



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

ПАРАМЕТРИ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА У
ПЕРИФЕРНОЈ КРВИ ОСОБА СА АКУТНИМ
ИСХЕМИЈСКИМ МОЖДАНИМ УДАРОМ

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

др Далибор Паспаљ

Крагујевац, 2015. године

I
УВОД

1.1 ОСОБЕНОСТИ ВАСКУЛАРИЗАЦИЈЕ МОЗГА

1.1.1 Анатомска разматрања

Мозак се снабдева артеријском крвљу из унутрашњих каротидних артерија (*a. carotis interna*) и вертебралних артерија (*a. vertebralis*). Унутрашње каротидне артерије снабдевају крвљу предњи део мождане циркулације, односно предње и средње мождане артерије (*a. cerebri anterior et a. cerebri media*), док вертебралне артерије доводе крв у задњи део мождане циркулације, односно базиларну артерију (*a. basilaris*) и задње мождане артерије (*a. cerebri posterior*). Предњи и задњи део мождане циркулације су повезани комуникантним артеријама, тако да на бази мозга образују Вилисов (*Willis*) круг. Теоријски, то би значило да услед трауматског или патолошког прекида протока крви кроз једну или више артерија перфузија мозга не би била значајно оштећена због постојања колатералне циркулације (1). Међутим, комплетан Вилисов круг постоји само код око 24% људи (2). Структуре које васкуларизује предњи део мождане циркулације су еволутивно млађе, као што је кортекс хемисфера великог мозга. Ове структуре су веома осетљиве на исхемију, као и на реперфузиону хеморагију уколико се оклудирани крвни суд отвори након 6 до 8 сати од појаве симптома. Еволутивно примитивније структуре мозга, као што су мождано стабло и мали мозак, васкуларизује задњи део мождане циркулације и ове структуре су отпорније на исхемију и клиничке последице инфаркта мозга. Оклузија у пределу задњег дела мождане циркулације може да изазове „*locked-in*“ синдром, када су готово све вољне функције, као и невољно контраховање дијафрагме током дисања, оштећене. Међутим, пацијент је свестан свог окружења, очуване су и функције чула вида и слуха, као и више интегративне кортикалне функције, што пацијента доводи у једно незавидно и суморно стање (1).

1.1.2 Значај анастомоза

Неколико клинички значајних анастомоза постоји између интракранијалних и екстракранијалних крвних судова. Региони где се налазе ове анастомозе су:

1. Орбитални регион, преко офталмичке артерије која повезује унутрашњу максиларну артерију, која је грана спољашње каротидне артерије, и унутрашњу каротидну артерију;

2. Петрозни-кавернозни регион, инферолатерално стабло, менингеохипофизно стабло, као и петрозне гране унутрашње каротидне артерије су повезане са каротидном артеријом;
3. Горњи цервикални регион, асцедентна фарингеална артерија, окципитална артерија и дубоке цервикалне артерије су повезане са вертебралном артеријом (3).

Ове анастомозе омогућавају одржавање протока кроз колатералне крвне судове, уколико је проток кроз једну или више артерија смањен. Наведене анастомозе постоје готово увек, али се не визуализују ангиографски, уколико проток кроз њих није патолошки увећан.

Процес колатералне рецикулације зависи од калибра и проходности примарних крвних судова. Примарни колатерални крвни судови омогућавају непосредан ток крви ка регионима захваћеним исхемијом кроз постојеће анастомозе. Секундарни колатерални крвни судови, као што су лептоменингеални крвни судови, могу да постоје анатомски, али је за остваривање значајнијег протока кроз њих потребно време (4).

1.2 ЕНДОТЕЛ КРВНИХ СУДОВА МОЗГА

1.2.1 Физиолошке улоге ендотела

Ендотел је слој ћелија који облаже луминалну површину крвних судова. До осамдесетих година прошлог века ендотел је сматран за прост „целофански омотач“ чија се улога своди на селективно пропуштање воде и електролита (5). Значајна открића су омогућила боље разумевање сложених улога ендотела као великог ендокриног органа. Различите и јединствене функције ендотелних ћелија учествују у одржавању хомеостазе читавог организма. Кључна улога ендотела је регулација протока крви, која се огледа у стварању антиромбогене површине која омогућава несметан проток плазме и уобличених крвних елемената кроз васкуларну мрежу. Осим тога, ендотел синтетише и преузима велики број различитих вазоактивних супстанци које делују паракрино и индукују констрикцију или дилатацију одређеног дела васкуларне мреже. Ендотел је такође укључен у контролу тромбозе и тромболизе, регулацију интеракције тромбоцита и леукоцита са зидом крвних судова, регулацију васкуларног тонуса и раста нових крвних судова (6).

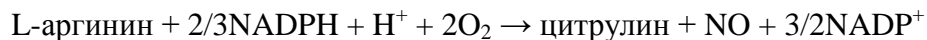
1.2.2 Ендотел крвних судова мозга

Неурони, глија ћелије, периваскуларни простор и ендотелне ћелије крвних судова мозга образују структуру која се назива **неуроваскуларна јединица**. Физиолошко функционисање ендотелних ћелија, као интегративног дела неуроваскуларне јединице, је непходно за одржавање хомеостазе микросредине мозга, регулацију протока крви кроз крвне судове мозга, прилагођавање размене материја кроз крвно-мождану баријеру и имунску компетентност можданог ткива (7).

Ендотелне ћелије мозга се знатно разликују од ендотелних ћелија у другим ткивима на више начина: 1) ендотелне ћелије мозга су међусобно повезане тесним везама (енгл. *tight junctions*), 2) у ендотелним ћелијама мозга постоји знатно мањи степен трансцитозе и парацелуларне дифузије хидрофилних супстанци, 3) ендотелне ћелије мозга садрже велики број митохондрија, што је у складу са великом метаболичком активнишћу ових ћелија, 4) постојање поларизације мембранских рецептора и транспотера који су укључени у активни транспорт нутритивних материја (8). Услед тога је пролазак плазме и јона у мождани ендотел врло ограничен и строго регулисан – феномен који се назива висока трансендотелна електрична отпорност (9).

1.2.3 Улога ендотела у регулацији протока кроз крвне судове мозга: NO зависни и NO независни механизми

Најпознатији и најбоље испитани ендотелни механизам регулације васкуларног тонуса и протока крви је синтеза и ослобађање NO. NO настаје из L-аргинина деловањем ензима азот-моноксид синтетазе (NOS). Вазопротективно дејство NO заснива се релаксацији свих крвних судова која се постиже активацијом солубилне гуанилил циклазе и повећањем концентрације цикличног гуанозил монофосфата у васкуларним глатким мишићним ћелијама (10, 11).



Постоје три форме NOS: неурална NOS (nNOS или NOS I), ендотелна NOS (eNOS или NOS II) и индуцибилна NOS (iNOS или NOS III). Све три изоформе NOS као кофакторе користе флавин аденин динуклеотид (FAD), флавин аденин мононуклеотид (FMN) и тетрахидро-L-биоптерин (BH₄). Реакција синтезе NO се одвија у две фазе, у првој

фази NOS врши хидроксилацију L-аргинина до N^ω-хидрокси-L-аргинина. У другој фази NOS оксидује N^ω-хидрокси-L-аргинин до L-цитрулина и NO (12, 13).

Неурална NOS (nNOS) је конститутивно заступљена у појединим неуронима мозга. Ензимску активност nNOS регулише Ca²⁺ и калмодулин. nNOS је укључена у модулацију низа физиолошких функција централног нервног система као што су учење, памћење и неурогенеза (14). Такође, тврдњу да је eNOS најзначајнија изоформа ензима NOS у регулацији периферног васкуларног тонуса је пољуљала студија са S-метил-L-цитрулином, који је селективни инхибитор nNOS. У овој студији је показано да блокада nNOS узрокује значајно смањење протока у надлактици, као и у коронарној циркулацији (15, 16). У васкуларним глатким мишићима се поред eNOS, у мањој мери експримира и nNOS, која је у стању да узрокује вазодилатацију у стањима када је eNOS нефункционална (17).

NO који се ослободи у лумен крвног суда је потентан инхибитор агрегације и адхезије тромбоцита. Поред значајне заштитне улоге у настајању тромбозе, NO на овај начин спречава ослобађање тромбоцитног фактора раста који стимулише пролиферацију ћелија глатких мишића. NO је укључен у експресију гена који имају улогу у атерогенези и смањује синтезу моноцитног хемотаксног протеина-1 (*monocyte chemoattractant protein-1* MCP-1) (18). NO такође смањује адхезију леукоцита за ендотел интеракцијом са леукоцитним адхезионим молекулима CD11/CD18 или смањењем експресије CD11/CD18 у леукоцитима (16, 19).

Значајан начин инактивације NO је његова реакција са супероксид анјон радикалом (O₂⁻) при чему настаје пероксинитрит (ONOO⁻). Пероксинитрит је један од најпотентнијих прооксиданата који изазива оксидативно оштећење, нитрацију и S-нитрозилацију протеина, липида и ДНК (20).

1.2.4 Улога астроцита у регулацији протока крви кроз крвне судове мозга

Резултати *in vitro* студија су указали на могућу улогу астроцита у регулацији протока крви кроз крвне судове мозга. Током нервне активности ослобађа се глутамат који посредством NMDA рецептора активира неуроналну азот-моноксид синтазу (nNOS), услед чега настаје повећана продукција азот-моноксида (NO) (21). NO повећава концентрацију cGMP

у глатким мишићним ћелијама крвних судова изазивајући њихову вазодилатацију. Повећано ослобађање глутамата активира и метаболитне рецепторе астроцита, што за последицу има повећање концентрације Ca^{2+} . Повећана концентрација Ca^{2+} индукује активацију фосфолипазе 2, која индукује повећано ослобађање арахидонске киселине (22). Арахидонска киселина се под дејством циклооксигеназа (COX) и P450 епоксигеназе преводи у вазоактивне метаболите, простагландин E_2 и еоксиеикозатриеноичне киселине, који активирају K^+ канале на глатким васкуларним мишићима и изазивају вазодилатацију (23).

Такође, глутамат активацијом NMDA и AMPA рецептора изазива повећану продукцију угљен-моноксида (CO). Наиме, глутамат посредством NMDA и AMPA рецептора активира конститутивну форму хемоксигеназе (HO-2) која деградацијом хема повећава концентрацију CO (24). CO активира такозване „велике“ калцијумом регулисане калијумске канале (енгл. *large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels* - BK_{Ca}) васкуларних глатких мишићних ћелија. Активација BK_{Ca} изазива хиперполаризацију мембране која смањује активност волтаж-зависних Ca^{2+} канала и вазодилатацију (25). NO такође утиче на активност HO-2, тако што је директно инхибира, али индиректно, повећањем концентрације cGMP, изазива супротан ефекат, односно активира HO-2 (26).

1.2.5 Ендотелна дисфункција у патофизиологији обољења мозга

Пермеабилност ендотела, односно способност ендотелних ћелија да спрече неконтролисани трансфер материја из циркулације у нервно ткиво, је кључна улога неуроваскуларне јединице. Ендотелна дисфункција (ЕД) се манифестује као изостајање ендотел-зависне вазорелаксације на стимулусе као што су ацетилхолин или сила смицања (*shear stress*) (27). ЕД је укључена у патогенезу многих акутних и хроничних стања која за крајњи исход имају акутни исхемијски мождани удар (АИМУ). Новија истраживања указују на чињеницу да активација ендотела у малим крвним судовима мозга представља први корак у патогенези лакунарних инфаркта, као подтипа АИМУ, који узрокују поремећај крвно-мождане баријере и пролазак супстанци из циркулације у нервно ткиво што додатно оштећује нервне и глија ћелије (28-31). Као одговор на локалну и системску инфламацију која настаје током АИМУ развија се додатна активација ендотела у церебралном васкуларном систему, адхезија леукоцита за ендотелне ћелије, дисфункција

крвно-мождане баријере, активација глија ћелија, као и повећано стварање медијатора запаљења. Активација ендотела се карактерише повећаном експресијом *de novo* синтетисаних леукоцитних адхезивних молекула као што су: Е-селектин, Р-селектин, интрацелуларни адхезивни молекул-1 (ICAM-1) и адхезивног молекула васкуларних ћелија-1 (VCAM-1) (31, 32).

1.3 МОЖДАНИ УДАР

1.3.1 Дефиниција и патогенеза možданог удара

Базично možдани удар може да се подели на **акутни исхемијски možдани удар** (85%) и **акутни хеморагични možдани удар** (15%). Акутни исхемијски možдани удар (АИМУ) настаје услед механичке оклузије церебралних крвних судова, најчешће емболусом, услед чега настаје исхемија. Када се проток крви у možданом ткиву знатно смањи, очување вијабилности ткива зависи од трајања исхемије и постојања и капацитета колатералних крвних судова.

Када се крвни проток кроз možдано ткиво сведе на вредности око 20 ml/100 g/min, екстракциона фракција кисеоника достиже максимум, а стопа потрошње кисеоника почиње да опада (33). Овај степен исхемије представља праг вијабилности који се назива „праг губитка нервне електричне функције“. Ако је крвни проток кроз možдано ткиво нижи од 10 ml/100 g/min, структура ћелијске мембране и функционисање ћелија захваћених исхемијом је значајно оштећена (34). При оваквом церебралном протоку крви недостатак кисеоника смањује добијање енергије аеробним процесима у митохондријама и активира добијање енергије недовољно ефикасним анаеробним метаболичким путевима. Анаеробном гликолизом у вишку се стварају лактати, што узрокује повећање ткивне рН вредности, и интра и екстрацелуларну ацидозу. Енергетски зависне функције ћелијске мембране које одржавају јонску хомеостазу се прогресивно смањују, услед чега K^+ излази из ћелије, а Na^+ и вода улазе у ћелију што за последицу има настајање цитотоксичног едема ћелија. Ca^{2+} такође улази у ћелије, оштећује функцију митохондрија и интрацелуларних мембрана, што изазива даље повећање цитотоксичности. Овај степен исхемије представља „праг губитка јонске хомеостазе ћелија“ (35).

1.3.2 Класификација и етиологија акутног исхемијског možданог удара

Акутни možдани удар је водећи узрок смрти, како у развијеним земљама, тако и у земљама у развоју. Клиничке манифестације možданог удара варирају у зависности од етиологије и фактора ризика. У циљу олакшавања и стандардизације подтипова možданог удара 1993. године је уведена TOAST (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment) класификација (36). На основу ове класификације акутни исхемијски možдани (АИМУ) удар може да се сврста у пет подтипова:

1. АИМУ услед атеросклерозе великих артерија – постоји стеноза већа од 50% одговарајуће екстракранијалне или интракранијалне артерије. У клиничкој слици постоје знаци оштећења кортекса и субкортекса великог мозга, možданог стабла и малог мозга.
2. АИМУ изазван кардиоемболизацијом – ЕКГ налазом или ехокардиографијом се идентификује бар један кардиолошки узрок емболизације (атријална фибрилација, стеноза аорте са атријалном фибрилацијом, скорашњи инфаркт миокарда, дилатативна кардиомиопатија, акинезија сегмента леве коморе, атријални миксом, инфективни ендокардитис). Допунским прегледима треба да се искључе стенозе магистралних крвних судова веће од 50%.
3. АИМУ услед оклузије малих артерија (лакунарни инфаркти) – у клиничкој слици постоје типични симптоми лакунарног инфаркта (моторна хемиплегија/хемипареза, атаксична хемипареза, синдром дизартрије и неспретне руке) или атипични лакунарни симптоми. Клиничку дијагнозу подржава постојање хипертензије или шећерне болести. Радиолошким испитивањем (СТ или MR) визуализује се лезија мања од 1,5 cm, или се лезија не уочава. Допунским испитивањем се искључује постојање стенозе магистралних крвних судова веће од 50% и кардиолошки узроци емболизације.
4. АИМУ другог узрока – допунским испитивањима се утврђују такозвани, ретки узроци АИМУ, као што су: хиперкоагулабилна стања, инфламаторне и

неинфламаторне неатеросклеротске васкулопатије, антифосфолипидни синдром, итд. Радиолошки знаци указују на исхемијски инфаркт без обзира на величину и локализацију.

5. АИМУ неутврђеног узрока:

- узрок није откривен и након интензивног дијагностичког испитивања,
- није одрађен неки од дијагностичких тестова који се сматра неопходним за потврђивање етиологије,
- постоје два или више потенцијалних узрока АИМУ (37).

Наведена класификација је модификована како би што мањи број АИМУ био сврстан у АИМУ неутврђеног узрока. Услед тога су Ау, Koroshetz и сарадници предложили SSS (Stop Stroke Study) TOAST класификацију која се данас најчешће примењује (38), мада су предложене и бројне друге субкласификације на основу различитих дијагностичких процедура и налаза (39, 40).

1.3.3 Епидемиологија можданог удара

Годишње у свету више од 15 милиона људи доживи мождани удар, од чега пет милиона умре, а код пет милиона заостаје трајна онеспособљеност услед чега овакве особе представљају изванредан терет, како за породицу тако и за заједницу. Мождани удар се ретко јавља код особа млађих од 40 година, мада је повећана инциденца код деце која болују од српасте анемије. Главни фактори ризика за оболевање од можданог удара су хипертензија и уживање дувана, слично као и за коронарну болест срца. Инциденца можданог удара се у развијеним земљама смањује услед адекватније контроле хипертензије и узимања одговарајуће антихипертензивне терапије, међутим апсолутни број оболелих од можданог удара наставља да расте услед глобалног старења светске популације (41).

1.4 ФАКТОРИ РИЗИКА ЗА НАСТАЈАЊЕ ИСХЕМИЈСКОГ МОЖДАНОГ УДАРА

Фактор ризика за исхемијски мождани удар представља карактеристику одређене особе због које та особа има већу вероватноћу за настајање можданог удара у односу на особу која нема ту карактеристику. Фактори ризика за мождани удар могу да се класификују као „традиционални“ и „нови“ фактори ризика, или као фактори који могу да се измене, и фактори који не могу да се измене. Фактори на које не може да се утиче обухватају обележја као што су: године старости, пол, етничка припадност и генско наслеђе. У традиционалне факторе који могу да се мењају спадају: хипертензија, дијабетес, хиперлипидемија, атријумска фибрилација, пушење, гојазност и коронарна болест (42).

1.4.1 „Традиционални“ фактори ризика

1.4.1.1 Хипертензија

Хипертензија је најчесталији фактор ризика за мождани удар са преваленцом од око 30% у Сједињеним Америчким Државама (43). Преваленција оболевања од хипертензије се повећава са годинама живота, а како светска популација постаје све старија и број оболелих од хипертензије се повећава. За свако повећање систолног притиска од 20 mmHg и дијастолног од 10 mmHg, смртност од исхемијске болести срца и можданог удара се удвостручује, док смањење систолног притиска за 10 mmHg, а дијастолног за 5 mmHg, смањује ризик од смрти услед можданог удара за 40% (44, 42).

Основно обележје хипертензије је повећање периферног васкуларног отпора у церебралним крвним судовима, који настаје услед смањења лумена, смањења броја крвних судова или услед повећања дужине крвних судова. Постоје бројни докази у литератури који указују да се услед хипертензије смањује и лумен и број крвних судова у церебралној васкуларној мрежи (45, 46). Последишно смањење протока крви коз мождано ткиво може да изазове хроничну хипоперфузију мозга, што може да буде један од механизма који објашњавају настајање деменције код пацијената са хипертензијом (47).

Хипертензија изазива промене у структури зида церебралних артерија, које се пре свега односе на смањење лумена и повећање односа дијаметар лумена/дебљина зида артерије. Пасивна структура артерија је од посебног значаја у стањима као што је исхемија, када крвни судови који окружују подручје исхемије постају максимално

дилатирани. У оваквим ситуацијама, мале промене у пасивној структури имају драматичне последице на проток крви. Хипертрофија церебралних артерија и њихово ремоделовање су адаптивни одговори чији је циљ да смање стрес на зид артерије, као и да заштите артериоле, капиларе и венуле од повећаног крвног притиска (48). Хипертензија такође повећава и тенгенцијални стрес на зид артерије, што за последицу има повећану продукцију фактора раста, оксидативни стрес и неадекватну синтезу NO (49). Сматра се да оксидативи стрес има централну улогу у механизмима којима хипертензија узрокује штетне цереброваскуларне ефекте. У прилог томе говори чињеница да су параметри оксидативног стреса повећани код свих облика хипертензије у хуманој популацији: есенцијална хипертензија, реноваскуларна и малигна хипертензија, као и прееклампсија (50, 51, 52).

1.4.1.2 *Diabetes mellitus*

Diabetes mellitus (дијабетес), као и хипертензија, умањује васкуларне протективне механизме, који омогућавају стабилан проток крви услед смањења крвног притиска (цереброваскуларна ауторегулација), чиме се фаворизује настајање можданог удара (53). Како се преваленција гојазности константно повећава у развијеним земљама, постоји и значано повећање броја оболелих од дијабетеса тип 2. Такође, све је више деце са дијагнозом дијабетеса тип 2 (54). Исто тако постоји значајно повећање броја оболелих од дијабетеса тип 1 (55). Алмдал и сарадници су у проспективној студији, спроведеној на 13.105 испитаника, утврдили да се ризик од можданог удара код оболелих од дијабетеса повећава 1,5 до 2 пута за мушкарце, и 2 до 6,5 пута за жене (56). Поред тога млађи пацијенти имају релативно већи ризик за настајање можданог удара од старијих пацијената.

Међутим, није сасвим јасно у којој мери регулација гликемије смањује ризик од можданог удара. Вредност гликемије наше, при чему гликемија наше не прелази 6 mmol/L, нема статистички значајан утицај на појаву можданог удара, изузев у случају терапије метформином (57). Такође, значајан показатељ успешности терапије је удео гликозилираног хемоглобина (HbA1c) у односу на укупни хемоглобин. Терапија при којој HbA1c не прелази 6% је довела до значане редукције инциденције можданог удара (58).

Додатни фактори који повећавају инциденцију можданог удара код оболелих од дијабетеса су хипертензија и хиперлипидемија. Код дијабетеса тип 2, ризик за настајање можданог удара се повећава 2 до 3 пута уколико је дијабетес компликован хипертензијом (59). Међутим терапија статинима има највећи утицај у смањењу инциденције можданог удара код оболелих од дијабетеса, што указује на значај поремећаја метаболизма липида у патогенези можданог удара (60).

Мождани удар се сматра макроваскуларном компликацијом дијабетеса услед убрзаног процеса атеросклерозе и промена на каротидним атреријама који настају у дијабетесу. Поред тога, постоји велики број доказа који указују на чињеницу да се у дијабетесу пре свега оштећују мали крвни судови мозга („миковаскулатура“) (61). Најпре долази до задебљања базалне мембране малих крвних судова мозга услед таложења колагена. Задебљање базалне мембране отежава нормално функционисање васкуларних глатких мишићних ћелија, перичита и астроцита који представљају функционални мост између васкуларног простора и нервних ћелија. Такође, долази до увећања стопаластих продужетака астроцита, као и повећања садржаја воде у митохондријама и ендоплазматском ретикулуму глатких мишићних ћелија (62). Поремећај функционисања ендотела је једна од првих фаза у развоју убрзане атеросклерозе код дијабетичних пацијената. Најпре LDL холестерол пролази кроз ендотелне ћелије, и улази у медију где се оксидује. У одговору на локалну инфламацију моноцити мигрирају у артеријски зид и фагоцитују оксидовани LDL и постају пенасте ћелије. Након смрти пенасте ћелије липидни садржај се ослобађа и постаје липидно језгро атеромског плака. Глатке мишићне ћелије пролиферишу и образују фиброзу капу изнад липидног језгра. Како се садржај LDL повећава *lamina elastica externa* се шири како би се проток крви очувао, међутим када се достигне критична тачка плак проминира у лумен крвног суда услед чега се повећава отпор протицању крви, а смањује се сам проток крви. Током времена може да дође до руптуре плака коју прати тромбоза, као физиолошка реакција на оштећење, која додатно смањује или потпуно прекида проток крви кроз дисталне делове ткива (63).

Поред структурних промена, настаје и ремоделовање зида крвних судова. У експерименталним моделима дијабетеса ремоделовање крвних судова је праћено повећањем садржаја матриксних металопроотеиназа (ММП) 2 и 9 (64). Иако велики број фактора раста може да буде укључен у ремоделовање крвних судова током дијабетеса, у

последње време посебну пажњу је привукао ендотелин 1 (ЕТ-1). ЕТ-1 је један од најпотентнијих вазоконстриктивних фактора и фактора раста који узрокује ремоделовање како малих тако и великих крвних судова мозга (65).

Ендотел-зависна релаксација церебралних крвних судова је знатно редукована код оболелих од дијабетеса. Постоје многи узроци за ово смањење, а неки од њих могу да буду: поремећаји у синтези NO, повећање оксидативног стреса, синтеза нефункционалних јонских канала у васкуларним глатким мишићним ћелијама, као и смањење активности Rho киназа (66).

1.4.1.3 Атријумска фибрилација

Атријумска фибрилација је најчесталији поремећај срчаног ритма, који се јавља код 1-2% укупне популације, а више од 6 милиона људи у Европи има овај поремећај (67). Атријумска фибрилација (фибрилација преткомора) је независни фактор ризика за мождани удар. Код особа са атријумском фибрилацијом ризик за настајање можданог удара се повећава од 2,6 до 4,5 пута у зависности од старосне доби (68). Вероватноћа за настајање можданог удара код пацијената са атријумском фибрилацијом се креће од 1,5% у старосној доби од 50 до 59 година, па до 23,5% у старосној доби од 80 до 89 година (69). Ризик за настајање можданог удара код пацијената са атријумском фибрилацијом се знатно повећава уколико, поред старости, постоје додатни фактори ризика као што су: женски пол, претходни мождани удари или транзиторни исхемијски атаци (ТИА), хипертензија, срчана слабост, дијабетес и васкулопатије (70, 71).

До скоро се сматрало да је тромбогенеза искључиво последица поремећене функције леве преткоморе, услед чега је поремећен проток крви, па се испуњава један од услова из Вирховљеве тријаде за настајање тромба. Међутим, сада је прихваћено становиште да је формирање тромба у левој преткомори последица истовременог деловања великог броја фактора (72, 73). Брза активност преткомора изазива повећано активирање тромбоцита и повећано стварање тромбина, а у атријалној фибрилацији додатно постоји и ендотелна дисфункција и активација инфламаторне каскаде. Наведени фактори су у много већој мери изражени у левој преткомори него у периферној циркулацији (74). Тромбоцити имају кључну улогу у тромбогенези услед интеракције са ендотелом, инфламаторним ћелијама и протеинима коагулације (75). Повећана продукција

тромбина, пре свега у левој комори у односу на периферну циркулацију, током атријумске фибрилације објашњава учесталије формирање тромба у левој преткомори. Ендотелна дисфункција, такође, има једну од кључних улога у процесу атерогенезе код пацијената са атријумском фибрилацијом (73). Асиметрични диметиларгинин (ADMA) је ендогени инхибитор азот-моноксид синтазе (NOS), а азот-моноксид испољава потентна антиромботична својства и инхибише адхезију тромбоцита и моноцита. ADMA такође учествује у развоју ендотелне дисфункције посредством оксидативног стреса (76). Постоје докази, како на анималним моделима тако и у хуманој популацији, да је ADMA значајно повишена током атријумске фибрилације (75, 77). Инфламација такође има значајну улогу тромбогенези услед атријумске фибрилације. Вредност С-реактивног протеина се брзо повећава код пацијената са атријумском фибрилацијом, а након успешне аблационе терапије вредност овог запаљењског маркера се брзо смањује, што наводи на закључак да атријумска фибрилација може да индукује запаљенски процес (78). Лим и сарадници су показали значајно повећање CD40 лиганда код пацијената са атријумском фибрилацијом (75). CD40 лиганд представља значајну везу између инфламације и тромбогенезе, јер делује на активирание тромбоците и ендотел, индукујући синтезу и секрецију ендотелних хемокина и експресију адхезивних молекула, чиме се фаворизује мобилизација леукоцита (79).

Касније тромбоемболијске компликације могу да захвате било који део артеријског система, али церебрална тромбоемболија, и последично исхемијски мождани удар, представља најчешћи исход. Бројни фактори утичу на локализацију емболуса, а самим тим које ће ткиво или орган бити захваћен тромбоемболијом, али је тешко детерминисати који од њих има одлучујућу улогу. Специфичне анатомске карактеристике појединих делова артеријског стабла вероватно имају значајну улогу у локализацији емболуса, као што је недостатак финог гранања периферних церебралних артерија или анатомске разлике између десне и леве каротидне артерије и артерије субклавије (*a. subclavia*) (80, 81). Суужење крвних судова изазвано атеросклерозом, као и места гранања крвних судова су критична места за емболизацију тромбом (80). Већа преваленција тромбоемболије каротидних артерија у односу на артерије субклавије је вероватно повезана са смањеним отпором протицању крви и већим протоком крви у овим артеријама.

Мождани удар изазван тромбоемболијом услед атријумске фибрилације има фаталан исход у 70% случајева, а код осталих пацијената често постоје тешки неуролошки дефицити и трајни поремећаји когнитивне функције, што је узрок продужене хоспитализације и дуготрајне рехабилитације ових пацијената (82).

Као превенција исхемијског можданог удара код пацијената са атријумском фибрилацијом се користи терапија варфарином, при чему је неопходно константно праћење коагулационог статуса. Циљ примене антикоагулантне терапије варфарином је одржавање коагулације у врло уском опсегу (од 2 до 3 INR). Смањење вредности INR испод 2 значајно повећава ризик од настајања исхемијског можданог удара, док повећање вредности INR изнад 3 повећава ризик од настајања интрацеребралне хеморагије (83).

1.4.1.4 Хиперлипидемија

Хиперлипидемија је један од најзначајнијих фактора ризика за настајање исхемијског можданог удара. Више од половине пацијената са исхемијским можданим ударом истовремено имају и хиперлипидемију, и такви пацијенти имају значајно већи морталитет (84, 85). И поред евидентне улоге хиперлипидемије у патогенези можданог удара, није сасвим јасан механизам остваривања нежељених ефеката повећане концентрације (пре свега) холестерола. Неки аутори указују на чињеницу да значајно смањење ризика од можданог удара услед употребе статина је само делом последица смањења концентрације холестерола у циркулацији, а пре свега настаје због повољних ефеката ове групе лекова на ендотелну функцију, као и због антиинфламаторног, антиромбогеног, имуномодулаторног и антиоксидативног дејства (86, 87). Хронично повећана концентрација холестерола покреће низ васкуларних поремећаја као што су: оксидативни стрес, ендотелна дисфункција, поремећај крвно-мождане баријере и васкуларна инфламација (88, 89). Хиперхолестеролемија изазива акумулацију и оксидацију LDL у интими зида крвних судова, што представља почетни корак у процесима ендотелне дисфункције и инфламације, који су кључни за развој ране фазе атеросклерозе (89).

Аполипопротеин Е (apoE) је гликопротеин, који у највећој мери синтетишу јетра и мозак, а такође и моноцити и макрофаги у крвним судовима. Налази се у свим врстама липопротеина, изузев у липопротеинима мале густине (LDL). ApoE има улогу лиганда за рецепторе који везују хиломикроне и липопротеине врло мале густине (VLDL). У здравим

крвним судовима ароЕ вероватно учествује у хомеостази холестерола, а у крвним судовима захваћеним атеросклерозом ароЕ има улогу у инфламаторним реакцијама. На хомеостазу холестерола ароЕ делије на три начина: 1) ароЕ из плазме делује на укупну хомеостазу холестерола у плазми олакшавањем преузимања липопротеинских остатака у јетри; 2) поремећај функције ароЕ, удружен са поремећајем аполипопротеина А-I, олакшава прелазак холестерола из пенастих ћелија у интиму лезије; 3) поремећај функције ароЕ модификује имунски одговор и макрофага и Т-лимфоцита, што доприноси перзистирању атеросклерозе као хроничне инфламаторне болести (90, 91).

Независно од развоја атеросклерозе, хиперлипидемија ремети функционисање и ендотелних ћелија и глатких мишићних ћелија крвних судова. Хиперлипидемија онемогућава ендотел-зависну релаксацију како каротидних артерија и базиларне артерије, тако и пиалних артериола (92). Функција ендотела се поправља применом L-аргинина или „скевенцера“ слободних радикала, што указује на улогу NO система у адекватном функционисању церебралног васкуларног система (93). Поред тога, оксидовани LDL изазива повећану адхезију леукоцита у малим крвним судовима мозга, као и повећан инфлукс јона Ca^{2+} у ћелије васкуларних глатких мишића активацијом Rho/Rho киназа (94, 95). На тај начин хиперлипидемија испољава своје дејство на функционисање мозга деловањем на ендотелне ћелије, васкуларне глатке мишиће и ћелије из циркулације.

1.4.1.5 Пушење

Пушење је независан фактор ризика за настајање можданог удара, пре свега за инфаркт мозга и субарахноидалну хеморагију. Код пушача се ризик за настајање можданог удара повећава за 50% (96). Ризик за настајање можданог удара код пушача се повећава пропорционално броју попушених цигарета. Код пасивних пушача се такође повећава ризик за настајање исхемијског можданог удара (42).

Један од механизма којим дуван остварује нежељена дејства на цереброваскуларни систем је индуковање оксидативног стреса. Наиме, дувански дим садржи високе концентрације различитих реактивних врста кисеоника (*reactive oxygen species* - ROS), као што су: супероксид анјон радикал, хидроксил радикал, водоник пероксид и пероксинитрит. ROS изазива оштећење макромолекула и поремећај функције ћелије на више начина: липопероксидација полинезасићених масних киселина ћелијске

мембране, оксидација протеина, прекид ланца ДНК, оксидација РНК, деполаризација митохондрија и индуковање апоптозе (97, 98, 99).

Састојци дуванског дима фаворизују настајање и развој атеросклерозе покретањем сложене инфламаторне реакције у којој посредују леукоцити који продиру у место инфламације деловањем цитокина као што су IL-1 β и TNF- α , повећањем активности матриксних металопроотеиназа 1 и 9 (MMP-1 и MMP-9), као и повећање адхезије и везивања моноцита за ендотел крвних судова (100, 101).

Код пушача постоји повећење ризика за настајање тромбозе услед повећања концентрације фактора активације тромбоцита, Фон Вилебрандовога фактора (vWF), β -тромбоглобулина, катехоламина и тромбоксана (102, 103). Претходно наведено повећање ROS изазвано дуванским димом, доводи до смањене расположивости NO, а дувански дим индукује и смањену продукцију NO деловањем на NOS. Промене у активности и расположивости NO узрокују почетне тромбогене промене, као и њихову прогресију. Недостатак NO доводи до секреције тромбоксана A₂ из тромбоцита, што последично изазива активацију нових тромбоцита, код којих настају конформационе промене интегринских рецептора (гликопротеин IIb-IIIa - GP IIb-IIIa) на површини тромбоцита. То узрокује повећан афинитет интегринских рецептора тромбоцита за лиганде – фибриноген и vWF. Повезивање фибриногена, vWF и GP IIb-IIIa на површини тромбоцита изазива повезивање активираних тромбоцита, што доводи до агрегације тромбоцита (103, 104).

