfizma kodirajućeg regiona PON1 gena iako ih ima preko 160. Kod polimorfizma označenog kao Q192R, zamena kodona CAA sa CGA, u okviru egzona 6, dovodi do supstitucije aminokiseline glutamina argininom na poziciji 192 (41). Kod L55M polimorfizma, zamena kodona TTG sa ATG, u okviru egzona 3, dovodi do supstitucije leucina metioninom na poziciji 55 (42).

Q192R polimorfizam ne utiče na koncentraciju, ali značajno utiče na aktivnost PON1. Q192 i R192 izoforme imaju različite afinitete i katalitičke aktivnosti prema brojnim supstratima (37). R192 izoforma hidrolizuje paraokson 6 puta brže, a znatno sporije sarin, soman i diazokson nego Q192 izoforma (33,37). Takođe, razlikuju se u brzini hidrolize nekih laktona i karbonatnih estara (28,37).

L55M polimorfizam ne utiče na interakciju enzima sa supstratom, ali utiče na koncentraciju, aktivnost enzima i nivoe iRNK PON1. M55M izoforma je povezana sa niskom aktivnošću, koncentracijom i nivoima iRNK PON1 (42,43). M55M i L55L pokazuju različitu ulogu u zaštiti LDL čestice od oksidacije, pri čemu veći protektivni efekat ima M55M izoforma (43,44). Osobe, nosioci LL genotipa, imaju više nivoe iRNK (43) i veću koncentraciju enzima PON1 nego osobe nosioci MM genotipa (37,44). Promenjen PON1 status povezan sa L55M polimorfizmom potiče od toga što je ovaj polimorfizam u značajnoj interakciji sa polimorfizmom C(-108)T u promotorskom regionu PON1 gena koji utiče na ekspresiju i aktivnost PON1 (45).

U promotorskom regionu PON1 gena je identifikovano najmanje 5 polimorfizama koji se nalaze u okviru 1000 baza uzvodno od kodirajućeg regiona. Nalaze se na pozicijama -909 (G ili A), -832 (A ili G), -162 (A ili G), -126 (C ili G) i -108 (C ili T), pri čemu baza koja prethodi start kodonu nosi broj „-1“. Varijacije u aktivnosti promotorskog regiona značajno koreliraju sa razlikama u koncentraciji i aktivnosti PON1 u serumu i pokazuju jak uticaj na gensku ekspresiju PON1 (31,39-41).

Smatra se da polimorfizam T(-108)C najviše doprinosi varijaciji u nivoima PON1, dok ostali A(-162)G, G(-909)C i A(-832)G pokazuju male ili, uopšte, ne pokazuju efekte (83,92). Promotorski region u dužini od oko 200 baznih parova koji sadrži polimorfne pozicije -108 i -162 je dovoljan za transkripciju PON1 gena (31). Polimorfna pozicija -108 se nalazi u centru vezujućeg mesta za transkripcioni faktor Sp1. Prisustvo T na poziciji -108 prekida sekvencu koju prepoznaje Sp1 i vezivanje ovog faktora je slabije nego da je na istoj poziciji vezan C. Nosioci CC genotipa imaju povećanu

koncentraciju, aktivnost i nivoe iRNK PON1 (46,47). Polimorfna pozicija -162 se nalazi u okviru sekvence za koju se vezuje transkripcioni faktor NF-1. Prisustvo G na poziciji -162 prekida sekvencu vezujućeg mesta što dovodi do smanjenja ekspresije gena za PON1 (31,37,45-47).

Polimorfizmi u kodirajućem regionu utiču na katalitičku aktivnost, dok u promotorskom regionu utiču na ekspresiju gena za PON1. Ispitivanje samo polimorfizama PON1 nije dovoljno da objasni varijaciju u aktivnosti i koncentraciji PON1, iz razloga što spoljašnji faktori pokazuju značajan uticaj na status PON1 (45). PON1 status se određuje interakcijom polimorfizama i faktora koji moduliraju PON1 aktivnost u cirkulaciji.

1.2.2.2. Paraoksonaza 2 (PON2)

PON2 je intracelijski protein relativne molekulske mase od oko 44 kDa (30). PON2 gen je eksprimiran u skoro svim humanim tkivima, sa najvećom ekspresijom u jetri, plućima, placenti, testisima i srcu. iRNK PON2 je, takođe, nađena u zidu arterija: uključujući endotelne ćelije, glatke mišićne ćelije i makrofage (30), zatim u bubrezima, želucu, slezini, pankreasu, tankom crevu, skeletnim mišićima (48). Nije vezana za HDL i LDL čestice (30). PON2 se nalazi u ćeliji vezana za ćelijsku membranu (48). Smatra se da se samo mala količina PON2 sekretuje van ćelije ili da se enzim brzo degradira u ekstraćelijskom prostoru nakon sekrecije (30,48). PON2 ne hidrolizuje organofosfate kao što je paraokson, ali zato poseduje hidrolaznu i laktonaznu aktivnost (34). Proučavanje *in vivo* i *in vitro* modela je pokazalo da PON2 sprečava oksidaciju LDL čestice (49), inhibira hemotaksu monocita indukovanu oksidovanom LDL česticom, povećava efluks holesterola, smanjuje veličinu aterosklerotske regije (48) i poseduje antiapoptotsku sposobnost (50). PON2 obezbeđuje znatnu zaštitu od oksidativnog stresa i povećane sinteze triglicerida (TG) u makrofagama, u uslovima hiperglikemije i smanjuje razvoj vaskularnih komplikacija u dijabetes melitusu (48,50).

1.2.2.2.1. Polimorfizmi i regulacija ekspresije PON2 gena

Dva uobičajena polimorfizma PON2 gena vode supstituciji aminokiselina u primarnoj strukturi proteina. Alanin ili glicin mogu da se nađu na poziciji 148 (A148G), dok serin ili cistein mogu biti na poziciji 311 (S311C). A148G polimorfizam je povezan sa varijacijama u koncentraciji ukupnog holesterola (UH), LDL-holesterola (LDL-H),

glukoze u plazmi našte i sa težinom na rođenju. S311C polimorfizam je povezan sa koronarnom srčanom bolešću, akutnim infarktom miokarda kod pacijenata sa dijabetesom tipa II, Alchajmerovom bolešću i smanjenom koštanom masom kod žena u postmenopauzi (30,49,50).

Signalni putevi u modulaciji ekspresije PON2 uključuju uPA (*engl.* urokinase-type plasminogen activator), ERK1/2 (*engl.* extracellular signal-regulated kinases), PI3K, tirozin kinazu, NF-kB, PPAR γ (*engl.* peroxisome proliferator-activated receptor γ) i AP-1 (51-53). U skorije vreme, funkcionalna studija promotorskog regiona PON2 je utvrdila postojanje DNK elementa koji vezuje SREBP-2 (*engl.* sterol regulatory element-binding protein-2), a nalazi se između -593 i -575 baznih parova i smatra se da on može da ima glavnu ulogu u regulaciji PON2 gena (53).

1.2.2.3. Paraoksonaza 3 (PON3)

Od sva tri izoenzima, PON3 je otkrivena najkasnije. Molekulske je mase oko 40 kDa. Primarno se sintetise u jetri i vezuje se za HDL česticu u serumu, ali u mnogo manjoj meri nego PON1. Humana PON3 je, u najvećem stepenu, eksprimirana u jetri i bubrezima, sa manjom ekspresijom u drugim tkivima (54,55). Mišija PON3, za razliku od humane i zečije (54,56), nije detektovana u krvi i na HDL čestici (57), što sugeriše da se nalazi u ćeliji. Kod miševa PON3 je eksprimirana u velikom broju tkiva kao što su jetra, masno tkivo, makrofage, pluća, pankreas, želudac, debelo crevo, adrenalni korteks, submaksilarne žlezde. iRNK PON3 je detektovana i kod mladih i kod odraslih miševa sa tom razlikom što su kod odraslih nivoi bili značajno niži. Umereni nivoi iRNK PON3 su detektovani u srčanom zidu, korenu aorte, aterosklerotskim lezijama oko korena aorte, venama, vezivnom tkivu oko srca. Detekcija iRNK PON3 u korenu aorte i aterosklerotskim lezijama može da znači da PON3, verovatno, pokazuje lokalnu ateroprotektivnu i antioksidativnu ulogu (58).

PON3 nema paraoksonaznu aktivnost, ima veoma ograničenu arilesteraznu aktivnost, ali ima znatno veću laktoneznu aktivnost nego PON1. Ovim ulogama se mogu objasniti njeni povoljni efekti na oksidativno-stresni status i na razgradnju lipidnih hidroperoksida (LOOH). Kao i PON2, PON3 hidrolizuje aromatične i alifatične dugolančane laktone kao što je dihidrokumarin. PON3 hidrolizuje i lekove kao što su statini (lovastatin i simvastatin) i diuretici (npr. spironolakton) (31). Ima antioksidantnu ulogu kao i druga dva izoenzima PON (30,49,50,55). U HeLa ćelijama kod kojih je

inicirana ekspresija PON3, sprečeno je formiranje i funkcija umereno oksidovanih LDL čestica, nastajanje LOOH i hemotaksa monocita (54). *In vitro* studije su pokazale da PON3 štiti LDL česticu od oksidacije. PON3 se pokazala 100 puta efikasnijom da odloži LDL oksidaciju indukovanu bakrom nego PON1, iako je PON1 prisutna u 200 puta većoj količini nego PON3 na HDL čestici zeca (56). Smatra se da pored ateroskleroze, PON3 štiti i od nastanka metaboličkih poremećaja kao što je gojaznost (57).

I.2.2.3.1. Polimorfizmi i regulacija ekspresije PON3 gena

Identifikovana su dva polimorfizma PON3 gena. Kod jednog na poziciji 311 je serin ili treonin, a kod drugog na poziciji 324 je glicin ili aspartanska kiselina. Ovi polimorfizmi su detektovani kod ljudi koji žive u južnoj Italiji i njihove funkcionalne posledice nisu još uvek razjašnjene (30).

Regulacija ekspresije PON3 gena je, još uvek, nepoznanica i do sada je izučavana u samo par studija, koje će biti pomenute kasnije u tekstu.

I.3. VARIJACIJE U VREDNOSTIMA GENSKE EKSPRESIJE

Varijacije u vrednostima genske ekspresije mogu da se jave pod uticajem bioloških i tehničkih faktora. Intra- i interindividualne biološke varijacije proizilaze iz genetskih varijacija, etničke pripadnosti, interakcije genotipa i spoljašnjih faktora i fizioloških varijacija kao što su pol, starost, cirkadijalni ritam i menstrualni ciklus (59-61). Tehničke varijacije mogu biti uzrokovane različitim koracima eksperimentalnog postupka kao što su priprema uzorka, odvajanje ćelija i ćelijskih komponenti, izolacija RNK, reakcija reverzne transkripcije (RT), reakcija lančane polimeraze (*engl.* polymerase chain reaction ili PCR) (59,62).

I.3.1. Uticaj bioloških varijacija na gensku ekspresiju

Pol i starost su glavne determinante fizioloških i morfoloških karakteristika organizma, kao i osetljivosti za nastanak bolesti. Analiza profila ekspresije gena u krvnim ćelijama je pokazala malu varijabilnost između polova, ali je pokazala značajnu intraindividualnu varijaciju u odnosu na hormonalni status posebno kod žena tokom menstrualnog ciklusa

(62). Privremene varijacije u ekspresiji gena, obezbeđuju informacije o dinamičkom ponašanju gena. Studije su tako pokazale kod muškaraca, kod kojih nema hormonalnih promena, da se pojavljuje varijacija u genskoj ekspresiji tokom dana. Dnevna intraindividualna fluktuacija genske ekspresije reflektuje uticaj cirkadijalnog ritma na sličan način kao što se uočava i kod broja leukocita, sekrecije kortizola, lipidne peroksidacije i nekih drugih biohemijskih markera (63). Upravo, zbog uticaja bioloških faktora, studije su pokazale da postoje velike razlike u vrednostima genske ekspresije između zdravih, odraslih osoba koje bi dovele do toga da se smanji mogućnost da se na osnovu njih razlikuju zdrave od obolelih osoba (61,64). Međutim, Whitney i saradnici (59) su u svom istraživanju pokazali da postoji veća varijabilnost u vrednostima genske ekspresije u krvi kod bolesnih osoba (onih kod kojih je dijagnostikovao kancer ili neka bakterijska infekcija) nego kod osoba kod kojih nije dijagnostikovana bolest, što ukazuje da se ipak rezultati genske ekspresije dobijeni iz krvi mogu koristiti za dijagnostikovanje bolesti. Distribucija i koncentracija ćelija krvi, a posebno udeo limfocita i monocita kao ciljnih ćelija za izolaciju RNK, se mogu značajno razlikovati kod zdravih osoba i za vreme trajanja bolesti (59,60,63) i često su izvor varijabilnosti u količini izolovane RNK i u vrednostima genske ekspresije. Mononuklearne ćelije periferne krvi (MČPK) su se koristile da se ispita varijacija u vrednostima genske ekspresije kod zdravih osoba (59) sa ciljem da se utvrdi da li bi se one mogle koristiti za razlikovanje zdravih od bolesnih osoba i da se ustanove mehanizmi nastanka nekih bolesti. Iako su interindividualne varijacije u vrednostima genske ekspresije iz MČPK bile značajne (59), one su bile mnogo manje od onih dobijenih iz pune krvi obolelih osoba. Ova zapažanja govore u prilog tome da korišćenje MČPK pre nego pune krvi predstavlja efektivan pristup za smanjenje interindividualnih varijacija. Određivanje genske ekspresije iz njih može postati dragocen način za dijagnostifikovanje bolesti i praćenje efekata terapije.

Da bi određivanje genske ekspresije iz biološkog materijala postalo pouzdano i reproducibilno sredstvo u kliničkim istraživanjima, potrebno je utvrditi sve faktore koji utiču na varijabilnost njenih vrednosti kod zdravih osoba. Dobro poznavanje varijabilnosti u ekspresiji gena kod zdravih osoba je fundamentalno za razumevanje promenjene ekspresije tokom bolesti (59,61). Stoga, sposobnost da se prepozna bolest zavisi od dizajna studije koji bi bio takav da eliminiše sve faktore koji mogu da prouzrokuju varijabilnost u vrednostima genske ekspresije, a koja nije povezana sa bolešću. Da bi se ovo postiglo potrebno je kontrolisati veliki broj različitih koraka

uključenih u kvantifikaciju specifičnih iRNK. Količina specifičnih iRNK može drastično da varira u fiziološkim i patološkim stanjima i da utiče na tačnost kvantifikacije. Ovo predstavlja poseban izazov kod malih promena genske ekspresije i kod malih koncentracija iRNK prisutnih u uzorku.

I.3.2. Uticaj fizičke aktivnosti na gensku ekspresiju

Fizička aktivnost je posebno važan faktor koji direktno utiče na gene koji regulišu zdravlje i životni vek. Sa druge strane, hronična fizička neaktivnost može da utiče na gene koji aktiviranjem mogu da naruše zdravlje i da doprinesu razvoju hipokinetičkih bolesti. Od nedavno se pokazalo sve veće interesovanje da se ispita veza između fizičke aktivnosti i ekspresije gena u cilju da se shvate osnovni mehanizmi preko kojih vežbanje doprinosi zdravlju i dugom životnom veku. Takođe, identifikacija gena koji se aktiviraju u skladu sa izvođenjem ili nedostatkom fizičke aktivnosti mogla bi da pruži korisne podatke za prevenciju i lečenje bolesti (4).

I.3.2.1. Fizička aktivnost i oksidativni stres

Pod fizičkom aktivnošću se generalno mogu smatrati svi pokreti koji nastaju kontrakcijom skeletnih mišića. Uglavnom se primenjuje aerobno vežbanje koje uključuje dinamičke i ritmičke pokrete mišića u trajanju dužem od 10 sekundi koje zahteva kiseonik za metabolizam lipida i glikogena ili glukoze u cilju dobijanja i transfera energije. Drugi model je obično kratkotrajno i intenzivno vežbanje (anaerobnog tipa), koje koristi kratkotrajne izvore energije dobijene iz adenozin-trifostata (ATP) i keratin-fosfata (4).

Tokom fizičke aktivnosti, mišićne kontrakcije dovode do nastanka izvesne količine mehaničkog i metaboličkog stresa koji potencijalno mogu da dovedu do osećaja bola i umora mišića i/ili oštećenja mišića (4,65). Mehanički i metabolički stres koji se javlja, gotovo, tokom svakog tipa vežbanja doprineće njenoj prooksidantnoj aktivnosti povećavajući stvaranje slobodnih radikala, prvenstveno ROS. Prekomerna količina stvorenih slobodnih radikala (atom, atomska grupa ili molekula sa jednim ili više nesparenih elektrona) kiseonika, azota, fosfora i sumpora može da dovede do poremećaja u ravnoteži antioksidanasa i prooksidanasa koji uzrokuju oksidativna oštećenja osetljivih molekula, kao što su nezasićene masne kiseline u membranama, tiolne grupe u proteinima i nukleinske baze u sastavu dezoksiribonukleinske kiseline

(DNK). Pored toga što su izuzetno nestabilni i reaktivni, slobodni radikali mogu da napadaju susedne biomolekule u sredini u kojoj se nađu i da iniciraju stvaranje novih slobodnih radikala. Smatra se da ovakvo stanje koje se naziva „oksidativni stres“ učestvuje u patogenezi mnogih bolesti (66).

Tokom vežbanja ROS nastaju iz nekoliko različitih izvora:

1. Nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) – ubihinon-reduktaza i ubihinon citohrom-c reduktaza u mitohondrijalnom lancu transporta elektrona su glavni izvori slobodnih radikala, gde čak 2 do 5% protoka elektrona stvara $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 . Metalom katalizovana Fenton-ova ili Haber-Weiss-ova reakcija između $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 može da nagradi najreaktivniji slobodni radikal u biološkim sistemima, hidroksil-radikal (OH^{\cdot}) (67).

2. Tokom ishemije ili anaerobnog vežbanja, ATP se razlaže na adenzin-difosfat (ADP) i adenzin-monofosfat (AMP) da bi obezbedio energiju za kontrakciju mišića. AMP se kontinuirano degradira do hipoksantina koji može da se konvertuje do ksantina i mokraćne kiseline uz redukciju O_2 jednim elektronom i nastankom $O_2^{\cdot-}$. Da bi došlo do aktivacije ovog puta, dovoljne količine hipoksantina i ksantina moraju biti prisutne u ćeliji. Enzim ksantin-oksidadza mora da se konvertuje iz redukovanog oblika (ksantin-dehidrogenaza) u oksidovani oblik pomoću intraćelijskih proteaza koje aktivira kalcijum (68,69). Takođe, povećava se sekrecija kateholamina koji mogu da podležu autooksidaciji u odsustvu ili prisustvu O_2 i da stvaraju $O_2^{\cdot-}$. Stvara se i mlečna kiselina koja se akumulira tokom intenzivnih vežbi kada dostavljanje kiseonika ne zadovoljava potrebe i ona može da prevede $O_2^{\cdot-}$ u OH^{\cdot} (70).

3. Aktivirani neutrofili i monociti koji infiltriraju povređene mišiće tokom inflamatornog procesa oslobađaju $O_2^{\cdot-}$ nastao dejstvom mijeloperoksidaze i nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat (NADPH)-oksidaze (71).

4. Pod fiziološkim uslovima, mikrozomi u jetri stvaraju slobodne radikale kao sporedne produkte detoksifikacije ksenobiotika, uglavnom, putem citohrom P450 kompleksa. NADPH predaje elektron O_2 i gradi $O_2^{\cdot-}$ u reakciji katalizovanom oksidazom mešovite funkcije, a $O_2^{\cdot-}$ može dalje da bude preveden u H_2O_2 (68).

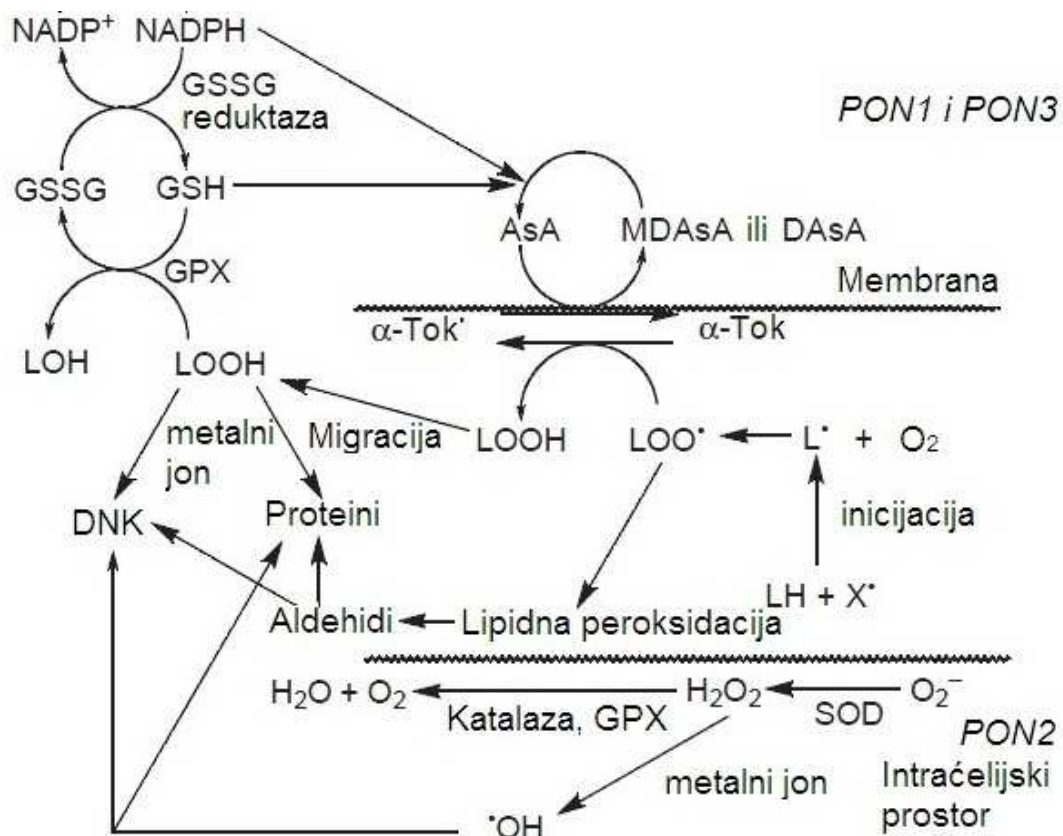
5. Peroksizomi stvaraju H_2O_2 , ali ne $O_2^{\cdot-}$ prilikom oksidacije masnih kiselina i D-amino kiselina (68).

Prva tri puta doprinose značajnom nastanku slobodnih radikala u mišićima pod fiziološkim i patološkim uslovima, dok su preostala dva od manjeg značaja za skeletne mišiće, zato što sadrže malo mikrozoma i peroksizoma.

Ekperimentalni podaci dobijeni elektronskom paramagnetnom rezonancom su pokazali da naporno, intenzivno vežbanje zaista izaziva povećanu produkciju slobodnih radikala u mišićima i jetri pacova. Glavni slobodni radikal koji nastaje je semihinon ili ubisemihinon čime je potvrđena teorija nastanka najveće količine slobodnih radikala u mitohondrijama (72).

1.3.2.2. Antioksidativna zaštita u organizmu

Antioksidansi smanjuju oksidativno oštećenje biomolekula sprečavanjem nastanka slobodnih radikala ili njihovim neutralisanjem pre nego što reaguju sa biomolekulima. Da bi se smatrali efikasnim, oni ne samo da treba da neutrališu slobodne radikale, već i da daju proizvode koji su manje reaktivni od početnih. Antioksidansi mogu biti endogena jedinjenja (enzimski i neenzimski antioksidansi) koje stvara organizam ili egzogena jedinjenja, tj. esencijalni antioksidansi koji se unose hranom (66).



Slika 2. Slobodno-radikalske reakcije i odgovor antioksidativne zaštite u intra- i ekstraćelijskom prostoru (Preuzeto iz Aldini G, Yeum KJ, Niki E, Russell RM (eds.) *Biomarkers for Antioxidant Defense and Oxidative Damage: Principles and Practical Applications*, 2010.)

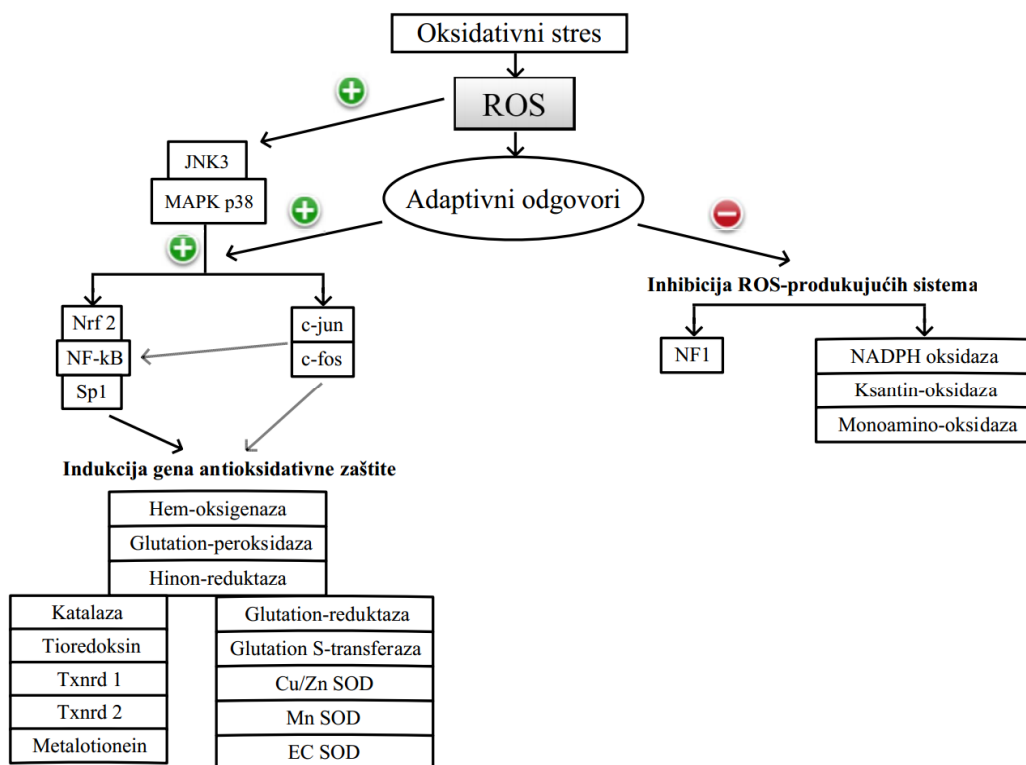
Da bi se ocenila uloga antioksidanasa, analizirane su slobodno-radikalske reakcije (Slika 2). Slobodni radikal ($X\cdot$) inicira reakciju nastanka alkil-radikala ($L\cdot$) izdvajanjem atoma vodonika iz lipida membrane (LH). Nastali radikal ($L\cdot$) reaguje sa kiseonikom iz lipida formirajući alkilperoksil-radikal ($LOO\cdot$), koji može da se neutrališe pomoću α -tokoferola (α -tok) pri čemu nastaje LOOH i α -tokoferil-radikal (α -tok \cdot). α -tokoferol je esencijalni, liposolubilni antioksidans koji se nalazi u sastavu ćelijske membrane i posebno je efikasan u vezivanju i inaktiviranju slobodnih radikala koji potiču iz unutrašnje mitohondrijalne membrane i drugih membrana (73). α -tok \cdot se obnavlja na ćelijskoj membrani redukcijom pomoću askorbinske kiseline (AsK). Ona se konvertuje u monodehidroaskorbinsku (MDAsK) ili dehidroaskorbinsku kiselinu (DAsK) i obe se dalje redukuju u askorbinsku kiselinu različitim reakcijama koje koriste NADPH ili tripeptid glutation (GSH) (73,74). Askorbinska kiselina je hidrosolubilni antioksidans koji se nalazi u citozolu i ekstraćelijskoj tečnosti. Njene hemijske osobine joj omogućavaju da direktno reaguje sa $O_2^{\cdot-}$ i $OH\cdot$ u plazmi, štiteći spoljašnjost ćelijske membrane od oštećenja (74). $O_2^{\cdot-}$ se uspešno redukuje aktivnošću SOD. Nastali H_2O_2 se zatim konvertuje u netoksična jedinjenja (O_2 i H_2O) pomoću katalaze ili glutation-reduktaze (GPx). Kombinacija ovih enzima je efikasan način da se ukloni $O_2^{\cdot-}$ iz ćelije. Ukoliko uspe da izbegne ovaj enzimski mehanizam, $O_2^{\cdot-}$ može da nagradi $OH\cdot$ u Fenton-ovoj reakciji. GSH je najzastupljeniji neproteinski izvor sulfhidrilnih (SH) grupa u ćeliji. Redukuje H_2O_2 i organske perokside (npr. LOOH) u reakciji koju katalizuje GPx pri čemu nastaje oksidovani glutation (GSSG) koji se pomoću glutation-reduktaze (GR) ponovo prevodi u redukovani oblik uz oksidaciju koenzima NADPH (66). GSH vezuje $OH\cdot$ i singlet kiseonik (1O_2) za koje ne postoji enzimska antioksidativna zaštita u organizmu (75). $LOO\cdot$ može da izdvoji atom vodonika iz lipida pri čemu nastaju LOOH i $LOO\cdot$, koji propagira dalju lipidnu peroksidaciju. LOOH ima dovoljno vremena da migrira u ćeliju i da samostalno, ili u kombinaciji sa jonima metala reaguje sa ćelijskim komponentama. Na ovaj način LOOH prenosi lanac slobodno-radikalskih reakcija intraćelijskim komponentama, kao što su DNK i proteini (76). Transferin i ceruloplazmin sprečavaju da joni metala učestvuju u Fenton-ovoj reakciji i tako smanjuju mogućnost nastanka $OH\cdot$ (66).

Sa slike 2 se može videti da oksidativni stres utiče na nivo fizioloških antioksidanasa i/ili odnos oksidovanih/redukovanih antioksidanasa.

I.3.2.3. Regulacija genske ekspresije slobodnim radikalima

Za ROS se prvobitno smatralo da su štetni za ćeliju, zato što njihovo prekomerno stvaranje narušava homeostatsku ravnotežu koja postoji između prooksidanasa i antioksidanasa. Međutim, poslednjih decenija je prepoznata njihova uloga u specifičnim putevima ćelijske signalizacije. Ova oba efekta utiču na brojne procese koji određuju funkcije ćelija i njihovo preživljavanje (66). Vežbama indukovane promene u telu i ćelijama prate klasičan fiziološki koncept hormeze koji kaže da male doze oksidativnog stresa i toksina mogu da povećaju toleranciju organizma da podnese veći stres i veću količinu toksina (77). Prema tome, sam oksidativni stres je najbolji način da se poveća endogena antioksidativna zaštita. Male doze ROS koje nastaju tokom umerenog vežbanja utiču na signalne puteve kao glasnici i indukuju adaptivne odgovore ćelije koje štite od kasnijeg jačeg stresa koji se javlja tokom vežbanja visokog intenziteta. Ove adaptacije predstavljaju rezultat kumulativnog efekta vežbanja na gensku ekspresiju enzima antioksidativne zaštite (4).

Genska kontrola nivoa antioksidanasa i prooksidanasa se vrši tokom dugotrajne i kratkotrajne fizičke aktivnosti, to jest u okviru nekoliko minuta od spoljašnjeg stresa. Akutni odgovor organizma na vežbanje uključuje različite regulatorne mehanizme: 1. metaboličke promene u cilju povećanja transfera energije; 2. hipertrofiju mišića; 3. popravke oštećenja mišića; 4. ushodnu regulaciju enzima antioksidativne zaštite i 5. inhibiciju oksidaza koje povećavaju stvaranje prooksidanasa (4). Vežbanje reguliše ekspresiju gena preko ROS i to oksidacijom, modifikacijom DNK ili delovanjem kao ćelijski signalni molekuli koji mogu da indukuju ili inhibiraju ekspresiju specifičnih gena. Prema istraživanju grupe autora (78), indukcija ekspresije enzima antioksidativne zaštite se podudara sa povećanjem oksidativnog oštećenja proteina, čime je potvrđena veza između oksidativnog stresa i genske ekspresije enzima antioksidativne zaštite. „GenMAPP“ opisuje regulatorne puteve koji inhibiraju specifične prooksidantne puteve i indukuju antioksidantne puteve. ROS imaju ulogu sekundarnih ili tercijarnih glasnika u aktivaciji ovih redoks-osetljivih puteva (79) (slika 3).



Slika 3. Signalni putevi aktivirani oksidativnim stresom (Preuzeto iz Alessio HM, Hagerman AE (eds.) *Oxidative stress, exercise and aging*, 2006.)

ROS inhibiraju ekspresiju gena za NADPH-oksidazu, ksantin-oksidazu i monoamino-oksidazu, tj. enzime koji dovode do stvaranja slobodnih radikala. Sa strane antioksidanasa, JNK3 i MAPK p38 (*engl.* mitogen-activated protein kinase p38) iniciraju aktivaciju transkripcionih faktora koji kontrolišu ekspresiju antioksidativnih enzima kao što su SOD, GPx i katalaza (slika 3). Pokazano je da se korišćenjem specifičnih NF-κB inhibitora sprečava oksidansima indukovana ekspresija katalaze i GPx, što potvrđuje hipotezu da ROS mogu da moduliraju nivo iRNK antioksidativnih enzima aktivirajući redoks-osetljive transkripcione faktore, kao što su NF-κB i AP-1 (80,81). Hollander i saradnici (81) su sugerisali da akutno vežbanje može da predstavlja dovoljan oksidativni stres da aktivira transkripciju gena preko NF-κB puta.

1.3.2.4. Fizička aktivnost i antioksidativna zaštita

Generalno, većina studija govori u prilog tome da utrenirane atlete imaju nadmoćniji sistem antioksidativne zaštite koja sprečava akumulaciju markera oksidativnog stresa tokom submaksimalnog vežbanja. Ipak, tokom i nakon maksimalnih napora čak i atlete, u dobroj sportskoj formi, mogu da osećaju znake i simptome metaboličkog i mehaničkog stresa u smislu akumulacije produkata oksidativnog stresa (povećane koncentracije malondialdehida (MDA), tiobarbituratna kiselina-reagujućih supstanci (TBKRS), LOOH, 8-hidroksi-2'-deoksigvanozin (8-OH-dG)) ili mišićnog oštećenja (povećanje aktivnosti kreatin-kinaze i koncentracije 3-metil histidina) i bola. Čini se paradoksalno da oksidativni stres nastao u vežbanju profesionalnih sportista može da uzrokuje oštećenje DNK i da dovede do povećanog nivoa oksidovanih baza, kao što su 8-OH-dG i mogućih mutacija i rizika za nastanak različitih bolesti, kao što je npr. kancer. Ipak, pretpostavlja se da kod dobro utreniranih osoba postoje tri puta koji se odvijaju paralelno da smanje oksidativno oštećenje DNK: 1. smanjenjem stvaranja ROS, posebno tokom submaksimalnih vežbi; 2. povećanjem aktivnosti enzima antioksidativne zaštite i 3. povećanom reparacijom DNK (4).

Gotovo sve studije su istovremeno ispitivale uticaj različitih vrsta fizičke aktivnosti na aktivnost i gensku ekspresiju izoenzima Cu/Zn SOD i Mn SOD kod ljudi i eksperimentalnih životinja. Fudbalski treninzi (82-84), maraton i polumaraton (85), biciklistička planinska vožnja (86) dovode do povećanog oksidativnog stresa, ali i kompenzatornog povećanja kapaciteta antioksidativne zaštite, prvenstveno, preko povećanja aktivnosti izoenzima SOD. Još uvek ostaje pitanje da li će se oksidativni stres javiti tokom dugotrajnog ili intenzivnog vežbanja. Zaključci su oprečni. Intenzitet, ali ne i trajanje, je glavna determinanta oštećenja DNK, odnosno glavni faktor u vežbama indukovanom oksidativnom stresu što ipak ne znači da dugotrajno vežbanje ne utiče na nastanak oksidativnog stresa (87). Smatra se da dugotrajno i intenzivno treniranje koje se karakteriše produženim ritmičkim vežbanjem, malog otpora sa velikim brojem ponavljanja, dovodi do ushodne regulacije enzima mišićnog antioksidativnog sistema (88,89). Međutim, kombinacija dužine trajanja i intenziteta vežbanja je pokazala različite efekte na aktivnosti i gensku ekspresiju Cu/Zn SOD i Mn SOD u limfocitima (90-92). Aerobno treniranje je uzorkovalo povećanje ekspresije Mn SOD u limfocitima nakon vežbi maksimalnog opterećenja pre početka ispitivanog perioda od 3 meseca. Međutim, nakon 3 meseca nije bilo razlike u njenim nivoima u poređenju pre i posle

maksimalnih vežbi opterećenja, dok se vrednosti genske ekspresije Cu/Zn SOD nisu menjale tokom ispitivanog perioda treniranja (91). Akutno intenzivno vežbanje koje je dovelo samo do ushodne regulacije Mn SOD gena potvrđeno je i u skeletnim mišićima pacova nakon jedne serije vežbanja (81). Genska ekspresija Mn SOD veoma brzo se prilagođava promenjenom prooksidantnom/antioksidantnom statusu u humanim limfocitima (80,81). Kod eksperimentalnih životinja nisu dobijeni konzistentni rezultati aktivnosti i genske ekspresije izoenzima SOD između različitih organa. Dugotrajno i intenzivno treniranje u srcu, plućima, jetri i skeletnom mišiću miševa koji su bili izloženi plivanju smanjilo je aktivnosti izoenzima SOD, dok su u bubrezima aktivnosti bile povećane (92). Genska ekspresija Cu/Zn SOD je u srcu bila smanjena, u jetri povećana, a u drugim organima nije bilo razlike, dok se genska ekspresija Mn SOD u svim testiranim organima nije menjala pod uticajem dugotrajnog i intenzivnog treniranja.

