



UNIVERZITET U NIŠU  
MEDICINSKI FAKULTET



Dr Boban D. Milojković

**ADENILATNI ENERGETSKI NABOJ I METABOLIZAM  
MOKRAĆNE KISELINE KOD PACIJENATA SA  
ESENCIJALNOM HIPERTENZIJOM**

doktorska disertacija

Mentor: Prof. dr Gordana Kocić

Niš, 2015.

<b>I Autor</b>	
Ime i prezime	<b>Boban Milojković</b>
Datum i mesto rođenja	27.11.1976.
Sadašnje zaposlenje	Pfizer H.C.P.
<b>II Doktorska disertacija</b>	
Naslov	Adenilatni energetska naboj i metabolizam mokraćne kiseline kod pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom
Broj stranica	125
Broj šema	21
Broj tabela	31
Broj bibliografskih podataka	265
Ustanova i mesto gde je rad izrađen	Centar za Biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Nišu (odsek za analitičku hemiju) i u Klinici za nefrologiju Kliničkog centra Niš
Naučna oblast	Medicina
Mentor	Prof. dr Gordana Kocić
<b>III Ocena i odbrana</b>	
Datum prijave teme	
Datum odluke i datum prihvatanja doktorske disertacije	
Komisija za ocenu podobnosti teme i kandidata	Prof.dr Stevan Ilić, predsednik Prof.dr Gordana Kocić, mentor i član Prof.dr Sonja Radenković
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije	Prof. Dr Milan Pavlović, predsednik Prof. Dr Gordana Kocić, mentor i član Prof. Dr Sonja Radenković, član Prof. Dr Marina Deljanin-Ilić, član Doc. Dr Aleksandar Tomić, član sa Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske Akademije u Beogradu
Datum odbrane doktorske disertacije	
Naučni doprinos disertacije ( autorski rad doktoranta na SCI listi)	Boban Milojkovic, Kocic G, Radenkovic S, Pavlovic R, Cvetkovic T, Deljanin-Ilic M, Ilic S, Bobana MD, Djindjic B, Stojanovic D, Sokolovic D, Jevtovic-Stoimenov T. Circulating purine compounds, uric acid, and xanthine oxidase/dehydrogenase relationship in essential hypertension and end stage renal disease. Ren Fail. 2014 May;36(4):613-8. doi: 10.3109/0886022X.2014.882240.

***Za izradu ove doktorske disertacije iskrenu zahvalnost dugujem:***

*Prof. dr Gordani Kocić, mentoru ove disertacije, za uloženi trud, korisne sugestije i podršku u izboru teme, stručnu i prijateljsku pomoć u svakom trenutku realizacije ovog rada, nesebično uloživši ogromno znanje i energiju*

*Prof. dr Stevanu Iliću za izuzetnu saradnju i razumevanje aktuelnih potreba kardiologije za biohemijski pristup ovom savremenom medicinskom problemu*

*Prof. dr Milanu Pavloviću, na uspešnoj saradnji, korisnim sugestijama, energiji i volji da se realizuje ovaj rad*

*Prof. dr Marini Deljanin- Ilić za korisne stručne savete, intuitivne naučne ideje i iskrenu podršku u realizaciji ove disertacije*

*Doc. dr Aleksandru Tomiću za korisne naučne savete i uspešnu saradnju*

*Prof. dr Sonji Radenković za stručnu i naučnu podršku, odabir i obradu pacijenata*

*Doc. dr Radmili Pavlović na izuzetnoj saradnji i analizama HPLC*

*Prof. dr Tanji Cvetković za laboratorijske analize na Klinici za nefrologiju*

*Dr Bobani Milojković za bezrezervnu podršku i pomoć tokom izrade doktorske disertacije*

*Str. saradniku na Institutu za biohemiju, Svetlani Stojanović, za biohemijske analize*

*Bošku, Veri, Tamari i roditeljima.....*

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Esencijalna hipertenzija – patogeneza i precipitirajući mehanizmi.....	1
1.2. Uzroci esencijalne hipertenzije .....	2
<b>2. METABOLIZAM PURINSKIH NUKLEOTIDA I MEĐUSOBNA VEZA SA HIPERTENZIJOM .....</b>	<b>13</b>
2.1. Metabolizam purinskih nukleotida .....	13
2.1.1. Tipovi purinskih nukleotida, sinteza, katabolizam i reutilizacija .....	14
2.2. Adenilatni energetski naboj u ćelijama .....	16
2.2.1. Koncentracija ATP i adenilatni energetski naboj u plazmi.....	19
2.2.2. Adenilni nukleotidi u regulaciji krvnog pritiska .....	20
2.2.3. Adenilni nukleotidi i funkcija endotela.....	23
2.3. Enzimi katabolizma i reutilizacije purina: izvori i značaj u metabolizmu purina u cirkulaciji.....	23
2.3.1. Poreklo i značaj metabolizma AMP, 5-nukleotidaze i adenozin dezaminaze .....	23
2.3.2. Strukturne osobine i uloga ksantin oksidaze i ksantin dehidrogenaze .....	26
2.3.3. Značaj mokraćne kiseline u razvoju hipertenzije.....	29
<b>3. OKSIDATIVNI STRES .....</b>	<b>31</b>
3.1. Slobodni radikali; ROS i RNS .....	32
3.2. Izvori i razlozi oksidativnog stresa u hipertenziji.....	36
<b>4. TERMINALNA BUBREŽNA INSUFICIJENCIJA I NJENA POVEZANOST SA ESENCIJALNOM HIPERTENZIJOM .....</b>	<b>40</b>
4.1. Hipertenzinogeni faktori koji doprinose nefrosklerozi .....	40
4.1.1 Klinička slika ishemijske nefropatije .....	42

4.2. Oksidativni stres kao faktor razvoja terminalne bubrežne insuficijencije i njenih konsekvenci.....	44
4.3. Uloga mokraćne kiseline kao faktora razvoja terminalne bubrežne insuficijencije u hipertenziji.....	46
<b>5. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>47</b>
<b>6. ISPITANICI I METODE.....</b>	<b>48</b>
6.1. Pacijenti i kontrolni zdravi davaoci krvi.....	48
6.2. Biohemijske analize.....	48
6.3. Statistička analiza.....	49
<b>7. REZULTATI.....</b>	<b>50</b>
7.1. Opšte karakteristike ispitivanih grupa bolesnika.....	50
7.2. Koncentracija adenilnih nukleotida i vrednosti adenilatnog energetskog naboja u ispitivanim grupama.....	51
7.3. Vrednosti azotnih produkata i mokraćne kiseline u ispitivanim grupama.....	55
7.4. Vrednosti derivata oksidativne modifikacije proteina AOPP i MDA u ispitivanim grupama bolesnika.....	55
7.5 Povezanost adenilnih nukleotida i njihovih indeksa sa biohemijskim parametrima.....	58
7.6 Značaj adenilatnog energetskog naboja i metabolizna mokraćne kiseline za pojavu hipertenzije.....	65
<b>8. DISKUSIJA.....</b>	<b>70</b>
8.1. Poremećaji adenilnih nukleotida i adenilatnog energetskog naboja u ispitivanim grupama.....	70
8.2. Aktivnost enzima metabolizma adenzina, 5-nukleotidaze i adenzin dezaminaze u ispitivanim grupama.....	74
8.3. Analiza koncentracije mokraćne kiseline u ispitivanim grupama i moguća patogenetska veza.....	76

<b>8.4. Markeri oksidativnog stresa, lipidni peroksidi i uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP) i odnos ksantin oksidaza/dehidrogenaza u plazmi pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom i terminalnom bubrežnom insuficijencijom i moguća patogenetska povezanost .....</b>	<b>81</b>
<b>8.5. Analiza aktivnosti ksantin oksidaze i ksantin dehidrogenaze u ispitivanim grupama .....</b>	<b>85</b>
<b>8.6. Lipidna peroksidacija u ispitivanim grupama .....</b>	<b>89</b>
<b>8.7. Analiza produkata uznapredovale oksidativne modifikacije proteina (AOPP) u ispitivanim grupama .....</b>	<b>94</b>
<b>8.8. Analiza korelacija .....</b>	<b>98</b>
<b>9. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>100</b>
<b>10. PREGLED LITERATURE .....</b>	<b>102</b>

## 1. UVOD

### 1.1. Esencijalna hipertenzija – patogeneza i precipitirajući mehanizmi

Arterijska hipertenzija je bolest koju karakterišu povišene vrednosti sistolnog (SP) i dijastolnog (DP) krvnog pritiska ( $KP \geq 140/90$  mm Hg), samo povišene vrednosti sistolnog krvnog pritiska (izolovana sistolna hipertenzija) ili uzimanje antihipertenzivne terapije (1-3).

**Tabela 1. Definicija i klasifikacija hipertenzije u odnosu na nivo krvnog pritiska**

#### Definicija i klasifikacija hipertenzije

Kategorija	Sistolni /dijastolni mm Hg
Optimalni	< 120 i < 80
Normalni	120 - 129 i / ili 80 - 84
Visoko normalni	130 - 139 i / ili 85 - 89
Hipertenzija 1.stepena	140 - 159 i / ili 90 - 99
Hipertenzija 2. stepena	160 - 179 i / ili 100 - 109
Hipertenzija 3. stepena	> 180 i / ili > 110
Izolovana sistolna hipertenzija	> 140 i / ili < 90
Podgrupa: granična hipertenzija	140-149/ > 90

Smatra se da je arterijska hipertenzija bolest sa najvećom prevalencijom u svetu, ne samo u kardiovaskularnoj patologiji, nego i uopšte. Pretpostavlja se da oko 20-25% opšte populacije ima hipertenziju, iako učestalost varira na osnovu geografskih, nacionalnih, rasnih, polnih ili starosnih kriterijuma. Bez obzira na ove razlike bolest



ima epidemijske razmere. Hipertenzija je jedan od glavnih faktora rizika za nastanak ishemijske bolesti srca (IBS), cerebrovaskularne bolesti, bolesti perifernih arterija i nepoželjnih kardiovaskularnih (KV) događaja. Oko 95% bolesnika koji se javljaju lekaru ima primarnu ili idiopatsku hipertenziju. Njena etiopatogeneza je multifaktorijalna i još uvek nerazjašnjena. Manji broj bolesnika ima tzv. sekundarnu hipertenziju čije je uzroke moguće otkriti i lečiti. Esencijalna hipertenzija je hipertenzija nepoznatog uzroka i smatra se da čini preko 90% svih hipertenzija (1-3).

Patogeneza esencijalne hipertenzije nije u potpunosti razjašnjena. Smatra se da u patogenezi učestvuju različiti faktori, uključujući; pojačanu aktivnost simpatikusasa izraženom beta-adrenergičkom osetljivošću; pojačanu aktivnost sistema renin-angiotenzin-aldosteron i porast cirkulišućih mineralokortikoida; nasleđe iretenciju soli i vode. Ovo može biti povezano sa redukovanom masom nefrona uzrokovanom genetskim faktorima, poremećajem intrauterinog razvoja (hipoksija, lekovi, nepravilna ishrana) ili postnatalnim okolnostima (malnutricija, infekcije) (3-5).

Primarna hipertenzija je najčešće asimptomatska zato pacijenti nisu svesni njenog pogubnog dugoročnog delovanja. Najčešći simptomi: glavobolja, zujanje u ušima, vrtoglavica i nesvestica se neretko javljaju i kod normotenzivnih osoba (1).

## 1.2. Uzroci esencijalne hipertenzije

Gledano fiziološki, krvni pritisak kao fizička veličina, može se definisati jednačinom:

$$TA (RR) = \min.Vol. \times UPVO (TPR).$$

TA krvni pritisak

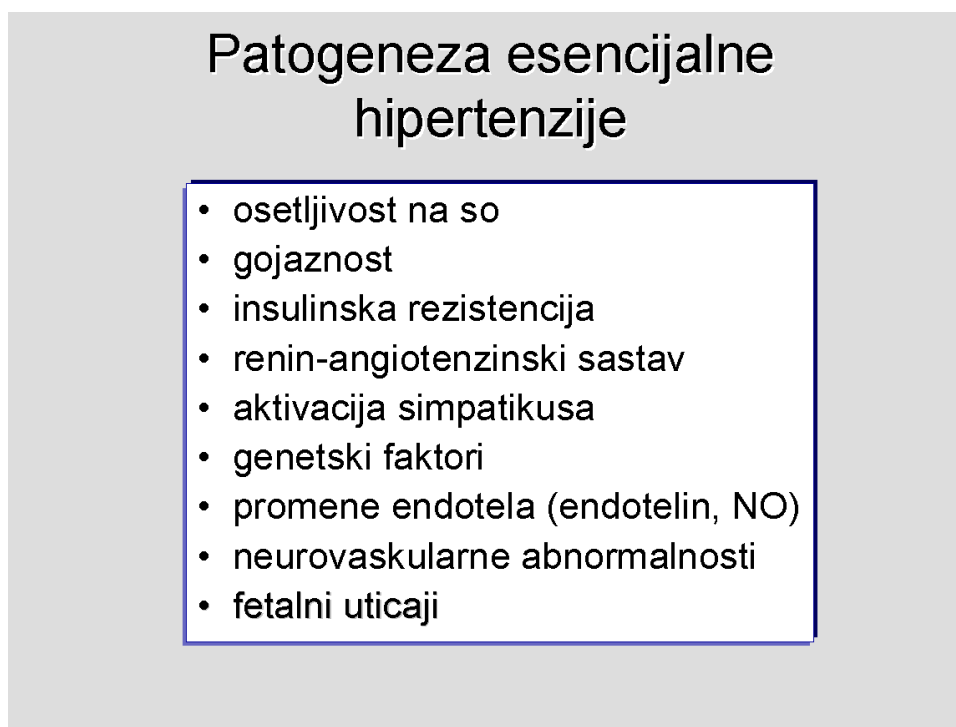
min. Vol = minutni volumen

UPVO = ukupni periferni otpor

Pomenuta jednačina pokazuje da je krvni pritisak u direktnoj zavisnosti od činioca koji utiču na min Vol (ukupna količina cirkulišuće tečnosti i kontraktilnost miokarda leve komore) i UPVR (strukturalne promene perifernih krvnih sudova i spazam arteriola). Promene nekog od ovih činioca mogu uticati na visinu krvnog pritiska. (1) Prema nastanku sve arterijske hipertenzije (AH) se dele u dve grupe: na esencijalnu (primarnu) arterijsku hipertenziju kojoj pripada 95% svih hipertenzija i sekundarnu arterijsku hipertenziju kojoj pripada 5% svih hipertenzija. Iako se uglavnom smatra da su uzroci

esencijalne AH nepoznati, to je samo delimično tačno jer postoji malo informacija o genima i genetskim varijacijama koje utiču na fenotipove koji regulišu KP, odnosno uzrokuju visok KP (3)

**Tabela 2. Patogenetski faktori esencijalne hipertenzije (adaptirano po Carreteru i Oparilu, 2000)**



### **-Genetski faktori**

Značaj genetskih faktora pokazan je na osnovu učestalosti oboljevanja jednojajčanih blizanaca i veće učestalosti esencijalne hipertenzije u pojedinim familijama. Genetska istraživanja afektiranih polimorfizama stavila su nekih desetak gena u prvi plan kao odgovornih, premda ne mogu da se primene jednostavna Mendellova pravila nasleđivanja. I genetski faktori podložni su modulaciji pod uticajem faktora sredine i nekih drugih demografskih faktora, kao i ishrane, što dovodi u vezu hipertenziju sa epigenetikom, posebno nutrigenomikom (5). Varijacije u krvnom pritisku koje su genski uzrokovane se nazivaju "nasledni KP"; ali jos uvek nije poznato koji su to geni koji dovode do varijacija krvnog pritiska. Faktori sredine koji dovode do porasta KP kao što su gojaznost, povećan unos alkohola i soli, stres, godine starosti, smanjen unos K i sl. se nazivaju "hipertenzinogeni faktori". Interakcija između naslednih i faktora

sredine ima uticaj na srednje fenotipove, kao što su renin-angiotenzin-aldosteron sistem, simpatička nervna aktivnost, renin-kalikrein-kinin sistem, endotelijalni faktori i mogu uticati preko drugih posrednih fenotipova na izlucivanje natrijuma, vaskularnu reaktivnost i srcanu kontraktilnost. Ovi i mnogi drugi posredni fenotipovi, određuju totalni vaskularni periferni otpor i minutni volumen i na taj način utiču na visinu KP. Neki faktori okoline deluju i preko srednjih fenotipova i time alteriraju i različite činioce neurohumoralnog sistema i mogu kod genski opterećenih osoba dovesti do povećanja KP, te stoga kod esencijalne hipertenzije i govorimo o višefaktorijsnosti u nastanku povišenog krvnog pritiska. Uticaj gena na KP je nagovešten mnogim porodičnim studijama koje su pokazale povezanost u kretanju KP kod braće i sestara ili pak roditelja i njihove dece.

Neki od "hipertenzinogenih faktora" imaju nasledne bihevioralne komponente i komponente okoline. Prema tome nasledni KP se može smatrati kao jezgro krvnog pritiska, a da "hipertenzinogeni faktori" povećavaju krvni pritisak iznad opsega nasleđenog krvnog pritiska. Ova činjenica bi mogla stvoriti četiri mogućnosti u reagovanju krvnog pritiska: 1. Pacijenti koji imaju nasledni KP u optimalnim granicama ( $< 120/80$  mmHg); ako im se pridruži jedan ili više "hipertenzinogenih faktora", krvni pritisak bi se verovatno povećao ili bi ostao u normalnim granicama ( $< 135/85$  mmHg). 2. Pacijenti koji imaju nasledni KP u kategoriji normalnog krvnog pritiska ( $130 / 85$  mmHg); ako im se pridruži jedan ili više "hipertenzinogenih faktora" će verovatno povećati krvni pritisak u granicama visokog normalnog KP ( $130-139/85-89$  mmHg) ili stepen 1 hipertenzije ( $140-159/90-99$  mmHg). 3. Pacijenti koji imaju nasledni KP u kategoriji visokog normalnog krvnog pritiska ( $130- 139/85-89$  mmHg), ako im se pridruži jedan ili više "hipertenzinogenih faktora", KP će se povećati u okviru hipertenzije ( $140 / 90$ mmHg) i 4. Pacijenti koji imaju nasledni KP u hipertenzivnim granicama, ako im se pridruži jedan ili više "hipertenzinogenih faktora" će razviti znatno teži stepen hipertenzije (od stepena 1 do stepena 3 hipertenzije)(4). Kada je ispitivana povezanost gena koji se okrivljuju za hipertenziju sa drugim faktorima rizika za razvoj ateroskleroze, ustanovljeno je da su u vezi sa genima za hiperlipidemiju, tako da oko 40% pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom ima i hiperholesterolemiju. Kako se hipertenzija dovodi u vezu sa regulacijom reapsorpcija Na, odnosno renin-angiotenzin-aldosteron sistemom, polimorfizam gena za angiotenzinogen označen kao

M235T je dokumentovan, koji dovodi do povećane ekspresije angiotenzinogen gena, a time i povećane sinteze angiotenzinogena i većih vrednosti u cirkulaciji. Sledeći polimorfizam zabeležen je za  $\beta$  i  $\gamma$  subjedinicu jonskih kanala za Na na nivou tubula, koji su visoko aktivni. Ovaj polimorfizam je veoma često zastupljen, čak u oko 25% pacijenata koji imaju hipertenziju rezistentnu na terapiju. Pored toga, esencijalna hipertenzija često je udružena sa gojaznošću i insulinskom rezistencijom, čineći jedinstven entitet, metabolički sindrom (6,7).

- **Renin-angiotenzin aldosteron sistem** može igrati važnu ulogu u patogenezi hipertenzije. Njega luče ćelije junksstglomerularnog aparata bubrega (8). U cirkulaciju renin ulazi inaktivan i tek posle aktivacije reaguje sa inaktivnim dekaeptidom iz jetre – angiotenzinogenom, pretvarajući ga u angiotenzin I. U daljoj reakciji angiotenzin I se pod uticajem angiotenzin konvertirajućeg enzima pretvara u angiotenzin II, koji se dalje enzimskom reakcijom pretvara u angiotenzin III. Iako se niske vrednosti renina očekuju kod većine pacijenata sa AH, utvrđeno je da ipak većina pacijenata nemaju snižene vrednosti, već normalne. Kada se nivo renina korektno utvrdi kod pacijenata sa AH, oko 20% ima visoke vrednosti renina, oko 30% ima niske vrednosti, a ostala polovina je distribuirana između ovih vrednosti (9). Izgleda da je u esencijalnoj hipertenziji ovaj renin abnormalno aktivan i da barem tri mehanizma mogu učestvovati u tome: a) heterogenost nefrona, b) nemodulacija c) povećana simpatička aktivnost (10). Angiotenzin deluje preko specifičnih AT<sub>1</sub> receptora direktno, a indirektno delovanjem na različite faktore rasta i citokine. Aktivacija specifičnih kinaza aktivira proces proliferacije glatkomišićnih ćelija, ali i vazokonstrikcije. Nasuprot njima deluju AT<sub>2</sub> receptori, tj. antagonistički, jer aktiviraju specifične ćelijske fosfataze, koje su opoziti kinazama. Povećana aktivnost renin-angiotenzin sistema može uticati na povećanje aktivnosti simpatičkog nervnog sistema (SNS) i tako uticati na sve njegove efekte. S druge strane preterana aktivnost SNS može uz povećani unos natrijuma da utiče na pojačanu aktivnost renin-angiotenzin sistema, inzulinsku rezistenciju i još mnoge druge mehanizme u organizmu, što u krajnjem, može uticati na porast krvnog pritiska (7).

#### -**Srčani baroreceptori –neurogeni faktor**

Presoreceptori u sprezi sa vazomotornim centrom u produženoj moždini i jedrima vagusa učestvuju u održavanju i regulaciji normalnog krvnog pritiska. Pri porastu

krvnog pritiska i centralnog venskog pritiska, vagalnom stimulacijom, a simpatičkom inhibicijom, preko smanjenja SF i UPVO, snižavaju krvni pritisak i obrnuto pri padu krvnog pritiska preko vagalne inhibicije, a simpatičke stimulacije normalizuju KP . Pri održavanju normalnog krvnog pritiska ovi receptorski refleksi se brzo oporavljaju, ali pri povećanom krvnom pritisku, tj. smanjenju osetljivosti na normalne draži upliviše da oni funkcionišu na višem nivou, povećavaju i simpatičku aktivnost, a time i održavanje KP na višim vrednostima (13). Ipak, neke novije studije sugerišu da disfunkcija baroreceptora kod hipertenzivnih pacijenata više utiče na težinu hipertenzije, a da je od manjeg značaja za njenu etiologiju (14)

#### **- Kalikrein-kinin-bradikinin**

U nastanku esencijalne arterijske hipertenzije ovaj sistem može igrati značajnu ulogu u onim slučajevima gde postoji poremećaj u nastanku ili povećanoj inhibiciji vazoaktivnog supstrata bradikininina , što može omogućiti prevagu vazokonstriktornih amina koji utiču na nastanak povećanog krvnog pritiska. Bradikinin kao krajnji produkt ovog sistema ispoljava svoje efekte preko pojačanog izlučivanja . U organizmu ga inhibiše angiotenzin konvertirajući enzim (1).

#### **- Mentalni stres i povećana aktivnost simpatičkog nervnog sistema**

Psihogeni faktori i mentalni stres, preko stimulacije hipotalamusa i vazomotornog centra, izazivaju aktivaciju simpatičkog nervnog sistema i dalje njegove efekte na povećanje krvnog pritiska . Ljudi izloženi ponavljanim psihogenim stresovima mogu mnogo češće da obole od arterijske hipertenzije nego oni koji nisu pod takvim stresom. Mnogo je epidemioloških studija koje potkrepljuju ovakvu tvrdnju (15).Efekti mentalnog stresa verovatno zavise od interakcije barem tri faktora: prirode stresa, njegova percepcija od izložene osobe i individualne fiziološke osetljivosti. Tako je opšte poznato da u razvoju esencijalne arterijske hipertenzije postoje dve faze: rana faza u kojoj je povišenje KP posledica pojačane aktivnosti SNS i RAS i druga, hronična faza, konstantno povišen KP, izazvana oštećenom funkcijom bubrega da izlučuje natrijum, čime se remeti proces autoregulacije u bubrezima tj. promena u renalnom perfuzionom pritisku dovodeći do retencije natrijuma i povećanja cirkulirajuće tečnosti(16)

**- Sistem prostaglandina**

Prostaglandini su supstrati u organizmu koji regulišu tonus krvnih sudova i kod zdravih osoba postoji stalni balans vazodilatatornih (PGE<sub>2</sub>) i vazokonstriktornih (PGF<sub>2</sub> alfa) prostaglandina, što je veoma značajno za održavanje normalne periferne cirkulacije. Prostaglandin PGE<sub>2</sub> ispoljava vazodilatatorne efekte na krvnim sudovima sprečavanjem dejstva angiotenzina II, stimulisanjem dejstva bradikininina i inhibicijom oslobađanja noradrenalina na nervnim završecima u zidu krvnog suda. Prostaglandin PGF<sub>2</sub> alfa svoj vazokonstriktorni efekat ispoljava stimulišući i dejstvo angiotenzina II. Kod pacijenata sa AH dolazi do poremećaja uravnoteženosti balansa dejstva ovih supstrata i prevage onih sa vazokonstriktornim efektom što vodi povećanju ukupnog perifernog otpora i razvoja arterijske hipertenzije (1).

**-Vaskularna reaktivnost**

Pacijenti sa esencijalnom hipertenzijom imaju izraženiju vaskularnu reaktivnost, koja se manifestuje kao povećana sklonost ka konstrikciji, naročito izraženu nakon stimulacije noradrenalinom, stresom hladnoće ili mentalnog stresa (5,9,11).

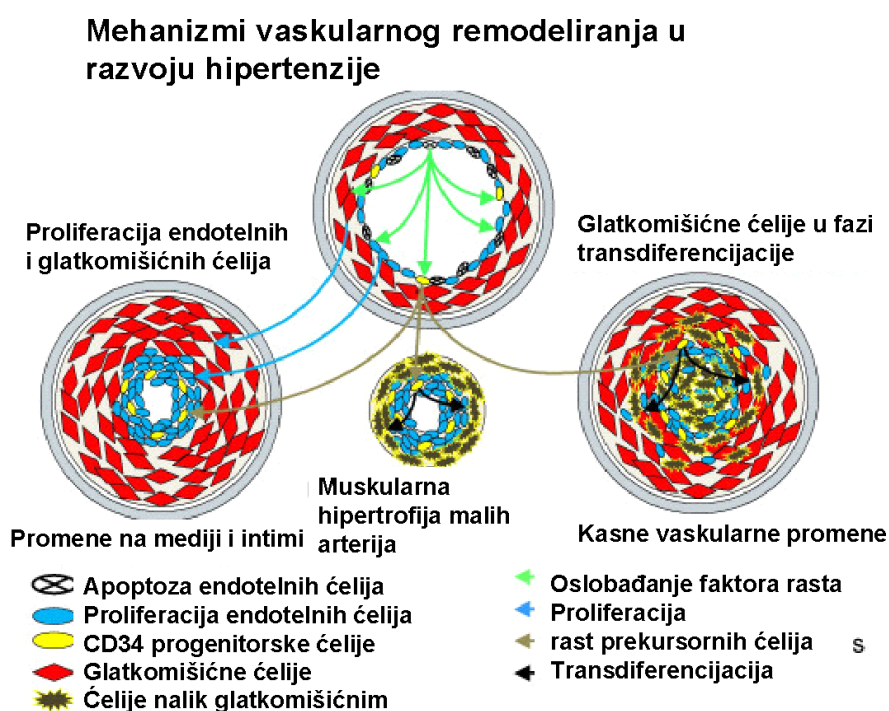
**-Vaskularno remodeliranje**

Struktura, mehaničke osobine i funkcija malih arterija je poremećena u esencijalnoj hipertenziji. To definiše esencijalnu hipertenziju kao specifično oboljenje organa, a kada se kaže organ, misli se na male arterijske krvne sudove, tačnije one koji imaju samo jedan sloj glatkomišićnih ćelija i dijametra su <300µm. Smanjena elastičnost krvnih sudova takođe je opisana i nastaje kao posledica depozita kolagena i hipertrofije mišićnih ćelija, fragmentacije i rastavljanja elastičnih vlakana. Sve to zajedno sa endotelnom disfunkcijom rezultuje pojavom vaskularne rigidnosti (11).

**-Endotelna disfunkcija**

Kada se spominje endotelna disfunkcija u razvoju esencijalne hipertenzije i njenih mogućih komplikacija, značajna su dva faktora: intaktnost endotelne barijere i sekrecija vazoaktivnih materija. Intaktnost endotelne barijere onemogućava kontakt sa intesticijumom, čime postoji zaštita od inicijacije koagulacije, taloženja penastih ćelija i efekata nekih medijatora na glatkomišićne ćelije. Sa aspekta delovanja vazoaktivnih

materija, vodeće mesto pripada azot oksidu NO. Njegovi efekti se ne odnose samo na vazodilataciju, već i na inhibiciju agregacije i adhezije trombocita i inhibiciju proliferacije glatkomišićnih ćelija. Induceri njegovog pulsativnog oslobađanja iz endotela su promena krvnog pritiska, mehanički “shear” stres i pulsne kontrakcije vaskulature. Pokazano je da u uslovima hipertenzije postoji smanjena bioraspodivnost NO u cirkulaciji, što je posledica njegove konverzije u nepoželjni peroksinitrit u uslovima pojačanog generisanja i delovanja slobodnih radikala, a smanjene eliminacije. To je pokazano infuzijama SOD, enzima koji uklanja superoksid anjon radikal ( $O_2^-$ ), kada je dolazilo do pada tenzije. Drugi značajan faktor regulacije funkcije endotela je normalno održavanje koncentracije angiotenzinogena, koji je u povećanim koncentracija hipertenzinogen, a izaziva i promene na endotelu (12-14).



Šema 1. Vaskularno remodeliranje u hipertenziji (adaptirano po Shiffrinu)

### - Povećan unos natrijuma

Prekomerni unos natrijuma dovodi do hipertenzije povećanjem minutnog volumena preko povećanja volumena cirkulišuće tečnosti i “preloda”. Povećana količina natrijuma može da povisi krvni pritisak i povećanjem vaskularne rezistencije i promenama u funkciji bubrega (20). Postoje mnogobrojne epidemiološke i

eksperimentalne studije koje pokazuju povezanost hipertenzije sa povećanim unosom natrijuma u hrani (7). U esencijalnoj hipertenziji fiziološke i patološke promene bubrega prethode promenama utvrđenim u drugim organima, ali da li one prethode ili prate nastanak hipertenzije nije utvrđeno. Volumen circulišuće tečnosti u organizmu varira direktno u zavisnosti od celokupnog Na u telu, jer je Na predominantno ekstracelularni sadržaj koji zadržava vodu u ekstracelularnom prostoru. Jedna od primarnih funkcija bubrega je da reguliše ekskreciju Na i vode i igra dominantnu ulogu u dugotrajnoj kontroli krvnog pritiska. Da bi se ostvario taj cilj dva važna bubrežna mehanizma su značajna. Prvi mehanizam reguliše volumen ekstracelularne tečnosti porastom ili smanjenjem urinarne ekskrecije Na i vode, što dovodi do promena u perfuzionom pritisku bubrega. Taj fenomen je označen kao pritisak natriureze i pritisak diureze (10). Drugi mehanizam uključuje angiotenzin-aldosteron hormon koji direktno kontroliše perifernu vaskularnu rezistenciju i bubrežnu reapsorpciju Na i vode (8).

Promene homeostaze vode i elektrolita predstavljaju važnu komponentu homeostaze telesnih tečnosti, ali i regulacije krvnog pritiska. Jedna od najznačajnijih funkcija elektrolita, posebno jona Na, predstavlja kontrola kretanja tečnosti kroz ćelijske membrane (kapilarna i ćelijska) u okviru kompartmenata telesnih tečnosti. Ćelijska membrana je u funkciji barijere sa ciljem fizičkog razdvajanja kompartmenata intracelularne i intersticijalne tečnosti. Elektroliti se kreću kroz ćelijsku membranu kroz svoje specifične kanale i radom jonskih pumpi, visoko specifičnih za pojedine jone. Svrha jonskih pumpi na nivou ćelijske membrane je da omogući kretanje jona protivno gradijentu koncentracije iz područja sa nižom u područje sa višom koncentracijom. Rad ovih pumpi zahteva upotrebu i stvaranje energije, u formi makroenergetskog jedinjenja ATP. Specifični kanali za jone Na dozvoljavaju prolaz ovih jona gradijentom koncentracije i u većini ćelija ovaj transport se ne odvija brzo u miru zbog veličine jona Na koji su kupirani sa molekulima vode. Radom jonske pumpe i prisustvom specifičnih jonskih kanala, uspostavlja se specifična razlika u koncentraciji jona intracelularnog i intersticijalnog prostora. Razlika u koncentraciji omogućava stvaranje i održavanje membranskog potencijala. Natrijum se filtrira u glomerulima bubrega. Sa povećanjem stepena filtracije, više natrijuma se filtrira u tubule bubrega iz plazme, a oko 85-90% Na se reapsorbuje u plazmu na nivou proksimalnog segmenta tubula bubrega. U odsustvu aldosterona, preostali natrijum će se izlučiti urinom što dovodi do smanjenja



reapsorpcije i povećanja koncentracije natrijuma u plazmi. Obratno, u slučaju povećanja nivoa aldosterona, više natrijuma se vraća u plazmu i dovodi do pojave hipernatrijemije i povećanja volumena cirkulišuće tečnosti, pa i krvnog pritiska (8).

Ekspanzija ekstracelularne tečnosti kod povećanog opterećenja natrijumom dovodi do inhibicije Na / K - ATP-azne pumpe dejstvom hormona oubain-a. Hormon oubain, endogeni digitalis, se oslobađa iz adrenalnih žlezdi srednjeg mozga kao odgovor nahipoksiju ili ekspanziju ekstracelularne tečnosti, prouzrokovanom retencijom Na i vode u bubrezima. Zavisno od njegove koncentracije, ovaj hormon se ponaša kao modulator natrijumove pumpe. U bubrežnim tubulima inhibicijom Na / K - ATP-azne pumpe oubain podstiče natriurezu. U srčanim i vaskularnim miocitima ova inhibicija dovodi do poremećene razmene jona na nivou ćelijske membrane; dolazi do povećanja koncentracije jona Na u glatkim mišićnim ćelijama, a smanjenje koncentracije K ,a kasnije dolazi do stvaranja mogućnosti ulaska većih količina Ca (preko sporih kalcijumovih kanala) u mišićne ćelije, a poznato je da je on kontraktilni element. Povećana koncentracija Ca u glatkim mišićnim ćelijama zidova arteriola dovodi do vazokonstrikcije i povećanja UPVO-a, a time i povećanje KP (17).

- **Godine života.** Pokazano je da sa godinama života rastu srednje vrednosti krvnog pritiska. Kod većine ljudi KP se ponaša kao kvantitativna veličina zavisna od godina starosti (1).

- **Povećana telesna težina** predisponira nastanak arterijske hipertenzije. Utvrđeno je da smanjenje telesne težine snižava krvni pritisak kod gojaznih pacijenata (prosečno smanjenje telesne težine za 1 kg povezano je sa smanjenjem KP za 1 mmHg), a ima i korisne efekte na prateće faktore kao što su insulinska rezistencija, dijabetes, hiperlipidemija i hipertrofija miokarda leve komore .Gojazne osobe imaju povećani minutni i udarni volumen i periferni otpor od osoba koje nisu gojazne (18).

#### - **Insulinska rezistencija i hiperinsulinemija**

Povećana insulinska rezistencija odnosno povećan nivo inzulina, je povezan sa povećanjem krvnog pritiska. Već opisana hipertenzija gojaznih osoba vezuje se jednim delom za hiperinzulinemiju. Međutim, neočekivano insulinska rezistencija se može naći

kod polovine ljudi sa hipertenzijom, a koji nisu gojazni, a što se može objasniti uključivanjem jednog ili više aspekata dejstva insulina. Hiperinzulinemija koja se razvija kao posledica rezistentnosti na inzulin može dovesti na tri načina do povećanja krvnog pritiska: povećanjem simpatičke aktivnosti, zadržavanjem Na i hipertrofijom mišićnog zida malih krvnih sudova (18).

#### **- Endotelin**

Endotelin spada u vazoaktivni peptid, koji sintetišu i sekretuju endotelne ćelije. Ponaša se kao lokalni hormon sa parakrinim delovanjem, što znači da deluje na okolno tkivo. To su glatkomišićne ćelije krvnih sudova, kod kojih izaziva kontrakciju i tako deluje hipertenzivno. Njegov potencijalni značaj u esencijalnoj hipertenziji je postuliran tako što su davani antagonisti receptora i efekat je bio zadovoljavajući na sniženje tenzije kod esencijalne hipertenzije. Ali činjenica da endotelin ispoljava niz povoljnih efekata na druga tkiva, usporila je razvoj ove nove klase lekova (10,12,14).

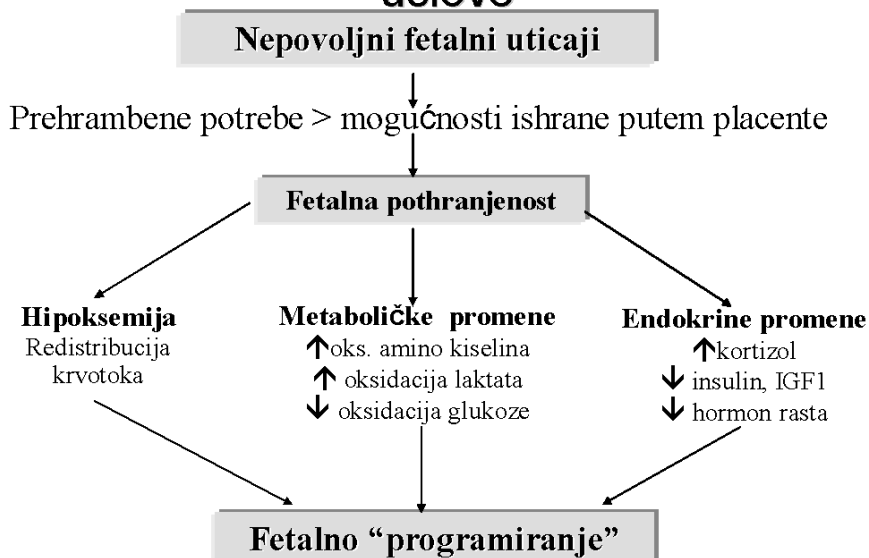
#### **-Alkohol**

Postoji linearna korelacija između konzumiranja alkohola, vrednosti TAI i prevalencije hipertenzije kod stanovništva. U većim količinama alkohol ispoljava vazopresorne efekte preko aktivnosti simpatičkog nervnog sistema, povećanja kortizola u plazmi i aktivacijom sistema rennin-angiotenzin-aldosteron (2) Takođe je utvrđeno da veće količine alkohola umanjuju efekte antihipertenzivne terapije, ali je taj efekat reverzibilan u 80% konzumenata, ako se prekine ili znatno smanji unos alkohola (2).

#### **-Fetalni faktori**

Sem napred navedenih mogućih uzročnika esencijalne arterijske hipertenzije navode se i drugi mogući činioci u nastanku ovog oboljenja kao pušenje, smanjen unos magnezijuma i kalcijuma u hrani, fizička neaktivnost, povećani unos kofeina, dijabet i dr. Posebno se poslednjih godina izučava fetalno reprogramiranje, koje nastaje kao posledica različitih metaboličkih efekata usled neadekvatne ishrane ploda od strane placente, uslovljene abnormalnostima placentarne ishrane (16).