1.4.1.6 Гојазност

Гојазност драматично повећава ризик од настајања možданог удара. Описано је више потенцијалних механизма којима гојазност индукује васкуларне промене. Централно дистрибуирану гојазност често прати интолеранција глукозе, атерогена дислипидемија и артеријска хипертензија. Ови поремећаји се заједно називају „метаболички синдром“. Висцерално адипозно ткиво не представља само резервоар енергетских једињења, већ и ткиво са ендокриним својствима. У адипозном ткиву се секретује више цитокина, који представљају посреднике у развоју обољења повезаних са гојазношћу. Matsuzawa и сарадници су испитујући ендокрина својства адипозног ткива, описали више гена који кодирају синтезу више цитокина, као што су адипонектин, затим протеин сличан колагену, који су назвали адипоцитни специфични цитокин, и друге цитокине који се

једним именом зову адипоцитокени (105). Адипонектин постоји у великој количини код здравих особа и испољава антитромбогена, антиатерогена и антиинфламацијска својства, док се код гојазних особа његова количина значајно смањује, што је у корелацији са повећаним ризиком од настајања можданог удара код гојазних особа (106, 107). Поред адипонектина, који се услед гојазности смањује, концентрација осталих адипоцитокени се повећава. Ова чињеница има кључну улогу у разумевању патогенезе васкуларног оштећења у гојазности. Дакле поред адипонектина, чија се концентрација смањује, висцерално адипозно ткиво гојазних особа у повећаној мери секретује и ослобађа: 1) проинфламаторне цитокине и хемокине (моноцитни хемотаксни протеин-1, фактор инхибиције миграције макрофага, TNF- α , IL-1 β , IL-6); 2) прокоагулантне и проинфламаторне медијаторе (ткивни фактор, инхибитор активатора плазминогена-1); 3) вазоактивне супстанце (ангиотензин и ендотелин-1); 4) молекуле који узрокују резистенцију на инсулин (TNF- α и резистин) (108). Све наведене супстанце испољавају штетне ефекте на васкуларну мрежу глобално и повећавају ризик од настајања нежељених васкуларних компликација где спада и исхемијски инфаркт мозга.

Код гојазних особа настаје и поремећај функције тромбоцита. Тромбоцити гојазних особа су већи и услед тога склонији агрегацији. Такође, тромбоцити гојазних особа су мање осетљиви на деловање антиагрегационих супстанци као што су: простациклин, инсулин и NO (109). Независно од наведених чињеница код гојазних особа постоји повећање броја тромбоцита, односно постоји позитивна корелација између *body mass index*-а и броја тромбоцита (110).

Адекватно функционисање васкуларних глатких мишића је такође поремећено код гојазних особа. Кључну улогу у овом поремећају има ендотелна дисфункција изазвана повећаном секрецијом проинфламаторних цитокина, смањеном секрецијом адипонектина и повећаним ослобађањем слободних масних киселина. Наиме, повећана секреција лептина, резистина, TNF α и IL-6, а смањена секреција адипонектина изазива повећану продукцију супероксид анјон радикала (O_2^-) који реагује са NO, и на тај начин смањује његову количину, што води смањењу вазорелаксације. Реакцијом O_2^- и NO настаје пероксинитрит ($ONOO^-$) који спада у најпотентније слободне радикале и изазива оксидативно оштећење ендотела (108, 111).

Важеће препоруке указују да *body mass index* треба да буде у границама од 18.5 до 24.9 kg/m². Смањење ризика настајања možданог удара услед смањења телесне масе је вероватно више последица боље контроле фактора ризика удружених са гојазношћу, односно боље регулисање хипертензије, гликемије и липидемије. У превенцији možданог удара се саветује исхрана са малим садржајем засићених масних киселина и натријума, а повећан унос воћа, поврћа и калијума (42).

1.4.2 „Нови“ фактори ризика

Нови фактори ризика за настајање исхемијског možданог удара слични су факторима ризика за настајање инфаркта миокарда, и ту спадају: хиперхомоцистеинемија, С-реактивни протеин, повећање односа apoB/apoA, наслеђе, инфекција одређеним патогенима, хиперкоагулабилна стања, микроалбуминурија (112).

1.4.2.1 Хиперхомоцистеинемија

Хомоцистеин (Нсу) је семиесенцијална, сумпоровита аминокиселина која настаје од есенцијалне аминокиселине метионина. Концентрација Нсу се одржава у физиолошким границама процесима реметилације и транссулфурације. Ензим метионин синтетаза врши реметилацију Нсу до метионина. За ову реакцију су као кофактори неопходни витамин В12 и фолна киселина. Ензим метилентетрахидрофолат редуктаза, катализује синтезу 5-метил тетрафолата који као кофактор учествује у реакцији реметилације. Транссулфурацију катализује ензима цистатион β-синтетаза, за чију је активност неопходно присуство витамина В6, као кофактора, при чему као производ реакције настаје цистатион (113).

Концентрацију Нсу у циркулацији одређује пре свега унос метионина исхраном, као и доступност витамина који као кофактори учествују у метаболизму Нсу. Сматра се да и стил живота, прекомерно конзумирање кафе и алкохола, пушење цигарета и физичка неактивност могу да допринесу повећању концентрације Нсу. Повећање концентрације Нсу (хиперхомоцистеинемија - ННсу) је удружено са старењем и смањењем реналне функције (114, 115).

Постоји позитивна корелација између ННсу и тромбозе, тако да Нсу може да се користи као предклинички маркер за настајање исхемијског možданог удара. Код особа које су хомозиготи за недостатак ензима цистатион β-синтетазе, утврђена је повећана

концентрација 8-изо-простагландина F (2 α), који је маркер липидне пероксидације (116). Наведена чињеница указује да је повећање липидне пероксидације активираних тромбоцита могући механизам којим ННсу повећава ризик настајања исхемијског мозданог удара. Повећање концентрације Нсу изнад 14 $\mu\text{mol/L}$ је у великој мери повезано са прогресијом атерома аортног лука, који је независан фактор ризика за рекурентне церебралне вакуларне испаде (117, 118).

Епигенетски механизми који контролишу експресију гена подразумевају: метилацију ДНК, модификације хистона, ремоделовање нуклеозома, виши степен формирања хроматина, деловање на РНК. Сви наведени механизми омогућавају одржавање хомеостатских услова, нормалан развој и реаговање на екстремне стимулусе. ННсу значајно ремети физиолошко одвијање наведених процеса, што такође представља механизам индуковања атеросклерозе и исхемијског мозданог удара (119, 120).

Једна од теорија којом се објашњава механизам штетног дејства Нсу сугерише да ковалентно везивање Нсу за протеине мења њихову функцију. Овај процес се назива хомоцистеинилација, и може да буде S-хомоцистеинилација, ако се Нсу везује дисулфидном везом за сулфхидрилну групу протеина, или N-хомоцистеинилација, ако се хомоцистеин везује амидном групом за аминок групу лизина у протеину. S-хомоцистеинилација мења функцију молекула на два начина: 1) инактивацијом потенцијално активних тиолних група и 2) мењањем редокс потенцијала протеина. Нсу се дисулфидном везом везује за фибронектин, анексин II и интрацелуларне металопротеине (121). N-хомоцистеинилацију индукује реактивни облик Нсу, Нсу-тиолактон, који се везује за аминок групе лизина унутар протеина. Нсу-тиолактон најчешће ремети функцију албумина у циркулацији, хемоглобина, имуноглобулина, LDL, HDL, трансферина, антитрипсина и фибриногена (122). Нсу изазива ендотелну дисфункцију посредством више различитих механизма чији је исход формирање атеросклеротског плака. Нсу: 1) инхибира раст ендотелних ћелија, 2) ремети равотежу између NO и O₂⁻ што има штетне последице на функционисање васкуларног система, 3) изазива повећану експресију адхезивних молекула, и 4) узрокује настајање модификованих LDL честица. Нсу активира и NAD(P)H оксидазу и ксантин оксидазу, два битна прооксидантна ензима, чија активност узрокује повећање O₂⁻ (121).

Како је ННсу стање које настаје услед недостатка витамина који су кофактори у ензимским реакцијама које су укључене у метаболизам Нсу, витаминска суплементација је терапија избора. Суплементација витаминима В12, В6 и фолном киселином смањује концентрацију Нсу у циркулацији, истовремено смањујући и ризик од обољења која су удружена са ННсу. Суплементација фолном киселином има најизраженије позитивне ефекте, витамином В12 нешто слабије, док суплементација витамином В6 не изазива никакву значајну корист. Препоручена дневна доза витамина за особе са дијагностикованим цереброваскуларним обољењем праћеним ННсу износи: за фолну киселину 400–1.000 µg, за витамин В12 400–600 µg, и за витамин В6 2–10 mg (117, 118).

1.4.2.2 С-реактивни протеин

С-реактивни протеин (CRP) спада у протеине акутне фазе запаљења и неспецифичне маркере инфламације. У највећој мери се ствара у хепатоцитима као одговор на стимулацију одређеним цитокинима, и по структури је пентамер сачињен од идентичних субјединица. IL-6, који се ослобађа из активираних леукоцита током инфекције или трауме и из васкуларних глатких мишићних ћелија у крвним судовима захваћених атеросклерозом, је најпотентнији стимулатор секреције CRP (123).

Многе студије указују на повезаност инфламације и морфолошких карактеристика и стабилности атеросклеротског плака (124, 125). Инфламација индукује тромбозу и васкуларно оштећење који су основи већине кардиоваскуларних болести, па и исхемијског možданог удара. Високо сензитивни С-реактивни протеин (енгл. *High-Sensitivity C-Reactive Protein* - hsCRP) је маркер инфламације и његова концентрација се повећава и у акутним и у хроничним системским запаљенским стањима. hsCRP изазива олакшану адхезију моноцита и њихову миграцију у васкуларни зид, што представља критичан процес у раној фази атеросклерозе. hsCRP индукује и поларизацију макрофага, што представља проинфламаторни покретач у настајању плака јер узрокује инфилтрацију атеросклеротских лезија макрофагима (126).

CRP инхибира активност ендотелне азот-моноксид синтазе (eNOS) и узрокује неадекватну васкуларну реактивност. CRP изазива значајно смањење iPHK која кодира протеин за eNOS као и активност eNOS (127). Механизам којим се остварује овај ефекат заснива се на поремећају eNOS, што за последицу има повећање ослобађања супероксид

анјон радикала (O_2^-), смањење секреције NO и измењену фосфорилацију eNOS. CRP изазива и смањење концентрације простагландина F-1 α , који је стабилни метаболит простаглицина, који је један од најпотентнијих вазодилатора, инхибитора агрегације тромбоцита и инхибитора пролиферације васкуларних глатких мишићних ћелија, који се синтетише у ендотелним ћелијама (128).

Мономерни CRP представља изоформу CRP која настаје дисоцијацијом пентамерног CRP. Мономерни CRP индукује секрецију интерлеукина-8 (IL-8) у неутрофилима и ендотелним ћелијама, подстиче адхезију неутрофила за ендотелне ћелије и одлаже апоптозу неутрофилних ћелија (129, 130). Eisenhardt и сарадници су доказали да: 1) CRP који постоји у атеросклеротским лезијама пре свега је мономерни CRP, 2) активирани тромбоцити у атеросклеротским лезијама врше дисоцијацију пентамерног CRP у мономерни CRP, 3) мономерни CRP у малим концентрацијама може да изазове активацију моноцита и покрене догађаје који узрокују котрљање, адхезију и трансмиграцију моноцита, за разлику од пентамерног CRP у истој концентрацији, 4) мономерни CRP у ниским концентрацијама, за разлику од пентамерног CRP, индукује продукцију ROS, 5) пентамерни CRP показује проинфламаторна својства у високим концентрацијама, што указује на чињеницу да је пентамерни CRP важан проинфламаторни молекул у стањима где је концентрација овог једињења знатно повишена (септикемија) (130).

Сада се сматра да је hsCRP моћнији предиктор нежељених кардиоваскуларних догађаја (инфаркт миокарда, мождани удар, изненадна смрт) од било које вредности холестерола. hsCRP је фактор ризика како за први мождани удар, тако и за настанак наредних можданих удара. У једној студији вредност hsCRP изнад 10,1 mg/L у прва 72 сата од можданог удара указује на већу вероватноћу фаталног исхода у наредне четири године, док се у другој студији наводи да вредност hsCRP изнад 15 mg/L значајно повезана са наредним нежељеним васкуларним догађајем или смртним исходом у наредних годину дана (131-133).

1.4.2.3 Повећање односа apoB/apoA

LDL холестерол се сматра једним од најзначајнијих фактора ризика за настајање кардиоваскуларних болести, јер оксидација LDL холестерола у плазми или у

субендотелном простору покреће серију догађаја који повећавају преузимање LDL холестерола од стране макрофага, васкуларних глатких мишићних ћелија и ендотелних ћелија. Повећано преузимање LDL холестерола од стране наведених ћелија индукује њихову трансформацију у пенасте ћелије, које представљају једну од основних компоненти атеросклеротског плака (134, 135). Оксидативна модификација LDL холестерола у великој мери повећава трансформацију моноцита или макрофага у пенасте ћелије (134). Аполипопротеин В (apoB) је протеин чија је концентрација у плазми у директној корелацији са концентрацијом холестерола, и чија се кључна улога огледа у спајању липидних честица (136). ApoB је структурни протеин који представља саставну компоненту хиломикрона, липопротеина врло мале густине (VLDL), липопротеина мале густине (LDL) и липопротеина средње густине (IDL), због чега концентрација apoB одлично рефлектрује концентрације свих проатерогених липидних честица. Липопротеини велике густине (HDL), чије се високе концентрације доводе у везу са антиатерогеним ефектом, не садрже apo B (137). HDL представљају хидросолубилне наночестице које сакупљају вишак холестерола из периферних ткива и на тај начин штите организам од кардиоваскуларних болести. За разлику од наведених липопротеина који садрже apoB, HDL садржи аполипопротеин А-I (apoA-I), тако да и HDL и apoA представљају такозване негативне факторе ризика за атеросклерозу, односно испољавају атеропротективно дејство. ApoA-I на површини HDL је неопходан за различите функционалне интеракције које усмеравају метаболизам HDL. ApoA-I се састоји од полипептидног ланца који садржи 243 аминокиселине и чини око 70% протеинског састава HDL (138).

Концентрација LDL и apoB су сматрани најбољим предикторима нежељених кардиоваскуларних догађаја, као што су инфаркт миокарда и мождани удар. Међутим сада се поред њих, повишен однос apoB/apoA сматра једним од најзначајнијих васкуларних фактора ризика за мождани удар (139).

1.4.2.4 Наслеђе

Појава можданог удара у породичној историји представља фактор ризика за мождани удар. Међутим, тешко се може изоловати један једини ген који има доминантну улогу у настајању можданог удара. Неколико истраживачких тимова су потврдили повезаност између генског локуса на хромозому 9p21 и коронарне болести (140-142). Како постоји

велика сличност у факторима ризика за коронарну болест и исхемијски мождани удар, испитивана је могућа веза између локуса 9p21 и исхемијског можданог удара, при чему је потврђено да је генски локус 9p21.3 независни фактор ризика за исхемијски мождани удар (143).

Церебрална аутозомно-доминантна и аутозомно-рецесивна артериопатија са субкортикалним инфарктима и леукоенцефалопатијом (CADASIL и CARASIL) су стања у чијој патогенези се налазе мутације одређених гена, а у чијој клиничкој слици настају симптоми исхемијског можданог удара. CADASIL карактерише мутација гена за NOTCH3 који је рецептор за епидермалне факторе раста на васкуларним глатким мишићним ћелијама (144). CARASIL настаје услед мутације гена за HtrA серинску протеазу 1 (145, 146). Наследна компонента долази до изражаја када су присутни други фактори ризика. У случају хомозиготних близанаца са CADASIL, исхемијски мождани удар се развио 14 година раније код близанца који је водио седентарни начин живота и пушио, у односу на близанца који је редовно вежбао и није пушио (147).

Поред утицаја наслеђа на настајање исхемијског можданог удара, утицај наслеђа је евидентан и у патогенези хеморагијског можданог удара. Постојање неруптурираних интракранијалних анеуризми представљају терапијски циљ у спречавању субарахноидалних крварења. Истраживањима је откривено неколико генских локуса повезаних са наведеним стањем (148).

1.4.2.5 Инфекција одређеним патогенима

У последњих неколико деценија истраживања су показала да различите бактеријске и вирусне инфекције имају велики значај у развоју атеросклеротских лезија (149, 150). Најчешћи патоген који се помиње у овом контексту је *Chlamydia pneumoniae*, чија су ДНК или антигени детектовани у преко 40% атеросклеротских лезија (151). Такође у студији Кџепа и сарадника потврђена је веза између инфекције *C. pneumoniae* и развоја атеросклерозе (152). Међутим, подаци о улози *C. pneumoniae* у патогенези можданог удара се разликују, а поједини аутори чак поричу било какву улогу *C. pneumoniae* у развоју можданог удара (153). Наведене разлике су можда последица употребе различитих метода, при чему серолошке методе указују на везу између можданог удара и инфекције *C. pneumoniae*, док коришћењем PCR технике (*polymerase chain reaction*) није откривена *C.*

pneumoniae у великим интрацеребралним крвним судовима код пацијената са можданим ударом, а у атеросклеротским лезијама интрацеребралних крвних судова средње величине овај патоген је детектован код 5 од 15 пацијената са можданим ударом (154, 155).

S. pneumoniae је облигаторно интрацелуларна, Грам негативна бактерија, први пут описана 1986. године (156). Везује се пре свега за патологију респираторног система, али преваленција серолошких доказа о инфекцији код особа који нису прележалие пнеумонију указују и на могућност субклиничких инфекција. Обзиром да *S. pneumoniae* инфицира респираторни систем одатле лако прелази у крвоток.

Један од могућих механизма индуковања атеросклеротских промена је инфекција ендотелних ћелија или васкуларних глатких мишићних ћелија *S. pneumoniae*, уз развој локалне инфламације и фиброзе. Такође, понављане или перзистентне инфекције *S. pneumoniae* могу да изазиву синтезу проинфламаторних цитокина који смањују тромборезистентну улогу ендотелних ћелија, што је објашњено у претходном тексту. Још један од могућих механизма којима *S. pneumoniae* повећава вероватноћу настајања можданог удара је индуковање атерогеног липидног профила. Наиме, код особа код којих је серолошки доказано постојање IgG антитела на *S. pneumoniae* откривене су и промене липидног профила, и то смањење HDL холестерола, повећање триглицерида, LDL холестерола, VLDL холестерола, као и укупног холестерола (152, 157). Хи и сарадници су указали на могућу улогу *heat-shock* протеина у развоју атеросклеротских промена индукованим бактеријским инфекцијама. *Heat-shock* протеин који се синтетише у артеријском зиду је од круцијалног значаја за заштиту ћелија од хемодинамског стреса, оксидативног стреса и цитокина. Али *heat-shock* протеини носе и знатан ризик од развоја аутоимуности, јер постоји велики степен сличности између различитих врста, почев од прокариотских организама до људи. Повећање титра антитела на микобактеријски *heat-shock* протеин HSP65, који је хомолог хуманог *heat-shock* протеина HSP60, је повезано развојем атеросклеротских промена каротидних артерија (158).

Поред *S. pneumoniae*, предмет истраживања различитих студија је била улога и других патогена у настанку можданог удара, као што су *Helicobacter pylori*, *Toxoplasma gondii*, *Herpes simplex virus 1* и *2*, *Varicella Zoster Virus*, и *cytomegalovirus*. Инфекција *h. pylori* се такође сматра једним од фактора ризика за настајање можданог удара (159). Механизам којим хронична инфекција *h. pylori* повећава ризик од настајања исхемијског

можданог удра није сасвим јасан. Једна од хипотеза се односи на активацију тромбоцита и поремећај коагулације. Доказано је да су вредности укупног холестерола, LDL холестерола, фибриногена и IL-8 биле значајно ниже код пацијената са можданим ударом код којих је претходно излечена инфекција *h. pylori* у односу на пацијенте који имају *h. pylori* (160).

Инфекција осталим наведеним патогенима, *Toxoplasma gondi*, *Herpes simplex virus 1* и 2, *Varicella Zoster Virus*, и *cytomegalovirus*, углавном није могла да се доведе у везу са развојем исхемијског можданог удара (161, 162).

1.4.2.6 Хиперкоагулабилна стања

Критична тачка у развоју тромбозе је неадекватно започињање коагулационе каскаде, а покретач не може увек са сигурношћу да се открије. Када је у питању артеријска тромбоза узрок је оштећење ендотела које може да настане услед руптуре атеросклеротског плака. Тромбоза вена може да се развије и када је ендотел неоштећен, па је узрок мање уочљив (163). Фон Вилебрандов фактор (vWF) и тромбоцити су компоненте крви које имају кључну улогу у иницирању настајања тромба. vWF је велики гликопротеин кога секретују ендотелне ћелије. Синтетише се и депонује у облику ултравеликог молекула, а потом се секретује егзоцитозом. Током секреције дејством ADAMTS13 протеаза ултравелики vWF се преводи у мање и хемостатски неактивније мултимере који постоје у циркулацији. Формирање угрушка започиње када се тромбоцити вежу преко мембранског гликопротеина Ib за специфична везујућа места vWF. Ова специфична везујућа места vWF су скривена када је vWF у глобуларној форми у циркулацији, а да би се изложила непходна је конформациона промена у виду издуживања. Наведена конформација постоји непосредно након секреције vWF, пре деловања ADAMTS13 протеаза или услед деловања повећане силе смицања (*shear* стрес) у суженим крвним судовима. Када се vWF веже за тромбоците активирају се други фактори коагулације, што изазива повећање крвног угрушка (164). Повишене серумске вредности vWF представљају фактор ризика за тромбогенезу, поготово код пацијената са претходним кардиоваскуларним поремећајима (165). Хипернатријемја је једно од стања у којима се повећава продукција и секреција vWF у ендотелним ћелијама. Dmitrieva и сарадници су у својој студији указали да секреција vWF услед повећане концентрације натријума индукује тромбозу, коју додатно

фаворизују стања као што су дехидратација, велики унос натријума исхраном, старост дијабетес и хиперосмотска терапија (166).

Наследне тромбофилије представљају урођене аномалије коагулационе каскаде. Најпознатији урођени протромбогени фактори ризика су недостатак природних антикоагуланаса, као што су протеин С, протеин S, антитромбин, или постојање фактора V Лајден (Leiden) и фактора II G20210A. Поремећај у синтези наведених фактора је најчешће узрок исхемијског мозданог удара код деце (167).

Протеин С је серинска протеаза која се у циркулацији налази у зимогеном облику, а када се активира назива се активирани протеин С и тада испољава антикоагулантну активност. Доминантно се синтетише у јетри у виду прекурсора који садржи 461 аминокиселину, док зрео гликопротеин садржи 419 аминокиселина. иРНК за протеин С се у малим количинама налази и у мозгу, али улога овог протеина С није сасвим расветљена (168). Протеин С се активира под ензимским дејством тромбина и прелази у активирани протеин С. Активирани протеин С испољава своје антикоагулантно својство деловањем на факторе Va и VIIIa, узрокујући цепање ових фактора коагулације у пределу неколико пептидних веза које садрже аргинин. Протеин С као и активирани протеин С могу да прођу крвно-моздану баријеру посредством ендотелног рецептора за протеин С (169, 170).

Протеин S је витамин К зависни протеин плазме који се синтетише у јетри и у ендотелним ћелијама. У плазми протеин S се налази у слободном облику или везан за C4b-везујући протеин. Протеин S делује као кофактор активираним протеину С у протеолитичкој инактивацији фактора Va и VIIIa (171). Недостак протеина S је чешћи узрок исхемијског мозданог удара у односу на недостатак протеина С (172).

Антитромбин је комплексан гликопротеин који се синтетише у јетри и који има више биолошки важних особина. Антитромбин је серинска протеаза која инхибира више ензима у коагулационој каскади. Антитромбин је кључни инхибитор коагулационог система и сматра се да обезбеђује 80% инхибиторне активности за тромбин, а поред тога инхибира активирани факторе коагулације X, IX, VII, XI, и XII. Преко антитромбина хепарин остварује своја антикоагулантна својства (173).

Фактор V Лајден је мутирани фактор V који је отпоран на протеолитичко дејство протеина С, тако да је његово прокоагулантно дејство пролонгирано. Ова мутација се

наслеђује аутозомно доминантно и хетерозиготи имају 3 до 5 пута већи ризик за настајање тромбозе, док се код хомозигота тај ризик повећава и до 80 пута (174). Наслеђивање мутираног гена за фактор V Лајден је најчешћи узрок мозданог удара који настаје као последица наследних коагулопатија (172).

Roort и сарадници су описали *point* мутацију гена за протромбин која се доводи у везу са повећаним концентрацијама протромбина (175).

Поред наведених поремећаја, и друга хематолошка патолошка стања су везана за чешће настајање мозданог удара. У та стања спадају: анемија српастих ћелија, малигни хематолошки поремећаји, полицитемија, тромбоцитемија, пароксизмална ноктурнална хемоглобинурија, тромботична тромбоцитопенијска пурпура, дисеминована интраваскуларна коагулација и хепарином индукована тромбоцитопенија (176).

1.4.2.7 Микроалбуминурија

Појава албумина у урину се назива албуминурија, при чему ако се урином излучи од 30 до 299 mg албумина дневно, стање се назива микроалбуминурија, а ако се излучи више такво стање се назива макроалбуминурија. Иако се микроалбуминурија углавном сматра раним маркером оштећења бубрежне функције, она представља и независни показатељ ендотелне дисфункције (177). Због тога се микроалбуминурија сматра и фактором ризика за настајање мозданог удара. Lee и сарадници су у својој студији пронашли снажну везу између вредности албумина у излученом урину и мозданог удара (178). Наиме, пронашли су да албуминурија претходи мозданом удару у готово свим истраживањима која су се бавила утврђивањем ове везе. Затим, концентрација албумина у урину је у директној сразмери са инциденцом мозданог удара. Албуминурија је такође регистрована код пацијената оболелих од дијабетеса са симптомима атеросклерозе великих крвних судова, што представља снажан предиктор смртог исхода чији је узрок поремећај кардиоваскуларног система. Међутим, не може се са сигурношћу рећи да микроалбуминурија узрокује моздани удар. Вероватније је да микроалбуминурија и моздани удар имају сличне патофизиолошке процесе за узрок, тако да албуминурија може да послужи као поуздан предиктор настајања мозданог удара, а посебну погодност представља једноставност поступка одређивања албумина у урину. Особе са вишим вредностима албумина у урину могу да буду еветнуални кандидати за интензивније

смањење ризика од настајања поремећаја везаних за кардиоваскуларни систем, пре свега употребу статина и модулятора ренин-ангиотензин система, за које се показало да смањују албуминурију и превенирају нежељене васкуларне догађаје (179)

1.5 ОКСИДАТИВНИ СТРЕС И АНТИОКСИДАТИВНА ЗАШТИТА

1.5.1 РЕДОКС РАВНОТЕЖА

Продукција слободних радикала и њихова разградња у ћелији су у сталној међусобној равнотежи, чиме се обезбеђује углавном редукована средина која је неопходна за одвијање физиолошких процеса, а самим тим и преживљавање ћелије. Митохондрије представљају основни извор АТФ, као и основно место потрошње кисеоника и настајања реактивних кисеоничких врста (*Reactive oxygen species - ROS*). Током одвијања метаболичких процеса у физиолошким околностима, највећи део кисеоника се у митохондријама у потпуности редукује до воде, међутим од 2-5% молекулског кисеоника настају делимично редуковани облици који испољавају различите степене реактивности и називају се слободни радикали. Слободни радикали могу да буду молекули, јони или атоми који имају неспарене електроне у својој структури, који су уједно и узрок њихове реактивности (180). Услед тежње да се постигне паран број електрона слободни радикали се понашају као снажни електрофили, и у реакцији са дономом електрона, односно супстратом, се редукују. У тој реакцији се супстрат оксидује и постаје секундарни слободни радикал, и на тај начин почиње серија радикалских реакција са тежњом просторног и временског ширења (181, 182). Прихваћено је да се слободни радикали обележавају великим латиничним словом R са тачком поред, која симболизује неспарени електрон из последње електронске орбитале - R \cdot .

Продукција и елиминација слободних радикала у организму су физиолошки у равнотежи. Оксидативно оштећење настаје када хомеостатски процеси нису у стању да ускладе продукцију и елиминацију слободних радикала, услед чега се слободни радикали стварају у вишку и оштећују ћелије и ткива, што је познато као оксидативни стрес. У ћелији долази до оштећења ДНК и протеина, задим настаје липидна пероксидација ћелијских мембрана, повећан инфлукс Ca²⁺ у ћелију, поремећај функције митохондрија и лиза ћелије (183). Међутим, у физиолошким условима слободни радикали често имају низ

значајних улога у регулацији различитих физиолошки процеса. Тако је, на пример, још 1990. године откривено да водоник пероксид има улогу регулацији сигналних путева цитокина, инсулина, фактора раста, активатора протеина-1 (AP-1) и нуклеарног фактора-κB (NF-κB) (184).

У еволуцији слободних радикала се описују три фазе: фаза иницијације, фаза пропагације и фаза терминације.

- У **фази иницијације** нерадикали примају или губе један електрон, услед чега им се знатно мењају физичке и хемијске особине и постају изузетно реактивни;
- У **фази пропагације** настали слободни радикал реагује са околним молекулима (циљни молекул), и одузима један електрон, при чему сам постиже стабилно стање, али индукује превођење циљног молекула у слободни радикал. Настали слободни радикали делују даље и у кратком временском периоду се број слободних радикала вишеструко повећава;
- У **фази терминације** настаје неутрализација слободних радикала и спречавање њихове даље пропагације. Неутрализација слободних радикала настаје деловањем неензимских и ензимских оксиданаса.

У физиолошким условима слободни радикали су укључени у антимикуробну активност фагоцитних ћелија, сигналну трансдукцију и регулацију ћелијског циклуса, а такође су потребни и за активност појединих ензима.

Беза између оксидативног стреса и имунских функција организма су добро познате, при чему имунски одбрамбени систем користи могућности леталног деловања слободних радикала на микроорганизме. Фагоцитне ћелије (макрофаги, неутрофили и еозинофили), као и Т и В лимфоцити садрже ензим, никотинамид аденин динуклеотид фосфат (NADPH) оксидазу која омогућава синтезу ROS као одговор на стимулацију имунског система (185, 186). У имунском одговору фагоцити повећавају садржај кисеоника 10 до 20 пута, што представља такозвани респираторни прасак (енгл. *respiratory burst*). Дејством NADPH оксидазе настаје O_2^- који је почетни супстрат за настајање више реактивних врста, као што су водоник пероксид (H_2O_2), хипохлорна киселина (HOCl), пероксинитрит ($ONOO^-$), и, вероватно, хидроксил радикал (OH \cdot) и озон (O_3) (183).

Средином деведесетих година прошлог века је откривено да активност NADPH оксидазе делује на сигналне путеве који су укључени у регулацију ћелијске пролиферације

оксидацијом цистеинских остатака протеина, чиме се мења њихова активност (187). У хипоксичним условима у митохондријама се у већој мери ослобађа ROS који узрокује стабилизацију индуцибилних фактора хипоксије (HIF) и активацију гена који омогућавају метаболичку адаптацију ћелије на ниске концентрације кисеоника (188, 189). Такође за активацију NF-κB је неопходно повећање концентрације ROS, пре свега H₂O₂, при чему се митохондрије наводе као главни извор ROS који учествује у регулацији NF-κB (190).

ROS су укључени у регулацију активности бројних ензима као што су: цитохром P450 и простагландин синтетаза (191).

1.5.2 РЕАКТИВНЕ ВРСТЕ - СЛОБОДНИ РАДИКАЛИ И НЕРАДИКАЛСКИ ОБЛИЦИ

Реактивне врсте представљају разнолику групу једињења у коју спадају слободни радикали и нерадикалски облици. Нерадикалска једињења, као што су водоник пероксид (H₂O₂) и пероксинитрит (ONOO⁻) немају неспарене електроне, али се понашају слично слободним радикалима, који представљају главну класу реактивних врста. У зависности од врсте атома који је активни центар слободног радикала слободни радикали се деле у четири категорије: реактивне кисеоничке врсте (енгл. *reactive oxygen species - ROS*), реактивне азотне врсте (енгл. *reactive nitrogen species - RNS*), реактивне угљеничне врсте (енгл. *reactive carbon species - RCS*) и реактивне сумпорне врсте (енгл. *reactive sulfur species - RSS*) (181).

Молекул кисеоника има два неспарена електрона у својој валентној орбитали, због чега и он може да прими електроне и да се редукује. Редукција кисеоника се одвија на унутрашњој мембрани митохондрија, при чему један молекул кисеоника прима четири протона и четири електрона, услед чега се наgraђују два молекула воде.

Редукција молекулског кисеоника се одвија деловањем ензимских комплекса који заједно чине респираторни ланац. Услед непотпуне редукције молекулског кисеоника настају високореактивни облици кисеоника. У Табели 1 су наведене реактивне врсте кисеоника.

Табела 1. Реактивне кисеоничке врсте - ROS

СЛОБОДНИ РАДИКАЛИ	НЕРАДИКАЛСКИ ОБЛИЦИ
$O_2^{\cdot -}$ супероксид ањон радикал	H_2O_2 водоник пероксид
HO^{\cdot} хидроксил радикал	$HOCl$ хипохлорна киселина
ROO^{\cdot} пероксил радикал	O_3 озон
RO^{\cdot} алкоксил радикал	1O_2 синглет кисеоник
HOO^{\cdot} хидропероксил радикал	

Слободни радикали могу да буду ендогеног или егзогеног порекла. Ендогено, слободни радикали настају: 1) физиолошки, у малој количини, на респираторном ланцу митохондрија током ћелијаког дисања, што је већ описано, 2) током инфламацијских процеса, исхемија/реперфузија повреда, и хроничних обољења (атеросклероза, карциноми), 3) услед металима-катализоване оксидације. Егзогено слободни радикали настају услед: 1) излагања загађењу или штетним агенсима (јонизација, UV зрачење, пушење), 2) метаболизма ксенобиотика (181).

На Табели 2 су наведене реактивне азотне врсте.

Табела 2. Реактивне азотне врсте - RNS

СЛОБОДНИ РАДИКАЛИ	НЕРАДИКАЛСКИ ОБЛИЦИ
NO^{\cdot} азот оксид радикал	NO_2^- азот диоксид ањон
NO_2^{\cdot} азот диоксид радикал	N_2O_3 азот триоксид
	N_2^+ нитронијум јон
	$ONOO^-$ пероксинитрит
	$ROONO$ алкил пероксинитрит
	NO^- нитроксил ањон
	NO^+ нитроксил катјон

Реактивне кисеоничке и азотне врсте се заједно обележавају RONS.

Слободни радикали могу да реагују са скоро свим макромолекулима (ДНК, протеини, липиди, угљени хидрати) у ћелији и узрокују оксидативно оштећење. Можда је најбоље описано и највише проучавано дејство RONS на липиде, вероватно због предложене оксидативне теорије атерогенезе. Наиме од почетка деведесетих година прошлог века се посумњало да улогу у атерогенези нема нативни LDL већ неки

модификовани облик LDL. Када је откривен оксидовани LDL закључено је да поседује знатно већи атерогени потенцијал јер се понаша као хемоатрактант за моноците, инхибира кретање ткивних макрофага, делује цитотоксично на ендотелне ћелије, инхибира вазодилатацију индуковану NO, понаша се као митоген за макрофаге и глатке мишићне ћелије (192, 193). Најбоље проучен механизам деловања слободних радикала на ћелију и ћелијаске структуре је липидна пероксидација. Потентни слободни радикали реагују са незасићеним масним киселинама одузимајући један јон водоника и један електрон. На тај начин настаје липидни радикал који реагује са молекулским кисеоником, при чему се ствара пероксил радикал (ROO^\bullet). Настали продукти липидне пероксидације, секундарни слободни радикали, реагују са ћелијским макромолекулима на исти начин као и примарни слободни радикали, при чему се омогућава ланчано ширење слободнорадикалских реакција и оксидативно оштећење ткива. Липидном пероксидацијом су најчешће захваћене ћелијске мембране, липопротеини (LDL) и једињења која садрже липиде.

