

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Aleksandra R. Vukašinić

**ISPITIVANJE POVEZANOSTI REDOKS
STATUSA I TELOMERA – TELOMERAZA
SISTEMA KOD BOLESNIKA SA AKUTNIM
INFARKTOM MIOKARDA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Aleksandra R. Vukašinić

**INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP
BETWEEN REDOX STATUS AND
TELOMERE - TELOMERASE SYSTEM
IN PATIENTS WITH ACUTE
MYOCARDIAL INFARCTION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

MENTORI:

dr Jelena Kotur – Stevuljević, redovni profesor
Univerziteta u Beogradu - Farmaceutski fakultet

dr Marija Zdravković, docent
Univerziteta u Beogradu - Medicinski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE:

dr Nataša Bogavac-Stanojević, redovni profesor
Univerziteta u Beogradu - Farmaceutski fakultet

dr Aleksandar N. Nešković, redovni profesor
Univerziteta u Beogradu - Medicinski fakultet

dr Barbara Ostanek, vanredni profesor
Univerziteta u Ljubljani, Slovenija - Farmaceutski fakultet

Datum odbrane doktorske disertacije: _____

“Ništa nije nemoguće za one koji imaju volju pokušati”

Aleksandar Veliki

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, pod mentorstvom prof. dr Jelene Kotur-Stevuljević. Deo disertacije je urađen na Katedri za kliničku biohemiju Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Ljubljani. Uzroci su sakupljani u Kliničko – bolničkom centru “Zemun” i Kliničko – bolničkom centru “Bežanijska kosa” u Beogradu.

Svaki put ima svoj početak i kraj, a svaka doktorska disertacije je jedno putovanje. I ova je jedno putovanje započeto davne 2013.godine, kao želja jenog mladog uma za otkrivanjem nečeg novog. Put beše trnovit, ne uvek prav, pun krivina, uspona i padova, prekriven maglom. Ali uspeli smo. Uspeli smo zajedno. I zato hvala Vam.

Najiskrenije se zahvaljujem svojoj mentorki prof. dr Jeleni Kotur-Stevuljević na svim stručnim savetima i sugestijama, podršci i poverenju, i strpljenju koje je imala za mene tokom izrade ove doktorske disertacije.

Najiskrenije se zahvaljujem i prof. dr Barbari Ostanek na poverenju, podršci i ostvarenoj saradnji.

Neizmernu zahvalnost dugujem i prof. dr Aleksandru Nešković i doc. dr Mariji Zdravković na saradnji, poverenju i uvek lepim rečima. Posebno dr Zorici Cvetković, bez koje ova saadnje ne bi ni bila moguća.

Hvala svim zaposlenima na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, na kolegijalnosti i pomoći. Bila je čast i veliko zadovoljstvo biti član takvog tima. Posebno hvala Mironu Sopići, Milici Miljković i Vesni Stanković koji su uvek bili spremni da rade sa mnom rame uz rame.

Veliko hvala i svim zaposlenima na Katedri za kliničku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Ljubljani, naročito prof. Janji Marc, Manji Cedilnik i Petri Ferkov, i što su me uvek rado primali, bili spremni da mi pomognu, odgovore na na sva moja pitanja i učinili da se osećam „kao kod kuće“. Veliko hvala i kolegama dr Srđanu Kafedžiću i dr Vidu Mlaku, na velikoj pomoći i kolegijalnosti.

Zahvalnost koja nema kraja je ona koju dugujem meni najdražima. Drugu Dušanu Malenovu, na našim kafama koje su trajale satima, spremnosti da podeli sve, i lepo i ono manje lepo, svoje ideje i do detalja analizira svaki postupak i situaciju. Jeleni Malić na bezuslovnoj pomoći i prijateljstvu, ali na zasukanim rukavima u momentu sakupljanja uzoraka. Savki Mutavdžić na divnom prijateljstvu i pomoći kad god je to bilo potrebno. I na karaju, mojoj porodici, mojim roditeljima i sestri Seleni. Njima dugujem najveću zahvalnost i ono što danas jesam. Hvala što ste uvek uz mene, vi ste moje sve...

Ovu disertaciju posvećujem njima, mojoj porodici.

ISPITIVANJE POVEZANOSTI REDOKS STATUSA I TELOMERA – TELOMERAZA SISTEMA KOD BOLESNIKA SA AKUTNIM INFARKTOM MIOKARDA

Sažetak: Kardiovaskularne bolesti ostaju vodeći uzrok smrtnost širom sveta i u Srbiji. U patofiziološkoj osnovi ovih bolesti leži aterosklerotski proces. Razvoj i napredovanje aterosklerotskog procesa usko su povezani sa oksidativnim stresom kao i narušenom funkcijom DNK gledano kroz telomera-telomeraza sistem. U ovom istraživanju, pažnja je bila usmerena na bolesnike sa akutnom infarktom miokarda sa elevacijom ST segmenta lečenih perkutanom koronarnom intervencijom (pPCI), u okviru kojih su analizirani MINOCA bolesnici i bolesnici bez ugrađenog stenta kao zasebne podgrupe. Parametri telomera-telomeraza sistema (dužina telomera leukocita i aktivnost enzima telomeraze) kao i parametri redoks statusa (prooksidativni, antioksidativni i oksidativni skor) analizirani su prvi put u populaciji u Srbiji, stoga je određen njihov referentni opseg. U ovoj studiji urađena je i optimizacija i validacija metoda za određivanje telomera-telomeraza sistema. Pokazano je da se kod bolesnika značajno skraćuje dužina telomera leukocita periferne krvi skraćuje, pre pPCI, dok se nakon pPCI povećava, i šest meseci od akutnog infarkta miokarda ponovo se vraća na nivo kao u trenutku pre pPCI. Sa druge strane, aktivnost enzima telomeraze se povećava pre pPCI i ostaje povišena i 6 meseci nakon akutnog infarkta miokarda. U krvi ovih bolesnika izmeren je i povećan oksidativni stres odnosno povišen prooksidativni i oksidativni skor pre pPCI, dok se posle pPCI vrednost poroksidativnog skora smanjuje progresivno sve do 6 meseci nakon akutnog infarkta miokarda. Sa druge strane, vrednosti oksidativnog skora posle pPCI se smanjuju i potom se ponovo povećavaju nakon 6 meseci. Nasuprot njima, antioksidativni skor je snižen pre pPCI u odnosu na bolesnike i ostaje nizak 6 meseci nakon akutnog infarkta miokarda. Poređenje grupa bolesnika je pokazalo da je dužina telomera leukocita bila značajno duža kod kontrolne grupe u odnosu na kardiovaskularne bolesnike, dok je aktivnost enzima telomeraze značajno viša kod svih podrupa bolesnika u odnosu na kontrolnu grupu. Prooksidativni i oksidativni skor najviši su bili kod MINOCA bolesnika i bolesnika bez stenta u odnosu na ostale grupe bolesnika i zdrave osobe, koji su imali slične vrednosti. Nasuprot njima, antioksidativni skor je bio niži kod MINOCA bolesnika i bolesnika bez stenta u odnosu na ostale grupe bolesnika i zdrave osobe. Slično kretanje parametara redoks statusa i telomera-telomeraza sistema pokazano je u nekoliko tipova uzoraka ovih bolesnika analiziranih u ovom istraživanju, kao što su arterijska krv pre pPCI i tromboaspirat dobijen tokom pPCI. S obzirom na to da postoji konstantna potreba za specifičnijim markerima koji će u ranom stadijumu specifično ukazati na akutni infarkt miokarda i eventualno biti korisni u praćenju ishoda bolesnika, novi parametri redoks statusa i telomera-telomeraza sistema kombinovni su sa osnovnim biohemijskim parametrima upotrebom statističke analize glavnih komponenti, kako bi se dobili sveobuhvatniji faktori sa dovoljnom tačnošću i specifičnošću da ispune pomenute zahteve. Izdvojio se „oksidativni-

telomera“ faktor koji je uključio dužinu telomera leukocita, prooksidativno-antioksidativni balans, totalni antioksidativni status i ishemijom modifikovani albumin sa dovoljnom dijagnostičkom tačnosti i specifičnosti (ROC analiza) da razdvoji STE-AIM bolesnike od zdravih osoba i ostalih kardiovaskularnih bolesnika. Relativna dužina telomera leukocita periferne krvi pokazala je potencijal da postane biomarker za dugoročno praćenje neželjenih ishoda bolesnika (kao što je reinfarkt i smrtni ishod). Dodatne longitudinalne studije na velikom broju bolesnika su neophodne kako bi se potvrdili podaci dobijeni u ovom istraživanju.

Ključne reči: akutni infarkt miokarda, ateroskleroza, relativna dužina telomera leukocita, aktivnost enzima telomeraze, redoks status, novi biomarkeri

Naučna oblast: Medicinske nauke

Uža naučna oblast: Medicinska biohemija

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN REDOX STATUS AND TELOMERE - TELOMERASE SYSTEM IN PATIENTS WITH ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION

Abstract: Cardiovascular diseases remain the leading cause of death worldwide and in Serbia. Its pathophysiological base is atherosclerosis. Development and progression of atherosclerotic process is tightly connected to oxidative stress and DNA dysfunction, evaluated through the telomere-telomerase system. In this study, the target group were patients with acute myocardial infarction, candidates for primary percutaneous intervention (pPCI), which also included MINOCA and patients without stent implementation. Since parameters of the telomere-telomerase system (leukocyte telomere length and telomerase activity) as well as parameters of redox status (prooxidative, antioxidative and oxidative score) were analyzed for the first time in the Serbian population, the reference values were calculated. Additionally, in our study, telomere-telomerase system measurement methods were optimised and *in-house* validation was performed in order to evaluate its possible clinical use. It was shown that leukocyte telomere length is reduced in the acute state before pPCI, while its increase was noticed after pPCI, and again decrease six months after the acute myocardial infarction. On the other side, telomerase activity was increased before pPCI and stayed elevated even six months after the acute myocardial infarction. Severe oxidative stress is measured in the blood of these patients, more precise, increased values of prooxidative and oxidative scores are noticed before pPCI, while after pPCI prooxidative score values were reduced and stayed low six months after the acute myocardial infarction. Oxidative stress showed lower values after pPCI and once again increased its values six months after the intervention. Oppositely, the antioxidative score is reduced in samples before pPCI compared to healthy controls, while its values were dramatically reduced after the pPCI and stayed low six months after the acute myocardial infarction. Analyzing the groups of patients, leukocyte telomere length was significantly longer in healthy persons than in all cardiovascular patients, while telomerase activity was significantly higher in all cardiovascular patients compared to healthy persons. Prooxidative and oxidative score had the highest value in MINOCA and patients without stent compared to other patients' groups and healthy persons as well. All opposite, antioxidative score had the lowest value in MINOCA and patients without stent compared to other patients' groups as well as healthy persons. Similar trend of parameters' values was noticed in redox status parameters and telomere-telomerase system parameters analyzed in different sample types included in this research, like arterial blood sampled before pPCI and thrombus obtained during pPCI. Since there is always a need for more specific biomarkers that will be able to indicate the disease in an early stage or efficiently monitor disease outcome, new parameters of redox status and the telomere-telomerase system were combined with basic biochemical parameters using

statistical principal component analysis in order to obtain new comprehensive factors, specific and sensitive enough to fulfill expectations. “Oxidative-telomere” factor stands out as a novel factor with diagnostic specificity and sensitivity (ROC analysis) high enough to discriminate STE-AIM patients from healthy persons and the rest of cardiovascular disease patients. “Oxidative-telomere” factor included leukocyte telomere length, prooxidative-antioxidant balance, total antioxidant status and ischemia modified albumin. Telomere length was shown to be a convenient parameter to monitor long-term outcomes like reinfection and death in patients. Still, additional longitudinal studies on great number of patients are needed to confirm the findings from this study.

Key words: acute myocardial infarction, relative leukocyte telomere length, telomere enzyme activity, redox status, novel biomarkers

Scientific field: Medical sciences

Scientific sub-field: Medical biochemistry

SADRŽAJ

1.	Uvod.....	3
1.1.	Kardiovaskularne bolesti.....	3
1.1.1.	Klasifikacija kardiovaskularnih bolesti.....	3
1.1.2.	Faktori rizika za KVB.....	4
1.1.3.	Manifestacija KVB.....	6
1.1.4.	MINOCA.....	7
1.1.5.	Patofiziološki procesi – endotelna disfunkcija i ateroskleroza.....	7
1.1.6.	Lečenje.....	8
1.1.7.	SYNTAX skore.....	9
1.2.	Telomere - telomeraza sistem.....	9
1.2.1.	Telomere – struktura i funkcija.....	9
1.2.2.	Telomeraza – struktura i funkcija.....	13
1.2.3.	Mehanizam replikacije telomera.....	15
1.2.4.	Mehanizam telomerazne aktivnosti.....	17
1.2.5.	Telomere i telomeraza u različitim tipovima ćelija.....	19
1.2.6.	Telomere, telomeraza, starenje i tumorogeneza.....	20
1.2.7.	Bolesti u kojima imaju ulogu telomere i telomeraze.....	21
1.2.8.	Kardiovaskularne bolesti, ateroskleroza telomera-telomeraza sistem.....	22
1.3.	Oksidativni stres.....	23
1.3.1.	Prooksidansi.....	23
1.3.2.	Izvori proksidanasa.....	24
1.3.3.	Egzogeni izvori proksidanasa (ROS).....	24
1.3.4.	Endogeni izvori proksidanasa.....	25
1.3.1.	Antioksidansi.....	28
2.	Ciljevi istraživanja:.....	31
3.	Materijal i metode.....	32
3.1.	Eksperimentalni dizajn istraživanja.....	32
3.1.1.	Kriterijumi za uključivanje bolesnika u studiju:.....	33
3.1.2.	Kriterijumi za isključivanje bolesnika iz studije:.....	33
3.2.	Biološki material korišćen u istraživanju.....	34
3.2.1.	Uzorci sakupljeni od kardiovaskularnih bolesnika.....	34
3.2.2.	Uzorci za optimizaciju određivanja aktivnosti enzima telomeraze.....	36
3.3.	Priprema uzorka i određivanje aktivnosti enzima telomeraze.....	36
3.3.1.	Izolovanje ezima telomeraze.....	36
3.3.2.	Određivanje enzima telomeraze.....	37
3.4.	Priprema uzorka i određivanje dužine telomera.....	37

3.4.1.	Izolovanje genomske DNK	37
3.4.2.	Određivanje dužine telomere leukocita qPCR metodom	38
3.5.	Određivanje parametara redoks statusa	38
3.6.	Osnovni biohemijski i hematološki parametri	40
3.7.	Ispitivanje stabilnosti uzorka za određivanje aktivnosti telomeraze i parcijalna validacija RTq-TRAP metode	40
3.8.	Parcijalna validacija RTq-TRAP metode	40
3.9.	Parcijalna in-house validacija metoda za određivanje dužine telomera leukocita	40
3.10.	Statistička analiza podataka	41
4.	<i>Rezultati</i>	43
4.1.	Stabilnost uzorka za određivanje aktivnosti telomeraze i parcijalna validacija TRAP metode .	43
4.2.	Standardna kriva i preračunavanje relativne aktivnosti enzima telomeraze pacijenata	45
4.3.	Parcijalna in-house validacija qRT-PCR metode za određivanje dužine telomera leukocita	46
4.3.	Standardna kriva i preračunavanje T/S odnosa za relativnu dužinu telomera leukocita	46
4.4.	Relativna dužina telomera leukocita i aktivnost enzima telomeraze kardiovaskularnih bolesnika i zdravih osoba	48
5.	<i>Diskusija</i>	70
6.	<i>Zaključci</i>	87
	<i>Reference</i>	89
	<i>Prilog 1</i>	102
	<i>Prilog 2</i>	103
	<i>Prilog 3</i>	104

1. Uvod

1.1. Kardiovaskularne bolesti

Kardiovaskularne bolesti (KVB) predstavljaju glavni uzok smrti u većini razvijenih zemalja, kao i u mnogim zemljama u razvoju. Više od trećine umrlih usled KVB pripadaju osobama srednjeg životnog doba. Značajan su uzrok radne nesposobnosti, velikih troškova zdravstvene zaštite i prevremene smrtnosti osoba mlađih od 65 godina. Zahvaljujući organizovanim preventivnim merama, došlo je do smanjenja stopa mortaliteta od KVB u svetu. Ipak, i pored opadanja uzrasno specifičnih stopa mortaliteta u razvijenim zemljama, apsolutni broj umrlih se nije smanjio, usled sve većeg porasta broja starije populacije u većini zemalja. Određeni uticaj na trend KVB ima i pravovremena terapija prvog infarkta miokarda, što je dovelo do boljeg preživljavanja osoba koje su ga imale, ali i do povećanja broja osoba sa recidivom. Iz ovih razloga, značaj KVB u patologiji stanovništva je izuzetno veliki, a smatra se da će takav ostati i u budućnosti (Visseren et al, 2021).

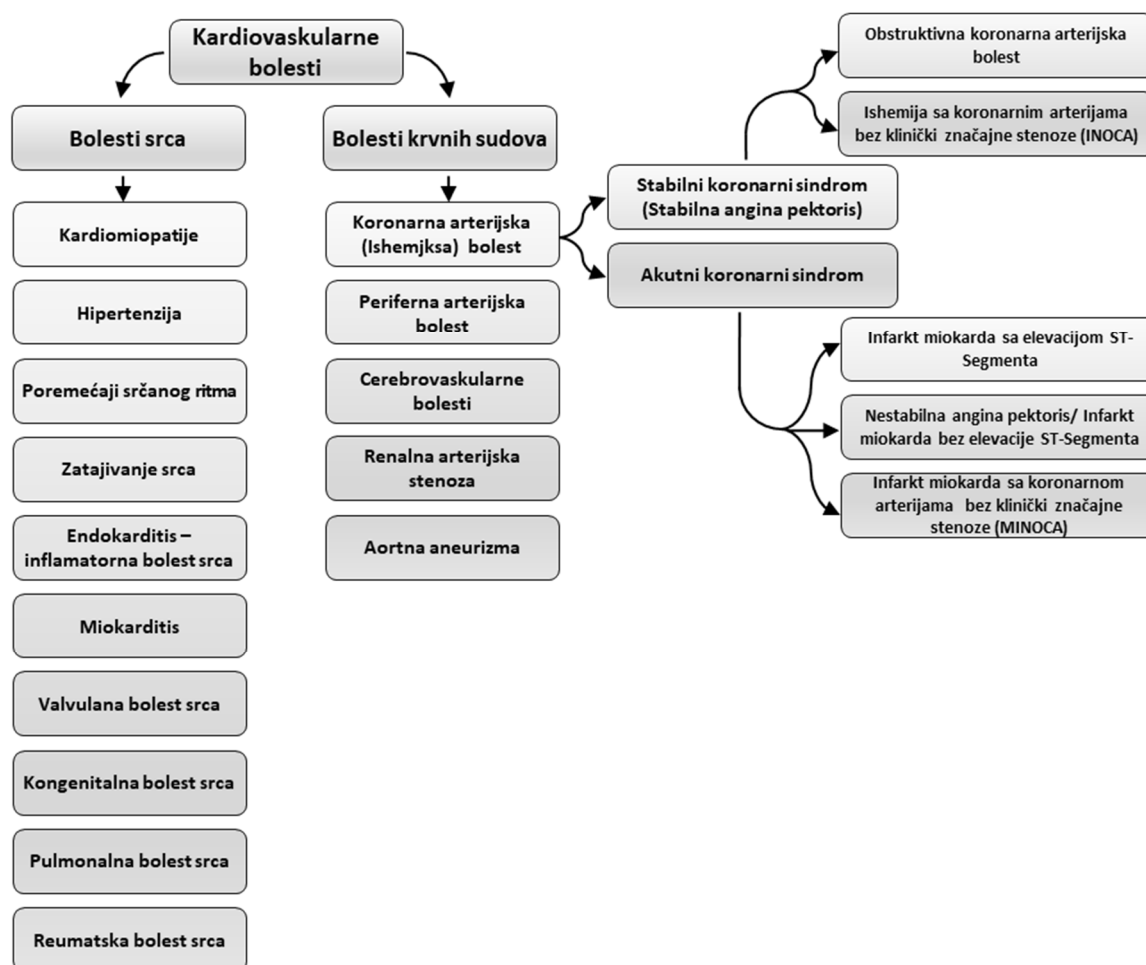
Redovno prikupljanje podataka o incidenciji KVB nedostaje skoro u svim zemljama sveta. Prema podacima iz 2014. godine, Srbija se nalazi na 14. mestu kada se posmatraju generalno sve kardiovaskularne bolesti, a na 20. mestu kada se posmatra koronarna arterijska bolest kao izdvojeno oboljenje. Noviji podaci odnosno rangiranje zemalja izostaje u poslednjih 10 godina. Prema podacima Nacionalnog registra za Srbiju, u 2021. godini dijagnoza akutnog koronarnog sindroma postavljena je kod 22.763 bolesnika, i činila je 50,9% svih smrtnih ishoda od ishemijske bolesti srca. (<https://www.batut.org.rs>). Stoga je njihova prevencija od izuzetnog značaja, kako bi se učestalost pojave i posledica samih KVB svela na što niži nivo (Visseren et al, 2021; WHO web-site).

1.1.1. Klasifikacija kardiovaskularnih bolesti

Kardiovaskularne bolesti predstavljaju heterogenu grupu bolesti koja obuhvata bolesti srca i krvnih sudova. Moguće ih je podeliti u dve velike grupe: *bolesti srca* i *bolesti krvnih sudova*. Bolesti srca obuhvataju bolesti srčanog mišića različite etiologije i patofizioloških mehanizama. U ovu grupu ubrajaju se kardiomiopatije, poremećaji srčanog ritma, hipertenzija, inflamatorna bolest srca, miokarditis, kongenitalna bolest srca, valvularna bolest srca, reumatska bolest srca, a opisani su i tumori srčanog mišića. Ove bolesti neće biti obrađivane u daljem tekstu.

Sa druge strane, bolesti krvnih sudova obuhvataju bolesti krvotoka odnosno najčešće arterijskog sistema u različitim organima (Slika 1). Stoga se razlikuju koronarna arterijska bolest, periferna arterijska bolest, cerebrovaskularne bolesti, renalna arterijska stenoza i aortna aneurizma.

Koronarna arterijska bolest odnosno akutni koronarni sindrom sa svojim pripadajućim entitetima (infarkt miokarda sa elevacijom ST-segmenta (STE-AIM), infarkt miokarda bez elevacije ST-segmenta (NSTEMI-AIM), infarkt miokarda sa koronarnim arterijama bez klinički značajne stenozе (MINOCA)), o kojima će prvenstveno biti reči u ovoj doktorskoj disertaciji, svrstavaju se primarno u grupu bolesti krvnih sudova srca. Smatra se da su njihov najznačajniji uzrok nastanka aterosklerotske promene u endotelu krvnog suda (pogledati pasus 1.1.5.) (*Jameson et al, 20th edition*).



Slika 1. Klasifikacija kardiovaskularnih bolesti

1.1.2. Faktori rizika za KVB

Redukovanje morbiditeta i mortaliteta KVB je od velikog kliničkog i populacionog značaja, stoga se moraju imati u vidu svi faktori koji eventualno mogu doprineti njihovom razvoju. KVB su multifaktorske bolesti i istovremeno prisustvo više od jednog faktora rizika značajno uvećava rizik pojave samih bolesti ili pak akutnog infarkta miokarda (*Frančuola-Zainović et al,*

2018; Abidov et al, 2020). Najznačajniji faktori rizika za razvoj KVB sumirani su u Tabeli 1. Svaki od navedenih faktora rizika uzet je u razmatranje prilikom regrutovanja bolesnika u ovom istraživanju i kasnije u obradi podataka zbog značajnog uticaja na same rezultate istraživanja, ali dalji doprinos svakog od njih ponaosob nije detaljnije obrađivan u ovoj tezi.

Tabela 1. Najznačajniji faktori rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (Frančuola-Zainović et al, 2018)

<i>Faktor rizika</i>	<i>Opis</i>
<i>Nepromenljivi</i>	
<i>Starosna dob</i>	Sa godinama se rizik od KVB povećava
<i>Pol</i>	Muški pol ima veću predispoziciju KVB
<i>Predispozicija/genotip</i>	Prisustvo KVB u porodičnoj anamnezi
<i>Socio-ekonomski faktori</i>	Nizak socioekonomski status, stres, depresija povećavaju rizik KVB
<i>Promenljivi</i>	
<i>Hipertenzija</i>	Sistolni krvni pritisak iznad 120mmHg Dijastolni krvni pritisak iznad 80mmHg
<i>Koncentracija lipida</i>	Povećan ukupan holesterol >5.20 mmol/L Povećani trigliceridi >1.70 mmol/L Povećan LDL holesterol >3.40 mmol/L Snižen HDL holesterol <1.60 mmol/L Non „HDL-holesterol“ >3.40 mmol/L
<i>Metabolički sindrom</i>	Ili Sindrom X predstavlja kombinacija faktora rizika (insulinske rezistencije, visokog krvnog pritiska i gojaznosti) koji značajno uvećava rizik nastanka KVB
<i>Dijabetes melitus</i>	HbA1c \geq 6.5% Koncentracija glukoze u krvi posle perioda noćnog gladovanja \geq 7.0mmol/L Nivo glukoze u krvi 2h nakon obroka \geq 11 mmol/L
<i>Gojaznost</i>	Indeks telesne mase iznad 25kg/m ²
<i>Ishrana</i>	Preporučeni dnevni unos namirnca: - Zasićene masne kiseline: < 10% - Trans masne kiseline: < 1% - Kuhinjska so: < 5g - Vlakna: 30g – 45g - Voće: 200g - Povrće: 200g - Riba: najmanje 2 puta nedeljno - Alkohol: 2 čaše (muškarci)/ 1 čaša (žene)
<i>Pušenje cigareta/duvanski dim</i>	Udvostručuje 10-godišnji rizik od nastanka KV događaja
<i>Fizička (ne)aktivnost</i>	Sedentarni način života povećava rizik nastanka KVB 1,5 puta
<i>Novodefinisani</i>	
<i>Visok nivo homocisteina, Lp(a), inflamatornih markera i hemostatiskih faktora</i>	/

Radi lakše dijagnoze i praćenja osoba sa povećanim rizikom za nastanak KVB, razvijen je i model za praćenje osoba pod rizikom, nazvan SCORE sistem (eng. *Systemic, Coronary Risk Estimation tables; SCORE*). SCORE se sastoji iz tabela za svaki pol, koje evaluiraju postojeće faktore rizika (status pušenja, krvi pritisak i koncentraciju ukupnog holesterola) i daju jedinstven zbir koji ukazuje na procenat verovatnoće za fatalni kardiovaskularni događaja u narednih 10

godina. Primenjuje se kod osoba koje nemaju već dijagnostifikovane KVB, dok se kod dijagnostikovanih bolesnika može koristiti za praćenje (SCORE2 working group, 2021). Sistem SCORE tabela prikazan je na Slici 2.



Slika 2. Skor sistem vrednovanja rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (modifikovano, preuzeto od SCORE2 working group, 2021)

1.1.3. Manifestacija KVB

Uobičajena manifestacija KAB je akutni koronarni sindrom (AKS), koji uključuje tri entiteta: nestabilna angina pektoris (NAP), akutni infarkt miokarda (AIM) sa elevacijom ST-segmenta (eng. *ST-segment elevation*; STE) i bez elevacije ST-segmenta (eng. *non ST-segment elevation*; NSTE). STE-AIM uglavnom nastaje kao posledica kompletne i dugotrajne okluzije arterijskih krvnih sudova i praćena je povišenim nivoom srčanih biomarkera u krvi, kao i tipičnom elevacijom ST-segmenta na elektrokardiogramu. Sa druge strane, NSTE-AIM je posledica teškog, nekompletnog suženja ili mikroembolizacije trombom ili ateromom, i uglavnom se odlikuje umereno povišenim srčanim biomarkerima u krvi i odsustvom elevacije ST-segmenta na

elektrokardiogramu (Makki et al, 2015; Jameson et al, 20th edition). NAP predstavlja osećaj bola koji se javlja u toku mirovanja ili pri laganim fizičkim aktivnostima, uzrokovan kritičnim niskim nivoom snabdevanja srčanog mišica kiseonikom. Ukoliko se ne tretira, najčešće napreduje do akutnog infarkta miokarda ili otkazivanja srca (Makki et al, 2015; Jameson et al, 20th edition).

1.1.4. MINOCA

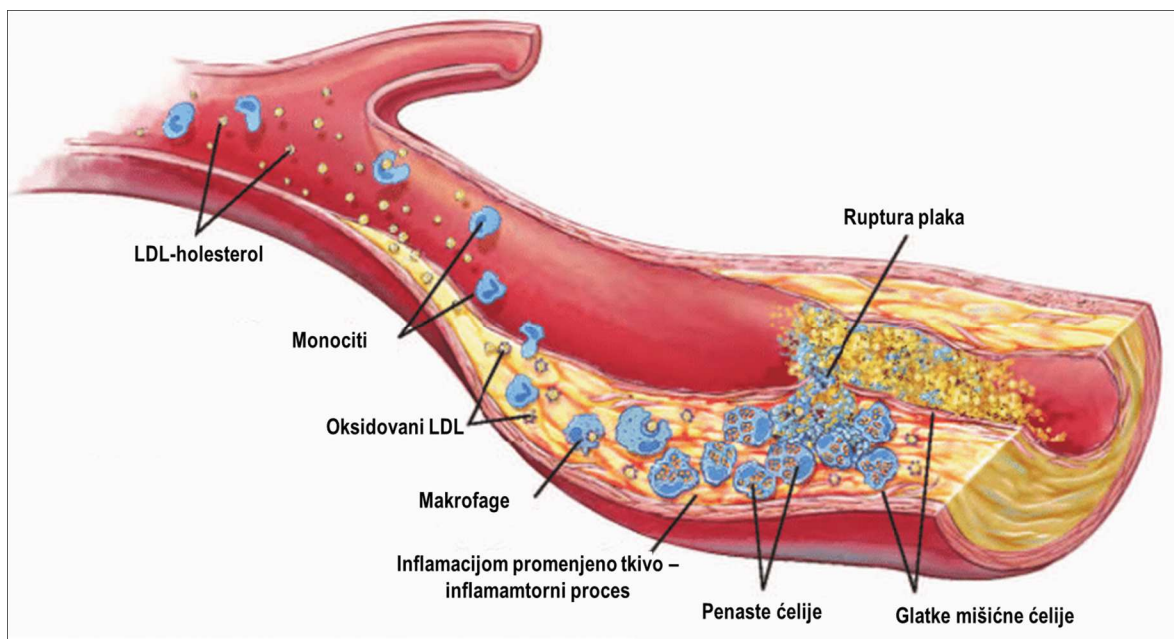
Između 5% i 25% od ukupnog broja infarkta miokarda čine infarkti miokarda bez opstrukcije koronarnih arterija (eng. *Myocardial infarction with non-obstructive coronary arteries*; MINOCA). MINOCA je sindrom koji klinički karakteriše prisustvo infarkta miokarda sa koronarnim arterijama bez klinički značajne stenoze (stenoza manja od 50%) na koronarno-angiografskom pregledu, zatim odsustvo opstruktivne koronarne arterijske bolesti kao i odsustvo karakteristične kliničke slike akutnog infarkta miokarda. Patofiziološki mehanizmi koji stoje u osnovi oštećenja miokarda kod ovih bolesnika su još uvek nedovoljno istraženi (Niccoli et al, 2015; Vidal-Peres et al, 2019; Del Buono et al, 2022).

1.1.5. Patofiziološki procesi – endotelna disfunkcija i ateroskleroza

Istraživanja su pokazala da u osnovi svih kardiovaskularnih poremećaja leži *endotelna disfunkcija*, gde se fiziološka svojstva endotela menjaju od vazodilatatornih, antiagregatornih i antiinflamatornih u vazokonstriktorna, prokoagulantna, hemotaktična i proinflamatorna (Hadi et al, 2005). Kada jednom nastane, endotelna disfunkcija vodi seriji patoloških procesa sa posledičnim suženjem lumena koronarnih arterija i nemogućnošću zadovoljavanja potreba srčanog mišića za kiseonikom. Do inicijalne disfunkcije endotela dovode različiti faktori rizika kao što su povišen krvni pritisak, pušenje, gojaznost, fizička neaktivnost i hiperlipidemija. Fizička oštećenja endotela koja nastaju kao posledica funkcionalnih promena omogućavaju ulazak leukocita u subendotelni prostor, kao i LDL lipoproteinskih čestica. Time se pokreće inflamatorni odgovor na mestu inicijalnog oštećenja endotela i pokreću medijatori oksidativnog stresa. Oksidativna modifikacija LDL lipoproteinskih čestica (posebno malih, gustih LDL čestica koje na taj način lakše prolaze u subendotelni prostor) dovodi do njihove modifikacije i preuzimanja od strane makrofaga (nastalih transformacijom utkivljenih monocita) što stvara tzv. penaste ćelije, koje nastaju tokom rane faze procesa ateroskleroze. Stoga, može se reći da endotelna disfunkcija predstavlja preteču aterosklerotskih promena na krvnim sudovima (Soehnlein et al, 2021).

Ateroskleroza je kompleksni progresivni patofiziološki proces koji karakteriše hronična inflamacija niskog stepena i formiranje aterosklerotskog plaka usped taloženja masnih naslaga na zidovima krvnih sudova, što dovodi do suženja lumena arterija i posledično otežavanog protoka krvi (slika 2). Ukoliko se ne predupredi na vreme, progresivan razvoj i napredovanje ateroskleroze

ima za posledicu nastanak *koronarne arterijske bolesti (KAB)*, u kojoj je narušeno snabdevanje miokardijuma kiseonikom (*Bondulas et al, 2016*).



Slika 3. Nastanak i napredovanje aterosklerotskog procesa (modifikovana, preuzeta od Nelson et al, 2017)

1.1.6. Lečenje

Osnovni način lečenja kod bolesnika sa STE-AIM je rekanalizacija trombotom okludirane arterije. Rekanalizacija se postiže na dva načina: farmakološkom ili mehaničkom reperfuzijom (*Jameson et al, 20th edition*). Pod farmakološkom reperfuzijom se podrazumeva primena lekova odnosno trombolitika, čiji je osnovni zadatak da razgrade tromb i na taj način uspostave prohodnost krvnog suda. Najčešće korišćeni trombolitici danas su alteplaza, reteplaza, tenekteplaza i streptokinaza (*Ilic et al, 2016; Ibanez et al, 2018; Neumann et al, 2019*).

Pod mehaničkom reperfuzijom se podrazumeva primarna perkutana koronarna intervencija (eng. *primary percutaneous coronary intervention*; pPCI), odnosno mehaničko otvaranje trombotom okludirane koronarne arterije sa ili bez ugradnje koronarnog stenta. U toku pPCI, jedan od načina uspostavljanja protoka kroz koronarnu arteriju je tromboaspiracija sadržaja kroz specijalno dizajnirane katetere. U oko 75% slučajeva tokom ovog postupka se može uzorkovati i trombotski materijal. Više studija i meta-analiza je pokazalo da je interventni način lečenja superioran u odnosu na farmakološku reperfuziju i danas predstavlja osnovni način lečenja bolesnika sa STE AIM, po preporukama European Society of Cardiology u toku prvih 12 sati od nastanka simptoma (*Ibanez et al, 2018*). Primarna perkutana koronarna intervencija u poređenju sa fibrinolitikima, smanjuje smrtnost za 25%, reinfarkte za 64%, rizik od moždanog udara za 53% i od intrakranijalne hemoragije za 95% (*Ilic et al, 2016; Ibanez et al, 2018; Neumann et al, 2019*).

1.1.7. SYNTAX skore

Kako bi se rangirala kompleksnost koronarne arterijske bolesti bolesnika koji se podvrgavaju pPCI proceduri, definisan je SYNTAX skor (eng. *Synergy between percutaneous coronary intervention with taxus*) (Head et al, 2014). Visoka vrednost skora je odraz značajnog aterosklerotskog procesa koji korelira sa uznapredovalim kardiološkim događajima, kompleksnijim stanjem bolesnika i lošijim ishodom (Sianos et al, 2005; Capodanno et al, 2009; Head et al, 2014)

Vrednost SYNTAX skora odgovara kompleksnosti same aterosklerotske lezije, procenjene na osnovu lokacije same lezije, narušenosti fiziološke funkcionalnosti arterije i specifičnosti odnosno kompleksnosti same lezije. Njegova najznačajnija karakteristika je da se bazira na pojedinačnim lezijama, ali krajnji skor predstavlja integrisane sve procenjivane lezije kako bi se ocenilo sveukupno stanje rizičnog miokardijuma. Generalno, postavlja se niz pitanja za svaku leziju, kako bi se odredio individualni skor svake lezije (kao što su: koji je segment koronarnog stabla uključen, koji je broj lezija, koja je starost lezija, da li uključuje i kolateralni arterijski krvotok, koji je prvi segment ispod vidljiv na angiografskom pregledu, da li zahvata bifurkacije ili trifurkacije, dužina lezije, kompozicija/kalcifikacija, da li je trombus, da li je difuzan/da li uključuje više koronarnih krvnih sudova). Pojedinačni skorovi na kraju se sumiraju u krajnji SYNTAX skor bolesnika. Pored SYNTAX skora 1, koji je prethodno opisan, razvijen je i SYNTAX skor 2, koji na osnovu istih podataka o aterosklerotskim lezijama bolesnika ukazuje na dugoročni ishod u smislu pojave neželjenih događaja kao što su reinfarkt ili smrtni ishod (Sianos et al, 2005; <https://syntaxscore.org>).

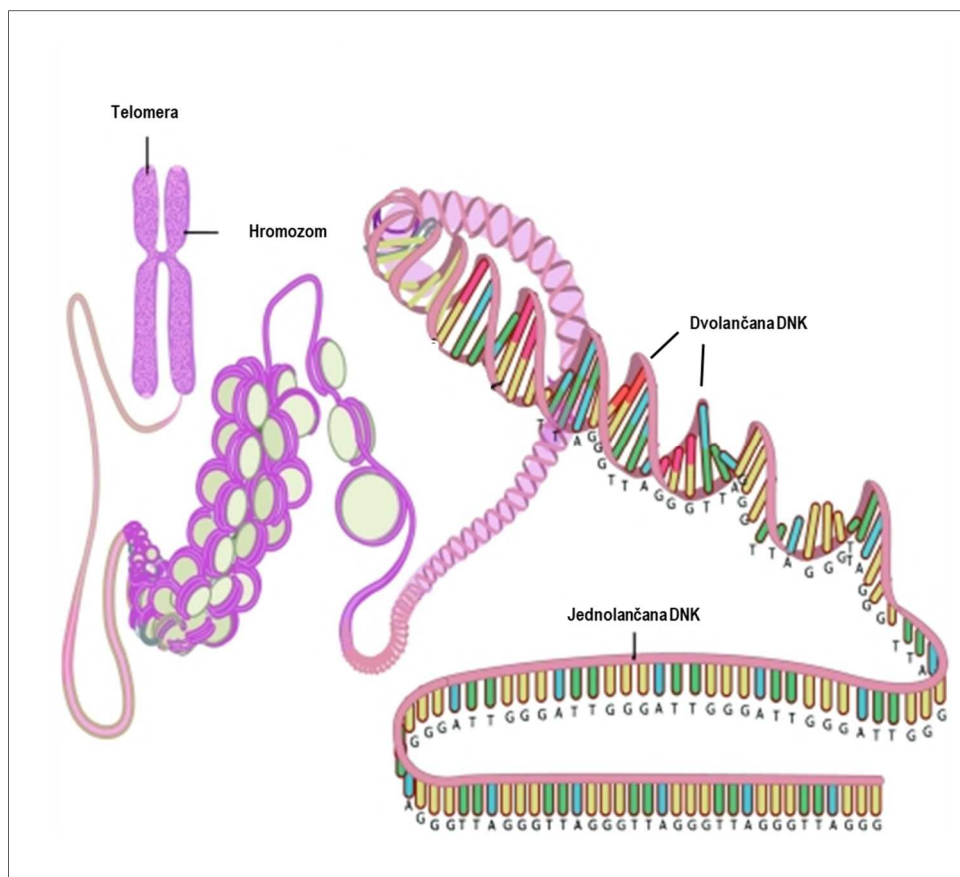
Cutoff vrednosti SYNTAX skora još uvek su predmet diskusije. Prvobitno se smatralo da su niske vrednosti SYNTAX skora ispod 27, dok je ta vrednost sada spuštena na 17-18. Vrednosti skora preko 33 se smatraju kao visoke vrednosti, dok se kao srednje visoke vrednosti skora podrazumevaju one između 17 i 33 (Head et al, 2014; Bundhunet al, 2017 Hatamnejad et al; 2022).

1.2. Telomere - telomeraza sistem

1.2.1. Telomere – struktura i funkcija

Telomere predstavljaju strukture DNK lokalizovane na krajevima eukariotskih hromozoma, poput kape, koje se razlikuju od strukture ostatka hromatina. Telomerna DNK svih eukariota sastoji se iz kratkih, heksamernih, ponavljajućih segmenata čija dužina neznatno varira zavisno od vrste organizma i ćelije u kojoj se posmatraju. Molekularna ispitivanja ustanovila su

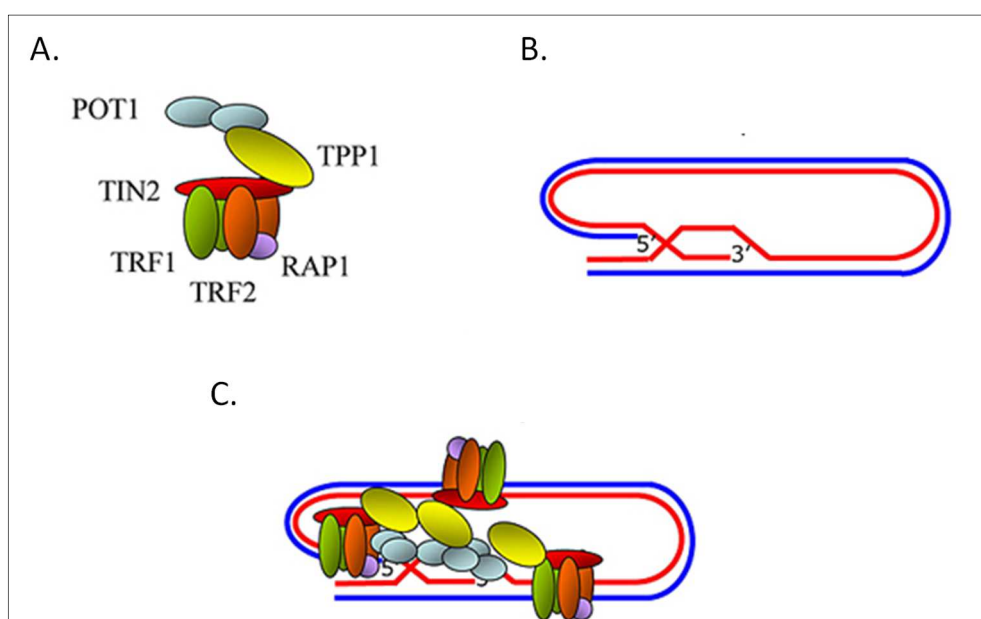
da je telomerni segment DNK bogat guaninom i izgrađen od ponavljajućih sekvenci d(TTAGGG). Karakteristično za ove strukture je da su nekodirajući segmenti DNK, odnosno ne nose genetske informacije za transkripciju. Njihova osnovna uloga je da štite krajeve hromozoma od degradacije i fuzije i na taj način održavaju stabilnost genoma (Gomez et al, 2012).