## Adaptacija fetusa na nepovoljne intrauterine uslove

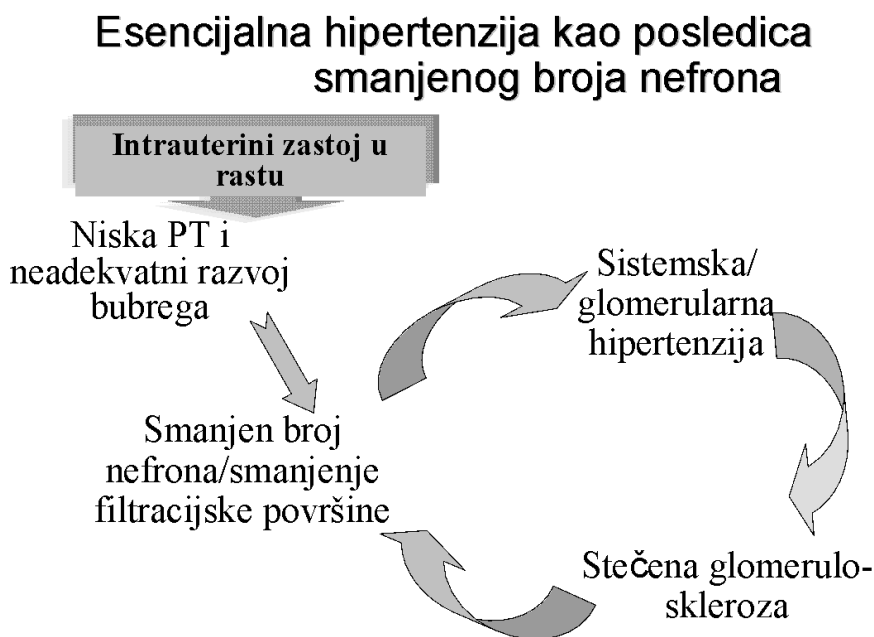


Barker DJP. Clinical Science 1998.

### Šema 2. Fetalni uticaji na razvoj esencijalne hipertenzije (adaptirano po Berkeru)

Među razlozima se navode sledeći:

- pothranjenost fetusa (deficit proteina u trudnoći)
- endokrine promene, praćene povećanjem koncentracije glikokortikoida i faktora rasta (IGF-I)
- neadekvatni vaskularni razvoj, neadekvatna sinteza elastina - smanjena elastičnost velikih arterija
- disfunkcija endotela (smanjen odgovor na acetilholin)
- smanjen broj nefrona (Brennerova hipoteza)
- ubrzani postnatalni rast



Šema 3. Fetalna glomerularna skleroza i razvoj esencijalne hipertenzije (adaptirano po Berkeru)

## 2. METABOLIZAM PURINSKIHNUKLEOTIDA I MEĐUSOBNA VEZA SA HIPERTENZIJOM

### 2.1. Metabolizam purinskih nukleotida

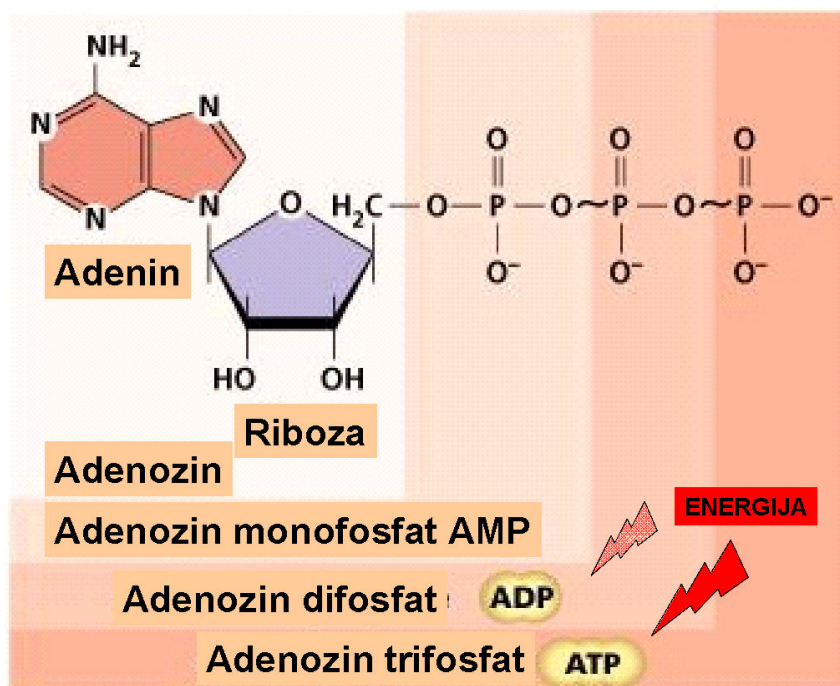
Esencijalna hipertenzija ja savremena bolest čovečanstva, koja usled specifičnih uslova života sve više pogađa mladju populaciju. I pored velikog napretka farmaceutskih preparata u lečenju esencijalne hipertenzije, često je loše regulisana. Treba tragati za svim faktorima koji mogu posredovati tome. Koncentracija i metabolizam adenilnih nukleotida (ATP, ADP, AMP, adenzina, hipoksantina, ksantina i mokraćne kiseline) zavisi od stepena oslobađanja i stepena katabolizma. Količina i vsrta nukleotida i nukleozida u cirkulaciji zavisi od stepena simpatičke stimulacije, hipoksije i oštećenja tkiva, a katabolizam je u direktnoj vezi sa enzimima koji ih proizvode.

Purinski nukleotidi predstavljaju jedinjenja koja su široko rasprostranjena u organskom svetu i u svim procesima u ćeliji imaju učešće (19,20,21)

1. ATP predstavlja izvor energije u ćeliji. ATP povezuje reakcije u kojima se energija stvara sa procesima u kojima se ona koristi, što podrazumeva aktivni transport, održavanje jonskog gradijenta, sintezu organskih jedinjenja i mišićnu kontrakciju.
2. Purini su prekursori RNK i DNK i predstavljaju supstrate u reakcijama koje katalizuju RNK i DNK polimeraza.
3. Purini predstavljaju i supstrate za biosintezu signalnih molekula sekundarnih glasnika, kao što su ciklični nukleotidi cAMP, cGMP i diadenozin polifosfati (ApnA).
4. Prekursori su biološki aktivnih formi vitamina u vidu koenzima NAD, NADP, Koenzima-A i FAD.
5. Derivati nukleotida su i indirektna jedinjenja u mnogim biosintetskim procesima, kao što je S-adenozil metionin.
6. Purini predstavljaju alosterijske efektore, tj intracelularna koncentracija ATP kontroliše neke metaboličke puteve, a GTP učestvuje u pokretanju makromolekula, kao što su peptidni lanci smešteni na ribozmima, ADP-riboza ima ulogu u posttranslacionoj modifikaciji određenih proteina.
7. O značaju purina u metabolizmu govori podatak da su njihovi analozi najmoćniji citostatici.

### **2.1.1. Tipovi purinskih nukleotida, sinteza, katabolizam i reutilizacija**

Purinski i pirimidinski nukleotidi služe za sintezu slobodnih radikala i nukleinskih kiselina i kao takvi su veoma značajni za život ćelija, tako da je organizam sposoban da ova jedinjenja sintetiše de novo i sinteza je najaktivnija je u jetri. Eritrociti, polimorfonuklearni leukociti i nervne ćelije su nesposobni da sintetišu purine de novo, s toga mozak zavisi od egzogenih faktora u sintezi purinskih nukleotida. Zbog ovoga postoji i sekundarni put sinteze purinskih nukleotida iz gotovih purinskih baza (22).



Šema 4. Adenin, njegovi derivati-nukleozidi i nukleotidi (adaptirano po Burnstoku)

Katabolizam purinskih nukleotida predstavlja kontinuiran proces koji počinje od nukleinskih kiselina, kada pod dejstvom enzima endonukleaze počinje katabolizam DNK i RNK do nukleotida. Nukleotidi koji se oslobode kao takvi ne mogu se koristiti za sintezu novih nukleinskih kiselina, tako da njihova razgradnja ide kroz dva metabolička puta. Od velike važnosti je metabolizam adenilnih nukleotida, koji imaju kao bazu adenin. Način metabolisanja u nizu organa i tkiva koji predstavlja dezaminaciju AMP, a koju katalizuje AMP dezaminaza do IMP, a defosforilacijom IMP nastaje inozin. Drugi put katabolizma AMP podrazumeva njegovu prethodnu defosforilaciju putem enzima 5'-nukleotidaze do adenzina, zatim se adenzin dezaminiše u inozin u reakciji koju katalizuje adenzin dezaminaza (23).

U endotelnim ćelijama krvnih sudova, s obirzom da poseduju ektonukleotidazu, odvija se drugi, alternativni put razgradnje nukleotida, tj. ATP-ADP-AMP –adenozin. Endotelne ćelije, glatkomišićne ćelije i krvne ćelije izlučuju purine i ekstracelularni ATP u cirkulaciju kanalima, vezikularnom egzocitozom ili propuštanjem liziranih ćelija. Tako oslobođen ATP utiče na tonus krvnih sudova, agregaciju trombocita i makrofaga.

Nakon signalne transdukcije, cirkulišući ATP se inaktivira dejstvom solubilnih purin-konvertujućih enzima ( nukleotid pirofosfataza, 5'-nukleotidaza, adenzin dezaminaza, čime se određuje koliki će biti nivopurina u krvi (24).

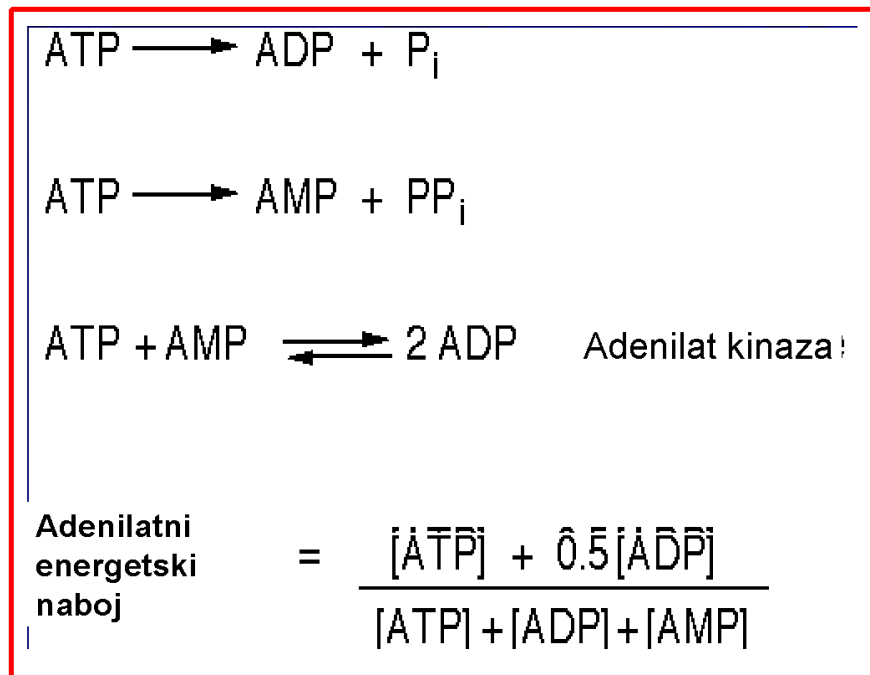
Kod hipoksije i ishemije, endotelne ćelije oslobađaju znatne količine ATP koje deluju na purinoreceptore čime se oslobađa azot monoksid (25).

Burnstock i saradnici (26) su pokazali da sinergističko dejstvo purina i faktora rasta dovodi do proliferacije glatkih mišićnih ćelija i endotelnih ćelija, te suženi krvni sudovi izazivaju hipertenziju, aterosklerozu, restenozu i ishemiju. U srcu se odvija primarni put degradacije ATP-ADP-AMP-adenozin-inozin-hipoksantin-ksantin. Fosforilisani purini ostaju u miocitima, dok nefosforilisani purini difunduju u ekstracelularni prostor. Za razliku od adenin nukleotida koji ne mogu da prođu kroz sarkolemu, adenzin i inozin prolaze u intersticijalni prostor gde se degradiraju do hipoksantina, ksantina i mokraćne kiseline, koji se protokom krvi ispiraju u krvne sudove (27).

## 2.2. Adenilatni energetska naboj u ćelijama

Fundamentalni princip života ćelije, tkiva i organizma u celini je održavanje stabilne koncentracije intracelularnog kiseonika, koji je omogućen optimalnom oksigenacijom i optimalnim održavanjem energije, a energetska valuta ćelije je ATP.

U ćeliji adenilni nukleotidi, ATP (adenozin trifosfat), ADP (adenozin difosfat) i AMP (adenozin monofosfata) predstavljaju dinamičku biohemijsko-matematičku jednačinu, koja predstavlja i odslikava metaboličke oscilacije ćelije. Dan Atkinson je prvi ukazao na koncentraciju adenilnih nukleotida u ćeliji i pokušao je da ukaže na zakonitosti koncentracija u ćelijama pojedinih adenilnih nukleotida. To je nazvano jednim imenom adenilatni energetska naboj i on predstavlja energetska status ćelije. U predloženoj jednačini, dominantno je ukazati na količinu nukleotida koji predstavljaju energetska bogatu vezu (28-32). Jednačina adenilatnog energetska naboja je prikazana na šemi.

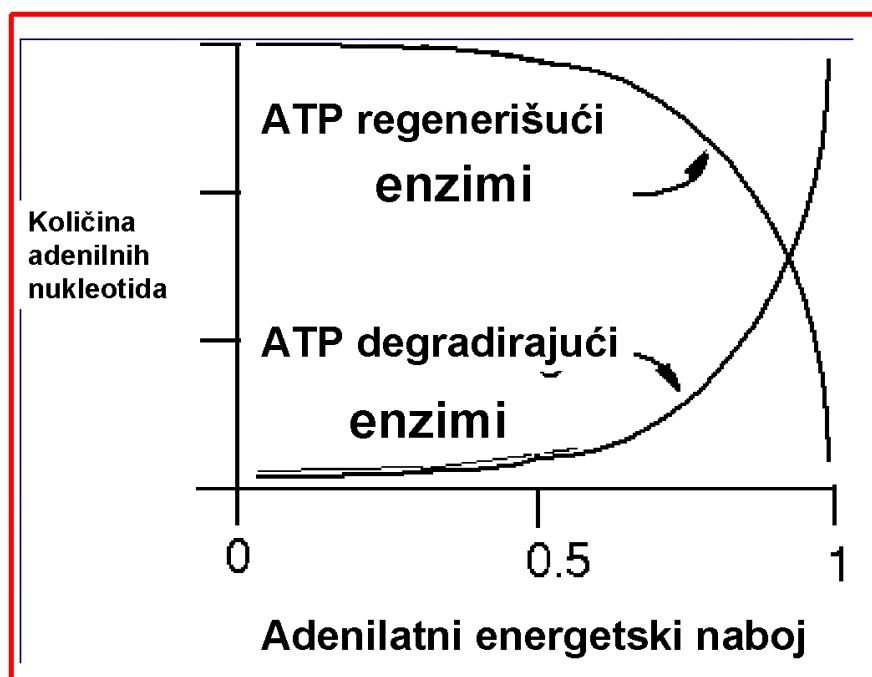


Šema 5. Adenilatni energetski naboj (Burnstok, 2006.)

Ukoliko se posmatra navedena jednačina, ustanovljeno je da teorijski, optimalni iznos ovog odnosa može iznositi 1. To znači da je u takvom stanju maksimalno potenciran transfer makroenergetske fosfatne veze, stvaranje energije je maksimalno, i ćelija je u nekom „idealnom“ stanju gledano sa aspekta količine energije kojom raspolaže. Ali takva situacija u ćeliji koja živi, stvara, razgrađuje i ima metaboličku aktivnost, gotovo je u granicama teorijskog. Sličan teorijski odnos bi bio kada bi ovaj odnos bio ravan nuli, kada praktično ne bi bilo raspoloživih makroenergetski bogatih fosfatnih veza. U fiziološkim uslovima adenilatni energetski naboj ima vrednost između 0,6-0,9, u miokardu, 0,85–0,95 u mozgu, skeletnim mišićima i eritrocitima, a 0,6–0,8 u jetri. Vrednost oko 0,6 je minimalna i odnosi se na nagomilavanje veće količine razgrađenih nukleotida i to posebno AMP. Svakako da je ovde značajno mesto enzima adenilat kinaze, koja katalizuje prevođenje ATP i AMP u dva molekula ADP. Na taj način se može vršiti reutilizacija AMP na način da se od njega stvara ADP. Vrlo je važno istaći da iako jednačina adenilatnog energetskog naboja predstavlja jednu fizičku veličinu koja pokazuje stanje energije i energetske zahteve ćelije, enzimi koji stvaraju i metabolišu ATP ne mogu da registruju ovakvu konstantu. Oni pre registruju promene



nivoa AMP i ADP, jer se mnogo jače detektuje. Na primer, ukoliko postoji pad ATP i za 10%, porast AMP može ići i do 8 puta. I ADP je veoma značajan efektor (31-36).



Šema 6. Adenilatni energetski naboj u odnosu na produkciju i razgradnju ATP (Burnstok, 2006.)

U uslovima kada je ćelija izložena nekom vidu stresa, koji može biti i samo hipoksija, dolazi do povećane potrošnje ATP. Normalne koncentracije ATP u ćeliji su milimolarne. Proces razgradnje ATP odvija se veoma brzo. To podrazumeva visoku aktivnost specifične nukleotidaze, to je ATP aza. Aktivnost ATPaze, kako je poznato veoma je značajna za održavanje mnogih metaboličkih procesa u ćeliji, pre svega procesa aktivnog transporta materija kroz ćelijsku membranu, jonske pumpe, mišićne kontrakcije, kao i ćelijskog kretanja. Sa aspekta metaboličkih zahteva, jasno je da je količina ATP i aktivnost ATP aze od esencijalnog značaja za funkciju miokarda, mišića i mozga, jer se radi o energetski zavisnim reakcijama najprisutnijim u ovim tkivima. Iako se proces razgradnje ATP meri čak delovima sekunde, mada u tim prvim momentima koncentracija ATP može da se odgovarajućim mehanizmima i održi stabilnom, što se dalje reperkutuje i na odnos ATP/ADP, kao i odnos ATP/AMP, koji se održavaju veoma suptilnom aktivacijom odgovarajućih enzima, a u prvom redu aktivacijom adenilat kinaze. U održavanju optimalnog adenilatnog energetskog naboja

dominantno mesto imaju enzimi koji vrše razgradnju i enzimi koji vrše resintezu ATP i ADP. Aktivnost kinaza je dakle od esencijalnog značaja za homeostazu tkiva. U ovom putu treba imati u vidu i stalno održavanje rezerve energije, u formi kreatin-fosfata, koji katalizuje CPK (kreatin-fosfo kinaza). Kao što je poznato ova reakcija je dvosmerna i tako je omogućeno održavanje energetske rezerve i njeno iskorišćavanje po potrebi (29-36) Ukoliko se posmatra s jedne strane ATPaza, a sa druge CPK, ova dva enzima dopunjuje jedan drugi, pa se često nazivaju „puferski sistem održanja nivoa ATP u ćeliji“ (37).

### **Kreatin fosfat +ADP (CPK) ATP+ Kreatin**

Pored toga u stanjima teških adenilatnih energetske krize, kada je veliki gubitak energije i smanjena produkcija, dolazi do potpune razgradnje AMP do odgovarajućih nukleozida (adenozin i inozin), da bi se konačno putem delovanja ksantin oksidaze stvorio krajnji produkt hipoksantin i mokraćna kiselina. Ukoliko je nastao hipoksantin, to je još uvek šansa da se putem hipoksantin-guanin fosforibozil transferaze uz prisustvo fosforibozil'pirofosfata (PRPP) nadomesti inozin monofosfat (IMP). Zbog toga se sve do stvaranja mokraćne kiseline može razmatrati ovaj proces kao reutilizacija, a ne katabolizam. Pokazano je da regulatorni enzimi imaju veću aktivnost u stanjima energetske krize, dok ukoliko adenilatni energetski naboj raste, aktivnost ovih enzima, u prvom redu adenilat kinaze, opada (32-37).

Imajući u vidu napred pomenute relacije, kada se posmatraju neka stanja i oboljenja, kao npr miokardna insuficijencija, koju prati hipoksija, adenilatni energetski naboj opada, a prati ga i pad F-kreatin/ATP, što su nedvosmisleni parametri „ćelijske energetske krize (37). Mehanizmi regulacije koncentracije adenilatnih nukleotida odnose se na uticaj na enzime koji ih stvaraju ili razlažu (31,32).

#### **2.2.1. Koncentracija ATP i adenilatni energetski naboj u plazmi**

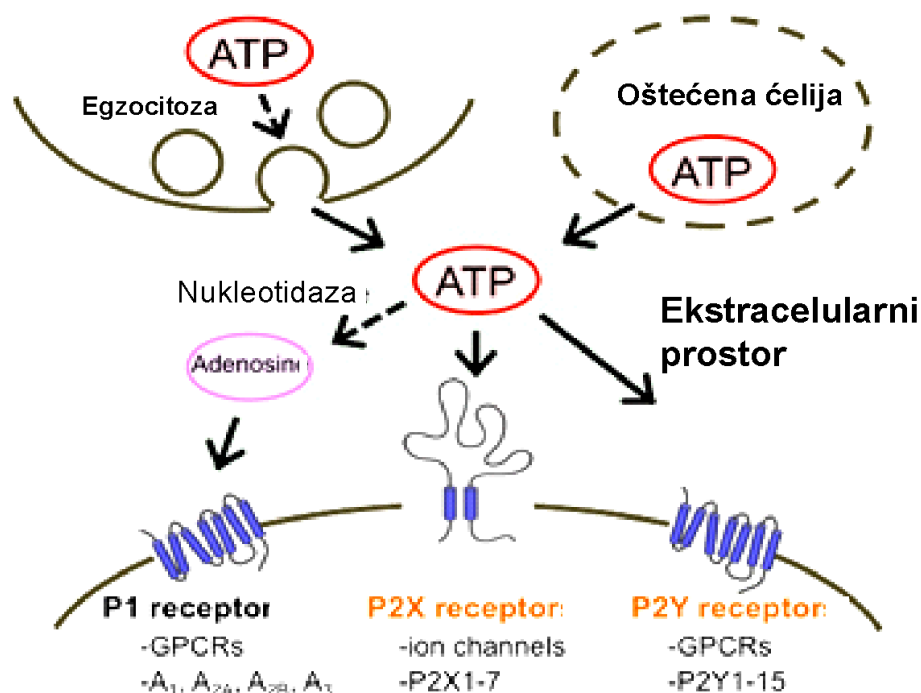
Koncentracija ATP u plazmi u velikom stepenu odražava metaboličko-energetski status tkiva. Koncentracija ATP u krvi iznosi oko 100  $\mu\text{mol/L}$ . To se naročito odnosi na energetski metabolizam, tačnije ćelijsku energetsku krizu. Pored

toga, neki literaturni podaci pokazuju da koncentracija adenilnih nukleotida u plazmi može reflektovati i potencijalni ishod oboljenja, kao što je septički šok, kardiogeni šok ili teške traume. zapaža se dramatični pad ATP kog prati i pad kreatin-fosfata, koji je u linearnoj korelaciji. Nasuprot tome raste nivo slobodnog, nefosforilisanog kreatina i kreatinina, kao i adenilnih nukleotida i nukleozida koji predstavljaju postepene prekursore razgradnje ATP. Ekstracelularni ATP ostvaruje vazodilatatorno delovanje (38-43).

Izvori adenilnih nukleotida u cirkulaciji su različiti. Koliki udeo ima svaka od pojedinih komponenti zavisi od fiziološkog, odnosno patološkog stanja. Jedan od izvora su uobličeni ćelijski elementi u cirkulaciji. Trombociti, kao ćelije koje učestvuju u koagulaciji krvi, oslobađaju ADP iz svojih granula. Zbog toga ADP ima protrombotične efekte (44,45).

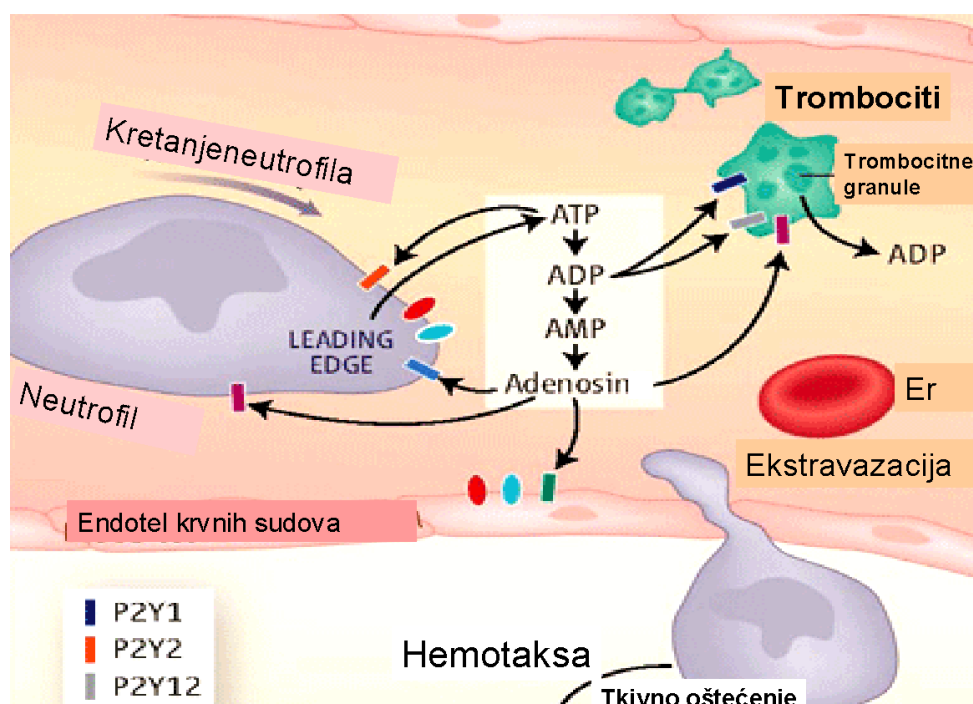
### **2.2.2. Adenilni nukleotidi u regulaciji krvnog pritiska**

Koncentracija adenilnih nukleotida u plazmi rezultat je odnosa oslobođenih i razgrađenih nukleotida (29-36,44,45). Svoje efekte u plazmi cirkulišući nukleotidi ostvaruju putem specifičnih purinergičkih receptora. Purinergički receptori su podeljeni u dve klase P1 i P2. Oni mogu prepoznati ATP, ADP, ali od pirimidinskih nukleotida i UTP i UDP. Izučavanjem P1 receptora ustanovljeno je da postoje 4 tipa, i to  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ , and  $A_3$ . Oni se razlikuju po farmakološkim efektima i to stoga što  $A_{2A}$  i  $A_{2B}$  receptori prevashodno interaguju sa  $G_s$  familijom G proteina, dok  $A_1$  i  $A_3$  receptor reaguju sa  $G_{i/o}$  proteinima. P2 receptori su podeljeni u dve podklase X i Y. P2X receptori predstavljaju ATP-zavisne neselektivne jonske kanale, dok su P2Y G-protein zavisni kanali. To su zapravo membranski receptori asocirani za G-protein. Svi nukleotidi, bilo tri, di ili monofosfatni, dakle ATP, ADP i AMP mogu delovati preko P2X receptora, koji su označeni kao jonski kanali za ligande, za koje je do sada poznato da postoji 8 podtipova ( $P_{2X1}$  to  $P_{2X7}$ ). Pored toga postoje i G-protein kuplovani receptori, (GPCR), za koje je poznato da do sada postoji 12 podtipova (46-50).



Šema 7. Purinerški receptori (adaptirano po Burnstoku, 2000)

U uslovima tkivnog oštećenja nukleotidi mogu izaći i iz endotela i iz oštećenih tkiva (51-56). Koliko će se zadržavati u cirkulaciji zavisi od aktivnosti ekto enzima, dakle membranskih enzima smeštenih u membranama cirkulišućih limfocita i neutrofila. Sve je to u tesnoj vezi sa količinom kiseonika koja je tkivima na raspolaganju. U održanju intravaskularne koncentracije adenilnih nukleotida značajno mesto imaju i eritrociti, koji oslobađaju ne samo azot oksid iz spoja sa hemoglobinom (nitrozo-Hb), nego i ATP. Dodatni izvor ATP može biti i endotel. Povećano oslobađanje iz endotela može se sresti naročito u uslovima mišićne kontrakcije i povećanog tonusa, tzv „shear“ stresa, ali i u uslovima hipotonije, delovanja antagonista kalcijuma, povećanje koncentracije trombina i lipopolisaharida. Oslobodeni ATP sada povratno pokreće vazodilatatorne efekte vezivanjem za P<sub>2Y1</sub>/P<sub>2Y2</sub> receptore, kao i sledstvenom stimulacijom oslobađanja azot oksida iz endotela i pokretanjem mehanizma oslobađanja vazodilatatora iz metabolizma arahidonske kiseline. Vrlo je bitno da se ustanovi i koliki je odnos u kvalitativnom i kvantitativnom smislu adenilnih nukleotida u arterijskom i venskom cirkulatornom sistemu i kakva je razlika u stanju mirovanja ili većeg fizičkog napora, odnosno mišićne kontrakcije (32-37, 45-56).



Šema 8. Adenilni nukleotidi u cirkulaciji: potencijalni izvori i uloga (adaptirano po Heptinstallu i sar. 2006.)

U isto vreme bitno je napomenuti da postoji značajna veza između purinergičke aktivnosti i protrombotičnih efekata, jer se ADP oslobađa iz aktivisanih trombocita (57,58). Oslobađanje ADP naročito je zapaženo u stanju akutnog infarkta miokarda, što pogoduje protrombotičnom stanju. Sa druge strane, u uslovima veće fizičke aktivnosti ATP se oslobađa iz eritrocita, zajedno sa kiseonikom i azot oksidom. Ustanju povećane fizičke aktivnosti, oslobađanje je intenzivno, a veći nivo ATP je i u venskoj krvi, ali se pod dejstvom slobodnih u cirkulaciji nukleotidaza razlaže odmah, tako da dolazi i do porasta ADP. Oslobađanje ATP u uslovima fizičkog treninga iz eritrocita je jako značajno, jer je pokazano da je ATP direktni antagonist ADP u protrombotičnim efektima. Ali i ADP ima uticaja na oslobađanje ATP iz eritrocita, antagonističkim delovanjem, i to preko  $G_i$ -protein povezanih  $P_{2Y13}$  receptora, odnosno inhibicije stvaranja cAMP (59,60). Uspostavljanje balansa, znači može biti u pozitivnom smislu u stanju fizičke aktivnosti, ali i negativno u stanju akutnog ćelijskog oštećenja ili aktivacijom trombocita. Ukoliko dođe do dalje razgradnje ADP posredstvom nukleotidaza, nastaje adenosin koji je takođe vrlo moćan vazodilatator. Oslobađanje

azot oksida može delovati preventivno na dalje oslobađanje tj trošenje ATP, a blokadom nukleotidaza, onemogućava stvaranje protrombotičnog ADP.

U plazmi se vrši ekstenzivni katabolizam purinskih nukleotida (32-34,42,43,48).

### 2.2.3. Adenilni nukleotidi i funkcija endotela

Sa sagledavanjem značaja endotela kao najveće endokrine žlezde, koji sekretuje ili oslobađa veliki broj hemijskih medijatora, povećan je interes za izučavanjem i koncentracije adenilnih nukleotida. U uslovima endotelnog oštećenja, izučavani su agonisti i antagonisti purinergičkih receptora u tretmanu kardiovaskularnih i pulmonalnih oštećenja. Zbog značaja koji ATP ima na funkciju endotela dodeljen mu je naziv "barijerno protektivni agens", koji je u stanju da smanji trenašendotelijalnu permeabilnost *in vitro*. Barijerno protektivni efekti koje ispoljava ATP nastaju kao posledica G-protein receptorskog mehanizma, jer male interferentne RNK koje direktno blokiraju sintezu  $G\alpha_q$  i  $G\alpha_{12}$  proteina, mogu značajno umanjiti ovaj efekat. Sa druge strane, inhibicija  $G\alpha_{12}$  proteina povećava protektivni efekat ATP na endotel (51-56).

## 2.3. Enzimi katabolizma i reutilizacije purina: izvori i značaj u metabolizmu purina u cirkulaciji

### 2.3.1. Poreklo i značaj metabolizma AMP, 5' - nukleotidaze i adenzin dezaminaze

- **Adenzin** je intermedijat na putu razgradnje intraćelijskog adenzin-trifosfata koji se u prisustvu 5'-NT stvara iz AMP reakcijom defosforilacije. On deluje kao lokalni hormone predstavlja informacionu vezu između ćelija i tkiva. Adenzin ima kratak poluživot zbog čega je njegovo fiziološko dejstvo lokalizovano. Glavni izvor adenzina u toku ishemičnog inzulta su kardiomiociti. Vaskularni endotel i glatke mišićne ćelije otpuštanjem i katabolizmom ATP pospešuju stvaranje AMP i adenzina, posebno u prisustvu reaktivnih kiseoničnih metabolita. Ekstraćelijski adenzin nastaje dejstvom ektonukleotidaza na površini srčanih fibroblasta, neutrofila, mast ćelija, aktivisanog endotela pri razvoju inflamatornog procesa. Takav adenzin dovodi do pojačanog

protoka krvi i reaktivne hiperemije, što govori o moćnom vazodilatatornom dejstvu ovog medija.

Adenozin se u ćelije transportuje olakšanom difuzijom uz postojanje specifičnog transportnog sistema, a iz ćelije izlazi dezaminacijom u inozin, reutilizacijom do formiranja AMP i oslobađanjem u ekstracelularnu tečnost (61). Postoje indirektni podaci da adenozin vrši svoju protektivnu ulogu i posredstvom azot-monoksida (NO) (62). Kardioprotektivna funkcija adenozina se ogleda u povećanju koronarnog protoka i zaštiti od ireverzibilnog ishemičnog oštećenja miokarda (63).

- **Enzim 5'-nukleotidaza** (5'-ribonukleotid fosfohidrolaza) se ubraja u fosfomonoesteraze, jer katalizuje hidrolitičko razlaganje 5'-monofosfata uz izdvajanje neorganskog fosfora.

5'-NT se može javiti u dva oblika: kao ekstracelularni, membranski enzim i kao intracelularni. Postoje podaci o postojanju trećeg i četvrtog oblika (64). Najveći deo 5'-NT lokalizovan je na spoljašnjoj strani plazma membrane ćelija. On spada u ektoenzime, jer mu je aktivni centar smešten na spoljašnjoj površini ćelije.

Po hemijskoj strukturi 5'-NT je glikoprotein, a u aktivnom centru se nalaze ostaci histidina, cisteina i serina, kao i joni cinka. Strukturu enzima 5'-NT čini glikoproteinski dimer ili tetramer sa subjedinicama molekulske mase 68-70 kD. Dimeri mogu biti heteromerni i homomerni. Enzim se aktivira dvovalentnim katjonima sledećim redosledom:  $Mn^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+} > Co^{2+}$  (117), astimulatorno deluje i redukovani NAD. U inhibitore 5'-NT spadaju:  $Cu^{2+}$  i  $Zn^{2+}$ , kao moćni inhibitori, a zatim  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ , EDTA. Optimalni pH sredine za aktivnost 5'-NT se kreće od 6,5 do 8,4, u zavisnosti od izvora enzima, sastava inkubacione sredine i vrste supstrata (121). 5'-NT se nalazi u tkivima i ćelijama jetre, pluća, CNS-a, testisa, bubregu, žučnim putevima (65).

Njegovu aktivnost pokazuju endotelne ćelije i glatke mišićne ćelije arterija, limfociti i granulociti.

Aktivnost enzima 5'-NT u tkivima zavisi od starosti i proliferacije ćelija.

Ekto-5'-NT ima i ulogu aktivacije i proliferacije limfocita i adhezije humanih limfocita za endotelne ćelije. Solubilna 5'-NT ima ulogu u rekonstituisanju permeabilnosti endotela kroz konverziju 5'-AMP do adenozina i kroz aktiviranje adenozinskih

receptora. U serumu zdravih osoba 5'-NT pokazuje malu aktivnost. Ne zavisi od vrste, pola i godina života. Povećanje aktivnosti se beleži kod bolesti koje su praćene retencijom žuči. 5'-ektonukleotidaza učestvuje u ubrzanom katabolizmu ATP u stanjima hipoksije, kao što su anemija, miokardna ishemija ili cerebralna ishemija, jer tkivna ishemija stimuliše aktivnost 5'-NT.

Veliki značaj se danas pridaje ekto 5'-NT (CD73) u funkciji kardiovaskularnog sistema. Histo-hemijske studije su pokazale da ekto enzim vrši hidrolizu AMP na površini kardiomiocita i skeletnih miocita. Učestvuje u vaskularnom tonusu, hemostazi i adheziji leukocita (66). Enzim reguliše ne samo funkcionisanje ćelija krvnog zida, već utiče i na pravac kretanja krvnih ćelija. Ekto 5'-NT ima važnu ulogu u regulaciji agregacije trombocita i inflamatornog odgovora potencirajući svoje efekte na endotelu koronarnih krvnih sudova (67). Primarni put razgradnje 5'-NT u miokardu se odvija aktivnošću citosolarne 5'-NT. Smanjena aktivnost citosolarne 5'-NT predstavlja protektivne efekte za miokard, jer u ovakvim uslovima ono preživljava zahvaljujući očuvanom ATP pulu, za razliku od membranskog enzima koji produkuje adenzin (68).

- **Adenzin dezaminaza** (adenzin aminohidrolaza; E.C. 3.5.4.4., ADA) je jedan od ključnih enzima purinskog metabolizma koji katalizuje ireverzibilnu reakciju hidrolitičke dezaminacije adenozina, prevodeći ga u inozin sa oslobađanjem amonijaka (69).

U gotovo svim ćelijama i tkivima u organizmu prisutna je aktivnost adenozin dezaminaze. To je glikoproteinski enzim koji u svojoj strukturi sadrži veliki broj kiselih amino kiselina, glukozamin i galaktozamin. Optimalni pH za odvijanje enzimske katalize je 6,3, a izoelektrična tačka je na pH 4,8. Čuva se na temperaturi od 2-8 oC kada je stabilan 6-8 meseci. Aktivatori nisu poznati. Inhibitorno na enzim deluju katjoni  $Ag^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  i  $Cu^{2+}$  kao i sulfhidrilni reagensi (p-hloromerhuri-fenilsulfonat). Specifična inhibicija izazvana blokiranjem SH grupa svedoči da humana ADA sadrži esencijalne SH grupe za svoju punu aktivnost. Enzim se takođe inhibiše guanidinom, biuretom i guanil ureom po tipu kompetitivne inhibicije (70). Metodom gel filtracije izolovane su 4 različite forme ovog enzima. Tri forme su određene kao: velika, intermedijarna i mala. U tkivima velike aktivnosti ovog enzima dominira mala forma (intestinum i slezina) za razliku od tkiva sa manjom aktivnošću (pluća i bubreg) gde je prisutna velika forma. Adenzin dezaminaza je široko zastupljena u svim ćelijama i



tkivima, kako sisara tako i nekih životinjskih vrsta, što je rezultat dominantnog značaja katalitičke reakcije produkcije inozina i hipoksantina kao i njihovog daljeg usmeravanja u katabolizam ili reutilizaciju purinskih nukleotida. Klinički značaj određivanja ovog enzima je u činjenici nedostatak ili čak smanjena aktivnost uzrokuju sindrom imunodeficijencije. Ukoliko je nedostatak nasledan, ishod može biti fatalan. Povećana koncentracija S-adenozil-homocisteina u cirkulaciji inhibira metilaciju DNK, tako da deluje toksično na T i B-ćelije (71). U stanju ishemije kod ljudi, 70% ATP se degradira do adenzina (72).

Korišćenjem inhibitora ADA, EHNA (eritro-9(2-hidroksi-3-nonil)) adenine i CPC 405 i CPC 406 postiže se ne samo povećanje adenzina, nego i redukovano odlivanje baza iz ishemičnog miokarda (73). ADA predstavlja, takođe i nespecifičan marker aktivacije T ćelija i njena aktivnost raste u bolestima za koje su karakteristične proliferacija i aktivacija T limfocita (74).