Pokušaji da se generalizuje nastanak oksidativnog stresa i odgovor antioksidativne zaštite nakon fizičke aktivnosti su do sada ostali neuspešni zbog vrste, načina i dužine treninga, tipa biološkog materijala (organi eksperimentalnih životinja, limfociti i mišići ljudi) korišćenih za analizu, komplikovanih mehanizama nastanka i odbrane od slobodnih radikala, različitih metoda za određivanje enzimskih aktivnosti i kvantifikacije genske ekspresije. Ipak, najvažniji uzrok neslaganja dosadašnjih studija se dovodi u vezu sa kompleksnom genskom regulacijom enzima antioksidativne zaštite.

I.3.3. Uticaj različitog tipa dijeta na gensku ekspresiju

Sastav hrane značajno utiče na ekspresiju gena kod sisara. Odgovor organizma na sastav hrane sastoji se u različitoj ekspresiji gena, i u mnogim slučajevima je specifičan za svaki genotip. Pored uloge u obezbeđivanju energije i efekata na sastav lipidnih membrana, hrana bogata mastima ima značajan uticaj na gensku ekspresiju dovodeći do promena u metabolizmu, rastu i ćelijskoj diferencijaciji. Efekti masti na gensku ekspresiju reflektuju adaptivne odgovore na promene u kvalitetu i kvantitetu digestovanih masti. Kod sisara, masne kiseline regulišu ekspresiju gena aktivacijom transkripcionih faktora HNF4 α (*engl.* hepatocyte nuclear factor 4 α), NF- κ B, SREBP1c i PPAR α , $-\beta$, i $-\gamma$) i to na tri načina: 1. direktnim vezivanjem masnih kiselina, acil-koenzima A (acil-KoA) ili oksidovanih masnih kiselina za transkripcione faktore; 2. regulacijom G-proteina na površini ćelijskih membrana oksidovanim masnim

kiselinama i aktivacijom intraćelijskih signalnih puteva i 3. regulacijom intraćelijske koncentracije kalcijuma koja utiče na ćelijske signalne puteve (93).

Proaterogena dijeta pokazuje štetan efekat na nivoe HDL-holesterola (HDL-H) i generalno teži da smanji PON1 aktivnost (94). Efekti različitih tipova zasićenih masti na PON1 status su ispitivani kod eksperimentalnih životinja. Normalni miševi i miševi kod kojih je izbačen gen za LDL receptor su dobijali aterogenu hranu koja je dovela, ne samo do značajnog pada genske ekspresije i aktivnosti PON1, već i pokazala negativnu korelaciju sa PON1 aktivnošću kod mužjaka (preko smanjenja nivoa iRNK) i ženki (preko smanjenja koncentracije HDL-H) (95). Aterogena dijeta (koja je sadržala 0,5% holesterola), u periodu od 14 nedelja, kojom su tretirani zečevi rezultirala je u 50% smanjenju PON1 aktivnosti u serumu. Nakon 16 nedelja proteinske dijetete istih zečeva, aktivnost PON1 se samo delimično vratila na početne vrednosti (96). Konzumiranje soka od nara bogatog polifenolima i drugim antioksidansima, takođe, povećava PON1 aktivnost. Među polifenolima koji se unose hranom, naringenin, flavon i kvercentin ne samo da štite od gubitka PON1 aktivnosti zbog svojih antioksidativnih osobina, već i povećavaju ekspresiju gena za PON1. Studija Gouedard-a i kolega je prikazala da kvercentin i naringenin povećavaju aktivnost PON1 promotora u ćelijskoj liniji H7 humanog hepatoma u istim koncentracijama u kojima su indukovali njegovu aktivnost *in vivo* (97). Ipak, efekti antioksidanasa (vitamina C, E i β -karotena) na aktivnost PON1 su pokazali nekonzistentne rezultate u različitim istraživanjima (37,39,40).

Arahidonska kiselina koja se, generalno, smatra proinflamatornom masnom kiselinom, povećava nivoe iRNK i aktivnost PON2 u makrofagama i smanjuje brzinu biosinteze holesterola regulacijom transkripcionih faktora AP-1 i PPAR γ . Suprotno ovom, nivoi iRNK i aktivnost PON2 su bili smanjeni u makrofagama miševa koji nisu imali gen za Δ^6 -desaturazu i koji nisu mogli da konvertuju linolensku u arahidonsku kiselinu (50). Ekspresija i enzimska aktivnost PON2 su indukovane kao odgovor na oksidativni stres u ćelijskim linijama (HepG2 i makrofagama), mišijim peritonealnim makrofagama, životinjskim modelima (miševi hranjeni sa aterogenom dijetom i miševi kod kojih je uklonjen gen za apoE) i kod hiperholesterolemičnih pacijenata (98-101). Polifenoli iz soka nara su, takođe, indukovali ekspresiju gena za PON2 i njegovu laktonaznu aktivnost, a koje su se smanjile dodatkom PPAR γ inhibitora (GW9662) (101). Kvercentin u kulturi makrofaga je povećao i ekspresiju i koncentraciju PON2, dok isti efekti nisu pokazani na ljudima, verovatno, zbog brzog metabolizma kvercentina (51).

I.3.4. Uticaj terapije hipolipemicima na gensku ekspresiju

Još uvek se malo zna o farmakološkoj regulaciji PON1 gena, iako su istraživanja počela pre više od dve decenije. Za sada su najviše proučavani efekti statina i fibrata (PPAR α agonista) na PON1 status. Lekovi koji bi ciljno delovali na aktivnost/ekspresiju PON1, za sada, nisu otkriveni.

Od hipolipemika najveću primenu imaju statini kao relativno nova i efikasna grupa lekova koja se široko primenjuje u cilju smanjenja koncentracije UH i LDL-H. Statini ispoljavaju mnogobrojne druge efekte kao što su: poboljšanje stanja oštećenog endotela, povećanje raspoloživosti azot-monoksida, antioksidativne i antiinflamatorne uloge, stabilizacija aterosklerotskog plaka. Stoga, statini se koriste u prevenciji nastanka i smanjenju posledica kardiovaskularnih bolesti (102). Oni su specifični, reverzibilni, kompetitivni inhibitori HMG-KoA-reduktaze, glavnog regulatornog enzima u biosintezi holesterola. Iako im je glavna uloga da blokiraju sintezu endogenog holesterola, njihov značaj je znatno veći od ovog koji proističe iz navedenog mehanizma. S obzirom da poseduju antioksidativne sposobnosti (103), poslednjih decenija je došlo do sve većeg interesovanja da se ispita na koji način statini ispoljavaju dejstvo na status enzima antioksidativne zaštite. Regulacija genske ekspresije enzima antioksidativne zaštite statinima se, uglavnom, vrši regulacijom transkripcije. Studije su došle do oprečnih zaključaka.

Ranija studija od strane Beltowskog i saradnika (104) je pokazala da terapija normolipidemičnih pacova fluvastatinom, ali ne i pravastatinom, smanjuje aktivnost PON1 u serumu i jetri. Slično smanjenje u aktivnosti i nivoima iRNK PON1, uzrokovano smanjenjem aktivnosti njenog promotorskog regiona, indukovano je pravastatinom, simvastatinom i fluvastatinom u ćelijskoj liniji H7 humanog hepatoma (105). Međutim, u ćelijskoj liniji (HepG2) humanog hepatoma, simvastatin je uzrokovao ushodnu regulaciju PON1 gena povećavajući količinu NF-1 i SREBP-2 transkripcionih faktora (106). U nastavku njihove prethodne studije, Deakin i saradnici (107) su potvrdili ulogu SREBP-2 i Sp1 u povećanju ekspresije PON1 uzrokovanom simvastatinom u HepG2 ćelijama. Interakcija Sp1 i SREBP-2 može biti jedan od načina na koji C(-108)T polimorfizam utiče na PON1 promotorsku aktivnost (106). Deakin i kolege (107) su išli korak dalje i pokazali da je ekspresija PON1 bila veća za oko 12% kod terapije simvastatinom kod pacijenata nosioca C(-108)C genotipa nego kod nosioca T(-108)T genotipa. Za razliku od ovih saznanja, Sardo-ova grupa (108) je pokazala da

terapija hiperholesterolemičnih pacijenata atorvastatinom povećava PON1 aktivnost nezavisno od T(-108)C, Q192R i L55M polimorfizama. Generalno posmatrano, statini pokazuju povoljne efekte na PON1 status, stimulišući njegovu ekspresiju i sprečavajući njegovu inaktivaciju sopstvenim antioksidantnim sposobnostima.

U poređenju sa bezafibratom, klofibratom i gemfibrozilom, fenofibrat se pokazao efikasniji u povećanju aktivnosti promotora, nivoa iRNK i aktivnosti PON1 u ćelijskoj liniji H7 humanog hepatoma. Bezafibrat je, takođe, pokazao efekte na ekspresiju PON1, ali u znatno manjem stepenu nego fenofibrat. Gemfibrozil je pokazao povoljne efekte na kardiovaskularne bolesti u kliničkim studijama, ali nije imao efekte na aktivnost PON1 promotora (105).

Povećana ekspresija PON2 je bila uočena kod terapije hipolipemicima (atorvastatin) i hipoglikemijskih lekova (roziglitazon). Oba leka su povećala ekspresiju i aktivnost PON2, što je dovelo do smanjenog ćelijskog oksidativnog stresa u humanim makrofagama hiperholesterolemičnih pacijenata, J774A.1 ćelijama makrofaga i mišijim makrofagama (51,52,101).

U kulturi Caco-2 ćelija koje su bile izložene oksidativnom stresu, genska i proteinska ekspresija PON3 bila je nepromenjena, iako je njena laktonazna aktivnost prema statinima bila smanjena (55). Slično se pokazalo i u peritonealnim makrofagama kod miševa soja C57BL/6 koji su bili izloženi različitim prooksidansima pri čemu nisu uočene promene u nivou iRNK PON3, dok je njena laktonazna aktivnost prema statinima bila smanjena. Suplementacija ovih miševa sa sokom od nara ili vitaminom E je povećala aktivnost, ali ne i ekspresiju PON3 gena (100). U ćelijama sličnim makrofagama (J774 A.1) koje su tretirane sokom od nara detektovalo se smanjenje laktonazne PON3 aktivnosti prema statinima u poređenju sa kontrolnim ćelijama (109).

I.3.5. Uticaj biološkog materijala i metode izolacije RNK na gensku ekspresiju

Za uspešnu i pouzdanu kvantifikaciju genske ekspresije potrebno je izolovati RNK očuvanog integriteta, visokog kvaliteta i zadovoljavajućeg kvantiteta bez prisustva kontaminanata (110,111). U laboratorijama, biološki materijal iz kojeg se izoluje RNK i tehnike za izolaciju RNK se značajno razlikuju. Još uvek nije predstavljena univerzalna metoda za izolaciju pomoću koje bi se iz svakog uzorka biološkog materijala izolovala RNK zadovoljavajućeg kvantiteta i kvaliteta.

Uzorak koji se koristi za analizu genske ekspresije razlikuje se od uzorka dobijenog direktno od pacijenta. Da bi se uzorak pripremio za analizu, potrebno je iz njega izolovati RNK. Izolacija RNK se, uglavnom, ne vrši na mestu uzorkovanja biološkog materijala, već je potrebno da se transportuje do specijalizovanih laboratorija, što ga čini osetljivim na degradaciju ili spoljnu kontaminaciju. Zbog toga je preporučljivo da se materijal od mesta uzimanja uzorka transportuje na ledu, što kraće vreme u nativnom obliku ili uz dodatak pogodnog reagensa. Tako, uspešna kvantifikacija genske ekspresije prvenstveno zavisi od pravilnog uzimanja, transporta i obrade biološkog materijala. RNK se može izolovati iz svežih, ili zamrznutih ćelija i tkiva, kao i iz kultura ćelija.

Tradicionalna metoda koja se primenjuje decenijama unazad, a koja je zasnovana na primeni gvanidin-izotiocijanat-fenol-hloroform ekstrakcije, koristi reagens koji brzo inhibiraju ribonukleaze i razdvajaju RNK od proteina plazme i genomske DNK (gDNK) (112). Novije automatizovane metode, nastale sa ciljem da se smanji vreme i broj koraka potrebnih da nastane uzorak RNK zadovoljavajućih karakteristika, stiču sve veću popularnost (113).

1.3.5.1. Krv i njene ćelije kao izvor RNK

Puna krv i njene ćelije spadaju u najdostupnije i najčešće korišćene biološke materijale za analizu genske ekspresije u opsežnim kliničkim istraživanjima.

Humana krv se sastoji od plazme i visoko specijalizovanih ćelija. Eritrociti čine 99,9%, dok leukociti i trombociti svega oko 0,1%. Od glavnih populacija leukocita koje se nalaze u humanoj perifernoj krvi 50-75% su granulociti (uglavnom neutrofili), 20-40% su limfociti i 3-8% monociti (cirkulišući prekursori makrofaga). Sve ove ćelije krvi pomažu održavanje homeostaze i igraju značajnu ulogu u urođenom i stečenom imunitetu (63). Poseban značaj imaju limfociti (T i B ćelije) koje nisu prisutne samo u krvi već i u drugim tkivima i organima. Oni cirkulišu i obezbeđuju nadzor kritičan za imuni odgovor i učestvuju u odbrani organizma od stranih agenasa. Zbog ovih uloga mogu da služe kao surogat ćelije, a nivoi ekspresije gena koji se u njima određuju kao biomarkeri za dijagnostifikovanje bolesti, ispitivanje različitih stadijuma bolesti i procenu efekata terapije (59,60). Štaviše, kao što se promene u koncentraciji biohemijskih parametara koji se odnose na druga tkiva i organe u stanju bolesti detektuju i kvantifikuju u krvi, tako se može očekivati da vrednosti genske ekspresije iz

krvi ili njenih ćelija posluže kao markeri za postavljanje dijagnoze i predviđanje toka bolesti koje nisu direktno povezane sa krvlju.

Kod sisara, zreli eritrociti su bez jedra i mitohondrija, tj. ne nose genetički materijal, pa stoga, i ne predstavljaju uzorak za ispitivanje genske ekspresije, već se mogu smatrati kontaminantima u većini metoda za izolaciju nukleinskih kiselina. Sa druge strane, nezreli eritrociti ili retikulociti sadrže DNK i RNK koji doprinose ukupnoj RNK izolovanoj iz pune krvi. Najdominantniji transkripti u retikulocitima su iRNK globinskih lanaca. Iako retikulociti čine svega od 0,5 do 2% od ukupnih eritrocita kod zdravih osoba, njihova RNK može da čini do 95% ukupne RNK izolovane iz pune krvi, upravo, zbog velikog broja eritrocita u krvi (114). Stoga, ako ne postoji potreba za kvantifikacijom transkripata iz retikulocita, leukociti preostaju ciljna ćelijska populacija iz kojih se izoluju i analiziraju nukleinske kiseline. U okviru njih, MČPK su transkripciono najaktivnije ćelije (63). Zbog toga većina studija iz različitih oblasti istraživanja, kao što su imunologija, infektivne bolesti, kardiovaskularne bolesti i kancer, upravo, koriste ovu granu bele loze.

Prilikom planiranja ili odabira strategije za izolaciju RNK iz krvi, treba uzeti u obzir nekoliko ključnih faktora. To su tip ćelija krvi iz kojih se izoluje RNK, visoka koncentracija proteina (50-100 g/L), prisustvo velike količine interferirajućih agenasa (neorganski joni, hemoglobin, iRNK globinskih lanaca iz retikulocita) (60,110), ćelijskih komponenata (gDNK, ribonukleaze), egzogenih kontaminanata (puder, organski rastvarači i pribor korišćeni tokom ekstrakcije), vreme stajanja i obrade krvi koji prethode izolaciji (115).

Različite tehnike fracionisanja ćelija krvi stvaraju različiti stepen homogenosti ćelija koji mogu da budu cilj za izolaciju RNK. Dodatni koraci odvajanja ćelija krvi zahtevaju dodatno obrađivanje uzorka, duže vreme izolacije, dodatnu opremu, a svi oni mogu da indukuju *ex vivo* promene u ekspresiji određenih transkripata (61,63). Takođe, razdvajanjem ćelija krvi može doći do gubitka ćelijske frakcije koja sadrži gen od interesa i smanjene osetljivosti metode za kvantifikaciju genske ekspresije. Različiti koraci centrifugiranja i pipetiranja koji moraju da se izvedu tokom izolacije mogu da dovedu do ukrštene kontaminacije između uzoraka. Uklanjanjem eritrocita, proteina i ćelijskih ostataka će se postići eliminacija kontaminirajućih i inhibišućih faktora, ali će se produžiti vreme kojom je RNK izložena dejstvu ribonukleaza (116). Iz tih razloga, metode za izolaciju RNK koje ne zahtevaju odvajanje ćelija mogu biti veoma korisne. Ukoliko je potrebno, postupci uklanjanja kontaminirajućih komponenata i inhibicija

ribonukleaza treba da budu takvi da se obezbedi uniformno i konzistentno izvođenje izolacije i kvantifikacija nukleinskih kiselina. Aktivnost ribonukleaza, koja je visoka u ćelijama, može biti sprečena upotrebom stabilizirajućeg ili lizirajućeg reagensa koji prethodi RNK ekstrakciji (113,116,117). Kombinacija brze ćelijske lize i ekstrakcije RNK u simultanim koracima bi, verovatno, bila najprihvatljivija opcija za dobijanje zadovoljavajućih rezultata.

1.3.5.2. Tkivo kao izvor RNK

Izolacija RNK iz ćelija je, generalno posmatrano, mnogo jednostavnija nego iz tkiva. Primaran razlog je taj što pre izolacije RNK trodimenzionalna arhitektura tkiva mora biti narušena u cilju nastanka suspenzije ćelija. Agresivne metode homogenizacije tkiva, u prisustvu jakih lizirajućih pufera, su neophodne da bi se obezbedio zadovoljavajući nivo razaranja tkiva koji bi dao prihvatljivu količinu RNK zadovoljavajuće čistoće i integriteta. Pored toga, neka tkiva sadrže velike količine ribonukleaza i takve su strukture da teško oslobađaju RNK, pa su potrebni drugačiji načini homogenizacije i čuvanja tkiva pre izolacije RNK. Sa druge strane, u odnosu na suspenzije ćelija, tkiva imaju značajne prednosti. Korišćenjem tkiva za analizu genske ekspresije, očuvana je njegova prirodna molekularna fiziologija u momentu ekstrakcije. Relativno mala količina tkiva (oko 100 mg), zbog velikog broja ćelija, daje veliki prinos RNK. Stabilnost RNK u tkivu je odlična kada se tkivo odmah, nakon uzorkovanja, zamrzne u tečnom azotu, pri čemu se trenutno inaktiviraju ribonukleaze, a zatim čuva na -80°C u dužem vremenskom periodu. Zamrznuta tkiva se mogu seći na manje komade ili pulverizovati pre izolacije RNK. Korišćenje tkiva za analizu genske ekspresije je važno kod ispitivanja molekularne fiziologije normanih tkiva, za utvrđivanje tkivno-specifičnih odgovora na prisustvo bolesti, uticaj spoljašnjih faktora na strukturu i funkciju tkiva (npr. mišićno tkivo i fizička aktivnost) (110).

1.3.5.3. Integritet RNK

Osnovni zahtev za uspešnu kvantitativnu analizu genske ekspresije je upotreba intaktne RNK. Intaktna RNK podrazumeva jasno vidljive, nedegradirane 28S i 18S ribozomalne subjedinice (rRNK) dobijene elektroforetskim razdvajanjem (110,111). Nakon ekstrakcije iz biološkog materijala, RNK je jako nestabilna. Dugi lanci iRNK do nekoliko kilo baza su veoma podložni degradaciji. Njena degradacija se može desiti

dejstvom ribonukleaza tokom pripreme i obrade uzorka, usled neadekvatnog čuvanja uzoraka u dužem vremenskom periodu ili u neodgovarajućim uslovima (118,119). RNK lošeg kvaliteta može da dovede u sumnju pouzdanost rezultata genske ekspresije (118). Prema tome, određivanje i potvrda kvaliteta i kvantiteta RNK je prvi kritičan korak u dobijanju pouzdanih podataka analize ekspresije gena.

Iako je očigledno da intaktna RNK najbolje prezentuje prirodno stanje transkriptoma, postoje situacije gde je potrebno da se kvantifikacija genske ekspresije izvrši iz uzoraka sa delimično degradiranim RNK (veoma starih, nekrotičnih ili uzoraka nakon biopsije). Ipak, do danas ostaje nepoznanica koliko se rezultati genske ekspresije dobijeni iz takvog materijala, mogu smatrati pouzdanim. Poznato je da se pouzdanost PCR metode za kvantifikaciju genske ekspresije može poboljšati korišćenjem endogene kontrole (referentnog gena čija se ekspresija ne menja pod uticajem fizioloških i patoloških faktora), čime se kompenzuju intra- i interkinetičke varijacije (119,120). Specifične greške u kvantifikaciji iRNK koje potiču od varijacija u količini i vrsti početnog materijala između uzoraka, integritetu i kvantitetu RNK, u efikasnosti RT i količini komplementarne DNK (*engl.* complementary DNK – cDNK) se na ovaj način mogu neutralisati (116,119,120). Ovo je naročito bitno kod uzoraka koji potiču od različitih tkiva, različitih osoba uzetih u različito vreme.

II. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Istraživanja genske ekspresije enzima antioksidativne zaštite, u okviru ove doktorske disertacije, obavljena su u tri dela. Prvi deo je obuhvatio ispitivanje uticaja fizičke aktivnosti na gensku ekspresiju enzima antioksidativne zaštite. Drugi deo se odnosio na ispitivanje uticaja aterogene dijeta i primene hipolipemika na gensku ekspresiju enzima antioksidativne zaštite. U trećem delu je izvršena optimizacija metode za izolaciju RNK iz različitih humanih i životinjskih tkiva.

U skladu sa tim, konkretni ciljevi ove doktorske disertacije su bili:

1. Ispitati uticaj intenzivne fizičke aktivnosti na gensku ekspresiju izoenzima SOD u humanim limfocitima;
2. Odrediti markere oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, kao i osnovne lipidne parametre i ispitati njihovu korelaciju sa vrednostima genske ekspresije SOD;
3. Ispitati uticaj aterogene dijeta i terapije atorvastatinom na gensku ekspresiju izoenzima PON u svakom pojedinačnom organu eksperimentalnih životinja;
4. Odrediti korelaciju vrednosti genske ekspresije izoenzima PON između organa eksperimentalnih životinja;
5. Utvrditi razlike u vrednostima genske ekspresije između ispitivanih izoenzima u organima eksperimentalnih životinja na normalnoj dijeti, aterogenoj dijeti i aterogenoj dijeti na terapiji atorvastatinom;
6. Optimizovati metodu za izolaciju RNK iz limfocita i pune krvi zdravih osoba, jetre, belog masnog tkiva i aorte eksperimentalnih životinja;
7. Ispitati uticaj metode za izolaciju RNK na gensku ekspresiju izoenzima SOD u humanim limfocitima i punoj krvi;
8. Utvrditi interindividualne varijacije u genskoj ekspresiji izoenzima SOD u humanim limfocitima i punoj krvi zdravih osoba.

III. ISPITANICI I METODE

III.1. ISPITANICI

Istraživanje je obuhvatilo 30 zdravih, odraslih osoba (15 žena i 15 muškaraca) starosti $31,3 \pm 0,9$ godina koji su činili kontrolnu grupu i 20 mladih muškaraca, fudbalera na početku profesionalne karijere. Sportisti su bili igrači fudbalskog kluba „Teleoptik“ Beograd, Srbija starosti $17,3 \pm 0,5$ godina. Iako pre početka studije nisu profesionalno trenirali fudbal, bili su uključeni u različite rekreativne aktivnosti. Svi ispitanici su bili nepušači, nisu konzumirali alkohol, nisu imali akutno ili hronično oboljenje, ni povrede u toku studije ili u predhodnih godinu dana i nisu koristili lekove, najmanje tri meseca, pre početka i tokom trajanja studije. Tokom trajanja studije vođen je dnevnik sportskih aktivnosti, koji obuhvata treninge i utakmice. Igrači su imali 5 do 7 treninga na terenu (10 do 15h) i jednu utakmicu nedeljno, tokom prvih 8 nedelja posmatranog perioda. Tokom naredne 4 nedelje, imali su 6 treninga (~12h) i jednu utakmicu nedeljno. Trening se sastojao od 15 minuta zagrevanja, serija trčanja niskog do umerenog intenziteta, intervalnog trčanja umerenog do visokog intenziteta, 1-1,5h rada na tehničkim i taktičkim elementima igre i simulacije utakmice. Pored toga, ispitanici su imali 2 treninga u teretani nedeljno (~2h). Učešće u studiji nije imalo uticaja na unapred isplanirane treninge i takmičarsku sezonu.

Tri uzorka venske krvi su uzeta od svakog ispitanika iz prednje kubitalne vene nakon perioda noćnog gladovanja. Krv je sakupljena vakutejner sistemima sa etilendiaminotetrasirćetnom kiselinom (EDTA) za izdvajanje plazme, sa litijum-heparinom za izolaciju RNK i vakutejnerima sa serum-separator gelom za dobijanje seruma. Uzorci za dobijanje plazme i seruma su, nakon uzimanja, čuvani na $+4^{\circ}\text{C}$ maksimalno 30 minuta do transporta u laboratoriju Katedre za medicinsku biohemiju. Plazma i serum su, zatim, odvojeni centrifugiranjem 10 minuta na 3000 rpm, podeljeni u alikvote i čuvani na -80°C do analize. Za određivanje brzine stvaranja O_2^- heparinizirana plazma je odmah nakon centrifugiranja korišćena za analizu. Uzorci pune krvi za izolaciju RNK su iskorišćeni za odvajanje MČPK pomoću Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare, Waukesha, Wisconsin, USA) gradijent-gela, koje su zatim suspendovane u 1mL TRIzol™ reagensa i zamrznute na -80°C do izolacije RNK.

Od jedne ženske osobe je vene-punkcijom u jutarnjim satima našte uzorkovano 13 vakutejnera pune krvi sa citratom kao antikoagulansom koji su odmah nakon uzimanja

spojeni u jedan uzorak (*engl.* pool - pul) od oko 75 mL. Iz dobijenog pula nakon homogenizacije, RNK je izolovana po 5 puta testiranim metodama; poluautomatskim vakuumskim sistemom, ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (ABI) korišćenjem pune krvi (ABI_{KRV}) i MČPK (ABI_{MČPK}) (12) i ručnom metodom ekstrakcije pomoću TRIzol™ reagensa (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) (TRI) korišćenjem MČPK (TRI_{MČPK}) (11).

Studija je planirana u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji, u skladu sa pravilima Etičkog komiteta Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i Etičkog komiteta Udruženja za medicinu sporta Srbije. Svi ispitanici su detaljno obavješteni o samoj proceduri studije, ciljevima, potencijalnim rizicima učešća i očekivanim ishodima studije. Učesnici su dali pristanak za dobrovoljno učešće. Demografski podaci, podaci o pušenju, uzimanju alkohola, fizičkoj aktivnosti i drugim varijablama, dobijani su iskazom osoba uključenih u studiju.

III.2. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

Ispitivanje uticaja aterogene dijeta i terapije atorvastatinom na nivoe genske ekspresije izoenzima PON se obavljalo na mužjacima albino Wistar pacova. Na početku studije, 18 pacova su bili 2 meseca stari i imali su težinu od 150 g do 190 g. Tokom trajanja studije, životinje su bile smeštene u metalnim kavezima (po 6 životinja u kavezu) u prostoriji sa kontrolisanom temperaturom od $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Svaka grupa od po 6 pacova je dobijala 24 g hrane po danu i imala je slobodan pristup vodi i hrani. Prva grupa pacova koja je služila kao kontrolna grupa je bila na standardnoj, komercijalnoj dijeti u obliku proteinskih briketa 11 nedelja, druga i treća grupa su bile nedelju dana na isto ovakvoj dijeti, a zatim 10 nedelja na aterogenoj dijeti pripremljenoj od standardne hrane dodavanjem 2% holesterola, 1% natrijum-holata i 3% suncokretovog ulja. Poslednjih 6 nedelja treća grupa pacova, koja je bila na aterogenoj dijeti, je oralno pomoću sonde primala terapiju koja se sastojala od 1,14 mg/kg atorvastatina. Masa životinja je merena jednom nedeljno i doza atorvastatina prilagođavala prema telesnoj masi. Nakon 11. nedelje eksperimenta, sve životinje su anestetizirane primenom rastuće koncentracije ugljen-dioksida, a zatim žrtvovane. Delovi levog režnja jetre, epididimalnog belog masnog tkiva i aorte su uzeti od pacova i nakon ispiranja fiziološkim rastvorom, trenutno zamrznuti u tečnom azotu, nakon čega su čuvani na -80°C do izolacije RNK.

Postupanje sa eksperimentalnim životinjama se obavljao u skladu sa Pravilnikom za rad sa eksperimentalnim životinjama Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (odobrenje za rad sa eksperimentalnim životinjama je dobijeno na osnovu dozvole Etičkog komiteta za rad sa eksperimentalnim životinjama br. 5/10).

Ispitivanje uticaja intenzivnog treniranja u trajanju od 12 nedelja na gensku ekspresiju izoenzima SOD je urađeno u MČPK mladih fudbalera, dok je uticaj aterogene dijeta i terapije atorvastatinom na gensku ekspresiju izoenzima PON ispitivan u jetri, belom masnom tkivu i aorti pacova. Za testiranje reproducibilnosti i efekata metoda izolacije RNK na vrednosti genske ekspresije izoenzima SOD korišćen je pul pune citratne krvi dobijen od ženske osobe. Poređenje metoda izolacije, ispitivanje njihovog uticaja i interindividualnih varijacija na nivoe genske ekspresije Cu/Zn SOD i Mn SOD je izvršeno na kontrolnoj grupi.

III.3. METODE

Kod ispitanika su izvršena sledeća određivanja:

III.3.1. Antropometrijska merenja

Na početku studije urađeno je antropometrijsko merenje na vagi BC-418 (Tanita, Tokio, Japan) i izmerena telesna masa. Visina je izmerena na prenosivom stadiometru sa tačnošću od 0,1 cm. Indeks telesne mase (ITM) je izračunat kao odnos telesne mase u kilogramima i kvadrata visine u metrima (kg/m^2).

III.3.2. Aerobni kapacitet (određivanje VO_2max)

VO_2max je testirana tokom kontinuiranog, progresivnog testa opterećenja na pokretnoj traci ergometru (Ergo XELG90 Woodway, Weil, Nemačka), gde se otpor, a samim tim i intenzitet vežbanja postepeno povećavaju, i meri odnos koncentracije udahnutog O_2 i izdahnutog CO_2 . Početna brzina je bila 8 km/h, koja se povećavala za 2 km/h svakih 3 minuta. Parametri respiracije su analizirani pomoću posebne aparature Quark b2 (Cosmed, Rim, Italija).

III.3.3. Određivanje koncentracije osnovnih biohemijskih i hematoloških parametara

Koncentracije osnovnih biohemijskih parametara (glukoze, ureje, kreatinina, mokraćne kiseline, bilirubina, alanin-aminotransferaze-ALT, aspartat-aminotransferaze-AST, C-reaktivnog proteina-CRP, UH, HDL-H i triglicerida-TG) su određivane rutinski, primenom automatizovanih enzimskih metoda na automatskom analizatoru ILAB 300+ (Instrumentation Laboratory, Milano, Italija) uz upotrebu proizvođača Biosystems S.A. (Barselona, Španija) i Byoanalitica (Beograd, Srbija). HDL-H je određivan istom enzimskom metodom kao i UH nakon precipitacije seruma fosfovolframovom kiselinom u prisustvu Mg^{2+} jona. Koncentracija LDL-H je računata preko Friedewald-ove formule (121).

Krvna slika (broj leukocita i leukocitarna formula, broj eritrocita i trombocita, koncentracija hemoglobina) je određivana na hematološkom brojaču Cell-Dyn 3700 (Abbott Diagnostics, Chichago, Illinois, USA).

III.3.4. Određivanje koncentracije markera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

U okviru markera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite su određivani ukupna aktivnost enzima SOD i njenih izoenzima u plazmi, koncentracija ukupnih SH grupa, brzina stvaranja O_2^- , koncentracija TBKRS i produkata uznapredovale oksidacije proteina (*engl.* advanced oxidation protein products - AOPP) metodama optimizovanim na Katedri za medicinsku biohemiju.

Hemikalije

Dikalijum-hidrogen-fosfat (K_2HPO_4 , Mr = 174,2 g/mol, Centrohem, Stara Pazova, Srbija)

Dinatrijum-monohidrogen-fosfat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, Mr = 178,0 g/mol, Kemika, Zagreb, Hrvatska)

DTNB (2,2'-dinitro-5,5'-ditio-dibenzojeva kiselina, $C_{14}H_8N_2O_8S_2$, Mr = 396,0 g/mol, Merck, Darmstadt, Nemačka)

EDTA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$, Mr = 372,2 g/mol, Carlo Erba, Milano, Italija)

Glacijalna sirćetna kiselina (CH_3COOH , Mr = 60,1 g/mol, 99,5%, Centrohem, Stara Pazova, Srbija)

Hloramin T (N-hloro-p-toluensulfonamid natrijum, $C_7H_7ClNNaO_2S \cdot 3H_2O$, Mr = 281,7 g/mol, Sigma-Aldrich, Seelze, Nemačka)

Hlorovodonična kiselina (HCl, Mr = 36,5 g/mol, 36,2%, Zorka, Šabac, Srbija)

Kalijum-cijanid (KCN, Mr = 65,1 g/mol, Merck, Darmstadt, Nemačka)

Kalijum-jodid (KJ, Mr = 166,07, Prolabo, Darmstadt, Nemačka)

Kalijum-dihidrogen-fosfat (KH_2PO_4 , Mr = 136,1 g/mol, Merck, Darmstadt, Nemačka)

L-adrenalin ((L)-4-(1-hidroksi-2-(metilamin)etil)benzen-1,2-diol, $C_9H_{13}NO_3$, Mr = 183,2 g/mol, Sigma-Aldrich, Seelze, Nemačka)

Malondialdehid (malondialdehid bis-dimethylacetal, $C_{11}H_{24}O_4$, Mr = 220,3 g/mol, $\rho=0,91$, 97%, Acros Organics, Geel, Belgija)

Natrijum-hidrogen-karbonat ($NaHCO_3$, Mr = 84,0 g/mol, Centrohem, Stara Pazova, Srbija)

Natrijum-karbonat ($Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$, Mr = 286,1 g/mol, Sigma Aldrich, Seelze, Nemačka)

NBT (2,2'-di-p-nitrofenil-5,5'-difenil-3,3'-(3,3'-dimetoksi-4,4'-difenilen)-ditetrazolijum hlorid, $C_{40}H_{30}N_{10}O_6Cl_2$, Mr = 817,7 g/mol, Sigma-Aldrich, Seelze, Nemačka)

Tiobarbiturna kiselina ([2-tio-barbiturna kiselina (4,6-dihidroksi-2-tiopirimidin)], $C_4H_4N_2O_2S$, Mr = 144,2 g/mol, Sigma-Aldrich, Seelze, Nemačka)

Trihlorsirćetna kiselina (C_2HCl_3O , Mr = 163,4 g/mol, Lach-Ner, Neratovice, Češka)

TRIS (2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol, $C_4H_{11}NO_3$, Mr = 121,1 g/mol, Acros Organics, Geel, Belgija)

Želatin (Merck, Darmstadt, Nemačka)

Aparatura

Analitička vaga (Mettler, Greifensee, Švajcarska),

Centrifuga sa velikom brzinom i hlađenjem („Centrifuge 5417R”, Eppendorf Instrumente GmbH, Hamburg, Nemačka)

Klinička centrifuga Univerzal Z 300 (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Nemačka)

pH-metar (WTW, Weilheim, Nemačka)

Tehnička vaga EW 420-3NM (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Nemačka)

UV-VIS spektrofotometar (UV-1800, Shimadzu, Nishinokyo-Kuwabara-cho, Japan)

Vodeno kupatilo (Precisterm Selekt, Barselona, Španija)

Vortex mešalica (VELP Scientifica, Milano, Italija)

III.3.4.1. Određivanje aktivnosti ukupne SOD i njenih izoenzima Cu/Zn SOD i Mn SOD

Za određivanje aktivnosti SOD u ispitivanim uzorcima korišćena je metoda koju su dali Misra i Fridovich (122), uz određene modifikacije. Metoda se zasniva na sposobnosti SOD da inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina u adrenohrom u alkalnoj sredini (pH = 10,2). Aktivnost ovog enzima se izražava u relativnim jedinicama koje se dobijaju merenjem apsorbancije nastalog ružičastog proizvoda oksidacije adrenalina na talasnoj dužini od 480 nm, bez prisustva SOD (kontrola) i u prisustvu SOD (analiza). Aktivnost SOD u uzorku se izračunava kao procenat inhibicije autooksidacije adrenalina. Autooksidacija adrenalina je zavisna od prisustva O_2^- , a SOD uklanja O_2^- i tako sprečava reakciju autooksidacije.