Slika 4. Prikaz lokalizacije i organizacije telomera (modifikovano, preuzeto od Huzen et al, 2010)

Telomere se nalaze na krajevima hromozoma i na njima se mogu opisati dva dela: *dvolančani deo* dužine 2 do 20 hiljada nukleotida, koga grade ponavljajuće sekvence d(TTAGGG) i njihove komplementarne baze d(AATCCC), i *jednolančani deo* dužine od 50 do 500 nukleotida iste ponavljajuće sekvence, i to uvek kao produžetak 3' kraja hromozoma (Slika 4) (de Lange, 2005). Telomerna jednolančana DNK orijentisana je u pravcu 5' – 3'. Kako je ovaj lanac bogat guaninom smatra se da može formirati kompleksne strukture, poznate kao *G-kvadripleksi* (eng. *G-quadruplexes*). G-kvadripleksi su multilančane strukture koje formiraju četvorougane ravni, Hoogsten-ovim vodoničnim vezama, na čijim uglovima se nalaze molekule guanina (Slika 5B). Ove četvorougane ravni stabilizovane su jonima metala koji se nalaze između slojeva G-kvadripleksa. Smatra se i da G-kvadripleksi mogu zauzimati različitu konformaciju (Oeseburg et al, 2009; Gomez et al, 2012).

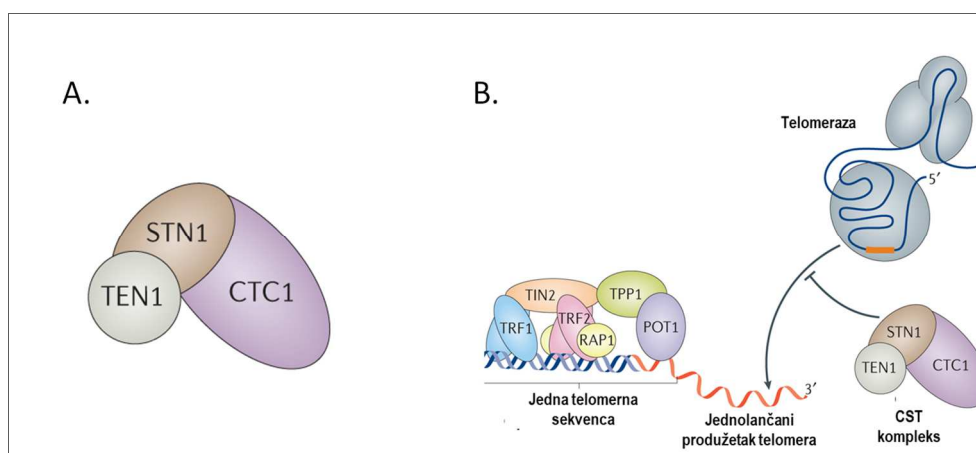
U nemitotičkoj fazi ćelijskog ciklusa, G-lanac je zaštićen telomernim „shelterin“ proteinskim kompleksom pomoću kog telomere formiraju dve petlje, *T* (eng. *T – loop*) i *D* (eng. *D – loop*), prikazane na slici 5A. Ovako formirani kompleksi sa telomerama imaju za cilj da zaštite hromozomske krajeve od degradacije i „end-to-end“ spajanja hromozoma. Smatra se da ovaj kompleks određuje i strukturu termina telomera, kao i da ima udela u kontroli sinteze telomerne DNK posredstvom *telomeraza*. Telomerni lanac DNK, u ovoj karakterističnoj strukturi, može se saviti unazad i zakačiti za dvolančanu telomernu regiju formirajući tako *T – petlju*, a potom premeštanjem i *D – petlju*. *T – petlja* se smatra krucijalnom u spomenutoj zaštiti hromozoma (*de Lange, 2005; Martinez et al, 2010; Diotti et al, 2011*).



Slika 5. Shematski prikaz: A. Shelterin kompleksa; B. Formiranje Q-kvadrupleksa u dvolančanoj molekuli DNK/Telomera; C. Kompleks telomere i Shelterin proteina – formiranje petlje (modifikovano, preuzeto od de Lange, 2005)

Shelterin kompleks (Slika 5A i 5C) sastoji se od šest proteina: vezujući faktor telomernih ponavljanja 1 i 2 (eng. *Telomeric Repeat binding Factor 1 and 2, TRF1 and TRF2*), *TRF1* interreagujući protein 2 (eng. *TRF1-Interacting Protein 2, TIN2*), zaštitni protein telomeraze 1 (eng. *Protection Of Telomerase 1, POT1*), *POT1-TIN2* organizujući protein (eng. *POT1 – TIN2 Organizing Protein, TPP1*, poznat i kao *TINT1, PTP, PIP1*) i represorni/aktivatorni protein 1 (eng. *Repressor/Activator Protein 1, RAP1*). *TRF1*, *TRF2* i *POT1* vezuju se direktno za telomernu DNK i to *TRF1* i *TRF2* za njen dvolančani heliksni deo, dok se *POT1* vezuje za 3' jednolančani deo, sa velikom specifičnošću za sekvencu 5'-TAGGGTTAG-3', najverovatnije na dislociranom lancu *D*-petlje. *TRF1* i *TRF2* ne ostvaruju nikakve međusobne interakcije, već se za DNK lanac

vezuju nezavisno jedan od drugog, iako oba imaju afinitet da dvostruki deo heliksa i za sekvence 5'-TAGGGTTAG-3'. POT1 protein može da se veže za TRF1 protein preko protein-protein interakcija i smatra se da ova veza utiče na vezivanje POT1 za jednolančani deo telomerne DNK. TIN2 vezuje TRF1 i TRF2 kroz nezavisne domene i povlači TPP1-POT1 kompleks gradeći na taj način most između različitih shelterin komponenti. TPP1 vezuje TIN2 i POT1 preko svog C – terminalnog i centralnog domena. Smatra se da TPP1 protein privlači POT1 ka telomerama. N – terminalni deo TPP1 proteina sadrži domen za vezivanje telomeraze (eng. *telomerase-interacting domen*), pa se smatra da je njegova uloga da privlači telomerazu na krajeve hromozoma, odnosno telomere. Na kraju RAP1 formira kompleks sa TRF2 što je ključno za njegovo vezivanje za telomere. Genetski kod za sintezu svakog od ovih proteina nalazi se na određenom mestu na hromozomu i ima specifičnu ulogu (Oeseburg et al, 2009; Smith et al, 2020).

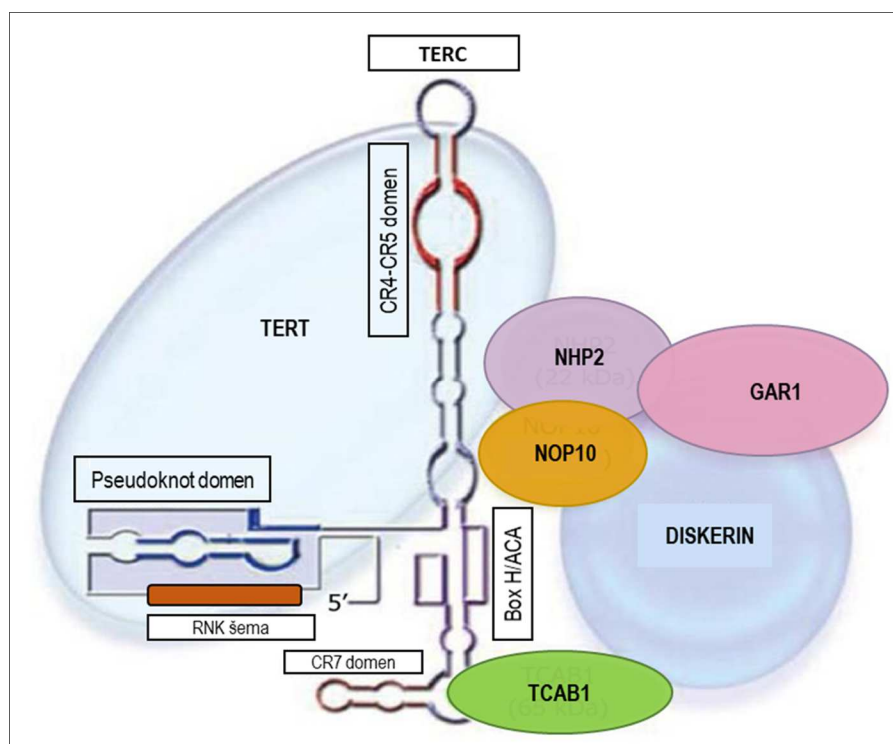


Slika 6. CST kompleks enzima telomeraze: Shematski prikaz (A); Uloga CST kompleksa u vezivanju enzima telomeraze za telomere (B) (modifikovano, preuzeto od Lim & Cech, 2021)

Pored *Shelterin* kompleksa, skorijim istraživanjima identifikovan je dodatni kompleks u humanim ćelijama, pretpostavlja se, neophodan za zaštitu i replikaciju telomera. Ovaj kompleks poznat je kao CST kompleks (Slika 6) i sastoji se iz tri proteinske komponente: *konzervirane telomerne komponente 1* (en. *Conserved Telomere Component 1, CTC1*), *STN1 komponente* i *TEN1 komponente*. Blokiranje CTC1 i STN1 komponenti ovog kompleksa vodi defektima telomera kao što su predugačak G-lanac, gubitak telomera ili problema u replikaciji telomera. Istraživanjima je pokazano da STN1 komponenta interaguje sa TPP1 subjedinicom *shelterin* kompleksa, i najverovatnije dovodi do usporavanja telomerazne aktivnosti i sprečava prekomerno produženje telomera (Stewart et al, 2012, Smith et al, 2020, Lim & Cech, 2021, Wang et al, 2023).

1.2.2. Telomeraza – struktura i funkcija

Telomeraza je ribonukleinski kompleks sa enzimskom aktivnošću koja dodaje kratke ponavljajuće segmente d(TTAGGG) na 3' kraju telomerne DNK (Slika 7). Aktivnost ovog enzima je precizno regulisana različitim mehanizmima, pa je stoga ograničena samo na ćelije sa proliferativnim potencijalom kao što su germinativne ćelije, ćelije embriona i stem ćelije hematopoetskog sistema i kože. U drugim tkivima se telomeraza inhibira tokom gestacionog perioda (Gomez et al, 2012; Smith et al, 2020).



Slika 7. Shematski prikaz strukture kompleksa enzima telomeraze (modifikovano, preuzeto od Ly, 2011)

Telomeraza (2.7.7.49) je RNK usmerena DNK polimeraza koja deluje kao reverzna transkriptaza bazirana na sopstvenoj RNK komponenti. Aktivna telomeraza je holoenzim, koji sačinjavaju katalitička subjedinicu – *humana telomerazna reverzna transkriptaza* (en. *human telomerase reverse transcriptase, hTERT*) i RNK komponentu – *humana telomerazna RNK* (en. *human telomerase RNK, hTR*) sačinjavajući jezrgo enzima, i pomoćni proteini neophodni za *in vivo* enzimsku aktivnost. Do sada je mnogo kako dokazanih tako i pretpostavljenih pomoćnih proteinskih kompleksa telomeraze. Njihova uloga je da regulišu biogenezu telomeraze, subcelularnu lokalizaciju i već pomenutu *in vivo* enzimsku funkciju. Najbolje proučene proteinske komponente ovog kompleksa su: *diskerin*, *NHP2*, *NOP10*, *pontin/reptin*, *Gar1* i *TCAB1*. Heterotrimer koji sačinjavaju diskerin, NOP10 i NHP2 vezan je za H/ACA motiv RNK lanca, a formiranje ovog trimera praćeno je vezivanjem i četvrtog faktora, Gar1, neophodnog za formiranje

biološki funkcionalne ribonukleinske partikule (RNP). H/ACA motiv zajedno sa CR-7 domenom lokalizovan je na telomeraznoj RNK i odgovoran je za stabilnost hTR, procesuiranje, nuklearnu lokalizaciju i aktivnost telomeraze *in vivo*. Pontin i reptin su dve zatvorene ATPaze potrebne za stabilnost diskerina u hTR *in vivo*. Predloženi model enzima telomeraze podrazumeva da diskrein, pontin i reptin formiraju neku vrstu veze („skelu“) koja privlači i stabilizuje hTR formirajući neaktivnu telomeraznu RNP. Pošto se ovaj kompleks formira, veruje se da pontin i reptin disosuju oslobađajući katalitički aktivan enzim. Subcelularnu lokalizaciju telomeraze verovatno reguliše skoro otkriveni TCAB1 protein (Gomez et al, 2012; Smith et al, 2020; He et al, 2022).

hTERT je relativno veliki protein (127kDa) i, kao što je već spomenuto, katalitička subjedinica telomeraze. On je ograničavajuća komponenta neophodna za aktivnost enzima u ćelijama. Gen za ovaj protein, od približno 37kb, lociran je na humanom genomu kao jedna kopija na hromozomu 5p15.33. Na C-terminalnom kraju ovog proteina je lociran motiv reverzne transkriptaze (Gomez et al, 2012; Smith et al, 2020). Aminokiselinska sekvenca katalitičke subjedinice telomeraza slična je onoj na reverznoj transkriptazi. Na celom četvoro-funkcionalnom domenu hTERT mogu se razlikovati četiri segmenta: 1) N-terminalni domen koji sadrži GQ blok (TEN domen) koji se ponaša kao sidro pomoću kog se telomeraza vezuje sa DNK prajmerom; 2) RNK vezujući domen (TRBD domen) sa motivima CP, QFP i T koji prepoznaju telomeraznu RNK sa velikim afinitetom; 3) domen reverzne transkriptaze (RT domen) koji sadrži sedam konzervisanih domena i IFD mesto; 4) nisko konzervisani C-terminalni domen (CTE domen). Strukturna istraživanja ovog proteina prilično su komplikovana pošto je teško održati dovoljno rastvorene hTERT za kristalizaciju, pa su stoga i podaci o strukturi i funkciji ovog proteina još uvek nepotpuni (Osterhage et al, 2009; Zvereva et al, 2010; Sweart et al, 2012).

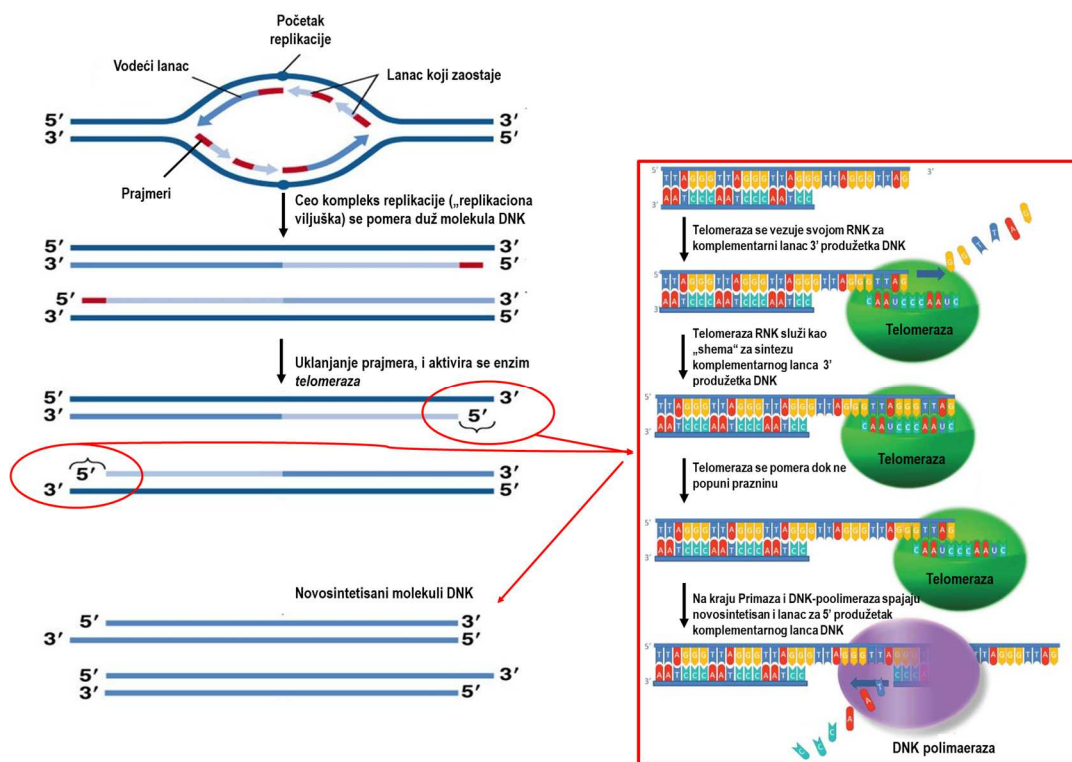
Telomerazni RNK lanac je esencijalan za telomeraznu aktivnost, ali nije ograničavajući faktor za telomerazu, stoga se smatra da ovaj lanac sadrži sekundarne strukturne elemente neophodne kako za katalitičku aktivnost tako i za procesivnost tipa I i II (poglavlje 1.2.4.), mutacije, telomernu stabilnost i lokalizaciju hTR. Telomerazna RNK kod ljudi sadrži 451 nukleotidnu reziduu i ima kodirajuću sekvencu od 11 bp (5-CUAACCUAAC-3') za telomernu DNK. Gen za hTR u humanom genomu lociran je na 3q26 hromozomu kao jedna kopija. hTR poseduje tri domena: 1) *pseudoknot/template* domen poznat i kao „core“ odnosno srž samog enzima koja sadrži visoko konzerviranu RNK sekvencu neophodnu za enzimsku aktivnost; 2) CR4/CR5 domen neophodan za aktivnost enzima kako *in vitro* tako i *in vivo*, s obzirom na to da se u ovom takođe visoko konzerviranom domenu nalazi petlja nazvana P6.1 koja je neophodna za vezivanje hTER jedinice za TERT jedinicu i naziva se još i trans-aktivacioni domen; 3) H/ACA domen sa CR-7 domenom, potrebni za stabilnost hTR, procesivnost, nukleusnu lokalizaciju i

aktivnost enzima pošto je primećeno da su mutacije u ovom domenu povezane sa nastankom autozomnih bolesti. hTR se transkribuje RNK polimerazom II, a stabilisan je udruživanjem proteina H/ACA domena sa diskerinom, NHP2, NOP10 i Gar1. Stabilnosti kompleksa doprinose i pontin i reptin. Proces elongacije telomera telomerazom je multistepeni proces i opisan je kasnije u tekstu (*Osterhage et al, 2009; Zvereva et al, 2010; Swart et al, 2012; Gomez et al, 2012; Smith et al, 2020*).

Regulacija telomeraze je veoma kompleksna i zahteva multiple kontrolne nivoe, uključujući transkripciju, splajsing mRNK (eng. *mRNK splicing*) sa proteinskom komponentom enzima, kao i sazrevanje i post-translacionu i post-transkripcionu modifikaciju hTERT. Smatra se da je najznačajnija determinanta enzimske aktivnosti transkripciona regulacija katalitičke subjedinice, hTERT. Novija istraživanja pokazuju da je hTERT modifikacija cilj kako post-transkripcione tako i post-translacione kontrole. Pozitivni regulatori hTERT transkripcije uključuju *cMyc* onkogene, transkripcioni faktor Sp1, protein E6 humanog papiloma virusa 16 i steroidne hormone (estrogene). Negativnim modulatorima hTERT transkripcije smatraju se transkripcioni faktor Mad1, tumor supresorni protein p53, pRB kao i brojni antiproliferativni i diferencijalni agensi uključujući interferon γ i transformišući faktor rasta β . Dodatno, utvrđena je i translaciona regulacija hTR jedinice. Kako telomeraza deluje na krajevima hromozoma, njena aktivacija i enzimaska aktivnost fino usklađene sa delovanjem proteinima iz kompleksa sa telomerom i transkripcijom telomerne RNK (*Cifuentes-Rojah et al, 2012*).

1.2.3. Mehanizam replikacije telomera

Kao što je već opisano, telomere predstavljaju niz ponavljajućih sekvenci d(TTAGGG) na kraju DNK lanca čija je osnovna uloga da zaštite hromozom od gubitka informacija prilikom svake replikacije. Nakon određenog broja replikacija, somatske ćelije će ući u proces replikativnog starenja, a ovaj proces poznat je kao „end-replication“ problem (*Wai, 2004; Swart et al, 2012*).



Slika 8. Shematski prikaz replikacije telomera tokom replikacije DNK molekula (modifikovano, preuzeto od Wai, 2004)

Replikacija DNK počinje na jednom ili više mesta na hromozomu i to enzim DNK polimerazom počinje replikaciju od prajmera na 3' kraju replikativne viljuške i ide ka 5' kraju DNK, formirajući tako novi lanac DNK komplementaran već postojećem (Slika 8). Na drugom lancu DNK koja podleže procesu replikacije, proces ne teče kontinuirano, pošto je njegova orijentacija suprotna ($5' \rightarrow 3'$), već iz segmenata poznatih kao Okazakijevi fragmenti koji polaze, takođe, iz replikativne viljuške. Kada je sinteza gotova prajmeri se razgrađuju, a prostori između novonastalih segmenata tzv „zaostajućeg“ lance DNK se popunjavaju dejstvom enzima *DNK ligaze*. Jedino prostor terminalnog prajmera ostaje nepopunjen. Taj terminalni prostor se dalje razgrađuje dejstvom $5' - 3'$ egzonukleaze, koja razgrađuje 130 do 210 nukleotidnih rezidua. Stoga se 5' kraj telomere skraćuje sa svakom deobom. Nakon određenog broja replikacija, telomera doseže kritičnu dužinu, tzv. *tačku starenja*, i dalje može ući u proces apoptoze i ćelijske smrti što je proces *fiziološkog starenja*. Ukoliko ćelija izbegne ovu kontrolnu tačku, dolazi do „end-to-end“ spajanja krajeva hromozoma i njihove destabilizacije što će rezultovati ili ćelijskom smrti ili karcinogenezom (Wai, 2004; Swart et al, 2012).

Istraživanja elektronskom mikroskopijom dokazala su da su telomere kompleksne strukture koje grade dve petlje, kao što je opisano ranije. Pretpostavlja se da T i D petlja maskiraju

telomerni produžetak i na taj način ostvaruju svoju protektivnu ulogu nad telomerama (Wai, 2004; Swart et al, 2012).

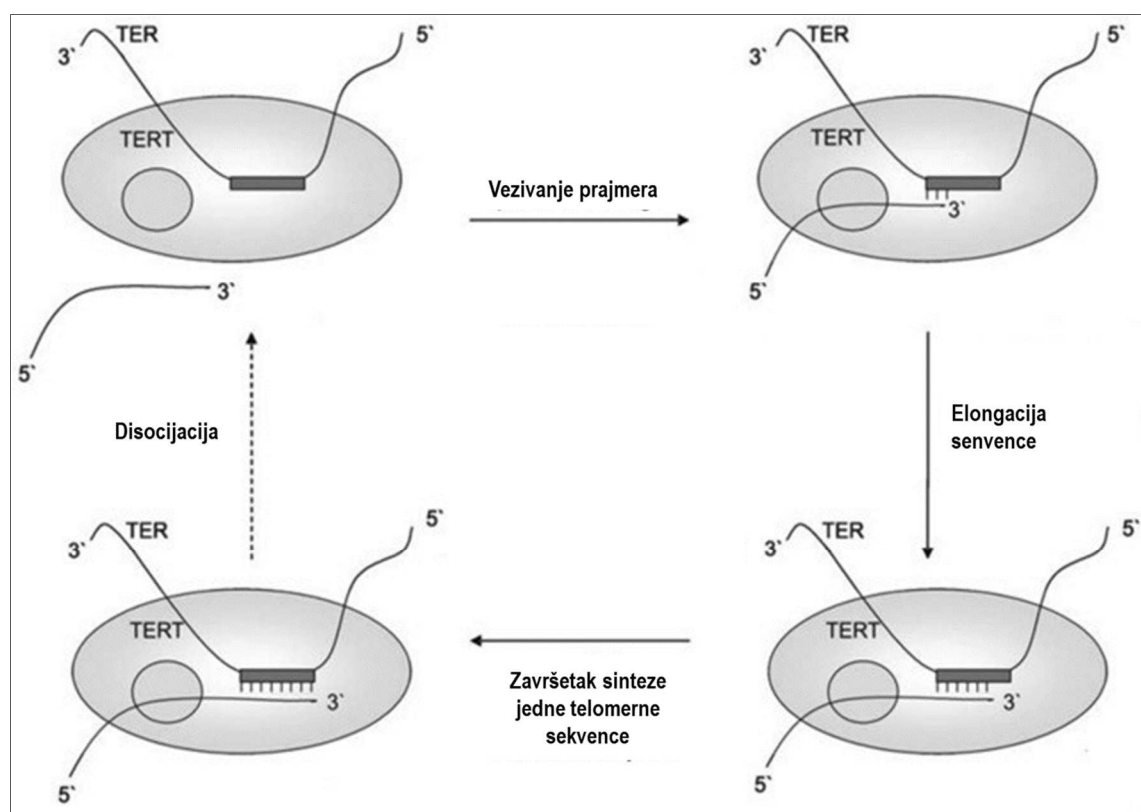
Za svoj integritet i funkciju, telomere zahtevaju najmanje tri faktora: *minimalnu dužinu ponavljajućih sekvenci, integritet G-lanca i regulaciju proteina koji učestvuju u izgradnji telomera* (telomere-binding proteins). Najznačajnija uloga, za sada, dodeljena je TRF1 i TRF2 proteinima *shelterin* kompleksa. TRF1 protein učestvuje u formiranju T-petlje pa se stoga smatra da pomažući u formiranju ove petlje doprinosi i njenoj stabilizaciji. Sa TRF1 subjedinicom *shelterin* kompleksa intereaguju mnogi proteini i enzimi učestvujući u regulaciji dužine telomera. Takvi su *poli-(ADP-ribose)-polimerase-TANK1* (tankiraza 1) ili *poli-(ADP-ribose)-polimerase-TANK2* (tankiraza 2). Ovi enzimi su odgovorni za ribozilaciju TRF1 proteina i inhibiciju njenog vezivanja za telomere. Kao posledica toga, otvara se put telomerazi i omogućeno je produženje telomera. Tankiraza se smatra pozitivnim regulatorom dužine telomera. Vezivanje TRF1 subjedinice za TRF2 subjedinicu telomernog kompleksa predstavlja negativnu regulaciju dužine telomera, jer se tim uspostavlja kompaktnost DNK telomernog lanca, stabilizuje se T-petlja i ograničava pristupačnost za telomerazu (Wai, 2004; Swart et al, 2012).

1.2.4. Mehanizam telomerazne aktivnosti

Jedno od najelegantnijih rešenje „end-replication“ problema jeste enzimaska aktivnost telomeraze. Kao što je već spomenuto ranije u tekstu, telomeraza deluje kao specifična reverzna transkriptaza koja ima jedinstvenu sposobnost da kopira i dodaje stotine nukleotida na isti DNK prajmer. Telomerazna RNK ponaša se kao šablon u ovom procesu. Interakcija između 5' kraja prajmera i hTERT subjedinice telomeraze neophodan je preduslov za dejstvo telomeraza i naziva se mestom za usidrenje (eng. „*anchor site*“) (Zvereva et al, 2010).

U okviru ciklusa telomeraze (Slika 9) mogu se opisati četiri osnovna koraka: 1) prepoznavanje i vezivanje prajmera; 2) sinteza telomere sekvence, elongacija; 3) translokacija, povezivanje za novi segment 3' kraja DNK; 4) disocijacija. Tokom faze elongacije, telomeraza dodaje uzastopne nukleotide na slobodnu 3'-hidroksilnu grupu telomerne DNK, reverzno ih prepisujući sa RNK šablona Watson-Crick-ovim specifičnim baznim uparivanjem. Kroz ove četiri faze telomeraza prepíše i ugradi jednu telomernu sekvencu. Kako to nije dovoljno, telomeraza svoju aktivnost ciklično ponavlja, ali specifično ostajući vezana za prajmer nakon svakog ciklusa, sve dok telomera ne dostigne određenu dužinu, nakon čega disosuje. Ova sposobnost enzima da katalizuje istu reakciju više puta uzastopno bez otpuštanja supstrata, naziva se *enzimska procesivnost*. Razlikuju se dva tipa: procesivnost I i II. Procesivnost I predstavlja sposobnost telomera da RNK – DNK dupleks vraćaju u aktivni centar nakon dodatka svakog nukleotida

odnosno sekvence, u fazi elongacije. Procesivnost II odnosi se na sposobnost telomeraze da relativnom translokacijom DNK prajmera, odnosno pomeranjem prajmera na početak tj, na onaj deo RNK šablona od kog započinje transkripcija, nakon dodatka svakog telomernog ponavljanja. Drugim rečima, procesivnost I podrazumeva jedan ciklus dodavanja ponavljajućeg segmenta telomera, nakon čega se telomeraza vraća u početno stanje i započinje novi sintetski ciklus. Za razliku od ove, procesivnost II podrazumeva uzastopno dodavanje sekvenci bez vraćanja enzima u početno stanje sve dok se ne sintetiše dovoljna dužina telomernog lanca. Humana telomeraza pokazuje procesivnost tipa II, za razliku od npr. telomeraze miša ili različitih gljivica koje je ne ispoljavaju. Na ovaj način telomeraza dodaje preko sto nukleotida tokom samo jednog ciklusa, što govori u prilog njene efikasnosti. Važno je napomenuti da je ovaj model delovanja telomeraze razvijen je nakon *in vitro* ispitivanja, a smatra se da se isti proces dešava i *in vivo* (Zvereva et al, 2010).



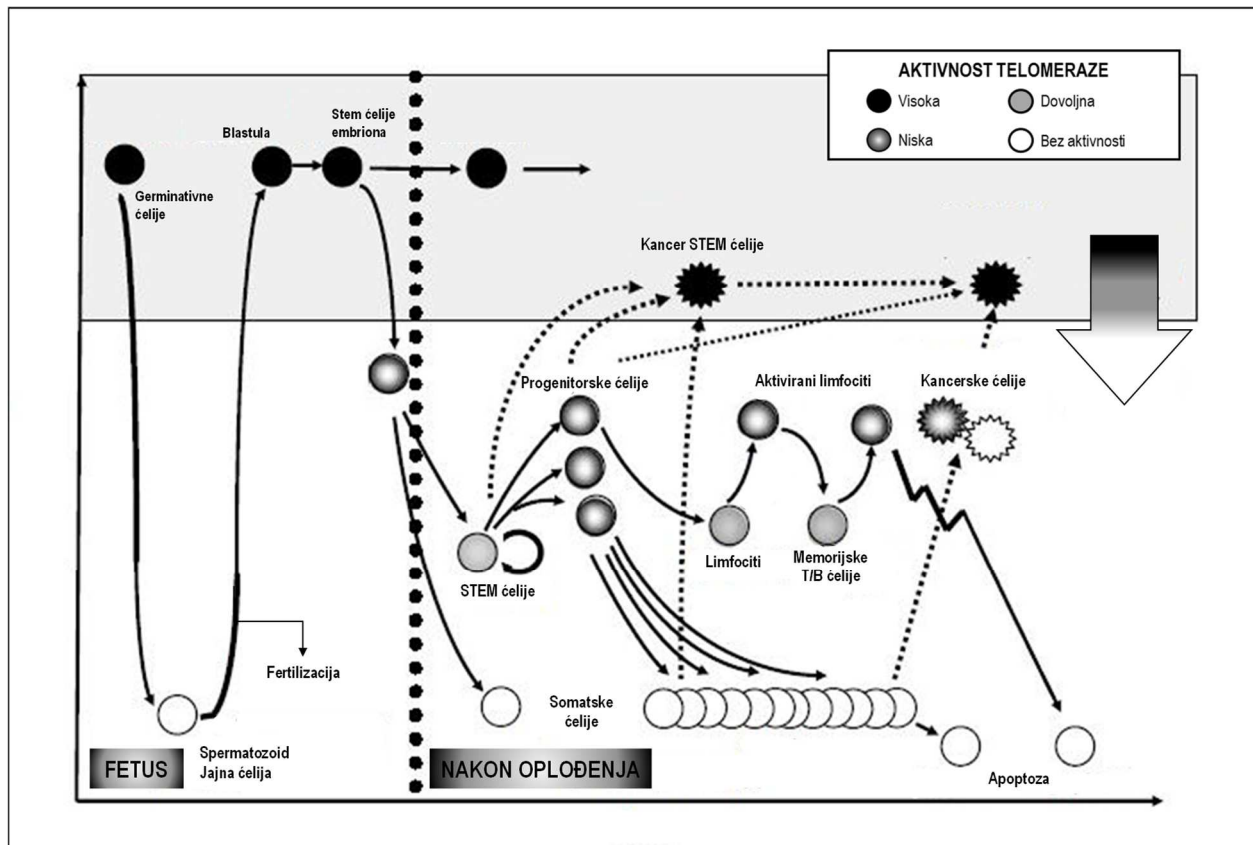
Slika 9. Ciklus enzima telomeraze tokom umnožava telomernih sekvenci (modifikovano, preuzeto od Zvereva et al, 2010)

Međutim, Haley i saradnici smatraju da telomeraza ugrađuje uzastopne nukleotidne sekvence bez disocijacije od prajmera reakcijom koja je poznata kao „*nucleotid addition processivity*“. Tokom elongacije telomera, održava se konstantna dužina RNK – DNK hibrida, od sedam do osam baznih parova, tako što se formiranjem svake nove veze na proksimalnom kraju, raskida po jedna na distalnom kraju hibrida. Kada se dosegne granica 5' šablona, odnosno mesta

kojim je prikazan DNK lanac za aktivno mesto, translokacijom se namešta novi 3' kraj telomerne DNK i započinje novi ciklus sinteze telomera. Sposobnost telomeraze da katalizuje više od jednog ciklusa sinteze dok je vezana za isti DNK prajmer, naziva se „*repeat addition processivity*“. Iako se smatra da se isti procesi dešavaju *in vitro* i *in vivo*, oni se ipak razlikuju po svom obimu, pa predstoji još mnogo istraživanja da se u potpunosti razjasni biohemija telomerazne aktivnosti (Wyatt *et al*, 2010).

1.2.5. Telomere i telomeraza u različitim tipovima ćelija

Dinamika telomera i telomeraze varira zavisno od ćelije u kojoj se posmatra. Germinativne ćelije ispoljavaju visok nivo aktivnosti telomeraze tokom faze brze proliferacije. Iako je aktivnost telomeraze nedetektibilna u neproliferativnim ćelijama spermatozoida i ovarijuma, visoko je aktivna nakon fertilizacije i njena aktivnost ostaje visoka u embrionalnim stem ćelijama, kao i germinativnim ćelijama za drugu generaciju (Slika 10) (Hiyama *et al*, 2007).



Slika 10. Aktivnost telomeraze u pojedinim ćelijskim vrstama od momenta fertilizacije do perioda nakon oplođenja (modifikovano, preuzeto od Hiyama *et al*, 2007)

U razvojnoj fazi, aktivnost telomeraze postepeno se smanjuje i nestaje u većini somatskih ćelija nakon rođenja. U stem ćelijama odraslih, aktivnost telomeraze je niska ili nedetektibilna i najčešće vezana za progenitorske ćelije koje imaju visoku reproducibilnu aktivnost u svakom

tkivu, ali su nedovoljne da stabilno održavaju dužinu svojih telomera. Takvi su na primer limfociti, gde telomerazna aktivnost, iako je detektabilna, nije dovoljna da bi se sprečilo skraćivanje telomera. Telomerazna aktivnost u ovim ćelijama povećava se kao odgovor na citokinima indukovanu proliferaciju i ponovno snižena u zrelijim ćelijskim linijama. Stoga, normalne stem ćelije se smatraju „smrtnim“ ćelijama i konačno stare skraćivanjem telomera. Za razliku od njih kancerske stem ćelije mogu nastajati od normalnih stem ćelija, progenitorskih ćelija ili eventualno iz somatskih ćelija i karakterišu se besmrtnošću, tačnije sposobnošću da se neodređeno dele i proliferišu (Hiyama et al, 2007; Shay et al, 2011; Saeed et al, 2013).

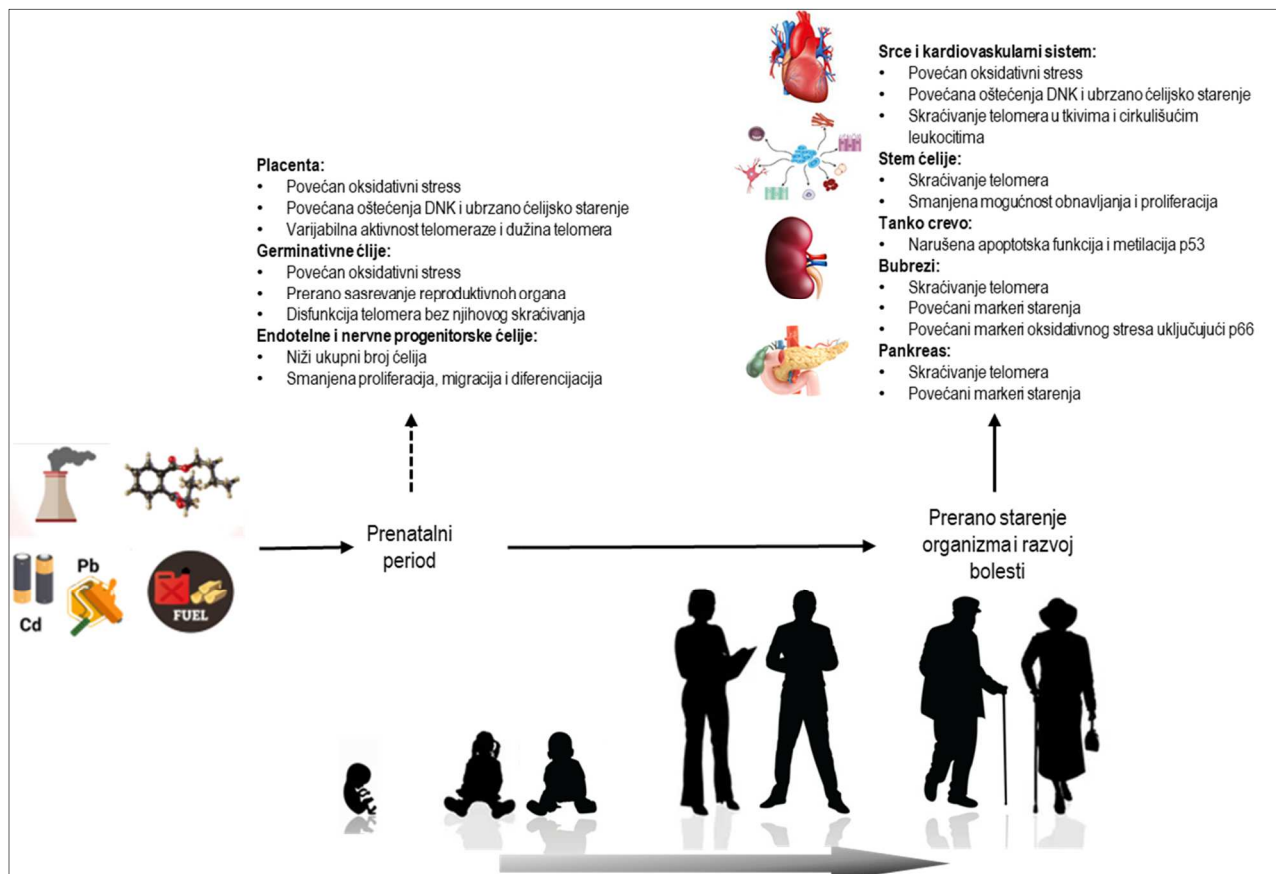
1.2.6. Telomere, telomeraza, starenje i tumorogeneza

Obavezan gubitak telomera sa svakom deobom oslikava „mitotički sat“ koji ukazuje koliko se ćelijskih deoba završilo. Dužina telomera ograničava kapacitet ćelijske deobe. Kada hromozomi nakon tog broja deoba dostignu neku vrstu kritične dužine, ćelija ulazi u replikativno starenje, što se smatra vrstom tumor supresornog mehanizma. Indukovanje starenja povezano je sa aktivacijom brojnim mehanizama, uključujući i p53, p21 i Rb/p16INK4A, što za posledicu ima zaustavljanje ćelijskog rasta i apoptozu. Uvođenje katalitičke subjediniće hTERT u normalnu humanu ćeliju vodi njenoj neograničenoj i nekontrolisanoj deobi, što znači da skraćivanje telomera kulminira ćelijskim starenjem ili u M1 fazi (en. *mortality stage*, M1). Kada ćelija zaobiđe tačke provere ovih fizioloških puteva, telomere će nastaviti dalje da se skraćuju. Ekstremno kratke telomere prepoznaju se kao dvolančani prekidi (eng. *double-stranded break*) i pokreću proteine odgovorne u slučaju oštećenja DNK (eng. *DNA-damage response proteins*), koji, zauzvrat, vode spajanju slobodnih krajeva hromozoma. Ćelija sa ovakvim nestabilnim i aberantnim hromozomima je kriznoj fazi ili M2 fazi (eng. *mortality stage 2*, M2) i brzo podleže apoptozi (Wai et al, 2010; Shay et al, 2011).

U tumorskim ćelijama, zaobilaženje tačaka provere ćelijskog ciklusa, vodi daljem skraćivanju telomera i aktiviranju telomeraze. Tada se telomere stabilizuju na konstantnoj dužini i postaju takoreći besmrtne. Ove besmrtne, sad već tumorske ćelije, prevazilaze barijeru starenja/M1 i kriznu fazu/M2 i imaju sposobnost da beskrajno proliferišu, što značajno može doprineti rastu tumora. Važno je ovde napomenuti da besmrtnost ćelija nije sama po sebi dovoljna za malignu transformaciju. Maligna transformacija zahteva, dodatno, aktivaciju onkogeni, inaktivaciju tumor supresornih gena i nekontrolisanu mitogenu stimulaciju. Stoga se može reći da aktiviranje telomeraze dodeljuje ćeliji besmrtnost, ali ne neoplastične karakteristike (Oeseburg et al, 2010; Wai et al, 2010; Shay et al, 2011).

1.2.7. Bolesti u kojima imaju ulogu telomere i telomeraze

Studije o telomerama i telomerazama danas su već brojne. U proteklih 80 godina, od njihovog otkrića pa do danas, mnoge činjenice o ovim strukturama su razjašnjene, ali se čini da je veći deo još uvek nedovoljno razjašnjen. Smatra se da telomere i telomeraza imaju udela u nastanku mnogih bolesti, ali je mali broj onih kod kojih je to i dokazano (*Cataldo, 2009; Hallows et al, 2012; Kam et al, 2021*).



Slika 11. Poremećaji poreklom iz fetalnog razvoja koji su povezani sa skraćivanjem dužine telomera u odrasloj dobi (modifikovano, preuzeto od Hallows et al, 2012)

Hallows i saradnici (*Hallows et al, 2012*) smatraju da sve bolesti starijeg doba vode poreklo još od fetalnog života. Šta više, aktivnost telomeraze je najveća u placentalnim trofoblastima u prvom trimestru trudnoće i opada sa njenim napredovanjem. Oni smatraju da različita tkiva, koja pokazuju merljive promene u parametrima oksidativnog stresa, aktivnosti telomeraze, dužine telomera i drugih markera starenja u toku intrauterinog razvoja, mogu imati ulogu u razvoju bolesti tih organa u toku kasnijeg životnog doba, kao što su dijabetes tipa 2, kardiovaskularne bolesti, bolesti bubrega i, kancera. Ova stanja objedinjena su nazivom *bolesti telomera* (Slika 11) (*Hallows et al, 2012*). U ovoj doktorskoj tezi biće reči samo o vezi sa kardiovaskularnim bolestima.

