

<sup>1</sup> Institut "Vinča", Laboratorija za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Univerzitet u Beogradu

<sup>2</sup> Biološki fakultet, Institut za fiziologiju i biohemiju, Univerzitet u Beogradu

<sup>3</sup> Farmaceutski fakultet, Katedra za fiziologiju, Univerzitet u Beogradu

<sup>4</sup> Institut za kardiovaskularne bolesti „Dedinje“, Klinika za vaskularnu hirurgiju, Beograd

## THE ROLE OF THE NITRIC OXIDE SYNTHASES IN BRAIN ISCHEMIA DURING CAROTID ENDARTERECTOMY

## ULOGA AZOT-MONOKSID SINTAZA U STANJIMA ISHEMIJE MOZGA TOKOM KAROTIDNE ENDARTEREKTOMIJE

Nikola Bogdanović<sup>1</sup>, Milan Obradović<sup>1</sup>, Nebojša Jasnić<sup>2</sup>,  
Biljana Spremo-Potparević<sup>3</sup>, Dragana Unić-Stojanović<sup>4</sup>,  
Dorđe Radak<sup>4</sup>, Esma R. Isenović<sup>1</sup>

### Summary

According to the World Health Organization, 15 million people per year are affected by stroke. The most common cause of stroke is brain ischemia, which occurs in almost 85% of cases. Ischemia caused by thromboembolism is defined as permanently or temporarily decreased blood flow which prevents an adequate delivery of oxygen, glucose and other important nutrients, leading progressively to metabolic changes and cell apoptosis. Carotid endarterectomy (CEA) can cause hypoxic – ischemic states of the brain or acute brain ischemia (ABI) leading eventually to stroke. The main cause of ABI as a result of CEA is cerebral hypoperfusion caused by clamping of carotid arteries, when hypoxia occurs.. Hypoxia per se is one of the triggers of complex physiological responses in the body, including the release of various mediators of inflammation. One of these inflammatory mediators is nitric oxide (NO), a free radical which has numerous physiological effects and also plays an important role in the immune response of the organism. However, NO may be very harmful and cause cell and tissue damage. The lack of literature data on the role of endothelial NOS (eNOS) and inducible NOS (iNOS) during CEA, as well as the mechanisms of their regulation in ischemic conditions, suggest that intensifying future research in this field is very important. An insight into molecular mechanisms of iNOS activity and expression regulation will certainly help to develop new therapeutic strategies for treating harmful effects of free radicals, especially uncontrolled production of NO.

**Key words:** carotid endarterectomy, acute brain ischemia, nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase, inducible nitric oxide synthase.

### Sažetak

Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije, 15 miliona ljudi godišnje doživi moždani udar. Najčešći uzročnik moždanog udara je ishemija mozga, koja se dešava u skoro 85% slučajeva. Moždana ishemija izazvana tromboembolijskim događajima definiše se kao trajno ili prolazno smanjenje cirkulacije krvi, što za posledicu ima nedostatak kiseonika, glukoze i ostalih važnih nutritijenata, dovodeći postepeno do metaboličkih promena i apoptoze ćelija. Tokom operativnih zahvata kao što je karotidna endarterektomija (CEA) može doći do hipoksično-ishemičnog stanja mozga ili akutne ishemije mozga (ABI), kao i do samog moždanog udara. Glavni uzrok ABI u toku CEA je cerebralna hipoperfuzija koja je uzrokovana klemovanjem karotidne arterije, pri čemu dolazi do hipoksije, što može predstavljati jedan od okidača za niz fizioloških odgovora organizma, među kojima je oslobađanje različitih medijatora inflamacije. Jedan od medijatora inflamacije je i azot monoksid (NO), slobodni radikal koji pored mnogobrojnih fizioloških efekata ima važnu ulogu i u samom imunom odgovoru organizma. Međutim, NO može biti veoma štetan i svojim delovanjem dovesti do oštećenja ćelija i tkiva. Nedostatak podataka u literaturi o ulozi endotelne NOS (eNOS) i inducibilne NOS (iNOS) tokom CEA, kao i mehanizama njihove regulacije u stanjima ishemije, ukazuju na pravac kojim treba da se usmere buduća istraživanja. Poznavanje molekularnih mehanizama regulacije aktivnosti i ekspresije iNOS, svakako će pomoći razvoju novih terapijskih strategija u tretmanu štetnih efekata produkcije slobodnih radikala, pre svega nekontrolisane produkcije NO.

**Ključne reči:** karotidna endarterektomija; akutna moždana ishemija; azot monoksid; endotelna azot monoksid sintaza, inducibilna azot monoksid sintaza.

## Uvod

Moždana ishemija izazvana tromboembolijskim događajima definiše se kao trajno ili prolazno smanjenje cirkulacije krvi, što za posledicu ima nedostatak kiseonika ( $O_2$ ), glukoze i ostalih važnih nutrijenata, dovodeći postepeno do metaboličkih promena i apoptoze ćelija [1, 2]. Stvaranje plaka na zidovima krvnih sudova prvo dovodi do pojave privremenih simptoma, poznatih kao prolazni ishemijski napad (TIA; *engl. Transient Ischemic Attack*), pri kome se privremena ishemija javlja u mozgu, kičmenoj moždini ili mrežnjači, bez izazivanja infarktnog stanja [3]. Za razliku od trajne ishemije, TIA ne uzrokuje trajno oštećenja mozga [4]. TIA je kratkotrajna epizoda vaskularne disfunkcije, često označena kao „mini šlog“, sa simptomima moždanog udara i trajanja od nekoliko minuta do 24 časa [5, 6].