Једно представља једну од најпроминентнијих ћелијских органела, па је самим тим и најизложеније деловању различитих како егзогених, тако и ендогених слободних радикала. Поред тога, и једарна ДНК и митохондријска ДНК су врло подложне оксидативном оштећењу (194). Продукција ROS и последично оштећење ДНК се налази у основи карциногенезе. Повећану продукцију ROS најчешће изазива хронична инфламација, где продужена стимулација макрофага и неутрофила узрокује стварање азот-моноксида (NO) и супероксид анјон радикала ($\text{O}_2^{\bullet-}$) у већој количини, као и осталих врста RONS (195). Активирани имунске ћелије активирају ензиме који катализују продукцију слободних радикала у различитим ткивима: NADPH оксидаза, индуцибилна азот-моноксид синтетаза (iNOS), ксантин оксидаза (XO) и мијелопероксидаза (MPO). Повећана продукција RONS активира нуклеарни транскрипциони фактор NF κ B, који стимулише циклооксигеназу 2 (COX2), липооксигеназу (LOX) и iNOS, што узрокује даље повећање продукције RONS (196). Повећана синтеза NO под дејством iNOS узрокује повећано стварање N_2O_3 , који настаје реакцијом NO и O_2 . N_2O_3 је снажно нитрозативно једињење, које изазива деаминацију ДНК база и реагује са секундарним аминима и образује N-нитрозамине који су врло канцерогени. У другој реакцији O_2 и NO настаје пероксинитрит (ONOO^-) који узрокује прекид ланца ДНК образовањем 8-нитрогуанина

(196, 197). Продукти липидне пероксидације реагују са аденином, цитозином и гуанином и имају улогу у епигенетским механизмима карциногенезе (198).

У поређењу са једарним геномом митохондријска ДНК (митДНК) садржи знатно мање интронских секвенци и недостаје јој заштитна улога хистона, услед чега је знатно осетљивија на деловање слободних радикала. Број мутација митДНК је 10 пута већи у односу на једарну ДНК на шта, поред наведених разлога, утиче и недостатак репаративних механизма ДНК, непосредна близина продукције слободних радикала и митДНК и јединствене структурне карактеристике које фаворизују настајање мутација. Такође, све наведене карактеристике утичу на екстензивнија оштећења митДНК и њихово пролонгирано трајање. Оштећење митДНК узрокује поремећај функције митохондрија, које се доводи у везу са низом обољења у хуманој популацији као што су: конститутивна обољења митохондрија, хроничне инфламацијске и дегенеративне болести и карциноми (199).

Велики број обољења се доводи у везу са поремећајем функције појединих протеина. Слободни радикали узрокују модификацију бочних ланаца аминокиселина, формирање S-S мостова и карбонилних група, фрагментацију и агрегацију протеина, губитак каталитичке функције и промене у секундарној и терцијарној структури протеина (181, 200). Метионин и цистеин, као две аминокиселине које садрже сумпор, су врло осетљиве на деловање слободних радикала. Деловање слободних радикала на цистеин узрокује настајање интра- или интерпротеинских дисулфидних мостова или формирање дисулфидних производа са глутатионом. Под дејством ROS метионин се преводи у метионин-сулфоксид, који је поред дисулфидних облика цистеина, једини реверзибилни облик настао деловањем ROS (181). Од ароматичних и хетероцикличних аминокиселина, хистидин и триптофан су посебно осетљиви на деловање слободних радикала. Деловањем RNS, као што су ONOO^- и NO_2^\bullet , на тирозин настаје нитротирозин, односно додавање нитро групе тирозину. Мерење нитротирозина се користи као индикатор оксидативног стреса, при чему се одређивање овог једињења масеном спектрофотометријом удруженом са HPLC сматра златним стандардом (201, 202). Алифатичне аминокиселине су најмање осетљиве на деловање слободних радикала.

Слободни радикали могу да делују и на угљене хидрате. Хидроксил радикал (HO^\bullet) као најреактивнији облик ROS може да одузме један атом водоника молекулу угљеног

хидрата при чему настаје слободни радикал чији је центар угљеник. RONS у ћелији могу да имају знатан утицај на прекидање веза у полисахаридима, као и да модификују моносахаридне јединице, при чему настали облик полисахарида може да има битно измењене функције (203).

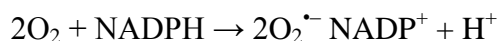
1.5.3 КАРАКТЕРИСТИКЕ ПОЈЕДИНИХ РЕАКТИВНИХ ВРСТА

Као што је већ претходно наведено, молекул кисеоника (O_2) поседује два неспарена електрона у последњој, валентној орбитали, па према томе може да прима електроне и при томе се редукује. Четири мембранска комплекса, смештена на унутрашњој страни митохондрија, образују респираторни ланац који поступно преноси електроне преко низа донора и реципијената, при чему је финални акцептор кисеоник. Уједно је електронски транспортни ланац (оксидативна фосфорилација) и главни ендогени извор ROS, пре свега супероксид анјон радикала ($O_2^{\bullet-}$), водоник пероксида (H_2O_2), као његовог дизмутованог продукта, и хидроксил радикала (HO^{\bullet}) (204).

1.5.3.1 Супероксид анјон радикал

Комплекс I и комплекс III респираторног ланца митохондрија поседују навећи потенцијал за продукцију супероксид анјон радикала ($O_2^{\bullet-}$), при чему комплекс I $O_2^{\bullet-}$ продукује у матриксу митохондрија, а комплекс III и у матриксу и интермембранском простору (205). $O_2^{\bullet-}$ реакцијом дисмутације, спонтано или катализовано ензимом супероксид дисмутазом, прелази у водоник пероксид (H_2O_2). *In vitro* 0,15–2% од укупне потрошње кисеоника у митохондријама се трансформише у $O_2^{\bullet-}$ (206). У физиолошким условима $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 имају улогу у регулацији васкуларног система при деловању стимулуса као што је сила смицања (*shear-stress*) (207).

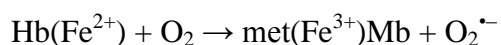
Поред респираторне оксидације у митохондријама велику количину $O_2^{\bullet-}$ продукују активирани имунске ћелије (пре свега фагоцити) током инфламацијских процеса. Продукција $O_2^{\bullet-}$, а потом и H_2O_2 и хипохлорне киселине ($HOCl$) у фагозомима је од есенцијалног значаја у процесу деструкције патогена. Мултикомпонентни ензимски системи – NADPH оксидазе приликом транспорта електрона преко биолошких мембрана продукују $O_2^{\bullet-}$, који даљим реакцијама даје друге врсте ROS:



Ова ензимска група се састоји од седам ензима: Nox1, Nox2, Nox3, Nox4 и Nox5 (NADPH оксидазе) и Duox1 и Duox2 (дуалне оксидазе). Све врсте су међусобно сличне по структури и свака од врста је специфична за поједина ткива, мада оваква дистрибуција није стриктна. За активацију NADPH оксидаза неопходно је присуство и других компоненти као што су: p22^{phox}, Noxo2/p47^{phox} и Noxa2/p67^{phox} (208, 209). Поред одбрамбене улоге, ова група ензима има значајну улогу у регулацији експресије гена, ћелијској диференцијацији и пролиферацији, посттранслационој обради протеина и сигналној трансдукцији (210, 211).

Поред NADPH оксидаза и други ензими који имају оксидазну активност, током својих каталитичких процеса стварају O₂^{•-}. Ензим ксантин оксидаза учествује у метаболизму пуринских база тако што катализује оксидацију хипоксантина у ксантин, а потом ксантина у мокраћну киселину. У условима ткивне хипоксије, која постоји у случају исхемијског можданог удара, рН вредност средине се знатно смањује па ксантин оксидаза продукује знатне количине O₂^{•-} (209, 212). Такође, метаболичким деловањем других оксидаза, као што су спермин оксидаза, N1-ацетилполиамин оксидаза, микрозомална моноаминооксидаза и моноамин оксидаза продукују се O₂^{•-} и H₂O₂ (213, 214, 215).

Гвожђе је есенцијални елемент који има могућност да прихвата и отпушта електроне, при чему прелази из Fe³⁺ у Fe²⁺, и обратно (216). Оксидацијом хемоглобина и миоглобина, протеина који садрже гвожђе такође настаје O₂^{•-} (217).



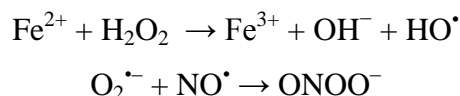
Зрачење узрокује поремећај функције митохондрија што за последицу има значајно повећање концентрације више ROS. Под таквим условима O₂ се само делимично редукује услед чега настају велике количине O₂^{•-}, као и H₂O₂ (218, 219).

Супероксид анјон радикал (O₂^{•-}) је релативно нетоксичан, међутим различитим реакцијама може да пређе у друге, потенцијално знатно токсичније реактивне врсте. Међусобном реакцијом два молекула O₂^{•-} један молекул се редукује, а други се оксидује, при чему настаје водоник пероксид и молекул кисеоника:



У киселој средини, наведена реакција је спонтана, а при рН вредностима које су заступљене у физиолошким системима (неутралне рН вредности) ову реакцију катализује ензим супероксид дисмутаза (220).

$O_2^{\bullet -}$ може да реагује са NO^{\bullet} , при чему настаје пероксинитрит $ONOO^-$ (221), а у Фентоновој реакцији, уз присуство прелазних метала (најчешће гвожђа), $O_2^{\bullet -}$ реагује са H_2O_2 , при чему настају два хидроксил радикала (HO^{\bullet}) (222):

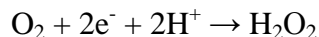


1.5.3.2 Водоник пероксид

Водоник пероксид (H_2O_2) је један од најстабилнијих облика реактивних врста кисеоника (ROS). H_2O_2 највећим делом настаје реакцијом дисмутације $O_2^{\bullet -}$ (209):

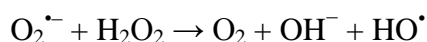


Такође, може да настане и непотпуном редукцијом молекулског кисеоника са два електрона и два протона:



Највећи део продукованог $O_2^{\bullet -}$ се конвертује у H_2O_2 дејством ензима супероксид дисмутаза 2 (SOD2 - MnSOD) у матриксу митохондрија, као и деловањем SOD1 (Cu/ZnSOD) у интермембранском простору митохондрија (209). Поред митохондрија, H_2O_2 се продукује и у пероксизомима, ендоплазматском ретикулуму и микрозомима.

Механизам којим H_2O_2 испољава токсичност се заснива на реакцији H_2O_2 и $O_2^{\bullet -}$ при чему настају врло реактивни и токсични хидроксил радикали, такозвана Хабер-Вејсова реакција (*Haber-Weiss*) (223):



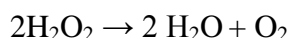
Сматра се да је у биолошким системима Хабер-Вејсова реакција катализована јонима прелазних метала (Fe^{2+}) – Фентонова реакција (222):



Репине и сарадници су пружили доказ за овакав предлог токсичног деловања H_2O_2 у биолошким системима испитујући културе *Staphylococcus aureus* у условима повећаног садржаја гвожђа и H_2O_2 (224, 225).

Међутим, H_2O_2 у физиолошким условима има есенцијалну улогу у процесима као што су зарастање рана, анти-микробна заштита, регулација пролиферације матичних ћелија и адаптивни процеси астроцита у циљу заштите неурона (226, 227). За разлику од $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 лако пролази кроз биолошке мембране, пре свега из митохондрија у цитоплазму и екстрацелуларни простор, тако да може да има улогу редокс гласника (228). Почев од седамдесетих година прошлог века откривене су поједине улоге H_2O_2 као сигналног молекула. Наиме, откривено је да H_2O_2 у микроларним концентрацијама индукује релаксацију пулмоналних артерија активацијом гуанилил циклазе, да потенцира тирозин-фосфатазну активност током деловања инсулина и да стимулише ћелијску пролиферацију (229-231). H_2O_2 мења активност циљних протеина реверзибилном модификацијом редокс стања цистеинских остатака који се враћају у претходно стање деловањем тиоредоксинског и глутатионског система (232).

Више различитих система је укључено у контролу концентрације H_2O_2 . У самим митохондријама најзначајнији је пероксиредоксин 3, који је повезан са тиоредоксинским системом (233), а поред њега значајан је и ензим митохондријска глутатион пероксидаза 1. У цитоплазми постоје слични ензими, као и ензим каталаза, који се примарно налази у пероксизомима, који катализује разградњу H_2O_2 до кисеоника и воде (209):

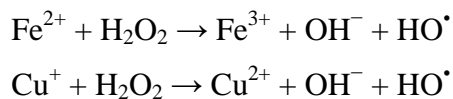


На основу наведених чињеница се закључује да је улога H_2O_2 у организму одређена његовом концентрацијом, коју прецизно контролишу ензими локализовани на различитим местима у ћелији.

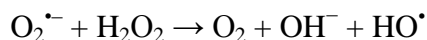
1.5.3.3 Хидроксил радикал

Хидроксил радикал (HO^{\cdot}) је најреактивнија, а самим тим и најтоксичнија, реактивна врста кисеоника. HO^{\cdot} настаје непотпуном редукцијом молекула кисеоника са три протона и три електрона. У биолошким системима највећи део HO^{\cdot} , преко Фентонове реакције, настаје

из водоник пероксида (H_2O_2) у присуству Fe^{2+} (или јона неког другог прелазног метала, Cu^+) (222):



У другој, Хабер-Вејсовој реакцији, се из водоник пероксида и супероксид анион радикала, уз присуство јона гвожђа, награђује HO^\bullet (223):



За разлику од осталих ROS, HO^\bullet реагује са било којим молекулом из непосредног окружења, протеинима, нуклеинским киселинама, липидима, полисахаридима, и представљају главни извор оксидативног оштећења у митохондријама, али и у самој ћелији. Због тога се прекомерна продукција HO^\bullet доводи у везу са низом обољења. Деловањем HO^\bullet на фибриноген настаје нерастворљиви полимер сличан фибрину који је изузетно отпоран на протеолизу. Сматра се да овај полимер има улогу у развоју више дегенеративних обољења као што су: атеросклероза, карциноми, дијабетес и неуролошки поремећаји (234-237). HO^\bullet лако ступа у реакцију са полинезасићеним масним киселинама и на тај начин започиње каскаду реакција липидне пероксидације. У условима исхемије у повећаним концентрацијама се продукује азот-моноксид, који у реакцији са $\text{O}_2^{\bullet -}$ даје пероксинитрит, чији разградни продукти, HO^\bullet и азот диоксид (NO_2^\bullet) реагују са липидима. Наведена чињеница је од посебног значаја када је у питању нервно ткиво, имајући у виду структурну заступљеност полинезасићених масних киселина (238).

Због велике реактивности, равнотежно стање концентрације HO^\bullet је практично нула (239). Међусобном реакцијом два молекула HO^\bullet настаје молекул H_2O_2 , чиме се значајно умањује штетно дејство HO^\bullet (240):

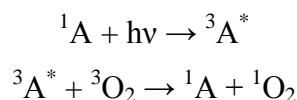


1.5.3.4 Синглет кисеоник

Синглет кисеоник ($^1\text{O}_2$) је, као и водоник пероксид (H_2O_2), нерадикалски облик ROS, али је потентан оксидујући агенс. Молекулски кисеоник, такође, може да се сматра слободним радикалом јер има два неспарена електрона у валентној орбитали. Променом спина једног од електрона молекулски кисеоник прелази у знатно реактивнији облик синглет

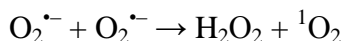
кисеоника. Наиме, електрони у последњој орбитали валентног кисеоника су истог спина, када један електрон промени спин настаје један од два облика синглет кисеоника ($^1\text{O}_2$): делта синглет кисеоник ($^1\Delta\text{gO}_2$) и сигма синглет кисеоник ($^1\Sigma\text{g}^+\text{O}_2$). У биолошким системима $^1\Sigma\text{g}^+$ врло брзо прелази $^1\Delta\text{g}$, тако да је практично само овај облик и присутан (241). $^1\text{O}_2$ има знатно дужи полуживот у односу на HO^\bullet (242).

Синглет кисеоник настаје у различитим реакцијама. У такозваном типу 2 фотосензитивних реакција – деловањем фотона на фотосензитивна једињења она прелази у нестабилно, побуђено стање. Како би прешла у стабилно стање, предају вишак енергије околини, при чему ако ту енергију прими, молекулски кисеоник настаје $^1\text{O}_2$ (243, 244):



Код биљака ова реакција се одвија током процеса фотосинтезе, где хлорофил прима фотоне и прелази у побуђено стање (фотосензитивно једињење је хлорофил), док се код животиња ова реакција среће у кожи и у оку (фотосензитивна једињења су меланин и ретинол) (244, 245).

Реакцијом два $\text{O}_2^{\bullet-}$ настају H_2O_2 и $^1\text{O}_2$:

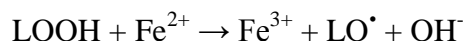


Синглет кисеоник ($^1\text{O}_2$) може директно да оксидује протеине, ДНК и липиде. У терапији појединих карцинома се користе једињења – фотосензитизери који када се изложе дневном светлу индукују трансфер електрона и продукцију $^1\text{O}_2$, што представља основу фотодинамске терапије (246). Најчешће се као фотосензитизери користе деривати порфирина који се инкорпорирају у туморско ткиво, а потом излагањем тумора светлу одређене таласне дужине идукује се оштећење тумора (246, 247). Реакција $^1\text{O}_2$ са липидима је од посебног значаја у процесу липидне пероксидације. $^1\text{O}_2$ у реакцији са биомолекулима даје секундарне радикале, који у реакцији са молекулским кисеоником прелази у одговарајуће пероксил- (ROO^\bullet) и алкоксил-радикале (RO^\bullet) (248).

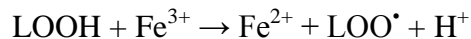
1.5.3.5 Липидна пероксидација

Слободни радикали реагују са масним киселинама и индукују оштећење процесом липидне пероксидације. У процесу липидне пероксидације липиди се оксидују и започиње процес њихове деградације. Полинезасићене масне киселине (енгл. *polyunsaturated fatty*

acids - PUFA) су најосетљивије на процес липидне пероксидације, чији су основни укупни ефекти смањење флуидности ћелијске мембране, што узрокује повећано „цурење“ јона (K^+ и Ca^{2+}), чији је проток иначе регулисан деловањем специфичних канала, и оштећење мембранских протеина, што за последицу има поремећај функције ензима, рецептора и јонских канала (241, 249). Јони гвожђа и бабра убрзавају процес липидне пероксидације на два начина (249): конвертовањем H_2O_2 у HO^\bullet , кидањем O-O везе, што представља Фентонову реакцију када је катализатор двовалентни јон гвожђа, при чему настају алкоксил радикали:



као и настајање пероксил радикала у присуству тровалентног јона гвожђа:



На овај начин се стварају секундарни радикали чиме се процес липидне пероксидације пролонгира.

Већина истраживача сматра да процес липидне пероксидације отпочиње деловањем $^1\Delta gO_2$ на PUFA мембранских липида, при чему се $^1\Delta gO_2$ и ствара током процеса липидне пероксидације, шта за последицу има ширење самог процеса (249). Такође, и $O_2^{\bullet -}$ узрокује пероксидацију масних киселина мембранских липида. Fridovich и Porter су изазвали оксидацију арахидонске киселине применом мешавине ензима ксантин оксидазе и етанала, као одговарајућег супстрата (250).

Изопростани су једна од врста продуката липидне пероксидације и представљају цикличне пероксиде који настају од PUFA које садрже три двоугубе везе (линолеинска, арахидонска, еикозапентаноична и докозахексаноична киселина). Повећана продукција изопростана је регистрована у низу обољења, као и након излагања различитим токсинима (241).

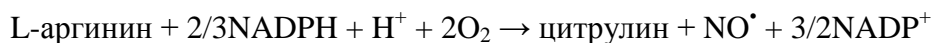
Разлагање липидних пероксида се убрзава у присуству јона гвожђа и бабра, као и загревањем, при чему настаје комплексна мешавина токсичних продуката као што су: епоксиди, zasiћени и незасићени алдехиди, кетони и хидрокарбони (на пример етан и пентан) (251, 241). Посебно токсични алдехиди су малондиалдехид (настаје пероксидацијом линолеинске, арахидонске и докозахексаноичне киселине) и 4-

хидроксиноненал (настаје пероксидацијом линолеинске и арахидонске киселине). Оба наведена продукта липидне пероксидације лако реагују са мембранским протеинима, оштећују рецепторе и ензиме, а такође реагују и са ДНК при чему имају мутагено дејство (251, 241).

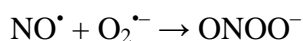
Мозак је орган који је посебно подложен настајању липидне пероксидације и оксидативном оштећењу због: велике количине кисеоника коју троши (20% потрошње у односу на цео организам), присуства јона гвожђа, слабо развијених антиоксидативних заштитних механизма и велике количине полинезасићених масних киселина, које улазе у састав можданог ткива, пре свега арахидонске и докозахексаноичне киселине (252, 253).

1.5.3.6 Азот-моноксид

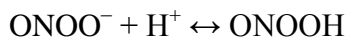
Као што је већ речено у претходном тексту, азот-моноксид (NO^\bullet) настаје деловањем ензима азот-моноксид синтазе (NOS) који L-аргинин преводи у цитрулин при чему се ослобађа NO^\bullet (11, 254):



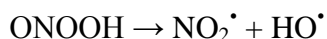
Постоје три облика NOS, две конститутивне, Ca^{2+} зависне - ендотелна (eNOS) и неуронална (nNOS) азот-моноксид синтаза, и индуцибилна, Ca^{2+} независна (iNOS) азот-моноксид синтаза. eNOS и nNOS продукују NO^\bullet у малим количинама, у којима NO^\bullet испољава значајне физиолошке улоге (14-19). У условима када се активира iNOS, као што је исхемија или инфламација, повећава се продукција NO^\bullet који има дужи полуживот. Улога NO^\bullet у организму је у директној сразмери са његовом концентрацијом. У мањим, физиолошким концентрацијама, NO^\bullet има улогу као сигнални молекул у регулацији васкуларног тонуса, агрегацији тромбоцита, реактивности макрофага, а такође испољава и антиоксидативна својства, односно штити ћелију од оксидативног оштећења (254, 255). iNOS активирају инфламаторни цитокини као што су IFN- γ , TNF- α или IL-1, мада је најбољи индуктор активности iNOS липополисахарид или ендотоксин грам негативних бактерија (256-258). У сличним условима се продукују и велике количине $\text{O}_2^{\bullet-}$, који у реакцији са NO^\bullet , даје пероксинитрит (ONOO^-), који је један од најреактивнијих слободних радикала:



Формирање ONOO^- је главни индиректни механизам којим NO^\bullet изазива цитотоксичност, јер ONOO^- индукује оштећење ДНК, оксидацију LDL, настајање изопростана, нитрацију тирозинских аминокиселинских остатака у протеинима, инхибицију акотиназе и ћелијске респирације у митохондријама (241, 259). ONOO^- врло лако реагује са јоном водоника, односно врло лако се протонује:



тако да у биолошким системима постоји и јонизована и протонована форма (260). При рН вредности од 7,4 већина пероксинитрита (~80%) ће бити у јонизованом облику, док при рН 6,4 већина пероксинитрита (~80%) је у протонованом облику (261). О-О веза протонованог пероксинитрита је изузетно лабилна и лако се раскида, тако да се пероксинитрит разлаже дајући два високореактивна слободна радикала, хидроксил радикал (HO^\bullet) и азот диоксид (NO_2^\bullet) (260, 261, 262):



Сматра се да је један од заштитних механизма који купирају деловање пероксинитрита мокраћна киселина, завршни продукт разградње пурина код виших примата и људи. Наиме, мокраћна киселина није директни „скевенџер“ пероксинитрита, већ реагује са слободним радикалима који настају из реакције пероксинитрита са угљен-диоксидом (263):



Реакцијом пероксинитрита са CO_2 , настаје нитрозопероксикарбоксилат, који се брзо разлаже на NO_2^\bullet и карбонатни радикал ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) (264).

Хемоглобин и миоглобин могу у значајној мери да везују NO^\bullet (265), а добри „скевенџери“ су и глутатион, витамин С и флавоноиди.

1.5.4 АНТИОКСИДАТИВНА ЗАШТИТА

Како улога слободних радикала у организму зависи од њихове концентрације, ћелије су развиле прецизне механизме којима у физиолошким условима одржавају концентрације слободних радикала у адекватном опсегу који је потребан за одговарајуће сигналне путеве. У спречавању настајања оксидативног оштећења укључено је више компоненти антиоксидативног заштитног система, од којих се неке налазе унутар ћелије, док су друге смештене екстрацелуларно. Оксидативно оштећење или оксидативни стрес настаје када се поремети равнотежа у продукцији и елиминацији слободних радикала, при чему постоји вишак слободних радикала. Антиоксидативна заштита обухвата ензимске и неензимске компоненте. Код здравих особа и једна и друга компонента има подједнако значајну улогу у „хватању“ и неутрализацији слободних радикала. У табели 3 су наведене и ензимске и неензимске компоненте антиоксидативне заштите.

Табела 3. Компоненте антиоксидативне заштите

АНТИОКСИДАТИВНИ ЕНЗИМИ	
Ензим	Локализација у ћелији
Супероксид дисмутаза	Митохондрије
Каталаза	Пероксизоми
Глутатион пероксидаза	Митохондрије/цитоплазма
Азот-моноксид синтетаза	Везана за мембране
НЕЕНЗИМСКИ АНТИОКСИДАНСИ	
Једињење	Порекло
Липосолубилни антиоксиданси	
α-токоферол (витамин Е)	Уноси се исхраном
β-каротен (провитамин А)	Уноси се исхраном
Ретинол (витамин А)	Уноси се исхраном
Мелатонин	Синтетише се у организму (епифиза, ретина, танко црево, костна срж, тромбоцити, лимфоцити, бубрези, панкреас)
Липоична киселина	Уноси се исхраном
Коензим Q	Синтетише се у организму (неопходан је за трансфер електрона са комплекса I и II на комплекс III респираторног ланца)
Хидросолубилни антиоксиданси	
Глутатион	Синтетише се у организму
Аскорбинска киселина (витамин C)	Уноси се исхраном
Мокраћна киселина	Синтетише се у организму (завршни продукт разградње пурина код виших примата и човека)

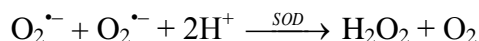
Билирубин	Синтетише се у организму (настаје током разградње хема)
Албумин	Синтетише се у организму (јетра)
Церулоплазмин	Синтетише се у организму (јетра)
Трансферин	Синтетише се у организму (јетра)
Феритин	Синтетише се у организму (јетра)

1.5.4.1 ЕНЗИМИ УКЉУЧЕНИ У АНТИОКСИДАТИВНУ ЗАШТИТУ

У антиоксидативне ензиме спадају: супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион пероксидаза (GPx) и глутатион редуктаза (GR) (266).

1.5.4.1.1 Супероксид дисмутаза

Ензим супероксид дисмутаза (SOD) је металопротеин који катализује конверзију супероксид анјон радикала ($O_2^{\bullet-}$) у водоник пероксид:



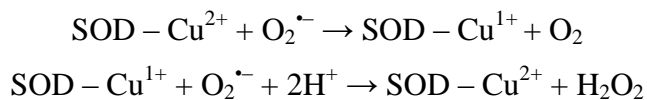
Наведена реакција се дешава и спонтано, међутим када је катализује SOD одвија се 10.000 пута брже (267). Fridovich је доказао да је ензим SOD неопходан за живот свих ћелија које користе кисеоник (268). Постоје три облика SOD:

- Cu,Zn-SOD, за чију је активност неопходно присуство бакра и цинка, и који се налази у цитоплазми ћелија;
- Mn-SOD или митохондријска SOD, чији активни центар садржи манган, и који се налази у митохондријама;
- EC-SOD или екстрацелуларна SOD;

Наведени изоензими SOD се обележавају још и као SOD1, SOD2 и SOD3 (269). Постоји још и Fe-SOD, која се налази прокариотским организмима, као и у хлоропластима одређених фамилија биљака (269, 270). Ген који кодира Cu,Zn-SOD се налази на хромозому 4p15.1–15.3, ген за Mn-SOD је смештен на хромозому 6q25, док се ген за EC-SOD налази на хромозому 21q22.11 (271). За каталитичку активност Cu,Zn-SOD су неопходни Cu^{2+} и Zn^{2+} , као и за рактивност EC-SOD, мада се ова два изоензима знатно разликују по аминокиселинском саставу, а EC-SOD садржи дисулфидни мост унутар субјединица који је неопходан за каталитичку активност ензима (272, 273).

Митохондрије, као органеле које у највећем степену учествују у метаболизму кисеоника, су главни извор продукције ROS у ћелији, пре свега $O_2^{\cdot-}$. Mn-SOD је најзначајнији ензим који учествује у разлагању ROS, обзиром на његову локализацију у митохондријама. Промена функције или експресије Mn-SOD има немерљив значај у физиолошком функционисању митохондрија, као и самих ћелија, имајући у виду могућност оксидативног оштећења и развоја различитих обољења (274). Значај Mn-SOD за живот је доказан испитивањем *knockout* мишева за ген који кодира Mn-SOD. Овакви мишеви су умирали непосредно након рођења (275). Mn-SOD има значајну улогу и у развоју карцинома, јер је у раним фазама развоја карцинома регистрована висока концентрација ROS и смањена активност антиоксидативних ензима, што узрокује оштећење ДНК и поремећај функционисања ћелије. Због тога се Mn-SOD сматра за посебан протеин који има улогу у супресији тумора. Супресивна активност Mn-SOD у развоју тумора је доказана испитивањем великог броја ћелијских линија са малигним фенотипом (276). Новосинтетисани полипептид за Mn-SOD се транспортује кроз мембране митохондрија у матрикс, где се ензим преводи у активан облик. Овај транспорт је условљен постојањем сигналне секвенце на N-терминалном крају. Нуклеотидни полиморфизам (замена цитозина за тимин) узрокује супституцију аланина валином (GCT кодира аланин, а GTT кодира валин). Особе које имају варијацију ензима Mn-SOD са аланином имају 30-40% већу активност ензима, и услед тога мањи ризик за оболевање од карцинома, пре свега панкреаса и макроцелуларног карцинома плућа (277-279). Мада се и код особа које су хомозиготи за Mn-SOD која садржи аланин чешће јављају одређене болести и одређене врсте карцинома (карцином простате, јајника и дојке) (280, 281). Такође, особе које су хомозиготи за Mn-SOD која садржи валин имају већи ризик од настајања коронарне болести и акутног инфаркта миокарда (282). Повећање ROS и оксидативни стрес узрокују посттранслационе модификације SOD, као што су нитрација, фосфорилација, глутатионилација и гликозилација, што води смањењу ензимске активности SOD (283).

Cu,Zn-SOD је прва SOD која је изолована, прво је названа еритрокупреин, и налази се у цитоплазми, једру, микрозомима и интермембранском простору митохондрија (284). У активности Cu,Zn-SOD, Cu^{2+} учествује у процесима оксидације и редукције, док Zn^{2+} омогућава одржавање стабилности ензима (285):



На значајну улогу коју има Cu,Zn-SOD у организму је указало откриће мутација гена за Cu,Zn-SOD код оболелих од амиотрофичке латералне склерозе, смртоносног неуродегенеративног обољења које захвата моторне неуроне мозга, можданог стабла и кичмене мождине (286). Испитивањем *knockout* мишева за ген који кодира Cu,Zn-SOD утврђено је да такве животиње имају већу учесталост поремећаја као што су: женски инфертилитет, дегенерација макуле и повећана смртност услед тумора јетре (286, 287). Cu,Zn-SOD је по структури хомодимер, чија молекулска маса износи приближно 32 kDa, и прилично је заступљен протеин у ћелији чинећи око 1% укупног протеинског садржаја ћелије. Свака субјединица садржи две функционалне петље: електростатичка петља, која садржи редокс активно место где се налази Cu^{2+} , и петља која садржи Zn^{2+} (288). Посебна карактеристика Cu,Zn-SOD је постојање дисулфидног моста између цистеинских резидуа (Cys57 и Cys146) што је необично за протеине који се налазе у редукованој средини као што је цитоплазма.

EC-SOD је последњи изоензим SOD који је откривен у плазми, лимфи и синовијалној течности. EC-SOD је по структури хидрофобни гликопротеин, који постоји као хомотетрамер приближне молекулске масе око 135 kDa (289). Након уклањања сигналног пептида, EC-SOD садржи три домена, аминокиселински домен који садржи гликозилирајућа места, домен који садржи активно место ензима и који је у великој мери сличан Cu,Zn-SOD, и кратки карбокси-терминални домен (290). Јединствена карактеристика EC-SOD је њен висок афинитет за хепарин. EC-SOD је у екстрацелуларном простору углавном везан за хијалуронску киселину и спречава деградацију овог гликозаминогликана индуковану оксидативним оштећењем (291). Постоји генска варијација EC-SOD (супституција аргинина глицином на положају 213), што узрокује смањење афинитета за колаген и хепарин услед чега се региструју повећане концентрације овог ензима у плазми, али се активност ензима не мења (292). Успостављање дисулфидних веза унутар молекула EC-SOD условљава његову ензимску активност (273). На значај EC-SOD су указале клиничке студије у којима је регистровано

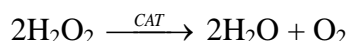
смањење активности EC-SOD током старења, код оболелих од хипертензије, васоспастичке ангине, анеуризме торакалне аорте и аортне стенозе (293, 294).

На дејство супероксид дисмутазе се наставља дејство каталазе и глутатион пероксидазе и глутатион редуктазе, који разграђују H_2O_2 до нетоксичних метаболита.

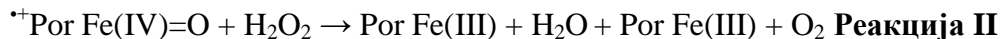
1.5.4.1.2 Каталаза

Водоник пероксид (H_2O_2) је једна од најчешћих реактивних врста кисеоника, премда сам по себи није слободан радикал. Како је ефикасна разградња H_2O_2 неопходна за аеробни живот, сви организми који користе кисеоник су развили системе за разградњу H_2O_2 (295). Хидропероксидазе, каталазе и пероксидазе, су заступљени код огромне већине живих организама, од бактерија до најкомплекснијих еукариотских ћелија, који раскидају пероксидну везу, пре свега у водоник пероксиду ($\text{H}-\text{O}-\text{O}-\text{H}$), али и у малим органским пероксидима ($\text{R}-\text{O}-\text{O}-\text{H}$). Класификовани су у неколико група: типичне, монофункционалне каталазе, бифункционалне каталазе-пероксидазе, и каталазе које садрже манган. Прве две групе садрже хем и заступљене су и код прокариотских и код еукариотских организама, док каталазе које садрже манган уместо хема постоје само код бактерија (296).