1.2.8. Kardiovaskularne bolesti, ateroskleroza telomera-telomeraza sistem

Procesu skraćivanja telomera, uprkos delovanju telomeraze, podležu i kardijačne stem ćelije i progenitorske ćelije srca. Ovo dokumentovano skraćivanje telomera u starim stem i progenitorskim ćelijama, može značajno ometati obnavljanje kardiomiocita. Smatra se da starenju kardiomiocita značajno doprinosi i oksidativni stres, jedan od glavnih činilaca u patogenezi KVB, koji će detaljnije biti objašnjen u narednom poglavlju. Povezanost, koja postoji, između telomera i oksidativnog stresa objašnjava se „začaranim krugom“ koji iznova pojačavajući oksidativni stres doprinosi starenju ćelija srca. Ovaj model se sastoji iz dva dela. Jedan deo objašnjava nastanak prooksidanasa, i to najviše reaktivnih kiseonikovih jedinjenja (*eng. reactive oxygen species*, ROS), u mitohondrijama putem normalnog metabolizma i iz drugih nemitohondrijalnih izvora (npr. inflamacija), koji dovode do oštećenja DNK ćelija koje uključuje i oštećenje telomera. Dolazi do aktivacije odgovora na oštećenje DNK (*eng. DNA damage response, DDR*) koji aktiviranjem dodatnih mehanizama uvodi ćeliju u proces starenja. Sa druge strane, ROS mogu da se ponašaju i kao signalne molekule, tačnije oštećenje DNK i telomera i aktivacija mehanizama starenja ćelija mogu dovesti do povećanje stvaranja ROS i oksidativnog stresa. Pretpostavlja se da ova dva mehanizma deluju jedan na drugi tako što ROS dovode do aktivacije DDR koji potom prouzrokuje starenje ćelije, a starenje opet dovodi do povećanja ROS, kao što je već opisano i tako se stvara „začarani“ krug. Smatra se da je ovo i mehanizam uključen u razvoj KVB, ali do sada ostaje nerazjašnjeno (*Correia-Melo et al, 2014*).

Uloga disfunkcije telomera u patogenezi KVB potkrepljena je sa nekoliko dokazanih pretpostavki. Odvojene studije slučaja pokazale su da su KVB češće kod pacijenata sa mutacijama u genima zaduženih za održavanje dužine telomera u germinativnim ćelijama (vode njihovom skraćivanju) kao i da su infarkti miokarda češći kod mlađih osoba nosilaca ovih mutacija. Humani kardiomiociti i kardijačne stem ćelije pokazuju skraćenje dužine telomera, shodno godinama, i ekspresiju markera starenja kao što su p53, p21 i p16. Ove promene koreliraju sa smanjenjem proliferativne i regenerativne sposobnosti starih kardiomiocita i stem ćelija srca. Relevantnost kritično kratkih telomera u starenju i bolesti kardiovaskularnog sistema, procenjena je iz brojnih epidemioloških studija. Ove studije pokazuju da je dužina leukocitnih telomera u obrnutoj korelaciji sa multiplim faktorima rizika za KVB, kao što su pušenje cigareta, gojaznost, dijabetes, sistemska inflamacija i fizička neaktivnost odnosno sedentarni način života (*Moslehi, 2012*).

Kako je ova oblast zainteresovala mnoge istraživače, tako se išlo dublje u istraživanje ove povezanosti. Minamino i saradnici (*Minamino et al, 2002*) pokazali su da se endotelne ćelije sa značajnim karakteristikama starenja nalaze i u aterosklerotskim regijama humanih koronarnih arterija. Oni su pokazali da inhibicija funkcije telomera uzrokuje starenje u endotelnim ćelijama,

dok uvođenje telomeraze, tačnije njene katalitičke subjedinice, suprimira starenje i produžuje životni vek ovih ćelija. Ovu studiju potvrdili su Ogami i saradnici (*Ogami et al, 2004*) dokazavši da su telomere endotelnih ćelija koronarnih bolesnika značajno kraće od telomera istih ćelija kod zdravih osoba. U podstudiji analize slučajeva *Cardiovascular Health Study* Fitzpatrika i saradnika (*Fitzpatrik et al, 2007*) ispitano je ukupno 419 starijih osoba i pokazano je da starije osobe imaju trostruko veći rizik od infarkta miokarda za svaku kilobazu koja se izgubi sa telomera. Dodatno, studija Willeit i saradnika (*Willeit et al, 2010*), bazirana na Bruneckovom modelu studija na populaciji, zaključila je da je dužina telomera nezavistan faktor rizika za nastanak infarkta miokarda (*Fuster et al, 2006; Khan et al, 2012; Yeh & Wang, 2016*).

1.3. Oksidativni stres

U zdravom humanom organizmu postoji jedinstvena i precizna ravnoteža između prooksidanasa i komponenti sistema antioksidativne zaštite. Prooksidansi (slobodni radikali), su nestabilni molekuli, velike reaktivnosti, koji u organizmu stupaju u hemijske reakcije sa strukturnim komponentama ćelije kao i molekulima ekstracelularnog prostora dovodeći do biohemijskih, strukturnih i funkcionalnih poremećaja. Nasuprot njima deluju antioksidansi, supstance koje dovode do odlaganja ili inhibicije oksidacije supstrata. Njihova uloga je da neutrališu štetno dejstvo prooksidanasa, pre nego što oni dovedu do oštećenja lipida, proteina i DNK kao esencijalnih molekula organizma. Ipak, mali procenat prooksidanasa uspe da izazove oštećenje, čak i u fiziološkim uslovima pri čemu dolazi do narušavanja ove jedinstvene ravnoteže. Kako posledica tog disbalansa između prooksidanasa i antioksidanasa, u korist prooksidanasa, nastaje oksidativni stres (OS) (*Sharifi-Rad et al, 2020*). Kao što je već pomenuto, oksidativni stres predstavlja značajan faktor rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (*Kotur-Stevuljevic et al, 2007; D'Oria et al, 2020*).

1.3.1. Prooksidansi

Prooksidansi ili slobodni radikali su reaktivne hemijske strukture, bilo atomi ili molekuli, koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona (*Rahal et al, 2014*). Zbog svoje specifične strukture, slobodni radikali su veoma nestabilni. Veliki broj njih ima kratak nezavistan životni vek pre nego što veže elektron kako bi postigao svoju stabilnost, u čemu se i ogleda njihova visoka reaktivnost (*Rahal et al, 2014*). U malim i umerenim količinama, imaju važne uloge u nekim biološkim procesima kao što su fagocitoza u granulocitima i makrofagama, održanje homeostaze u gastrointestinalnom traktu, a pretpostavlja se da učestuju i u signalnim procesima nazvanim redoks signalni putevi. Te male količine oksidativnog stresa koje učestvuju u fiziološkim procesima u

organizmu, definisane su kao *oksidativni eustres* (Sies, 2019). U prekomernim količinama, prooksidansi mogu uzrokovati strukturne promene ćelijskih strukturalnih komponenti (proteina, lipida i DNK) dovodeći do narušavanja njihove fiziološke funkcije, a samim tim vitalnih ćelijskih procesa (Sharifi-Rad et al, 2020). Sa druge strane, ove suprafiziološke količine prooksidanasa koje vode razvoju poremećaja u organizmu, definisane su kao *oksidativni distres* (Sies, 2019). U daljem tekstu, fokus će biti na oksidativnom distresu.

Opisan je veliki broj hemijski različitih grupa slobodnih radikala, ali su za razvoj kardiovaskularnih bolesti najznačajniji derivati kiseonika i azota (Bartekova et al, 2019). Pojam ROS obuhvata veliku grupu slobodnih kiseonikovih radikala. Ovaj tip prooksidanasa je najčešće prisutan u plućima. U organizmu se formira ili unese veliki broj različitih ROS, ali fiziološki su najznačajniji superoksidni anjon ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikal ($OH\cdot$) i vodonik-peroksid (H_2O_2) (Bartekova et al, 2019). Najštetniji i najreaktivniji od pomenutih je svakako hidroksil radikal ($OH\cdot$) koji nastaje kako iz vodonik-peroksida i superoksidnog anjona tako i u drugim putevima, npr. iz azot-monoksida (Bartekova et al, 2019). Štetan uticaj hidroksil radikala ogleda se u njegovoj reaktivnosti, odnosno u njegovoj sposobnosti da „napadne“ ćelijske membrane dovodeći do njihovog oštećenja, zatim deluje štetno i na proteine, naročito fibrinogen, razarajući disulfidne veze i dovodeći do narušavanja njihove primarne strukture i gubitka funkcije (Lipinski, 2011). Hidroksil radikal deluje štetno i na DNK, naime pokazano je *in vivo* da je jedan od ključnih učesnika u oksidativnom oštećenju DNK strukture što vodi njenoj dezintegraciji (Halliwell et al, 2021).

1.3.2. Izvori proksidanasa

Slobodni radikali nastaju kao intermedijeri metaboličkih procesa tokom normalnog ćelijskog metabolizma, a značajni su i egzogeni izvori poput zračenja, pušenje cigareta, zagađenje vazduha. Stoga se može izvršiti klasifikacija slobodnih radikala na prooksidanse endogenog porekla (nastali u metaboličkim procesima) i prooksidanse egzogenog porekla (Bartekova et al, 2019).

1.3.3. Egzogeni izvori proksidanasa (ROS)

Egzogeni izvori slobodnih radikala su mnogobrojni: pušenje cigareta, UV i jonizujuće zračenje, joni teških metala, ozon, alergeni, neki lekovi ili toksini, pesticidi, insekticidi i uopšteno zagađivači vazduha. Jonizujuće zračenje deluje tako što prevodi hidroksil radikal, superokside i organske radikale u organske hidroperokside i vodonikperokside, koji potom reaguju sa jonima metala (gvožđa i bakra) na ćelijskom nivou. Sa druge strane, UV zračenje pokreće oksidativne reakcije stimulišući riboflavin, porfirine i NADPH-oksidadu, gde se posledično stvaraju povećane

količine 8-dezoksi-guanina i povećano koristi intracelularni glutation. Joni teških metala imaju značajnu ulogu u stvaranju slobodnih radikala. Neki metali poput gvožđa, bakra, kadmijuma, nikla, arsena i olova indukuju stvaranje slobodnih radikala bilo Fentonov-om (reakcija kojom se metal M^n oksiduje do M^{n+1} stanja u prisustvu vodonik peroksida koji se pritom redukuje do hidroksil radikala i hidroksid jona) ili Haber-Weiss-ovom reakcijom (reakcija u kojoj metal iz M^{n+1} prelazi u M^n stanje u prisustvu superoskidnog anjona, pri čemu nastaje molekul kiseonika), ili pak direktnom interakcijom sa ćelijskim komponentama (na primer, tokom produkcije tiolnih radikala) (Snezhkina et al, 2019).

1.3.4. Endogeni izvori prooksidanasa

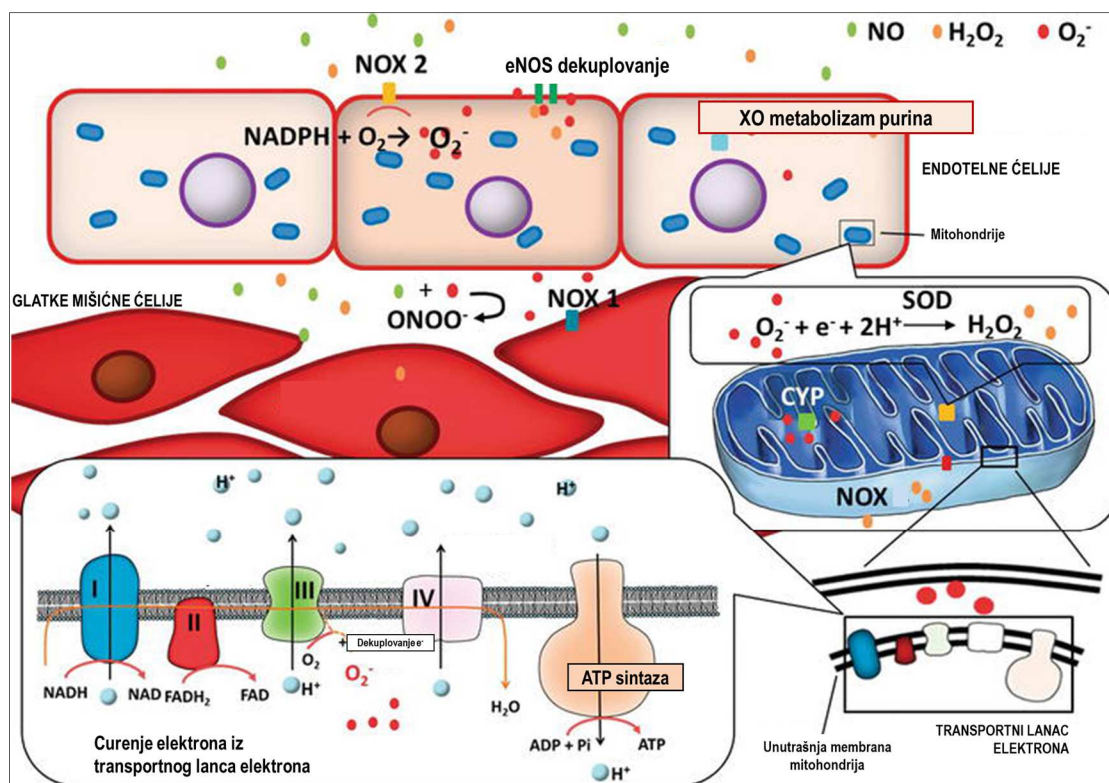
Najznačajniji izvori endogenih prooksidanasa su: transportni lanac elektrona u mitohondijama (kompleksi I i III transportnog lanca elektrona), endoplazmatski retikulum, peroksizomi, NADPH oksidaza (NOX), endotelna NO-sintaza (NOS), ksantin oksidaza i citohrom P450 (Slika 12) (Snezhkina et al, 2019). Ovi izvori proizvode kako ROS tako i reaktivna azotna jedinjenja, ali će na dalje biti reči samo o ROS.

NOX grupa enzima prisutna je kako u zidovima krvnih sudova, tako i u infiltrirajućim monocitima odnosno u makrofagama. U fiziološkim uslovima, učestvuje u prenosu elektrona kroz unutrašnju membranu mitohondrija u procesu stvaranja ćelijske energije. Pod dejstvom NOX formira se superoksidni anjon, koji se u malim fiziološkim količinama koristi u imunskom odgovoru ćelija, dok njegove povećane količine imaju štetne efekte za organizam, budući da favorizuju stvaranje hidroksil radikala (Berard et al, 2007). U zidovima krvnih sudova identifikovane su tri izoforme NOX, i to izoforme NOX1, NOX2 i NOX4. Izoforme NOX1 i NOX2 prevashodno učestvuju u formiranju superoksidnog anjona, dok se izoforma NOX4 osim u zidovima krvnih sudova, može naći i u mitohondrijama i sarkoplazmatskom retikulumu kardiomiocita i prvenstveno učestvuje u nastanku vodonik-peroksida (Förstermann et al, 2017; He et al, 2019). U *in vivo* studijama na miševima ApoE^{KO} (eng. Apolipoprotein E knock-out ili B6.129P2-Apoe^{tm1Unc}/J; miševi koji su nosioci homozigot mutacije gena za ApoE, što se ogleda u povećanoj sintezi holesterola u organizmu nezavisno od pola i starosti, najčešće su upotrebljavani u studijama KVB (<https://www.jax.org/strain/002052>)) and p47^{phox-/-} (B6N.129S2-Ncf1^{tm1Shl}/J; miševi nosioci homozigot mutacije Ncf1 (eng. neutrophil cytosolic factor 1) gena, što rezultuje u nemogućnosti sinteze p47-phox proteina (ili Ncf1 proteina), koji je citosolna subjedinica enzima NOX (<https://www.jax.org/strain/002052>)) uočeno je da su ROS poreklom od NOX iz endotelnih ćelija i glatkih mišićnih ćelija neophodni za aktivaciju endotela u procesu ateroskleroze, kao i proliferaciju glatkih mišićnih ćelija, potvrđujući da su NOX enzimi kako iz makrofaga tako i iz vaskularnih ćelija neophodni za proces ateroskleroze (Förstermann et al, 2017).

Drugi bitan izvor ROS je ksantin-oksido-reduktaza. Ksantin-oksido-reduktaza je enzim koji učestvuje u katabolizmu purinskih baza. Ovaj enzim je prisutan u dve izoforme, ksantin dehidrogenaza i ksantin oksidaza, koje mogu u određenim uslovima da prelaze jedna u drugu (*Battelli et al, 2014*). Konstitutivno ekspimirana forma je ksantin-dehidrogenaza, koja katalizuje reakciju prevođenja hipoksantina/ksantina do mokraćne kiseline uz prisustvo NAD^+ kao kofaktora, koji se tom prilikom redukuje do NADH. U određenim uslovima, ksantin-dehidrogenaza se može konvertovati u ksantin-oksidadu, koja takođe katalizuje reakciju prevođenja hipoksantina do ksantina i potom ksantina do mokraćne kiseline ali uz prisustvo kiseonika (O_2) kao kofaktora, koji se pritom redukuje do H_2O_2 . Uslovi koji favorizuju stvaranje ROS u humanom organizmu su niska pH vrednost i pritisak kiseonika u organizmu, što je slučaj kod infarkta miokarda (tačnije ishemije miokarda) (*Chung et al, 1997; Battelli et al, 2014*). Ksantin-oksido-reduktaza je ekspimirana u epitelnim ćelijama jetre, intestinuma i mlečnim žlezdama u dehidrogenaznoj izoformi, a u nekoliko studija potvrđeno je njeno prisustvo i u ćelijama srca i vaskularnim endotelnim ćelijama (*Battelli et al, 2014*), dok je njena aktivnost u serumu kod zdravih osoba uglavnom niska. U uslovima koji favorizuju nastanak ROS aktivna je ksantin-oksidadza. Ksantin-oksidadza nastaje interkonverzijom ksantin-dehidrogenaze bilo reverzibilnom oksidacijom tiolnih grupa na Cys535 i Cys992 ili pak ireverzibilnom proteolitičkom transformacijom dejstvom proteaza kao što su tripsin, himotripsin ili pankratin (*Berry et al, 2004*). U nekim patološkim stanjima, kao što su kardiovaskularne bolesti, serumska aktivnost se povećava najverovatnije zbog prisustva oksidazne izoforme, za koju se smatra da značajno doprinosi nastanku ROS i razvoju oksidativnog stresa, a samim tim i u nastanku endotelne disfunkcije i ateroskleroze, ali i reperfuzionj povredi (*Berry et al, 2004; Battelli et al, 2014*)

Takođe bitan izvor ROS je endotelna NOS (eNOS), odnosno deкупlovanje eNOS. eNOS je fiziološki dimerni enzim čija je osnovna uloga stvaranje vaskularno protektivnog jedinjenja, azot-monoksida (NO), iz L-arginina uz prisustvo (6R)-5,6,7,8-tetrahidro-L-biopteridina (BH4) kao esencijalnog kofaktora (*Förstermann et al, 2006*). Ovaj enzim je posebno osetljiv na prisustvo ili nedostatak kofaktora, BH4. U nekim patološkim stanjima, kao što su KVB, kada su koncentracije BH4 smanjene, fiziološke karakteristike enzima se menjaju iz protektivnih do značajnog učesnika u oksidativnom stresu, odnosno eNOS prestaje da proizvodi NO i okreće se proizvodnji superoksidnog anjona. Ovaj proces označen je kao deкупlovanje eNOS. Deкупlovanje eNOS je od značaja proces s obizom da povećane koncentracije superoksidnog anjona, pored toga što ometaju fiziološku funkciju enzima, smanjuju i bioraspoloživost NO, kako superokaidni anjon brzo reaguje sa raspoloživim NO i prevodi ga u peroksinitritni anjon koji iznova doprinosi pogoršanju oksidativnog stresa (*Yang et al, 2009; Shaito et al, 2022*)

Stvaranju superoksidnog anjona takođe doprinose i citohrom P450 enzimi. Oni predstavljaju grupu hemproteina koji imaju sličnu strukturu i funkciju eNOS, ali su uključeni u metabolizam holesterola, vitamina i arahidonske kiseline (He et al, 2019).



Slika 12. Endogeni izvori prooksidanasa (Modifikovano, preuzeto od He et al, 2019)

Superoksidni anjon ($O_2^{\bullet -}$), je radikal koji pripada grupi ROS i učestvuje u stvaranju drugih molekula ROS (kao što su vodonik-peroksid ili hidroksil-radikal) u određenim uslovima. Od superoksidnog anjona može nastati vodonik-peroksid spontanom transferom elektrona pri niskom pH ili u reakciji katalizovanoj antioksidativnim enzimom superoksid-dismutazom. Niski nivoi vodonik-peroksida favorizuju antioksidativno okruženje, dok su više koncentracije prooksidativnog karaktera (Förstermann et al, 2017). Sa druge strane, malondialdehid (MDA) je veoma reaktivan metabolit, nastao tokom lipidne peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina, ali i kao sporedni proizvod njihove sinteze. Metabolize se mitohondrijalnom aldehyd-dehidrogenazom i dekarboksilacijom do acetaldehida, koji se potom oksiduju do acetata i dalje do vode i ugljendioksida. MDA ima značajnu ulogu u karcinogenezi, dijabetes melitusu, kardiovaskularnim i neurovaskularnim bolestima (Đorđević et al, 2020).

U organizmu, krajnji proizvodi reakcije serumskog albumina i hloridnih oksidanasa (hipohloritna kiselina), kao i reakcije enzima mijeloperoksidaze, nastaju nefunkcionalni proteini koji sadrže di-tirozin ukrštene veze, pentozin ili karbonil grupu, i nazivaju se kolektivno

uznapredovali produkti oksidacije proteina (eng. *advanced oxidation protein products*, AOPP). Jednom kada nastanu, AOPP mogu dovesti do različitih oštećenja tkiva, a dokazani su i učesnici procesa ateroskleroze (*Bagyura et al, 2022*). Humani serumski albumin, u uslovima hipoksije, acidoze ili oštećenja slobodnim radikalima formira takozvani ishemijski modifikovani albumin (IMA), gde su modifikovane krajnje aminokiseline albuminskog lanca. IMA je izuzetno osetljiv marker i detektabilan je i u ranoj reverzibilnoj fazi akutnog koronarnog sindroma (*Wahab, 2017*).

Prooksidansi se endogeno stvaraju u organizmu u brojnim procesima (ćelijski izvori su oksidativni transport elektrona u mitohondrijama, endoplazmatski retikulum, peroksizomi, NADH oksidaza vezana za ćelijsku membranu, ciklookigenaze, a potom i proces fagocitoze), a mogu biti i egzogenog porekla (duvanski dim, jonizujuće zračenje, UVA zračenje, teški metali, ozon, zagađenje vazduha) (*Sharifi-Rad et al, 2020*). Njihov značaj je izuzetno veliki u razvoju mnogih bolesti, kao što su kardiovaskularne, kanceri, neurovaskularne i neurodegenetivne bolesti, stoga je nekada daleko značajnije znati njihov ukupan sadržaj u krvi. S obzirom na to, Erel je osmislio praktičnu spektrofotometrijsku metodu kojom meri ukupan odnosno totalni oksidativni status seruma pacijenata (*Erel, 2005*). Alamdari je otišao korak dalje i predložio laboratorijsko određivanje balansa između prooksidanasa i antioksidanasa u serumu pacijenata kroz prooksidativno-antioksidativni balans kao laboratorijski biomarker (*Alamdari et al, 2007; Alamdari et al, 2008*). Prooksidativno-antioksidativni balans je test kojim je moguće odrediti opterećenje seruma prooksidansima i istovremeno antioksidativni kapacitet krvi u jednom određivanju (*Alamdari, 2007*).

Shodno tome, definisani su i skorovi, koji računski obuhvataju aktivnosti prooksidativnih molekula u serumu pacijenata ili pak sveukupan oksidativni status. Obuhvatajući samo određivane prooksidanse, tačnije srednju vrednost njihovih Z skor vrednosti nastao je prooksidativni skor. Nasuprot njemu, oksidativni skor nastao je kao razlika srednjih Z skor vrednosti prooksidanasa i vrednosti antioksidanasa u humanom serumu (*Veglia et al, 2009*).

1.3.1. Antioksidansi

Antioksidansi su od vitalnog značaja u odbrambenom mehanizmu organizma od redoks disbalansa. To su molekule koje imaju sposobnost da neutrališu dejstvo slobodnih radikala pre nego što stupi u reakciju sa supstratom, tačnije ćelijskom strukturom i promeni njenu strukturu i funkciju. Stoga se može reći da antioksidansi aktivno učestvuju u održavanju precizne redoks ravnoteže organizma. Antioksidansi slede nekoliko mehanizama odbrane koji se mogu podeliti na *primarni* mehanizam odbrane organizma (najčešće ovaj mehanizam obuhvata direktno uklanjanje slobodnih radikala (eng. *scavenging*) pre nego što oštete ćelijske strukture; takvi su na primer

enzimi SOD, glutatuaion peroksidaza i drugi) i *sekundarni* mehanizam odbrane (podrazumeva princip prekidanja lančane reakcije supstrata; takvi su na primer vitamini C i E kao i mokraćna kiselina) (Tan et al, 2018; Malekmohammad et al, 2019).

Kardiovaskularni sistem je opremljen različitim protektivnim sistemima protiv oksidativnog napada. Antioksidansi su konstantno prisutni u organizmu (endogeni antioksidansi) ili se pak mogu unositi u organizam, najčešće putem ishrane ili suplemenata (egzogeni antioksidansi). Zavisno od strukture i mehanizma antioksidativnog dejstva, mogu se podeliti na enzimске i neenzimске antioksidanse, a prema svojoj lokalizaciji, mogu biti intracelularne ili ekstracelularne komponente antioksidativne zaštite (Malekmohammad et al, 2019). Pregled najznačajnijih antioksidanasa za kardiovaskularni sistem i njihov osnovni mehanizam odbrane prikazani su u Tabeli 2.

Slično kao kod prooksidanasa, imajući u vidu aditivno dejstvo svih antioksidativnih molekula u humanom organizmu, definisan je totalni antioksidativni status, parametar kojim se određuje sveukupni antioksidativni kapacitet seruma bolesnika (Erel, 2004). Nasuprot njemu, matematički je formulisan i antioksidativni skor, koji predstavlja srednju vrednost Z skor vrednosti svih pojedinačnih antioksidanasa određivanih u humanom serumu (Veglia et al, 2009).

Tabela 2. Pregled funkcija komponenti antioksidativne zaštite u kardiovaskularnom sistemu

<i>Antioksidans</i>	<i>Funkcija</i>
<i>Enzimski - endogeni</i>	
<i>Paraoksonaza 1</i>	Sprečava lipidnu peroksidaciju; Promoviše antiaterogenu prirodu HDL čestica; učestvuje u regulaciji reverznog transporta holesterola
<i>Superoksid dismutaza</i>	Katalizuje razlaganje superoksidnog anjona do O ₂ i manje štetnih peroksida; Sprečava stvaranje peroksinitrita, redukuje nivoe F ₂ -izoprostana i izofurana u aorti kao i nivoe prelaznih metala
<i>Katalaza</i>	Razlaže H ₂ O ₂ ; Redukuje proliferaciju vaskularnih glatkih mišićnih ćelija
<i>Glutation – peroksidaza</i>	Razlaže i uklanja lipidne perokside uz prisustvo glutaciona
<i>Glutation – reduktaza</i>	Regeneriše oksidovani glutacion; Inhibira H ₂ O ₂ indukovanu ekspresiju MCP1 i VCAM1
<i>Tireodoksin – reduktaza</i>	Reguliše nivo tireodoksina, proteina koji učestvuje u redoks signalnim putevima i odgovoru na oksidativni stres; Povećava bioraspoloživost azot-monoksida
<i>Neenzimski - endogeni</i>	
<i>Glutation</i>	Najznačajnija komponenta antioksidativnog sistema, deluje tako što sprečava oksidaciju supstrata u brojnim reakcijama ili pak neutrališe slobodne radikale; smanjuje veličinu aterosklerotske lezije u aortnom luku
<i>Mokraćna kiselina</i>	Blokira dejstvo superoksidnog anjona i hidrosil radikala; Ublažava aktivaciju endotela i proliferaciju endotelnih glatkih mišićnih ćelija
<i>Bilirubin</i>	Neutrališe slobodne radikale, sprečava oksidaciju proteina; Ublažava aktivaciju/disfunkciju endotela i proliferaciju endotelnih glatkih mišićnih ćelija
<i>Koenzim Q</i>	Inhibira oksidaciju proteina i lipida, neutrališe dejstvo peroksil radikala; Stimuliše fiziološku funkciju endotela
<i>α – Liponska kiselina</i>	Sprečava razvijanje aterosklerotskih lezija, povećava aktivnost eNOS enzima
<i>Metal vezujući proteini</i>	Albumin (bakar), ceruloplazmin (bakar), metalotionenin (bakar), feritin (gvožđe), mioglobin (gvožđe), transferin (gvožđe)
<i>Neenzimski – egzogeni</i>	
<i>Askorbinska kiselina</i>	Prva linija odbrane u plazmi, snažan inhibitor lipidne peroksidacije (sprečava stvaranje ROS tokom faze propagacije, a i u samoj inicijalnoj reakciji lipidne peroksidacije), pojačava aktivnost NOS enzima, inhibira ciklooksigenaze, smanjuje adheziju ćelija, poboljšava funkciju oštećenog endotela
<i>Tokoferol</i>	Sprečava formiranje penastih ćelija i nastanak endotelne disfunkcije, neutrališe slobodne radikale smanjuje oksidaciju LDL čestica i modulaciju endotelnih ćelija
<i>Vitamin B grupe</i>	Neutrališe hidrosil radikal i lipidne hidroperoksi radikale; poboljšavaju endotelnu funkciju
<i>Vitamin A i karotenoidi</i>	Prevenција peroksidacije LDL holesterola; redukuju inflamaciju, oksidativni stres i endotelnu disfunkciju
<i>Polifenoli/ Flavonoidi</i>	Neutrališu i smanjuju formiranje ROS, povećavaju ekspresiju eNOS, inhibiraju angiogenezu, smanjuje agregaciju trombocita i hipertenziju

2. Ciljevi istraživanja:

- 1) Optimizovati i validirati metodu za određivanje relativne dužine telomera i aktivnosti enzima telomeraze leukocita periferne krvi.
- 2) Proceniti relativnu dužinu telomera i aktivnost enzima telomeraze u leukocitima periferne venske krvi kod zdravih ispitanika i u podgrupama bolesnika sa kardiovaskularnim oboljenjima (stabilna angina pectoris i akutni infarkt miokarda (STE-AIM i MINOCA bolesnici)).
- 3) Proceniti relativnu dužinu telomera i aktivnost enzima telomeraze u leukocitima arterijske krvi (STE-AIM i MINOCA bolesnici) i homogenatu trombo aspirata u STE-AIM podgrupi bolesnika.
- 4) Utvrditi da li postoji povezanost telomera – telomeraza sistema i oksidativnog stresa kod bolesnika sa akutnim koronarnim sindromom (STE-AIM i MINOCA bolesnici)
- 5) Proceniti vezu između relativne dužine telomera i aktivnosti enzima telomeraze određenih u leukocitima periferne venske i arterijske krvi kao i homogenatu okludirajućeg tromba sa kliničkim pokazateljima statusa bolesnika nakon akutnog infarkta miokarda (kratkoročna i dugoročna prognoza, veličina infarkta određena preko maksimalne koncentracije troponina I (TnI)).
- 6) Proceniti vezu između parametara redoks statusa određenih u leukocitima periferne venske i arterijske krvi kao i u homogenatu okludirajućeg tromba sa kliničkim pokazateljima statusa bolesnika nakon akutnog infarkta miokarda (kratkoročna i dugoročna prognoza, veličina infarkta određena preko maksimalne koncentracije troponina I (TnI)).

3. Materijal i metode

3.1. Eksperimentalni dizajn istraživanja

Istraživanje je nerandomizovana prospektivna studija koja je sprovedena u saradnji između Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (Srbija), KBC Zemun, Beograd (Srbija), KBC Bežanijska Kosa, Beograd (Srbija) i Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Ljubljani (Slovenija), u periodu oktobar 2015. godine do oktobra 2016. godine. U studiju su uključene tri grupe ispitanika: **grupa bolesnika**, koju čine 105 bolesnika oba pola sa infarktom miokarda sa elevacijom ST segmenta (STE-AIM) koji su kandidati za lečenje primarnom perkutanom koronarnom intervencijom, **kontrolna grupa bolesnika**, koju čine 22 bolesnika sa stabilnom anginom pectoris, i **kontrolna grupa zdravih ispitanika**, koju čine 102 zdrave osobe koji su sa grupom bolesnika bile uparene po godinama i polu. Iz grupe bolesnika (N=105) naknadnom analizom izdvojile su se dve podgrupe bolesnika, i to MINOCA (N=6) i bolesnici sa AIM bez implantiranog stenta usled ruptуре krvnog suda tokom intervencije (dalje *Bez stenta*) (N=7). Krv od bolesnika je uzorkovana u akutnom stanju odnosno na samom prijemu u bolnicu (grupa bolesnika) ili nakon izvršenog angiografskog pregleda (kontrolna grupa ispitanika) (procedura je detaljno opisana u *poglavlju 3.2.*). Grupa bolesnika je praćena šest meseci od akutnog događaja, nakon čega im je bio uzorkovan kontrolni uzorak, a potom i naredne četiri godine kada je rađena samo evaluacija stanja bolesnika i samog ishoda intervencije. Praćeni su ponovni reinfarkti miokarda kao i sveukupno preživljavanje bolesnika.

AP bolesnici su regrutovani u KBC Zemun, Beograd (Srbija), među bolesnicima koji su upućivani na angiografski pregled. STE-AIM bolesnici su regrutovani u koronarnim jedinicama KBC Zemun, Beograd (Srbija), KBC Bežanijska Kosa, Beograd (Srbija). Sama intervencija je rađena po pravilima SOP kod indikovanih bolesnika (eng. *Standard Operating Procedure*; ESC/EACTS Guidelines on Myocardial Revascularization) uz obaveznu aspiraciju trombotskog materijala. Uzorkovane su periferna arterijska (pre intervencije) i periferna venska krv pre i neposredno posle intervencije (2h posle otvaranja okludirane arterije). Određivanje aktivnosti enzima telomeraze leukocita, relativne dužine telomera leukocita periferne krvi, parametara oksidativnog stresa i lipidnog statusa iz biološkog materijala, što je bio i predmet istraživanja ove doktorske teze, vršeno je u laboratorijama Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (Srbija) i Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Ljubljani (Slovenija). Grupa bolesnika sa stabilnom anginom pectoris je regrutovana sa odeljenja kardiologije KBC Zemun, Beograd (Srbija), koji su bili pozivani na već planirani angiografski pregled.

Bolesnici su bili uključeni u istraživanje nakon što su dobili adekvatno objašnjenje od stručnog osoblja i potpisali pisani pristanak. Budući da u samom trenutku prijema nije bilo moguće razlikovati MINOCA bolesnici od non-MINOCA bolesnici, nakon same intervencije bolesnici su bili podjeljeni na tri entiteta, i to: STE-AIM bolesnici, MINOCA bolesnici i bolesnici bez stenta.

Uporedo sa grupom bolesnika sakupljena je i kontrolna grupa zdravih ispitanika. Kontrolna grupa je bila regrutovana u Opštoj bolnici Medigroup, Beograd (Srbija), po sledećim inkluzionim kriterijumima: normalan krvni pritisak (sistolni ispod 140mmHg; dijastolni ispod 90mmHg), odsustvo kardiovaskularnih bolesti, bolesti jetre ili bubrega, malignih bolesti, kao i prethodna infekcija, trauma ili hiruška intervencija. Dodatno, kontrolnoj grupi je odsustvo kardiovaskularnih bolesti potvrđeno specijalističkim kardiološkim pregledom (elektrokardiogramom, ehokardiogramom i kardiološkim testom opterećenja) od strane kardiologa KBC Zemun, Beograd (Srbija), KBC Bežanijska Kosa, Beograd (Srbija).

Etički odbori zdravstvenih ustanova uključenih u studiju su odobrili ovo istraživanje:

- a) KBC Zemun, Beograd, Srbija – br.325/1, 24. septembar 2015. godine,
- b) KBC Bežanijska Kosa, Beograd, Srbija – br.4705/4, 31. maj 2016. godine,
- c) Opšta bolnica Medigroup, Beograd, Srbija – 1080/15, 18.jun 2016. godine,
- d) Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

3.1.1. Kriterijumi za uključivanje bolesnika u studiju:

- a) Bolesnici sa akutnim infarktom miokrada sa elevacijom ST segmenta oba pola od 18-80 godina koji daju informisani pristanak i koji su kandidati za pPCI
- b) Bol u grudima trajanja do 12 časova

3.1.2. Kriterijumi za isključivanje bolesnika iz studije:

- a) Akutni infarkt miokrada sa elevacijom ST segmenta nastao na mestu tromboze stenta,
- b) Bolesnici koji su prethodno dobili trombolitičku terapiju,
- c) Akutni infarkt miokrada sa elevacijom ST segmenta kod bolesnika sa prethodnim aortokoronarnim premošćenjem
- d) Bolesnici sa kardiogenim šokom
- e) Trudnice i dojilje
- f) Nedavanje informisanog pristanka

3.2. Biološki material korišćen u istraživanju

3.2.1. Uzorci sakupljeni od kardiovaskularnih bolesnika

Uzorci bolesnika uzorkovani su u nekoliko tačaka i to: a) prva tačka na prijemu u koronarnu jedinicu urgentne službe, ali pre same pPCI procedure (periferna venska krv (PVK) i arterijska krv (AK)); b) druga tačka nakon isteka 2h od završene pPCI procedure (PVK); c) treća tačka šest meseci od akutnog koronarnog događaja (PVK). Tromb uklonjen tokom same pPCI procedure korišćen je kao uzorak u ovom istraživanju. Pregled uzoraka po vremenima dat je u Tabeli 3. Od AP bolesnika uzorak periferne venske krvi je uzorkovana neposredno pre angiografskog pregleda.

Tabela 3. Shematski prikaz uzorka uzimanik od bolesnika u studiji

	<i>Pre pPCI</i>	<i>Tokom pPCI</i>	<i>Posle pPCI</i>	<i>180±15 dana nakon pPCI</i>
<i>Uzorak periferne venske krvi sa EDTA antikoagulansom</i>	X	/	X	X
<i>Uzorak periferne krvi bez antikoagulansa</i>	X	/	X	X
<i>Uzorak arterijske krvi sa heparin antikoagulansom</i>	X	/	/	/
<i>Okluzivni tromb</i>	/	X	/	/

Od bolesnika je uzorkovano ukupno 5 uzoraka periferne venske krvi i to: 2 uzorka u epruvetama sa EDTA antikoagulansom od 9mL za dobijanje plazme (jedan pre operacije i jedan posle) i 2 uzorka u epruvetama bez antikoagulasa od 9mL za dobijanje seruma (jedan pre operacije i jedan posle), i 1 uzorak arterijske krvi u epruveti sa heparin antikoagulansom od 9mL za dobijanje plazme (pre operacije). Kako nije bilo moguće uzorkovati dva dodatna uzorka arterijske krvi od bolesnika tokom same intervencije (jedan za dobijanje plazme, jedan za dobijanje seruma), odlučili smo se za korišćenje heparinizirane plazme i samo jedan uzorak koji će biti pogodan za sve analize. Najčešće korišćeni uzorak za dobijanje plazme u rutinskoj biohemijskoj analizi je puna krv sa EDTA antikoagulansom. Korišćenje heparina kao antikoagulansa nosi vremensku ograničenost obrade uzoraka, s obzirom da je preporučena brza obrada ovakvih uzoraka, naročito ako iz njih sledi izolovanje DNK (*Lam et al, 2004*). Dodatno, zbog samog mehanizma antikoagulantnog dejstva EDTA (helirajući agens koji vezuje jone Ca^{2+}) bi eventualno mogao da interferira u određivanju parametara redoks statusa bolesnika (za koje se rutinski koristi uzorak seruma), koji su obuhvaćeni ovom doktorskom tezom. Stoga, odlučili smo da koristimo EDTA antikoagulans za dobijanje plazme i uz njega uzorak bez antikoagulansa za dobijanje seruma za uzorke periferne venske krvi, i heparin antikoagulans za dobijanje plazme u uzorcima arterijske krvi. Svi uzorci

ovom istraživanju obrađivani su u roku 4h od uzorkovanja. Parametri telomera-telomeraza sistema određivani su u uzorcima pune krvi pre pPCI i posle pPCI, u uzorcima arterijske krvi pre pPCI i homogenatu tromboaspirata tokom pPCI. Parametri redoks statusa i to totalni oksidativni status (TOS), uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP), ishemijom modifikovani albumin (IMA), (TAS), aktivnost enzima superoksid-dismutaze (SOD), aktivnost enzima paraoksonaze 1 (PON-1) i ukupne sulfhidrilne grupe proteina (tSHG) određivani su u serumu pre pPCI i posle pPCI, dok su nivo superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$), malondialdehid (MDA), prooksidativno-antioksidativni balans (PAB) određivani u plazmi pre pPCI i posle pPCI. Biohemijski parametri određivani su u serumu pre pPCI, dok su osnovni hematološki parametri analizirani u plazmi pre pPCI. Jedini izuzeci bili su plazma arterijske krvi i homogenat tromboaspirata u kojima su određivani svi parametri redoks statusa.

Uzorci periferne venske i arterijske krvi su čuvani i transportovani na $+4^{\circ}C$, a uzorak tromboaspirata je skladišten i transportovan na suvom ledu, na $-79^{\circ}C$. Svi uzorci su nakon transporta na Farmaceutski fakultet, Univerziteta u Beogradu, bili obrađeni, što podrazumeva odvajanje plazme i izdvajanje sloja leukocita istaloženih na površini sloja eritrocita nakon centrifugiranja uzorka krvi (10min na 4000 RPM) sa antikoagulansom (EDTA ili heparin). Iz leukocita je potom bio izolovan enzim telomeraza i genomska DNK za određivanje relativne dužine telomera (detaljani protokoli su navedeni u potpoglavljima 3.3.1. i 3.4.1.). Tromb je bio homogenizovan mehanički u prisustvu tečnog azota, a homogenat potom resuspendovan u fiziološkom rastoru i podeljen na tri dela (za izolovanje enzima telomeraze, genomske DNK i za određivanje redoks statusa). Obrađeni uzorci seruma, plazme, izolovana genomska DNK, izolovani enzim telomeraza kao i homogenat tromba čuvani su na $-80^{\circ}C$ do izvođenja samih analiza.

Šestomesečno praćenje bolesnika, podrazumevalo je da su uključeni ispitanici bili pozivani nakon 6 meseci od akutnog događaja na kontrolni pregled pri kome će biti evaluirani klinički podaci, kao i uzeta krv (1 uzorak u epruveti sa EDTA antikoagulansom od 9 mL za dobijanje plazme i 1 uzorak u epruveti bez antikoagulasa od 9 mL za dobijanje seruma) za određivanje relativne dužine telomera, aktivnosti enzima telomeraze i parametara redoks statusa. Uzorci su obrađivani kao i uzorci u prvoj tački i nakon toga čuvani se na $-80^{\circ}C$ do izvođenja analiza.