Iako je iznenadna okluzija krvnog suda izazvana tromboembolijskim događajima najčešći uzrok ishemičnog oštećenja mozga [2], primećeno je da tokom operativnih zahvata kao što je karotidna endarterektomija (CEA; *engl. Carotid Endarterectomy*) može doći do hipoksično-ishemičnog stanja mozga ili akutne ishemije mozga (ABI; *engl. Acute Brain Ischemia*), kao i do samog moždanog udara [2, 7]. Glavni uzrok moždanog udara u toku CEA je cerebralna hipoperfuzija koja je uzrokovana klemovanjem karotidnih arterija, dok su u intraoperativnom, kao i postoperativnom periodu tromb, embolizam i cerebralna hiperperfuzija glavni uzročnici lošeg kliničkog ishoda [6, 8-11].

Narušena ravnoteža između oksidativnih i antioksidativnih procesa ima važnu ulogu u patologiji ABI [12, 13]. Naime, povećana produkcija slobodnih radikala, kao što su superoksid anjon radikal ( $O_2^-$ ), azot monoksid (NO), vodonik peroksid, peroksinitrit i visoko reaktivni hidroksil radikal može imati ključnu ulogu u patogenezi ABI [14]. Danas, jedan od glavnih ciljeva istraživanja ABI nastale tokom CEA, je razvijanje terapijskih strategija usmerenih ka smanjenju oštećenja mozga nastalog oksidativnim stresom, kroz razumevanje molekularnih mehanizama nastanka ABI [11]. Jedan od terapijskih pristupa mogao bi biti stimulisanje antioksidativne aktivnosti u krvi koja obezbeđuje zaštitu protiv neuroloških oštećenja u stanju ishemije mozga [6, 12].

NO je slobodni radikal koji je uključen u različite fiziološke i patofiziološke procese, a nastaje aktivnošću enzima azot-monoksid sintaza (NOS; *engl. Nitric Oxide Synthase*) [15]. Jedna od glavnih uloga NO je vazodilatatorni efekat koji ostvaruje u krvnim sudovima. NO je molekul koji je prisutan u celom organizmu, ali se u fiziološkim uslovima primarno sintetisuje u endotelnim ćelijama krvnih sudova i od velike je važnosti za homeostazu kardiovaskularnog sistema (KVS) zbog svoje kardioprotektivne uloge [6, 15].

Nedostatak podataka u literaturi o ulozi NOS, endotelne (eNOS) i inducibilne (iNOS), tokom CEA kao i mehanizama njihove regulacije u stanjima ishemije, ukazuju na značaj istraživanja u ovoj oblasti. Poznavanje molekularnih mehanizama regulacije aktivnosti i ekspresije NOS, svakako će pomoći razvoju novih terapijskih strategija u tretmanu štetnih efekata produkcije slobodnih radikala, pre svega nekontrolisane produkcije NO u stanjima ishemije mozga.

## AKUTNA ISHEMIJA MOZGA (ABI)

Moždano tkivo je izuzetno osetljivo na ishemiju, tako da i kratki periodi ishemije mogu izazvati niz kompleksnih događaja u neuronima, koji mogu dovesti do apoptoze ćelija [16, 17]. ABI je neuropatološko stanje koje karakteriše apoptoza neuronskih ćelija koja je izazvana nizom patofizioloških događaja, među kojima je jedan od bitnijih činilaca oksidativni stres [12]. Veliki broj novonastalih slobodnih radikala u toku ishemije mozga mogu dovesti do funkcionalnih i strukturnih oštećenja neurona, usled oštećenja lipida, proteina i nukleinskih kiselina [12, 14, 18]. Različiti regioni mozga imaju različit stepen tolerancije na ishemiju, pri čemu je bela masa tolerantnija na ishemiju od sive mase mozga [16, 17]. Takođe, određene populacije neurona, kao što su CA1 piramidalni neuroni hipokampusa, mnogo su osetljivije na ishemiju od drugih, poput dentatne granule neurona [16, 17]. Moždana ishemija rezultuje naglim smanjenjem protoka krvi najčešće izazvanim naglom okluzijom krvnog suda, što dovodi do gubitka neuroloških funkcija [1, 2].

Ishemično oštećenje mozga čine patološki događaji koji mogu biti izazvani moždanim udarom, teškim povredama glave, kardiorespiratornim zastojeom, kao i nekim operativnim procedurama poput CEA, vantelesnog krvotoka i indukovane hipotenzije [7]. Ovi patološki putevi ishemične kaskade nastali tokom nekoliko minuta mogu da izazovu nepovratna oštećenja neurona [1, 19], dovodeći do hipoksično-ishemičnog stanja [2]. Regioni mozga kao što su hipokampus, amigdaloidna jedra i prefrontalni korteks odgovaraju na akutni i hronični stres i pokazuju promene u morfologiji i biohemiji, koje su u velikoj meri reverzibilne [20]. Moždana ishemija deluje kao faktor stresa tj. stresor i na taj način stimuliše hipotalamusnu-hipofiznu-adrenalnu osovinu (HPA; *engl. hypothalamic-pituitary-adrenal axis*) [11, 21]. Brojne studije pokazuju da endokrine promene HPA osovine mogu takođe dovesti do moždane ishemije [11, 21]. Kao posledica CEA nastaje složena biološka reakcija, poznata kao hipermetabolički odgovor na stres, koja je posredovana HPA osovinom, a karakteriše je patološka aktivacija autonomnog nervnog sistema i podizanje nivoa kateholamina [11, 22, 23]. Pored toga, ova reakcija dalje implicira hemodinamičke, metaboličke, inflamatorne i imunološke promene usmerene na uspostavljanje homeostaze i oporavak [8]. Metaboličke i endokrine promene koje na-

staju tokom operacije, uključujući povećano snabdevanje O<sub>2</sub>, povećan katabolizam i oštećenje funkcija imunog sistema su povezane sa lošim postoperativnim i kliničkim ishodom [8]. Pored oštećenja tkiva koja nastaju tokom prolazne ishemije, dodatna oštećenja tkiva i mikrocirkulacije nastaju i tokom reperfuzije tkiva. [9, 10].