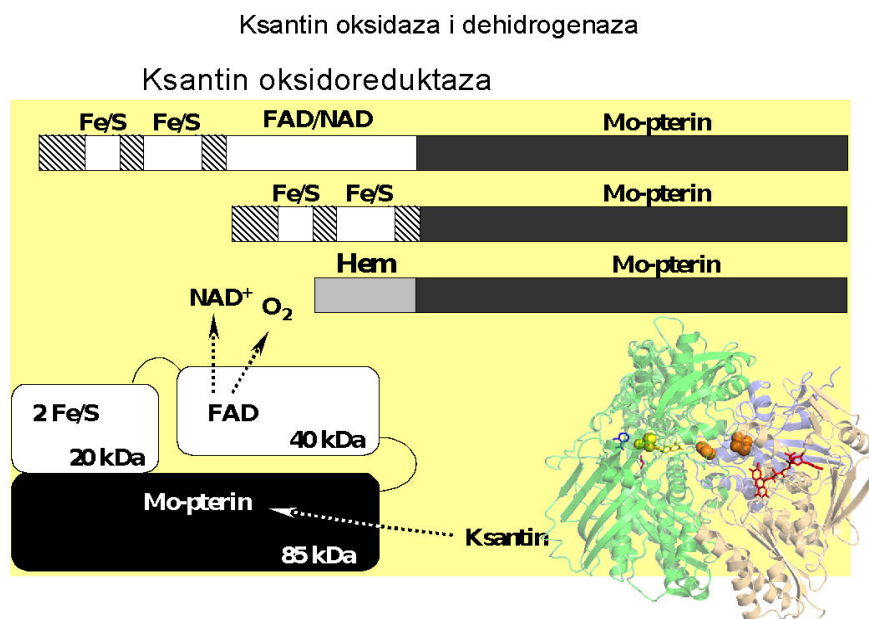
### 2.3.2. Strukturne osobine i uloga ksantin oksidaze i ksantin dehidrogenaze

#### - Ksantin oksidaza

Ksantin oksidaza katalizuje reakciju stvaranja mokraćne kiseline iz supstrata ksantina, ali katalizuje i oksidaciju hipoksantina u ksantin. Ksantin oksidaza (XO) (EC 1.1.3.22) i ksantin dehidrogenaza (XD) (EC 1.1.7.1.4) predstavljaju dve interkonvertibilne forme jednog istog enzima (75).

Ispitivanja ovog enzima u različitim tkivima pokazala su da se enzim prvobitno stvara kao dehidrogenazni oblik (NAD-zavisna forma), ali oksidacijom sulfhidrilnih grupa prelazi u oksidaznu formu. Enzim je po svojoj strukturi molibden metalo-enzim, koji postoji kao homodimer molekulske mase oko 290 000, pri čemu svaki monomer funkcioniše nezavisno u reakcijama (76).

Na N-terminalnom delu nalazi se gvožđe-sumpor deo, a C-terminalni deo vezuje molibden i taj deo direktno učestvuje u oksidaciji hipoksantina i ksantina. Enzim poseduje četiri aktivna redoks centra. Vrlo je zastupljen u različitim organima i tkivima, a posebno je bogat endotel. Takva distribucija daje očekivani nalaz redovne prisutnosti ovog enzima u cirkulaciji.



Šema 9. Struktura ksantin oksidoreduktaze i ksantin oksidaze (Đorđević i sar.)

Dominantan oblik u fiziološkim uslovima je XDH. Kada se za reakciju u kojoj se hipoksantin ili ksantin oksiduju do mokraćne kiseline, koristi NAD<sup>+</sup> kao akceptor elektrona, u reakciji nastaje NADH (XDH). Ako je akceptor e-molekulski O<sub>2</sub> onda nastaje O<sub>2</sub><sup>-</sup> - XO. U uslovima ishemije dominira XO kao i u uslovima povećanog nivoa oksidativnog stresa (77).

Ksantin dehidrogenaza/oksidaza katalizuju transformaciju hipoksantina u ksantin i mokraćnu kiselinu u kataboličkom putu purinskih nukleotida. U normalnim fiziološkim uslovima ovu reakciju katalizuje uglavnom ksantin dehidrogenaza i ona ne produkuje slobodne radikale. Međutim, u izmenjenim uslovima favorizovana je ksantin oksidaza koja generiše superoksid anjon radikal i vodonik peroksid (78).

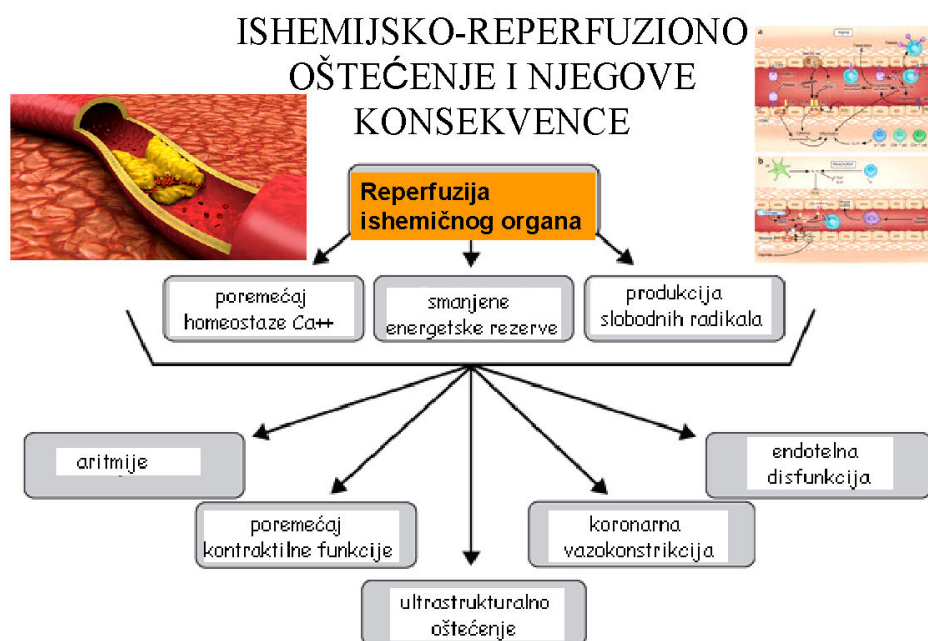
U eksperimentima na hepatocitama, Nishinoi sar. (79) su pokazali da hipoksija indukuje povećanu transformaciju ksantin dehidrogenaze u ksantin oksidazu. Takođe, ksantin oksidaza u ćelijama aktivira se posredstvom povećane količine slobodnog citozolarnog kalcijuma (80).

Pored svih navedenih razloga koji idu u prilog povećanom stvaranju slobodnih kiseonikovih radikala, u stanjima hipoksije zbog inhibicije aerobne respiracije moguća je i smanjena produkcija ovih molekula. Naime, postoje podaci da se pod normalnim uslovima, u mitohondrijalnoj oksidativnoj fosforilaciji približno 1 % od ukupnog elektronskog protoka koristi za obrazovanje superoksid anjon radikala (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) koji se u

normalnim okolnostima eliminiše superoksid dismutazom (SOD) i glutationom. U akutnoj hipoksiji, zbog inhibicije elektronskog protoka, ova produkcija  $O_2^-$  je delimično ili u potpunosti inhibirana (81).

Ksantin oksidaza je uglavnom eksprimirana u citoplazmi hepatocita, crevnoj sluzokoži, vaskularnim endotelnim ćelijama i epitelu dojke. Proizvodnja slobodnih kiseonikovih radikala posredovana dejstvom XO u kancerskim tkivima može biti izazvana velikim povećanjem formiranja supstrata, koji se javlja sekundarno uz ubrzani metabolizam adenilnih nukleotida tokom progressa karcinoma. Visoka aktivnost XO može biti pokušaj da se smanji salvage put aktivnosti purina, koji je od vitalnog značaja za brzu sintezu DNK (80). Različiti rezultati studija o aktivnosti XO mogu biti posledica ispitivanja u različitim vrstama tkiva i pod različitim uslovima. U serumu zdravih osoba se nalazi veoma niska aktivnost XO ili je uopšte nema.

Posebno značajno mesto ksantin oksidaze je u ishemijsko reperfuzionim oštećenjima. Naime, mu uslovima hipoksije, tkiva se delimično oštećuju, dolazi do aktivacije proteaza i konverzije XD u XO. Kada nastupi oksigenacija, ksantin oksidaza dobija supstrat kada počinje reakcija, koja dovodi do oštećenja tkiva (82-84).



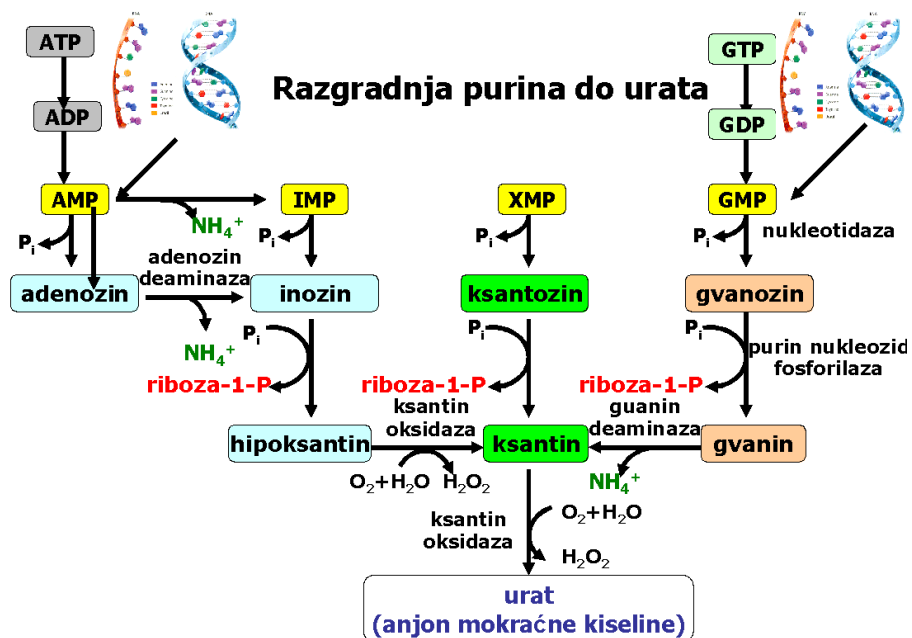
Šema 10. Uloga ksantin oksidaze u ishemijsko-reperfuzionim stanjima (adaptirano po Hearseu)

Značajan porast aktivnosti je uočen u slučajevima kada je poremećena cirkulacija i kod srčane insuficijencije kod bolesnika sa reumatskom groznicom (85). Takođe je zabeležena signifikantna korelacija između XO i krvnog pritiska kod normotenzivnih osoba, što dokazuje da je XO jedan od mogućih faktora rizika za nastanak visokog krvnog pritiska ili se javlja kao posledica razvoja hipertenzije (86)..Postoje podaci da mokraćna kiselina korelira sa krvnim pritiskom, a preventivno davanje alopurinola normalizuje tenziju (87).

Smatra se da bolesnici sa koronarnom bolešću srca akumuliraju velike količine hipoksantina i ksantina u srcu, a ove velike količine supstrata aktiviraju ksantin oksidazu i stvaranje slobodnih radikala(88).

### 2.3.3. Značaj mokraćne kiseline u razvoju hipertenzije

Mokraćna kiselina nije jednostavni produkt katabolizma purina već značajan modulator i regulator krvnog pritiska. Nastaje pod delovanjem enzima ksantin oksidaze.



Šema 11. Metabolizam purina (adaptirano po Koraćević i sar.)

Ne samo da se povećanje mokraćne kiseline često registruje u loše regulisanoj hipertenziji, već se i eksperimentalno hipertenzija može izazvati inhibicijom urikaze i indukcijom eksperimentalne hiperurikemije. U tom smislu su mnoga antropolška istraživanja bila usmerena na ispitivanje potencijalnih razloga i uslova pod kojima je gen za urikazu “iščezao” samo kod čoveka tokom evolucije primata. Hipotetični odgovor se odnosi na činjenicu da je tokom uspravljanja čovek morao da poveća krvni pritisak, putem zadržavanja mokraćne kiseline, jer se smatralo da je ishrana bila deficitarna u soli. Predložena je hipoteza po kojoj se “nonsens” mutacija gena za urikazu desila između 24 i 13 miliona godina unazad tokom razvoja hominoida. (*Pongo/Gorila/Pan/Homo* linija). Ovakve hipoteze naročito ističu autori, kao što su Wu i sar (89), Watanabe i sar (90) i Oda i sar (91).

U poslednje vreme mokraćna kiselina polako zadobija značajno mesto kao izolovani i nezavisni faktor rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti, a kao udruženi faktor, značajno povećava mortalitet. Mokraćna kiselina deluje hipertenzivno posredstvom aktivacije renin-angiotenzin sistema. O toj vezi kao i značaju u kardiovaskularnom riziku, mnoge studije i meta analize su diskutovale svoje podatke i hipoteze, Kao što je NHANES studija, izraelska studija, japanske OSAKA i OKINAVA studije, Austrijska studija na čak 83683 pacijenata, LIFE study i druge (92-98). U slučaju esencijalne hipertenzije, hiperurikemija je prisutna u blizu 90% pacijenata (99-103).

Iako je reč o nedavno proučenim suptilnim mehanizmima, ipak je ideja da je hipertenzija često udružena sa gihtom poznata još od početka XIX veka, kada je Frederik Mohamed notirao ovaj klinički entitet, iako nije merio mokraćnu kiselinu i ta zapažanja su bila objavljena u Lancetu. Tada je prva hipoteza i postavljena od strane istog autora vezana za neki kauzalni odnos, tačnije da mokraćna kiselina može biti razlog hipertenzije. Od tada se na giht gleda kao na oboljenje gde se simptomi vezani za zglobove gledaju kao vrh ledenog brega”. A još opasnije je postojanje asimptomatske hiperurikemije, gde se ona sasvim slučajno otkriva kada se razviju svi drugi ozbiljni simptomi hipertenzije, kardiovaskularnih ili bubrežnih oštećenja. (102-108). Dugo godina se vodila polemika o ulozi mokraćne kiseline u razvoju hipertenzije i kardiovaskularnih bolesti, a nakon ustanovljavanja veze, postavilo se pitanje „šta je starije, kokoška ili jaje”, tačnije, da li hiperurikemija prethodi gojaznosti, hipertenziji i bubrežnoj insuficijenciji, ili ih prati kao metabolička konsekvencija (103).

Eksperimentalni podaci na životinjama, pokazali su da izazivanje hiperurikemije oksonskom kiselinom, koja je blokator urikaze, dovodi do razvoja hipertenzije kod životinja. mehanizmi koji su dokumentovani, zasnivaju se na stimulaciji oslobađanja angiotenzinogena i smanjenoj bioraspoloživosti azot oksida (NO). Ubrzo nakon toga životinje razvijaju tipične promene u vidu hijalinoze krvnih sudova i endotelna oštećenja (109-111).

Povećana razgradnja ATP-a je najčešći razlog nagomilavanja mokraćne kiseline i njenih soli urata, ukoliko nije u pitanju urođena metabolička greška-giht. Stoga se sekundarna hiperurikemija često naziva "marker ćelijske energetske krize" Pored toga, kako je već navedeno, simpatička stimulacija oslobađanjem purinskih nukleotida, stvara dovoljno supstrata u cirkulaciji da mokraćna kiselina može nastati i unutar nje (112).

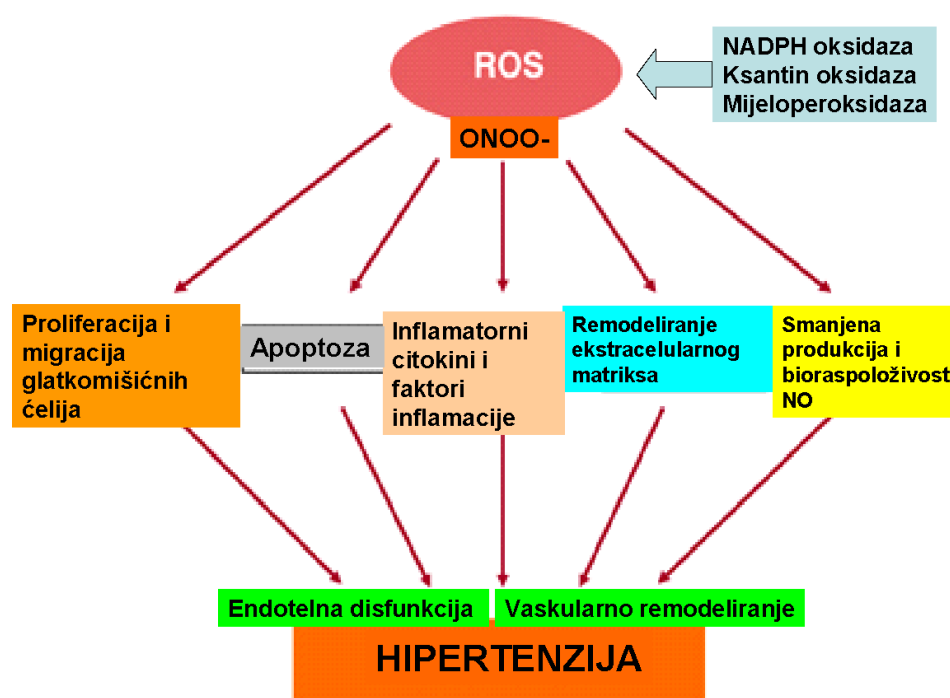
Efekti mokraćne kiseline na renin-angiotenzin sistem dobro su proučeni i to je jedan od evolucionih mehanizama, koji je omogućio da čovekoliki majmun u uspravnom položaju izbegne ortostatku hipotenziju (113-116). Mokraćna kiselina izaziva i proliferaciju mišićnih ćelija vaskulature (delovanjem na MAP kinaze), izaziva endotelnu disfunkciju, aktivira i oslobađanje PDGF, a može se naći kao loše rastvorljiva i u depozitima ateromatoznih ploča (117). O udelu mokraćne kiseline u razvoju hipertenzije svedoči veliki broj studija, i kreće se od 1,6 do 2 puta. Analizama je čak ustanovljeno da svako povećanje mokraćne kiseline za 1mg/dL dovodi do porasta od oko 27 mm Hg sistolnog pritiska u periodu oko 5 godina. Od interesa su i studije koje su uključivale terapijski tretman hipertenzija inhibitorima ksantin oksidaze, alopurinolom (118-123).

### **3. OKSIDATIVNI STRES**

Oksidativni stres se definiše kao stanje poremećene ravnoteže između prooksidativnih faktora sa jedne i antioksidativnih sa druge strane, odnosno između stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika i azota (eng. *reactive oxygen species*, ROS; *reactive nitrogen species*, RNS) i njihovog uklanjanja antioksidansima.

Stanje oksidativnog stresa praćeno je povećanim nivoom proizvoda oksidacije, kao što su lipidni hidroperoksidi, oksidacioni proizvodi proteina i fragmenti DNK (124). ROS i RNS

su, kao proizvodi normalnog ćelijskog metabolizma, u niskim i umerenim koncentracijama korisni za žive organizme. Njihovi povoljni efekti se ogledaju u učešću u brojnim ćelijskim signalnim putevima, indukovanju mitogenog odgovora, kao i u odbrani od infektivnih činioca (125). U stanjima povećanog stvaranja, ROS i RNS koje ne mogu u potpunosti biti eliminisane ili neutralisane enzimskim i neenzimskim antioksidansima, dovode do oksidativnog oštećenja i patogeneze različitih bolesti (126).



Šema 12. Uloga slobodnih radikala u razvoju hipertenzije (adaptirano po Liftonu i sar. 2004.)

### 3.1. Slobodni radikali: ROS i RNS

Reaktivne vrste koje dovode do stanja oksidativnog stresa u biološkim sistemima, mogu biti radikalske i neradikalske, koje se mogu lako prevesti u slobodne radikale. Slobodnim radikalima se smatraju molekuli ili molekularni fragmenti sa jednim ili više nesparenih elektrona u spoljašnjoj orbitali, koji ih čine veoma reaktivnim i podložnim interakcijama sa biomolekulima. Radikali nastali od kiseonika predstavljaju najvažnije radikalske vrste u živim sistemima (125). U molekularnom obliku kiseonik je relativno nereaktivan, ali sa dodatkom jednog elektrona nastaje superoksid-anjon radikal koji se smatra primarnim ROS i učestvuje u stvaranju sekundarnih kiseoničnih vrsta .

## PODELA SLOBODNIH RADIKALA

1. **Reaktivni oblici kiseonika (Reactive Oxygen Species – ROS)**
  - **Slobodni radikali kiseonika**
    - Superoksidni anjonski radikal ( $O_2^{\bullet-}$ )
    - Hidroksilni radikal ( $HO^{\bullet}$ )
    - Peroksilni ( $ROO^{\bullet}$ )
    - Hidroksiperoksilni ( $RO^{\bullet}$ )
    - Alkoksilni ( $HO_2^{\bullet}$ )
  - **Reaktivni neradikalni derivati kiseonika**
    - vodonik peroksid ( $H_2O_2$ )
    - hipohloritna kiselina ( $HClO$ )
    - singletni kiseonik ( $^1O_2$ )
2. **Reaktivni oblici azota (Reactive Nitrogen Species - RNS)**
  - **Slobodni radikali azota**
    - azot (II)-oksid ( $NO^{\bullet}$ )
    - azot (IV)-oksid ( $NO_2^{\bullet}$ )
  - **Jedinjenja i molekuli kao što su:** peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) i nitrozilni katjon ( $NO^+$ )
3. **Slobodni radikali hlora**
  - Hipohloritni anjon ( $OCl^-$ )
  - Atomski hlor ( $Cl^{\bullet}$ )

**Tabela 3. Podela slobodnih radikala (adaptirano po Đorđević V. i sar.)**

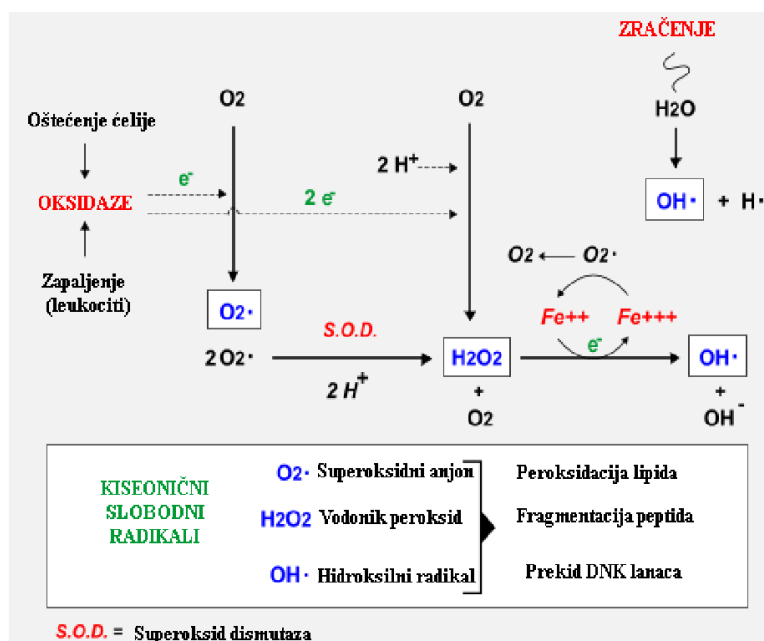
Važan ćelijski izvor oksidativnog stresa je formiranje ROS kroz nepotpunu redukciju kiseonika u respiratornom lancu mitohondrija. Pod uobičajenim uslovima aerobnog metabolizma u mitohondrijalnom elektron transportnom lancu molekularni kiseonik podleže tetravalentnoj redukciji do vode. U uslovima nepotpune redukcije kiseonika, formiraju se ROS, kao nestabilne i veoma reaktivne vrste. Pri tome, postoji tačan redosled kojim se ROS stvaraju, odnosno prvo nastaje superoksid-anjon radikal ( $O_2^{\bullet-}$ ), koji dalje daje vodonik-peroksid ( $H_2O_2$ ), a potom i hidroksil-radikal ( $OH^{\bullet}$ ) (128). Iako najzastupljeniji među reaktivnim kiseoničnim vrstama,  $O_2^{\bullet-}$  nije dovoljno reaktivan da deluje na makromolekule direktno, ali može da započne lanac stvaranja drugih ROS. On se smatra primarnim ROS koji može da reaguje sa drugim molekulama i generiše sekundarne ROS, direktno ili posredstvom enzimima i metalima katalizovanih procesa (127). Iako primarno nastaje u kompleksu I (NADH-dehidrogenaza) i kompleksu III (citohrom c-reduktaza) mitohondrijalnog elektron transportnog lanca, znatne količine  $O_2^{\bullet-}$  mogu nastati pod dejstvom različitih enzimskih sistema kao što su ksantin-oksidaza i NAD (P) H-oksidaza. Vodonik-peroksid je mali neradikalni molekul, koji lako difunduje i prolazi kroz ćelijske membrane i ima sposobnost da učestvuje u stvaranju



drugih ROS (128). Pored nastajanja u elektron transportnom lancu mitohondrija, važan izvor vodonik-peroksida su i peroksizomi, organele koje u najvećoj meri koriste ćelijski kiseonik za obavljanje više metaboličkih funkcija (129). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> učestvuje u formiranju visoko reaktivnog hidroksil-radikala, u Fentonovoj reakciji:



## MEHANIZAM NASTANKA SLOBODNIH RADIKALA



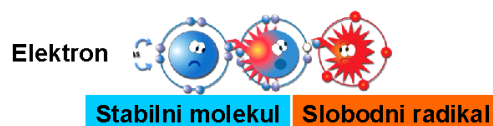
Šema 13. Mehanizmi nastanka slobodnih radikala ((adaptirano po Đorđević V. i sar.))

Hidroksil-radikal (OH<sup>•</sup>) je neutralna forma hidroksidnog jona sa visokom reaktivnošću, ali sa malim poluvremenom eliminacije (10<sup>-9</sup>s), tako da se njegovo delovanje ostvaruje isključivo na mestu formiranja (130).

ROS se formiraju i u fagocitima kao odgovor organizma na inflamatorne agense (citokine i bakterijske produkte). U interakciji sa stranim partikulama aktivira se NAD(P)H-oksidaza, najbolje okarakterisana u neutrofilima, gde nastali O<sub>2</sub><sup>•-</sup> pokreće seriju reakcija odgovornih za uništavanje bakterija. Ovaj odbrambeni mehanizam praćen je aktivacijom i enzima mijeloperoksidaze, ključnog u nastajanju hipohlorne kiseline (HOCl), neradikalne ROS sa baktericidnim dejstvom. U literaturi je opisana je i nefagocitna NAD(P)H-oksidaza, koja produkuje superoksidni anjon, u mnogo

manjoj meri nego u neutrofilima, za koji se smatra da učestvuje u intraćelijskim signalnim putevima (125,131). Pored ROS, reaktivne vrste azota (RNS) takođe mogu da izazovu oštećenja kada njihovo stvaranje u organizmu prevazilazi mogućnosti njihove neutralizacije i eliminacije.

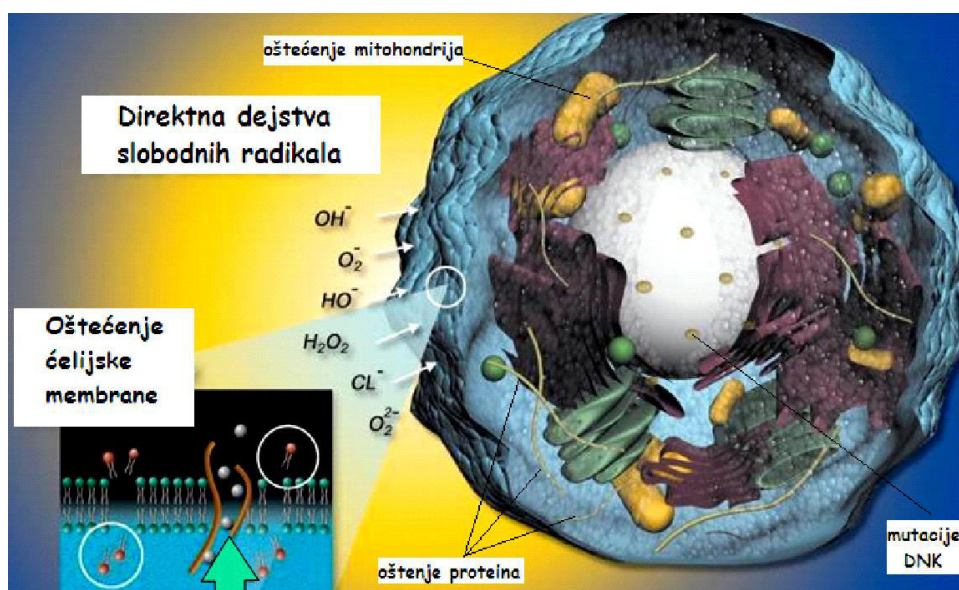
## Produkcija slobodnih radikala



- U toku apsorpcije radijacije (zračenja)
- U procesu oksidativne fosforilacije u mitohondrijama
- U procesu fagocitoze
- U procesu biotransformacije egzogenih i endogenih supstrata u ER-u
- U procesu metabolisanjalekova i alkohola
- U enzimskim reakcijama koje katalizuju oksidaze
- U procesu sinteze ikozanoida
- U reakcijama oksidoredukcije u prisustvu metala s promenljivom valencom
- U procesu lipidne peroksidacije nezasićenih masnih kiselina

### Šema 14. Mehanizmi produkcije slobodnih radikala (adaptirano po Đorđević V. i sar.)

Ovakvo stanje naziva se još i nitrozativnim stresom i može da dovede do promene strukture, a time i funkcije proteina, kroz reakcije nitrozilacije (132). Azot-monoksid (NO•) je važan reaktivni radikal, sintetisan u tkivima pod dejstvom enzima azot-monoksid sintetaza koje metabolišu arginin do citrulina (133). Ovaj mali molekul učestvuje u brojnim fiziološkim procesima, uključujući neurotransmisiju, regulaciju krvnog pritiska, relaksaciju glatkih mišića, regulaciju imunog sistema i odbrambeni sistem organizma (134). Iako sam nema veliku reaktivnost, NO• u prisustvu kiseonika ili superoksida može da pređe u reaktivnije vrste, kao što su azot-dioksid i peroksininitrit (135). Pored endogenog stvaranja ROS, koje se vezuje za metaboličke procese, pre svega u mitohondrijama, reaktivne vrste mogu nastati i pod dejstvom egzogenih uticaja u koje se ubrajaju ekstremne temperature, zračenje, ksenobiotici, hemijski toksini, pesticidi i teški metali (136,137).



Šema 15. Slobodni radikali i ćelijska oštećenja (adaptirano po Đorđević V. i sar.)

Postoji veliki broj indeksa koji se koriste za ocenu oksidativnog statusa i efikasnosti antioksidanasa, najčešće su korišćeni produkti lipidne peroksidacije i relevantni biomarkeri. Lipidna peroksidacijajerezultat kompleksnih lančanih reakcija koje rezultuju formiranjem različitih oksidovanih proizvoda, tj. peroksidikala masnih kiselina ( $\text{ROO}\cdot$ ) i odgovarajućih hidroperoksida ( $\text{ROOH}$ ) (138). Nastali peroksidikali su nestabilni molekuli čijom daljom konverzijom nastaju stabilniji proizvodi, kao što su izoprostani i aldehidi. Nastali aldehidi najčešće se određuju kao supstance koje reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom (eng. thiobarbituric acid reacting substances, TBARS), a njihov nivo se izražava u ekvivalentima malondialdehida (MDA) i predstavlja najčešće korišćenindeks lipidne peroksidacije (139). Kao markeri oksidativnog stresa određuju se i hidroperoksidi ( $\text{LOOH}$ ), često izraženi kao konjugovani dieni, kao i F2-izoprostani.

### 3.2.Izvori i razlozi oksidativnog stresa u hipertenziji

Povišen krvni pritisak predstavlja najčešći faktor rizika za nastanak KVB, pri čemu više vrednosti podrazumevaju veći rizik, naročito kada su prisutni i drugi faktori, kao što su porodična istorija preuranjenih KVB, gojaznost, dijabetes, pušenje ili bolesti bubrega (140). Brojne epidemiološke studije su sprovedene kako u razvijenim

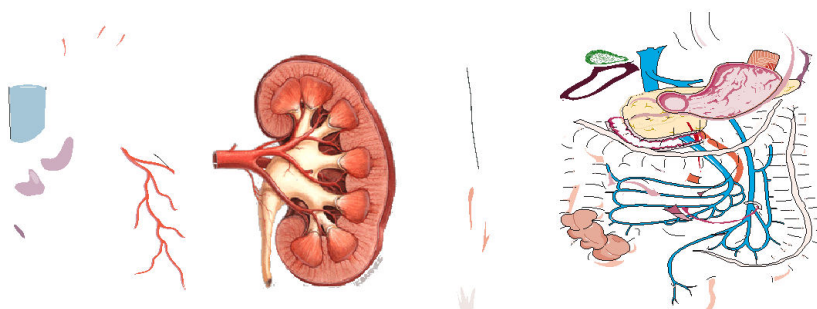
zemljama, tako i u zemljama u razvoju, čime je pokazano da je hipertenzija glavni faktor rizika za nastanak KVB. Istraživanja su pokazala da čak i visoki-normalni arterijski krvni pritisak predstavlja faktor rizika za KVB, tj. koronarnu bolest srca, kod oba pola i u različitim etničkim grupama (141). Pokazano je da oksidativni status osoba sa farmakološki nelečenom esencijalnom hipertenzijom karakteriše povećanje nivoa markera lipidne peroksidacije u krvi, kao i povećana produkcija superoksid-anjona i vodonik-peroksida u polimorfonuklearnim leukocitima i smanjenje aktivnosti antioksidativnih enzima i koncentracije vitamina E. Pored toga, normalizacija vrednosti krvnog pritiska dovodi do normalizacije vrednosti navedenih parametra oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite (142). Dokazano je da je u stanju hipertenzije smanjena bioraspoloživost azot-monoksida, važnog vazodilatatora, koji se degradira u prisustvu slobodnih radikala. Naime, poluvreme eliminacije, a samim tim i biološka aktivnost NO zavisi od prisustva ROS, pre svega superoksid-anjona koji reaguje sa NO i dovodi do formiranja visoko reaktivnog peroksinitrita. Ova reakcija se odvija 10 puta brže od reakcije u kojoj superoksid-dismutaza razlaže superoksid-anjon, a rezultat je smanjenje bioraspoloživosti azot-monoksida, kao i njegovih zaštitnih efekata (143). NO oslobođen u vaskularnom endotelu ispoljava anti-aterosklerotsko dejstvo, pa se inicijacija, ali i ubrzavanje procesa ateroskleroze dovodi u vezu sa stanjima deficita NO. Povećana produkcija ROS se sve više dovodi u vezu sa endotelnom disfunkcijom, koja je prisutna kod pacijenata sa aterosklerozom, a novija istraživanja su pokazala da prisustvo endotelne disfunkcije može da predvidi i nivo kardiovaskularnih događaja uopšte (144). Iako su mehanizmi koji dovode do endotelne disfunkcije kompleksni i uključuju više činioca, smatra se da ključnu ulogu u ovom fenomenu mogu imati ROS, kao i da smanjenje njihove produkcije, odnosno nivoa oksidativnog stresa može usporiti ili sprečiti razvoj KVB (143,144). Narušena endotelna homeostaza se dovodi u vezu sa gotovo svim faktorima rizika za nastanak KVB, kod starih ljudi, hipertenzivnih osoba, u stanjima povišenog LDL holesterola i triglicerida, pacijenata sa dijabetesom tipa 1 ili 2, kao i u metaboličkom sindromu (143).

Promene homeostaze vode i elektrolita i njihov uticaj na ekspresiju oksidativnog stresa je dokumentovan u literaturi i u direktnoj je vezi sa funkcijom bubrega. Pitanje koje je logično je gde stoji direktna veza između elektrolitnog dizbalansa i slobodnih radikala, a samim tim i moguće karike hipertenzije, slobodnih radikala i bubrega? Na ovo pitanje

se može odgovoriti ukoliko se zna da se Na iz primarne mokraćne preko bazolateralne membrane tubula reapsorbuje aktivno i tako dovodi do vraćanja vode preko katjanskog kotransportnog sistema. U tom smislu, krvni pritisak i volumen ekstracelularne tečnosti su determinisani bubrežnim kapacitetom izlučivanja NaCl (engl. renal NaCl excretory capacity“). Ključni signal koji modulira reapsorpciju NaCl i sekreciju K<sup>+</sup> uključuje specifične kinazne enzime, takozvane WNK kinaze, koje interaguju sa SPAK (proline/alanine-bogate kinaze) i oksidativni stres-responsivnim kinazama (OSR1). OSR1 se posebno eksprimira u tkivima kao što su bubrezi (tubulski system), srce, skeletni mišići, tanko crevo i kolon.

## OSR-1 ekspresija

- OSR1 se posebno eksprimira u tkivima kao što su bubrezi-tubulski sistem, srce, skeletni mišići, tanko crevo i kolon

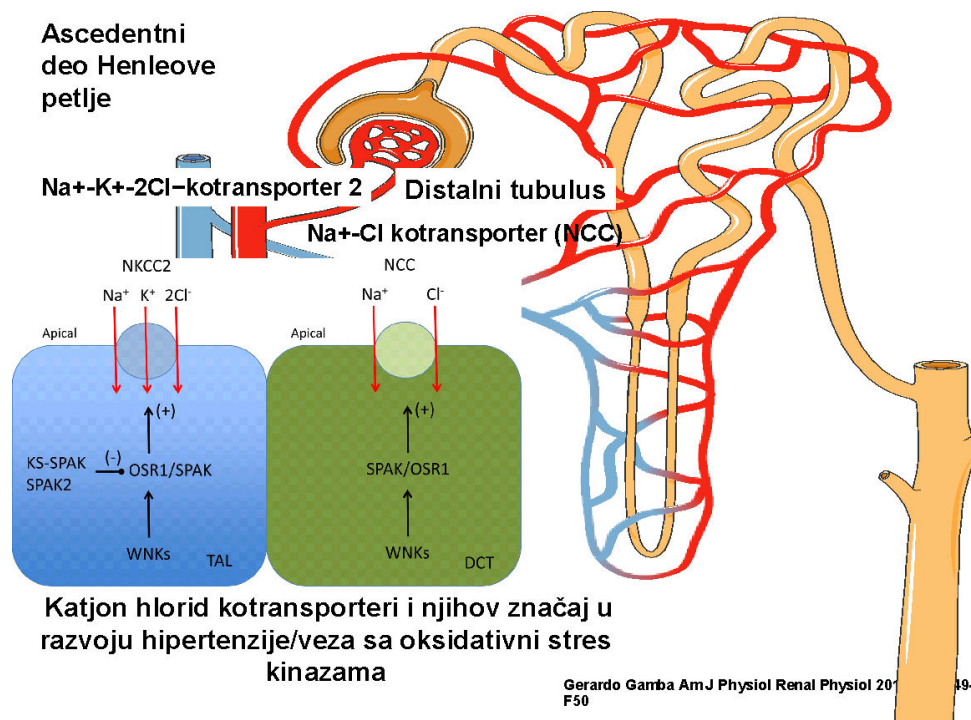


**Šema 16. Ekspresija Oksidativni-stres zavisnih kinaza (adaptirano po Wilsonu i sar.2008)**

U ćelijama sisara, SPAK fosforiliše i aktivira katjanske kotrasportere NKCC1, NKCC2, and NCC, kada postoje hiperosmotski ili hipotonični uslovi. Visoka aktivnost ovog enzimskog sistema je jedan od razloga hipertenzije. U tom smislu, direktna veza oksidativnog stresa i elektrolitnog dizbalansa je očigledna. Ova veza ima svoju prirodnu i odbrambenu logičku zasnovanost, jer je u stanjima šoknih hipovolemijskih stanja organizam izložen velikom naletu slobodnih radikala, pa je oksidativni stres jedan od mehanizama da se pospeši nadoknada tečnosti i elektrolita povećanom reapsorpcijom, dakle uštedom gubitka vode i elektrolita na nivou tubula. Ali kada oksidativni stres hronično traje, onda on „nepotrebno održava“ ovaj mehanizam i tako dovodi do jednog od mehanizama „dopremanja“ tečnosti i elektrolita na nivou tubula

bubrega. Na taj način, oksidativni stres može biti pokretač mehanizama povećanja volumena cirkulišuće tečnosti i krvnog pritiska i biti jedan od patogenetskih mehanizama nastanka esencijalne hipertenzije i njenih konsekvenci (145).