Kontrolnim ispitanicima krv je bila uzorkovana nakon perioda noćnog gladovanja, i to uzorci seruma i plazme sa EDTA. Uzorci krvi kontrolnih ispitanika bili su obrađeni kao i uzorci bolesnika i nakon toga čuvani su na $-80^{\circ}C$ do izvođenja analiza.

3.2.2. Uzorci za optimizaciju određivanja aktivnosti enzima telomeraze

U svrhu optimizacije metode za određivanje aktivnosti enzima telomeraze za rutinsku upotrebu, sakupljeni su dodatno uzorci bolesnika sa karcinomima u KBC Zemun, Beograd (Srbija). Krv je sakupljena od 3 različita bolesnika sa dijagnostikovanim karcinomima (akutna mijeloidna leukemija, karcinom ezofagusa i difuzni limfom B-ćelija). Krv bolesnika sa karcinomom bila je neophodna za uzorke koji bi prikazali visoke vrednosti enzima telomeraze u humanim uzorcima. Nasuprot njima, uzorci 3 kontrolna zdrava ispitanika su predstavljali uzorke sa niskim vrednostima enzima telomeraze u humanim uzorcima. Uzorci su obrađeni po protokolu koji je opisan u daljem tekstu.

Ćelijske linije humanih karcinoma u studiji su korišćene kao standardi ili uzorci sa najvišom vrednosti, sa kojom bi uzorci u rutinskoj kliničkoj analizi mogli biti upoređivani. Ćelijske linije korišćene u studiji su: HeLa ćelije (ATCC, Manassas, VA), Ramos Blue ćelije (ATCC, Manassas, VA) i ćelije Humanog osteosarkoma (ATCC, Manassas, VA). Sve ćelije su održavane i presejavane po uputstvima proizvođača do određene pasaže kada su lizirane po protokolu za izolovanje enzima telomeraze (detaljno predstavljene u poglavlju 3.3.1.).

3.3. Priprema uzorka i određivanje aktivnosti enzima telomeraze

3.3.1. Izolovanje enzima telomeraze

Enzim telomeraze je izolovan iz uzoraka krvi sa EDTA antikoagulansom (uzorci periferne venske krvi) ili heparin antikoagulansom (uzorci arterijske krvi) pomoću hladnog CHAPS pufer protokola (Kim *et al*, 1994). Nakon centrifugiranja uzorka pune krvi sa antikoagulansom, beličasti sloj leukocita istaložen na eritrocitima (eng. *buffy coat*) se sakupi za dalju analizu. Ukupni leukociti se operu dva puta u *RBC Lysis Buffer* (Roche Life Sciences, Penzberg, Germany) rastvoru sobne temperature i potom se rastvore u CHAPS puferu koji sadrži 10mM TRIS-HCl (pH=7.5) (Fisher Scientific International Inc., Hampton, NH), 1mM MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific – Acros Organics, Geel, Belgium), 1mM EGTA (Thermo Fisher Scientific – Acros Organics, Geel, Belgium), 0.1mM AEBSF (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), 5mM 2-mercaptoetanol (Thermo Fisher Scientific – Acros Organics, Geel, Belgium), 0.5% CHAPS (Fisher Scientific International Inc, Hampton, NH), i 10% glicerol (Avantor Inc., Randor, PA). Koncentracija proteina je određena u svim uzorcima Bradfordovim testom (Pierce™ Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Detaljna proskripcija CHAPS pufera i način pripreme opisanu su u Prilogu 1. Nakon izolacije, svi uzorci su razblaživanjem u CHAPS puferu dovedeni na istu koncentraciju proteina.

3.3.2. Određivanje enzima telomeraze

Aktivnost enzima telomeraze određena je pomoću modifikovane *real-time telomeric repeat amplification protocol* (RTq-TRAP) metode (Hou et al, 2001; Wege et al, 2003), koja je optimizovana u našoj laboratoriji. Polimerizovana lančana reakcija (*eng. polymerised chained reaction, PCR*) izvedena je u finalnom volumenu od 15 μ l koji sadrži: qPCR Master Mix (5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX), Solis Biodyne, Tartu, Estonia), TS prajmer (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), ACX prajmer (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) i izolovani proteinski ekstrakt enzima telomeraze. Sekvence korišćenih prajmera prikazane su u Prilogu 2, a detaljna proskripcija pripreme PCR reakcione smeše i PCR protokol opisani su u Prilogu 3. PCR analiza za telomerazu je optimizovana i određena na aparatu Applied BioSystems 7500 Real- Time PCR System (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA).

Tabela 4. Spisak prajmera korišćenih u studiji

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera u 5'-3' smeru
TS primer	AATCCGTCGAGCAGAGTT
ACX primer	GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAACC
Tel Forward	ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTAGTGT
Tel Reverse	TGTTAGGTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTAACA
Alb Forward	CGGCGGCGGGCGGCGGGCTGGGCGGAAATGCTGCACAGAATCCTTG
Alb Reverse	GCCCGGCCCGCCGCGCCCGTCCCGCCGAAAAGCATGGTCGCCTGTT

3.4. Priprema uzorka i određivanje dužine telomera

3.4.1. Izolovanje genomske DNK

Određivanje dužine telomera leukocita periferne krvi (*Leukocyte telomere length, LTL*) vrši se iz genomske DNK. Genomska DNK je bila izolovana iz *buffy coat* sloja pomoću FlexiGene DNA kit-a (Quagen, Hilden, Germany). Deo *buffy coat-a* se izdvoji od uzorka. U prvom koraku se liziraju eritrociti puferom za liziranje eritrocita. Uzorci se mešaju inverzijama i centrifugiraju 20 sekundi na 10000g. Odstrani se supernatant. Potom se dodaje denaturacioni pufer (sadrži t-Octilfenoksipolietoksietanol) i enzim proteaza pomešani u odnosu 1:100 neposredno pre upotrebe, a koji liziraju ćelijske membrane. Uzorci se odmah vorteksiraju do potpunog rastvaranja taloga, i zatim inkubiraju na +65°C do potpune lize. Potom se taloži DNK dodavanjem apsolutnog izopropanola (Acros organics, Geel, Belgium) i meša inverzijama do pojave vidljive niti DNK. Potom se uzorci centrifugiraju 3minuta na 10000g i odstrani supernatant. Precipitirana DNK ispira se dva puta u rastvoru 70% etanola (Acros organics, Geel, Belgium) naizmeničnim vorteksiranjem

nakon dodavanja 70% etanola i centrifugiranjem 3minute na 10000g. Izdvojeni zalog DNK se osuši na vazduhu. Nakon sušenja, izolovani talog DNK se resuspenduje u rehidratacionom puferu (koji sadrži 10 mM Tris-Cl, pH=8.5) i inkubira na +65°C do potpunog rastvaranja. Nakon izolovanja DNK proverava se njen prinos i čistoća spektrofotometrijski na talasnim dužinama 230nm, 260nm i 280nm. Svi uzorci dovedeni su na istu koncentraciju DNK pre dalje analize razblaživanjem u rehidratacionom rastvoru.

3.4.2. *Određivanje dužine telomere leukocita qPCR metodom*

Dužina telomera leukocita (*eng. leukocyte telomere length, LTL*) određena je modifikovanom qPCR metodom i rezultati su potom izraženi kao T/S odnos (*eng. telomere/standard ratio, T/S odnos*), odnosno kao odnos dužine telomera i standardnog gena (*eng. single copy gene*) koji služi za normalizaciju (Cawton, 2002; Jodczyk et al, 2015). Kao standardni gen izabran je albumin. (Cawthon, 2009) Sekvence prajmera korišćenih za analizu prikazane su u Tabeli 4. Reakcije su odvojeno izvedene za dužinu telomera i standardni gen, albumin, ali uvek u okviru iste PCR ploče. Konačne PCR reakcione smeše za reakcije određivanja dužine telomera i albumina, kao i protokol PCR reakcije za određivanje TL i albumina prikazani su u Prilogu 4. Analize LTL su određivane na sistemu LighCycler® 480 II System (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland) na Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Ljubljani, Slovenija. Dobijene Cq vrednosti za LTL i standardni gen (albumina) za svaki uzorak, prevođene su na koncentraciju DNK, pomoću standardne krive. Standardna kriva formirana je analizom uzorka DNK poznatih rastućih koncentracija (raspona od 0,80ng/μL do 48,7ng/μL) kako za telomere tako i za albumin. U uzorcima su uporedo određivani brojevi umnožaka telomera leukocita i albumina, a potom su dobijene Cq vrednosti uzoraka prevedene u koncentracije DNK. Krajnje vrednosti dužine telomera, T/S odnos, izračunavan je kao odnos koncentracije preračunate DNK za telomere i albumin za svaki uzorak i predstavlja prosečnu dužinu telomera po genomu.

3.5. *Određivanje parametara redoks statusa*

Redoks status kod pacijenata procenjen je na osnovu vrednosti nekoliko određenih prooksidativnih i antioksidativnih parametara. Kao markeri prooksidativnog statusa određivani su: prooksidativno-antioksidativni balans (PAB), totalni oksidativni status (TOS), nivo superoksid anjon radikala ($O_2^{\bullet-}$), malondialdehid (MDA), uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP) i ishemijski modifikovani albumin (IMA). Sa druge strane, kao parametri antioksidativne zaštite određivani su: totalni antioksidativni status (TAS), aktivnost enzima superoksid-dismutaze (SOD), aktivnost enzima paraoksonaze 1 (PON-1) i ukupne sulfhidrilne grupe proteina (tSHG).

Nivo MDA je određivan kao reaktivna jedinjenja tiobarbiturne kiseline (eng. *thiobarbituric acid reactive species*, TBARS) spektrofotometrijskim testom koji se zasniva na apsorpcionom maksimumu kompleksa malondialdehida i ostalih TBARS sa tiobarbiturnom kiselinom na 535 nm prema metodi Girotti i saradnika (*Girotti et al, 1991*). Određivanje brzine nastajanja superoksid anjon radikala ($O_2^{\bullet-}$) je zasnovano na metodi koju su dali Auclair i Voisin, odnosno na sposobnosti superoksid anjon radikala da redukuje nitroblutetrazolijum (NBT), tačnije kao brzina njegove redukcije (*Auclair et al, 1985*). Određivanje PAB-a se zasniva na merenju koncentracija vodonik-peroksida (H_2O_2) u antioksidativnom okruženju, gde hromogen 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) reaguje i sa vodonik-peroksidom (enzimski katalizovana enzimom peroksidazom) i sa antioksidansima (mokraćnom kiselinom; reakcije je nekatalizovana) istovremeno, dajući intenzivno plavo obojeni proizvod (*Alamdari et al, 2007*). Metoda za određivanje koncentracije AOPP zasniva se na praćenju promene apsorpcije seruma na 340nm u kiseljoj sredini koja potiče od proizvoda oksidacije proteina ili hloramina-T u standardnim rastvorima (*Witko-Sarsat et al, 1996*). Princip metode za određivanje TOS zasniva se na reakciji ukupnih oksidanasa u uzorku koji oksiduju fero jon, orto-dianizidni kompleks, do feri jona (*Erel, 2005*). Određivanje vrednosti IMA zasniva se na ACB (en. *albumin cobalt binding*, ACB) metodi i većoj sposobnosti nemodifikovanog albumina da veže kobalt u odnosu na modifikovani, što se ogleda u porastu vezivanja kobalta za supstrat ditiotreitola u reakciji (*Sinha et al, 2003*).

Aktivnosti enzima superoksid-dismutaze (SOD) određivane su prema metodi Misra i Fridovich koja se zasniva na sposobnosti enzima da inhibira autooksidaciju epinefrina u alkalnoj sredini (*Misra et al, 1972*). Koncentracija ukupnih sulfhidrilnih (SH) grupa merena je Ellmanovom metodom uz ditiidinitrobenzojevu kiselinu (DTNB) kao reagens (*Ellman, 1959*). Totalni antioksidativni status (TAS) određivan je spektrofotometrijski uz ABTS kao hromogen (*Erel, 2004*). Aktivnost enzima paraoksonaze (PON1) merena je kinetički uz paraokson kao supstrat, po metodi Richter-Furlong (*Richter et al, 1999*).

Da bi se potom sagledao zbirni uticaj ovih pokazatelja redoks statusa, oksidativni status bolesnika je procenjivan i pomoću izračunatih novoformulisanih, zbirnih skorova, koji sveobuhvatnije prikazuju stanje bolesnika. Korišćeni su prooksidativni, antioksidativni i oksidativni skor (*Veglia et al, 2009*). Antioksidativni skor izračunat je kao prosečni z-skor antioksidativnih parametara, dok je Prooksidativni skor bio prosečan z-skor prooksidativnih markera. Na kraju, oksidativni skor predstavlja razliku antioksidativnog i prooksidativnog skora (*Veglia et al, 2009*).

3.6. Osnovni biohemijski i hematološki parametri

Osnovni biohemijski parametri (koncentracije glukoze, mokraćne kiseline, ukupnog holesterola, triglicerida i LDH) određivani su standardnim enzimskim metodama, dok je HDL holesterol određivan direktnom enzimskom metodom. Sve analize su aplikovane na biohemijski analizator ILAB 600 (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy). Za izračunavanje vrednosti LDL holesterola korišćena je Friedwald-ova formula (*Friedewald et al, 1972*). Nivoi troponina-I određivani su komercijalnim Access Immunoassay sistemom (UniCelDxI 600 Access Immunoassay System, Beckman Coulter Inc, USA). Svi hematološki parametri rađeni su na ADVIA hematološkom sistemu (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Germany).

3.7. Ispitivanje stabilnosti uzorka za određivanje aktivnosti telomeraze i parcijalna validacija RTq-TRAP metode

Stabilnost proteinskog ekstrakta za određivanje aktivnosti enzima telomeraze nije bila dovoljno poznata usled nedostatka naučnih podataka. Stoga izvedena je studija ispitivanja stabilnosti proteinskog telomeraznog ekstrakta, gde su alikvoti uzoraka bili čuvani različit vremenski period na različitim temperaturama, a uključeno je i ponovljeno zamrzavanje. Vremenske tačke određivanja bile su: tačka 0 na dan izolacije; tačka 1 jedan dan nakon izolacije; tačka 2 tri dana nakon izolacije, tačka 3 sedam dana nakon izolacije, tačka 4 dve nedelje nakon izolacije; tačka 5 jedan mesec nakon izolacije i tačka 6 šest meseci nakon izolacije. U svakoj vremenskoj tački bile su ispitivanje dve temperature -20°C i -80°C .

3.8. Parcijalna validacija RTq-TRAP metode

Reproducibilnost metode je testirana u sveže pripremljenim uzorcima gde je analiza urađena 10 puta u jednoj seriji puštanja na sva tri nivoa aktivnosti telomeraze i analizirana u jednom danu. Ponovljivost metode je utvrđena iz prethodno opisanih vremenskih tačaka 0-6 (pogledati poglavlje 3.7.).

3.9. Parcijalna in-house validacija metoda za određivanje dužite telomera leukocita

Reproducibilnost metode za određivanje LTL utvrđena je u sveže izolovanim uzorcima genomske DNK. Analize u uzorcima sa niskom i normalnim vrednostima dužine telomera ponovljene su 10 puta u jednoj seriji određivanja. Da bi se utvrdila ponovljivost metode, tri uzorka

sa oba nivoa (vrednosti dužina telomera, odnosno normalni i niski) ponovljena su po 5 puta unutar svake serije puštanja tokom održivanja LTL u studiji.

3.10. Statistička analiza podataka

Za statističku obradu dobijenih podataka korišćen je IBM® SPSS® Statistics version 25 software (SPSS, New York, USA). Nakon prikupljanja eksperimentalnih podataka, njihova raspodela proverena je *Kolmogorov-Smirnov* testom. Podaci koji slede normalnu raspodelu predstavljeni su kao srednje vrednosti sa standardnom devijacijom, dok su podaci koji ne slede normalnu raspodelu predstavljeni kao medijane sa rasponom vrednosti odnosno 25. – 75. percentilna vrednost.

U zavisnosti od tipa raspodele podataka, odnosno da li slede normalnu raspodelu ili ne, korišćeni su parametarski i neparametarski testovi za poređenje dve i većeg broja populacija (*Mann Whitney* test i *Student's t* test za poređenje dve nezavisne populacije, *Fredman* test ili parametarski t-test parova za poređenje dve ili više zavisnih populacija, analiza varijanse sa *Tukey's post hoc* testom i *Kruskal-Wallis* test sa *Mann Whitney U* testom kao post hoc testom uz *Bonferroni* korekciju za poređenje tri i većeg broja nezavisnih populacija). Za ispitivanje homogenosti frekvenci korišćen je *Chi-kvadrat* test. Veze između varijabli utvrđivana je *Spearman* korelacionom analizom. Određivanje referentnog intervala novih parametara izvedeno je upotrebom neparametarske metode, odnosno određivanje 2,5. i 97,5 percentila kao donje odnosno gornje granice referentnih vrednosti.

Kako bi se redukovao broj ispitivanih varijabli na manji broj faktora, urađena je *Principal component* analiza (eng. *Principal component analysis*, PCA). Korišćena je *varimax-normalized* rotacija. Uključene su normalno distribuirane varijable i varijable koje nisu imale normalnu distribuciju, ali nakon logaritamske transformacije tako da prate normalnu distribuciju podataka. Za izdvojene faktore primenjena je *eigen* vrednost >1 , dok su varijable sa vrednostima faktora $>0,5$ korišćene samo u interpretaciji. Kao nezavisne varijable u daljoj analizi uzeti su samo skorovi računati za faktore sa *eigen* vrednosti >1 . Tokom PCA analize praćena je povezanost svih određivanih biohemijskih parametara sa SYNTAX skorom. SYNTAX skor je podeljen u tercile kako su sugerisali Head i saradnici (*Head et al, 2014*). Podelom na tercile u ovoj studiji, najniži tercil obuhvatio je vrednosti SYNTAX skora manje od 10, a najviši vrednosti više od 17.

Procene dijagnostičke tačnosti novoformiranih parametara, analizirana je logističkom regresionom analizom. *Receiver operation characteristic curve* (ROC) analizom je ispitana

dijagnostička tačnost parametara. Granične vrednosti računate su preko Youden indeksa, gde je najviša izračunata vrednost Youden indeksa bila upravo granična (*eng. cut-off*) vrednost.

Regresiona analiza je korišćena i za analizu podataka o optimizaciji TRAP metode, dok je statistička analiza varijanse (ANOVA) korišćena za analizu ispitivanja stabilnosti proteinskih telomeraznih ekstrakata. Razlike među grupama potvrđene su Post-Hoc Dunnet testom. Statistički značajne vrednosti podrazumevane su vrednosti sa $p < 0,05$.

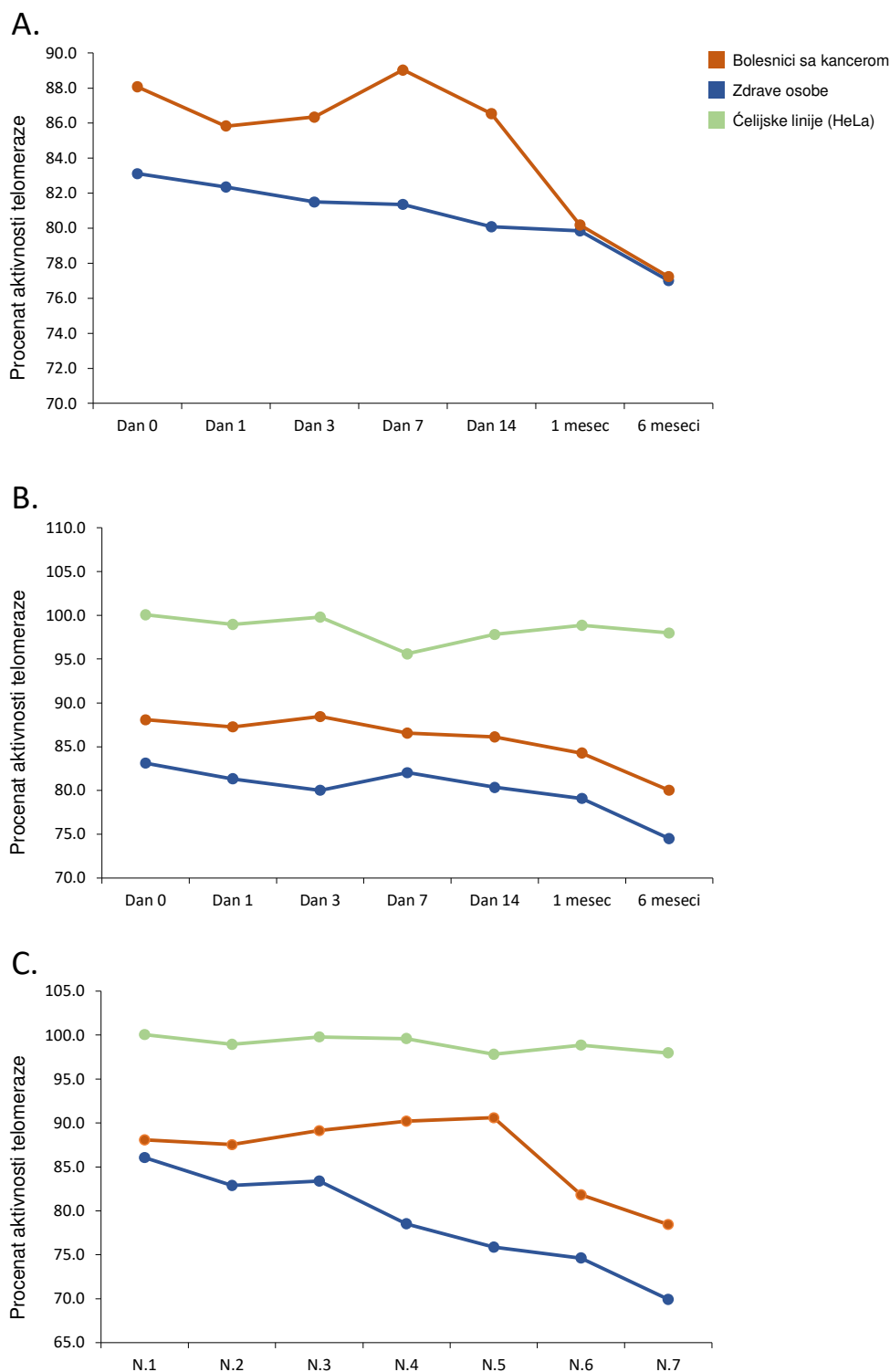
4. Rezultati

4.1. Stabilnost uzorka za određivanje aktivnosti telomeraze i parcijalna validacija TRAP metode

Rezultati aktivnosti telomeraze tokom optimizacije RTq-TRAP metode predstavljeni su kao procenat aktivnosti enzima telomeraze. Za 100% aktivnosti uzeta je aktivnost ćelijske linije (*Hela* ćelije, ATCC, Manassas, VA). Generalno, reakcija je bila proglašena pozitivnom ukoliko je njena Cq vrednost bila bar 5 ciklusa ispred Cq vrednosti negativne kontrole (negativna kontrola je bila reakciona smeša bez prisutnog uzorka ili standarda, pogledati Prilog 3). Reakcije sa Cq vrednostima kasnijim od 37 ciklusa, bile su smatrane negativnim. Pozitivne reakcije aktivnosti telomeraze bile su potvrđene internim standardom. Kao interni standard uzet je albumin (kao u reakciji za određivanje LTL).

Rezultati stabilnosti uzorka za određivanje aktivnosti enzima telomeraze, odnosno proteinskog telomeraznog ekstrakta, prikazani su kao procenat aktivnosti telomeraze u odnosu na ćelijsku liniju i sumirani su na Slici 13 (A i B). Skladištenje na -20°C je bilo prihvatljivije za uzorke sa visokom vrednosti telomeraze, uzorke poreklom od bolesnika sa kancerom, nego za uzorke poreklom od zdravih osoba, koji su imali početno nisku aktivnost enzima telomeraze. Aktivnost telomeraze kod uzoraka bolesnika sa kancerom, čuvanih na -20°C , je opadala vremenom, ali je statistički značajan pad aktivnosti bio primećen tek posle 14 dana skladištenja. U uzorcima zdravih osoba, statistički niža vrednost uočena je već posle 7 dana skladištenja na -20°C . Skladištenjem uzoraka na -80°C uzorci telomeraze poreklom od bolesnika obolelih od kancera ostali su statistički nepromenjeni i posle 6 meseci, dok je u uzorcima poreklom od zdravih osoba vremenom uočeno opadanje aktivnosti enzima telomeraze i to između prvog i šestog meseca skladištenja uzoraka.

Telomeraza izolovana iz ćelijskih linija (*Hela* (ATCC, Manassas, USA), Ramos blue (ATCC, Manassas, USA) i Humani osteosarkom (ATCC, Manassas, USA)) korišćena je kao standardni uzorak. Na Slici 13B prikazane su srednje vrednosti procenta aktivnosti enzima telomeraze izolovane iz ćelijskih linija (*Hela* (ATCC, Manassas, USA)). Skladištenje ovih uzoraka na -80°C se pokazalo adekvatnim načinom, s obzirom na to da nije uočeno opadanje aktivnosti ni nakon 6 meseci čuvanja uzoraka. Uzorci telomeraze izolovani iz ćelijskih linija čuvani su samo na -80°C , što se smatra „zlatnim standardom“ za čuvanje ovog tipa uzoraka.



Slika 13. Stabilnost preteinskog ekstrakta za određivanje aktivnosti enzima telomeraze u uzorcima zdravih osoba, bolesnika sa kancerom i HeLa ćeljijske linije: A) čuvanje uzoraka na -20°C , B) čuvanje uzoraka na -80°C , C) ciklusi odmrzavanja i zamrzavanja uzoraka na -80°C .

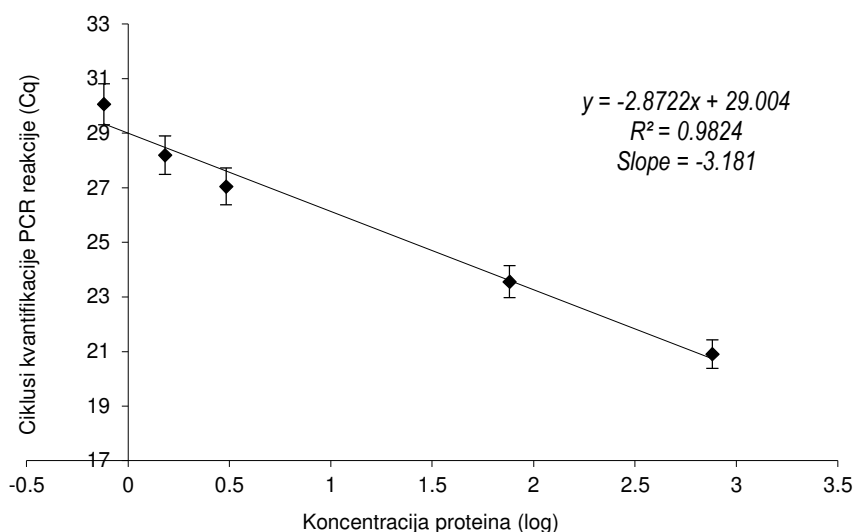
Ciklusi ponovnog zamrzavanja i odmrzavanja uticali su negativno u smislu inhibiranja telomerazne aktivnosti na svim ispitivanim nivoima (Slika 13C). Uzorci telomeraze sa niskom inicijalnom vrednosti mogli su biti odmrznuti najviše dva puta bez značajnog uticaja na aktivnost

enzima. Uzorci telomeraze poreklom od bolesnika obolelih od kancera sa inicijalno visokom vrednosti mogli su biti odmrznuti do 4 puta bez značajne promene u enzimskoj aktivnosti. U uzorcima ćelijskih linija, uočen je gubitak aktivnosti telomeraze usled ponovnog odmrzavanja i zamrzavanja uzoraka, a statistički značajan gubitak aktivnosti uočen je tek nakon jedanaestog ponovnog odmrzavanja uzorka.

Rezultati parcijalne *in-house* validacije TRAP metode pokazali su zadovoljavajuću reproducibilnost i ponovljivost metode. Reproducibilnost metode je 0,17%, a njena ponovljivost je iznosila 2,27% za uzorke sa inicijalno visokom vrednosti aktivnosti enzima telomeraze. Sa druge strane, za inicijalno niske vrednosti aktivnosti enzima telomeraze reproducibilnost metode je bila 1,67%, dok je ponovljivost metode iznosila 1,71%.

4.2. Standardna kriva i preračunavanje relativne aktivnosti enzima telomeraze pacijenata

Optimizovana RTq-TRAP metoda u našoj laboratoriji za određivanje aktivnosti enzima telomeraze rezultovala je zadovoljavajućom linearnošću. Standardna kriva ($y = -2,8722x + 29,004$; $R^2 = 0,9824$; $r = 0,9911$) pokriva visok raspon koncentracija proteinskih ekstrakata 0,76–700 $\mu\text{g/mL}$, sa visokom efikasnošću reakcije 106,24% (nagib = $-3,181$) i prikazana je na Slici 14.



Slika 14. Standardna kriva dobijena optimizovanom metodom za određivanje aktivnosti enzima telomeraze

Kvantifikacija uzoraka postignuta je u eksponentnoj fazi amplifikacije PCR reakcije, gde je aktivnost enzima obrnuto proporcionalna signalu poreklom od produkata u očitanoj Cq

intervalu. Kako bismo preveli Cq vrednosti u relativnu aktivnost enzima, korišćena je modifikovana formula (Elmore, 2002):

$$\text{Relativna aktivnost telomeraze} = \log(100 \times 2^{((Cq_{ST} - Cq_{unk}) - (Cq_{pac} - Cq_{unk}))})$$

U formuli, Cq_{ST} predstavlja Cq vrednost standardnog uzorka puštanog za svaki uzorak bolesnika, a Cq_{unk} vrednost unutrašnje kontrole puštane za svaku seriju uzoraka. Cq_{pac} predstavlja Cq vrednost uzorka bolesnika.

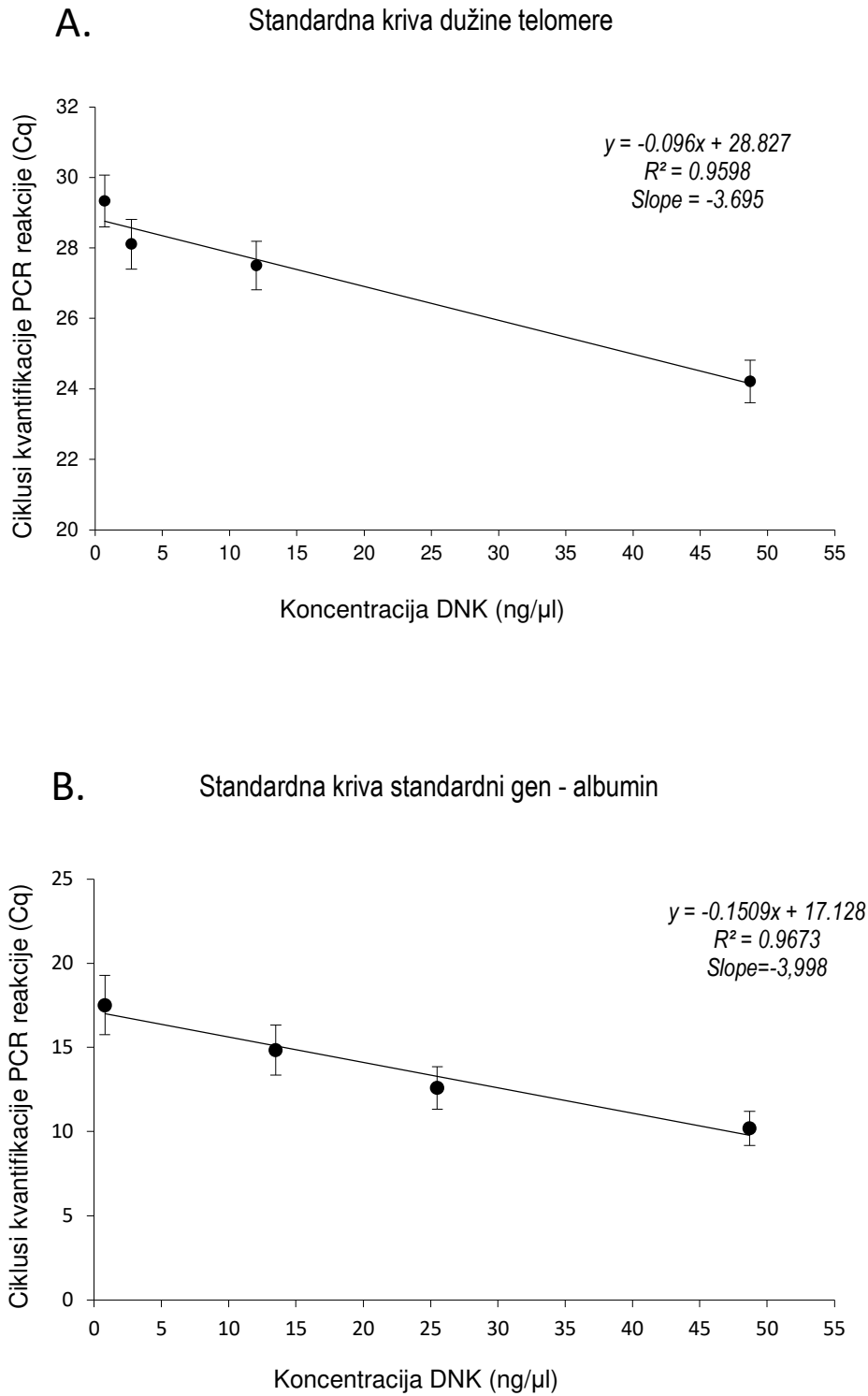
4.3. Parcijalna in-house validacija qRT-PCR metode za određivanje dužine telomera leukocita

Rezultati parcijalne *in-house* validacije qRT-PCR metode za određivanje dužine telomera leukocita pokazali su takođe zadovoljavajuću reproducibilnost i ponovljivost metode. reproducibilnost metode u uzorcima sa inicijalno niskim vrednostima LTL je 1,28%, dok je u uzorcima sa inicijalno normalnim vrednostima ponovljivost iznosila 2,07%. Ponovljivost metode u uzorcima sa inicijalno niskom vrednosti LTL je 0,49%, a u uzorcima sa inicijalno normalnim vrednostima 0,87%. Preporučene vrednosti FDA za kliničke parametre je manje od 15%.

4.3. Standardna kriva i preračunavanje T/S odnosa za relativnu dužinu telomera leukocita

Optimizovana RTq-PCR metoda za određivanje LTL u našoj laboratoriji rezultovala je zadovoljavajućom linearnošću. Standardna kriva telomera ($y = -0,096 + 28,827x$; $R^2 = 0,9598$; $R = 0,9796$) pokriva visok raspon koncentracija genomske DNK od 0,80 ng/μL do 48,7 ng/μL, sa visokom efikasnošću reakcije, oko 90% (nagib = -3,695) i prikazana je na Slici 15A. Istovremeno, određena je i standardna kriva standardnog gena – albumina ($y = -0,1509x + 17,128$; $R^2 = 0,9673$; $R = 0,9835$) pokriva visok raspon koncentracija genomske DNK od 0,80 ng/μL do 48,7 ng/μL, sa visokom efikasnošću reakcije, preko 90% (nagib = -3,996), prikazana je na Slici 15B.

Dužina telomera leukocita izračunava se kao T/S odnos po predlogu Cawthon-a u odnosu na albumin kao standardni gen (Cawton, 2002; Cawthon, 2009).



Slika 15. Standardne krive dobijene optimizovanom RTq-PCR metodom za dužinu telomera leukocita (A) i standardnog gena – albumina (B)

4.4. Relativna dužina telomera leukocita i aktivnost enzima telomeraze kardiovaskularnih bolesnika i zdravih osoba

Pregled demografskih podataka, osnovnih kliničkih podataka ispitanika kao i njihovi osnovni biohemijski i hematološki parametri sumirani su u Tabeli 5. Zdrave osobe (N=102), STE-AIM bolesnici (N=105) i bolesnici sa anginom pektoris i (N=22) uključeni su u ovu studiju.

Tabela 5. Demografski, klinički, biohemijski i hematološki podaci ispitanika uključenih u studiju

Parametar	Kontrolna grupa (N=102)	STE-AIM bolesnici (N=105)	Angina pektoris bolesnici (N=22)	p
Godine starosti	52,0 ± 9,18	60,9 ± 11,79	60,0 ± 10	0,059
Pol, muškarci/žene [§]	51/51 ^{ns}	81/24	16/6	<0,001,
Status pušenja, pušači/nepušači [§]	24/78	48/44 ^{ns}	16/6	<0,001
Krvni pritisak sistolni, mmHg [#]	127 ± 18	136 ± 24 ^a	131 ± 11 ^a	0,040
Krvni pritisak dijastolni, mmHg [#]	81 ± 10	85 ± 14	79 ± 7	0,093
BMI, kg/m ² #	25,7 ± 3,4	25,8 ± 4,5	28,4 ± 4,2	0,601
Glukoza [#] , mmol/L [#]	5,55 ± 0,71	7,8 ± 3,64 ^a	6,2 ± 1,84 ^a	<0,001
Trigliceridi, mmol/L	1,27 (0,91 – 1,71)	1,72 (1,20 – 2,44)	0,94 (0,74 - 1,70) ^b	<0,001
HDL holesterol, mmol/L [#]	1,50 ± 0,37	1,14 ± 0,395 ^a	1,30 ± 0,212	<0,001
LDL holesterol, mmol/L	3,27 (2,77 - 3,78)	3,33 (2,64 - 4,47)	3,17 (2,77 – 3,78)	0,767
Ukupan holesterol, mmol/L	5,98 (5,30 – 6,62)	5,58 (4,66 – 6,42)	4,39 (3,46 – 5,43) ^{a,b}	0,001
Ukupni proteini plazme, g/L	73,3 (69,7 – 77,0)	69,5 (65,0 – 75,0) ^a	68,5 (64,5 – 71,0) ^a	<0,001
Troponin I, mg/L	/	0,41 (0,07 – 2,93)	/	/
Kreatin kinaza aktivnost, IU/L	/	204 (100 – 487)	53 (47 - 150)	0,003
Hemoglobin, g/L [#]	143 ± 8,5	144 ± 16,2	137 ± 10,3 ^{a,b}	0,036
Ukupan broj eritrocita, 10 ¹² /L	/	4,8 ± 0,57	4,5 ± 0,61	0,333
Ukupan broj leukocita, 10 ⁹ /L	/	12,2 ± 4,29	9,3 ± 2,65	0,001
Ukupan broj trombocita, 10 ⁹ /L	/	246 (204 - 303)	213 (183 - 247)	0,023
Dislipidemija, %	/	49,3	9,1	/
Intolerancija na glukozu, %	28,2	38,1	27,3	/
Diabetes melitus, %	/	44,6	31,2	/
Statini, %	/	17,2	7,8	/
SYNTAX skor, arbitrarna jedinica	/	14 (8,0 - 20, 0)	27 (19,0 – 35,0)	<0,001
Koronarni krvni sudovi zahvaćeni klinički značajnom stenozom (>50%), broj	/	1 – 5	1 - 3	/
Ugrađeni stentovi, broj	/	1 – 5	0	/
Ejekciona frakcija leve komore, %	/	42,1	/	/

Poređenje frekvenci[§] - grupe su poređene jedna u odnosu na drugu u okviru istog kriterijuma ; ^au odnosu na zdrave ispitanike; ^bu odnosu na STE-AIM bolesnike;

Grupe su poređene Kruskal-Wallis testom sa Mann Whitney U testom kao post hoc testom,

[§] grupe su poređene Chi-kvadrat testom;

[#] Grupe su poređene ANOVA testom sa Tukey testom kao post hoc testom

Svi ispitanici u studiji su bili sličnih godina, i konstitucije, gledano kroz BMI, statistički značajno više vrednosti uočene su u sistolnom krvnom pritisku kod dve podgrupe kardiovaskularnih bolesnika (STE-AIM i angina pektoris) u odnosu na zdrave ispitanike, dok dijastolni krvni pritisak nije pokazao statistički značajnu razliku. Broj pušača u odnosu na nepušače statistički je viši u grupi bolesnika sa anginom pektoris. Vrednosti glukoze statistički su bile značajno više u grupi STE-AIM bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike i bolesnike sa anginom pektoris kao i vrednosti triglicerida. Vrednosti HDL holesterola najniže su bile u grupi STE-AIM bolesnika, dok se vrednosti LDL holesterola nisu značajno razlikovale. Vrednosti triglicerida bile su statistički značajno više kod STE-AIM bolesnika u odnosu na AP bolesnike, kod kojih su bile najniže. Statistički značajno niže vrednosti kreatin kinaze uočene su u grupi sa anginom pektoris u odnosu na STE-AIM bolesnike. Vrednosti troponina I određivane su samo u grupi STE-AIM bolesnika, pa nije bilo moguće izvršiti statističko poređenje. Vrednosti SYNTAX skora značajno su bile više u grupi bolesnika sa anginom pektoris u odnosu na STE-AIM bolesnike. Od hematoloških parametara značajno povišene vrednosti broja leukocita izmerene su u grupi STE-AIM bolesnika u odnosu na bolesnike sa anginom pektoris, kod kojih su vrednosti bile u okviru referentnih vrednosti.

Iz grupe STE-AIM bolesnika izdvojene su dve podgrupe: MINOCA i bolesnici kojima nije ugrađen stent (grupa *Bez stenta*). Pregled njihovih demografskih osobina, osnovni klinički podaci, biohemijski i hematološki parametri sumirani su u Tabeli 6.