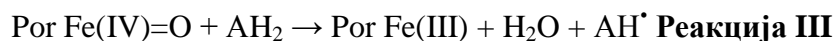
Каталитичка реакција подразумева разградњу два молекула H_2O_2 при чему настају два молекула воде и молекула кисеоника:



Наведена реакција се одвија у два корака, при чему се два молекула H_2O_2 везују за активно место ензима, односно хем (296):



Каталазе испољавају и пероксидазну активност, при чему се донори електрона (AH_2) оксидују и настају радикали (AH^\bullet). Овакав пероксидазни циклус се одвија кроз три корака, и доста је спор (296):

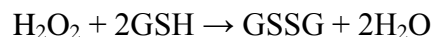


Све типичне каталазе су хомотетрамерни протеини и свака субјединица садржи протопорфирин IX у коме се налази Fe(III). Испитивањем структуре каталазе код различитих врста откривено је да је архитектура активног места ензима остала готово неизмењена током еволуције, међутим постоје знатне разлике у осталим деловима молекула (296).

Каталаза се налази у пероксизомима и недостатак овог ензима се доводи у везу са развојем дијабетеса типа 2 (297, 298). Ген за каталазу се налази на хромозому 11p13. У стањима повећане продукције ROS цистеин у молекулу каталазе прелази у цистеинску киселину, што узрокује нитрацију тирозила и смањење каталитичке активности ензима (299).

1.5.4.1.3 Глутатион пероксидаза

Глутатион пероксидаза (GPx) је ензим који садржи селеноцистеински остатак као активно место и катализује редукцију H₂O₂ и липидних хидропероксида до воде и липидних алкохола у реакцији у којој се као редуктивни косупстрат користи глутатион (GSH) (300):



Као производ реакције настаје оксидовани глутатион (GSSG) који се састоји из два молекула GSH повезаних дисулфидним мостом, и враћа се у редуковано стање деловањем ензима глутатион редуктазе.

GPx може да редукује и пероксинитрит (ONOO⁻) (301). Постоји пет познатих изоформи GPx: класична форма ензима која се налази у ћелијама се углавном обележава ка GPx-1; GPx-2 је изоформа која се налази у ћелијама које облажу гастроинтестинални систем и сматра се да ова изоформа GPx има улогу у метаболисању пероксида у липидима унетих храном; GPx-3 је изоформа која се налази у плазми и телесним течностима; GPx-4 или фосфолипидна GPx која катализује редуковање липидних хидропероксида до липидних алкохола; и snGPx која се налази у семеној течности (241, 272). У свим облицима GPx селен је неопходан за каталитичку активност ензима.

GPx-1 је ензим који се налази у готово свим ћелијама организма и чији недостатак се доводи у везу са ендотелном дисфункцијом, срчаном слабошћу и патолошким структурним променама крвних судова и миокарда (302). Један од начина на који

хиперхомоцистеинемија узрокује оксидативни стрес у крвним судовима и атеросклерозу је смањење експресије гена за GPx-1, који се налази на хромозому 3p21.3 (271).

Поред великог броја фактора који одређују ризик од настајања атеросклеротских промена у крвним судовима, сматра се да GPx-3 има значајну улогу у редуквању оксидативног стреса. Наиме, смањење GPx-3 се доводи у везу са смањењем биорасположивости азот-моноксида (NO) и настајањем цереброваскуларне артеријске тромбозе услед активације тромбоцита (303, 304).

Експресија GPx-4 смањује количину оксидованих фосфолипида и холестеролских хидропероксида, као и проинфламаторних пероксида који настају деловањем ензима липооксигеназе и циклооксигеназе, чиме се смањује васкуларни оксидативни стрес и настајање атеросклерозе (305).

1.5.4.2 ПОЈЕДИНЕ НЕЕНЗИМСКЕ КОМПОНЕНТЕ АНТИОКСИДАТИВНЕ ЗАШТИТЕ

1.5.4.2.1 Глутатион

Глутатион (GSH) је најзаступљенији интрацелиларни молекул са антиоксидативним дејством. По структури је трипептид - γ -глутамилцистеинилглицин, и учествује у различитим анаболичким и катаболичким реакцијама у организму (306). Услед карактеристика као што су: растворљивост у води, знатна концентрација у ћелији и нуклеофилни карактер након депротонације, GSH има кључну улогу у антиоксидативном систему ћелије. GSH има одговарајуће особине за реакције детоксификације, учествује у фази II реакција коњугације са ксенобиотицима, а такође учествује у редокс сигналним системима ћелије (307).

Синтеза глутатиона се одвија у две фазе. У првој фази се формира пептидна веза између цистеина и карбоксилне групе бочног ланца глутамата деловањем ензима γ -глутамил цистеин ситетазе (лигазе). Ова веза штити GSH од деловања ћелијских и серумских пептидаза. У наредној реакцији се додаје глицин и настаје GSH. Продукција GSH је регулисана механизмом негативне повретне спреге GSH и ензима γ -глутамил цистеин ситетазе, тако да се концентрација GSH у цитоплазми одржава на нивоу од 1 до

15 mM (307). Однос GSH/GSSG у ћелији регулише ћелијску пролиферацију, диференцијацију и апоптозу.

У ендоплазматском ретикулуму GSH је углавном у оксидованом облику (GSSG) јер служи као оксидујући еквивалент за формирање дисулфидних мостова у новосинтетисаним протеинима чиме се омогућава њихово правилно набирање (308). У једру GSH штити ДНК од оксидативног и радијационог оштећења и одржава једарне протеине и транскриптивне факторе у редукованом стању, што је предуслог за адекватну транскрипцију гена и репарацију ДНК (307). Митохондрије GSH преузимају из цитоплазме и садрже око 10-15% GSH у ћелији (309). GSH заједно са митохондријском GPx образује битан митохондријски антиоксидативни систем који штити ћелију од H₂O₂ који настаје услед цурења електрона током процеса оксидативне фосфорилације. За разлику од цитоплазме, митохондрије немају могућност синтезе GSH, тако да је неопхоно постојање и активност адекватног транспортера у митохондријским мембранама који пребације GSH из цитоплазме у митохондрије (307).

Ензими глутатион пероксидаза (GPx) и глутатион S-трансфераза смањују концентрацију редукованог глутатиона – GSH, и смањују однос GSH/GSSG, повећањем концентрације оксидованог глутатиона, односно глутатион-дисулфида - GSSG. Адекватна концентрација GSH се одржава или синтезом GSH *de novo* или деловањем ензима глутатион редуктазе.

1.5.4.2.2 Албумин

Албумин је примарни антиоксиданс плазме. Процењује се да приближно 70% ROS у серуму неутралишу албумини, што је омогућено постојањем тиолних група у молекулима албумина, као и високом концентрацијом албумина у плазми (310). Поред тога, албумини поседују могућност везивања лиганда, што доприноси њиховом антиоксидативном капацитету албумина спречавањем оксидације LDL бакром, као и спречавањем продукције O₂^{•-} реакцијом H₂O₂ са гвожђем. Концентрација албумина у плазми је у обрнутој сразмери са ризиком за настајање кардиоваскуларних обољења, а повећање серумске концентрације албумина знатно смањује ризик од настајања кардиоваскуларних обољења (311-313).

1.5.4.2.3 Билирубин

Билирубин такође има антиоксидативна својства и може да спречи оксидацију LDL у серуму. Билирубин је завршни продукт разградње хема, а његова антиоксидативна својства су омогућена редокс циклусом у коме се билирубин оксидује до биливердина деловањем липофилних ROS, а потом се враћа у билирубин деловањем биливердин редуктазе (314). Значај билирубина као антиоксиданса је доказан експериментима са мишевима којима је искључен ген за хем оксигеназу, ензим који разграђује хем. Код оваквих животиња су се развијала неуротоксична оштећења, епи-напади и трауматска оштећења мозга (315).

1.5.4.2.4 Витамин С

Витамин С или аскорбинска киселина делује у спрези са каротеноидима и токоферолима током неутрализације ROS у хидрофилном окружењу (316). Витамин С омогућава редукцију оксидованог токоферола. Неутрализацијом ROS, витамин С спречава оксидацију LDL, и на тај начин делује превентивно у развоју атеросклерозе (317). Код пацијената са исхемијским можданим ударом забележена је знатно нижа концентрација витамина С у плазми, док је концентрација проинфламаторних маркера као што су CRP, ICAM-1, MCP-1 била знатно повишена током првих 2-5 дана након постављања дијагнозе исхемијског можданог удара (318). У EPIC-Norfolk студији регистрована је обрнута сразмера између концентрације витамина С у плазми и mortalитета од инфаркта миокарда и кардиоваскуларних болести (319).

1.5.4.2.5 Каротеноиди

Каротеноиди представљају широко распрострањену групу биљних пигмента који воћу и поврћу дају жуту, наранџасту или црвену боју. Иако их има више од 600, само шест (лутеин, ликопен, зеаксантин, β -криптоксантин, β -каротен и α -каротен) чини 95% од укупне количине каротеноида у хуманој плазми и има позитиван учинак на здравље (320). Каротеноиди смањују ризик од развоја кардиоваскуларних болести, а механизам који то остварују укључује смањење оксидативног оштећења и инфламације. Постоји инверзна повезаност између концентрације каротеноида у плазми и биомаркера оксидативног стреса F₂-изопростана, као и инфламацијских маркера, CRP и ICAM-1 (321).

1.5.4.2.6 Токофероли

Токофероли су облици витамина Е, који су у хуманој плазми и LDL заступљени у четири изоформе: α -токоферол, γ -токоферол, β -токоферол и δ -токоферол. Иако је γ -токоферол најзаступљенији у исхрани, α -токоферол има највећу биорасположивост (322). У реакцији са ROS α -токоферол прелази у α -токофероксил радикал, који је релативно стабилан, па се услед тога прекида ланчана реакција липидне пероксидације. Настали α -токофероксил радикал се редукује до α -токоферола уз присуство витамина С.

II

ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

На основу свих горе наведених литературних података, као и ранијих истраживања циљ наше студије је био:

2.1 Генерални циљ

Одређивање функције тромбоцита код пацијената са АИМУ и корелација вредности ових параметара са ендотелном функцијом, која је процењивана неинвазивним биохемијским методама, у смислу секреторне активности на антитромбогене / протромбогене факторе који се синтетишу у ендотелу (*von Willebrandov* фактор – vWf).

2.2 Специфични циљеви

51. Испитати учешће различитих параметара оксидативног стреса (нитрита (NO_2^-), супероксид анјон радикала (O_2^-), липидних пероксида (TBARS) и водоник пероксида (H_2O_2)) и антиоксидационог система (супероксид дисмутаза – SOD и каталаза CAT) на опоравак болесника са АИМУ и њихову повезаност са клиничком сликом.

2. Испитати потенцијалну корелацију ендотелне дисфункције и степена оксидативног стреса у етиопатофизиологији АИМУ.

III

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1 ИСПИТАНИЦИ

3.1.2 Врста студије

Реч је о клиничкој проспективној студији у трајању од годину дана.

3.1.3 Популација која се истражује

Планирано истраживање је спроведено у Специјалној болници за цереброваскуларне болести "Свети Сава", Београд. Студијом је обухваћено 120 испитаника (оба пола, од 60 до 80 година старости) са исхемијском лезијом у сливу *a. cerebrii media-e*. У студију су укључени само пацијенти: 1. са клинички манифестним АИМУ у сливу *a. cerebrii media-e*, (подручје М1 и М2), 2. налаз неуроимицинга који показује знаке акутне исхемије у подручју *a. cerebrii media-e*, који је конзистентан са клиничком дијагнозом, 3. функционалним дефицитом базираним на NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale) скору (323): 7-25, 4. код којих се исхемијски инфаркт мозга јавља први пут, 5. код којих не постоје друге неуролошке болести, 6. са информационам пристанак за укључивање у истраживање. Из студије су искључени испитаници: 1. са знацима интракранијалног крварења или хеморагијске трансформације исхемичког можданог удара, 2. са исхемичним можданим ударом у подручју слива *a. cerebrii media-e*, који захвата мање од 2/3 територије поменуте артерије, 3. са исхемичним можданим ударом у подручју постериорне циркулације (подручје иригације вертебралне, базиларне, или постериорне церебралне артерије), 4. са епилептичким нападом на почетку болести, 5. који користе било који облик антиагрегационе терапије и/или кортикостероидне лекове, 6. са системском инфекцијом 7. са клинички нестабилним медицинским стањем на основу клиничке презентације, историје болести и обављених дијагностичких процедура, као што су акутни инфаркт миокарда, плућна емболија, тешка хронична ренална инсуфицијенција и малигна обољења, 8. код којих услед *exitus-a* у акутној фази није могуће наставити испитивање.

Истраживање је одобрио Етички одбор Специјалне болнице за цереброваскуларне болести "Свети Сава", Београд.

3.1.4 Узорковање

Испитаници би били подељени у две групе: експерименталну (болесници са АИМУ, хоспитализовани у Специјалној болници за цереброваскуларне болести "Свети Сава") и контролну групу, који би чинили испитаници исте старосне доби који у својој историји болести немају нежељени акутни цереброваскуларни догађај и који нису користили било који облик антиагрегационе терапије.

3.1.5 Варијабле које се мере у студији

Након клиничке верификације АИМУ, узорци крви за одређивање индекса агрегације тромбоцита на: АДП, колаген и аспирин, као и на активност (vWAct) и антиген (vWAg) за *von Willebrandov* фактор – vWf ће су узимани: 1. унутар 24 сата од пријема, 2. седмог дана хоспитализације, док су узорци крви за одређивање параметара оксидационог стреса (ниво индекса липидне пероксидације (TBARS), азотни моноксид (NO) у форми нитрита, супероксид анион радикала (O_2^-) и водоник пероксида (H_2O_2)), као и ензима прве линије ендogene антиоксидационе заштите у еритроцитима (супероксид дисмутазе – SOD и каталазе CAT) узимани у исто време као и узорци за рутинске биохемијске анализе у АИМУ (глукоза, уреа, креатинин, тропонин, CRP, холестерол, триглицериди): 1. на пријему у хоспитализацију, 2. унутар 24 сата након АИМУ, 3. унутар 72 сата након АИМУ и 4. седмог дана након АИМУ. Узорци крви у свим претходно поменути временским интервалима (осим првог узорка - на пријему у хоспитализацију) су узимани између 8 и 9 часова ујутру, с обзиром да је за прецизно одређивање биохемијских параметара функције тромбоцита неопходно да узорак крви буде свеж, тј. да се анализе ураде без претходног или накнадног замрзавања.

Биохемијски параметри функције тромбоцита (антиген (vWFAg) и активност (vWFAct) фон Вилебрандов-ог фактора, и индекса агрегације тромбоцита (TRAP)) су одређивани коришћењем латекс имуноесеја за квантитативно одређивање сваког од параметара у хуманој плазми. Про- и анти-оксидациони маркери су мерени спектрофотометријском методом.

Као примарна варијабла истраживања користиће се укупни скор за сваку групу, који ће одсликати дисфункцију ендотела и тромбоцита. Овај скор ће бити израчунат на основу процента промене сваког појединачног мереног параметра у односу на горњу, односно доњу нормалну вредност (Укупно 7 параметара у 3 категорије – дисфункција ендотела, дисфункција тромбоцита и оксидациони стрес). Очекује се да већи скор дисфункције буде у експерименталној у односу на контролну групу. Тестирање значајности статистичке разлике између група ће се обавити на основу коришћена Т-теста за два независна узорка. Уколико се подаци буду дистрибуирали непараметријски, користиће се *Willcoxon – Mann Whitney* тест.

3.1.6 Снага студије и величина узорка

Прорачун величине узорка је извршен на основу резултата претходно објављене студије (324). При томе је коришћен компјутерски програм *PC Sample Size* и статистички тест за примарну варијаблу, Т-теста за два независна узорка, уз $\alpha=0.05$, $\beta=0.2$ (Снага студије 80 %). На основу наведеног прорачунато је да је за експерименталну групу потребно најмање 60 пацијента, а у контролној групи 40 испитаника, што укупно чини да је студијски узорак најмање 100 испитаника.

3.2. БИОХЕМИЈСКИ ПАРАМЕТРИ КОАГУЛАЦИЈЕ

3.2.1. Одређивање антигена за фон Вилебрандов фактор (vWFAg)

За одређивање антигена за фон Вилебрандов фактор (vWFAg) је коришћен латекс имуноесеј за квантитативно одређивање vWFAg у хуманој плазми, на апарату ACL-ELITE PRO, (Instrumentation Laboratory Company, Bedford, MA 01730-2443, USA). Кит за одређивање vWFAg-а се састоји из: 1) латекс реагенса (Nr. Cat. 0020002310): 2 бочице x 3 ml суспензије поликлонских антитела зеца (на vWFAg) обложених полистиренским латекс честицама, са додатком говеђег серумског албумина и стабилизатора. 2) реакционог пуфера (Nr. Cat. 0020002320): 2 бочице x 4 ml HEPES пуфера са додатком говеђег серумског албумина и стабилизатора.

Метода се заснива на аглутинацији латекс честица у присуству vWFAg-а. Степен аглутинације је директно пропорционалан концентрацији vWFAg-а у узорку плазме и одређује се мерењем смањења количине светлости које ослобађају створени агрегати.

3.2.2. Одређивање активности фон Вилебрандов-ог фактора (vWFAct)

За одређивање активности фон Вилебрандов-ог фактор-а (vWFAct) је коришћен латекс имуноесеј за квантитативно одређивање vWFAg у хуманој плазми, на апарату ACL-ELITE PRO, (Instrumentation Laboratory Company, Bedford, MA 01730-2443, USA).

Кит за одређивање vWFAct се састоји из: 1) латекс реагенса (Nr. Cat. 0020004710): 2 бочице x 4,5 ml суспензије лиофилизованих пречишћених моноклонских антитела миша (на функционални епитоп vWF-a) обложених полистиренским латекс честицама са додатком говеђег серумског албумина и стабилизатора. 2) пуфера (Nr. Cat. 0020004720): 2 бочице x 4,5 ml Tris пуфера са додатком говеђег серумског албумина и стабилизатора.

Метода се заснива на мерењу пораста замућености која настаје као последица аглутинације латекс реагенса. Специфична моноклонска анти-vWF антитела, адсорбована за латекс реагенс реагују са vWF плазме. Степен аглутинације је директно

пропорционалан активности vWF-а у узорку плазме, и одређује се мерењем снижења количине светлости које ослобађају створени агрегати.

3.2.3. Одређивање индекса агрегације тромбоцита (TRAP)

Поступак за детерминацију индекса агрегације тромбоцита (TRAP) се састоји у следећем:

300 μ l раствора CaCl_2 (MP0530) загрејаног на 37 °C се помеша са 300 μ l пуне крви, затим следи инкубација 3 мин, након чега се дода 20 μ l TRAP тест реагенса и започиње мерење на апарату MULTIPLATE (Dynabyte Informationssysteme GmbH, Munich, Germany) у трајању од 6 минута.

Кит за одређивање TRAP-а се састоји из:

1. TRAP тест (MP0150): TRAP-6; 1 x 1 ml лиофилизата (1 mM) са 5 епрувета за разблажење
2. TRAP тест (MP0195): TRAP-6; 1 x 1 ml лиофилизата (1 mM) без 5 епрувета за разблажење
3. TRAP тест (MP0250): TRAP-6; 1 x 1 ml лиофилизата (1 mM) без 5 епрувета за разблажење

3.2.4. Биохемијске анализе

Узорци венске крви (4.5 ml) испитаницима су узети: непосредно након пријема у јединицу интензивне неге у Специјалној болници за цереброваскуларне болести "Свети Сава", Београд, затим након 24 сата, 72 сата и 7 дана. Крв је узимана у вакумске епрувете са цитратом, а основна обрада узорака се састојала се од одвајања еритроцита од плазме центрифугирањем (10 min на 5000 rpm, 4 °C). Исталожени еритроцити су ресуспендовани и три пута испрани физиолошким раствором уз центрифугирање 10 min на 5000 rpm, а затим замрзнути на -20 °C до анализе.

Анализа биохемијских параметара коагулације (vWF Ag, vWF Act, TRAP, aPTT и INR), као и редокс статуса ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , NO^{\cdot} , TBARS, SOD, CAT) урађена је у Лабораторији за хематологију специјалне болнице за цереброваскуларне болести "Свети Сава" у Београду, као и Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију на Факултету медицинских наука у Крагујевцу.

3.2.4.1. Одређивање концентрације супероксид анјон радикала ($O_2^{\cdot-}$)

Одређивање концентрације супероксид анјон радикала ($O_2^{\cdot-}$) у плазми заснива се на реакцији $O_2^{\cdot-}$ са нитро тетразолијум плавим (Nitro Blue Tetrazolium - NBT) до нитроформаза плавог (325). Мерење се врши на таласној дужини максималне апсорпције $\lambda_{\max}=550 \text{ nm}$. Есејна смеша ("*assay mixture*") садржи: 50 mM TRIS-HCl пуфера (pH = 8.6), 0.1 mM EDTA, 0.1 mg/ml желатина и 0.1 mM NBT. Пре употребе раствор се претходно гасира азотом под притиском у трајању од једног часа.

У епрувете (12 x 100) пипетира се 50 μl плазме и 950 μl есејне меше, чиме реакција отпочиње. Као слепа проба уместо плазме користи се адекватна количина дестиловане воде. На самом почетку реакције измери се екстинкција меше и нотира се као екстинкција E_1 . Сваких 60 секунди се врши мешање пластичним штапићем и нотира екстинкција након мешања до своје стабилизације, што подразумева две узастопне приближно исте екстинкције. Последња екстинкција се означава као E_2 . Исти поступак се примењује и за слепу пробу.

Концентрација ослобођеног $O_2^{\cdot-}$ добија се на основу следећих једначина:

$$\Delta E_u = E_{2u} - E_{1u} \text{ (за узорак)}$$

$$\Delta E_{sp} = E_{2sp} - E_{1sp} \text{ (за слепу пробу)}$$

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

$$\text{nmol } O_2^{\cdot-}/\text{ml плазме} = \Delta E / 0.015 \times 1/0.05$$

3.2.4.2. Одређивање концентрације водоник пероксида (H_2O_2)

Детерминација количине водоник пероксида (H_2O_2) заснива се на оксидацији фенол-црвеног помоћу водоник пероксида, реакцијом која је катализована ензимом пероксидазом из коњске ротквице (Horse Radish Peroxidase – HRPO) (326). Ова реакција резултује формирањем једињења чији је максимум апсорпције на $\lambda_{max} = 610 \text{ nm}$. Линеарна зависност апсорбанце на 610 nm од концентрације H_2O_2 је постојана за $1 - 60 \text{ mM}$ опсег концентрација ($1 - 60 \text{ nmol/ml}$).

Ова метода омогућује детерминацију настајања и ослобађања H_2O_2 за временски интервал од $5 - 60$ минута. У епрувете (12×100) се пипетира 200 ml плазме и 800 ml свеже направљеног раствора фенол црвеног (Phenol Red Solution – PRS) који садржи 140 mM NaCl, 10 mM калијум фосфатног пуфера ($\text{pH} = 7$), 5.5 mM D(+)-глукозе и 0.28 mM фенол-црвеног. Узорцима се затим дода 10 ml ($1 : 20$) HRPO, припремљен *ex tempore*. Узорци се остављају на собној температури 10 минута, а затим се подеси $\text{pH} > 12$, помоћу 1 M NaOH. Као слепа проба плазме користи се адекватна количина дестиловане воде.

Концентрација ослобођеног H_2O_2 у венској крви израчунава се на основу калибрационог дијаграма (стандардне криве), који се одређује за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве користи се стандардни (Stock) раствор H_2O_2 , уз претходну проверу концентрације (A_{230} за 10 mM H_2O_2 износи 0.810). У три епрувете пипетира се, уместо плазме, $5, 10$ и 20 ml 1 mM раствора H_2O_2 , 200 ml дестиловане воде, 800 ml раствора фенол-црвеног и 10 ml ($1 : 20$) HRPO. Након инкубације од 10 минута на собној температури, подеси се $\text{pH} > 12$, помоћу 1 M NaOH (10 ml).

Концентрација, а затим и количина ослобођеног H_2O_2 у плазми израчунава се на основу фактора апсорбанце (F)/nmol H_2O_2 :

$$F = \frac{\Delta A}{\text{nmol } H_2O_2 / \text{cuv}}$$

На основу апсорбанце узорка (A_u) на $\lambda_{max} = 610 \text{ nm}$ и њеног упоређивања са слепом пробом (A_{sp}) израчунава се финална апсорбанца (DA) ($A = A_u - A_{sp}$). Помоћу овако

добијене апсорбанце, фактора F и количине плазме употребљене у есеју (200 ml) израчунава се концентрација и количина H₂O₂ у плазми по формули:

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

3.2.4.3. Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS)

Индекс липидне пероксидације, као један од параметара оксидативног стреса, одређује се индиректно преко продукта реакције липидне пероксидације са тиобарбитурном киселином, одакле и потиче скраћеница TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances – TBARS). За одређивање концентрације TBARS у плазми врши се специфична екстракција по следећем протоколу: у *Eppendorf* епрувете пиретира се 0.4 ml 28 % TCA и 0.8 ml плазме. Тако добијени узорци се инкубирају у леденом куратилу (-4 °C) 10 минута. Након инкубације узорци се центрифугурају 4 минута на 15000 rpm, а у добијеном супернатанту одређује се концентрација TBARS спектрофотометријски (327). Метода се заснива на одређивању нивоа липидних пероксида на основу реакције једног од њих, малонилдиалдехида (MDA) са тиобарбитурном киселином (TBA).

У епрувете (12 x 100) пиретира се 800 µl екстракта плазме и 200 µl 1% TBA и 0.05 M NaOH. Као слепа проба уместо екстракта плазме користи се еквивалентна количина дестиловане воде. Након пиретирања, узорци се инкубирају у воденом куратилу 15 минута на 100 °C. Након инкубације, узорци се прилагоде собној температури, па се приступа детерминисању концентрације ослобођених TBARS спектрофотометријски на таласној дужини од $\lambda = 530 \text{ nm}$.

Концентрација ослобођених TBARS добија се на основу следеће једначине

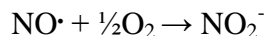
$$\text{nmol TBARS/ml плазме} = \Delta A (A_u - A_{sp}) / 1.56 \times 1.25$$

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

3.2.4.4. Одређивање концентрације азот монооксида (NO•)

За одређивање концентрације нитрита (NO_2^-) у плазми врши се специфична екстракција по следећем протоколу: у *Eppendorf* епрувете пипетира се 0.1 ml 3 М РСА, 0.4 ml 20 mM EDTA и 0.2 ml плазме. Тако добијени узорци инкубирају се у леденом куратилу ($-4\text{ }^\circ\text{C}$) 10 минута. Након инкубације узорци се центрифугурају 4 минута на 15000 rpm, супернатант се одлива, а преципитат ресуспендује у 2 М K_2CO_3 до pH = 7.4.

У тако добијеним узорцима екстракта плазме одређује се концентрација ослобођених нитрита спектрофотометријском реакцијом уз употребу Griess-овог реагенса (328). С обзиром да се у реакцији са молекуларним кисеоником:



ствара еквимоларна количина нитрита, можемо са веома великом сигурношћу тврдити да количина ослобођених нитрита представља количину ослобођеног $\text{NO}\cdot$.

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

У епрувете (12 x 100) пипетира се 0.1 ml екстракта плазме, 250 μl свеже направљеног Griess-ов реагенса и 125 μl амонијачног пуфера (pH = 9.0), кога сачињавају амонијум хлорид (NH_4Cl) и натријум тетраборат ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$). Амонијачни пуфер, који се у току припреме мора загревати, због изузетно слабе растворљивости натријум тетрабората, има за сврху стабилизацију диазо-комплекса. Као слепа проба екстракта плазме користи се дестилована вода. Концентрација ослобођених нитрита у узорцима одређује се на основу калибрационе криве. Калибрациона крива конструише се на основу екстинкција узорака, који у себи садрже познату концентрацију нитрита, након њихове реакције са Griess-овим реагенсом у присуству пуфера. Добија се пипетирањем различитих количина воденог раствора 1 mM NaNO_2 у 1 ml дестиловане воде и то: 3, 6, 12, 24 μl , чиме се добија

одређена концентрација нитрита. Након стабилизације боје на собној температури 5 - 10 минута приступа се детерминисању концентрације ослобођених нитрита спектрофотометријски на таласној дужини од $\lambda = 550\text{nm}$. Концентрација, а затим количина ослобођених нитрита, добија се на основу одређивања стандардног фактора (F):

$$F = \frac{\text{Екстинкција стандарда-екстинкција слепе пробе}}{\text{Концентрација NaNO}_2 \text{ у стандарду}}$$

за сваки појединачни стандард (F1 - F4), а затим добијањем њихове аритметичке средине. Затим се разлика екстинкција узорка и слепе пробе подели са стандардом (F):

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

3.2.4.5. Одређивање активности супероксид дисмутазе (SOD)

Одређивање активности SOD врши се адреналинском методом. Ова метода припада групи метода "негативног" типа, јер се прати смањење брзине аутооксидације адреналина у алкалној средини, која је зависна од O_2^- (329). Присутна SOD уклања O_2^- и при томе инхибира реакцију аутооксидације адреналина. Брзина аутооксидације адреналина прати се спектрофотометријски преко промене апсорбанце на 480 nm. Пораст апсорбанце на 480 nm потиче од акумулације адренохрома. Брзина аутооксидације адреналина једнака је нагибу линеарног дела пораста апсорпције. Процент инхибиције користи се као мера каталитичке активности ензима. Брзина аутооксидације адреналина у одсуству ензима узима се као референтна (контролна), а брзина аутооксидације у присуству SOD, односно протеина у цитосолу представља део референтне вредности.

У 3.2 ml реакционе смеше коју чине: 3 ml карбонатног буфера, pH = 10.2 и 0.1 ml раствора адреналина, додаје се 0.01 ml раније припремљеног супернатанта. Аутооксидација адреналина прати се у току 4 минута на 480 nm. Реакција је стабилна у температурном опсегу од 26 – 30 °C. Упоредо се ради и контролна реакција. Процент инхибиције аутооксидације адреналина у присуству SOD из узорка, у односу на контролну реакцију аутооксидације адреналина користи се за израчунавање SOD активности. Количина SOD изражена је у јединицама SOD активности по граму Нб

(јед/гНб). Јединица SOD активности дефинисана је као запремина, односно количина протеина која узрокује 50 % инхибиције брзине аутооксидације адреналина у линеарном делу пораста апсорпције.

Израчунавање се врши по следећој једначини:

$$\text{SOD-1} = \frac{2(\Delta K - \Delta A) \times R}{V \times \text{Hb} \times \Delta K}$$

при чему је:

ΔK - промена апсорпције контролне реакције у минути

ΔA - промена апсорпције реакције са узорком у минути

V - запремина узорка која се сипа у реакциону смешу (ml)

Hb - количина хемоглобина (g/100ml лизата)

R – разблажење

3.2.4.6. Одређивање активности каталазе (CAT)

Активност каталазе у сонификату одређује се по методи *Beutler*-а (330). Метода се састоји у спектрофотометријском праћењу брзине разградње водоник-пероксида у присуству каталазе на 230 nm. На тој таласној дужини водоник пероксид апсорбује светлост. Тачна концентрација водоник-пероксида одређује се на следећи начин: у односу на апсорпцију разблаженог раствора руфера (1 : 10), као нула, читава се апсорпција раствора састављеног од 0.9 ml разблаженог пуфера и 0.1 ml разблаженог 30 % раствора H_2O_2 (1 : 100). Концентрација водоник пероксида израчунава се на основу екстинкционог коефицијента, који је за H_2O_2 , на 230 nm, 0.071, по формули:

$$C = \frac{\Delta A}{0.071}$$

Добијена концентрација затим се разблажује до 10 mM.

Реакциона смеша:

У кварцну кивету у којој се налази 50 μ l пуфера додаје се између 5 и 50 μ l узорка (зависно од активности каталазе). Реакција почиње додатком 1 ml 10 mM раствора водоник-пероксида. Пад апсорбанце прати се на 230 nm у току 3 минута. Активност се изражава у јед/mg протеина, а јединица је дефинисана као количина редукованог H_2O_2 , изражена у μ M, у минути. Израчунавање се врши према следећој једначини:

$$CAT = \frac{\Delta A \cdot R}{0,071 \cdot Low \cdot V}$$

при чему је:

ΔA – промена апсорбанце у минути

R – разблажење

V – запремина узорка (ml)

Low – количина протеина (mg/ml сонификата).

3.3. Статистичка обрада података

Статистичка обрада података рађена је у статистичком пакету *SPSS 10.0 for Windows*.

За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, коришћене су методе дескриптивне статистике: мере централне тенденције (средња вредност, медијана), мере варијабилитета (стандардна девијација, минимум и максимум), као и графичко и табеларно приказивање.

За испитивање нормалности расподеле параметара коришћен је *Kolmogorov-Smirnov test* и *Shapiro-Wilk* тест.

У зависности од расподеле, за анализу података коришћени су одговарајући параметријски или непараметријски тестови. Тестирање значајности статистичке разлике између група вршено је *T-тестом* за два независна узорка, односно *Mann Whitney* тестом.

За тестирање разлике између два мерења коришћен је *Упарени t-тест*, односно *Willcoxon*-ов тест. За упоређивање аритметичке средине неког обележја више од две порулације коришћен је *ANOVA* или *Kruskal Wallis* тест. За анализу међусобне корелације параметара коришћене су методе линеарне корелације. За мерење јачине линеарне везе између обележја коришћен је *Pearson*-ов или *Spearman*-ов коефицијент корелације.

IV

РЕЗУЛТАТИ

4.1. ДЕМОГРАФСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ИСПИТАНИКА И ВРЕМЕ ПРЕЖИВЉАВАЊА

Демографске карактеристике испитаника и време преживљавања пацијената након АИМУ су приказане на Табели 4.

Табела 4 показује да није било статистички значајне разлике у полној дистрибуцији (χ^2 тест: $P>0.05$) и годинама старости (Т тест: $P>0.05$) испитаника између експерименталне и контролне групе.

Женски пол је био заступљенији у обе испитиване групе пацијената. Од укупно шездесет (60) пацијената укључених у експерименталну групу, четрдесетосам (48) њих су чиниле жене, а дванаест мушкарци (12), док је контролну групу чинило двадесетчетири (24) жене и шеснаест (16) мушкараца.

Просечан број година старости је био веома сличан између експерименталне (75.90 ± 7.37) и контролне групе (73.85 ± 10.48).

Већи број пацијената из експерименталне групе је преминуо након АИМУ. Од укупно шездесет (60) пацијената укључених у експерименталну групу, двадесетчетири (24) пацијената је преживело АИМУ, док је тридесетшесторо (36) преминуло.

Просечан број дана до леталног исхода за испитанике у експерименталној групи је износио скоро једанаест дана (10.95 ± 9.92).

Табела 4. Демографски подаци испитаника ($X\pm SD$ или n).