Imajući u vidu povezanost i značajnu ulogu oksidativnog stresa u razvoju i progresiji hipertenzije, neke studije su ispitivale efekte antihipertenzivne terapije na novo produkata lipidne peroksidacije i antioksidativnog statusa. Ustanovljeno je da ACE inhibitori pouzdano deluju kao lekovi koji umanjuju oksidativni stres, ali i endotelnu disfunkciju. Iako su slični podaci u *in vitro* studijama pokazani za beta blokatore, kalcijum antagoniste i blokatore alfa receptora, njihov direktni efekat u *in vivo* kliničkim studijama, studija Baykala i sar (146) nije potvrdila.



Šema 17. veza između katjon-hloridnih kotransportera i oksidativni-stres zavisnih kinaza (adaptirano poGerardo-Gambi 2010)

## **4. TERMINALNA BUBREŽNA INSUFICIJENCIJA I NJENA POVEZANOST SA ESENCIJALNOM HIPERTENZIJOM**

### **4.1. Hipertenzinogeni faktori koji doprinose nefrosklerozi**

Dobro je poznata dvosmerna veza između hipertenzije i hronične bolesti bubrega. S jedne strane, bolesti bubrega su veoma često udružene sa hipertenzijom (147), dok s druge strane, povišen krvni pritisak može da uzrokuje trajne strukturne i funkcionalne promene u prethodno zdravom bubregu vodeći nefroangiosklerozi(148) . Tako bubreg može da bude i “krivac”i “žrtva” hipertenzije. Sve do devedesetih godina prošlog veka posvećivana je pažnja hipertenziji kao faktoru rizika za kardiovaskularne bolesti, dok je hronična bolest bubrega kao posledici hipertenzije bila zanemarena (149). Međutim, devedesetih godina prošlog veka u SAD, a potom i u zapadnoj Evropi, zabeležen je brz porast broja bolesnika u terminalnoj insuficijenciji bubrega, čija je osnovna bolest bila hipertenzivna nefropatija,koja je postala drugi po učestalosti uzrok terminalne insuficijencije bubrega .

U Srbiji se porast incidence i prevalence hipertenzivne nefropatije beleži tek poslednjih deset godina pa je ona postala najčešći uzrok terminalne insuficijencije bubrega (150,151).

Gotovo istovremeno sa porastom incidence hronične bolesti bubrega uzrokovane hipertenzijom pojavljuje se sve veći broj dokaza da ishemijska nefropatija uzrokovana aterosklerotičnom stenozom renalnih arterija predstavlja čest uzrok hronične insuficijencije bubrega (152,153). Upravo je ta sve veća učestalost nefroangioskleroze i ishemijske nefropatije kao uzroka terminalne insuficijencije bubrega nametnula potrebu da se ovim bolestima, njihovoj pravovremenoj dijagnozi, kao i prevenciji i lečenju posveti više pažnje. Kod pacijenata koji imaju terminalnu bubrežnu insuficijenciju oko  $\frac{1}{4}$  ima hipertenziju. razlozi za ovo su mnogostruki, ali sobzirom na vrlo često zajedništvo, vrlo često se kao najčešći faktor udružene pojave spominju genetski faktori. tako su se kod nekih latinoameričkih familija ustanovili poremećaji i polimorfizmi vezani za 11B2 gen, koji inače ima ulogu u sintezi nosača i reapsorpciji natrijuma na nivou tubula. On je lociran na 16q regionu 22.hromozoma. sa druge strane

u nekim azijskim familijama dokazani su polimorfizmi vezani za 1q region 21. hromozoma, što odgovara genu koji kodira sintezu receptora za atrijalni natriuretički peptid. kad je u pitanju američka populacija, polimorfizmi su dokumentovani na genima 31-34 lokus 2q. Ove populacije su ispitivane kao najpredisponiranije za razvoj hronične bubrežne insuficijencije na terenu duže hipertenzije (154,155). U suštini rizik od razvoja hronične bubrežne insuficijencije raste sa starošću i osobe preko 65 godina starosti spadaju u veoma predisponirane. Kao osnovni mehanizam u razvoju hronične bubrežne insuficijencije je retencija tečnosti i elektrolita, koja se manifestuje hipertenzijom koja je praćena edemima. Klinički se može zapaziti tamna braon-žuta prebojenost kože zbog taloženja uree, pojava proteinurije, a stanje prati pojava anemije, gubitak apetita i svraba kože.

Theodor Fahr je 1919. predložio naziv nefroskleroza za hroničnu bolest bubrega koja nastaje kao posledica dugotrajne hipertenzije ili starenja (156).

Klinička slika nefroangioskleroze može biti različita, ali najčešće bolest protiče asimptomatski, bez specifičnih simptoma i znakova. Naime, progresivna insuficijencija bubrega kod sredovečnih ili starijih bolesnika sa dugogodišnjom hipertenzijom, blagom proteinurijom ili mikroalbuminurijom normalnim sedimentom mokraće ne mora uvek da bude posledica nefroangioskleroze. Tačna dijagnoza nefroangioskleroze može da se postavi samo histološki, ali se biopsija bubrega kod ovakvih bolesnika, a pogotovo kod starijih, retko primenjuje, što se ne može smatrati pogrešnim.

U praksi se najčešće dijagnoza nefroangioskleroze postavlja na osnovu kriterijuma koje su predložili Schlessinger i saradnici (157), a koji se danas već smatraju klasičnim. Ovi su kriterijumi nabrojani u tabeli 4, a pored njih neki autori preporučuju i nekoliko dodatnih: starost bolesnika preko 55 godina, muški pol, hiperurikemija, normalan sediment mokraće i simetrično smanjeni bubrezi izmereni ultrazvučnim pregledom (153,158,159).



1. Porodična anamneza o esencijalnoj hipertenziji
2. Dugogodišnja hipertenzija koja prethodi proteinuriji
3. Prisustvo hipertenzivne retinopatije
4. Dokaz o hipertrofiji leve komore (EKG ili EHO)
5. Druge aterosklerotične promene: periferna arterijska bolest, ishemijska bolest srca, cerebrovaskularna bolest
6. Proteinurija ispod 0,5 g/24 h ili $\leq 2+$ pomoću test traka
7. Normalna ili blago smanjena funkcija bubrega
8. Odsustvo bilo koje druge bolesti bubrega, dijabetesa, drugih sistemskih bolesti ili izloženost nefrotoksinima

**Tabela 4. Klinički kriterijumi za dijagnozu nefroangioskleroze**

#### **4.1.1 Klinička slika ishemijske nefropatije**

Ishemijska nefropatija (sinonimi: ishemijska bolest bubrega, aterosklerotična renovaskularna bolest, ateromatозна renovaskularna bolest) je posledica smanjenog protoka krvi kroz bubrege usled stenozе renalnih arterija. Stenoza renalnih arterija može da uzrokuje dva klinička sindroma. Prvi je renovaskularna hipertenzija, koja je obično posledica unilateralne stenozе renalne arterije i nije udružena sa smanjenom funkcijom bubrega, jer se kompenzatorno povećava funkcija kontralateralnog bubrega. Drugi sindrom je ishemijska nefropatija, koja se razvija kod bolesnika sa hemodinamski značajnom stenozom renalnih arterija oba bubrega ili stenozom renalne arterije solitarnog bubrega i koja je praćena klinički značajnim smanjenjem glomerulske filtracije.

Ishemijska nefropatija se može ispoljiti sledećim kliničkim slikama:

Akutna insuficijencija bubrega tokom lečenja hipertenzije, naročito pri upotrebi lekova iz grupe blokatora renin-angiotenzin sistema često u kombinaciji sa diureticima. Obično nastaje 1.-14. dana po otpočinjanju lečenja i često je reverzibilna. Kako je obostrana stenoza bubrežne arterije česta (između 30%-50%), na ishemijsku nefropatiju bi trebalo uvek posumnjati pri pojavi azotemije kod bolesnika sa prethodno dijagnostikovanom renovaskularnom hipertenzijom. Ponavljane epizode edema pluća

koji mogu biti udruženi sa hipertenzijom ali i sa normalnim ili čak sniženim krvnim pritiskom. U osnovi ovog poremećaja je najverovatnije zadržavanje vode i soli. Nejasna i progresivna azotemija kod starijih bolesnika (preko 60 godina starosti kada nastanak esencijalne hipertenzije nije tipičan), pogotovu kod onih sa postojećom poliarterijskom bolešću aterosklerotične prirode. Progresivna azotemija kod bolesnika sa poznatom renovaskularnom hipertenzijom lečenom medikamentozno. Akutna bubrežna insuficijencija koja se superponira na hroničnu insuficijenciju bubrega. Bolesnici sa stenozom renalne arterije (jednostrano kod solitarnog i afunkcionalnog kontralateralnog bubrega ili obostrano) imaju rizik od okluzije arterije. Nagli nastanak okluzije se prikazuje u vidu naglo nastale anurije, akutne bubrežne insuficijencije i hipertenzivne krize (160,161).

Kod svakog bolesnika kod koga se pojavi sumnja na nefroangiosklerozu neophodno je da se uradi dopler renalnih arterija da bi se isključila stenoza renalne arterije, a kada se sumnja na embolizaciju kristalima holesterola ili na neku drugu nefropatiju, biopsija bubrega. To omogućava da se postavi tačna dijagnoza i primeni najefikasnije lečenje.

Terminalna bubrežna insuficijencija u oko  $\frac{3}{4}$  slučajeva dovodi do dijalize. Smrtnost je kod ovih pacijenata 20-30 puta veća nego u generalnoj populaciji. veliki je broj faktora rizika koji do mogu dovesti do fatalnog ishoda, ali je s hipertenzija, hiperlipidemija i kardiovaskularne bolesti među najzastupljenijima i spadaju u takozvane „tradicionalne“ faktore rizika. Pored toga postoje i takozvani faktori rizika specifični za bubrežnu insuficijenciju i tu spadaju: uremija i dijaliza, dok ekstrarenalni faktori koji mogu imati veliki uticaj su: proteinurija, hipervolemija i edemi, povećana aktivnost renin-angiotenzin sistema, inflamacija, infekcija, oksidativni stres, poremećaj metabolizma kalcijuma i fosfora, anemija, povećana koncentracija homocisteina, prokoagulantni trombogeni faktori, porast koncentracije citokina. Povećana koncentracija citokina i proteina akutne faze dovodi do povećanja koncentracije nekih toksičnih metabolita, kao što je asimetrični dimetil arginin (ADMA) i promena na relaciji intima-medija, kao i ventrikularne hipertrofije (162-164).

## 4.2. Oksidativni stres kao faktor razvoja terminalne bubrežne insuficijencije i njenih konsekvenci

Oksidativni stres je jedan od značajnih faktora razvoja terminalne bubrežne insuficijencije, gde je posebno značajan dizbalans pro i antioksidativnih sistema. Oksidativni stres doprinosi razvoju ateroskleroze, koja sa svoje strane i do 70 puta povećava rizik od razvoja kardiovaskularnih komplikacija. Sa druge strane amiloidoza kao posledica taloženja oksidativno modifikovanih proteina i poremećaja metabolizma  $\beta$ 2 mikroglobulina je jedan od razloga poremećaja bubrežne funkcije kao glavni producenti oksidativnog stresa navodi se inflamacija, koja ima za posledicu oslobađanje slobodnih radikala iz aktiviranih makrofaga i polimorfonukleaza. Tu se u prvi mah misli na mijeloperoksidaznu reakciju, mada je i ksantin oksidaza, ali i aktivacija NADPH oksidaznog sistema takođe od značaja. Pored toga uloga ciklooksigenaze i lipooksigenaze je veoma značajna. Od radikala koji u ovim reakcijama nastaju poseban značaj imaju: superoksid anjon radikal ( $O_2^-$ ), vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ), hidroksilni radikal ( $OH^-$ ), peroksinitrit, hipohlorna kiselina ( $OCl^-$ ) i peroksinitrit ( $ONOO$ ). Ukoliko hipohlorna kiselina reaguje sa aminima mogu nastati i hloramini ( $RNH-Cl$ ). Pored prisutne inflamacije i pada antioksidativnog sistema, značajan faktor produkcije radikala u terminalnoj bubrežnoj insuficijenciji je i bio-inkompatibilni efekat dijaliznih membrana, kao i prisustvo endotoksina. Značaj membrana za dijalizu kao faktora oksidativnog stresa je popravljena modifikacijom istih, tertmanom sa nekim liposolubilnim antioksidansima, kao što je vitamin E. Oksidativno modifikovani biomolekuli, poput lipida i proteina dovode do pojave oxoLDL, koji je značajan faktor stvaranja penastih ćelija (165,166).

Biomolekuli koji su target oksidativne modifikacije u toku terminalne bubrežne insuficijencije su prikazani na tabeli.

Kada je u pitanju insuficijencija antioksidativnog sistema, naročito je značajan pad aktivnosti enzimskog antioksidativnog sistema, glutation-peroksidaze, superoksid dizmutaze i katalaze. Od neenzimskih antioksidanasa značajan je pad koncentracije glutationa. Nijedna struktura bubrega nije pošteđena u toku delovanja slobodnih radikala. One se pre svega odnose na glomerule, tubule i vaskularne strukture (165-167).

Konkretni dokazi učešća oksidativnog stresa u razvoju terminalne bubrežne insuficijencije su :

-povećano generisanje radikala što je dokazano njihovim doziranjem u krvi i telesnim tečnostima, kao i u tkivu bubrega

-antioksidansi pokazuju povoljan efekat

-eksperimentalna indukcija oksidativnog stresa dovodi do poremećaja na nivou bubrega

Najvažniji načini kako slobodni radikali izazivaju oštećenja su sledeći:

-hemodinamske promene sa promenom glomerularne propostljivosti

-aberrantni odgovor proliferacije mezangijuma i drugih struktura

-ćelijska apoptoza i odumiranje nefrona

-aktivacija proinflamatornih citokina i adhezivnih faktora.

Naročito je značajno da se velike studije i meta analize bave izučavanjem efekata antioksidanasa, naročito vitamina E, za koji je poznato da kao antioksidans štiti posebno lipidno okruženje. To znači da povoljno deluje na zaštitu nezasićenih masnih kiselina fosfolipida ćelijskih membrana, kao i LDL aterogene lipoproteine krvne plazme (167).

## Biomarkeri oksidativnog stresa u terminalnoj bubrežnoj insuficijenciji

- Ugljeni hidrati: reaktivni aldehidi i produkti glikacije
- Proteini: oksidovani amini, AOPP, karbonilne grupe, oksidovani tioli
- Amino kiseline: cistein, homocistein, nitrotirozin, izoaspartat
- Lipidi: uznapredovali produkti lipooksidacije, MDA, lipidni hidroperoksidi, oxo-LDL
- Derivati arahidonske kiseline: F2 izoprostani
- Nukleinske kiseline: 8-hidroksi dezoksigvanin (8-oxo-gvanin)

**Tabela 5. Biohemijski markeri oksidativnog stresa u terminalnoj bubrežnoj insuficijenciji (adaptirano po Jonesu 2008.)**

### **4.3. Uloga mokraćne kiseline kao faktora razvoja terminalne bubrežne insuficijencije u hipertenziji**

Dugo godina mokraćna kiselina razmatrala se samo kao jedno loše rastvorljivo jedinjenje koje kad se nagomila u cirkulaciji, po sili gravitacije se taloži u sitnim zglobovima i karlicama i čašicama bubrega, dovodeći do pojave uratnog gihta. Ukoliko se razmatra taloženje mokraćne kiseline, treba se zapitati da li je zaista samo zglob i bubreg predilekciono mesto. Eksperimentalni podaci pokazali su da to nije tako, već da se mokraćna kiselina može taložiti u krvnim sudovima, što znači da može učestvovati u aterosklerozi krvnih sudova. Sa druge strane, značajno su se pomerile vrednosti koncentracije mokraćne kiseline ka nižim, često gotovo normalnim ili granično normalnim vrednostima, kada je u pitanju kardiovaskularni rizik (hiper)urikemije. Tako od nebitnog i gotovo zanemarujućeg faktora, mokraćna kiselina vremenom prerasta u vodeće faktore rizika za razvoj bubrežnih oštećenja na terenu hipertenzije. Čak pojedini autori smatraju da je vodeći faktor rizika za bubrežne bolesti (102,103,111,113,120).

## 5. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati koncentraciju u plazmi adenilnih nukleotida ATP, ADP, AMP i mokraćne kiseline kod pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom i ustanoviti da li postoje razlike u odnosu na starost, pol, tenziju (sistolnu i dijastolnu), standardne biohemijske analize i tip terapije.
2. Ustanoviti odnos adenilatnog energetskeg naboja kao markera ćelijske energetske krize u ispitivanim grupama i njegov odnos sa stepenom hipertenzije i terminalnom bubrežnom insuficijencijom.
3. Ispitati kakva je međuzavisnost nivoa adenilnih nukleotida, nukleozida i mokraćne kiseline i aktivnosti enzima koji ih metabolišu (5-nukleotidaza i adenzin dezaminaza)
4. Ispitati aktivnost i odnos ksantin oksidazne i dehidrogenazne forme u ispitivanim grupama.
5. Ispitati koncentraciju markera oksidativnog stresa kod određivanja oksidativne modifikacije lipida (MDA) i uznapredovalih produkata oksidativne modifikacije proteina (AOPP).
6. Definisati mesto mokraćne kiseline kao faktora razvoja esencijalne hipertenzije i progresije hipertenzije u hroničnu bubrežnu insuficijenciju.

## 6. ISPITANICI I METODE

### 6.1. Pacijenti i kontrolni zdravi davaoci krvi

Istraživanje je obavljeno na Klinici za nefrologiju i hemodijalizu Kliničkog centra Niš i u laboratoriji klinike. Deo istraživanja je odrađen na Medicinskom fakultetu, na Institutu za Biohemiju.

Ispitivanjem su obuhvaćeni pacijenti sa esencijalnom hipertenzijom. Kontrolnu grupu je činila zdrava populacija ljudi bez kardiovaskularnih, bubrežnih i inflamatornih bolesti. Istraživanjem je obuhvaćeno 50 pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom, 40 pacijenata na hemodijalizi i 22 kontrolne osobe.

Dijagnoza esencijalne arterijske hipertenzije postavljena je na osnovu kriterijuma evropskog udruženja za hipertenziju "Guidelines Committee. European Society of Hypertension -- European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension, 2003", uvidom u medicinsku dokumentaciju bolesnika i merenjem arterijske tenzije. Prema preporukama, merenje arterijske tenzije rađeno je u sedećem položaju, nakon kraćeg odmora, u toku rutinskog kliničkog pregleda. Merenje tenzije je vršeno na nadlaktici leve ruke korišćenjem živinog manometra, a kao referentna vrednost uzimana je srednja vrednosti iz tri uzastopna merenja.

Svim pacijentima je uzimana heparinizovana krv koja je bila centrifugirana, odvajana. Nakon toga su praćene standardne biohemijske analize. Za uzimanje krvi za merenje koncentracije adenilnih nukleotida su bile specijalno pripremljene epruvete, kako bi se momentalno vršila deproteinizacija i kako ne bi došlo do njihove spontane degradacije.

### 6.2. Biohemijske analize

Krv je uzimana iz kubitalne vene pacijenata i kontrolnih zdravih osoba. Pre uzimanja krvi pacijenti i zdravi ispitanici su dali pristanak za učestvovanje u studiji i nisu imali nikakav težak fizički napor, niti su unosili hranu 12 časova pre uzimanja uzorka krvi. Od svakog pacijenta i zdravih ispitanika je uzimano 10mL krvi. Rutinske biohemijske analize (urea, kreatinin) određivane su na automatskom analizatoru Klinike za Nefrologiju i hemodijalizu Medicinskog fakulteta u Nišu (A24 for In Vitro Diagnostics Biosystems SA, Barcelona, Spain).

**Određivanje adenilnih nukleotida ATP, ADP, AMPi mokraćne kiseline** rađeno je metodom tečne hromatografije po metodi Coolena i sar (168). Krv, koja je uzeta uz EDTA kao antiokoagulans, koji inaktivira dalji katabolizam ATP, odmah je tretirana kiselinom, kako bi se nukleotidi taložili. Korišten je sistem za hromatografiju 1200 Agilent HPLC system, a specifične kolone su bile marke Zorbax Extended C18 column (4.6 mm x 250 mm, 5 µm). Korišćene su dve mobilne faze protoka 1 mL/min. Korišćeni su odgovarajući interni standardi.

**Određivanje koncentracije produkata uznapredovale oksidacije proteina AOPP:** AOPP je određivan po metodi Druke i sar (169). Metoda se bazira na određivanju

oslobođenih hloramina, pri čemu se hloramin-T koristi kao standard. Merenje se vršilo spektrofotometrijskom tehnikom, pri čemu su uzorci plazme prvo razblaživani pet puta, pri čemu se plazmi dodaje rastvor kalijum-jodida. Reakcija se prekida stvaranjem kisele sredine, dodatkom trihlorsirćetne kiseline. Absorbanca se čita na 340nm. Kao standard se koristi rastvor hloramina T, a kao slepa proba pufer, kome se dodaje kalijum jodid i trihlorsirćetna kiselina.

**Određivanje produkta lipidne peroksidacije MDA u plazmi:** reakcija se zasniva na tome da stvoreni malondialdehid (MDA) sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) stvara MDA-TBA<sub>2</sub> hromogen na visokoj temperaturi, čiji se intenzitet boje čita na 532 nm (170).

**Određivanje ksantin oksidaze i dehidrogenaze** vršeno je po metodi Kizakija i Sakurade, koja se bazira na merenju mokračne kiseline-produkta razgradnje ksantina. Da bi se merila celokupna oksidoreduktazna aktivnost je određivana u dve serije. Jednoj seriji uzoraka je dodavan NAD, koji je akceptor elektrona, tako da je tu dobijana i ksantin oksidazna i ksantin dehidrogenazna aktivnost. Druga serija je rađena samo u prisustvu kiseonika i supstrata ksantina, pa je tu detektovana ksantin oksidazna aktivnost. Oduzimanjem ksantin oksidaze (XO) od ksantin oksidoreduktaze (XOD), dobija se ksantin dehidrogenazna aktivnost (XD) (171).

**Određivanje aktivnosti 5'-nukleotidaze** vršeno je po metodi Wooda i Viliamsa (1981), gde je kao supstrat korišćen 10mM AMP, a aktivnost enzima je određivana na bazi oslobođenog fosfora.

**Određivanje aktivnosti adenozin dezaminaze** vršeno je po metodi Pedersona i Berrija, koja se zasniva na merenju količine oslobođenog amonijaka iz supstrata 4mM adenzina. Količina oslobođenog amonijaka je detektovana na bazi alkalne hipohlorit metode.

### 6.3. Statistička analiza

Dobijeni rezultati su obrađivani standardnom metodologijom deskriptivne i analitičke statistike. Za statističku analizu korišćen je SPSS for Windows software. Komparacija među grupama je vršena u zavisnosti od tipa i distribucije obeležija Studentovim t testom i Hi-kvadrat testom. Za korelacionu analizu korišćen je Pirsonov korelacioni test.



## 7. REZULTATI

### 7.1. Opšte karakteristike ispitivanih grupa bolesnika

Distribucija bolesnika u odnosu na pol prikazana je u Tabeli 6.

**Tabela 6. Polna distribucija ispitanika u odnosu na ispitivane grupe**

	Grupa			
	kontrola	Hipertenzija	Dijaliza	Total
Ženski	8 (36,4%)	24 (46,7%)	20 (50,0%)	52 (45,7%)
Muški	14 (63,6%)	26 (53,3%)	20 (50,0%)	60 (54,3%)
Total	<b>22 (100,0%)</b>	<b>50 (100,0%)</b>	<b>40 (100,0%)</b>	<b>112 (100,0%)</b>

Podaci su prikazani kao n (%), NS za sve parametre

Učinjena analiza nije pokazala postojanje značajnije razlike u polnoj distribuciji između ispitivanih grupa bolesnika (Tabela 6).

Prosečna starost i vrednosti sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska ispitivanih bolesnika prema grupama prikazana je u Tabeli 7.

**Tabela 7. Prosečna starost i vrednosti krvnog pritiska**

	Kontrola	hipertenzija	Dijaliza	Total
Starost	63,2±8,2 (59,6-66,9)	66,0±9,0 (62,6-69,4)	65,2±5,9 (63,3-67,1)	65,0±7,6 (63,4-66,6)
Sistolni TA	121,0±7,1 (117,0-124,9)	169,6±13,8** (164,4-174,8)	162,7±10,1** (158,7-166,6)	156,9±21,1 (151,9-162,0)
Dijastolni TA	72,0±5,5 (68,9-75,0)	96,4±10,1 <sup>§</sup> (92,6-100,2)	85,3±6,6 <sup>§</sup> (82,7-87,9)	87,1±12,2 (84,3-90,0)

Podaci su prikazani kao srednja vrednost±SD (95%CI za srednju vrednost); ANOVA: post hoc \*\*p<0,01 naspram kontrolne, &&p<0,01 naspram ostale grupe

Urađena analiza nije pokazala značajniju razliku u prosečnoj starosti ispitivanih bolesnika. Vrednosti sistolnog krvnog pritiska su bile značajno veće u grupi bolesnika sa hipertenzijom i bolesnika na hemodijalizi u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika, dok se vrednosti između ovih grupa nisu razlikovale značajnije. Vrednosti dijstolnog krvnog pritiska bile su značajno različite između ispitivanih grupa bolesnika pri čemu su najmanje u kontrolnoj, a najveće u grupi bolesnika sa esencijalnom hipertenzijom (Tabela 7).

## 7.2. Koncentracija adenilnih nukleotida i vrednosti adenilatnog energetskog naboja

Koncentracija cirkulišućih adenilnih nukleotida ATP, ADP i AMP u ispitivanim grupama bolesnika prikazana je u Tabeli 8.

**Tabela 8. Koncentracija cirkulišućih adenilnih nukleotida u ispitivanim grupama bolesnika**

	Kontrolna	Hipertenzija	Dijaliza	Total
ATP	937,8±139,2 (860,7-101,4)	487,1±115,9 <sup>a</sup> (444,3-531,2)	439,7±185,1 <sup>a</sup> (368,0-511,5)	561,2±244,0 (504,9-618,8)
ADP	216,0±54,4 <sup>d</sup> (185,3-246,1)	322,8±204,1 <sup>d</sup> (246,6-399,0)	621,7±122,7 (574,1-669,3)	415,5±226,1 (362,6-468,4)
AMP	22,1±4,5 (19,6-24,6)	83,8±25,2 <sup>c</sup> (74,1-93,5)	114,8±26,5 <sup>c</sup> (104,5-125,1)	83,0±41,2 (73,4-92,6)

Podaci su prikazani kao srednja vrednost±SD (95%CI za srednju vrednost); ANOVA: post hoc ap<0.01 naspram kontrola, bp<0.01 naspram dijaliza; cp<0.01 naspram ostale grupe

Učinjena statistička obrada pokazala je da su vrednosti cirkulišućih adenilnih nukleotida značajno različite u ispitivanim grupama bolesnika. Vrednosti ATP-a bile su značajno manje u grupama bolesnika sa hipertenzijom i dijalizom u odnosu na

kontrolnu grupu. Vrednosti ADP bile su značajno manje u grupi bolesnika sa hipertenzijom i kontrolnoj grupi u odnosu na grupu bolesnika na hemodijalizi. Vrednosti AMP su pokazale najveće intergrupne varijacije i bile su značajno najmanje u kontrolnoj i značajno najveće u bolesnika na programu hemodijalize (Tabela 8).

Vrednosti adenilatnih indeksa u ispitivanim grupama bolesnika date su u Tabeli 9.

**Tabela 9. Vrednosti adenilatnih indeksa u ispitivanim grupama bolesnika**

	Kontrolna	Hipertenzija	Dijaliza	Total
AEC	0,88±0,01 (0,88-0,89)	0,72±0,05** (0,70-0,74)	0,63±0,03** (0,61-0,64)	0,72±0,10 (0,70-0,74)
ATP/ADP	4,52±0,96 (3,99-5,05)	1,93±0,88** (1,60-2,26)	0,70±0,24** (0,60-0,79)	1,99±1,58 (1,62-2,36)
ATP/UA	4,49±1,0 (3,91-5,06)	2,14±1,74** (1,49-2,79)	1,08±0,35** (0,94-1,21)	2,21±1,75 (1,80-2,62)
ADP/UA	1.01±0.27 (0.86-1.16)	1.16±0.73 (0.88-1.43)	1.58±0.43** (1.41-1.75)	1.29±0.59 (1.11-1.41)

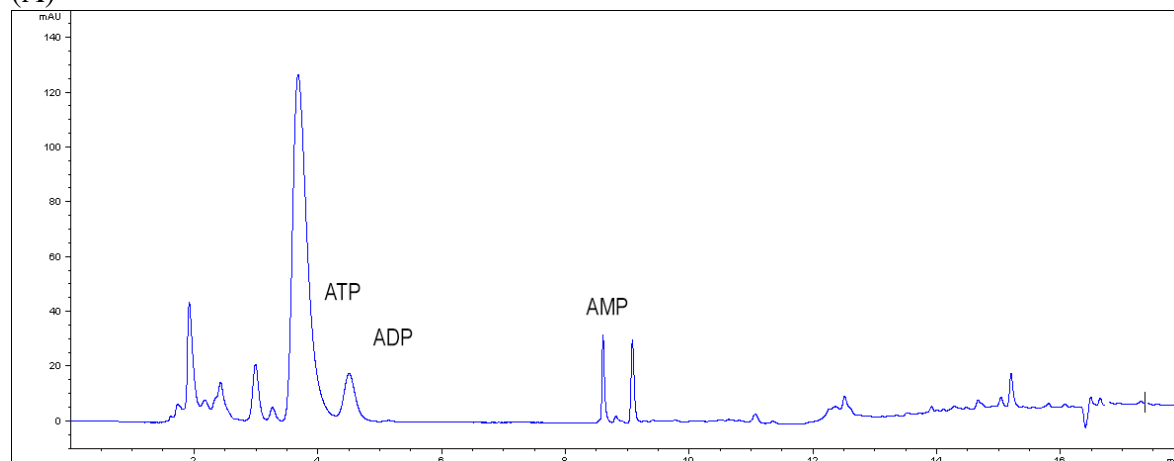
Podaci su prikazani kao srednja vrednost±SD (95%CI za srednju vrednost);

ANOVA: post hoc \*\*p<0,01 naspram ostale grupe

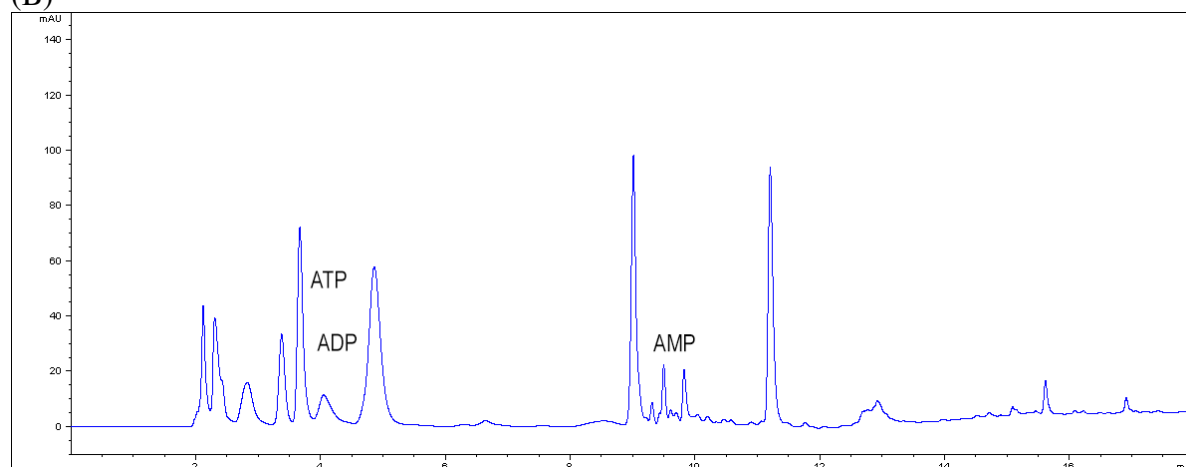
Učinjenja statistička analiza pokazala je postojanje značajnih međugrupnih varijacija u vrednostima ispitivanih indeksa. Vrednosti AEC, odnosa ATP/ADP i ATP/UA bile su značajno različite između ispitivanih grupa bolesnika. Vrednosti AEC, ATP/ADP i ATP/UA bile su najveće u kontrolnoj grupi i najmanje kod bolesnika na dijalizi. Odnos ADP/UA bio je sličan u kontrolnoj i grupi sa hipertenzijom a najveći u grupi bolesnika na dijalizi (Tabela 9).

SLIKA 1. HPLC-DAD hromatogram adenilat-nukleotidnog profila: (A) kontrole (K4), (B) hipertenzivnog pacijenta (HR4) i (C) pacijenta na dijalizi (RD18)

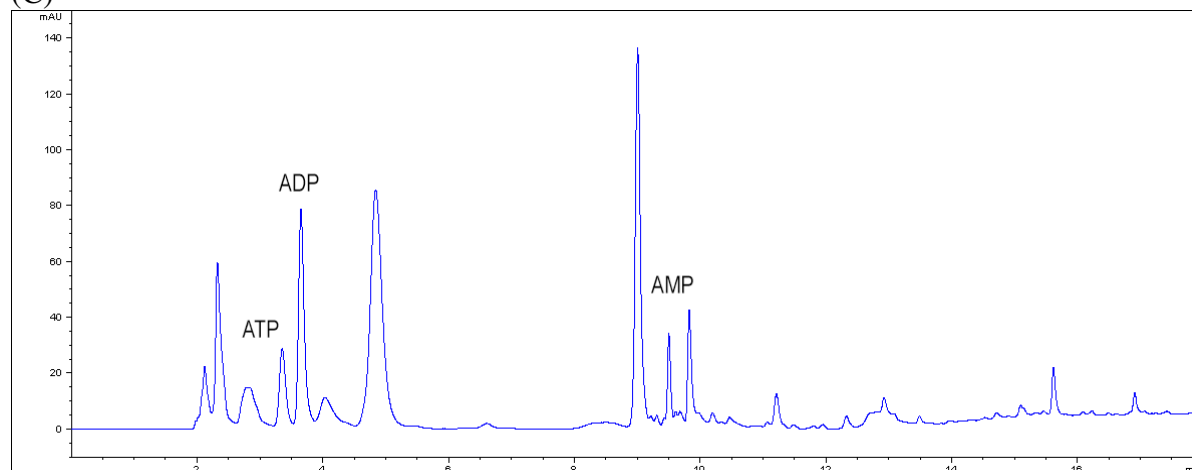
(A)



(B)



(C)

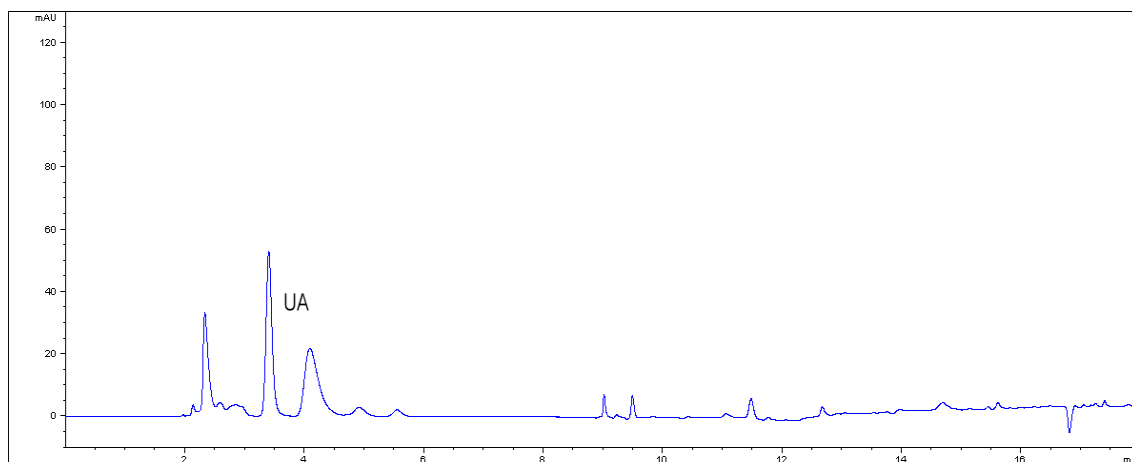


Hromatografska separacija je postignuta na koloni Zorbax Extended C18 (4.6mm x 250mm, 5 $\mu$ m), pomoću linearnog gradijenta dve mobilnefaze: fosfatnogpufera(50 mM, pH6) i metanola. ATP, ADP i AMP su praćeni pomoću diode array detektora (DAD) pri fiksnoj talasnoj dužini od 254nm. Sva tri jedinjenja su identifikovana poređenjem

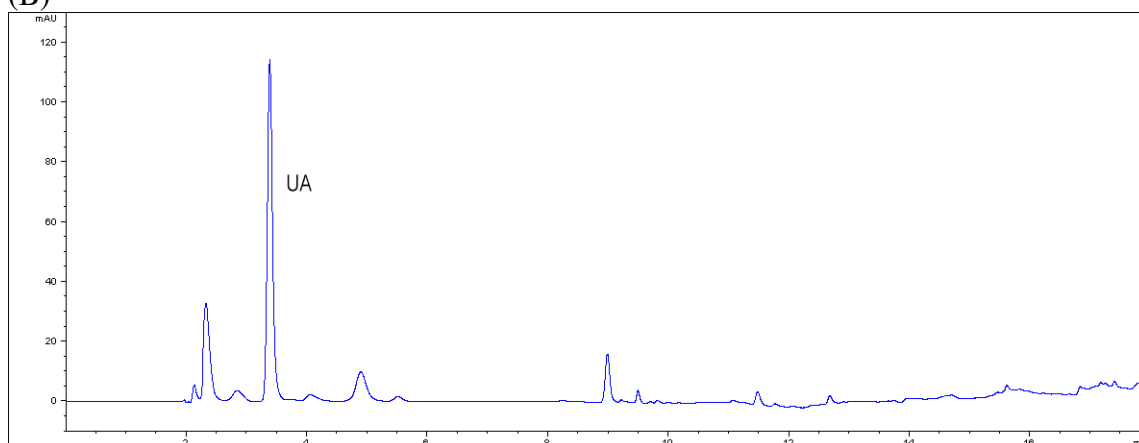
njihovog retencionih vremena sa onim čistih standarda a dodatna karakterizacija je izvršena analizom apsorpcionog spektra svakog hromatografskog pika.