Tabela 6. Demografski, klinički, biohemijski i hematološki podaci podgrupa STE-AIM bolesnika

Parametar	STE-AIM bolesnici (N=92)	MINOCA (N=7)	Bez stenta (N=6)	p
Godine starosti [#]	60,9 ± 11,79	59 ± 13	60 ± 10	0,923
Pol [§]	75/17**	4/3	2/4**	<0,001
Status pušenja, pušači/nepušači [§]	48/44	3/4	4/2*	<0,01
Krvni pritisak sistolni, mmHg [#]	136 ± 24	161 ± 30	127 ± 17 ^b	0,040
Krvni pritisak dijastolni, mmHg [#]	85 ± 14	96 ± 26	82 ± 11	0,093
BMI [#] , kg/m ²	25,8 ± 4,5	25,9 ± 2,9	26,6 ± 7,7	0,195
Glukoza [#] , mmol/L	7,8 ± 3,64	10,4 ± 2,43 ^a	5,9 ± 1,08 ^b	0,007
Trigliceridi, mmol/L	1,72 (1,20 – 2,44)	1,78 (0,64 - 2,11)	2,31 (1,72 - 4,74) ^{a,b}	<0,001
HDL, mmol/L	1,14 ± 0,395	1,65 ± 0,334 ^a	0,88 ± 0,198 ^{a,b}	<0,001
LDL, mmol/L	3,33 (2,64 - 4,47)	4,62 (3,71 - 5,08) ^a	2,95 (2,52 - 4,13) ^{a,b}	<0,001
Ukupan holesterol, mmol/L	5,58 (4,66 – 6,42)	5,29 (4,99 – 5,88)	6,82 (6,33 – 7,33) ^{a,b}	0,013
Ukupni proteini plazme, g/L	69,5 (65,0 – 75,0)	69,0 (59,00 – 75,00)	75,5 (66,8 – 78,3)	0,230
Troponin I, mg/L	0,41 (0,07 – 2,93)	0,002 (0,002 - 2,5)	0,002 (0,001 - 6,0)	0,732
Kreatin kinaza aktivnost, IU/L	204 (100 – 487)	178 (78 - 611)	206 (90 - 319)	0,367
Hemoglobin, g/L [#]	144 ± 16,2	149 ± 17,3	125 ± 18,4 ^{a,b}	<0,001
Ukupan broj eritrocita, 10 ¹² /L [#]	4,8 ± 0,57	5,0 ± 0,71	4,4 ± 0,53	0,085
Ukupan broj leukocita, 10 ⁹ /L [#]	12,2 ± 4,29	9,4 ± 2,30 ^a	15,6 ± 9,25	<0,001
Ukupan broj trombocita, 10 ⁹ /L	246 (204 - 303)	222 (135 - 278)	408 (349 – 494) ^{a,b}	<0,001
Syntax skor, arbitralna jedinica	14 (8,0 - 20, 0)	/	24,5 (16,5 - 36,5) ^a	<0,001
Koronarni krvni sudovi zahvaćeni klinički značajnom stenozom, broj	1 – 5	0	1 – 3	/
Ugrađeni stentovi, broj	1 – 5	0	0	/

Poređenje frekvenci - *<0,05; **<0,001; ^au odnosu na zdrave ispitanike; ^bu odnosu na STE-AIM bolesnike

Grupe su poredene Kruskal-Wallis testom sa Mann Whitney U testom kao post hoc testom;

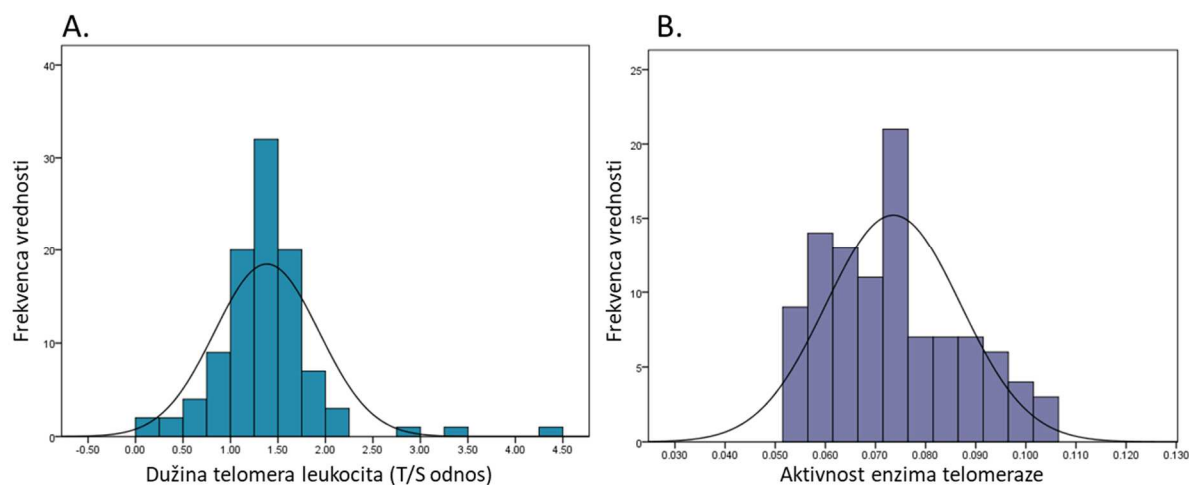
[§]Grupe su poredene Chi-kvadrat testom;

[#]Grupe au poredene ANOVA sa Tukey testom kao post hoc testom

Najviše vrednosti triglicerida, ukupnog holesterola, ukupnih proteina, broja leukocita i kreatin kinaze imala je grupa bolesnika bez stenta. Najviše vrednosti glukoze, HDL holesterola, LDL holesterola i sistolnog krvnog pritiska uočene su u grupi MINOCA bolesnika u odnosu na preostale dve grupe. Očekivano, vrednosti troponina I bile su najviše u grupi STE-AIM bolesnika (Tabela 6).

Dužina telomera leukocita i aktivnost enzima telomeraze određivane su po prvi put u populaciji u Srbiji. Prikupljeni rezultati analizirani su Kolmogorov-Smirnov testom i utvrđeno je da dužina telomera leukocita ($p < 0,001$) kao i aktivnost enzima telomeraze ($p = 0,001$) ne prate normalnu raspodelu kod kardiovaskularnih bolesnika, dok je u grupi zdravih osoba raspodela normalna (za LTL $p = 0,180$, za aktivnost enzima telomeraze $p = 0,136$). Radi daljeg poređenja prikupljenih podataka, u obe grupe ispitanika podatke smo prikazali kao medijane i raspon 25. –

75. percentil, s obzirom na to da takav prikaz neće uticati na podatke koji prate normalnu raspodelu.



Slika 16. Raspodela vrednosti dužine telomera leukocita (A) i aktivnosti enzima telomeraze (B) kod zdravih ispitanika u studiji

Na Slici 16A prikazan je grafik raspodele vrednosti LTL kod zdravih ispitanika. Vrednosti LTL kretale su se od 0,13 do 4,46, što odgovara najnižoj i najvišoj vrednosti. Srednja vrednost LTL iznosila je 1,38, a medijana 1,39. Upotrebom neparametarske analize određene su referentne vrednosti LTL. Naime iz skupa određenih vrednosti odbačene su ekstremne vrednosti, a potom i 2,5% najnižih i 2,5% najviših vrednosti. Granične vrednosti preostalih 95% vrednosti LTL uzete su kao referentne vrednosti, i iznose 0,70 – 3,05 (Tabela 7).

Tabela 7: Referentne vrednosti i pregled srednjih vrednosti i medijana za dužinu telomera leukocita i aktivnosti enzima telomeraze kod zdravih ispitanika i KVB bolesnika u studiji

Parametar	Grupa ispitanika	Najniža vrednost	Najviša vrednost	Medijana (25. – 75. percentilna vrednost)	Referentne vrednosti
Dužina telomera leukocita	Zdravi ispitanici	0,13	4,46	1,39 (1,12 – 1,60)	0,70 – 3,05
	KVB bolesnici	0,48	2,93	1,12 (0,92 – 1,34)	/
Aktivnost enzima telomeraze	Zdravi ispitanici	0,054	0,104	0,074 (0,063 – 0,083)	0,055 – 0,102
	KVB bolesnici	0,317	0,470	0,374 (0,350 – 0,396)	/

Na isti način je analizirana i aktivnost enzima telomeraze (Slika 16B). Vrednosti aktivnosti telomeraze prikazane su kumulativno za oba pola, i kretale su se od 0,054 do 0,104, što odgovara najnižoj i najvišoj vrednosti. Srednja vrednost aktivnosti telomeraze iznosila je 0,074, kao i medijana (medijana=0,074). Upotrebom neparametarske analize određene su takođe referentne

vrednosti aktivnosti telomeraze, i taj opseg iznosi 0,055 – 0,102 (Tabela 7). Vrednosti LTL KV bolesnika bila je ispod referentnog opsega, dok su vrednosti enzima telomeraze bile skoro i tri puta više od gornje granice referentnog opsega.

U daljoj obradi sakupljenih podataka, grupe su analizirane po starosnoj dobi, indeksu telesne mase, statusu pušenja, nivou arterijskog krvnog pritiska i krvnoj grupi kod zdravih osoba i dodatno po vrednostima troponina I, broju krvnih sudova sa klinički značajnom stenozom i SYNTAX skoru kod kardiovaskularnih bolesnika uključenih u studiju. U podgrupama podaci više ne slede normalnu raspodelu, stoga su prikazani kao medijane i obrađivani su neparametarskim testovima. Rezultati su prikazani u Tabeli 8.

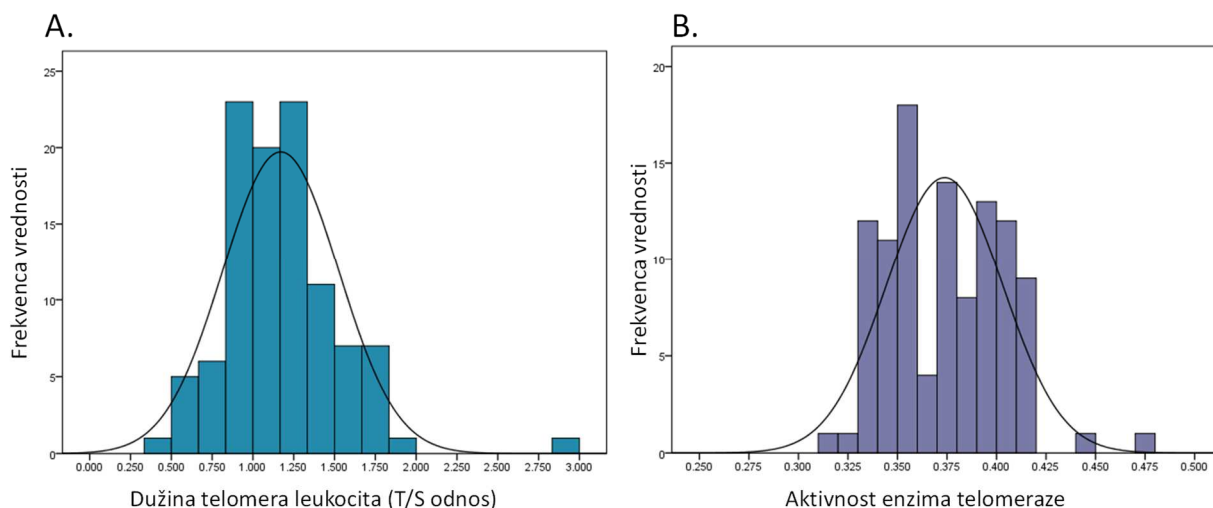
Tabela 8. Analiza telomera-telomeraza sistema u grupi zdravih ispitanika uključenih u studiju

Parametar	Duzina telomera	p	Aktivnost telomeraze	p
Pol				
<i>Muški (N=51)</i>	1,32 (1,04-1,49)	0,480*	0,063 (0,058-0,070)	<0,001*
<i>Ženski (N=51)</i>	1,48 (1,18-1,69)		0,79 (0,074-0,088)	
Godine starosti				
<i>Do 45 (N=27)</i>	1,46 (1,18-1,69)	/	0,074 (0,067-0,088)	/
<i>45 – 60 (N=59)</i>	1,34 (1,06-1,62)	0,250*	0,073 (0,059-0,083)	0,138*
<i>Preko 60 (N=16)</i>	1,43 (1,28-1,64)	0,811*; 0,441#	0,074 (0,064-0,081)	0,393*; 0,395#
Status pušenja				
<i>Nepušači (N=78)</i>	1,38 (1,09-1,62)	0,785*	0,072 (0,061-0,082)	0,120*
<i>Pušači (N=24)</i>	1,45 (1,20-1,62)		0,074 (0,068-0,088)	
BMI (kg/m²)				
<i>18 – 25 (N=45)</i>	1,46 (1,14-1,63)	/	0,074 (0,071-0,090)	/
<i>25 – 30 (N=47)</i>	1,39 (1,13-1,64)	0,574*	0,066 (0,058-0,081)	0,003*
<i>preko 30 (N=10)</i>	1,04 (0,89-1,57)	0,047*; 0,034#	0,064 (0,060-0,070)	0,001*; 0,515#
Krvni pritisak				
<i>Normalan krvni pritisak (N=78)</i>	1,42 (1,12-1,63)	0,307*	0,074 (0,063-0,085)	0,200*
<i>Povišen krvni pritisak (N=24)</i>	1,29 (0,97-1,57)		0,066 (0,062-0,075)	
Krvna grupa				
<i>O (N=42)</i>	1,46 (1,07-1,67)	/	0,074 (0,064-0,078)	/
<i>A (N=40)</i>	1,41 (1,12-1,67)	0,996*;	0,074 (0,069-0,085)	0,165*;
<i>B (N=11)</i>	1,27 (1,16-1,59)	0,543*; 0,420#	0,063 (0,057-0,076)	0,012*; 0,013#
<i>AB (N=9)</i>	1,13 (1,03-1,43)	0,156*; 0,119#; 0,370\$	0,058 (0,055-0,076)	0,025*; 0,015#; 0,331\$

*u odnosu na prvu grupu; #u odnosu na drugu grupu po redu; \$u odnosu na treću grupu po redu; grupe su poredene Kruskal-Wallis testom sa Mann Whitney U testom kao post hoc testom za poređenje dve nezavisne grupe podataka

Dužina telomera leukocita pokazuje statistički značajno niže vrednosti u grupi prekomerno gojaznih osoba (BMI preko 30) u odnosu na umereno gojazne osobe i na normalno uhranjene osobe. Starosna dob, vrednosti krvnog pritiska status pušenja cigareta nisu značajno uticali na vrednosti LTL. Dužina telomera leukocita kod krvnih grupa snižavala se po redosledu O>A>B>AB ali ova razlika nije bila satistički značajna.

Analizirajući aktivnost enzima telomeraze, uočena je statistički značajno viša aktivnost telomeraze kod žena u odnosu na muškarce. Statistički značajno niže vrednosti enzima telomeraze imale su umereno gojazne osobe, kao i kod prekomerno gojaznih osoba (BMI preko 30) u odnosu na normalno uhranjene osobe. Slično kao kod LTL, aktivnosti enzima telomeraze opada po redosledu O=A>B>AB u odnosu na krvnu grupu ispitanika. Naime, osobe sa krvnom grupom O i A imale su značajno više aktivnosti enzima telomeraze u odnosu na osobe sa krvnom grupom B i AB.



Slika 17. Raspodela vrednosti dužine telomera leukocita (A) i aktivnosti enzima telomeraze (B) kod zdravih ispitanika u studiji

Na Slici 17 prikazani su grafici raspodela vrednosti LTL (Slika 17A) i aktivnosti enzima telomeraze (Slika 17B) kod KVB bolesnika u ovoj studiji. Vrednosti LTL kod KVB bolesnika kretale su se od 0,475 do 2,93, što odgovara najnižoj i najvišoj vrednosti. Srednja vrednost LTL iznosila je 1,17, a medijana 1,12. Sa druge strane, vrednosti enzima telomeraze kod KVB bolesnika bile su u rasponu vrednosti od 0,317 do 0,470. Srednja vrednost telomeraze iznosila je 0,374, a medijana 0,375 (Tabela 5).

Uzimajući u obzir uticaje analiziranih činilaca, analizirana je dužina telomera i aktivnost enzima telomeraze u grupi STE-AIM bolesnika, a rezultati su sumirani u Tabeli 9. U grupi kardiovaskularnih bolesnika ni jedan od faktora analiziranih u zdravoj populaciji ne pokazuje

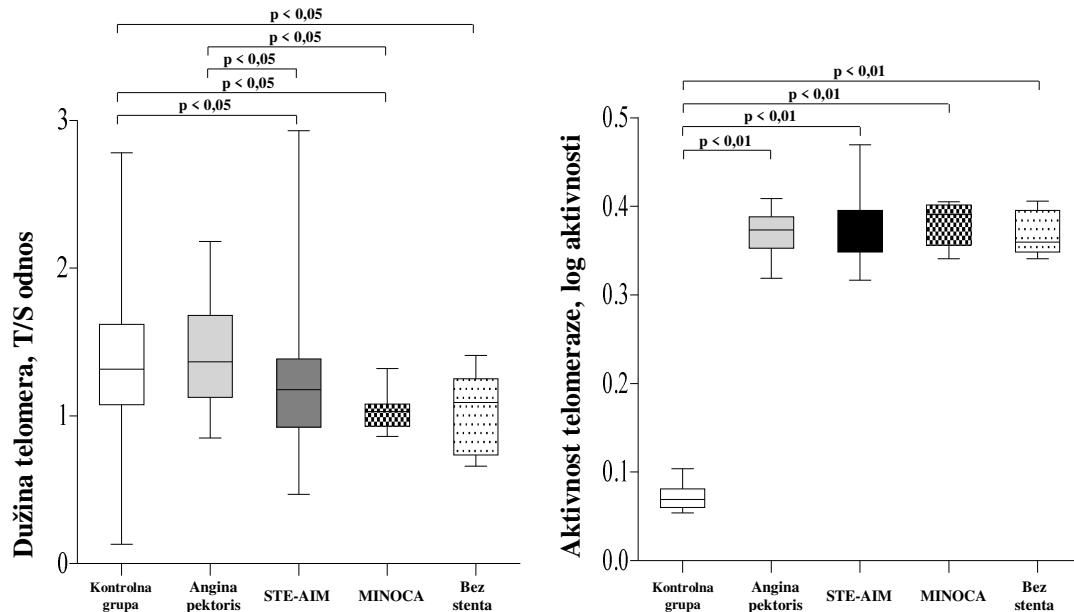
statistički značajan uticaj na dužinu telomera leukocita i aktivnost enzima telomeraze, i pored variranja u vrednostima.

Tabela 9. Analiza telomera-telomeraza sistema u grupi kardiovaskularnih bolesnika uključenih u studiju

Parametar	Dužina telomera	p	Aktivnost telomeraze	p
Pol				
Muški (N=97)	1,19 (0,92-1,37)	0,748*	0,375 (0,350-0,379)	0,475*
Ženski (N=30)	1,10 (0,99-1,38)		0,374 (0,347-0,387)	
Godine starosti				
Do 45 (N=17)	1,10 (0,91-1,60)	/	0,373 (0,347-0,405)	/
45 – 60 (N=39)	1,07 (0,86-1,28)	0,492*	0,375 (0,349-0,405)	0,062*
Preko 60 (N=71)	1,21 (0,98-1,45)	0,729*; 0,096 [#]	0,374 (0,347-0,391)	0,795*; 0,460 [#]
Status pušenja				
Nepušači (N=70)	1,14 (0,89-1,37)	0,825*	0,377 (0,346-0,395)	0,904*
Pušači (N=57)	1,20 (0,94-1,40)		0,373 (0,350-0,394)	
BMI				
18 – 25 (N=56)	1,15 (0,98-1,39)	/	0,375 (0,348-0,396)	/
25 – 30 (N=56)	1,13 (0,84-1,33)	0,185*	0,375 (0,353-0,395)	0,787*
Preko 30 (N=15)	1,30 (1,10-1,62)	0,264*; 0,103 [#]	0,352 (0,331-0,388)	0,255*; 0,161 [#]
Krvni pritisak				
Normalan krvni pritisak (N=86)	1,19 (0,94-1,34)	0,873*	0,375 (0,351-0,399)	0,438*
Povišen krvni pritisak (N=41)	1,12 (0,90-1,48)		0,371 (0,344-0,393)	
Broj krvnih sudova zahvaćenih stenozom				
Manje od 3 (N=98)	1,19 (0,93-1,37)	0,569*	0,374 (0,350-0,396)	0,121*
Više od 3 (N=29)	1,08 (0,88-1,50)		0,376 (0,346-0,394)	
SYNTAX skor				
Manje od 17 (N=93)	1,19 (0,93-1,46)	/	0,370 (0,351-0,395)	/
17 – 23 (N=19)	1,20 (1,06-1,42)	0,638*	0,374 (0,341-0,384)	0,209*
Više od (N=15)	1,01 (0,87-1,19)	0,051*; 0,041 [#]	0,391 (0,364-0,402)	0,059*; 0,013 [#]
Troponin I				
Manje od 0,04ng/ml (N=37)	1,12 (0,91-1,34)	0,341*	0,361 (0,346-0,393)	0,116*
Više od 0,04ng/ml (N=90)	1,19 (0,99-1,46)		0,381 (0,351-0,404)	
Broj leukocita				
Manje od $11 \times 10^9/L$ (N=60)	1,17 (0,91-1,43)	0,820*	0,376 (0,350-0,402)	0,433*
Više od $11 \times 10^9/L$ (N=72)	1,18 (0,93-1,37)		0,372 (0,347-0,393)	

*u odnosu na prvu grupu; # u odnosu na drugu grupu po redu; grupe su poređene Kruskal-Wallis testom sa Mann Whitney U testom kao post hoc testom za poređenje dve nezavisne grupe podataka

Dalje su u svim ispitivanim grupama analizirane LTL i aktivnost enzima (slika 18). Značajno kraće telomere uočene su u grupama STE-AIM i MINOCA bolesnika u poređenju sa zdravim osobama kao i sa AP bolesnicima. Između podgrupa KVB bolesnika (STE-AIM, MINOCA i bez stenta) nije bilo značajne razlike u LTL. Sa druge strane, značajno više vrednosti enzima telomeraze bile su uočene u svim grupama bolesnika u poređenju sa vrednostima zdravih osoba, dok među grupama bolesnika aktivnost enzima telomeraze nije pokazivala statistički značajnu razliku.



Slika 18. Dužina telomera leukocita i aktivnost enzima telomeraze ispitanika uključenih u studiju

Rezultati LTL i aktivnosti enzima telomeraze analizirani su i u uzorcima STE-AIM bolesnika uzorkovani u različitim vremenskim tačkama. Rezultati su sumirani u Tabeli 10. LTL su bile značajno kraće kod STE-AIM bolesnika pre pPCI intervencije u poređenju sa zdravim ispitanicima, ali i istim bolesnicima posle pPCI. Dužina telomera značajno se povećava u odnosu na kontrolnu grupu u trenutku posle pPCI. Šest meseci od akutnog događaja, tačnije od pPCI intervencije, LTL je ostala značajno niža u poređenju sa kontrolnom grupom, odnosno ostaje sličnih vrednosti kao što je bila u trenutku akutnog događaja, odnosno pre pPCI. Aktivnost enzima telomeraze pokazala je statistički nižu aktivnost u kontrolnoj grupi u poređenju sa različitim vremenskim tačkama STE-AIM bolesnika, i ostaje povišena, i šest meseci nakon pPCI u poređenju sa istim bolesnicima u akutnom stanju, odnosno neposredno pre same pPCI.

Tabela 10. Dužina telomera leukocita i aktivnost telomeraze kod STE-AIM bolesnika u različitim vremenskim intervalima nakon AIM

Parametri	Kontrolna grupa (N=102)	STE-AIM bolesnici			P
		Pre pPCI intervencije (N=92)	Posle pPCI intervencije (N=92)	6 meseci nakon AIM (N=25)	
Dužina telomera leukocita - LTL (T/S odnos)	1,39 (1,110 - 1,628)	1,18 (0,909 - 1,516) ^a	1,62 (1,18 - 2,05) ^{a, b}	1,15 (0,93 - 1,33) ^a	0,036
Aktivnost telomeraze (log aktivnosti)	0,069 (0,061 - 0,081)	0,359 (0,345 - 0,394) ^{aa}	0,363 (0,354 - 0,395) ^{aa}	0,395 (0,367 - 0,421) ^{aa, bb}	<0,001

^{a, b} vs zdrave osobe (a), pre pPCI (b), posle pPCI; ^{a, b} - p<0,05; ^{aa, bb} - p<0,001; Grupe STE-AIM bolesnika su poređene Friedmanovim testom, grupe STE-AIM bolesnika sa kontrolnom grupom su poređene Mann Whitney U testom.

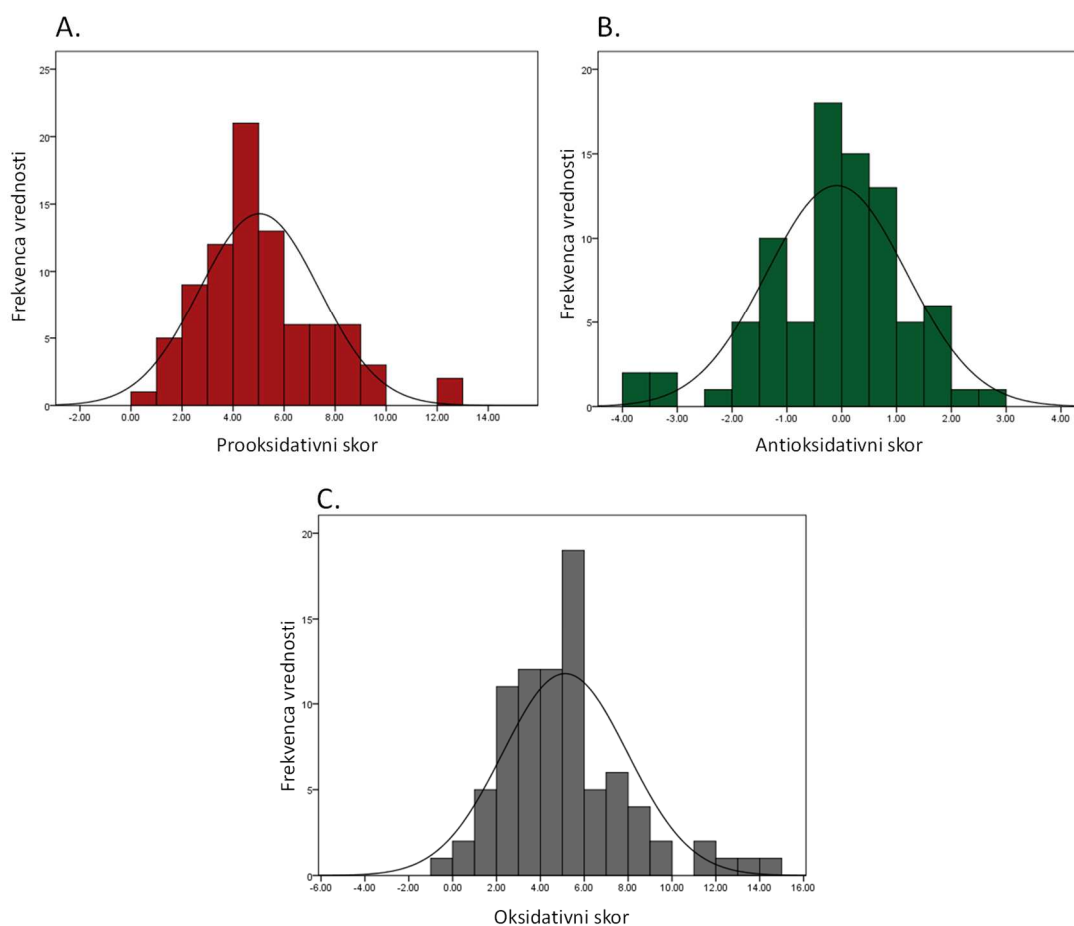
Aktivnost enzima telomeraze i LTL analizirane su takođe i u različitim tipovima uzoraka, kao što su periferna venska krv, arterijska krv i tromboaspirat. Rezultati su prikazani u Tabeli 11. LTL u perifernoj krvi pre kontrolne grupe je statistički značajno duža u odnosu na različite tipove uzoraka STE-AIM bolesnika. Među različitim uzorcima STE-AIM bolesnika, izdvojio se tromboaspirat kao uzorak sa statistički najdužim LTL u odnosu na perifernu krv pre pPCI i arterijsku krv. Sa druge strane, vrednosti enzima telomeraze statistički su značajno niže u kontrolnoj grupi u odnosu na različite tipove uzoraka STE-AIM bolesnika, dok među uzorcima STE-AIM bolesnika nije primećena statistički značajna razlika u odnosu na tip uzorka.

Tabela 11. Dužina telomera leukocita i aktivnost telomeraze kod STE-AIM bolesnika u različitim različitim vrstama uzoraka

Parametri	Kontrolna grupa (N=102)	Pre pPCI intervencije (periferna venska krv) (N=92)	Arterijska krv (N=37)	Tromboaspirat (N=17)	P
Dužina telomera leukocita - LTL (T/S odnos)	1,39 (1,110 - 1,628)	1,18 (0,909 - 1,516) ^a	1,14 (0,868 - 1,589) ^a	1,25 (1,01 - 1,84) ^{a, c}	0,036
Aktivnost telomeraze (log aktivnosti)	0,069 (0,061 - 0,081)	0,359 (0,345 - 0,394) ^{aa}	0,359 (0,345 - 0,387) ^{aa}	0,366 (0,367 - 0,379) ^{aa}	<0,001

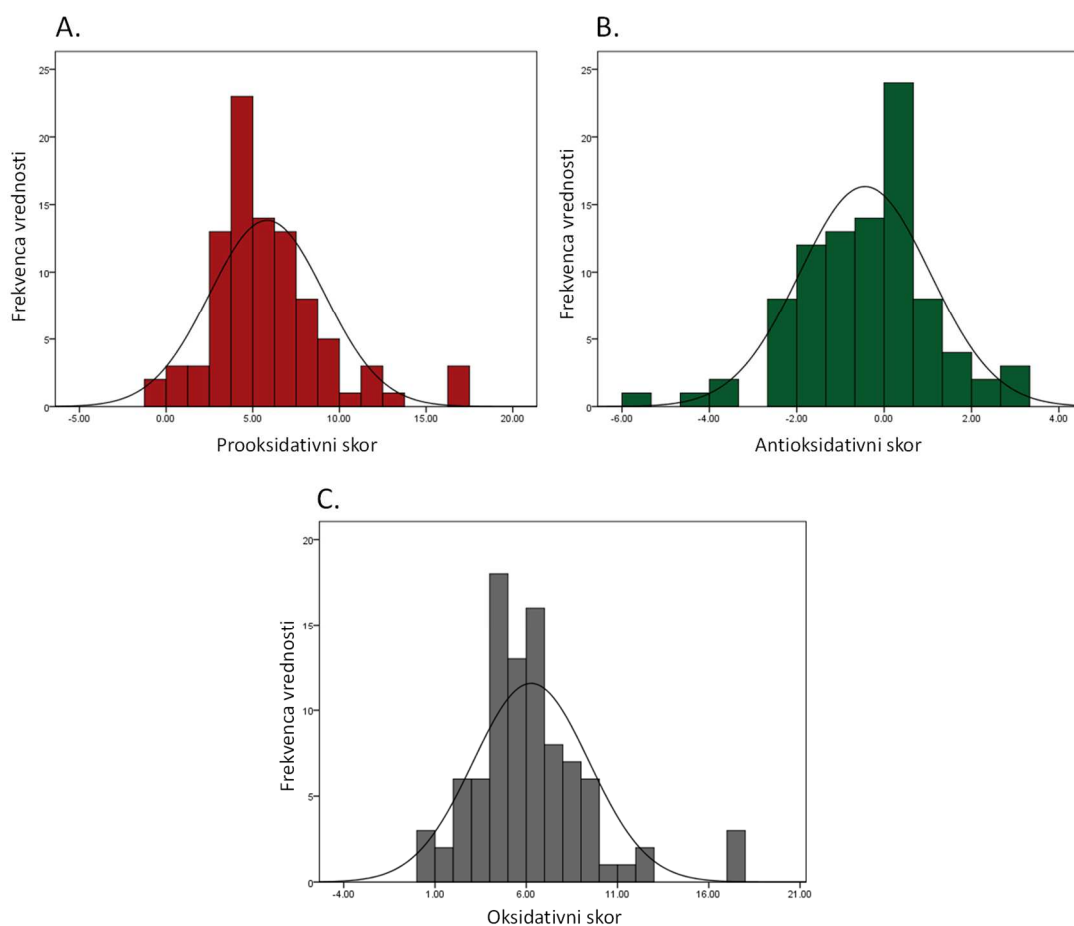
^{a, c} vs zdrave osobe (a), arterijska krv (c) ^{a, c} - p<0,05; ^{aa, cc} - p<0,001; Grupe su poređene Kruskal-Wallis testom sa Mann Whitney U testom kao post hoc testom

Uporedo sa novim parametrima telomera-telomeraza sistema, u svim ispitivanim grupama određivan je redoks status kroz sveobuhvatne skorove, i to prooksidativni, antioksidativni i oksidativni skor. Prooksidativni, antioksidativni i oksidativni skor određivani su, takođe, prvi put u populaciji Srbije. Prikupljeni rezultati analizirani su Kolmogorov-Smirnov testom u cilju provere normalnosti raspodele, i utvrđeno je da u kontrolnoj grupi ispitanika prooksidativni skor (p=0,006), antioksidativni skor (p=0,019), kao i oksidativni skor (p<0,001) ne prate normalnu raspodelu (Slika 19).



Slika 19. Raspodela vrednosti prooksidativnog skora (A), antioksidativnog skora (B) i oksidativnog skora (C) kod zdravih ispitanika u studiji

U grupi kardiovaskularnih bolesnika podaci su normalno distribuirani za antioksidativni skor ($p=0,200$), dok vrednosti prooksidativnog ($p=0,019$) i oksidativnog skora ($p=0,006$) ne prate normalnu raspodelu (Slika 20). Radi daljeg poređenja prikupljenih podataka, u obe grupe ispitanika podaci su prikazani kao medijane i raspon 25. – 75. percentil.



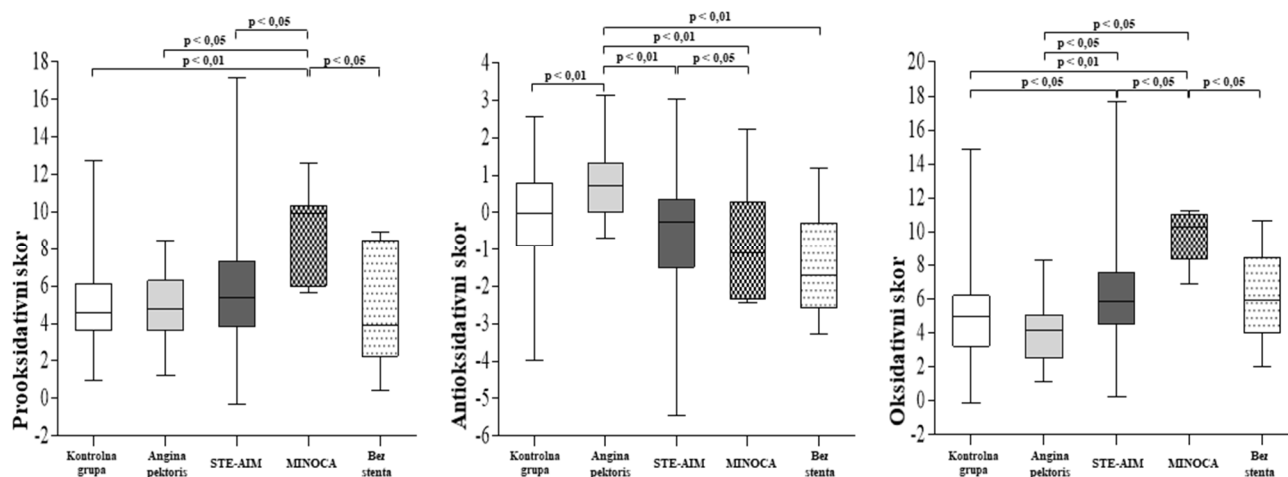
Slika 20. Raspodela vrednosti prooksidativnog skora (A), antioksidativnog skora (B) i oksidativnog skora (C) kod kardiovaskularnih bolesnika u studiji

U Tabeli 12 sumirani su osnovni podaci o novim parametrima redoks statusa. Vrednosti prooksidativnog skora kretale su se od 0,95 do 12,72, što odgovara najnižoj i najvišoj vrednosti u zdravoj populaciji. Srednja vrednost prooksidativnog skora iznosila je 5,03, a medijana 4,60. Antioksidativni skor imao je opseg vrednosti od -3,99 do 2,55 kod zdravih osoba, a njegova srednja vrednost iznosi -0,092, dok je medijana -0,031. Na isti način analiziran je oksidativni skor i vrednosti pokazuju raspon vrednosti od -0,140 do 14,86. Srednja vrednost oksidativnog skora iznosila je 5,13, a njegova medijana 4,94. Upotrebom neparametarske analize određene su referentne vrednosti i za parametre redoks statusa i njihov pregled dat je u Tabeli 12. Na isti način analizirane su i vrednosti bolesnika i njihov pregled prikazan je u Tabeli 12. Vrednosti prooksidativnog skora u grupi KV bolesnika, bile su blago povišene u odnosu na referentni interval, dok su vrednosti antioksidativnog skopa bile blago ispod donje granice referentnog opsega. Vrednosti oksidativnog skora bile su znatno povišene kod KV bolesnika u odnosu na gornju granicu referentnog intervala.

Tabela 12. Pregled vrednosti parametara redoks statusa kod zdravih osoba i kardiovaskularnih bolesnika

Grupe	Parametri	Najniža vrednost	Najviša vrednost	Medijana (25. – 75. percentilna vrednost)	Referentne vrednosti
Zdrave osobe	Prooksidativni skor	0,950	12,72	4,60 (3,64 – 6,14)	4,52 – 5,54
	Antioksidativni skor	-3,99	2,55	-0,031 (-0,906 – 0,784)	-0,369 – 0,185
	Oksidativni skor	-0,140	14,86	4,94 (3,21 – 6,19)	4,51 – 5,75
KVB	Prooksidativni skor	-0,291	17,20	5,35 (3,82 – 7,36)	/
	Antioksidativni skor	-5,47	3,03	-0,292 (-1,526 – 0,360)	/
	Oksidativni skor	0,222	17,68	5,87 (4,52 – 7,55)	/

Na Slici 21 prikazane su vrednosti parametara redoks statusa kod podgrupa KVB bolesnika i zdravih osoba. MINOCA bolesnici imali su statistički najviše vrednosti prooksidativnog skora u poređenju sa svim ostalim grupama bolesnika i zdravim osobama. Antioksidativni skor je bio statistički najviši u grupi AP bolesnika u odnosu na ostale podrupe bolesnika, dok su vrednosti oksidativnog skora bile statistički najviše u grupi MINOCA bolesnika.



Slika 21. Vrednosti redoks status skorova kod ispitanika uključenih u studiju

U Tabeli 13 sumirani su rezultati redoks status skorova dobijenih u uzorcima STE-AIM bolesnika u različitim vremenskim intervalima. Prooksidativni skor je statistički značajno viši kod STE-AIM bolesnika pre pPCI intervencije u odnosu na posle pPCI intervencije i 6 meseci nakon AIM. Antioksidativni skor je bio statistički niži nakon pPCI intervencije u poređenju sa pre pPCI intervencije. Sveobuhvatni oksidativni skor kod STE-AIM je pokazao statistički značajno niže vrednosti u momentu nakon pPCI intervencije u odnosu na uzorak pre pPCI, dok se njegove

vrednosti 6 meseci nakon akutnog događaja statistički značajno povećavaju u poređenju na pre pPCI i posle pPCI intervencije.

Tabela 13. Vrednosti redoks status skorova kod STE-AIM bolesnika u različitim vremenskim intervalima nakon AIM

Parametri	Kontrolna grupa (N=102)	STE-AIM bolesnici			
		Pre pPCI intervencije (N=92)	Posle pPCI intervencije (N=92)	6 meseci nakon AIM (N=25)	p
Prooksidativni skor	4,62 (3,62 - 5,49)	5,71 (4,09 - 7,87) ^a	4,47 (3,70 - 6,15) ^b	4,14 (3,08 - 5,38) ^{bb}	<0,001
Antioksidativni skor	0,357 (-0,205 - 0,885)	0,363 (0,071 - 1,189)	-0,313 (-0,67 - 0,64) ^{aa,bb}	-1,94 (-0,59 - -3,61) ^{a*, bb}	<0,001
Oksiativni skor	4,79 (3,21 - 5,84)	4,99 (4,05 - 6,73)	4,69 (3,51 - 6,13) ^b	5,86 (1,98 - 4,52) ^{a, b, c}	<0,001

^{a, b, c} vs zdrave osobe (a), pre pPCI (b), posle pPCI (c); ^{a, b, c} - p<0,05; ^{aa, bb, cc} - p<0,001; Grupe STE-AIM bolesnika su poredene Friedmanovim testom, grupe STE-AIM bolesnika sa kontrolnu grupom su poredene Mann Whitney U testom.

Analiza različitih vrsta uzoraka kod STE-AIM bolesnika prikazana je u Tabeli 14. Analiza arterijske krvi pokazala je statistički značajno više vrednosti prooksidativnog i oksidativnog skora u odnosu na perifernu vensku krv, ali i uzorak tromboaspirata. Sa druge strane, vrednosti antioksidativnog skora su bile značajno niže u poređenju isto sa perifernom venskom krvi i tromboaspiratom.

Tabela 14. Vrednosti redoks status skorova kod STE-AIM bolesnika u različitim vrstama uzoraka

Parametri	Kontrolna grupa (N=102)	Pre pPCI intervencije (periferna venska krv) (N=92)	Arterijska krv (N=37)	Tromboaspirat (N=17)	p
Prooksidativni skor	4,62 (3,62 - 5,49)	5,71 (4,09 - 7,87) ^a	8,39 (6,31 - 11,37) ^{aa, bb, cc}	4,81 (2,33 - 19,93) ^{bb, cc}	<0,001
Antioksidativni skor	0,357 (-0,205 - 0,885)	0,363 (0,071 - 1,189)	-0,861 (-1,34 - 0,19) ^{aa,bb,cc}	12,23 (0,376 - 28,33) ^{aa, bb,cc}	<0,001
Oksiativni skor	4,79 (3,21 - 5,84)	4,99 (4,05 - 6,73)	9,02 (6,88 - 11,62) ^{aa, bb}	-3,04 (-0,39 - 12,43) ^{aa, bb, cc}	<0,001

^{a, b, c} vs zdrave osobe (a), pre pPCI (b), arterijska krv (c) ^{a, b, c} - p<0,05; ^{aa, bb, cc} - p<0,001; Grupe su poredene Kruskal-Wallis testom sa Mann Whitney U testom kao post hoc testom

Analizom tromboaspirata uočeno je da je prooksidativni skor u tromboaspiratu imao statistički značajno niže vrednosti od arterijske krvi, dok su vrednosti antioksidativnog skora pokazale statistički značajno više vrednosti u uzorcima tromboaspirata u odnosu na uzorke periferne venske krvi i arterijske krvi. Nasuprot tome, vrednosti oksidativnog skora za uzorke tromboaspirata pokazale su najniže vrednosti u odnosu na sve vrste uzoraka (Tabela 14).

Povezanost novih biomarkera i osnovnih biohemijskih i hematoloških parametara ispitana je u grupi zdravih osoba i u podgrupama kardiovaskularnih bolesnika, korelacionom analizom. Rezultati zdravih osoba su prikazani u Tabeli 15 i Tabeli 16.