Варијабла	Експериментална група (n=60)	Контролна група (n=40)	P
Пол (ж/м)	48/12	24/16	0.537
Старост (године)	75.90 ± 7.37	73.85 ± 10.48	0.545
Исход (преживео/преминуо)	24/36	40/0	0.000
Дана до леталног исхода (n)	10.95 ± 9.92	/	/

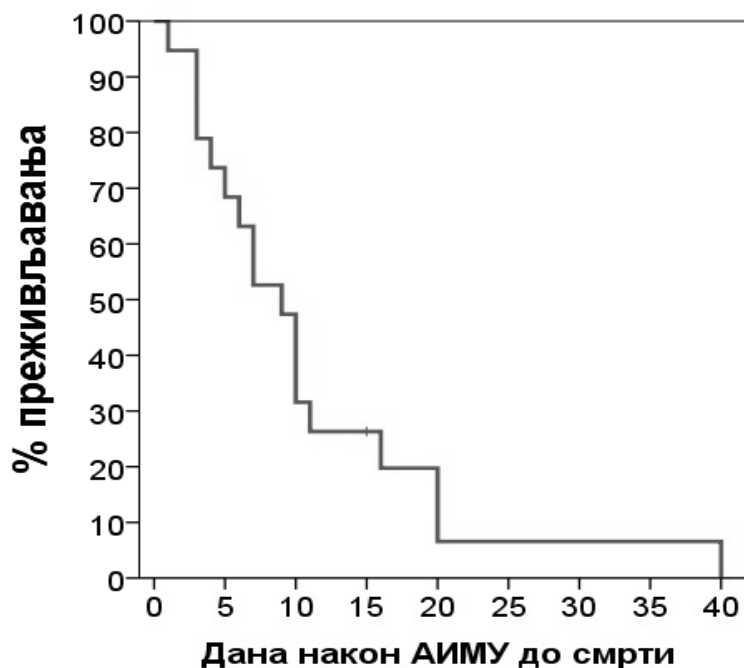
График 1 представља *Kaplan-Meier*-ову криву кумулативних вероватноћа и приказује време преживљавања испитаника у експерименталној групи након АИМУ.

На графику је презентован проценат преживелих пацијената у односу на број дана након АИМУ који су протекли до смртог исхода.

На основу дистрибуције преживљавања пацијената почевши од првог до четрдесетог дана након АИМУ уочава се да је 40% или двадесетчетири (24) испитаника преживело АИМУ.

У групи преминулих пацијената којих је било тридесетшест (36), 20% пацијената је преминуло за мање од 3 дана након АИМУ. Највећи проценат преминулих пацијената (око 50%) је забележен седмог дана након АИМУ, док је код мање од 10% пацијената смрт наступила након 20 и више од дана од АИМУ (График 1).

График 1. Време преживљавања пацијената након АИМУ: *Kaplan-Meier*-ова крива кумулативних вероватноћа.



4.2. ПОРЕЂЕЊЕ НИВОА РУТИНСКИХ БИОХЕМИЈСКИХ ПАРАМЕТАРА ИЗМЕЂУ КОНТРОЛНЕ И ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ГРУПЕ

Табела 5 и График 2 приказују разлике у нивоима рутинских биохемијских параметара између експерименталне и контролне групе испитаника.

Нивои глукозе у крви су били статистички значајно виши код припадника експерименталне групе у односу на контролну групу (*Mann Whitney* тест: $P < 0.01$).

Поред тога испитаници из експерименталне групе су имали статистички значајно више нивое холестерола (Т тест: $P < 0.05$) и триглицерида (*Mann Whitney* тест: $P < 0.05$).

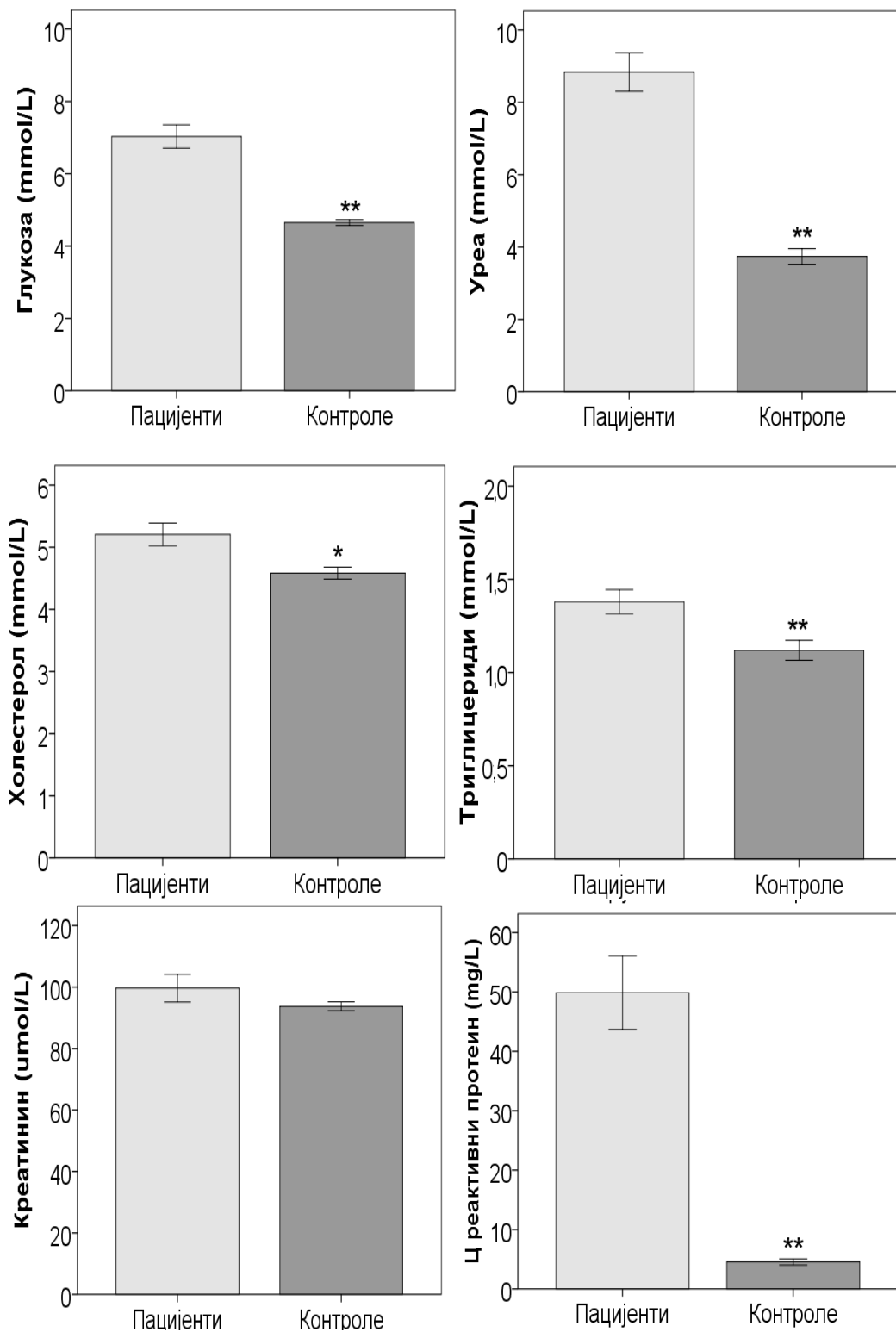
Вредности урее (*Mann Whitney* тест: $P < 0.01$) и Ц реактивног протеина (*Mann Whitney* тест: $P < 0.01$) су такође биле статистички значајно више код експерименталне у односу на контролну групу испитаника.

Са друге стране, једино вредности креатинина нису биле значајно различите између испитиваних група.

Табела 5. Разлике у нивоима биохемијских параметара из категорије „рутинске биохемијске анализе“ између експерименталне и контролне групе ($X \pm SD$).

Варијабла	Експериментална група (n=60)	Контролна група (n=40)	P
Глукоза (mmol/L)	7.04±2.33	4.65±0.36	0.000
Уреа (mmol/L)	8.83±3.81	3.74±0.83	0.000
Креатинин (umol/L)	99.63±31.59	93.72±4.90	0.848
Холестерол (mmol/L)	5.20±1.28	4.58±0.43	0.039
Триглицериди (mmol/L)	1.38±0.45	1.11±0.23	0.023
Ц реактивни протеин (mg/L)	50.53±44.41	4.54±2.38	0.000

График 2. Разлике у нивоима биохемијских параметара из категорије „рутинске биохемијске анализе“ између експерименталне и контролне групе ($X \pm SE$).



4.3. ПОРЕЂЕЊЕ НИВОА БИОХЕМИЈСКИХ ПАРАМЕТАРА КООГУЛАЦИЈЕ ИЗМЕЂУ КОНТРОЛНЕ И ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ГРУПЕ

Табела 6 и График 3 приказују разлике у нивоима биохемијских параметара коагулације између контролне и експерименталне групе испитаника.

Вредности $vWAct$ (Т тест: $P<0.01$) и $vWAg$ (Т тест: $P<0.01$) су били статистички значајно виши у крви испитаника експерименталне групе у односу на контролну групу.

Поред тога, вредности $TRAP$ су биле значајно више код припадника експерименталне у односу на контролну групу (*Mann Whitney* тест: $P<0.01$).

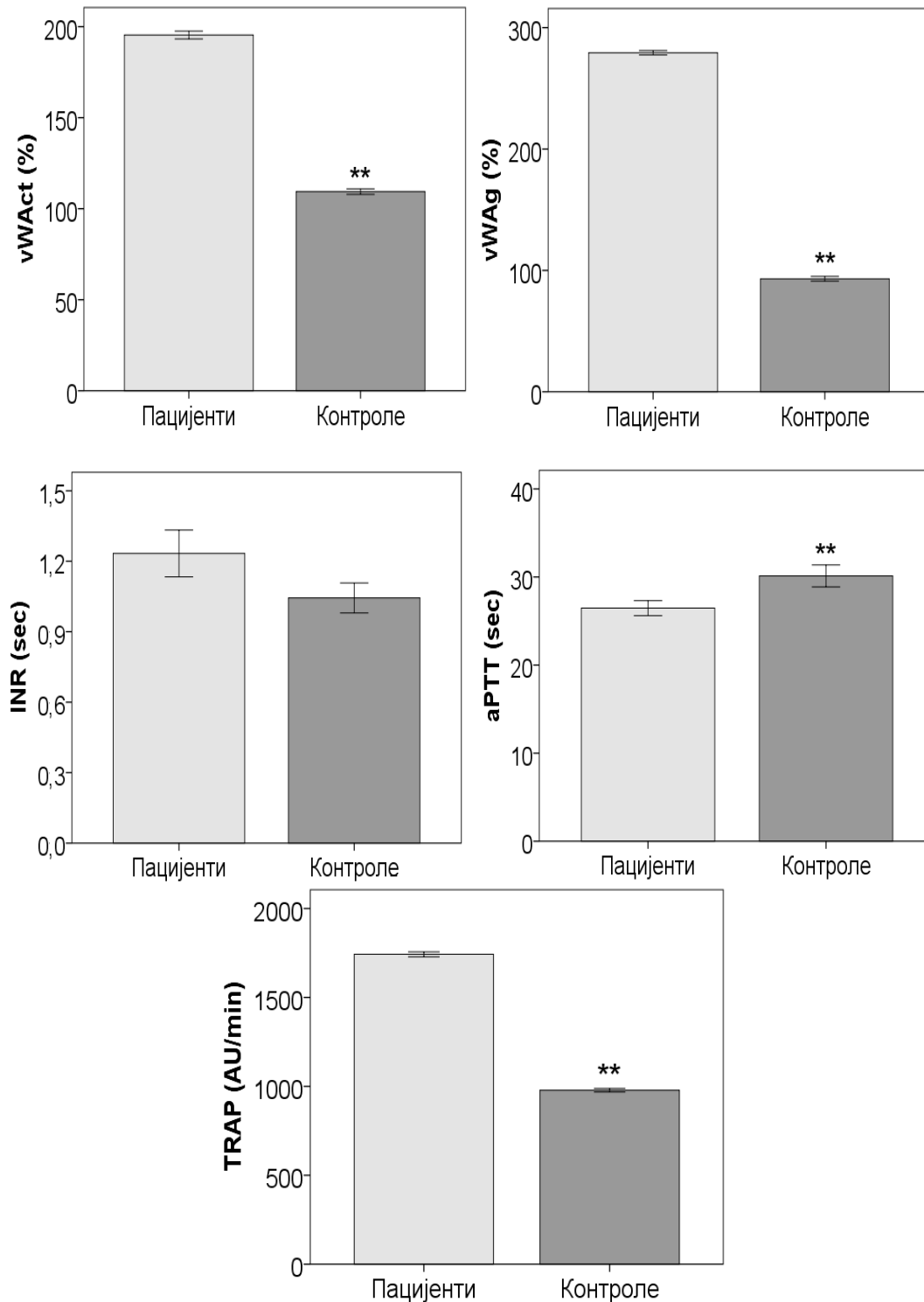
Са друге стране, вредности $aPTT$ (*Mann Whitney* тест: $P<0.01$) су биле статистички ниже код испитаника након АИМУ, у поређењу са испитаницима из контролне групе.

Није забележена статистички значајна разлика у вредностима INR -а између експерименталне групе из испитаника и контролне групе.

Табела 6. Разлике у нивоима коагулационих параметара између експерименталне и контролне групе ($X\pm SD$).

Варијабла	Експериментална група (n=60)	Контролна група (n=40)	P
$vWAct$ (%)	195.42±10.84	109.43±8.28	0.000
$vWAg$ (%)	279.30±8.96	93.05±10.74	0.000
$TRAP$ (AU/min)	1742.32±69.78	978.23±56.52	0.000
INR (sec)	1.23±0.69	1.04±0.18	0.213
$aPTT$ (sec)	26.46±5.89	30.12±3.52	0.004

График 3. Разлике у нивоима коагулационих параметара између експерименталне и контролне групе ($X \pm SE$).



4.4. ПОРЕЂЕЊЕ НИВОА ПАРАМЕТАРА ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА ИЗМЕЂУ КОНТРОЛНЕ И ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ГРУПЕ

Табела 7 и График 4 приказују разлике у вредностима про- и анти-оксидативних маркера између контролне и експерименталне групе испитаника.

Вредности про-оксидативних маркера у крви испитаника између група су биле различите.

Нивои O_2^- (*Mann Whitney*: $P < 0.05$) и TBARS (*Mann Whitney*: $P < 0.01$) су били статистички више код испитаника након АИМУ у односу на контролну групу испитаника, док су нивои NO_2^- били нижи у експерименталној групи (*Mann Whitney* тест: $P < 0.01$).

Вредности H_2O_2 су биле више у експерименталној групи испитаника, али без статистичке значајности.

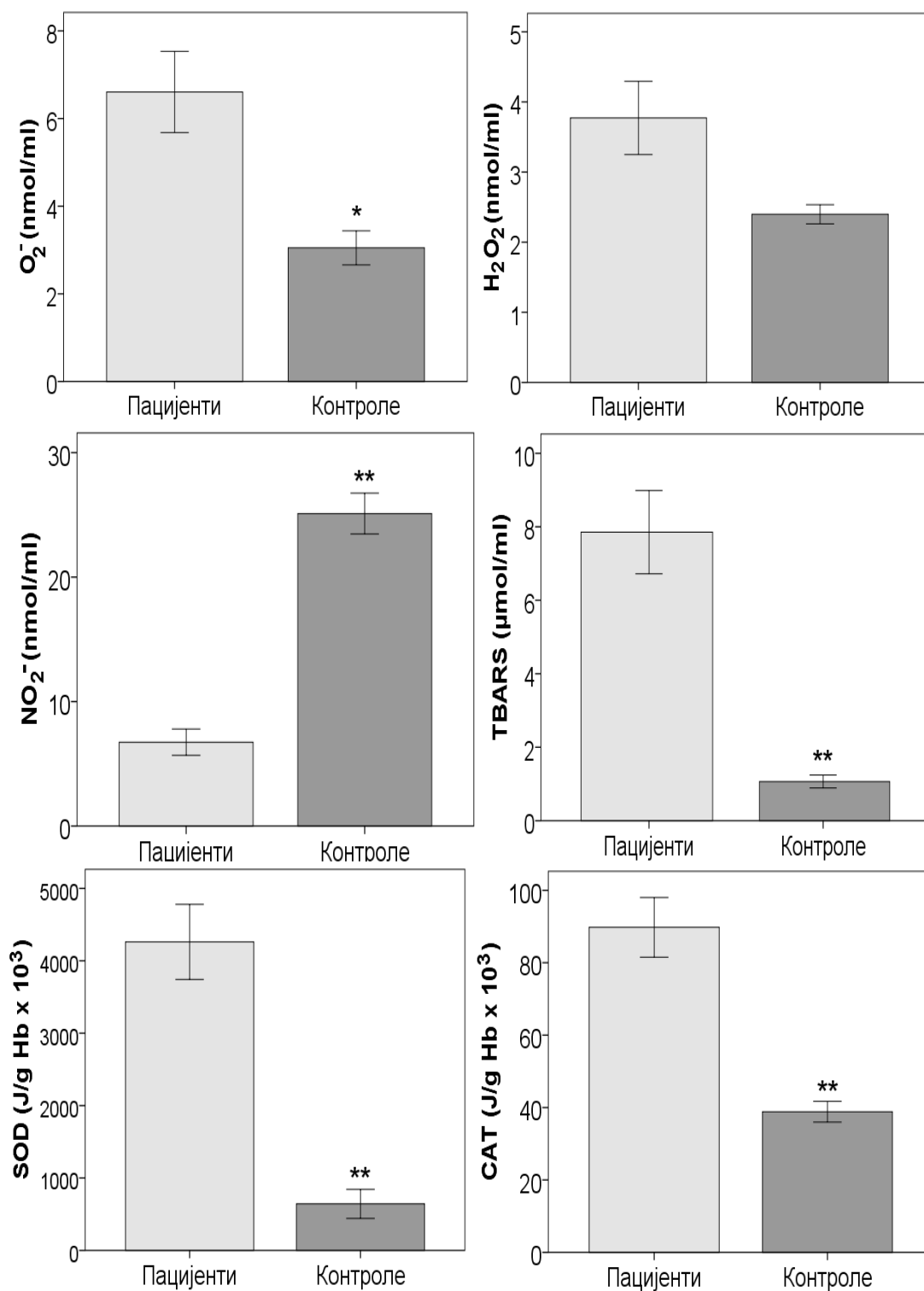
Вредности анти-оксидативних маркера у крви испитаника су показале исти квантитативни однос разлике између група.

Нивои оба испитивана анти-оксидативна параметра SOD (*Mann Whitney* тест: $P < 0.01$) и CAT (*Mann Whitney* тест: $P < 0.01$) су били статистички значајно виши у експерименталној групи у односу на контролну групу испитаника.

Табела 7. Разлике у нивоима параметара оксидативног стреса између експерименталне и контролне групе ($X \pm SD$).

Варијабла	Експериментална група (n=60)	Контролна група (n=40)	P
O_2^- (nmol/ml)	6.49±6.57	3.04±1.73	0.013
H_2O_2 (nmol/ml)	3.81±3.71	2.39±0.61	0.483
NO_2^- (nmol/ml)	6.85±7.84	25.09±7.34	0.000
TBARS (μ mol/ml)	7.85±7.93	1.06±0.78	0.000
SOD (J/g Hb x 10^3)	4217.02±3696.72	643.46±897.27	0.000
CAT (J/g Hb x 10^3)	91.28±57.94	38.85±12.89	0.000

График 4. Разлике у нивоима параметара оксидативног стреса између експерименталне и контролне групе ($X \pm SE$).



4.5. ДИНАМИКА НИВОА РУТИНСКИХ БИОХЕМИЈСКИХ ПАРАМЕТАРА КОД ИСПИТАНИКА СА АИМУ ТОКОМ ВРЕМЕНА ПРАЋЕЊА

Табела 8 и График 5 приказују промене нивоа рутинских биохемијских параметара у крви испитаника са АИМУ током времена праћења (од првог до седмог дана након АИМУ).

Нивои глукозе (*Wilcoxon* тест: $P < 0.05$) су били статистички значајно нижи седмог него првог дана након АИМУ.

Вредности холестерола (Упарени Т тест: $P < 0.01$) су такође доживеле пад седмог дана, док се вредности триглицерида ($P = 0.574$) нису значајно мењале у односу на први дан.

Вредности креатинина (*Wilcoxon* тест: $P < 0.01$) су седмог дана биле статистички значајно ниже него првог дана након АИМУ.

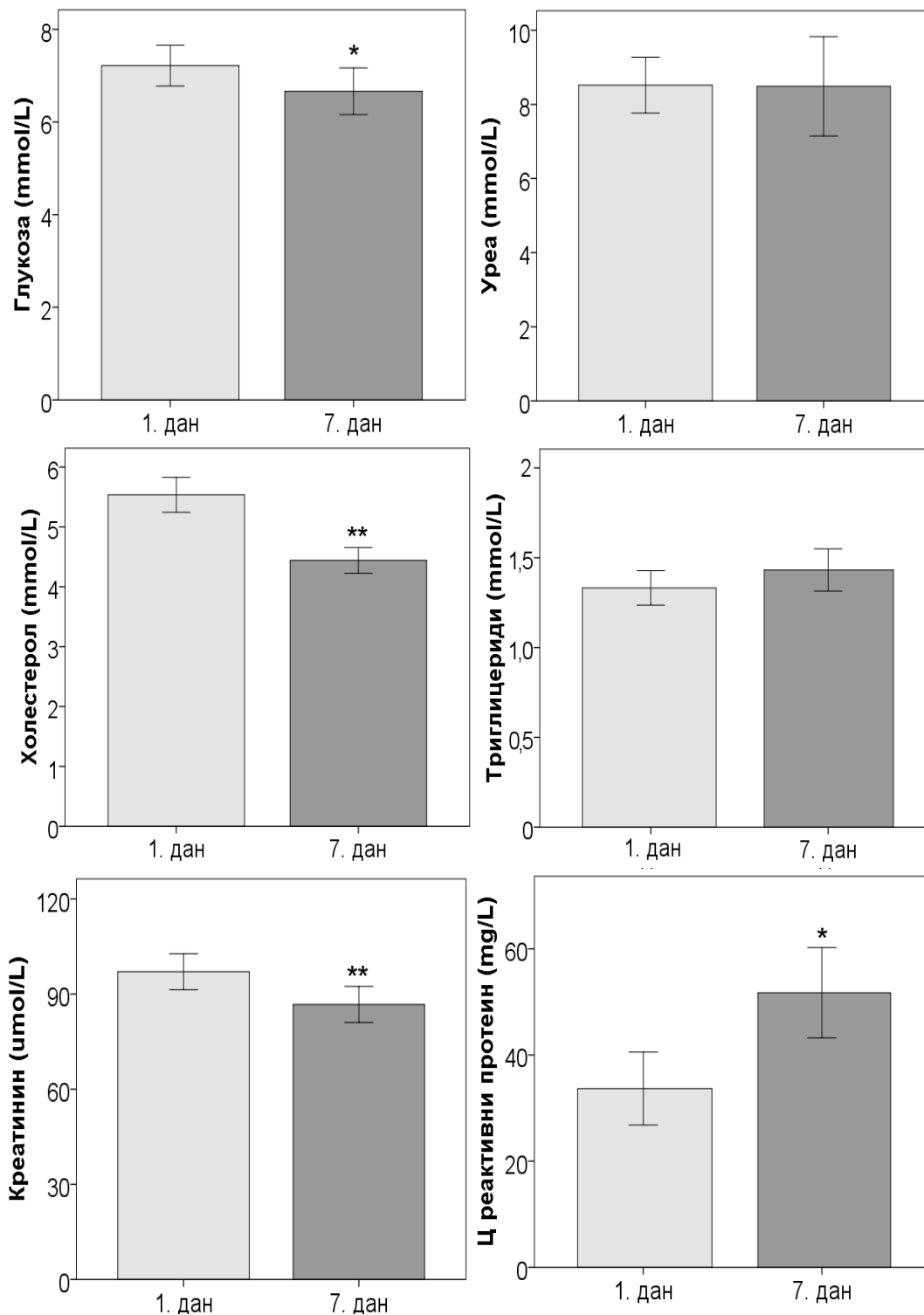
Са друге стране вредности Ц реактивног протеина су наставиле да расту у даним након АИМУ и седмог дана су биле статистички значајно више у односу на почетак праћења (*Wilcoxon* тест: $P < 0.05$).

Вредности урее се нису битније мењале током периода праћења испитаника ($P = 0.081$).

Табела 8. Разлике у нивоима биохемијских параметара из категорије „рутинске биохемијске анализе“ забележених 1. и 7. дана након АИМУ ($X \pm SD$).

Варијабла	1 дан након АИМУ	7 дана након АИМУ	P
Глукоза (mmol/L)	7.21±2.16	6.66±2.47	0.048
Уреа (mmol/L)	8.52±3.69	8.48±6.57	0.081
Креатинин (umol/L)	97.04±26.58	86.72±26.68	0.002
Холестерол (mmol/L)	5.53±1.36	4.44±1.00	0.000
Триглицериди (mmol/L)	1.33±0.44	1.43±0.55	0.574
Ц реактивни протеин (mg/L)	33.67±32.95	51.72±40.80	0.042

График 5. Разлике у нивоима биохемијских параметара из категорије „рутинске биохемијске анализе“ забележених 1. и 7. дана након АИМУ ($X \pm SE$).



4.6. ДИНАМИКА НИВОА БИОХЕМИЈСКИХ ПАРАМЕТАРА КОАГУЛАЦИЈЕ КОД ИСПИТАНИКА СА АИМУ ТОКОМ ВРЕМЕНА ПРАЋЕЊА

Табела 9 и График 6 приказују промене нивоа биохемијских параметара коагулације у крви испитаника са АИМУ током времена праћења (од првог до седмог дана након АИМУ).

Нивои $vWAct$ (Упарени Т тест: $P < 0.01$) и $vWAg$ (Упарени Т тест: $P < 0.01$) су седмог дана након АИМУ били статистички значајно нижи у односу на први дан праћења.

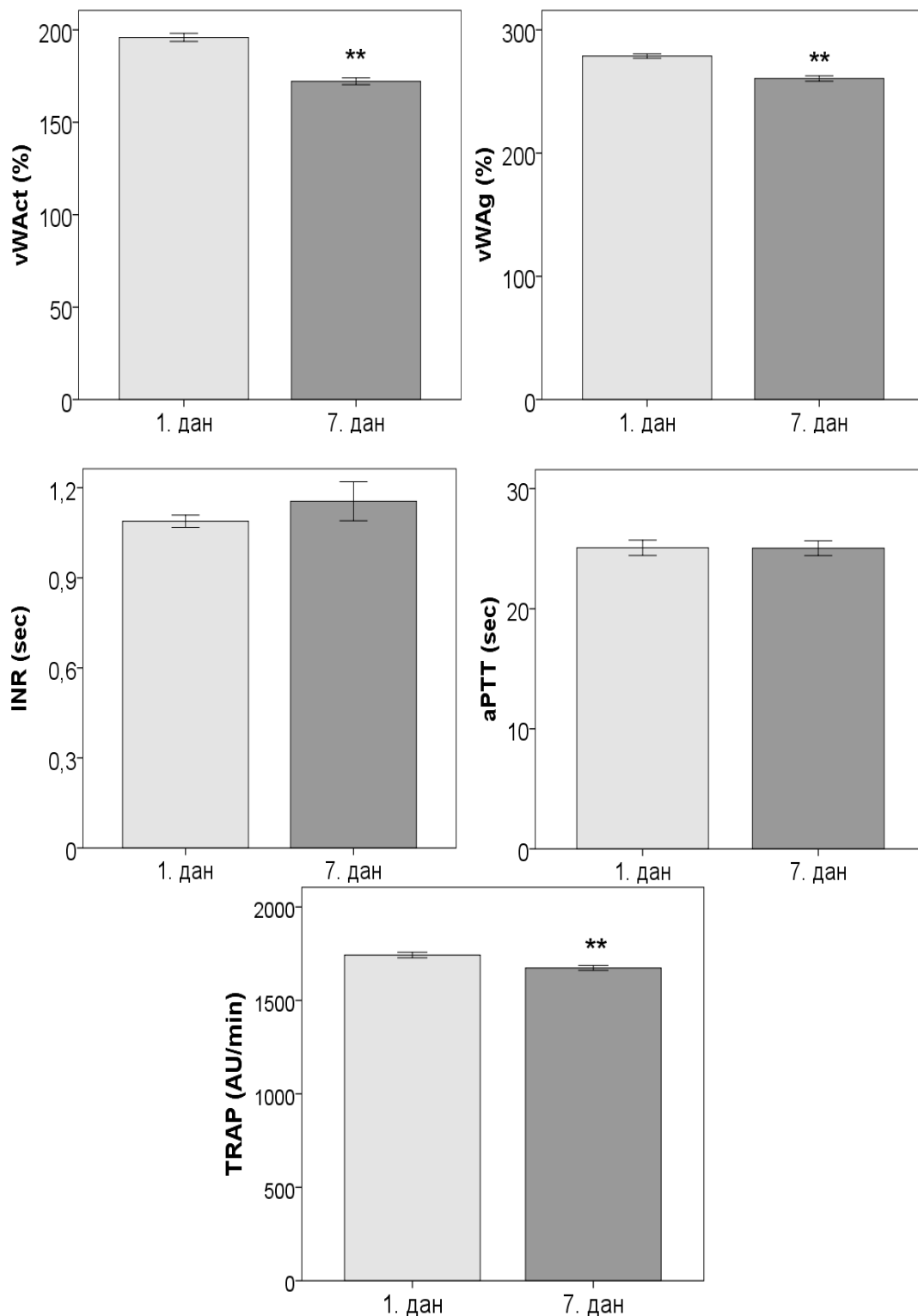
Вредности $TRAP$ -а (*Wilcoxon* тест: $P < 0.01$) су такође на крају периода праћења испитаника (седмог дана након АИМУ) достигле статистички значајан пад у односу на први дан након АИМУ.

Са друге стране, вредности преостала два маркера коагулационог статуса испитаника (INR -а и $aPTT$ -а) се нису значајније разликовале седмог у односу на први дан праћења.

Табела 9. Разлике у нивоима коагулационих параметара забележених 1. и 7. дана након АИМУ ($X \pm SD$).

Варијабла	1 дан након АИМУ	7 дана након АИМУ	Р
$vWAct$ (%)	195.89±10.80	172.16±8.87	0.000
$vWAg$ (%)	278.77±8.75	260.56±10.85	0.000
$TRAP$ (AU/min)	1742.41±71.28	1673.45±63.91	0.000
INR (sec)	1.08±0.09	1.15±0.30	0.432
$aPTT$ (sec)	25.07±3.01	25.04±2.90	0.958

График 6. Разлике у нивоима коагулационих параметара забележених 1. и 7. дана након АИМУ ($X \pm SE$).



4.7. ДИНАМИКА НИВОА ПАРАМЕТАРА ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА КОД ИСПИТАНИКА СА АИМУ ТОКОМ ВРЕМЕНА ПРАЋЕЊА

Табела 10 и График 7 приказују промене нивоа маркера оксидативног стреса у крви испитаника са АИМУ током времена праћења (од првог до седмог дана након АИМУ).

Седмог дана након АИМУ вредности O_2^- , NO_2^- , и TBARS су биле више код наших испитаника у односу на први дан праћења, али тај квантитативни однос није био статистички значајан.

Насупрот томе, вредности преосталог про-оксидативног маркера H_2O_2 су седмог дана достигле нижи ниво у односу на почетак праћења, али без статистичке значајности.

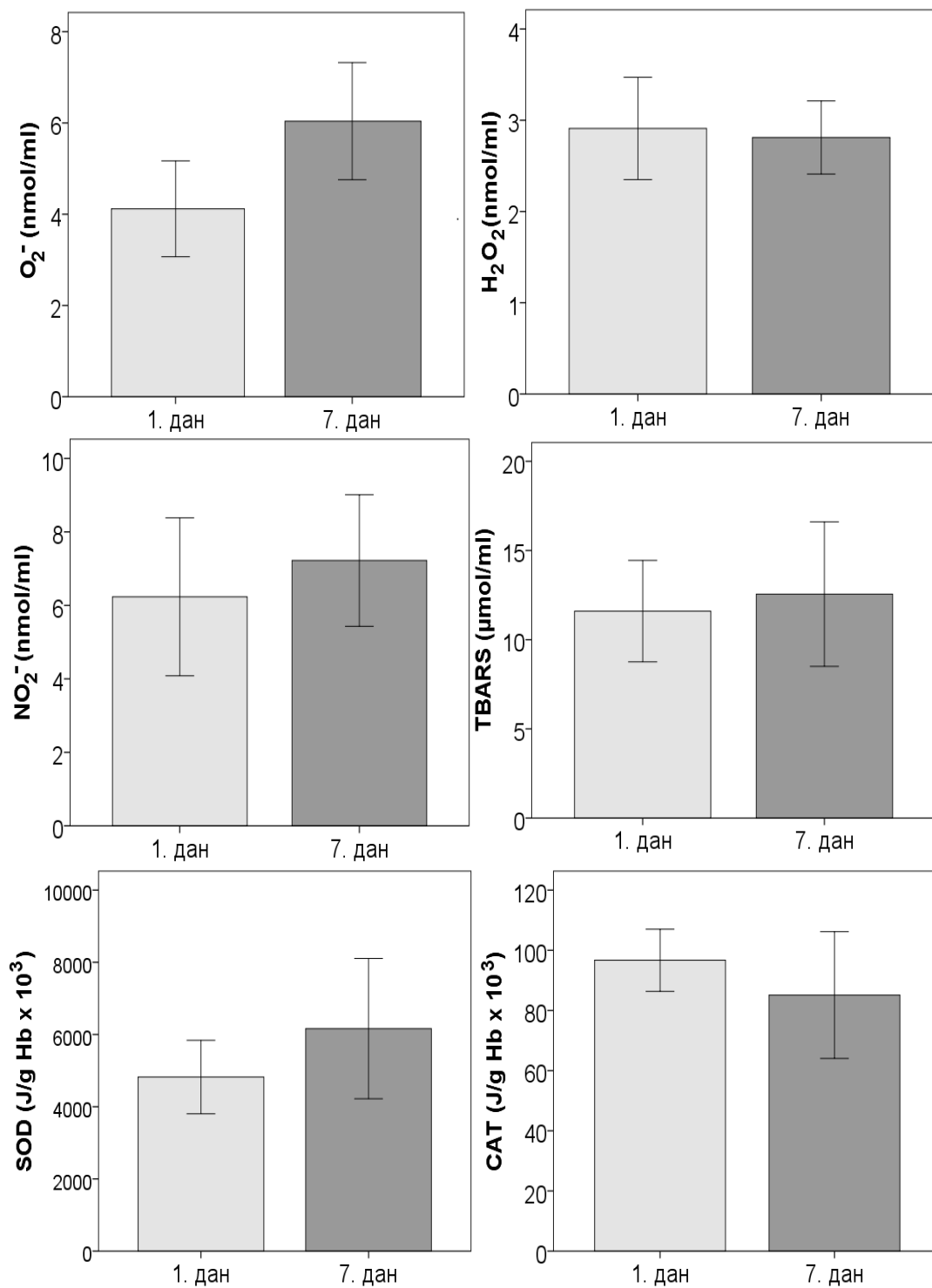
Са друге стране, вредности испитиваних параметара анти-оксидативног система заштите SOD и CAT су седмог дана након АИМУ достигле виши ниво у односу на почетак праћења, али као и претходим случајевима, забележени пораст није био статистички сигнификантан.

Сумарно посматрано, сви испитивани параметри редокс равнотеже код наших испитаника се нису битније мењали током времена праћења након АИМУ.

Табела 10. Разлике у нивоима параметара оксидативног стреса забележених 1. и 7. дана након АИМУ ($X \pm SD$).

Варијабла	1 дан након АИМУ	7 дана након АИМУ	P
O_2^- (nmol/ml)	4.11±3.31	6.03±4.05	0.333
H_2O_2 (nmol/ml)	2.91±1.77	2.81±1.26	0.869
NO_2^- (nmol/ml)	6.23±6.79	7.22±5.66	0.441
TBARS (μ mol/ml)	11.59±8.99	12.55±12.80	0.597
SOD (J/g Hb x 10^3)	4821.32±3218.53	6163.56±6148.40	0.646
CAT (J/g Hb x 10^3)	96.67±32.63	85.12±66.61	0.582

График 7. Разлике у нивоима параметара оксидативног стреса забележених 1. и 7. дана након АИМУ ($X \pm SE$).