SLIKA 2. HPLC-DAD hromatogram mokracne kiseline: (A) kontrole (K4), (B) hipertenzivnog pacijenta (HR4) i (C) pacijenta na dijalizi (RD18)

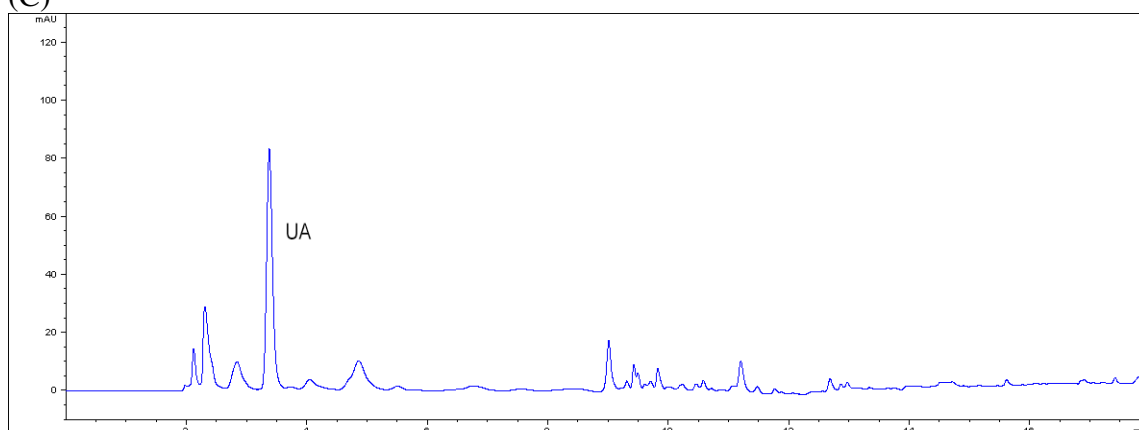
(A)



(B)



(C)



Hromatografska separacija je postignuta na koloni Zorbax Extended C18 (4.6mm x 250mm, 5 $\mu$ m), pomoću linearnog gradijenta dve mobilnefaze: fosfatnogpufera(50 mM,

pH6) i metanola. *UA* je proučena pomoću diode array detektora (DAD) pri fiksnoj talasnoj dužini od 280nm. *UA* je identifikovana poređenjem retencionog vremena standarda sa onim iz uzoraka a dodatna karakterizacija je izvršena analizom apsorpcionog spektra hromatografskog pika.

### 7.3. Vrednosti azotnih produkata i mokraćne kiseline u ispitivanim grupama

Vrednosti azotnih produkata i mokraćne kiseline u ispitivanim grupama bolesnika prikazane su u Tabeli 10.

**Tabela 10. Vrednosti azotnih produkata i mokraćne kiseline u ispitivanim grupama bolesnika**

	Kontrola	Hipertenzija	Dijaliza	Total
UA	218,9±57,0 <sup>b</sup> (187,3-250,5)	269,4±78,1 <sup>b</sup> (240,2-298,6)	408,5±96,6 (371,0-446,0)	312,4±113,0 (286,0-338,8)
Urea	4,41±0,67 <sup>b</sup> (4,04-4,78)	6,11±1,96 <sup>b</sup> (5,38-6,85)	36,2±6,0 (33,8-38,5)	17,3±15,5 (13,6-20,9)
Kreatinin	71,9±7,9 <sup>b</sup> (67,5-76,3)	88,2±22,9 <sup>b</sup> (79,6-96,8)	860,8±132,2 (809,5-912,1)	381,2±389,7 (290,2-472,1)

Podaci su prikazani kao srednja vrednost±SD (95%CI za srednju vrednost); ANOVA: post hoc  $p < 0,01$  naspram dijaliza;

Vrednosti ureje, mokraćne kiseline i kreatinina bile su slične u kontrolnoj i grupi bolesnika sa arterijskom hipertenzijom, ali su bile značajno veće kod bolesnika na hemodijalizi (Tabela 10).

### 7.4. Vrednosti derivata oksidativne modifikacije proteina AOPP i MDA u ispitivanim grupama bolesnika

Vrednosti derivata oksidativne modifikacije proteina AOPP i MDA u ispitivanim grupama bolesnika prikazane su u Tabeli 11.

**Tabela 11. Derivati oksidativne modifikacije proteina**

	kontrola	Hipertenzija	Dijaliza	Total
AOPP	185,2±58,0 <sup>a</sup> (157,2-213,2)	290,4±86,0 (252,2-328,5)	199,3±107,0 <sup>a</sup> (161,7-236,4)	222,3±100,0 (199,3-245,4)
MDA	2.98±0.80 <sup>b</sup> (2.62-3.33)	3.32±0.85 <sup>b</sup> (3.00-3.64)	4.02±0.93 (3.68-4.37)	3.49±0.96 (3.27-3.70)

Podaci su prikazani kao srednja vrednost±SD (95%CI za srednju vrednost); AOPP-uznapredovali produkti oksidacije proteina; MDA-malondialdehid; ANOVA: post hoc ap<0,01 naspram hipertenzija; bp<0,01 naspram dijaliza

Urađena analiza pokazala je postojanje značajnih razlika u vrednostima derivata oksidativne modifikacije proteina AOPP i MDA između ispitivanih grupa. Vrednosti AOPP bile su značajno najveće u bolesnika sa hipertenzijom u odnosu na kontrolnu i grupu bolesnika na dijalizi. Vrednosti MDA kao produkta lipidne peroksidacije bile su značajno veće kod bolesnika na hroničnom programu hemodijalize u odnosu na kontrolnu i grupu bolesnika sa esencijalnom hipertenzijom. (Tabela 11).

Aktivnost enzima metabolizma ksantina i nukleinskih kiselina u ispitivanim grupama bolesnika prikazane su u Tabeli 12.

**Tabela 12. Enzimi metabolizma ksantina i nukleinskih kiselina**

	Kontrolna	hipertenzija	Dijaliza	Total
ksantin oksidaza	42,5±14,7 (35,4-49,6)	69,5±10,7** (64,7-74,3)	73,2±18,1** (67,0-79,4)	64,5±19,9 (59,9-69,0)
ksantin oksidoreduktaza	123,1±24,0 (111,5-134,7)	169,1±36,9** (152,7-185,4)	145,3±38,6 (131,8-158,8)	146,6±38,5 (137,8-155,5)
ksantin dehidrogenaza	80,6±25,7** (68,2-93,0)	106,1±18,3 (97,8-114,4)	72,5±35,7** (59,8-85,2)	84,3±32,1 (76,8-91,8)

Podaci su prikazani kao srednja vrednost±SD (95%CI za srednju vrednost);

ANOVA: \*\*p<0,01 naspram kontrola, &&p<0,01 naspram hipertenzija

Aktivnost ksantin oksidaze bila je slična u grupama bolesnika sa hipertenzijom i na dijalizi, dok je aktivnost u kontrolnoj grupi bila značajno manja u odnosu na druge grupe. Vrednosti ksantin oksidoreduktaze bile su slične u kontrolnoj i grupi bolesnika

na dijalizi dok su kod bolesnika sa hipertenzijom bile značajno veće u odnosu na druge grupe. Aktivnost ksantin dehidrogenaze bila je slična u kontrolnoj i grupi bolesnika na hemodijalizi dok je u grupi sa hipertenzijom bila značajno veća nego u ostale dve grupe (Tabela 12).

Aktivnost enzima uključenih u metabolizam nukleinskih kiselina kod ispitivanih grupa bolesnika prikazana je u Tabeli 13.

**Tabela 13. Enzimi metabolizma nukleinskih kiselina**

	Kontrola	hipertenzija	dijaliza	Total
adenozin dezaminaza	37,7±21,8 (25,1-50,4)	50,1±32,5 (35,3-65,0)	41,4±28,4 (31,5-51,3)	43,3±28,6 (36,4-50,2)
5nt	278,0±249,9 (126,9-429,0)	213,8±164,0 (132,3-295,4)	126,0±137,3 (55,4-196,6)	200,1±189,3 (145,1-255,1)
5nt / adenzin dezaminaza	7.374*	4.267	3.043	4.621

Podaci su prikazani kao srednja vrednost±SD (95%CI za srednju vrednost);

ANOVA: post hoc \*p<0.05 naspram ostale grupe

Učinjena analiza podataka pokazuje da između ispitivanih grupa bolesnika ne postoji statistički značajna razlika u vrednostima adenzin dezaminaze i 5prim nukleotidaze, ali je potvrđena značajno manja vrednosti njihovog odnosa kod bolesnika sa hipertenzijom i hroničnom bubrežnom insuficijencijom (Tabela 13).



## 7.5 Povezanost adenilnih nukleotida i njihovih indeksa sa biohemijskim parametrima

### Korelaciona analiza u kontrolnoj grupi

Povezanost adenilnih nukleotida i njihovih indeksa sa ispitivanim enzimima metabolizma ksantina, nukleinskih kiselina i adenzina kao i sa vrednostima krvnog pritiska i azotnim produktima u kontrolnoj grupi bolesnika prikazana je u Tabeli 14, pri čemu su parcijalni korelacioni koeficijenti kontrolisani prema polu i starosti bolesnika.

**Tabela 14. Povezanost adenilnih nukleotida i njihovih indeksa sa ispitivanim enzimima metabolizma ksantina i mokraćnom kiselinom u kontroli**

	UA	ksantin oksidaza	ksantin oksidoreduktaza	ksantin dehidrogenaza
ATP	0,312	0,225	-0,194	-0,310
ADP	0,356	0,148	<b>-0,641*</b>	<b>-0,667**</b>
AMP	0,262	0,128	-0,202	-0,259
AEC	-0,232	-0,012	<b>0,552*</b>	0,506
ATP/ADP	-0,311	-0,056	<b>0,535*</b>	0,517
ATP/UA	<b>-0,815**</b>	0,117	-0,038	-0,104
ADP/UA	-0,480	0,135	<b>-0,606*</b>	<b>-0,628*</b>
UA	-	0,026	-0,004	-0,019

Parcijalni linearni korelacioni koeficijent prilagodjen prema polu i starosti: \*\*p<0.01

Učinjena parcijalna korelaciona analiza prilagođena prema polu i starosti bolesnika pokazuje da postoji značajna i jaka negativna korelacija između vrednosti mokraćne kiseline i odnosa ATP/UA (C=-0.815, p<0.01) u kontroli. Slična značajna negativna korelacija, ali nešto slabijeg intenziteta, postoji između aktivnosti ksantin oksidoreduktaze i ksantin dehidrogenaze sa ADP (C=-0.641, p<0.05 i C=-0.667, p<0.01) i sa odnosom ADP/UA (C=-0.606, p<0.05 i C=-0.628, p<0.015). Značajna pozitivna korelacija registrovana je između aktivnosti ksantin oksidoreduktaze i vrednosti AEC i odnosa ATP/ADP (C=0.552, p<0.05 i C=0.535, p<0.05) (Tabela 14).

Povezanost adenilnih nukleotida i njihovih indeksa sa azotnim produktima i krvnim pritiskom u kontrolnoj grupi prikazana je u Tabeli 15.

**Tabela 15. Povezanost adenilnih nukleotida i njihovih indeksa sa azotnim produktima i krvnim pritiskom u kontrolnoj grupi**

	urea	Kreat	Sist	Dija
ATP	-0,342	0,009	-0,146	0,289
ADP	-0,409	-0,050	-0,058	0,004
AMP	<b>-0,522*</b>	0,083	-0,131	-0,036
AEC	0,277	0,084	0,010	0,215
ATP/ADP	0,290	0,148	0,076	0,174
ATP/UA	-0,018	0,087	0,190	0,197
ADP/UA	-0,248	-0,004	0,216	0,038
UA	-0,152	-0,078	-0,215	0,010

Parcijalni linearni korelacioni koeficijent prilagodjen prema polu i starosti: \*\*p<0.01

Učinjena parcijalna korelaciona analiza prilagođena prema polu i starosti bolesnika pokazuje da postoji značajna negativna korelacija između vrednosti ureje i AMP (C=-0.522, p<0.05) u kontrolnoj grupi (Tabela 15).

Povezanost adenilnih nukleotida i njihovih indeksa sa AOPP i enzimima metabolizma nukleinskih kiselina u kontrolnoj grupi prikazana je u Tabeli 16.

**Tabela 16. Povezanost adenilnih nukleotida i njihovih indeksa sa AOPP, MDA i enzimima metabolizma nukleinskih kiselina u kontroli**

	uznapredovali produkti oksidacije proteina	MDA	adenozin dezaminaza	5nt
ATP	0,028	-0.085	0,018	-0,285
ADP	-0,402	0.055	0,014	-0,393
AMP	<b>-0,569*</b>	0.001	0,105	-0,319
AEC	<b>0,582*</b>	-0.129	-0,008	0,277
ATP/ADP	<b>0,626*</b>	-0.091	-0,031	0,290
ATP/UA	0,380	0.280	0,342	0,068
ADP/UA	-0,164	0.028	0,262	-0,147
UA	-0,311	-0.361	-0,250	-0,373

MDA-malondialdehid; Parcijalni linearni korelacioni koeficijent prilagodjen prema polu i starosti: \*\*p<0.01

Učinjena parcijalna korelaciona analiza prilagođena prema polu i starosti bolesnika pokazuje da postoji značajna negativna korelacija između vrednosti uznapredovalih produkata oksidacije proteina i AMP ( $C=-0.5569$ ,  $p<0.05$ ) kao i pozitivna sa vrednostima AEC i odnosom ATP/ADP u kontrolnoj grupi ( $C=0.582$ ,  $p<0.05$  i  $C=-0.626$ ,  $p<0.05$ ). Nije nađena značajna korelacija sa završnim produktima lipidne peroksidacije (Tabela 16).

### Korelaciona analiza u grupi bolesnika sa hipertenzijom

Povezanost adenilnih nukleotida i njihovih indeksa sa ispitivanim enzimima metabolizma ksantina, nukleinskih kiselina i adenzina kao i sa vrednostima krvnog pritiska i azotnim produktima u grupi bolesnika sa hipertenzijom prikazana je u Tabeli 17, pri čemu su parcijalni korelacioni koeficijenti kontrolisani prema polu i starosti bolesnika.

**Tabela 17. Povezanost adenilnih nukleotida i njihovih indeksa sa ispitivanim enzimima metabolizma ksantina i mokraćnom kislinom kod hipertenzivnih bolesnika**

	UA	ksantin oksidaza	ksantin oksidoreduktaza	ksantin dehidrogenaza
ATP	-0,039	0,386	0,159	-0,078
ADP	<b>-0,401*</b>	0,000	0,042	-0,022
AMP	0,243	0,117	0,156	-0,073
AEC	0,173	0,344	0,063	-0,018
ATP/ADP	0,188	0,320	0,166	0,043
ATP/UA	<b>-0,675**</b>	0,145	0,332	0,148
ADP/UA	<b>-0,469*</b>	-0,184	0,188	0,119
UA		0,229	-0,338	-0,245

Parcijalni linearni korelacioni koeficijent prilagodjen prema polu i starosti: \*\* $p<0.01$

Učinjena parcijalna korelaciona analiza prilagođena prema polu i starosti bolesnika pokazuje da postoji značajna negativna korelacija između vrednosti mokraćne kiseline sa vrednostima ADP, odnosom ATP/UA i ADP/UA ( $C=-0.401$ ,

$p < 0.05$ ,  $C = -0.675$ ,  $p < 0.01$  i  $C = -0.469$ ,  $p < 0.05$ ) u grupi bolesnika sa hipertenzijom (Tabela 12).

Povezanost adenilnih nukleotida i njihovih indeksa sa azotnim produktima i krvnim pritiskom u bolesnika sa arterijskom hipertenzijom prikazana je u Tabeli 18.

**Tabela 18. Povezanost adenilnih nukleotida i njihovih indeksa sa azotnim produktima i krvnim pritiskom kod hipertenzivnih bolesnika**

	Urea	kreat	Sist	Dija
ATP	0,264	0,281	0,093	-0,112
ADP	<b>0,637**</b>	<b>0,414*</b>	0,243	-0,108
AMP	-0,361	-0,244	-0,230	-0,301
AEC	-0,150	-0,039	-0,067	0,140
ATP/ADP	<b>-0,555**</b>	<b>-0,396*</b>	<b>-0,381*</b>	-0,086
ATP/UA	0,320	0,042	0,012	-0,303
ADP/UA	<b>0,557**</b>	<b>0,498**</b>	0,232	0,140
UA	-0,226	-0,070	0,066	0,304

Parcijalni linearni korelacioni koeficijent prilagodjen prema polu i starosti: \*\* $p < 0.01$

Učinjena parcijalna korelaciona analiza prilagođena prema polu i starosti bolesnika pokazuje da postoji značajna negativna korelacija između vrednosti ureje, kreatinina i sistolnog krvnog pritiska sa odnosom ATP/ADP ( $C = -0.555$ ,  $p < 0.01$ ,  $C = -0.396$ ,  $p < 0.05$  i  $C = -0.381$ ,  $p < 0.05$ ). Značajna pozitivna korelacija nađena je između vrednosti ureje i kreatinina sa ADP ( $C = 0.637$ ,  $p < 0.01$  i  $C = -0.414$ ,  $p < 0.05$ ) kao i sa vrednostima ADP/UA ( $C = -0.557$ ,  $p < 0.01$  i  $C = 0.498$ ,  $p < 0.01$ ) u grupi bolesnika sa arterijskom hipertenzijom (Tabela 18).

Povezanost adenilnih nukleotida i njihovih indeksa sa AOPP i enzimima metabolizma nukleinskih kiselina u kontrolnoj grupi prikazana je u Tabeli 19.

**Tabela 19. Povezanost adenilnih nukleotida i njihovih indeksa sa AOPP, MDA i enzimima metabolizma nukleinskih kiselina u hipertenzivnih bolesnika**

	uznapredovali produkti oksidacije proteina	MDA	adenozin dezaminaza	5nt
ATP	0,128	-0.206	-0,393	0,031
ADP	-0,040	0.011	-0,221	0,238
AMP	0,102	-0.058	-0,423	0,071
AEC	0,091	-0.136	-0,058	-0,310
ATP/ADP	0,065	-0.089	-0,138	-0,233
ATP/UA	-0,023	-0.046	-0,279	-0,157
ADP/UA	-0,131	-0.012	-0,185	0,103
UA	0,187	0.235	0,059	0,117

MDA-malondialdehid; Parcijalni linearni korelacioni koeficijent prilagodjen prema polu i starosti:

Učinjena statistička analiza nije pokazala postojanje značajnije korelacije između vrednosti adenilnih nukleotida i njihovih indeksa sa AOPP, MDA i enzimima metabolizma nukleinskih kiselina u hipertenzivnih bolesnika (Tabela 19).

### **Korelaciona analiza u grupi bolesnika na dijalizi**

Povezanost adenilnih nukleotida i njihovih indeksa sa ispitivanim enzimima metabolizma ksantina, nukleinskih kiselina i adenzina kao i sa vrednostima krvnog pritiska i azotnim produktima u grupi bolesnika na hemodijalizi prikazana je u Tabeli 20, pri čemu su parcijalni korelacioni koeficijenti kontrolisani prema polu i starosti bolesnika.

**Tabela 20. Povezanost adenilnih nukleotida i njihovih indeksa sa ispitivanim enzimima metabolizma ksantina i mokraćnom kislinom kod bolesnika na dijalizi**

	UA	ksantin oksidaza	ksantin oksidoreduktaza	ksantin dehidrogenaza
ATP	<b>0,555**</b>	-0,249	-0,292	-0,179
ADP	0,235	-0,019	-0,308	-0,174
AMP	0,299	-0,110	-0,267	-0,145
AEC	<b>0,496**</b>	-0,228	-0,143	-0,080
ATP/ADP	<b>0,539**</b>	-0,291	-0,159	-0,091
ATP/UA	-0,050	-0,136	-0,278	-0,131
ADP/UA	<b>-0,626**</b>	0,123	-0,167	-0,052
UA	-	-0,191	-0,148	-0,157

Parcijalni linearni korelacioni koeficijent prilagodjen prema polu i starosti: \*\* $p < 0.01$

Učinjena parcijalna korelaciona analiza prilagođena prema polu i starosti bolesnika pokazuje da postoji značajna pozitivna korelacija između vrednosti mokraćne kiseline sa vrednostima ATP, AEC i ATP/ADP ( $C=0.555$ ,  $p < 0.01$ ,  $C=0.496$ ,  $p < 0.01$  i  $C=0.539$ ,  $p < 0.01$ ) u grupi bolesnika na hemodijalizi. Ujedno registrovana je značajna negativna korelacija vrednosti mokraćne kiseline sa odnosom ADP/UA ( $C=-0.626$ ,  $p < 0.01$ ) (Tabela 20).

Povezanost adenilnih nukleotida i njihovih indeksa sa azotnim produktima i krvnim pritiskom kod bolesnika na hemodijalizi prikazana je u Tabeli 21.

**Tabela 21. Povezanost adenilnih nukleotida i njihovih indeksa sa azotnim produktima i krvnim pritiskom kod bolesnika na dijalizi**

	urea	Kreat	Sist	Dija
ATP	0,275	0,019	-0,012	-0,052
ADP	0,184	-0,165	0,211	<b>0,386*</b>
AMP	0,323	-0,015	0,149	<b>0,449*</b>
AEC	0,130	0,084	-0,148	-0,285
ATP/ADP	0,265	0,153	-0,126	-0,216
ATP/UA	0,001	-0,274	-0,159	0,064
ADP/UA	-0,178	<b>-0,405*</b>	-0,037	0,342
UA	<b>0,444*</b>	0,374	0,196	-0,043

Parcijalni linearni korelacioni koeficijent prilagodjen prema polu i starosti: \*\* $p < 0.01$

Učinjena parcijalna korelaciona analiza prilagođena prema polu i starosti bolesnika pokazuje da postoji značajna pozitivna korelacija između vrednosti dijastolnog krvnog pritiska sa ADP i AMP ( $C=0.386$ ,  $p < 0.05$ ,  $C=0.449$ ,  $p < 0.05$ ). Značajna pozitivna korelacija nađena je i između vrednosti ureje sa mokraćnom kiselinom ( $C=0.444$ ,  $p < 0.05$ ). Postoji i značajna negativna korelacija vrednosti kreatinina sa odnosom ADP/UA ( $C=-0.405$ ,  $p < 0.05$ ) u grupi bolesnika na programu hemodijalize (Tabela 21).

Povezanost adenilnih nukleotida i njihovih indeksa sa AOPP, MDA i enzimima metabolizma nukleinskih kiselina u kontrolnoj grupi prikazana je u Tabeli 22.

**Tabela 22. Povezanost adenilnih nukleotida i njihovih indeksa sa AOPP, MDA i enzimima metabolizma nukleinskih kiselina u bolesnika na dijalizi**

	uznapredovali produkti oksidacije proteina	MDA	adenozin dezaminaza	5nt
ATP	0,358	0.210	-0,190	-0,052
ADP	0,205	0.260	-0,090	0,270
AMP	0,280	0.425**	-0,198	0,102
AEC	0,304	0.014	-0,120	-0,190
ATP/ADP	0,332	0.016	-0,183	-0,257
ATP/UA	0,356	0.321	-0,245	-0,102
ADP/UA	0,111	0.214	-0,110	0,093
UA	0,018	-0.159	0,038	0,094

MDA-malondialdehid; Parcijalni linearni korelacioni koeficijent prilagodjen prema polu i starosti: \*\*p<0.01

Učinjena parcijalna korelaciona analiza prilagođena prema polu i starosti bolesnika pokazuje da postoji značajna pozitivna korelacija između vrednosti MDA i koncentracije AMP (C=0.425, p<0.01). Ostali parametri nisu pokazali takvu značajnu povezanost (Tabela 22).

## **7.6. Značaj adenilatnog energetskog naboja i metabolizma mokraćne kiseline za pojavu hipertenzije**

Povezanost adenilnih nuklotida, njihovih indeksa, azotnih produkata, mokraćne kiseline i enzima metabolizma ksantina i nukleinskih kiselina sa prisustvom arterijske hipertenzije analiziran je u binarnom regresionom modelu (Enter model) pri čemu su u analizu uključene kontrolna i grupa bolesnika sa arterijskom hipertenzijom.

Povezanost opštih karakteristika bolesnika sa prisustvom arterijske hipertenzije dato je u Tabeli 23.



**Tabela 23. Povezanost opštih karakteristika bolesnika sa prisustvom hipertenzije**

	B	S.E.	df	Sig.	Exp(B)	95.0% C.I. for EXP(B)	
						Lower	Upper
Starost	0.010	0.005	1	0.059	0.798	0.751	0.770
Pol	0.702	0.329	1	0.055	1.912	0.811	4.512
Constant	-0.916	0.315	1	0.003			

Zavisna varijabla arterijska hipertenzija, NS za sve parametre

Učinjena analiza binarnom regresijom (Enter model) nije pokazala značajniju povezanost starosti i pola bolesnika sa prisustvom arterijske hipertenzije (Tabela 23).

Povezanost koncentracija cirkulišućih adenilnih nukleotida sa prisustvom hipertenzije prikazana je u Tabeli 24.

**Tabela 24. Povezanost koncentracija cirkulišućih adenilnih nukleotida sa prisustvom hipertenzije**

	B	S.E.	Df	Sig.	Exp(B)	95.0% C.I. for EXP(B)	
						Lower	Upper
ATP	-0.030	0.016	1	0.063	0.970	0.940	1.002
ADP	0.006	0.003	1	0.071	1.006	0.999	1.013
AMP	2.130	21.535	1	0.992	8.417	0.002	12.350
Constant	21.022	10.529	1	0.066	13.489		

Zavisna varijabla arterijska hipertenzija, NS za sve parametre

Učinjena analiza binarnom regresijom (Enter model) nije pokazala značajniju povezanost koncentracija cirkulišućih adenilnih nukleotida sa prisustvom arterijske hipertenzije (Tabela 24).

Povezanost vrednosti azotnih produkata i mokraćne kiseline sa prisustvom arterijske hipertenzije prikazana je u Tabeli 25.

**Tabela 25. Prediktivni značaj azotnih produkata i mokraćne kiseline za prisustvo arterijske hipertenzije**

	B	S.E.	df	Sig.	Exp(B)	95.0% C.I. for EXP(B)	
						Lower	Upper
UA	0.013	0.006	1	0.038	1.013	1.001	1.026
Urea	0.936	0.438	1	0.033	2.549	1.080	6.016
Kreat	0.065	0.047	1	0.167	1.067	0.973	1.169
Constant	-12.220	4.202	1	0.004	0.000		

Zavisna varijabla arterijska hipertenzija

Učinjena analiza binarnom regresijom (Enter model) je pokazala značajnu pozitivnu povezanost koncentracija mokraćne kiseline i ureje sa prisustvom arterijske hipertenzije Exp(B) 1.01 (95%CI 1.001-1.026) i Exp(B) 2.54 (95%CI 1.080-6.016). Ostali indeksi nisu imali značajniji prediktivni potencijal (Tabela 25).

Povezanost vrednosti adenilatnih indeksa sa prisustvom arterijske hipertenzije prikazana je u Tabeli 26.

**Tabela 26. Prediktivni značaj vrednosti adenilatnih indeksa za prisustvo arterijske hipertenzije**

	B	S.E.	Df	Sig.	Exp(B)	95.0% C.I. for EXP(B)	
						Lower	Upper
AEC	-3.335	2.213	1	0.061	0.075	0.050	1.218
ATP/ADP	-5.065	2.571	1	0.049	0.060	0.001	0.975
ATP/UA	-1.077	0.323	1	0.001	0.341	0.181	0.642
ADP/UA	-1.246	0.403	1	0.0712	0.626	0.625	1.025
Constant	16.918	8.337	1	0.042	22.267		

Zavisna varijabla arterijska hipertenzija

Učinjena analiza binarnom regresijom (Enter model) je pokazala značajnu negativnu prediktivnu vrednost odnosa ATP/ADP i ATP/UA sa prisustvom arterijske hipertenzije Exp(B) 0.06 (95%CI 0.001-0.975) i Exp(B) 0.34 (95%CI 0.181-0.642). Ostali indeksi nisu imali značajniji prediktivni potencijal (Tabela 26).

Povezanost vrednosti derivata oksidativne modifikacije proteina MDA sa prisustvom arterijske hipertenzije prikazana je u Tabeli 27.

**Tabela 27. Prediktivni značaj derivata oksidativne modifikacije proteina za prisustvo arterijske hipertenzije**

	B	S.E.	Df	Sig.	Exp(B)	95.0% C.I. for EXP(B)	
						Lower	Upper
Aopp	0.023	0.008	1	0.004	1.023	1.007	1.039
MDA	0.526	0.365	1	0.149	1.69	0.828	3.459
Constant	-4.695	1.732	1	0.007	0.009		

AOPP-derivati oksidativne modifikacije proteina, MDA-malondialdehid; Zavisna varijabla: arterijska hipertenzija. Učinjena analiza binarnom regresijom (Enter model) je pokazala značajnu pozitivnu prediktivnu vrednost derivata oksidativne modifikacije proteina sa prisustvom arterijske hipertenzije Exp(B) 1.023 (95%CI 1.007-1.039) (Tabela 27).

Povezanost aktivnosti enzima metabolizma ksantina sa prisustvom arterijske hipertenzije prikazana je u Tabeli 28.

**Tabela 28. Prediktivni značaj enzima metabolizma ksantina za prisustvo arterijske hipertenzije**

	B	S.E.	df	Sig.	Exp(B)	95.0% C.I. for EXP(B)	
						Lower	Upper
ksantin oksidaza	0.158	0.066	1	0.017	1.171	1.029	1.332
ksantin oksidoreduktaza	0.231	0.096	1	0.065	1.710	0.952	1.945
ksantin dehidrogenaza	0.382	0.160	2	0.089	2.834	0.490	2.223
Constant	-8.056	3.886	1	0.038	0.000		

Zavisna varijabla arterijska hipertenzija

Učinjena analiza binarnom regresijom (Enter model) je pokazala značajnu pozitivnu prediktivnu vrednost aktivnosti kasantin oksidaze sa prisustvom arterijske hipertenzije  $\text{Exp}(B)$  1.171 (95%CI 1.029-1.332). Ostali parametri nisu imali značajniji prediktivni potencijal (Tabela 28).

Povezanost aktivnosti enzima metabolizma nukleinskih kiselina sa prisustvom arterijske hipertenzije prikazana je u Tabeli 29.

**Tabela 29. Prediktivni značaj enzima metabolizma nukleinskih kislina za prisustvo arterijske hipertenzije**

	B	S.E.	Df	Sig.	Exp(B)	95.0% C.I. for EXP(B)	
						Lower	Upper
5nt	-0.006	0.004	1	0.129	0.994	0.987	1.002
adenozin dezaminaza	0.019	0.028	1	0.481	1.020	0.966	1.077
Constant	-8.056	3.886	1	0.038	0.000		

Zavisna varijabla arterijska hipertenzija

Učinjena analiza binarnom regresijom (Enter model) nije pokazala značajnu prediktivnu vrednost ovih enzima sa prisustvom arterijske hipertenzije (Tabela 29).

## 8. DISKUSIJA

Esencijalna hipertenzija je savremena bolest čovečanstva, koja usled specifičnih uslova života sve više pogađa mlađu populaciju. I pored velikog napretka farmaceutskih preparata u lečenju esencijalne hipertenzije, često je loše regulisana. Intenzivno se traga za svim faktorima koji mogu posredovati tome. Koncentracija i metabolizam adenilnih nukleotida (ATP, ADP, AMP, adenzina, hipoksantina, ksantina i mokraćne kiseline) zavisi od stepena oslobađanja i stepena katabolizma. Količina i vrsta nukleotida i nukleozida u cirkulaciji zavise od stepena simpatičke stimulacije, hipoksije i oštećenja tkiva, a katabolizam je u direktnoj vezi sa enzimima koji ih proizvode.

Analiza osnovnih karakteristika bolesnika i ispitanika koji su uključeni u ovo istraživanje nije pokazala postojanje značajnije razlike u polnoj distribuciji i prosečnoj starosti ispitivanih bolesnika, čime su se stekli uslovi dobre polne i starosne homogenizacije bolesnika, a sve u cilju lakše obrade i interpretacije rezultata. Prosečne vrednosti sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska kretale su se u opsegu rezultata nađenih kod bolesnika sličnih karakteristika uključenih u druga istraživanja (172). Karakteristična razlika između grupa u vrednostima dijastolnog krvnog pritiska takođe je potvrđena i u drugim sličnim istraživanjima i predstavlja karakterističan klinički nalaz na velikoj populaciji ispitivanih bolesnika(173).

### 8.1. Poremećaji adenilnih nukleotida i adenilatnog energetskog naboja u ispitivanim grupama

Učinjena statistička obrada pokazala je da su vrednosti cirkulišućih adenilnih nukleotida značajno različite u ispitivanim grupama bolesnika. Vrednosti ATP-a bile su značajno manje u grupama bolesnika sa hipertenzijom i dijalizom u odnosu na kontrolnu. Vrednosti ADP bile su značajno manje u grupi bolesnika sa hipertenzijom i kontrolnoj u odnosu na grupu bolesnika na hemodijalizi. Vrednosti AMP su pokazale

najveće intergrupne varijacije i bile su značajno najmanje u kontrolnoj grupi i značajno najveće kod bolesnika na programu hemodijalize (Tabela 3).

Vrednosti AEC, odnosa ATP/ADP i ATP/UA bile su značajno različite između ispitivanih grupa bolesnika. Učinjenja statistička analiza pokazala je postojanje značajnih medjgrupnih varijacija u vrednostima ispitivanih indeksa. Vrednosti AEC, ATP/ADP i ATP/UA bile su najveće u kontrolnoj grupi i najmanje kod bolesnika na dijalizi. Odnos ADP/UA bio je sličan u kontrolnoj i grupi sa hipertenzijom, a najveći u grupi bolesnika na dijalizi (Tabela 4).

Istraživanja u ovoj tezi su bila usmerena na praćenje nivoa ATP, ADP i AMP od nukleotida u cirkulaciji. Metoda određivanja ovih nukleotida u cirkulaciji je visoko senzitivna, a zahteva sveže uzorke, visoko sofisticiranu metodologiju, pa je stoga zahtevna i nije aplikabilna za standardne kliničkolaboratorijske uslove, kao što je i opisano u radovima Gormana i sar. (41), Harknessa i sar (42), Fariasa i sar. (43). U dostupnoj literaturi zato ima relativno malo podataka o tome kako se njihove vrednosti kreću u različitim kliničkim stanjima, uprkos velikoj farmakološkoj aktivnosti.

ATP je ubikvitarni nukleozid trifosfat, koji predstavlja osnovno makroenergetsko jedinjenje u ćeliji. Stvara se u aerobnim uslovima u mitohondrijama u procesu ćelijskog disanja, tj respiratornog lanca, a oslobađa se i iz nekih reakcija kao što je glikoliza direktno na nivou supstrata (28-37).

ATP se oslobađa u cirkulaciju iz više izvora: to su agregirali trombociti, endotel, simpatikusni nervni sistem i adrenalna medula. U manjem stepenu se može osloboditi i iz glatkomišićnih ćelija, poprečnoprugastih mišića u toku intenzivnog fizičkog napora, kao i iz ishemičnog miokarda. Stimulusi za povećano oslobađanje ATP su mehanički (“shear”) stres, što inače postoji u hipertenziji, kao i stimulacija simpatikusa, dakle čak i provocirana stresom (38-52). Može se oslobađati i simultano, u toku oslobađanja serotonina i dopamina u nervnom tkivu, noradrenalina iz simpatikusa ili acetil holina iz parasimpatikusa. Nervi koji ga “prepoznaju” kao transmitter označeni su kao purinergički nervni sistem. Postoje dva osnovna tipa receptora i to su P1 i P2, koji pokazuju različit stepen senzitivnosti na nukleotide i nukleozide. Naime, P1 receptori pokazuju sledeću senzitivnost adenzin>ATP>ADP>AMP. Sa druge strane, senzitivnost P2 receptora je sledeća:

ATP>ADP>AMP>adenozin. Ukoliko pođemo od poznate činjenice da u cirkulaciji je potrebno i moguće delovanje P<sub>2</sub> receptora, jasno je da mala bioraspoloživost ATP ukazuje da endotel, inače oštećen, ne može da kompenzuje nedostatak ATP tako što će ispoljavati efekte njegovi derivati razgradnje (31,33,34,46-48).

Delovanje ATP na konstrikciju i vazodilataciju u cirkulaciji je dvostruko, zavisno da li se odnosi na P<sub>2X</sub> ili P<sub>2Y</sub> receptore. Ali krajnji ishod kod zdravih ispitanika kojima je eksperimentalno davan ATP intravenski je vazodilatacija. Ovaj ishod je ipak kod pacijenata sa aterosklerozom i endotelnom disfunkcijom i hiperkoagulabilnošću značajno kompromitovan. Naime, P<sub>2X</sub> purinoreceptori su locirani u glatkomišićnim ćelijama, a efekat im je kontrakcija, tj sledstvena vazokonstrikcija. Za razliku od njih, P<sub>2Y</sub> purinoreceptori su locirani u endotelu, amanjim delom u glatkomišićnim ćelijama i efekat je vazodilatacija. Nedavno su izolovani u endotelu u manjem stepenu i P<sub>2X</sub> purinoreceptori, ali njihov efekat je vezan za regulaciju adhezije i endotelne permeabilnosti, a manje u vazodilataciji indukovanoj mehaničkim stresom. P<sub>2X</sub> purinoreceptori su "jonotropni" tj jonski kanali koji omogućavaju transport katjona, dok su P<sub>2Y</sub> purinoreceptori „metabotropni”, jer se aktiviraju preko G proteina, fosfolipaze C i adenil ciklaze. P<sub>2Y</sub> purinoreceptori su posebno značajni u toku agregacije trombocita, pa je tako jedan od lekova koji ih inhibira klopidogrel. Podaci koji su značajni za ovo istraživanje su da ukoliko se radi o oštećenom endotelu tj. endotelnoj disfunkciji, onda preostaju samo efekti vazospazma. To se odnosi i na mesta gde se formiraju trombi. Naime, efekti ATP na glatkomišićne ćelije označeni su kao intesticijalni i mogući su samo ako ATP može da prođe normalno intaktni endotel. Na osnovu rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da je alarmantni pad ATP prisutan već kod pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom i ukoliko se nadoveže na to dokumentovana endotelna disfunkcija, logično je očekivati da je rezultanta delovanja vazokonstrikcija. Drugi mehanizam dolaska ATP na mesto glatkomišićnih ćelija je oslobađanje iz perivaskularnog simpatikusnog nervnog sistema. Ukoliko se pođe od poznatog podatka da u hipertenziji postoji povećana simpatikusna stimulacija, onda je jasno da će u hipertenziji preovladavati perivaskularni „intesticijalni” efekti ATP nad endotelnim, što kao rezultantu ima vazokonstrikciju. Ovome treba dodati i treću otežavajuću komponentu, a to je oslobađanje ATP iz agregiranih trombocita, na koj način se upotpunjuje nepoželjni efekat ATP, čak i ako ga ima u cirkulaciji, na terenu endotelne

disfunkcije i agregacije trombocita. To je tipično za aterosklerotične procese. Jedini kompenzatorni mehanizam je oslobađanje NO, koji se oslobađa u toku stimulacije P<sub>2Y</sub> purinoreceptora iz endotela (39-54).

Adenilatni energetska naboj je veoma senzitivna parametar metaboličkih oscilacija u ćeliji, a reperkutuje se i na perifernom, cirkulatornom nivou. Kada su u pitanju kompenzatorni mehanizmi, održavanje ATP i ADP na nekom zadovoljavajućem nivou je neophodno da bi se osnovne ćelijske, odnosno fiziološke funkcije odvijale. Ovaj nivo je neophodan za održavanje mišićne kontrakcije, motiliteta i jonskog transporta. Ukoliko se prati alteracija adenilatnog energetska naboja u ispitivanim grupama, jasno je da se na osnovu ovog pada može s pravom sumnjati u efektivnost pomenutih ćelijskih funkcija, koje dalje pogoršavaju stanje (1,5,24,25). Kada je reč o akutnim stanjima, kao što je intenzivan fizički napor, stanja oscilacija se ubrzo uspostavljaju. Ali kada su u pitanju stanja hronične metaboličke i hemodinamske abnormalnosti, kakva je situacija u esencijalnoj hipertenziji i terminalnoj bubrežnoj insuficijenciji, nastale promene je teško kompenzovati (54-58,60).