Reagensi

Karbonatni pufer: 0,05 mmol/L, pH 10,2, kome je dodat 1 mmol/L EDTA (pravi se *ex tempore*)

Rastvor HCL: 15 mmol/L

Osnovni rastvor adrenalina: 10 mmol/L, rastvoren u 15 mmol/L HCl (pravi se *ex tempore*)

Rastvor KCN: 8 mmol/L u karbonatnom puferu pH=10,2

Uzorak

EDTA plazma

Eksperimentalni postupak

U epruvete pipetirati (μ L):	Kontrola	Analiza	Analiza i inhibitor
Plazma	-	10	10
KCN	-	-	5
Karbonatni pufer	700	690	685
Adrenalin	50	50	50

Reakcija počinje dodavanjem adrenalina u reakcionu smešu. Nakon mešanja kivetu ostaviti na tamnom mestu, na 25⁰C, 3 minuta (vreme preinkubacije). Očitavati

apsorbanciju na svaki minut u toku naredna 3 minuta. Izračunati $\Delta A/\text{min}$ za kontrolu i analize.

Za određivanje aktivnosti izoenzima Mn SOD u uzorak se dodaje 8 mmol/L rastvora KCN u odnosu 1:1, koji inhibira aktivnost Cu/Zn SOD. Posle inkubiranja od 15 minuta na sobnoj temperaturi, Mn SOD se određuje na isti način kao što je opisano za ukupnu SOD. Vrednost za aktivnost Cu/Zn SOD dobija se kao razlika između aktivnosti ukupne SOD i Mn SOD (14,121).

Izračunavanje

Jedinica aktivnosti SOD definiše se kao aktivnost enzima koja dovodi do 50% inhibicije autooksidacije adrenalina u linearnom delu promene apsorbanije u minuti. Bira se ona koncentracija adrenalina koja će u kontroli dati promenu apsorbanije od 0,025 u minuti. Pri tome se polazi od koncentracije adrenalina od 10 mmol/L, a zatim se on razblažuje sve dok se ne postigne $\Delta A/\text{min}$ od 0,025. Izabrana je promena apsorbanije u minuti od 0,025 jer je utvrđeno da SOD tada postiže najviši procenat inhibicije autooksidacije adrenalina. S obzirom na definiciju relativne jedinice aktivnosti enzima SOD, jedinična aktivnost bi dovela do 50%-nog smanjenja apsorbanije odnosno A/min bi u takvom uzorku bila 0,0125.

Aktivnost SOD u relativnim jedinicama se izračunava preko sledeće proporcije:

$$0,0125 : 1U = [0,025 - (\Delta A_{\text{analize}}/\text{min})] : Z$$

Da bi se izračunala aktivnost primenjuje se sledeći obrazac:

$$\text{SOD, IU/L} = Z \times 75000$$

75000 – faktor razblaženja uzorka preveden u litre

III.3.4.2. Određivanje koncentracije ukupnih sulfhidrilnih grupa

Princip Ellman-ove metode (123) za određivanje koncentracije ukupnih SH) grupa zasniva se na činjenici da DTNB u baznoj sredini (pH 9,0) reaguje sa alifatičnim tiolima, pri čemu se stvara 1 mol p-nitrofenol-anjona po 1 molu tiola. Žuta boja nastalog anjona meri se spektrofotometrijski na 412 nm i temperaturi od 25°C.

Reagensi

Fosfatni pufer: 0,2 mol/L K_2HPO_4 , 2 mmol/L EDTA, pH 9,0

Fosfatni pufer: 50 mmol/L, pH=7,0

DTNB reagens: 10 mmol/L, rastvoren u fosfatnom puferu pH 7,0

Uzorak

Plazma

Eksperimentalni postupak

U epruvete pipetirati (μL):	Slepa proba	Analiza
Pufer	950	900
Plazma	-	50
DTNB reagens	20	20

Reakcione smeše promešati na vortex mešalici i inkubirati 25 minuta na 25°C u mraku, a zatim očitati apsorbancije na 412 nm, prema slepoj probi.

Izračunavanje

Koncentracija ukupnih SH grupa u plazmi izračunava se preko molarnog apsorpcionog koeficijenta p-nitrofenola na 412 nm, koji za date uslove iznosi $13600 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ prema obrascu:

$$[\text{SH grupe}], \text{ mmol/L} = A_A \times 1,43$$

A_A – apsorbancija analize

1,43 – faktor koji se preračunava na osnovu molarnog apsorpcionog koeficijenta p-nitrofenola i razblaženja uzorka

III.3.4.3. Određivanje nivoa superoksid-anjon radikala u plazmi optimizovanom Auclair-Voisin-ovom metodom

Metoda koju su uspostavili Auclair i Voisin (124) za određivanje nivoa O_2^- zasniva se na njegovoj sposobnosti da redukuje nitro grupu aromatičnog jedinjenja nitrobluetetrazolijuma (NBT). Redukcijom NBT nastaje u vodi slabo rastvorljiv plavi diformazan preko intermedijera monoformazana. U reakcionu smešu se dodaje želatin čija je uloga da održava diformazan u rastvorenom obliku. U reakcijama u kojima se stvara O_2^- , NBT se nepotpuno redukuje do monoformazana. Pojačana redukcija NBT pri višim pH vrednostima, u stvari, predstavlja posledicu inhibicije reakcije spontane

dismutacije kiseonika, koje je kompetentna reakciji redukcije NBT. Uvođenje N₂ u NBT reagens pod pritiskom 1 h pre određivanja smanjuje pritisak O₂ i povećava redukciju NBT. Promena boje žutog NBT u plavi monoformazan, meri se spektrofotometrijski i predstavlja nivo stvaranja O₂⁻.

Reagensi

Fosfatni pufer: 0,05 mol/L, pH 8,6 uz dodavanje EDTA u koncentraciji 0,1 mmol/L EDTA

Radni reagens: 1 mmol/L NBT rastvoriti u sveže napravljenom fosfatnom puferu, uz dodatak 0,1 mg/mL želatina. U pripremljeni reagens uvoditi 1 h N₂ pod pritiskom, neposredno pre analize.

Uzorak

Plazma

Eksperimentalni postupak i izračunavanje

Pomešati 20 µL plazme i 200 µL radnog reagensa i pratiti povećanje apsorbancije na 550 nm. Meriti promenu apsorbancije na svakih 15 sekundi u toku jednog minuta (reakcija je linearna samo u toku prvog minuta). Izračunati ΔA/min.

Brzina stvaranja O₂⁻ se izražava preko brzine stvaranja redukovano NBT i izračunava se preko obrasca:

$$[\text{redukovani NBT}], \mu\text{mol}/\text{min}/\text{L} = \Delta A/\text{min} \times 1400$$

1400 – faktor koji se preračunava na osnovu molarnog apsorpcionog koeficijenta monoformazana koji iznosi 15 000 Lmol⁻¹cm⁻¹ i razblaženja uzorka

III.3.4.4. Određivanje koncentracije tiobarbiturna kiselina-reagujućih supstanci

Proizvodi lipidne peroksidacije se koriste kao osetljivi i jednostavni biomarkeri za merenje oksidativnog stresa u biološkim sistemima. MDA je veoma poznat klasičan biomarker koji se široko koristi u *in vitro* i *in vivo* studijama.

Princip spektrofotometrijske metode za određivanje koncentracije TBKRS zasniva se na činjenici da krajnji proizvodi peroksidacije lipida reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom (TBK) i grade obojeni kompleks koji pokazuje maksimum apsorbancije na 535 nm (125).

Reagensi

TBK reagens: 0,917 mmol/L trihlorsirćetne kiseline, 15% rastvor; 2,6 mol/L (0,375%) TBK; 0,25 mol/L HCl. Ove komponente se rastvaraju u destilovanoj vodi, a reagens se čuva u frižideru na +4°C.

TRIS-Cl pufer: 0,05 mol/L, pH 7,4.

Osnovi standard MDA: 1 mmol/L

Uzorak

Serum/Plazma

Eksperimentalni postupak i izračunavanje

Za izračunavanje koncentracije MDA koji čini najveći deo TBKRS, koristi se standardna kriva, koja se konstruiše upotrebom osnovnog standarda MDA koncentracije 1 mmol/L. Osnovni standard koncentracije 1 mmol/L se pravi tako što se od komercijalne supstance (koncentrovanog standarda) odmeri 25 µL i dopuni se vodom do 100 mL (STOCK I). Od ovog standarda se pravi sekundarni standard koncentracije 10 µmol/L (STOCK II) odmeravanjem 100 µL primarnog standarda i dopunjavanjem vodom do 1 mL. Zatim se od STOCK II pravi serija razblaženja u opsegu koncentracija 1-10 µmol/L po sledećoj tabeli:

U epruvete pipetirati (µL):										
	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	S ₉	S ₁₀
MDA	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Pufer	990	980	970	960	950	940	930	920	910	900

U epruvete pipetirati (µL):	Slepa proba	Standard	Analiza
plazma	-	-	300
TRIS-Cl pufer	300	-	-
Standard	-	300	-
TBK reagens	600	600	600

Reakcione smeše promešati na vortex mešalici i inkubirati na 100°C, u vodenom kupatilu 5 minuta. Ohladiti na ledu, centrifugirati na 10000 rcf, 10 minuta na +4°C i očitati apsorbanciju na 535 nm.

Upotrebom razblaženih standarda je konstruisana standardna kriva $y = 0,0042 + 0,0512x$ ($r = 0,999753$) sa koje je očitana koncentracija MDA iz uzorka na osnovu njegove apsorbcije.

III.3.4.5. Određivanje koncentracije uznapredovalih produkata oksidacije proteina

Spektralnom analizom razblaženog uzorka plazme ili seruma fosfatnim puferom (pH 7,4) u opsegu talasnih dužina 200-400 nm uočava se karakterističan pik na 340 nm. Dodavanjem sirćetne kiseline u razblažen serum i rastvora KJ (1,16 mol/L) dolazi do promene apsorbcije koja se meri na 340 nm. Koncentracija AOPP se izražava preko ekvivalenta hloramina T koji se koristi za izradu standardne krive u koncentracijama od 10 $\mu\text{mol/L}$ do 100 $\mu\text{mol/L}$, pri čemu njegova apsorbcija linearno raste sa porastom koncentracije (126).

Reagensi

Standardni rastvor hloramina T: 100 $\mu\text{mol/L}$ u fosfatnom puferu pH=7,4

Rastvor KJ: 1,16 mol/L u fosfatnom puferu pH=7,4. Reagens čuvati u tamnoj boci.

Fosfatni pufer: 20 mmol/L, pH 7,4

Uzorak

Plazma

Eksperimentalni postupak i izračunavanje

U epruvete pipetirati (μl):	Slepa proba	Standard	Analiza
Pufer pH 7,4	400	-	320
Analiza	-	-	80
Standard	-	400	-
Glacijalna sirćetna kiselina	40	40	40
Rastvor KJ	20	20	20

Izmešati na vortex mešalici i odmah izmeriti apsorbciju na 340 nm. Tip reakcije je metoda završne tačke sa slepom probom reagensa. Za konstruisanje standardne krive se koriste sledeće koncentracije hloramina T: 12,5, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ pripremljene od

standardnog rastvora koncentracije 100 $\mu\text{mol/L}$. Iz dobijene standardne krive $y = 0,0794 + 0,019x$ ($r = 0,9989$) je očitana koncentracija AOPP iz uzorka na osnovu njegove apsorbanije i izražena u jedinicama $\mu\text{mol/L}$ ekvivalenta hloramina T. Pošto se početni uzorak plazme razblažuje sa puferom $\text{pH}=7,4$ u odnosu 1:5, očitano koncentraciju AOPP sa krive pomnožiti sa 5.

III.3.5. Izolacija RNK

III.3.5.1. Izolacija RNK pomoću TRIzol™ reagensa

TRIzol™ reagens predstavlja monofazni rastvor fenola, guanidin-izotiocijanata, crvene boje i drugih komponenata, koji ima sposobnost da očuva integritet RNK zahvaljujući efikasnoj inhibiciji enzima ribonukleaza tokom razaranja ćelija i rastvaranja ćelijskih komponenti u procesu izolacije. Crvena boja prisutna u reagensu olakšava detekciju organske faze i ne reaguje sa nukleinskim kiselinama. Proces izolacije RNK pomoću ovog reagensa predstavlja modifikovan klasični metod izolacije RNK, opisan od strane Chomczynski-a i saradnika (112). Takođe, metoda je optimizovana za laboratorijske uslove Katedre za medicinsku biohemiju.

Hemikalije

Ficoll-Paque PLUS™ (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Waukesha, Wisconsin, USA)

Hloroform (CHCl_3 , *engl.* molecular biology grade, $M_r = 119,4$ g/mol, Serva, Heidelberg, Nemačka)

Izopropil-alkohol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$, *engl.* molecular biology grade, $M_r = 60,1$ g/mol, Serva, Heidelberg, Nemačka)

Etanol apsolutni ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, $M_r = 46,1$ g/mol, Centrohem, Stara Pazova, Srbija)

Voda za PCR analizu (*engl.* PCR grade water, Ambion, Austin, Texas, USA)

Natrijum-hlorid (NaCl , $M_r = 58,4$ g/mol, Sigma Aldrich, Seelze, Nemačka)

Kalijum-hlorid (KCl , $M_r = 74,6$ g/mol, Merck, Darmstadt, Nemačka)

Kalijum-dihidrogen-fosfat (KH_2PO_4 , $M_r = 136,1$ g/mol, Merck, Darmstadt, Nemačka)

Dinatrijum-monohidrogen-fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $M_r = 178,0$ g/mol, Kemika, Zagreb, Hrvatska)

TRIzol™ reagens (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)

Tečni azot

Napomena

Sve navedene hemikalije se čuvaju u frižideru na +4°C. 10-15 min pre izolacije RNK se ostavljaju da stoje na sobnoj temperaturi (Ficoll™ trijažirati u zapreminama od 2 mL u plastične sterilne epruvete).

Reagensi

Razblaženi rastvor etanola: 75%, pravljen u vodi za PCR analizu

Fosfatni pufer (PBS): 137 mmol/L NaCl, 2,7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 2mmol/L KH₂PO₄, pH = 7,4; sterilisan u autoklavu.

Aparatura

Klinička centrifuga Univerzal Z 300 (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Nemačka)

Centrifuga sa velikom brzinom i hladenjem (Eppendorf Instrumente GmbH, Hamburg, Nemačka)

Centrifuga („Minispin plus“, Eppendorf Instrumente GmbH, Hamburg, Nemačka)

pH-metar (WTW, Weilheim, Nemačka),

Vortex mešalica (VELP Scientifica, Milano, Italija)

Izdvajanje MČPK pomoću Ficoll™ gradijent-gela

Protokol:

- uzorak krvi centrifugirati 10 minuta na 1000 rcf na sobnoj temperaturi u kliničkoj centrifugi
- u novu sterilnu epruvetu automatskom pipetom preneti oko 2 mL interfaze koja sadrži plazmu, leukocite i deo staloženih eritrocita (na ovaj način se izbegava korišćenje fiziološkog rastvora za razblaživanje početnog uzorka krvi) i promešati.
- 2 mL razblaženog uzorka naneti na prethodno pripremljeni Ficoll™ rastvor, tako da se faze ne pomešaju
- centrifugirati 20 minuta na 1000 rcf na sobnoj temperaturi, u kliničkoj centrifugi

- nakon centrifugiranja, u novu sterilnu epruvetu pipetom prebaciti međufazu (*engl.* „buffy coat“) koja sadrži MĆPK
- suspenziju ćelija isprati dva puta PBS puferom
- nakon svakog ispiranja centrifugirati 5 minuta na 750 rcf na sobnoj temperaturi
- nakon drugog centrifugiranja dekantovati PBS i talog resuspendovati u TRIzol™ reagensu (u 1 mL reagensu resuspendovati maksimalno 1×10^7 ćelija)
- suspenziju mononuklearnih ćelija u TRIzol™ reagensu koristiti odmah za izolaciju RNK ili zamrznuti na -80°C za čuvanje u dužem vremenskom periodu

Izolovanje RNK iz MĆPK suspendovanih u TRIzol™ reagensu

Protokol

- ćelije u TRIzol™ reagensu lizirati provlačenjem kroz nastavak za pipete
- lizirani uzorak ostaviti da stoji na sobnoj temperaturi 5 minuta da bi nukleoproteinski kompleksi u potpunosti disosovali
- dodati 200 μL hloroforma, snažno promućkati ili promešati na vortex mešalici da se dobije mlečno-homogena emulzija i ostaviti da stoji 15 minuta na $+4^{\circ}\text{C}$ u frižideru
- nakon centrifugiranja 15 minuta na 12000 rcf na $+4^{\circ}\text{C}$ pojavljuju se jasno odvojene faze gornja (vodena) faza u kojoj se nalazi RNK, interfaza i donja (fenol-hloroformska) organska faza u kojoj se nalaze DNK i proteini
- gornju, vodenu fazu prebaciti u novu tubicu i dodati onoliko mL izopropanola koliko ima i vodene faze (500-600 μL)
- promešati invertovanjem tube 10 puta i ostaviti da stoji 30 minuta na sobnoj temperaturi da bi se izvršila precipitacija RNK
- centrifugirati 15 minuta na 12000 rcf na $+4^{\circ}\text{C}$; dekantovati supernatant i isprati talog sa 1mL 75% etanola
- centrifugirati 10 minuta na 12000 rcf na $+4^{\circ}\text{C}$; ukloniti nastavkom pažljivo etanol i talog osušiti na sobnoj temperaturi; isprati talog 2 puta
- talog RNK rastvoriti u 50 μL vode za PCR analizu i čuvati na -80°C
- koncentraciju i čistoću rastvora RNK odrediti spektrofotometrijski, a integritet utvrditi elektroforezom na nativnom agaroznom gelu

Izolacija RNK iz organa pacova pomoću TRIzol™ reagensa

Tkiva pacova (jetra, belo masno tkivo i aorta) su homogenizovana u tarioniku pomoću pistila (jetra i masno tkivo) u prisustvu TRIzol™ reagensa i pomoću tečnog azota (aorta, sa koje je prethodno uklonjeno masno i vezivno tkivo), nakon čega je dodat TRIzol™ reagens. Za homogenizaciju 50-100 mg tkiva korišćeno je 1 mL TRIzol™ reagensa. Nakon homogenizacije, postupak izolacije RNK iz tkiva je identičan postupku izolacije iz suspenzije MČPK.

III.3.5.2. Izolacija RNK korišćenjem ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation™ instrumenta

Poluautomatska procedura izolacije RNK na ABI instrumentu korišćenjem vakuuma i specijalizovanih reagenasa omogućava simultano tretiranje 96 uzoraka u roku od sat vremena (113). Liziranje ćelija se dešava, gotovo, odmah nakon dodatka lizirajućeg reagensa (*engl.* „Nucleic Acid Purification Lysis Solution“) u uzorak pune krvi ili suspenzije MČPK. Ovaj reagens inaktivira ribonukleaze, sprečava degradaciju RNK, dok istovremeno, selektivno taloži RNK (gDNK i proteini ostaju u rastvoru), čime se postiže odvajanje RNK od DNK i drugih ćelijskih debrisa. Takođe, uklanjanje gDNK i PCR inhibitora se postiže korišćenjem reagensa „Absolute RNA Wash Solution“.

Reagensi

Fosfatni pufer (PBS): 137 mmol/L NaCl, 2,7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 2mmol/L KH₂PO₄, pH = 7,4; sterilisan u autoklavu.

„**2× Nucleic Acid Purification Lysis Solution**“ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

„**RNA Purification Wash Solution 1**“ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

„**RNA Purification Wash Solution 2**“ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

„**Absolute RNA Wash Solution**“ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

„**Nucleic Acid Purification Elution Solution**“ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Aparatura

ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Eksperimentalni postupak

Izolacija RNK iz pune krvi i MČPK izvodi se na instrumentu ABI identičnim postupkom prema preporukama proizvođača (113), samo sa razlikom početne pripreme uzorka. Prilikom korišćenja pune krvi, uzorak se razblažuje sa PBS puferom u odnosu 1:1, a zatim na dobijenu smesu dodaje ista zapremina „2× Nucleic Acid Purification Lysis Solution“. Međutim, prilikom korišćenja MČPK, na „buffy coat“ koji se dobija nakon izolacije na Ficoll™ gradijent-gelu dodaje prethodno pripremljen rastvor PBS i „2× Nucleic Acid Purification Lysis Solution“ u odnosu 1:1. Maksimalne količine krvi (750 µL) i ćelija (5×10^6) iskorišćene za pripremu lizata koji podležu daljoj izolaciji RNK ili bivaju zamrznuti na -80°C na duže čuvanje. U odnosu na preporuke proizvođača, a u sklopu optimizacije metode izolacije RNK iz pune krvi ili MČPK, modifikovan je broj MČPK koji je aplikovan u aparatu. Umesto preporučenih 1×10^6 ćelija, korišćeno je 5×10^6 ćelija, pošto u preliminarnim eksperimentima nije izmerena apsorbanija rastvora RNK dobijena iz 1×10^6 ćelija i nije detektovana na nativnom agaroznom gelu. Sukcesivno dodavanje lizata MČPK nije dovelo do toga da se filter na ploči za izolaciju RNK zapuši, tako da je pouzdano izvršeno izolovanje RNK bez proporcionalnog povećanja količine ostalih reagenasa. Na sličan način je povećana i zapremina lizata pune krvi. Međutim, već prilikom dodavanja naredne zapremine od 650 µL filter na ploči za izolaciju se zapušio.

Protokol

- na 40 µL „RNA Purification Wash Solution 1“ koji je prethodno dodat na ploču za izolaciju dodati 650 µL lizata i propustiti kroz 80% vakuum u trajanju od 180 sekundi
- dobijeni talog ispirati sa „RNA Purification Wash Solution 1“ i sa „RNA Purification Wash Solution 2“ pod vakuumom od 80% u trajanju od po 180 sekundi
- dobijeni talog inkubirati sa „Absolute RNA Wash Solution“ 900 sekundi, a zatim sa „RNA Purification Wash Solution 2“ 300 sekundi

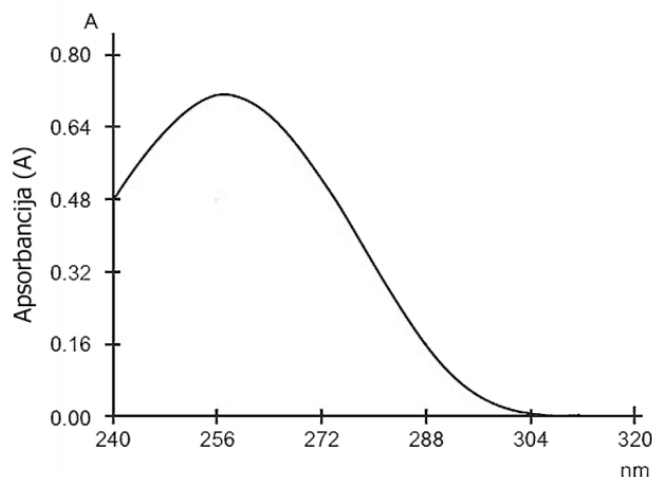
- nakon inkubacije, vakuumom ukloniti rastvore, dok RNK ostaje staložena na površini membrane ploče za izolaciju
- ispirati dva puta sa „RNA Purification Wash Solution 2“ pod vakuumom od 80% u trajanju od po 180 sekundi
- pre-eluacioni vakuum od 90% u trajanju od 300 sekundi će dodatno staložiti RNK
- eluirati RNK pomoću „Nucleic Acid Purification Elution Solution“ pri čemu se dobija 150 μ L rastvora RNK

Uzorak RNK dobijen ABI metodom se može odmah koristiti za kvantitativnu analizu, ili se čuva u dužem vremenskom periodu na -80°C .

III.3.5.3. Određivanje koncentracije i provera kvaliteta rastvora RNK

Spektrofotometrijska analiza predstavlja direktan način određivanje koncentracije i čistoće rastvora nukleinskih kiselina (110).

Čisti rastvori RNK imaju karakterističan apsorpcioni spektar između 230 i 320 nm (slika 4). On je predstavljen oblikom iskrivljene zvonaste krive sa maksimumom apsorbcije na 260 nm. Apsorbancija UV zraka ima vrednost nula na 320 nm. Uzorci RNK visokog kvaliteta imaju pozitivan nagib krive između 230 nm i 260 nm, a negativan nagib nakon 260 nm.



Slika 4. Tipičan UV apsorpcioni spektar čiste RNK

Merenje apsorbancije na talasnoj dužini od 260 nm omogućava direktno računanje koncentracije RNK u uzorku prema jednačini:

$$[\text{RNK}], \text{ ng } / \mu\text{L} = \text{A260} \times \text{faktor razblaženja uzorka} \times 40$$

A260 – apsorbancija izmerena na 260 nm

40 – srednji apsorpcioni koeficijent za RNK na $\lambda = 260$ nm

Računanje koje se bazira na talasnoj dužini od 260 nm daje malo informacija o kvalitetu i čistoći uzorka RNK. U prisustvu velike količine soli, proteina i/ili organskih rastvarača, vrednosti apsorbancija mogu da budu promenjene u velikoj meri. Iz ovog razloga, računanje odnosa apsorbancija A260/A280, A260/A230 i A260/A240 predstavlja prihvatljivu procenu čistoće rastvora RNK. Odnos apsorbancija A260/A280 rastvora čiste RNK ima vrednost $2,0 \pm 0,1$. Odnos apsorbancija niži od ovog obično označava kontaminaciju proteinima prenetu rastvoru RNK tokom izolacije. Odnos apsorbancija A260/A230 treba da bude veći od 2,0, a manji od 2,4. Vrednosti niže od 2,0 mogu da označavaju kontaminaciju gvanidinom (poreklom od lizirajućeg pufera ili TRIzol™ reagensa), β -merkaptoetanolom ili drugim organskim jedinjenjima kao što su fenol, šećeri ili alkohol. Odnos A260/A240 treba da bude oko 1,4. Vrednosti značajno različite od ove označavaju prisustvo velike količine soli. Svi kontaminanti se uklanjaju reprecipitacijom RNK sa natrijum-acetatom ili etanolom, praćeno sa 2 do 3 ispiranja taloga 75% etanolom i finalnim ispiranjem 95% etanolom da bi se ubrzalo sušenje taloga RNK. Iako su vrednosti dobijene računanjem odnosa apsorbancija dobar indikator kvaliteta uzorka RNK, od velike je važnosti da se ispita i apsorpcioni spektar uzorka u opsegu talasnih dužina od 230 nm do 320 nm.

Eksperimentalni postupak

Koncentracija RNK je određena je u razblaženim uzorcima (5 μ l uzorka + 45 μ L vode za PCR analizu) spektrofotometrijskim merenjem apsorbancije na 260 nm i izračunata korišćenjem obrasca. Za svaki uzorak je urađena spektralna analiza, pri čemu su očitane i vrednosti apsorbancije na 230, 240, 280 i 320 nm. Čistoća uzoraka je procenjivana iz odnosa apsorbancija A260/280, A260/230 i A260/240.

III.3.5.4. Provera integriteta RNK

Najbolji indikator integriteta RNK je detekcija i merenje odnosa rRNK subjedinica nakon elektroforeze na 1% nativnom agaroznom gelu. RNK dobrog integriteta pokazuje jasno vidljive 28S i 18S rRNK (moguće je detektovati 5S i 5,8S rRNK subjedinice, pa čak i transportne RNK, koje, pošto su malih masa, najdalje putuju na gelu), minimalne količine degradiranih subjedinica na gelu (koje se vide kao traka ili smir, *engl.* „smear“) iznad, ispod i između 28S i 18S subjedinica. Kod sisara poželjan odnos 28S i 18S rRNK treba da bude 2:1, dok se, čak, boljim smatra i odnos 2,5:1 i veći (110). Takođe, elektroforezom na gelu se mogu detektovati nespecifične trake poput gDNK koje se ne mogu uočiti merenjima apsorbanacija na preporučenim talasnim dužinama. Merenjem apsorbanacije na 260 nm i računanje koncentracije RNK može biti lažno povećano u slučaju prisustva gDNK čije bi se eventualno prisustvo moglo ustanoviti nakon elektroforeze na gelu. gDNK će se pokazati nakon bojenja na gelu kao zona u ili ispod starta u kom je nanet uzorak (110).

Nedostatak jasno vidljivih 28S i 18S rRNK obično znači da je uzorak bio izložen napadu ribonukleaza, posebno ako se smir nalazi na donjem delu gela, ispod nivoa 18S rRNK. Takođe, prekomerna količina deterdženata i soli u uzorku mogu da uzrokuju pojavu smira, pa čak i da inhibiraju ulazak RNK u gel.

Hemikalije

Agaroz (*engl.* molecular biology grade, Sigma-Aldrich, Seelze, Nemačka)

TRIS (2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol, $C_4H_{11}NO_3$, Mr = 121,1 g/mol, Acros Organics, Geel, Belgija)

Glacijalna sirćetna kiselina (CH_3COOH , Mr = 60,1 g/mol, 99,5%, Centrohem, Stara Pazova, Srbija)

EDTA ($Na_2EDTA \times 2H_2O$, Mr = 372,4, Carlo Erba, Milano, Italija)

Etidijim-bromid (3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridijum bromid, $C_{21}H_{20}BrN_3$, Mr = 394,3 g/mol, 10 mg/mL, 10 mL Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Bromfenol-plavo [(4,4'-(1,1-dioksido-3*H*-2,1-benzoksatiol-3,3-diil)-bis-(2,6-dibromofenol), $C_{19}H_{10}Br_4O_5S$, Mr = 700,0 g/mol, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Ficoll-Paque PLUS™ (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Waukesha, Wisconsin, USA)

Reagensi

Pufer za elektroforezu TRIS-acetat-EDTA (TAE) (*engl.* „running buffer“): pravi se u normalnom sudu od 24,2 g TRIS, 5,71 mL glacijalne sirćetne kiseline, 1,86 g Na₂EDTA i dejonizovane vode do 500 mL i predstavlja 10× koncentrovan rastvor koji se čuva na sobnoj temperaturi.

Pufer za nalivanje uzorka (*engl.* „loading buffer“): pravi se u normalnom sudu od 7,5 mL dejonizovane vode u kome je rastvoreno 0,025 g bromfenol-plavog i dodato 2,5 mL Ficoll™ gela. Predstavlja 6× koncentrovan rastvor koji se čuva na sobnoj temperaturi.

Rastvor etidijum-bromida: 0,5 µg/mL koji se pravi *ex tempore*.

Aparatura

UV-VIS spektrofotometar (UV-1800, Shimadzu, Nishinokyo-Kuwabara-cho, Japan)

Horizontalan „submarine“ sistem za elektroforezu (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, UK)

EPS 601 power supply (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, UK)

MacroVue UV-25 transilluminator (Hoefler, Holliston, MA, USA)

Ekperimentalni postupak

0,75 g agaroze se rastvara uz zagrevanje u 75 mL 1×TAE pufera. Uzorci za nalivanje na gel se pripremaju tako što se 4 µL uzoraka koji sadrže od 400 - 800 ng RNK pomešaju sa 1 µL „loading buffer“. Nanose se na nativni 1% agarozni gel u adekvatnoj kadici sa 1×TAE puferom. Razdvajanje se vrši pomoću struje napona od 140 V, jačine od 170 mA u trajanju od 15 minuta. Posle završene elektroforeze, rRNK subjednice se vizueliziraju nakon bojenja sa etidijum-bromidom na transiluminatoru na $\lambda=306$ nm.

III.3.6. Kvantifikacija genske ekspresije

Analiza nukleinskih kiselina kao novo poglavlje u fundamentalnoj nauci započela je otkrićem PCR koja je omogućila *in vitro* amplifikaciju (umnožavanje) željenog segmenta DNK imitirajući prirodnu replikaciju koja se normalno odvija u ćelijama. RT koja prethodi PCR predstavlja modifikaciju klasične PCR metode i namenjena je detekciji i kvantifikaciji RNK sekvenci. U RT-PCR metodi se u prvom koraku sintetiše

cDNK na osnovu RNK matrice, a zatim se cDNK amplifikuje klasičnom PCR metodom. Usavršavanjem ove dve metode, u cilju prevazilaženja nedostataka koji su se prvenstveno odnosili na završnu kvantifikaciju nukleinskih kiselina, nastao je Real time PCR (Real time RT-PCR, ili kinetički RT-PCR, ili kvantitativni PCR, ili qPCR) kao jedna od najsavremenijih metoda za detekciju i kvantifikaciju nukleinskih kiselina, a posebno iRNK kao nosioca ekspresije gena. Metoda Real time PCR zbog svoje visoke osetljivosti, dobre reproducibilnosti i širokog dinamičkog opsega kvantifikacije naročito je pogodna za kvantifikaciju male količine transkripata u tkivima sa malom količinom RNK, za male količine biološkog materijala i za male promene u vrednostima genske ekspresije (127,128).

Iako je „mikroarray“ tehnologija poslednjih decenija uzela maha u analizi velikog broja genskih transkripata simultano naspram tehnologija koje su bile ograničene na analizu jednog gena ili malog klastera gena, još uvek postoje nedoslednosti u njenim rezultatima koje je potrebno validirati qPCR ili imunohistohemijским metodama (50,60).

Aparatura

7500 Real time PCR Sistem (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Klinička centrifuga Univerzal Z 300 (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Nemačka)

Centrifuga („Minispin plus“, Eppendorf Instrumente GmbH, Hamburg, Nemačka)

Vortex mešalica (VELP Scientifica, Milano, Italija)

Laminarna komora (Thermo Scientific, HERASafe, Waltham, MA, USA)

III.3.6.1. Reakcija reverzne transkripcije

U RT reakciji sintetisana je cDNK na osnovu RNK matrice korišćenjem enzima MultiScribe™ reverzne transkriptaze prema preporukama proizvođača (129).

Reagensi

High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) koji sadrži sve komponente za RT osim vode za PCR analizu

Standard ukupne humane RNK (*engl.* Control total human RNA, P/N 4307281, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Voda za PCR analizu (Ambion, Austin, Texas, USA)

Eksperimentalni postupak

Sastav reakcione smeše u ukupnoj zapremini od 20 μ L je sledeći:

- 10 μ L RNK određene koncentracije
- 2 μ L 10 \times koncentrovanog pufera za RT (*engl.* „RT Buffer“)
- 0,8 μ L 25 \times mešavine dezokinukleozid-trifosfata (dNTP Mix) koncentracije 100 mmol/L
- 2 μ L 10 \times nasumičnih prajmera (*engl.* „Random Primers“)
- 1 μ L reverzne transkriptaze (*engl.* „MultiScribe Reverse Transcriptase™“)
- 1 μ L ribonukleaznog inhibitora (*engl.* „RNase inhibitor“)
- 3,2 μ L vode za PCR analizu.

Prvobitno se vrši inkubacija od 10 minuta na 25°C. Nakon nje, u trajanju od 120 minuta na 37°C, vrši se RT i koja se završava na 85°C u trajanju od 5 sekundi.

Ukupna humana RNK korišćena kao kalibrator je, takođe, prepisana u cDNK. Svaki RT eksperiment je praćen reakcijom bez enzima reverzne transkriptaze i bez RNK, umesto kojih se koristila voda za PCR analizu čime se dodatno proverava eventualna kontaminacija gDNK i da li je došlo do ukrštene kontaminacije prilikom pripreme ploče za qPCR. Ove negativne kontrole za RT su tretirane kao i ostali uzorci. RT je izvedena na 7500 Real-Time PCR sistemu.

Koncentracije cDNK koje su korišćene za narednu fazu qPCR određene su pomoću standardne krive posebno za svaku grupu ispitanika i eksperimentalnih životinja.

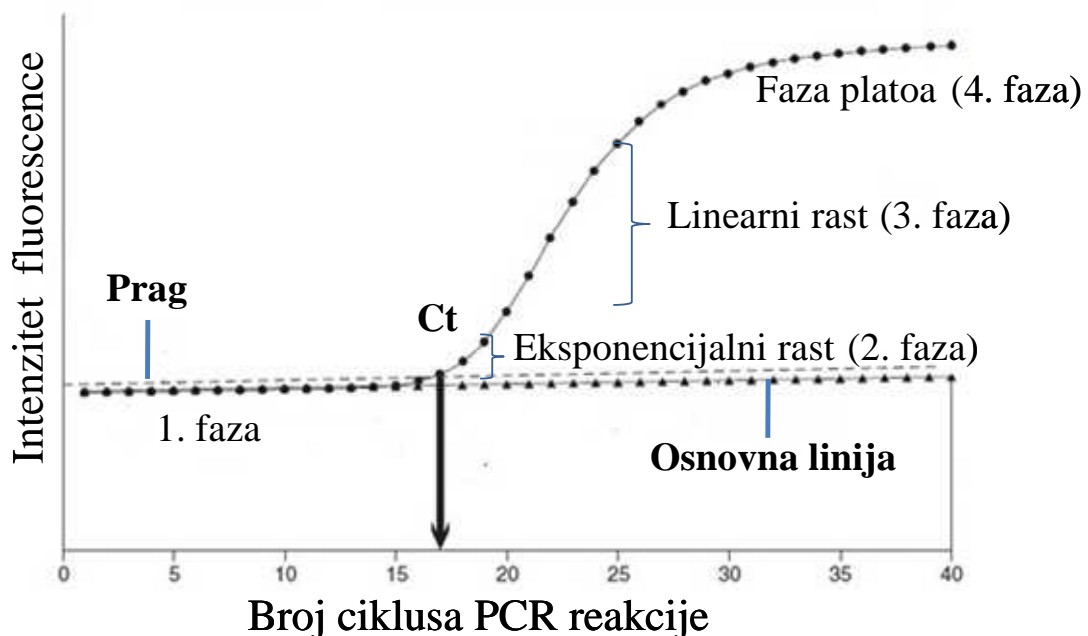
III.3.6.2. Real time PCR

Za kvantitativnu analizu genske ekspresije (nivoa iRNK) je korišćena qPCR metoda. cDNK nastala u reakcijama RT se amplifikuje korišćenjem specifičnih začetnika ili prajmera za regione gena antioksidativne zaštite Cu/Zn SOD, Mn SOD kod ljudi i PON1, PON2 i PON3 kod eksperimentalnih životinja. qPCR eksperimenti su izvedeni na 7500 Real-Time PCR sistemu korišćenjem TaqMan™ hemije.