## KAROTIDNA ENDARTEREKTOMIJA (CEA) I AKUTNA ISHEMIJA MOZGA

Karotidna endarterektomija je hirurška procedura u karotidnoj arteriji, koja se koristi za smanjenje rizika od moždanog udara [11]. Asimptomatska karotidna stenozna podrazumeva prisustvo stenotičnih lezija na karotidnim arterijama, u bolesnika koji namaju i nisu imali neurološke simptome moždane ishemije [11]. Simptomatska stenozna podrazumeva istovremeno prisustvo stenozne karotidnih arterija i simptoma cerebralne ishemije i ima visok rizik od moždanog udara, ali za razliku od asimptomatske stenozne, nastupa 2 dana nakon pojave simptoma [24]. Prema preporuci Nacionalnog instituta za zdravlje i kliničku veštinu SAD-a (NICE; *engl. National Institute for Health and Care Excellence*, USA) pacijenti sa umerenim do ozbiljnim (50-99 % začepljenja) stenozom unutrašnje karotidne arterije i simptomima, moraju se operirati najbolje u roku od 2 nedelje od nastanka simptoma [24]. Pacijenti sa asimptomatskom stenozom unutrašnje karotidne arterije imaju veći rizik od nastanka moždanog udara u poredjenju sa opštom populacijom, ali manji rizik od pacijenata sa simptomatskom stenozom. Učestalost moždanog udara u svetu, uključujući fatalni moždani udar je 1-2 % na godišnjem nivou [24], dok je smrtnost pacijenata od endarterektomije tokom hirurške intervencije 1-2 % [24]. Svake godine preko 25 000 ljudi u Srbiji doživi moždani udar a čak 10% ih je mlađe od 30 godina [25]. Dve velike kliničke studije su pokazale da operacija karotida 30 dana od moždanog udara smanjuje rizik od smrtnosti za 3%, dok kod asimptomatskih pacijenata sa stenozom za čak 60 % i produžava životni vek za najmanje 5 godina nakon operacije [26].

Postoje podeljena mišljenja među hirurzima oko načina tretiranja asimptomatskih pacijenata, tj. da li je dovoljno tretirati pacijente lekovima ili je neophodna operacija [27]. Tradicionalni način endarterektomije podrazumeva otvaranje arterije i uklanjanje plaka, dok noviji pristup uključuje endovaskularnu angioplastiku, koja je endoskopska metoda i postavljanje katetera oko luka aorte i do karotidne arterije (stenta) [11]. Kateter sadrži balon za proširenje arterije i ubacuje stent koji drži arteriju otvorenom. U nekoliko kliničkih ispitivanja 30 dana nakon srčanog ili moždanog udara smrtnost je bila znatno veća nego kod stenta sa CEA (9,6 % bez endovaskularne angioplastike u odnosu na 3,9 % sa) [28]. CEA je zlatni standard za tretiranje simptomatskih pacijenata sa karotidnom aterosklerozom [11, 29]. Međutim, uspešnost ove operativne procedure zavisi od stope pre i postope-

rativnih neželjenih neuroloških događaja [30, 31]. ABI izazvana TIA inicira kompleksni niz događaja u centralnom nervnom sistemu i HPA osovini, koji na kraju mogu dovesti do nervnog i ćelijskog oštećenja. Mozak je izuzetno osetljiv na ishemiju i kao odgovor na stres pokazuje promene u morfologiji i biohemijskim procesima, koje su u velikoj meri reverzibilne [31]. Za ove promene se zna da modifikuju funkciju HPA osovine, ali njihovi mehanizmi još nisu razjašnjeni. Patogeneza ABI je složena i obuhvata više mehanizama, uključujući proizvodnju slobodnih radikala, dovodeći do oksidativnog stresa koji doprinosi neurološkim oštećenjima. Kroz interakciju sa velikim brojem molekula, reaktivne vrste kiseonika (ROS; *engl. reactive oxygen species*) mogu uništavati nepovratno ili menjati funkciju ćelijskih lipida, proteina i nukleinskih kiselina, kao i prekinuti ćelijske signalne puteve nakon cerebralne ishemije. Cilj CEA je da se spreče negativne posledice stenozne karotidnih arterija, sekundarne ateroskleroze, tj. ishemičnog moždanog udara [11].

Kao i kod bilo koje operacije, pažljiva procena relativne koristi i rizika od postupka se traži na individualnoj osnovi pacijenta. Perioperativni CEA rizik za smrtnost u narednih 30 dana treba da bude manji od 3 % za asimptomatske pacijente, odnosno za 6 % u pacijenta sa simptomima. Pacijenti sa simptomima obično imaju TIA bez većih posledica ili blaži moždani udar, koji može uticati na disfunkciju jedne strane tela, uključujući poremećaj govora ili vida [4].

## ULOGA AZOT MONOKSIDA (NO) U STANJIMA ISHEMIJE MOZGA

U fiziološkim uslovima NO se primarno sintetise u endotelnim ćelijama krvnih sudova i uključen je u različite procese važne za homeostazu KVS [15]. Disfunkcija endotela tokom različitih patoloških stanja u KVS često je inicirana smanjenom sintezom NO. Međutim, hiperprodukcija NO može dovesti do oštećenja ćelija direktnom promenom strukture proteina ili indirektno kroz formiranje visoko reaktivnog peroksinitrita [32, 33] što se najčešće dešava u različitim patofiziološkim stanjima, poput ishemije mozga [32]. Povećan nivo NO dovodi do inhibicije enzima uključenih u regulaciju metabolizma i DNK sinteze [12, 34-36]. Pokazano je da tokom ABI dolazi do povećane produkcije NO [37-39].