4.8. ПОРЕЂЕЊЕ ДИНАМИКЕ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА ТОКОМ ВРЕМЕНА ПРАЋЕЊА ИЗМЕЂУ ГРУПА ДЕФИНИСАНИХ ИСХОДОМ

Табела 11 приказује разлике у нивоима параметара оксидативног стреса између преживелих и преминулих пацијената током времена праћења (на пријему, након 24 сата, 72 сата и 7 дана).

У случају O_2^- статистички значајна разлика је забележена на пријему између пацијената који су летални исход доживели за мање од 3 дана након АИМУ и пацијената који су преживели АИМУ (*Mann Whitney* тест: $P=0.009$).

Вредности H_2O_2 нису показале значајније разлике приликом компарације између наведених група које су дефинисане временом у свим временима праћења.

Што се тиче NO_2^- статистички значајна разлика је забележена на пријему између пацијената који су летални исход доживели за мање од 3 дана након АИМУ и пацијената који су преминули између трећег и седмог дана након АИМУ (*Mann Whitney* тест: $P=0.005$), затим између пацијената који су преминули између трећег и седмог дана након АИМУ и пацијената који су преминули након више од седам дана након АИМУ (*Mann Whitney* тест: $P=0.008$), као и између пацијената који су преминули између трећег и седмог дана након АИМУ и преживелих пацијената (*Mann Whitney* тест: $P=0.023$).

Вредности TBARS нису показале значајније разлике приликом компарације између наведених група које су дефинисане временом у свим временима праћења.

Вредности оба испитивана анти-оксидациона маркера (SOD и CAT) нису показале сигнификантне разлике приликом поређења између наведених група које су дефинисане временом у свим временима праћења.

Ни у једној од група није забележена статистички значајна промена параметара оксидативног стреса при поновљеним мерењима (*Friedman* тест: $P>0.05$).

Табела 11. Разлике у нивоима параметара оксидативног стреса забележених на пријему, 24ч, 72ч и 7 дана након АИМУ код преминулих и преживелих пацијената (X±SD).

Летални исход	На пријему	1 дан након АИМУ	3 дана након АИМУ	7 дана након АИМУ	P
O₂⁻ (nmol/ml)					
< 3 дана	1.83±1.66	6.66±4.55	/	/	0.180
3 -7 дана	3.38±1.65	5.10±2.85	6.48±3.81	/	0.264
>7 дана	4.90±5.18	8.53±10.53	4.61±1.69	11.53±6.52	0.145
Преживели	7.91±7.61	5.46±5.53	6.59±5.44	4.61±2.24	0.185
P	0.042	0.453	0.855	0.076	
H₂O₂ (nmol/ml)					
< 3 дана	4.49±2.50	5.39±0.38	/	/	0.180
3 -7 дана	4.18±1.96	4.37±2.70	4.59±3.34	/	0.264
>7 дана	5.83±6.26	5.73±6.50	1.56±1.33	3.59±0.87	0.615
Преживели	3.43±3.44	3.57±2.88	3.20±2.92	2.79±1.31	0.319
P	0.272	0.600	0.057	0.380	
NO₂⁻ (nmol/ml)					
< 3 дана	5.93±2.95	3.52±1.09	/	/	0.180
3 -7 дана	1.58±1.01	5.42±7.39	6.59±10.12	/	0.441
>7 дана	7.73±1.07	7.92±6.77	8.34±3.90	8.64±1.12	0.145
Преживели	6.00±6.41	6.68±8.63	10.76±11.25	6.84±6.86	0.958
P	0.034	0.651	0.611	0.242	
TBARS (μmol/ml)					
< 3 дана	3.61±3.40	2.95±2.89	/	/	0.655
3 -7 дана	2.50±2.71	4.66±7.65	0.81±0.11	/	0.264
>7 дана	5.45±5.51	7.48±9.28	6.85±3.70	20.71±25.16	0.615
Преживели	6.62±5.69	8.37±7.66	10.37±9.82	9.71±10.33	0.392
P	0.141	0.317	0.080	0.380	
SOD (J/g Hb x 10³)					
< 3 дана	1059.85±677.38	4855.00±5796.86	/	/	0.180
3 -7 дана	1505.98±1405.64	4136.47±6195.86	4159.54±2020.24	/	0.050
>7 дана	2215.70±2350.26	3756.15±2267.23	1824.98±1442.27	3488.39±2744.97	0.615
Преживели	2891.73±2139.93	4057.47±3371.69	2754.28±2697.78	3238.45±3311.39	0.134
P	0.135	0.360	0.334	0.770	
CAT (J/g Hb x 10³)					
< 3 дана	37.10±41.95	76.50±30.40	/	/	0.655
3 -7 дана	89.10±41.50	94.58±66.03	136.25±58.08	/	0.717
>7 дана	83.80±39.47	93.88±50.85	96.10±46.00	75.50±5.30	0.896
Преживели	97.55±51.55	103.41±61.85	99.42±64.03	92.17±80.06	0.159
P	0.081	0.633	0.337	0.770	

Табела 12 приказује Сох-ову регресиону анализу која може да укаже на евентуални предиктивни значај параметара оксидативног стреса на преживљавање пацијената након АИМУ.

Резултати ове анализе преживљавања показују да ниједан параметар оксидативног стреса није значајно утицао на преживљавање након АИМУ (Сох-ова регресија: $P > 0.05$).

Табела 12. Утицај параметара оксидативног стреса на преживљавање: Сох-ова регресија.

Варијабла		Р	Exp(B)
O_2^-	на пријему	0.115	0.895
O_2^-	1 дан након АИМУ	0.336	1.037
O_2^-	3 дана након АИМУ	0.612	0.955
O_2^-	7 дана након АИМУ	0.947	7.218
H_2O_2	на пријему	0.404	1.041
H_2O_2	1 дан након АИМУ	0.457	1.043
H_2O_2	3 дана након АИМУ	0.624	0.914
H_2O_2	7 дана након АИМУ	0.982	0.112
NO_2^-	на пријему	0.355	1.033
NO_2^-	1 дан након АИМУ	0.979	1.001
NO_2^-	3 дана након АИМУ	0.855	0.992
NO_2^-	7 дана након АИМУ	0.936	1.256
TBARS	на пријему	0.220	0.929
TBARS	1 дан након АИМУ	0.191	0.938
TBARS	3 дана након АИМУ	0.109	0.891
TBARS	7 дана након АИМУ	0.961	0.613
SOD	на пријему	0.140	1.000
SOD	1 дан након АИМУ	0.896	1.000
SOD	3 дана након АИМУ	0.908	1.00
SOD	7 дана након АИМУ	0.940	1.001
CAT	на пријему	0.149	0.991
CAT	1 дан након АИМУ	0.911	1.001
CAT	3 дана након АИМУ	0.403	1.005
CAT	7 дана након АИМУ	0.992	1.013

4.9. КОРЕЛАЦИЈА ИЗМЕЂУ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА И ПАРАМЕТАРА КОАГУЛАЦИЈЕ

Табела 13 приказује корелациону анализу између параметара оксидационог стреса и биохемијских параметара коагулације код пацијената након АИМУ.

Табела 13. Корелације између параметара оксидативног стреса и параметара коагулације.

Параметар		INR 1. дан	INR 7. дан	aPTT 1. дан	aPTT 7. дан	vWAg 1. дан	vWAg 7. дан	vWAct 1. дан	vWAct 7. дан	TRAP 1. дан	TRAP 7. дан
O ₂ ⁻	1. дан	-0.002	-0.192	0.306	0.205	0.009	0.241	-0.014	-0.467*	0.126	0.187
O ₂ ⁻	7. дан	-0.470	-0.169	-0.782*	-0.698*	-0.136	0.429	0.092	0.126	-0.269	-0.412
H ₂ O ₂	1. дан	0.043	-0.005	-0.214	0.095	-0.188	0.069	0.160	-0.175	-0.408	-0.071
H ₂ O ₂	7. дан	-0.017	0.109	-0.067	0.000	-0.504	-0.750*	0.683*	0.467	-0.700*	-0.300
NO ₂	1. дан	-0.181	0.094	0.125	-0.419	-0.105	-0.263	0.092	0.093	0.050	0.086
NO ₂	7. дан	-0.269	0.025	0.167	0.433	-0.336	0.167	-0.100	-0.483	0.500	0.017
TBARS	1. дан	-0.200	-0.163	-0.154	-0.484*	0.099	0.190	0.398	0.283	0.312	0.311
TBARS	7. дан	-0.017	0.117	-0.283	-0.367	0.034	0.617	-0.233	-0.183	0.267	0.000
SOD	1. дан	-0.280	-0.398	0.233	0.019	0.323	-0.115	-0.135	-0.151	0.044	0.270
SOD	7. дан	-0.076	-0.109	0.400	0.233	-0.378	-0.800**	0.483	0.433	-0.400	-0.233
CAT	1. дан	0.073	0.168	-0.296	-0.019	-0.038	0.310	0.145	0.263	0.294	0.362
CAT	7. дан	0.109	0.293	0.133	-0.067	-0.429	-0.050	0.500	-0.133	-0.050	0.200

Статистички значајне корелације су пронађене између:

1. O_2^- узоркованог првог дана након АИМУ и $vWAct$ узоркованог седмог дана након АИМУ (*Spearman*-ов коефицијент корелације: $P < 0.05$),
2. O_2^- узоркованог седмог дана након АИМУ и $aPTT$ узоркованог првог и седмог дана након АИМУ (*Spearman*-ов коефицијент корелације: $P < 0.05$),
3. H_2O_2 узоркованог седмог дана након АИМУ и $vWAg$ узоркованог седмог дана након АИМУ (*Spearman*-ов коефицијент корелације: $P < 0.05$), $vWAct$ узоркованог првог дана након АИМУ (*Spearman*-ов коефицијент корелације: $P < 0.05$), и TRAP узоркованог првог дана након АИМУ (*Spearman*-ов коефицијент корелације: $P < 0.05$),
4. TBARS узоркованог првог дана након АИМУ и $aPTT$ узоркованог седмог дана након АИМУ (*Spearman*-ов коефицијент корелације: $P < 0.05$),
5. SOD узоркованог седмог дана након АИМУ и $vWAg$ узоркованог седмог дана након АИМУ (*Spearman*-ов коефицијент корелације: $P < 0.01$).

V

ДИСКУСИЈА

Акутни мождани удар (инфаркт мозга, инсулт, шлог, мождана кап) (АМУ) се дефинише као фокални или глобални поремећај мождане функције, који нагло настаје, траје дуже од 60 минута, а последица је поремећаја мождане циркулације или стања у коме проток крви није довољан да задовољи метаболичке потребе неурона за кисеоником и глукозом (331). Најчешће настаје услед запушења крвног суда (акутни исхемијски мождани удар - 75-80% болесника) или прскања крвног суда и изливања крви у мозак или око мозга (акутни хеморагијски мождани удар - 20-25% болесника) (332). АМУ представља ургентно медицинско стање може изазвати трајно неуролошких оштећења, компликације, и смрт. Фактори ризика за мождани удар укључују старост, висок крвни притисак, транзиторни исхемијски напад (ТИА), дијабетес, повишене вредности холестерола, пушење и фибрилација преткомора (331).

АМУ је трећи узрок смрти у развијеним земљама света, после болести срца и рака, а други узрок смрти у целом свету (333). У нашој земљи АМУ је први узрок смрти код жена, док је код мушкараца на другом месту, уз процену да сваких 20 минута неко доживи, а сваких 60 минута неко умре од можданог удара. Највећа стопа смртности је присутна у првих месец дана болести и износи чак до 23%. Осим што се ради о болести са веома високом смртношћу, подједнако је озбиљна и чињеница да је ово неуролошка болест са највећим степеном инвалидитета. Рачуна се да се тек око половине свих преживелих врати некој врсти запослења, а да око 20-30% није способно за преживљавање без помоћи другог лица. Ово је, такође, болест са високим процентом понављања, тако да ће сваки трећи болесник, у периоду од 5 година, поново доживети мождани удар.

Акутни исхемијски мождани удар (АИМУ), као доминантни тип можданог удара настаје услед престанка снабдевања одређеног дела мозга кисеоником, чиме се иницира покретање каскаде исхемијских процена (334). Као најважнији узроци прекида мождане циркулације се наводе формирање тромба на терену нестабилног атеросклеротског плака и емболија крвних судова мозга (335). Управо због тога се интеракција тромбоцита и оштећеног васкуларног ендотела, који продукујући *von Willebrand* фактор (vWF) омогућавају адхезију и агрегацију тромбоцита, сматра кључном у настанку ризичних поремећаја мождане циркулације које воде прекиду перфузије мозга. Повезаност АИМУ са стањима повећане активности vWF, као важног параметра функције коагулационог

система, је мало проучавана, али довољно да се истакне све већа улога овог гликопротеина у патогенези можданог удара (336, 337).

Мождано ткиво је посебно осетљиво на исхемију, јер поседује малу респираторну резерву и потпуно је зависно од аеробног метаболизма, за разлику од већине других органа. Услед одсуства оксидативног метаболизма, зауставља се производња високо енергетских једињења, као што је аденозин трифосфат (АТР), што онемогућава одвијање енергетски зависних процеса (рад јонских пумпи) неопходних за опстанак ћелија. На овај начин се покреће читав низ међусобно повезаних догађаја који у крајњем воде у оштећења и смрт ћелије.

Исхемија такође подстиче производњу слободних радикала и других реактивних врста кисеоника, потенцирајући развој оксидационог стреса и последична оштећења ћелија. Слободни радикали путем редокс сигнализације директно иницирају апоптозу неурона. Улога оксидативног стреса у оштећењу можданог ткива након АИМУ, последњих година постаје све значајнија захваљујући студијама у којима је показано да многобројни маркери оксидационог оштећења могу корелирати са степеном некрозе и прогресијом болести (338, 339). Захваљујући томе се све већа пажња посвећује примени агенаса који могу смањити дејство реактивних кисеоничних врста (везују их и инхибирају) на неуроне. У недавно спроведеним студијама је показано да антиоксидативни агенси, могу редуковати оштећења изазвана АИМУ, делујући на нивоу ендотела крвних судова мозга (340, 341, 342). Узевши у обзир етиологију настанка АИМУ-а као и круцијалну улогу L-аргинин/NO система у контроли васкуларног тонуса намеће се питање да ли овај систем може бити значајан и у механизму настанка овог стања и/или бити потенцијално ново терапијско поље? Литературни подаци који проучавају поменути проблематику су међутим оскудни и неусаглашени (343).

Развој једноставних прогностичких маркера који су корелација са исходом пацијената са АИМУ може бити од огромне користи. Како такви маркери у клиничкој пракси могу имати потенцијал за предвиђање исхода код пацијенти са АИМУ и могу бити корисни у евалуацији проучавања различитих типова терапеутских интервенција. Бројне аналитичке методе су развијене тако да се могу бити користити за предвиђање исхода АИМУ.

Хематолошке и биохемијске анализе су једноставне, јефтине и могу се рутински изводити и често понављати у болничкој клиничкој лабораторију. Хематолошки параметри се користе за дијагнозу и прогнозу бројних хематолошких као и не-хематолошких болести (344, 345, 346). Стога, као јефтине и лако доступни тестови, хематолошке и биохемијске анализе се сматрају корисним за прогнозу и могу бити огромне вредност за пацијенте са АИМУ.

Већина студија је користила хематолошке и биохемијске параметре у време пријема у болницу за предвиђање исхода код пацијената. Постоји веома мали број извештаја за предвиђање исхода након доживљеног АИМУ код ових пацијента коришћењем накнадно сакупљених узорака у различитим временским интервалима (346, 347).

5.1 ДЕМОГРАФСKE КАРАКТЕРИСТИКЕ ИСПИТАНИКА И ВРЕМЕ ПРЕЖИВЉАВАЊА

Поређење током времена у акутном исхемијском možданом удару

Није било статистички значајне разлике у погледу старости и пола између пацијената из експерименталне и контролне групе (Табела 4). На основу дистрибуције преживљавања пацијената почевши од првог до четрдесетог дана након АИМУ уочава се да је 40% испитаника преживело АИМУ (Табела 4). У групи преминулих пацијената, 20% пацијената је преминуло за мање од 3 дана након АИМУ. Највећи проценат преминулих пацијената (око 50%) је забележен седмог дана након АИМУ, док је код мање од 10% пацијената смрт наступила након 20 и више од дана од АИМУ (График 1). У студији коју су спровели *Saposnik* и сарадници смртност је била 6,9% 7-ог дана, 12,6% 30-ог дана и 23,6% годину након АИМУ. У поменутој студији рана смртност (7 дана) се односила на неуролошку смрт (а не на смрти услед компликација или других медицинских стања) и није постојала повезаност између старости или пола и ране смртности након АИМУ (348, 349). Нешто нижа смртност пацијента након АИМУ, тачније 6,8 % до 30-ог дана је забележена у студији коју су спровели *Daе-Hyun Kim* и сарадници, за разлику од распона

од 10 - 25% који је забележен у претходним студијама (349, 350, 351, 352, 353, 354). Међутим, смртност у студији коју су спровели *Saposnik* и сарадници је већа него у студији која је спроведена широм земаља Кореје (349, 355). Ова варијација може бити због старости, пола, расе, квалитета болничке неге, фактора ризика и озбиљности можданог удара међу пацијентима.

5.2 РУТИНСКИ БИОХЕМИЈСКИ ПАРАМЕТРИ

Поређење током времена у акутном исхемијском можданом удару

Повишен ниво глукозе у крви је имплициран као слаб прогностички фактор за АИМУ и хеморагични мождани удар (356, 357). Испитивања на животињама су показала погоршање исхемијске повреде услед хипергликемије (357, 358). Дијабетес предиспонира оклузивне васкуларне болести, али не и интрацеребрална крварења (357, 359). Међутим, код хеморагичних можданих удара ствара предиспозицију за већу величину хематома и повећану смртност до 30-ог дана након можданог удара (357, 360, 361). Код дијабетичара, исхемијски мождани удари су често повезани са великом величином инфаркта и лошим исходом због смањене ауторегулације и промена у згрушавању крви (357, 362). Чак и код не-дијабетичара са хипергликемијом, величина лезије и неуролошки дефицит су били гори (357, 363). Многе студије негирају прогностички значај повишеног нивоа глукозе у крви (357, 364, 365). У нашој студији нивои глукозе у крви су били статистички значајно виши код припадника експерименталне групе у односу на контролну групу (Табела 5) и статистички значајно нижи седмог него првог дана након АИМУ (Табела 8). У студији коју су спровели *Bhatia R* и сарадници, уреа у крви и нивои креатинина су били значајно виши код пацијената који су касније преминули. Високе вредности креатинина значајно су утицале на лошији исход. *Woo* и сарадници су показали да су више вредности уреје у плазми и нивои креатинина повезани са тежим можданим ударом, међутим, ови параметри немају завистан утицај на морталитет (357, 365). У нашој студији вредности уреје су биле статистички значајно више код припадника експерименталне групе у односу на контролну групу (Табела 5) и међутим није било статистички значајне разлике између вредности уреје

седмог и првог дана након АИМУ (Табела 8). Док су вредности креатинина биле статистички значајно ниже седмог него првог дана након АИМУ (Табела 8).

Хиперлипидемија је један од најзначајнијих фактора ризика за настајање исхемијског možданог удара. Више од половине пацијената са исхемијским možданим ударом истовремено имају и хиперлипидемију, и такви пацијенти имају значајно већи морталитет (84, 85). Серумски липиди су повезани са већим ризиком од АИМУ (357, 366). Инверзна повезаност постоји за укупни холестерол и излив крви на мозак. Већа смртност је примећена код хеморагијског možданог удара са нивоима холестерола испод 160 mg/dL (357, 367). У недавној студији укупни холестерол мерен унутар 24 сата је сугерисао да су виши нивои холестерола повезани са повољнијим исходом након АИМУ (357, 368). У нашој студијској популацији вредности холестерола су биле статистички значајно више код припадника експерименталне групе у односу на контролну групу (Табела 5) и статистички значајно нижи седмог него првог дана након АИМУ, док се вредности триглицерида нису статистички значајно разликовале седмог и првог дана након АИМУ (Табела 8).

Сматра се да је високо сензитивни С-реактивни протеин (енгл. *High-Sensitivity C-Reactive Protein* - hsCRP) моћнији предиктор нежељених кардиоваскуларних догађаја (инфаркт миокарда, možдани удар, изненадна смрт) од било које вредности холестерола. hsCRP је фактор ризика како за први možдани удар, тако и за настанак наредних možданих удара. hsCRP је типичан протеин акутне фазе, присутан у серуму и другим телесним течностима. Средња вредност hsCRP у плазми код здравих људи је приближно 1 mg/L и значајно се повећава, 100 или више пута у случају оштећења ткива, инфекције или запаљења (369, 370). Бројне студије су показале да се hsCRP значајно повећана код пацијената са АИМУ (370, 371, 372, 373), и да је повезан са тежином исхемичног možданог удара.

У једној студији вредност hsCRP изнад 10,1 mg/L у прва 72 сата од možданог удара указује на већу вероватноћу фаталног исхода у наредне четири године, док се у другој студији наводи да вредност hsCRP изнад 15 mg/L значајно повезана са наредним нежељеним васкуларним догађајем или смртним исходом у наредних годину дана (131-133). У нашем истраживању пацијенти из контролне групе су имали средње вредности

CRP 4,54 mg/L, док су статистички значајно више вредности CRP биле у експерименталној групи и то до десет пута више и износиле су 50,53 mg/L. Што се тиче поређења током времена, статистички значајно више вредности CRP биле седмог дана него првог дана након АИМУ (Табела 8, график 5).

5.3 БИОХЕМИЈСКИ ПАРАМЕТРИ КОАГУЛАЦИЈЕ

Поређење током времена у акутном исхемијском možданом удару

von Willebrand factor (vWF), синтетише се и складишти у ендотелијалним ћелијама и тромбоцитима, лучи се локално на месту повреде неког оштећеног крвног суда, где посредује агрегацију и адхезију тромбоцита (374, 375) Пошто се vWF повећано ослобађа када су ендотелне ћелије оштећене, предложен је као могући показатељ оштећења ендотела. Повишени плазма или ендотелни нивои vWF су посматране код плућне хипертензије, (375, 376) конгестивне срчане инсуфицијенције, (375, 377) исхемијске болести срца, (375, 378) мигрене, (375, 379) хроничне атријалне фибрилације (АФ), (375, 380) и исхемијског možданог удара, (375, 381) што значи да vWF може да има улогу у предвиђању тромбозе.

Имајући у виду значај vWf у патогенези поменутих болести, за његово испитивање су, у највећем броју радова, коришћене вредности vWfAg и vWfAg у плазми (382).

У нашем истраживању vWfAg у АИМУ је показао следећу динамику: код испитаника са АИМУ, уочене су статистички значајно ниже вредности овог параметра седмог дана у односу на први дан након АИМУ (Табела 9); истовремено, поређењем вредности између експерименталне и контролне групе добили смо статистички значајно веће вредности vWfAg у експерименталној групи (Табела 6, графикон 3). Овакви резултати би се могли објаснити чињеницом да код оболелих од АИМУ долази до повећане експресије vWfAg, који може бити маркер или последица дисфункције церебралне циркулације.

Могуће промене у хематолошким параметрима на почетку možданог удара играју важну улогу у промени церебралног протока крви (383, 384, 385, 386).

Czlonkowska и сарадници (384, 386) су показали значај хематокрита као предиктивног фактора смртности до 30. дана након можданог удара (384, 386). У другој студији, број тромбоцита добијен у року од 48 сати био је значајно мањи код пацијената са АИМУ него у контролној групи. Број тромбоцита је такође значајно нижа код пацијената који су касније преминули него код пацијента који су преживели (387).

Активација тромбоцита игра пресудну улогу у атерогенези, артеријској тромбози и стога патофизиологији исхемијског можданог удара. Активација тромбоцита резултује површинском експресијом P-селектина (CD62P) и CD40L који директно или индиректно регрутују леукоците. Ово резултује у тромбоцитно-леукоцитном агрегацијом, активирањем леукоцита и активирањем појединих реакција каскаде, ангажовањем и ендотелних и глатко-мишићних ћелија артеријског зида (388, 389). Код не-активираних тромбоцити и CD62P и CD40L молекули се експримирају на површини у малим количинама, али након активације *protease-activated receptor-1* (PAR-1) тромбином и TRAP (*trombin receptor-activating peptide*) они постају веома експримирани на површини тромбоцита (389, 390).

Физиолошка агрегација тромбоцита у TRAP тесту је између 923-1509 AU/min (агрегационе јединице у минути). У нашој студији вредности TRAP-а у контролној групи су биле физиолошке, док су у експерименталној групи вредности TRAP-а биле статистички значајно више (Табела 6, график 3). Даљом анализом вредности овог параметра запажене су статистички значајно биле више вредности TRAP-а првог него седмог дана (Табела 9, график 6). Овакав резултат је у складу са предходно рађеним студијама (389, 391, 392, 393).

Смањење вредности INR-а (*international normalized ration*) испод 2 значајно повећава ризик од настајања исхемијског можданог удара, док повећање вредности INR-а изнад 3 повећава ризик од настајања интрацеребралне хеморагије (83). У нашој студији су забележене вредности INR-а испод 2 и у експерименталној и у контролној групи, без статистички значајне разлике између ове две групе (Табела 6, график 3), статистички значајне разлике није било ни кад се пореде вредности INR-а првог и седмог дана након АИМУ (Табела 9, график 6).

Активирано парцијално тромбoplastинско време (aPTT) је индикатор који мери ефикасност и унутрашњег, и спољашњег пута коагулације крви. Вредности aPTT-а су биле статистички значајно ниже у експерименталној него у контролној групи (Табела 6, график 3), и нису показивале статистички значајне промене првог и седмог дана након АИМУ (Табела 9, график 6).

5.4 ПАРАМЕТРИ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА

Поређење током времена у акутном исхемијском možданом удару

Ако се узме у обзир комплексност дијагностиковања, лечења и рехабилитације пацијената са možданим ударом, све већа пажња је посвећена идентификацији молекула који учествују у смрти неурона и исхемијској повреди мозга. Феномен исхемије-реперфузије који се неминовно јавља у току и након блокаде церебралне перфузије, доводи до повећане генерације слободних радикала, истичући важну улогу оксидативног стреса на развој оштећења неурона (394). Ова студија је дизајниран да евалуира могуће промене у динамици маркера оксидативног стреса у току болести и њихову повезаност са клиничким исходом код пацијената са АИМУ. Одлучили смо да пратимо вредности оксидативних параметара у четири временска периода, на основу искуства већине релевантних студија (395), у циљу стварања најкомплетније слике редокс стања.

Познато је да је možдано ткиво нарочито подложно штетним ефектима слободних радикала (396). Липиди možдане ћелијске мембране су веома богати бочним ланцима незасићених масних киселина, који су посебно осетљиви на напад слободних радикала, чинећи погодну базу за липидну пероксидацију. Степен овог процеса се може оценити путем мерења индекса пероксидације липида, у овој студији изражен као TBARS.

Недавне студије су показале да су концентрације маркера липидне пероксидације биле веће код пацијената са АИМУ него у контролној групи (397). Међутим, већина ових студија не обезбеђује континуирано праћење наведених маркера, што би било од интереса пратити у погледу њихове потенцијалне прогностичке вредности. У нашој студији, осим групе пацијената који су умрли 7 дана након АИМУ, вредности TBARS су биле без значаних промена током читавог периода праћења (Табела 11). То би могло да значи да

TBARS не може бити толико осетљива маркер за предвиђање исхода, или праћење клиничког тока.

С друге стране, L-аргинин / NO је систем предложен као други параметар који има кључну улогу патофизиологији церебралне исхемијско-реперфузионе повреде (398). NO доминантно генерише ендотелна азот-моноксид синтатаза (eNOS) локализована у васкуларном ендотелу и хороидном плексусу (399). У физиолошким условима, NO је критичан за регулисање цереброваскуларне хемодинамике и експримира анти-инфламаторну, антиоксидативну и анти-коагулантну активност (400). У периоду исхемије, концентрација NO пада због недостатка кисеоника (401), док је одмах након реперфузије, биосинтеза овог молекула углавном подстакнута претераном активацијом неуралне азот-моноксид синтатаза (nNOS) (401). Подаци из литературе показали су да се концентрација NO врати на физиолошки ниво за око 1 сат после реперфузије (402) и поново се повећава због експресије iNOS између 12 сати и до 8 дана касније (403), што је значајано са аспекта поређења са овом студијом. У том смислу, приметили смо благи тренд раста од прве до последње тачке праћења (у групама пацијената који су умрли између трећег и седмог дана и 7 дана након АИМУ), што је у корелацији са наведеним налазима (403). Међутим, занимљиво је да су вредности на пријему биле највеће у групи пацијената који су умрли седам дана након АИМУ и код пацијената који су преживели указујући да у нашој студијској популацији NO може потенцијално имати заштитну улогу и тако бити у вези са бољим исходом, или чак преживљавањем (Табела 11). Овај резултат наглашава да NO може евентуално имати бољи прогностички значај у односу на TBARS. Тачан механизам кроз који NO постиже своје ефекте још увек није јасан. За сада се претпоставља да тип азот-моноксид синтатазе (NOSs) може бити одговоран за дејства NO. Нажалост не може се предвидети који облик NOSs може претежно деловати, иако су сви облици су присутни у можданом ткиву. Стога, предложено је да nNOS преовлађује током ране повреде нерава, док iNOS доприноси касној повреди нерава, док активност eNOS може бити протективна (404). Да сумирамо, да ли су ефекти NOSs корисни или штетни зависи од ћелијског одељак у коме настаје NO, од његове концентрације, редокс стања средине и од еволутивне фазе исхемијске мождане повреде (404).

Још један веома важан про-оксидативни параметар који се неизбежно производи током исхемијске повреде је O_2^- . Истраживања на животињама су предложила да

хипоксични и исхемични услови у мозгу стварају оптимално окружење за генерацију O_2^- , који представља један од најтоксичнијих ROS и самим тим доводи до ћелијских оштећења (405). Занимљиво је да готово да нема поузданих клиничка испитивања у вези са потенцијалном улогом овог молекула у патогенези исхемијског možданог удара. У овој студији смо показали да овај маркер може бити веома осетљив у смислу повезаности са исходом болести. Наиме, током периода праћења вредности O_2^- показан је благи тренд пораста у групама пацијената који су умрли (између трећег и седмог дана и 7 дана након АИМУ), док је смањен код пацијената који су преживели. Ипак, ове промене остају безначајне. Штавише, вредности на пријему су биле знатно ниже у групи са најнегативнијим исходом (смртни исход за мање од 3 дана након АИМУ) у поређењу са пацијентима који су преживели (Табела 11). То значи да иако смо могли очекивати да код пацијената који су умрли први O_2^- треба да буде виши на почетку исхемије, то није био случај у нашој студији и он је почео да се значајно повећа током периода праћења. Објашњење за овај резултат је тешко наћи. Можемо претпоставити да доминантан генератор O_2^- , NADPH оксидаза (405) постаје активна не одмах након блокаде перфузије, него сатима и данима касније.

Молекуларна интеракција између ROSs и анти-оксидативних ензима је веома комплексна и динамична. Супероксид анјон може се конвертовати посредством SOD у H_2O_2 и касније се трансформисати у токсични хидроксил радикал ($\bullet HO$), преко *Haber-Weiss* реакције, конвертован у воду посредством глутатион пероксидазе (GPx) или преведен у воду и кисеоник преко CAT (406). Претпоставља се да акумулација H_2O_2 испољава неуротоксичне ефекте иако су недавне *in vitro* студије показале било физиолошку или заштитну улогу овог молекула у мозгу (406). У нашој студији није било значајних промена током периода праћења осим у групи пацијената који су умрли у року од 3 дана након АИМУ (благо повећан ниво, али без статистичке потврде). С друге стране, вредности овог молекула нису се значајно разликовале између подгрупе умрлих или преживелих болесника (Табела 11). Овај резултат показује да H_2O_2 није довољно осетљив маркер у смислу предвиђања исхода. Насупрот томе, *Nanetti* и његова група су приметили више вредности овог молекула у раним фазама АИМУ у вези са његовом касном проценом (407). Међутим, они су пратили пацијенте у само два интервала (на пријему и

након једног месеца), а последњи интервал је био после доста дужег периода, остављајући могућност за “хватање” H_2O_2 посредством CAT и GPx.

Имајући у виду промене у производњи оксиданаса током можданог удара (394), евалуација антиоксидативног система одбране изгледа да је логичан део у склапању редокс слагалице код ових болесника. Фармаколошка испитивања на животињама показала су да антиоксидативни молекули (SOD и CAT) су у стању да прођу крвно-мождану баријеру и тиме смањују исхемијска церебрална оштећења (408). Поред тога, трансгени мишеви прекомерно експримирају SOD имају смањену величину инфаркта у поређењу са *wild-type* мишевима (409). Слично претходним случајевима, број релевантних хуманих истраживања која испитују улогу антиоксидативних молекула одбране у патогенези можданог удара је веома оскудан. *Spranger* и сарадници (410) су показали да је ниво SOD нижи код пацијената са можданим ударом него у контролној групи. У нашој студији, иако су промене значајне, у подгрупи са најнегативним исходом (умрли у року од 3 дана и између 3. и 7. дан након АИМУ) смо приметили да су оба антиоксидативна маркера (SOD и CAT) повећана током периода праћења. Повећан ниво ових ензима може бити последица активације антиоксидативне одбране као одговор на повећану производњу O_2^- у подгрупама са најгорим исходом. Имајући у виду одсуство разлика између подгрупа преминулих и преживелих пацијената можемо приметити да антиоксидативни заштита нема значајан предиктиван значај код ових пацијената. Наша открића су у корелацији са предходном поменутом студијом (395), где је такође примећена повећана антиоксидативна активност током времена.

Ова студија пружа нове увиде у редокс хомеостазу током исхемијског можданог удара који могу бити од интереса у осветљавању молекуларних механизма који су укључени у ово животно угрожавајуће стање. Посебан допринос добијених резултата може бити испитивање повезаности редокс поремећаја и клиничког исхода код ових болесника. У том смислу, наша открића су истакла да NO и O_2^- могу послужити као најрелевантнији адјувантни биомаркери за праћење напредовања болести и евалуације терапије.

VI

ЗАКЉУЧЦИ

На основу свега изложеног у овој студији можемо извести следеће закључке:

1. С обзиром да није било значајне разлике у демографским карактеристикама испитаника између контролне и експерименталне групе, можемо закључити да је укупни студијски узорак био хомоген, што је омогућило валидну интерпретацију, тумачење и анализу резултата.
2. Прва седмица након АИМУ представља временски интервал у оквиру кога постоји највећа опасност од смртног исхода. Овај податак може бити важан у временској контроли терапијских поступака и праћења ових болесника.
3. Повишене вредности свих рутинских биохемијских параметара одређиваних у групи пацијената са АИМУ показују да у патогенези исхемије централног нервног система контрибуира читав низ метаболичких поремећаја о којима се мора водити рачуна током превенције и терапије овако сложених пацијената.
4. Снижење вредности већине биохемијских маркера након АИМУ указује да они могу бити изузетно корисни у праћењу тока и прогнози овог нежељеног цереброваскуларног догађаја.
5. Резултати који се тичу динамике вредности CRP-а показују постојање и инфламацијског патофизиолошког супстрата у АИМУ, као и да овај маркер може да буде веома осетљив у предикцији акутног прекида перфузије мозга и успешности лечења истог.
6. Ова студија је потврдила да вон Вилебрандов фактор (von Willebrand factor, vWf) може да представља такође важан показатељ дисфункције церебралне циркулације, односно тока и исхода АИМУ.
7. Остали испитивани биохемијски параметри коагулације (TRAP, INR, aPTT) су показали да такође могу да буду значајни индикатори тежине клиничке слике и ефикасности терапије АИМУ.
8. NO и O₂⁻ могу послужити као најрелевантнији адјувантни биомаркери за праћење напредовања болести и евалуације терапије.
9. Параметри антиоксидативног ензимског система заштите нису показали да имају предиктиван значај код ових пацијената.