III.3.6.2.1. Princip Real time PCR metode

qPCR je metoda koja omogućava kvantifikaciju genske ekspresije u realnom vremenu tj. u trenucima kako se reakcija dešava. Reakcija se karakteriše brojem ciklusa kada je amplifikacija specifičnog transkripta prvi put detektovana, a ne podrazumeva detekciju broj transkripta nakon unapred definisanog broja ciklusa. U toku PCR reakcije emituje se fluorescentni signal čiji se intenzitet povećava direktno proporcionalno količini novonastalih PCR produkata (128).

U toku PCR reakcije mogu se razlikovati 4 karakteristične faze (slika 5): 1. faza se nalazi ispod fluorescence pozadine gde se očekuje eksponencijalna amplifikacija; 2. faza se nalazi iznad osnovne linije i karakteriše je eksponencijalni rast fluorescence; u 3. fazi dolazi do naglog, strmog porasta intenziteta fluorescence i ova faza definiše linearnu amplifikaciju; na kraju PCR reakcije 4. faza, faza platoa, u toku koje se održava konstantnom brzina akumulacije PCR produkata uz malu promenu fluorescence. (130,131). Količina amplifikovane ciljne sekvence analiziranog gena je direktno proporcionalna njegovoj početnoj količini samo tokom eksponencijalne faze PCR reakcije. Prema tome, ključni činilac u kvantifikaciji pomoću qPCR metode je merenje PCR produkta analiziranog gena u okviru ove faze.



Slika 5. Tok PCR reakcije

U početnim ciklusima intenzitet fluorescence se značajno ne menja što definiše opseg PCR ciklusa koji se naziva bazalni nivo ili osnovna linija (*engl.* „baseline“). Drugim rečima, osnovna linija se odnosi na početne cikluse PCR reakcije u kojima dolazi do

male promene fluorescentnog signala tj. 1. fazu PCR reakcije. Definišu je početni ciklus 3 i završni 15 koje „7500 System SDS Software“ podešava automatski. Ovaj opseg ciklusa može da se podesi i manuelno nakon uvida u tok reakcija. Linija koja sa postavlja neposredno iznad osnovne linije, ali dovoljno nisko u okviru eksponencijalnog dela amplifikacione krive naziva se prag (*engl.* „threshold“). Prag postavlja program automatski, ili se pak može postaviti manuelno od strane operatera, kao i osnovna linija (132). Ciklus u kome je fluorescentni signal seče prag naziva se ciklus praga (*engl.* „threshold cycle“ – Ct). Vrednost Ct je obrnuto proporcionalna količini ciljne sekvence u uzorku. Što je veći početni broj kopija ciljne sekvence tj. transkripata, Ct ima manju vrednost i obratno (133).

III.3.6.2.2. Detekcija i kvantifikacija PCR produkata

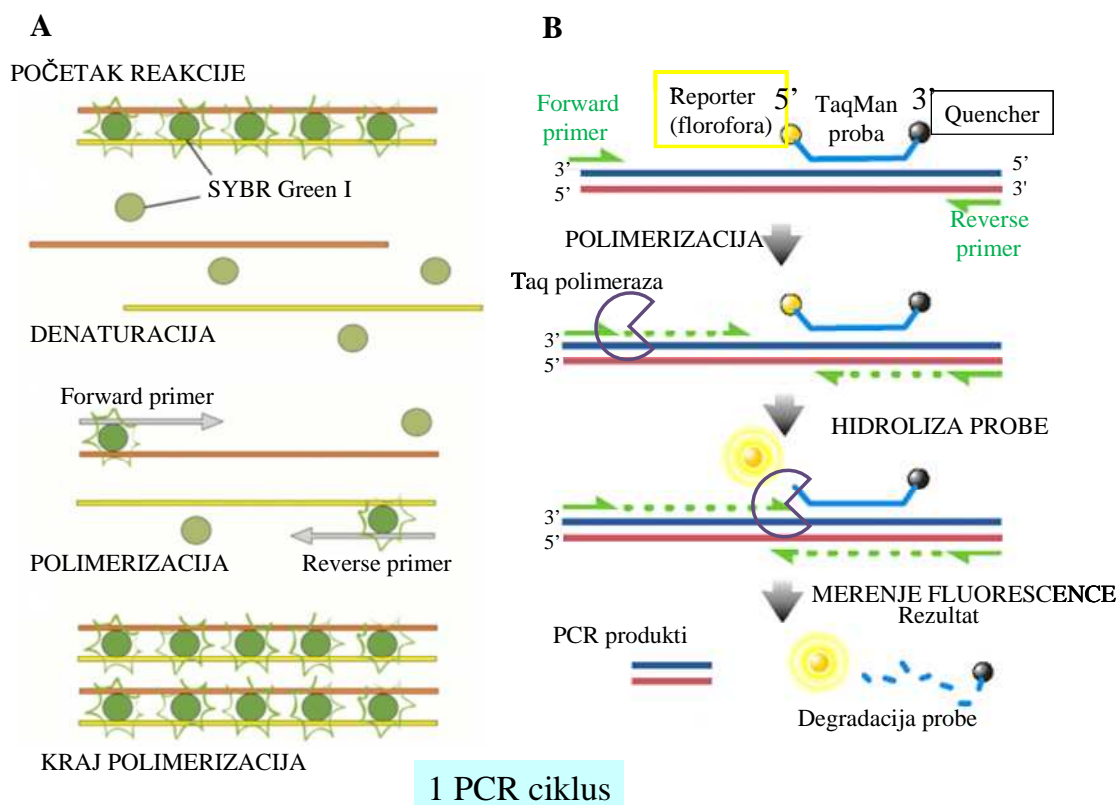
Koriste se dve tehnike kojima se detektuju PCR produkti (slika 6):

1. SYBR Green™

SYBR Green tehnika zasnovana je na primeni interkalirajuće SYBR Green I boje koja se vezuje za manji žleb dvolančane DNK. Sa povećanjem broja ciklusa PCR reakcije povećava se i količina dvolančane DNK, a samim tim i intenzitet fluorescentnog signala koga emituje SYBR Green I boja. Nedostatak ove tehnike je da se njom detektuju sve dvolančane DNK, uključujući i nespecifične produkte reakcije (134).

2. TaqMan™

Detekcija samo specifičnih produkata amplifikacije u toku PCR reakcije je postignuta uvođenjem fluorogene probe koja podleže 5' → 3' egzonukleaznoj aktivnosti DNK polimeraze. TaqMan-ova proba je oligonukleotid koji sadrži reporter tj. fluorescentnu boju na 5' kraju i boju koja sprečava fluorescencu, tj. kvenčer (*engl.* quancher) na 3' kraju. TaqMan-ova proba se, po principu komplementarnosti, vezuje za unutrašnji region PCR produkta, između prajmera. Dok se reporter i kvenčer nalaze u blizini, tj. kada je proba intaktna, kvenčer apsorbuje fluorescencu koju emituje reporter i nema emisije signala. Kada DNK polimeraza replikuje lanac DNK za koji je vezana proba, svojom 5' egzonukleaznom aktivnošću uklanja probu sa lanca i sa nje odvaja nukleotide počevši od 5' kraja za koju je vezan reporter. Ovo dovodi do emitovanja fluorescencije čiji se intenzitet povećava nakon svakog ciklusa proporcionalno brzini razgradnje probe, tj. povećanju slobodnih reportera (133,135).



Slika 6. Tipovi hemije za detekciju qPCR proizvoda, SYBR Green (A) i TaqMan (B)

Kvantifikacija PCR produkata (133) može biti:

1) **apsolutna**, gde se određuje tačan broj kopija ciljne sekvence preko standardne krive. Metoda zahteva da budu poznate apsolutne količine kalibratora koji se koriste za konstruisanje standardne krive. U tu svrhu, obično se kao kalibrator, koristi RNK poznate koncentracije koja je prevedena u broj kopija RNK preko molekulske težine. Iz desetostrukih razblaženja kalibratora konstruiše se standardna kriva sa koje se ekstrapolacijom, preko poznatog Ct uzorka nepoznatog broja kopija, očitava tačan broj kopija RNK;

2) **relativna**, gde se određuje promena u genskoj ekspresiji ciljnog gena u testiranom uzorku u odnosu na isti gen u kalibratoru. U ovom slučaju, nije potrebno znati tačan broj kopija ciljnog gena kao kod apsolutne kvantifikacije i nije neophodno koristiti standardnu krivu.

Da bi se vrednosti genske ekspresije dobile apsolutnom ili relativnom kvantifikacijom, potrebno je da se izvrši normalizacija dobijenih podataka (Ct vrednosti). To se postiže korišćenjem endogene kontrole, pošto se, uporedo sa amplifikacijom ciljnog gena vrši i njena amplifikacija.

Tip kvantifikacije koji odgovara ciljevima našeg istraživanja je relativna kvantifikacija. U okviru nje, računanje ekspresije ciljnog gena može se izvršiti metodom relativne standardne krive ili komparativnom $\Delta\Delta\text{Ct}$ metodom (133). U ovom radu su korišćene obe metode računanja genske ekspresije.

III.3.6.2.3. Validacija Real time PCR metode

Pre odabira načina računanja genske ekspresije, izvodi se validacija eksperimenta (133) kojom se testiraju efikasnosti PCR amplifikacije ciljnog gena i endogene kontrole. Ove dve efikasnosti treba da bude približno iste. Da bi se utvrdilo da li dve PCR reakcije imaju istu efikasnost, analizira se kakav je odnos ΔCt (Ct ciljnog gena – Ct endogene kontrole) i logaritamskog serijskog dvostrukog razblaženja uzorka RNK. Nagib semi-logaritamske regresione linije treba da bude manji od 0,1 da bi se smatralo da su efikasnosti amplifikacija oba gena ekvivalentna. Međutim, pošto se time ne pokazuje kakva je pojedinačna PCR amplifikacija, treba izračunati relativnu efikasnost PCR amplifikacije ciljnog gena i endogene kontrole. Ako se pokaže da ciljni gen i endogena kontrola imaju sličnu tj. blisku efikasnost, za računanje relativne genske ekspresije se može koristiti $\Delta\Delta\text{Ct}$ metoda, u suprotnom primenjuje se metoda relativne standardne krive.

Efikasnost amplifikacije predstavlja brzinu stvaranja PCR produkata (amplikona) i izražava se u procentima. Ako se količina PCR produkata udvostručuje tokom ekspanzionalne faze PCR reakcije, onda je njena efikasnost 100%. Ako se efikasnost smanjuje, količina PCR produkata smanjivaće se u svakom narednom ciklusu i kriva amplifikacije će biti pomerena u desno, tj. kasnije.

Nagib standardne krive (a) se obično koristi za računanje efikasnosti PCR amplifikacije (E) prema jednačini:

$$E = 10^{-1/a} - 1$$

qPCR standardna kriva se grafički prikazuje kao semi-logaritamska regresiona kriva koja je predstavljena funkcijom $\text{Ct} = f(\log \text{ konc. RNK})$. Zadovoljavajuće vrednosti za efikasnost amplifikacije PCR reakcije treba da budu od 90% do 110%, tj. nagibi standardnih krivih treba da imaju vrednost između -3,6 i -3,1. Standardna kriva koja ima nagib -3,32 predstavlja reakciju sa 100% efikasnošću. Nagibi krivih koji su manji od -3,6 (npr. -3,9) definišu reakciju sa efikasnošću manjom od 90%, dok nagibi veći od -3,1

(npr. -2,5) daju reakcije sa efikasnošću većom od 110%, verovatno, uzorkovane lošim kvalitetom uzoraka, greškama u pipetiranju ili prisustvom inhibitora.

Izračunata PCR efikasnost nam govori kakav će biti učinak našeg komercijalnog testa za kvantifikaciju iRNK ciljnog gena u qPCR metodi. Male PCR efikasnosti obično rezultiraju u lošoj preciznosti između replikata uzoraka.

III.3.6.2.4. Metoda standardne krive za relativnu kvantifikaciju

Metoda standardne krive za računanje relativne ekspresije ili relativna standardna kriva se koristi za očitavanje količine cDNK nepoznatog uzorka ekstrapolacijom preko njegove Ct vrednosti, a ekspresija izražava relativno u odnosu na kalibrator. Konstruiše se tako što se logaritamske vrednosti dvostrukih razblaženja rastvora cDNK nanose na x-osu, a njihove odgovarajuće vrednosti Ct na y-osu za ispitivane gene i za endogenu kontrolu posebno. Da bi se mogla koristiti za predviđanja, ona mora da ima nagib $-3,3 \pm 10\%$ i $R^2 \geq 0,99$. Za računanje relativne genske ekspresije količina cDNK uzorka za testirani gen se normalizuje tj. deli sa količinom cDNK istog uzorka za endogenu kontrolu. Zatim, normalizovane količine cDNK za svaki uzorak se dele sa normalizovanim količinama cDNK za kalibrator. Dobijene vrednosti relativne genske ekspresije (RQ) uzoraka su izražene kao n-puta razlika u odnosu na kalibrator za koga se smatra da ima $RQ = 1$ (133).

Relativna genska ekspresija se računa pomoću sledećih obrazaca:

Normalizovani ciljni gen (u uzorku) = količina cDNK za ciljni gen (ng/μL) / količina cDNK za endogenu kontrolu (ng/μL)

Normalizovani ciljni gen (u kalibratoru) = količina cDNK za ciljni gen (ng/μL) / količina cDNK za endogenu kontrolu (ng/μL)

RQ = Normalizovani ciljni gen (u uzorku) / Normalizovani ciljni gen (u kalibratoru)

III.3.6.2.5. Komparativna $\Delta\Delta Ct$ metoda

Komparativna $\Delta\Delta Ct$ metoda je češće korišćena i jednostavnija metoda za računanje relativne ekspresije ciljnog gena, zato što ne zahteva korišćenje standardne krive, već koristi matematičku formulu za računanje vrednosti genske ekspresije (120). Uslov da bi se ovaj način računanja primenio i davao pouzdane rezultate je da efikasnosti amplifikacija ciljnog gena i endogene kontrole budu bliske i u rasponu vrednosti 90 - 110%.

Relativna ekspresija (RQ) ciljnog gena, normalizovana u odnosu na endogenu kontrolu i relativna u odnosu na standard se računa po sledećem obrascu:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

pri čemu je:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{uzorka} - \Delta Ct_{kalibratora}$$

ΔCt uzorka i ΔCt kalibratora su normalizovane količine ciljnog gena u uzorku i kalibratoru, a koje se računaju na sledeći način:

$$\Delta Ct_{uzorka} = Ct_{ciljni\ gen\ u\ uzorku} - Ct_{endogena\ kontrola\ u\ uzorku}$$

$$\Delta Ct_{kalibratora} = Ct_{ciljni\ gen\ u\ kalibratoru} - Ct_{endogena\ kontrola\ u\ kalibratoru}$$

Reagensi

TaqMan™ komercijalni testovi (*engl.* TaqMan™ Gene Expression Assays, Assay-on-Demand™ Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sa 5' egzonukleaznom aktivnošću za kvantifikaciju genske ekspresije koji sadrže specifične prajmere i probe za svaki gen sledećih kataloških brojeva:

Hs00533490_m1 za Cu/Zn SOD

Hs00167309_m1 za Mn SOD

Hs99999903_m1 za β -aktin

Rn01455909_m1 za PON1

Rn01456019_m1 za PON2

Rn01500926_m1 za PON3

Rn00565886_m1 za HMBS

Za odabir endogene kontrole testirano je 2 gena za MČPK i krv ispitanika, gliceraldehid-3-fosfatdehidrogenaza (GAPDH) i β -aktin i 8 gena za tkiva eksperimentalnih životinja, GAPDH, β -aktin, TBP (*engl.* TATA box binding protein), Ywhas (*engl.* tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide), β -2-mikroglobulin (B2M), HPRT1 (*engl.* hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1), HMBS (*engl.* hydroxymethylbilane synthase) i PPIA (*engl.* peptidyl prolyl isomerase A). Kao geni sa najstabilnijom ekspresijom su se pokazali humani β -aktin i HMBS gen za tkiva eksperimentalnih životinja. Rezultati testiranja ovih gena su urađeni preko programa *geNorm* VBA applet for Microsoft Excel i nisu prikazani u ovoj disertaciji.

2×TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Voda za PCR analizu (Ambion, Austin, Texas, USA)

Eksperimentalni postupak

Reakciona smeša u ukupnoj zapremini od 20 µL sadržala je sledeće komponente:

- 10 µL 2× „TaqMan™ Universal PCR Master Mix”
- 1 µL 20× TaqMan™ Gene Expression Assay
- 4 µL cDNK uzorka određene koncentracije
- 5 µL Voda za PCR analizu

Vremena i termalni protokoli reakcije je predložio proizvođač:

1. Inicijalna faza: 2 minuta na 50°C
10 minuta na 95°C
2. PCR faza: 40 ciklusa denaturacije na 95°C 15 sekundi i amplifikacije na 60°C u toku 1 minuta.

Izračunavanje

Svi uzorci su urađeni u triplikatu (standardna devijacija Ct vrednosti manja od 0,16) i aritmetička sredina Ct vrednosti je uzeta za izračunavanje vrednosti relativne genske ekspresije. Svaka ploča je sadržala uzorak bez cDNK kao kontrola za potencijalnu unakrsnu kontaminaciju. U svaku analizu je bila uključena endogena kontrola zbog korekcije internih razlika u efikasnosti amplifikacija, a nivo ekspresije svakog gena u uzorku je normalizovan sa nivoom ekspresije svoje endogene kontrole. Ct vrednosti svakog uzorka iz pulovane krvi su dobijene pri automatskom i manuelnom podešavanju, dok se za ostale humane i uzorke dobijene od eksperimentalnih životinja koristilo samo manuelno podešavanje osnovne linije i praga amplifikacije.

Za računanje relativne genske ekspresije kod fudbalera je korišćena relativna standardna kriva, pri čemu su rezultati izraženi kao stepen promene u odnosu na kalibrator „Control total human RNA” kojoj je dodeljena vrednost relativne ekspresije 1. Računanje genske ekspresije kod eksperimentalnih životinja je izvršeno samo pomoću relativne standardne krive, pri čemu su količine cDNK svakog uzorka u testiranom genu deljene sa količinom cDNK u endogenoj kontroli bez korišćenja kalibratora. Računanje relativne

genske ekspresije je urađeno $\Delta\Delta C_t$ metodom i relativnom standardnom krivom za uzorak pulovane krvi.

III.3.7. Statistička obrada podataka

Statistička analiza izvedena je primenom odgovarajućih statističkih testova. Normalnost distribucije je proveravana Kolmogorov-Smirnov testom. Za analizu podataka distribuiranih po normalnoj raspodeli upotrebljeni su Student-ov t -test i analiza varijanse (ANOVA) sa Tucky *post hoc* test-om. Pre analize parametara sa log-normalnom raspodelom izvršena je njihova logaritamska transformacija (kod TG). Podaci koji nisu pratili normalnu raspodelu analizirani su primenom neparametarskog Kruskall-Wallis testa za analizu razlika između većeg broja grupa, dok je za poređenje rezultata između dve grupe primenjen Mann-Whitney test. Korelacija između normalno distribuiranih parametara proverena je Pearson-ovom linearnom regresionom analizom. Istovremeni uticaj dve ili više promenljivih na varijaciju u zavisnoj promenljivoj testiran je upotrebom multiple linearne regresije po enter principu selekcije. Korelacija parametara koji nisu distribuirani po normalnoj raspodeli testirana je Spearman-ovom neparametarskom korelacionom analizom. Varijacije parametara izražene su kao koeficijent varijacije (KV, %).

Vrednosti parametara sa normalnom raspodelom su prikazane kao aritmetička srednja vrednost \pm standardna devijacija ($\bar{x} \pm SD$). Za log-normalno distribuirane parametre, vrednosti su prikazane kao geometrijska srednja vrednost i 95% interval pouzdanosti (CI) za geometrijsku sredinu. Parametri čija raspodela nije bila normalna predstavljani su kao medijana (Me) i interkvartilno odstupanje. U Pearson-ovoj linearnoj analizi vrednosti su prikazane kao koeficijenti korelacije (r), dok su u multiploj linearnoj analizi vrednosti prikazane kao R^2 , nestandardizovani koeficijent korelacije (B) i njegova standardna greška (SE_B).

Statistička analiza je izvođena uz upotrebu računarskog programa PASW™ Statistic verzija 18, MedCalc™ (Mariakerke, Belgium) verzija 11.4.4.0 and Microsoft™ Office Excel 2007. Razlike u vrednostima parametara su smatrane statistički značajnim za nivo značajnosti (p) manji od 0,05.

IV. REZULTATI

IV.1. UTICAJ FIZIČKE AKTIVNOSTI NA GENSKU EKSPRESIJU IZOENZIMA SOD

Uticaj intenzivnog treniranja nakon 12 nedelja na vrednosti genske ekspresije Cu/Zn SOD i Mn SOD je ispitivan u grupi fudbalera koji se pre ove studije nisu profesionalno, već samo rekreativno bavili sportom. Od njih su prvobitno uzeti podaci o starosti, izmerena im je visina i težina, a izračunat im je ITM. Fudbaleri su imali $17,3 \pm 0,5$ godina sa prosečnom visinom od $180,8 \pm 4,6$ cm i težinom od $73,6 \pm 8,1$ kg. Izračunat ITM je iznosio $22,9 \pm 2,1$ kg/m² na početku i $22,9 \pm 1,8$ kg/m² na kraju studije. Razlika u ITM nije bila značajna nakon 12 nedelja treniranja ($p=0,946$). VO₂max je bio statistički značajno veći nakon intenzivnog treniranja nego pre ($p=0,03$), $56,5 \pm 3,6$ mL/min/kg i $54,8 \pm 3,9$ mL/min/kg, respektivno.

Nije uočena statistički značajna razlika u hematološkim parametrima kod fudbalera pre i nakon intenzivne fizičke aktivnosti, osim koncentracije hemoglobina koja je nakon 12 nedelja bila značajno niža, ali u okviru referentnih vrednosti (tabela 1).

Tabela 1. Osnovni hematološki parametri kod fudbalera

	Pre treniranja	Posle treniranja	p
Eritrociti (x10 ¹² /L)	5,34±0,37	5,20±0,22	0,184
Hemoglobin, g/L	153,20±7,48	146,00±5,87	0,047
Leukociti (x10 ⁹ /L)	5,97±0,83	6,12±1,29	0,718
Granulociti (x10 ⁹ /L)	3,14±0,92	3,33±1,17	0,662
Limfociti (x10 ⁹ /L)	2,10±0,58	2,02±0,37	0,480
Monociti (x10 ⁹ /L)	0,73±0,14	0,77±0,08	0,784
Trombociti (x 10 ⁹ /L)	241,10±57,78	237,70±44,80	0,722

Vrednosti su prikazane kao $\bar{x} \pm SD$. p-verovatnoća za Student-ov *t*-test za parove

Osnovni biohemijski parametri su prikazani u tabeli 2. Student-ov *t*-test za parove je pokazao da nema razlike u koncentracijama parametara pre i posle 12 nedelja treniranja, osim za aktivnosti ALT i AST koje su bile statistički značajno niže nakon 12 nedelja ($p=0,03$ i $p<0,001$, respektivno), ali u okviru referentnih vrednosti.

Tabela 2. Osnovni biohemijski parametri pre i posle 12 nedelja intenzivne fizičke aktivnosti

	Pre treniranja	Posle treniranja	p
Glukoza, mmol/L	6,00±0,58	5,96±0,62	0,987
Urea, mmol/L	6,71±0,99	6,76±1,19	0,868
Kreatinin, µmol/L	132,24±7,52	128,03±13,34	0,078
Mokraćna kiselina, µmol/L	344,13±120,41	330,37±89,50	0,681
Bilirubin, µmol/L	14,14±9,27	15,97±5,77	0,541
ALT, U/L	22,33±5,38	18,67±4,64	0,030
AST, U/L	42,5±10,82	26,83±8,18	<0,001
CRP, mg/L	2,21±2,2	2,18±1,63	0,972
UH, mmol/L	4,42±0,50	4,36±0,65	0,655
HDL-H, mmol/L	1,27±0,19	1,33±0,17	0,120
LDL-H, mmol/L	2,88±0,74	2,74±0,62	0,488
TG, mmol/L*	0,79 (0,67-0,93)	0,63 (0,52-0,77)	0,070

Vrednosti su prikazane kao $\bar{x} \pm SD$. p-verovatnoća za Student-ov *t*-test za parove
 *geometrijska srednja vrednost (95% CI) za vrednosti koje imaju log-normalnu raspodelu

Hematološki parametri i osnovni biohemijski parametri (tabele 1 i 2) su potvrdili da mladi fudbaleri nisu imali inflamatorno, infektivno ili neko drugo oboljenje koje bi, eventualno, moglo da utiče na gensku ekspresiju izoenzima SOD.

Nivo oksidativnog stresa pre i posle 12 nedelja intenzivne fizičke aktivnosti analiziran je određivanjem specifičnih markera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u krvi (tabela 3). U grupi fudbalera, prooksidansi i antioksidansi nisu bili u ravnoteži. Aktivnosti ukupne SOD su bile značajno niže, a nivoi O_2^- značajno viši nakon 12 nedelja intenzivne fizičke aktivnosti. Iako je aktivnost ukupne SOD bila značajno niža, aktivnosti njenih izoenzima se nisu značajno promenile nakon treniranja.

Tabela 3. Markeri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod fudbalera

	Pre treniranja	Posle treniranja	p
TBKRS, $\mu\text{mol/L}$	1,05 \pm 0,15	1,15 \pm 0,16	0,212
O ₂ ⁻ , $\mu\text{mol NBT/min/L}^*$	49,15 (31,28-77,22)	99,91(42,16-236,74)	0,011
AOPP, $\mu\text{mol/L}$	23,68 \pm 18,60	33,61 \pm 15,98	0,172
SH grupe, mmol/L	0,50 \pm 0,07	0,57 \pm 0,08	0,169
SOD, U/L	85,73 \pm 52,67	32,27 \pm 18,31	0,012
Cu/Zn SOD, U/L	57,12 \pm 27,67	21,57 \pm 20,22	0,510
Mn SOD, U/L	28,62 \pm 18,36	11,00 \pm 9,31	0,433

Vrednosti su prikazane kao $\bar{x} \pm \text{SD}$. p-verovatnoća za Student-ov *t*-test za parove

*geometrijska srednja vrednost (95% CI) za vrednosti koje prate log-normalnu raspodelu

Nakon detaljne evaluacije metoda za izolaciju RNK prikazane na kraju poglavlja „Rezultati“, a u cilju odabira one koja bi nam dala pouzdane i reproducibilne rezultate, uticaj fizičke aktivnosti na vrednosti genske ekspresije Cu/Zn SOD i Mn SOD je određivan u MČPK korišćenjem TRI metode, pri čemu su nakon PCR reakcije osnovna linija i prag amplifikacije podešeni manuelno. Vrednosti genske ekspresije oba gena su izračunate pomoću relativne standardne krive. Na osnovu naših rezultata, vrednosti genske ekspresije Cu/Zn SOD se nisu statistički značajno promenile ($p=0,106$) nakon 12 nedelja, dok su vrednosti Mn SOD bile značajno veće ($p=0,031$) nakon u odnosu na pre treniranja (tabela 4, slika 7).

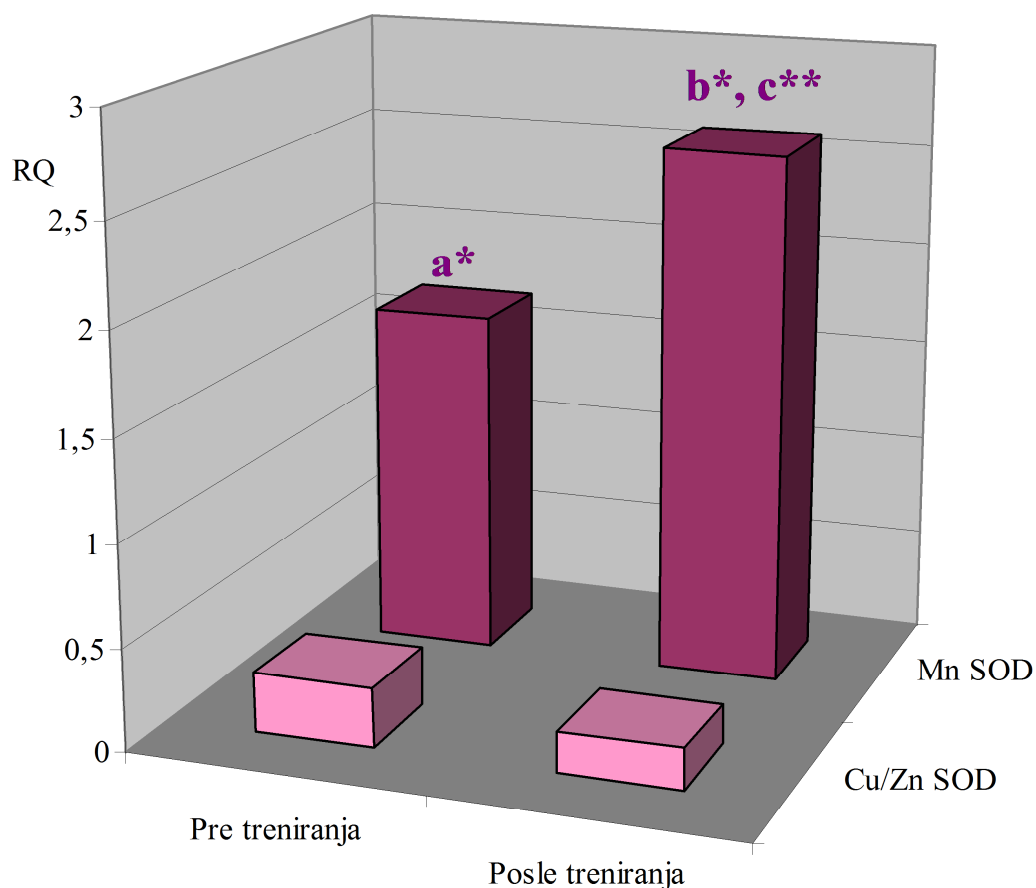
Tabela 4. Vrednosti genske ekspresije Cu/Zn SOD i Mn SOD kod fudbalera

	Pre treniranja	Posle treniranja	p ¹
Cu/Zn SOD	0,29 \pm 0,14	0,20 \pm 0,07	0,106
Mn SOD	1,69 \pm 0,95	2,60 \pm 1,61	0,031
p ²	< 0,001	< 0,001	

Vrednosti su prikazane kao $\bar{x} \pm \text{SD}$. p-verovatnoća za Student-ov *t*-test za parove

1 – verovatnoća za razlike između istih gena pre i nakon treniranja

2 – verovatnoća za razlike između različitih gena pre i nakon treniranja



Slika 7. Efekti intenzivne fizičke aktivnosti na vrednosti genske ekspresije (RQ) izoenzima SOD

Vrednosti su prikazane kao $\bar{x} \pm SD$. p-verovatnoća za Student-ov *t*-test za parove

a - statistički značajno različit od Cu/Zn SOD pre treniranja

b - statistički značajno različit od Cu/Zn SOD nakon treniranja

c – statistički značajno različit od Mn SOD pre treniranja

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

Vrednosti genske ekspresije Mn SOD su bile značajno veće od Cu/Zn SOD i pre i posle treniranja ($p=0,0004$ i $p=0,0002$, respektivno) (tabela 4 i slika 7). Osim toga što su vrednosti genske ekspresije Mn SOD bile znatno veće posle nego pre treniranja, između njih je postojala i pozitivna korelacija (Pearson-ov koeficijent korelacije $r = 0,698$, $p = 0,036$).

Ispitivanje veze između vrednosti genske ekspresije izoenzima SOD i markera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite je urađeno primenom parametarske Pearson-ove korelacije. Pre treniranja nisu postojale značajne korelacije između testiranih parametara (tabela 5), dok su značajne korelacije postojale nakon 12 nedelja intenzivne fizičke aktivnosti (tabela 6).

Tabela 5. Pearson-ova korelacija markera oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite i vrednosti genske ekspresije (RQ) pre treniranja

	RQ Cu/Zn SOD	RQ Mn SOD
TBKRS, $\mu\text{mol/L}$	-0,02	-0,14
O_2^- , $\mu\text{mol NBT/min/L}$	0,15	-0,43
AOPP, $\mu\text{mol/L}$	0,40	-0,31
SH grupe, mmol/L	0,41	0,19
SOD, U/L	0,17	-0,62

U tabeli su date vrednosti Pearson-ovog koeficijenta korelacije (r).

Koncentracija TBKRS je bila u negativnoj korelaciji sa vrednostima genske ekspresije Mn SOD ($p=0,009$) nakon 12 nedelja treniranja. Ukupna SOD aktivnost u plazmi je bila u pozitivnoj korelaciji sa vrednostima genske ekspresije Cu/Zn SOD ($p=0,005$) (tabela 6).

Tabela 6. Pearson-ova korelacija markera oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite i vrednosti genske ekspresije (RQ) nakon 12 nedelja treniranja

	RQ Cu/Zn SOD	RQ Mn SOD
TBKRS, $\mu\text{mol/L}$	-0,36	-0,714*
O_2^- , $\mu\text{mol NBT/min/L}^*$	0,28	-0,34
AOPP, $\mu\text{mol/L}$	0,17	0,39
SH grupe, mmol/L	-0,38	0,02
SOD, U/L	0,778*	0,37

* $p<0,01$. U tabeli su date vrednosti Pearson-ovog koeficijenta korelacije (r).

Primenom Pearson-ove korelacione analize uočena je veza između markera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite sa vrednostima genske ekspresije Cu/Zn SOD i Mn SOD (tabela 6). Da bi se utvrdilo koji marker oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite pokazuje nezavistan uticaj na vrednosti genske ekspresije izoenzima, da li postoji prediktivna sposobnost nivoa genske ekspresije na aktivnosti izoenzima SOD i na ukupnu SOD aktivnost u plazmi primenjena je multipla linearna regresiona analiza. Vrednosti ukupne SOD aktivnosti i vrednosti genske ekspresije Mn

SOD koje su dobijene nakon 12 nedelja treniranja su uzete kao zavisno promenljive, a parametri koji su u Pearson-ovoj korelacionoj analizi pokazali značajnu korelaciju sa ove dve promenljive su bili nezavisno promenljive. Dobijeni rezultati i modeli su prikazani u tabelama 7 i 8.

Tabela 7. Multipla linearna regresiona analiza za ispitivanje uticaja markera koji determinišu ukupnu SOD aktivnost u plazmi kod fudbalera nakon 12 nedelja treniranja

	R ²	p	B	SE _B
RQ Cu/Zn SOD	0,606	0,005	-	-
Model 1	0,684	0,025	52,16	146,50
Model 2	0,879	0,069	62,40	145,12

Model 1 uključuje RQ vrednosti Cu/Zn SOD i SH grupe.

Model 2 uključuje RQ vrednosti Cu/Zn SOD, SH grupe, TBKRS, AOPP, O₂⁻.

Determinante za predviđanje vrednosti genske ekspresije Cu/Zn SOD nisu detektovane, iako postoji značajna korelacija sa ukupnom SOD aktivnošću u plazmi (tabela 6). Međutim, vrednosti genske ekspresije Cu/Zn SOD su bile parametar koji nezavisno utiče na ukupnu aktivnost SOD (p=0,025) kada se u model uključi preostali marker antioksidativne zaštite (SH grupe). Kada se u model uključe i parametri oksidativnog stresa (TBKRS, AOPP, O₂⁻) prediktivna uloga vrednosti genske ekspresije Cu/Zn SOD na ukupnu aktivnost SOD u plazmi se gubi (p=0,069) (tabela 7).

Tabela 8. Multipla linearna regresiona analiza za ispitivanje uticaja markera oksidativno-stresnog statusa koji determinišu gensku ekspresiju Mn SOD kod fudbalera nakon 12 nedelja treniranja

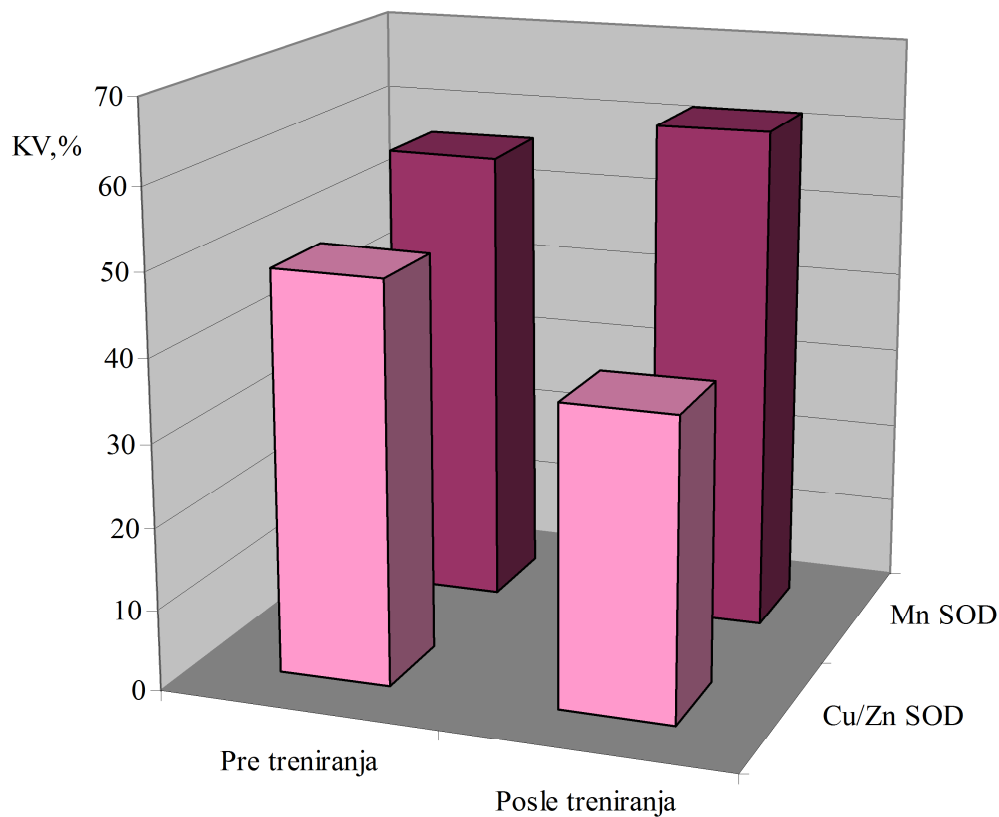
	R ²	p	B	SE _B
TBKRS	0,508	0,009		
Model 1	0,686	0,017	-6,57	2,19
Model 2	0,855	0,063	-3,16	1,13

Model 1 uključuje TBKRS, AOPP, O₂⁻.