Uloga NO tokom ishemije mozga je složena [39]. Neuroprotektivna uloga NO se ogleda u poboljšanju protoka krvi posle ishemijskog događaja, pri čemu dolazi do vazodilatacije, inhibicije agregacije trombocita i adhezije leukocita [40, 41]. Međutim, pri velikim koncentracijama NO dolazi do povećanog afiniteta NO prema gvožđu i tiolnim grupama u proteinima, što dovodi do neurotoksičnosti [12, 42, 43]. Naime, NO reaguje sa superoksid anjonima pri čemu nastaju peroksinitriti, koji predstavljaju jake oksidante i tako narušavaju metabolizam

gvožđa [40, 44, 45]. Podaci iz literature ukazuju da štetni efekti NO u moždanom tkivu mogu biti povezani sa povećanim postishemijskim oslobađanjem ekscitatornih neurotransmitera [40, 46, 47]. Regulacija koncentracije NO može se ostavari pomoću antagonista glutamatnog receptora, pošto povećan nivo NO inicira proizvodnju glutamata. Takođe, reperfuzija tkiva nakon ishemije povećava nivo oksigenacije tkiva, ali i znatnu produkciju NO i superoksida, što može dovesti do brzog porasta peroksinitrita [48].

## ULOGA AZOT MONOKSID SINTAZE (NOS) U STANJIMA ISHEMIJE MOZGA

NOS je enzim koji konvertuje aminokiselinu L-arginin (L-Arg) u L-citrulin, pri čemu NO nastaje kao krajnji produkt enzimske reakcije. Do sada su opisane tri izoforme NOS: neuronalna NOS (nNOS; tip-I; *engl. neuronal NOS*), inducibilna NOS (iNOS; tip-II; *engl. inducible NOS*) i endotelna NOS (eNOS; tip-III; *engl. endothelial NOS*) [49-51]. Tokom ishemije mozga kao i nakon reperfuzije tkiva dolazi do aktivacije sve tri izoforme NOS enzima, iNOS, eNOS i nNOS. [12, 47, 52]. Smatra se da tokom ishemije mozga dolazi do aktivacije nNOS u neuronima i glija ćelijama i do ponovnog preuzimanja glutamata u sinapsama. Pored toga, aktivacija NMDA receptora (*engl. N-methyl-D-aspartate receptors*) rezultuje povećanjem intracelularnog kalcijuma ( $Ca^{2+}$ ) [52], što dodatno povećava aktivnost nNOS. Povećana aktivnost iNOS i eNOS u vaskularnom endotelu tokom ishemije mozga, verovatno potiče usled aktivacije u makrofagima i infiltriranim neutrofilima [53] tako da razvijanje novih strategija u cilju inhibicije ili inaktivacije NOS može predstavljati novi terapijski pristup pošto se zna da povećana aktivnost nNOS i iNOS prouzrokuje neurotoksičnost [39].

Enzim eNOS je pretežno vezan za ćelijsku membranu [54]. Kada je neaktivan, vezan je za kaveolin, dok povećanje intracelularne koncentracije jona  $Ca^{2+}$  dovodi do vezivanja kalmodulina za eNOS i aktiviranja ovog enzima. Aktiviranje eNOS zahteva dimerizaciju enzima, prisustvo supstrata L-arginina, i kofaktor BH4 (*engl. (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin*). Stimulusi koji dovode do povećanja intracelularne koncentracije  $Ca^{2+}$  dovode i do sinteze NO. eNOS zahteva veću koncentraciju  $Ca^{2+}$  za svoju aktivnost od iNOS [55]. NO stvoren u niskim dozama od strane eNOS izoforme, funkcioniše kao signalni molekul u nekoliko bioloških procesa, uključujući i regulaciju vaskularnog tonusa, remodelovanje vaskulature (dilataciju i stanjivanje zida) i angiogenezu. Povećana ekspresija eNOS može imati važnu ulogu u regulisanju angiogeneze nakon moždanog udara [56]. Međutim, pokazano je da veoma visoke doze eNOS mogu uticati nepovoljno po organizam [57]. Naime, rizik od infarkta kod miševa sa injeciranim eNOS je značajno povećan 24 časa nakon okluzije srednje cerebralne arterije (MCA) u poređenju sa normalnim mišem [57].