Tabela 15. Korelaciona analiza osnovnih biohemijskih i hematoloških parametara sa parametrima redoks statusa i telomera-telomeraza sistema u grupi zdravih osoba[#]

Parametri	Dužina telomere leukocita	Aktivnost telomeraze	Proooksidativni skor	Antioksidativni skor	Oksidativni skor
Dužina telomere leukocita	1	0,179	0,039	0	-0,026
	/	0,116	0,734	0,999	0,819
Aktivnost telomeraze	0,179	1	-0,293**	-0,051	-0,241*
	0,116	/	0,007	0,644	0,027
Glukoza	-0,036	-0,042	-0,021	-0,189	0,027
	0,755	0,705	0,851	0,086	0,808
Ukupni protein plazme	0,179	0,401**	-0,042	-0,008	-0,052
	0,117	<0,001	0,706	0,943	0,64
Trigliceridi	-0,082	-0,08	0,224*	-0,111	0,271*
	0,476	0,471	0,040	0,315	0,013
Ukupan holesterol	0,021	0,175	0,002	-0,05	0,003
	0,858	0,112	0,987	0,653	0,978
HDL-holesterol	0,277*	0,047	-0,059	0,163	-0,173
	0,014	0,669	0,593	0,138	0,116
LDL-holesterol	-0,065	-0,09	0,198	-0,05	0,159
	0,572	0,413	0,071	0,651	0,148
AST	-0,053	-0,359**	0,181	-0,114	0,21
	0,642	0,001	0,1	0,301	0,055
ALT	-0,101	-0,337**	0,231*	-0,054	0,211
	0,38	0,002	0,034	0,624	0,054
LDH	-0,078	-0,511**	0,239*	-0,116	0,304**
	0,526	<0,001	0,042	0,33	0,009
Proooksidativni skor	0,039	-0,293**	1	-0,033	0,857**
	0,734	0,007	/	0,767	<0,001
Antioksidativni skor	0	-0,051	-0,033	1	-0,482**
	0,999	0,644	0,767	/	<0,001
Oksidativni skor	-0,026	-0,241*	0,857**	-0,482**	1
	0,819	0,027	<0,001	<0,001	/

[#] Podaci su analizirani Spearmanovom korelacionom analizom

Kod zdravih osoba, statistički značajna pozitivna korelacija uočena je između LTL i vrednosti HDL-holesterola ($\rho=0,277$; $p=0,014$), aktivnosti enzima telomeraze i ukupnih proteina plazme ($\rho=0,401$; $p<0,001$), vrednosti proooksidativnog skora i triglicerida ($\rho=0,224$; $p=0,040$), aktivnosti enzima ALT ($\rho=0,231$; $p=0,034$), LDH ($\rho=0,239$; $p=0,042$) i oksidativnog skora ($\rho=0,857$; $p<0,001$), kao i između oksidativnog skora i triglicerida ($\rho=0,271$; $p=0,013$) i aktivnosti enzima LDH ($\rho=0,304$; $p=0,009$). Statistički značajna negativna korelacija uočena je između aktivnosti enzima telomeraze i enzima AST ($\rho=-0,359$; $p=0,001$), ALT ($\rho=-0,337$; $p=0,002$) i LDH

($\rho=-0,511$; $p<0,001$), kao i između prooksidativnog skora i aktivnosti enzima telomeraze ($\rho=-0,241$; $p=0,027$). Oksidativni skor pokazao je značajnu negativnu korelaciju sa antioksidativnim skorom ($\rho=-0,482$; $p<0,001$), kao i sa aktivnosti enzima telomeraze ($\rho=-0,359$; $p=0,001$).

Tabela 16. Korelaciona analiza osnovnih biohemijskih i hematoloških parametara sa parametrima redoks statusa i telomera-telomeraza sistema u grupi KVB bolesnika[#]

Parametri	Dužina telomere leucita	Aktivnost telomeraze	Prooksidativni skor	Antioksidativni skor	Oksidativni skor
Dužina telomera	1 /	-0,257* 0,013	0,001 0,991	0,068 0,522	0 0,997
Aktivnost telomeraze	-0,257* 0,013	1 /	0,09 0,391	-0,132 0,209	0,144 0,168
Glukoza	-0,031 0,772	-0,076 0,472	-0,035 0,744	-0,11 0,296	0,069 0,516
Ukupni proteini	-0,115 0,367	0,058 0,652	0,091 0,472	0,029 0,821	0,075 0,556
Trigliceridi	-0,16 0,139	0,034 0,755	0,433** <0,001	0,322** 0,002	0,254* 0,017
Ukupan holesterol	-0,182 0,087	-0,019 0,859	0,246* 0,019	0,178 0,094	0,112 0,294
HDL-holesterol	0,167 0,194	-0,111 0,386	-0,048 0,71	0,033 0,795	-0,119 0,351
LDL-holesterol	-0,056 0,686	-0,062 0,648	0,144 0,29	0,103 0,452	0,039 0,776
AST	-0,123 0,247	0,105 0,324	-0,143 0,175	-0,148 0,162	-0,134 0,205
ALT	-0,038 0,719	-0,027 0,799	-0,179 0,09	-0,104 0,328	-0,145 0,171
LDH	-0,124 0,343	0,041 0,75	-0,147 0,253	-0,185 0,15	-0,017 0,898
Kreatin kinaza	-0,076 0,473	0,174 0,097	-0,032 0,763	-0,002 0,985	-0,071 0,502
Troponin I	0,028 0,796	0,155 0,142	-0,044 0,677	-0,022 0,838	-0,07 0,508
Ukupan broj eritrocita	0,178 0,072	-0,099 0,321	0,063 0,53	0,057 0,567	0,057 0,569
Koncentracija hemoglobina	0,121 0,221	0,014 0,886	0,034 0,734	-0,007 0,943	0,029 0,773
Hematokrit	0,123 0,223	-0,024 0,812	-0,013 0,898	0,012 0,905	-0,029 0,775
Ukupan broj leukocita	-0,015 0,881	-0,057 0,565	0,049 0,624	-0,143 0,151	0,072 0,471
Ukupan broj trombocita	-0,11 0,27	0,247* 0,012	0,158 0,11	0,008 0,937	0,181 0,068
Prooksidativni skor	0,001 0,991	0,09 0,391	1 /	0,352** 0,001	0,806** <0,001
Antioksidativni skor	0,068 0,522	-0,132 0,209	0,352** 0,001	1 /	-0,2 0,055
Oksidativni skor	0 0,997	0,144 0,168	0,806** <0,001	-0,2 0,055	1 /

[#] Podaci su analizirani Spearmanovom korelacionom analizom

Korelaciona analiza urađena je i u grupi bolesnika i rezultati su sumirani u Tabeli 16. U grupi STE-AIM bolesnika, statistički značajnu negativnu korelaciju pokazali su LTL i aktivnost enzima telomeraze ($\rho=-0,257$; $p=0,013$). Statistički značajnu pozitivnu korelaciju aktivnost telomeraze pokazala je sa ukupnim brojem trombocita ($\rho=-0,247$; $p=0,012$). Značajnu pozitivnu korelaciju pokazali su svi novi parametri redoks statusa sa vrednostima triglicerida i to prooksidativni skor ($\rho=0,433$; $p<0,001$), antioksidativni skor ($\rho=0,322$; $p=0,02$) i oksidativni skor ($\rho=0,254$; $p=0,017$). Statistički značajnu pozitivnu korelaciju pokazao je i prooksidativni skor sa antioksidativnim skorom ($\rho=0,352$; $p=0,001$) i oksidativnim skorom ($\rho=0,806$; $p<0,001$).

Nakon logaritamske transformacije podataka, čija raspodela je odstupala od normalne raspodele, primenjena je multipla regresiona analiza (*backward* selekcija) kako bi se procenila međusobna povezanost novih biomarkera LTL i aktivnosti enzima telomeraze kod STE-AIM bolesnika, sa promenljivim varijablama, kao što su ukupan holesterol, HDL-holesterol, LDL-holesterol i oksidativni skor. Promenljive varijable obuhvatale su sve osnovne biohemijske i hematološke parametre. Prikazani su statistički značajni modeli (Tabela 17).

Tabela 17. Modeli koji predviđaju zavisnost dužine telomera leukocita i aktivnosti telomeraze kod STE-AIM bolesnika upotrebom multiple linerne regresione analize

Parametar	B	95. IP	Korigovano R ²	P
Dužina telomera leukocita				
Aktivnost telomeraze, LDL-holesterol i HDL-holesterol	0,944	0,758-1,234	0,766	<0,001
Aktivnost enzima telomeraze				
Dužina telomera leukocita, ukupan holesterol, HDL-holesterol i Oksidativni skor	0,099	0,054-0,143	0,970	0,012

B-Nestandardni koeficient beta, 95.IP-interval pouzdanosti

U tabeli 17 predstavljeni su najbolji modeli koji predviđaju LTL i aktivnost enzima telomeraze u grupi STE-AIM bolesnika. Kod LTL najbolji model sastoji se od: aktivnosti enzima telomeraze, LDL-holesterola i HDL-holesterola, čija kombinacija značajno predviđa zavisnost vrednosti LTL kod STE-AIM bolesnika, tačnije vrednost koeficijenta R² (0,766) ukazuje da izabrani model utiče sa 76% na vrednosti LTL. Sa druge strane, najbolji model koji predviđa vrednosti enzima telomeraze u grupi STE-AIM bolesnika sastoji se od LTL, ukupnog holesterola, HDL-holesterola i oksidativnog skora, i vrednosti koeficijenta R² (0,970) ukazuje da izabrani model utiče čak 97% na vrednosti enzima telomeraze.

U cilju provere kliničke tačnosti novih parametara (LTL, aktivnosti telomeraze, prooksidativnog, antioksidativnog i oksidativnog skora), urađena je ROC analiza. ROC analiza

omogućava procenu dijagnostičke tačnosti parametara, tačnije njihovu sposobnost da razdvoje dva klinička entiteta. U našoj studiji testirana je sposobnost novih parametara da razdvoje bolesnike po kriterijumu STE-AIM od zdravih osoba, ali i od AP i nonSTE-AIM bolesnika (odnosno MINOKA bolesnika i bolesnika bez stenta). Rezultati su sumirani u Tabeli 18.

Tabela 18. Evaluacija kliničke tačnosti parametara telomera-telomeraza sistema i redoks statusa kod STE-AIM bolesnika u odnosu na AP bolesnike

Parametar	AUC (95. IP)	Standardna greska	Asimptotska značajnost	Cut-off	95% IP
Dužina telomera leukocita	0,433	0,058	0,246	1,189	0,318 – 0,547
Aktivnost telomeraze	0,511	0,055	0,852	0,374	0,404 – 0,618
Prooksidativni skor	0,477	0,058	0,696	5,444	0,364 – 0,591
Antioksidativni skor	0,755	0,049	0,001	-0,772	0,659 – 0,852
Oksidativni skor	0,549	0,062	0,403	5,723	0,427 – 0,67

IP=interval pouzdanosti za B, Cutt-off vrednost računata koristeći Youden index

Zasebne ROC analize krivi novih parametara pokazuju da novi parametri imaju sličnu diskriminatornu sposobnost prema STE-AIM bolesnicima u odnosu na AP bolesnike (Tabela 15). Antioksidativni skor se izdvojio sa dovoljnom statističkom značajnosti i diskriminatornom sposobnosti (AUC (95.IP) = 0,755) da izdvoji STE-AIM bolesnike od AP bolesnika (Tabela 18). Sa druge strane, ROC analizom novih parametara ponaosob samo u grupi STE-AIM bolesnika izdvojio se oksidativni skor kao parametar zadovoljavajuće statističke značajnosti i diskriminatorne sposobnosti (AUC (95.IP) = 0,709) da razdvoji STE-AIM bolesnike od nonSTE-AIM bolesnika (ili MINOKA i bez stenta) (Tabela 19).

Tabela 19. Evaluacija kliničke tačnosti parametara telomera-telomeraza sistema i redoks statusa kod STE-AIM bolesnika u odnosu na MINOKA bolesnike i bolesnike bez stenta

Parametar	AUC (95. IP)	Standardna greska	p	Cut-off	95% IP
Dužina telomera leukocita	0,600	0,073	0,244	1121	0,458 – 0,743
Aktivnost telomeraze	0,490	0,077	0,910	0,375	0,390 – 0,760
Prooksidativni skor	0,345	0,085	0,071	5,454	0,179 – 0,511
Antioksidativni skor	0,575	0,095	0,384	0,413	0,390 - 0,760
Oksidativni skor	0,709	0,084	0,015	5,348	0,544 – 0,874

IP=interval pouzdanosti za B, Cutt-off vrednost računata koristeći Youden index

U cilju povećanja diskriminatorne sposobnosti novih parametara telomera-telomeraza sistema i redoks statusa, parametri su binarnom logističkom regresijom kombinovani u modele. Najbolji modeli prikazani su u Tabeli 20.

Tabela 20. Model za evaluaciju kliničke tačnosti novih parametara kod STE-AIM bolesnika u odnosu na zdrave osobe

<i>Model</i>	<i>AUC (95. IP)</i>	<i>Standardna greška</i>	<i>IP</i>	<i>Cut-off</i>	<i>95% IP</i>
<i>Dužina telomera leukocita i aktivnost enzima telomeraze</i>	0,711	0,040	<0,001	0,544	0,632 – 0,790
<i>Prooksidativni skor, antioksidativni skor i oksidativni skor</i>	0,603	0,043	0,018	0,472	0,519 – 0,687
<i>Dužina telomera leukocita, aktivnost enzima telomeraze, prooksidativni skor, antioksidativni skor i oksidativni skor*</i>	0,628	0,059	0,027	0,410	0,513 – 0,743
<i>Dužina telomera leukocita, aktivnost enzima telomeraze, prooksidativni skor, antioksidativni skor i oksidativni skor**</i>	0,686	0,059	0,030	0,275	0,535 – 0,838

IP=interval pouzdanosti za B, Cut-off vrednost računata koristeći Youden index;

*STE-AIM od AP i non-STE-AIM bolesnika

** STE-AIM od non-STE-AIM bolesnika

Prvi model, sadrži zajedno dva nezavisna parametra telomera-telomeraza sistema (LTL i aktivnosti enzima telomeraze), i analiza pokazuje da ROC kriva novoformiranog modela ima dobru diskriminatornu sposobnost da razdvoji STE-AIM bolesnike od zdravih osoba (AUC (95.IP) = 0,711), dok se ta diskriminatorna sposobnost gubi analizom samo grupe bolesnika i podgrupe STE-AIM bolesnika (podaci nisu prikazani). Kriva modela koji sadrži parametre redoks statusa (prooksidativni, antioksidativni i oksidativni skor) pokazuje takođe statistički značajnu sposobnost razdvajanja STE-AIM bolesnika od zdravih osoba, ali je njegova diskriminatorna sposobnost niska (AUC (95.IP) = 0,603). Poslednji model predstavlja kombinaciju svih pet novo-ispitivanih parametara. ROC analiza ukazuje da je dobijeni model statistički značajan u razdvajanju STE-AIM bolesnika od ostalih kardiovaskularnih bolesnika (AP i nonSTE-AIM), sa dobrom diskriminatornom sposobnošću (AUC (95.IP) = 0,628), dok je njegova sposobnost značajna i u razdvajanju STE-AIM bolesnika od nonSTE-AIM bolesnika (AUC (95.IP) = 0,686; p = 0,030).

STE-AIM bolesnici su praćeni nakon pPCI intervencije šest meseci i dodatno još četiri godine. Reinfarkt i smrt bolesnika su neželjeni ishod praćeni u kraćem (6 meseci) i dužem (4 godine) vremenskom periodu. U toku šest meseci nakon pPCI intervencije nije bilo zabeleženih neželjenih ishoda među bolesnicima uključenim u studiju. Ukupno dva smrtna slučaja i jedan reinfarkt zabeleženi su tokom 4 godine među bolesnicima ove studije. Kako bi razumeli ulogu

LTL u progresiji KAB, Rezultati STE-AIM bolesnika su podjeljeni u tercile prema vrednostima LTL. Oba bolesnika sa smrtnim ishodom imali su vrednosti LTL u najnižem tercilu (0,933 i 0,975), dok je vrednost LTL bolesnika sa reinfarktom bila na granici najnižeg i srednjeg tercila (1,074). Nasuprot vrednostima LTL, vrednosti enzima telomeraze kod bolesnika sa reinfarktom (0,441) bila je u najvišem tercilu, kao i vrednosti kod dva preminula bolesnika (0,393 i 0,419), iako su vrednosti preminulih bolesnika bile neznatno niže od bolesnika sa reinfarktom miokarda. Isti trend vrednosti LTL i aktivnosti enzima telomeraze prate i u arterijskoj krvi kod ovih bolesnika. Naime, LTL u arterijskoj krvi oba preminula bolesnika nalazi se u najnižem tercilu vrednosti LTL (0,941 i 0,962), dok je vrednost LTL bolesnika sa reinfarktom bila u srednjem tercilu (1,086). Isto kao kod periferne krvi, vrednosti enzima telomeraze u arterijskoj krvi kod bolesnika sa smrtnim ishodom (0,399 i 0,425), ali i bolesnika sa reinfarktom (0,455) bila je u najvišem tercilu. Uzorci tromboaspirata nisu uzorkovani tokom pPCI intervencije kod ova tri bolesnika, zbog farmakološkog pristupa pPCI, pa stoga nije bilo moguće izvršiti adekvatno praćenje.

Kako bi se smanjio broj početnih varijabli analiziranih u ovoj studiji, one su kombinovane u manji broj faktora upotrebom analize glavnih komponenti (eng. *Principal Component Analysis, PCA*). PCA je primenjena na parametre redoks statusa, osnovne biohemijske parametre (trigliceride, ukupne serumske proteine, ukupni holesterol, nivo hemoglobina, troponin I, kreatin kinazu - aktivnost, i BMI), parametere telomera-telomeraza sistema. Kako skorovi redoks statusa nisu dali statistički značajne faktore (rezultati nisu prikazani), analiza je proširena na pojedinačne parametre redoks statusa koji su korišćeni za izračunavanje redoks skorova (pogledati poglavlje 3.5.). Rezultati su sumirani u Tabeli 21.

Tabela 21. Ekstrahovani faktori pomoću PCA u uzorcima periferne venske i arterijske krvi pacijenata sa STE-AIM

Tip uzorka	Faktori	Uključene varijable sa učešćem	Varijabilnost faktora – pojedinačno (%)	Varijabilnost faktora – kumulativno (%)
Periferna venska krv*	Trigliceridi-protein faktor	AOPP (0.748) TG (0.733) Ukupne SH-grupe (0.627)	17.1	48.6
	Oksidativni-telomere faktor	PAB (-0.734) TAS (0.669) IMA (0.624) LTL (0.504)	12.1	
	KVB biomarker faktor	Troponin I (0.891) CK-aktivnost (0.864) BMI (-0.585)	10.9	
	Holesterol-protein faktor	Hemoglobin (0.663) Ukupan kolesterol (0.640) Ukupni serumski proteini (0.592)	8.5	
Arterijska krv**	Oksidativni faktor	O ²⁻ (0.829) PAB (0.797) TAS (0.731) IMA (0.563)	43,3	65.9
	Arterijski oksidativni-telomere faktor	LTL (0.790) PON1 (0.766) TOS (0.629)	11.4	
	Oksidativni-telomeraza faktor	Aktivnost telomeraze (-0.855) SOD (-0.501) TOS (0.545)	11.2	

*Kaiser-Meyer-Olkin Measure of Sampling Adequacy for peripheral serum samples = 0.613;

**Kaiser-Meyer-Olkin Measure of Sampling Adequacy for arterial serum samples = 0.716.

Primenom PCA analize izdvojena su četiri faktora u rezultatima uzoraka periferne venske krvi. Objasnili su ukupno 48.6% varijacije svih uključenih varijabli. Prvi ekstrahovani faktor uključio je AOPP, TG i ukupne SH-grupe i obuhvatio je 17.1% ukupne varijanse. Nazvan je „trigliceridi-proteinski faktor“. Drugi ekstrahovani faktor objašnjava 12.1% ukupne varijanse i sastojao se od PAB, TAS, IMA i LTL varijabli, a imenovan je kao „Oksidativni-telomera faktor“. „Markeri kardiovaskularnih bolesti“ kao faktor objasnio je ukupno 10.9% ukupne varijanse, i kao treći ekstrahovani faktor obuhvatio je Troponin I, CK aktivnost i BMI. Četvrti ekstrahovani faktor je bio „Holesterol-proteinski faktor“ koji je obuhvatio 8.5% ukupna varijanse i bio je okarakterisan pozitivnim uključenjem nivoa hemoglobina, ukupnog holesterola i ukupnih serumskih proteina.

Potom su pomoću PCA analizirani i parametri redoks statusa i telomera-telomeraza sistema urađenim u rezultatima uzoraka arterijske krvi. Prvi faktor uključio je pozitivno učešće O²⁻, PAB, TAS i IMA. Objasnio je ukupno 43.3% ukupne varijanse i nazvan je „Oksidativni faktor“. Druga dva faktora objašnjavala su svaki po približno 11% ukupne varijanse i nazvani su „Arterijski oksidativni-telomera faktor“ i „Oksidativni-telomeraza faktor“ i prikazani su u Tabeli 21.

Kako bi se proverilo da li je neki od novo-formiranih faktora povezan sa visokim vrednostima sistema za evaluiranje kompleksnosti KVB (SYNTAX skorom) i prognozom kod STE-AIM bolesnika koji su podvrgnuti pPCI intervenciji, urađena je binarna logistička analiza (ENTER selekcija). Rezultati su sumirani u Tabeli 22.

Tabela 22. Binarna logistička analiza prediktora visokih vrednosti SYNTAX skora (>17) u perifernoj venskoj i arterijskoj krvi

<i>Tip uzorka</i>	<i>Faktori</i>	<i>OR</i>	<i>95. IP</i>	<i>p</i>
<i>Periferna venska krv</i>	<i>Triglicerid-protein faktor</i>	2.063	0.998 – 4.266	0.051
	<i>Oksidativni-telomere faktor</i>	0.427	0.194 – 0.943	0.035
	<i>KVB biomarker faktor</i>	0.876	0.506 – 1.518	0.637
	<i>Holesterol-protein faktor</i>	0.379	0.184 – 0.777	0.008
<i>Arterijska krv</i>	<i>Oksidativni faktor</i>	0.481	0.208 – 1.116	0.088
	<i>Arterijski oksidativni-telomere faktor</i>	1.634	0.727 – 3.671	0.235
	<i>Oksidativni-telomeraza faktor</i>	1.086	0.455 – 2.590	0.853

OR = odds ratio; IP = interval pouzdanosti.

Dva faktora sa najvišom sposobnosti da predvide visoke vrednosti SYNTAX skora su „Oksidativni-telomera faktor“ (OR=0.427; p=0.035) i „Holesterol-proteinski faktor“ (OR=0.379; p=0.008). Za povećane vrednosti SYNTAX skora „Oksidativni-telomera faktor“ odgovoran je sa 4,27%, dok „Holesterol-proteinski faktor“ učestvuje sa 3,79%. Sa druge strane, ni jedan od novonastalih faktora u arterijskoj krvi nije bio dovoljno dobar da predvidi visoke vrednosti SYNTAX skora kod AIM bolesnika (Tabela 22).

Bolesnici u studiji su bili podeljeni na STE-AIM i nonSTE-AIM (odnosno MINOCA i bez stenta), po urađenim analizama krvi, srčanim biomarkerima i nakon elektrokardiografije (EEG) koji su prethodili adekvatnom zbrinjavanju pacijenata. Diskriminatorska sposobnost novih faktora prema STE-AIM statusu proverene je ROC analizom i rezultati su prikazani u tabeli 23.

Tabela 23. Model za proveru dijagnostičke tačnosti novoformiranih faktora kod STE-AIM bolesnika u odnosu na NSTE-AIM bolesnike u perifernoj venskoj krvi

<i>Faktori</i>	<i>AUC (95.IP)</i>	<i>Standardna greška</i>	<i>p</i>	<i>Cut-off</i>	<i>95% CI</i>
<i>Triglicerid-protein faktor</i>	0.292	0.135	0.124	0.057	0.028 – 0.556
<i>Oksidativni-telomere faktor</i>	0.860	0.095	0.008	0.673	0.00 – 1.00
<i>KVB biomarker faktor</i>	0.756	0.097	0.059	0.530	0.565 – 0.946
<i>Holesterol-protein faktor</i>	0.698	0.157	0.142	0.568	0.386 – 1.000

IP=interval pouzdanosti za B. Cut-off vrednost računata koristeći Youden index

Među novim faktorima, „Oksidativno-telomera faktor“ je pokazao dobru diskriminatornu sposobnost da razdvoji STE-AIM bolesnike od NSTE-AIM bolesnika (AUC (95.IP) = 0.860, Cut-off (95% CI) = 0.673 (0.00 – 1.00)). Diskriminatorna sposobnost faktora nije testirana u arterijskoj krvi bolesnika, budući da uzorak arterijske krvi nije uziman od MINOCA i bolesnika bez stenta prilikom sakupljanja uzraka za studiju zbog različite terapijske procedure.

5. Diskusija

Kardiovaskularne bolesti ostaju i dalje vodeći uzrok smrtnosti u razvijenim zemljama širom sveta, ali i u zemljama u razvoju. U Srbiji je tokom 2020.godine umrlo 55.305 osoba od KVB, dok je dijagnoza akutnog koronarnog sindroma postavljena kod 20.434 bolesnika, a od istog je umrlo ukupno 4.385 osoba u Srbiji (<https://www.batut.org.rs>). Stoga, u rutinskoj kliničkoj analizi postoji sve veća potreba za ranim biomarkerima koji će pomoći ranom otkrivanju KVB, ali i njihovom praćenju u cilju sprečavanja neželjenih posledica, odnosno reinfarkta ili pak smrtnog ishoda. U ovoj disertaciji ispitivani su parametri telomera-telomeraza sistema (LTL i aktivnost enzima telomeraze) i parametri redoks statusa (prooksidativni, antioksidativni i oksidativni skor) kao novi biomarkeri KVB.

Uvođenje analize novih parametara poput LTL i aktivnosti enzima telomeraze u rutinsku laboratorijsku analizu, zahteva primenu pouzdanih i validiranih analitičkih metoda, sa tačno utvrđenom preanalitičkom fazom, kao što je priprema uzoraka. Sama priprema uzorka, kao važan deo preanalitičke faze, je često kritična i mora biti pažljivo razmatrana i precizno ispoštovana. Kako u praksi tako i u istraživačkom radu, postoji često potreba za čuvanjem uzoraka radi ponavljanja analiza ili pak potvrđivanja rezultata, stoga su podaci o njihovoj stabilnostima od izuzetne važnosti. U ovoj studiji korišćeno je nekoliko tipova uzoraka za analizu navedenih novih parametara. Uzorci plazme i seruma, kao derivati pune krvi, najčešće su upotrebljavani uzorak u rutinskoj laboratorijskoj analizi i njihova stabilnost je uveliko poznata (*Kachhawa et al, 2017*). Pored njih, korišćena je genomska DNK, kao uzorak izbora za ispitivanje LTL. Do sada postoje već brojne studije koje govore u prilog visokoj stabilnosti genomske DNK kao uzorka i mogućnostima njenog skladištenja (*Lam et al, 2004*), stoga ispitivanje njene stabilnosti nije bilo razmatrano u ovoj studiji. Kao treća vrsta uzorka korišćen je proteinski ekstrakt za određivanje enzima telomeraze (*Kim et al, 1994*). Podataka o stabilnosti telomeraznog proteinskog ekstrakta je malo, pa je jedan od prvih ciljeva u ovoj studiji bilo ispitivanje njegove stabilnosti.

Telomeraza je enzim koji poseduje sopstvenu RNK komponentu (*Zvereva et al, 2010*). Brojna istraživanja su pokazala da enzimska aktivnost, nivoi biohemijskih parametara, kao i prinos i kvalitet RNK mogu biti pod uticajem uslova u kojima se čuvaju uzorci, odnosno delovanjem ambijentalne temperature, temperature zamrzavanja i ponovnim odmrzavanjem, kao i vremenskim periodom u kom se skladište (*Tsui et al, 2002; Gojković et al, 2018; Hedayati et al, 2020*). Imajući u vidu ove faktore, u našoj studiji, ispitana je aktivnost proteinskog ekstrakta nakon skladištenja na -20°C i -80°C, kratkoročno i nakon nekoliko meseci, kao i nakon nekoliko ciklusa odmrzavanja i ponovnog zamrzavanja uzoraka. „Zlatnim standardom“ za čuvanje ovog tipa uzoraka, smatra se

temperatura od -80°C , što je i potvrđeno našim rezultatima. Naime, uzorci ćelijskih linija i humani uzorci sa početno visokom aktivnosti enzima sačuvali su enzimsku aktivnost tokom čak šest meseci skladištenja na -80°C . Sa druge strane, uzorci telomeraze sa početno niskom aktivnosti enzima telomeraze trebalo bi da budu obrađeni i po mogućstvu analizirani odmah nakon uzimanja samog uzorka, s obzirom da se njihova stabilnost i na -80°C gubi između prvog i šestog meseca. Više temperature, kao što je -20°C , pogodnije su za uzorke sa početno visokom aktivnosti enzima, gde čuvaju aktivnost čak 14 dana (Slika 12). Informacije o ciklusima ponovnog odmrzavanja-zamrzavanja uzoraka su veoma značajne, s obzirom da bi ponovljeno odmrzavanje i zamrzavanje uzorka moglo da se dogodi tokom rutinskog laboratorijskog rada (npr. kvar zamrzivača u kome se čuvaju sami uzorci ili pak iznenadni nestanci struje). Tsui i saradnici su pokazali da odmrzavanje može da ošteti RNA sekvencu (Tsui et al, 2002). Naši rezultati idu u prilog ovom tvrđenju. Humanu uzorci sa visokom aktivnosti telomeraze mogu biti odmrznuti i ponovno zamrznuti više puta (čak četiri puta), u odnosu na one sa niskom aktivnosti enzima, što ponovo potvrđuje višu stabilnost uzoraka sa višom aktivnosti enzima telomeraze. Interesantan podatak naše studije pokazuje da je telomeraza poreklom od ćelijske linije najaktivnija u poređenju sa aktivnosti telomeraza izolovanih iz leukocita. Iako su ćelijske linije humanog porekla, kako bi se obezbedilo njihovo kontinuirano preživljavanje u kulturi odnosno u *in vitro* uslovima, najčešće su ćelije imortalizovane i na taj način izbegavaju ćelijsko starenje i održavaju kontinuiranu proliferaciju. Sam proces imortalizacije podrazumeva mutacije u određenim kontrolnim tačkama (kao što su p53, p16, pRb) ili reaktivacija enzima telomeraze, što vodi doprinosi ovako visokoj aktivnosti enzima telomeraze (Maqsood et al, 2013).

Nakon utvrđivanja stabilnosti uzoraka, pre uvođenja nove metode u rutinsku laboratorijsku analizu, neophodno je izvršiti njenu *in-house* validaciju, što podrazumeva uvrđivanje njene ponovljivosti i tačnosti, kako bi se varijacije tokom rutinskog rada svele na minimum. Agencija za hranu i lekove je propisala pravila u smislu koeficijenta varijacija za tačnost i reproducibilnost metoda za rutinske laboratorijske uzorke i oni moraju varirati u okviru 15% (FDA Food, 2018). U ovoj studiji, u laboratoriji Katedre za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu validirane su dve PCR metode i to za određivanje aktivnosti enzima telomeraze (RTq-TRAP) metoda i za određivanje dužine telomera leukocita. Ispitivane metode pokazale su zadovoljavajuće koeficiente varijacije tačnosti i reproducibilnosti unutar serija kao i između serija, što potvrđuje mogućnost njihove upotrebe kao rutinskih laboratorijskih metoda (Poglavlja 4.1. i 4.3.).

S obzirom na to da pomenute dve PCR metode do sada nisu korišćene u kliničkoj laboratorijskoj dijagnostici u našoj laboratoriji, izvršena je pre svega njihova optimizacija.

Optimizacija se sastojala u podešavanju temperature na kojoj je PCR reakcija najefikasnija. Optimizovana RTq-TRAP metoda daje zadovoljavajuću linearnost i obuhvata širok opseg koncentracija proteinskih ekstrakata 0,76–700 µg/mL (Slika 13). S obzirom na to da je aktivnost enzima telomeraze obrnuto proporcionalna Cq vrednostima očitanim u PCR reakciji, korišćena je modifikovana formula Elmore i saradnika (*Elmore, 2002*), kako bi se Cq vrednosti prevele u relativnu telomeraznu aktivnost radi lakšeg analiziranja i tumačenja rezultata (Poglavlje 4.2.). Sa druge strane optimizovana metoda za određivanje LTL takođe je pokazala zadovoljavajuću linearnost i podrazumeva širok opseg koncentracija genomske DNK 0,70–48,70ng/µL (Slika 14). Slično aktivnosti enzima telomeraze, i LTL je obrnuto proporcionalna vrednostima Cq, ali za njeno preračunavanje koristio se odnos sa standardnim genom, T/S odnos, koji je predložio Cawton (*Cawton, 2002*).

Do sada nema studija koje su se bavile isključivo određivanjem referentnih vrednosti LTL i aktivnosti enzima telomeraze u različitim populacijama, kao ni u Srbiji. Iako Kahl i saradnici razvijaju novu metodu koja je, kako smatraju, dovoljno osetljiva da odredi dužinu telomera u humanim uzorcima (*Kahl et al, 2020*), za definisanje okvirnog opsega dužine telomera oslanjaju se na studiju Pickett-ove istraživačke grupe, koji smatraju da je normalni opseg telomera od 5 do 15kb (*Pickett et al, 2011*). Studija Lesmana grupe definiše referentni opseg telomera uzimajući u obzir samo decu uzrasta od 30 meseci do 18 godina (*Lesmana et al, 2021*), dok De Meyer i njegova grupa u svojoj longitudinalnoj studiji osnovni nivo i referentni opseg telomera određuju samo na populaciji srednjih godina u Belgiji (*De Meyer et al, 2006*). U ovoj studiji dužina telomera izražena je u baznim parovima i nije direktno uporediva sa referentnim opsegom dobijenim u ovoj studiji, s obzirom na to da nema objavljenih studija o korelaciji dužine telomera izražene u kb i T/S odnosu. S obzirom na to da su novi parametri telomera-telomeraza sistema prvi put određivani u populaciji u Srbiji, neophodno je bilo odrediti njihov referentni opseg pre dalje analize podataka bolesnika u studiji, kako bi se lakše definisale niske ili povišene vrednosti novoispitivanih parametara. Referentne vrednosti parametara telomera-telomeraza sistema određene su analizom grupe zdravih osoba (Tabela 7), prethodno odabranih po tačno određenim kriterijumima kako bi se uticaji eventualnih faktora na vrednost parametara sveli na minimum (Poglavlje 3.1.). Referentne vrednosti zdrave populacije u Srbiji za LTL kretale su se u rasponu od 0,70 do 3,05, dok je cut-off vrednost dobijena ROC analizom iznosila 1,189. Slično LTL, referentne vrednosti zdrave populacije u Srbiji za aktivnost telomeraze od 0,055 do 0,102, dok je cut-off vrednost bila 0,374. U ovoj studiji određivani su i skorovi redoks statusa i to prooksidativni, antioksidativni i oksidativni skor (Poglavlje 3.5.). S obzirom na to da su i novi parametri redoks statusa prvi put određivani u populaciji u Srbiji, neophodno je bilo definisati i njihov referentni opseg pre dalje analize podataka bolesnika. Referentne vrednosti parametara određene su takođe analizom grupe

zdravih osoba (Tabela 12), a njihove cut-off vrednosti ulaze u referentni opseg kao kod telomera-telomeraza sistema (Tabela 18). Do sada nema studija u kojima je određen referentni opseg prooksidativnog, antioksidativnog i oksidativnog skora na ovoj populaciji.

Poznato je da na vrednosti LTL i aktivnost enzima telomeraze utiču mnogi faktori, kao što su pol (*Lansdorp 2022*), starosna dob (*Hornsby 2007; Vaiserman & Krasnienkov, 2021*), duvanski dim (*Barragán et al, 2021*), gojaznost (*Clemente et al, 2019; Barragán et al, 2021*), krvni pritisak (*Huang et al, 2020*), pa čak i krvna grupa (*Mazidi et al, 2017*), stoga je dalja analiza telomera-telomeraza sistema obuhvatila upravo ove faktore. Naši podaci potvrđuju da vrednosti LTL mogu da variraju u odnosu na pol i blago povišene vrednosti pokazale su žene u odnosu na muškarce. U skladu sa vrednostima LTL, vrednosti enzima telomeraze pokazale su značajnu varijaciju u vrednostima, gde je značajno višu aktivnost telomeraze pokazao ženski pol u odnosu na muški. Do sada brojne studije govore o varijacijama vrednosti telomera-telomeraza sistema u skadu sa godinama (*Hornsby 2007; Vaiserman & Krasnienkov, 2021*). Naime, sasvim očekivano je da prirodno starenje organizma prati i ćelijsko starenje koje oslikava skraćenje dužine telomera leukocita i gubljenje aktivnosti telomeraze. Naši rezultati potvrđuju ove tvrdnje. I u populaciji u Srbiji vrednosti LTL se skraćuju neznatno sa godinama, dok se vrednosti enzima telomeraze polako gubi. Sličan uticaj na vrednosti LTL i enzima telomeraze kao starosna dob ima i gojaznost. Naime nekoliko studija govori o tome da povišena telesna masa može da uzrokuje ubrzano starenje organizma, odnosno gledano kroz telomera – telomeraza sistem može da dovede do skraćanja LTL i neaktivnosti enzima telomeraze. Rezultati naše studije su u skladu sa ovim tvrdnjama. Prekomerno gojazni pacijenti, sa indeksom telesne mase preko 30, imaju daleko kraće LTL i nižu aktivnost telomeraze u odnosu na osobe sa umerenom gojaznošću i normalno uhranjene osobe (Tabela 8). Veza između krvnog pritiska i dužine telomera leukocita je još uvek nedovoljno razjašnjena. Nekoliko studija pokazuje vezu između povišenog krvnog pritiska, kraćih telomera i niže aktivnosti telomeraze (*Huang et al, 2020; Zhang et al, 2020; Honkonen et al, 2020*), dok sa druge strane Aydos i Tükün u svojoj studiji tvrde da ne postoji uzročno posledična veza i da su krvni pritisak i telomera-telomeraza sistem nezavisni faktori rizika za KVB (*Aydos & Tükiin, 2007*). Naši rezultati, iako pokazuju blagu varijaciju u vrednosti, ne pokazuju značajnu razliku u vrednostima parametara telomera-telomeraza sistema u odnosu na grupe ispitanika po nivoima krvnog pritiska kod zdravih ispitanika. Interesantna varijacija vrednosti enzima telomeraze uočena je kod zdravih osoba u odnosu na njihovu krvnu grupu. Naime ispitanici sa krvnom grupom A i O imalu značajno više aktivnosti enzima telomeraze u odnosu krvne grupe B i AB, dok ova razlika nije uzrokovala značajnu razliku u vrednostima LTL. Studija Kozlitina i saradnika govori o obrnuto srazmernoj vezi između veličine eritrocita i LTL (*Kozlitina et al, 2012*), dok studija Olssona govori o različitoj dužini telomera kod različitih krvnih ćelija reptila (*Olsson, 2020*). On

je pokazao da su limfocitne telomere prosečno za 270% duže od eritrocitnih, tačnije hematopoetskih prethodnika zrelih eritrocita, dok su kod monocita reptila telomere i do 380% duže od eritrocitnih (*Olsson, 2020*). Sličnu studiju na humanoj populaciji izveli su Demanelis i saradnici, ali uzimajući u obzir različita tkiva, ali ne i krvne grupe različite krvne grupe ispitanika, pa pravi uzrok ove varijacije ostaje predmet za dalja istraživanja. Pokazali su da testikularne telomere mogu biti čak i do 2,5 puta duže od telomera ostalih tkiva u istraživanju, odnosno telomera poreklom iz ćelija krvi (leukocita), hipokampusa, želudca, pluća, dojki, mukose esofagusa, prostate, pankreasa, koronarne arterije, transverzalnog i sigmoidnog colona, izloženog dela kože (svetlosti), ovarijuma i skeletnih miša (*Demanelis et al, 2020*).

Pojava KVB kod osoba unosi nove faktore koji svakako utiču na vrednosti telomera-telomeraza sistema. U grupi bolesnika, primetili smo sličan trend vrednosti, tačnije varijacije u vrednostima novih parametara u odnosu na već pomenute faktore kod zdravih osoba, ali oni nisu bili od statističke važnosti u grupi KV bolesnika u ovoj studiji. Jedina razlika u vrednostima LTL i aktivnosti telomeraze uočena je kod KV bolesnika sa visokom vrednosti SYNTAX skora. Bolesnici sa vrednostima SYNTAX skora nižim od 17, imali su više vrednosti telomeraze i duže telomere u odnosu na KV bolesnike sa vrednostima SYNTAX skora iznad 23. Nekoliko novijih studija govori o vezi između LTL, aktivnosti telomeraze i ozbiljnosti koronarne arterijske bolesti gledano kroz angiografske parametre (*Kunadian et al, 2015; Sun et al, 2020*). Stoga je ova razlika bazirana na SYNTAX skor, kao sveobuhvatnom pokazatelju, dublje analizirana u daljoj obradi podataka.

Ispitanici u studiji bili su slični po godinama, konstituciji i polu, iako daleko veći broj muškaraca oboleva od KVB u Srbiji u odnosu na žene (<https://www.batut.org.rs>), što potvrđuju i naši podaci. Grupa bolesnika obuhvatala je STE-AIM, NSTEMI i AP bolesnike (Poglavlje 3.1.). Bolesnici su imali prisutne faktore rizika za razvoj KVB (Tabela 5), i to povišen krvni pritisak, visok BMI, povišene nivoe glukoze, snižen HDL-holesterol. Dijabetes melitus, kao značajan faktor rizika, bio je dijagnostifikovan kod svih KVB bolesnika u studiji, i to kod čak 44% AIM-STE bolesnika i kod 31% AP bolesnika. Pored dijabetes melitusa, kao značajan faktor rizika podrazumevana je i intolerancija na glukozu. Pod intolerancijom na glukozu smatraju se stanja u kojima je povišen nivo glukoze u krvi bolesnika u odnosu na referentne vrednosti, ali one nisu još uvek dijagnostifikovane kao dijabetes melitus (*Rao et al, 2004*) i smatraju se visoko rizičnim za razvoj kako dijabetes melitusa, tako i za nastanak KVB. U ovoj studiji, intoleranciju na glukozu imalo je dodatnih 38% STE-AIM i 27% AP bolesnika. Dijabetes melitus i intolerancija na glukozu su nedovoljno razjašnjenih uticaja na dužinu telomera. Kirchner i saradnici u svom pregledu literature navode studije koje su potvrdile pozitivnu asocijaciju dužine telomera i dijabetes

melitusa, iako ostaje nejasno da li su kratke telomere posledica ili uzrok same bolesti (*Kirchner et al, 2017*). Njihove tvrdnje dokazuju i Khalangot i saradnici u svojoj studiji potvrđujući pozitivnu vezu između narušene tolerancije na glukozu i dužine telomera (*Khalangot et al, 2019*). Sa druge strane, Grunnet istraživačka grupa pak tvrdi da je dužina telomera u negativnoj korelaciji sa koncentracijom glikoze kod normalno uhranjenih osoba (*Grunnet et al, 2019*).

Jedan od najznačajnijih faktora rizika za KVB je dislipidemija. Stanje u kome su narušene normalne vrednosti lipidnog statusa, odnosno povišeni nivo triglicerida, LDL-holesterola i ukupnog holestrola, a snižen nivo HDL-holesterola definiše se kao dislipidemija i predstavlja nezavistan faktor rizika za nastanak KVB (*Du & Qin, 2023*). U grupi bolesnika dislipidemiju je imalo skoro 50% STE-AIM i 10% AP bolesnika. U skladu sa ovim podatkom, na terapiji statinima bilo je 17% STE-AIM i 7% AP bolesnika u trenutku uključivanja u studiju. Veza dislipidemije i detaljnije određenih frakcija (kao što su trigliceridi, LDL-holesterol i HDL-holesterol) i LTL je detaljnije objašnjena u daljem tekstu.