Model 2 uključuje TBKRS, AOPP, O₂⁻, SH grupe, SOD.

Koncentracija TBKRS je zadržala ulogu prediktivnog faktora (p=0,017) za vrednosti genske ekspresije Mn SOD kada se u model uključe ostali markeri oksidativnog stresa

(AOPP i $O_2^{\cdot-}$). Međutim, kada su pored njih u drugom modelu dodati markeri antioksidativne zaštite, prediktivna sposobnost TBKRS se izgubila ($p=0,063$) (tabela 8). Povećanje genske ekspresije Mn SOD i njena veća interindividualna varijabilnost u limfocitima je očekivana kada su osobe izložene povećanom oksidativnom stresu (pre vs nakon treniranja, 56% vs 62%) (slika 8). Nasuprot tome, vrednosti genske ekspresije citoplazmatskog izoenzima se nisu značajno promenile nakon 12 nedelja, a i njegova ekspresija je postala stabilnija nakon perioda izloženosti povećanom oksidativnom stresu što je pokazano manjom interindividualnom varijabilnošću (pre vs nakon treniranja 49% vs 36%).



Slika 8. Interindividualne varijacije u vrednostima genske ekspresije Cu/Zn SOD i Mn SOD pre i nakon treniranja

IV.2. UTICAJ DIJETE I TERAPIJE ATORVASTATINOM NA GENSKU EKSPRESIJU IZOENZIMA PON

Kao i kod grupe fudbalera, RNK iz organa eksperimentalnih životinja je izolovana samo pomoću TRI metode. Prilikom žrtvovanja životinja nije sakupljena dovoljna količina krvi da bi se iz njenih MČPK izolovala RNK TRI metodom, tako da su korišćeni samo njihovi organi. Karakteristike RNK iz jetre, belog masnog tkiva i aorte su prikazane u tabeli 9.

Količina organa iz kojih je izolovana RNK je bila u preporučenim granicama (50-100 g tkiva) za TRI metodu (112). Statistička analiza ANOVA je pokazala da tip dijetete i terapija nisu uticali na prinos i čistoću rastvora u kome se nalazila RNK dobijena iz jetre, belog masnog tkiva i aorte (tabela 9).

Tabela 9. Prinos i karakteristike rastvora RNK dobijene TRI metodom iz organa pacova

		Grupa pacova na normalnoj dijeti	Grupa pacova na aterogenoj dijeti	Grupa pacova na aterogenoj dijeti i terapiji	p ¹
Jetra	Konc. RNK, ng/μL	680,72±96,16 (14,13)	786,24±324,74 (41,3)	916,40±245,62 (41,3)	0,18
	A260/280	1,90±0,05 (2,63)	1,92±0,05 (2,60)	1,98±0,07 (3,53)	0,35
	A260/230	2,25±0,13 (3,94)	2,17±0,35 (16,13)	2,32±0,31 (13,36)	0,71
	A260/240	1,70±0,06 (3,52)	1,75±0,11 (6,28)	1,62±0,11 (6,79)	0,40
Belo masno tkivo	Konc. RNK, ng/μL	456,00±310,46 (68,08)	501,12±327,96 (65,45)	519,20±324,91 (62,58)	0,94
	A260/280	1,92±0,14 (7,29)	1,95±0,11 (5,64)	1,91±0,06 ^{c†} (3,14)	0,91
	A260/230	2,00±0,13 (6,50)	2,21±0,27 (12,22)	2,10±0,19 (9,05)	0,48
	A260/240	1,56±0,14 (8,97)	1,59±0,15 (9,43)	1,63±0,06 (3,68)	0,63

nastavak tabele je na sledećoj strani

		Grupa pacova na normalnoj dijeti	Grupa pacova na aterogenoj dijeti	Grupa pacova na aterogenoj dijeti i terapiji	p¹
Aorta	Konc. RNK, ng/ μ L	203,20 \pm 66,90 ^{a*}	183,60 \pm 163,26 ^{b†}	200,00 \pm 135,07 ^{c*}	0,97
	A260/280	2,12 \pm 0,17 (8,01)	2,00 \pm 0,04 (2,00)	2,09 \pm 0,09 (4,31)	0,51
	A260/230	2,22 \pm 0,19 (8,55)	2,30 \pm 0,07 (3,04)	2,20 \pm 0,06 (2,73)	0,43
	A260/240	1,60 \pm 0,22 (13,75)	1,48 \pm 0,13 (8,78)	1,74 \pm 0,14 (8,19)	0,24
p²		0,007	0,03	<0,001	

Vrednosti su prikazane kao $\bar{x} \pm SD$ (KV,%).

1 - verovatnoća za razlike u koncentracijama RNK u istim organima pacova na različitim tretmanima

2 – verovatnoća za razlike u koncentracijama RNK između organa na svakom pojedinačnom tretmanu

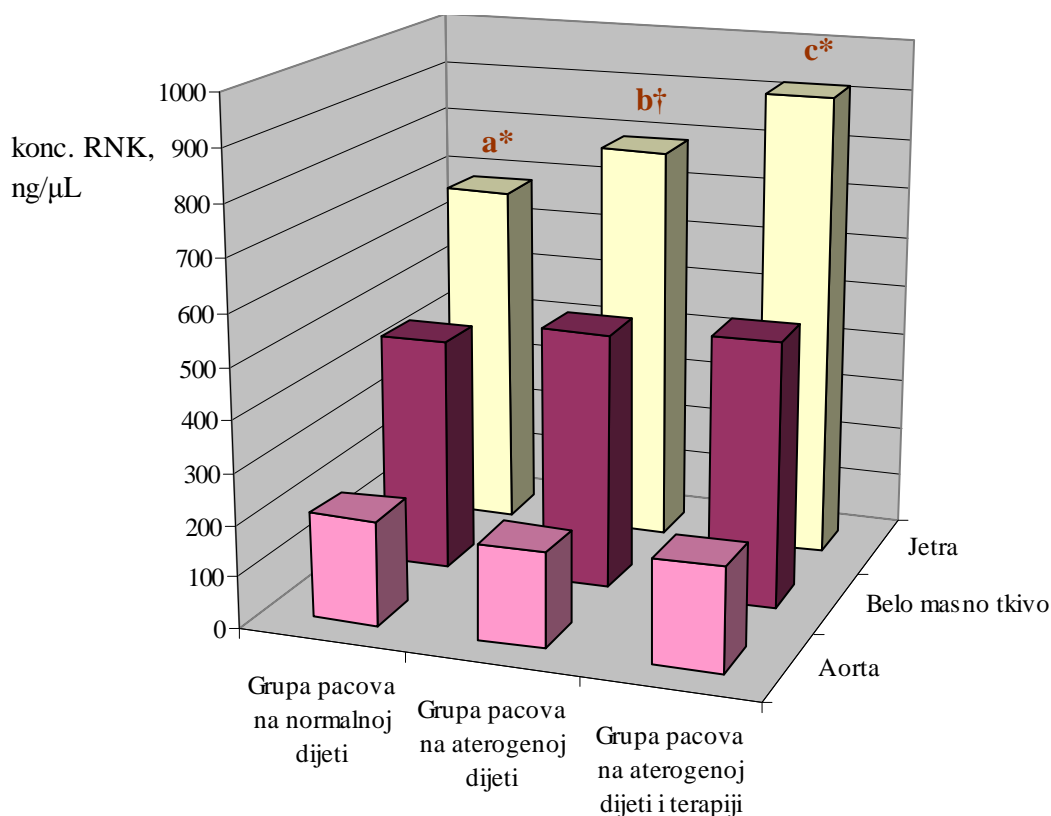
a- statistički značajno u odnosu na jetru pacova na normalnoj dijeti

b- statistički značajno u odnosu na jetru pacova na aterogenoj dijeti

c- statistički značajno u odnosu na jetru pacova na aterogenoj dijeti i terapiji

* p<0,001, † p<0,05 (p vrednost za Tucky *post hoc* test)

Koncentracija RNK između jetre, belog masnog tkiva i aorte se statistički značajno razlikovala posebno u okviru svake grupe pacova, na normalnoj, aterogenoj i aterogenoj dijeti sa terapijom (p=0,007, p=0,03 i p<0,001, respektivno). Statistički najmanji prinos je bio iz aorte u odnosu na jetru na bilo kom tipu dijete i terapije, dok se koncentracije RNK iz belog masnog tkiva i aorte u sve tri grupe nisu razlikovale (tabela 9 i slika 9).



Vrednosti su prikazane kao \bar{x} .

a- statistički značajno u odnosu na jetru pacova na normalnoj dijeti

b- statistički značajno u odnosu na jetru pacova na aterogenoj dijeti

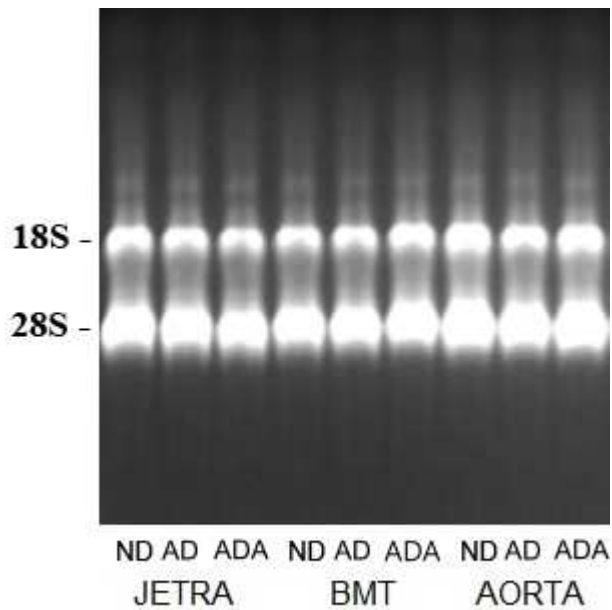
c- statistički značajno u odnosu na jetru pacova na aterogenoj dijeti i terapiji

* $p < 0,001$, † $p < 0,05$ (p vrednost za Tucky *post hoc* test)

Slika 9. Prosečne koncentracije RNK dobijene iz organa sve tri grupe pacova

Svi odnosi apsorbancija su bili u okviru preporučenih granica (110). KV koncentracija RNK (%) su bili veći u uzorcima RNK dobijenim iz belog masnog tkiva nego iz druga dva organa u sve tri grupe pacova (tabela 9). Iz organa pacova na bilo kom tretmanu, koncentracije RNK su bile značajno veće od koncentracija RNK dobijene iz humane krvi ili MČPK.

RNK izolovana iz sva tri organa pacova na različitim tretmanima je bila očuvanog integriteta u svim uzorcima, sa jasno vidljivim rRNK subjedinicama i međusobnim odnosom oko 2 (slika 10).



Slika 10. Elektroforetski profil po jednog uzorka RNK izolovanih iz organa pacova na ispitivanim tretmanima

ND grupa -grupa pacova na normalnoj dijeti; AD grupa - grupa pacova na aterogenoj dijeti; ADA grupa - grupa pacova na aterogenoj dijeti i terapiji; BMT – belo masno tkivo

U svim tkivima je detektovana genska ekspresija PON1, PON2 i PON3, međutim vrednosti su se razlikovale u zavisnosti od tretmana i tipa tkiva. Uticaj tipa dijete i terapije na vrednosti genske ekspresije izoenzima paraoksonaze u jetri, belom masnom tkivu i aorti je prikazan u tabeli 10 i slikama 11 i 12.

Tabela 10. Vrednosti genske ekspresije (RQ) izoenzima PON u organima sve tri grupe pacova

		Grupa pacova na normalnoj dijeti	Grupa pacova na aterogenoj dijeti	Grupa pacova na aterogenoj dijeti i terapiji
Jetra	PON1	1,07 (0,94-1,16)	1,18 (1,01-1,23)	0,88 (0,80-0,99) ^{a*}
	PON2	0,96 (0,86-1,05)	1,08 (1,04-1,13) ^{b*}	0,99 (0,83-1,31)
	PON3	1,07 (0,93-1,18)	1,00 (0,89-1,23)	0,84 (0,74-1,08)
Belo masno tkivo	PON1	0,27 (0,05-0,69)	0,14 (0,05-1,15)	0,23 (0,17-0,89)
	PON2	1,07 (0,90-1,31)	1,13 (1,03-1,27)	1,14 (0,99-1,22)
	PON3	0,86 (0,66-2,53)	0,88 (0,45-2,15)	0,89 (0,74-2,34)
Aorta	PON1	0,17 (0,05-0,32)	0,29 (0,13-0,40)	0,18 (0,10-0,40)
	PON2	0,84 (0,65-1,06)	1,17 (0,67-1,32)	0,80 (0,72-0,99)
	PON3	0,85 (0,39-1,16)	0,65 (0,49-1,89)	1,10 (0,46-1,41)

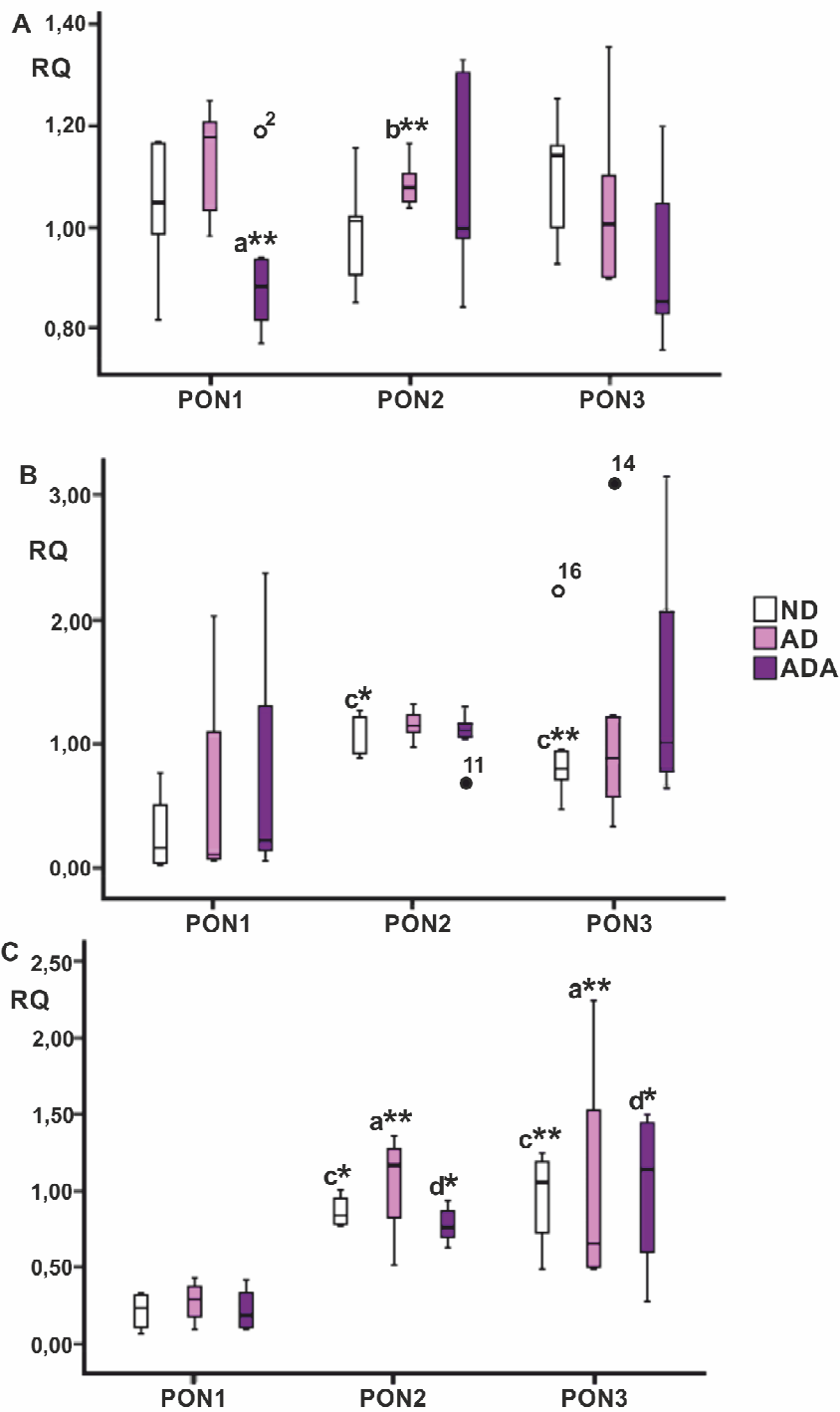
Vrednosti su prikazani kao Me (interkvartilni raspon).

a - statistički značajno različito u odnosu na grupu pacova na aterogenoj dijeti

b - statistički značajno različito u odnosu na grupu pacova na normalnoj dijeti

* $p < 0,05$ (Mann Whitney test)

Vrednosti genske ekspresije PON1 u jetri su bile značajno niže ($p=0,028$) u grupi pacova na aterogenoj dijeti sa terapijom nego u grupi pacova na aterogenoj dijeti bez terapije. Vrednosti genske ekspresije PON2 u jetri su bile značajno niže ($p=0,045$) u grupi pacova na normalnoj dijeti, nego u grupi na aterogenoj dijeti. Vrednosti genske ekspresije PON3 su bile niže u jetri u grupama pacova na aterogenoj dijeti i aterogenoj dijeti u kombinaciji sa terapijom u poređenju sa grupom na normalnoj dijeti, ali ovo sniženje nije bilo statistički značajno. U belom masnom tkivu i u aorti nije bilo razlika u genskoj ekspresiji izoenzima ponaosob između testiranih grupa (tabela 10).

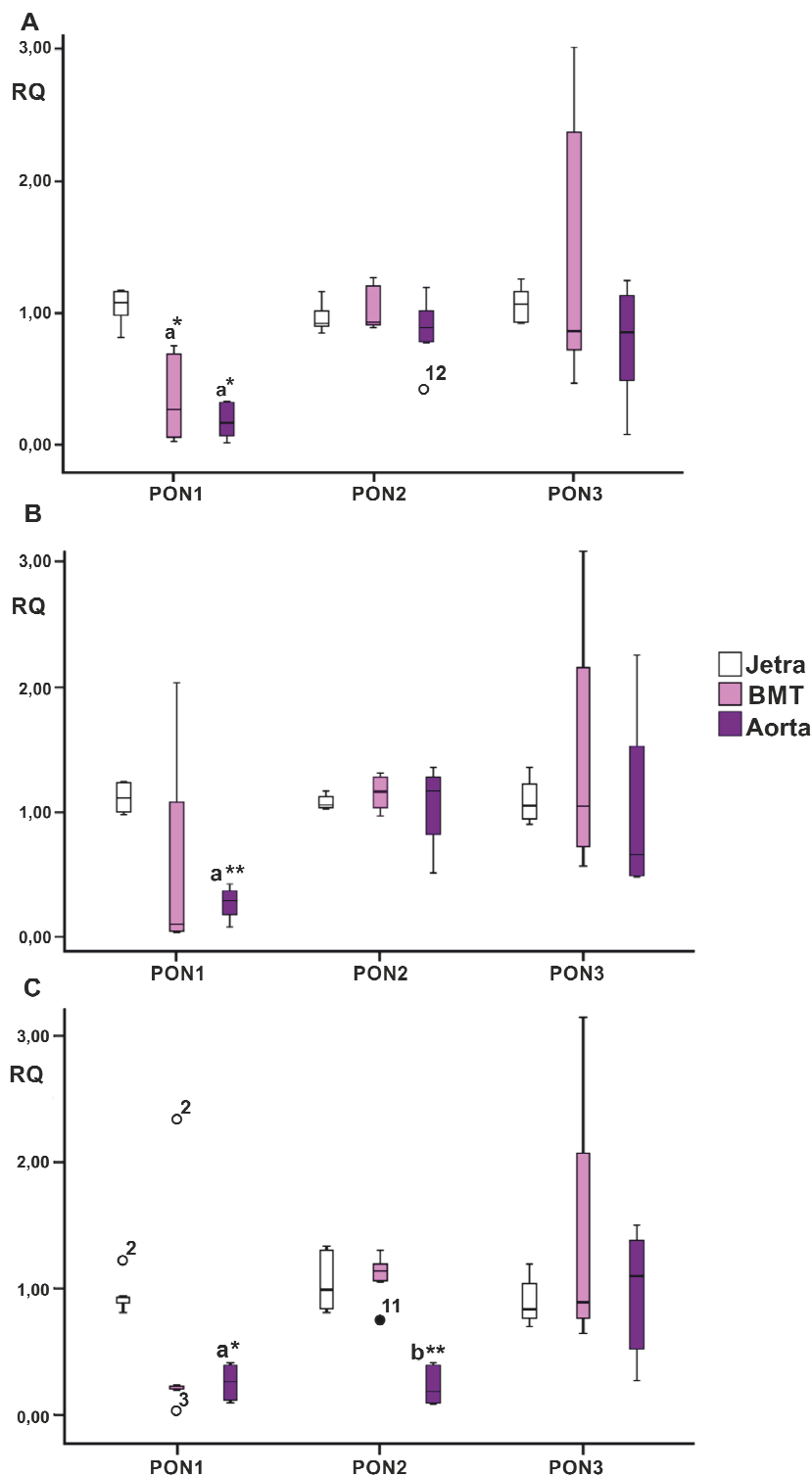


Slika 11. Uticaj tipa dijeta i terapije atorvastatinom na vrednosti genske ekspresije (RQ) PON1, PON2 i PON3 u jetri (A), belom masnom tkivu (B) i aorti (C)

- a - značajno različita od RQ vrednosti PON1 u AD grupi
- b - značajno različita od RQ vrednosti PON2 u ND grupi
- c - značajno različita od RQ vrednosti PON1 u ND grupi
- d - značajno različita od RQ vrednosti PON1 u ADA grupi
- * $p < 0,01$, ** $p < 0,05$ (p za Mann Whitney test)

ND grupa - grupa pacova na normalnoj dijeti; AD grupa - grupa pacova na aterogenoj dijeti; ADA grupa - grupa pacova na aterogenoj dijeti i terapiji, BMT – belo masno tkivo

U jetri nije bilo značajne razlike vrednostima genske ekspresije između PON1, PON2 i PON3 na normalnoj dijeti, pri čemu su se njihovi nivoi održali i pod uticajem aterogene dijete i aterogene dijete sa terapijom (slika 11A). Vrednosti genske ekspresije PON2 i PON3 su bile značajno veće od PON1 i u belom masnom tkivu ($p=0,004$ i $p=0,016$, respektivno) i u aorti ($p=0,01$ and $p=0,025$, respektivno) kod pacova na normalnoj dijeti (slike 11B i 11C). Razlike u ekspresiji između gena su ostale značajne samo u aorti u grupi pacova na aterogenoj dijeti i aterogenoj dijeti sa terapijom, dok su se izgubile u belom masnom tkivu pacova na istim tretmanima. Vrednosti genske ekspresije PON2 i PON3 su bile značajno veće od PON1 u aorti na aterogenoj dijeti ($p=0,021$ za oba gena) i aterogenoj dijeti sa terapijom ($p=0,004$ i $p=0,01$, respektivno) (slika 11C).



Slika 12. Distribucija vrednosti genske ekspresije (RQ) izoenzima paraoksonaze između organa pacova na normalnoj dijeti (ND) (A), aterogenoj dijeti (AD) (B) i aterogenoj dijeti i terapiji atorvastatinom (ADA) (C)

a- značajno različita od RQ vrednosti PON1 u jetri
 b- značajno različita od RQ vrednosti PON2 u BMT
 * $p < 0,01$, ** $p < 0,05$ (p za Mann Whitney test)
 BMT – belo masno tkivo

Distribucija vrednosti genske ekspresije svakog gena pojedinačno između jetre, belog masnog tkiva i aorte pod uticajem aterogene dijeta i aterogene dijeta sa terapijom atorvastatinom prikazana je na slici 12. U grupi pacova na normalnoj dijeti, ekspresija PON1 je bila značajno veća u jetri nego u aorti ($p=0,004$) i nego u belom masnom tkivu ($p=0,004$), dok razlike u ekspresiji PON2 i PON3 nisu bile značajne između organa (slika 12A). U grupi pacova na aterogenoj dijeti, razlike u vrednostima genske ekspresije PON1 između jetre i aorte su zadržale značajnost ($p=0,014$), ali se značajnost razlike izgubila između jetre i belog masnog tkiva. I u ovoj grupi pacova nije bilo razlike u genskoj ekspresiji PON2 i PON3 ponaosob između organa (slika 12B). U grupi pacova na aterogenoj dijeti sa terapijom, vrednosti genske ekspresije PON1 su i dalje bile značajno veće u jetri nego aorti ($p=0,004$), dok su vrednosti genske ekspresije PON2 bile veće u belom masnom tkivu nego aorti ($p=0,04$). Nije bilo razlike u vrednostima genske ekspresije PON3 između organa (slika 12C).

Postojala je značajna pozitivna korelacija vrednosti genske ekspresije PON1 između jetre i masnog tkiva ($p=0,019$) i vrednosti genske ekspresije PON3 između jetre i aorte ($p=0,024$) (tabela 11). Jedino se u masnom tkivu pokazala korelacija vrednosti genske ekspresije PON1 i PON3 sa graničnom značajnošću ($p=0,072$). Nisu postojale značajne korelacije vrednosti genske ekspresije izoenzima PON kod pacova na aterogenoj dijeti i aterogenoj dijeti sa terapijom.

Tabela 11. Spearman-ova korelacija vrednosti genske ekspresije (RQ) izoenzima PON kod pacova na normalnoj dijeti

		Jetra			Belo masno tkivo			Aorta		
		RQ PON1	RQ PON2	RQ PON3	RQ PON1	RQ PON2	RQ PON3	RQ PON1	RQ PON2	RQ PON3
Jetra	RQ PON1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RQ PON2	-0,429	-	-	-	-	-	-	-	-
	RQ PON3	0,429	-0,143	-	-	-	-	-	-	-
Belo masno kivo	RQ PON1	0,886*	-	-	-	-	-	-	-	-
	RQ PON2	-	-0,486	-	0,205	-	-	-	-	-
	RQ PON3	-	-	-0,143	0,771	0,543	-	-	-	-
Aorta	RQ PON1	-0,486	-	-	-0,714	-	-	-	-	-
	RQ PON2	-	0,429	-	-	-0,486	-	0,486	-	-
	RQ PON3	-	-	0,829*	-	-	-0,086	0,657	0,603	-

Podaci su prikazani kao Spearman-ov koeficijent korelacije (ρ).

* $p < 0,05$.

IV.3. POREĐENJE METODA ZA IZOLACIJU RNK IZ HUMANE KRVI

Da bismo ispitali reproducibilnost metode za izolaciju RNK pripremili smo pul pune citratne krvi. Za tu svrhu iskorišćena je krv ženske osobe čija je krvna slika data u tabeli 12 iz koje se može videti da osoba nije bila u stanju inflamacije ili infekcije.

Tabela 12. Vrednosti hematoloških parametara u ispitivanoj krvi

Hematološki parametri	Koncentracija
Leukociti	8,25 x10 ⁹ /L
Limfociti	2,75 x10 ⁹ /L
Monociti	0,33 x10 ⁹ /L
Granulociti	5,17 x10 ⁹ /L
Eritrociti	4,25 x10 ¹² /L
Hemoglobin	124,3 g/L
Trombociti	273,9 x 10 ⁹ /L

Iz pula citratne krvi RNK je izolovana po 5 puta sa 3 metode. Kvalitet rastvora dobijene RNK, koncentracije RNK i KV (%) su prikazani u tabeli 13.

Tabela 13. Karakteristike RNK dobijene iz uzorka citratne krvi

	TRI _{MČPK}		ABI _{KRV}		ABI _{MČPK}	
	$\bar{x} \pm SD$	KV(%)	$\bar{x} \pm SD$	KV(%)	$\bar{x} \pm SD$	KV(%)
Konc. RNK, ng/μL	102,08±8,83	8,65	34,16±2,34 ^{a*}	6,85	17,09±1,72 ^{a,b*}	10,05
A260/280	1,98±0,05	2,52	1,91±0,08	4,19	2,05±0,22 ^{b†}	10,84
A260/230	2,03±0,08	3,94	0,53±0,09 ^{a*}	16,98	0,40±0,03 ^{a,b*}	10,77
A260/240	1,78±0,06	3,60	0,99±0,11 ^{a*}	11,26	0,66±0,04 ^{a,b*}	5,62

a - statistički značajna razlika u odnosu na TRI_{MČPK} metodu

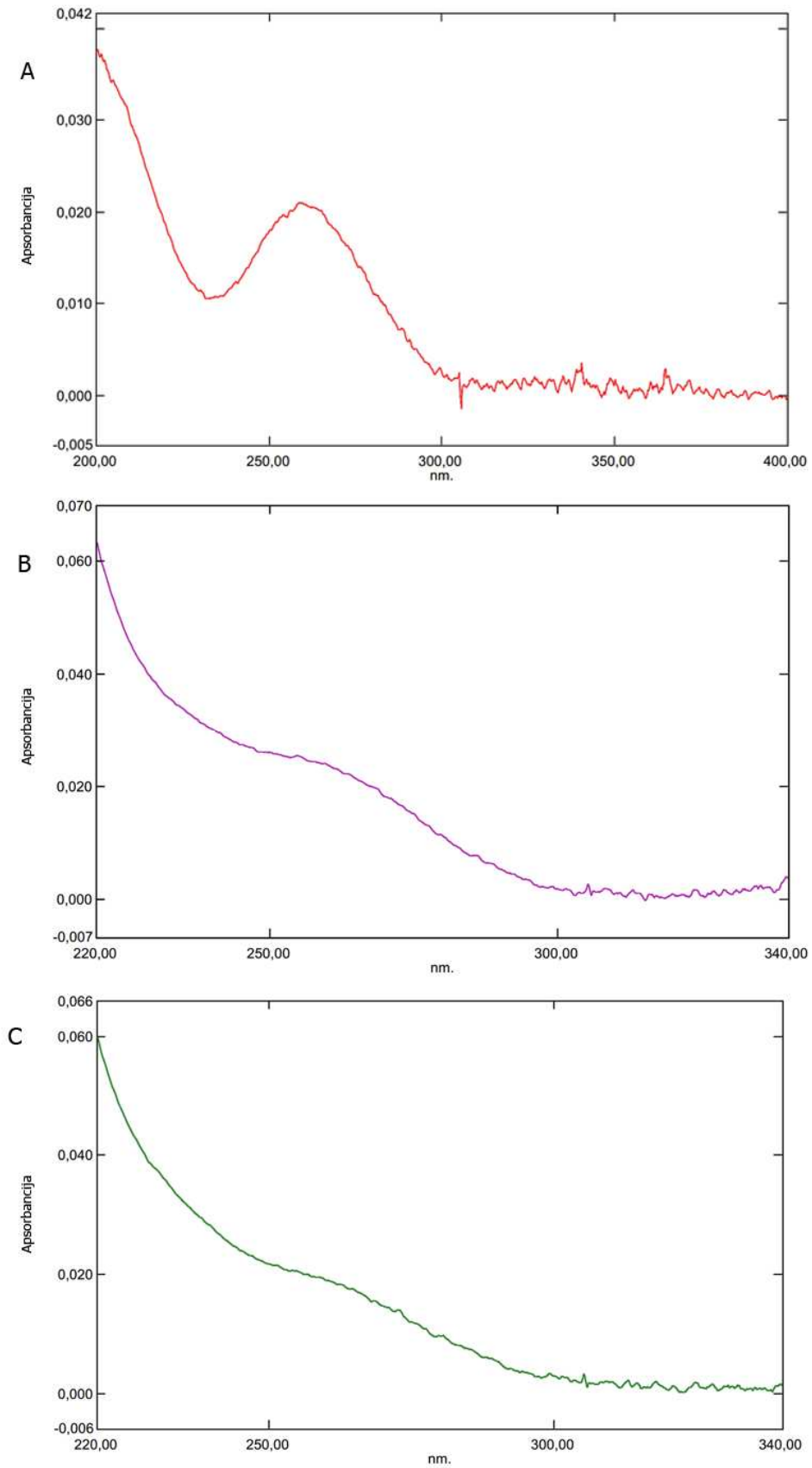
b - statistički značajna razlika u odnosu na ABI_{KRV} metodu

*p<0,001; †p<0,05 (p vrednost za Tucky *post hoc* test)

Analizom varijanse je utvrđeno da je TRI_{MČPK} metodom izolacije dobijena statistički značajno veća koncentracija RNK (p<0,001) nego pomoću ABI metode bez obzira da li je korišćena puna krv ili MČPK (tabela 13). Međutim, kada se koncentracija RNK preračuna na broj ćelija iz kojih je izolovana, što je 1 × 10⁷ ćelija (limfociti i monociti)

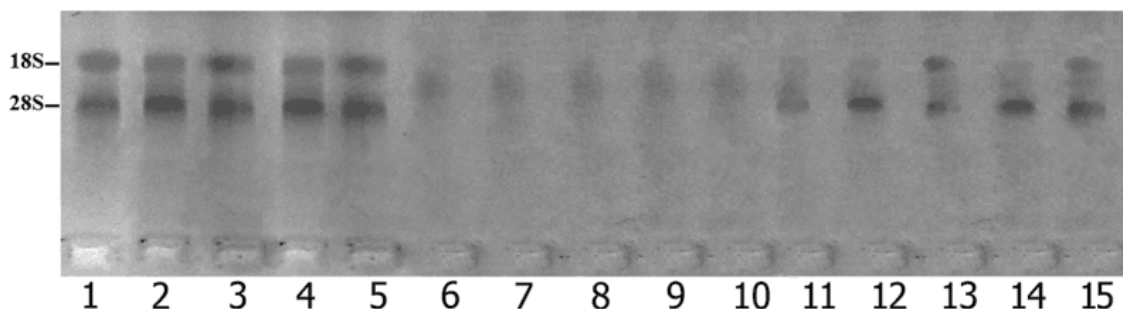
za $TRI_{M\acute{C}PK}$, $0,25 \times 10^7$ (leukociti, trombociti i retikulociti) za ABI_{KRV} i $0,5 \times 10^7$ (limfociti i monociti) za $ABI_{M\acute{C}PK}$ metodu, nije bilo razlike u koncentraciji RNK dobijene pomoću $TRI_{M\acute{C}PK}$ i ABI_{KRV} , dok se razlika zadržala između $TRI_{M\acute{C}PK}$ i $ABI_{M\acute{C}PK}$ ($p < 0,001$) i ABI_{KRV} i $ABI_{M\acute{C}PK}$ metoda ($p < 0,001$). Najmanja koncentracija RNK je dobijena pomoću $ABI_{M\acute{C}PK}$ metode. Pokazana je jasna varijacija u količini izolovane RNK i kvalitetu rastvora u kome se ona nalazi između metoda. S obzirom da se vrednosti KV do 10% mogu smatrati prihvatljivim, najveća varijacija u koncentraciji izolovane RNK je bila kod $ABI_{M\acute{C}PK}$ (10,05%), a najmanja kod ABI_{KRV} metode (6,85%). Rastvori RNK bez prisustva proteina su dobijeni pomoću sve 3 metode, bez obzira šta je bio početni uzorak (tabela 13). Čistoća rastvora RNK (odsustvo organskih rastvarača i neorganskih soli) je bila zadovoljavajuća samo kod $TRI_{M\acute{C}PK}$ metode, što je prikazano odnosom A260/230 između 2,0 i 2,4 i odnosom A260/240 većim od 1,4. Takođe, odnosi apsorbancija za TRI metodu su bili statistički značajno veći od odnosa za ABI metodu bez obzira na tip uzorka. Svih 5 uzoraka RNK dobijenih pomoću ABI_{KRV} metode su pokazali izvestan stepen onečišćenja, što je potvrđeno niskim odnosima apsorbancija. KV tih odnosa apsorbancija su bili veći nego kod drugih metoda (tabela 13).

Iako su izračunati odnosi apsorbancija za svaki uzorak dovoljni za procenu njenog kvaliteta, važno je ispitati i spektar svakog od njih na talasnim dužinama od 230 do 320 nm. Čisti uzorci nukleinskih kiselina će dati karakterističan oblik krive kao iskrivljeno zvono sa maksimumom apsorbancije na 260 nm, kakav je bio spektar samo uzoraka RNK dobijenim $TRI_{M\acute{C}PK}$ metodom. Spektri uzoraka dobijenim primenom druge dve metode nisu dali očekivane krive što ukazuje da njihovi rastvori nisu bili zadovoljavajuće čistoće (110). Na slici 13 je prikazan po jedan uzorak rastvora RNK dobijen svakom metodom.



Slika 13. Spektri po jednog uzorka RNK izolovanih $TRI_{M\acute{C}PK}$ (A), $ABI_{KR\acute{V}}$ (B) i $ABI_{M\acute{C}PK}$ (C) metodama

RNK izolovana TRI_{MČPK} i ABI_{MČPK} metodama izolacije je bila intaktna, obe subjedinice 28S i 18S bile su vidljive na gelu u odnosu približno jednakom 1,2. rRNK subjedinice u uzorcima dobijenim ABI_{KRV} metodom nisu bile vidljive na gelu, već je detektovano široko polje fluorescence tzv. smir. Na gelu, na startu gde su naneti uzorci nije detektovana fluorescencija što predstavlja odsustvo gDNK (slika 14).