Pacijenti sa terminalnom bubrežnom insuficijencijom imali su najniži nivo ATP i stoga veoma poremećen odnos ATP/ADP, ATP/UA, kao i vrednost adenilatnog energetska naboja. Efekti ATP na nivou bubrega su veoma karakteristični, a ogledaju se u vazokonstrukciji aferentnih arteriola, dok na nivou eferentnih arteriola ATP ne pokazuje efekte (51,52,58,59). Veoma je važno imati u vidu da pored lokalnih tkivnih efekata povećana količina ADP deluje i na aktivaciju agregacije trombocita, što doprinosi aterogenim i trombogenim efektima (38,57). Slominska i sar (60) su pratili nivo adenilnih nukleotida u odnosu na stepen bubrežne insuficijencije. Pokazan je linearni pad koncentracije ATP u odnosu na stepen bubrežnog oštećenja, koji ima veliki uticaj i na sintezu ATP u eritrocitima i oslobađanje u cirkulaciju. Ovi istraživači su pokazali da dijaliza deluje povoljno na uspostavljanje adenilatnog naboja u eritrocitima, ali da je stanje reverzibilno.

Bilo na koji način da se ATP oslobodio dužina njegovog poluživota zavisi od dostupnih enzima koji ga odmah degradiraju. Reč je o ektonukleotidazama, koje su lokalizovane u endotelu velikim delom, na površini ćelija bele krvne loze, prisutni



slobodni u cirkulaciji iz različitih perifernih tkiva, ali i simultano oslobođeni iz aktiviranog simpatikusa (52).

Dobijeni rezultati u ovoj studiji pokazuju da je homeostaza adenilnih nukleotida u esencijalnoj hipertenziji, a posebno u terminalnoj bubrežnoj insuficijenciji značajno narušena i indirektno odslikava da su endotelne ćelije izložene mehaničkom stresu, glatkomišićne ćelije izložene vazokonstriktornim stimulusima, tkiva hipoksiji i ćelijskoj energetske krizi, a cirkulacija trombogenim efektima.

## **8.2. Aktivnost enzima metabolizma adenzina, 5-nukleotidaze i adenzin dezaminaze u ispitivanim grupama**

Učinjena analiza podataka pokazuje da između ispitivanih grupa bolesnika ne postoji statistički značajna razlika u vrednostima adenzin dezaminaze i 5'-nukleotidaze, ali je potvrđena značajno manja vrednost njihovog odnosa kod bolesnika sa hipertenzijom i hroničnom bubrežnom insuficijencijom (Tabela 13).

Poznato je da je ekto-5'-nukleotidaza (e5NT, CD73) transmembranski integralni enzim koji je izrazito eksprimiran u endotelu i da je uključen u metabolizam nukleotida. CD73 konvertuje AMP u adenzin koji posredstvom specifičnog subtipa P1 receptora ispoljava citoprotektivne efekte uključujući različite mehanizme kao što je vazodilatacija, supresija inflamacije, inhibicija tromboze i antiadrenergični efekti. Pad aktivnosti ekto-5'-nukleotidaze u grupi pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom i terminalnom bubrežnom insuficijencijom ukazuje na to da je smanjena produkcija adenzina. Koncentracije adenzina rastu kao odgovor na brojne štetne stimulse i stresore i uloga adenzina u vazodilataciji je velika. Endotel je glavno mesto za CD73 posredovanu produkciju adenzina i njegov citoprotektivni efekat. Rezultati Chadjisthos i sar (174) sa specifičnim imunohistohemijskim tehnikama kolokalizacije su pokazali da ekto-5'-nukleotidaza ili CD73 antigen endotela, nije samo odgovorna za produkciju adenzina, već i aktivaciju adenzinskih receptora i antiinflamatorne mehanizme, koji idu preko VCAM-1 (vaskularnog endotelijalnog faktora), kao i propagaciju ovih signala između ćelija. Eksperimenti na genski

modifikovanim životinjama (*CD73<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>*), koje uopšte nemaju ovaj protein, pokazali su da takve životinje rano razvijaju aterosklerozu, inflamaciju i adheziju inflamatornim ćelijama (175,176). Nukleotidi (predominantno ATP ili ADP) koji se oslobađaju iz različitih ćelija posredstvom specifičnih kontrolisanih ili nespecifičnih mehanizama predstavljaju glavni supstrat za produkciju adenzina posredstvom CD73. Direktni efekti ekstracelularnih nuklotida (posredovani preko P2 receptora) su tipično suprotni od onih koji se odvijaju preko adenzinskih P1 receptora. Retencija nuklotica i smanjenje produkcije adenzina zbog gubitka CD73 funkcije može imati negativne posledice i može biti važan uzrok različitih patoloških stanja. Protektivna uloga CD73 je pokazana u aterosklerozi i trombozi. Pomenuti efekti objašnjavaju se podatkom da na nivou endotela, stvoreni adenzin deluje preko A<sub>2</sub>B receptora, koji povećavaju endotel-barijernu funkciju i suprimiraju adheziju leukocita na endotel, preko cAMP-zavisne intracelularne signalizacije. Pored toga ekto-5'-nukleotidaza (e5NT, CD73 locirana na membrani endotelnih ćelija ima dodatnu protektivnu ulogu, jer je uključena i u inhibiciju agregacije trombocita (177-179). Redukovana aktivnost CD73 usled kontakta limfocita sa endotelijumom povećava njegovu permeabilnost i transmigraciju leukocita. Stimulacija ekspresije i regulacija aktivnosti endotelne CD73 može zato imati protektivne efekte u brojnim kardiovaskularnim oboljenjima i biti specifični target za nove terapijske procedure koje imaju za cilj povećanje endotelne protekcije. Ukoliko se ima u vidu koliki je značaj adenzina za funkciju bubrega, kao što je prezervacija ćelijskih struktura, zaštita od hipoksije, vazodilatacija korteksa i medule, inhibicija oslobađanja renina i stimulacija jonskog transporta, onda pad aktivnosti ekto-5'-nukleotidaze, koji je više nego dvostruk kod pacijenata sa terminalnim stadijumima bubrežne insuficijencije upućuje na značajne poremećaje sinteze adenzina. Postavilo se onda s pravom pitanje, šta se dešava sa prisutnim povećanim nivoom AMP? Imajući u vidu šemu katabolizma purina, kao i metabolički promet nukleotida, nameće se logičan zaključak da katabolizam purina nesumnjivo ide putem oksidativne dezaminacije AMP, kada nastaje IMP, koji se dalje kataboliše. Na nivou mnogih tkiva potvrđeno je zapravo da je pomenuti put oksidativne dezaminacije katabolizam u užem smislu, dok je sinteza adenzina zapravo sinteza lokalnog hormona (179). Efekti ekto-5'-nukleotidaze naročito su od značaja u renalnoj ishemiji, tako da više nego dvostruki pad aktivnosti još više kompromituje funkciju bubrega i značajno doprinosi daljem

produblivanju ishemijskih konsekvenci. Radovi Grenza i sar (180) su dokumentovali značaj pada ovog enzima u hipoksiji bubrega.

Adenozin dezaminaza nasuprot ekto-5'-nukleotidazi, katalizuje razgradnju adenozina i usmerava ga ili u proces reutilizacije ili u dalji katabolizam. Premda je uloga adenozin dezaminaze najviše proučavana kada su u pitanju imunodeficientna stanja ili stimulacija aktivacija Th1 ćelijskog imunskog odgovora, ipak je mesto ovog enzima i u ovim stanjima modulator prometa adenozina. Činjenica da aktivnost enzima pokazuje tendenciju porasta u esencijalnoj hipertenziji, a održava se i nešto povećanim u terminalnoj bubrežnoj insuficijenciji, može implicirati da kompenzatorni mehanizmi održanja adenozina kao lokalnog vazodilatatora ipak izostaju. Povećanje aktivnosti adenozin dezaminaze pokazali su pojedini autori u stanjima insulinske rezistencije i metaboličkog sindroma, pri čemu se akcenat daje na ulozi adenozin dezaminaze u smanjenju insulinske senzitivnosti. Ovakvi podaci su potvrđeni i u gojaznosti, poremećajima metabolizma lipida i hipertenziji. Ovi podaci potvrđeni su od strane Bakera i sar (181) i Siddiqija (182). Dobijeni podaci u ovoj studiji pokazuju da ona može pokazivati tendenciju porasta u esencijalnoj hipertenziji.

### **8.3. Analiza koncentracije mokraćne kiseline u ispitivanim grupama i moguća patogenetska veza**

Koncentracija mokraćne kiseline u plazmi određivana je na dva načina-standardnim biohemijskim testom na automatskom analizatoru, ali i HPLC hromatografijom u sklopu određivanja cirkulišućih nukleotida. Nije bilo značajnih razlika i odstupanja. Nivo mokraćne kiseline u grupi pacijenata sa terminalnim stadijumom bubrežne insuficijencije na programu hemodijalize, značajno je bio viši nego u kontrolnoj grupi, a i u grupi pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom. Ovakvi podaci mogu se očekivati ukoliko se razmatra koncentracija adenilnih nukleotida i porast razgradnog produkta AMP, kao supstrata kao i ksantin oksidaze, enzima koji treba da u poslednjem koraku kataboliše hipoksantin i ksantin. Dobijeni rezultati u ovoj studiji pokazuju da mokraćna kiselina pokazuje tendenciju porasta kod pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom i dobijeni podaci su u skladu sa podacima u literaturi (94-96). Ono što se ni u ovoj studiji

sa sigurnošću ne može reći je dilema koja postoji već duže vreme u literaturi, a to je da li porast mokraćne kiseline prethodi esencijalnoj hipertenziji u sklopu nekog metaboličkog dizbalansa ili je prati i pogoduje razvoju endotelne disfunkcije, arteriolopatiji i kasnijim kardiovaskularnim ili bubrežnim konsekvencama (98-105,120).

Mokraćna kiselina je loše rastvorljiva u krvi, što se odnosi i na njene soli urate, koji se nešto bolje rastvaraju. Svega oko 5% mokraćne kiseline je vezano za proteine, tako da je mononatrijumova so u najvećem stepenu prisutna. Normalne vrednosti mokraćne kiseline nešto su niže kod žena i kreću se oko  $360\mu\text{mol/L}$  (6mg%) kod žena, a kod muškaraca do  $416\mu\text{mol/L}$  (7mg%) (92,93,99). Kakva je njena uloga u cirkulaciji ima oprečnih mišljenja u vezi antioksidativnih efekata. Naime, nekada se smatralo da je ona antioksidans i da tako može biti i skavendžer slobodnih radikala, jer reaguje sa vodonik peroksidom. Međutim, noviji podaci su pokazali da zbog specifičnog redoks statusa u sredini koja ima prooksidativna svojstva i ona se, paradoksalno, ponaša kao prooksidans, što je i poznato kao „uratni paradoks” jer u reakciji sa nekim oksidišućim agensima produkuje slobodne radikale, naročito kada reaguje sa NO (119,183,184). Za razliku od ovih dilema koje su u literaturi postojale kada je u pitanju cirkulišuća mokraćna kiselina, podaci na ćelijskom nivou su veoma egzaktni. Ovi podaci se odnose na efekte na nivou krvnih sudova i objašnjavaju hipertenzivne i aterosklerotične efekte. Naime, zahvaljujući prisustvu specifičnih organskih anjonskih transportera mokraćna kiselina ulazi u glatkomišićne ćelije krvnih sudova, prihvataju je fagociti, ali utiše i na druge ćelije perifernih tkiva. Tada aktivira kompleksi sistem signalne transmisije koji rezultuje aktivacijom p38, Erk  $\frac{1}{2}$  i nuklearnih transkripcionih faktora, kao što je NF  $\kappa$ B i AP-1. Kao posledica aktivacije ove signalne kaskade dolazi do transkripcije i sinteze faktora rasta, kao što je trombocitni faktor rasta (PDGF), koji dovodi do proliferacije glatkomišićnih ćelija. Sa druge strane, dolazi do sinteze vazokonstriktivnih supstanci, kao što su endotelin, angiotensin II i thromboksan A<sub>2</sub>, koji u cirkulaciji stimulišu vazokonstrikciju i hipervolemiju, obadve jako pogoduju hipertenziji (117-119,185). Dokaz efekta angiotenzina je potvrđen eksperimentalno u uslovima eksperimentalne hiperurikemije. Aktivacija sekrecije citokina i proinflamatornih molekula, aktivira imunski odgovor, adheziju imunskih ćelija što pogoduje oslobađanju slobodnih radikala. Među njima dokumentovana je povećana sinteza C-reactivnog proteina i

monocit-hemoatraktant proteina-1. Među citokinima koji mogu imati najopasnije delovanje su interleukini i to IL-1 i IL-6, kao i Faktor tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), koji predstavljaju "prvu liniju" nespecifičnog imunskog odgovora, stimulišući sve simptome inflamacije, pa i sledstveno ćelijsko oštećenje. Kako je već napomenuto, mokraćna kiselina reaguje i sa azot oksidom, čime značajno umanjuje njegovu bioraspoloživost. Ona promoviše adheziju i agregaciju trombocita, čime dovodi do stimulisanoj prokoagulatnoj stanja i vaskularne tromboze. Dokaz direktnog delovanja mokraćne kiseline su eksperimentalne studije i studije ćelijskih kultura, a depoziti mokraćne kiseline u ateromima dokazani su na patohistološkim preparatima. Pored toga, pokazano je da na nivou bubrega aktivira sintezu renina na nivou jukstaglomerularnog sistema (111,112,114,115,117,186).

**Tabela 30. Sekundarna hiperurikemija (adaptirano po Koraćević i sar.)**

## Sekundarna hiperurikemija

### 1. Povećana sinteza mokraćne kiseline

- I Hemoblastoze i maligne bolesti

### 2. Povećana razgradnja nukleinskih kiselina

- I Psorijaza
- II Povećano unošenje purina
- III Ćelijska energetska kriza u hroničnim bolestima

### 3. Smanjeno renalno izlučivanje mokraćne kiseline

- I Hronične bolesti bubrega
- - poremećena tubularna sekrecija mokraćne kiseline
- II Acidoza (laktatna, ketoacidoza)
- - mlečna kiselina i keto kiseline kompetiraju sa mokraćnom kiselinom za transportni sistem za izlučivanje MK u tubulima
- III Uticaj lekova: diuretici (tiazid, furosemid), salicilna kiselina, tuberkulostatici (pirazinamid, izonijazid)
- - inhibiraju renalno izlučivanje mokraćne kiseline

### 4. Trovanja (olovo, berilijum)

Kauzalna vaza između nivoa mokraćne kiseline i esencijalne hipertenzije naročito je dokumentovana kod mlađih osoba i u stadijumima prehipertenzije, što potvrđuje da na nivo mokraćne kiseline treba gledati sa velikom ozbiljnošću, pogotovu kada i neki parametri neurovegetativne disfunkcije mogu implicirati razvoju hipertenzije. Ovi podaci su daleko izraženiji nego u kasnijim fazama razvoja hipertenzije (97, 101,102).

Podaci da mokraćna kiselina pokazuje porast kod pacijenata sa bubrežnim oboljenjima su takođe u skladu sa podacima u literaturi. Kakva je uzročno posledična povezanost ova dva entiteta pokušale su da odgovore opservacione i eksperimentalne studije. U prilog kauzalnoj vezi idu podaci da sniženje nivoa mokraćne kiseline korišćenjem specifičnih lekova poboljšava regulaciju arterijske tenzije (187-191). Razmatrani su mogući poznati razlozi sekundarne hiperurikemije koji su prikazani na tabeli.

Razlog signifikatno povećanog nivoa kod pacijenata koji su imaju terminalnu bubrežnu insuficijenciju je pored povećanog katabolizma, kao evidentne ćelijske energetske krize i je činjenica da je sekundarna hiperurikemija potencirana u bubrežnim oboljenjima kao posledica loše eliminacije mokraćne kiseline. Eliminacija mokraćne kiseline putem bubrega je značajan faktor održavanja normalnog nivoa mokraćne kiseline u krvi, jer se oko 2/3 mokraćne kiseline eliminiše urinom, a svega oko 1/3 fecesom. Količina koja se inače i eliminiše fecesom je uglavnom egzogenog porekla, jer se purini uneti hranom u digestivnom traktu u potpunosti razlažu zbog toga što su prisutni svi enzimi katabolizma purina, pa se najvećim delom mokraćna kiselina odunetih purina reapsorbuje (192,193).

Kada je u pitanju bubrežna eliminacija mokraćne kiseline, značajno je napomenuti da mokraćna kiselina podleže nizu različitih multipnih i kompleksnih procesa i mehanizama, kao što su:

- glomerularna filtracija
- reapsorpcija na nivou proksimalnih tubula
- sekrecija na nivou proksimalnih tubula
- postsekreciona reapsorpcija na nivou proksimalnih tubula

Mokraćna kiselina se slobodno filtrira na nivou glomerula, ali se potom oko 90% reapsorbuje na nivou tubulskog sistema. U tubularnu reapsorpciju su uključeni transporteri SLC22A12 (URAT1) i SLC2A9 (GLUT9). Ovi procesi mogu biti otežani sa promenama pH ka kiselom i pojavom veće količine organskih kiselina. Tubulska sekrecija mokraćne kiseline se odvija u posredovana transporterima kao što su ABCG2, SLC17A1, SLC17A3, SLC22A6 (OAT1) i SLC22A8 (OAT3). Bubrežna insuficijencija nesumnjivo smanjuje aktivnost sistema sekrecije i eliminacije mokraćne kiseline, pa se neretko preporučuje i kao parametar bubrežne funkcije zajedno sa ureom i kreatininom kao neproteinska azotna jedinjenja. O tome svedoče neke studije, koje su čak pokazale

visoku korelaciju između nivoa mokraćne kiseline i kreatinina. Da između ova dva parametra nije slučajna već kauzalna veza u smislu parametra funkcije bubrega, pokazuju neki podaci da povećanje mokraćne kiseline često prethodi povećanju nivoa kreatinina, parametra stadijuma bubrežne insuficijencije, uz to od 3-10 puta je faktor rizika za porast kreatinina. Ovi parametri su naročito značajni kod žena. Studije su pokazale da svako povećanje mokraćne kiseline za oko 2mg% dovodi do oko 70% porasta predispozicije za razvoj bubrežne insuficijencije. Kakva je povezanost sa bubrežnom funkcijom svedoči i podatak povezanosti albuminurije i povećanja mokraćne kiseline. Pokazano je da svako povećanje mokraćne kiseline za oko 1mg% povećava oko 80% rizik za razvoj mikro i makroalbuminurije (187,189,192,193).

Pored već napred opisanih mehanizama proaterogenog, vazokonstriktornog i inflamatornog efekta mokraćne kiseline, opisani su i mehanizmi koji se odnose na direktno oštećenje na nivou bubrega. Tu se pre svega misli na arteriolopatiju preglomerularnih krvnih sudova, što smanjuje autoregulaciju sistema aferentnih arteriola i dovodi do glomerularne hipertenzije, glomerularne skleroze, tubulointestinalnih oštećenja i infiltracije ćelijama zapaljenja. Pored toga, proliferacija glatkomišićnih ćelija i vazokonstrikcija smanjuju volumen krvnog suda pa nastaje hipoperfuzija bubrega. To dovodi do tubulointestinalne inflamacije i fibroze (109,116--119).

Ovakva saznanja koja proističu iz dobijenih rezultata, upućuju na činjenicu da na povećan nivo mokraćne kiseline kod pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom treba gledati sa posebnom pažnjom, pogotovu kada je hipertenzija novootkrivena, rezistentna na predloženu terapiju. Ovo saznanje posebno treba imati u vidu ako se zna da su normalne vrednosti mokraćne kiseline i kod žena i muskaraca arbitrarne, dakle, varijacije tolerancije mogu biti individualne. Kod pacijenata sa terminalnom bubrežnom insuficijencijom, hiperurikemija ne samo da otežava kliničku sliku i patogenezu ovog oboljenja već višestruko doprinosi pojavi kardiovaskularnih komplikacija tako da treba možda delovati adekvatnom hipourikemijskom terapijom.

#### **8. 4. Markeri oksidativnog stresa, lipidni peroksidi i uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP) i odnos ksantin oksidaza/dehidrogenaza u plazmi pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom i terminalnom bubrežnom insuficijencijom i moguća patogenetska povezanost**

Kod viših aerobnih organizama prednosti energije dobijene aerobnim metabolizmom praćene su i nusfektima ove produkcije u vidu formiranja rekativnih kiseničnih radikala (ROS) (128).

Ovi visoko bioaktivni i kratkoživeći molekuli mogu interreagovati sa lipidima, proteinima i nukleinskim kiselinama izazivajući ozbiljna oštećenja na nivou molekula i same ćelije. Tokom evolucije živi organizmi su uspeli da razviju specifične mehanizme zaštite kojima se adaptiraju na prisustvo i nemonovno stvaranje ROS tokom aerobnog metabolizma. U normalnim fiziološkim uslovima ovo je delikatna ravnoteža između oksidanata i antooksidanata koja ne samo da čuva ćelije od toksičnih efekata ROS već takođe omogućava i postojanje redoks signalnih procesa koji regulišu funkcije ćelije i organa.

Savremene biohemijske analize su usmerene na traženje “idealnog” biomarkera oksidativnog stresa. Kako je radikale kao male i kratkoživeće molekule u kliničko laboratorijskim uslovima praktično nemoguće meriti, traga se za metodom koja je brza, jednostavna, osetljiva, reproducibilna, a može ukazati i na dinamiku oboljenja.

Međutim poremećaj u redoks homeostazi dovodi do konstantno povišenih vrednosti ROS koje dovode do pojave patoloških poremećaja (195). Evaluacija redoks statusa je od značaja ne samo u razmatranju patogeneze arterijske hipertenzije, nego i njenih negativnih konsekvenci sa aspekta razvoja kardiovaskularne i/ili hroničnih bubrežne insuficijencije.

Rezultati ove studije pokazali su da su markeri oksidativnog stresa povišeni i u esencijalnoj hipertenziji, a naročito u stadijumu terminalne bubrežne insuficijencije. Postavlja se pitanje da li postoji kauzalna veza između oksidativnog stresa i hipertenzije ili je u pitanju korelacija parametara bez kauzalnog odnosa. Podaci u literaturi jasno ukazuju na sledeće premise:

-takozvana “redoks disfunkcija” potvrđena je kod pacijenata sa hipertenzijom



- oslobođanje O<sub>2</sub>.- od strane perifernih polimorfonukleara je povećano u hipertenziji
  - Nivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je povećan kod pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom
  - Nivo produkata oksidativne modifikacije biomolekula, kao što su izoprostani, 8-oxo-2'-dezoksiguanozin, oksidisani LDL, karbonilne grupe, uznapredovali produkti oksidacije proteina i nitrotirozin, dokazani su kao povišeni kod pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom
  - mehanički stres vaskularnog korita (shear stress) indukuje oksidativni stres
  - enzimski i neenzimski antioksidativni sistem je snižene aktivnosti u esencijalnoj hipertenziji
- Ukoliko bi se postavilo pitanje na koji način oksidativni stres doprinosi razvoju esencijalne hipertenzije, podaci u literaturi potkrepljuju sledeće relacije:
- indukcija oksidativnog stresa inhibicijom sinteze redukovanog glutaciona (GSH), kao i superoksid dizmutaze (SOD) inhibitora dovodi do razvoja arterijske hipertenzije kod pacova
  - infuzija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u medulu bubrega indukuje hipertenzivno stanje kod pacova
  - tretman hipertenzivnih životinja antioksidansima smanjuje hipertenziju
  - različite genske varijante životinja kod kojih je došlo do alteracije generisanja radikala dovode do poremećaja i razvoja hipertenzije
  - in vitro* eksperimenti gde se ćelije tretiraju slobodnim radikalima dovode do poremećaja koji nalikuju onima u hipertenziji na tkivima
  - sistemska "redoks disfunkcija" vrlo često prethodi esencijalnoj hipertenziji

Pored ROS, jedna druga grupa molekula nazvana zajedničim imenom reaktivni azotni produkti „reactive nitrogen species (RNS)” takođe interreaguje i ispoljava značajne funkcije u različitim fiziološkim i patološkim procesima redoks signalizacije (196). Pokazano je da poremećaji oksidativnog stresa imaju značajnu ulogu u nastanku arterijske hipertenzije. Naime, hipertenzivne životinje su imale porast mitohondrijalne produkcije ROS kako u krvnim sudovima tako i na nivou bubrega i CNS-a. Jedan od značajnih izvora ROS predstavlja i aktivnost ksantin oksidaze. Ovaj enzim ima dve interkonvertibilne forme u vidu ksantin dehidrogenaze (XDH) i ksantin oksidaze (XO), koje učestvuju u metabolizmu purina tako što katalizuju konverziju hipoksantina u ksantin i ksantina u mokraćnu kiselinu. XDH obično koristi NAD<sup>+</sup> kao akceptor elektrona dok oksidaza redukuje molekularni kiseonik u reakciji u kojoj se generiše

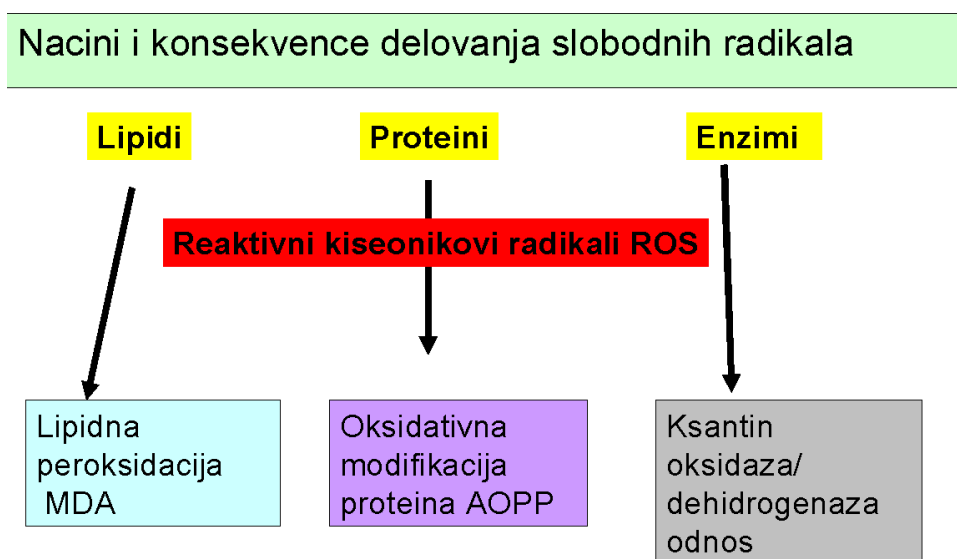
$O_2^{\cdot-}$  i vodonik peroksid  $H_2O_2$ (197) XO forma predominira u stanjima oksidativnog stresa i može dovesti do razvoja endotelne disfunkcije zbog njene lokalizacije u luminalnoj površini vaskularnog endotelijuma(198).Pored produkcije ROS od strane XO, obe forme XDH i XO generišu mokraćnu kiselinu koja ispoljava antioksidativne sposobnosti kao što su kupiranje peroksinitril ONOO- i hidroksilnih radikala HO, prevenira inaktivaciju endotelnih enzima izazvanu povišenim oksidativnim stresom i stabilizuje vitamin C (194).

Sa druge strane mokraćna kiselina može takođe ispoljiti prooksidativni i proinflamatorni efekat. Ujedno visoki nivoi serumske mokraćne kiseline su udruženi sa povećanim kardiovaskularnim rizikom i oboljenjima kao i lošim ishodom ovih bolesti mada još uvek nije jasno dali su ovi efekti posledica direktnog delovanja mokraćne kiseline ili samo odraz oksidativnog oštećenja izazvanog ROS koje generiše ksantin oksidaza (199).

Poslednjih godina sve se više ispituje patogenetski uticaj  $H_2O_2$  koji dolazi u žižu interesovanja kao ključni molekul u patofiziologiji arterijske hipertenzije. Vodonik peroksid izgleda ispoljava značajnije štetne efekte od  $O_2^{\cdot-}$  zbog njegovog dužeg poluzivota i difuzibilnosti između ćelija(200, 201)

Šta više konverzija  $O_2$  - u  $H_2O_2$  je stimulisana u stanjima kada postoji kardiovaskularno oboljenje i povećana ekspresija aktivnosti superoksid dizmutaze SOD koja je uslovljena povećanjem nivoa angiotenzina II. Ujedno  $H_2O_2$  takođe povećava aktivaciju intrarenalnog renin-angiotenzin sistema, koji je glavni regulator krvnog pritiska i renalne funkcije(202).Slični rezultati su dobijeni i u humanoj populaciji tokom kliničkih i epidemioloških istraživanja. Porast nekoliko međuprodukata oksidativnog stresa kao što su malondialdehid, oksidisani LDL karbonilne grupe i nitrozamini registrovani su kod bolesnika obolelih od esencijalne arterijske hipertenzije (203).

Ujedno oba i enzimski i neenzimski antioksidativni i protektivni mehanizmi su značajno redukovani u hipertenzivnom stanju kod ljudi(204).



**Šema 18. Načini delovanja slobodnih radikala na biomolekule (adaptirano po Dorđević i sar.)**

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju a vezani za porast oksidativnog stresa i njegovu ulogu u nastanku arterijske hiepertenzije u skladu su sa navedenim literturnim podacima. Naime vrednosti ureje, mokraćne kiseline i kreatinina bile su slične u kontroli i grupi bolesnika sa arterijskom hipertenzijom ali su bile značajno veće u bolesnika na hemodijalizi (Tabela 10), što jasno ukazuje na značaj ovih poremećaja u bolesnika sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom. Međutim same vrednosti ovih markera se nisu značajnije razlikovale u grupi bolesnika sa esencijalnom hipertenzijom i kontrole što navodi da ovi rutinski biohemijski pokazatelji nisu indikativni za procenu intenziteta oksidativnog stresa i procenu postojanja poremećaja koji dovode do nastanka endotelne disfunkcije. Slični rezultati u kojima su vrednosti ureje i kreatinina u granicama normalnih opsega kod bolesnika sa esencijalnom hipertenzijom nalaze i drugi autori. Iako bilo koja elevacija ureje i kreatinina ne znači i strukturno oboljenje bubrega takođe i vrednosti ureje i kreatinina unutar optimalnih vrednosti samo po sebi ne isključuju posotojanje redukcije glomerulane filtracije. Zbog toga svaka analiza serumskih vrednosti ovih markera mora biti učinjena oprezno jer brojni ekstrarenalni faktori utiču na njihove koncentracije. Zbog toga brojni autori preporučuju određivanje odnosa urea/kreatinin kao pouzdanijeg markera renalne funkcije i renalnog oštećenja (205).

## 8.5. Analiza aktivnosti ksantin oksidaze i ksantin dehidrogenaze u ispitivanim grupama

Ksantin oksidaza katalizuje reakciju stvaranja mokraćne kiseline iz supstrata ksantina, ali katalizuje i oksidaciju hipoksantina u ksantin. Ksantin oksidaza i ksantin dehidrogenaza (XDH) su dve interkonvertibilne forme jednog istog enzima. S obzirom da je posebno bogat endotel, to saznanje daje očekivani nalaz redovne prisutnosti ovog tje ovih interkonvertibilnih formi enzima u cirkulaciji (206-210).

Aktivnost ksantin oksidaze bila je slična u grupama bolesnika sa hipertenzijom i na dijalizi dok je aktivnost u kontrolnoj bila značajno manja u odnosu na druge grupe. Vrednosti ksantin oksidoreduktaze bile su slične u kontroli i grupi bolesnika na dijalizi dok su u bolesnika sa hipertenzijom bile značajno veće u odnosu na druge grupe. Aktivnost ksantin dehidrogenaze bila je slična u kontroli i grupi bolesnika na hemodijalizi dok je u grupi sa hipertenzijom bila značajno veća no u ostale dve grupe. . Jos jednom je potvrđen napred izneti podatak velikih epidemioloških i kliničkih studija na ljudima da poremećaji u metabolizmu mokraćne kiseline i aktivnosti ksantin oksidaze stoje u osnovi patogenetskih poremećaja koji se sreću u arterijskoj hipertenziji.

Oksidativni stres koji generišu ovi enzimi može dovesti do ateroskleroze endotelne disfunkcije, kardiovaskularnih oboljenja i metaboličkog sindroma. U tom svetlu dobijeni rezultati koji uključuju alteraciju ksantin oksidazne aktivnosti i poremećaje u metabolizmu mokraćne kiseline pokazuju na moguće patogenetske mehanizme koji stoje u osnovi esencijalne hipertenzije.

Istraživanja ksantin oksidazne aktivnosti privukla su posebnu pažnju saznanjem da se u toku enzimske reakcije oksidacije ksantina oslobađa superoksidni anjon, što ovaj enzim svrstava u glavne producente slobodnih radikala. Postavlja se pitanje koja su to stanja koja u hipertenziji i hroničnoj bubrežnoj insuficijenciji mogu dovesti do produkcije ksantin oksidaze iz dehidrogenaze (206-210). Jedan od razloga je povećana genska ekspresija enzima, što se može zaključiti na osnovu podataka da je celokupna XOD forma povećana, naročito u hipertenziji (211-213). Istraživanja koja su sprovedena u drugim laboratorijama pokazuju da povećana aktivnost ksantin oksidaze može poticati sa dva nivoa-transkripcionog (povećana genska ekspresija i posledična

sinteza enzima) i posttranslacionom (posttranskripcionom) nivou (214). Zanimljivi su podaci da se enzim u ćelijama može fosforilisati preko aktivacije različitih kinaza naročito preko p38 MAP kinaza i kazein kinaze II, procesa koji se vrše u hipoksiji. Regulacija aktivnosti endotelne XO pobuđuje poseban interes. Pokazano je da se XO direktno povećano ekspimira pod uticajem povećane koncentracije  $H_2O_2$  i jona kalcijuma (214-216). Njeno prisustvo u endotelu je vrlo kompleksno, jer se veza sa endotelom održava vezivanjem za glikozaminoglikane. Veza sa ovim šećerima menja joj kinetičke karakteristike. Kada su u pitanju lokalna endotelna oštećenja, vezana forma je direktno odgovorna za kontinuiranu endotelnu disfunkciju, ali cirkulišuća forma je stalni izvor slobodnih radikala, koji vrše oksidaciju svih dostupnih supstrata, naročito LDL čestica. Nastali oxoLDL sa svoje strane je glavni razlog formiranja penastih ćelija u aterosklerozi. Koliko je mesto XO u ovom procesu potvrđuju studije da je dodatak alopurinola značajno smanjio nastanak oxoLDL u eksperimentalnoj hiperholesterolemiji, kao i studije efekta inhibicije ksantin oksidaze kod spontano hipertenzivnih životinja (217).

Endotelna ksantin oksidoreduktaza (XOR) zajedno sa NAD (P) H oksidazom i azot oksid (NO) sintazom ima ključnu fiziološku ukogu u inflamatornoj ćelijskoj signalnoj transdukciji, regulaciji sinteze NO i vaskularnoj funkciji (217-222). Posebno je interesantna veza koja je ustanovljena između aktivnosti XO i NOS. Naime, kada ima dovoljno azot oksida (NO), on pokazuje inhibitorni efekat na aktivnost XO (šema). Ali ukoliko je aktivnost XO visoka, onda oslobođeni  $O_2^{\cdot}$  stvara toksičan peroksinitritni radikal, koji umanjuje biorasploživost NO, a time se dodatno aktivira XO. Ovaj *circulus vitiosus* naročito je patognomoničan za endotelnu disfunkciju i hipoksična stanja. To stanje je poznato kao „nitrozo-redoks“ dizbalans. Taj fenomen naročito je karakterističan za XO koja je vezana za endotel, jer je pokazano da oslobođeni  $O_2^{\cdot}$  odmah reaguje sa oslobođenim NO iz endotela i tako odmah, čak stotinu puta brže nego što bi se preko SOD izvršila detoksikacija, „zarobljava NO“ i stvara peroksinitrit radikal (223,224) .

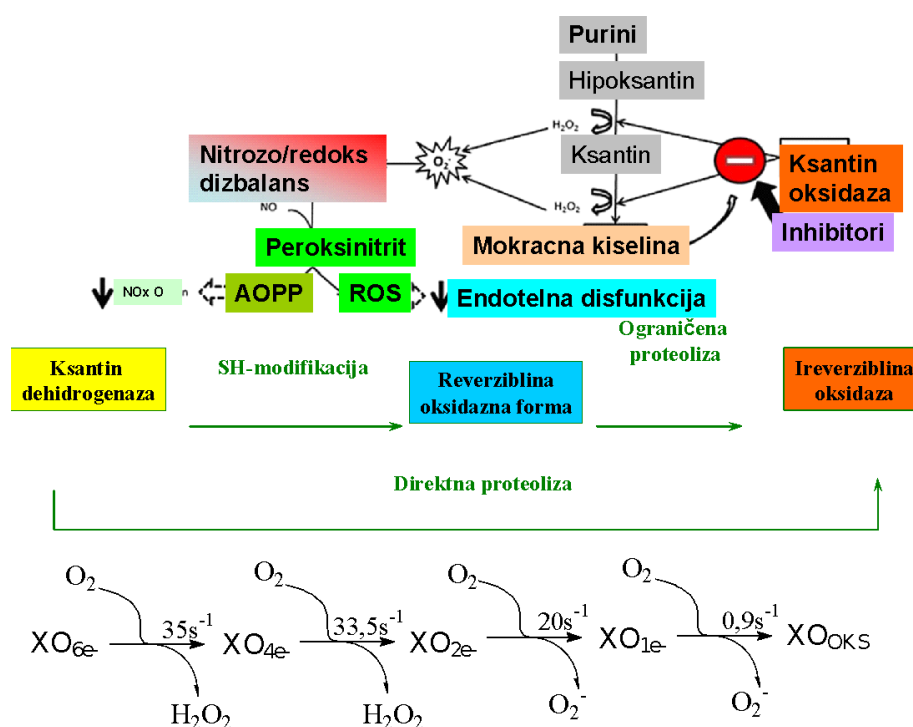
U prilog povećane konverzije XDH u XO ide i činjenica da oksidativni stres katalizovan drugim oksidacionim reakcijama najčešće na račun iflamatornih ćelija takođe može prevesti XDH u XO. Još jedan od razloga povećane aktivnosti XO na nivou endotela je i delovanje Interferona-gama (IFN- $\gamma$ ), koji se oslobađa iz limfnih

ćelija. Uloga XO u nespecifičnom imunskom odgovoru potvrđena je i podatkom da pored IFN- $\gamma$ , medijatori primarnog imunskog odgovora, citokini „prve linije odbrane“, kao što su faktor tumorske nekroze (TNF $\alpha$ ), interleukini (IL-1 i IL-3), takođe stimulišu XO aktivnost. Ukoliko bi se razmotrila suptilna genska povezanost ovih mehanizama došlo bi se do promotorskih mesta na DNK koja se aktiviraju putem transkripcionog faktora NF-kB. Naime, pokazano je da se p65 aktivna subjedinica redoks-senzitivnog transkripcionog faktora NF-kB direktno vezuje za promotorsko mesto gena za XOD, takozvani 5-UTR region. Tako je XO i XOD direktno povezana sa nespecifičnim imunskim odgovorom i inflamacijom, koja se pokreće preko Toll-like receptora. Pomenuti mehanizam eksperimentalno je dokumentovan i prilikom aplikacije lipopolisaharida LPS, koga sadrže inače Gram- bakterije. Direktna povezanost je potvrđena tako što dodatak Alopurinola inhibirai NF-kB. Razlog treba tražiti u nespecifičnoj odbrani epitela od bakterijskih noksi, pa je enzim XOD poznat kao „housekeeping enzyme“, ali kada je ova reakcija posledica stimulisane „sterilne“ inflamacije, kakva je u aterosklerozi u vrlo velikom stepenu, onda XO drastično pogoršava već lošu sliku po endotel. Jedan od razloga je stimulacije sekrecije endotelina i P-selktina, koji imaju vazokonstriktorne efekte (212,213,215,218).