U grupi STE-AIM bolesnika izdvojile su se dve podgrupe bolesnika, MINOCA i bolesnici bez stenta (Poglavlje 3.1.). Sve tri podgrupe KVB bolesnika imale su prisutne najznačajnije faktore rizika (konzumiranje cigareta, visok krvni pritisak, povišenu telesnu masu, povišen nivo glukoze i dislipidemiju). Zanimljiv podatak je nivo lipida u MINOCA pogrupi bolesnika (Tabela 8). MINOCA bolesnici predstavljaju 5% ukupnog broja STE-AIM bolesnika u Srbiji. U našoj studiji ukupno ih je uključeno 6 zbog pomenute učestalosti pojavljivanja. Njihova patofiziološka osnova nije sa sigurnošću poznata, ali smatra se da učestvuju isti faktori kao kod STE-AIM uz manje varijacije (*Vidal-Perez et al, 2019; Del Buono et al, 2022*). Naime, iako je nivo LDL-holesterola bio povišen, praćen je izuzetno povišenim nivoom HDL-holesterola. Nekoliko novijih studija potvrđuje ovaj nalaz visokih lipida kod MINOCA bolesnika, ali ne daje tačan mehanizam kojim do povećanja dolazi, koji ostaje nedovoljno razjašnjen (*Inandiklioglu et al, 2022; Kallmeyer et al, 2023*). Svakako, povišen nivo HDL-holesterola sa svojim pozitivnih efektima u reverznom transportu holesterola, ali i činjenici da je za njega vezan jedan od enzima antioksidativne zaštite organizma, verovatno je jedan od razloga što ovi bolesnici i pored prisutnog infarkta miokarda nemaju koronarne arterije sa klinički značajnom stenozom, iako Gao i saradnici (*Gao et al, 2022*) sugerišu da terapija povećanja HDL-holesterola nema pozitivnog efekta na snižavanje faktora rizika kod MINOCA bolesnika, ova veza ostaje da se potvrdi u budućim studijama na većem broju ispitanika.

Novoispitivani parametri telomera-telomeraza sistema su potom analizirani kod zdravih ispitanika i u podgrupama bolesnika. Potvrđene su značajano kraće telomere leukocita kod sve četiri podgrupe KVB bolesnika (odnosno AP, STE-AIM, MINOCA i bez stenta) u odnosu na

kontrolnu grupu u našoj studiji (Slika 18). Kraće telomere kod MINOCA bolesnika (*Inandiklioglu et al, 2022*) u odnosu na zdrave osobe, kao i kod bolesnika sa AIM (*Gupta et al, 2020*) i nonSTE-AIM (*Chan et al, 2020*) u odnosu na zdrave ispitanike potvrđene su u studijama i autori su se složili da je LTL potencijalni biomarker za skrining i praćenje pacijenata sa KAB, ali i da su potrebne dodatne multicentralne studije da se ova pretpostavka potvrdi. Neophodno je ipak naglasiti da je po prvi put u našoj studiji određena dužina telomera leukocita i aktivnost enzima telomeraze kod MINOCA bolesnika u kombinaciji sa parametrima redoks statusa u Srbiji. Nedostatak razlike u dužini telomera između kardiovaskularnih podgrupa ukazuje da je prisustvo samog patološkog procesa, odnosno KVB, glavni razlog narušavanja integriteta telomera i nezavistan je od daljih specifičnih kardiovaskularnih događaja (*Fitzpatrick et al, 2007; Willeit et al, 2010*). Kraće telomere u grupi bolesnika, pratila je povećana aktivnost enzima telomeraze, kao ključnog enzima za održavanje dužine telomera, kod sve četiri podgrupe bolesnika u odnosu na zdrave osobe. Tačan mehanizam povećanja aktivnosti telomeraze u KVB nije poznat sa sigurnošću, ali se smatra da je posredovan telomeraznom katalitičkom subjedinicom (TERT) i njenom stimulacijom preko formiranja 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiganina (8-oxoG), produkta oksidacije guanina u telomernoj DNK, s obzirom na to da je oksidativni stres neodvojiv proces u nastanku i napredovanju KVB (*Lee et al, 2017*), a čiji mehanizam će biti detaljnije objašnjen u daljem tekstu. Slično telomerama leukocita, nije uočena razlika u aktivnosti telomeraze između ove četiri grupe KVB bolesnika, što najverovatnije ukazuje da enzim ima generalno kardioprotektivno dejstvo (*Hoffmann et al, 2021*). In vitro studije pokazale su da nakon akutnog infarkta miokarda aktiviranje TERT subjedinice telomeraze u srcu vodi poboljšanju ventrikularne funkcije srca, usporenoj kardijačnoj dilataciji i sveukupnom boljem preživljavanju miševa. Dodatno, TERT aktivacija praćena je i povećanom pojavom Ki67 pozitivnih kardiomiocita, markera proliferacije koji ukazuje na povećanu regeneraciju srčanog mišića nakon akutnog infarkta miokarda (*Bär et al, 2014; Ait-Aissa et al, 2019*).

Povećanju aktivnosti enzima telomeraze u grupi bolesnika verovatno doprinosi i terapija statinima. Skorije studije dovele su u vezu statine, kao čestu terapiju kod KVB bolesnika, sa povećanom aktivnosti enzima telomeraze (*Boccardi et al, 2013; Strazhesko et al, 2016*). Značajan procenat bolesnika u našoj studiji je na terapiji statinima (Tabela 5) u grupama STE-AIM i AP bolesnika, dok ni MINOCA ni bolesnici bez stenta ih nisu dali ovaj podatak tokom uzimanja anamnestičkih podataka.

Analizirajući određene vremenske tačke STE-AIM bolesnika (akutno stanje – na samom prijemu u intenzivnu jedinicu, dva sata nakon intervencije i 6 meseci nakon akutnog ogađaja), naši rezultati pokazuju povećanje aktivnosti enzima telomeraze u akutnoj fazi, odnosno na prijemu

u intenzivnu jedinicu (Tabela 10), koja ostaje povišena i šest meseci od akutnog događaja. Povećana aktivnost telomeraze najverovatnije je posledica skraćenih telomera u akutnom stanju bolesnika, koje ostaju kraće u odnosu na zdrave osobe čak i šest meseci od akutnog događaja, što ukazuje da je potrebno više od šest meseci za potpuni oporavak od AIM, iako trenutno nema dodatnih studija koje podržavaju naše rezultate.

Važan faktor nastanka i napredovanja KVB i samog procesa ateroskleroze je oksidativni stres. U skladu sa tim, u ovoj studiji određivan je i redoks status kod KV bolesnika, kroz nove sveobuhvatne skorove (Poglavlje 3.5.). Uznapredovali oksidativni stres je uočen kod STE-AIM i MINOCA bolesnika, gledano kroz povišene vrednosti oksidativnog skora (Slika 21). Uočeno je da se nakon pCI intervencije u značajnoj meri pogoršava oksidativni stres kod STE-AIM bolesnika, najverovatnije kao posledica nastanka reperfuzione povrede (*Eltzschig et al, 2011; Fröhlich et al, 2013*). Rezultati naše studije pokazuju nagli pad antioksidativnog skora nakon pPCI intervencije kod STE-AIM bolesnika, koji oslikava sveukupnu iscrpljenu antioksidativnu odbranu organizma. Reperfuziona povreda je povreda tkiva koja nastaje nakon ponovnog uspostavljanja normalnog krvotoka u prethodno ishemičnim područjima, kao što je slučaj kod akutnog infarkta miokarda (*Fröhlich et al, 2013*). Najznačajniji mehanizam povrede tkiva je upravo nastanak oksidativnog stresa, s obzirom na to da reperfuziona povreda može da uveća oslobađanje slobodnih radikala i stoga, dodatno komplikuje redoks stanje u već oštećenom endotelijumu (*Granger et al, 2015*). Primećeno je da vrednosti prooksidativnog i oksidativnog skora kod STE-AIM bolesnika ostaju visoke i nakon 6 meseci od akutnog događaja. U svojoj longitudinalnoj studiji, Napoleão i saradnici pratili su markere inflamacije (P-selektin, solubilni CD40 ligand i TNF-alfa) 40 dana nakon akutnog infarkta miokarda i pokazali da P-selektin i solubilni CD40 ligand pokazuju prvo pad vrednosti u prvih sedam dana od AIM, a potom se vrednosti ponovno povećavaju i čak prevazilaze vrednosti akutnog stanja, dok vrednosti TNF-alfa ostaju poviše tokom celog perioda praćenja nakon AIM (*Napoleão et al, 2007*). Imajući u vidu povezanost inflamacije i oksidativnog stresa u patologiji AIM, naš nalaz povećanih pametara redoks statusa još jednom potvrđujući da je period od 6 meseci suviše kratak za za potpuni oporavak od AIM.

Povećanju aktivnosti enzima telomeraze i skraćivanju dužine telomera leukocita kod KVB najverovatnije doprinosi i prisutan oksidativni stres, što je i potvrđeno rezultatima u ovom istraživanju. Brojne su studije koje govore o ovoj vezi telomera-telomeraza sistema, oksidativnog stresa i kardiovaskularnih bolesti. Efekti oksidativnog stresa na telomerazu još uvek nisu dovoljno razjašnjeni. Dok neke studije sugerišu da ROS promovišu aktivnost telomeraze (*Fouquerel et al, 2016; Lee et al, 2017*), Aeby i saradnici predložili su svoje rezultate gde se aktivnost telomeraze smanjuje u uslovima oksidativnog stresa (*Aeby et al, 2016*). Naši rezultati potvrđuju da je aktivnost

telomeraze povećana u uslovima oksidativnog stresa, što se dešava nakon rekanalizacije okludirane arterije (Tabela 10). Sa druge strane, Coluzzi i saradnici (Coluzzi et al, 2014), radeći na primarnim fibroblastima, objasnili su da oksidativni stres oštećuje telomere najverovatnije putem stvaranja modifikovanih DNK baza (8-oxoG) i stvaranjem jednolančanih prekida u DNK lancu, koji su u stanju da pokrenu genomsku nestabilnost, dok su Tian i saradnici pokazali jaku vezu između kratkih telomera u leukocitima periferne krvi i preuranjene KAB (Tian et al, 2017). Pojava kraćih telomera kod bolesnika sa aterosklerozom može biti uzrokovano povećanom potrošnjom leukocita u procesu inflamacije kao i ubrzanim trošenjem telomera usled povećane replikacije zbog uznapredovalog stanja oksidativnog stresa (Yeh & Wang, 2016). AIM pokreće snažan imunski odgovor koji podrazumeva povećanje novoa infmalatornih medijatora (kao što su citokini) i aktivaciju signalnih puteva, najčešće DAMPs/TLR/IL-1 koji posledično vodi regrutaciji inflamatorinih ćelija. Snažna inflamacija služi kako bi se pokrenuli reparatorni mehanizmi, ali sa druge strane preterano snažni inflamatorni odgovor vodi remodelovanju leve komore i srčanoj insuficijenciji. AIM je takođe povezan sa aktivacijom koštane srži koja vodi povećanom influksu leukocita na mesto samog procesa što dodatno pojačava proces ateroskleroze i doprinosi trajanju infarkta miokarda (Fang et al, 2015; Ong et al, 2018). Sa druge strane, povećan BMI, dijabetes melitus i intolerancija na glukozu (Tabela 8), koji su često prateći komorbiditeti kod bolesnika sa KAB, mogu svakako doprineti daljem skraćivanju LTL, isto kao i konzumiranje cigareta, stres i stanje uznemirenosti, koji su često prisutni kod ovih bolesnika, ali njihov uticaj nije dalje istraživan u ovoj studiji (Gielen et al, 2018; Piplani et al, 2018; Andujar et al, 2018).

Suprotno očekivanjima, rezultati u našoj studiji pokazuju da reperfuziona povreda nije uzrokovala skraćivanje LTL. Uočeno je značajno produženje LTL nakon uspostavljanja protoka okludirane arterije (Tabela 10). Tačan uzrok i mehanizam ovog procesa nisu poznati, ali pretpostavlja se da prekomerno stvaranje prooksidanasa nakon rekanalizacije okludirane arterije pokreće kompenzatorne mehanizme za preživljavanje, koji se ovde ogledaju u produženim telomerama kako bi omogućili duži život ovim važnim igračima imunskog sistema. U svojim istraživanjima, Lanna i njegova grupa pokazali su da T-ćelije mogu da produže telomere bez aktiviranja enzima telomeraze putem telomernih vezikula koje preuzimaju od antigen prezentujućih ćelija, što je jedan od mogućih scenarija i kod ovih bolesnika (Lanna et al, 2022). Analiza telomera-telomeraza sistema pokazala je u ovoj studiji da nakon više meseci kompenzatorni mehanizmi najverovatnije slabe, te su i vrednosti telomera slične onima neposredno pre pPCI, što još jednom potvrđuje da je ovaj period od 6 meseci nedovoljan za potpuni oporavak organizma od AIM ili pak da je bolest dobila hronični tok sa ponovnim jačanjem uticaja faktora rizika.

Aterosklerotski tromb, uzet tokom same pPCI intervencije, i arterijska krv obrađivani su kao uzorci u ovoj studiji. Silvain i saradnici opisali su veoma složenu strukturu aterosklerotskog tromba (Silvain *et al*, 2011). Oni su pokazali da u strukturi aterosklerotskog tromba dominiraju fibrinska vlakna (~56%), zatim ćelija kao što su trombociti (~16%), eritrociti (~11%) i leukociti (~1,5%), i na kraju kristali holesterola (~5%) (Silvain *et al*, 2011). Analize dužine telomera i aktivnosti enzima telomeraze na tromboaspiratima u našoj studiji, gde smo izdvojili aterosklerotski tromb i nakon njegove mehaničke homogenizacije tečnim azotom koristili ga u celosti kao uzorak za analizu, pokazali su slične rezultate kao u akutnom stanju (Tabela 9), sugerišući da jednom kad nastane KAB može da vodi narušavanju strukture telomera onemogućavajući im na taj način fiziološku funkciju i modifikujući telomeraze stalnim ubrzavanjem njihove aktivnosti. Najverovatniji mehanizmi stimulacije telomeraze je putem stvaranja 8-oksoguanin formacija kao što je prethodno objašnjeno. Narducci je sa svojom istraživačkom grupom izveo sličan eksperiment i takođe pokazao visoku aktivnost telomeraze u polimorfonuklearnim neutrofilima koronarnih plakova dobijenih iz medijuma nakon ispiranja angioplastičnih balona (Narducci *et al*, 2007). Povećane vrednosti prooksidativnog skora i veoma povećane vrednosti antioksidativnog skora u našoj studiji (Tabela 14) ukazuju takođe na ozbiljno uznapredovalo stanje oksidativnog stresa, u kom se već aktivirali kompenzatorni mehanizmi poput antioksidativne zaštite, najverovatnije prouzrokuje promenu strukture telomera i aktivnosti telomeraze. Neophodno je naglasiti, prvi put u našoj studiji je ispitivana veza između telomera-telomeraza sistema i redoks statusa na celom aterosklerotskom trombu izolovanom tokom pPCI intervencije.

Najčešće korišćeni uzorak u laboratorijskoj praksi je periferna venska krv, dok je arterijska krv gotovo napuštena kao uzorak osim za analizu acido-baznog statusa i gasova u krvi (Kim *et al*, 2013; Ayaz *et al* 2021). Najveći broj studija vezanih za AIM rađen je u uzorcima periferne venske krvi (Matin *et al*, 2020; Sotoudeh Anvari *et al*, 2016, Di Filippo *et al*, 2006) ili pak na uzorcima biopsija krvnih sudova u *in vivo* i *in vitro* studijama (Shrestha *et al*, 2018; Rios-Navarro *et al*, 2021). Eksperimenti Szasz i saradnika na zdravim aortama i venama Cava pacova, pokazali su značajnu razliku u pogledu metabolizma ROS, tačnije povećano stvaranje ROS, koje prati povećana ekspresija glavnih enzima ROS metabolizma (kao što su ksantin-oksidaza, Cu,Zn-SOD i katalaza), pokazana je u uzorcima vene *cava*, dok isto nije pokazano u uzorcima aorte (Szasz *et al*, 2008). U skladu sa tim, određivali smo parametre redoks statusa i telomera-telomeraza sistema u uzorcima i arterijske krvi kod STE-AIM bolesnika u našoj studiji. Uočeni su slične vrednosti LTL i aktivnosti enzima telomeraze u akutnom stanju bolesnika (Tabela 10). Sa druge strane parametri redoks statusa oslikavaju veoma izraženo stanje oksidativnog stresa (Tabela 13), koje se ogleda kroz izuzetno povećane vrednosti prooksidativnog i oksidativnog skora, i istrošenu antioksidativnu zaštitu. Ovakvo stanje ukazuje da je oksidativni stres u arterijskoj krvi

najverovatnije prouzrokovan akutno rekanalizacijom okludirane arterije, odnosno reperfuzionom povredom (*Herrington et al, 2012*), s obzirom da su vrednosti antioksidativnog skora izuzetno niske.

Neraskidiva veza između parametara oksidativnog stresa i telomera-telomeraza sistema potvrđena je i u našem istraživanju. Primetili smo da kod zdravih osoba, snižena aktivnost telomeraze može da bude uslovljena povećanim oksidativnim stresom, s obzirom na to da je negativna korelacija uočena sa parametrima redoks statusa (Tabela 15). Snižanju aktivnosti telomeraze mogu da doprinesu prateće bolesti kao što su bolesti jetre koje se ogledaju kroz povećane aktivnosti enzima, kao što su AST, ALT i LDH. Bolesti jetre česti su kao komorbiditeti KVB (*Xanthopoulos et al, 2019*). Visoka aktivnost enzima telomeraze povezana je često sa visokom regenerativnom sposobnošću jetre (*Lin et al, 2018*). U stanjima kada je fiziološka funkcija jetre narušena, povećavaju se markeri funkcije jetre (enzimi AST, ALT i LDH) i najčešće je praćeno gubljenjem njene regenerativne sposobnosti, što se oslikava na aktivnost telomeraze (*Rudolph et al, 2000*). U svojim studijama, Rudolph i saradnici pokazali su na telomeraza-deficijentnim miševima da ponovno reaktiviranje ovog enzima dovodi do popravljavanja funkcija jetre i smanjuje napredovanje ciroze (*Rudolph et al, 2000*). Dodatno, sniženje ukupnih proteina plazme može dovesti takođe do sniženja aktivnosti telomeraze, što je i očekivano, s obzirom na to da je telomeraza, kao i svi enzimi, proteinski kompleks (*Kamal et al, 2020*). Dužina telomera može se povećati sa povećanjem vrednosti HDL-holesterola, kao što su potvrdili Rehkopf i saradnici u trogodišnjoj longitudinalnoj studiji kod osoba sa prisutnim faktorima rizika (kao što su gojaznost, insulinska rezistencija, visok krvni pritisak, visoki lipidni status), pokazujući pozitivnu korelaciju vrednosti HDL-holesterola i dužine telomera (*Rehkopf et al, 2016*). Ova pozitivna korelacija najverovatnije je uslovljena kardioprotektivnim osobinama HDL-holesterola (*Rehkopf et al, 2016*).

Redoks status parametri pokazuju pozitivnu vezu sa lipidnim parametrima, što je i očekivano, s obzirom na to da je oksidacija lipida jedan od ključnih događaja narušenog metabolizma lipida i samim tim i uzrok KVB (*Malekmohammad et al, 2021*). Oksidativni skor je u statistički značajno negativnoj vezi sa antioksidativnim skorom (Tabela 16), što još jednom potvrđuje da napredovanje oksidativnog stresa vodi iscrpljenju antioksidativne zaštite organizma (*Sharifi-Rad et al, 2020*).

U grupi KV bolesnika, veza među parametrima redoks i lipidnog statusa potvrđuje prethodne pretpostavke, povišene vrednosti triglicerida neminovno će dovesti do povećanja prooksidativnog i oksidativnog skora, a antioksidativni skor se inicijalno povećava kao kompenzatorni mehanizam. Povišenju vrednosti prooksidativnog skora dodatno će doprineti i

povišene vrednosti ukupnog holesterola (Tabela 16). Skraćivanje dužine telomera dovodi do aktiviranja enzima telomeraze, s obzirom na to da je glavni enzim koji učestvuje u održavanju njihove dužine u ćelijama. Bitna veza uočena je između aktivnosti telomeraze i broja trombocita, tačnije sa povećanjem broja trombocita, povećava se i aktivnost telomeraze. Tačna i direktna veza između ova dva parametra nije sa sigurnošću poznata. Studije su pokazale vezu trombocita i infarkta miokarda odnosno KVB. Poznato je da trombociti imaju sposobnost da otpočnu i utiču na sam tok inflamacije tako što luče selektine, jedan od najbolje poznatih je svakako P-selektin. P-selektin je potvrđen kao učesnik u stvaranju trombociti-neutrofila ćelijskih kompleksa, za koje se smatra da imaju pozitivan uticaj na ishemijsku/reperfuzionu povredu tkivu, tako što smanjuju mogućnost infiltracije neutrofila (*Hatucha et al, 2021*), a sam proces KVB i infarkt miokarda dovode do povećanja aktivnosti telomeraze kako smo već pokazali. Detaljnija uzročno-posledična veza između ova dva parametra ostaje da bude razjašnjena u daljim istraživanjima.

Kako bi bolje razumeli vezu između parametara i njihovu sposobnost da utiču jedni na druge, parametre smo grupisali u nekoliko modela u cilju pronalaska najboljeg prediktora dužine telomera leukocita.

Pokazali smo da model koji se sastoji od aktivnosti telomeraze, HDL-c i LDL-c (Tabela 14) može da bude značajan prediktor dužine telomera leukocita. Istraživanja do sada pokazala su umerenu korelaciju između dužine telomera leukocita i triglicerida (negativna) i nivoa HDL-c (pozitivna) (*Rehkopf et al, 2016*) i sa hiperholesterolemijom kod mlađih osoba (negativna) (*Banach & Penson, 2020*). Dodatno, kratke telomere leukocita su povezane i sa lipidnim statusom različitim molekularnim mehanizmima, kao što su povećana inflamacija i oksidativno oštećenje, procesi koji su već opisani kao mogući uzroci skraćivanja telomera (*Révész et al, 2014*), ali precizni mehanizmi još uvek ostaju nerazjašnjeni. U skladu sa rezultatima pomenutih studija stoji i drugi model, koji pored prethodno opisanih parametara ima i oksidativni skor (Tabela 17). Svakako, ovaj rezultat ukazuje na potencijalnu ulogu LTL kao markera za progresiju ili pak ishod KVB.

U cilju potvrde da li LTL može biti korišćen kao marker progresije i/ili ishoda KVB, bolesnici su praćeni i 4 godine nakon akutnog događaja. Naši rezultati idu u korak sa već publikovanim rezultatima studija koji pokazuju da LTL može biti povezana sa jednogodišnjim ishodom KAB (*Margaritis et al, 2017*), tačnije vrednosti LTL niže od 0,916. Margaritis istraživačka grupa je predložila kao samostalan prediktor ishoda kardiovaskularnih događaja u post-AIM stanjima nezavistan od godina bolesnika. Zaista, dva preminula bolesnika i bolesnik koji je imao reinfarkt u našoj studiji, po podacima četvorogodišnjeg praćenja imali su LTL u najnižem

tercilu vrednosti telomera, a slično je pokazano i u arterijskim uzorcima. Ipak, dalja istraživanja na većem broju ispitanika neophodna su kako bi se dublje razumela ova uzajamna povezanost.

Rana dijagnostika akutnog infarkta miokarda je od velike važnosti, kako bi se bolesnici na vreme zbrinuli i uputili na odgovarajuću terapiju. Postoji konstantna potreba za dovoljno tačnim kliničkim markerima koji će sa sigurnošću uspeti da prepoznaju i otkriju STE-AIM bolesnike, i samim tim povećati procenat uspešnosti njihovog lečenja i samim tim preživljavanja. Stoga je veoma bitan podatak, kada se ispituju novi parametri i njihova klinička tačnost, upravo njihova sposobnost da razdvoje dva različita entiteta. U ovoj studiji testirali smo nove parametre po više kriterijuma (STE-AIM bolesnici u odnosu na zdrave osobe, u odnosu na NSTEMI i u odnosu na sve ostale KVB bolesnike uključene u studiju), i zasebno ni jedan od novih parametara nije imao dovoljnu kliničku tačnost da razdvoji podgrupe bolesnika (Tabela 18). Nakon grupisanja u modele, izdvojila su se tri značajna modela (Tabela 19). Najbolju diskriminatornu sposobnost da razdvoje zdrave osobe od STE-AIM bolesnika imali su modeli koji su uključivali parametre telomera-telomeraza sistema i drugi model koji je uključivao sve parametre redoks statusa. Jedini model koji je imao dovoljno visoku značajnost, ali slabu diskriminatornu sposobnost da razdvoji STE-AIM bolesnike od svih ostalih bolesnika je model koji uključuje sve nove parametre, odnosno LTL, aktivnost telomeraze, prooksidativni, antioksidativni i oksidativni skor (Tabela 19). Neophodno je naglasiti da je ova analiza kliničke tačnosti parametara telomera-telomeraza sistema i redoks statusa kod STE-AIM bolesnika u Srbiji, urađena prvi put u našoj studiji.

Značajna uloga oksidativnog stresa u patofiziologiji AIM je pokazana u mnogim istraživanjima kao i doprinos telomera-telomeraza sistema (*Bagatini et al, 2011; Yeh & Wang, 2016*). Isto tako, uloga rutinskih biohemijskih i hematoloških parametara (kao što su lipidi, CRP, ukupan broj leukocita i drugi) u nastanku i napredovanju AIM je već dobro poznata i ovi parametri su najčešće u interpretaciji grupisani na osnovu njihovih sličnosti ili porekla. U ovoj studiji, uz pomoć PCA analize, ispitivani parametri su kombinovani samo na osnovu njihove varijabilnosti u nove parametre, takozvane faktore, iako nemaju slično poreklo (npr. lipidi parametri) ili pak ulogu u patofiziologiji AIM (npr. faktori rizika za razvoj KVB). Na ovaj način, dobijeni su sveobuhvatniji parametri koji mogu eventualno imati veću sposobnost da oslikavaju patofiziologiju AIM ili/i ishod same bolesti, što može biti od kliničke važnosti. Uticaj novonastalih parametara na ishod bolesnika sa AIM evaluiran je kroz njihov uticaj na SYNTAX skor, skor koji se formira na osnovu kliničkog stanja bolesnika i broja i procenta okluzije koronarnih arterija, a ima zadatak da ukaže na ozbiljnost stanja bolesnika koji se upućuju na pPCI intervenciju (*Sianos et al, 2005*). Predviđanje visokog SYNTAX skora je od velike važnosti, s obzirom da predstavlja objektivnu meru kompleksnosti KAB i služi kao alat za procenu stanja bolesti i razumevanje njene prognoze.

Dodatno, studije su predložile SYNTAX skor kao efikasnu refleksiju ozbiljnosti stanja aterosklerotskog plaka (*Brugaletta et al, 2012; Cavalcante et al, 2017; Yammine et al, 2017*). U ovoj studiji, kombinacija pojedinačnih parametara redoks statusa i LTL u uzorcima periferne venske krvi formirale su „Oksidativni-telomera faktor“, faktor koji podrazumeva pozitivni doprinos PAB, TAS, IMA i LTL, ukazujući da oko 12% varijanse u SYNTAX skoru potiče od ova četiri parametra (Tabela 18). Van Belle i saradnici su pokazali da nezavisno povećanje vrednosti IMA kod AIM bolesnika (*Van Belle et al, 2010*), i predložili ovaj biomarker kao mogući i nezavistan prediktor jednogodišnjeg kardiološkog ishoda kod KVB bolesnika. Nivoi IMA, mereni u prvih 24 časa od prijema u koronarnu jedinicu, pokazali su sposobnost da identifikuju bolesnika koji zahtevaju agresivniji medicinski tretman, kao što je pPCI (*Van Belle et al, 2010*). Sa druge strane, Panjwani i saradnici sugerisali su da IMA ipak ne može biti samostalno korišćen kao parametar za identifikaciju AIM budući da njegov ishod može da zavisi i od drugih faktora, kao što je nivo serumskog albumina (*Panjwani et al, 2019*). Isto tako PAB se smatra sveobuhvatnim biomarkerom koji istovremeno meri balans između plazma prooksidanasa i kapaciteta antioksidanasa, i već je savetovana njegova upotreba kao pogodnog parametra za procenu oksidativnog stresa kod STE-AIM bolesnika od strane različitih grupa, gde visoke vrednosti PAB-a kod bolesnika sa koronarno arterijskom bolesti ukazuju na povećan nivo oksidativnog stresa kod ovih bolesnika (*Kotur-Stevuljević et al, 2009; Nabatchican et al, 2014*). Snižene vrednosti TAS-a već su primećene u studijama o KAB (*Aksoy et al, 2012; Yildiz et al, 2021*), ali njihova prediktivna sposobnost još uvek nije opisana. Studije govore, takođe, o kratkim LTL kao nezavisnom faktoru rizika za predviđanje kratkoročnih MACE (eng. *Major adverse cardiovascular events*) i dugoročnog ishoda kod KAB bolesnika. Postoji obrnuto proporcionalna povezanost LTL sa koronarnom bolesti srca, koja je nezavisna od tradicionalnih kardiovaskularnih faktora rizika (*Yin et al, 2018*). Dodatno, oksidativni stres se smatra mogućim činiocem koji doprinosi skraćanju LTL kod visoko rizičnih osoba za KAB. Tačan mehanizam kojim oksidativni stres dovodi do skraćanja LTL nije sa sigurnošću poznat, ali je njegov pretpostavljeni mehanizam opisan prethodno u tekstu. Stoga, ovaj faktor dobijen u PCA analizi predstavlja jedinstvenu kombinaciju markera periferne krvi, koja je sposobna da predvidi više vrednosti SYNTAX skora i posledično ukaže na kompleksnije stanje i ozbiljniju prognozu AIM bolesnika koji idu na pPCI intervenciju, a koja u ranijim studijama nije bila opisana. U arterijskoj krvi, LTL zajedno sa pozitivnim učešćem aktivnosti enzima paraoksonaze i TOS formirala je „Arterijski oksidativni-telomera faktor“ koji ukazuje na poreklo oko 11% varijabilnosti u SYNTAX skoru. TOS je mera kompletnog prooksidativnog okruženja (suma dejstva vodonik-peroksida i lipidnih hidroperoksida) u krvi, uzimajući u obzir i njihov aditivni efekat (*Erel, 2005*). Iako je pokazano da TOS pokazuje pozitivnu i nezavisnu korelaciju za nastanak kardiovaskularnih bolesti kod

postmenopausalnih žena (Klasić *et al*, 2020), još uvek nema dovoljno studija koje potvrđuju njegov dijagnostički potencijal. Nasuprot TOS, paraoksonaza je enzim antioksidativne zaštite i njegova anti-inflamatorna, anti-apoptotska, antiagregatorna uloga kao i uloga u modifikovanju lipida su dobro poznate (Shokri *et al*, 2020). Preostali parametri (PAB, TAS, IMA) sa superoksidnim anjonom formirali su „Oksidativni faktor“ u aterijskoj krvi, koji u najvećoj meri doprinosi varijabilnosti u SYNTAX skoru sa čak 43%, što potvrđuje veliki uticaj oksidativnog stresa u kardiovaskularnim bolestima (Senoner & Dichtl, 2019), o čemu je prethodno bilo reči. Dodatno u prilog oksidativnog stresa stoji 11% varijabilnosti u SYNTAX skoru poreklom od „Oksidativni-telomeraza faktora“ koji uključuje pozitivne uticaje enzima telomeraze, TOS i superoksid-dismutaze.

Drugi izdvojeni faktor čine koncentracija hemoglobina, nivoa ukupnog holesterola i ukupnih serumskih proteina, nazvan „Holesterol-protein faktor“, i ima nešto niži udeo, odnosno pokazuje da 8,5% varijanse kod SYNTAX skora potiče od ova tri biomarkera. Niska koncentracija hemoglobina je obično povezana sa anemijom koja u stanju akutnog koronarnog sindroma može dodatno da pogorša ishemiju miokarda, s obzirom na to da postoji već nedovoljno snabdevanje miokarda kiseonikom, ali podataka koji povezuju anemiju sa kliničkim ishodom u AKS još uvek nema dovoljno. Sabatine i njegova istraživačka grupa su u svom istraživanju na velikom broju bolesnika sa AKS pronašli značajnu i nezavisnu vezu između koncentracije hemoglobina i ozbiljnijeg kardiovaskularnog ishoda (Sabatine *et al*, 2005). U njihovoj studiji, među STE-AIM bolesnicima, uočen je progresivni porast smrtnih ishoda usled kardiovaskularnih događaja kao i zatajivanje srca u slučajevima kada je nivo hemoglobina opao ispod 140 g/L, ukazujući da anemija može biti snažan i nezavistan pokazatelj glavnih ozbiljnih kardiovaskularnih događaja kod bolesnika sa AKS (Sabatine *et al*, 2005). Dodatno, Feng i saradnici vrednostima hemoglobina dodali su starosnu dob bolesnika, nivo albumina i kreatinina kod bolesnika sa AIM (Feng *et al*, 2011). Međutim, ne postoje podaci koji ukazuju na direktnu povezanost koncentracije hemoglobina i SYNTAX skora. Sa druge strane, lipoproteinske subklase su dobro poznati faktor rizika za AIM (Soedamah-Muthu *et al*, 2003). Standardni lipidni panel povezan sa KVB sastoji se od visokih vrednosti triglicerida, visokih vrednosti non-HDL-holesterola (naročito povećane vrednosti malih, gustih LDL čestica) i niskih vrednosti HDL-holesterola (Xu *et al*, 2020), a dodatno su Xu i njegova grupa pronašli vezu između nivoa Lp(a) i SYNTAX skora u grupi bolesnika sa vrednostima LDL-holesterola preko 2,59 mmol/L (Xu *et al*, 2020). Do sada nema publikovanih podataka koji bi doveli u vezu SYNTAX skor sa ukupnim proteinima seruma. Studije objavljene do sada pokazuju jedino vezu hsCRP-a, albumina i SYNTAX skora. Precizna povezanost između ovih parametara nije sa sigurnošću poznata, ali može da podrazumeva više mogućih mehanizama. Inflamacija igra bitnu ulogu u svim stadijumima ateroskleroze, što znači

da su snižen nivo albumina i visok nivo CRP-a, kao proteini akutne faze, povezani sa samom prirodom procesa. Visok nivo CRP-a može biti prateća pojava mnogih procesa, kao što su preuzimanje LDL-holesterola od strane makrofaga i njihovo pretvaranje u penaste ćelije, dok je snižen nivo albumina direktno povezan sa sniženom viskoznošću krvi, a samim tim i narušenom funkcijom endotela, povećanom aktivnosti trombocita i agregacijom (Karabaž *et al*, 2018). Svi ovi procesi doprinose progresiji aterosklerotskog procesa koji se može reflektovati kroz SYNTAX skor, budući da su Karabaž i kolege pokazali da odnos hsCRP/albumin kao indikator usko povezan sa kompleksnošću i stanjem bolesnika sa KAB, ali i kao i nezavisnim prediktorom srednje visokih vrednosti SYNTAX skor-a (Karabaž *et al*, 2018). Ipak, dalja istraživanja su neophodna kako bi se razumela ova intrigirajuća povezanost. Najviši procenat varijacije, čak 17%, objasnio je „Triglicerid-protein“ faktor koji je uključio pozitivni doprinos standardnih učesnika razvoja aterosklerotskog procesa, odnosno trigliceride, proizvode oksidacije proteina gledane kroz AOPP i antioksidativnu zaštitu organizma prikazanu kroz ukupne SH-grupe proteina.

Ipak, samo neki od novoformiranih faktora su bili dovoljno značajni da predvide visoke vrednosti SYNTAX skora i to „Oksidativni-telomera faktor“ i „Holesterol-protein faktor“ iz periferne venske krvi (Tabela 19). Ovaj rezultat svedoči o neraskidivoj vezi lipida i oksidativnog stresa u nastanku i napredovanju kardiovaskularnih bolesti, kojima se neizostavno može dodati dužina telomera leukocita kao potencijalno obećavajući parametar.

U ovoj studiji, za razliku od STE-AIM bolesnika koji su bili dobro definisani, nonSTE-AIM bolesnici su uključivali nekoliko podgrupa bolesnika primljenih u urgentnu jedinicu (Poglavlje 3.1.1). U akutnom stanju, veoma je teško izvršiti brzu diskriminaciju bolesnika sa STE-AIM od onih sa nonSTE-AIM. U kliničkoj praksi, najčeće se koriste vrednosti srčanog troponina I (cTnI) i EEG kao parametri procene. Srčani troponin I (cTnI) je specifičan biomarker za oštećenja miokardijuma i smatra se zlatnim standardom za dijagnostikovanje infarkta miokarda (Hasić *et al*, 2003). Napredak u analitičkoj osetljivosti analiza za cTnI povukao je za sobom neminovni gubitak u njegovoj specifičnosti u njegovoj najklasičnijoj primeni, odnosno dijagnostici akutnog infarkta miokarda. Bolesnici sa blago povišenim vrednostima cTnI po svemu sudeći upadaju u rizičnu zonu dijagnostičke nesigurnosti budući da razlozi za blago povišene vrednosti cTnI mogu biti veoma različiti (biološka varijacija, analitički problemi, povećana propustljivost plazma membrane kao i oštećenje kardiomiocita izazvano infarktomi koji mogu dovesti do citosolnog oslobađanja TnI (Alaour *et al*, 2018). Uzimajući sve prethodno rečeno jasno je da postoji konstantna potreba za razvijanjem novih biomarkera, sa dovoljno visokom specifičnošću i osetljivošću na akutni infarkt miokarda koji će biti u stanju da pomognu u ranoj dijagnozi ovog stanja. Novoformirani „Oksidativni-telomera“ faktor je pokazao zadovoljavajuću diskriminatornu sposobnost u

razdvajanju STE-AIM bolesnika od nonSTE-AIM koja do sada nije potvrđena u studijama. Studija Hjort i saradnika ispituje diskriminatornu sposobnost nekoliko zasebnih biohemijskih parametara (kao što je mioglobina, N-terminalni pro-BNP, serumski amiloid A1 i 2, Interleukin-6, fibroblastni faktor rasta 23, apolipoprotein C-I) da razdvoji STE-AIM bolesnike od NSTEMI bolesnika, što i uspevaju u akutnom stanju, ali se njihova diskriminatorna sposobnost gubi tokom 6 godina praćenja od akutnog događaja (*Hjort et al, 2021*). U ovoj studiji, nakon 4 godine praćenja pacijenata nije bila sakupljena krv od istih, pa stoga nije bilo moguće odrediti ispitivane parametre. Dodatne longitudinalne studije na većem broju ispitanika neophodne su da se potvrdi diskriminatorna sposobnost „Oksidativnog-telomera“ faktora iz ove studije.

6. Zaključci

U ovoj studiji analizirani su novi parametri telomera-telomeraza sistema odnosno dužina telomera leukocita i aktivnost enzima telomeraze, i redoks statusa izraženi kao sveobuhvatni skorovi (prooksidativni, antioksidativni i oksidativni) odnosno njihova potencijalna primena u rutinskoj kliničkoj laboratorijskoj praksi. Na osnovu rezultata ove doktorske disertacije doneti su sledeći zaključci:

1. Validacijom metoda za određivanje relativne dužine telomera i aktivnosti enzima telomeraze, pokazana je zadovoljavajuća reproducibilnost i ponovljivost metoda, u okviru 15% preporučenih od strane FDA za kliničke metode, i samim tim je njihova potencijalna implementacija u kliničkoj praksi moguća.
2. Ispitivanjem stabilnosti uzorka za određivanje aktivnosti enzima telomeraze pokazano je da proteinski ekstrakt treba analizirati odmah nakon završenog izolovanja ili ga pak treba skladištiti na -80°C ukoliko nije moguće nastaviti odmah određivanje aktivnosti telomeraze.
3. Određena je relativna dužina telomera i aktivnost enzima telomeraze u leukocitima periferne venske krvi kod zdravih osoba, kao i vrednosti sveobuhvatnih parametara redoks statusa (prooksidativni, antioksidativni i oksidativni skor) i izračunate su referentne vrednosti, s obzirom na to da su ovi parametri određivani po prvi put u populaciji u Srbiji u ovoj studiji.
4. Uočene su skraćene LTL kod STE-AIM, MINOCA bolesnika i bolesnika bez stenta u odnosu na kontrolnu grupu, koje su praćene povišenom aktivnosti enzima telomeraze kod ovih podgrupa kardiovaskularnih bolesnika u odnosu na zdrave osobe. AP bolesnici su pokazali duže telomere u odnosu na zdrave osobe i aktivniju telomerazu.
5. Relativna dužina telomera i aktivnost enzima telomeraze u leukocitima arterijske krvi i homogenatu tromboaspirata u STE-AIM podgrupi bolesnika prate vrednosti ova dva parametra u perifernoj venskoj krvi (kraće LTL i povišena aktivnost telomeraze).
6. Uočen je uznapredovali oksidativni stres, praćen dodatnim pogoršanjem usled reperfuzione povrede nakon rekanalizacije okludirane arterije procenjen kroz pogoršanje novih parametra redoks statusa.
7. Rezultati ovog istraživanja potvrđuju postojanje veze između faktora rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti, oksidativnog stresa kao i telomera-telomeraze sistema kod STE-AIM bolesnika, a verovatno i kod MINOCA bolesnika što je neophodno potvrditi na većem broju uzoraka.

8. Kraće LTL u perifernoj i arterijskoj krvi u negativnoj su vezi sa kliničkim pokazateljima statusa bolesnika nakon akutnog infarkta miokarda i dugoročnom prognozom bolesnika sa STE-AIM praćeno kroz SYNTAX skor.
9. Nova kombinacija parametara redoks statusa (PAB, TAS, IMA) i dužina telomera u okviru „Oksidativnog-telomera faktora“ dobijenog pomoću PCA analize učestvuje velikim procentom u predikciji povišenih vrednosti SYNTAX skora koji ukazuje na ozbiljnost stanja bolesnika koji se upućuju na pPCI intervenciju.
10. „Oksidativno telomera faktor“ je u stanju da primenom u logističkoj regresionoj analizi razdvoji KVB bolesnike od zdravih osoba, kao i STE-AIM bolesnike od svih ostalih KVB bolesnika.

Reference

- Abidov A, Chehab O. Cardiovascular risk assessment models: Have we found the perfect solution yet? *J Nucl Cardiol*. 2020 Dec;27(6):2375-2385.
- Aeby E, Ahmed W, Redon S, Simanis V, Lingner J. Peroxiredoxin 1 protects telomeres from oxidative damage and preserves telomeric DNA for extension by telomerase. *Cell Rep* 2016; 17: 3107-3114.
- Ait-Aissa K, Heisner JS, Norwood Toro LE, Bruemmer D, Doyon G, Harmann L, Geurts A, Camara AKS, Beyer AM. Telomerase Deficiency Predisposes to Heart Failure and Ischemia-Reperfusion Injury. *Front Cardiovasc Med*. 2019;6:31.
- Aksoy S, Cam N, Gurkan U, Oz D, Özden K, et al. Oxidative stress and severity of coronary artery disease in young smokers with acute myocardial infarction. *Cardiol J*. 2012; 19(4):381-386.
- Alamdari DH, Ghayour-Mobarhan M, Tavallaie S, et al. Prooxidant-antioxidant balance as a new risk factor in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Clin Biochem*. 2008;41(6):375-380.
- Alamdari DH, Paletas K, Pegiou T, Sarigianni M, Befani C, Koliakos G. A novel assay for the evaluation of the prooxidant-antioxidant balance, before and after antioxidant vitamin administration in type II diabetes patients. *Clin Biochem*. 2007;40(3-4):248-254.
- Alaour B, Liew F, Kaier TE. Cardiac Troponin - diagnostic problems and impact on cardiovascular disease. *Ann Med*. 2018; 50(8):655-665.
- Andujar P, Courbon D, Bizard E, et al. Smoking, telomere length and lung function decline: a longitudinal population-based study. *Thorax* 2018; 73: 283-285.
- Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA, editor. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton, FL: *CRC Press*;1985.p.123-132.
- Ayaz F, Furrakh M, Arif T, Ur Rahman F, Ambreen S. Correlation of Arterial and Venous pH and Bicarbonate in Patients With Renal Failure. *Cureus*. 2021; 13(11):e19519.
- Aydos SE, Tükün A. Does telomere length affect blood pressure?. *Adv Ther*. 2007;24(2):269-272.
- Bagatini MD, Martins CC, Battisti V, Gasparetto D, da Rosa CS, et al. Oxidative stress versus antioxidant defences in patients with acute myocardial infarction. *Heart Vessels*. 2011; 26(1):55-63.
- Bagyura Z, Takács A, Kiss L, et al. Level of advanced oxidation protein products is associated with subclinical atherosclerosis. *BMC Cardiovasc Disord*. 2022;22(1):5.
- Banach M, Penson PE. Cellular senescence, telomeres, and cardiovascular risk in familial hypercholesterolaemia. *Eur J Prev Cardiol* 2020; zwaa145.
- Bär C, Bernardes de Jesus B, Serrano R, Tejera A, Ayuso E, Jimenez V, Formentini I, Bobadilla M, Mizrahi J, de Martino A, Gomez G, Pisano D, Mulero F, Wollert KC, Bosch F, Blasco MA. Telomerase expression confers cardioprotection in the adult mouse heart after acute myocardial infarction. *Nat Commun*. 2014;5:5863.