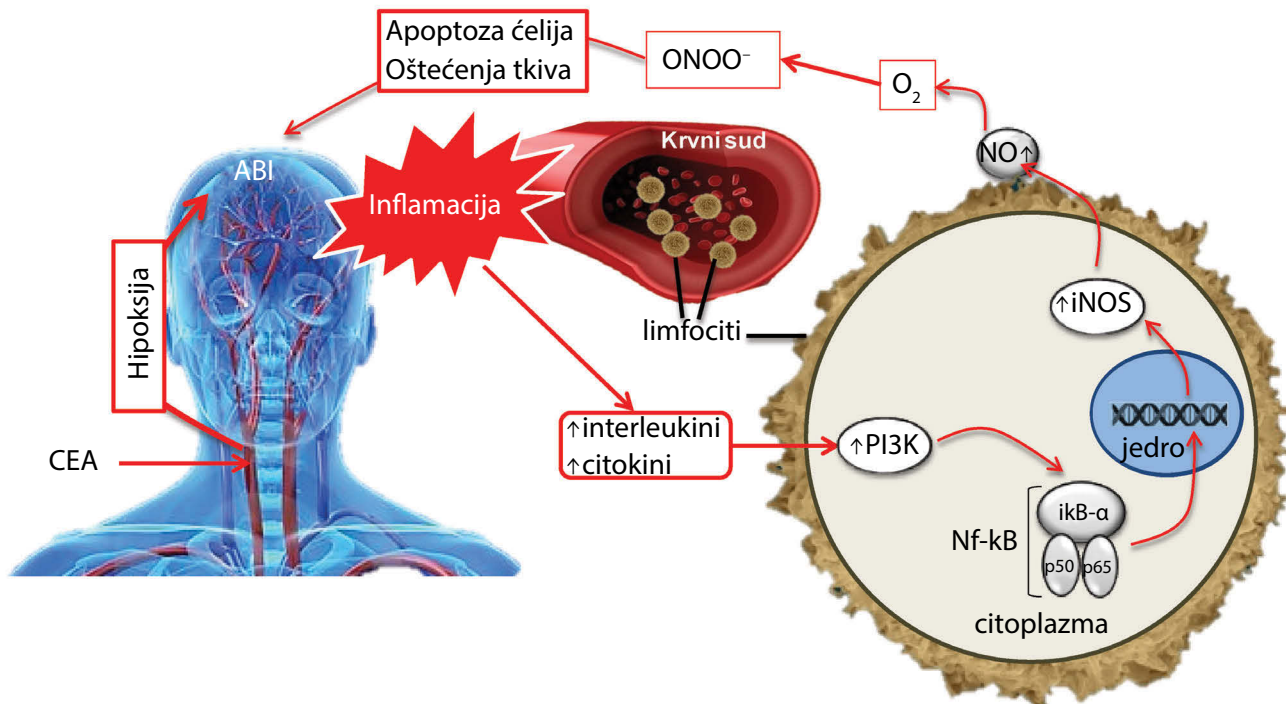
Enzim iNOS je predominantno lokalizovan u citosolu ćelije [54]. iNOS je enzim sa velikom mogućnošću sinteze NO i može da sintetiše i do 1000 puta više NO od eNOS [15]. Ovako nastali NO može imati štetne efekte, jer u velikim koncentracijama reaguje sa superoksidnim anjonima, što dovodi do nastanka visoko reaktivnih vrsta  $O_2$  [58]. Do ekspresije iNOS dolazi nakon indukcije, usled inflamacije posredovane citokinima-indukovanim faktorima transkripcije kao što je npr. nukleusni faktor- $\kappa B$  (NF $\kappa B$ ; *engl. Nuclear Factor- $\kappa B$* ) koji se vezuje za elemente u okviru promotora gena za iNOS ili nekim drugim patofiziološkim stimulusima [59, 60]. Kalmodulin ostaje nekovalentno vezan za kompleks iNOS i stoga predstavlja suštinsku podjedinicu ove izoforme [61]. Zajedno sa drugim izoformama, postoje vezivna mesta za NADPH, FMN i FAD [62]. Aktivnost iNOS je pokazana u širokom spektru ćelija i tkiva [63-65], kao što su makrofazi [66], hondrociti [67], Kupferove ćelije, hepatociti [68, 69], neutrofilima [70], zatim u pulmonarnom epitelu [71], limfocitima [72] i vaskulaturi [73]. Regulacija proizvodnje NO preko iNOS nužno se javlja tokom transkripcije i translacije [73]. Ekspresija iNOS gena i naknadno prevođenje iRNK je kontrolisana velikim brojem agonista, posebno proinflamatornim medijatorima. Citokini uključeni u regulaciju ekspresije iNOS su faktor nekroze tumora (TNF- $\alpha$ ), interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) i interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), slobodne masne kiseline (SMK) koje učestvuju u imunskom odgovoru. Takođe je pokazano da u stanju hipoksije dolazi do povećane ekspresije iNOS [74].

Jedna od osnovnih razlika između eNOS i iNOS je u mehanizmu regulacije njihove aktivnosti. Enzim eNOS je konstitutivna izoforma NOS koja je  $Ca^{2+}$  i kalmodulin zavisna, odnosno njena aktivnost je regulisana nivoom intraćelijskog  $Ca^{2+}$ , dok je aktivnost iNOS, koji takođe sadrži kalmodulin, nezavisna od koncentracije  $Ca^{2+}$  [75]. Dakle, za aktivaciju eNOS je potrebna veća koncentracija  $Ca^{2+}$  u odnosu na iNOS [55]. Takođe, za razliku od eNOS koji je aktivan u fiziološkim uslovima, aktivacija iNOS nastaje kao odgovor na različite faktore poput citokina [76], endotoksina ili oksidativnog stresa [77] u različitim patofiziološkim uslovima [78].

## ZAKLJUČAK

Hipoksično-ishemična stanja mozga nastala tokom CEA, usled hipoperfuzije, predstavljaju glavni uzrok lošeg kliničkog ishoda [6, 8-11]. Razumevanje molekularnih mehanizama u regulaciji iNOS u patološkim procesima ABI nastale tokom CEA, je od izuzetne važnosti. Razvoj inflamacije, kao i narušena ravnoteža između oksidativnih i antioksidativnih procesa imaju važnu ulogu u patologiji ABI [12-14]. Važni medijatori inflamatornih i oksidativnih procesa su iNOS i NO, stoga bi jedan od potencijalnih terapijskih pristupa mogao biti i smanjenje aktivnosti i ekspresije iNOS i prekomerne produkcije NO, odnosno stimulisanje antioksidativne aktivnosti u krvi (**Slika 1.**).





**Slika 1. Predloženi mehanizam regulacije aktivnosti i ekspresije iNOS tokom CEA.** CEA- karotidna endarterektomija; ABI– akutna moždana ishemija; PI3K– fosfatidilinozitol-3 kinaza; O<sub>2</sub>- kiseonik; NO- azot oksid; iNOS- inducibilna NOS; NfκB- nukleusni faktor kapa B; IkBa- I kapa B alfa; ONOO<sup>-</sup> peroksinitrit; ↑– fiziološko povećanje; (figura čoveka je preuzeta i modifikovana sa sajta <http://www.dreamstime.com/royalty-free-stock-image-cardiovascular-system-image5564156>).