Slika 14. Elektroforetski profil RNK izolovane testiranim metodama iz pulovanog uzorka (TRI_{MČPK} (1-5), ABI_{KRV} (6-10) i ABI_{MČPK} (11-15))

Iako kvalitet i integritet RNK dobijene ABI metodom nije bio zadovoljavajući, relativna ekspresija gena Cu/Zn SOD i Mn SOD je određivana u svim uzorcima RNK koji su izolovani dvema metodama, i to na dva načina, relativnom standardnom krivom i $\Delta\Delta C_t$ metodom.

Pre izvođenja relativne standardne krive, svi uzorci RNK su prepisani u cDNK i svedeni na koncentraciju od 48,0 ng/ μ L za uzorke dobijene pomoću TRI_{MČPK}, na 19,2 ng/ μ L za uzorke dobijene pomoću ABI_{KRV} i na 7,68 ng/ μ L za uzorke dobijene pomoću ABI_{MČPK} metode. Za svaku metodu napravljen je pul cDNK navedenih koncentracija iz koga su dalje pravljeni razblaženja za standardnu krivu. Po pet razblaženja su pravljeni iz svakog pula cDNK i svaki od njih je amplifikovan PCR metodom u kvadrilikatu. Sledeće koncentracije su korišćene za konstruisanje standardne krive: 1,5, 0,75, 0,375, 0,1875 i 0,09375 ng/ μ L za TRI_{MČPK}; 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 i 0,03125 ng/ μ L za ABI_{KRV} i 0,48, 0,24, 0,12, 0,06, 0,03 ng/ μ L ABI_{MČPK} metodu. Nakon qPCR metode, standardna kriva je konstruisana tako da su na x-osi nanete vrednosti logaritmovanih koncentracija RNK, a na y-osi Ct vrednosti. Ct vrednosti računa softver pri automatskoj i pri manuelnoj postavci osnovne linije i praga amplifikacije. Karakteristike dobijenih standardnih krivih su prikazane u tabeli 14.

Tabela 14. Karakteristike standardnih krivih $Ct = f(\log \text{ konc. RNK})$ i efikasnosti amplifikacija (E) gena u uzorcima dobijenim iz pula pomoću ispitivanih metoda

	Automatska osnovna linija i prag amplifikacije				Manuelna osnovna linija i prag amplifikacije			
	Nagib	Odsečak	R ²	E, %	Nagib	Odsečak	R ²	E, %
TRI_{MČPK}								
β-actin	-3,52	22,32	0,985	92,5	-3,49	19,69	0,991	93,6
Cu/ZnSOD	-3,60	29,13	0,999	89,5	-3,51	28,57	0,996	92,5
Mn SOD	-3,52	27,99	0,997	92,3	-3,54	26,58	0,996	91,5
ABI_{KRV}								
β-actin	-3,64	23,45	0,995	88,1	-3,39	29,18	0,997	97,4
Cu/ZnSOD	-3,62	30,19	0,989	88,8	-3,42	26,11	0,997	96,2
Mn SOD	-3,43	27,88	0,996	95,6	-3,36	23,35	0,992	98,3
ABI_{MČPK}								
β-actin	-3,32	23,92	1,000	100	-3,34	22,98	1,000	99,2
Cu/ZnSOD	-3,33	28,78	0,993	99,6	-3,33	28,55	0,995	99,7
Mn SOD	-3,33	28,57	0,998	99,6	-3,33	26,04	0,998	99,6

Od svih krivih nezadovoljavajući nagib (< od -3,6) je dobijen za standardnu krivu za β-aktin i Cu/Zn SOD za ABI_{KRV} metodu, dok je granična vrednost nagiba Cu/Zn SOD gena bila kod TRI_{MČPK} metode pri automatskom podešavanju osnovne linije i praga amplifikacije. Vrednosti nagiba uticale su na efikasnosti amplifikacija ciljnih sekvenci β-aktina i Cu/Zn SOD u qPCR metodi koje su, takođe, bile manje od prihvatljive (< od 90%) kod ABI_{KRV} i za Cu/Zn SOD kod TRI_{MČPK} metode. Standardna kriva za β-aktin kod TRI_{MČPK} metode je imala neodgovarajući R². Za računanje relativne genske ekspresije preko relativne standardne krive za sve gene i sve uzorke mogle bi se koristiti one standardne krive dobijene pri manuelnom podešavanju osnovne linije i praga amplifikacije zato što su svi nagibi, koeficijenti korelacije standardnih krivih i izračunate efikasnosti u prihvatljivim granicama (-3,1 < nagib < -3,6; R² > 0,99; efikasnost > 90%, respektivno). Međutim, računanjem efikasnosti amplifikacija gena u svim uzorcima nam ne govori o tome da li su one dovoljno bliske da bi se, umesto metode relativne standardne krive, mogla koristiti ΔΔCt metoda za računanje genske ekspresije

kao znatno jednostavnija i isplativija. Validacijom eksperimenta se, preko nagiba krivih koje prate funkciju $\Delta Ct = f(\log \text{ konc. RNK})$, pokazuje u kakvom su odnosu efikasnosti amplifikacije testiranih gena (Cu/Zn SOD i Mn SOD) i endogene kontrole (β -aktin).

Tabela 15. Nagibi krivih $\Delta Ct = f(\log \text{ konc. RNK})$

Nagibi			
	Testirani geni	Auto	Manuelno
TRI _{MČPK}	Cu/Zn SOD i β -aktina	-0,0854	-0,0281
	Mn SOD i β -aktina	-0,0071	-0,0710
ABI _{KRV}	Cu/Zn SOD i β -aktina	0,0224	-0,0268
	Mn SOD i β -aktina	0,2125	-0,0568
ABI _{MČPK}	Cu/Zn SOD i β -aktina	-0,0154	0,0117
	Mn SOD i β -aktina	-0,0138	0,0082

$\Delta Ct = Ct_{\text{ciljnog gena (Cu/Zn SOD ili Mn SOD)}} - Ct_{\beta\text{-aktina}}$

Auto – automatsko podešavanje osnovne linije i praga amplifikacije

Manuelno – manuelno podešavanje osnovne linije i praga amplifikacije

Da bi se efikasnosti amplifikacija ciljnog gena i endogene kontrole smatrale približno ekvivalentnim, nagibi krivih $\Delta Ct = f(\log \text{ konc. RNK})$ treba da budu manji od 0,1. Ovaj uslov je zadovoljen u svim slučajevima, osim u slučaju Mn SOD i β -aktina pri automatskom podešavanju osnovne linije i praga amplifikacije gde je nagib duplo veći od maksimalnog prihvatljivog i iznosi 0,2125 (tabela 15). Iako su efikasnosti amplifikacije Cu/Zn SOD i β -aktina bile približno iste (prikazano nagibom od 0,0224 manjim od 0,1), pojedinačne efikasnosti navedenih gena su bile neprihvatljive za dalju kvantifikaciju genske ekspresije pomoću qPCR metode (88,8% i 88,1%, respektivno) (tabela 14). Sa druge strane, efikasnost amplifikacije Mn SOD gena je bila zadovoljavajuća i iznosila 95,6%; međutim pošto nije bliska efikasnosti amplifikacije β -aktina dalje računanje genske ekspresije pomoću $\Delta\Delta Ct$ metode bi bilo nepouzdan.

Ct vrednosti ili količine cDNK očitane na osnovu njih, dobijene pri manuelnom podešavanju osnovne linije i praga amplifikacije se mogu koristiti za računanje relativne ekspresije na bilo koji način, $\Delta\Delta Ct$ ili relativnom standardnom krivom (RSK). Tada, bez obzira koji način računanja se koristi, dobijene vrednosti genske ekspresije treba da budu približno iste. Tucky *post hoc* test je pokazao da se vrednosti genske ekspresije Cu/Zn SOD i Mn SOD ($RQ_{\Delta\Delta Ct} TRI_{MČPK}$ vs $RQ_{RSK} TRI_{MČPK}$; $RQ_{\Delta\Delta Ct} ABI_{KRV}$ vs $RQ_{RSK} ABI_{KRV}$ i $RQ_{\Delta\Delta Ct} ABI_{MČPK}$ vs $RQ_{RSK} ABI_{MČPK}$) za svako automatsko i manuelno

podešavanje ponaosob nisu statistički značajno razlikovale ($p > 0,05$) (tabele 16 i 17), odnosno da se računanje relativne genske ekspresije može vršiti preko relativne standardne krive ili $\Delta\Delta CT$ metode i da se pritom dobiju bliske vrednosti. Takođe, nije bilo značajne razlike u vrednostima genske ekspresije svakog gena između automatskog i manuelnog podešavanja osnovne linije i praga amplifikacije za svaku metodu i način računanja.

Analizom varijanse je pokazano da su se vrednosti genske ekspresije Cu/Zn SOD (računate na oba načina) između testiranih metoda statistički značajno razlikovale. Statistički najmanje vrednosti su dobijene $ABI_{M\acute{C}PK}$ metodom, dok su najveće vrednosti dobijene ABI_{KRV} metodom (tabela 16). Poređenjem metoda Tucky *post hoc* test-om se pokazalo da statistički značajne razlike ne postoje između $RQ_{RSK} TRI_{M\acute{C}PK}$ vs $RQ_{RSK} ABI_{KRV}$ vrednosti za automatsko podešavanja, $RQ_{RSK} TRI_{M\acute{C}PK}$ vs $RQ_{RSK} ABI_{KRV}$ i $RQ_{RSK} ABI_{KRV}$ vs $RQ_{RSK} ABI_{M\acute{C}PK}$ vrednosti za manuelno podešavanje. Najmanji KV u vrednostima genske ekspresije (5,99%) dobijen je pomoću $TRI_{M\acute{C}PK}$ metode manuelnim podešavanjem, a izračunat metodom relativne standardne krive. Najveći KV (60,35%) je dobijen za vrednosti genske ekspresije izračunate pomoću relativne standardne krive automatskim podešavanjem osnovne linije i praga amplifikacije u uzorcima dobijenim ABI_{KRV} metodom.

Tabela 16. Vrednosti genske ekspresije (RQ) Cu/Zn SOD i KV (%) iz pulovanog uzorka

	Automatska osnovna linija i prag amplifikacije				Manuelna osnovna linija i prag amplifikacije			
	TRI _{MČPK}	ABI _{KRV}	ABI _{MČPK}	p	TRI _{MČPK}	ABI _{KRV}	ABI _{MČPK}	p
RQ _{ΔΔCt}	0,45±0,03	1,31±0,68 ^{a†}	0,40±0,07 ^{a†,b‡}	0,005	0,45±0,03	1,24±0,57 ^{a*}	0,38±0,05 ^{a,b*}	0,002
KV za RQ _{ΔΔCt}	6,69	51,90	17,50	-	6,23	45,80	13,15	-
RQ _{RSK}	0,47±0,03	1,06±0,64	0,40±0,07 ^{a†,b*}	0,029	0,50±0,03	0,75±0,37	0,46±0,06 ^{a*}	0,047
KV za RQ _{RSK}	6,43	60,35	17,50	-	5,99	49,58	12,96	-

Vrednosti su prikazane kao $\bar{x} \pm SD$. p-verovatnoća za ANOVU.

a - statistički značajna razlika u odnosu na TRI_{MČPK} metodu

b - statistički značajna razlika u odnosu na ABI_{KRV} metodu

*p<0,05; †p<0,01; ‡p<0,001 (p vrednost za Tucky *post hoc* test)

Tabela 17. Vrednosti genske ekspresije (RQ) Mn SOD i KV (%) iz pulovanog uzorka

	Automatska osnovna linija i prag amplifikacije				Manuelna osnovna linija i prag amplifikacije			
	TRI _{MČPK}	ABI _{KRV}	ABI _{MČPK}	p	TRI _{MČPK}	ABI _{KRV}	ABI _{MČPK}	p
RQ _{ΔΔCt}	3,25±0,47	36,48±29,91 ^{a*}	2,02±0,28 ^{a‡·b*}	0,012	2,93±0,20	28,02±16,13 ^{a†}	2,15±0,18 ^{a,b†}	0,001
KV za RQ _{ΔΔCt}	14,45	81,99	13,88	-	6,82	57,56	8,37	-
RQ _{RSK}	3,04±0,41	23,55±24,54	1,99±0,27 ^{a‡}	0,053	2,71±0,18	14,39±7,18 ^{a†}	2,09±0,15 ^{a,b†}	0,001
KV za RQ _{RSK}	13,50	104,22	13,53	-	6,64	49,90	7,17	-

Vrednosti su prikazane kao $\bar{x} \pm SD$. p-verovatnoća za ANOVU.

a - statistički značajna razlika u odnosu na TRI_{MČPK} metodu

b - statistički značajna razlika u odnosu na ABI_{KRV} metodu

*p<0,05; †p<0,01; ‡p<0,001 (p vrednost za Tucky *post hoc* test)

Statističkom metodom analiza varijanse je pokazano da su se vrednosti genske ekspresije Mn SOD (računate na oba načina) između testiranih metoda statistički značajno razlikovale, osim u slučaju vrednosti računatim metodom relativne standardne krive pri automatskom podešavanju osnovne linije i praga ($p=0,053$) (tabela 17). Ovo je očekivano s obzirom na KV za RQ_{RSK} $ABI_{KR\bar{V}}$ vrednosti koji je bio najveći i iznosio 104,22%. Najmanji KV je dobijen za RQ_{RSK} $TRI_{M\bar{C}PK}$ vrednosti (6,64%) pri manuelnom podešavanju osnovne linije i praga amplifikacije. Takođe, kao i kod Cu/Zn SOD, statistički najmanje vrednosti genske ekspresije Mn SOD su dobijene u $ABI_{M\bar{C}PK}$ uzorcima, dok su najveće dobijene u $ABI_{KR\bar{V}}$ uzorcima, a računate preko relativne standardne krive (tabela 17).

IV.4. POREĐENJE METODA ZA IZOLACIJU RNK I UTICAJ INTERINDIVIDUALNIH VARIJACIJA NA GENSKU EKSPRESIJU IZOENZIMA SOD U KONTROLNOJ GRUPI

Uticao metoda izolacije na vrednosti genske ekspresije su dodatno testirane i u kontrolnoj grupi kod kojih je RNK izolovana $ABI_{KR\bar{V}}$ i $TRI_{M\bar{C}PK}$ metodama. Korišćene su samo ove dve metode izolacije RNK, jedna koje daje najveću ($ABI_{KR\bar{V}}$) i druga koja daje najmanju ($TRI_{M\bar{C}PK}$) varijaciju u vrednostima genske ekspresije oba izoenzima. U uzorcima izolovanim $TRI_{M\bar{C}PK}$ metodom koncentracija RNK ($113,68 \pm 58,15$ ng/ μ L) je bila statistički značajno veća nego u uzorcima dobijenim $ABI_{KR\bar{V}}$ metodom ($37,16 \pm 3,82$ ng/ μ L), $p=0,002$. Nakon korekcije koncentracije RNK u odnosu na početni broj ćelija, nije bilo značajne razlike u prinosu koje su dale ove dve metode. Kao i kod pulovanog uzorka, rastvori RNK dobijeni obema metodama nisu sadržali proteine što je pokazano odnosom A260/280 većim od 1,8. Statistički značajno veća koncentracija organskih i neorganskih kontaminanata je bila u uzorcima dobijenim $ABI_{KR\bar{V}}$ metodom, što je pokazano odnosima apsorbancija A260/230 značajno manjim od 2 i A260/A240 značajno manjim od 1,4 ($p<0,001$ za oba odnosa apsorbancija) (tabela 18).

Tabela 18. Karakteristike RNK u kontrolnoj grupi

	TRI _{MČPK}		ABI _{KRV}		p
	$\bar{x} \pm SD$	KV(%)	$\bar{x} \pm SD$	KV(%)	
Konc. RNK, ng/ μ L	113,68 \pm 58,15	51,16	37,16 \pm 3,82	6,85	0,002
A260/280	2,06 \pm 0,11	5,17	2,04 \pm 0,08	4,53	0,74
A260/230	2,12 \pm 0,09	4,19	0,95 \pm 0,16	16,93	<0,001
A260/240	1,58 \pm 0,08	4,12	0,90 \pm 0,07	13,76	<0,001

Vrednosti su prikazane kao $\bar{x} \pm SD$. p-verovatnoća za Student-ov *t*-test za parove

Elektroforetski profil uzoraka je pokazao odsustvo 28S i 18S rRNK subjedinica u ABI_{KRV} uzorcima. Kod TRI_{MČPK} metode pored jasne vidljivosti, odnos subjedinica je bio zadovoljavajući (oko 1,2) (slika nije prikazana u okviru poglavlja „Rezultati“).

S obzirom na rezultate poređenja metoda dobijenim iz pulovanog uzorka, vrednosti genske ekspresije su dobijene pri manuelnom podešavanju osnovne linije i praga amplifikacije i računane preko relativne standardne krive u TRI_{MČPK} i ABI_{KRV} uzorcima. Vrednosti genske ekspresije Cu/Zn SOD su bile značajno veće (p=0,002) u TRI_{MČPK} uzorcima nego u uzorcima dobijenim ABI_{KRV} metodom (tabela 19 i slika 15), što je suprotno sa rezultatima iz pulovanog uzorka gde je ABI_{KRV} metoda izolacije davala veće vrednosti genske ekspresije nego TRI_{MČPK} metoda (tabela 5). Vrednosti genske ekspresije Mn SOD, kao i kod pulovanog uzorka, su bile statistički značajno veće (p=0,002) u uzorcima RNK dobijenim ABI_{KRV} nego TRI_{MČPK} metodom (tabela 19 i slika 15).

Tabela 19. Vrednosti genske ekspresije (RQ) Cu/Zn SOD i Mn SOD i KV (%) u kontrolnoj grupi

	Cu/Zn SOD			Mn SOD		
	TRI _{MČPK}	ABI _{KRV}	p	TRI _{MČPK}	ABI _{KRV}	p
RQ	0,26 \pm 0,07	0,08 \pm 0,03	0,002	1,63 \pm 0,48 ^{a*}	9,83 \pm 5,49 ^{b**}	0,002
KV,%	27,26	36,59		29,45	55,86	

Vrednosti su prikazane kao $\bar{x} \pm SD$. p-verovatnoća za Student-ov *t*-test za parove

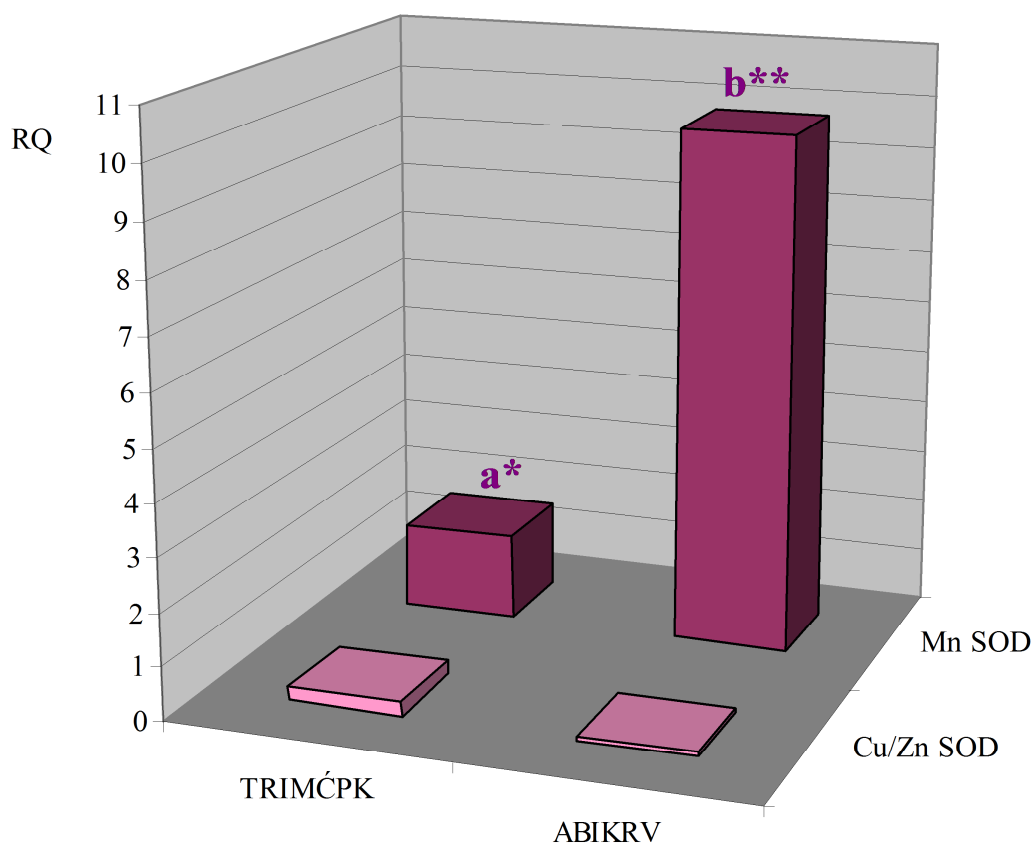
a – statistički značajno različit od TRI_{MČPK} za Cu/Zn SOD gen

b - statistički značajno različit od ABI_{KRV} za Cu/Zn SOD gen

* p<0,01, ** p<0,001

U okviru svake metode je testirana i razlika u ekspresiji između Cu/Zn SOD i Mn SOD gena, pri čemu je Mn SOD pokazao značajno veću ekspresiju u odnosu na Cu/Zn SOD i u MČPK ($p < 0,01$) i u punoj krvi ($p < 0,001$) (tabela 19 i slika 15).

Razlike u vrednostima genske ekspresije između izoenzima u okviru svake metode i između metoda se najbolje mogu uočiti na slici 15.



Slika 15. Vrednosti genske ekspresije (RQ) izoenzima SOD u kontrolnoj grupi

a – statistički značajno različit od $TRI_{MČPK}$ za Cu/Zn SOD gen

b - statistički značajno različit od ABI_{KRV} za Cu/Zn SOD gen

* $p < 0,01$, ** $p < 0,001$

Izračunati interindividualni KV prikazani u tabeli 19, govore u prilog izrazito većoj varijaciji u vrednostima genske ekspresije oba izoenzima dobijenim u ABI_{KRV} uzorcima. Nisu postojale značajne razlike u genskoj ekspresiji Cu/Zn SOD i Mn SOD između polova u grupi ispitanika ($p = 0,99$ i $p = 0,49$, respektivno).

V. DISKUSIJA

V.1. UTICAJ FIZIČKE AKTIVNOSTI NA GENSKU EKSPRESIJU IZOENZIMA SOD U LIMFOCITIMA

Umerena, svakodnevna fizička aktivnost je od velikog značaja za zdravlje ljudi. Pokazalo se da je efikasna u prevenciji i terapiji mnogih bolesti savremenog zapadnog sveta kao što su kardiovaskularne bolesti, dijabetes i gojaznost (136,137). Prema tome, postoji veliki interes o tome kako različiti tipovi fizičke aktivnosti utiču na zdravstveno stanje ljudi posmatrano kroz promene aktivnosti i genske ekspresije enzima antioksidativne zaštite. Mnoge studije su objavile različite rezultate do sada i nisu uspele da daju jedinstven obrazac za svaki nivo i obim vežbanja. Značajan put da bi se razumeli povoljni efekti fizičke aktivnosti je ispitivanje ćelijskih i molekularnih odgovora na vežbanje. Stoga, jedan od ciljeva naše studije je bio da ispitamo efekte dugotrajnog i intenzivnog treninga fudbalera na aktivnosti i gensku ekspresiju izoenzima SOD.

Nivo oksidativnog stresa pre i nakon 12 nedelja treniranja je analiziran u krvi određivanjem specifičnih markera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite. Prema našim rezultatima, prooksidansi i antioksidansi nisu bili u ravnoteži (tabela 3). U grupi fudbalera, postojala je iscrpljenost antioksidativne zaštite koja se ogledala kroz statistički značajno snižene aktivnosti ukupne SOD u plazmi nakon 12 nedelja treniranja do čega je najverovatnije dovelo dugotrajno, značajno povećanje nivoa O_2^- . Tendencija rasta koncentracija AOPP i TBKRS je posledica dugoročnog izlaganja zahtevnim i intenzivnim treninzima. Povećanje $VO_2\max$ ($p=0,03$) je, takođe, potvrdilo efektivnost intenzivnog i dugotrajnog treniranja i ukazalo na poboljšanje aerobnog kapaciteta (138). Kontinuirano, intenzivno treniranje sa čestim takmičarskim utakmicama izložilo je ispitanike povećanom oksidativnom stresu tj. obimno stvaranje O_2^- je prevazišlo raspoloživ kapacitet SOD da ga ukloni (66). Najveći broj studija je pokazao da usled fizičke aktivnosti različitog intenziteta dolazi do povećanja aktivnosti SOD (82,84,88), mada nisu retke ni studije koje su pokazale da se aktivnost SOD ne menja (138), pa čak i smanjuje (139). Iako je ukupna aktivnost SOD značajno pala, aktivnosti pojedinačnih izoenzima se nisu razlikovale pre i nakon intenzivnog treninga, mada su obe pokazale tendenciju pada (tabela 3). Način promene aktivnosti nekih enzima kao što je i Cu/Zn SOD podržava saznanje da iscrpljujuća fizička aktivnost indukuje poremećaj u

ravnoteži između stvaranja ROS i antioksidativne zaštite, koja dalje dovodi do nastanka oksidativnog stresa. Vrlo je verovatno da velika produkcija ROS može da prevaziđe kapacitet njihovih neutralisanja, koje rezultira u promeni intraćelijskog redoks stanja i/ili modifikaciji katalitičkih centara antioksidativnih enzima, tako da oba dovode do inhibicije enzima (140). Nedostatak značajnosti razlike između aktivnosti izoenzima SOD pre i nakon 12 nedelja može da potiče i od niske osetljivosti Misra-Fridovich-ove metode (122) korišćene za određivanje njihove aktivnosti. Relativna osetljivost za određivanje aktivnosti SOD veoma varira između testova. Zapravo, utvrđeno je postojanje desetostrukih razlika u osetljivosti između sedam najčešće korišćenih testova (141); tako da korišćenje testova manje osetljivosti može da dovede do toga da se ne detektuju male promene aktivnosti SOD. Glavni proizvod dismutacije O_2^- je H_2O_2 čije je prekomerno stvaranje moglo da utiče na aktivnost Cu/Zn SOD dovodeći do njegove inhibicije (6), a da pritom ne inhibira aktivnost Mn SOD (14). Pošto je Cu/Zn SOD izoenzim mnogo više zastupljen u ukupnoj plazmatskoj SOD nego Mn SOD nije iznenađujuće što se ukupna SOD smanjila nakon treniranja (20).

Oba izoenzima SOD su uključena u slične biohemijske puteve, ali se razlikuju po lokaciji i transkripcionoj regulaciji. Cu/Zn SOD ima stabilnu ekspresiju, dok je ekspresija Mn SOD promenljiva i nestabilna pod uticajem mnogih intra- i ekstraćelijskih faktora. Smatra se da Mn SOD predstavlja glavnu odbranu od slobodnih radikala u mitohondrijama i da ima centralnu ulogu u zaštiti od oksidativnog stresa (8,13). Promene u nivou O_2^- mogu da dovedu do promena u sistemu antioksidativne zaštite uzrokujući indukciju ili inhibiciju gena koji kodiraju enzime antioksidativne zaštite i transkripcione faktore. Njegovo prekomerno stvaranje tokom i nakon vežbanja je odgovorno za aktivaciju NF- κ B i AP-1 koji indukuju ekspresiju gena za antioksidantne enzime kao što su katalaza, GPx, SOD, a posebno Mn SOD (142). Vider i saradnici su prvi pokazali da fizička aktivnost indukuje aktivaciju NF- κ B u humanim limfocitima. Promotorski region gena za Mn SOD kod sisara sadrži vezujuća mesta za transkripcione faktore NF- κ B i AP-1 koja mogu da se aktiviraju dejstvom citokina, toksina i ROS (8,13). Za razliku od Mn SOD, gen za Cu/Zn SOD u svom promotorskom regionu, takođe, sadrži vezujuće mesto za NF- κ B, međutim ono nije lako podložno aktivaciji eksternim stimulusima, pa se može očekivati različit odgovor ovih gena na fizičku aktivnost (13).

Većina studija je ispitivala uticaj fizičke aktivnosti na gensku ekspresiju Cu/Zn SOD i Mn SOD u organima eksperimentalnih životinja (skeletnom mišiću, jetri i srcu). Kod

ljudi, uticaj fizičke aktivnosti je ispitivan, uglavnom, u limfocitima kao najlakše dostupnim ćelijama vitalnim za održavanje homeostaze i esencijalnim medijatorima inflamacije i stresa (63,86,90,142), iako postoji i par studija na humanim mišićima (143). Zeibig i kolege su potvrdili da treningom indukovana ekspresija gena odgovornih za oksidativni metabolizam u mišićima se odražava u limfocitima. Odgovori gena na fizičku aktivnost pokazuju veliku sličnost između osoba, što sugerise da vežbanje može da da karakterističan profil eksprimiranih gena u limfocitima, koje je ekvivalentno onom profilu u mišićima. Njihovi rezultati su pokazali da vežbanje može da utiče na ekspresiju gena u limfocitima na dozno-zavisan način i da indukuje ekspresiju pojedinih gena koja se dalje lako mogu kvantifikovati (144).

Intenzivni i dugotrajni treninzi nakon 12 nedelja doveli su do povećanja ekspresije gena za Mn SOD, dok je genska ekspresija Cu/Zn SOD ostala stabilna nakon ovog perioda vremena (tabela 4, slika 7). Kao i za aktivnosti izoenzima, očekivalo se da vrednosti genske ekspresije budu povećane nakon treniranja. Međutim, ovakav vid fizičke aktivnosti doveo je samo do povećanja kapaciteta antioksidativne zaštite u mitohondrijama, kao vežbama indukovanom glavnom mestu nastanka slobodnih radikala (145). Većina O_2^- nastane u mitohondrijama tokom vežbanja i metaboliše se pomoću Mn SOD koji se nalazi u njima, a ostatak koji napusti mitohondrije biva neutralisan pomoću Cu/Zn SOD (6). Povećana inducibilnost Mn SOD i očuvana inducibilnost Cu/Zn SOD gena bi mogle da potiču od dugotrajnog korišćenja antioksidativne zaštite u mitohondrijama MČPK mladih fudbalera. Pod uticajem različitih stimulusa pokazano je, od strane mnogih autora, da je Mn SOD glavna inducibilna izoforma SOD u limfocitima (146), dijafragmi i drugim tipovima mišića (147). Čak se smatra da njena smanjena inducibilnost dovodi do većeg oksidativnog oštećenja makromolekula uključujući DNK i veću verovatnoću za nastanak nekih kancera (148). Adaptacija ćelije na oksidativni stres je postignuta povećanjem aktivnosti i genske ekspresije antioksidativnih enzima posebno preko stimulacije gena za Mn SOD, zato što mitohondrije predstavljaju najznačajnije i najveće mesto nastanka ROS prilikom velikog trošenja energije tokom vežbanja (72). Ovo je veoma značajan deo intraćelijske antioksidativne zaštite gde ogromna količina O_2^- može da inicira aktivaciju transkripcionog faktora NF- κ B, čija poremećena regulacija može da bude povezana sa nastankom inflamacije, neodgovarajućim imunskim odgovorom, nastankom i progresijom kancera i drugih bolesti (79).

Ovakvi rezultati su slični onima dobijenim u studijama od strane Gomez-Cabrera-e (149) i Suzuki-ja i kolega (150). ROS su indukovali ekspresiju gena Mn SOD, ali nisu pokazali uticaj na regulaciju Cu/Zn SOD gena. Još jednom je potvrđeno da se regulacija Cu/Zn SOD gena razlikuje od one za Mn SOD; ne zavisi od oksidativnog metabolizma u MČPK i smatra se da je rezultat adaptivnih mehanizama na dugotrajne, intenzivne treninge. Istraživački tim Garcia-Lopez-a (138) je došao do sličnog zaključka. Istražujući efekte dugotrajnih, intenzivnih treninga i treninga snage u trajanju od 21 nedelje na aktivnosti i ekspresiju enzima antioksidativne zaštite u MČPK kod zdravih muškaraca srednjih godina, koji se prethodno nisu bavili sportom, su pokazali da su iscrpljujući, dugotrajni treninzi indukovali ekspresiju samo Mn SOD gena, dok su vrednosti genske ekspresije Cu/Zn SOD ostale nepromenjene. Njihov program snage i napornih treninga nije pokazao efekte na aktivnosti izoenzima SOD u limfocitima. Štaviše, pronašli su neslaganje, tj. odsustvo pozitivne korelacije aktivnosti izoenzima i nivoa genske ekspresije. Ovo je pokazano i u našoj studiji. Aktivnosti izoenzima Cu/Zn SOD i Mn SOD se nisu značajno promenile pre i nakon dugotrajnih i intenzivnih treninga (tabela 3), ali nisu pokazale ni korelaciju sa vrednostima genske ekspresije. Iako se očekivalo da vrednosti genske ekspresije budu u pozitivnoj korelaciji sa aktivnostima ili koncentracijama enzima (92), više puta je pokazano da takva korelacija ne mora da postoji. Umereno vežbanje kod pacova nije indukovalo ekspresiju gena za Mn SOD u levoj srčanoj komori, iako je njena aktivnost bila statistički značajno veća, a ukupna SOD aktivnost se nije promenila u poređenju sa grupom pacova koja nije trenirala (145). Slično je pokazano i u plućima starih pacova (151). Pretpostavlja se da do nedoslednosti u nivoima genske ekspresije i aktivnostima enzima dolazi zbog razlika u stabilnosti iRNK, *in vivo* posttranskripcionoj regulaciji i/ili translacionoj efikasnosti. Tako da neki faktori mogu da utiču na pojedine iRNK i da blokiraju njenu translaciju i posledično dovedu do njene degradacije. Alternativno, degradacija iRNK može biti primarni cilj regulacije. Možemo da pretpostavimo da je verovatno ekspresija Cu/Zn SOD gena bila inicijalno povećana, a da je zatim opala ne pokazujući statističku značajnost pre i nakon treniranja i da sve to, u stvari, predstavlja mehanizam adaptacije na dugotrajnu i intenzivnu fizičku aktivnost (138). Različiti testovi za određivanje enzimske aktivnosti i genske ekspresije, kao i vrsta biološkog materijala u kojima su određivani, takođe, mogu biti razlog što nisu detektovane korelacije aktivnosti i vrednosti genske ekspresije u analiziranim studijama, uključujući i našu.

Uprkos različitoj genskoj regulaciji Cu/Zn SOD and Mn SOD u MČPK, naši rezultati su pokazali da je ukupna SOD aktivnost značajno opala nakon perioda od 12 nedelja (tabela 3). Poznato je da fizička aktivnost povećava antioksidativnu zaštitu i smanjuje oksidativni stres (78). Niska SOD aktivnost ne mora da predstavlja faktor rizika za oksidativnu modifikaciju ćelijskih struktura, već moguće uključivanje drugih enzimskih i neenzimskih odbrambenih sistema u plazmi, ili pak povećanje antioksidativne zaštite na nivou ćelije u poređenju sa ekstraćelijskim prostorom. Ukupni sadržaj SH grupa je indirektna mera aktivnosti glutaciona u serumu (75). U okviru ranije studije smo utvrdili značajno povećanje koncentracije ukupnih SH grupa tokom niza godina treniranja odbojke kod žena (152), ali u ovom istraživanju period od 12 nedelja nije bio dovoljan da se detektuje značajno povećanje koncentracije ukupnih SH grupa. Kao i kod rezultata Majerczak-ove grupe (143), postojala je tendencija rasta koncentracije ukupnih SH grupa u grupi fudbalera nakon 12 nedelja intenzivne fizičke aktivnosti (tabela 3).

Korelacije između markera oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite i vrednosti ekspresije gena Cu/Zn SOD i Mn SOD pre i nakon treniranja su testirane Pearson-ovom linearnom analizom. Nisu postojale značajne korelacije pre treniranja kod prethodno neutreniranih mladića (tabela 5), dok su nakon 12 nedelja postojale značajne korelacije (tabela 6). Veće koncentracije TBKRS su prepoznate kao marker oksidativnog stresa koji se javlja u intenzivnom vežbanju (145). Iako se njegova koncentracija nije značajno promenila nakon 12 nedelja treninga, bila je u značajnoj negativnoj korelaciji sa vrednostima genske ekspresije Mn SOD. Takođe, naši rezultati su pokazali da njegova koncentracija predstavlja prediktivni parametar za vrednosti genske ekspresije Mn SOD u MČPK ($p=0,017$) kada se u regresioni model uključe ostali markeri oksidativnog stresa. Njegova prediktivna sposobnost ima graničnu značajnost ($p=0,063$) kada se u model pored markera oksidativnog stresa uključe i markeri antioksidativne zaštite (tabela 8). Niske koncentracije TBKRS, kao kasnog markera oštećenja ćelija i ćelijskih komponenti, će dovesti do ushodne regulacije gena za Mn SOD. Možemo pretpostaviti da bi korišćenje dijetarnih antioksidanasa koji bi inhibirali lipidnu peroksidaciju (125), imalo povoljan efekat na gensku ekspresiju Mn SOD.