XOR aktivnost stvara pro i antioksidativne produkte, koji su uključeni u patogenezu arterijske hieprtenzije, dislipidemije i dijabetesa, koji sa svoje strane predstavljaju glavne faktore rizika za aterosklerozu. Posebno mokraćna kiselina može imati protektivne ali i negativne efekte u vaskualrnoj altreraciji potencirajuć značaj multi-direcionalnih efekata inhibicije XOR. Šta više XOR produkti su udruženi sa ćelijskom diferencijacijom, dovodeći do adipogeneze i stvaranja penušavih ćelija (228).

Da je veza u hipertenziji direktna pokazali su rezultati nekih eksperimentalnih studija gde je kod hipertenzivnih životinja alopurinol smanjio XO ali i značajno smanjio eksperimentalnu hipertenziju. Značaj slobodnih radikala potvrđen je dodatkom enzima SOD (217,225).

Neki podaci pokazali su da XO može u manjem stepenu vršiti konverziju nitrata i nitrita u NO, čime umesto ksantina, koristeći ove substrate može suprimirati dalje stvaranje radikala. U protektivnom smislu često se spominje i oslobođena mokraćna kiselina, ali zbog svog redoks statusa, ona se često nameće kao oksidans u redoks sistemima, a ne kao antioksidans (223,224).



Šema 19. Potencijalno toksični mehanizmi delovanja ksantin oksidaze (adaptirano po Đorđević i sar.)

Učinjena analiza binarnom regresijom (Enter model) je pokazala značajnu pozitivnu prediktivnu vrednost aktivnosti ksantin oksidaze sa prisustvom arterijske hipertenzije  $\text{Exp(B)} 1.171$  (95%CI 1.029-1.332). Ostali parametri nisu imali značajniji prediktivni potencijal što još jednom potvrđuje značaj ovih poremećaja u patogenezi esencijalne arterijske hipertenzije.

Rezultati koji su u ovoj studiji dobijeni pokazuju da je ksantin oksidaza značajno povišena naročito u grupi pacijenata u terminalnoj fazi bubrežne insuficijencije. Ovaj enzim se relativno jednostavno određuje ukoliko se poznaju kinetičke karakteristike i uslovi sprovođenja analiza, tako da može biti vrlo pouzdan marker progresije hipertenzije, a naročito progresije bubrežne insuficijencije. Ovi podaci do sada su uglavnom eksperimentalno potvrđivani u uslovima nefritisa (226,227).

## 8.6. Lipidna peroksidacija u ispitivanim grupama

Poslednjih godina traga se intenzivno za ranim patogenetskim markerima poremećaja koji bi doveli do endotelne disfunkcije i hipertenzije. U rezultatima do kojih se došlo može se videti da lipidna peroksidacija pokazuje statistički značajno veće vrednosti i u grupi pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom, kao i u grupi pacijenata koji su ušli u terminalnu bubrežnu insuficijenciju. U razmatranju patogenetske povezanosti, potrebno je analizirati koji mogući mehanizmi mogu posredovati u povećanom generisanju slobodnih radikala i koji procesi su njihova konsekvencija. Podaci vezani za povećanu produkciju radikala u dostupnoj literaturi ukazuju na mijeloperoksidazni sistem i ksantin oksidazni, kao generatori radikala. Ovaj sistem je izražen u inflamatornim ćelijama, što dovodi u vezu hroničnu inflamaciju u patogenezi hipertenzije. Drugi mehanizam je produkcija toksičnog vodonik peroksida ( $H_2O_2$ ), koja je najvećim delom posredovana efektima ksantin oksidaze (77, 229-231). U indirektno mehanizme povećane produkcije radikala spada povećan unos soli i sistem renin-angiotenzin (232,233). Dobijeni rezultati pokazuju da je lipidna peroksidacija u grupi pacijenata sa hipertenzijom blago povećana, dok je u grupi pacijenata koji imaju terminalnu bubrežnu insuficijenciju značajno povišena.

Analiza produkcije  $H_2O_2$  ukazuje da je oksidativni stres u osnovi razvoja hipertenzije već da može poslužiti i kao skrining marker potencijalne predikcije ka razvoju hipertenzije, jer je pokazana tendencija porasta lipidnih peroksida (TBA-reagujućih substanci) u grupama klinički zdravih osoba, koje su imale naslednu opterećenost hipertenzivnih događaja. Pa ipak još uvek sa sigurnošću nije ustanovljeno da li je u pitanju konsekvencija razvoja hipertenzije ili patogenetski faktor (234,235). Sa tog aspekta je potrebno razmatrati oksidativni stres i njime posredovanu lipidnu peroksidaciju kroz oba moguća mehanizma.

Ukoliko se posmatra oksidativni stres kao konsekvencija hipertenzije, na osnovu dobijenih rezultata, treba napomenuti da u hipertenziji postoji povećana napetost krvnih sudova, poznata kao „shear stress”, ali i povećani vaskularni pritisak, koji mehaničkim putem mogu oštetiti endotel. Da ovi faktori mogu biti odgovorni za oksidativni stres, svedoči podatak da sniženje krvnog pritiska pozitivno korelira sa parametrima oksidativnog oštećenaj biomolekula (236). Pojedini lekovi u osnovi svog mehanizma

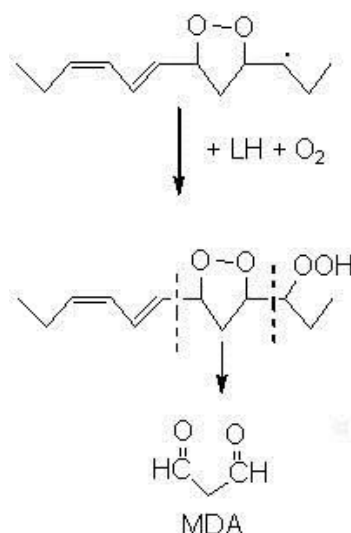


delovanja ispoljavaju mogućnost supresije formiranja slobodnih radikala. Ukoliko bi ovo bili jedini naučno zasnovani patogenetski mehanizmi, moglo bi se očekivati da antioksidansi mogu sprečiti konsekvence hipertenzije, ali ovi podaci u kliničkim studijama ipak nisu dali u dovoljnoj meri ohrabrujuće rezultate (237,238).

Kao producenti radikala spominju se u literaturi i sistem renin-angiotenzin, odnosno balans natrijuma u sprezi sa WNK kinazama, koje posreduju između produkcije radikala i Na, Cl kotransportnih sistema (145).

Lipidni peroksidi su zbog jednostavnog načina merenja dugo godina prihvatljiv marker oksidativne modifikacije biomolekula, tačnije lipida. Naravno de se ne mogu smatrati „idealnim biomarkerom”, jer metoda reakcije sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA-reagujuće supstance) nije ni strogo specifična niti izuzetno senzitivna. Ali sa druge strane, praćenje dinamike promene može biti od značaja, što je inače preporuka kada se bilo koji biohemijski markeri prate, a nivo lipidnih peroksida korelira sa stepenom generisanja slobodnih radikala (77,239-241).

Konsekvence lipidne peroksidacije najviše se ogledaju u toksičnim efektima samih nastalih produkata, kao i u izmeni strukture membrana i lipoproteina. Lipidni hidroperoksidi ispoljavaju deterdženska svojstva, jer oslobađaju fosfolipide iz membranskih struktura. Membrana postaje oštećena, usled promene strukture, fizikohemijskih svojstava, pa samim tim i biološke funkcije, kao što je fluidnost, promet elektrona, fleksibilnost, selektivna permeabilnost, ćelijska signalizacija, receptorska funkcija, funkcija transportera. Lipidi ćelijskih membrana i lipoproteina krvne plazme se velikim delom sastoje od fosfolipida, koji u svojim kompleksnim molekulima sadrže nezasićene masne kiseline. Nezasićene masne kiseline sadrže dvostruke veze, koje podležu peroksidaciji. Primarni produkt su hidroperoksidi, a sekundarni malon-dialdehid (MDA) i F-2 izoprostani (240,241).



**Šema 20. Struktura malondialdehida**

Metoda određivanja MDA nije strogo specifična jer je daju i neki produkti ugljenih hidrata. Lipidna peroksidacija je brza lančana reakcija, koju indukuju slobodni radikali, ima sposobnost samopropagacije u ćelijskoj membrani i drugim lipidnim molekulima koji sadrže nezasićene masne kiseline. Ona započinje izdvajanjem vodonika ili vezivanjem kiseonika, čime se direktno menja struktura masnokiselinskog lanca. Osnovo i najosetljivije mesto je metilenski most (RH). Ukoliko je dvostruka veza direktno smeštena uz metilenski most tada je metilenska C-H veza posebno fragilna i osetljiva na oduzimanje vodonika. Dolazi do oduzimanja elektrona na ugljenikovoj vezi, kada se formira karbonilni radikal ( $R\cdot$ ), koji podleže daljem rearanžiranju dvostruke veze i formira se peroksil radikal. lančana reakcija se ogleda u tome da tako stvoreni peroksilni radikal „napada“ novu nezasićenu vezu na drugoj masnoj kiselini i reakcija ide u nedogled. Ukoliko se u blizini nađe metal sa promenljivom valencom, nastaje alkoksil ( $RO\cdot$ ) ili hidroksil radikal ( $HO\cdot$ ) tako se odvija prva reakcija takozvane inicijacije, jer se od peroksil radikala formiraju hidroperoksidi. Reakcija se nastavlja propagacijom, kada nastaju hidroperoksidi. Stabilniji proizvodi koji nastaju su alkil, peroksil i alkoksil radikali. Lipidni hidroperoksidi (ROOH) su prvi stabilni produkti lipidne peroksidacije. Lipidna peroksidacija može teći enzimskim i neenzimskim putem. Ukoliko je enzimska, katalizuje je lipooksigenazni put, tada nastaju peroksil radikali. Neenzimski proces se odvija u prisustvu kiseonika i metala sa promenljivom valencom. Među naosetljivijim masnim kiselinama su one koje imaju više nezasićenih

veza, kao što je linoleinska i arahidonska (77,229). Lipidni hidroperoksidi, bilo da su posredovani metalima sa promenljivom valencom ili ne, stvaraju veliki dijapazon arznovrsnih produkata, kao što su dugolančani aldehidi fosfolipida ili aldehidi holesterolskih estara. Nedavno je ustanovljeno da i peroksinitrit može da indukuje stvaranje lipidnih peroksida (242).

Imajući u vidu mehanizme produkcije slobodnih radikala, kao i njihovo mesto u patogenezi esencijalne hipertenzije i razvoja bubrežne insuficijencije na temelju ovih događanja, strategije prevencije bi se mogle ogledati u upotrebi odgovarajućih skavendžera radikala (antioksidanasa) ili prevenciji inicijacije oksidativnog stresa u hipertenziji. U ovom smislu, povoljniji efekti su postignuti inhibicijom produkcije radikala, nego antioksidansima. Ukoliko se uzme u obzir značaj renin-angiotenzin-aldosteron sistema u blokadi reapsorpcije natrijuma, u kontekstu veze sa slobodnim radikalima i oksidativnim stresom, onda mehanizam delovanja ACE inhibitora može opravdati njihovu primenu u hipertenziji sa više stanovišta. Povećan unos natrijuma indukuje oksidativni stres, što takođe ide u prilog ovom mehanizmu povezanosti (243). Upotreba blokatora ksantin oksidaze, alopurinola, pokazuje povoljne efekte u početnim stadijumima hipertenzije. ACE inhibitori blokiraju i stvaranje peroksinitritnog radikala. Od skavendžera radikala treba spomenuti beta blokatore, za koje su ovi efekti dokazani u *in vivo* i *in vitro* studijama. Blokatori kanala za kalcijum takođe na još uvek nedovoljno poznat način umanjuju produkciju slobodnih radikala (233,238,247).

Dobijeni podaci u ovoj tezi na svoj način takođe potvrđuju da je oksidativni stres neminovni akter u razvoju esencijalne hipertenzije i njenih konsekvenci.

Kada je u pitanju progresija oboljenja i razvoj terminalne bubrežne insuficijencije, uloga oksidativnog stresa u patogenezi bubrežnih bolesti, glomerularne skleroze i tubularnih oštećenja je dobro dokumentovana. jedan od mehanizama je aktivacija i proliferacija mezangijskih ćelija (234,244-247). Pomenuti proces je posredovan signalnim mehanizmima putem protein kinaze C, mitogen-aktivirajućim protein kinazama (MAPK), kao i aktivacijom transformšućih faktora (TGF- $\beta$ 1) i fibronektina. Oksidativni stres može biti suprimiran dodatkom antioksidanasa što je u ovim oboljenjima eksperimentalno potvrđeno (243). Kao jedan od mehanizama koji indukuje oslobađanje slobodnih radikala je vrlo poznata Fentonova reakcija, koja se odvija u prisustvu metala sa promenljivom valencom, u prvom redu gvožđa. Jedan od izvora

gvožđa je urinarni transferin, protein koji vezuje gvožđe. Značaj gvožđa dokumentovan je eksperimentalno tako što je ustanovljeno poboljšanje dodatkom helatora (havatača) gvožđa ili eksperimentalno uvođenjem gvožđe deficitarne dijete (245-249).

Postavlja se pitanje i koji su mehanizmi koji se direktno odnose na hipertenziju koji pogoduju razvoju bubrežne insuficijencije. Među najvažnijim mehanizmima koji sinergistički deluju je povećan volumen ekstracelularne tečnosti, koji može biti apsolutni (generalni porast vode i elektrolita) i relativni (smanjenje volumena vaskularnog korita).

U faktore koji su odgovorni za apsolutni porast, nesumnjivo je mesto renin-angiotenzin-aldosteron sistema, koje je potencirano regionalnom ishemijom (236,248)

U faktore koji su odgovorni za relativni porast je povećana aktivnost vegetativnog nervnog sistema, kao i endotelina, a redukcija vazodilatatornih komponenti (azot oksida) i poremećaj sekrecije prostaglandina (232,237,238).

Pomenuti faktori deluju po tipu *circulus vitiosus*, jer povećana retencija vode i elektrolita remeti i kardiovaskularnu funkciju, otežano je izlučivanje tečnosti, što sada sa svoje strane potencira retenciju. Kod pacijenata na dijalizi je prisutna i dijastolna disfunkcija. Natrijum ima osobinu da se taloži u vezivnim tkivima, kao što su hrskavice, kolagen i glikozaminoglikani, odakle se oslobađa i tako pogoršava stanje. Tako se jedna konstantna hipervolemija nameće kao glavni faktor pogoršanja hipertenzije kod pacijenata na dijalizi. Simpatička aktivnost takođe ima veliki uticaj, a da je ona direktno poreklom uticaja na renalne arterije, pokazali su eksperimenti sa nefrektomijom ili deaferencijacijom. I ovaj mehanizam dovodi se u vezu sa renin-angiotenzin sistemom, gde se smatra da angiotenzin pokazuje „neurogeno“ delovanje, jer ACE inhibitori deluju inhibitorno i na ovaj mehanizam (234,244).

Terapija eritropoetinom je obavezna kod pacijenata na hemodijalizi, a pokazano je da je odgovorna za najmanje 10mmHg porasta hipertenzije. Razloge treba tražiti u povećanju viskoznosti krvi, aktivaciji autonomnog nervnog sistema i smanjenoj produkciji azot oksida (233,246).

Pacijenti sa bubrežnim oboljenjima imaju smanjenu sposobnost sinteze aktivne forme vitamina D procesom hidrosilacije, tako da postoji prisutan sekundarni hiperparatireoidizam. Hiperparatireoidizam mehanizmom mobilizacije kalcijuma na nivou kostiju dovodi do povećanja cirkulišućeg pula kalcijuma, a tendencije ka

osteoporozu zbog pražnjenja koštanih depoa. Kalcijum na nivou cirkulacije ulazi u glatkomišićne elije krvnih sudova i tu dovodi do vazokonstrikcije i posledične hipertenzije (238).

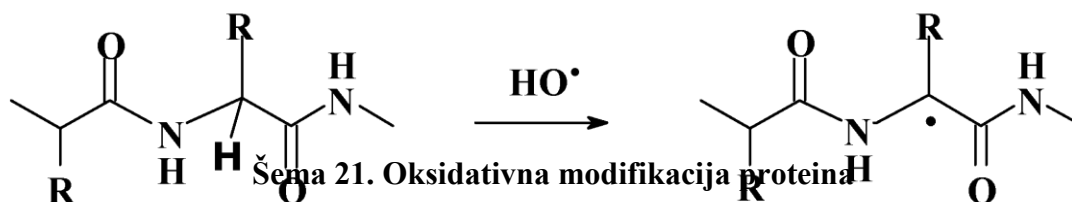
Pogoršanju funkcije bubrega u hipertenziji doprinosi sistem renin-angiotenzin još na jedan način, jer aktivira oksidativni stres lokalno na nivou bubrega indukcijom translokacije citozolarne subjediniice NAD(P)H oksidaze u mitohondrijalnu mebranu, gde dovodi do indukcije oslobađanja slobodnih radikala. kao jedan od kandidata za stvaranje jednog od najopasnijih radikala, peroksinitritnog radikala su i izoforme azot oksid sinatze NOX 1-4, koje su dokumentovane u korteksu bubrega (249). Veliki broj kliničkih studija pokazao je da je nivo malondialdehida vrlo validan marker bubrežnih oštećenja (234,235,245,246).

### **8.7. Analiza produkata uznapredovale oksidativne modifikacije proteina (AOPP) u ispitivanim grupama**

Vrednosti suptilnijih pokazatelja intenziteta i patogenetskih poremećaja u stanjima povišenog oksidativnog stresa kao što su derivati oksidativne modifikacije proteina daju značajno više informacija. Urađena analiza pokazala je postojanje značajnih razlika u vrednostima derivata uznapredovale oksidativne modifikacije proteina AOPP između ispitivanih grupa. Vrednosti AOPP bile su značajno veće kod bolesnika sa hipertenzijom u odnosu na kontrolnu i grupu bolesnika na dijalizi. Ovo jasno ukazuje da oksidativna modifikacija proteina predstavlja jednu od glavnih patogenetskih karakteristika hipertenzivnog stanja koja stoji u osnovi ne samo ćelijskog oštećenja već i nastanka endotelne disfunkcije i posledičnih poremećaja vazomocije i razvoja ateroskleroze. Slični nalazi i rezultati prezentovani su u nekoliko studija u kojima su produkti oksidativne modifikacije proteina bili izrazito povećani u uslovima postojanja esencijalne arterijske hipertenzije bez obzira na prisustvo ili odsustvo pratećih kardiovaskularnih oboljenja i komplikacija(251). Ujedno ovi parametri su bili i značajni pokazatelji redukcije glomerulane filtracije i u stanjima sa normalnim azotnim produktima kod trudnica (252).AOPP kao marker oksidativne modifikacije proteina prvi put je dokumentovan 1996 godine i to kod pacijenata sa hroničnom uremijom. Spektralne karakteristike AOPP molekula pokazala su da je reč o kompleksnoj

hromofori, koja odgovara pojavi ditirozina, karbonilnih grupa i pentozidina. Oksidativna modifikacija proteina je kovalentna modifikacija proteina koja je izazvana ili indukovana reaktivnim intermedijatima slobodnih radikala ili njihovim krajnjim produktima (169,253-255).

Proteini su, kako je poznato, u kvalitativnom i kvantitativnom smislu glavne komponente svih ćelijskih sistema, bilo kao enzimi, hormoni, receptori, jonski transporteri, glukozni transporteri, različiti nosači i gradivne komponente ćelija i ekstracelularnog matriksa. U odnosu na organe proteina ima negde oko tri puta više nego lipida, najmanje 50 puta više nego DNK i holesterola. Sa tog aspekta gledano, kvantitativno su najzastupljeniji substrat. U odnosu na plazmu, koja prosečno sadrži 60-80g/l proteina, to je najmanje 100 puta više nego sadržaj lipida (oko 0,5g/l totalnih lipida). Oksidativna modifikacija proteina protiče skoro hiljadu puta brže nego modifikacija drugih biomolekula (albumin  $8 \times 10^{10} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), a DNK ( $8 \times 10^8 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Kada se gleda primarna struktura proteina, konsekvence oksidativne modifikacije su modifikacija pojedinih amino kiselina, gubitak pojedinih amino kiselina, agregacija i fragmentacija proteina (256,257).



Konsekvence oksidativne modifikacije proteina su: oksidacija bočnog lanca (koristi se i kao marker), fragmentacija, formiranje novih reaktivnih speciesa (peroxid, DOPA), oslobađanje drugih radikala i lančane reakcije, dimerizacija i agregacija proteina, konformacione promene enzima i receptora, gubitak strukture i funkcionalne aktivnosti, poremećaj ćelijskog metabolizma, efekat na gensku regulaciju i ekspresiju, modulacija ćelijske signalizacije, i indukcija apoptoze i nekroze, povećana imunogenost (oxo LDL), abnormalno prihvatanje i prepoznavanje od strane receptora (258-262).

Amino kiseline koje su najpodložnije oksidativnoj modifikaciji (5) su prikazane na tabeli.

**Tabela 31. Oksidativno modifikovane amino kiseline i njihovi primarni prekursori (adaptirano po Đorđević i sar.)**

<b>Cistein</b>	Disulfidi, Mešoviti disulfide
<b>Metionin</b>	Metionin-sulfoksidi
<b>Tirozin</b>	Ditirozin, Nitrotirozin, hlorotirozin. Dopa
<b>Triptofan</b>	Hidroksi i nitro-triptofan, Kinurenin
<b>Fenil-alanin</b>	Hidroks-ifenil-alanin
<b>Valin, Leucin</b>	Hidroperoksidi
<b>Histidin</b>	alfa-ketohistidin, asparagin, aspartat
<b>Glutamil</b>	Oksalna kis. Pirogrozdjana kis
<b>Prolin</b>	Hidroksiprolin, pirolidin, glutamat semialdehid
<b>Treonin</b>	2-amino-3-keto-buterna kis
<b>Arginin</b>	Glutamat semialdehid, hloramin
<b>Lizin</b>	Alfa-aminoadipinska kis. Hloramini, MDA-lizin, akrolein- lizin, karboksimetri-lizin

Oksidativnu modifikaciju proteina mogu pokrenuti različiti radikali. Kada je u pitanju hipertenzija i bubrežna oboljenja, najčešći razlozi su kao i drugim oboljenjima i stanjima, a to su:

- Hemijski agensi (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fe<sup>2+</sup>, HOBr, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ONOO)
- Aktivisani fagociti (“oxidative burst”)
- Lipidni peroksidi (MDA, akrolein)
- Mitohondrije (elektron transportni sistem)

- Enzimi oksidoreduktaze (ksantin oksidaza, mijeloperoksidaza, P-450 enzimi)
- Neki lekovi i njihovi metaboliti

Derivati oksidativne modifikacije proteina najčešće opisani su oksidacioni produkti sumpora (Cis disulfidi, S-tiolati, Met sulfoksidi), karbonilni derivati (aldehidi i ketoni), intermedijati sa tirozinom, produkti nitrozilacije, modifikacija triptofana, hidroperoksi derivati alifatičnih amino kiselina, hloramini i produkti dezaminacije, interkonverzije jedne amino kiseline u drugu ( histidin u asparagin, prolin u oksiprolin), kompleksi sa produktima lipidne peroksidacije (MDA, akrolein), kao i oksidacioni derivati amino kiselina (para-hidroksi-fenil-acet-aldehid), produkti agregacije i raskidanje peptidnih veza. Različiti produkti oksidativne modifikacije proteina daju različite konsekvence na ćelijsku funkciju. Stvaranje karbonila je najčešće udruženo sa disfunkcijom, a neke oksidativne modifikacije, mada ređe mogu da proteknu afunkcionalno (256,257).

Produkti uznapredovale oksidacije proteina (AOPP) su značajni prediktori razvoja nefropatije. Kada se porede u multivarijantnoj analizi sa dugim faktorima rizika za lošu prognozu, staju u red sa hipertenzijom i proteinurijom. U nekim studijama spominju se i kao „surogat“ markeri uspešnosti terapije u bubrežnoj insuficijenciji. Među faktorima koji doprinose razvoju uznapredovalih produkata oksidativne modifikacije proteina je hronična inflamacija, aktivacija renin-angiotenzin sistema, kao i smanjena antioksidativna zaštita. Povećanje nivoa AOPP korelira i sa tubularnom sklerozom i sa glomerulosklerozom, što znači da mogu biti marker generalnog bubrežnog oštećenja. AOPP mogu biti uključeni u remodeliranje bubrežne mase, kao i fibrogenezu. Jedan od mehanizama kako AOPP oštećuje bubrege je i progresija aterosklerotičnih promena i pogoršanje hipertenzije. I u ovim modelima davanje antioksidativne terapije dokumentovalo je moguću kauzalnu vezu. AOPP pokreću i „circulus vitiosus“ preko dva sistema: stvoreni produkti oksidacije dalje, sa svoje strane pokreću lančane reakcije dalje produkcije radikala (260). Sa druge strane AOPP stimuliše aktivaciju redoks-senzitivnog transkripcionog faktora NF-κB, koji je najjači inducer inflamacije, putem oslobađanja inflamatornih citokina. Inflamacija aktivira NADPH oksidazni i mijeloperoksidazni sistem leukocita (169,254). Pored toga



dokumentovana je i infiltracija makrofagalnim ćelijama, što promoviše fibrogenezu. Stimulisana je produkcija i hemokina, kao što je MCP-1, koji stimuliše miofibroblastnu aktivnost (261,262). Dokazano je da AOPP stimuliše i oslobađanje transformirajućeg faktora  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), koji takođe pokazuje fibrozirajuća svojstva posredujući nefrosklerozi i smanjenju bubrežne mase. Tako se AOPP deklariraju ne samo kao jednostavni produkti oksidativne modifikacije proteina, već proinflamatorni i induceri fibrogeneze (253,258,263).

## 8.8. Analiza korelacija

Učinjena parcijalna korelaciona analiza prilagođena prema polu i starosti bolesnika pokazuje da postoji značajna negativna korelacija između vrednosti mokraćne kiseline sa vrednostima ADP, odnosom ATP/UA i ADP/UA u grupi bolesnika sa hipertenzijom. Za razliku od povezanosti, koja je registrovana u grupi zdravih gde su aktivnost ksantin oksidoreduktaze i ksantin dehidrogenaze imale značajnu korelaciju sa adenilnim nukleotidima i njihovim indeksima ovakve veze nisu registrovane u grupi hipertenzivnih bolesnika. Ovaj gubitak povezanosti između aktivnosti enzima u metabolizmu ksantina i vrednostima adenilnih nukleotida i njihovim indeksima jasno ukazuje na jedan od mogućih patogenetskih mehanizama koji stoje u osnovi esencijalne hipertenzije, a odnosi se na disfunkciju prooksidativnih i antioksidativnih mehanizama ćelija i tkiva (264). Učinjena parcijalna korelaciona analiza prilagođena prema polu i starosti bolesnika pokazuje da postoji značajna negativna korelacija između vrednosti ureje, kreatinina i sistolnog krvnog pritiska sa odnosom ATP/ADP. Značajna pozitivna korelacija nađena je između vrednosti ureje i kreatinina sa ADP u grupi bolesnika sa arterijskom hipertenzijom. Kod zdravih ispitanika jedina korelacija je nađena između vrednosti ureje i AMP dok ostalih značajnih povezanosti nije bilo. Ovi rezultati ukazuju na značaj poremećaja bubrežne funkcije kod bolesnika sa esencijalnom arterijskom hipertenzijom kao i na značaj adekvatne i pravovremene terapije esencijalne arterijske hipertenzije u cilju očuvanja bubrežne funkcije i očuvanja glomerulane filtracije. Pored ovih rezultata pokazalo se da degradacioni produkti adenilnih nukleotida u obliku

niskoenergetskih jedinjenja predstavljaju rani i potencijalno značajan marker nastupajućih poremećaja koji se javljaju u toku razvoja arterijske hipertenzije (265).

Učinjena statistička analiza nije pokazala postojanje značajnije korelacije između vrednosti adenilnih nukleotida i njihovih indeksa sa uznapredovalim produktima oksidacije proteina i enzimima metabolizma nukleinskih kiselina u hipertenzivnih bolesnika. Međutim u grupi zdravih ispitanika ova korelacija je pokazana za veći broj oblika adenilnih nukleotida i njihovi indeksa sa uznapredovalim produktima oksidacije proteina. Rezultati ukazuju na značaj oksidativnog stresa kao patogenetskog faktora u razvoju esencijalne arterijske hipertenzije ne samo kroz aposlutni porast njegovog intenziteta i porast oštećenja proteinskih struktura, pa samim tim i endotelne funkcije (mereno kroz vrednosti uznapredovalih produkta oksidacije proteina) već i kroz gubitak normalnih kontraregulatornih mehanizama koji se suprotstavljaju porastu oksidativnog stresa, kao što su enzimi koji učestvuju u stvaranju adenilatih nukleotida.

1. Koncentracija cirkulišućih adenilnih nukleotida pokazuje značajan pomak ka degradacionim produktima u arterijskoj hipertenziji, a naročito kod pacijenata sa terminalnom bubrežnom insuficijencijom na programu hemodijalize. Snižene vrednosti ATP-a odlika su bolesnika sa hipertenzijom i terminalnom bubrežnom insuficijencijom, dok su visoke vrednosti ADP odlika bolesnika na hemodijalizi. Vrednosti AMP pokazuju najveće međugrupne varijacije i mogu služiti kao najbolji pokazatelj pada energetskeg metabolizma.
2. Adenilatni energetskei naboj kao i adenilatni indeksi (ATP/ADP i ATP/mokraćna kiselina) pokazuju izrazite međugrupne varijacije, pri čemu njihov pad predstavlja karakteristiku hipertenzivnog stanja, a posebno prisustva terminalne bubrežne insuficijencije.
3. Dobijeni rezultati u ovoj studiji pokazuju da je homeostaza adenilnih nukleotida u esencijalnoj hipertenziji, a posebno u terminalnoj bubrežnoj insuficijenciji značajno narušena i indirektno odslikava da su endotelne ćelije izložene mehaničkom stresu, glatkomišićne ćelije izložene vazokonstriktornim stimulusima, tkiva hipoksiji i ćelijskoj energetskeo krizi, a cirkulacija trombogenim efektima.
4. Vrednosti azotnih produkata i mokraćne kiseline nisu značajnije poremećene kod postojanja esencijalne arterijske hipertenzije.
5. Aktivnost enzima produkcije adenzina 5-nukleotidaze pokazuje trend pada dok aktivnost enzima degradacije - adenzin dezaminaze pokazuje trend porasta kod bolesnika sa arterijskom hipertenzijom i hroničnom bubrežnom insuficijencijom, pri čemu je ovaj dinamički odnos u smislu povećane degradacije adenzina značajno veći kod bolesnika hroničnom bubrežnom insuficijencijom.
6. Vrednost produkata uznapredovale oksidacije proteina značajno raste kod bolesnika sa hipertenzijom, što ukazuje na značaj, ali i uspešnost primene ove terapijske procedure u sprečavanju oštećenja tkiva i progresiji endotelne disfunkcije kod ovih bolesnika. Podatak da kod bolesnika sa bubrežnom insuficijencijom na programu hemodijalize nije bilo razlika u odnosu na kontrolne uzorke je posledica izrazitog gubitka albumina bubrežima kod

pacijenata sa terminalnom bubrežnom insuficijencijom, koji su glavni substrati oksidativne modifikacije, a nivo AOPP u ovoj studiji je dat u apsolutnoj koncentraciji.

7. Koncentracija lipidnih peroksida MDA, značajno raste kod pacijenata sa terminalnom bubrežnom insuficijencijom, ali pokazuje tendenciju porasta kod pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom.
8. Kod bolesnika sa arterijskom hipertenzijom postoji porast aktivnosti ksantin oksidaze, ali i porast dehidrogenazne forme pri čemu je evidentiran i porast aktivnosti ksantin oksidoreduktaze, što ukazuje na porast prooksidativnih mehanizama, ali i još uvek očuvani kapacitet antioksidativnih mehanizama kojima se sprečava značajniji porast oksidativnog stresa. Kompenzaorna komponenta u vidu povećane dehidrogenazne aktivnosti nije registrovana kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom insuficijencijom, a ksantin oksidaza pokazuje izrazito povećanje.
9. Vrednosti mokraćne kiseline i ureje, produkata uznapredovale oksidacije proteina i aktivnosti ksantin oksidaze pokazuju pozitivnu povezanost sa pojavom arterijske hipertenzije dok odnosi ATP/ADP i ATP/mokraćna kiselina imaju negativni prognostički značaj za prisustvo arterijske hipertenzije.
10. Dobijeni rezultati u ovoj studiji pokazuju da je homeostaza adenilnih nukleotida i markera oksidativnog stresa u esencijalnoj hipertenziji, a posebno u terminalnoj bubrežnoj insuficijenciji značajno narušena i indirektno odlikava da su endotelne ćelije izložene mehaničkom stresu, glatkomišićne ćelije izložene vazokonstriktornim stimulusima, tkiva hipoksiji i ćelijskoj energetskej krizi, a cirkulacija pro-trombogenicim efektima.

## LITERATURA

1. Lović B, U. Ilić S.: Interna medicina, Prvo izdanje, knjiga II. Prosveta, Niš, 2004; 13-23.
2. European Society of Hypertension Guidelines for the Management of arterial Hypertension. J of Hypertension 2003; 21: 1011-1053.
3. Yufi FC. Molecular genetics of human hypertension. J Hypertens 1998; 16: 1871-1878.
4. Oscar AC, Susanne O. Essential hypertension. Part I: Definition and Etiology. Circulation 2000; 329-335.
5. Lifton RP. Genetic determinants of human hypertension. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995; 92: 8545-8551.
6. Williams RR, Hunt SC. Tabulations and expectations regarding the genetics of human hypertension. Kidney Int 1994; 45: 557-964.
7. Sanjay V, Tiwari SC. Essential Hypertension - Pathogenesis and Pathophysiology. J Indian Academy of Clinical Medicine 2001; 2 (3): 140-161.
8. Laragh JH. The renin system and four lines of hypertension research. Hypertension 1992; 20: 267-269.
9. Laragh YH, Sealy JE. Renin system under standard for analysis and treatment of hypertensive patients in Laragh YH, Brenner BM (eds). Hypertension, Pathophysiology, Diagnosis and Management, unded Renin Press, New York 1995; 1813-1836.
10. Guiton AC, Hall JE. The dominant role of kidneys in longterm arterial pressure regulation in normal and hypertensive states. In Laragh JH, Brenner BM (eds): Hypertension, Pathophysiology, Diagnosis and Management, 2 ed. Raven Press, New York 1995; 1311-1326.
11. Williams GH, Hallenberg NK. Non-modulation hypertension. A subset of sodium-sensitive hypertension. Hypertension 1991; 17: 181-185.
12. Fisher DL, Ferri C. Age, gender and non modulation. Hypertension 1997; 29: 980-985.

13. Sheperd JT. Increased systemic vascular resistance and primary hypertension: expanding complexity. *J Hypertens* 1990; 8: 15-27.
14. Hetall M. Comparativ study of baroreflex sensitivity in patients with long-lasting medically treated essential hypertension. *Clin.Auton.Res* 2002; 12(6): 465-471.
15. Metal T. Age and blood pressure changes: A 20 year follow up study in nunsin 9 secluded order. *Hypertensin* 1988; 12: 457-461.
16. Di Bona GF. Nervous kidney. Interaction between renal sympathetic nerves and the renin-angiotensin system in the control of renal function, *Hypertension* 2000; 38: 1083-88.
17. Steassen JA . Essential hypertension. *The Lancet* 2003; 361: 1629-1641.
18. Ferrannini E. Physiological and metabolic consequences of obesity *Metabolism* 1995; 9: 15-17.
19. Cohen BE, Lee G, Arispe N, Pollard Hb. Cyclic 3'-5'-adenosine monophosphate binds to annexin I and regulates calcium – dependent membrane aggregation and ion channel activity. *FEBS Lett* 1995; 377: 444-450.
20. Edwards FA. ATP receptors. *Curr Opin neurobiol* 1994; 4 (3): 347-352.
21. Traut TW. Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Moll Cell Bioche* 1994; 140: 1-22.
22. Koraćević D, Bjelaković G, Đorđević V, Nikolić J, Pavlović D, Kocić G. *Biohemija, Savremena Administracija Beograd, 2000.*
23. Kocić G. Promet Purina i pirimidina. U: Koraćević D, Bjelaković G, Đorđević VB, Nikolić J, Pavlović DD, Kocić G. *Biohemija. Savremena administracija, Beograd 1996; 584-608.*
24. Yegutkin GG, Samburski SS, Jalkanen S. Soluble purine-converting enzymes circulate in human blood and regulate extracellular ATP level via counteracting pyrophosphatase and phosphotransfer reactions. *FASEB J* 2003; 17: 1328-1330.
25. Bodin P, Burnstock G. Purinergic signaling: ATP release. *Neurochem Res* 2001; 26: 959-969.
26. Burnstock G. Purinergic Signaling and Vascular Cell Proliferation and Death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 364-373.

27. Manfredi JP, Holmes EW. Purine salvage pathways in myocardium. *Annu Rev Physiol* 1985; 47: 691-705.
28. Ataulakhanov AI, Ataulakhanov FI, Vitvitsky V M, Zhabotinsky AM, Pichugin AV. What Determines the Intracellular ATP Concentration *Biochemistry (Moscow)* 1985; 50: 850–856.
29. Aprille J. Regulation of the mitochondrial adenine nucleotide pool size in liver: mechanism and metabolic role. *FASEB J* 1988;2: 2547–2556.
30. Smolenski RT, Kalsi KK, Zych M, Kochan Z, Yacoub MH. Adenine/ribose supply increases adenosine production and protects ATP pool in adenosine kinase-inhibited cardiac cells. *J Mol. Cell Cardiol* 1998; 30: 673-683.
31. Kalsi KK, Smolenski RT, Pritchard RD, Khaghani A, Seymour AM, Yacoub H. Effects of dipyridamole and adenine/ribose on ATP concentration and adenosine production in cardiac myocytes. *Adv Exp Med Bio* 1998; 431: 781-784.
32. Bergfeld GR, Forrester T. Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 40–47.
33. Burnstock G. Potential therapeutic targets in the rapidly expanding field of purinergic signalling. *Clin Med*, 2002; 2: 45–53.
34. Burnstock G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev* 2006;58: 58–86.
35. Heptinstall S, Glenn JR, Johnson A, Myers B, White AE, Zhao L. Leukocytosis, vascular disease and adenine nucleotide metabolism. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2006; 26: 22.
36. Kaminsky YG, Kosenko EA, Kondrashova MN. Analysis of the circadian rhythm in energy metabolism of rat liver. *Int J Biochem* 1984; 16: 629–639.
37. Bessman SP. The creatine phosphate energy shuttle. *Ann Rev Biochem*, 1985; 54: 831–862.
38. Birk AV, Broekman MJ, Gladek EM, Robertson HD, Drosopoulos JH, Marcus AJ, et al. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. *J Laboratory Clin Med* 2002; 140:166–175.

39. Coade S, Pearson J. Metabolism of adenine nucleotides in human blood. *Circ Res* 1989; 65: 531–53.
40. Gorman MW, Feigl EO, Buffington CW. Human plasma ATP concentration. *Clin Chem* 2007; 53(2): 318-25.
41. Gorman MW, Marble DR, Ogimoto K, Feigl EO. Measurement of adenine nucleotides in plasma. *Luminescence*, 2003;18(3): 173-181.
42. Harkness RA, Coade SB, Webster AD. ATP, ADP and AMP in plasma from peripheral venous blood. *Clin Chim Acta* 1984; 143(2): 91-98.
43. Forrester T, Lind AR. Identification of adenosine triphosphate in human plasma and the concentration in the venous effluent of forearm muscles before, during and after sustained contractions. *J Physiol*. 1969; 204(2): 347-364.
44. Ryan LM, Rachow JW, McCarty BA, McCarty DJ. Adenosine triphosphate levels in human plasma. *J Rheumatol* 1996; 23(2): 214-219.
45. Farias M, Gorman MW, Savage MV, Feigl EO. Plasma ATP during exercise: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288(4): 1586-590.
46. Burnstock G, Williams M. P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295: 862-869.
47. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 413–492.
48. North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 2002; 82: 1013–1067.
49. Schwiebert LM, Rice WC, Kudlow BA, Taylor AL, Schwiebert EM. Extracellular ATP signaling and P2X nucleotide receptors in monolayers of primary human vascular endothelial cells. *Am J Physiol* 2002; 282: 289–301.
50. Gachet C. Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006; 46: 277–300.
51. Burnstock G. Release of vasoactive substances from endothelial cells by shear stress and purinergic mechanosensory transduction. *Journal of anatomy* 1999; 194 ( 3): 335-342.



52. Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; 362: 299-309.
53. Usatyuk PV, Fomin VP, Shi S, Garcia JG, Schaphorst K, Natarajan V. Role of  $Ca^{2+}$  in diperoxovanadate-induced cytoskeletal remodeling and endothelial cell barrier function. *Am J Physiol* 2003; 285: 1006–1017.
54. Bodin P, Burnstock G. ATP-stimulated release of ATP by human endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 27: 872–875.
55. Bodin P, Burnstock G. Increased release of ATP from endothelial cells during acute inflammation. *Inflamm Res* 1998; 47: 351–354.
56. Kolosova IA, Mirzapioiazova T, Adyshev D, Usatyuk P, Romer LH, Jacobson JR, et al. Signaling Pathways Involved in Adenosine Triphosphate-Induced Endothelial Cell Barrier Enhancement. *Circulation Research* 2005; 97:115.
57. Stafford N, Pink AE, White AE, Glenn JR, Heptinstall S. Mechanisms involved in adenosine triphosphate-induced platelet aggregation in whole blood. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2003; 23: 1928 .
58. Pearson JD, Gordon JL. Vascular endothelial and smooth muscle cells in culture selectively release adenine nucleotides. *Nature* 1979; 281: 384–386.
59. Guidicelli Y, Pecquery R, Provin D, Agli B, Nordmann R. Regulation of lipolysis and cyclic AMP synthesis through energy supply in isolated human fat cells. *Biochim Biophys Acta* 1977; 23: 385–398.
60. Slominska EM, Szolkiewitz M, Smolenski RT, Rutkowski B, Swierczynski J. High plasma adenine Concentration in chronic renal failure and its relation to erythrocyte ATP. *Nephron* 2002; 91(2): 286-291.
61. Muller MM, Kraup M, Chiba P, Rumpold H. Regulation of purine uptake in normal and neoplastic cells. *Adv Enzyme Regul* 1983; 21: 239-256.
62. Zhao T, Xi L, Chelliah J, Levasseur JE, Kukreja RC. Inducible nitric oxide synthase mediates delayed myocardial protection iduced by activation of adenosine A1 receptors: evidence from gene-knockout mice. *Circulation* 2000; 102: 902-907.
63. Tune JD, Gorman MW, Feigl EO. Matching coronary blood flow to myocardial oxygen consumption. *J Appl Phisiol* 2004; 97: 404-415.

64. Thompson L. 5'-Nucleotidase - an overview of the last three years. In: Harkness et al. Purine and Pyrimidine Metabolism in Man VII, Part B. Plenum Press 1991: 145-150.
65. Resta R, Thompson LF. T cell Signalling Through CD73. *Cell signal* 1997; 2: 131-139.
66. Morell A, Losa G, Barandun S. Surface Markers, 5'-Nucleotidase Activity and in vitro Functions of Lymphocytes from Patients with Primary Humoral Immunodeficiency. *Lin Immunol Immunopathol* 1985; 35: 9-21.
67. Takano T, Clish CB, Gronert K, Petasis N, Serhan CN. Neutrophil-mediated changes in vascular permeability are inhibited by topical application of aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 and novel lipoxin B4 stable analogues. *J Clin Invest* 1998; 101: 819-826.
68. Gustafson LA, Kroll K. Downregulation of 5' nucleotidase in rabbit heart during coronary underperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1998; 274: 529-538.
69. Koraćević D. Enzimi. U Koraćević D, Bjelaković G, Đorđević VB, Nikolić J, Pavlović DD, Kocić G. *Biohemija. Savremena administracija, Beograd* 1996: 2-159.
70. Van der Weyden M, Kelley W. Human Adenosine Desaminase. Distribution and properties. *J Biol Chem* 1964; 251: 5448-5456.
71. Deoxyadenosine triphosphate as a potentially toxic metabolite in adenosine deaminase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 472-476.
72. Smolenski RT, Suijters A, Yacoub MH. Adenine nucleotide catabolism and adenosine formation in isolated human cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1992; 24: 91-96.
73. Barankiewicz J, Dansk AM, Abushanab E, Makings L, Wiemann T, Wallis RA, et al. Regulation of Adenosine Concentration and Cytoprotective Effects of Novel Reversible Adenosine Deaminase Inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 283: 1230-1238.
74. Eroglu A, Canbolat O, Demirci S, Kocaoglu H, Eryavuz Y, Akgul H. Activities of adenosine deaminase and 5'-nucleotidase in cancerous and noncancerous human colorectal tissues. *Med Oncol* 2000; 17: 319-324.
75. Massey V, Harris CM. Milk xanthine oxidoreductase: the first one hundred years. *Biochem Soc Trans* 1997; 25: 750-755.

76. Hoidal JR, Hueckstedt T, Sanders KA, Pfeffer K. Transcriptional regulation of human xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase. *Biochem Soc Trans* 1997; 25: 796-799.
77. Đorđević BV, Pavlović DD, Kocić G. Biohemija slobodnih radikala. Medicinski fakultet Niš, 2000.
78. Sarnesto A, Linder N, Raivio KO. Organ distribution and molecular forms of human xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase protein. *Lab. Investig* 1996; 74: 48-56.
79. Nishino T, Nakanishi S, Okamoto K, Mizushima J, Hori H, Iwasaki T, et al. Conversion of xanthine dehydrogenase into oxidase and its role in reperfusion injury. *Biochem. Soc. Trans* 1997; 25: 783-786.
80. Mc Cord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med* 1985; 17(312): 159-163.
81. Ikeda T, Shimokata K, Daikoku T, Fukatsu T, Tsutsui Y, Nishiyama Y. Pathogenesis of cytomegalovirus-associated pneumonitis in ICR mice: possible involvement of superoxide radicals. *Arch. Virol* 1992; 127: 11-24.
82. Hearse DJ, Manning AS, Downey JM, Yellon DM. Xanthine oxidase: a critical mediator of myocardial injury during ischemia and reperfusion? *Acta Physiol Scand* 2001; 548: 65-78.
83. Linas SL, Whittenburg D, Repine JE. Role of xanthine oxidase in ischemia/reperfusion injury. *AM J Physiol* 1990; 258: 711-716.
84. Yellon, D.M. & Hausenloy, D.J. Myocardial reperfusion injury. *N. Engl. J. Med.* 2007; 357: 1121-1135.
85. Bakhtiyarov ZA. Changes in xanthine oxidase activity in patients with circulatory failure. *Ter Arkh* 1989; 61: 68-69.
86. Newaz MA, Adeb NN, Muslim N, Razak TA, Htut NN. Uric acid, xanthine oxidase and other risk factor of hypertension in normotensive subjects. *Clin Exp Hypertens* 1996; 18: 1035-1050.

87. Sanchez LG, Tapia E, Avila C, Soto V, Franco M, Santamaria J. Mild hyperuricemia induces glomerular hypertension in normal rats. *Am J Physiol* 2002; 283: 1105-1110.
88. Xia Y, Zweier JL. Substrate Control of Free Radical Generation from Xanthine Oxidase in the Postischemic Heart. *J Biol Chem* 1995; 270: 18797-18803.
89. Wu XW, Lee CC, Muzny DM, Caskey CT. Urate oxidase: primary structure and evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9412-6.
90. Watanabe S, Kang DH, Feng L, Nakagawa T, Kanellis J, Lan H. Uric acid, hominoid evolution, and the pathogenesis of salt-sensitivity. *Hypertension* 2002; 40: 355-60.
91. Oda M, Satta Y, Takenaka O, Takahata N. Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications. *Mol Biol Evol* 2002; 19: 640–653.
92. Baker JF, Krishnan E, Chen L, Schumacher HR. Serum uric acid and cardiovascular disease: recent developments and where do they leave us? *Am J Med* 2005; 118: 816-26.
93. Fang J, Alderman MH. Serum uric acid and cardiovascular mortality the NHANES I epidemiologic follow-up study, 1971–1992: National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 2000; 283: 2404-10.
94. Kahn HA, Medalie JH, Neufeld HN, Riss E, Goldbourt U. The incidence of hypertension and associated factors: the Israel ischemic heart disease study. *Am Heart J* 1972; 84: 171–182.
95. Taniguchi Y, Hayashi T, Tsumura K, Endo G, Fujii S, Okada K. Serum uric acid and the risk for hypertension and type 2 diabetes in Japanese men: The Osaka Health Survey. *J Hypertens* 2001; 19: 1209–1215.
96. Nagahama K, Inoue T, Iseki K. Hyperuricemia as a predictor of hypertension in a screened cohort in Okinawa, Japan. *Hypertens Res* 2004; 27: 835–841.
97. Strasak A, Ruttman E, Brant L, Kelleher C, Klenk J, Concini H. Serum Uric Acid and Risk of Cardiovascular Mortality: A Prospective Long-Term Study of 83 683 Austrian Men. *Clin Chem* 2008; 54: 273-84.

98. Hoiegggen A, Alderman MH, Kjeldsen SE, Julius S, Devereux RB, De Faire U, et al. : LIFE Study Group. The impact of serum uric acid on cardiovascular outcomes in the LIFE study. *Kidney Int* 2004; 65 : 1041–1049.
99. Johnson RJ, Rideout BA. Uric acid and diet—insights into the epidemic of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 2004; 350:1071–1073.
100. Masuo K, Kawaguchi H, Mikami H, Oqihara T, Tuck ML. Serum uric acid and plasma norepinephrine concentrations predict subsequent weight gain and blood pressure elevation. *Hypertension* 2003; 42: 474–480.
101. Feig DI, Kang DH, Nakagawa T, Mazzali M, Johnson RJ. Uric acid and hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2006; 8: 111-5.
102. Johnson RJ, Segal MS, Srinivas TR, Ejaz A, Mu W, Roncal C, et al. Essential hypertension, progressive renal disease and uric acid: A pathogenetic link? *J Am Soc Nephrol* 2005; 16 : 1909– 1919.
103. Kanbay M, Solak Y, Dogan E, Lanaspá MA, Covic A. Uric acid in hypertension and renal disease: the chicken or the egg? *Blood Purif* 2010; 30: 288-95.
104. Johnson RJ, Feig DI, Herrera-Acosta J, Kang DH. Resurrection of uric acid as a causal risk factor in essential hypertension. *Hypertension* 2005; 45: 18–20.
105. Selby JV, Friedman GD, Quesenberry CP. Precursors of essential hypertension: pulmonary function, heart rate, uric acid, serum cholesterol, and other serum chemistries. *Am J Epidemiol* 1990; 131: 1017–1027.
106. Kaya EB, Yorgun H, Canpolat U, Hazirolan T, Sunman H, Ulgen A, et al. Serum uric acid levels predict the severity and morphology of coronary atherosclerosis detected by multidetector computed tomography. *Atherosclerosis* 2010; 213: 178-83.
107. Alcaíno H, Greig D, Castro P, Verdejo H, Mellado R, García L, et al. The role of uric acid in heart failure. *Rev Med Chile* 2011; 139: 505-515.
108. Doehner W, von Haehling S, Anker SD. Uric acid as a prognostic marker in acute heart failure—new expectations from an old molecule. *Eur J Heart Fail* 2007; 9: 437-9.
109. Durante P, Chavez M, Perez M, Romero F, Rivera F. Effect of uric acid on hypertension progression in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 2010; 86: 957-64.

110. Mazzali M, Kanellis J, Han L, Feng L, Chen Q, Kang DH, et al. Hyperuricemia induces a primary arteriopathy in rats by a blood pressure-independent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 282: 991–997.
111. Sanchez LG, Tapia E, Avila C, Soto V, Franco M, Santamaria J, et al. Mild hyperuricemia induces glomerular hypertension in normal rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283: 1105–1110.
112. Tomiyama H, Higashi Y, Takase B, Node K, Sata M, Inoue T, et al. Relationships Among Hyperuricemia, Metabolic Syndrome, and Endothelial Function. *Am J Hypertens* 2011; 24: 770-4.
113. Perlstein TS, Gumieniak O, Hopkins PN, Murphey LJ, Brown NJ, Williams GH, et al. Uric acid and the state of the intrarenal renin-angiotensin system in humans. *Kidney Int* 2004; 66 : 1465 –1470.
114. Khosla UM, Zharikov S, Finch JL, Nakagawa T, Roncal C, Mu W, et al. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. *Kidney Int* 2005; 67:1739– 1742.
115. Zoccali C, Maio R, Mallamaci F, Sesti G, Perticone F. Uric acid and endothelial dysfunction in essential hypertension. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:1466– 1471.
116. Saito I, Saruta T, Kondo K, Nakamura R, Oguro T, Yamagami K, et al. Serum uric acid and the renin-angiotensin system in hypertension. *J Am Geriatrics Soc* 1978; 26: 241–247.
117. Rao GN, Corson MA, Berk BC. Uric acid stimulates vascular smooth muscle cell proliferation by increasing platelet derived growth factor A-chain expression. *J Biol Chem* 1991; 266: 8604–8608.
118. Kang DH, Yu ES, Park JE, Yoon KI, Kim MG, Kim SJ, Johnson R. Uric acid induced C-reactive protein (CRP) expression via upregulation of angiotensin type 1 receptors (AT<sub>1</sub>) in vascular endothelial cells and smooth muscle cells [Abstract]. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14 : 136.
119. Mazzali M, Hughes J, Kim YG, Jefferson JA, Kang DH, Gordon KL, et al. Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism. *Hypertension* 2001; 38: 1101– 1106.
120. Johnson RJ, Kivlighn SD, Kim Y-G, Suga S, Fogo A. Reappraisal of the pathogenesis and consequences of hyperuricemia in hypertension, cardiovascular disease, and renal disease. *Am J Kid Dis* 1999; 33: 225–234.

121. Rosenfeld JB. Effect of long-term allopurinol administration on serial GFR in normotensive and hypertensive hyperuricemic subjects. *Adv Exp Med Biol* 1974; 41: 581–596.
122. Wei L, Mackenzie IS, Chen Y, Struthers AD, MacDonald TM. Impact of allopurinol use on urate concentration and cardiovascular outcome. *Br J Clin Pharmacol* 2011; 71: 600-607.
123. George J, Struthers AD. Role of urate, xanthine oxidase and the effects of allopurinol in vascular oxidative stress. *Vasc Health Risk Manag* 2009; 5: 265-72.
124. Pinchuk I, Shoal H, Dotan Y, Lichtenberg D. Evaluation of antioxidants: scope, limitations and relevance of assays. *Chem Phys Lipids* 2012; 165(6): 638-47.
125. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1): 44-84.
126. Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005; 45: 287–306.
127. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005; 12(10): 1161-208.
128. Pinazo MD, Gallego R, García JJ, Zanon V, Nucci C, Dolz-Marco R, et al. Oxidative stress and its downstream signaling in aging eyes. *Clin Interv Aging* 2014; 9: 637-52.
129. Liochev SI, Fridovich I. The Haber-Weiss cycle - 70 years later: an alternative view. *Redox Rep* 2002; 7(1): 55-7.
130. Liochev SI, Fridovich I. The role of O<sub>2</sub> in the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 1994; 16(1): 29-33.
131. Decoursey TE, Ligeti E. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2173-93.
132. Ridnour LA, Thomas DD, Mancardi D, Espey MG, Miranda KM, Paolocci N, et al. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biol Chem* 2004; 385(1): 1-10.

133. Ghafourifar P, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26(4): 190-5.
134. Bergendi L, Benes L, Duracková Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 1999; 65: 1865-74.
135. Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta* 2001; 306(1-2): 1-17.
136. Carr A, Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J* 1997; 13(9): 1007-24.
137. Cadet JL, Brannock C. Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochem Int* 1998; 32(2): 117-31.
138. Porter NA. Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1984; 105: 273-82.
139. Moore K, Roberts LJ. Second Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res* 1998; 28: 659-671.
140. Van den Hoogen PC, Feskens EJ, Nagelkerke NJ, Menotti A, Nissinen A, Kromhout D. The relation between blood pressure and mortality due to coronary heart disease among men in different parts of the world. Seven Countries Study Research Group. *N Engl J Med* 2000; 342(1): 1-8.
141. Vasan RS, Larson MG, Leip EP, Evans JC, O'Donnell CJ, Kannel WB, Levy D. Impact of high-normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 2001; 345(18): 1291-7.
142. Kumar KV, Das UN. Are free radicals involved in pathobiology of human essential hypertension? *Free Radic Res Commun* 1993; 19: 59-66.
143. Munzel T, Gori T, Bruno RM, Taddei S. Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease? *Eur Heart J* 2010; 31(22): 2741-8.
144. Munzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, Schulz E. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann Med* 2008; 40(3): 180-96.
145. Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, et al. Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* 2001; 293: 1107-1112.



146. Baykal Y, Yilmaz MI, Celik T, Gok F, Rehber H, Akay C, Kocar IH. Effects of antihypertensive agents, alpha receptor blockers, beta blockers, angiotensin-converting enzyme inhibitors, angiotensin receptor blockers and calcium channel blockers, on oxidative stress. *J Hypertens.*2003; 21(6): 1207-1211.
147. Coresh J, Wei GL, McQuillan G. Prevalence of high blood pressure and elevated serum creatinine level in the United States: findings from the third national health and nutrition examination survey (1988–1994). *Arch Int Med* 2001; 161: 1207–1216.
148. Djukanović Lj, Stefanović V, Djordjević V. Klinička dijagnoza nefroangioskleroze, njena pouzdanost i značaj. U: Radenković S, urednik. *Kardionefrologija*. Niš: GIP Punta 2011; 95–101.
149. Marin R, Gorostidi M, Diez-Ojea B. Nephrosclerosis. The Cinderella of chronic kidney disease. *Nefrologia* 2010; 30(3): 275–279.
150. US Renal data System. *USRDS 2004 annual data report: atlas of end stage renal disease in the United States*. Bethesda MD (USA): National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases 2004.
151. ERA-EDTA Registry. *ERA–EDTA registry 2003 annual report*. Amsterdam (Netherlands): Academic Medical Centre 2005.
152. Jacobson HR. Ischemic renal disease: an overlooked clinical entity? *Kidney Int* 1988; 34(5): 729–743.
153. Meyrier A, Hill GS, Simon P. Ischemic renal diseases: new insights into old entities. *Kidney Int* 1998; 54:2–13.
154. Hsueh WC, Mitchell BD, Schneider JL, Wagner MJ, Bell CJ, Nanthakumar E. QTL influencing blood pressure maps to the region of PPH1 on chromosome 2q31-34 in Old Order Amish. *Circulation* 2000; 101: 2810-2816.
155. Kristjansson K, Manolescu A, Kristinsson A, Hardarson T, Knudsen H, Ingason S. Linkage of essential hypertension to chromosome 18q. *Hypertension* 2002; 39: 1044-1049.
156. Uber F. Nephrosklerose. *Virchows Arch (Pathol Anal)* 1919; 26: 119–178.
157. Schlessinger SD, Tankersley MR, Curtis JJ. Clinical documentation of end-stage renal disease due to hypertension. *Am J Kidney Dis* 1994; 23: 655–660.

158. Marcantoni C, Ma LJ, Federspiel C, Fogo AB. Hypertensive nephrosclerosis in African Americans versus Caucasians. *Kidney Int* 2002; 62(1): 172–80.
159. Zucchelli P, Zuccala A. The diagnostic dilemma of hypertensive nephrosclerosis: the nephrologists view. *Am J Kidney Dis* 1993; 21: 87–91.
160. Dimković N. Hipertenzija kao uzrok i posledica bolesti bubrega. U: Djukanović Lj, Ležaić V, Dimković N. Hipertenzija i hronična bolest bubrega. Monografije naučnih skupova AMN SLD 2010; 1: 31–46.
161. Zucchelli P. Hypertension and atherosclerotic renal artery stenosis: Diagnostic Approach. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 184–186.
162. Levin NW, Kotanko P, Eckardt KU. Blood pressure in chronic kidney disease stage 5D-report from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes controversies conference. *Kidney Int* 2010; 77: 273-284.
163. K/DOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations (2006). Updates Hemodialysis adequacy Peritoneal Dialysis adequacy Vascular Access. *Am J Kidney Dis* 2006; 48: 2-90.
164. Agarwal R. Blood pressure and mortality among hemodialysis patients. *Hypertension* 2010; 55: 762-768.
165. Kao MP, Ang DS, Pall A, Struthers AD. Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options. *J hum Hypertension* 2010; 24(1): 1–8.
166. Lahera V, Goicoechea M, de Vinuesa SG. Oxidative stress in uremia: the role of anemia correction. *J Am Soc Nephrol* 2006;(17): 174–177.
167. Boaz M, Smetana S, Weinstein T. Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial *Lancet* 2000; 356(9237): 1213–1218.
168. Coolen E, Arts I, Swennen E, Bast A, Cohen Stuart M, Dagnelie P. Simultaneous determination of adenosine triphosphate and its metabolites in human whole blood by RP-HPLC and UV-detection. *J Chromatogr B* 2008; 64: 43–51.
169. Tilman D, Beatrice DL, Sandrine C, Jean-Michel D, Khoa P, Miriam F, et al. Advanced Oxidation Protein Products as Novel Mediators of Inflammation and Monocyte Activation in Chronic Renal Failure. *J Immunol* 1998; 161: 2524-2532.

170. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med.* 1990; 9(6): 515-40.
171. Kizaki H, Sakurada T. Simple micro-assay methods for enzymes of purine metabolism. *J Lab Clin Med* 1977; 89(5): 1135–1144.
172. Barochiner J, Aparicio L, Cuffaro P, Galarza C, Marin M, Alfie J, et al. Home blood pressure profile in very elderly hypertensives: should we use the same thresholds as in younger patients? *Journal of the American Society of Hypertension* 2015; 9(3): 184-190.
173. Mahmoud K, Ismail T, Saad M, Mohsen L, Ibrahiem M, Fadeel N, et al. Values of ambulatory blood pressure monitoring for prediction of cognitive function impairment in elderly hypertensive patients. *The Egyptian Heart Journal* 2015; 67(1): 7-12.
174. Chadjichristos CE, Scheckenbach KE, van Veen TA, Richani MZ, de WC, Yang Z, et al. Endothelial-specific deletion of connexin40 promotes atherosclerosis by increasing CD73-dependent leukocyte adhesion. *Circulation* 2010; 121: 123–131.
175. Buchheiser A, Emde B, Fischer JW, Schrader J. Role of CD73-derived adenosine in atherosclerosis. *Circulation* 2007; 116: 114.
176. Bouis D, McCubbrey AL, Hyman MC, Thompson LF, Pinsky DJ. Bimodal atherogenic effects of CD73 in apolipoprotein E deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 115.
177. Stelzner TJ, Weil JV, O'Brian RF. Role of cyclic adenosine monophosphate in the induction of endothelial barrier properties. *J Cell Physiol* 1989; 139: 157–166.
178. Thomson LF, Eltzschig HK, Ibla JC, Van de Wiele CJ, Resta R, Morote-Garcia JC, et al. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J Exp Med.* 2004; 200: 1395–1405.
179. Resta R, Hooker SW, Laurent AB, Jamshedur SM, Franklin M, Knudsen TB, et al. Insights into thymic purine metabolism and adenosine deaminase deficiency revealed by transgenic mice overexpressing ecto-5'-nucleotidase (CD73). *J Clin Invest* 1997; 99: 676–683.

180. Grenz A, Zhang H, Eckle T, Mittelbronn M, Wehrmann M, Kohle C, et al. Protective role of ecto-5-nucleotidase (CD73) in renal ischemia. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 833–845.
181. Bakker J, Stephan L, Gans O, Rijk B, Jan C, Maaten T, et al. The potential role of adenosine in the pathophysiology of the insulin resistance syndrome. *Atherosclerosis* 2001; 155: 283-290.
182. Siddiqi SS. A study on the modulation of ADA activity in Monocyte of Type 2 diabetic patients by Antioxidant. *JACM* 2011; 12(2): 113-116.
183. Gersch C, Pali SP, Kim KM, Angerhofer A, Johnson RJ, Henderson GN. Inactivation of nitric oxide by uric acid. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2008; 27: 967-78.
184. Bergamini C, Cicoira M, Rossi A, Vassanelli C. Oxidative stress and hyperuricaemia: pathophysiology, clinical relevance and therapeutic implications in chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2009; 11: 444-52.
185. Kanellis J, Watanabe S, Li JH, Kang DH, Li P, Nakagawa T, et al. Uric acid stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production in vascular smooth muscle cells via mitogen-activated protein kinase and cyclooxygenase-2. *Hypertension* 2003; 41: 1287–1293.
186. Erdogan D, Gullu H, Caliskan M. Relationship of serum uric acid to measures of endothelial function and atherosclerosis in healthy adults. *Int J Clin Pract* 2005; 59: 1276–1282.
187. Iseki K, Oshiro S, Tozawa M, Iseki C, Ikemiya Y, Takishita S. Significance of hyperuricemia on the early detection of renal failure in a cohort of screened subjects. *Hypertens Res* 2001; 24: 691–697.
188. Filippatos GS, Ahmed MI, Gladden JD, Mujib M, Aban IB, Love TE, et al. Hyperuricaemia, chronic kidney disease, and outcomes in heart failure: potential mechanistic insights from epidemiological data. *Eur Heart J* 2011; 32: 712-20.
189. Iseki K, Oshiro S, Tozawa M, Iseki C, Ikemiya Y, Takishita S. Significance of hyperuricemia on the early detection of renal failure in a cohort of screened subjects. *Hypertens Res* 2001; 24: 691–697.
190. Klag J, Whelton K, Randall L, Neaton D, Brancati L, Ford E, et al: Blood pressure and end stage renal disease in men. *N Engl J Med* 1996; 334 : 13 –18.

191. Iseki K, Ikemiya Y, Inoue T, Iseki C, Kinjo K, Takishita S. Significance of hyperuricemia as a risk factor for developing ESRD in a screened cohort. *Am J Kidney Dis* 2004 44: 642–650.
192. Anzai N, Kanai Y, Endou H. New insights into renal transport of urate. *Curr Opin Rheumatol* 2007; 19: 151-7.
193. Roch-Ramel F, Guisan B, Diezi J. Effects of uricosuric and antiuricosuric agents on urate transport in human brush-border membrane vesicles. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 280: 839– 845.
194. Hink HU, Santanam N, Dikalov S, McCann L, Nguyen AD, Parthasarathy S, et al. Peroxidase properties of extracellular superoxide dismutase - Role of uric acid in modulating in vivo activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1402-1408.
195. Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295: 849-868.
196. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84 .
197. Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol (London)* 2004; 555: 589-606.
198. Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 87-114.
199. Johnson RJ, Kang DH, Feig D, Kivlighn S, Kanellis J, Watanabe S, et al. Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? *Hypertension* 2003; 41: 1183-1190.
200. Ardanaz N, Pagano PJ. Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: regulation and signaling leading to dysfunction. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006; 231: 237- 251.
201. Cai H. NAD(P)H oxidase-dependent self-propagation of hydrogen peroxide and vascular disease. *Circ Res* 2005; 96: 818-822.

202. Sousa T, Pinho D, Morato M, Marques-Lopes J, Fernandes E, Afonso J, et al. Role of superoxide and hydrogen peroxide in hypertension induced by an antagonist of adenosine receptors. *Eur J Pharmacol* 2008; 588: 267-276.
203. Zhou L, Xiang W, Potts J, Floyd M, Sharan C, Yang H, et al. Reduction in extracellular superoxide dismutase activity in African-American patients with hypertension. *Free Rad Biol Med* 2006; 41: 1384-1391..
204. Wen Y, Killalea S, McGettigan P, Feely J. Lipid peroxidation and antioxidant vitamins C and E in hypertensive patients. *Ir J Med Sci* 1996; 165: 210-212.
205. Neil B, Carmelo C, Dichoso C, Eugene C. Blood urea nitrogen and serum creatinine: Physiology and interpretations. *Urology* 1975; 5(5): 583-588 .
206. Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 87-114.
207. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 774–797.
208. Harrison R. Physiological roles of xanthine oxidoreductase. *Drug Metab Rev* 2004; 36: 363–375.
209. Godber BL, Schwarz G, Mendel RR, Lowe DJ, Bray RC, Eisenthal R, et al. Molecular characterization of human xanthine oxidoreductase: the enzyme is grossly deficient in molybdenum and substantially deficient in iron-sulphur centres. *Biochem J* 2005; 388: 501–508.
210. McManaman JL, Bain DL. Structural and conformational analysis of the oxidase to dehydrogenase conversion of xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem* 2002; 277: 21261–21268.
211. Houston M, Estevez A, Chumley P, Aslan M, Marklund S, Parks DA, Freeman BA. Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium – Kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling. *J Biol Chem* 1999; 274: 4985-4994.

212. McNally JS, Saxena A, Cai H, Dikalov S, Harrison DG. Regulation of xanthine oxidoreductase protein expression by hydrogen peroxide and calcium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1623–1628.
213. Ganten U, Ganten D. Endothelial dysfunction and xanthine oxidoreductase activity in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension* 2001; 37: 414–418.
214. Hoidal JR, Xu P, Huecksteadt T, Sanders KA, Pfeffer K. Transcriptional regulation of human xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase. *Biochem Soc Trans* 1997; 25: 796–799.
215. Matsui N, Satsuki I, Morita Y, Inaizumi K, Kasajima K, Kanoh R, et al. Xanthine oxidase-derived reactive oxygen species activate nuclear factor  $\kappa$ B during hepatic ischemia in rats. *Jpn J Pharmacol* 2000; 84: 363–366.
216. Xu P, LaVallee P, Hoidal JR. Repressed expression of the human xanthine oxidoreductase gene: E-box and TATA-like elements restrict ground state transcriptional activity. *J Biol Chem* 2000; 275: 5918–5926.
217. Schonbein GW. Xanthine oxidase activity associated with arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4754–4759.
218. Kittleson MM, Hare JM. Xanthine oxidase inhibitors: an emerging class of drugs for heart failure. *Eur Heart J* 2005; 26: 1458–1460.
219. Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol (Lond)* 2004; 555: 589–606.
220. Doehner W, Anker SD. Xanthine oxidase inhibition for chronic heart failure: is allopurinol the next therapeutic advance in heart failure? *Heart* 2005; 91: 707–709.
221. Anker SD, Hambrecht R. Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol on endothelial function and peripheral blood flow in hyperuricemic patients with chronic heart failure: results from 2 placebo-controlled studies. *Circulation* 2002; 105: 2619–2624.
222. Guthikonda S, Woods K, Sinkey CA, Haynes WG. Role of xanthine oxidase in conduit artery endothelial dysfunction in cigarette smokers. *Am J Cardiol* 2004; 93: 664–668.

223. Godber BL, Doel JJ, Sapkota GP, Blake DR, Stevens CR, Eisenthal R, Harrison R. Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem* 2000; 275: 7757–7763.
224. Millar TM, Kanczler JM, Bodamyali T, Blake DR, Stevens CR. Xanthine oxidase is a peroxynitrite synthase: newly identified roles for a very old enzyme. *Redox Rep* 2002; 7: 65–70.
225. Hearse DJ, Manning AS, Downey JM, Yellon DM. Xanthine oxidase: a critical mediator of myocardial injury during ischemia and reperfusion? *Acta Physiol Scand Suppl* 1986; 548: 65–78.
226. Gwinner W, Plasger J, Brandes RP, Kubat B, Schulze M, Regele H, et al. Role of xanthine oxidase in passive Heymann nephritis in rats. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 538–544.
227. Mayer MD, Khosravan R, Vernillet L, Wu JT, Joseph-Ridge N, Mulford DJ. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of febuxostat, a new non-purine selective inhibitor of xanthine oxidase in subjects with renal impairment. *Am J Ther* 2005; 12: 22–34.
228. Maria GB, Letizia P, Andrea B. Xanthine oxidoreductase in atherosclerosis pathogenesis: Not only oxidative stress. *Atherosclerosis* 2014; 237(2): 562-567.
229. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
230. Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* 2004; 44: 381-386.
231. Lacy F, Kailasam MT, O'Connor DT, Schmid-Schonbein GW, Parmer RJ. Plasma hydrogen peroxide production in human essential hypertension - Role of heredity, gender, and ethnicity. *Hypertension* 2000; 36: 878-884.
232. Rodriguez-Martinez MA, Garcia-Cohen EC, Baena AB, Gonzalez R, Salaices M, Marin J. Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. *Br J Pharmacol* 1998; 125: 1329-1335.



233. Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 2003; 42: 1075-1081.
234. Nistala R, Whaley-Connell A, Sowers JR. Redox control of renal function and hypertension. *Antiox Redox Signal* 2008; 10: 2047-2089.
235. Elks CM, Mariappan N, Haque M, Guggilam A, Majid DS, Francis J. Chronic NF- $\kappa$ B blockade reduces cytosolic and mitochondrial oxidative stress and attenuates renal injury and hypertension in SHR. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296: 298-305.
236. Kedziora K, Czuczejko J, Pawluk H, Kornatowski T, Motyl J, Szadujkis L, et al. The markers of oxidative stress and activity of the antioxidant system in the blood of elderly patients with essential arterial hypertension. *Cell Mol Biol Lett* 2004; 9: 635-641.
237. Sousa T, Pinho D, Morato M, Marques-Lopes J, Fernandes E, Afonso J, et al. Role of superoxide and hydrogen peroxide in hypertension induced by an antagonist of adenosine receptors. *Eur J Pharmacol* 2008; 588: 267-276.
238. Asghar M, Banday AA, Fardoun RZ, Lokhandwala MF. Hydrogen peroxide causes uncoupling of dopamine D1-like receptors from G proteins via a mechanism involving protein kinase C and G-protein-coupled receptor kinase 2. *Free Rad Biol Med* 2006; 40: 13-20.
239. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.
240. Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295: 849-868.
241. Pham-Huy L, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci* 2008; 4: 89-96.
242. Adler S, Huang H, Loke KE, Xu X, Tada H, Laumas A, Hintze TH. Endothelial nitric oxide synthase plays an essential role in regulation of renal oxygen consumption by NO. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: 838-843.
243. Singh U, Devaraj S, Jialal I. Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. *Annu Rev Nutr* 2005; 25: 151-174.

244. Briones AM, Touyz RM. Oxidative stress and hypertension: current concepts. *Curr Hypertens Rep* 2010; 12: 135-142.
245. Suzuki H, Nakazato K, Asayama K, Masawa N, Takamata M, Sakata N. The role of oxidative stress on pathogenesis of hypertensive arterial lesions in rat mesenteric arteries. *Acta Histochem Cytochem* 2002; 35: 287-293.
246. Minuz, P, Patrignani P, Gaino S, Degan M, Menapace L, Tommasoli R, et al. Increased oxidative stress and platelet activation in patients with hypertension and renovascular disease. *Circulation* 2002; 106: 2800-2805.
247. Munzel T, Gori T, Bruno RM, Taddei S. Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease? *Eur Heart* 2010; 31: 2741-2748.
248. Kristal B, Shurtz-Swirski R, Chezari J, Manaster J, Levy R, Shapiro G, et al. Participation of peripheral polymorphonuclear leukocytes in the oxidative stress and inflammation in patients with essential hypertension. *Am J Hypertens* 1998; 11: 921-928.
249. Thakali K, Davenport L, Fink GD, Watts SW. Pleiotropic effects of hydrogen peroxide in arteries and veins from normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 2006; 47: 482-487.
250. Cai H. NAD(P)H oxidase-dependent self-propagation of hydrogen peroxide and vascular disease. *Circ Res* 2005; 96: 818-822.
251. Hideaki K, Junichi T, Ken O, Tadanori A, Minoru O. Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2002; 162(1): 221-225 .
252. Huang QT, Zhong M, Tian JW, Hou FF. Higher plasma AOPP is associated with increased proteinuria excretion and decreased glomerular filtration rate in pre-eclamptic women. *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health* 2013; 3(1): 16-20 .
253. Sarsat WV, Frielander M, Capeillere BC, Nguyen KT, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia, *Kidney Int* 1996; 49: 1304– 1313.
254. Sarsat WV, Frielander M, Capeillere BC, Nguyen KT, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J. Immunol* 1998; 161: 2524–2532.

255. Descamps LB, Sarsat WV. Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure. *Kidney Int* 2001; 59: S-108– S-113.
256. Davies KJA, Delsignore ME. Protein damage and degradation by oxygen radicals: III. Modification of secondary and tertiary structure, *J. Biol. Chem* 1987; 262: 9908–9913.
257. Meucci E, Mordente A, Martorana GE. Metal-catalyzed oxidation of human serum albumine: conformational and functional changes *J Biol Chem* 1991; 266: 4692–4699.
258. Mezzano D, Pais EO, Aranda E, Panes O, Downey P, Ortiz M, et al. Inflammation, not hyperhomocysteinemia, is related to oxidative stress and hemostatic and endothelial dysfunction in uremia, *Kidney Int* 2001; 60: 1844–1850.
259. Alderman CJ, Shah S, Foreman JC, Chain BM, Katz DR. The role of advanced oxidation protein products in regulation of dendritic cell function, *Free Rad Biol Med* 2002; 32: 377–385.
260. Kaneda H, Taguchi J, Ogasawara K, Aizawa T, Ohno M. Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2002; 162: 221– 225.
261. Sarsat WV, Gausson V, Nguyen AT, Touam M, Drueke T, Santangelo F, et al. AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: a potential target for N-acetyl-cysteine treatment in dialysis patients. *Kidney Int* 2003; 64: 82–91.
262. Drueke T, Sarsat WV, Massy Z, Latscha DB, Guerin AP, Marchais SJ, et al. Iron therapy, advanced oxidation protein products, and carotid artery intima-media thickness in end-stage renal disease. *Circulation* 2002; 106: 2212– 2217.
263. Kalousova M, Zima T, Tesar V, Sulkova S, Fialova L. Relationship between advanced glycoxidation end products, inflammatory markers/acute-phase reactants, and some autoantibodies in chronic hemodialysis patients, *Kidney Internat* 2003; 62– 64.

264. Chapman J, Sposito A. Hypertension and dyslipidaemia in obesity and insulin resistance: Pathophysiology, impact on atherosclerotic disease and pharmacotherapy. *Pharmacology & Therapeutics* 2008; 117(3): 354-373.

265. Pitchai B, Kaur T, Sing M. Potential target sites to modulate vascular endothelial dysfunction: Current perspectives and future directions. *Toxicology* 2008; 245: 49-64.

**Универзитет у Нишу**  
**ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ**

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом  
Аденилатни енергетски набој и метаболизам мокраћне киселине код пацијената са  
есенцијалном хипертензијом

---

---

која је одбрањена на медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 11.11.2015.

Аутор дисертације\_

Бобан Милојковић

Потпис аутора дисертације:

---

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Име и презиме аутора: Бобан Милојковић

Наслов дисертације: Аденилатни енергетски набој и метаболизам мокраћне киселине код пацијената са есенцијалном хипертензијом

Ментор: Проф. др Гордана Коцић

Изјављујем да је штампани облик моје докторске дисертације истоветан електронском облику, који сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**.

У Нишу, 11.11.2015.

Потпис аутора дисертације:

---

**Универзитет у Нишу**  
**ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ**

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

**Аденилатни енергетски набој и метаболизам мокраћне киселине код пацијената са есенцијалном хипертензијом**

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да подвучете само једну од шест понуђених лиценци; опис лиценци дат је у Упутству).

У Нишу, 11.11.2015.

Аутор дисертације: Бобан Милојковић

Потпис аутора дисертације:

---