## ZAHVALNICA

Ovaj rad je podržan projektima br. 173033 (E.R.I.) i br. 41002 (Đ.R.) finansiranim od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

## LITERATURA

- Lakhan, S.E., Kirchgessner, A., and Hofer, M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med.* 2009; 7: 97.
- Breton-Romero, R., Gonzalez de Orduna, C., Romero, N., Sanchez-Gomez, F.J., de Alvaro, C., Porras, A., Rodriguez-Pascual, F., Laranjinha, J., Radi, R., and Lamas, S. Critical role of hydrogen peroxide signaling in the sequential activation of p38 MAPK and eNOS in laminar shear stress. *Free Radic Biol Med.* 2012; 52(6): 1093-1100.
- Easton, J.D., Saver, J.L., Albers, G.W., Alberts, M.J., Chaturvedi, S., Feldmann, E., Hatsukami, T.S., Higashida, R.T., Johnston, S.C., Kidwell, C.S., Lutsep, H.L., Miller, E., Sacco, R.L., American Heart, A., American Stroke Association Stroke, C., Council on Cardiovascular, S., Anesthesia, Council on Cardiovascular, R., Intervention, Council on Cardiovascular, N., and Interdisciplinary Council on Peripheral Vascular, D. Definition and evaluation of transient ischemic attack: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association/ American Stroke Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular Nursing; and the Interdisciplinary Council on Peripheral Vascular Disease. The American Academy of Neurology affirms the value of this statement as an educational tool for neurologists. *Stroke.* 2009; 40(6): 2276-2293.
- Atanassova, P.A., Chalakov, N.T., and Dimitrov, B.D. Major vascular events after transient ischaemic attack and minor ischaemic stroke: post hoc modelling of incidence dynamics. *Cerebrovasc Dis.* 2008; 25(3): 225-233.
- Kimura, K., Minematsu, K., Yasaka, M., Wada, K., and Yamaguchi, T. The duration of symptoms in transient ischemic attack. *Neurology.* 1999; 52(5): 976-980.
- Bogdanović, N., *Analiza aktivnosti i ekspresije azot-monoksid sintaza u krvi pacijenata tokom karotidne endarterektomije*, in *Biološki fakultet.* 2014, Univerzitet u Beogradu: Beograd.
- Raichle, M.E. The pathophysiology of brain ischemia. *Ann Neurol.* 1983; 13(1): 2-10.
- Marrocco-Trischitta, M.M., Tiezzi, A., Svampa, M.G., Bandiera, G., Camilli, S., Stillo, F., Petasecca, P., Sampogna, F., Abeni, D., and Guerrini, P. Perioperative stress response to carotid endarterectomy: the impact of anesthetic modality. *J Vasc Surg.* 2004; 39(6): 1295-1304.
- Braughler, J.M. and Pregenzer, J.F. The 21-aminosteroid inhibitors of lipid peroxidation: reactions with lipid peroxy and phenoxy radicals. *Free Radic Biol Med.* 1989; 7(2): 125-130.
- Arumugam, T.V., Granger, D.N., and Mattson, M.P. Stroke and T-cells. *Neuromolecular Med.* 2005; 7(3): 229-242.
- Radak, D., Sotirovic, V., Obradovic, M., and Isenovic, E.R. Practical Use of Near-Infrared Spectroscopy in Carotid Surgery. *Angiology.* 2013.
- Chen, S.D., Yang, D.I., Lin, T.K., Shaw, F.Z., Liou, C.W., and Chuang, Y.C. Roles of Oxidative Stress, Apoptosis, PGC-1alpha and Mitochondrial Biogenesis in Cerebral Ischemia. *Int J Mol Sci.* 2011; 12(10): 7199-7215.
- Haidara, M.A., Yassin, H.Z., Zakula, Z., Mikhailidis, D.P., and Isenovic, E.R. Diabetes and antioxidants: myth or reality? *Curr Vasc Pharmacol.* 2010; 8(5): 661-672.
- Warner, D.S., Sheng, H., and Batinic-Haberle, I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol.* 2004; 207(Pt 18): 3221-3231.
- Singh, S. and Evans, T.W. Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? *Eur Respir J.* 1997; 10(3): 699-707.
- Mattson, M.P., Duan, W., Pedersen, W.A., and Culmsee, C. Neurodegenerative disorders and ischemic brain diseases. *Apoptosis.* 2001; 6(1-2): 69-81.
- Woodruff, T.M., Thundiyil, J., Tang, S.C., Sobey, C.G., Taylor, S.M., and Arumugam, T.V. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Mol Neurodegener.* 2011; 6(1): 11.
- Niizuma, K., Endo, H., and Chan, P.H. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. *J Neurochem.* 2009; 109 Suppl 1: 133-138.
- Dirnagl, U., Iadecola, C., and Moskowitz, M.A. Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999; 22(9): 391-397.