- Barragán R, Ortega-Azorín C, Sorlí JV, et al. Effect of Physical Activity, Smoking, and Sleep on Telomere Length: A Systematic Review of Observational and Intervention Studies. *J Clin Med*. 2021;11(1):76.
- Bartekova M., Ferenczyova K., Jelemensky M., Dhalla N.S. Role of Oxidative Stress and Cardiovascular Risk Factors in Ischemic Heart Disease. In: Chakraborti S., Dhalla N., Ganguly N., Dikshit M. (eds) *Oxidative Stress in Heart Diseases*. Springer, Singapore. 2019.
- Battelli MG, Polito L, Bolognesi A. Xanthine oxidoreductase in atherosclerosis pathogenesis: not only oxidative stress. *Atherosclerosis*. 2014 Dec;237(2):562-567.
- Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007;87(1):245-313.
- Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol*. 2004;555(3):589-606.
- Boccardi V, Barbieri M, Rizzo MR, et al. A new pleiotropic effect of statins in elderly: modulation of telomerase activity. *FASEB J* 2013; 27: 3879-85.
- Boudoulas KD, Triposciadis F, Geleris P, Boudoulas H. Coronary atherosclerosis: pathophysiologic basis for diagnosis and management. *Prog Cardiovasc Dis* 2016; 58(6): 676-692.
- Brugaletta S, Magro M, Simsek C, Heo JH, de Boer S, et al. Plaque compositional Syntax score: combining angiography and lipid burden in coronary artery disease. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2012; 5(3 Suppl):S119-121.
- Bundhun PK, Sookharee Y, Bholee A, Huang F. Application of the SYNTAX score in interventional cardiology: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017; 96(28):e7410.
- Calado TR., Young SN. Telomere Diseases. *N Engl J Med*. 2009; 361(24): 2353-2365.
- Capodanno D, Di Salvo ME, Cincotta G, Miano M, Tamburino C, Tamburino C. Usefulness of the SYNTAX score for predicting clinical outcome after percutaneous coronary intervention of unprotected left main coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Interv*. 2009;2(4):302-308.
- Cavalcante R, Sotomi Y, Mancone M, Whan Lee C, Ahn JM, et al. Impact of the SYNTAX scores I and II in patients with diabetes and multivessel coronary disease: a pooled analysis of patient level data from the SYNTAX, PRECOMBAT, and BEST trials. *Eur Heart J*. 2017; 38(25):1969-1977.
- Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(3):e21.
- Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(10):e47.
- Chan D, Martin-Ruiz C, Saretzki G, Neely D, Qiu W, Kunadian V. The association of telomere length and telomerase activity with adverse outcomes in older patients with non-ST-elevation acute coronary syndrome. *PLoS One*. 2020;15(1):e0227616.
- Cifuentes-Rojah C., Shippen ED. Telomerase Regulation. *Mutat Res* 2012; 730(1-2): 20-27.

- Clemente DB, Maitre L, Bustamante M, et al. Obesity is associated with shorter telomeres in 8 year-old children. *Scien Rep*. 2019;9(1):18739.
- Coluzzi E, Colamartino M, Cozzi R, et al. Oxidative stress induces persistent telomeric DNA damage responsible for nuclear morphology change in mammalian cells. *PLoS One* 2014; 9: e110963.
- Correia-Melo C, Hewitt G, Passos JF. Telomeres, oxidative stress and inflammatory factors: partners in cellular senescence? *Longev Healthspan*. 2014;3(1):1.
- de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*. 2005;19(18):2100-2110.
- De Meyer T, Rietzschel E, Debuzyere M, Gillebert T, Van Oostveldt P, Bekaert S. Reference values and basic determinants of telomere length in a large middle-aged population. *Circulation*. 2006; 114(18):848-848.
- Del Buono MG, La Vecchia G, Rinaldi R, Sanna T, Crea F, Montone RA. Myocardial infarction with nonobstructive coronary arteries: the need for precision medicine. *Curr Opin Cardiol*. 2022; 37(6):481-487.
- Demanelis K, Jasmine F, Chen LS, Chernoff M, Tong L, Delgado D, Zhang C et al. Determinants of telomere length across human tissues. *Science*. 2020;369(6509):eaaz6876.
- Di Filippo C, Cuzzocrea S, Rossi F, Marfella R, D'Amico M. Oxidative stress as the leading cause of acute myocardial infarction in diabetics. *Cardiovasc Drug Rev*. 2006; 24(2):77-87.
- Diotti R, Loayza D. Shelterin complex and associated factors at human telomeres. *Nucleus*. 2011;2(2):119-135.
- Djordjević A, Kotnik P, Horvat D, Knez Ž, Antič M. Pharmacodynamics of malondialdehyde as indirect oxidative stress marker after arrested-heart cardiopulmonary bypass surgery. *Biomed Pharmacother*. 2020;132:110877.
- D'Oria R, Schipani R, Leonardini A et al. The Role of Oxidative Stress in Cardiac Disease: From Physiological Response to Injury Factor. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:5732956.
- Du Z, Qin Y. Dyslipidemia and Cardiovascular Disease: Current Knowledge, Existing Challenges, and New Opportunities for Management Strategies. *J Clin Med*. 2023; 12(1):363.
- Editors. In: Jameson J, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Loscalzo J. eds. Harrison's Principles of Internal Medicine, 20e. *McGraw Hill*. 2018.
- Ellman GL. Tissue sulphidryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70-77.
- Elmore LW, Forsythe HL, Ferreira-Gonzalez A, Garrett CT, Clark GM, Holt SE. Real-time quantitative analysis of telomerase activity in breast tumor specimens using a highly specific and sensitive fluorescent-based assay. *Diagn Mol Pathol*. 2002; 11(3): 177-185.
- Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med*. 2011;17(11):1391-1401.
- Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 2005 Dec;38(12):1103-1111.

- Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004;37(4):277-285.
- Fang L, Moore XL, Dart AM, Wang LM. Systemic inflammatory response following acute myocardial infarction. *J Geriatr Cardiol.* 2015;12(3):305-12. doi: 10.11909/j.issn.1671-5411.2015.03.020.
- FDA, Food. Guidance for industry: bioanalytical method validation. 2018 <http://www.fda.gov/cder/Guidance/4252fnl.pdf>.
- Feng QZ, Zhao YS, Li YF. Effect of haemoglobin concentration on the clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction and the factors related to haemoglobin. *BMC Res Notes.* 2011; 4:142.
- Fitzpatrick AL, Kronmal RA, Gardner JP, et al. Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the Cardiovascular Health Study. *Am J Epidemiol* 2007; 165:14–21.
- Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation.* 2006;113(13):1708-1714.
- Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation Research.* 2017;120:713-735.
- Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2017;120(4):713-735.
- Fouquerel E, Lormand J, Bose A, et al. Oxidative guanine base damage regulates human telomerase activity. *Nat Struct Mol Biol* 2016; 23: 1092-1100.
- Francula-Zaninovic S, Nola IA. Management of Measurable Variable Cardiovascular Disease' Risk Factors. *Curr Cardiol Rev.* 2018;14(3):153-163.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972; 18:499-502.
- Fröhlich GM, Meier P, White SK, Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI. *Eur Heart J.* 2013;34(23):1714-1722.
- Fuster JJ., Andreas V. Telomere Biology and Cardiovascular Disease. *Circ Res.* 2006; 99:1167-1180.
- Gao S, Xu H, Ma W, Yuan J, Yu M. Remnant Cholesterol Predicts Risk of Cardiovascular Events in Patients With Myocardial Infarction With Nonobstructive Coronary Arteries. *J Am Heart Assoc.* 2022;11(10):e024366.
- Gielen M, Hageman GJ, Antoniou EE, et al; TELOMAAS group. Body mass index is negatively associated with telomere length: a collaborative cross-sectional metaanalysis of 87 observational studies. *Am J Clin Nutr* 2018; 108: 453-475.
- Girotti MJ, Khan N, McLellan BA. Early measurements of systemic lipid peroxidation products in plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma.* 1991;31(1):32-35.

- Gojkovic T, Vladimirov S, Spasojevic-Kalimanovska V, et al. Preanalytical and analytical challenges in gas chromatographic determination of cholesterol synthesis and absorption markers. *Clin Chim Acta*. 2018;478:74–81.
- Gomez DE, Armando RG, Farina HG, Menna PL, Cerrudo CS, Ghiringhelli PD, Alonso DF. Telomere structure and telomerase in health and disease (review). *Int J Oncol*. 2012;41(5):1561-1569.
- Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: the evolution of a concept. *Redox Biol*. 2015; 6: 524-551.
- Grunnet LG, Pilgaard K, Alibegovic A, Jensen CB, Hjort L, Ozanne SE, Bennett M, Vaag A, Brøns C. Leukocyte telomere length is associated with elevated plasma glucose and HbA1c in young healthy men independent of birth weight. *Sci Rep*. 2019;9(1):7639.
- Gupta MD, Miglani M, Bansal A, Jain V, Arora S, Kumar S, Virani SS, Kalra A, Yadav R, Pasha Q, Yusuf J, Mukhopadhyay S, Tyagi S, Girish MP. Telomere length in young patients with acute myocardial infarction without conventional risk factors: A pilot study from a South Asian population. *Indian Heart J*. 2020 Nov-Dec;72(6):619-622.
- Hadi HA, Carr CS, Al Suwaidi J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag*. 2005;1(3):183-98.
- Halliwell B, Adhikary A, Dingfelder M, Dizdaroğlu M. Hydroxyl radical is a significant player in oxidative DNA damage in vivo. *Chem Soc Rev*. 2021;50(15):8355-8360.
- Hallows SE, Regnault TR, Betts DH. The long and short of it: the role of telomeres in fetal origins of adult disease. *J Pregnancy*. 2012;2012:638476.
- Hałucha K, Rak-Pasikowska A, Bil-Lula I. Protective Role of Platelets in Myocardial Infarction and Ischemia/Reperfusion Injury. *Cardiol Res Pract*. 2021;2021:5545416.
- Hasić S, Kiseljaković E, Jadrić R, Radovanović J, Winterhalter-Jadrić M. Cardiac troponin I: the gold standard in acute myocardial infarction diagnosis. *Bosn J Basic Med Sci*. 2003; 3(3):41-44.
- Hatamnejad, M.R., Heydari, A.A., Salimi, M. et al. The utility of SYNTAX score predictability by electrocardiogram parameters in patients with unstable angina. *BMC Cardiovasc Disord*. 2022; 19.
- He W, Kwesiga MP, Gebreyesus E, Liu S. Nitric Oxide and Oxidative Stress-Mediated Cardiovascular Functionality: From Molecular Mechanism to Cardiovascular Disease. In (Ed.), *Vascular Biology - Selection of Mechanisms and Clinical Applications*. IntechOpen. 2019.
- He Y, Feigon J. Telomerase structural biology comes of age. *Curr Opin Struct Biol*. 2022; 76:102446.
- Head SJ, Farooq V, Serruys PW, Kappetein AP. The SYNTAX score and its clinical implications. *Heart*. 2014; 100(2):169-177.
- Hedayati M, Razavi SA, Boroomand S, Kheradmand Kia S. The impact of pre-analytical variations on biochemical analytes stability: A systematic review. *J Clin Lab Anal*. 2020;34(12):e23551.

- Herrington WG, Nye HJ, Hammersley MS, Watkinson PJ. Are arterial and venous samples clinically equivalent for the estimation of pH, serum bicarbonate and potassium concentration in critically ill patients? *Diabet Med.* 2012; 29(1):32-35.
- Hiyama E, Hiyama K. Telomere and telomerase in stem cells. *Br J Cancer.* 2007; 96, 1020–1024.
- Hjort M, Eggers KM, Lindhagen L, et al. Differences in biomarker concentrations and predictions of long-term outcome in patients with ST-elevation and non-ST-elevation myocardial infarction. *Clin Biochem.* 2021;98:17-23.
- Hoffmann J, Richardson G, Haendeler J, Altschmied J, Andrés V, Spyridopoulos I. Telomerase as a Therapeutic Target in Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021;41(3):1047-1061.
- Honkonen M, Vääräniemi K, Saijonmaa O, et al. Leukocyte telomere length is inversely associated with arterial wave reflection in 566 normotensive and never-treated hypertensive subjects. *Aging (Albany NY).* 2020; 12:12376-12392.
- Hornsby PJ. Telomerase and the aging process. *Exp Gerontol.* 2007;42(7):575-581.
- Hou M, Xu D, Bjorkholm M, et al. Real-time quantitative Telomeric repeat amplification protocol assay for the detection of telomerase activity. *Clin Chem.* 2001;47:519–524.
- <https://www.batut.org.rs>
- [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
- Huang YQ, Liu L, Lo K, Huang JY, Zhang B, Feng YQ. The relationship between mean telomere length and blood pressure: results from the National Health and Nutrition Examination Surveys. *Ann Transl Med.* 2020;8(8):535.
- Huzen J, de Boer RA, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, van der Harst P. The emerging role of telomere biology in cardiovascular disease. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2010;15(1):35-45.
- Ibanez B, James S, Agewall S, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2018;39(2):119-177.
- Ilić I, Stanković I, Vidaković R, et al. Influence of manual thrombus aspiration on left ventricular diastolic function in patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Srp Arh Celok Lek* 2016; 144(1-2): 23-30.
- Inandiklioglu N, Demir V, Celik Y, Demirtas M. Leukocyte telomere length and lipid parameters in patients with myocardial infarction with non-obstructive coronary arteries. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2022;67(6):346-352.
- Jodczyk S, Pearson JF, Aitchison A, Miller AL, Hampton MB, Kennedy MA. Telomere length measurement on the Roche LightCycler 480 Platform. *Genet Test Mol Biomarkers* 2015; 19(2): 63-68.

- Kachhawa K, Kachhawa P, Varma M, Behera R, Agrawal D, Kumar S. Study of the Stability of Various Biochemical Analytes in Samples Stored at Different Predefined Storage Conditions at an Accredited Laboratory of India. *J Lab Physicians*. 2017;9(1):11-15.
- Kahl VFS, Allen JAM, Nelson CB, et al. Telomere Length Measurement by Molecular Combing. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:493.
- Kallmeyer A, Pello Lázaro AM, Blanco-Colio LM, et al. Absence of High Lipoprotein(a) Levels Is an Independent Predictor of Acute Myocardial Infarction without Coronary Lesions. *J Clin Med*. 2023;12(3):960.
- Kam MLW, Nguyen TTT, Ngeow JYY. Telomere biology disorders. *NPJ Genom Med*. 2021; 6(1):36.
- Kamal S, Junaid M, Ejaz A, Bibi I, Akash MSH, Rehman K. The secrets of telomerase: Retrospective analysis and future prospects. *Life Sci*. 2020;57:118115.
- Karabağ Y, Çağdaş M, Rencuzogullari I, Karakoyun S, Artaç İ, et al. Relationship between C-reactive protein/albumin ratio and coronary artery disease severity in patients with stable angina pectoris. *J Clin Lab Anal*. 2018; 32(7):e22457.
- Khalangot MD, Krasnienkov DS, Chizhova VP, Korkushko OV, Shatilo VB, Kukharsky VM, Kravchenko VI, Kovtun VA, Guryanov VG, Vaiserman AM. Additional Impact of Glucose Tolerance on Telomere Length in Persons With and Without Metabolic Syndrome in the Elderly Ukraine Population. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:128.
- Khan S, Chaturgoon AA., Naidoo PD. Telomeres and atherosclerosis. *Cardiovasc J Afr*. 2012; 23:563-571.
- Kim BR, Park SJ, Shin HS, Jung YS, Rim H. Correlation between peripheral venous and arterial blood gas measurements in patients admitted to the intensive care unit: A single-center study. *Kidney Res Clin Pract*. 2013; 32(1):32-38.
- Kim N, Piatyszek M, Prowse K, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994;266:2011–2015.
- Kirchner H, Shaheen F, Kalscheuer H, Schmid SM, Oster H, Lehnert H. The Telomeric Complex and Metabolic Disease. *Genes (Basel)*. 2017;8(7):176.
- Klasic A, Kavarić N, Vujčić S, Spasojević-Kalimanovska V, Kotur-Stevuljević J, Ninić A. Total oxidant status and oxidative stress index as indicators of increased Reynolds Risk Score in postmenopausal women. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(19):10126-10133.
- Kotur-Stevuljević J, Memon L, Stefanović A, et al. Correlations of oxidative stress parameters and inflammatory markers in coronary artery disease patients. *Clin Biochem*. 2007; 40(3-4):181-187.
- Kotur-Stevuljević J, Vemić S, Spasojević-Kalimanovska V, Spasić S, Jelić-Ivanović Z. Association of prooxidative-antioxidative balance (PAB) with inflammation markers in coronary artery disease patients. *Free Radical Research*. 2009; 43:96-97.
- Kozlitina J, Garcia CK. Red blood cell size is inversely associated with leukocyte telomere length in a large multi-ethnic population. *PLoS One*. 2012;7(12):e51046.

- Kunadian V, Veerasamy M, Sinclair H, et al. Association of Telomere Length and Telomerase Activity with Clinical Parameters in Older Patients Undergoing Invasive Management Of non-ST Elevation Acute Coronary Syndrome. *Heart* 2015;101:A2-A3.
- Lam NY, Rainer TH, Chiu RW, Lo YM. EDTA is a better anticoagulant than heparin or citrate for delayed blood processing for plasma DNA analysis. *Clin Chem*. 2004;50(1):256-257.
- Lanna A, Vaz B, D'Ambra C, et al. An intercellular transfer of telomeres rescues T cells from senescence and promotes long-term immunological memory. *Nat Cell Biol*. 2022;24(10):1461-1474.
- Lansdorp PM. Sex differences in telomere length, lifespan, and embryonic dyskerin levels. *Aging Cell*. 2022;21(5):e13614.
- Lee HT, Bose A, Lee CY, Opresko PL, Myong S. Molecular mechanisms by which oxidative DNA damage promotes telomerase activity. *Nucleic Acids Res*. 2017; 45:11752-11765.
- Lee HT, Bose A, Lee CY, Opresko PL, Myong S. Molecular mechanisms by which oxidative DNA damage promotes telomerase activity. *Nucleic Acids Res* 2017; 45:11752-11765.
- Lesmana A, Tian P, Karlaftis V, Hearps S, Monagle P, Ignjatovic V, Elwood N, The Harmonising Age Pathology Parameters in Kids Study Team. Continuous reference intervals for leukocyte telomere length in children: the method matters. *Clin Chem and Lab Med (CCLM)*. 2021;59(7): 1279-1288. doi.org/10.1515/cclm-2021-0059
- Lim CJ, Cech TR. Shaping human telomeres: from shelterin and CST complexes to telomeric chromatin organization. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021;22(4):283-298.
- Lin S, Nascimento EM, Gajera CR, et al. Distributed hepatocytes expressing telomerase repopulate the liver in homeostasis and injury. *Nature*. 2018;556(7700):244-248.
- Lipinski B. Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2011;2011:809696.
- Ly H. Telomere dynamics in induced pluripotent stem cells: Potentials for human disease modeling. *World J Stem Cells* 2011; 3(10): 89-95
- Makki N, Brennan TM, Girotra S. Acute coronary syndrome. *J Intensive Care Med*. 2015; 30(4): 86-200.
- Malekmohammad K, Bezsonov EE, Rafieian-Kopaei M. Role of Lipid Accumulation and Inflammation in Atherosclerosis: Focus on Molecular and Cellular Mechanisms. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:707529.
- Malekmohammad K, Sewell RDE, Rafieian-Kopaei M. Antioxidants and Atherosclerosis: Mechanistic Aspects. *Biomolecules*. 2019;9(8):301.
- Maqsood MI, Matin MM, Bahrami AR, Ghasroldasht MM. Immortality of cell lines: challenges and advantages of establishment. *Cell Biol Int*. 2013; 37(10):1038-1045.
- Margaritis M, Sanna F, Lazaros G, Akoumianakis I, Patel S, Antonopoulos AS et al. Predictive value of telomere length on outcome following acute myocardial infarction: evidence for contrasting effects of vascular vs. blood oxidative stress. *Eur Heart J*. 2017;38(41):3094-3104.

- Martínez P, Blasco MA. Role of shelterin in cancer and aging. *Aging Cell*. 2010;9(5):653-666.
- Matin E, Ghaffari S, Garjani A, Roshanravan N, Matin S, Mesri Alamdari N, Safaie N. Oxidative stress and its association with ST resolution and clinical outcome measures in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI) undergoing primary percutaneous coronary intervention. *BMC Res Notes*. 2020; 13(1):525.
- Mazidi M, Penson P, Banach M. Association between telomere length and complete blood count in US adults. *Arch Med Sci*. 2017;13(3):601-605.
- Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Ishida Y, Yoshida H, Komuro I. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation*. 2002;105(13):1541-1544.
- Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972;247:3170-3175.
- Moslehi J. Telomere and Mitochondria in Aging Heart. *Circ Res*. 2012; 110(9):1226-1237.
- Nabatchican F, Einollahi N, Kazemi Khaledi A. Relationship between prooxidant-antioxidant balance and severity of coronary artery disease in patients of Imam Khomeini Hospital of Tehran, Iran. *Acta Med Iran*. 2014; 52(2):116-121.
- Napoleão P, Santos MC, Selas M, Viegas-Crespo AM, Pinheiro T, Ferreira RC. Variations in inflammatory markers in acute myocardial infarction: a longitudinal study. *Rev Port Cardiol*. 2007;26(12):1357-1363.
- Narducci ML, Grasselli A, Biasucci LM, et al. High telomerase activity in neutrophils from unstable coronary plaques. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 2369-2374.
- Nelson JR, Wani O, May HT, Budoff M. Potential benefits of eicosapentaenoic acid on atherosclerotic plaques. *Vascul Pharmacol*. 2017;91:1-9.
- Neumann FJ, Sousa-Uva M, Ahlsson A, et al. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization the task force on myocardial revascularization of the European society of cardiology (ESC) and European association for cardio-thoracic surgery (EACTS). *Eur Heart J* 2019; 40(2): 87-165.
- Niccoli G, Scalone G, Crea F. Acute myocardial infarction with no obstructive coronary atherosclerosis: mechanisms and management. *European Heart Journal*. 2015;36(8):475–481.
- Oeseburg H, de Boer RA, van Gilst WH, van der Harst P. Telomere biology in healthy aging and disease. *Pflugers Arch*. 2010;459(2):259-268.
- Ogami M, Ikura Y, Ohsawa M, Matsuo T, et al. Telomere shortening in human coronary artery diseases. *Arterioscler ThrombVasc Biol*. 2004 Mar 1;24(3):546-550.
- Olsson M, Geraghty NJ, Wapstra E, Wilson M. Telomere length varies substantially between blood cell types in a reptile. *R Soc Open Sci*. 2020;7(6):192136. doi: 10.1098/rsos.192136.
- Ong SB, Hernández-Reséndiz S, Crespo-Avilan GE, Mukhametshina RT, Kwek XY, Cabrera-Fuentes HA, Hausenloy DJ. Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple

- players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacol Ther.* 2018;186:73-87.
- Osterhage LJ., Friedman LK. Chromosome End Maintenance. *J. Biol. Chem.* 2009; 284:16061-16065.
- Panjwani JP, Naqvi F, Ruqaya, Siddiqui IA, Farhan, et al. Role of ischemia modified albumin and total oxidative stress as a biomarker in the diagnosis of myocardial infarction in Pakistani population. *Int J Biol Biotech.* 2019; 16(3):667-667.
- Pickett, H. A., Henson, J. D., Au, A. Y., Neumann, A. A., and Reddel, R. R. Normal mammalian cells negatively regulate telomere length by telomere trimming. *Hum. Mol. Genet.* 2011;20, 4684–4692. doi: 10.1093/hmg/ddr402
- Piplani S, Alemao NN, Prabhu M, Ambar S, Chugh Y, Chugh SK. Correlation of the telomere length with type 2 diabetes mellitus in patients with ischemic heart disease. *Indian Heart J* 2018; Suppl 3: S173-176.
- 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.
- Rao SS, Disraeli P, McGregor T. Impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Am Fam Physician.* 2004;69(8):1961-8.
- Rehkopf DH, Needham BL, Lin J, et al. Leukocyte Telomere Length in Relation to 17 Biomarkers of Cardiovascular Disease Risk: A Cross-Sectional Study of US Adults. *PLoS Med* 2016; 13:e1002188.
- Révész D, Milaneschi Y, Verhoeven JE, Penninx BW. Telomere length as a marker of cellular aging is associated with prevalence and progression of metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: 4607-4615.
- Richter RJ, Furlong CE. Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics* 1999;9:745 – 753.
- Rios-Navarro C, Daghbouche-Rubio N, Gavara J, de Dios E, Perez N, et al. Ischemia-reperfusion injury to coronary arteries: Comprehensive microscopic study after reperfused myocardial infarction. *Ann Anat.* 2021; 238:151785.
- Rudolph KL, Chang S, Millard M, Schreiber-Agus N, DePinho RA. Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. *Science.* 2000;287:1253–1258.
- Sabatine MS, Morrow DA, Giugliano RP, Burton PB, Murphy SA, McCabe CH, Gibson CM, Braunwald E. Association of hemoglobin levels with clinical outcomes in acute coronary syndromes. *Circulation.* 2005; 111(16):2042-2049.
- Saeed H., Iqtedar M. Stem cell function and maintenance – ends that matter: Role of telomeres and telomerase. *J. Biosci.* 2013; 38(3):641-649.
- SCORE2 working group and ESC Cardiovascular risk collaboration. SCORE2 risk prediction algorithms: new models to estimate 10-year risk of cardiovascular disease in Europe. *Eur Heart J.* 2021;42(25):2439-2454.

- Senoner T, Dichtl W. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? *Nutrients*. 2019;11(9):2090.
- Shaito A, Aramouni K, Assaf R, Parenti A, Orekhov A, Yazbi AE, Pintus G, Eid AH. Oxidative Stress-Induced Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2022;27(3):105.
- Sharifi-Rad M, Anil Kumar NV, Zucca P et al. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Front Physiol*. 2020;11:694.
- Shay WJ., Wright EW. Role of telomeres and telomerase in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2011; 21(6): 349-353.
- Shokri Y, Variji A, Nosrati M, et al. Importance of paraoxonase 1 (PON1) as an antioxidant and antiatherogenic enzyme in the cardiovascular complications of type 2 diabetes: Genotypic and phenotypic evaluation. *Diabetes Res Clin Pract*. 2020;161:108067.
- Shrestha B, Prasai PK, Kaskas AM, Khanna A, Letchuman V, et al. Differential arterial and venous endothelial redox responses to oxidative stress. *Microcirculation*. 2018; 25(7):e12486.
- Sianos G, Morel MA, Kappetein AP, et al. The SYNTAX Score: an angiographic tool grading the complexity of coronary artery disease. *EuroIntervention*. 2005;1(2):219-227.
- Sies H. Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology. *Oxidative Stress*. 2019;153–163.
- Silvain J, Collet JP, Nagaswami C, et al. Composition of coronary thrombus in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2011; 57: 1359-1367.
- Sinha MK, Gaze DC, Tippins JR, Collinson PO, Kaski JC. Ischemia modified albumin is a sensitive marker of myocardial ischemia after percutaneous coronary intervention. *Circulation*. 2003;107(19):2403-2405.
- Smith EM, Pendlebury DF, Nandakumar J. Structural biology of telomeres and telomerase. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(1):61-79.
- Snezhkina AV, Kudryavtseva AV, Kardymon OL, Savvateeva MV, Melnikova NV, Krasnov GS, Dmitriev AA. ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:6175804.
- Soedamah-Muthu SS, Chang YF, Otvos J, Evans RW, Orchard TJ. Lipoprotein subclass measurements by nuclear magnetic resonance spectroscopy improve the prediction of coronary artery disease in Type 1 diabetes. A prospective report from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetologia*. 2003; 46(5):674-82.
- Soehnlein O, Libby P. Targeting inflammation in atherosclerosis - from experimental insights to the clinic. *Nat Rev Drug Discov*. 2021; 20(8):589-610.
- Sotoudeh Anvari M, Mortazavian Babaki M, Boroumand MA, Eslami B, Jalali A, Goodarzynejad H. Relationship between calculated total antioxidant status and atherosclerotic coronary artery disease. *Anatol J Cardiol*. 2016; 16 (9):689-695.
- Stewart JA, Chaiken MF, Wang F, Price CM. Maintaining the end: roles of telomere proteins in end-protection, telomere replication and length regulation. *Mutat Res*. 2012;730(1-2):12-19.

- Strazhesko ID, Tkacheva ON, Akasheva DU, et al. Atorvastatin Therapy Modulates Telomerase Activity in Patients Free of Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. *Front Pharmacol.* 2016;7:347.
- Sun Y, Zhao JQ, Jiao YR, et al. Predictive value of leukocyte telomere length for the severity of coronary artery disease. *Per Med.* 2020;17(3):175-183.
- Szasz T, Thompson JM, Watts SW. A comparison of reactive oxygen species metabolism in the rat aorta and vena cava: focus on xanthine oxidase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 295(3):H1341-H1350.
- Tan BL, Norhaizan ME, Liew WP, Sulaiman Rahman H. Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. *Front Pharmacol.* 2018;9:1162.
- Tian R, Zhang LN, Zhang TT, et al. Association Between Oxidative Stress and Peripheral Leukocyte Telomere Length in Patients with Premature Coronary Artery Disease. *Med Sci Monit* 2017; 23: 4382-4390.
- Tsui NB, Ng EK, Lo YM. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem.* 2002;48:1647–1653.
- Uryga A, Gray K, Bennett M. DNA damage and repair in vascular disease. *Annu Rev Physiol* 2016; 78: 45-66.
- Vaiserman A, Krasnienkov D. Telomere length as a marker of biological age: state-of-the-art, open issues, and future perspectives. *Frontiers in genetics.* 2021;11:630186.
- Van Belle E, Dallongeville J, Vicaut E, Degrandart A, Baulac C, et al. Ischemia-modified albumin levels predict long-term outcome in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J.* 2010; 159(4):570-576.
- Veglia F, Werba JP, Tremoli E, et al. Assessment of oxidative stress in coronary artery bypass surgery: comparison between the global index OXY-SCORE and individual biomarkers. *Biomarkers.* 2009; 14(7): 465-472
- Vidal-Perez R, Abou Jokh Casas C, Agra-Bermejo RM, et al. Myocardial infarction with non-obstructive coronary arteries: A comprehensive review and future research directions. *World J Cardiol* 2019; 11(12): 305-315.
- Visseren FLJ, Mach F, Smulders YM, et al. 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J.* 2021;42(34):3227-3337.
- Wahab M. Ischemia modified albumin (IMA) in acute coronary syndrome (ACS) and left bundle branch block (LBBB). Does it make the difference? *Egypt Heart J.* 2017;69(3):183-190.
- Wai KL. Telomeres, Telomerase, and Tumorigenesis – A Review. *MedGenMed.* 2004; 6(3): 19.
- Wang H, Ma T, Zhang X et al. CTC1 OB-B interaction with TPP1 terminates telomerase and prevents telomere overextension. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(10):4914-4928.
- Wege H, Chui MS, Le HT, et al. SYBR Green real-time Telomeric repeat amplification protocol for the rapid quantification of telomerase activity. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:e3.

- Willeit P, Willeit J, Brandstatter A, Ehrlenbach S, et al. Cellular aging reflected by leukocyte telomere length predicts advanced atherosclerosis and cardiovascular disease risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30: 1649–1656.
- Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996;49:1304-1313.
- Wyatt MDH, West CS, Beattie LT. InTERTpreting telomerase structure and function. *Nuc Acid Res.* 2010;38(17): 5609-5622.
- Xanthopoulos A, Starling RC, Kitai T, Triposkiadis F. Heart Failure and Liver Disease: Cardiohepatic Interactions. *JACC Heart Fail.* 2019;7(2):87-97.
- Xu W, Guan H, Gao D, Wang Z, Ba Y, et al. The Association of Syntax Score with Levels of Lipoprotein(a) and Inflammatory Biomarkers in Patients with Stable Coronary Artery Disease and Different Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2020; 13:4297-4310.
- Yamine M, Itagaki S, Pawale A, Toyoda N, Reddy RC. SYNTAX score may predict the severity of atherosclerosis of the ascending aorta. *J Thorac Dis.* 2017; 9(10):3859-3865.
- Yang YM, Huang A, Kaley G, Sun D. eNOS uncoupling and endothelial dysfunction in aged vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297(5):H1829-1836.
- Yeh JK, Wang CY. Telomeres and telomerase in cardiovascular diseases. *Genes (Basel).* 2016; 7(9): 58.
- Yildiz D, Ekin S, Sahinalp S. Evaluations of Antioxidant Enzyme Activities, Total Sialic Acid and Trace Element Levels in Coronary Artery Bypass Grafting Patients. *Braz J Cardiovasc Surg.* 2021; 36(6):769-779.
- Yin H, Akawi O, Fox SA, Li F, O'Neil C, Balint B, Arpino JM, Watson A, Wong J, Guo L, Quantz MA. Cardiac-referenced leukocyte telomere length and outcomes after cardiovascular surgery. *JACC: Basic to Translational Science.* 2018;3(5):591-600.
- Zhang S, Li R, Yang Y, et al. Longitudinal Association of Telomere Attrition with the Effects of Antihypertensive Treatment and Blood Pressure Lowering. *Aging Dis.* 2020;11(3):494-508.
- Zvereva MI, Shcherbakova DM, Dontsova OA. Telomerase: Structure, Function, and Activity Regulation. *Biochemistry (Moscow)* 2010; 75(13):1569-1583.

Prilog 1.***Priprema hladnog CHAPS Lizirajućeg pufera***

CHAPS hladni lizirajući pufer sadrži:

- 10mM TRIS-HCl (pH=7,5)
- 1mM MgCl₂
- 1mM EGTA
- 0,1mM AEBSF
- 5mM β-merkaptetanola
- 0,05% CHAPS
- 10% glicerol

Rastvor se priprema neposredno pred samo izolovanje telomeraze, a β-merkaptetanol je preporučljivo dodati pred samo rastvaranje izolovanih ćelija/leukocita. CHAPS hladni lizirajući pufer (2ml; 20analiza) je najbolje pripremiti pipetiranjem razblaživanjem radnih/postojećih rastvora i to prema sledećoj šemi:

Rastvor/supstanca	Koncentracija rastvora/supstance	Zapremina (μL)
<i>H₂O (duplo destilovana)</i>	/	836,7
<i>TRIS base</i>	50mM	400
<i>HCl</i>	37%	1
<i>MgCl₂</i>	50mM	40
<i>EGTA</i>	10mM	200
<i>AEBSF</i>	1mM	200
<i>Glicerol</i>	Gustine 1,26g/mol	159
<i>CHAPS</i>	100mM	162,6
<i>β-merkaptetanol</i>	14,3M	0,7

Prilog 2.**Aktivnost telomeraze – Real-Time PCR**

Aktivnost telomeraze može se odrediti pomoću RTq-PCR metode, koja ima tri koraka kao i tradicionalni TRAP metoda, s tom razlikom da izostaje elektroforetsko razdvajanje proizvoda PCR reakcije, već se oni kvantifikuju tokom samog PCR-a. Kao standardi koriste se razblaženja proteinskog sktrakta ćelijskih linija.

RTq-PCR reakcija se priprema po sledećoj šemi:

Reakciona smeša	Koncentracija (završna)	Zapremina (µL)
<i>H₂O (PCR clean)</i>	/	4
<i>HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) (5x)</i>	1x	2
<i>TS prajmer (18,1mM)</i>	0,1µg	0,5
<i>ACX prajmer (11,1mM)</i>	0,1µg	0,5
<i>Uzorak (proteinski ekstrakt)/Standard</i>	/	3
<i>Ukupno:</i>		10

PCR ploču cnetrifugirati na 1900 obrtaja 2 minuta. Real-time PCR aparat podesiti prema sledećem protokolu:

Temperatura (°C)	Vreme	Broj ciklusa
25	30 minuta	1
95	12 minuta	1
95	15 sekundi	50 (ciklusi umnožavanja)
60	15 sekundi	
72	30 sekundi*	
95	10 sekundi	1 (kriva disocijacije)
60	60 sekundi	
95	15 sekundi	
60	15 sekundi	

Prilog 3.***Dužina telomera leukocita– Real-Time PCR***

Dužina telomera se može odrediti upotrebom RTq-PCR metode, a uz korišćenje komercijalnih standarda za telomere moguće ih je i apsolutno kvantifikovati. Dužina telomera leukocita se radi u odnosu na jedan referentni gen (albumin).

RTq-PCR reakcione smeše za LTL i referentnog gena albumina se pripremaju prema identičnoj šemi koja sledi, ali se izvode u dve odvojene reakcione RTq-PCR ploče:

Reakciona smeša	Koncentracija (finalna)	Zapremina (µL)
<i>H₂O (PCR clean)</i>	/	2
<i>HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) (5x)</i>	1x	2
<i>Forward prajmer telomera/ Forward prajmer albumina</i>	500nM	2
<i>Reverse prajmer telomera/ Reverse prajmer albumina</i>	500nM	2
<i>Uzorak genomske DNK /standard</i>	/	2
<i>Ukupno:</i>		10

PCR ploče centrifugirati na 1900 obrtaja 2 minuta. Real-time PCR aparat namestiti podesiti prema sledećem protokolu za određivanje LTL:

Temperatura (°C)	Vreme	Broj ciklusa
95	12 minuta	1
95	15 sekundi	4
62	10 sekundi	
87	15 sekundi	
95	15 sekundi	40 (ciklusa umnožavanja)
62	10 sekundi	
72	15 sekundi	
95	1 sekund	1 (kriva disocijacije)
50	1 sekund	
95	kontinuirano	

Real-time PCR aparat namestiti podesiti prema sledećem protokolu za određivanje LTL:

Temperatura (°C)	Vreme	Broj ciklusa
95	12 minuta	1
95	15 sekundi	40 (ciklusa umnožavanja)
62	10 sekundi	
87	15 sekundi	
95	1 sekund	1 (kriva disocijacije)
50	1 sekund	
95	kontinuirano	

Biografija

Dr Aleksandra Vukašinić je rođena 14. avgusta 1988.godine u Novom Sadu (Republika Srbija). Farmaceutski fakultet upisala je školske 2007/2008 godine, smer magistar farmacije – medicinski biohemičar i na istom diplomirala 13. decembra 2012. godine, prosečnom ocenom 8,82 i ocenom 10 na diplomskom ispitu.

Tokom studija bavila se studentskim naučno istraživačkim radom; tokom školske 2008/2009 godine na Katedri za fizičku hemiju, a potom od 2009. do 2012. godine na Katedri za medicinsku biohemiju. Učestovala je na Naučnim skupovima studenata biomedicinskih nauka u zemlji i inostranstvu, na Petom Kongresu Farmaceuta Srbije, kao i na 78. Kongresu Evropskog udruženja o aterosklerozi (Hamburg, Nemačka, 2010.). Boravila je na Farmaceutskim fakultetima u Češkoj (mart 2011.) i Hrvatskoj (novembar 2012.) u okviru TWIN programa studentskih razmena. Dobitnik je stipendije Erasmus Mundus JoinEU-See, za šestomesečni boravak na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Bolonji, Italija (avgust 2011. – mart 2012.). Nakon završenog fakulteta, jednogodišnji pripravnički staž, obavila je u Centralnoj laboratoriji Kliničko-bolničkog centra „Bežanijska Kosa“ u periodu od januara 2013. godine do januara 2014. godine, a stručni ispit položila februara 2014. godine.

Doktorske akademske studije, modul Medicinska Biohemija, upisala je školske 2013/2014 godine na Farmaceutskom fakultetu, Univerzitet u Beogradu pod mentorstvom profesorke Jelene Kotur – Stevuljević i komentorstvom doc dr Marije Zdravković. Istraživanja za svoju doktorsku disertaciju sprovedla je u saradnji sa Farmaceutskim fakultetom Univerziteta u Ljubljani, Slovenija, i saradnjom sa profesorkom Janjom Marc i profesorkom Barbarom Ostanek. U toku izrade svoje doktorske disertacije više puta je boravila u laboratoriji Kliničke biohemije Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Ljubljani. Od oktobra 2015. godine do novembra 2017. godine, bila je zaposlena na Katedri za Medicinsku biohemiju u zvanju Saradnika u nastavi.

Od februara 2018. godine do aprila 2021. godine radila je na Institutu za Eksperimentalnu Medicinu, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Peruđi, Italija, odsek za Humanu anatomiju i neuroanatomiju pod rukovodstvom profesora Guglielmo Sorci, u zvanju istraživač/doktorant. Aprila 2021. godine, odbranila je doktorsku disertaciju na Univerzitetu u Peruđi, pod mentorstvom profesora Guglielmo Sorci, na temu „RAGE kao potencijalni biomarker i target za prevenciju gubljenja mišićne mase i produžetka života kod kancer kaheksije“. U julu 2021. godine, dobija post-doktorsko usavršavanje u neuroimunološkoj laboratoriji Fondacije Santa Lucia, u Rimu, Italija, a potom i u *start-up research and development* laboratoriji *Senticell* kompanije, gde pod rukovodstvom profesora Alessio Lanna, radi do oktobra 2022. godine. Od oktobra 2022. godine, prelazi u farmaceutsku

kompaniju Maven Pharma, iz Rima/Napulja. Danas, Aleksandra radi kao istraživač na institutu za Biomedicinu, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Peruđi, Italija, kao istraživač na zajedničkom projektu profesora Guglielmo Sorci, profesorke Elisabetta Albi i profesora Marca Dionigi, i kao konsultant u farmaceutskoj kompaniji Maven Pharma.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Александра Вукашиновић

Број индекса 13/13

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом: „Испитивање повезаности редокс статуса и теломера – теломераза система код болесника са акутним инфарктом миокарда“

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

Потпис аутора

У Београду, 6.јул 2023.

Aleksandrić Aleksandra

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

Име и презиме аутора Александра Вукашиновић

Број индекса 13/13

Студијски програм Докторске академске студије – модул Медицинска биохемија

Наслов рада “Испитивање повезаности редокс статуса и теломера – теломераза система код болесника са акутним инфарктом миокарда“

Ментор др Јелена Котур - Стевуљевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис аутора

У Београду, 6. јул 2023.

Aleksandrovic' Aleksandra

Изјава о коришћењу

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

„Испитивање повезаности редокс статуса и теломера – теломераза система код болесника са акутним инфарктом миокарда“

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 6. јул 2023.

Marković Aleksandra

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