Ukupna SOD aktivnost u plazmi je bila u pozitivnoj korelaciji sa vrednostima genske ekspresije Cu/Zn SOD nakon perioda intenzivnih treninga od 12 nedelja. Uključivanjem ostalih markera antioksidativne zaštite u multipli linearni model nezavisna prediktivna sposobnost genske ekspresije Cu/Zn SOD na ukupnu plazmatsku SOD aktivnost se zadržala ($p=0,025$), a pokazala graničnu značajnost ($p=0,069$) kada se u model uključe i

markeri oksidativnog stresa (tabela 7). Ovo nije iznenađujuće s obzirom da u ukupnoj SOD aktivnosti preovlađuje aktivnost Cu/Zn SOD izoenzima (20). Intenzivno treniranje nije uticalo na ekspresiju Cu/Zn SOD gena u limfocitima, ali je dovelo do značajnog pada ukupne SOD aktivnosti. Očekuje se da bi ovo smanjenje bilo mnogo brže i uočljivije u određenim grupama ispitanika koji su izloženi dodatnom oksidativnom stresu, na primer, kao kod gojaznih ljudi. Zajedno sa povećanjem koncentracije TBKRS koje dovodi do nishodne regulacije Mn SOD, ovi ispitanici bi bili izloženi jačem oksidativnom stresu. Koliko je nama poznato, ovo istraživanje je prvo koje je utvrdilo postojanje prediktivnih sposobnosti TBKRS kao markera oksidativnog stresa na nivoe genske ekspresije Mn SOD u limfocitima i prediktivnih sposobnosti genske ekspresije Cu/Zn SOD u limfocitima na ukupnu aktivnost SOD u plazmi. Pri svemu tome, sve pretpostavke proistekle iz ovog istraživanja treba da budu testirane na većoj grupi ispitanika.

Ushodna regulacija Mn SOD gena u limfocitima i njena veća varijabilnost je i bila očekivana kada su fudbaleri bili izloženi većem oksidativnom stresu. Genska ekspresija Cu/Zn SOD kod fudbalera se nije promenila, čak je i postala stabilnija nakon 12 nedelja napornog, dugotrajnog treniranja, što je pokazano sa 13% manjom interindividualnom varijacijom u odnosu na pre treniranja (slika 8).

V.2. UTICAJ ATEROGENE DIJETE I TERAPIJE ATORVASTATINOM NA GENSKU EKSPRESIJU IZOENZIMA PON

S obzirom na značajnu ulogu članova porodice paraoksonaze u metabolizmu lipida, aterosklerozi i kardiovaskularnim oboljenjima, mnoge studije su pokušale da utvrde fiziološke, nutricionne i farmakološke faktore koji mogu da modifikuju ekspresiju i aktivnost njenih izoenzima (48-51,55,97-101,104,108). Pošto je hrana bogata holesterolom i zasićenim mastima široko prisutna među zdravom populacijom savremene civilizacije, teže je selektovati i proučavati humani model. Takođe, nemogućnost pribavljanja, teža dostupnost uzoraka humanih organa i ograničena ekspresija izoenzima PON u krvi su doprineli da se efekti hiperlipidemije i subsekventne terapije atorvastatinom na vrednosti genske ekspresije proučavaju u organima pacova. Ovo je prva studija u kojoj je genska ekspresija i distribucija PON1, PON2 i PON3 testirana kod hiperlipidemičnih pacova i kod hiperlipidemičnih pacova na terapiji atorvastatinom, korišćenjem visoko osetljive i specifične qPCR metode.

Sa ciljem da se utvrde vrednosti genske ekspresije izoenzima PON, većina studija je sprovedena na normolipidemičnim miševima ili pacovima, iz razloga što je poznato da hiperlipidemija *per se*, direktno ili indirektno povećanjem oksidativnog stresa, može da modifikuje gensku ekspresiju članova porodice PON. Ipak, naši rezultati se nisu u potpunosti slagali sa tim. Nivoi genske ekspresije PON1 su bili značajno niži u grupi pacova na aterogenoj dijeti koji su lečeni atorvastatinom nego u grupi pacova koji su bili samo na aterogenoj dijeti ($p=0,028$), a ni jedan od njih se nije značajno razlikovao od nivoa genske ekspresije kod pacova na normalnoj dijeti (tabela 10).

Naša studija je jedina studija koja je pokazala da pod uticajem terapije atorvastatinom dolazi do smanjenja ekspresije PON1 u jetri kod hiperlipidemičnih pacova hranjenih aterogenom dijetom. Gouedard je sa svojim timom (105) pokazao da statini (pravastatin, simvastatin i fluvastatin) redukuju PON1 aktivnost od 25% do 40% i nivoje njene ekspresije od 30% do 50% u kulturi ćelija (HuH7) humanog hepatoma. Oni su sugerisali da regulacija ekspresije hepatičnog PON1 gena samostalno determiniše nivoje PON1 aktivnosti. Eksperimentalno su potvrdili da su testirani statini na dozno-zavisan način značajno smanjili aktivnost PON1 promotorskog regiona. Pošto studija datira iz 2003 godine, malo se znalo o regulaciji PON1 gena na nivou promotorskog regiona. Zaključili su da antagonističko dejstvo statina na nuklearni receptor LXR (*engl.* liver X receptor) verovatno utiče na nishodnu regulaciju PON1 gena (105). U suprotnosti sa otkrićem Gouedard-ovog tima, a u saglasnosti sa većinom ostalih studija, statini su povećavali ekspresiju PON1 u različitim *in vitro* sistemima aktivacijom transkripcionih faktora, Sp1 koji se vezuje za PON1 promotorski region u kombinaciji sa SREBP-2 ili NF-1 (106,107).

Dugotrajna primena atorvastatina, kao što je bila u našem istraživanju (42 dana), može da dovede do nishodne regulacije PON1 gena kao rezultat adaptacije na trenutno smanjene potrebe za njom. Osim toga, moguće je da je terapija atorvastatinom kod hiperlipidemičnih pacova, svojom antioksidativnom ulogom obezbedila, na indirektan način, da ne dođe do indukcije gena za antioksidantni enzim PON1 i da njegova aktivnost bude očuvana, čak i da opadne (153). Ovo nije neočekivano s obzirom da aterogena dijeta nije indukovala, ni inhibirala ekspresiju gena za PON1 (tabela 10). Suprotna saznanja objavljenih studija o aktivnostima i genskoj ekspresiji PON1, verovatno potiču zbog razlika u eksperimentalnim modelima, vrste i doze statina, dužine terapije, dela promotorskog regiona PON1 koji je proučavan. Evidentno je da je potrebno još proučavanja da bi se razjasnili efekti statina na ekspresiju PON1 gena.

U poslednje vreme se PON2 i PON3 intenzivno proučavaju. Dugotrajno konzumiranje hrane bogate holesterolom je dovelo do povećanja nivoa genske ekspresije PON2 u jetri miševa (99). Proučavanja ekspresije PON2 u makrofagama (J774A.1) su pružila slične rezultate (154). Ova zapažanja su u skladu sa našim, gde smo pokazali da je aterogena dijeta indukovala ekspresiju gena za PON2 u jetri (tabela 10, slika 11A). Indukcija ovog gena zapažena je i kod terapije atorvastatinom u makrofagama miša (101). U našim grupama pacova ovo nije pokazano ni u jetri ni u belom masnom tkivu ni u aorti. U aterosklerotskim plakovima i regionima oko plakova, koncentracija i genska ekspresija PON2 je bila smanjena (155), što je u suprotnosti sa našim rezultatima gde se genska ekspresija PON2 nije promenila u aorti pod uticajem aterogene dijeta. Ovo može da bude naš doprinos dosadašnjim dokazima da PON2 može da ima značajnu ateroprotektivnu ulogu u ćeliji i da dugotrajna primena aterogene dijeta može da indukuje ćelijske kompenzatorne mehanizme koji stimulišu ekspresiju PON2 gena. Ekspresija PON3 se nije promenila ni pod uticajem aterogene dijeta, ni pod uticajem terapije u ispitivanim organima (tabela 10). Ovo su pokazale i prethodno objavljene studije, kao što je studija od strane Reddy-jeve grupe (54). Pored aterogene dijeta, ni povećani oksidativni stres, ispitivan u mišijim peritonealnim makrofagama, nije pokazao efekte na vrednosti genske ekspresije PON3 (100). Zajedno sa našim rezultatima, može da se pretpostavi da stabilna i relativno visoka ekspresija PON3 gena može da obezbeđuje njegovu veću i različitu ulogu u odnosu na druga dva izoenzima u prevenciji ateroskleroze i oksidativnog stresa.

Grupa autora korišćenjem imunohistohemijske i qPCR metode je ispitivala distribuciju proteina i genske ekspresije PON1, 2 i 3 u 23 tkiva C57BL/6J miševa (29). Genska ekspresija sva tri izoenzima je detektovana u svim tkivima, čak i u onim u kojima nije utvrđeno prisustvo enzima. Dok je ekspresija PON2 i PON3 bila slična u svim tkivima i neočekivano velika, ekspresija PON1 je bila veoma varijabilna. Objašnjenje su pronašli u različitoj metaboličkoj aktivnosti ispitivanih organa.

Ako posmatramo ekspresiju sva tri izoenzima u tkivima koja smo i mi ispitivali, postoje sličnosti, ali i razlike u odnosu na studiju Rodríguez-Sanabria-je (29). Kao što smo i očekivali, ekspresija sva tri izoenzima je bila kvantifikovana u sva tri tkiva. U jetri su sva tri gena imala sličnu ekspresiju koja se nije promenila pod uticajem aterogene dijeta ni terapijom atorvastatinom (slika 11). PON2 i PON3 su imali veću ekspresiju od PON1 ($p < 0,01$ i $p < 0,05$, respektivno) u belom masnom tkivu kod pacova na normalnoj dijeti. Primenom aterogene dijeta i aterogene dijeta sa terapijom razlike u ekspresiji između

izoenzima su prestale da budu značajne. Kod C57BL/6J miševa za koje pretpostavljamo, mada nije naglašeno u studiji (29), da su bili na normalnoj, proteinskoj dijeti, takođe, nivoi ekspresije PON2 i PON3 su bili viši od PON1 u masnom tkivu. U aorti pacova na normalnoj dijeti nivoi ekspresije PON2 i PON3 su bili značajno viši od PON1, dok za razliku od belog masnog tkiva ove razlike su zadržale značajnost i u druge dve grupe pacova. Ovo je potvrdilo pretpostavku da ova dva izoenzima mogu da imaju lokalnu antiaterogenu i antioksidativnu ulogu u arterijskom zidu pacova. Za PON2 je ovo davno poznato, a za PON3 je pokazano kod pacova na aterogenoj dijeti, ali bez terapije statinima (100). Ovo, takođe, podržava saznanje da PON3 može da ima značajnu ulogu i kao intraćelijski antioksidans. Kod miševa u studiji Rodriguez-Sanabria-je (29), sva tri izoenzima su imali sličnu ekspresiju u aorti.

Ni aterogena dijeta ni terapija atorvastatinom nisu promenili distribuciju PON1 i PON3, ponaosob između organa (slika 12). PON1 je najviše eksprimirana u jetri u poređenju sa druga dva organa pacova, što je prikazano i kod miševa (29). Iako je više eksprimiran u jetri nego u masnom tkivu pacova na normalnoj dijeti, nivoi ekspresije PON1 ova dva tkiva su pokazali značajnu pozitivnu korelaciju ($\rho=0,886$, $p=0,019$) (tabela 11). Značajnost razlike u nivoima ekspresije PON1 se zadržala samo u odnosu jetra-aorta dok se izgubila u odnosu jetra-belo masno tkivo kod pacova na aterogenoj dijeti i aterogenoj dijeti u kombinaciji sa terapijom. Ovakvi rezultati govore u prilog pretpostavci da i PON1 verovatno ima značajnu antioksidativnu, antiinflamatornu i antiaterogenu ulogu u zidu aorte kao i PON2 i PON3. PON3 je imao sličnu ekspresiju u svim organima u sve tri grupe, što se poklapalo sa studijom Rodriguez-Sanabria-je (29). Kod normolipidemičnih pacova nivoi ekspresije PON3 u jetri i aorti su značajno pozitivno korelirali ($\rho=0,829$, $p=0,042$) (tabela 11). Ekspresija PON2 je bila slična u sva tri tkiva i na normalnoj i na aterogenoj dijeti (slika 12). Međutim, kod pacova na aterogenoj dijeti i terapiji, nivoi ekspresije PON2 su bili promenjeni i postali su viši u belom masnom tkivu nego aorti ($p<0,05$) (slika 12), što doprinosi tezi da PON2, verovatno, može da ima ulogu u metabolizmu lipida sličnu kao i PON1 (26). Kod normolipidemičnih miševa nivoi ekspresije PON2 su bili slični u svim organima (29).

Studija od strane Rodríguez-Sanabria-je i kolega (29), za razliku od naše, je pored distribucije iRNK, pratila i distribuciju proteina PON1, 2 i 3 u izabranim tkivima i pronašla neslaganje u genskoj ekspresiji i ekspresiji proteina u nekim od njih. Tako, na primer, imunohemijskom metodom nije utvrđeno prisustvo proteina PON2 i PON3 u kičmenoj moždini, dok su nivoi njihove ekspresije bili kvantifikovani, kao ni proteina

PON2 u plućima, tankom i debelom crevu, iako su njegovi nivoi ekspresije bili slični onima u jetri. Ovo su tek prva saznanja koja se odnose na neslaganja nivoa ekspresije gena i proteina. Pretpostavlja se da se PON2 i PON3 nakon sinteze sekretuju van tkiva ili, što je verovatnije, da sintetisana iRNK ne podleže translaciji (29).

Ovako rasprostranjena distribucija vrednosti genske ekspresije i proteina ukazuje da članovi PON porodice imaju značajno veću ulogu u zaštiti ćelija i tkiva od potencijalno štetnih produkata lipidne peroksidacije i posledične inflamacije uzrokovane oksidovanim lipidima nego što se ranije smatralo (86).

V.3. UTICAJ METODE IZOLACIJE RNK I RAZLIČITIH UZORAKA KRVI NA GENSKU EKSPRESIJU IZOENZIMA SOD

Da bismo odredili pouzdanu metodu za izolaciju RNK, zadovoljavajućeg kvantiteta i visokog kvaliteta iz pune krvi i MČPK za qPCR analizu, testirali smo poluautomatski aparat (ABI) i ručnu ekstrakcionu metodu (TRI). Iako je publikovano nekoliko radova koji opisuju kvantitet RNK izolovan pomoću ABI i njen učinak u qPCR i „microarray“ analizama (156,157), do danas nisu publikovani rezultati koji porede ove dve metode na osnovu prinosa, integriteta RNK, čistoće rastvora u kome je ona izolovana i na osnovu vrednosti relativne genske ekspresije izoenzima SOD. Za razliku od EC SOD, Cu/Zn SOD i Mn SOD su odabrani s obzirom da ni jedan od njih ne pokazuje značajne razlike u vrednostima genske ekspresije između polova, niti između funkcionalnih polimorfnih oblika, a ekspimiraju se u, gotovo, svim tipovima ćelija sa različitom regulacijom transkripcije i translacije (13). Ove osobine ih čine dobrim modelima za ispitivanje uticaja bioloških i tehničkih faktora na vrednosti genske ekspresije. Osim toga, iako veliki deo ukupne SOD aktivnosti iz plazme potiče od aktivnosti EC SOD, genska ekspresija ovog izoenzima nije detektovana u krvi i njenim ćelijama i zbog toga ovaj izoenzim nije korišćen za testiranje metoda izolacije RNK, ispitivanje uticaja interindividualnih varijacija i fizičke aktivnosti na vrednosti genske ekspresije.

Kao biološki material u našem istraživanju za poređenje metoda korišćena je puna krv i MČPK. RNK je iz pune krvi izolovana ABI_{KRV} metodom, a iz MČPK izolovana $ABI_{MČPK}$ i $TRI_{MČPK}$ metodama. Očekivano, sve tri metode su dale zadovoljavajuće količine RNK (157). Nije bilo statističke razlike u količini dobijene ABI_{KRV} i $TRI_{MČPK}$ metodama, dok je $ABI_{MČPK}$ dala znatno manju količinu RNK. Spektralna analiza je pokazala visok stepen onečišćenja rastvora RNK potencijalnim PCR inhibitorima

dobijenim $ABI_{KR\text{V}}$ i $ABI_{M\acute{C}PK}$ metodama, što je prikazano odnosima apsorbancija $A_{260}/_{230}$ ($1,04\pm 0,14$ i $0,48\pm 0,05$, respektivno) značajno manjim od 2 i $A_{260}/_{240}$ ($0,99\pm 0,11$ i $0,66\pm 0,04$, respektivno) značajno manjim od 1,4 (tabela 13), a i samim izgledom spektralnih krivih (slika 13). Statistički značajno veći stepen onečišćenja je bio u uzorcima RNK dobijenim $ABI_{M\acute{C}PK}$ metodom ($p=0,001$) u odnosu na druge dve. Jedino u $TRI_{M\acute{C}PK}$ uzorcima nije bilo kontaminacije fenolom, šećerima i alkoholom, što je pokazano odnosom $A_{260}/_{230}$ većim od 2. Suprotno našim rezultatima, pokazano je da je ABI instrumentom izolovana RNK iz pune krvi ljudi i pacova zadovoljavajućeg kvaliteta i pogodna za „microarray“ analizu (158), kao i da izrazito nizak odnos apsorbancija $A_{260}/_{230}$ ($\ll 2$) nije pokazivao inhibitorski efekat tokom „microarray“ analize ili *in vitro* transkripcije (158). Uzorci RNK dobijeni testiranim metodama nisu sadržali proteine, takođe, potencijalne inhibitore PCR reakcije što je potvrđeno odnosima $A_{260}/_{280}$ većim od 1,8. Elektroforetski profil svih 15 uzoraka (po 5 za sve 3 metode) prikazan na slici 14, govori o izuzetnoj degradaciji RNK iz uzoraka dobijenim $ABI_{KR\text{V}}$ metodom u prilog čemu govori nedostatak jasno vidljivih 28S i 18S rRNK. Subjedinice su bile intaktne u $TRI_{M\acute{C}PK}$ uzorcima sa međusobnim odnosom od oko 1,2. rRNK subjedinice su se slabije videle u $ABI_{M\acute{C}PK}$ uzorcima s obzirom na manju količinu RNK nanešenu na gel. Većina studija je potvrdila da integritet iRNK više odgovara integritetu 28S rRNK subjedinice koja se mnogo brže degradira nego 18S rRNK zato što je duža (sa povećanjem dužine veća je verovatnoća da će biti degradirana). Međutim, novija istraživanja su pokazala da odnos subjedinica manji od 2 ne mora da znači da je RNK lošeg kvaliteta, samo pod uslovom da se na gelu ne vide degradacioni proizvodi (118). Čak i za onu RNK kod koje je odnos subjedinica veći od 1 može se smatrati da je zadovoljavajućeg kvaliteta za qPCR analizu (158).

Kvantifikacija genske ekspresije u uzorcima RNK dobijenom $ABI_{KR\text{V}}$ i $ABI_{M\acute{C}PK}$ metodama bi na ovom koraku trebalo biti prekinuta zato što se pouzdrano zna da će uzorci sa degradiranom RNK, u rastvoru sa organskim i neorganskim kontaminantima i uzorci intaktne RNK, u rastvoru sa organskim i neorganskim kontaminantima kompromitovati rezultate qPCR analize (110,118). U našoj studiji analize su nastavljene sa takvim uzorcima sa ciljem da se utvrdi da li će i u kom stepenu, one uticati na vrednosti relativne genske ekspresije Cu/Zn SOD i Mn SOD i na njihovu varijabilnost. Uprkos degradiranoj RNK u $ABI_{KR\text{V}}$ uzorcima amplifikacija Cu/Zn SOD, Mn SOD i β -aktina je bila detektovana i kvantifikovana (tabele 16 i 17). Nekoliko objašnjenja postoje za ovakvu pojavu. *In situ* stabilnost rRNK se razlikuje od stabilnosti iRNK, tako

da potpuna degradacija rRNK subjedinicica može da se dogodi pod dejstvom ribonukleaza, ali i drugih faktora, dok iRNK može da ostane intaktna (157). Iako je očigledno da je rRNK degradirana (slika 14), iRNK koja se amplifikuje je ostala intaktna. qPCR uključuje analizu manjih iRNK regiona, pa je, stoga, tolerantan na delimično degradiranu RNK. Fragmentacija dugih iRNK će rezultirati u gubitku molekule koja bi se detektovala qPCR metodom samo u slučaju da se RNK degradira unutar sekvence koja RT reakcijom daje produkt koji treba da se amplifikuje. Maksimalna dužina amplikona ne bi trebalo da prelazi 400 baza (idealno bi bilo da je njegova dužina od 80 do 150 baza), s obzirom da manji amplikoni daju konzistentnije rezultate i PCR je efikasniji (115). Pozitivni rezultati qPCR analize u uzorcima degradirane i kontaminirane RNK su dobijeni i zahvaljujući visokoj osetljivosti i specifičnosti komercijalnih testova za kvantifikaciju genske ekspresije (Assay-on-Demand™, Applied Biosystems) (119).

Pouzdanost kvantifikovanja genske ekspresije qPCR metodom, testirana je računanjem efikasnosti amplifikacija sva tri gena u uzorcima RNK dobijenim iz pulovane krvi. Prethodno je potvrđeno da integritet RNK utiče na vrednosti genske ekspresije (uglavnom na Ct vrednost) (115,133), a da generalno ne utiče na efikasnosti amplifikacija ispitivanih gena (118). Naši rezultati su pokazali da su efikasnosti amplifikacija β -aktina i Cu/Zn SOD u uzorcima degradirane i kontaminirane RNK dobijene ABI_{KRV} metodom bile ispod 90%, dok je za Mn SOD u istim uzorcima efikasnost bila zadovoljavajuća i iznosila 95,6% pri automatskom podešavanju osnovne linije i praga amplifikacije (tabela 14). Međutim, kada se manuelno podese osnovna linija i prag postižu se zadovoljavajuće efikasnosti β -aktina i Cu/Zn SOD u tim istim uzorcima. U uzorcima kontaminirane, ali intaktne RNK dobijene ABI_{MČPK} metodom, efikasnosti amplifikacija sva tri gena su bile, gotovo, idealne za eksperimentalne uslove (> 99%) i pri automatskom, i pri manuelnom podešavanju osnovne linije i praga amplifikacije. Pored toga što efikasnosti amplifikacija testiranih gena i endogene kontrole treba da budu u rasponu od 90% do 110% (133), one treba da budu i dovoljno bliske da bi se za računanje genske ekspresije mogla koristiti $\Delta\Delta C_t$ metoda; u suprotnom se vrednosti genske ekspresije moraju računati metodom relativne standardne krive koja iziskuje dodatni eksperimentalni rad, veći utrošak vremena i reagenasa. Iako efikasnosti amplifikacija β -aktina i Cu/Zn SOD nisu bile zadovoljavajuće (< 90%), one su bile približno iste za automatska podešavanja, što bi nas, da ne određujemo pojedinačne efikasnosti, navelo da očekujemo pouzdane vrednosti genske ekspresije. Ovim smo

pokazali da samo pri manuelnom podešavanju u potpunosti degradirana RNK iz ABI_{KRV} uzoraka nije uticala na efikasnosti amplifikacija, dok izuzetno visoka količina organskih kontaminanata nije uticala na efikasnosti ni pri automatskom ni pri manuelnom podešavanju osnovne linije i praga amplifikacije. Takođe, računanje vrednosti relativne ekspresije pri automatskom podešavanju osnovne linije i praga amplifikacije se ne bi moglo vršiti pod ovakvim eksperimentalnim uslovima sve dok se ne postignu zadovoljavajuće efikasnosti amplifikacija ciljnih gena. Manuelnim podešavanjem osnovne linije i praga računanje genske ekspresije se može vršiti na oba načina (relativnom standardnom krivom ili $\Delta\Delta C_t$ metodom) pri čemu se očekuju bliske vrednosti.

Evaluacija efikasnosti amplifikacije je esencijalan marker u qPCR kvantifikaciji i značajno utiče na tačnost i preciznost rezultata genske ekspresije (118,130). Na nju prvenstveno utiču komponente PCR reakcije (temperature vezivanja prajmera za matricu, dužina prajmera i/ili dužina amplifikovanog produkta). Naši eksperimentalni uslovi su isključili svaki od navedenih faktora s obzirom da su korišćeni komercijalni testovi (Assay-on-Demand™, Applied Biosystems) (119) sa optimizovanom dužinom i koncentracijom prajmera i proba i termalnim protokolima koje je propisao proizvođač (129). Naši rezultati su potvrdili da na efikasnost amplifikacija gena nisu uticali eksperimentalni uslovi postavke qPCR, kao ni degradirana, ni intaktna RNK u rastvoru sa kontaminantima pri manuelnom podešavanju osnovne linije i praga amplifikacije (tabela 14).

Jedan od naših ciljeva je bio da testiramo uticaj metode, odnosno uticaj tehničkih, metodoloških i eksperimentalnih faktora na vrednosti genske ekspresije. Zato smo efekte intraindividualnih, specifičnih varijacija koje potiču od različite nasledne, genetičke osnove i od uticaja spoljašnjih faktora (59,61,62) umanjili korišćenjem uzorka krvi dobijenim od jedne osobe ženskog pola koja je bila nepušač, koja se nije bavila fizičkom aktivnošću, koja nije bila na terapiji lekovima i nije bila u stanju akutne ili hronične inflamacije/infekcije (tabela 12). Pouzdanost metoda za izolaciju RNK je testirana ispitivanjem reproducibilnosti (izražen kao KV,%) iz uzorka pulovane krvi iz koga je po 5 puta RNK izolovana pomoću ispitivanih metoda. Sve metode su dale zadovoljavajuće reproducibilnosti u količinama izolovane RNK (KV < 10%), međutim značajno veće varijacije u čistoći rastvora u kome se nalazila RNK su dobijene ABI_{KRV} i ABI_{MČPK} metodama (tabela 13). Pored varijacija u kvantitetu i kvalitetu RNK koje su dobijene ekstrakcionim metodama, naši rezultati su pokazali da postoji značajna

varijacija u vrednostima genske ekspresije Cu/Zn SOD i Mn SOD dobijenim za automatska i manuelna podešavanja osnovne linije i praga amplifikacije (tabela 16 i 17). Takođe, varijacija u vrednostima genske ekspresije je bila najveća u uzorcima RNK dobijenim ABI_{KRV} metodom posebno za automatska podešavanja. Varijacija u vrednostima genske ekspresije za oba gena dobijenih računanjem preko $\Delta\Delta C_t$ ili relativne standardne krive za sve 3 metode izolacije su bile manje pri manuelnom, nego pri automatskom podešavanju. Manuelnim podešavanjem osnovne linije i praga je postignuto povećanje preciznosti između replikata (tabele 16 i 17) i osetljivost eseja za gensku ekspresiju, a da je podešavanje osnovne linije i praga urađeno po preporukama (132) govore nam poboljšani nagibi standardnih krivih $C_t = f(\log \text{ konc. RNK})$ za sva tri gena (tabela 14).

Glavna razlika između ovih tehnika izolacije, TRI_{MČPK} i ABI_{MČPK}, sa jedne i ABI_{KRV} sa druge strane, je u sadržaju RNK iz granulocita, retikulocita i trombocita (114,159,160). Vrednosti genske ekspresije izračunate preko $\Delta\Delta C_t$ metode i relativne standardne krive za Cu/Zn SOD i Mn SOD su se statistički značajno razlikovale u uzorcima pune krvi i MČPK za oba načina podešavanja osnovne linije i praga (tabele 16 i 17). Pretpostavljamo da je povećanim vrednostima relativne genske ekspresije oba gena u uzorcima RNK, dobijenim ABI_{KRV} metodom, dopirinosila iRNK iz granulocita, retikulocita i trombocita. Očigledno je da se efekat PCR inhibitora prisutan u tim uzorcima, nije ispoljio na vrednosti genske ekspresije ili je efekat bio maskiran efektima transkripata iz retikulocita. Dok kod druge dve metode, gde su selektivno odvojeni limfociti i monociti od ostalih ćelija krvi, vrednosti genske ekspresije, iako statistički značajno niže i međusobno različite, su pokazale i manju varijabilnost. U retikulocitima, iRNK globinskih lanaca čine čak 95% ukupne ćelijske iRNK čiji su poluživoti preko 24h. Zajedno sa prisustvom manje količine neglobinskih transkripata, amplifikacija globinskih transkripata je veoma verovatna (114). Osim toga, visok nivo globinskih transkripata može da dovede do nespecifičnih vezivanja za druge sekvence, što rezultira u smanjenju osetljivosti za relativno slabo eksprimirane gene iz granulocita, a posebno iz limfocita i monocita (60). Studija od strane Wu-a i kolega (161) je potvrdila da koncentracija globinskih transkripata u uzorcima RNK izolovanim iz pune krvi pomoću PAXgeneTM Blood RNA (PAX) izolacionog sistema ima negativan uticaj na osetljivost i varijabilnost rezultata genske ekspresije dobijene korišćenjem „microarray“ tehnologije. Smanjenje koncentracije globinskih iRNK iz retikulocita je dovelo do povećanja broja detektovanih proba, smanjenja varijabilnosti rezultata genske ekspresije

i povećanja osetljivosti za RNK transkripte koji potiču od ostalih ćelija krvi (160-162). U uzorcima dobijenim pomoću PAX metode postoji četiri puta veća ekspresija gena za globinske lanace u odnosu na ABI sistem, koji za oko 50% ima veću ekspresiju istih gena u odnosu na uzorke RNK dobijenim od MČPK (157). Osim razlika u ćelijskom sastavu uzorka, ovako velike razlike u vrednostima relativne genske ekspresije dobijene qPCR metodom, čak i do 7 puta, potiču od razlika u integritetu RNK (158).

U istraživanju publikovanom u „Affymetrics technical note“ (163) direktno su poređene metode izolacije iz pulovane krvi dobijene od jedne osobe i to pune krvi (PAX), iz leukocita i trombocita nakon liziranja eritrocita (QIAamp™ RNA Blood Mini Kit ili QIAamp) i iz MČPK (Ficoll/TRIZol™). Sve metode su dale RNK visokog kvaliteta i očuvanog integriteta zadovoljavajućeg za „mikroarray“ analizu; međutim rezultati govore u prilog većoj varijabilnosti u vrednostima ekspresije gena u uzorcima dobijenim u punoj krvi u odnosu na druge uzorke. Ovim su potvrdili da metode izolacije pokazuju efekat na vrednosti genske ekspresije i da, najverovatnije, sastav početnih uzoraka utiče na varijabilnost rezultata. Najmanji broj eksprimiranih gena je bio u PAX uzorcima u poređenju sa uzorcima dobijenim ostalim metodama, iako su oni sadržali transkripte iz svih ćelija krvi. Ovakvoj smanjenoj osetljivost „microarray“ analize doprinela je amplifikacija globinskih transkripata što je prikazano prisustvom dominantne trake veličine od oko 680 baznih parova koja predstavlja indikator velike količine iRNK multigenske familije hemoglobina. Znatno veći broj gena je eksprimiran u QIAamp u poređenju sa Ficoll/TRIZol™ uzorcima što je i očekivano s obzirom da se pomoću QIAamp izoluje RNK iz svih ostalih ćelija krvi izuzev retikulocita. Neočekivano su bili detektovani i transkripti iz retikulocita što sugeriše da liziranje eritrocita, u okviru QIAamp metode, nije dovelo do potpunog uklanjanja retikulocita i eritrocita. Marker ekspresije iRNK granulocita i retikulocita nisu bili detektovani u Ficoll/TRIZol™ uzorcima. Do sličnog zaključka su došli Min i saradnici (164), pokazavši da postoji jaka zavisnost između kvantifikacije genske ekspresije i tipa ćelija krvi koje se koriste, a samim tim i metode izolacije RNK. Uzorci RNK izolovani pomoću PAX metode su pokazali manji broj eksprimiranih gena sa nižim vrednostima ekspresije, ali većom interindividualnom varijabilnošću u poređenju sa Ficoll/TRIZol™ metodom. Oni su smatrali da ove razlike u „microarray“ kvantifikaciji delom potiču od prisustva tj. odsustva iRNK globinskih lanaca u PAX, odnosno Ficoll/TRIZol™ uzorcima.

Testiranjem metoda ABI_{KRV} i $TRI_{M\acute{C}PK}$ u kontrolnoj grupi potvrdili smo da postoji znatno veća interindividualna varijacija u uzorcima dobijenim ABI_{KRV} nego $TRI_{M\acute{C}PK}$ metodom (tabela 19), što nam sugeriše da na osnovu vrednosti genske ekspresije dobijene iz ABI_{KRV} uzoraka, ne bismo mogli da razlikujemo zdrave od bolesnih ispitanika. O nepouzdanosti i varijabilnosti rezultata qPCR metode iz uzoraka ABI_{KRV} nam govori i podatak da su vrednosti genske ekspresije Cu/Zn SOD bile niže u uzorcima ABI_{KRV} nego u $TRI_{M\acute{C}PK}$, što je suprotno onim rezultatima dobijenim iz pulovanog uzorka (tabele 16 i 19).

Interferencija globinskih transkripata predstavlja jedan od glavnih izazova prilikom korišćenja pune krvi za kvantifikaciju genske ekspresije. Postoji nekoliko pristupa kojim bi se izbegle ovakve interferencije, a to su: selektivno liziranje eritrocita (kao kod QIAamp metode), korišćenje hemoglobin specifičnih oligonukleotida za vezivanje iRNK globinskih lanaca, razgradnja glavnih globinskih transkripata dejstvom enzima ribonukleaze H (160) ili korišćenje M \acute{C} PK. Dodatni koraci uklanjanja globinskih transkripata su se pokazali korisnim u poboljšanju osetljivosti, povećanju broja detektovanih proba i smanjenju varijabilnosti rezultata „microarray“ analiza (161,162,165). Međutim, pokazalo se da su ovakvi postupci veoma varijabilni i malo pouzdani za klinička ispitivanja (ne uklanjaju se svi globinski transkripti i procedura sadrži dodatne korake koji se odnose na enzimске reakcije koje je teško kontrolisati) (157), a čak i kada su bili izvedeni nisu se dobili isti rezultati genske ekspresije kao kada su se koristile samo M \acute{C} PK (160). Pošto su rezultati „microarray“ u pozitivnoj korelaciji sa rezultatima qPCR metode, rezultate slične „microarray“ analizi možemo očekivati i nakon qPCR metode (165). Nama su poznate samo dve studije, jedna koja je kvantifikovala gensku ekspresiju sa qPCR i „microarray“ metodama (157), a druga samo sa qPCR metodom (64), i koje su istraživale efekat velike količine globinskih transkripata na vrednosti genske ekspresije. U suprotnosti sa svim ostalim studijama, pokazale su da na kvantifikaciju ispitivanih transkripata (od kojih je jedan bio i β -aktin) nisu uticali globinski transkripti iz uzoraka RNK dobijeni metodama koje koriste punu krv. Naprotiv, pokazale su da je rezidualna ekspresija globinskih lanaca iz pune krvi bila bliska onoj koja se dobija iz M \acute{C} PK.

Uprkos problemima koje uzrokuje iRNK globina, postoji potreba da se ispituje genska ekspresija iz pune krvi pre nego iz pojedinih ćelija. Prvo, da bi se kvantifikovala genska ekspresija koja reflektuje stanje transkriptoma u momentu uzorkovanja krvi, poželjno je da se izbegnu dodatni koraci fracionisanja krvi pri čemu može neizbežno doći do

aktivacije ćelija limfocitne loze. Drugo, čak i ako se odvoje ćelije krvi, transkripti za α i β globinske lance su najzastupljeniji transkripti prisutni u ukupnoj RNK izolovanoj pri odvajanju leukocita i trombocita (pokazano kod QIAamp metode) (160) i samo frakcionisanje može da dovede do povećane varijabilnosti u rezultatima genske ekspresije za „microarray“ analize (164). Treće, mnogo je populacija ćelija u okviru krvi: neutrofili, T ćelije, B ćelija, NK ćelije, monociti, eozinofili, bazofili, dendritične ćelije u kojima može da se ispituje ekspresija. Dok neke studije mogu da zahtevaju analizu individualnih ćelija, druge imaju za cilj da ove ćelije proučavaju zajedno, pri čemu bi uštedele vreme i sredstva, a metodologija korišćenja pune krvi je uniformnija nego svaki dodatni korak koji bi se uveo u cilju frakcionisanja krvi.

Pored testiranja potencijala, tačnosti i efikasnosti metoda da izoluju RNK intaktnog integriteta i dovoljnog kvantiteta, ispitivali smo i koliko je koja metoda jednostavna korisnicima. Ova činjenica ide u prilog poluautomatskoj metodi ABI_{KRV} (113) čijim reagensima se omogućava trenutna zaštita RNK od dejstva ribonukleaza nakon uzorkovanja krvi bez odvajanja mononuklearnih ćelija tj. minimalno dalje tretiranje pune krvi u cilju frakcionisanja, mogućnost stajanja takve krvi na sobnoj temperaturi, ili u frižideru u dužem vremenskom periodu, smanjeno vreme izolacije RNK, smanjen rizik od izloženosti uzoraka laboratorijskom osoblju. Ovim instrumentom se može izolovati RNK istovremeno iz 96 uzoraka. Za razliku od ABI_{KRV} metode, ekstrakciji RNK pomoću TRI_{MČPK} i ABI_{MČPK} metoda prethodi centrifugiranje krvi na tečnom gradijent-gelu u cilju odvajanja limfocita i monocita od ostalih ćelija krvi. Ovaj dodatni korak frakcionisanja ćelija krvi u izolaciji RNK zahteva dodatnu opremu i reagense, dugotrajan je i omogućava potencijalnu unakrsnu kontaminaciju između uzoraka. Izlaganje MČPK sobnoj temperaturi pre dodavanja TRIzol™ reagensa ili lizirajućeg reagensa koji inhibiraju ribonukleaze i sprečavaju degradaciju RNK je mnogo duže nego vreme potrebno da se pripreme uzorci za ABI_{KRV} metodu, što može da dovede do *ex vivo* aktivacije leukocita i povećanog oksidativnog stresa u njima (63). Pored svih prednosti, čak i da se ABI_{KRV} metoda dodatno usavrši u cilju povećanja prinosa RNK i čistoće rastvora u kome se izoluje, ostaje problem velike količine globinskih transkripata koji se izoluju iz pune krvi zajedno sa ostalom RNK.