20. Andrew, K.A., Simkins, H.M., Witzel, S., Perret, R., Hudson, J., Hermans, I.F., Ritchie, D.S., Yang, J., and Ronchese, F. Dendritic cells treated with lipopolysaccharide up-regulate serine protease inhibitor 6 and remain sensitive to killing by cytotoxic T lymphocytes in vivo. *J Immunol.* 2008; 181(12): 8356-8362.
21. Olsson, T., Marklund, N., Gustafson, Y., and Nasman, B. Abnormalities at different levels of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis early after stroke. *Stroke.* 1992; 23(11): 1573-1576.
22. Fassbender, K., Schmidt, R., Mossner, R., Daffertshofer, M., and Hennerici, M. Pattern of activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in acute stroke. Relation to acute confusional state, extent of brain damage, and clinical outcome. *Stroke.* 1994; 25(6): 1105-1108.
23. Husmann, M., Thalhammer, C., Spring, S., Meier, T., Roffi, M., Schwarz, U.R., Rousson, V., and Amann-Vesti, B.R. Influence of plaque volume on hemodynamic response and stress hormone release in patients undergoing carotid artery stenting. *Int Angiol.* 2012; 31(1): 10-15.
24. Swain, S., Turner, C., Tyrrell, P., Rudd, A., and Guideline Development, G. Diagnosis and initial management of acute stroke and transient ischaemic attack: summary of NICE guidance. *BMJ.* 2008; 337: a786.
25. Savic, M., Gvozdenovic, S., and Krajnov, J. [Importance of self-assessment of functional and communication abilities on the outcome of rehabilitation in patients with hemiplegia after cerebrovascular stroke]. *Med Pregl.* 2000; 53(7-8): 405-408.
26. Halliday, A., Mansfield, A., Marro, J., Peto, C., Peto, R., Potter, J., Thomas, D., and Group, M.R.C.A.C.S.T.C. Prevention of disabling and fatal strokes by successful carotid endarterectomy in patients without recent neurological symptoms: randomised controlled trial. *Lancet.* 2004; 363(9420): 1491-1502.
27. Burton, D.G., Giles, P.J., Sheerin, A.N., Smith, S.K., Lawton, J.J., Ostler, E.L., Rhys-Williams, W., Kipling, D., and Faragher, R.G. Microarray analysis of senescent vascular smooth muscle cells: A link to atherosclerosis and vascular calcification. *Exp Gerontol.* 2009; 44(10): 659-665.
28. Sidawy, A.N., Zwolak, R.M., White, R.A., Siami, F.S., Schermerhorn, M.L., Sicard, G.A., and Outcomes Committee for the Society for Vascular, S. Risk-adjusted 30-day outcomes of carotid stenting and endarterectomy: results from the SVS Vascular Registry. *J Vasc Surg.* 2009; 49(1): 71-79.
29. International Carotid Stenting Study, i., Ederle, J., Dobson, J., Featherstone, R.L., Bonati, L.H., van der Worp, H.B., de Borst, G.J., Lo, T.H., Gaines, P., Dormann, P.J., Macdonald, S., Lyrer, P.A., Hendriks, J.M., McCollum, C., Nederkoorn, P.J., and Brown, M.M. Carotid artery stenting compared with endarterectomy in patients with symptomatic carotid stenosis (International Carotid Stenting Study): an interim analysis of a randomised controlled trial. *Lancet.* 2010; 375(9719): 985-997.
30. Moritz, S., Schmidt, C., Bucher, M., Wiesenack, C., Zimmermann, M., Schebesch, K.M., Kasprzak, P., and Metz, C. Neuromonitoring in carotid surgery: are the results obtained in awake patients transferable to patients under sevoflurane/fentanyl anesthesia? *J Neurosurg Anesthesiol.* 2010; 22(4): 288-295.
31. Beese, U., Langer, H., Lang, W., and Dinkel, M. Comparison of near-infrared spectroscopy and somatosensory evoked potentials for the detection of cerebral ischemia during carotid endarterectomy. *Stroke.* 1998; 29(10): 2032-2037.
32. Allen, C.L. and Bayraktutan, U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Int J Stroke.* 2009; 4(6): 461-470.
33. Guix, F.X., Uribesalgo, I., Coma, M., and Munoz, F.J. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol.* 2005; 76(2): 126-152.
34. Cherubini, A., Polidori, C., Benedetti, C., Ercolani, S., Senin, U., and Mecocci, P., Association Between Ischemic Stroke and Increased Oxidative Stress, in *2nd Virtual Congress of Cardiology 2nd Virtual Congress of Cardiology Argentine Federation of Cardiology.*
35. Wei, G., Dawson, V.L., and Zweier, J.L. Role of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in nitric oxide generation in the brain following cerebral ischemia. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1455(1): 23-34.
36. Chan, P.H. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001; 21(1): 2-14.
37. Iadecola, C., Zhang, F., Casey, R., Clark, H.B., and Ross, M.E. Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia. *Stroke.* 1996; 27(8): 1373-1380.
38. Dawson, D.A., Masayasu, H., Graham, D.I., and Macrae, I.M. The neuroprotective efficacy of ebselen (a glutathione peroxidase mimic) on brain damage induced by transient focal cerebral ischaemia in the rat. *Neurosci Lett.* 1995; 185(1): 65-69.
39. Breton, R.R. and Rodríguez, J.C.G., eds. Excitotoxicity and Oxidative Stress in Acute Ischemic Stroke, *Acute Ischemic Stroke.* Vol. CC BY 3.0 license. 2012, InTech.
40. Mracsko, E., Hügycz, M., Institoris, A., Farkas, E., and Bari, F. Changes in pro-oxidant and antioxidant enzyme levels during cerebral hypoperfusion in rats. *Brain Res.* 2010; 1321: 13-19.
41. Kubes, P., Suzuki, M., and Granger, D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88(11): 4651-4655.
42. Iadecola, C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci.* 1997; 20(3): 132-139.
43. Lipton, S.A. Neuronal protection and destruction by NO. *Cell Death Differ.* 1999; 6(10): 943-951.
44. Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., and Freeman, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 87(4): 1620-1624.
45. Reif, D.W. and Simmons, R.D. Nitric oxide mediates iron release from ferritin. *Arch Biochem Biophys.* 1990; 283(2): 537-541.
46. Montague, P.R., Gancayco, C.D., Winn, M.J., Marchase, R.B., and Friedlander, M.J. Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science.* 1994; 263(5149): 973-977.
47. Soskic, S.S., Dobutovic, B.D., Sudar, E.M., Obradovic, M.M., Nikolic, D.M., Djordjevic, J.D., Radak, D.J., Mikhailidis, D.P., and Isenovic, E.R. Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) and its Potential Role in Insulin Resistance, Diabetes and Heart Failure. *Open Cardiovasc Med J.* 2011; 5: 153-163.
48. Suofu, Y., Clark, J., Broderick, J., Wagner, K.R., Tomsick, T., Sa, Y., and Lu, A. Peroxynitrite decomposition catalyst prevents matrix metalloproteinase activation and neurovascular injury after prolonged cerebral ischemia in rats. *J Neurochem.* 2010; 115(5): 1266-1276.
49. Lyons, C.R., Orloff, G.J., and Cunningham, J.M. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem.* 1992; 267(9): 6370-6374.
50. Marsden, P.A., Schappert, K.T., Chen, H.S., Flowers, M., Sundell, C.L., Wilcox, J.N., Lamas, S., and Michel, T. Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett.* 1992; 307(3): 287-293.
51. Bredt, D.S. and Snyder, S.H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron.* 1992; 8(1): 3-11.
52. Love, S. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol.* 1999; 9(1): 119-131.
53. Nakka, V.P., Gusain, A., Mehta, S.L., and Raghupir, R. Molecular mechanisms of apoptosis in cerebral ischemia: multiple neuroprotective opportunities. *Mol Neurobiol.* 2008; 37(1): 7-38.
54. Schulz, R., Rassaf, T., Massion, P.B., Kelm, M., and Balligand, J.L. Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide in cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther.* 2005; 108(3): 225-256.
55. Fleming, I. and Busse, R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 284(1): R1-12.
56. Cui, X., Chopp, M., Zacharek, A., Zhang, C., Roberts, C., and Chen, J. Role of endothelial nitric oxide synthetase in arteriogenesis after stroke in mice. *Neuroscience.* 2009; 159(2): 744-750.
57. Huang, Z., Huang, P.L., Ma, J., Meng, W., Ayata, C., Fishman, M.C., and Moskowitz, M.A. Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996; 16(5): 981-987.
58. Ferdinandy, P. and Schulz, R. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *Br J Pharmacol.* 2003; 138(4): 532-543.
59. Balligand, J.L. and Cannon, P.J. Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17(10): 1846-1858.
60. Mungro, I.N., Gros, R., You, X., Pirani, A., Azad, A., Csont, T., Schulz, R., Butany, J., Stewart, D.J., and Husain, M. Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death. *J Clin Invest.* 2002; 109(6): 735-743.