VII

ЛИТЕРАТУРА

РЕФЕРЕНЦЕ

1. Prince EA, Ahn SH. Basic vascular neuroanatomy of the brain and spine: what the general interventional radiologist needs to know. *Semin Intervent Radiol.* 2013 Sep;30(3):234-9
2. Krishnaswamy A, Klein JP, Kapadia SR. Clinical cerebrovascular anatomy. *Catheter Cardiovasc Interv* 2010;75(4):530–539
3. Geibprasert S, Pongpech S, Armstrong D, Krings T. Dangerous extracranial-intracranial anastomoses and supply to the cranial nerves: vessels the neurointerventionalist needs to know. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2009 Sep;30(8):1459-68
4. Liebeskind DS: Collateral circulation. *Stroke* 2003; 34: 2279–2284
5. Wilson SH and Lerman A. Function of Vascular Endothelium. *Heart Physiology and Pathophysiology* 2001;:27
6. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, Nishigaki I. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci.* 2013 Nov 9;9(10):1057-69.
7. Iadecola C. The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia. *Acta Neuropathol.* 2010 Sep;120(3):287-96.
8. Petty MA, Lo EH. Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation. *Prog Neurobiol.* 2002 Dec;68(5):311-23.
9. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006 Jan;7(1):41-53.
10. P Pacher, JS Beckman, L Liaudet. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007;87(1):315–424.
11. Förstermann, T Münzel. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation.* 2006;113(13):1708–14.
12. Noble MA, Munro AW, Rivers SL, Robledo L, Daff SN, Yellowlees LJ, Shimizu T, Sagami I, Guillemette JG, Chapman SK. Potentiometric analysis of the flavin cofactors of neuronal nitric oxide synthase. *Biochemistry.* 1999;38:16413–16418.

13. Stuehr D, Pou S, Rosen GM. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J Biol Chem.* 2001;276:14533–14536.
14. Zhou L, Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide.* 2009;20:223–230.
15. Melikian N, Seddon MD, Casadei B, Chowienczyk PJ, Shah AM. Neuronal nitric oxide synthase and human vascular regulation. *Trends Cardiovasc Med.* 2009;19:256–262.
16. U Förstermann, WC Sessa. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012;33(7):829–37.
17. Schwarz PM, Kleinert H, Förstermann U. Potential functional significance of brain-type and muscle-type nitric oxide synthase I expressed in adventitia and media of rat aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2584–2590.
18. Zeiher AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse R. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res.* 1995;76:980–986.
19. Arndt H, Smith CW, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell adhesion in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Hypertension.* 1993;21:667–673.
20. Mikkelsen RB, Wardman P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene.* 2003;22:5734–5754.
21. Fergus A, Lee KS. Regulation of cerebral microvessels by glutamatergic mechanisms. *Brain Res.* 1997 Apr 18;754(1-2):35-45.
22. Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA, Thompson WJ, Barres BA. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci.* 2008 Jan 2;28(1):264-78.
23. Howarth C. The contribution of astrocytes to the regulation of cerebral blood flow. *Front Neurosci.* 2014 May 9;8:103.
24. Parfenova H, Tcheranova D, Basuroy S, Fedinec AL, Liu J, Leffler CW. Functional role of astrocyte glutamate receptors and carbon monoxide in cerebral vasodilation response to glutamate. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012 Jun 1;302(11):H2257-66.
25. Leffler CW, Parfenova H, Jaggar J. Carbon monoxide as an endogenous cerebrovascular modulator. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301: H1–H11, 2011.

26. Leffler CW, Balabanova L, Fedinec AL, Parfenova H. Nitric oxide increases carbon monoxide production by piglet cerebral microvessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Oct;289(4):H1442-7.
27. Davis CM, Fairbanks SL, Alkayed NJ. Mechanism of the sex difference in endothelial dysfunction after stroke. *Transl Stroke Res.* 2013 Aug;4(4):381-9.
28. Gelderblom M, Leyboldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe CU, Siler DA, Arumugam TV, Orthey E, Gerloff C, Tolosa E, Magnus T: Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke* 2009, 40:1849–1857.
29. Lammie A: The role of oedema in lacune formation. *Cerebrovasc Dis* 1998;8:246.
30. Wardlaw JM: What causes lacunar stroke? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76:617–619.
31. Knottnerus IL, Ten Cate H, Lodder J, Kessels F, van Oostenbrugge RJ. Endothelial dysfunction in lacunar stroke: a systematic review. *Cerebrovasc Dis.* 2009;27(5):519-26.
32. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ: Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 2007;115:1285–1295.
33. Wise, R.J.; Rhodes, C.G.; Gibbs, J.M.; Hatazawa, J.; Palmer, T.; Frackowiak, R.S.; Jones, T. Disturbance of oxidative metabolism of glucose in recent human cerebral infarcts. *Ann. Neurol* 1983, 14, 627–637.
34. Hakim, A.M. The cerebral ischemic penumbra. *Can. J. Neurol Sci.* 1987, 14, 557–559.
35. Barber PA. Magnetic resonance imaging of ischemia viability thresholds and the neurovascular unit. *Sensors (Basel).* 2013 May 27;13(6):6981-7003.
36. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE 3rd. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke.* 1993 Jan;24(1):35-41.
37. Medić S. Prognostička studija akutnog ishemijskog moždanog udara [dissertation]. Medicinski fakultet; Univerzitet u Beogradu; 2012.
38. Ay H, Furie KL, Singhal A, et al. An evidence-based causative classification system for acute ischemic stroke. *Ann Neurol* 2005;58(5):688-97.
39. Amarenco P, Bogousslavsky J, Caplan LR et al. New Approach to Stroke Subtyping: The A-S-C-O (Phenotypic) Classification of Stroke. *Cerebrovasc Dis* 2009;27:502–508.

40. Ko Y, Lee S, Chung JW, Han MK, Park JM, Kang K, Park TH, Park SS, Cho YJ, Hong KS, Lee KB, Lee J, Kim DE, Kim DH, Cha JK, Kim JT, Choi JC, Shin DI, Lee JS, Lee J, Yu KH, Lee BC, Bae HJ. MRI-based Algorithm for Acute Ischemic Stroke Subtype Classification. *J Stroke*. 2014 Sep;16(3):161-72.
41. World Health Organization. Global burden of stroke. In: *Atlas of Heart Disease and Stroke*. World Health Organization, Geneva, 2004.
42. Romero JR, Morris J, Pikula A. Stroke prevention: modifying risk factors. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2008 Aug;2(4):287-303
43. Rosamond W, F. K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern SM, Ho M, Howard VKB, Kittner S, Lloyd-Jones D, McDermott M, Meigs J, Moy C, et al. Heart disease and stroke statistics—2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2008;117(4):e25–146
44. Lewington S, Clarke R, et al. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 2002;360 (9349):1903–13
45. Pires PW, Dams Ramos CM, Matin N, Dorrance AM. The effects of hypertension on the cerebral circulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013 Jun 15;304(12):H1598-614.
46. Sokolova IA, Manukhina EB, Blinkov SM, Koshelev VB, Pinelis VG, Rodionov IM. Rarefaction of the arterioles and capillary network in the brain of rats with different forms of hypertension. *Microvasc Res* 30: 1–9, 1985
47. de la Torre JC. Cardiovascular risk factors promote brain hypoperfusion leading to cognitive decline and dementia. *Cardiovasc Psychiatry Neurol* 2012: 367516, 2012
48. Laurent S, Boutouyrie P, Lacolley P. Structural and genetic bases of arterial stiffness. *Hypertension* 45: 1050 –1055, 2005
49. Harrison DG, Widder J, Grumbach I, Chen W, Weber M, Searles C. Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *J Intern Med* 2006;259:351–363
50. Peterson JR, Sharma RV, Davisson RL. Reactive oxygen species in the neuropathogenesis of hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2006;8:232–241
51. Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 2004;44:248–252.

52. Iadecola C, Davisson RL. Hypertension and cerebrovascular dysfunction. *Cell Metab.* 2008 Jun;7(6):476-84
53. Goldstein LB, Bushnell CD, Adams RJ, Appel LJ, Braun LT, Chaturvedi S, et al. Guidelines for the primary prevention of stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2011; 42:517–584
54. American Diabetes Association. [Accessed on March 30, 2011] National diabetes fact sheet. Available from <http://www.diabetes.org/diabetes-statistics.jsp>
55. Ekeh S, Blumenstock G, Willasch AM, Hub R, Ranke MB, Neu A. Continuous rise in incidence of childhood Type 1 diabetes in Germany. *Diabet Med.* 2008; 25(6):755-7
56. Almdal T, Scharling H, Jensen JS, Vestergaard H. The independent effect of type 2 diabetes mellitus on ischemic heart disease, stroke, and death: a population-based study of 13,000 men and women with 20 years of follow-up. *Arch Intern Med.* 2004; 164(13):1422–6
57. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet.* 1998; 352(9131):854–65
58. Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, Raskin P, Zinman B. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med.* 2005; 353(25):2643–53
59. Hu G, Sarti C, Jousilahti P, Peltonen M, Qiao Q, Antikainen R, Tuomilehto J. The impact of history of hypertension and type 2 diabetes at baseline on the incidence of stroke and stroke mortality. *Stroke.* 2005; 36(12):2538–43
60. Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington PN, Hitman GA, Neil HA, Livingstone SJ, Thomason MJ, Mackness MI, Charlton-Menys V, Fuller JH. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2004; 364(9435):685–96
61. Frier BM. Cognitive functioning in type 1 diabetes: the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) revisited. *Diabetologia.* 2011; 54(2):233–6

62. McCuskey PA, McCuskey RS. In vivo and electron microscopic study of the development of cerebral diabetic microangiopathy. *Microcirc Endothelium Lymphatics*. 1984; 1(2):221-44
63. Muller MD, Reed AB, Leuenberger UA, Sinoway LI. Physiology in medicine: peripheral arterial disease. *J Appl Physiol* (1985). 2013 Nov 1;115(9):1219-26
64. Ergul A, Kelly-Cobbs A, Abdalla M, Fagan SC. Cerebrovascular complications of diabetes: focus on stroke. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2012 Jun;12(2):148-58
65. Ergul A. Endothelin-1 and diabetic complications: focus on the vasculature. *Pharmacol Res*. 2011 Jun;63(6):477-82
66. Didion SP, Lynch CM, Baumbach GL, Faraci FM. Impaired endothelium-dependent responses and enhanced influence of Rho-kinase in cerebral arterioles in type II diabetes. *Stroke*. 2005; 36(2): 342-7
67. Camm AJ, Kirchhof P, Lip GY, Schotten U, Savelieva I, Ernst S et al. European Heart Rhythm Association; European Association for Cardio-Thoracic Surgery. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2010;31(19):2369-429
68. Wolf PA, Abbott RD, et al. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. *Stroke* 1991;22(8):983-8
69. Wang TJ, Massaro JM, Levy D, Vasani RS, Wolf PA, D'Agostino RB, et al. A risk score for predicting stroke or death in individuals with new-onset atrial fibrillation in the community. *JAMA* 2003;290:1049-1056
70. Murphy NF, Simpson CR, Jhund PS, Stewart S, Kirkpatrick M, Chalmers J, et al. A national survey of the prevalence, incidence, primary care burden and treatment of atrial fibrillation in Scotland. *Heart* 2007;93:606-612
71. Kim CK, Jung S, Yoon BW. Practical Issues to Prevent Stroke Associated with Non-valvular Atrial Fibrillation. *J Stroke*. 2013 Sep;15(3):144-52
72. Sanders P, Morton JB, Kistler PM, Vohra JK, Kalman JM, Sparks PB. Reversal of atrial mechanical dysfunction after cardioversion of atrial fibrillation: implications for the

- mechanisms of tachycardia-mediated atrial cardiomyopathy. *Circulation* 2003;108:1976–84
73. Watson T, Shantsila E, Lip GYH. Mechanisms of thrombogenesis in atrial fibrillation: Virchow's triad revisited. *Lancet* 2009;373:155–66
74. Stuhlinger MC, Oka RK, Graf EE, et al. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2003;108:933–8
75. Lim HS, Willoughby SR, Schultz C, Gan C, Alasady M, Lau DH, Leong DP, Brooks AG, Young GD, Kistler PM, Kalman JM, Worthley MI, Sanders P. Effect of atrial fibrillation on atrial thrombogenesis in humans: impact of rate and rhythm. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Feb 26;61(8):852-60
76. Willoughby SR, Roberts-Thomson RL, Lim HS, et al. Atrial platelet reactivity in patients with atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2010;7: 1178–83
77. Goette A, Hammwöhner M, Bukowska A, et al. The impact of rapid atrial pacing on ADMA and endothelial NOS. *Int J Cardiol* 2012; 154:141–6
78. Rotter M, Jais P, Vergnes MC, et al. Decline in C-reactive protein after successful ablation of long-lasting persistent atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:1231–3
79. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998;391:591–4
80. Wasilewska M, Gosk-Bierska I. Thromboembolism associated with atrial fibrillation as a cause of limb and organ ischemia. *Adv Clin Exp Med*. 2013 Nov-Dec;22(6):865-73
81. McBane RD, Hodge DO, Wysokinski WE: Clinical and echocardiographic measures governing thromboembolism destination in atrial fibrillation. *J Thromb Haemost* 2008, 99, 951–955
82. Petty GW, Brown RD, Whisnant JP, Sicks JD, Fallon WM, Wiebers DO: Ischemic stroke subtypes: a populationbased study of functional outcome, survival, and recurrence. *Stroke* 2000, 31, 1062–1068
83. Levine MN, Raskob G, et al. Hemorrhagic complications of anticoagulant treatment: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004;126(3 Suppl):287S–310S

84. Hermann DM, Chopp M. Promoting brain remodeling and plasticity for stroke recovery: therapeutic potential, caveats and consequences for clinical translation. *Lancet Neurol.* 2012; 11:369–380
85. Horenstein RB, Smith DE, Mosca L. Cholesterol predicts stroke mortality in the Women’s Pooling Project. *Stroke.* 2002;33:1863–1868
86. Endres M. Statins and stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25(9):1093–110.
87. Vaughan CJ, Delanty N, Basson CT. Statin therapy and stroke prevention. *Curr Opin Cardiol.* 2001;16:219–224
88. ElAli A, Doeppner TR, Zechariah A, Hermann DM. Increased bloodbrain barrier permeability and brain edema after focal cerebral ischemia induced by hyperlipidemia: role of lipid peroxidation and calpain-1/2, matrix metalloproteinase-2/9, and RhoA overactivation. *Stroke.* 2011;42:3238–3244
89. Osto E, Matter CM, Kouroedov A, Malinski T, Bachschmid M, Camici GG, Kilic U, Stallmach T, Boren J, Iliceto S, Lüscher TF, Cosentino F. c-Jun N-terminal kinase 2 deficiency protects against hypercholesterolemia-induced endothelial dysfunction and oxidative stress. *Circulation.* 2008;118:2073–2080
90. Curtiss LK, Boisvert WA. Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2000 Jun;11(3):243-51
91. Meir KS, Leitersdorf E. Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Jun;24(6):1006-14
92. Kitayama J, Faraci FM, Lentz SR, Heistad DD. Cerebral vascular dysfunction during hypercholesterolemia. *Stroke* 2007; 38: 2136–2141.
93. Ishikawa M, Stokes KY, Zhang JH, Nanda A, Granger DN. Cerebral microvascular responses to hypercholesterolemia: roles of NADPH oxidase and P-selectin. *Circ Res* 2004; 94: 239–24
94. Ayata C, Shin HK, Dileköz E, Atochin DN, Kashiwagi S, Eikermann-Haerter K, Huang PL. Hyperlipidemia disrupts cerebrovascular reflexes and worsens ischemic perfusion defect. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013 Jun;33(6):954-62
95. Galle J, Mameghani A, Bolz SS, Gambaryan S, Gorg M, Quaschnig T et al. Oxidized LDL and its compound lysophosphatidylcholine potentiate AngII-induced vasoconstriction by stimulation of RhoA. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1471–1479

96. Shinton R, Beevers G. Meta-analysis of relation between cigarette smoking and stroke. *BMJ*. 1989 Mar 25;298(6676):789-94
97. Mazzone P, Tierney W, Hossain M, Puvenna V, Janigro D, Cucullo L. Pathophysiological impact of cigarette smoke exposure on the cerebrovascular system with a focus on the blood-brain barrier: expanding the awareness of smoking toxicity in an underappreciated area. *Int J Environ Res Public Health*. 2010 Dec;7(12):4111-26
98. DeMarini DM. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat Res*. 2004 Nov;567(2-3):447-74
99. Kong Q, Lin CL. Oxidative damage to RNA: mechanisms, consequences, and diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2010 Jun;67(11):1817-29
100. Kaplanski G, Marin V, Fabrigoule M, Boulay V, Benoliel AM, Bongrand P, Kaplanski S, Farnarier C. Thrombin-activated human endothelial cells support monocyte adhesion in vitro following expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1; CD106). *Blood*. 1998 Aug 15;92(4):1259-67
101. Nordskog BK, Blixt AD, Morgan WT, Fields WR, Hellmann GM. Matrix-degrading and pro-inflammatory changes in human vascular endothelial cells exposed to cigarette smoke condensate. *Cardiovasc Toxicol*. 2003;3(2):101-17
102. Girdhar G, Xu S, Jesty J, Bluestein D. In vitro model of platelet-endothelial activation due to cigarette smoke under cardiovascular circulation conditions. *Ann Biomed Eng*. 2008 Jul;36(7):1142-51
103. Barua RS, Ambrose JA. Mechanisms of coronary thrombosis in cigarette smoke exposure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Jul;33(7):1460-7
104. Gkaliagkousi E, Ritter J, Ferro A. Platelet-derived nitric oxide signaling and regulation. *Circ Res*. 2007 Sep 28;101(7):654-62
105. Matsuzawa Y. Establishment of a concept of visceral fat syndrome and discovery of adiponectin. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2010;86(2):131-41
106. Oliveira GB, França JÍ, Piegas LS. Serum adiponectin and cardiometabolic risk in patients with acute coronary syndromes. *Arq Bras Cardiol*. 2013 Nov;101(5):399-409
107. Hui X, Lam KS, Vanhoutte PM, Xu A. Adiponectin and cardiovascular health: an update. *Br J Pharmacol*. 2012 Feb;165(3):574-90

108. Anfossi G, Russo I, Doronzo G, Pomero A, Trovati M. Adipocytokines in atherothrombosis: focus on platelets and vascular smooth muscle cells. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:174341
109. Anfossi G, Russo I, Trovati M. Platelet dysfunction in central obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2009 Jul;19(6):440-9
110. Vizioli L, Muscari S, Muscari A. The relationship of mean platelet volume with the risk and prognosis of cardiovascular diseases. *Int J Clin Pract.* 2009 Oct;63(10):1509-15
111. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996 Nov;271(5 Pt 1):C1424-37
112. Hankey GJ. Potential new risk factors for ischemic stroke: what is their potential? *Stroke.* 2006 Aug;37(8):2181-8
113. Graham IM, O'Callaghan P. Vitamins, homocysteine and cardiovascular risk. *Cardiovasc Drugs Ther* 2002;16:383-389
114. Kulkarni K, Richard BC. Lifestyle, homocysteine, and the metabolic syndrome. *Metab Syndr Relat Disord.* 2003 Jun;1(2):141-7
115. Di Santolo M, Banfi G, Stel G, Cauci S. Association of recreational physical activity with homocysteine, folate and lipid markers in young women. *Eur J Appl Physiol.* 2009 Jan;105(1):111-8
116. Tacconelli S, Capone ML, Patrignani P. Measurement of 8-iso-prostaglandin F2alpha in biological fluids as a measure of lipid peroxidation. *Methods Mol Biol.* 2010;644:165-78
117. Sen S, Reddy PL, Grewal RP, Busby M, Chang P, Hinderliter A. Hyperhomocysteinemia is Associated with Aortic Atheroma Progression in Stroke/TIA Patients. *Front Neurol.* 2010 Nov 26;1:131
118. Ansari R, Mahta A, Mallack E, Luo JJ. Hyperhomocysteinemia and neurologic disorders: a review. *J Clin Neurol.* 2014 Oct;10(4):281-8
119. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and stroke. *Lancet.* 2005; 365:194–196
120. Kalani A, Kamat PK, Tyagi SC, Tyagi N. Synergy of homocysteine, microRNA, and epigenetics: a novel therapeutic approach for stroke. *Mol Neurobiol.* 2013 Aug;48(1):157-68

121. Manolescu BN, Oprea E, Farcasanu IC, Berteanu M, Cercasov C. Homocysteine and vitamin therapy in stroke prevention and treatment: a review. *Acta Biochim Pol.* 2010;57(4):467-77
122. Jakubowski H. Homocysteine is a protein amino acid in humans. Implications for homocysteine-linked disease. *J Biol Chem.* 2002 Aug 23;277(34):30425-8
123. Khera A, de Lemos JA, Peshock RM, Lo HS, Stanek HG, Murphy SA, Wians FH Jr, Grundy SM, McGuire DK. Relationship between C-reactive protein and subclinical atherosclerosis: the Dallas Heart Study. *Circulation.* 2006 Jan 3;113(1):38-43
124. Lombardo A, Biasucci LM, Lanza GA, Coli S, Silvestri P, Cianflone D, Liuzzo G, Burzotta F, Crea F, Maseri A. Inflammation as a possible link between coronary and carotid plaque instability. *Circulation.* 2004 Jun 29;109(25):3158-63
125. Norata GD, Marchesi P, Pulakazhi Venu VK, Pasqualini F, Anselmo A, Moalli F, Pizzitola I, Garlanda C, Mantovani A, Catapano AL. Deficiency of the long pentraxin PTX3 promotes vascular inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2009 Aug 25;120(8):699-708
126. Yousuf O, Mohanty BD, Martin SS, Joshi PH, Blaha MJ, Nasir K, Blumenthal RS, Budoff MJ. High-sensitivity C-reactive protein and cardiovascular disease: a resolute belief or an elusive link? *J Am Coll Cardiol.* 2013 Jul 30;62(5):397-408
127. Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, Shaul P, Jialal I. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation* 2002;106:1439– 41
128. Devaraj S, Singh U, Jialal I. The evolving role of C-reactive protein in atherothrombosis. *Clin Chem.* 2009 Feb;55(2):229-38
129. Khreiss T, Jozsef L, Potempa LA, Filep JG. Conformational rearrangement in C-reactive protein is required for proinflammatory actions on human endothelial cells. *Circulation.* 2004;109:2016 –2022
130. Eisenhardt SU, Habersberger J, Murphy A, Chen YC, Woollard KJ, Bassler N, Qian H, von Zur Muhlen C, Hagemeyer CE, Ahrens I, Chin-Dusting J, Bobik A, Peter K. Dissociation of pentameric to monomeric C-reactive protein on activated platelets localizes inflammation to atherosclerotic plaques. *Circ Res.* 2009 Jul 17;105(2):128-37

131. Muir KW, Weir CJ, Alwan W, et al. C-reactive protein and outcome after ischemic stroke. *Stroke* 1999;30:981-985
132. Winbeck K, Poppert H, Etgen T, et al. Prognostic relevance of early serial C-reactive protein measurements after first ischemic stroke. *Stroke* 2002;33:2459-2464
133. Kidd PM. Integrated brain restoration after ischemic stroke—medical management, risk factors, nutrients, and other interventions for managing inflammation and enhancing brain plasticity. *Altern Med Rev.* 2009 Mar;14(1):14-35
134. Boullier A, Bird DA, Chang MK, et al. Scavenger receptors, oxidized LDL, and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001;947:214–22
135. Malaguarnera M, Vacante M, Avitabile T, Malaguarnera M, Cammalleri L, Motta M. L-Carnitine supplementation reduces oxidized LDL cholesterol in patients with diabetes. *Am J Clin Nutr.* 2009 Jan;89(1):71-6
136. Jiang, R., Schulze, M.B., Li, T., Rifai, N., Stampfer, M.J., Rimm, E.B., Has, B., 2004. Non-HDL cholesterol and apolipoprotein B predict cardiovascular disease events among men with Type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27, 1991– 1997
137. Haas ME, Attie AD, Biddinger SB. The regulation of ApoB metabolism by insulin. *Trends Endocrinol Metab.* 2013 Aug;24(8):391-7
138. Gursky O. Crystal structure of $\Delta(185-243)$ ApoA-I suggests a mechanistic framework for the protein adaptation to the changing lipid load in good cholesterol: from flatland to sphereland via double belt, belt buckle, double hairpin and trefoil/tetrafoil. *J Mol Biol.* 2013 Jan 9;425(1):1-16
139. Lima LM, Carvalho Md, Sousa MO. Apo B/apo A-I ratio and cardiovascular risk prediction. *Arq Bras Cardiol.* 2007 Jun;88(6):e187-90
140. McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science* 2007;316:1488–1491
141. Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, et al. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med* 2007;357:443–453
142. Helgadottir A, Thorleifsson G, Manolescu A, et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science* 2007;316:1491–1493
143. Gschwendtner A, Bevan S, Cole JW, et al. Sequence variants on chromosome 9p21.3 confer risk for atherosclerotic stroke. *Ann Neurol* 2009;65:531–539.

144. Monet-Lepretre M, Bardot B, Lemaire B, et al. Distinct phenotypic and functional features of CADASIL mutations in the Notch3 ligand binding domain. *Brain* 2009;132(Pt 6):1601–1612
145. Hara K, Shiga A, Fukutake T, et al. Association of HTRA1 mutations and familial ischemic cerebral small-vessel disease. *N Engl J Med* 2009;360:1729–1739
146. Meschia JF. New information on the genetics of stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2011 Feb;11(1):35-41
147. Mykkanen K, Junna M, Amberla K, et al. Different clinical phenotypes in monozygotic CADASIL twins with a novel NOTCH3 mutation. *Stroke* 2009;40:2215–2218.
148. Yasuno K, Bilguvar K, Bijlenga P, et al. Genome-wide association study of intracranial aneurysm identifies three new risk loci. *Nat Genet* 2010;42:420–425
149. Lindsberg P, Grau AJ. Inflammation and infections as risk factors for ischemic stroke. *Stroke.* 2003;34:2518 –2532
150. Heuschmann PU, Neureiter D, Gesslein M, Craiovan B, Maass M, Faller G, Beck G, Neundoerfer B, Kolominsky-Rabas PL: Association between infection with helicobacter pylori and chlamydia pneumoniae and risk of ischemic stroke subtypes: results from a population-based case–control study. *Stroke* 2001, 32(10):2253–2258
151. Taylor-Robinson D, Thomas BJ. Chlamydia pneumoniae in arteries: the facts, their interpretation, and future studies. *J Clin Pathol.* 1998;51:793–797
152. Kēniņa V, Auce P, Millers A. The relationship between seropositivity against Chlamydia pneumoniae and stroke and its subtypes in a Latvian population. *Medicina (Kaunas).* 2011;47(12):657-60
153. Tremolada S, Delbue S, Ferrareso M, Carloni C, Elia F, Larocca S, et al. Search for genomic sequences of microbial agents in atherosclerotic plaques. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2011;24(1):243-6
154. Tanne D, Haim M, Boyko V, Goldbourt U, Reshef T, Adler Y, et al. Prospective study of Chlamydia pneumoniae IgG and IgA seropositivity and risk of incident ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2003;16(2):166-70
155. Voorend M, van der Ven AJ, Kubat B, Lodder J, Bruggeman CA. Limited role for C. pneumoniae, CMV and HSV-1 in cerebral large and small vessel atherosclerosis. *Open Neurol J* 2008;2:39-44

156. Grayston JT, Kuo C-C, Wang S-P, et al. A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infections. *N Engl J Med* 1986;315:161–8
157. Murray LJ, O'Reilly DP, Ong GM, O'Neill C, Evans AE, Bamford KB. *Chlamydia pneumoniae* antibodies are associated with an atherogenic lipid profile. *Heart*. 1999 Mar;81(3):239-44
158. Xu Q, Willeit J, Marosi M, Kleindienst R, Oberhollenzer F, Kiechl S, Stulnig T, Luef G, Wick G. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis. *Lancet*. 1993 Jan 30;341(8840):255-9
159. Alvarez-Arellano L, Maldonado-Bernal C. *Helicobacter pylori* and neurological diseases: Married by the laws of inflammation. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2014 Nov 15;5(4):400-4
160. Majka J, Róg T, Konturek PC, Konturek SJ, Bielański W, Kowalsky M, Szczudlik A. Influence of chronic *Helicobacter pylori* infection on ischemic cerebral stroke risk factors. *Med Sci Monit* 2002; 8: CR675-CR684
161. Sealy-Jefferson S, Gillespie BW, Aiello AE, Haan MN, Morgenstern LB, Lisabeth LD. Antibody levels to persistent pathogens and incident stroke in Mexican Americans. *PLoS One*. 2013 Jun 14;8(6):e65959
162. Mayr M, Kiechl S, Willeit J, Wick G, Xu Q. Infections, immunity, and atherosclerosis: associations of antibodies to *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, and cytomegalovirus with immune reactions to heat-shock protein 60 and carotid or femoral atherosclerosis. *Circulation*. 2000 Aug 22;102(8):833-9
163. Goldhaber SZ, Bounameaux H. Pulmonary embolism and deep vein thrombosis. *Lancet*. 2012 May 12;379(9828):1835-46
164. Reininger AJ (2008) Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis. *Haemophilia* 14(Suppl 5):11–26
165. Denis CV, Lenting PJ. von Willebrand factor: at the crossroads of bleeding and thrombosis. *Int J Hematol*. 2012 Apr;95(4):353-61
166. Dmitrieva NI, Burg MB. Secretion of von Willebrand factor by endothelial cells links sodium to hypercoagulability and thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Apr 29;111(17):6485-90

167. Zadro R, Herak DC. Inherited prothrombotic risk factors in children with first ischemic stroke. *Biochem Med (Zagreb)*. 2012;22(3):298-310
168. Yamamoto K, Loskutoff DJ. Extrahepatic expression and regulation of protein C in the mouse. *Am. J. Pathol.* 1998; 153:547–555
169. Deane R, et al. Endothelial protein C receptor-assisted transport of activated protein C across the mouse blood-brain barrier. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2009; 29:25–33
170. Zlokovic BV, Griffin JH. Cytoprotective protein C pathways and implications for stroke and neurological disorders. *Trends Neurosci.* 2011 Apr;34(4):198-209
171. Hackeng TM, Rosing J. Protein S as cofactor for TFPI. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Dec;29(12):2015-20
172. Soare AM, Popa C. Deficiencies of proteins C, S and antithrombin and factor V Leiden and the risk of ischemic strokes. *J Med Life.* 2010 Jul-Sep;3(3):235-8
173. Liumbruno GM, Franchini M, Lanzoni M, Candura F, Vaglio S, Profili S, Catalano L, Facco G, Pupella S, Calizzani G, Grazzini G. Clinical use and the Italian demand for antithrombin. *Blood Transfus.* 2013 Sep;11 Suppl 4:s86-93
174. Franchini M, Veneri D, Salvagno GL, et al. Inherited thrombophilia. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2006; 43: 249-90
175. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood.* 1996;88:3698–3703
176. Cucchiara BL. Evaluation and management of stroke. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009:293-301
177. Ovbiagele B. Microalbuminuria: risk factor and potential therapeutic target for stroke? *J Neurol Sci.* 2008;271:21–28
178. Lee M, Saver JL, Chang KH, Ovbiagele B. Level of albuminuria and risk of stroke: systematic review and meta-analysis. *Cerebrovasc Dis.* 2010;30(5):464-9
179. Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JF: Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation* 2007; 116: 85–97
180. Stoian I, Oros A, Moldoveanu E. Apoptosis and free radicals. *Biochem Mol Med.* 1996 Dec;59(2):93-7.