VI. ZAKLJUČAK

U skladu sa postavljenim ciljevima studije, a na osnovu rezultata istraživanja došli smo do sledećih zaključaka:

1. Intenzivna i dugotrajna fizička aktivnost nakon 12 nedelja dovela je do povećanja ekspresije gena za Mn SOD u limfocitima, dok je genska ekspresija Cu/Zn SOD ostala stabilna nakon ovog perioda vremena.
2. Ukupna aktivnost SOD u plazmi je opala, dok se aktivnosti izoenzima Cu/Zn SOD i Mn SOD se nisu značajno promenile pre i nakon dugotrajnih i intenzivnih treninga, ali nisu pokazale ni korelaciju sa vrednostima genske ekspresije.
3. Iako se koncentracija TBKRS nije značajno promenila nakon 12 nedelja treninga, bila je u značajnoj negativnoj korelaciji sa nivoima genske ekspresije Mn SOD. Koncentracija TBKRS predstavlja prediktivni parameter za nivo genske ekspresije Mn SOD u limfocitima kada se u regresioni model uključe ostali markeri oksidativnog stresa.
4. Ukupna SOD aktivnost u plazmi je bila u pozitivnoj korelaciji sa nivoima genske ekspresije Cu/Zn SOD nakon perioda intenzivne fizičke aktivnosti od 12 nedelja. Uključivanjem preostalih markera antioksidativne zaštite u multipli linearni model nezavisna prediktivna sposobnost genske ekspresije Cu/Zn SOD na ukupnu SOD aktivnost u plazmi se zadržala.
5. Terapija atorvastatinom je dovela do smanjenja genske ekspresije PON1 u jetri pacova na aterogenoj dijeti.
6. Aterogena dijeta je indukovala ekspresiju gena za PON2 u jetri.
7. U jetri su sva tri gena imala sličnu ekspresiju koja se nije promenila ni pod uticajem aterogene dijetete ni terapijom atorvastatinom.
8. PON2 i PON3 su imali veću ekspresiju od PON1 u belom masnom tkivu kod pacova na normalnoj dijeti. U aorti pacova na normalnoj, aterogenoj i aterogenoj dijeti sa terapijom nivoi ekspresije PON2 i PON3 su bili značajno viši od PON1. Kod pacova na aterogenoj dijeti i terapiji, nivoi ekspresije PON2 su bili promenjeni i postali su viši u belom masnom tkivu nego aorti. Nivoi genske ekspresije PON3 u jetri i aorti su bili u značajnoj pozitivnoj korelaciji.
9. Ni aterogena dijeta, ni terapija atorvastatinom nisu promenili distribuciju PON1 i PON3 ponaosob između organa. PON1 je najviše ekspimiran u jetri. Ekspresija PON3 nije se promenila pod uticajem aterogene dijetete ni pod

uticajem terapije u ispitivanim organima. PON3 je imao sličnu ekspresiju u svim organima u sve tri grupe pacova.

10. Sve tri testirane metode su dale zadovoljavajuće prinose RNK. Samo $TRI_{M\acute{C}PK}$ metodom je dobijen čist rastvor RNK bez organskih i neorganskih kontaminanata sa očuvanim integritetom rRNK subjedinica.
11. Vrednosti genske ekspresije Cu/Zn SOD i Mn SOD su se značajno razlikovale između metoda pri automatskom i manuelnom podešavanju osnovne linije i praga amplifikacije. Najveće vrednosti su dobijene u ABI_{KRV} uzorcima, dok su $TRI_{M\acute{C}PK}$ i $ABI_{M\acute{C}PK}$ uzorci imali približne vrednosti genske ekspresije.
12. Varijacija u vrednostima genske ekspresije je bila najveća u ABI_{KRV} uzorcima, posebno pri automatskom podešavanju osnovne linije i praga amplifikacije, dok je najmanja bila u $TRI_{M\acute{C}PK}$ uzorcima pri manuelnom podešavanju osnovne linije i praga i korišćenjem relativne standardne krive za računanje genske ekspresije.
13. Inhibitorni efekat kontaminanata na vrednosti genske ekspresije izoenzima SOD se nije ispoljio u ABI_{KRV} uzorcima, već su vrednosti genske ekspresije izoenzima SOD bile značajno više nego u uzorcima dobijenim $ABI_{M\acute{C}PK}$ i $TRI_{M\acute{C}PK}$ metodama. Kontaminanti su ispoljili inhibitorni efekat na qPCR metodu u $ABI_{M\acute{C}PK}$ uzorcima. RNK tih uzoraka je bila očuvanog integriteta u rastvoru sa kontaminantima, a vrednosti genske ekspresije Cu/Zn SOD i Mn SOD su bile značajno niže nego u $TRI_{M\acute{C}PK}$ uzorcima.
14. Interindividualne varijacije u vrednostima genske ekspresije su bile značajno manje u uzorcima dobijenim $TRI_{M\acute{C}PK}$, što bi omogućilo da na osnovu njih razdvojimo zdrave od bolesnih ispitanika.

VI. LITERATURA

1. Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW, Steitz JA, Weiner AM. Molecular biology of the gene. California: Benjamin/Cummings Publishing Comp; 1987.
2. Strahl C, Blackburn EH. The effects of nucleoside analogs on telomerase and telomeres in Tetrahymena. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22: 893–900.
3. Zhang Y. Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. *Genes and Dev.* 2003; 17: 2733-40.
4. Alessio HM, Hagerman AE. Oxidative stress, exercise and aging. London: Imperial College Press; 2006.
5. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969; 244: 6049–55.
6. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 1995; 64: 97–112.
7. Marklund SL. Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. *Biochem J.* 1984; 220: 269–72.
8. Zelko IN, Mariani TJ, Folz R J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn - SOD (SOD1), Mn - SOD (SOD2), and EC - SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33: 337 – 49.
9. Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY. Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89: 10405–9.
10. Liou W, Chang LY, Geuze HJ, Strous GJ. Crapo JD, Slot JW. Distribution of CuZn superoxide dismutase in rat liver. *Free Radic Biol Med.* 1993; 14: 201-7.
11. Levanon D, Lieman-Hurwitz J, Dafni N, Wigderson M, Sherman L, Bernstein Y, Laver-Rudich Z, Danciger E, Stein O, Groner Y. Architecture and anatomy of the chromosomal locus in human chromosome 21 encoding the Cu/Zn superoxide dismutase. *EMBOJ* 1985; 4: 77–84.
12. Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Amyotrophic lateral sclerosis: a proposed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99: 9010–4.
13. Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. *Free Radic Biol Med.* 2009; 47: 344–56.
14. Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem.* 1973; 248: 4793–96.

15. Creagan R, Tischfield J, Ricciuti F, Ruddle FH. Chromosome assignments of genes in man using mouse-human somatic cell hybrids: mitochondrial superoxide dismutase (indophenols oxidase-B, tetrameric) to chromosome 6. *Humangenetik* 1973; 20: 203–9.
16. Van Landeghem GF, Tabatabaie P, Beckman G, Beckman L, Andersen PM. Manganese-containing superoxide dismutase signal sequence polymorphism associated with sporadic motor neuron disease. *Eur J Neurol.* 1999; 6: 639–44.
17. Hiroi S, Harada H, Nishi H, Satoh M, Nagai R, Kimura A. Polymorphisms in the SOD2 and HLA-DRB1 genes are associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 261: 332–9.
18. Morten KJ, Ackrell BA, Melov S. Mitochondrial reactive oxygen species in mice lacking superoxide dismutase 2: attenuation via antioxidant treatment. *J Biol Chem.* 2006; 281: 3354-9.
19. St. Clair DK, Oberley TD, Muse KE, St Clair WH. Expression of manganese superoxide dismutase promotes cellular differentiation. *Free Radic Biol Med.* 1994; 16: 275–82.
20. Marklund SL, Holme E, Hellner L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chim Acta.* 1982; 126: 41–51.
21. Folz R J, Crapo J D. Extracellular superoxide dismutase (SOD3): tissue-specific expression, genomic characterization, and computer-assisted sequence analysis of the human EC SOD gene. *Genomics* 1994; 22: 162–71.
22. Karlsson K, Marklund SL. Binding of human extracellular- superoxide dismutase C to cultured cell lines and to blood cells. *Lab Invest.* 1989; 60: 659–66.
23. Enghild JJ, Thogersen IB, Oury TD, Valnickova Z, Hojrup P, Crapo JD. The heparin-binding domain of extracellular superoxide dismutase is proteolytically processed intracellularly during biosynthesis. *J Biol Chem.* 1999; 274: 14818-22.
24. Folz RJ, Peno-Green L, Crapo JD. Identification of a homozygous missense mutation (Arg to Gly) in the critical binding region of the human EC-SOD gene (SOD3) and its association with dramatic increased serum levels. *Hum Mol Genet.* 1994; 3: 2251–4.
25. Juul K , Tybjaerg- Hansen A , Marklund S , Heegaard NHH , Steffensen R , Sillesen H, Jensen G , Nordestgaard BG. Genetically Reduced Antioxidative Protection and Increased Ischemic Heart Disease Risk: The Copenhagen City Heart Study. *Circulation* 2004; 109: 59–65.

26. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Human serum paraoxonase. *Gen Pharmacol.* 1998; 3: 329-36.
27. Aviram M. Introduction to the serial review on paraoxonases, oxidative stress, and cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37: 1301-3.
28. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett.* 1998; 423: 57-60.
29. Rodríguez-Sanabria F, Rull A, Beltrán-Debón R, Aragonès G, Camps J, Mackness B, Mackness M, Joven J. Tissue distribution and expression of paraoxonases and chemokines in mouse: the ubiquitous and joint localization suggest a systemic and coordinated role. *J Mol Histol.* 2010; 41: 379-86.
30. Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.* 2005; 38: 153-63.
31. Draganov DI, La Du BN. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004; 369: 78-88.
32. Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) is present in postprandial chylomicrons. *Atherosclerosis* 2005; 180: 55-61.
33. Davies HG, Richter RJ, Keifer M, Broomfield CA, Sowalla J, Furlong CE. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet.* 1996; 14: 334-6.
34. Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res.* 2005; 46: 1239-47.
35. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest.* 1998; 101: 1581-90.
36. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, Navab M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1995; 96: 2882-91.

37. Deakin SP, James RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci.* 2004; 107: 435-47.
38. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. The hunt for nutritional and pharmacological modulators of paraoxonase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 1248-50.
39. Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem Pharmacol.* 2005; 69: 541-50.
40. Marchegiani F, Marra M, Olivieri F, Cardelli M, James RW, Boemi M, Franceschi C. Paraoxonase 1: genetics and activities during aging. *Rejuvenation Res.* 2008; 11: 113-27.
41. Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du BN. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet.* 1993; 52: 598-608.
42. Brophy VH, Jarvik GP, Richter RJ, Rozek LS, Schellenberg GD, Furlong CE. Analysis of paraoxonase (PON1) L55M status requires both genotype and phenotype. *Pharmacogenetics* 2000; 10: 453-60.
43. Leviev I, Negro F, James RW. Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amounts of mRNA. An explanation for differences in serum concentrations of paraoxonase associated with the (Leu-Met54) polymorphism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 2935-9.
44. Teiber JF, Draganov DI, LaDuBN. Purified human serum PON1 does not protect LDL against oxidation in the in vitro assays initiated with copper or AAPH. *J Lipid Res.* 2004; 45: 2260-8.
45. Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet.* 2001; 68: 1428-36.
46. Leviev I, James RW. Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 516-21.
47. Suehiro T, Nakamura T, Inoue M, Shiinoki T, Ikeda Y, Kumon Y, Shindo M, Tanaka H, Hashimoto K. A polymorphism upstream from the human paraoxonase (PON1) gene and its association with PON1 expression. *Atherosclerosis* 2000; 150: 295-8.

48. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 2001; 276: 44444-9.
49. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. The paraoxonase gene family and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol.* 2002; 13: 357-62.
50. Li HL, Liu DP, Liang CC. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. *J Mol Med.* 2003; 81: 766-79.
51. Shiner M, Fuhrman B, Aviram M. Macrophage paraoxonase 2 (PON2) expression is up-regulated by pomegranate juice phenolic anti-oxidants via PPAR gamma and AP-1 pathway activation. *Atherosclerosis* 2007; 195: 313–21.
52. Shiner M, Fuhrman B, Aviram M. Macrophage paraoxonase2 (PON2) expression is upregulated by unesterified cholesterol through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway. *Biol Chem.* 2007; 388: 1353-8.
53. Fuhrman B, Gantman A, Khateeb J, Volkova N, Horke S, Kiyon J, Dumler I, Aviram M. Urokinase activates macrophage PON2 gene transcription via the PI3K/ROS/MEK/SREBP-2 signalling cascade mediated by the PDGFRbeta. *Cardiovasc Res.* 2009; 84: 145-54.
54. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusis AJ, Navab M, Fogelman AM. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 542–7.
55. Shamir R, Hartman C, Karry R, Pavlotzky E, Eliakim R, Lachter J, Suissa A, Aviram M. Paraoxonases (PONs) 1, 2, and 3 are expressed in human and mouse gastrointestinal tract and in Caco-2 cell line: selective secretion of PON1 and PON2. *Free Radic Biol Med.* 2005; 39: 336–44.
56. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem.* 2000; 275: 33435–42.
57. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Wang SS, Bourquard N, Fogelman AM, Lusis AJ, Reddy ST. Decreased obesity and atherosclerosis in human paraoxonase 3 transgenic mice. *Circ Res.* 2007; 100: 1200–7.

58. Shih DM, Xia YR, Yu JM, Lusic AJ. Temporal and Tissue-Specific Patterns of Pon3 Expression in Mouse: In situ Hybridization Analysis. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 660: 73–87.
59. Whitney AR, Diehn M, Popper SJ, Alizadeh AA, Boldrick JC, Relman DA, Brown PO. Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 1896–901.
60. Debey S, Schoenbeck U, Hellmich M, Gathof BS, Pillai R, Zander T, Schultze JL. Comparison of different isolation techniques prior gene expression profiling of blood derived cells: impact on physiological responses, on overall expression and the role of different cell types. *Pharmacogenomics J.* 2004; 4: 193–207.
61. Radich JP, Mao M, Stepaniants S, Biery M, Castle J, Ward T, Schimmack G, Kobayashi S, Carleton M, Lampe J, Linsley PS. Individual-specific variation of gene expression in peripheral blood leukocytes. *Genomics* 2004; 83:980–8.
62. Kim SJ, Dix DJ, Thompson KE, Murrell RN, Schmid JE, Gallagher JE, Rockett JC. Effects of storage, RNA extraction, genechip type, and donor sex on gene expression profiling of human whole blood. *Clin Chem.* 2007; 53: 1038-45.
63. Abbas A K. *Cellular and Molecular Immunology.* Philadelphia: WB Saunders; 1991.
64. Øvstebø R, Lande K, Kierulf P, Foss Haug K B. Quantification of relative changes in specific mRNAs from frozen whole blood – methodological considerations and clinical implications. *Clin Chem Lab Med.* 2007; 45: 171-6.
65. Pyne DB. Exercise-induced muscle damage and inflammation: a review. *Aust J Sci Med Sport.* 1994; 26: 49-58.
66. Scandalios JG: *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.
67. Grisham MB. *Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine.* Texas: RG Landes Co; 1992.
68. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979; 59: 527–605.
69. Kuppasamy P, Zweier JL. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase: Evidence for hydroxyl radical generation. *J Biol Chem.* 1989; 264: 9880–4.

70. Miller JW, Selhub J, Joseph JA. Oxidative damage caused by free radicals produced during catecholamine autoxidation: protective effects of O-methylation and melatonin. *Free Radic Biol Med.* 1996; 21: 241-9.
71. Petrone WF, English DK, Wong K, McCord JM. Free radicals and inflammation: Superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1980; 77: 1159–63.
72. Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Comm.* 1982; 107: 1198-205.
73. Packer L. Protective role of vitamin E in biological systems. *Am J Clin Nutr.* 1991; 53: 1050–5.
74. Beyer RE. The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: Interaction with vitamin E and coenzyme Q. *J Bioenerg Biomembr.* 1994; 26: 349–58.
75. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem.* 1983; 52: 711–60.
76. Abou- Seif MA, Rabia A, Nasr M. Antioxidant status, erythrocyten membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in malignant lymphoma patients. *Clin Chem Lab Med.* 2000; 38: 737 – 42.
77. Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J. Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann NY Acad Sci.* 2006; 1067: 425-35.
78. Franco AA, Odom RS, Rando TA. Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27: 1122–32.
79. Morel Y, Barouki R. Repression of gene expression by oxidative stress. I *Biochem J.* 1999; 342: 481-96.
80. Zhou LZ, Johnson AP, Rando TA. NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31: 1405–16.
81. Hollander J, Fiebig R, Gore M, Ookawara T, Ohno H., Ji LL. Superoxide dismutase gene expression is activated by a single bout of exercise in rat skeletal muscle. *Pflugers Arch.* 2001; 442: 426–34.
82. Cazzola R, Russo-Volpe S, Cervato G. Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. *Eur J Clin Invest.* 2003; 33: 924–30.

83. Brites FD, Evelson PA, Christiansen MG, Nicol MF, Basílico MJ, Wikinski RW, Llesuy SF. Soccer players under regular training show oxidative stress but an improved plasma antioxidant status. *Clin Sci (Lond)*. 1999; 96: 381-5.
84. Metin G, Gümüştaş MK, Uslu E, Belce A, Kayserilioglu A. Effect of regular training on plasma thiols, malondialdehyde and carnitine concentrations in young soccer players. *J Physiol*. 2003; 46: 35-9.
85. Child RB, Wilkinson DM, Fallowfield JL, Donnelly AE. Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. *Med Sci Sports Exerc*. 1998; 30: 1603-7.
86. Tauler P, Sureda A, Cases N, Aguilo A, Rodriguez-Marroyo JA, Villa G, Tur JA, Pons A. Increased lymphocyte antioxidant defences in response to exhaustive exercise do not prevent oxidative damage. *J Nutr Biochem*. 2006; 17: 665-71.
87. Niess AM, Hartmann A, Grünert-Fuchs M, Poch B, Speit G. DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int J Sports Med*. 1996; 17: 397-403.
88. Miyazaki H, Oh-ishi S, Ookawara T, Kizaki T, Toshinai K, Ha S, Haga S, Ji LL, Ohno H. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *J Appl Physiol*. 2001; 84: 1-6.
89. Fatouros IG, Jamurtas AZ, Villiotou V, Pouliopoulou S, Fotinakis P, Taxildaris K, Deliconstantinos G. Oxidative stress responses in older men during endurance training and detraining. *Med Sci Sports Exerc*. 2004; 36: 2065-72.
90. Cases N, Sureda A, Maestre I, Tauler P, Aguilo A, Cordova A, Roche E, Tur JA, Pons A. Response of antioxidant defences to oxidative stress induced by prolonged exercise: antioxidant enzyme gene expression in lymphocytes. *Eur J Appl Physiol*. 2006; 98: 263-9.
91. Morikawa A, Tsutomu I, Han Y, Nagata M. Effects of exercise training on superoxide dismutase gene expression in human lymphocytes. *Intern J Sport Health Sci*. 2004; 2: 187-94.
92. Nakao C, Ookawara T, Kizaki T, Oh-Ishi S, Miyazaki H, Haga S, Sato Y, Ji LL, Ohno H. Effects of swimming training on three superoxide dismutase isoenzymes in mouse tissues. *J Appl Physiol*. 2000; 88: 649-54.

93. Afman L, Müller M. Nutrigenomics: from molecular nutrition to prevention of disease. *J Am Diet Assoc.* 2006; 106: 569-576.
94. Hedrick CC, Hassan K, Hough GP, Yoo JH, Simzar S, Quinto CR, Kim SM, Dooley A, Langi S, Hama SY, Navab M, Witztum JL, Fogelman AM. Short-term feeding of atherogenic diet to mice results in reduction of HDL and paraoxonase that may be mediated by an immune mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 1946–52.
95. Thomas-Moya E, Gianotti M, Proenza AM, Lladó I. Paraoxonase 1 response to a high-fat diet: gender differences in the factors involved. *Mol Med.* 2007; 13: 203–9.
96. Mackness MI, Bouiller A, Hennuyer N, Mackness B, Hall M, Tailleux A, Duriez P, Delfly B, Durrington P, Fruchart JC, Duverger N, Caillaud JM, Castro G. Paraoxonase activity is reduced in pro-atherosclerotic diet in rabbits. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 269: 232–6.
97. Gouedard C, Barouki R, Morel Y. Dietary polyphenols increase paraoxonase 1 gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependant mechanism. *Mol Cell Biol.* 2004; 24: 5209–22.
98. Shih DM, Gu L, Hama S, Xia Y-R, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. *J Clin Invest.* 1996; 97: 1630–9.
99. Forte TM, Subbanagounder G, Berliner JA, Blanche PJ, Clermont AO, Jia Z, Oda MN, Krauss RM, Bielicki JK. Altered activities of anti-atherogenic enzymes LCAT, paraoxonase, and platelet-activating factor acetylhydrolase in atherosclerosis-susceptible mice. *J Lipid Res.* 2002; 43: 477-85.
100. Rosenblat M, Draganov D, Watson CE, Bisgaier CL, La Du BN, Aviram M. Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 468-74.
101. Rosenblat M, Hayek T, Hussein K, Aviram M. Decreased macrophage paraoxonase 2 expression in patients with hypercholesterolemia is the result of their increased cellular cholesterol content: effect of atorvastatin therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 175-80.

102. Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease. *Lancet*. 1994; 344: 1383–89.
103. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21: 1712–19.
104. Bełtowski J, Wójcicka G, Jamroz A. Differential effect of 3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A reductase inhibitors on plasma paraoxonase 1 activity in the rat. *Pol J Pharmacol*. 2002; 54: 661–71.
105. Gouedard C, Koum-Besson N, Barouki R, Morel Y. Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene PON-1 by fenofibrate and statins. *Mol Pharmacol*. 2003; 63: 945–56.
106. Deakin S, Leviev I, GuernFier S, James RW. Statin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase. A role for sterol regulatory element-binding protein-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 2083–89.
107. Deakin S, Guernier S, James RW. Pharmacogenetic interaction between paraoxonase-1 gene promoter polymorphism C-107T and statin. *Pharmacogenet Genom*. 2007; 17: 451–7.
108. Sardo MA, Campo S, Bonaiuto M, Bonaiuto A, Saitta C, Trimarchi G, Castaldo M, Bitto A, Cinquegrani M, Saitta A. Antioxidant effect of atorvastatin is independent of PON1 gene T(–107)C, Q192R and L55M polymorphisms in hypercholesterolemic patients. *Curr Med Res Op*. 2005; 21: 777–84.
109. Boesch-Saadatmandi C, Pospissil RT, Graeser AC, Canali R, Boomgaarden I, Doering F, Wolffram S, Egert S, Mueller MJ, Rimbach G. Effect of quercetin on paraoxonase 2 levels in RAW264.7 Macrophages and in human monocytes – role of quercetin metabolism. *Int J Mol Sci*. 2009; 10: 4168–77.
110. Farrell RE. *RNA Methodologies A Laboratory Guide for Isolation and Characterization*, 4th edn. Amsterdam: Elsevier; 2010.
111. Pfaffl MW. Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin SA, editor. *A–Z of Quantitative PCR*. California: IUL Biotechnology Series, International University Line; 2004. 87–120 p.
112. TRIzol® Reagent. California: Life technologies. c2007 [cited 2007, Sept 8]. Available from: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf

113. ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid PrepStation User guide. California: Applied Biosystems. c2007 [cited 2007, Dec 11]. Available from: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041216.pdf
114. Bastos RN, Aviv H. Globin RNA precursor molecules: biosynthesis and process in erythroid cells. *Cell* 1977; 11: 641–50.
115. Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl M. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett.* 2006; 28:1601–13.
116. Mannhalter C, Koizar D, Mitterbauer G, Evaluation of RNA Isolation Methods and Reference Genes for RT-PCR Analyses of Rare Target RNA. *Clin Chem Lab Med.* 2000; 38: 171–7.
117. Isolation of Total RNA from Whole Blood and from Cells Isolated from Whole Blood. California: Applied Biosystems. c2007 [cited 2007, Oct 29]. Available from: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041270.pdf
118. Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-CR performance. *Mol Asp Med.* 2006; 27: 126–39.
119. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 2002; 29: 23-39.
120. Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods.* 2001; 25: 402–8.
121. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972; 18: 499-502.
122. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972; 247: 3170-5.
123. Ellman E. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959; 82: 70–7.
124. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA, editor. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research.* Boca Raton. Florida: CRC Press; 1985. 123-132 p.

125. Girotti MJ, Khan N, McLellan BA. Early measurement of systemic lipid peroxidation products in plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma*. 1991; 31: 32-5.
126. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*. 1996; 49: 1304 - 13.
127. Orlando C, Pinzani P, Pazzagli M. Developments in quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med*. 1998; 36: 255-69.
128. Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem*. 2000; 285: 194-204.
129. Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System. Relative Quantification Getting Started Guide. California: Applied Biosystems. c2007 [cited 2007, Dec 19]. Available from: <http://www.lifetechnologies.com/content/dam/LifeTech/migration/en/filelibrary/nucleic-acid-amplification-expression-profiling/pdfs.par.83765.file.dat/relative-quant-ct.pdf>
130. Tichopad A, Dilger M, Schwarz G, Pfaffl MW. Standardised determination of real-time PCR efficiency from a single reaction setup. *Nucl Acids Res*. 2003; 31: 6688.
131. Kainz P. The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1494: 23-7.
132. Data Analysis on the ABI PRISM[®] 7700 Sequence Detection System: Setting Baselines and Thresholds. California: Applied Biosystems. c2007 [cited 2007, Sept 16]. Available from: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_042502.pdf
133. User Bulletin #2 ABI Prism 7700 Sequence detection System; 1997 & 2001. California: Applied Biosystems. c2008 [cited 2008, May 10]. Available from: <http://www2.udel.edu/ctcr/sites/udel.edu.ctcr/files/ABI%20Prism%207000%20Sequence%20Detection%20System%20User%20Guide.pdf>.

134. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 1998; 24: 954-62.
135. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 7276-80.
136. Bassuk SS, Manson JE. Epidemiological evidence for the role of physical activity in reducing risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *J Appl Physiol*. 2005; 99: 1193–204.
137. Roberts CK, Barnard RJ. Effects of exercise and diet on chronic disease. *J Appl Physiol*. 2005; 98: 3–30.
138. García-López D, Häkkinen K, Cuevas MJ, Lima E, Kauhanen A, Mattila M, Sillanpää E, Ahtiainen JP, Karavirta L, Almar M, González-Gallego J. Effects of strength and endurance training on antioxidant enzyme gene expression and activity in middle-aged men. *Scand J Med Sci Sports*. 2007; 17: 595–604.
139. Hubner-Wozniak E, Panczenko-Kresowska B, Lerczak K, Posnik J. Effects of graded treadmill exercise on the activity of blood antioxidant enzymes, lipid peroxides and nonenzymatic anti-oxidants in long-distance skiers. *Biol Sport*. 1994; 11: 217-26.
140. Ji LL, Stratman FW, Lardy HA. Enzymatic down regulation with exercise in rat skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys*. 1988; 263: 137– 49.
141. Oyanuagui Y. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Analytical Biochem*. 1984; 142: 290– 6.
142. Vider J, Laaksonen DE, Kilk A, Atalay M, Lehtmaa J, Zilmer M, Sen CK. Physical exercise induces activation of NFkappaB in human peripheral blood lymphocytes. *Antioxid Redox Signal*. 2001; 3: 1131–7.
143. Majerczak J, Rychlik B, Grzelak A, Grzmil P, Karasinski J, Pierzchalski P, Pulaski L, Bartosz G, Zoladz JA. Effect of 5-week moderate intensity endurance training on the oxidative stress, muscle specific uncoupling protein (UCP3) and superoxide dismutase (SOD2) contents in vastus lateralis of young, healthy men. *J Physiol Pharmacol*. 2010; 61: 743-51.

144. Zeibig J, Karlic H, Lohninger A, Damsgaard R, Smekal G. Do blood cells mimic gene expression profile alterations known to occur in muscular adaptation to endurance training? *Eur J Appl Physiol.* 2005; 95: 96–104.
145. Marini M, Lapalombella R, Margonato V, Ronchi R, Samaja M, Scapin C, Gorza L, Maraldi T, Carinci P, Ventura C, Veicsteinas A. Mild exercise training, cardioprotection and stress gene profile. *Eur J Appl Physiol.* 2007; 99: 503-10.
146. Joksic G, Pajovic SB, Stankovic M, Pejic S, Kasapovic J, Cuttone G, Calonghi N, Masotti L, Kanazir DT. Chromosome aberrations, micronuclei, and activity of superoxide dismutases in human lymphocytes after irradiation in vitro. *Cell Mol Life Sci.* 2000; 57: 842–50.
147. Pereira B, Costa Rosa LF, Safi DA, Medeiros MH, Curi R, Bechara EJ. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in muscle and lymphoid organs of sedentary and exercise-trained rats. *Physiol Behav.* 1994; 56: 1095–9.
148. Lee TB, Lim DY, Jeon HJ, Min YD, Kim KC, Kim KJ, Choi CH. Differential Induction of Mn-containing Superoxide Dismutase by Paraquat in Peripheral Lymphocytes of Normal Subjects and Gastric Cancer Patients. *Mol Cells.* 2003; 16: 13-8.
149. Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardo FV, Sastre J, Ji LL, Vina J. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol.* 2005; 567: 113–20.
150. Suzuki K, Ohno H, Oh-ishi S, Kizaki T, Ookawara T, Fujii J, Radak Z, Taniguchi N. Superoxide dismutases in exercise and disease. In: Sen Ck, Parker L, Hänninen O, editors. *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise.* Amsterdam: Elsevier; 2000. 243–295 p.
151. Gomi F, Matsuo M. Effects of 60% oxygen inhalation on the survival and antioxidant enzyme activities of young and old rats. *Mech Ageing Dev.* 2001; 123: 1295–304.
152. Martinovic J, Dopsaj V, Dopsaj MJ, Kotur-Stevuljevic J, Vujovic A, Stefanovic A, Nestic G. Long-term effects of oxidative stress in volleyball players. *Int J Sports Med.* 2009; 30: 851-6.
153. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS. Atorvastatin and gemfibrozil metabolites, but not the parent drugs, are potent antioxidants against lipoprotein oxidation. *Atherosclerosis* 1998; 138: 271–80.

154. Rosenblat M, Oren R, Aviram M. Lysophosphatidylcholine (LPC) attenuates macrophage-mediated oxidation of LDL. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 344: 1271-7.
155. Fortunato G, Di Taranto MD, Bracale UM, Del Guercio L, Carbone F, Mazzaccara C, Morgante A, D'Armiento FP, D'Armiento M, Porcellini M, Sacchetti L, Bracale G, Salvatore F. Decreased paraoxonase-2 expression in human carotids during the progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: 594–600.
156. Tanner MA, Berk LS, Felten DL, Blidy AD, Bit SL, Ruff DW. Substantial changes in gene expression level due to the storage temperature and storage duration of human whole blood. *Clin Lab Haem.* 2002; 24: 337–41.
157. Shou J, Dotson C, Qian H R, Tao W, Lin C, Lawrence F, N'Cho M, Kulkarni NH, Bull CM, Gelbert LM, Onyia JE. Optimized blood cell profiling method for genomic biomarker discovery using high-density microarray. *Biomarkers* 2005; 10: 310-20.
158. Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, Mueller O, Schroeder A, Auffray C. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33: e56.
159. Gnatenko DV, Dunn JJ, McCorkle SR, Weissmann D, Perrotta PL, Bahou WF. Transcript profiling of human platelets using microarray and serial analysis of gene expression. *Blood* 2003; 101: 2285–93.
160. Feezor RJ, Baker HV, Mindrinos M, Hayden D, Tannahill CL, Brownstein BH, Fay A, MacMillan S, Laramie J, Xiao W, Moldawer LL, Cobb JP, Laudanski K, Miller-Graziano CL, Maier RV, Schoenfeld D, Davis RW, Tompkins RG. Whole blood and leukocyte RNA isolation for gene expression analyses. *Physiol Genomics.* 2004; 19: 247-54.
161. Wu K, Miyada G, Martin J, Finkelstein D. Globin reduction protocol: a method for processing whole blood RNA samples for improved array results. [Internet]. California: Affymetrix, Inc. c2013 [cited 2013, Mar 21]. Available from: <http://www.genome.duke.edu/cores/microarray/services/rna-qc/documents/Globin%20reduction%20protocol%20A%20method.pdf>
162. Liu J, Walter E, Stenger D, Thach D. Effects of globin mRNA reduction methods on gene expression profiles from whole blood. *J Mol Diagn.* 2006, 8: 551-8.

163. Affymetrix Technical Note: An Analysis of Blood Processing Methods to Prepare Samples for GeneChip[®] Expression Profiling. [Internet]. California: Affymetrix, Inc. c2010 [cited 2010, Aug 3]. Available from: http://media.affymetrix.com/support/technical/technotes/blood_technote.pdf
164. Min JL, Barrett A, Watts T, Pettersson FH, Lockstone HE, Lindgren CM, Taylor JM, Allen M, Zondervan KT, McCarthy MI. Variability of gene expression profiles in human blood and lymphoblastoid cell lines. *BMC Genomics* 2010; 11: 96.
165. Vartanian K, Slottke R, Johnstone T, Casale A, Planck SR, Choi D, Smith JR, Rosenbaum JT, Harrington CA. Gene expression profiling of whole blood: comparison of target preparation methods for accurate and reproducible microarray analysis. *BMC Genomics* 2009, 10: 2.

RADOVI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE:

1. **Vujovic A**, Spasojevic-Kalimanovska V, Bogavac-Stanojevic N, Kotur-Stevuljevic J, Sopic M, Stefanovic A, Baralic I, Djordjevic B, Jelic-Ivanovic Z, Spasic S. Lymphocyte Cu/ZnSOD and MnSOD gene expression responses to intensive endurance soccer training. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 2013; 27: 3843-3847.
2. **Vujovic A**, Spasojevic-Kalimanovska V, Bogavac-Stanojevic N, Spasic S, Kotur-Stevuljevic J, Jelic-Ivanovic Z. Comparison of two RNA isolation methods for determination of SOD1 and SOD2 gene expression in human blood and mononuclear cells. *Indian Journal of Biotechnology*. In Press

BIOGRAFIJA AUTORA

Ana Ninić je rođena 1978. godine u Kruševcu, Srbija. Diplomirala je 2005. sa prosečnom ocenom 8,87 na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani farmaceut.

Od marta 2006. zaposlena je kao stručni saradnik u Institutu za medicinku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, gde je učestvovala u izvođenju praktične nastave. Oktobra 2006. upisana je na doktorske studije iz Medicinske biohemije na Farmaceutskom fakultetu. Februara 2007. godine izabrana je za asistenta za užu naučnu oblast Medicinska biohemija. Specijalističke studije iz Medicinske biohemije na Farmaceutskom fakultetu upisala je aprila 2008.

Učestvuje u izvođenju nastave na integrisanim akademskim studijama na studijskim programima Farmacija i Farmacija – Medicinska biohemija.

Objavila je ukupno 13 naučnih rada i 12 saopštenja na međunarodnim i domaćim skupovima. Prema podacima internet sajta „Scopus Database” do 2012. godine citirana je 57 puta.

U periodu od 2008. do 2010. godine je bila saradnik na projektu osnovnih istraživanja „Ispitivanje biohemijskih i genetičkih faktora rizika kao uzročnika i markera ateroskleroze i drugih oboljenja: analitički i klinički aspekti”, a od 2011. godine je saradnik na projektu „Interaktivna uloga dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije u aterosklerozi i drugim bolestima: genetički i biohemijski markeri“, koje finansira Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Od 2008. do 2011. godine bila je angažovana kao saradnik na međunarodnom projektu u okviru programa COST (European research programme COST, European Cooperation in Science and Technology). Scientific Domain: Biomedicine and Molecular Biosciences; Action: Lipid Peroxidation Associated Disorders: LPO (B35); Role of oxidative stress and dyslipidemia in atherosclerosis. Od 2010. godine je saradnik na međunarodnom projektu COST: Scientific Domain: Biomedicine and Molecular Biosciences; Action: HDL: From Biological Understanding to Clinical Exploitation (BM0904).

Naučno-istraživačka aktivnost Ane Ninić bazira se na ispitivanju genske ekspresije enzima antioksidativne zaštite i određivanju markera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kao prediktivnih faktora za nastanak kardiovaskularnih bolesti.

Član je Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno-radikalnu fiziologiju. Govori engleski jezik.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Ана Нинић

број уписа 4/06

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Генска експресија ензима антиоксидативне заштите у ткивима пацова и хуманој крви:
утицај спољних фактора и корелација са биохемијским маркерима оксидативног стреса

- 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/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 09.12.2013.



Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора Ана Нинић

Број уписа 4/06

Студијски програм Докторске академске студије из медицинске биохемије

Наслов рада Генска експресија ензима антиоксидативне заштите у ткивима пацова и хуманој крви: утицај спољних фактора и корелација са биохемијским маркерима оксидативног стреса

Ментор Др Весна Спасојевић-Калимановска, редовни професор, Универзитет у Београду, Фармацеутски факултет

Потписани Ана Нинић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 09.12.2013.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Генска експресија ензима антиоксидативне заштите у ткивима пацова и хуманој крви:
утицај спољних фактора и корелација са биохемијским маркерима оксидативног стреса

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 09.12.2013.



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.