61. Xie, Q.W., Cho, H.J., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Ding, A., Troso, T., and Nathan, C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*. 1992; 256(5054): 225-228.
62. Knowles, R.G. and Moncada, S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*. 1994; 298 (Pt 2): 249-258.
63. Stuehr, D.J. and Griffith, O.W. Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1992; 65: 287-346.
64. Isenovic, E. and LaPointe, M.C. Role of Ca(2+)-independent phospholipase A(2) in the regulation of inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *Hypertension*. 2000; 35(1 Pt 2): 249-254.
65. Isenovic, E.R., Fretaud, M., Koricanac, G., Sudar, E., Velebit, J., Dobutovic, B., and Marche, P. Insulin regulation of proliferation involves activation of AKT and ERK 1/2 signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2009; 117(5): 214-219.
66. MacMicking, J., Xie, Q.W., and Nathan, C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*. 1997; 15: 323-350.
67. Charles, I.G., Palmer, R.M., Hickery, M.S., Bayliss, M.T., Chubb, A.P., Hall, V.S., Moss, D.W., and Moncada, S. Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(23): 11419-11423.
68. Curran, R.D., Billiar, T.R., Stuehr, D.J., Ochoa, J.B., Harbrecht, B.G., Flint, S.G., and Simmons, R.L. Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis. *Ann Surg*. 1990; 212(4): 462-469; discussion 470-461.
69. Geller, D.A., Nussler, A.K., Di Silvio, M., Lowenstein, C.J., Shapiro, R.A., Wang, S.C., Simmons, R.L., and Billiar, T.R. Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(2): 522-526.
70. Sethi, S. and Dikshit, M. Modulation of polymorphonuclear leukocytes function by nitric oxide. *Thromb Res*. 2000; 100(3): 223-247.
71. Asano, K., Chee, C.B., Gaston, B., Lilly, C.M., Gerard, C., Drazen, J.M., and Stamler, J.S. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(21): 10089-10093.
72. Iakubets, O.I., Fafula, R.V., Vorobets, D.Z., and Vorobets, Z.D. [Arginase and NO-synthase pathways of L-arginine metabolism in peripheral blood lymphocytes of patients with ovarian cancer]. *Ukr Biokhim Zh*. 2013; 85(5): 105-113.
73. Hickey, M.J., Granger, D.N., and Kubes, P. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and regulation of leucocyte/endothelial cell interactions: studies in iNOS-deficient mice. *Acta Physiol Scand*. 2001; 173(1): 119-126.
74. Ferreiro, C.R., Chagas, A.C., Carvalho, M.H., Dantas, A.P., Jatene, M.B., Bento De Souza, L.C., and Lemos Da Luz, P. Influence of hypoxia on nitric oxide synthase activity and gene expression in children with congenital heart disease: a novel pathophysiological adaptive mechanism. *Circulation*. 2001; 103(18): 2272-2276.
75. Fukuto, J.M. Chemistry of N-hydroxy-L-arginine. *Methods Enzymol*. 1996; 268: 365-375.
76. Elizalde, M., Ryden, M., van Harmelen, V., Eneroth, P., Gyllenhammar, H., Holm, C., Ramel, S., Olund, A., Arner, P., and Andersson, K. Expression of nitric oxide synthases in subcutaneous adipose tissue of non-obese and obese humans. *J Lipid Res*. 2000; 41(8): 1244-1251.
77. Fujimoto, M., Shimizu, N., Kunii, K., Martyn, J.A., Ueki, K., and Kaneki, M. A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. *Diabetes*. 2005; 54(5): 1340-1348.
78. Osei, S.Y., Ahima, R.S., Fabry, M.E., Nagel, R.L., and Bank, N. Immunohistochemical localization of hepatic nitric oxide synthase in normal and transgenic sickle cell mice: the effect of hypoxia. *Blood*. 1996; 88(9): 3583-3588.