181. Đukić M, Ninković M, Jovanović M. Oxidative stress: Clinical diagnostic significance. *Journal of Medical Biochemistry* 2008;27(4):409-425
182. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human diseases: Curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994;344: 721–4
183. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int.* 2014;2014:761264
184. Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest.* 2001 Jan;107(1):7-11
185. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood.* 1998 Nov 1;92(9):3007-17
186. Romero MM, Basile JI, López B, Ritacco V, Barrera L, Sasiain Mdel C, Alemán M. Outbreaks of *Mycobacterium tuberculosis* MDR strains differentially induce neutrophil respiratory burst involving lipid rafts, p38 MAPK and Syk. *BMC Infect Dis.* 2014 May 16;14:262
187. Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 1997 Jan 3;272(1):217-21
188. Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Sep 29;95(20):11715-20
189. Chandel NS. Mitochondria as signaling organelles. *BMC Biol.* 2014 May 27;12:34.
190. Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT. Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol.* 2000 Jul 15;165(2):1013-21
191. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M. Free radicals metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160(1): 1-40
192. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem.* 1997 Aug 22;272(34):20963-6
193. Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med.* 2000 Jun 15;28(12):1815-26

194. Anavi S, Ni Z, Tirosh O, Fedorova M. Steatosis-induced proteins adducts with lipid peroxidation products and nuclear electrophilic stress in hepatocytes. *Redox Biol.* 2014 Dec 24;4C:158-168
195. Lonkar P, Dedon PC. Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: reconciling chemical mechanisms and biological fates. *Int J Cancer.* 2011 May 1;128(9):1999-2009
196. Bartsch H, Nair J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbecks Arch Surg.* 2006 Sep;391(5):499-510
197. Ohshima H, Bartsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res.* 1994 Mar 1;305(2):253-64
198. Linhart K, Bartsch H, Seitz HK. The role of reactive oxygen species (ROS) and cytochrome P-450 2E1 in the generation of carcinogenic etheno-DNA adducts. *Redox Biol.* 2014;3C:56-62
199. Kim H, Won SJ, Fabian C, Kang M, Szardenings M, Shin M. Mitochondrial DNA Aberrations and Pathophysiological Implications in Hematopoietic Diseases, Chronic Inflammatory Diseases, and Cancers. *Ann Lab Med.* 2015 Jan;35(1):1-14
200. Stadtman ER, Van Rommer H, Richardson A, Wehr NB, Levine RL. Methionine oxidation and aging. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1703 (2): 135–40
201. Duncan MW. A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine. *Amino Acids.* 2003 Dec;25(3-4):351-61
202. Ho E, Karimi Galougahi K, Liu CC, Bhindi R, Figtree GA. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol.* 2013 Oct 8;1(1):483-91
203. Duan J, Kasper DL. Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen/nitrogen species. *Glycobiology.* 2011 Apr;21(4):401-9
204. Ishii T, Miyazawa M, Hartman PS, Ishii N. Mitochondrial superoxide anion (O₂⁻) inducible "mev-1" animal models for aging research. *BMB Rep.* 2011 May;44(5):298-305

205. Han D, Williams E, Cadenas E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem. J* 2001;353:411–416
206. St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ and Brand MD (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 277(47):44784–44790
207. Liu Y, Zhao H, Li H, Kalyanaraman B, Nicolosi AC, Gutterman DD. Mitochondrial sources of H₂O₂ generation play a key role in flow-mediated dilation in human coronary resistance arteries. *Circ Res.* 2003 Sep 19;93(6):573-80
208. Lassègue B, Griendling KK. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Apr;30(4):653-61
209. Pelletier M, Lepow TS, Billingham LK, Murphy MP, Siegel RM. New tricks from an old dog: mitochondrial redox signaling in cellular inflammation. *Semin Immunol.* 2012 Dec;24(6):384-92
210. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007; 87:245-313
211. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4:181-189
212. Cantu-Medellin N, Kelley EE. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. *Redox Biol.* 2013 Jun 10;1(1):353-8
213. Wang Y, Casero RA Jr. Mammalian polyamine catabolism: a therapeutic target, a pathological problem, or both? *J Biochem.* 2006; 139:17–25
214. Zangar RC, Davydov DR, Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004; 199:316–331
215. Di Lisa F, Kaludercic N, Carpi A, Menabo R, Giorgio M. Mitochondrial pathways for ROS formation and myocardial injury: the relevance of p66(Shc) and monoamine oxidase. *Basic Res Cardiol.* 2009; 104:131–139
216. Premkumar K, Min K, Alkan Z, Hawkes WC, Ebeler S, Bowlus CL. The potentiating and protective effects of ascorbate on oxidative stress depend upon the concentration of dietary iron fed C3H mice. *J Nutr Biochem.* 2007;18:272–278

217. Balagopalakrishna C, Abugo OO, Horsky J, Manoharan PT, Nagababu E, Rifkind JM. Superoxide produced in the heme pocket of the beta-chain of hemoglobin reacts with the beta-93 cysteine to produce a thiyl radical. *Biochemistry*. 1998 Sep 22;37(38):13194-202
218. Riley PA. Free radicals in biology: Oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*. 1994; 65:27-33
219. Huang XJ, Song CX, Zhong CQ, Wang FS. Research progress in the radioprotective effect of superoxide dismutase. *Drug Discov Ther*. 2012 Aug;6(4):169-77
220. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science*. 1978 Sep 8;201(4359):875-80
221. Pall ML. The NO/ONOO-cycle as the central cause of heart failure. *Int J Mol Sci*. 2013 Nov 13;14(11):22274-330
222. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot*. 2003 Jan;91 Spec No:179-94
223. Haber F, Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc Lond A* 1934; 147: 332–51
224. Repine JE, Fox RB, Berger EM. Hydrogen peroxide kills *Staphylococcus aureus* by reacting with staphylococcal iron to form hydroxyl radical. *J Biol Chem* 1981; 256: 7094–6
225. Linley E, Denyer SP, McDonnell G, Simons C, Maillard JY. Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Jul;67(7):1589-96
226. Haskew-Layton RE, Payappilly JB, Smirnova NA, Ma TC, Chan KK, Murphy TH, Guo H, Langley B, Sultana R, Butterfield DA, Santagata S, Alldred MJ, Gazaryan IG, Bell GW, Ginsberg SD, Ratan RR. Controlled enzymatic production of astrocytic hydrogen peroxide protects neurons from oxidative stress via an Nrf2-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Oct 5;107(40):17385-90
227. Murphy MP, Holmgren A, Larsson NG, Halliwell B, Chang CJ, Kalyanaraman B, Rhee SG, Thornalley PJ, Partridge L, Gems D, Nyström T, Belousov V, Schumacker PT, Winterbourn CC. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab*. 2011 Apr 6;13(4):361-6

228. Collins Y, Chouchani ET, James AM, Menger KE, Cocheme HM, Murphy MP. Mitochondrial redox signalling at a glance. *Journal of cell science*. 2012; 125:801–806
229. Burke TM, Wolin MS. Hydrogen peroxide elicits pulmonary arterial relaxation and guanylate cyclase activation. *Am J Physiol*. 1987 Apr;252(4 Pt 2):H721-32
230. Heffetz D, Zick Y. H₂O₂ potentiates phosphorylation of novel putative substrates for the insulin receptor kinase in intact Fao cells. *J Biol Chem*. 1989 Jun 15;264(17):10126-32
231. Burdon RH, Rice-Evans C. Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation. *Free Radic Res Commun*. 1989;6(6):345-58
232. Rhee SG. Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science*. 2006 Jun 30;312(5782):1882-3
233. Cao Z, Lindsay JG, Isaacs NW. Mitochondrial peroxiredoxins. *Subcell Biochem*. 2007; 44:295-315
234. Smith EB. Fibrin deposition and fibrin degradation products in atherosclerotic plaques. *Thromb Res*. 1994 Aug 1;75(3):329-35
235. Costantini V, Zacharski LR, Memoli VA, Kisiel W, Kudryk BJ, Rousseau SM. Fibrinogen deposition without thrombin generation in primary human breast cancer tissue. *Cancer Res*. 1991 Jan 1;51(1):349-53
236. Mantovani G, Macciò A, Madeddu C, Mura L, Gramignano G, Lusso MR, Massa E, Mocchi M, Serpe R. Antioxidant agents are effective in inducing lymphocyte progression through cell cycle in advanced cancer patients: assessment of the most important laboratory indexes of cachexia and oxidative stress. *J Mol Med (Berl)*. 2003 Oct;81(10):664-73
237. Jayasena T, Grant RS, Keerthisinghe N, Solaja I, Smythe GA. Membrane permeability of redox active metal chelators: an important element in reducing hydroxyl radical induced NAD⁺ depletion in neuronal cells. *Neurosci Res*. 2007 Mar;57(3):454-61
238. Warner DS, Sheng H, Batinić-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol*. 2004 Aug;207(Pt 18):3221-31
239. Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) *Free radicals in biology and medicine*: Oxford University Press

240. Tirzitis G, Bartosz G. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochim Pol.* 2010;57(2):139-42
241. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006 Jun;141(2):312-22
242. Yasui H, Hayashi S, Sakurai H. Possible involvement of singlet oxygen species as multiple oxidants in p450 catalytic reactions. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2005 Feb;20(1):1-13
243. Foote CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol.* 1991 Nov;54(5):659
244. Ishihara M, Fujisawa S. Review. Photooxygenation, photodegradation and antioxidative activity of platonin, a cyanine photosensitizing dye. *In Vivo.* 2007 Mar-Apr;21(2):163-73
245. Holt NE, Zigmantas D, Valkunas L, Li XP, Niyogi KK, Fleming GR. Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting. *Science.* 2005 Jan 21;307(5708):433-6
246. Reiter RJ, Tan DX, Qi WB. Suppression of oxygen toxicity by melatonin. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* 1998 Nov;19(6):575-81
247. Lamberti MJ, Vittar NB, Rivarola VA. Breast cancer as photodynamic therapy target: Enhanced therapeutic efficiency by overview of tumor complexity. *World J Clin Oncol.* 2014 Dec 10;5(5):901-7
248. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res.* 1998 Aug;39(8):1529-42
249. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 1984 Apr 1;219(1):1-14
250. Fridovich SE, Porter NA. Oxidation of arachidonic acid in micelles by superoxide and hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 1981 Jan 10;256(1):260-5
251. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991;11(1):81-128
252. Popa-Wagner A, Mitran S, Sivanesan S, Chang E, Buga AM. ROS and brain diseases: the good, the bad, and the ugly. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:963520

253. Chen CT, et al. Regulation of brain polyunsaturated fatty acid uptake and turnover. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2008; 79(3–5):85–91
254. Mangge H, Becker K, Fuchs D, Gostner JM. Antioxidants, inflammation and cardiovascular disease. *World J Cardiol*. 2014 Jun 26;6(6):462-77
255. Wink DA, Vodovotz Y, Grisham MB, DeGraff W, Cook JC, Pacelli R, Krishna M, Mitchell JB. Antioxidant effects of nitric oxide. *Methods Enzymol*. 1999;301:413-24
256. Heba G, Krzeminski T, Porc M, et al. Relation between expression of TNF alpha, iNOS, VEGF mRNA and development of heart failure after experimental myocardial infarction in rats. *J Physiol Pharmacol* 2001; 52: 39-52
257. Xie Q, Nathan C. The high-output nitric oxide pathway: Role and regulation. *J Leukocyte Biol* 1994; 56: 576-582
258. Guzik TJ, Korbout R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol*. 2003 Dec;54(4):469-87
259. Ischiropoulos H, al-Mehdi AB. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett* 1995; 364: 279-282
260. Ferrer-Sueta G, Radi R. Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem Biol*. 2009 Mar 20;4(3):161-77
261. Radi R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *J Biol Chem*. 2013 Sep 13;288(37):26464-72
262. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Feb;87(4):1620-4
263. Squadrito GL, Cueto R, Splenser AE, Valavanidis A, Zhang H, Uppu RM, Pryor WA. Reaction of uric acid with peroxynitrite and implications for the mechanism of neuroprotection by uric acid. *Arch Biochem Biophys*. 2000 Apr 15;376(2):333-7
264. Denicola A, Freeman BA, Trujillo M, Radi R. Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch Biochem Biophys*. 1996 Sep 1;333(1):49-58
265. Cabrales P, Friedman JM. HBOC vasoactivity: interplay between nitric oxide scavenging and capacity to generate bioactive nitric oxide species. *Antioxid Redox Signal*. 2013 Jun 10;18(17):2284-97

266. Peng C, Wang X, Chen J, Jiao R, Wang L, Li YM, Zuo Y, Liu Y, Lei L, Ma KY, Huang Y, Chen ZY. Biology of ageing and role of dietary antioxidants. *Biomed Res Int.* 2014;2014:831841
267. Klug D, Rabani J, Fridovich I. A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. *J Biol Chem* 1972;247:4839–4842
268. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 1975;44:147-59
269. Bowler C, Van Montague M, Inze D (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43:83-116
270. Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem.* 1987;22(2):111-80
271. Banerjee M, Vats P. Reactive metabolites and antioxidant gene polymorphisms in Type 2 diabetes mellitus. *Redox Biol.* 2013 Dec 11;2C:170-177
272. Leopold JA, Loscalzo J. Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med.* 2009 Dec 15;47(12):1673-706
273. Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Dec;79(24):7634-8
274. Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med.* 2009 Aug 15;47(4):344-56
275. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 1995;11:376–381
276. Oberley LW. Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomed Pharmacother* 2005;59:143–148
277. Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, Capanec C, Pessayre D, Degoul F. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics* 2003;13:145–157
278. Wheatley-Price P, Asomaning K, Reid A, Zhai R, Su L, Zhou W, Zhu A, Ryan DP, Christiani DC, Liu G. Myeloperoxidase and superoxide dismutase polymorphisms are

- associated with an increased risk of developing pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2008;112:1037–1042
279. Liu G, Zhou W, Park S, Wang LI, Miller DP, Wain JC, Lynch TJ, Su L, Christiani DC. The SOD2 Val/Val genotype enhances the risk of nonsmall cell lung carcinoma by p53 and XRCC1 polymorphisms. *Cancer* 2004;101:2802–2808
280. Woodson K, Tangrea JA, Lehman TA, Modali R, Taylor KM, Snyder K, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) polymorphism, alpha-tocopherol supplementation and prostate cancer risk in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study (Finland). *Cancer Causes Control* 2003;14:513–518
281. Olson SH, Carlson MD, Ostrer H, Harlap S, Stone A, Winters M, Ambrosone CB. Genetic variants in SOD2, MPO, and NQO1, and risk of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2004;93:615–620
282. Kakko S, Päivänsalo M, Koistinen P, Kesäniemi YA, Kinnula VL, Savolainen MJ. The signal sequence polymorphism of the MnSOD gene is associated with the degree of carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2003 May;168(1):147-52
283. Yamakura F, Kawasaki H. Post-translational modifications of superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Feb;1804(2):318-25
284. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969 Nov 25;244(22):6049-55
285. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:97-112
286. Valentine JS, Doucette PA, Zittin Potter S. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. *Annu Rev Biochem* 2005;74:563–593
287. Turner BJ, Talbot K. Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog Neurobiol* 2008;85:94–134
288. Rotunno MS, Bosco DA. An emerging role for misfolded wild-type SOD1 in sporadic ALS pathogenesis. *Front Cell Neurosci*. 2013 Dec 16;7:253
289. Marklund SL, Holme E, Hellner L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chim Acta* 1982;126:41–51

290. Folz RJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase (SOD3): tissue-specific expression, genomic characterization, and computer-assisted sequence analysis of the human EC SOD gene. *Genomics* 1994;22:162–171
291. Gao F, Koenitzer JR, Tobolewski JM, Jiang D, Liang J, Noble PW, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase inhibits inflammation by preventing oxidative fragmentation of hyaluronan. *J Biol Chem* 2008;283:6058–6066
292. Sandstrom J, Nilsson P, Karlsson K, Marklund SL. 10-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *J Biol Chem* 1994;269:19163–19166
293. Yamashita K, Takahiro K, Kamezaki F, Adachi T, Tasaki H. Decreased plasma extracellular superoxide dismutase level in patients with vasospastic angina. *Atherosclerosis*. 2007 Mar;191(1):147-52
294. Liao M, Liu Z, Bao J, Zhao Z, Hu J, Feng X, Feng R, Lu Q, Mei Z, Liu Y, Wu Q, Jing Z. A proteomic study of the aortic media in human thoracic aortic dissection: implication for oxidative stress. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2008 Jul;136(1):65-72, 72.e1-3
295. Zamocky M, Koller F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Prog Biophys Mol Biol*. 1999; 72:19–66
296. Zamocky M, Furtmüller PG, Obinger C. Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Sep;10(9):1527-48
297. Góth L, Lenkey A, Bigler WN. Blood catalase deficiency and diabetes in Hungary. *Diabetes Care*. 2001 Oct;24(10):1839-40
298. Góth L. Catalase deficiency and type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2008 Dec;31(12):e93
299. Ghosh S, Janocha AJ, Aronica MA, Swaidani S, Comhair SA, Xu W, Zheng L, Kaveti S, Kinter M, Hazen SL, Erzurum SC. Nitrotyrosine proteome survey in asthma identifies oxidative mechanism of catalase inactivation. *J Immunol*. 2006 May 1;176(9):5587-97
300. Mills GC. Glutathione peroxidase and the destruction of hydrogen peroxide in animal tissues. *Arch Biochem Biophys* 1960;86:1–5
301. Sies H, Sharov VS, Klotz LO, Briviba K. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J Biol Chem* 1997;272:27812–27817

302. Prabhakar R, Morokuma K, Musaev DG. Peroxynitrite reductase activity of selenoprotein glutathione peroxidase: a computational study. *Biochemistry*. 2006 Jun 6;45(22):6967-77
303. Ramprasath T, Senthil Murugan P, Prabakaran AD, Gomathi P, Rathinavel A, Selvam GS. Potential risk modifications of GSTT1, GSTM1 and GSTP1 (glutathione-S-transferases) variants and their association to CAD in patients with type-2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Apr 1;407(1):49-53
304. Ramprasath T, Murugan PS, Kalaiarasan E, Gomathi P, Rathinavel A, Selvam GS. Genetic association of Glutathione peroxidase-1 (GPx-1) and NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1(NQO1) variants and their association of CAD in patients with type-2 diabetes. *Mol Cell Biochem*. 2012 Feb;361(1-2):143-50
305. Seiler A, Schneider M, Förster H, Roth S, Wirth EK, Culmsee C, Plesnila N, Kremmer E, Rådmark O, Wurst W, Bornkamm GW, Schweizer U, Conrad M. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell Metab*. 2008 Sep;8(3):237-48
306. Lyon RP, Atkins WM. Self-assembly and gelation of oxidized glutathione in organic solvents. *J Am Chem Soc*. 2001 May 16;123(19):4408-13
307. Pimentel D, Haeussler DJ, Matsui R, Burgoyne JR, Cohen RA, Bachschmid MM. Regulation of cell physiology and pathology by protein S-glutathionylation: lessons learned from the cardiovascular system. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Mar 15;16(6):524-42
308. Bass R, Ruddock LW, Klappa P, Freedman RB. A major fraction of endoplasmic reticulum-located glutathione is present as mixed disulfides with protein. *J Biol Chem*. 2004 Feb 13;279(7):5257-62
309. Griffith OW, Meister A. Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J Biol Chem*. 1979 Aug 25;254(16):7558-60
310. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett*. 2008 Jun 11;582(13):1783-7
311. Halliwell B. Albumin--an important extracellular antioxidant? *Biochem Pharmacol*. 1988 Feb 15;37(4):569-71

312. Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *JAMA*. 1998 May 13;279(18):1477-82
313. Schalk BW, Visser M, Bremmer MA, Penninx BW, Bouter LM, Deeg DJ. Change of serum albumin and risk of cardiovascular disease and all-cause mortality: Longitudinal Aging Study Amsterdam. *Am J Epidemiol*. 2006 Nov 15;164(10):969-77
314. Sedlak TW, Saleh M, Higginson DS, Paul BD, Juluri KR, Snyder SH. Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 31;106(13):5171-6
315. Doré S, Sampei K, Goto S, Alkayed NJ, Guastella D, Blackshaw S, Gallagher M, Traystman RJ, Hurn PD, Koehler RC, Snyder SH. Heme oxygenase-2 is neuroprotective in cerebral ischemia. *Mol Med*. 1999 Oct;5(10):656-63
316. Chou PT, Khan AU. L-ascorbic acid quenching of singlet delta molecular oxygen in aqueous media: generalized antioxidant property of vitamin C. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983 Sep 30;115(3):932-7
317. Chen K, Suh J, Carr AC, Morrow JD, Zeind J, Frei B. Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000 Dec;279(6):E1406-12
318. Sánchez-Moreno C, Dashe JF, Scott T, Thaler D, Folstein MF, Martin A. Decreased levels of plasma vitamin C and increased concentrations of inflammatory and oxidative stress markers after stroke. *Stroke*. 2004 Jan;35(1):163-8
319. Khaw KT, Bingham S, Welch A, Luben R, Wareham N, Oakes S, Day N. Relation between plasma ascorbic acid and mortality in men and women in EPIC-Norfolk prospective study: a prospective population study. *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Lancet*. 2001 Mar 3;357(9257):657-63
320. Maiani G, Castón MJ, Catasta G, Toti E, Cambrodón IG, Bysted A, Granado-Lorencio F, Olmedilla-Alonso B, Knuthsen P, Valoti M, Böhm V, Mayer-Miebach E, Behnlian D, Schlemmer U. Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol Nutr Food Res*. 2009 Sep;53 Suppl 2:S194-218

321. Hozawa A, Jacobs DR Jr, Steffes MW, Gross MD, Steffen LM, Lee DH. Relationships of circulating carotenoid concentrations with several markers of inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA)/Young Adult Longitudinal Trends in Antioxidants (YALTA) study. *Clin Chem*. 2007 Mar;53(3):447-55
322. Traber MG. Vitamin E regulatory mechanisms. *Annu Rev Nutr*. 2007;27:347-62
323. Brott T, Adams HP, Olinger CP, Marler JR, Barsan WG, Biller J, Spilker J, Holleran R, Eberle R, Hertzberg V, Rorick M, Moomaw CJ, Walker M (1989) Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke* 20:864–870
324. Nomura E, Kohriyama T, Kozuka K, Kajikawa H, Nakamura S. Sequential changes in von Willebrand factor and soluble thrombomodulin in acute ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2001; 10(6):257-64
325. Auclair C, Voisin E (1985) Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press, Inc: Boca Raton, pp 123-132
326. Pick E, Keisari Y(1980) A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 38:161-170
327. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi, K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351-358
328. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131-138
329. Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide-anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247:3170-3175
330. Beutler E (1982) Catalase. In: Beutler E (ed) *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*. Grune and Stratton, New York, pp 105-106
331. Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM. *Stroke*. *Lancet* 2008, 371 (9624): 1612–23
332. Sims NR, Muyderman H. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009, 1802 (1): 80–91

333. Mathers CD, Boerma T, Ma Fat D. Global and regional causes of death. *British medical bulletin* 2009, 92: 7-32
334. Deb P, Sharma S, Hassan KM. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. *Pathophysiology: the official journal of the International Society for Pathophysiology* 2010, ISP 17 (3): 197–218
335. Richard S. Snell (2006). *Clinical neuroanatomy*, 6. ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp. 478–485
336. Kleinschnitz C, De Meyer SF, Schwarz T, Austinat M, Vanhoorelbeke K, Nieswandt B, Deckmyn H, Stoll G. Deficiency of von Willebrand factor protects mice from ischemic stroke. *Blood*. 2009; 113(15):3600-3
337. Zhao BQ, Chauhan AK, Canault M, Patten IS, Yang JJ, Dockal M, Scheiflinger F, Wagner DD. von Willebrand factor-cleaving protease ADAMTS13 reduces ischemic brain injury in experimental stroke. *Blood*. 2009;114(15):3329-34
338. Kelly PJ, Morrow JD, Ning M, Koroshetz W, Lo EH, Terry E, Milne GL, Hubbard J, Lee H, Stevenson E, Lederer M, Furie KL. Oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 in acute ischemic stroke: the Biomarker Evaluation for Antioxidant therapies in Stroke (BEAT-Stroke) study. *Stroke* 2008;39:100-4
339. Domínguez C, Delgado P, Vilches A, Martín-Gallán P, Ribó M, Santamarina E, Molina C, Corbeto N, Rodríguez-Sureda V, Rosell A, Alvarez-Sabín J, Montaner J. Oxidative stress after thrombolysis-induced reperfusion in human stroke. *Stroke* 2010;41:653-60
340. Lees KR, Zivin JA, Ashwood T, Davalos A, Davis SM, Diener HC, Grotta J, Lyden P, Shuaib A, Hårdemark HG, Wasiewski WW. NXY-059 for acute ischemic stroke. *The New England Journal of Medicine* 2006, 354 (6): 588–600
341. Wang CX and Shuaib A: Neuroprotective effects of free radical scavengers in stroke. *Drugs Aging* 24: 537-546, 2007
342. Lapchak PA and Zivin JA: The lipophilic multifunctional antioxidant edaravone (Radicut) improves behavior following embolic strokes in rabbits: a combination therapy study with tissue plasminogen activator. *Exp Neurol* 2009, 215: 95-100
343. Qand Agha Nazari, Keita Mizuno, Toshiaki Kume, Yuki Takada-Takatori, Yasuhiko Izumi, and Akinori Akaike. In Vivo Brain Oxidative Stress Model Induced by

- Microinjection of Sodium Nitroprusside in Mice. *J Pharmacol Sci*, 2012, (Epub ahead of print)
344. Nadkarni A, Gorakshakar A, Surve R, Sawant P, Phanasgaonkar S, Nair S, Ghosh K, Colah RB. Hematological and molecular analysis of novel and rare beta-thalassemia mutations in the Indian population. *Hemoglobin* 2009;33:59–65
345. Fedorova OI, Kondurtsev VA, Davydkin IL, Limareva LV. Peripheral blood responses in elderly patients with some prevalent diseases. *Klin Med (Mosk)* 2008;86:48–51
346. Nayak AR, Kashyap RS, Kabra D, Deoras P, Purohit HJ, Taori GM, Dagainawala HF. Evaluation of routinely performed hematological and biochemical parameters for the prognosis of acute ischemic stroke patients. *Neurol Sci*. 2011 Oct;32(5):855-60
347. D'Erasmus E, Aliberti G, Vecchi E, Celi FS, Mazzuoli GF. Evaluation of platelet changes in completed ischemic stroke. *Ital J Neurol Sci* 1988;9:573–576
348. Saposnik G, Hill MD, O'Donnell M, Fang J, Hachinski V, Kapral MK. Variables associated with 7-day, 30-day, and 1-year fatality after ischemic stroke. *Stroke* 2008;39:2318-2324
349. Kim DH, Cha JK, Bae HJ, Park HS, Choi JH, Kang MJ, Kim BG, Huh JT, Kim SB. Organized Comprehensive Stroke Center is Associated with Reduced Mortality: Analysis of Consecutive Patients in a Single Hospital. *J Stroke*. 2013 Jan;15(1):57-63
350. Hankey GJ. Long-term outcome after ischaemic stroke/transient ischaemic attack. *Cerebrovasc Dis* 2003;16:14-19
351. Saposnik G, Hill MD, O'Donnell M, Fang J, Hachinski V, Kapral MK. Variables associated with 7-day, 30-day, and 1-year fatality after ischemic stroke. *Stroke* 2008;39:2318-2324
352. de Jong G, van Raak L, Kessels F, Lodder J. Stroke subtype and mortality. A follow-up study in 998 patients with a first cerebral infarct. *J Clin Epidemiol* 2003;56:262-268
353. Turaj W, Slowik A, Dziedzic T, Pulyk R, Adamski M, Strojny J, et al. Increased plasma fibrinogen predicts one-year mortality in patients with acute ischemic stroke. *J Neurol Sci* 2006;246:13-19
354. Saposnik G, Fang J, O'Donnell M, Hachinski V, Kapral MK, Hill MD. Escalating levels of access to in-hospital care and stroke mortality. *Stroke* 2008;39:2522-2530

355. Jung KH, Lee SH, Kim BJ, Yu KH, Hong KS, Lee BC, et al. Secular trends in ischemic stroke characteristics in a rapidly developed country: Results from the Korean Stroke Registry Study (Secular trends in Korean stroke). *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2012;5:327-334
356. Nedergaard M. Transient focal ischemia in hyperglycemic rats is associated with increased cerebral infarction. *Brain Res* 1987;408:79-85
357. Bhatia R S, Garg R K, Gaur S P, Kar A M, Shukla R, Agarwal A, Verma R. Predictive value of routine hematological and biochemical parameters on 30-day fatality in acute stroke. *Neurol India* 2004;52:220-3
358. Alex M, Baron EK, Goldenberg S, Blumenthal HT. An autopsy study of cerebrovascular accident in diabetes mellitus. *Circulation* 1962;25:663-73
359. Mohr JP, Rubenstein LV, Tatemichi TK, et al. Blood sugar and acute stroke: The NINCDS Pilot Stroke Data Bank (abstrack). *Stroke* 1985;16:143
360. Melamed E. Reactive hyperglycemia in patients with acute stroke. *J Neurol Sci* 1976;29:267-75
361. Candelise L, Landi G, Orazio EN, Boccardi E. Prognostic significance of hyperglycemia in acute stroke. *Arch Neurol* 1985;42:661-3
362. Mohr JP, Rubenstein LV, Tatemichi TK, et al. Blood sugar and acute stroke: The NINCDS Pilot Stroke Data Bank (abstrack). *Stroke* 1985;16:143
363. Pulsinelli WA, Levy DE, Sigsbee B, et al. Increased damage after ischemic stroke in patients with hyperglycemia with or without established diabetes mellitus. *Am J Med* 1983;74:540-4
364. Adams HP, Olinger C, Biller J et al. Usefulness of admission blood glucose in predicting outcome of acute cerebral infarction (abstract). *Stroke* 1987;18:296
365. Woo J, Lau E, Kay R, et al. A case control study of some hematological and biochemical variables in acute stroke and their prognostic value. *Neuroepidemiology* 1990;9:315-20
366. Sridharan R. Risk factors for ischemic stroke: A case control analysis. *Neuroepidemiology* 1992;11:24-30

367. Lindenstrom E, Boysen G, Nyboe J. Influence of total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol and triglycerides on risk of cerebrovascular disease: The Copenhagen City Heart Study. *Br Med J* 1994;309:11-5
368. Vauthey C, deFreitas GR, van, Melle G, et al. Better outcome after stroke with higher serum cholesterol levels. *Neurology* 2000;54:1944-9
369. Cao JJ, Thach C, Manolio TA, Psaty BM, Kuller LH, Chaves PH, et al. C-reactive protein, carotid intima-media thickness, and incidence of ischemic stroke in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *Circulation*. 2003; 108(2): 166–170
370. Liu LB, Li M, Zhuo WY, Zhang YS, Xu AD. The role of hs-CRP, D-dimer and fibrinogen in differentiating etiological subtypes of ischemic stroke. *PLoS One*. 2015 Feb 13;10(2)
371. Eikelboom JW, Hankey GJ, Baker RI, McQuillan A, Thom J, Staton J, et al. C-reactive protein in ischemic stroke and its etiologic subtypes. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2003; 12(2): 74–81
372. Pandey A, Shrivastava AK, Saxena K. Neuron specific enolase and c-reactive protein levels in stroke and its subtypes: correlation with degree of disability. *Neurochem Res*. 2014; 39(8): 1426–1432
373. Luo Y, Wang Z, Li J, Xu Y. Serum CRP concentrations and severity of ischemic stroke subtypes. *Can J Neurol Sci*. 2012; 39(1): 69–73
374. Jaffe EA. Endothelial cells and the biology of factor VIII. *N Eng J Med* 1977;296:377-383
375. Sato M, Suzuki A, Nagata K, Uchiyama S. Increased von Willebrand factor in acute stroke patients with atrial fibrillation. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2006 Jan-Feb;15(1):1-7
376. Rabinovitch M, Andrew M, Thom H, et al. Abnormal endothelial factor VIII associated with pulmonary hypertension and congenital heart defects. *Circulation* 1987;76:1043-1052
377. Penny WF, Weinstein M, Salzman EW, et al. Correlation of circulating von Willebrand factor levels with cardiovascular hemodynamics. *Circulation* 1991;83:1630-1636
378. Jansson JH, Nilsson TK, Johnson O. von Willebrand factor in plasma: a novel risk factor for recurrent myocardial infarction and death. *Br Heart J* 1991;66:351-355

379. Tietjen GE, Al-Qasbi MM, Athanas K, et al. Increased von Willebrand factor in migraine. *Neurology* 2001;57:334-336
380. Lip GYH, Lowe GDO, Rumley A, et al. Increased markers of thrombogenesis in chronic atrial fibrillation: effects of warfarin treatment. *Br Heart J* 1995;73:527-533
381. Folsom AR, Rosamond WD, Shahar E, et al, for the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. Prospective study of markers of hemostatic function with risk of ischemic stroke. *Circulation* 1999;100:736-742
382. Spiel AO, Gilbert JC, Jilma B. von Willebrand factor in cardiovascular disease: focus on acute coronary syndromes. *Circulation* 2008; 117(11):1449-1459
383. Chamorro A, Vila N, Ascaso C, et al. Early prediction of stroke severity. Role of erythrocyte sedimentation rate. *Stroke* 1995;26:573-6
384. Czlonkowska A, Ryglewicz D, Lechowicz W. Basic analytical parameters as the predictive factors for 30 day case fatality rate in stroke. *Acta Neurol Scand* 1997;95:121-4
385. Chambers BR, Norris JW, Shurvell BL et al. Prognosis of acute stroke. *Neurology* 1987;37:221-5).
386. Bhatia R S, Garg R K, Gaur S P, Kar A M, Shukla R, Agarwal A, Verma R. Predictive value of routine hematological and biochemical parameters on 30-day fatality in acute stroke. *Neurol India* 2004;52:220-3
387. D'Erasmus E, Aliberti G, Celi FS, et al. Platelet count, mean platelet volume and their relation to prognosis in cerebral infarction. *J Intern Med* 1990;227:11-4
388. Jennings LK. Mechanisms of platelet activation: Need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost* 2009;102:248-257
389. Lukasik M, Dworacki G, Michalak S, Kufel-Grabowska J, Watala C, Kozubski W. Chronic hyper-reactivity of platelets resulting in enhanced monocyte recruitment in patients after ischaemic stroke. *Platelets*. 2012;23(2):132-42
390. Anand SX, Viles-Gonzalez JF, Badimon JJ, Cavusoglu E, Marmur JD. Membrane-associated CD40L and sCD40L in atherothrombotic disease. *Thromb Haemost* 2003;90:377-384

391. Lukasik M, Rozalski M, Luzak B, Michalak S, Watala C, Kozubski W. Platelet activation and reactivity in the convalescent phase of ischaemic stroke. *Thromb Haemost* 2010;103:644–650
392. Jurk K, Jahn U-R, Van Aken H, Schriek C, Droste DW, Ritter MA, Bernd Ringelstein E, Kehrel BE. Platelets in patients with acute ischemic stroke are exhausted and refractory to thrombin, due to cleavage of the seven-transmembrane thrombin receptor (PAR-1). *Thromb Haemost* 2004;91:334–344
393. Michelson AD, Barnard MS, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin. *Circulation* 2001;104:1533–1537
394. El Kossi MM, Zakhary MM. Oxidative stress in the context of acute cerebrovascular stroke. *Stroke* 2000;1:1889-1892
395. Cherubini A, Polidori MC, Bregnocchi M, Pezzuto S, Cecchetti R, Ingegneri T, di Iorio A, Senin U, Mecocci P. Antioxidant profile and early outcome in stroke patients. *Stroke* 2000;31:2295-2300
396. Lebel CP, Bondy SC. Oxygen radicals: a common mediators of neurotoxicity. *Neurotoxicol Teratol* 1991;13:341–346
397. Lee WC, Wong HY, Chai YY, Shi CW, Amino N, Kikuchi S, Huang SH. Lipid peroxidation dysregulation in ischemic stroke: plasma 4-HNE as a potential biomarker? *Biochem Biophys Res Commun* 2012;425:842-847
398. Nanetti L1, Taffi R, Vignini A, Moroni C, Raffaelli F, Bacchetti T, Silvestrini M, Provinciali L, Mazzanti L. Reactive oxygen species plasmatic levels in ischemic stroke. *Mol Cell Biochem* 2007;303:19-25
399. Stanarius A, Topel I, Schulz S, Noack H, Wolf G. Immunocytochemistry of endothelial nitric oxide synthase in the rat brain: a light and electron microscopical study using the tyramide signal amplification technique. *Acta Histochem* 1997;99:411–429
400. Godínez-Rubí M, Rojas-Mayorquín AE, Ortuño-Sahagún D. Nitric oxide donors as neuroprotective agents after an ischemic stroke-related inflammatory reaction. *Oxid Med Cell Longev* 2013:297357

401. Adachi N, Lei B, Soutani M, Arai T. Different roles of neuronal and endothelial nitric oxide synthases on ischemic nitric oxide production in gerbil striatum. *Neurosci Letter* 2000;288:151–154
402. Ito Y, Ohkubo T, Asano Y, Hattori K, Shimazu T, Yamazato M, Nagoya H, Kato Y, Araki N. Nitric oxide production during cerebral ischemia and reperfusion in eNOS- and nNOSknockout mice. *Curr Neurovasc Res* 2010;7:23–31
403. Khan M, Sekhon B, Giri S, Jatana M, Gilg AG, Ayasolla K, Elango C, Singh AK, Singh I. S-Nitrosoglutathione reduces inflammation and protects brain against focal cerebral ischemia in a rat model of experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25:177–192
404. Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* 1997;28:1283–1288
405. Fabian RH, Perez-Polo JR, Kent TA. Perivascular nitric oxide and superoxide in neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295:H1809-14
406. Veal EA, Day AM, Morgan BA. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell* 2007;26:1–14
407. Nanetti L, Raffaelli F, Vignini A, Perozzi C, Silvestrini M, Bartolini M, Provinciali L, Mazzanti L. Oxidative stress in ischaemic stroke. *Eur J Clin Invest* 2011;41:1318-1322
408. Liu TH, Beckman JS, Freeman BA, Hogan EL, Hsu CY. Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. *Am J Physiol* 1989;256:H589–H593
409. Kinouchi H, Epstein CJ, Mizui T, Carlson E, Chen SF, Chan PH. Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:11158–11162
410. Spranger M, Krempien S, Schwab S, Donnenberg S, Hacke W. Superoxide dismutase activity in serum of patients with acute cerebral ischemic injury: correlation with clinical course and infarct size. *Stroke* 1997;28:2425–2428